

Izvješće o dosadašnjem radu

Pozadina:

Dosadašnji rad je bio poduzet u svrhu optimiziranja analize količine H_2O_2 u biljnom ekstraktu detekcijom oksidaci Fe^{2+} u Fe^{3+} zamjenom sredstva za spektrofotometrijsku detekcijuom željeza(III) Ksilenol oranže sa tiocijanatnim aniona.

Sredstvo za povećavanje oksidacije Fe^{2+} je bio sorbitol, koji iz hidroksilnih radikala nastalih fentonovom reakcijom ponovno generira vodikov peroksid dovodeći do dodatne oksidacije.

Obavljeni eksperimenti:

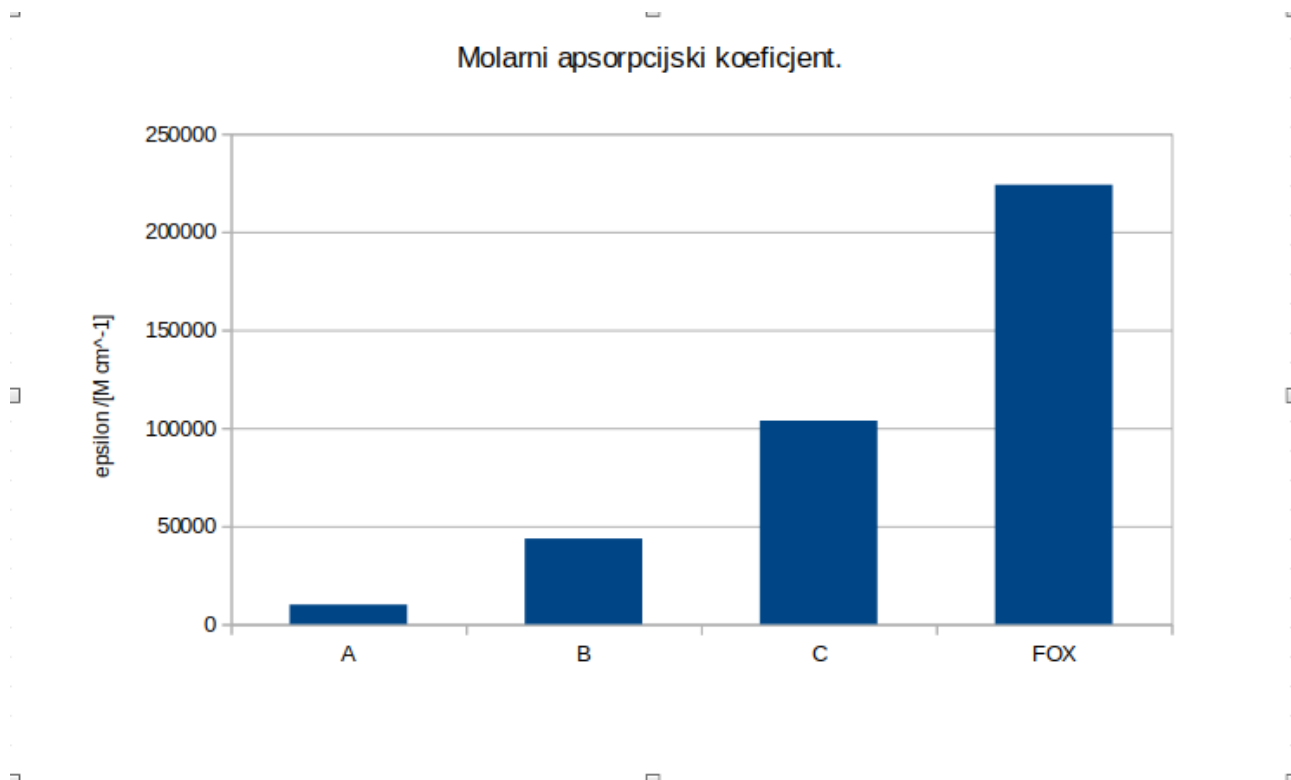
Probane su tri procedure:

A) Dodatak 100 μL uzorka ($\sim 100 \mu\text{M}$ H_2O_2) na 100 mM KSCN, 250 μM $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ i 100 μM sorbitol ukupni volumen 1 mL i inkubacija 5 min ($\lambda_{\text{max}} = 470$)

B) Inkubacija 100 μL uzorka ($\sim 100 \mu\text{M}$ H_2O_2) u 100 mM sorbitolu i 250 μM $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ te potom inkubacija u 100mM KSCN i dodatak vode do 1 mL ($\lambda_{\text{max}} = 470$)

C) Kao i pod B, ali dopunjeno acetonom umjesto dH_2O (Konačni udio acetona je 50%). ($\lambda_{\text{max}} = 480$)

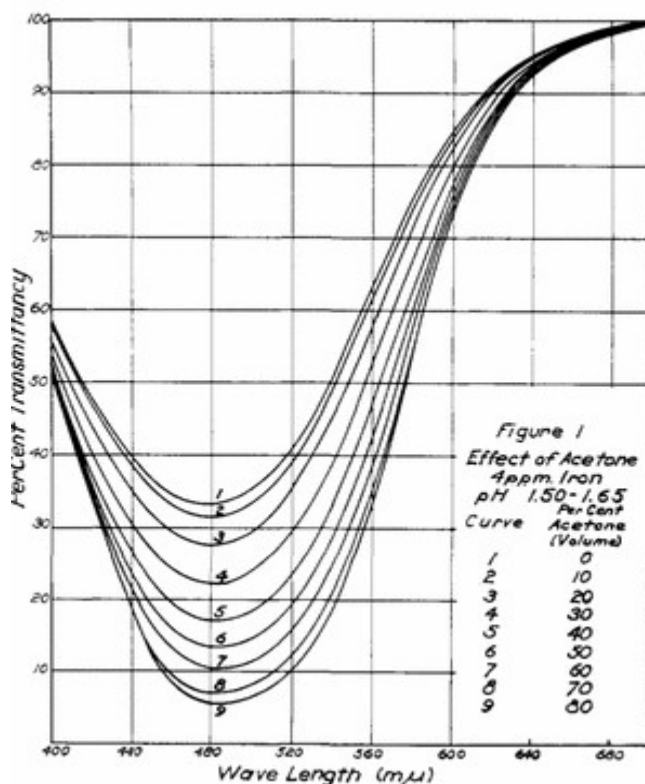
Molarni apsorpcijski koeficijenti za sve metode i za fox reafens su prikazani na grafu.



Pošto je metoda A pokazivala osjetljivost sličnu literaturnoj SNC- za detekciju željeza u metode B i C uveden je odvojeni korak inkubacije uzorka sa Fe^{2+} i sorbitolom pod pretpostavkom da SCN^- djeluje kao skavanger $\cdot\text{OH}$ radikala koji u reakciji sa sorbitolom regenerira H_2O_2 i time pojačava oksidaciju željeza. Rezultati su u skladu sa hipotezom.

Aceton u metodi C je preuzet temeljem literature istraživanja o optimizaciji detekcije željeza pomoću tiocijanata.

Odvojena inkubacija sa sorbitolom pokazuje povećanje sukladno literaturnom za djelovanje sorbitola 4-5X, dok 50% aceton djeluje bolje od predviđenog s povećanjem 2.5X naspram očekivanih 2X. Veće količine acetona bi vjerojatno idalje povećale apsorbanciju (Vidi donji graf) međutim eksperimentalno je određeno da ako udio acetona prelazi 70% pojavljuje se percipitat. Percipitat vjerojatno nema (Nije ispitano) osobit utjecaj apsorbanciju, ali svakako zahtjeva centrifugiranje da se ukloni.

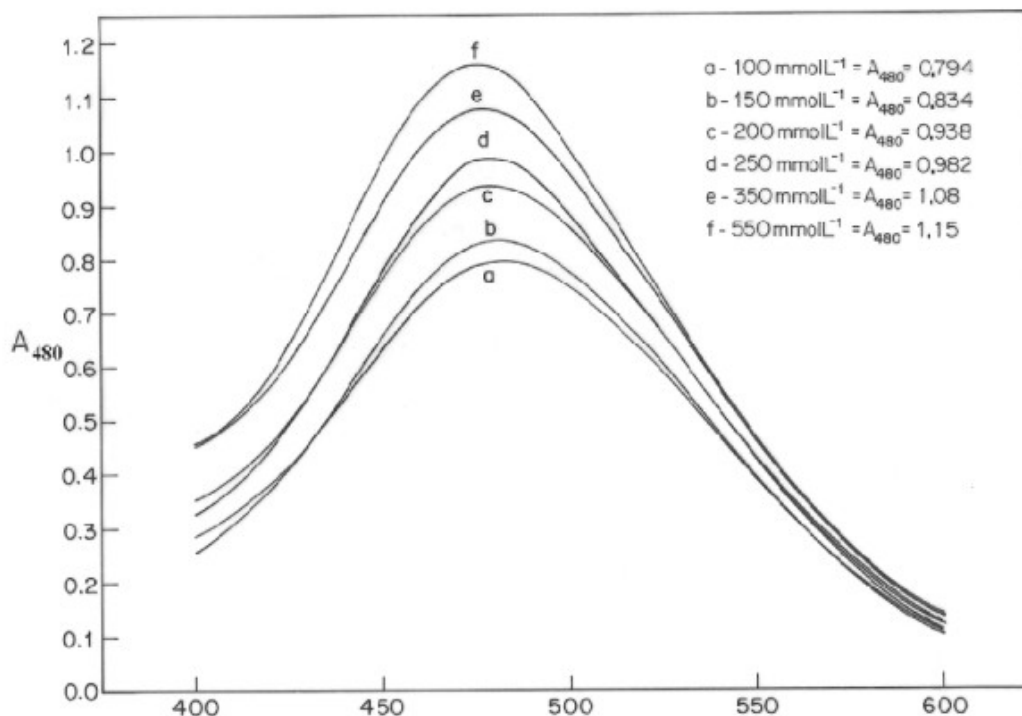


Iako se razlika u osjetljivosti između SCN^- i FOX metode čini dramatična na grafu razlika je samo kakvih 2 puta što nije osobito relevantno za ovakvu metodu jer u slučaju da je potrebna ta razina osjetljivost FOX može se naprosto rabiti 200 uL umjesto 100 uL uzorka. Dodatno, za raspon koncentracija svježeg tkiva apsorbancije dobiven SNC- metodom bi se trebala kretati od 0,1 do 1.

Što se tiče moguće daljnjeg pojačanja osjetljivosti postoje dva moguća puta:

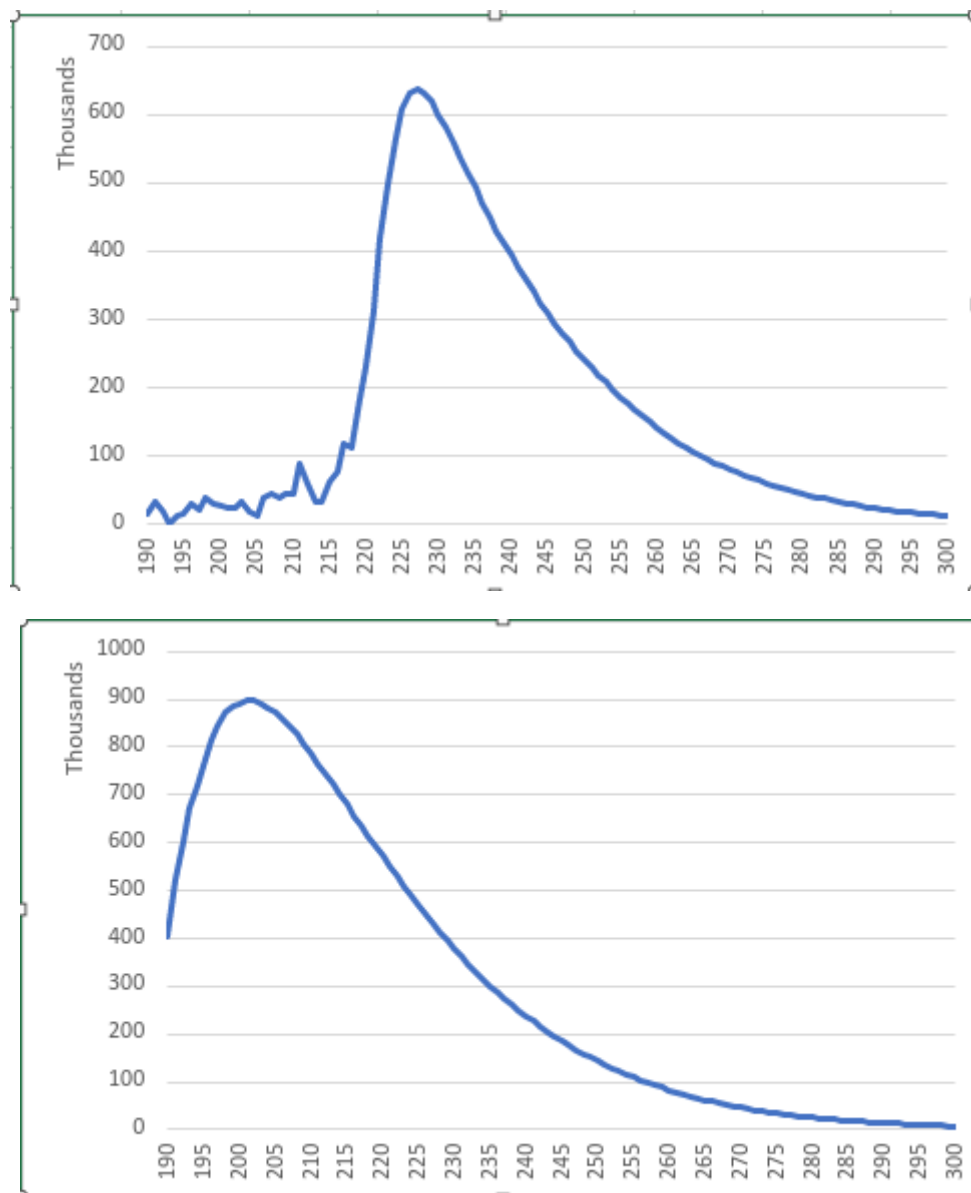
1. povećanje udjela acetona (uz centrifugiranje). Dodatno centrifugiranje možda i ne bude dodatno opterećenje jer je moguće da na uzorcima biljnog tkiva dođe do precipitacije proteina ili nukleinskih kiselina.

2. Povećanje SCN⁻. Fe-SCN kompleksi su u ravnoteži sa slobodnim Fe³⁺. 100 mM je bila koncentracija pri kojoj bi trebao biti gotovo isključivo obojani Fe-SCN kompleks, međutim meni novi podaci pokazuju da dodatni SCN možda može i značajnije doprinjeti (Vidi graf, graf je rađen pri 2,8 ppm Fe (Unutar nama relevantnom rasponu)).



Kao što se vidi sa grafa Apsorbancije se ovom metodom može povećati za cca 50%.

Nadalje, svim metodama su određeni maksimumi apsorpcije, i za metodu A je određena stabilnost boje koji nije bio optimalan (4% na 30 min). Međutim, za sustav s acetonom literatura tvrdi da je boja stabilna i više sati. Glavni mehanizam nestabilnosti boje je oksidacija SNC⁻ od strane Fe³⁺.



Dodatno k tome određeno je da u apsorbancija pri 240 nm H_2O_2 u 0,1% TCA zapravo raste! I ne samo da raste naego imai drguačiji oblik i položaj spektra negou dH_2O (Vidi grafove, prvi je u TCA). Nije ispitano kako se ovo ispoljava u ukupnoj

Trenutna hipoteza je da dolazi do nekekave kemijske reakcije, međutim pouzdana dijagnoza nije trenutno moguća uslijed nemogućnosti pronalaska literaturnog spektra H_2O_2 (Sigurno postoji samo još ne naidoh)

Preporuča se pratiti promjenu spektra kroz vrijeme, ukoliko se vidi promjena riječ je vjerojatno o reakciji, a ukoliko je statičan vjerojatno je riječ čisto o promjeni spektra usijed promjene pufera. Valja vidjeti i spektre H_2O_2 u kiselim uvjetima koji ne sadrže TCA.

Sljedeći koraci:

- Validacija metode na živom tkivu i usporedba sa FOX metodom.
- Daljnja optimizacija osjetljivosti (Niži prioritet)
- Ustanoviti pufer u kojem se ne gubi peroksid (Spiking + analiza na 240 nm i sa SNC-)
- Ustanoviti postoji li efekt količine tkvia i ekstrakta