

Spektrofotometrično določanje železa v krvni plazmi in Spektrofotometrično določanje anorganskega fosforja v krvni plazmi oz. serumu

Opis metode:

Spektrofotometrija je kvantitativna metoda za določevanje koncentracije. Osnova za metodo je Beer-Lambertov zakon. Delež absorbirane svetlobe je funkcija koncentracije vzorca, dolžine poti žarka skozi vzorec in absorpcijskega koeficienta.

Potek dela:

Določanje železa:

V tri epruvete smo dali po 1ml krvne plazme in v drugo in tretjo po 0,1 oz 0,2 ml standardne raztopine Fe. V vse tri smo potem dodali še 2ml hidroksilamin hidroklorida za redukcijo Fe³⁺ in 1 ml 30% TCA da oborimo proteine v plazmi. Raztopino centrifugiramo. Po centrifugiranju prenesemo 3ml supernatanta iz vsake v čisto epruveto, kjer dodamo v vsako še 1ml Na acetata (25%) in 1ml 0,1% 1,10 fenantrolina. Počakamo, da se razvije barva in merimo A pri 511 nm. V slepo probo damo vse razen reagenta.

Določanje fosforja:

K 0,5 ml plazme dodamo 9,5 ml 5% TCA, premešamo in centrifugiramo. 5ml supernatanta prenesemo v čisto centrifugirko, dodamo 1ml vanadij molibdenove kislin in 0,4 ml aminonaftol sulfonske kisline. Počakamo, da se razvije barva in merimo A pri 690nm.

V tri 10ml bučke odpipetiramo po 0,5, 1,0, 1,5 ml standarda P, dodamo 5ml TCA, 1ml vandij molibdenove kisline in 0,4 ml aminonaftol sulfonske kisline. Počakamo da se razvije barva in merimo A pri 690 nm.

Računi in grafi:

- Določanje železa:

| | 0,1 mL dod | 0,2 mL dod | enote |
|-------|------------|------------|-------|
| A_x | 0,089 | 0,089 | / |
| A_s | 0,184 | 0,327 | / |
| c_x | ? | ? | µg/mL |
| c_s | 0,00005 | 0,00005 | g/mL |
| V_x | 1 | 1 | mL |
| V_s | 0,1 | 0,2 | mL |
| V_1 | 4,1 | 4,2 | mL |
| V_2 | 4 | 4 | mL |

Formula za računanje s standardnim dodatkom:

| | | | |
|-------|------------|------------|-------|
| c_x | 4,9165E-06 | 4,0013E-06 | g/mL |
| c_x | 4,92 | 4,00 | µg/mL |

| | |
|---------------|------------|
| c_x povpr.: | 4,46 µg/mL |
|---------------|------------|

$$\frac{A_x}{A_s} = \frac{c_x V_x V_2}{(C_x V_x + C_s V_s) \cdot V_1}$$

Če pa izrazimo c_x (konc. vzorca), pa izgleda tako:

$$c_x = \frac{\frac{A_x}{A_s} c_s V_s V_1}{V_x \cdot (V_2 - \frac{A_x}{A_s} V_1)}$$

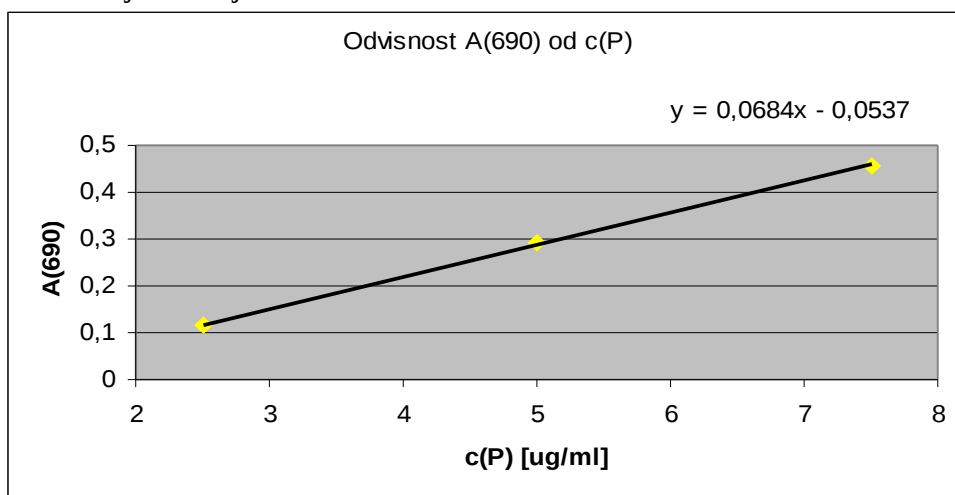
Ker imamo enačbo, za izračun ne potrebujemo grafa.

Rezultat:

Koncentracija Fe v krvni plazmi je **4,5 $\mu\text{g/mL}$** .

V našem vzorcu ($V = 1 \text{ mL}$) je torej 4,5 μg oziroma 80,2 nmol Fe.

- Določanje fosforja



| A | c(P) |
|-------|----------------------|
| 690 | [$\mu\text{g/ml}$] |
| 0,116 | 2,5 |
| 0,291 | 5 |
| 0,458 | 7,5 |

$$A_{\text{vzorca}} = 0,481$$

$$c_{p \text{ v } 6,4 \text{ ml}} = \frac{0,481 + 0,0537}{0,0684} = 7,82 \mu\text{g} / \text{ml}$$

$$c_{p \text{ v } 6,4 \text{ ml}} = c_{p \text{ v } 10 \text{ ml}}$$

$$c_{p \text{ v } 0,5 \text{ ml}} = \frac{c_{p10 \text{ ml}} \cdot V_{10 \text{ ml}}}{V_{0,5 \text{ ml}}} = \frac{7,82 \mu\text{g} / \text{ml} \cdot 10 \text{ ml}}{0,5 \text{ ml}} = 156,4 \mu\text{g} / \text{ml} = 15,6 \text{ mg} / \text{dl}$$

Tabela normalnih koncentracij

| mg/dL | | ug/mL | |
|-------|-----|-------|-----|
| min | max | min | max |

| | | | | |
|---------|-----|-----|------|------|
| odrasli | 3 | 4,5 | 0,3 | 0,45 |
| otroci | 4,5 | 6,5 | 0,45 | 0,65 |