

Test colorimétrique pour le dosage du fer dans le vin et les aliments
4 x 100 ml (200 tests)

Pour usage in vitro uniquement
Conserver entre +2 et +8°C

Principe

Le fer est dissocié des protéines dans des conditions particulières de force ionique, et réduit à l'état bivalent grâce à l'acide ascorbique. Il forme ensuite un complexe stable avec le FERENE-S, dont l'intensité de couleur est proportionnelle à la quantité de fer présent dans l'échantillon.

Spécifications

Longueur d'onde: 582 nm (575 – 582 nm)
Cuvettes: 1,00 cm (verre; plastique)
Température: 25 à 37°C
Méthode: point final
Réaction: 15 minutes
Mesure: contre l'air ou l'eau
Linéarité: 2 – 40 mg/L

Réactifs

- # 1: Tampon, 4 flacons avec env. 84 ml chacun (> 0,1 mol/L)
- # 2: Ferrene-S, 4 flacons avec env. 16 ml chacun (Ferene-S > 0,1 mmol/L; acide ascorbique > 0,1 mol/L).
- # 3: Calibrant, 1 x 5 ml (Fer ionique à 20 mg/l).

Les réactifs sont prêts à l'emploi. Ils sont stables à 2-8 °C jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette, à condition qu'il n'y ait pas de contamination lors de l'utilisation.

Amener les réactifs à la température de travail souhaitée avant utilisation (+25°C à +37°C). Mélanger doucement avant utilisation. Fermer immédiatement après utilisation.

Les réactifs ne sont pas dangereux pour la santé. Appliquer les précautions habituelles en vigueur dans le laboratoire. Après utilisation, les réactifs doivent être éliminés comme déchets de laboratoire. Les emballages peuvent être recyclés.

Préparation des échantillons

- Le vin peut être testé directement.
- Utiliser des échantillons clairs et à pH neutre dans une plage de 20 à 40 mg/L; sinon, diluer l'échantillon pour atteindre cette plage.
- Les échantillons fortement colorés doivent être traités au PVPP (polyvinylpyrrolidone par ex. à 0,1 g/10 mL échant.)
- Pour les applications sur analyseurs de biochimie, nous recommandons d'ajouter du PVP (polyvinylpyrrolidone) à une concentration finale de 5 g/l dans le réactif R1 (2,1 ml d'une solution mère à 200 g/l dans chaque flacon)
- Les solutions troubles doivent être filtrées ou centrifugées
- Les échantillons contenant du gaz carbonique doivent être dégazés

Procédure

Pipeter dans les cuvettes:	Blanc réactif (BR)	Calibrant	Échantillons
Réactif 1 (tampon)	1680 µl	1680 µl	1680 µl
Eau bi-distillée	100 µl	-	-
Standard (flacon 3)	-	100 µl	-
Échantillon	-	-	100 µl
Mélanger avec précaution. Lire l'absorbance A ₁ après 5 minutes à +25 – +37°C, ensuite rajouter:			
Réactif 2 (Ferene-S)	320 µl	320 µl	320 µl
Mélanger avec précaution. Lire l'absorbance A ₂ après 10 minutes à +25 – +37°C. La couleur est stable env. 30 min à t° ambiante.			

Calcul des résultats

$\Delta A = (A_2 - df \times A_1)_{\text{échant. ou standard}} - (A_2 - df \times A_1)_{\text{BR}}$
avec df = facteur de dilution des densités optiques par les volumes de réactifs utilisés:

$$df = (\text{volume échant.} + R1) / (\text{volume échant.} + R1 + R2) = 0,848$$

$$\text{et } C_{\text{échant.}} [\text{mg/L}] = \frac{C_{\text{standard}} [\text{mg/L}]}{\Delta A_{\text{standard}}} \times \Delta A_{\text{échantillon}}$$

Comme la concentration du standard est fixée à 20 mg/L, cela donne une formule de calcul qui dépend de l'unité choisie:

$$C_{\text{échant.}} [\text{mg/L}] = (\Delta A_{\text{échant.}} / \Delta A_{\text{standard}}) \times 20$$

ou $C_{\text{échant.}} [\mu\text{mol/L}] = (\Delta A_{\text{échant.}} / \Delta A_{\text{standard}}) \times 358$

Notes

1. Il est possible de faire varier les volumes de façon proportionnelle.
2. Pour des concentrations supérieures à la limite de linéarité, diluer l'échantillon de façon à être dans la plage de mesure requise; répéter la mesure et multiplier par le facteur de dilution.
3. Utiliser des cuvettes à usage unique ou des tubes très propres lavés avec de l'HCl dilué et de l'eau distillée.
4. Spécificité: le test est spécifique du fer, aucune interférence n'a été détectée.
5. Le volume échantillon est bas car le complexe Ferene-S est très sensible; un volume échantillon faible a l'avantage de réduire les interférences possible de l'échantillon
6. Le test se déroule dans des conditions de pH acide, donc il n'est pas nécessaire d'ajuster le pH (par ex. pour des échantillons de vin ou après traitement à l'acide perchlorique)

Exemples supplémentaires d'applications

- Détermination du fer dans la farine supplémentée:
 - peser avec précision 0,8 g de farine dans un tube de 10 ml
 - ajouter 6 – 7 ml d'acide perchlorique 7% (w/v)
 - agiter et mélanger pendant 10 min.
 - remplir à la marque (10 ml) avec l'acide perchlorique 7%
 - mélanger quelque fois par renversement
 - centrifuger à 1700 - 2000 x g pendant 20 min; il est aussi possible de filtrer (ex. Macherey Nagel réf. 531012, MN 615 1/4, diamètre 125 mm)
 - utilise le surnageant ou filtrat pour le test

Le contenu en fer est calculé avec la formule:

$$\text{Contenu [g/100 g]} = \frac{C_{\text{fer}} [\text{g/l}]}{\text{poids}_{\text{échantillon}} [\text{g/l}]} \times 100$$

(poids_{échantillon} = 80 (g/L) si le poids initial est bien de 0,8 g dans 10 ml comme dans notre exemple)

Littérature

1. Textbook of Clinical Chemistry, Ed. by N.W. Tietz, W.B. Saunders Co., Philadelphia (1999).
2. Duffy J. R., Gaudin J., Clin. Biochem. 10, 122 (1977).
3. Higgins T., Clin. Chem. 27, 1619 (1981).

Applications sur automates de biochimie

Application générale (tous analyseurs)	
Température	37°C (25°C est possible aussi)
Longueur d'onde	575 - 600 nm (primaire) / 700 nm (secondaire)
Type de test et séquence	Mesure en point final en bi-réactif: <ul style="list-style-type: none"> - pipetage R1 (5 Vol.) + échantillon (20 – 50 µl) - pré-incubation 2 – 3 min - mesure A1 (avant addition de R2) - pipetage R2 (1 Vol.) - incubation >= 5 min à 37 °C - mesure A2 - calcul A2 – A1 contre courbe de calibration
Calibration	2 à 5 standards de 0 à 10 mg/l Courbe de calibration linéaire
Blanc réactif	Oui
Réactifs	R1 and R2 dans un ratio d'env. 5 et 1
Echantillons	20 µl pour basse sensibilité (domaine 0 – 20 mg/l) 50 µl pour haute sensibilité (domaine 0 – 10 mg/l)

Exemple Konelab / Arena			
Définition du test:			
Nom entier	Enzytec Fer		
Code informatique	#		
Test utilisé	Oui		
Type test	Photométrique		
Unité	mg/l		
Nbre de décimales	1		
Température	37 °C		
Linéarité	0	20	mg/l
Absorbance initiale	0.000	2.000	E
Limite dilution	0	20	mg/l
Seconde dil. 1 +	#	#	
Mode validation	Automatique		
Dilution 1 +	0.0		
Type spécimen	Vin (autres)		
Facteur corrélation	1.00		
Biais corrélation	0.00		
Paramètres de calibration			
Type Calibrage	Linéaire		
Sens de la courbe	Croissant		
Fréquence (jours)	1	Err. (mA)	#
Points/calib.	en simple	Err. (%)	#
Mode validation	Automatique		
Limite réponse min/max	# / #		
Décalage utilise	Non		
Type de calibrage	Séries	(séparés possible aussi)	
Calibrants	Calibrants fer ionique		
Concentrations	0 à 10 mg/l		
Distribution / mesure			
Blanc additionnel	oui (ou temps fixé)	Excès antigène	Non
Réactif 1	ENZYT FE R1		
Volume (µl)	150	Volume (µl)	10
Distribué avec	Eau		
Réactif lavage	Non		
Volume échant.(µl)	15	(ajuster selon sensibilité)	
Distribué avec	Eau	Volume (µl)	10
Réactif lavage	Non		
Incubation (sec)	180		
Mesure du BLANC	point-final		
Réponse min / max	# / #		
Réactif 2	ENZYT FE R2		
Volume (µl)	25		
Réactif lavage	Non		
Distribué avec	Eau	Volume (µl)	10
Incubation (sec)	300		
Mesure	Point final		
λ 1 / λ 2 (nm)	600 / 700	(575 / 700 possible aussi)	
Type mesure	Temps fixé		

Exemple Lisa 200		
Nom du dosage	Enzytec Fer Ferene	
Nom abrégé	Fer	
Unités	mg/l	
Type de test	End-point calibration	
Valeur filtre (nm)	580	
1ère lecture = zéro	NON (A1 doit être mesuré pour chaque échantillon)	
Temps d'attente 1 (tours avant addition R2)	4 (4 tours = 4 x 24 sec.)	
Nombre de mesures (= temps d'incubation)	15 (15 tours x 24 sec = 6 min)	
REACT 1	VOL (µl)	250
	DIL (µl)	0
	POS	#
REACT 2	VOL (µl)	45
	DIL (µl)	0
	POS	#
ÉCHANT.	VOL (µl)	20–50 µl (ajuster selon sensibilité requise)
	DIL	0
DÉCLENCHANT	REACTIF 2	
Temps d'attente 2 (tours après addition R2)	0 (les mesures démarrent immédiatement après R2)	
Calibration	1er degré (= calibration linéaire; 2ème degré = calibration non linéaire, possible aussi)	
Blanc = Standard	OUI (l'eau utilisée pour le blanc sert de premier point dans la calibration)	
Nombre de standards	3	
Standard 1	VAL (mg/l)	2 (= exemple avec 2 mg/l)
	POS	# (indiquer la position sur le rotor)
Standard 2	VAL (mg/l)	5 (= exemple avec 5 mg/l)
	POS	#
Standard 3	VAL (mg/l)	10 (= exemple avec 10 mg/l)
	POS	#
Nb répét. Echant./Contrôle	1 (nombre de répétitions; il est possible aussi de choisir 2)	
Contrôle	VAL (mg/l)	# (concentration du CQ)
	POS	# (position sur le rotor)
	DEV	# (déviations acceptées)
Pré-dilution	1	
Post-dilution	4	
Diluant	Sérum physiologique	
Type rinçage	3	
Valeur normale	SUP	20 (en mg/l)
	INF	0
Limite linéarité	20 (en mg/l)	
Limite DO Blanc	INF	0
	SUP	500

valeur entrée par l'opérateur

Exemple Hitachi 717	
TEST	[Fer Ferene]
CODE REACTION	[2POINTS] - [24] - [50]
VOLUME Echantillon (µl)	[30] - [5] (ajuster selon besoins)
VOLUME réactif R1	[250] - [50] - [NON]
VOLUME réactif R2	[40] - [20] - [NON]
LONGUEUR D'ONDE	[700] [600]
TYPE CALIBRATION	[LIN] [1] [4]
ETL (1) CONC. POS.	[0] - [1] (exemple)
ETL (2) CONC. POS.	[2] - [2] (2 mg/l =exemple)
ETL (3) CONC. POS.	[5] - [3] (5 mg/l =exemple)
ETL (4) CONC. POS.	[10] - [4] (10 mg/l =exemple)
LIMITE DEV. STAND.	[0.1]
LIMITE DUPLICATE	[#]
LIMITE SENSIBILITE	0
LIMITE D.O (CINET)	[0] - [CROISS]
LIMITE PROZONE	[32000] - [1]
VALEURS USUELLES	[#] - [#]
VALEURS D'ALERTE	[#] - [#]
FACTEUR INSTRUMENT	[1.0]