



Vitamin B12 (Cyanocobalamin)

Mikrobiologischer Mikrotiterplatten-Test zur quantitativen Bestimmung von
Vitamin B12 (Cyanocobalamin)

Microbiological microtiter plate test to quantitate
Vitamin B12 (Cyanocobalamin)

Art. No.: P1002



In vitro Test
Lagerung bei 2 - 8°C
Storage at 2 - 8°C (35.6 - 46.4 °F)

Vertrieb / Distributor:
R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany
Tel.: +49 (0) 6151 - 81 02-0
Fax.: +49 (0) 6151 - 81 02-20



Hersteller / Manufacturer:
ifp Institut für Produktqualität GmbH, Berlin, GERMANY
Tel.: +49 (0)30 / 74 73 33 - 0
Fax.: +49 (0)30 / 74 73 33 - 4999



Anschrift :

R-Biopharm AG
An der neuen Bergstraße 17
64297 Darmstadt
www.r-biopharm.com

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Auftragsannahme

Tel.: 0 61 51 - 81 02 - 0
Fax: 0 61 51 - 81 02 - 20
E-mail: orders@r-biopharm.de

Marketing

Fax: 0 61 51 - 81 02 - 40
E-mail: info@r-biopharm.de

VitaFast®

ist ein eingetragenes Warenzeichen der ifp Institut für Produktqualität GmbH.
ifp führt auch Auftragsanalytik durch.

Hersteller: ifp Institut für Produktqualität GmbH
Wagner-Régeny-Str. 8, 12489 Berlin
GERMANY
www.produktqualitaet.com

VitaFast®

is a registered trademark of the ifp Institut für Produktqualität GmbH.
ifp also carries out contract analysis.

Manufacturer: ifp Institut für Produktqualität GmbH
Wagner-Régeny-Str. 8, 12489 Berlin
GERMANY
www.produktqualitaet.com

Kurzinformation

Einfach durchzuführender mikrobiologischer Mikrotiterplattentest zur Bestimmung des Gesamtgehaltes an Vitamin B12 (hinzugefügtes und natürliches Vitamin B12) in Lebensmitteln und pharmazeutischen Erzeugnissen. Alle benötigten Reagenzien und Standard sind im Test enthalten. Mit dem Test können 96 Bestimmungen inkl. Standards durchgeführt werden. Für die Auswertung ist ein Mikrotiterplattenphotometer (610 - 630 nm alternativ bei 540 - 550 nm) notwendig.

Probenaufarbeitung

Flüssige Proben (zugesetztes Vitamin B12):
steril filtrieren und verdünnen

Feste Proben (zugesetztes Vitamin B12):
Probe homogenisieren, extrahieren,
zentrifugieren und verdünnen

Flüssige und feste Proben (zugesetztes und natürliches Vitamin B12):
Probe homogenisieren, mit NaCN 1 %
behandeln, enzymatische Hydrolyse,
extrahieren, zentrifugieren und verdünnen

Zeitbedarf: Testdurchführung..... ca. 60 min
Auswertung.....2 min

Inkubation: 44 - 48 h im Dunkeln bei 37 °C

AOAC-RI zertifizierte Matrices:

Kindernährmittel, Cerealien, Tabletten, Mehle, Säfte und Milch

Standardbereich: 0,03 - 0,18 µg / 100 g (ml)

Bestimmungsgrenze: 0,03 µg / 100 g (ml)

Nachweisgrenze: 0,021 µg / 100 g (ml)

Wiederfindungsrate: 90 - 105 %

Intra-assay VK für Standards: < 10 %

Inter-assay VK für Standards: < 10 %

1. Testprinzip

Der VitaFast® Vitamin B12 (Cyanocobalamin) Mikrotiterplattentest ist ein mikrobiologisches Verfahren zur Bestimmung des Gesamtgehaltes an Vitamin B12 (hinzugefügtes und natürliches Vitamin B12) in Lebensmitteln und pharmazeutischen Erzeugnissen. Das mikrobiologische Testsystem ist an internationale Normen angelehnt.

Vitamin B12 wird aus dem Probenmaterial extrahiert und der Extrakt verdünnt. Das Vitamin B12 Assay-Medium und der verdünnte Extrakt werden in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte gegeben, die mit *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (*leichmannii*) beschichtet sind. *Lactobacillus delbrueckii* ist auf die Anwesenheit von Vitamin B12 angewiesen. Nach Zugabe von Vitamin B12 als Standard oder als in einer Probe enthaltenes Vitamin wächst der Keim solange, bis das Vitamin aufgebraucht ist. Die Inkubation erfolgt bei 37 °C für 44 - 48 h.

Das Wachstum von *Lactobacillus delbrueckii* in Abhängigkeit vom extrahierten Vitamin B12 wird als Trübung gemessen und mit einer Standard-Konzentrationsreihe verglichen. Die Messung erfolgt im Mikrotiterplattenphotometer bei 610 - 630 nm (alternativ bei 540 - 550 nm).

2. Packungsinhalt

Der Testkit enthält Reagenzien für die Durchführung von 96 Bestimmungen inkl. Standards. Jeder Testkit enthält:

- 1 x Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten, beschichtet mit *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (*leichmannii*)
- 3 x bidestilliertes, steriles Wasser (30 ml) für die Herstellung der Standards, Ansatz des Mediums und Verdünnung der Proben
- 3 x Vitamin B12 Assay-Medium (fest)
- 3 x Vitamin B12 (Cyanocobalamin)-Standard (fest)
- 3 x Abklebefolie (1 ganze und 2 halbe Abklebefolien, ausreichend für 3 Testansätze)
- 1 x Ersatzrahmen zum Umstecken der Mikrotiterstreifen

Anmerkung: Nach Ablauf des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.

3. Zusätzlich benötigte Reagenzien und Geräte

- **Sterilbank** (steriles Arbeiten wird empfohlen)
- **Mikrotiterplattenphotometer** 610 - 630 nm (540 - 550 nm)
- Inkubator mit dunkler Inkubationskammer, 37 °C
- Wasserbad beheizbar auf 95 °C
- pH-Meter
- Zentrifuge > 8.000 x g (falls sich Probe nicht filtrieren lässt)
- sterile Mikropipettenspitzen für Mikropipetten 20 - 200 µl; 100 - 1000 µl
- sterile Zentrifugenröhrchen mit Schraubverschluss und Graduierung (15 und 50 ml), sterile Reaktionsgefäße 1,5 oder 2,0 ml
- 500 ml Schraubglasgefäß, 100 und 1000 ml Messkolben, 100 ml Becherglas
- Sterilfilter Polyethersulfon 0,2 µm mit Spritze
- dest. oder deionisiertes Wasser für die Probenextraktion
- HCl 1,0 mol/ l und 0,1 mol/ l
- NaOH 1,0 mol/l und 0,1 mol/ l

Reagenzien zur Bestimmung des natürlichen VitaminB12 – Gehaltes

- NaCN-Lösung 1 % (100 mg NaCN (z. B. J. T. Baker 0281) in 10 ml Wasser); anstelle von NaCN kann auch KCN (z. B. J. T. Baker 0213) verwendet werden
- Taka Diastase, *Aspergillus oryzae*; (z. B. Fluka 86250)
- Acetatpuffer pH 4,5 (in ein 100 ml Becherglas mit Magnetrührer werden 0,66 g Natriumacetat wasserfrei (z. B. Merck 106268) eingewogen und mit ca. 50 ml dest. oder deionisiertem Wasser unter Rühren gelöst; anschließend werden 0,69 ml Essigsäure (> 99 %, z. B. J. T. Baker 6052) zugegeben; der pH-Wert der Lösung sollte 4,5 betragen (eventuell mit HCl 0,1 mol / l korrigieren); den Ansatz mit dest. oder deionisiertem Wasser quantitativ in einen 100 ml Messkolben überführen und mit dest. oder deionisiertem Wasser zur Marke auffüllen; der Puffer ist 1 Woche bei 2 - 8 °C lagerbar)

4. Vorsichtsmaßnahmen

- Natriumcyanid (NaCN) bzw. Kaliumcyanid (KCN) ist stark toxisch. Die Probenvorbereitung mit NaCN / KCN muss unter dem Abzug erfolgen. Beim Umgang und der Entsorgung von NaCN / KCN sind die nationalen / regionalen Vorschriften zu beachten
- das Assay-Medium kann Reizungen der Schleimhäute, Augen und Haut hervorrufen
- nach Testabschluss sind die Mikrotiterstreifen fachgerecht zu entsorgen (z. B. Autoklav)

5. Reagenzien und ihre Lagerung

Den Testkit / die Reagenzien bei 2 - 8 °C lagern.

Angesetzte Reagenzien (Standard, Medium) unmittelbar einsetzen und nach Testansatz verwerfen.

6. Probenvorbereitung

Zur Bestimmung des **zugewetzten Vitamins B12** in mit Vitamin angereicherten Festproben genügt in der Regel eine heiße Wasserextraktion. Flüssige Proben können ohne vorherigen Erhitzungsschritt steril filtriert und mit sterilem Wasser aus dem Testkit verdünnt werden.

Zur Bestimmung des **Gesamtgehaltes an Vitamin B12 (natürliches und zugewetztes)** muss die Probe durch eine enzymatische Hydrolyse und NaCN / KCN aufgeschlossen werden.

Originalproben bis zur Analyse lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahren. Es wird eine Dreifachbestimmung von Standard- und Probenlösung empfohlen. **Bei unbekanntem Probenmatrix** sollte immer mit **2 Verdünnungsstufen** des Probenextraktes gearbeitet werden. Probenextrakte am selben Tag der Herstellung verwenden und bis zur Testung dunkel aufbewahren.

Die **Probenextraktion** erfolgt mit 1 g (ml) homogenisierter Probe in 40 ml dest. oder deionisiertem Wasser bzw. Aufschlusslösung. Dies entspricht einem **Extraktionsverdünnungsfaktor von 40**. Dieser Faktor ist bereits in der Standardkurve (siehe Quality Assurance Certificate) berücksichtigt. **Bei niedrigen Vitamin B12-Konzentrationen kann die Probeneinwaage auf bis zu 5 g (ml) erhöht werden** (bei der Auswertung zu berücksichtigen).

Anmerkungen:

- Bei der Durchführung eines enzymatischen Aufschlusses wird empfohlen, einen Reagenzienblindwert mitzuführen um sicherzustellen, dass kein Vitamin B12 in den Enzymen enthalten ist. Dieser ist bei der Auswertung zu berücksichtigen.
- Dotierungen zur Probe sollten ebenfalls durchgeführt werden, um die Anwesenheit von Inhibitoren zu erkennen, da diese zu negativen Ergebnissen führen können. Eine bekannte Konzentration an Vitamin B12 wird vor der Extraktion zur Probe zugefügt. Der Gehalt der Dotierlösung sollte ungefähr der des zu erwarteten Vitamingehaltes entsprechen, um genaue Ergebnisse zu erzielen. Bei geringen Wiederfindungen kann dies die Anwesenheit eines Inhibitors anzeigen. In diesem Fall sollte die Probe stärker verdünnt werden, um den Einfluss der störenden Substanz zu eliminieren. Dotierstandards sind bei R-Biopharm erhältlich.

Es dürfen nur sterile Probenextrakte bzw. steril verdünnte Probenextrakte auf die Mikrotiterplatte pipettiert werden. Verdünnungen davon können in den Test eingesetzt werden. Verdünnungen werden grundsätzlich mit sterilem Wasser aus dem Testkit hergestellt (= **Verdünnungsfaktor**). Daher sind nach der Probenextraktion **sterile Arbeitsbedingungen und steriles Verbrauchsmaterial** notwendig. Eine Sterilfiltration des Probenansatzes bzw. Probenextraktes ist **immer** notwendig bei:

- Proben, wie Fruchtsäfte und Energy Drinks, die während der Probenaufarbeitung nicht erhitzt werden (außer wenn 30 Minuten bei 95 °C erhitzt wird)
- Proben, die Kräuter und Gewürze enthalten, sowie bei Honig und Tee
- Vitaminmische, Premixe, Tabletten (hochangereicherte Proben nach 6.3) (außer wenn 30 Minuten bei 95 °C erhitzt wird)
- niedrig vitaminkonzentrierte Proben, die stark gefärbt sind; dadurch kann die Färbung eliminiert werden
- ist eine Filtration auf Grund fester Partikel bzw. Trübung nicht möglich, wird zuvor eine Zentrifugation empfohlen (größer 8.000 x g für 5 bis 10 min)

Die Filtration von Proben kann entfallen, wenn bei der Probenaufarbeitung ein Erhitzungsschritt bei 95 °C für 30 min durchgeführt wird. Die Proben müssen trotzdem mit sterilem Wasser aus dem Testkit verdünnt werden. Das Assay-Medium muss immer steril filtriert werden.

Rechenbeispiel zu den Verdünnungsfaktoren der Probe

Feste Probe mit Sollwert 1,2 µg / 100 g (vom Hersteller vorgegeben)

Um mit der Verdünnung des Extraktes in den mittleren Bereich der Standardkurve zu gelangen, wird der Sollwert durch die Konzentration des Standard 2 dividiert.

Berechnung:

$$1,2 \mu\text{g} / 0,06 \mu\text{g} = 20$$

→ also ein Verdünnungsfaktor von 20 (1 : 20)

Verdünnungsschritte:

a) 1 : 10 → 0,1 ml Probenextrakt + 0,9 ml steriles Wasser aus dem Testkit

b) 1 : 2 → 0,5 ml aus a) + 0,5 ml steriles Wasser aus dem Testkit

6.1. Zugewetztes Vitamin B12 in flüssigen Proben (Multivitaminsäfte, Fitnessgetränke)

1 ml Probe in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführen, mit dest. oder deionisiertem Wasser exakt auf 40 ml auffüllen, schütteln, steril filtrieren (bzw. 30 min bei 95 °C im Wasserbad erhitzen und danach schnell auf unter 30 °C abkühlen) und je nach Konzentrationsgehalt in sterilen 1,5 ml (oder 2,0 ml) Reaktionsgefäßen mit sterilem Wasser aus dem Testkit weiter verdünnen.

6.2. Zugewetztes Vitamin B12 in Fruchtgummis und Zuckerwaren (Bonbons)

15 - 20 g Fruchtgummis bzw. Bonbons in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen einwiegen, ca. 40 ml dest. oder deionisiertes Wasser zugeben, bei 95 °C im Wasserbad unter schütteln lösen und schnell auf unter 30 °C abkühlen. Die Lösung quantitativ mit dest. oder deionisiertem Wasser in einen 100 ml Messkolben überführen und mit dest. oder deionisiertem Wasser zur Marke auffüllen. Das 1 g Probenmaterial entsprechende Volumen abnehmen, in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführen und mit dest. oder deionisiertem Wasser exakt auf 40 ml auffüllen, schütteln, steril filtrieren (bzw. 30 min bei 95 °C im Wasserbad erhitzen und danach schnell auf unter 30 °C abkühlen) und je nach Konzentrationsgehalt in sterilen 1,5 ml (oder 2,0 ml) Reaktionsgefäßen mit sterilem Wasser aus dem Testkit weiter verdünnen.

Beispiel: Probeneinwaage 17 g Fruchtgummis

Berechnung: $100 \text{ ml} / 17 \text{ g Probeneinwaage} = 5,88 \text{ ml} / \text{g}$

1 g Probe ist in 5,88 ml enthalten. Also werden 5,88 ml in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert und wie oben erläutert aufgearbeitet.

6.3. Zugewetztes Vitamin B12 in Tabletten, Kapseln und Vitamin- mischungen

Zuvor das Tabletten- und Kapselgewicht ermitteln (Durchschnitt von 5 - 10 Tabletten bzw. Kapseln). Tabletten im Mörser oder Mixer gut homogenisieren. Kapseln aufschneiden und aufgeschnitten extrahieren.

6.3.1 Probeneinwaage mit 1 g und Vorextraktion

1 g einer Tablette, Vitaminmischung oder Premix bzw. eine aufgeschnittene Kapsel (Kapselgewicht berücksichtigen) in ein 500 ml Schraubglasgefäß genau einwiegen, mit ca. 400 ml dest. oder deionisiertem Wasser versetzen, 500 µl einer 1 %igen NaCN-Lösung (frisch hergestellt) zugeben und gut schütteln. 30 min bei 95 °C (Wasserbad) extrahieren. Währenddessen mindestens 5 mal gut schütteln.

Die Probelösung schnell auf unter 30 °C abkühlen, mit dest. oder deionisiertem Wasser quantitativ in einen 1000 ml Messkolben überführen und mit dest. oder deionisiertem Wasser zur Marke auffüllen. 1 ml davon in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführen, mit dest. oder deionisiertem Wasser exakt auf 40 ml auffüllen, schütteln, steril filtrieren (bzw. 30 min bei 95 °C im Wasserbad erhitzen und danach schnell auf unter 30 °C abkühlen) und in sterilen 1,5 ml (oder 2,0 ml) Reaktionsgefäßen mit sterilem Wasser aus dem Testkit je nach Konzentrationsgehalt weiter verdünnen.

Achtung: Bei der Berechnung des Ergebnisses muss der Vor – Verdünnungsfaktor (1 g auf 1000 ml) und jede weitere Verdünnung berücksichtigt werden. Der Verdünnungsschritt 1 ml auf 40 ml ist in der Standardkurve bereits berücksichtigt.

6.3.2 Probeneinwaage mit 0,2 g

0,2 g einer Tablette, Vitaminmischung oder Premix bzw. eine aufgeschnittene Kapsel (Kapselgewicht berücksichtigen) in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen genau einwiegen, mit ca. 20 ml dest. oder deionisiertem Wasser versetzen, 500 µl einer 1 %igen NaCN-Lösung (frisch hergestellt) zugeben und gut schütteln. Mit dest. oder deionisiertem Wasser quantitativ zur Marke 40 ml auffüllen und 30 min bei 95 °C (Wasserbad) extrahieren. Währenddessen mindestens 5 mal gut schütteln. Die Probelösung schnell auf unter 30 °C abkühlen, zentrifugieren und den klaren Überstand je nach Konzentrationsgehalt in sterilen 1,5 ml (oder 2,0 ml) Reaktionsgefäßen mit sterilem Wasser aus dem Testkit weiter verdünnen.

Anmerkung:

Bei der Auswertung muss die Einwaage berücksichtigt werden, da abweichend von 1 g.

6.4. Zugewetztes Vitamin B12 in Cerealien, Kindernährmitteln und Mehlen

1 g (ml) homogenisierte Probe in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen genau einwiegen, mit ca. 30 ml dest. oder deionisiertem Wasser versetzen und gut schütteln. Anschließend mit dest. oder deionisiertem Wasser auf 40 ml auffüllen und 30 min bei 95 °C (Wasserbad) extrahieren. Währenddessen mindestens 5 mal gut schütteln. Es ist darauf zu achten, dass dabei das Zentrifugenröhrchen immer fest verschlossen ist. Die Probelösung schnell auf unter 30 °C abkühlen, zentrifugieren und den klaren Überstand je nach Konzentrationsgehalt in sterilen 1,5 ml (oder 2,0 ml) Reaktionsgefäßen mit sterilem Wasser aus dem Testkit weiter verdünnen.

6.5. Gesamtvitamingehalt (natürliches und zugewetztes Vitamin B12) in Milchprodukten, Cerealien und Kindernährmitteln

Um gebundenes, natürliches Vitamin B12 mit zu erfassen oder bei nicht vitaminisierten Untersuchungsmatrices zu bestimmen, muss die Probe mit NaCN / KCN behandelt und enzymatisch aufgeschlossen werden. Die Verfahren mit zusätzlicher Behandlung von Enzymen sind in der Literatur näher beschrieben. Folgendes Aufschlussverfahren hat sich bewährt:

1 g (ml) homogenisierte Probe in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen genau einwiegen, mit 20 ml dest. oder deionisiertem Wasser und 250 µl einer 1 %igen NaCN-Lösung (frisch hergestellt) versetzen, schütteln und mit HCl einen pH-Wert von 4,5 einstellen.

Alternativ kann anstelle mit Wasser mit einem Acetatpuffer extrahiert werden (dies erfordert keine pH-Einstellung der verschiedenen Proben); zu 1 g Probe 20 ml Acetatpuffer pH 4,5 zugeben, schütteln und mit 250 µl einer 1 %igen NaCN-Lösung (frisch hergestellt) versetzen.

300 mg Taka Diastase zuwiegen, gut schütteln und 1 h bei 37 °C im Dunkeln inkubieren (gelegentlich leicht umschwenken). Danach mit dest. oder deionisiertem Wasser exakt auf 40 ml auffüllen und 30 Minuten im Wasserbad bei 95 °C erhitzen. Währenddessen mindestens 5 mal gut schütteln. Es ist darauf zu achten, dass dabei das Zentrifugenröhrchen immer fest verschlossen ist. Anschließend die Probelösung schnell auf unter 30 °C abkühlen, zentrifugieren und den klaren Überstand je nach Konzentrationsgehalt in sterilen 1,5 ml (oder 2,0 ml) Reaktionsgefäßen mit sterilem Wasser aus dem Testkit weiter verdünnen.

7. Testdurchführung

7.1. Testvorbereitungen

Flasche mit sterilem Wasser: farbigen Deckel nach oben drücken, nach hinten bis zum Glasrand abziehen und dann durch Drehen den gesamten Verschluss entfernen.

Vitamin-B12-Standards vor der Testdurchführung frisch lösen und verdünnen. Jede Verdünnungsstufe ist ausreichend für 3 Kavitäten.

- Vitamin B12-Standardflasche öffnen, Schraubverschluss mit der Öffnung nach oben ablegen
- zur Vitamin B12-Standardflasche **x ml (x = siehe Quality Assurance Certificate und Etikett Standardflasche)** steriles Wasser aus der Wasserflasche zugeben, Flasche mit Deckel verschließen und schütteln = **Standardkonzentrat**
- in 6 sterilen Reaktionsgefäßen (Fassungsvermögen 1,5 oder 2,0 ml) steriles Wasser vorlegen und anschließend Standardkonzentrat dazu pipettieren, nach folgendem Schema = **Standardkurve:**

Standardkurve* in µg / 100 g (ml)	Steriles Wasser in µl		Standard- konzentrat in µl		Gesamt- volumen in µl
Leerwert : 0	900	+	0	=	900
Standard 1: 0,030	900	+	100	=	1000
Standard 2: 0,060	400	+	100	=	500
Standard 3: 0,090	350	+	150	=	500
Standard 4: 0,120	300	+	200	=	500
Standard 5: 0,180	200	+	300	=	500

* Die Standardkurve enthält bereits den Extraktionsverdünnungsfaktor 1 : 40.

Eine **Vitamin B12 Assay-Medium-Flasche** ist ausreichend für mindestens 6 Streifen. Mediumflasche öffnen, mit einer Pinzette das Trockenmittel herausnehmen und verwerfen.

- 10 ml steriles Wasser aus dem Testkit zur Mediumflasche zugeben
- Mediumflasche fest verschließen und gut schütteln
- Mediumflasche im Wasserbad bei 95 °C für 5 min erhitzen; währenddessen mindestens 2 mal gut schütteln; es ist darauf zu achten, dass dabei die Mediumflasche immer fest verschlossen ist
- Mediumflasche schnell auf unter 30 °C abkühlen
- Medium steril über 0,2 µm Filter in ein steriles 15 ml Zentrifugenröhrchen filtrieren

7.2. Testansatz

Zum Pipettieren auf die Mikrotiterplatte dürfen nur sterile Proben, die mit sterilem Wasser aus dem Testkit verdünnt wurden, eingesetzt werden.

- die **benötigten Streifen** der Mikrotiterplatte entnehmen und in den Ersatzrahmen stecken (nicht benötigte Mikrotiterplatten-Streifen im Rahmen zusammen mit dem Trockenmittel im Folienbeutel gut verschlossen aufbewahren und bei 2 - 8 °C lagern)

Zuerst das Medium dann die Standards bzw. die Probenverdünnung wie folgt pipettieren:

- 150 µl Vitamin B12 Assay-Medium in die Kavitäten geben
- 150 µl Standard bzw. verdünnte Probe in die Kavitäten geben (Pipettenspitzen jeweils mit Standard- und Probelösung vorspülen)
- sorgfältig die Streifen / Kavitäten mit Folie luftdicht abkleben: Schutz der Folie abziehen, die Folie flach und glatt auf die Kavitäten auflegen und diese mit der Hand sorgfältig und fest auf die **Ränder der Kavitäten** andrücken bzw. aufkleben
- Inkubation bei **37 °C** im Dunkeln für **44 - 48 h** im Inkubator

7.3. Messung

- Klebefolie nochmals mit der Hand andrücken, anschließend die Platte über Kopf auf eine Tischoberfläche legen und Keime gut aufschütteln
- Platte wieder zurückdrehen, in die richtige Position legen und Folie diagonal, von oben rechts beginnend, 180° nach hinten vorsichtig abziehen; dabei mit einer Hand die **Streifen fest im Rahmen halten (Folie ist stark klebend)**

- eventuell auftretende Bläschen an der Oberfläche der Messlösungen zerstören (mit Hilfe einer Pipettenspitze oder einer Nadel)
- Messung der Trübung im Mikrotiterplattenphotometer bei 610 - 630 nm (alternativ bei 540 - 550 nm)

Hinweis:

- nach 44 - 48 h Inkubation kann die Mikrotiterplatte auch für max. 48 h im Kühlschrank aufbewahrt werden, um danach die Trübung zu messen
- um Zeitverluste durch Feiertage oder Wochenende zu vermeiden, kann die Mikrotiterplatte auch nach 60 h Inkubation ausgewertet werden. Eine Zeitschaltuhr sollte benutzt werden, um nach 44 - 48 h den Inkubator auszuschalten

8. Auswertung

Eine 4-Parameter Auswertung wird empfohlen, z. B. mit der RIDA[®]SOFT Win (auf Anfrage bei R-Biopharm erhältlich).

Der Test ist korrekt verlaufen, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind:

- OD Leerwert < OD Standard 1
- OD Standard 5 > 0,6 OD

Der **Extraktionsverdünnungsfaktor von 40** ist bei der Darstellung der Standardkurve bereits berücksichtigt. In die unten stehende Formel muss lediglich die weitere Verdünnung des Probenextraktes (Verdünnungsfaktor) sowie eine abweichende Probeneinwaage berücksichtigt werden.

$$\text{Vitamin B12} = \frac{\text{Konz. Standardkurve} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Probemenge in g (ml)}}$$

(in µg / 100 g)
(in µg / 100 ml)

Beispiel für Auswertung:

Einwaage: 1 g
 Extraktionsverdünnungsfaktor: **1 : 40 (wird nicht berücksichtigt)**
 Verdünnungsfaktor (des Probenextraktes):
 1 : 20 (muss berücksichtigt werden)
 Gemessene Konz. aus Standardkurve:
 0,06 µg Vitamin B12 / 100 g (ml)

$$0,06 * 20 / 1 = 1,2 \mu\text{g Vitamin B12} / 100 \text{ g (ml)}$$

Auswertung für Tabletten, Kapseln und Vitaminmischungen

Vitamin B12 in µg / Tablette bzw. Kapsel =

$$\frac{\text{Konz. Standardkurve} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Tabletten- bzw. Kapselgewicht in g}}{\text{Einwaage in g} \times 100}$$

Diese Angaben entsprechen dem heutigen Stand unserer Kenntnisse und sollen über unsere Produkte und deren Anwendungsmöglichkeiten informieren. Sie haben somit nicht die Bedeutung, bestimmte Eigenschaften der Produkte oder deren Eignung für einen konkreten Einsatzzweck zuzusichern. R-Biopharm übernimmt keine Gewährleistung, außer für die standardisierte Qualität der Reagenzien. Defekte Produkte werden ersetzt. Darüber hinaus gehende Ansprüche für direkte oder indirekte Schäden oder Kosten aus der Nutzung der Produkte entstehen nicht.

VitaFast[®] Vitamin B12 (Cyanocobalamin)

Brief information

Easy to use microbiological microtiter plate test for the quantification of total vitamin B12 (enriched and natural vitamin B12) in food and pharmaceutical products. All required reagents and standard are contained in the test kit. The kit is sufficient for 96 determinations incl. standard. Evaluation requires a microtiter plate reader (610 - 630 nm alternatively at 540 - 550 nm).

Sample preparation

Liquid samples (added vitamin B12):
sterile filtration and dilution

Solid samples (added vitamin B12):
sample homogenization, extraction, centrifugation
and dilution

Liquid and solid samples (added and native vitamin B12):
sample homogenization, treatment with 1%
NaCN, enzymatic extraction, centrifugation and
dilution

Time requirement: Test conductionapprox. 60 min
Evaluation..... 2 min

Incubation: 44 - 48 h in the dark at 37°C (98.6 °F)

AOAC-RI certified matrices:
infant formula, cereals, pills, powders, juice and milk

Standard range: 0.03 - 0.18 µg / 100 g (ml)

Limit of Quantitation: 0.03 µg / 100 g(ml)

Limit of Detection: 0.021 µg / 100 g (ml)

Recovery: 90 - 105 %

Intra-assay CV for standards: < 10 %

Inter-assay CV for standards: < 10 %

1. Principle of the test

The VitaFast[®] Vitamin B12 (Cyanocobalamin) microtiter plate test is a microbiological method for the quantitative determination of total vitamin B12 (added and natural vitamin B12) in food and in pharmaceutical products. The microbiological test system is in accordance with international norms.

Vitamin B12 is extracted from the sample and the extract is diluted. The vitamin B12 assay medium and the diluted extract are pipetted into the wells of a microtiter plate which is coated with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (*leichmannii*). The growth of *Lactobacillus delbrueckii* is dependent on the supply of vitamin B12. Following the addition of vitamin B12 as a standard or as a compound of the sample, the bacteria grow until the vitamin is consumed. The incubation is done in the dark at 37 °C (98.6 °F) for 44 - 48 h.

The intensity of metabolism or growth of *Lactobacillus delbrueckii* in relation to the extracted vitamin B12 is measured as turbidity and compared to a standard curve. The measurement is done using a microtiter plate reader at 610 - 630 nm (alternatively at 540 - 550nm).

2. Reagents provided

Each test kit contains sufficient materials for 96 determinations incl. standards. Each test kit contains:

- 1 x microtiter plate with 96 wells, coated with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (*leichmannii*)
- 3 x redist., sterile water (30 ml) for the preparation of standards, assay-medium and dilution of extracted samples
- 3 x vitamin B12 assay medium (solid)
- 3 x vitamin B12 (cyanocobalamin) standard (solid)
- 3 x adhesive foil (1 complete and 2 halves of adhesive foils, sufficient for 3 test runs)
- 1 x additional holder for microtiter strips

Remark:

No quality guarantee can be assumed after expiration of the shelf life.

3. Required reagents and instruments, not provided

- **sterile bench** (sterile working is recommended)
- **microtiter plate reader** 610 - 630 nm (540 - 550 nm)
- incubator with dark chamber, 37 °C (98.6 °F)
- water bath heatable to 95 °C (203 °F)
- pH meter
- centrifuge > 8000 x g (if the sample cannot be filtrated)
- sterile tips for graduated micropipette 20 - 200 µl and 100 - 1000 µl
- sterile graduated centrifuge vials with screw cap (15 and 50 ml) and sterile reaction vials 1.5 or 2.0 ml
- 500 ml screw glass jar and volumetric flasks (100 and 1000 ml), 100 ml beaker
- sterile filters polyethersulfon 0.2µm with syringe
- redist. or deionized water for sample extraction
- HCl 1.0 mol/ l and 0.1 mol/ l
- NaOH 1.0 mol/ l and 0.1 mol/ l

Reagents for the determination of native Vitamin B12

- NaCN solution 1 % (100 mg NaCN, e. g. J. T. Baker 0281, ad 10 ml water); instead of NaCN also KCN (e. g. J. T. Baker 0213) can be used
- taka diastase, aspergillus oryzae; (e. g. Fluka 86250)
- acetate buffer pH 4.5 (weigh 0.66 g sodium acetate water free (e.g. Merck 106268) in a 100 ml beaker with magnetic stirrer, solve it with approx. 50 ml redist. or deionized water under stirring; add 0.69 ml acetic acid (> 99 %, e. g. J. T. Baker 6052), the pH should be 4.5 (if necessary correct with 0.1M HCl); transfer the buffer quantitatively into a 100 ml volumetric flask and fill up to the mark with redist. or deionized water (the buffer can be stored for 1 week at 2 - 8 °C (35.6 - 46.4 °F))

4. Warning and precautions for the user

- NaCN and/or KCN are highly toxic; the sample extraction with NaCN / KCN should be performed in an exhaust hood; it is important to comply with national/regional regulations for handling and disposal of NaCN / KCN
- the assay medium could evoke irritations of mucosa, eyes and skin
- after running the test the used strips must be disposed of according to regulations (e.g. autoclaved)

5. Storage instructions

Store the kit / reagents at 2 - 8 °C (35.6 - 46.4 °F).

Use the prepared reagents (standard, medium) directly and reject them after the assay.

6. Sample preparation

For the determination of **added vitamin B12** in nutrient enriched solid samples, a hot water extraction is usually sufficient. Liquid samples can be used directly after sterile filtration and dilution with sterile water from the test kit.

For the determination of the **total vitamin B12 (native and added)** content, the sample has to be treated with NaCN / KCN and enzyme.

Samples should be stored protected from light at 4 °C (39.2 °F). Standards and samples should be run in triplicate. **Unknown sample matrices** should be analyzed **with two dilutions** of the sample extract. Sample extracts have to be used within one day and should be stored in the dark until analyzing.

Sample extraction is carried out with 1 g (ml) homogenized sample in 40 ml redist. or deionized water or extraction solution. This equals a **sample extraction dilution factor of 40**. This factor is already included in the standard curve (see Quality Assurance Certificate). **For low vitamin B12 concentrations a sample weight of up to 5 g (ml) can be used** (this has to be considered in the evaluation).

Note: when an enzymatic sample preparation is done, it is recommended to carry out a reagent blank to ensure that no vitamin B12 is present in the used reagents (enzymes).

Spike recovery studies may also be performed in order to identify the presence of any inhibitory compounds, which may negatively affect the result. An aliquot of spiking solution containing a known amount of vitamin B12 should be added to the sample prior to extracting. Spiking levels should generally be approximately 100 % of the expected vitamin content of the sample, in order to obtain an accurate result. When low spike recoveries are obtained, this may indicate the presence of an inhibitory compound. The sample should be diluted further where possible to eliminate these inhibitory effects. Spiking standards are available from R – Biopharm.

Only sterile sample extracts or sterile dilutions thereof should be pipetted onto the microtiter plate. Dilutions have to be prepared with sterile water from the test kit. **Therefore after the sample extraction sterile working conditions and sterile consumables are necessary.** A sterile filtration of the sample or the sample extract is **always** necessary for:

- samples like fruit juices and fitness drinks, which are not heated during sample extraction (except when the sample is heated 30 min at 95 °C (203 °F) in a water bath)
- samples containing herbs and spices as well as honey and tea
- vitamin mixes, premixes, tablets (highly enriched samples, see 6.3) (except when the sample is heated 30 min at 95 °C (203 °F) in a water bath)
- samples with low vitamin concentrations that are highly coloured; (the filtration step eliminates the colouring)
- if filtration is not possible due to solid particles or due to cloudiness, centrifugation should be carried out before the sterile filtration step (greater than 8000 x g for 5 min)

The sterile filtration of the sample is not necessary, if the sample extraction is carried out at 95 °C (203 °F) for 30 min. Nevertheless the extracted samples have to be diluted with sterile water from the test kit (the assay medium has to be always filtered).

Example for the dilution factors of the sample extract

Solid sample with a labeled concentration of 1.2 µg vitamin B12 / 100 g

The dilution of the extract should be in the middle of the standard curve. Therefore, the expected concentration is divided by the concentration of standard 2.

Calculation:

$$1.2 \mu\text{g} / 0.06 \mu\text{g} = 20$$

→ dilution factor 20 (1 : 20)

Dilution steps:

a) 1 : 10 → 0.1 ml sample extraction solution + 0.9 ml sterile water from the test kit

b) 1 : 2 → 0.5 ml from a) + 0.5 ml sterile water from the test kit

6.1. Added vitamin B12 in liquid samples (multivitamin juices, fitness drinks)

Add 1 ml sample into a 50 ml sterile centrifuge vial and fill up exactly to 40 ml with redist. or deionized water. Thereafter shake, sterile filter (or heat the sample 30 min at 95 °C in a water bath, thereafter chill down quickly below 30 °C (86 °F)) and, depending on the concentration range, further dilute in 1.5 ml (or 2.0 ml) sterile reaction vials with sterile water from the test kit.

6.2. Added vitamin B12 in fruit gums and candies

Weigh about 15 - 20 g fruit gums or candies in a 50 ml sterile centrifuge vial, add about 40 ml redist. or deionized water and solve the sample at 95 °C (203 °F) in water bath. Chill down quickly to below 30 °C (86 °F), transfer the extraction solution with redist. or deionized water quantitatively into a 100 ml volumetric flask and fill up to the mark with redist. or deionized water. Transfer the volume corresponding to 1 g of test material into a 50 ml centrifuge vial and fill up to 40 ml with redist. or deionized water, shake, sterile filter (or heat the sample 30 min at 95 °C in a water bath, thereafter chill down quickly below 30 °C (86 °F)) and, depending on the concentration range, further dilute in 1.5 ml (or 2.0 ml) sterile reaction vials with sterile water from the test kit.

Example: sample weight 17 g fruit gums

calculation: 100 ml / 17 g sample weight = 5.88 ml/g

1 g sample is contained in 5.88 ml. Transfer 5.88ml into a 50 ml centrifuge vial and continue as described above.

6.3. Added vitamin B12 in capsules, pills and vitamin mixes

First the capsule or pill weight has to be determined (average of 5 - 10 capsules or pills). Pills are then homogenized in a mortar or mixer. Capsules are cut open and extracted.

6.3.1 Sample preparation with 1 g sample size and pre-extraction

Weigh 1 g of pills, vitamin mix, premix or cut open capsule (take weight into consideration) into a 500 ml screw glass jar, add about 400 ml redist. or deionized water, add 500 µl of a NaCN solution (1 %, freshly prepared) and shake well. Extract for 30 minutes at 95 °C (203 °F) in a water bath. During extraction the glass jar has to be shaken well at least five times. Chill down quickly to below 30 °C (86 °F), transfer the extraction solution with redist. or deionized water quantitatively into a 1000 ml volumetric flask and fill up to the mark with redist. or deionized water. Transfer 1ml into a 50 ml sterile centrifuge vial and fill up exactly to 40ml with redist. or deionized water. Thereafter shake, sterile filter (or heat the sample 30 min at 95 °C in a water bath, thereafter chill down quickly below 30 °C (86 °F)) and, depending on the concentration range, further dilute in 1.5 ml (or 2.0 ml) sterile reaction vials with sterile water from the test kit.

Attention: For the calculation of the result, the pre-dilution factor of 1000 has to be considered (1 g up to 1000 ml). The dilution step 1 ml up to 40 ml is already included in the standard curve.

6.3.2 Sample preparation with 0.2 sample size

Weigh 0.2 g of pills, vitamin mix, premix or cut open capsule (take weight into consideration) into a 50 ml centrifuge vial, add about 20 ml redist. or deionized water, add 500 µl of a NaCN solution (1 %, freshly prepared), shake well and fill up to 40 ml with redist. or deionized water. Extract for 30 minutes at 95 °C (203 °F) in a water bath. During extraction the vial has to be shaken well at least five times. It is important to make sure that the centrifuge vial is tightly closed. Chill down quickly to below 30 °C (86 °F). Thereafter centrifuge and, depending on the concentration range,

further dilute the clear supernatant in 1.5 ml (or 2.0 ml) sterile reaction vials with sterile water from the test kit.

Note: For the evaluation the weight of sample has to be considered.

6.4. Added vitamin B12 in cereals, baby food and flour

Weigh 1 g (ml) homogenized sample into a 50 ml centrifuge vial, add about 30 ml redist. or deionized water, shake well and fill up to 40 ml with redist. or deionized water. Extract for 30 minutes at 95 °C (203 °F) in a water bath. During extraction the vial has to be shaken well at least five times. It is important to make sure that the centrifuge vial is tightly closed. Chill down quickly to below 30 °C (86 °F). Thereafter centrifuge and, depending on the concentration range, further dilute the clear supernatant in 1.5 ml (or 2.0 ml) sterile reaction vials with sterile water from the test kit.

6.5. Total vitamin content (native and added vitamin B12) in milk products, cereals and baby food

To extract the bound, native vitamin B12 as well, or to determine it in nonfortified samples, the sample has to be extracted with NaCN/KCN and enzyme. Procedures with additional treatments using enzymes are described in the literature. The following extraction procedure has proved itself:

Weigh exactly 1 g (ml) homogenized sample into a 50 ml centrifuge vial, add 20 ml redist. or deionized water and 250 µl of NaCN solution (1 %, freshly prepared). Shake and adjust pH to 4.5 with HCl.

Alternatively instead of water an acetate buffer can be used for the extraction (no pH adjustment is necessary); to 1 g sample add 20 ml acetate buffer pH 4.5 and shake; thereafter add 250 µl NaCN solution (1 %, freshly prepared).

Add 300 mg taka diastase, shake well and incubate for 1 h in the dark at 37 °C (98.6 °F) (shake at times). Fill up exactly to 40 ml with redist. or deionized water. Thereafter, heat the extract for 30 minutes in a water bath at 95 °C (203 °F). During extraction the vial has to be shaken well at least five times. It is important to make sure that the centrifuge vial is tightly closed. Chill down quickly to below 30 °C (86 °F). Thereafter centrifuge and, depending on the concentration range, further dilute the clear supernatant in 1.5 ml (or 2.0 ml) sterile reaction vials with sterile water from the test kit.

7. Test implementation

7.1. Test preparation

The bottle with sterile water: push the coloured lid up, pull off right up to the glass rim and turn entire lid to remove it.

Vitamin B12 standards should be dissolved and diluted freshly. Each dilution is sufficient for three wells.

- open the vitamin B12 standard bottle, place the lid down with the opening facing upwards
- add **x ml (x = see quality assurance certificate and label standard bottle)** sterile water (from the test kit) to the standard bottle. Close the bottle with the lid and dissolve the standard by shaking = **standard concentrate**
- take 6 sterile vials (1.5 or 2.0 ml) and prepare from the dissolved standard concentrate a **standard curve** according to the following scheme:

standard curve* in µg / 100 g (ml)	sterile water in µl		standard concentrate in µl		total volume in µl
blank: 0	900	+	0	=	900
standard 1: 0.030	900	+	100	=	1000
standard 2: 0.060	400	+	100	=	500
standard 3: 0.090	350	+	150	=	500
standard 4: 0.120	300	+	200	=	500
standard 5: 0.180	200	+	300	=	500

* the sample extraction dilution of 1 : 40 is already included in the standard curve

The **vitamin B12 assay medium** is sufficient for 6 microtiter strips. Open the assay-medium bottle and remove the desiccant using tweezers (discard the desiccant).

- add 10 ml sterile water from the test kit to the vitamin B12 assay medium bottle
- close the assay medium bottle carefully and shake well
- heat the bottle in a water bath to 95 °C (203 °F) for 5 min while shaking at least twice; always make sure that the bottle is tightly closed
- quickly chill down to room temperature below 30 °C (86 °F)
- filter the medium through a 0.2 µm filter into a sterile 15 ml centrifuge vial

7.2. Test procedure

Only sterile samples which are diluted with sterile water from the test kit should be pipetted onto the microtiter plate.

- remove the **required strips** of the microtiter plate and place them into the additional holder. Return the unused strips together with the desiccant to the foil bag and seal it well, store at 2 - 8 °C (35.6 - 46.4 °F)

Pipette first the assay medium and then standard or diluted samples, as followed:

- pipette 150 µl vitamin B12 assay medium into the wells
- pipette 150 µl standard or diluted sample into the assigned wells (flush the pipette tip with standard or sample solution)
- cover the strips / cavities with adhesive foil: pull off the protective layer of the foil, place the foil flat onto the strips, smoothing it down by hand, press the foil firmly onto the strips
important: make sure the cavities are sealed airtight by smoothing down the foil over the cavities, take special care with the wells around the edges
- incubate at **37 °C (98.6 °F)** in the dark for **44 - 48 h** in an incubator

7.3. Measurement

- press down the adhesive foil once more, place the microtiter plate upside down on a table and dissolve the microorganisms thoroughly by shaking the plate on the surface of the desk
- invert the plate to the regular position and remove the adhesive foil diagonally, 180 degrees backwards, starting from the upper right; **the foil is strongly adhesive, so pulling it off the microtiter plate must be done with great care: hold the strips firmly in the frame with one hand while you pull off the foil diagonally from the top right to the back**
- destroy any bubbles on the surface of liquid in the wells (by means of a pipette tip or a needle)
- measure the turbidity with a microtiter plate reader at 610 - 630 nm (alternatively at 540 - 550 nm)

Note:

- after 44 - 48 h of incubation, the microtiter plate can be stored for max. 48 h in the refrigerator, thereafter the turbidity should be measured
- to avoid any time losses due to weekends or bank holidays, the microtiter plate can be evaluated after 60 h. It is recommended to use a timer to turn off the incubator after 44 - 48 h

8. Evaluation

A **4-parameter** evaluation is recommended, e. g. the RIDA[®] SOFT Win from R-Biopharm.

The test evaluation is correct on the condition that

- OD blank < OD standard 1
- OD standard 5 > 0.6 OD

The sample dilution factor of 40 is already included in the standard curve (see Quality Assurance Certificate). In the below formula merely the further dilution factor of the extract and a differing sample weight need to be taken into consideration.

$$\begin{array}{l} \text{vitamin B12} = \\ \text{(in } \mu\text{g / 100 g)} \\ \text{(in } \mu\text{g / 100 ml)} \end{array} = \frac{\text{conc. standard curve} \times \text{dilution factor}}{\text{sample weight in g (ml)}}$$

Example:

Sample weight: 1 g
Sample extraction dilution: **1 : 40 (must not be considered)**
Dilution of the sample extraction: 1 : 20 (has to be considered)
Measured concentration from the standard curve: 0.06 µg vitamin B12 / 100 g (ml)

$$0.06 * 20 / 1 = 1.2 \mu\text{g vitamin B12 / 100 g (ml)}$$

Evaluation for capsules, pills, vitamin mixes

vitamin B12 in µg / pill or capsule =

$$\frac{\text{conc. standard curve} \times \text{dilution factor} \times \text{pill or capsule weight in g}}{\text{sample weight in g} \times 100}$$

R-Biopharm makes no warranty of any kind, either expressed or implied, except that the materials from which its products are made are of standard quality. If any materials are defective, R-Biopharm will provide a replacement product. There is no warranty of merchantability of this product, or of the fitness of the product for any purpose. R-Biopharm shall not be liable for any damages, including special or consequential damage, or expense arising directly or indirectly from the use of this product.

9. Literature

- Official Methods of Analysis (AOAC) 960.46
- Schweizer Lebensmittelbuch SLMB Kapitel 62/9.2.1
- The United States Pharmacopeial Convention (USP) Biological Tests / (171) Vitamin B12 Activity Assay
- AOAC 952.20 Cobalamin (Vitamin B12 Activity) in Vitamin Preparations, Microbiological Methods (1960)
- Vitamin-Bestimmungen, Verlag Chemie GmbH Weinheim/Bergstr.; Strohecker und Henning
- The Vitamins, 2. Auflage, Vol. VII. Academic Press, New York/London (1967): V. Herbert und J.R.Bertino

