

Colorimetrischer Test für die Bestimmung von Eisen in Wein und andere Lebensmittel  
4 x 100 ml (200 Tests)

Nur für den Laborgebrauch  
Lagerung bei 2 - 8 °C

**Testprinzip**

Eisen (Fe<sup>+3</sup>) wird unter starken ionischen Bedingungen aus den Proteinen herausgelöst und mit Ascorbinsäure zu Fe<sup>+2</sup> reduziert. Danach reagiert es mit dem Chromogen Ferene-S und bildet dabei einen stabilen Komplex in blauer Farbe. Die Intensität der Farbe ist proportional zu der Konzentration des Eisens in der Probe.

**Test Spezifikationen**

Wellenlänge: 582 nm (575 - 582 nm)  
Schichtdicke: 1,00 cm (Glas; Plastik)  
Temperatur: 20 bis 37 °C  
Methode: Endpunkt-Messung  
Inkubationszeit: 15 min  
Messung: gegen Luft oder Wasser  
Linearität: 2 - 40 mg/l

**Reagenzien**

- # 1: Puffer, 4 Flaschen mit jeweils ca. 84 ml (Puffer > 0,1 mol/l)
- # 2: Ferene-S, 4 Flaschen mit jeweils ca. 16 ml (Ferene-S > 0,1 mmol/l; Ascorbinsäure > 0,1 mol/l)
- # 3: Standard, 1 Flasche mit ca. 5 ml (Eisen 20 mg/l)

Alle Reagenzien sind gebrauchsfertig. Sie sind bei 2 - 8 °C bis zum Ende der Haltbarkeit stabil (siehe Etikett), wenn während des Laboreinsatzes keine Kontamination erfolgt.

Reagenzien vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur bringen (20 - 25 °C). Vor dem Einsatz vorsichtig mischen. Nach dem Gebrauch sofort wieder verschließen.

Die Reagenzien sind nicht gefährlich. Die allgemeinen Regeln beim Arbeiten in chemischen Laboratorien müssen beachtet werden. Nach Gebrauch die Reagenzien mit dem Laborabfall entsorgen. Das Verpackungsmaterial kann dem Recycling zugeführt werden.

**Probenvorbereitung**

- Weinproben können direkt eingesetzt werden.
- Farblose, flüssige und neutrale Proben unverdünnt einsetzen, wenn die Eisenkonzentration zwischen 2 - 40 mg/l liegt; ansonsten mit Wasser bis in diesen Konzentrationsbereich verdünnen.
- Stark gefärbte Proben mit PVPP (Polyvinyl-Polypyrrolidone z.B. 1 g/100 ml Probe) vorbehandeln.
- Für die Applikation auf Automaten wird empfohlen PVP (Polyvinyl-Pyrrolidone) in einer Konzentration von final 5 g/l dem Reagenz 1 zuzusetzen (2,1 ml einer 200 g/l PVP-Stamm-lösung in jede Flasche R1 pipetieren)
- Trübe Lösungen filtrieren oder zentrifugieren
- Proben mit Kohlendioxid müssen zuerst entgast werden

**Testdurchführung**

In Küvetten pipetieren	Reagenzien Blank (RB)	Standard	Proben
Reagenz 1 (Puffer)	1680 µl	1680 µl	1680 µl
Bidest. Wasser	100 µl	-	-
Reagenz 3 (Standard)	-	100 µl	-
Probe	-	-	100 µl
Sorgfältig mischen, 5 min bei 25 - 37 °C inkubieren, Extinktion E <sub>1</sub> messen, dann hinzufügen:			
Reagenz 2 (Ferene-S)	320 µl	320 µl	320 µl
Sorgfältig mischen, 10 min bei 25 - 37 °C inkubieren und Extinktion E <sub>2</sub> messen. Die Farbe ist 30 min bei Raumtemperatur stabil.			

**Berechnung**

$\Delta E = (E_2 - df \times E_1)_{\text{Probe oder Standard}} - (E_2 - df \times E_1)_{\text{RB}}$   
mit df = Verdünnungsfaktor der Extinktionen durch die Reagenzienvolumina:

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

und  $C_{\text{Probe}} [\text{mg/l}] = \frac{C_{\text{Standard}} [\text{mg/l}]}{\Delta E_{\text{Standard}}} \times \Delta E_{\text{Probe}}$

Die Konzentration des Standards ist auf 20 mg/l eingestellt, somit ergibt sich die folgende Berechnungsformel:

$C_{\text{Probe}} [\text{mg/l}] = (\Delta E_{\text{Probe}} / \Delta E_{\text{Standard}}) \times 20$   
oder  $C_{\text{Probe}} [\mu\text{mol/l}] = (\Delta E_{\text{Probe}} / \Delta E_{\text{Standard}}) \times 358$

**Hinweise**

1. Eine proportionale Änderung der Volumina hat keinen Einfluss auf die Ergebnisse.
2. Einweg-Küvetten benutzen, oder saubere Glass-Küvetten, die mit verdünnter HCl und anschließend bidest. Wasser gereinigt wurden.
3. Spezifität: der Test ist spezifisch für Eisen, es wurden keine Interferenzen festgestellt.
4. Das Probenvolumen ist im Vergleich zu anderen Testsystemen gering, da das Chromogen (Ferene-S) sehr sensitiv ist; das geringe Probenvolumen hat den Vorteil, dass Interferenzen durch die Probenmatrix reduziert werden
5. Der Test findet unter sauren Bedingungen statt, so dass in den meisten Fällen keine Einstellung des pH-Wertes notwendig ist (z.B. bei Weinproben oder bei anderen Proben nach der Perchlorsäure Behandlung)

**Zusätzliche Applikationsbeispiele**

- Bestimmung von Eisen in Mehl:
  - genau 0,8 g Mehl in ein verschließbares Zentrifugenröhrchen einwiegen
  - mit 6 - 7 ml Perchlorsäure 7 % (w/v) resuspendieren
  - mischen und 10 min schütteln
  - mit Perchlorsäure 7 % (w/v) auf 10 ml auffüllen
  - einige min über Kopf mischen
  - bei 1700 - 2000 g für 20 min zentrifugieren, alternativ filtrieren (z.B. Macherey Nagel Nr. 531012, MN 615 1/4, Durchmesser 125 mm)
  - Überstand bzw. Filtrat im Test einsetzen

Der Eisengehalt wird mit nachstehender Formel berechnet:

$\text{Eisengehalt [g/100 g]} = \frac{C_{\text{Eisen}} [\text{g/l}]}{\text{Einwaage}_{\text{Probe}} [\text{g/l}]} \times 100$

(Einwaage<sub>Probe</sub> = 80 g/l in unserem Beispiel (0,8 g in 10 ml))

**Literatur**

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)

**Applikationen für Automaten**

<b>Allgemeine Rahmenbedingungen (alle Geräte)</b>	
Temperatur	37 °C (25 °C ist auch möglich)
Wellenlänge	575 - 600 nm (primär) / 700 nm (sekundär)
Testschritte	Endpunkt-Messung mit 2 Reagenzien: <ul style="list-style-type: none"> <li>- R1 (5 Vol.) + Probe (20 - 50 µl) pipetieren</li> <li>- Vorinkubation 2 - 3 min</li> <li>- E1-Messung (vor Zugabe von R2)</li> <li>- R2 (1 Vol.) pipetieren</li> <li>- Inkubation &gt;= 5 min bei 37 °C</li> <li>- E2-Messung</li> <li>- Berechnung E2-E1 gegen Eichkurve</li> </ul>
Kalibrierung	2 - 5 Kalibratoren zwischen 0 und 10 mg/l lineare Eichkurve
Reagenz Blank	ja
Reagenzien	R1 und R2 im Verhältnis ca. 5 zu 1
Probenvolumen	20 µl für geringere Sensitivität (0 - 20 mg/l) 50 µl für mehr Sensitivität (0 - 10 mg/l)

<b>Beispiel: Konelab / Arena</b>			
<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 0	High 20	Unit 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		
<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 (separate is also possible)		
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	ENZYT Iron R1		
volume (µl)	150		
dispense with	Water	Volume (µl)	10
wash reagent	None		
Sample volume (µl)	15	(adjust to sensitivity needs)	
dispense with	Water	Volume (µl)	10
wash reagent	None		
Incubation (sec)	180		
Measurement BLANK	End-point		
response min./max	# / #		
Reagent 2	ENZYT Iron R2		
volume (µl)	25		
wash reagent	None		
dispense with	Water	Volume (µl)	10
Incubation (sec)	300		
Measurement	End-point		
λ 1 / λ 2 (nm)	600 / 700	575 / 700 is also possible	
measurement type	Fixed timing		

<b>Beispiel: Lisa 200</b>		
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 <sup>st</sup> 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 rinsing	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

<b>Beispiel: Hitachi 717</b>	
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]