Akceptuję
W ramach naszej witryny stosujemy pliki cookies w celu świadczenia państwu usług na najwyższym poziomie, w tym w sposób dostosowany do indywidualnych potrzeb. Korzystanie z witryny bez zmiany ustawień dotyczących cookies oznacza, że będą one zamieszczone w Państwa urządzeniu końcowym. Możecie Państwo dokonać w każdym czasie zmiany ustawień dotyczących cookies. Więcej szczegółów w naszej Polityce Prywatności

Metody wykorzystywane do oznaczania żelaza w różnych próbkach biologicznych

Żelazo jest jednym z podstawowych składników niezbędnych do regulowania procesów biochemicznych w organizmach ludzi, zwierząt i roślin. Wchodzi w skład wielu hemoprotein, takich jak hemoglobina, mioglobina i cytochromy. Żelazo dostarczane jest w diecie, a jego wchłanianie jako żelaza dwu-wartościowego jest ściśle kontrolowane na poziomie błony śluzowej jelita [5].

Żelazo występuje w kilku postaciach, jako:

a) Żelazo hemoglobiny (stanowiąc ok. 60%-70% całej zawartości w organizmie),

b) Żelazo zapasowe, które zmagazynowane jest w postaci ferrytyny lub hemosyderyny w różnych narządach (20%-25%),

c) Żelazo mioglobiny (4%),

d) Żelazo innych chromoprotein jak: cytochromy, peroksydaza, katalaza (0,2%),

e) Żelazo osocza w formie transportowej (0,1% całości) [1].

Zawartość żelaza w surowicy szacowana jest na 80-130 µg/100 ml, a w pełnej krwi na ok. 50 mg/100 ml. W niedokrwistości, w chorobie trzewnej, po krwotokach, w zaburzeniach wchłaniania, chorobach infekcyjnych i nowotworach obserwuje się zmniejszone stężenie żelaza. Z kolei podwyższone stężenie żelaza obserwowane jest przy zapaleniu wątroby, a czasami także w anemii złośliwej i hemolitycznej. Małe ilości żelaza wydalane są z moczem oraz wskutek złuszczenia komórek nabłonkowych (ok. 1-1,5 mg na dobę). Na wchłanianie żela mają wpływ różne czynniki m.in. kwasowość soku żołądkowego oraz stan zapasów żelaza w ustroju. Przy niedoborze żelaza wchłaniane są o wiele większe jego ilości niż normalnie [5].

Żelazo jest również pospolicie występującym składnikiem skorupy ziemskiej (stanowi ok. 5,08%). Pierwiastek ten spotykany jest w postaci minerałów tlenkowych, siarczkowych, a także jako izomorficzna domieszka krzemianów. Związek ten wykorzystywany jest w przemyśle, gdzie jego najcenniejszymi rudami są magnetyt ($Fe_3\ O_3$), hematyt (Fe_2O_3), limonit ($2Fe_2O_3 \cdot 3H_2O$), syderyt ($FeCO_3$) i piryt (FeS_2) [4]. Pierwiastek ten jest bardzo ruchliwy (w warunkach niesprzyjających szybko migruje w głąb profilu glebowego), powodując tym samym obniżenie ilości form łatwo przyswajalnych dla roślin [4]. Żelazo występuje również we wszystkich wodach lądowych i morskich (stopień utlenienia +2 lub +3). Związki Fe^{2+} należą do łatwo rozpuszczalnych w wodzie o pH< 7. W wodach powierzchniowych ulegają szybko utlenieniu i wytrącają się w postaci różnych tlenków. Związki żelaza występujące na III- stopniu utlenienia w fazie rozpuszczonej utrzymują się w postaci połączeń kompleksowych, z kolei tlenki żelaza w stanie koloidalnym odgrywają ważną rolę w procesach sorpcji i koagulacji innych substancji koloidalnych oraz jonów. Koloidalna zawiesina tlenków żelaza w wodzie katalizuje procesy utleniania. Zależność ta wykorzystywana jest

w procesach oczyszczania ścieków [4].

Oznaczanie żelaza w próbkach

Do oznaczania mikrogramowych ilości żelaza wykorzystywane są metody kolorymetryczne, w których wykorzystywane są barwne reakcje jakie dają jony Fe^{2+} oraz jony Fe^{3+} z niektórymi odczynnikami. Zazwyczaj w reakcjach wykorzystywane są związki organiczne, które dają barwne kompleksy z żelazem. Wśród nich najczęściej wymienia się : αα'- dipirydyl, o-fenantrolin, kwas sulfosalicylowy czy tiocyjanian amonu lub potasu czy dwupirydyl [1], [2]. Dwupirydyl odznacza się wysoką czułością i selektywnością, a dodatkowo pozwala na oznaczanie całkowitej zawartości żelaza po redukcji Fe^{3+} do Fe^{2+}. Powstałe w środowisku kwaśnym, obojętnym lub alkalicznym czerwono zabarwione kompleksowe połączenia jonów żelazawych z dwupirydylem podlegają prawu Lamberta-Beera (w szerokich granicach stężeń), a dodatkowo połączenia te są trwałe nawet w ciągu kilku miesięcy [2].

W trakcie oznaczania stężenia żelaza należy pamiętać, że wykorzystywana w badaniach surowica nie powinna wykazywać nawet śladu hemolizy, a w trakcie ozbaczenia należy szczególnie przestrzegać czystości odczynników, wody oraz szkła. Przygotowywane szkło powinno byc umyte w mieszaninie chromowej (lum mieszaninie kwasu siarkowego z kwasem azotowym). Woda wykorzystywana w oznaczeniu musi być podwójnie destylowana) [1].

Oznaczanie Fe(III) metodą rodankową z wykorzystaniem spektrofotometrii

Jony rodankowe (tiocyjanianowe) w w lekko kwaśnym środowisku mogą reagować z Fe(III), w wyniku czego powstają czerwono zabarwione kompleksy żelazowo-rodankowe. Maksimum absorpcji tych kompleksów przypada przy λ=480 nm. W wyniku stopniowej reakcji tzw. kompleksowania w roztworze mogą powstać kompleksy $Fe(SCN)^{2+}$, $Fe(SCN)2^{+}$ itd., aż do powstania $Fe(SCN)6^{3-}$. To, które kompleksy przeważają w roztworze zależne jest w dużej mierze od stężenia reagentów oraz pH środowiska [3].

Za pomocą metody rodankowej można oznaczać zarówno zawartość jonów Fe(III) w roztworze, jak i całkowitą zawartość żelaza. Możliwe jest to po wcześniejszym utlenieniu Fe(II). W trakcie oznaczenia pojawiają się związki przeszkadzające (aniony tworzące z Fe(III) trwałe kompleksy) takie jak: fluorki, fosforany, cytryniany, szczawiany, a także jony metali tworzących w warunkach reakcji barwne kompleksy (Co, Mo, Bi, Ti)[3].

Przygotowanie roztworów wzorcowych do oznaczenia:

a) roboczy roztwór wzorcowy soli Fe^{3+}: roztwór o stężeniu 10 µg Fe^{3+} /mL sporządzony przez 100-krotne rozcieńczenie roztworu podstawowego żelaza(III) o stężeniu 1mg Fe^{3+} /mL 0,1%-wym roztworem HCl.

b) roztwór roboczy: należy przygotować w kolbie o pojemności 100 mL po wcześniejszym jej przepłukaniu 0,1% roztworem kwasu solnego (HCl).

c) przygotowanie serii roztworów wzorcowych (do przygotowania krzywej kalibracyjnej): 6 kolbek miarowych o pojemności 50 mL należy przepłukać za pomocą 0,1M roztworu HCl. Następnie do każdej z nich należy odpipetować odpowiednie objętości roboczego roztworu wzorcowego o stężeniu 10 µ g/mL: 0 (ślepa próba), 2,00; 4,00; 6,00; 8,00 i 10,00 mL. Do kolbek dodać 5 mL 20% roztworu tiocyjanianu potasu, po czym uzupełnić do kreski 0,1 M roztworem HCl. Roztwory dokładnie wymieszać, a dalej kolejno przelać do kuwety i zmierzyć ich absorbancję przy długości fali równej

λ=480 nm (stosując jako odnośnik roztwór ślepej próby). Na podstawie otrzymanych wyników wykreślić wykres krzywej kalibracyjnej [3].

Wykonanie oznaczenia:

Badany roztwór należy przenieść ilościowo do skalibrowanej kolby miarowej o pojemności 100 ml. Próbkę dopełnić wodą destylowaną do kreski, całość dokładnie wymieszać, po czym z otrzymanego roztworu pobrać trzy 25-ml porcje (do kolbek miarowych o poj. 50 ml). Następnie do każdej kolbki dodać 5 ml 20% roztworu tiocyjanianu potasu, a całość uzupełnić do kreski za pomocą 0,1 M roztworu kwasu solnego (HCl).

Wszystkie przygotowane w powyższy sposób roztwory należy dokładnie wymieszać, a dalej przelać kolejno do kuwety spektrofotometrycznej. Zmierzyć absorbancję próbek przy długości fali równej λ= 480 nm stosując jako odnośnik roztwór ślepej próby. Na podstawie otrzymanych wyników odczytać stężenie żelaza (III) w barwnym roztworze z krzywej kalibracyjnej i obliczyć oznaczaną ilość żelaza (wartość w mg) korzystając z poniższego wzoru:

$$X = c \cdot v / 1000 \ [mg]$$

gdzie:

c – stężenie żelaza odczytane z krzywej kalibracyjnej (µg/ml),

v – objętość badanego roztworu żelaza (w powyższym przykładzie = 50 ml) [3].

Oznaczanie żelaza w materiale roślinnym (wg Krauze A., Domska D., 1969)

1) Należy odważyć około 1-2 g suchej, zmielonej próbki roślinnej i po zwęgleniu na łaźni piaskowej spala się przez 3-4 godz w piecu w temperaturze ok. 450-500°C. W celu przyspieszenia spalania do ostudzonego popiołu zwilżonego wodą destylowaną dodaje się 0,5-1 ml wody utlenionej (ok. 33%) i po odparowaniu na łaźni wodnej spala się jeszcze przez 1 godzinę.

2) W przypadku uzyskania ciemnej barwy popiołu do próbki należy dodać 0,5-1 ml kwasu nadchlorowego, po czym próbkę spalać na łaźni piaskowej do odparowania kwasu i uzyskania szarobiałej (słoma) lub białej (ziarno) barwy popiołu.

3) Otrzymany, ostudzony popiół zwilżyć 2 ml wody destylowanej i dodać 5 ml kwasu solnego wcześniej rozcieńczonego wodą w stosunku 1 : 1. Próbkę przykryć szkiełkiem zegarkowym, a dalej podgrzać do wrzenia i rozpuszczenia. Po ostudzeniu do próbki dodać 5 ml 25% kwasu siarkowego, a dalej odparować do momentu usunięcia z próbki kwasu solnego.

4) Otrzymany roztwór należy rozcieńczyć za pomocą gorącej wody destylowanej, po czym roztwór przesączy przez średnie sączki do kolb miarowych o objętości 50 ml (sączek należy kilkakrotnie przemywać gorącą wodą destylowaną).

5) Po ostudzeniu i uzupełnieniu wodą destylowaną do kreski oraz po dokładnym wymieszaniu z przygotowanej próbki należy pobrać 5 ml (co odpowiada 0,1-0,2 g substancji roślinnej i stężeniu

0,5 ml 25-procentowego kwasu siarkowego) do probówek kalibrowanych na 25 ml. Następnie dodać 1ml p-hydroksyfenyloglicyny(tj.: 0,1 g rozpuszczony w 100 ml 0,4 M kwasu siarkowego), 1 ml dwupirydylu (tj.: 0,5 g w 100 ml 10% kwasu octowego) oraz 4 ml wodorotlenku sodu w celu doprowadzenia do pH 4,0.

6) Uzupełniony do kreski wodą destylowaną i wymieszany barwny roztwór kolorymetruje się przy długości fali równej λ= 490 nm w kuwetach o grubości warstwy równej 1 cm [2].

Informacje dnia: GUS: w Polsce prawie 1,3 mln studentów Nowelizacja ustawy dot. stypendiów na uczelniach czeka Największą barierą dla renaturyzacji rzek jest prawo Gatunki inwazyjne roślin są potężnym zagrożeniem dla rodzimej flory Ekspertka: dotyk uspokaja i daje poczucie bliskości Kiedy defekt jest lepszy niż perfekcja GUS: w Polsce prawie 1,3 mln studentów Nowelizacja ustawy dot. stypendiów na uczelniach czeka Największą barierą dla renaturyzacji rzek jest prawo Gatunki inwazyjne roślin są potężnym zagrożeniem dla rodzimej flory Ekspertka: dotyk uspokaja i daje poczucie bliskości Kiedy defekt jest lepszy niż perfekcja GUS: w Polsce prawie 1,3 mln studentów Nowelizacja ustawy dot. stypendiów na uczelniach czeka Największą barierą dla renaturyzacji rzek jest prawo Gatunki inwazyjne roślin są potężnym zagrożeniem dla rodzimej flory Ekspertka: dotyk uspokaja i daje poczucie bliskości Kiedy defekt jest lepszy niż perfekcja

Partnerzy