

## 亚铁离子含量检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号：BC5410

规格：50T/48S

**产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。**

| 试剂名称 | 规格           | 保存条件   |
|------|--------------|--------|
| 试剂一  | 液体 80mL×1 瓶  | 2-8℃保存 |
| 试剂二  | 液体 30 mL×1 瓶 | 2-8℃保存 |
| 标准品  | 粉剂×1 支       | 2-8℃保存 |

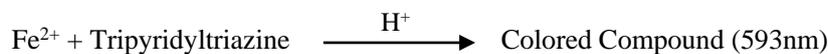
溶液的配制：

1. 标准品：10mg FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O，临用前加入 900μL 蒸馏水和 20μL 浓硫酸，充分混匀，配制成 40 mmol/L 标准液，2-8℃可保存 2 周。

### 产品说明：

铁是人体必需的微量元素之一，对于维持机体正常生理功能具有重要作用。亚铁离子是血红蛋白、肌红蛋白、细胞色素及其他酶系统的重要组成成分，帮助氧的运输，促进脂肪氧化。缺乏铁元素容易造成贫血、代谢紊乱，并影响机体的免疫功能。铁过量是引发或加剧多种慢性病（如糖尿病、心脑血管疾病、神经退化性疾病等）的危险因素。

样本中的Fe<sup>2+</sup>在酸性条件下与三吡啶基三嗪形成蓝色配合物，在593nm处有吸收峰，通过测定该波长吸光度即可计算Fe<sup>2+</sup>的含量。



**注意：**实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

### 需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、天平、低温离心机、水浴锅/恒温培养箱、1mL玻璃比色皿、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、可调式移液枪、涡旋震荡仪、冰、蒸馏水、浓硫酸和氯仿。

### 操作步骤：

#### 一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 组织：按照组织质量（g）：试剂一体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一）进行冰浴匀浆。10000g，4℃离心 10min，取上清置冰上待测。
2. 细菌/细胞：按照细胞数量（10<sup>4</sup> 个）：试剂一体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 试剂一），冰浴超声波破碎细胞（功率 200W，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 5min）；然后 10000g，4℃离心 10min，取上清置于冰上待测。
3. 血清（浆）等液体样本：直接测定。若有浑浊请离心后取上清待测。

#### 二、测定步骤

1. 可见分光光度计预热30min以上，调节波长至593nm，蒸馏水调零。

2. 标准溶液的稀释：取10 $\mu$ L 40 mmol/L标准液，加入990 $\mu$ L蒸馏水，混匀得到400  $\mu$ mol/L标准液，将400  $\mu$ mol/L标准液用试剂一进行稀释得到100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.5625 $\mu$ mol/L的标准液备用，注意标准溶液需要现用现配。

3. 标准溶液稀释可参考下表：

| 序号 | 稀释前浓度 ( $\mu$ mol/L) | 标准液体积 ( $\mu$ L) | 试剂一体积 ( $\mu$ L) | 稀释后浓度 ( $\mu$ mol/L) |
|----|----------------------|------------------|------------------|----------------------|
| 1  | 400                  | 500              | 1500             | 100                  |
| 2  | 100                  | 1000             | 1000             | 50                   |
| 3  | 50                   | 1000             | 1000             | 25                   |
| 4  | 25                   | 1000             | 1000             | 12.5                 |
| 5  | 12.5                 | 1000             | 1000             | 6.25                 |
| 6  | 6.25                 | 1000             | 1000             | 3.125                |
| 7  | 3.125                | 1000             | 1000             | 1.5625               |

备注：实验中每个标准管需800 $\mu$ L标准液。

4. 在1.5mL离心管中按下表步骤加样：

| 试剂名称 ( $\mu$ L)  | 测定管 | 标准管   | 空白管 |
|--|-----|---|-----|
| 样本   | 800 | -   | -   |
| 标准液  | -   | 800   | -   |
| 试剂一  | -   | -   | 800 |
| 试剂二  | 400 | 400   | 400 |
| 充分混匀，37 $^{\circ}$ C静置10min  |     |   |     |
| 氯仿   | 200 | -   | -   |
| 充分涡旋震荡5min，之后12000g常温离心10min，小心吸取上层无机相800 $\mu$ L于1mL玻璃比色皿，测定593nm处吸光值，记为A测定，计算 $\Delta A$ 测定=A测定-A空白。 |     | 于593nm处吸光值，记为A标准、A空白，计算 $\Delta A$ 标准= A标准-A空白。空白管和标准曲线只需测1-2次。 |     |

### 三、亚铁离子含量计算

#### 1. 标准曲线的绘制：

根据标准管的浓度 ( $x$ ,  $\mu$ mol/L) 和吸光度 $\Delta A$ 标准 ( $y$ ,  $\Delta A$ 标准)，建立标准曲线。根据标准曲线，将 $\Delta A$ 测定 ( $y$ ,  $\Delta A$ 测定) 带入公式计算样本浓度 ( $x$ ,  $\mu$ mol/L)。

#### 2. 亚铁离子含量的计算：

(1) 按血清(浆)等液体体积计算：亚铁离子含量 ( $\mu$ mol/L) =  $x$

(2) 按样本蛋白浓度计算：亚铁离子含量 ( $\mu$ mol/mg prot) =  $x \times 10^{-3} \times V_{\text{提取}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{提取}}) = 0.001x \div C_{\text{pr}}$

(3) 按样本质量计算：亚铁离子含量 ( $\mu$ mol/g 质量) =  $x \times 10^{-3} \times V_{\text{提取}} \div W = 0.001x \div W$

(4) 按细胞/细菌数量计算：亚铁离子含量 ( $\mu$ mol/ $10^6$  cell) =  $x \times 10^{-3} \times V_{\text{提取}} \div N = 0.001x \div N$

$V_{\text{提取}}$ ：加入试剂一的体积，1mL； $C_{\text{pr}}$ ：蛋白质浓度，mg/mL； $W$ ：样本质量，g； $N$ ：细菌或细胞总数，以 $10^6$ 计； $10^3$ ：单位换算系数， $1\mu$ mol/L =  $10^{-3}\mu$ mol/mL。

#### 注意事项：

1. 用试剂一稀释得到的标准液容易失效，建议现用现配。

2. 如果 $\Delta A$ 测定过低或测定管吸光值接近空白管，可以增加样本量后再进行测定；如果 $\Delta A$ 测定大于1，建议将样本用试剂一适当稀释后再进行测定。注意同步修改计算公式。

#### 实验实例：

- 1、取 0.1026g 小鼠肝脏样本，加入 1mL 试剂一，冰浴匀浆，离心后取上清按照测定步骤操作，使用 1mL 玻璃比色皿测得计算  $\Delta A$  测定=A 测定-A 空白=0.315-0.01=0.305，根据标准曲线  $y=0.0104x-0.008$ ， $R^2=0.9948$ ，计算  $x=30.096$ ，按样本质量计算：

亚铁离子含量 ( $\mu\text{mol/g}$  质量) =  $0.001x \div W = 0.293 \mu\text{mol/g}$  质量。

- 2、取 800 $\mu\text{L}$  牛血清，按照测定步骤操作，使用 1mL 玻璃比色皿测得计算  $\Delta A$  测定=A 测定-A 空白=0.400-0.01=0.390，根据标准曲线  $y=0.0104x-0.008$ ， $R^2=0.9948$ ，计算  $x=38.269$ ，按液体体积计算：

亚铁离子含量 ( $\mu\text{mol/L}$ ) =  $x=38.269 \mu\text{mol/L}$ 。

#### 参考文献：

[1] Dong C, Yang M, Wang W. Study on spectrophotometric determination of Fe(II) and Fe(III) with 2, 4, 6-tri(2'-pyridyl)-1, 3, 5-triazine. [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2004, (01):76-78.

[2] Huang Y, Ma H, Xu J, et al. Development and Validation of Reference Methods for Determination of Serum iron. [J]. Chinese Journal of Laboratory Diagnosis, 2011, 15(03):453-457.

[3] Wang H, Liu B, Ding Z, et al. Ferene method flow injection analysis as optimized in situ analysis of dissolved iron in marine waters. [J]. Marine Sciences, 2016, 40(05):82-87.

#### 相关系列产品：

- BC1730/BC1735 血清铁浓度检测试剂盒
- BC2810/BC2815 血锌浓度检测试剂盒
- BC2860/BC2865 血清总铁结合能力 (TIBC) 检测试剂盒
- BC4350/BC4355 组织铁含量检测试剂盒

