

RIDASCREEN[®] FAST Vitamin B12

Art. Nr. R2103

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung
von Vitamin B12

Enzyme immunoassay for the quantitative determination
of vitamin B12

In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C
Storage at 2 - 8 °C (36 - 46 °F)

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Please contact for questions and further information:

Zentrale/Switchboard

Tel./Phone: +49 (0) 61 51 - 81 02-0

Auftragsannahme/Order department

Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20

E-Mail: orders@r-biopharm.de

Marketing & Vertrieb/Marketing & sales

Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-40

E-Mail: info@r-biopharm.de

RIDA® und RIDASCREEN®

sind eingetragene Marken der R-Biopharm AG

Hersteller: R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

RIDA® and RIDASCREEN®

are registered trademarks of R-Biopharm AG

Manufacturer: R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

Kurzinformation

RIDASCREEN®FAST Vitamin B12 (Art. Nr. R2103) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Vitamin B12 in Milch, Milchpulver, Lebensmitteln für besondere medizinische Zwecke*, Müsli und Getreideflocken, angereicherten Getreidemehlen, Vitaminpulver, -mischungen, -tabletten und Vitaminsäften.

Alle Reagenzien für die Durchführung des Enzymimmunoassays - inkl. Standards - sind im Testkit enthalten. Ein Testkit ist ausreichend für 48 Bestimmungen (einschl. Standardbestimmungen). Zur Auswertung benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

Probenvorbereitung: Milch: direkt in den Test einsetzen, eventuell verdünnen
 Säfte: direkt in den Test einsetzen, eventuell verdünnen
 andere Matrices: extrahieren, eventuell verdünnen

Zeitbedarf: Probenvorbereitung (10 Proben)..... 10 - 60 min
 Testdurchführung (Inkubationszeit).....25 min

Nachweisgrenze: 0,5 µg/L (ppb) (in der Messlösung**) (bezogen auf die Standardsubstanz)

Die Spezifität des RIDASCREEN®FAST Vitamin B12 Tests wurde durch die Bestimmung der Kreuzreaktivität zu den entsprechenden Substanzen im Puffersystem ermittelt. In Proben kann die Spezifität aufgrund von Matrixeffekten von den im Puffersystem ermittelten Ergebnissen abweichen. Vor der Analyse von kreuzreaktiven Substanzen muss deren Nachweisgrenze und Wiederfindungsrate in der jeweiligen Matrix durch den Anwender bestimmt werden. Der Test kann nicht zwischen Analyten und kreuzreaktiven Substanzen diskriminieren.

Spezifität:	Vitamin B12 (Cyanocobalamin)	100%
	Hydroxocobalamin	ca. 95%
	Methylcobalamin	ca. 95%
	Adenosylcobalamin (Coenzym B12)	ca. 91%

* Richtlinie 1999/21/EG Commission über diätetische Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke

** siehe Produktinformation

Zur Erhöhung der Prüfungsqualität bei ELISA-Verfahren verweisen wir zusätzlich auf unser ELISA-Handbuch in der jeweiligen Fassung. Dieses führt Mindeststandards hinsichtlich der Rahmenbedingungen auf, die bei der Verwendung von Testsystemen der R-Biopharm AG und der Durchführung von ELISA-Analysen mit diesen Testsystemen zu beachten sind. Das Handbuch kann unter der Webseite www.r-biopharm.com/de/produkte/lebensmittel-futtermittelanalytik abgerufen, gedruckt und gespeichert werden.

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN®FAST Vitamin B12 ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Vitamin B12 in Milch, Milchpulver, Lebensmitteln für besondere medizinische Zwecke, Müsli und Getreideflocken, angereicherten Getreidemehlen, Vitaminpulver, -mischungen, -tabletten und Vitaminsäften.

2. Allgemeines

Vitamin B12 gehört zur Gruppe der wasserlöslichen Vitamine. Es kann vom menschlichen Körper selbst nicht hergestellt werden und muss deshalb über die Nahrung aufgenommen werden. Vitamin B12 wird von unserem Körper nur in geringen Mengen benötigt, dennoch spielt es eine wichtige Rolle für das Nervensystem, hat eine Schutzwirkung für das Herz-Kreislauf-System und spielt eine bedeutende Rolle in der Nukleotid-Biosynthese, der Eisenaufnahme und dem Aminosäurestoffwechsel. Ein Mangel an Vitamin B12 kann zu perniziöser Anämie und neurologischen Symptomen führen.

3. Testprinzip

Grundlage ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Kavitäten der Mikrotiterplatte sind mit spezifischen Antikörpern gegen Vitamin B12 beschichtet. Bei Zugabe von Standard bzw. Probe und Konjugat konkurrieren freies und enzymmarkiertes Vitamin B12 um die Vitamin B12-Antikörperbindungsstellen (kompetitiver Enzymimmunoassay). Nicht gebundenes enzymmarkiertes Vitamin B12 wird anschließend in einem Waschschrift wieder entfernt. Der Nachweis erfolgt durch Zugabe von Substrat/Chromogen. Gebundenes Konjugat wandelt das Chromogen in ein blaues Endprodukt um. Die Zugabe der Stopp Lösung führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Messung erfolgt photometrisch bei 450 nm; die Extinktion der Lösung ist umgekehrt proportional zur Vitamin B12-Konzentration in der Probe.

4. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien einer Packung können 48 Bestimmungen durchgeführt werden (einschließlich Standardbestimmungen). Jeder Testkit enthält:

Komponente	Deckelfarbe	Zustand		Inhalt
Microtiter plate Mikrotiterplatte	-	gebrauchsfertig		48 Kavitäten
Sample buffer Probenpuffer	transparent	2-fach Konzentrat	2x	125 ml
Standard 1 Standard 1	weiß	gebrauchsfertig	0 µg/L (ppb)	1,3 ml
Standard 2 Standard 2	weiß	gebrauchsfertig	0,5 µg/L (ppb)	1,3 ml
Standard 3 Standard 3	weiß	gebrauchsfertig	1,5 µg/L (ppb)	1,3 ml
Standard 4 Standard 4	weiß	gebrauchsfertig	4,5 µg/L (ppb)	1,3 ml
Standard 5 Standard 5	weiß	gebrauchsfertig	12 µg/L (ppb)	1,3 ml
Standard 6 Standard 6	weiß	gebrauchsfertig	30 µg/L (ppb)	1,3 ml
Wash buffer salt Tween Waschpuffer (Salz)		Salz zum Auflösen		
Conjugate Konjugat	rot	gebrauchsfertig		3 ml
Substrate/Chromogen Substrat/Chromogen Red Chromogen Pro	braun	gebrauchsfertig		10 ml
Stop solution Stopp Lösung	gelb	gebrauchsfertig		14 ml

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1. Geräte:

- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Schlagmühle, Mörser, Ultra-Turrax oder Homogenisator
- Zentrifuge + Zentrifugenröhrchen
- Wasserbad (100 °C)
- Eisbad (0 °C)
- Schüttler
- optional: Faltenfilter und Trichter
- Messpipetten
- variable 20 - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten
- optional: Mehrfachdispenser, 8-Kanalpipette

5.2. Reagenzien:

- destilliertes oder demineralisiertes Wasser

6. Vorsichtsmaßnahmen

Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.

Dieser Kit kann gesundheitsgefährdende Substanzen enthalten.

Sicherheitshinweise zu den enthaltenen Komponenten entnehmen Sie bitte den Sicherheitsdatenblättern (MSDS) zu diesem Produkt auf unserer Internetseite www.r-biopharm.de.

7. Reagenzien und ihre Lagerung

Die Reagenzien bei 2 - 8 °C lagern. Komponenten des Testkits auf keinen Fall einfrieren.

Nicht benötigte Kavitäten zusammen mit dem Trockenmittel im Folienbeutel gut verschlossen aufbewahren und weiterhin bei 2 - 8 °C lagern.

Die Standards, das Konjugat und das Substrat/Chromogen sind lichtempfindlich, deshalb direkte Lichteinwirkung vermeiden.

Nach Ablauf des Verfallsdatums (siehe Testkit-Außenetikett) kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.

Ein Austausch von Einzelreagenzien zwischen Kits verschiedener Chargennummern ist nicht zulässig (Ausnahmen: Probenpuffer, Waschpuffer (Salz), Stopp Lösung).

8. Anzeichen für Reagenzienverfall

- bläuliche Färbung des rötlichen Substrat/Chromogens vor Zugabe in die Kavitäten
- Extinktion kleiner 0,6 ($E_{450\text{ nm}} < 0,6$) für den Nullstandard

9. Probenvorbereitung

Die Proben kühl und lichtgeschützt lagern. Die Proben sollten vor der Probenvorbereitung auf 20 - 25 °C temperiert werden. Zur Qualitätskontrolle wird empfohlen, Kontrollproben mitzuführen.

Anmerkung:

Die Proben sollten am Tag der Extraktion gemessen werden.

Der Probenpuffer ist auch zur Probenvorbereitung von folsäurehaltigen Proben in Verbindung mit dem RIDASCREEN®FAST Folsäure (Folic Acid) (R3203) verwendbar.

9.1. Milch, Milchpulver und Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke

Milch:

- die homogenisierte Milch kann unverdünnt in den Test eingesetzt werden, eventuell mit Probenpuffer in den Messbereich verdünnen (Verdünnungsfaktor entsprechend neu berechnen!)
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

Milchpulver, Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke:

- 1 g Probe in ca. 5 ml dest. Wasser suspendieren, mit dest. Wasser auf 10 ml auffüllen (Verdünnungsfaktor = 10)
- 10 min schütteln / rühren
- die verdünnte Probe 3 min im Wasserbad bei 100 °C erhitzen, schnell abkühlen (Eisbad), eventuell mit Probenpuffer in den Messbereich verdünnen (Verdünnungsfaktor entsprechend neu berechnen!)
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

9.2. Müsli und Getreideflocken

Eine repräsentative Probe vor dem Extrahieren zermahlen und mischen (Partikelgröße < 250 µm).

- 1 g der gemahlene Probe in ein Reagenzgefäß einwiegen, in ca. 5 ml Probenpuffer suspendieren und mit Probenpuffer auf 10 ml auffüllen (Verdünnungsfaktor = 10)
- 10 min schütteln / rühren
- ungelöste Bestandteile durch Zentrifugation (alternativ: filtrieren) entfernen

- Überstand abnehmen, falls der Überstand noch trüb sein sollte, filtrieren
- Überstand oder Filtrat gegebenenfalls mit Probenpuffer in den Messbereich des Tests verdünnen (Verdünnungsfaktor entsprechend neu berechnen!)
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

9.3. Angereicherte Getreidemehle

Eine repräsentative Probe vor dem Extrahieren mischen, gegebenenfalls zerkleinern (Partikelgröße < 250 µm).

- 1 g der gemahlten Probe in ein Reagenzgefäß einwiegen, in ca. 5 ml Probenpuffer suspendieren und mit Probenpuffer auf 10 ml auffüllen (Verdünnungsfaktor = 10)
- 10 min schütteln / rühren
- ungelöste Bestandteile durch Zentrifugation (alternativ: filtrieren) entfernen
- Überstand abnehmen, falls der Überstand noch trüb sein sollte, filtrieren
- Überstand oder Filtrat gegebenenfalls mit Probenpuffer in den Messbereich des Tests verdünnen (Verdünnungsfaktor entsprechend neu berechnen!)
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

9.4. Vitaminpulver, -mischungen und -tabletten

Vitaminpulver/-mischung:

- 1 g Vitaminpulver/-mischung in 5 ml Probenpuffer lösen und mit Probenpuffer auf 10 ml auffüllen (Verdünnungsfaktor = 10)

Tabletten:

- Tabletten mörsern, sorgfältig mischen, davon 1 g in 5 ml Probenpuffer lösen und mit Probenpuffer auf 10 ml auffüllen (Verdünnungsfaktor = 10)

Mit diesen Proben wie folgt weiterarbeiten:

- 10 min schütteln / rühren
- ungelöste Bestandteile durch Zentrifugation (alternativ: filtrieren) entfernen
- Überstand oder Filtrat gegebenenfalls mit Probenpuffer in den Messbereich des Tests verdünnen (Verdünnungsfaktor entsprechend neu berechnen!)
- 50 µl pro Kavität in den Test einsetzen

9.5. Vitaminsäfte

- der homogenisierte Saft kann unverdünnt in den Test eingesetzt werden
- gegebenenfalls ungelöste Bestandteile durch Zentrifugation (alternativ: filtrieren) entfernen
- eventuell mit Probenpuffer in den Messbereich verdünnen (Verdünnungsfaktor entsprechend neu berechnen!)
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

10. Testdurchführung

10.1. Testvorbereitungen

Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) bringen.

Der **Probenpuffer** liegt als 2-fach Konzentrat vor. Das Konzentrat 1:2 mit destilliertem Wasser verdünnen (z.B. 50 ml Pufferkonzentrat + 50 ml dest. Wasser). Der verdünnte Probenpuffer hat eine Haltbarkeit von 4 - 6 Wochen bei 2 - 8 °C.

Als **Waschpuffer** wird ein PBS-Tween-Puffer benötigt, benutzen Sie dazu bitte den beiliegenden Waschpuffer (Salz) (siehe 4.). Zur Herstellung des Puffers den gesamten Inhalt des Beutels in 1 Liter destilliertem Wasser lösen. Der gelöste Waschpuffer ist ca. 4 - 6 Wochen bei 2 - 8 °C haltbar.

Alternativ: Inhalt des Beutels in 100 ml dest. Wasser lösen (10-fach Konzentrat). Die Lösung ist ca. 8 - 12 Wochen bei Raumtemperatur (20 -25 °C) haltbar. Um die gebrauchsfertige Lösung herzustellen 1 Teil des 10-fach Konzentrats mit 9 Teilen dest. Wasser mischen.

10.2. Testdurchführung

Standards und Proben müssen zeitgleich auf derselben Mikrotiterplatte abgearbeitet werden. Sorgfältiges Waschen ist sehr wichtig. Ein Eintrocknen der Kavitäten zwischen den Arbeitsschritten ist zu vermeiden.

1. So viele Kavitäten in den Halterahmen einsetzen, wie für alle Standards und Proben in Doppelbestimmung benötigt werden. Die Positionen der Standards und der Proben protokollieren.

2. Je 50 µl des Standards bzw. der vorbereiteten Proben in die entsprechenden Kavitäten pipettieren; für jeden Standard oder Probe eine neue Pipettenspitze benutzen.
3. Je 50 µl Konjugat in die entsprechenden Kavitäten pipettieren (eventuell einen Mehrfachdispenser oder eine 8-Kanal-Pipette verwenden) und 15 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) lichtgeschützt inkubieren.
4. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf saugfähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit Hilfe einer 8-Kanalpipette mit gebrauchsfertigem Waschpuffer (10.1) waschen (250 µl/Kavität), die Kavitäten leeren und die Restflüssigkeit entfernen. Diesen Vorgang noch zweimal wiederholen.
5. Je 100 µl Substrat/Chromogen in jede Kavität pipettieren (eventuell einen Mehrfachdispenser oder eine 8-Kanalpipette verwenden) und 10 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
6. Je 100 µl Stopp Lösung in jede Kavität pipettieren (eventuell einen Mehrfachdispenser oder eine 8-Kanalpipette verwenden). Die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 5 min nach Zugabe der Stopp Lösung messen.

11. Auswertung

Für die Auswertung ist bei R-Biopharm eine speziell für die RIDASCREEN® Enzymimmunoassays entwickelte Software, RIDA®SOFT Win / RIDA®SOFT Win.net (Art. Nr. Z9996), erhältlich. Diese Software gibt das Ergebnis sowohl in µg/kg bzw. µg/L als auch in µg/100 g bzw. µg/100 ml an.

Der Verlauf der Standardkurve kann dem beigefügten Analysenzertifikat entnommen werden.

Hinweis für die Berechnung ohne Software:

$$\frac{\text{Extinktion Standard (bzw. Probe)}}{\text{Extinktion Nullstandard}} \times 100 = \% \text{ Extinktion}$$

Den Nullstandard somit gleich 100 % setzen und die Extinktionswerte in Prozent angeben. Die errechneten Werte für die Standards in einem Koordinatensystem auf halblogarithmischem Millimeterpapier gegen die Vitamin B12-Konzentration (µg/kg bzw. µg/L) auftragen.

Um die in den Proben enthaltene tatsächliche Vitamin B12-Konzentration zu erhalten, muss die aus der Standardkurve abgelesene Konzentration noch mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

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. Für darüber hinaus gehende direkte, indirekte Schäden oder sonstige Kosten im Zusammenhang mit der Nutzung der Produkte haftet R-Biopharm nicht.

RIDASCREEN[®]FAST Vitamin B12 (Vitamin B12)

Brief information

RIDASCREEN[®]FAST Vitamin B12 (Art. No. R2103) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative determination of Vitamin B12 in milk, milk powders, food for special medical purpose*, grain and cereals, fortified flour, vitamin powders, -mixtures, -tablets, and vitamin juices.

All reagents required for the enzyme immunoassay - including standards - are contained in the test kit. The test kit is sufficient for 48 determinations (including standards). A microtiter plate spectrophotometer is required for quantification.

Sample preparation: milk: can be applied directly, dilution if necessary
 juices: can be applied directly, dilution if necessary
 other matrices: extraction, dilution if necessary

Time requirement: sample preparation (for 10 samples)..... 10 - 60 min
 test implementation (incubation time).....25 min

Detection limit: 0.5 (µg/L) ppb (in measurement solution**)
(corresponding to
standard substance)

The specificity of the RIDASCREEN[®]FAST Vitamin B12 test was determined by analyzing the cross-reactivities to corresponding substances in a buffer system. In samples, the specificity may deviate from those determined in the buffer system due to matrix effects. Prior to the analysis of cross-reactive substances, the user has to determine the Limit of Detection and the recovery for the substance in the respective sample matrix. The test cannot discriminate between analytes and cross-reactive substances.

Specificity:	Vitamin B12 (Cyanocobalamin)	100%
	Hydroxocobalamin	approx. 95%
	Methylcobalamin	approx. 95%
	Adenosylcobalamin (Coenzym B12)	approx. 91%

* Commission Directive 1999/21/EC on dietary foods for special medical purposes

** see product information

In order to increase the quality of assessment when performing ELISA-procedures, we refer additionally to our Good ELISA Practice (GEP) – Manual in the respective version. Such lists minimum standards concerning the framework conditions when using test-kits of R-Biopharm AG and performing ELISA-analysis. The manual can be retrieved, printed and downloaded under the website www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis.

1. Intended use

RIDASCREEN®FAST Vitamin B12 is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative determination of Vitamin B12 in milk, milk powders, food for special medical purpose, grain and cereals, fortified flour, vitamin powders, -mixtures, -tablets, and vitamin juices.

2. General

Vitamin B12 belongs to group of the water soluble vitamins. It is not produced by the human body and must be included in the diet. Vitamin B12 is needed only in small concentrations, however it plays an important role for the nervous system, has protective effects for the heart and plays an important role in nucleotide biosynthesis, iron intake, and metabolism of amino acids. A lack of vitamin B12 can lead to anemia and neurological deficits.

3. Test principle

The basis of the test is the antigen-antibody reaction. The microtiter plate is coated with specific antibodies against Vitamin B12. Vitamin B12 standards, respectively sample and enzyme labeled Vitamin B12 (conjugate) are added. Free and enzyme labeled Vitamin B12 compete for the antibody binding sites (competitive enzyme immunoassay). Any unbound conjugate is then removed in a washing step. Substrate/chromogen is added to the wells, bound conjugate converts the chromogen into a blue product. The addition of the stop solution leads to a color change from blue to yellow. The measurement is made photometrically at 450 nm. The resulting absorbance values are inversely proportional to the Vitamin B12 concentration of the sample.

4. Reagents provided

Each kit contains sufficient materials for 48 measurements (including standard analyses). Each test kit contains:

Component	Cap Color	Format	Volume
Microtiter plate	-	Ready to use	48 wells
Sample buffer	Transparent	2-fold concentrate	2x 125 ml
Standard 1	White	Ready to use	0 µg/L (ppb) 1.3 ml
Standard 2	White	Ready to use	0.5 µg/L (ppb) 1.3 ml
Standard 3	White	Ready to use	1.5 µg/L (ppb) 1.3 ml
Standard 4	White	Ready to use	4.5 µg/L (ppb) 1.3 ml
Standard 5	White	Ready to use	12 µg/L (ppb) 1.3 ml
Standard 6	White	Ready to use	30 µg/L (ppb) 1.3 ml
Wash buffer salt Tween		Salt for dissolving	
Conjugate	Red	Ready to use	3 ml
Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro	Brown	Ready to use	10 ml
Stop solution	Yellow	Ready to use	14 ml

5. Materials required but not provided

5.1. Equipment:

- microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- laboratory mincer/grinder, mortar, ultra-turrax or homogenizer
- centrifuge + centrifugal vials
- water bath (100 °C / 212 °F)
- ice bath (0 °C / 32 °F)
- shaker
- optional: paper filter and funnel
- graduated pipettes
- variable 20 µl - 200 µl und 200 - 1000 µl micropipette
- optional: multichannel pipette or 8 channel pipette

5.2. Reagents:

- distilled or demineralized water

6. Warnings and precautions for the users

This test should only be carried out by trained laboratory employees. The instruction for use must be strictly followed.

This kit may contain hazardous substances. For hazard notes on the contained substances please refer to the appropriate material safety data sheets (MSDS) for this product, available online at www.r-biopharm.com.

7. Storage instructions

Store the kit at 2 - 8 °C (36 - 46 °F). Do not freeze any test kit components.

Return any unused microwells to their original foil bag, reseal them together with the desiccant bag provided and further store at 2 - 8 °C (36 - 46 °F).

The standards, the conjugate and the substrate/chromogen are light sensitive, therefore, avoid exposure to direct light.

No quality guarantee is accepted after the expiration date on the kit label.

Do not interchange individual reagents between kits of different lot numbers. (exception: sample buffer, wash buffer (salt), stop solution)

8. Indication of instability or deterioration of reagents

- any bluish coloration of the red stained substrate/chromogen prior to test implementation
- an absorption smaller than 0.6 ($A_{450\text{ nm}} < 0.6$) for the zero standard

9. Preparation of samples

The samples should be stored in a cool place, protected from light. The samples should be brought to room temperature before analysis (20 - 25 °C / 68 - 77 °F). For quality control it is recommended to analyse control samples.

Remark:

The samples should be measured at the day of extraction.

The sample buffer can also be used for the sample preparation of folic acid containing samples in combination with the RIDASCREEN®FAST Folsäure (Folic Acid) (R3203).

9.1. Milk, milk powder and food for special medical purpose

Milk:

- homogenized milk can be directly applied in the test. If necessary dilute milk samples with sample buffer into the testing range (new calculation of the dilution factor is necessary!)
- add 50 µl per well in the assay

Milk powder, food for special medical purpose:

- suspend 1 g sample in approx. 5 ml distilled water, fill up to 10 ml with distilled water (dilution factor = 10)
- shake / mix for 10 min
- heat the diluted sample for 3 min at 100 °C (212 °F) in a water bath, cool down quickly (ice bath), dilute the supernatant or filtrate if necessary with sample buffer into the testing range (new calculation of the dilution factor is necessary!)
- add 50 µl per well in the assay

9.2. Grain and cereals

A representative sample should be ground and thoroughly mixed before proceeding with the extraction procedure (particle size < 250 µm).

- weigh 1 g of ground sample into a suitable vial, suspend with approx. 5 ml sample buffer and fill up to 10 ml with sample buffer (dilution factor = 10)
- shake / mix for 10 min
- centrifuge (or alternatively filter) in order to remove undissolved components
- take supernatant, if supernatant is still turbid, filtrate
- dilute the supernatant or filtrate if necessary with sample buffer into the testing range (new calculation of the dilution factor is necessary!)
- add 50 µl per well in the assay

9.3. Fortified flour

A representative sample should be ground and thoroughly mixed before proceeding with the extraction procedure (particle size < 250 µm)

- weigh 1 g of the homogenized flour sample into a suitable vial, suspend with approx. 5 ml sample buffer and fill up to 10 ml with sample buffer (dilution factor = 10)
- shake / mix for 10 min
- centrifuge (or alternatively filter) in order to remove undissolved components
- take supernatant, if supernatant is still turbid, filtrate

- dilute the supernatant or filtrate if necessary with sample buffer into the testing range (new calculation of the dilution factor is necessary!)
- add 50 µl per well in the assay

9.4. Vitamin powder, -mixture, and –tablets

Vitamin powder / -mixture:

- dissolve 1 g of vitamin powder / -mixture in 5 ml sample buffer and fill up to 10 ml with sample buffer (dilution factor = 10)

Tablets:

- crush the tablets and dissolve 1 g in 5 ml sample buffer and fill up to 10 ml with sample buffer (dilution factor = 10)

Continue with these samples as is described below:

- shake / mix for 10 min
- centrifuge (or alternatively filter) in order to remove undissolved components
- dilute the supernatant or filtrate if necessary with sample buffer into the testing range (new calculation of the dilution factor is necessary!)
- add 50 µl per well in the assay

9.5. Vitamin juice

- the homogenized juice can be inserted directly in the test
- centrifuge (or alternatively filter) in order to remove undissolved components
- dilute if necessary with sample buffer into the testing range (new calculation of the dilution factor is necessary!)
- add 50 µl per well in the assay

10. Test implementation

10.1. Test preparation

Bring all reagents to room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) before use.

The **sample buffer** is provided as a 2-fold concentrate. The concentrate is diluted 1:2 with distilled water (e.g. 50 ml sample buffer concentrate + 50 ml distilled water). The diluted sample buffer expires after approx. 4 - 6 weeks at 2 - 8 °C (36 - 46 °F).

A PBS-Tween buffer is required as **wash buffer**, please use the wash buffer salt (pouch) contained in the kit. Dissolve the total content of the pouch in one liter of

distilled water. The ready to use wash buffer expires after approx. 4 - 6 weeks at 2 - 8 °C (36 – 46 °F).

Alternatively: Dissolve the content of the pouch in 100 ml of distilled water to obtain a 10-fold concentrated wash buffer. This solution expires after approx. 8 - 12 weeks, stored at room temperature (20 - 25 °C / 68 – 77 °F). Use one part of this concentrate and dissolve with 9 parts of distilled water to obtain the ready to use washing buffer.

10.2. Test procedure

Standards and samples must be tested on one microtiter plate at one time. Carefully follow the recommended washing procedure. Do not allow microwells to dry between working steps.

1. Insert a sufficient number of wells into the microwell holder for all standards and samples to be run in duplicate. Record standard and sample positions.
2. Add 50 µl of each standard or prepared sample to the wells in duplicate; use a new pipette tip for each standard or sample.
3. Add 50 µl of conjugate to each well (multichannel pipette or 8 channel pipette) and incubate for 15 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark.
4. Pour the liquid out of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times in a row) against absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Using a 8 channel pipette, fill the wells with ready to use wash buffer (250 µl/well) (10.1). Empty the wells again and remove all remaining liquid. Repeat the washing step two more times.
5. Add 100 µl of the substrate/chromogen to each well (multichannel pipette or 8 channel pipette); and incubate for 10 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark.
6. Add 100 µl of stop solution to each well (multichannel pipette or 8 channel pipette); and measure the absorbance at 450 nm within 5 min.

11. Results

A special software, the RIDA[®]SOFT Win / RIDA[®]SOFT Win.net (Art. No. Z9996) is available for evaluation of the RIDASCREEN[®] enzyme immunoassays. The results are given in µg/kg respectively µg/L and µg/100 g respectively µg/100 ml.

The course of the standard curve is shown in the Quality Assurance Certificate enclosed in the test kit.

Remark for the calculation without software:

$$\frac{\text{absorbance standard (or sample)}}{\text{absorbance zero standard}} \times 100 = \% \text{ absorbance}$$

The zero standard is thus made equal to 100 % and the absorbance values are quoted in percentages. The values calculated for the standards are entered in a system of coordinates on semi-logarithmic graph paper against the vitamin B12 concentration ($\mu\text{g}/\text{kg}$ or $\mu\text{g}/\text{L}$).

In order to obtain the Vitamin B12 concentration actually contained in a sample, the concentration read from the standard curve must be further multiplied by the corresponding dilution factor.

The data corresponds to our present state of technology and provides information on our products and their uses. 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. Defective products will be replaced. 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.

R-Biopharm AG

Postanschrift / Postal Address:

An der neuen Bergstraße 17
64297 Darmstadt, Germany

Sitz / Corporate Seat: Pfungstadt

Tel.: +49 (0) 61 51 - 81 02-0

Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-40

E-mail: info@r-biopharm.de

www.r-biopharm.com

Vorsitzender des Aufsichtsrats /

Chairman of Supervisory Board:

Dietrich Mollat

Vorstand / Board of Management:

Dr. Ralf M. Dreher (Vorsitzender / Chairman),

Dr. Carsten Bruns, Jochen Hirsch, Dr. Peter Schubert

Handelsregister / Commercial Register:

Amtsgericht Darmstadt HRB 8321