

Metodo colorimetrico per il dosaggio del ferro nel vino e prodotti alimentari
4 x 100 ml (200 test)

Solo per uso *in vitro*
Conservare tra +2 e +8°C

Principio

Il ferro è dissociato dalle proteine in condizioni particolari di forza ionica, e si riduce allo stato bivalente grazie all'acido ascorbico. Successivamente reagisce con il reagente cromogeno FERENE-S e forma un complesso stabile, la cui intensità di colore è proporzionale alla quantità di ferro presente nel campione.

Specifiche

Lunghezza d'onda: 582 nm (575 - 582 nm)
Cammino ottico: 1,00 cm (vetro; plastica)
Temperatura: 20 - 37°C
Metodo: punto finale
Tempo reazione: 15 minuti
Misura: contro aria o acqua
Linearità: 2 - 40 mg/L

Reagenti

- # 1: Tampone, 4 bottiglie da ca. 84 ml ciascuna (> 0,1 mol/L)
- # 2: Ferrene-S, 4 bottiglie da ca. 16 ml ciascuna (Ferene-S > 0,1 mmol/L; acido ascorbico > 0,1 mol/L).
- # 3: Standard, 1 x 5 ml (Ferro ionico a 20 mg/l).

Tutti i reagenti sono pronti all'uso. Sono stabili tra 2 e 8 °C fino alla data di scadenza indicata, a condizione che non siano stati contaminati durante il loro utilizzo.

Portare i reagenti a temperatura ambiente (20-25 °C) prima dell'utilizzo. Mescolare delicatamente prima dell'aggiunta. Chiudere immediatamente dopo l'utilizzo.

Adottare le comuni norme di sicurezza necessarie in un laboratorio chimico. Dopo l'impiego, i reattivi devono essere eliminati come rifiuti di laboratorio. Gli imballaggi possono essere riciclati.

Preparazione dei campioni

- I vini possono essere utilizzati direttamente.
- Utilizzare direttamente campioni chiari, limpidi ed a pH neutro se la concentrazione di ferro è compresa tra 20 - 40 mg/L; altrimenti, diluire il campione con acqua per raggiungere questo intervallo.
- I campioni fortemente colorati devono essere trattati con PVPP (Polivinilpolipirrolidone es. 0,1 g/10 ml di campione)
- Per le applicazioni su analizzatori di biochimica, raccomandiamo di aggiungere PVP (Polivinilpolipirrolidone) ad una concentrazione finale di 5 g/l nel reagente R1 (2,1 ml della soluzione madre da 200 g/l in ciascuna provetta)
- Le soluzioni torbide devono essere filtrate o centrifugate
- I campioni che contengono anidride carbonica devono essere degassati

Procedura

Aggiungere nelle cuvette	Reagente Bianco (BR)	Standard	Campioni
Reagente 1 (tappo)	1680 µl	1680 µl	1680 µl
Acqua bi-distillata	100 µl	-	-
Standard (bottiglia 3)	-	100 µl	-
Campione	-	-	100 µl
Mescolare con precauzione. Leggere l'assorbanza A ₁ dopo 5 minuti a +25 - +37 °C.			
Reagente 2 (Ferene-S)	320 µl	320 µl	320 µl
Mescolare con precauzione. Leggere l'assorbanza A ₂ dopo 10 minuti a +25 - +37 °C. Il colore è stabile ca. 30 min a t° ambientale			

Calcolo dei risultati

$$\Delta A = (A_2 - df \times A_1)_{\text{campione o standard}} - (A_2 - df \times A_1)_{\text{RB}}$$

con df = fattore di diluizione delle densità ottiche in base ai volumi dei reagenti o del campione:

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

$$e \quad C_{\text{campione}} [\text{mg/L}] = \frac{C_{\text{standard}} [\text{mg/L}]}{\Delta A_{\text{standard}}} \times \Delta A_{\text{campione}}$$

Dal momento che la concentrazione dello standard è fissata a 20 mg/L, la formula di calcolo dipende dall'unità scelta:

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

$$o, C_{\text{campione}} [\mu\text{mol/L}] = 358 \times (\Delta A_{\text{campione}} / \Delta A_{\text{standard}})$$

Note

1. E' possibile eseguire variazioni proporzionali dei volumi di reazione.
2. Per concentrazioni superiori al limite di linearità, diluire il campione in modo ad essere nell'intervallo di misura necessario; ripetere la misura e moltiplicare per il fattore di diluizione.
3. Utilizzare cuvette monouso o provette molto pulite, lavate con HCl diluito e acqua distillata.
4. Specificità: il test è specifico per il ferro, non è stata rilevata alcuna interferenza.
5. Il volume del campione da utilizzare è basso, in confronto agli altri test, perchè il cromogeno Ferene-S è molto sensibile; la riduzione del volume del campione ha il vantaggio di ridurre le possibili interferenze della matrice.
6. Il test deve essere eseguito in condizioni di pH acido, pertanto non è necessario regolare il pH (ad es. per campioni di vino o dopo trattamento con acido perclorico)

Esempi supplementari d'applicazioni

- Determinazione del ferro nella farina:
 - pesare 0,8 g di farina in una provetta da 10 ml
 - aggiungere 6 - 7 ml di acido perclorico 7% (w/v)
 - agitare e mescolare per 10 min
 - portare a 10 ml con l'acido perclorico 7% (w/v)
 - mescolare per alcuni minuti ad inversione
 - centrifugare a 1700 - 2000 x g per 20 min; in alternativa è possibile eseguire la filtrazione (es. Macherey Nagel ref. 531012, MN 615 1/4, diametro 125 mm)
 - utilizzare la soluzione surnatante come campione per la determinazione del ferro

Il contenuto in ferro è calcolato con la formula seguente:

$$\text{Contenuto [g/100 g]} = \frac{C_{\text{ferro}} [\text{g/l}]}{\text{peso}_{\text{campione}} [\text{g/l}]} \times 100$$

(peso_{campione} = 80 (g/L) se il peso iniziale è di 0,8 g in 10 ml come nel nostro esempio)

Letteratura

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).

Applicazioni su analizzatori automatici

Applicazione in generale (tutti gli analizzatori)	
Temperatura	37°C (oppure 25°C)
Lunghezza d'onda	575 - 600 nm (primaria) / 700 nm (secondaria)
Tipo di test e sequenza	Sequenza di due reagenti con metodo a punto finale: - aggiunta R1 (5 vol.) + campione (20 - 50 µl) - pre-incubazione 2 - 3 min - misura A1 (prima dell'aggiunta di R2) - aggiunta R2 (1 volume) - incubazione >= 5 min à 37 °C - misura A2 - calcolo A2 - A1 contro curva di calibrazione
Calibrazione	2- 5 standard da 0 a 10 mg/l Curva di calibrazione lineare
Reagente Bianco	Si
Reattivi	R1 e R2 in un rapporto di volume di 5 a 1
Campioni	20 µl per sensibilità bassa (0 - 20 mg/l) 50 µl per sensibilità alta (0 - 10 mg/l)

Esempio Konelab / Arena (software inglese)			
Test Definition:			
Full name	Enzytec Iron		
Online name	#		
Test used	yes		
Test type	Photometric		
Result unit	mg/l		
Number of decimals	1		
Temperature	37 °C		
	Low	High	Unit
Test limit	0	20	mg/l
Initial absorbance	0.000	2.000	E
Dilution limit	0	20	mg/l
Secondary dilution 1 +	#	#	
Acceptance	Automatic		
Dilution 1 +	0.0		
Sample type	Wine (Other)		
Correction factor	1.00		
Correction bias	0.00		
Calibration parameter			
Calibration type	Linear		
Curve direction	Ascending		
Repeat time (d)	1	Err. (mA)	#
Points/calibrator	simple	Err. (%)	#
Acceptance	Automatic		
Response limit min/max	# / #		
Bias correction in use	No		
Type of calibrators	Series	(separate is also possible)	
Calibrator identification	Iron calibrator (20 mg/l)		
Concentrations	0 to 10 mg/l		
Distribution			
Additional blank	YES (or fixed time)	Antigen excess	No
Reagent 1 volume (µl)	ENZYT Iron R1		
dispense with wash reagent	Water	Volume (µl)	10
Sample volume (µl)	15	(adjust to sensitivity needs)	
dispense with wash reagent	Water	Volume (µl)	10
Incubation (sec)	None		
Measurement BLANK response min./max	180		
Reagent 2 volume (µl)	End-point		
wash reagent	# / #		
dispense with	ENZYT Iron R2		
Incubation (sec)	25		
Measurement	None		
λ 1 / λ 2 (nm)	Water	Volume (µl)	10
measurement type	300		
	End-point		
	600 / 700	575 / 700 is also possible	
	Fixed timing		

Esempio Lisa 200 (software inglese)	
Full Test name	Enzytec Iron Ferene
Short name	Iron
Units	mg/l
Type of test	End-point calibration
Filter (nm)	580
1st reading = zero	NO (A1 must be measured for each sample)
Waiting time 1 (tours before addition of R2)	4 (4 tours = 4 x 24 sec.)
Number of measurements (= incubation time)	15 (15 tours x 24 sec = 6 min)
Reagent 1 VOL (µl)	250
DIL (µl)	0
POS	#
Reagent 2 VOL (µl)	45
DIL (µl)	0
POS	#
Sample. VOL (µl)	20 - 50 µl (adjust to sensitivity needs)
DIL	0
Starter (of reaction)	REAGENT 2
Waiting time 2 (tours after addition of R2)	0 (measurements start immediately after addition of R2)
Calibration	1 degree (= linear calibration; 2 degrees = non-linear calibration is also possible)
Blank = Standard	YES (water used for blank is used as 1 st point of the calibration curve)
Number of standards	3
Standard 1 VAL (mg/l)	2 (= example with 2 mg/l)
POS	# (position on the instrument)
Standard 2 VAL (mg/l)	5 (= example with 5 mg/l)
POS	#
Standard 3 VAL (mg/l)	10 (= example with 10 mg/l)
POS	#
Nb repeat Sample/Control	1 (number of repetitions ; it is possible to choose 2)
Control VAL (mg/l)	# (concentration of QC sample)
POS	# (position on the instrument)
DEV	# (deviation accepted)
Pre-dilution	1
Post-dilution	4
Sample diluents	Physiologic solution
Type rincing	3
Normal values UPPER	20 (in mg/l)
LOWER	0
Limit linearity	20 (in mg/l)
Blanc OD limit LOWER	0
UPPER	500

value entered by the operator

Esempio Hitachi 717 (software inglese)	
TEST	[IRON]
ASSAY CODE	[2POINTS] - [24] - [50]
SAMPLE VOLUME (µl)	[30] - [5] (adjust to sensitivity needs)
REAGENT VOLUME R1	[250] - [50] - [NO]
REAGENT VOLUME R2	[40] - [20] - [NO] (can be lower)
WAVELENGTH	[700] [600]
CALIBRATION TYPE	[LIN] [1] [4]
STD.(1) CONC. POS.	[0] - [1] (example)
STD.(2) CONC. POS.	[2] - [2] (2 mg/l =example)
STD.(3) CONC. POS.	[5] - [3] (5 mg/l =example)
STD.(4) CONC. POS.	[10] - [4] (10 mg/l =example)
SD LIMIT	[0.1]
DUPLICATE LIMIT	[#]
SENSITIVITY LIMIT	0
LIMITE D.O (CINET)	[0] - [INCR.]
PROZONE CHECK	[32000] - [1]
EXPECTED VALUE	[#] - [#]
PANIC VALUE	[#] - [#]
INSTRUMENT FACTOR	[1.0]