

Prueba colorimétrica para la cuantificación de hierro en vino y alimentos  
4 x 100 ml (200 pruebas)

Para uso "in vitro" solamente  
Conservar entre +2 y +8°C

**Principio**

El hierro se disocia de las proteínas en condiciones particulares de fuerza iónica y se reduce al estado bivalente gracias al ácido ascórbico. Luego reacciona con el reactivo cromogénico FERRENE-S generando un complejo estable azul, cuya intensidad de color es proporcional a la cantidad de hierro presente en la muestra.

**Especificaciones**

Longitud de onda: 582 nm (575 – 582 nm)  
Cubetas: 1,00 cm (vidrio; plástico)  
Temperatura: 25 – 37°C  
Método: Punto final  
Tiempo de reacción: 15 minutos  
Medida: contra aire o agua  
Linealidad: 2 – 40 mg/L

**Reactivos**

- # 1: Tampón, 4 frascos con aprox. 84 ml cada uno (> 0,1 mol/L)
- # 2: Ferrene-S, 4 frascos con aprox. 16 ml cada uno (Ferrene-S > 0,1 mmol/L; ácido ascórbico > 0,1 mol/L).
- # 3: Calibrador, 1 x 5 ml (Hierro iónico = 20 mg/l).

Los reactivos están listos para utilizar. Son estables a 2-8 °C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, si no se contaminan durante su uso.

Dejar que los reactivos alcancen la temperatura de trabajo (20 – 25 °C). Mezclar suavemente antes y cerrar cuidadosamente después de utilización.

Los reactivos no son peligrosos. Se deben seguir las normas habituales de trabajo del laboratorio. Luego de su uso, los reactivos pueden eliminarse como residuos de laboratorio. Los embalajes pueden reciclarse.

**Preparación de las muestras**

- El vino puede utilizarse directamente.
- Utilizar muestras claras y a pH neutro directamente si la concentración de hierro es entre 2 a 40 mg/L; si no, diluir la muestra con agua hasta ese rango
- Las muestras muy coloreadas deben tratarse al PVPP (polivinilpirrolidona a 0,1 g/100 ml de muestra)
- Para las aplicaciones en autoanalizadores bioquímicos, recomendamos añadir el PVP (polivinilpirrolidona) a una concentración final de 5 g/l en el reactivo R1 (2,1 ml de una solución madre de 200 g/l en cada frasco)
- Las soluciones turbias deben filtrarse o centrifugarse
- Las muestras que contienen gas carbónico deben desgasificarse

**Procedimiento**

Pipetear en las cubetas:	Blanco reactivo (BR)	Control	Muestras
Tampón (Reactivo 1)	1680 µl	1680 µl	1680 µl
Agua Bidestilada	100 µl	-	-
Calibrador (frasco 3)	-	100 µl	-
Muestra	-	-	100 µl
Mezclar con precaución. Leer la absorbancia A <sub>1</sub> después de 5 minutos a +25 – +37 °C.			
Reactivo 2 (Ferrene-S)	320 µl	320 µl	320 µl
Mezclarse con precaución. Leer la absorbancia A <sub>2</sub> después de 10 min a +25 – +37 °C. El color es estable aprox. 30 min a t° ambiente			

**Cálculo de los resultados**

$$\Delta A = (A_2 - df \times A_1)_{\text{muestra o control}} - (A_2 - df \times A_1)_{\text{BR}}$$

Donde df = factor de dilución de las densidades ópticas a causa de los volúmenes de reactivos o de muestra:

$$df = (\text{muestra} + R) / (\text{muestra} + R + R) = 0,848$$

$$y \quad C_{\text{muestra}} [\text{mg/L}] = \frac{C_{\text{control}} [\text{mg/L}]}{\Delta A_{\text{control}}} \times \Delta A_{\text{muestra}}$$

Como la concentración del control es 20 mg/L, esto da el siguiente cálculo:

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

**Notas**

1. Una variación proporcional de los volúmenes de reacción no modifica el resultado del ensayo.
2. Para concentraciones superiores al límite de linealidad, diluir la muestra, repetir el ensayo y multiplicar el resultado por el factor de dilución.
3. Utilizar cubetas desechables ó tubos limpios lavados con HCl diluido y agua destilada.
4. Especificidad: el ensayo es específico para hierro, no se detectaron interferencias.
5. El volumen muestra es bajo comparado con otros ensayo ya que el cromógeno Ferrene-S es muy sensible; un pequeño volumen de muestra tiene la ventaja de reducir las posibles interferencias de la matriz.
6. El ensayo se desarrolla en condiciones de pH ácido, por lo tanto no es necesario ajustar el pH (por ejemplo. para muestras de vino o después del tratamiento con ácido perclórico)

**Ejemplos de aplicaciones adicionales**

- Determinación de hierro en la harina suplementada:
  - pesar con precisión 0,8 g de harina en un tubo de 10 ml
  - añadir 6 - 7 ml de ácido perclórico 7% (w/v)
  - agitar y mezclar durante 10 min
  - llenar a volumen (10 ml) con ácido perclórico 7%
  - mezclar varias veces por inversión
  - centrifugar a 1700 - 2000 x g durante 20 min; es posible filtrar (ej. Macherey Nagel ref. 531012, MN 615 1/4, diámetro 125 mm.)
  - utilizan el sobrenadante o filtrado para el ensayo

El contenido en hierro se calcula con la fórmula:

$$\text{Contenido [g/100 g]} = \frac{C_{\text{hierro}} [\text{g/l}]}{\text{peso}_{\text{muestra}} [\text{g/l}]} \times 100$$

(peso<sub>muestra</sub> = 80 (g/L) si el peso inicial es de 0,8 g en 10 ml como en nuestro ejemplo)

**Literatura**

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).

Aplicaciones para autoanalizadores bioquímicos

<b>Aplicación general (para cualquier autoanalizador)</b>	
Temperatura	37°C (25°C es posible tambien)
Longitud de onda	575 - 600 nm (primaria) / 700 nm (secundaria)
Tipo de prueba y secuencia	Medición a punto final en Bireactivo: - pipetear R1 (5 vol.) + muestra (20 - 50 µl) - preincubación 2 - 3 min - medición A1 ((antes de la adición de R2) - pipetear R2 (1 vol.) - incubación >= 5 min a 37 °C - medición A2 - calculo A2 - A1 contra la curva de calibración
Calibración	2 - 5 estándares de 0 a 10 mg/l Curva de calibración lineal
Blanco reactivo	Sí
Reactivos	R1 y R2 en una relación aprox. 5 a 1
Muestras	20 µl para baja sensibilidad (de 0 - 20 mg/l) 50 µl para alta sensibilidad (de 0 - 10 mg/l)

**Ejemplo Konelab / Arena (Software ingles)**

<b>Test Definition:</b>			
Full name	Enzytec Iron		
Online name	#		
Test used	yes		
Test type	Photometric		
Result unit	mg/l		
Number of decimals	1		
Temperature	37 °C		
Test limit	Low	High	Unit
Initial absorbance	0	20	mg/l
Dilution limit	0.000	2.000	E
Secondary dilution 1 +	0	20	mg/l
Acceptance	#	#	
Dilution 1 +	Automatic		
Sample type	0.0		
Correction factor	Wine (Other)		
Correction bias	1.00		
	0.00		
<b>Calibration parameter</b>			
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 (es posible tb. individual)		
Calibrator identification	Iron calibrator (20 mg/l)		
Concentrations	0 to 10 mg/l		
<b>Distribution</b>			
Additional blank	YES (or fixed time)	Antigen excess	No
Reagent 1 volume (µl)	ENZYT Iron R1		
dispense with wash reagent	150	Volume (µl)	10
Sample volume (µl)	Water	(ajustar a la sensibilidad requerida)	
dispense with wash reagent	None	Volume (µl)	10
Incubation (sec)	15		
Measurement BLANK response min./max	Water		
Reagent 2 volume (µl)	None		
wash reagent dispense with	180		
Incubation (sec)	End-point		
Measurement	# / #		
λ 1 / λ 2 (nm)	ENZYT Iron R2		
measurement type	25		
	None		
	Water	Volume (µl)	10
	300		
	End-point		
	600 / 700	575 / 700 es posible tb.	
	Fixed timing		

**Ejemplo Lisa 200 (Software ingles)**

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 debe medirse para cada muestra)	
Waiting time 1 (ciclos antes de la adición de R2)	4 (4 ciclos = 4 x 24 sec.)	
Number of measurements (= tiempo de incubación)	15 (15 ciclos 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 (ajustar a la sensibilidad necesaria)
	DIL	0
Starter (de la reacción)	REAGENT 2	
Waiting time 2 (ciclos luego de la adición de R2)	0 (la medición se inicia inmediatamente luego de la adición del R2)	
Calibration	1 degree (= calibración lineal; 2 degrees = es posible calibración no lineal)	
Blank = Standard	YES (el agua utilizada como blanco se usa como 1er punto de la curva de calibración)	
Number of standards	3	
Standard 1	VAL (mg/l)	2 (= ejemplo con 2 mg/l)
	POS	# (posición en el equipo)
Standard 2	VAL (mg/l)	5 (= ejemplo con 5 mg/l)
	POS	#
Standard 3	VAL (mg/l)	10 (= ejemplo con 10 mg/l)
	POS	#
Nb repeat Sample/Control	1 (número de repeticiones; es posible elegir 2)	
Control	VAL (mg/l)	# (concentración de la muestra de QC)
	POS	# (posición en el equipo)
	DEV	# (desviación aceptada)
Pre-dilution	1	
Post-dilution	4	
Sample diluents	Solución fisiológica	
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

# valor ingresado por el operador

**Ejemplo Hitachi 717 (Software ingles)**

TEST	[IRON]
ASSAY CODE	[2POINTS] - [24] - [50]
SAMPLE VOLUME (µl)	[30] - [5] (ajustar a la sensibilidad requerida)
REAGENT VOLUME R1	[250] - [50] - [NO]
REAGENT VOLUME R2	[40] - [20] - [NO] (puede ser menor)
WAVELENGTH	[700] [600]
CALIBRATION TYPE	[LIN] [1] [4]
STD.(1) CONC. POS.	[0] - [1] (ejemplo)
STD.(2) CONC. POS.	[2] - [2] (2 mg/l =ejemplo)
STD.(3) CONC. POS.	[5] - [3] (5 mg/l =ejemplo)
STD.(4) CONC. POS.	[10] - [4] (10 mg/l =ejemplo)
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]