

Název: Stanovení železa ve vzorcích krve pomocí diferenční
pulzní voltametrie

Školitel: MVDr. Ludmila Krejčová

Datum: 24.2. 2012

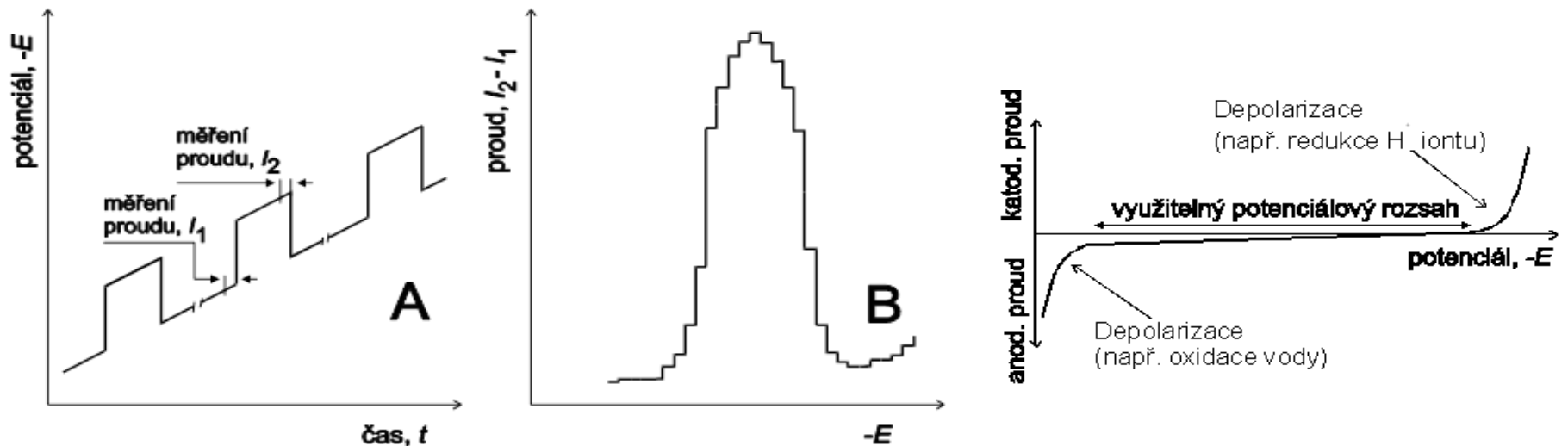
Reg.č.projektu: CZ.1.07/2.3.00/20.0148

Název projektu: Mezinárodní spolupráce v oblasti "in vivo" zobrazovacích technik



Diferenční pulzní voltametrie

- elektroanalytická metoda
- elektrochemický článek je tvořen elektrodami ponořenými do roztoku (elektrolytu)
- studuje závislost el. proudu protékajícího pracovní elektrodou ponořenou v analyzovaném roztoku na jejím potenciálu (který se s časem mění - roste či klesá)
- není-li v roztoku u pracovní elektrody analyt, který by se redukoval či oxidoval, je elektroda polarizována a protéká jí pouze kapacitní (nabíjecí) proud potřebný na změnu potenciálu
- pokud je v roztoku přítomna látka, která se při určitém potenciálu oxiduje nebo redukuje (tzv. depolarizátor), dojde k depolarizaci elektrody a teče jí elektrolytický (faradayický) proud
- velikost odpovídajícího anodického či katodického proudu určuje koncentraci stanovované látky



Pracovní elektrody (polarizovatelné):

- potenciál je závislý na koncentraci analytu
- voltametrie: stacionární (visící) Hg elektroda (HMDE)
elektrody z tuhých inertních materiálů (Pt,Au,C)

Referentní elektrody (nepolarizovatelné):

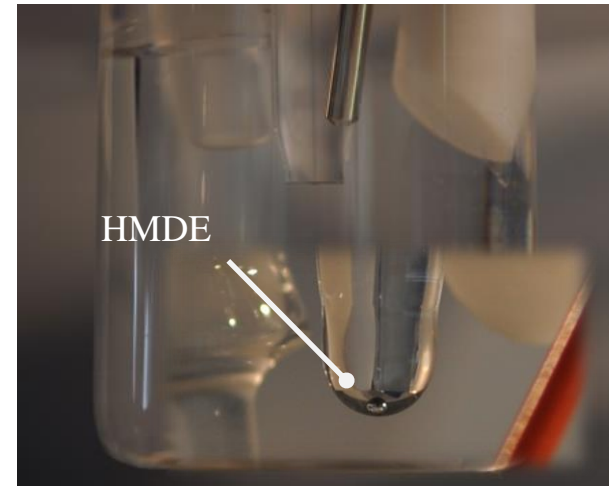
- stálý potenciál
- elektrody II. druhu (Ag/Ag Cl/KCl 3M)
(spojené s analyzovaným roztokem solným můstkem)

Pomocné elektrody (nepolarizovatelné):

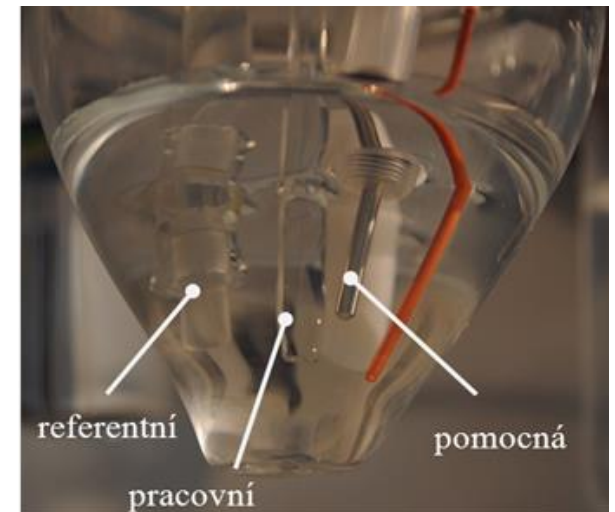
- elektrody z inertního materiálu (Pt, C) o velkém povrchu

Příprava vzorku k analýze:

- přidavek indiferentního elektrolytu (stálé pH)
- odstranění kyslíku probubláním argonem



rtuťová elektroda



detail tříelektrodového zapojení

ERYTROCITY

fce : transport dýchacích plynů O_2 (z plic ke tkáním) a CO_2 (z tkání do plic)
udržování ABR (stálé pH krve)

ryby, ptáci, plazi - ery jaderné a oválné

savci - ery bezjaderné a bikonkávní (velbloud - oválné ery)

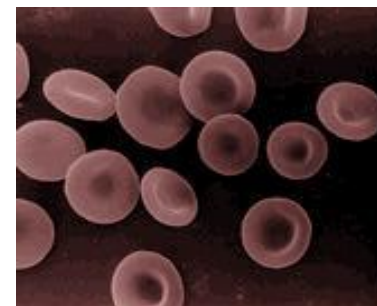
velikost: 4 - 9 μm

počet: $1mm^3$ 4 - 5 000 000 ery (Ho), 2 400 000 (Gal) , 6 650 000 (Ca)

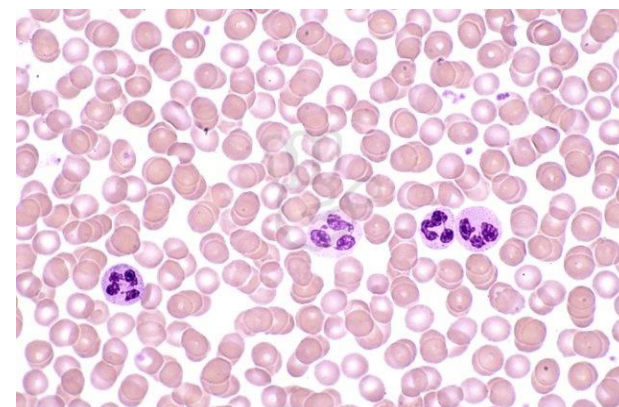
- o 1/3 větší povrch než koule \rightarrow lepší vazba O_2 na HB
- nemají dělicí schopnost
- životnost 100 dní (1000 km)
- erytropoéza v kostní dřeni (embryonálně v játrech)
- stimulace krvetvorby EPO (v ledvinách)

HEMOGLOBIN

- 130 – 160 g/l krve
- globin (bílkovinná složka)
- hem (barvivo obsahující Fe)
- formy HB (HBO_2 , $HBCO_2$, $HBCO$)



Erythrocyty zdroj: wikipedia.com



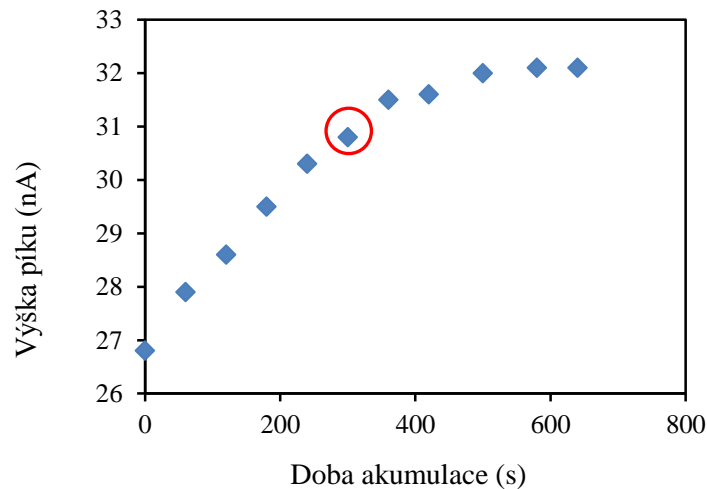
Krevní nátěr

zdroj: med.muni.cz

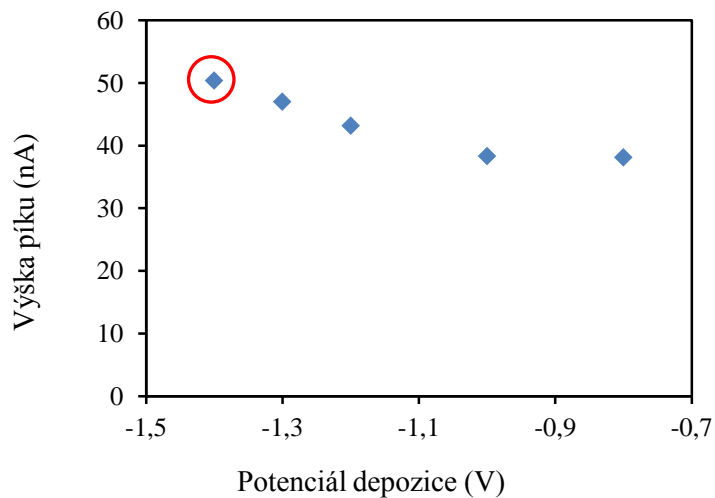
Optimalizace metody stanovení Fe pomocí DPV

koncentrace Fe²⁺: 1 μg/ml
vzorek: 50 μl
ACS voda: 1550 μl
elektrolyt : 400 μl
(trietanolamin 0,05M; KBrO₃ 0,1M; NaOH 0,1M)

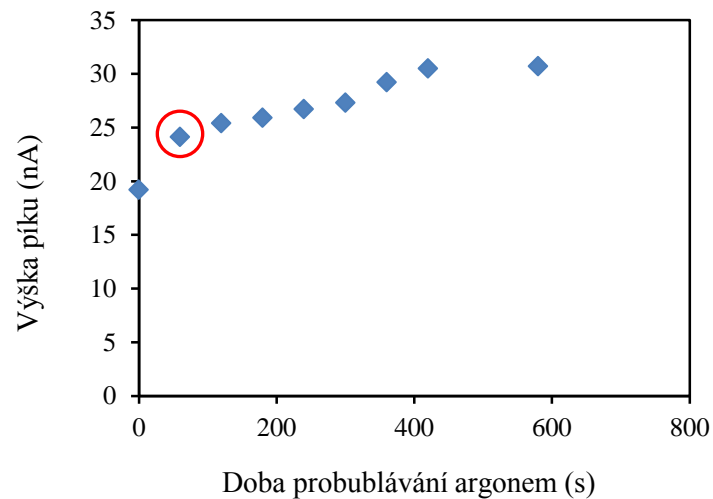
1) optimalizace doby akumulace (s) při potenciálu -0,6 V



2) optimalizace potenciálu depozice doba akumulace 360s

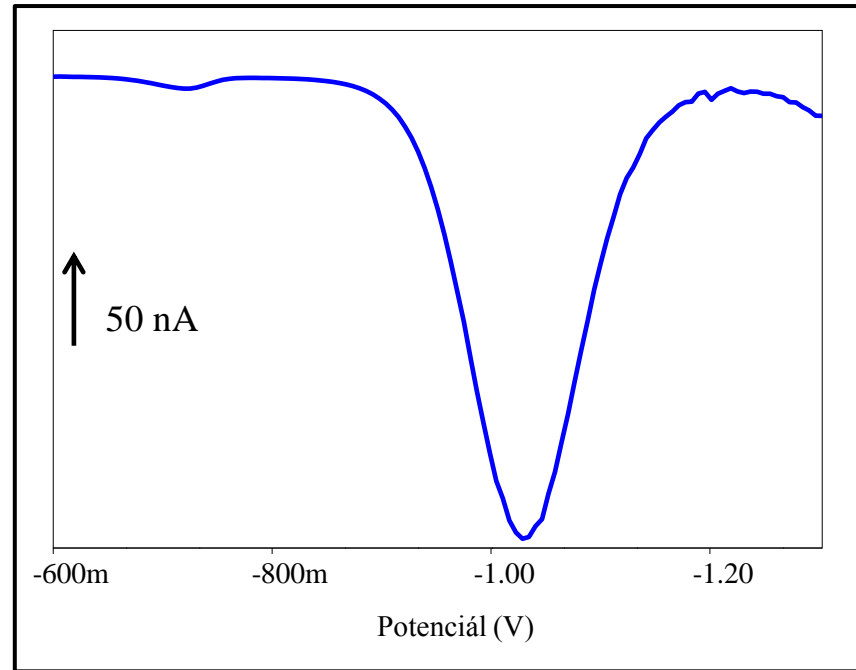


3) optimalizace doby probublávání argonem doba akumulace 360s , potenciál depozice -1,3 V



Parametry metody stanovení Fe v erythrocytech

počáteční potenciál : -0,6V
konečný potenciál : -1,3V
probublávání argonem : 120s
čas akumulace : 360s
potenciál akumulace : -1,3V
potenciálová amplituda: 0,005V
potenciálový čas: 0,006V
potenciálový krok: 0,005V
ekvilibrace : 10s



voltamogram Fe

měření byla provedena v elektrochemické cele s klasickým tříelektrodovým zapojením v prostředí trietanolamnového pufru

měřicí systém se skládal z těchto zařízení :

889IC SAMPLE CENTER, 797 VA COMPUTRACE STAND, 800 DOSINO, 846 DOSING INTERFACE, 843 PUMP STATION

Příprava vzorku :

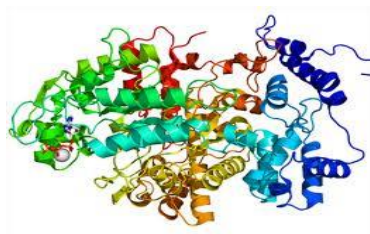
0,1 g erytrocytů → tekutý dusíku (5 min) → 500 μ l 1mM HCl → 1ml fosfátového pufru pH 7 →



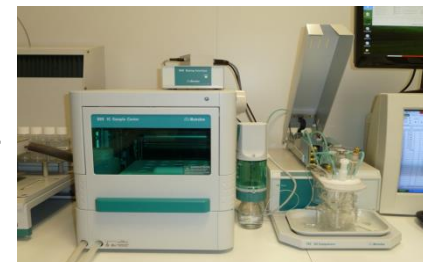
→ ultrazvuk (2 min) → vortex (10 min) → centrifugace (30 min) → odpipetování supernatantu →



→ srážení bílkovin (20%TFA) → centrifugace (10min) → supernatant pro stanovení Fe



+



Závěr:

Byla optimalizována metoda ke stanovení Fe

Optimalizovaly se tyto parametry: doba akumulace: 360s

potenciál depozice: -1,3V

doba probublávání argonem : 120s

Další cíle:

Vytvoření kalibrační přímky pro Fe

Optimalizace přípravy vzorků pro stanovení Fe v erytrocytech

Poděkování :

Martině Staňkové - za výdrž při přípravě vzorků

Ing. et Ing. Davidu Hynkovi PhD. - za odborné vedení

pracovníkům laboratoře metalomiky a nanotechnologií

Děkuji za pozornost

