



## Vitamin B 6 (Pyridoxin)

Mikrobiologischer Mikrotiterplatten-Test zur quantitativen Bestimmung von Vitamin B6 (Pyridoxin)

Microbiological microtiter plate test to quantitate vitamin B6 (pyridoxine)

Art. No.: P1008

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](http://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](mailto:orders@r-biopharm.de)

Marketing

Fax: 0 61 51 - 81 02-40  
E-mail: [info@r-biopharm.de](mailto: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](http://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](http://www.produktqualitaet.com)

## Kurzinformation

Einfach durchzuführender mikrobiologischer Mikrotiterplattentest zur Bestimmung des Gesamtgehaltes an Vitamin B6 (hinzugefügtes und natürliches Vitamin B6) in Lebensmitteln, Futtermitteln 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 (zugeseztes Vitamin B6):

enzymatische Hydrolyse, extrahieren,  
steril filtrieren und verdünnen

Feste Proben (zugeseztes Vitamin B6):

Probe homogenisieren, enzymatische Hydrolyse,  
extrahieren, zentrifugieren und verdünnen

Flüssige und feste Proben (zugeseztes und natürliches Vitamin B6):

Probe homogenisieren,  
enzymatische Hydrolyse, extrahieren,  
zentrifugieren und verdünnen

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

Inkubation: 44 - 48 h im Dunkeln bei 30 °C

Standardbereich: 0,002 - 0,012 mg / 100 g (ml)

Wiederfindungsrate: 90 - 105 %

Intra-assay VK für Standards: < 10 %

Inter-assay VK für Standards: < 10 %

## 1. Testprinzip

Der VitaFast® Vitamin B6 (Pyridoxin) Mikrotiterplattentest ist ein mikrobiologisches Verfahren zur Bestimmung des Gesamtgehaltes an Vitamin B6 (hinzugefügtes und natürliches Vitamin B6) in Lebensmitteln, Futtermitteln und pharmazeutischen Erzeugnissen. Das mikrobiologische Testsystem ist an internationale Normen angelehnt.

Vitamin B6 wird aus dem Probenmaterial extrahiert und der Extrakt verdünnt. Das Vitamin B6 Assay-Medium und der verdünnte Extrakt werden in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte gegeben, die mit *Saccharomyces cerevisiae* beschichtet sind. *Saccharomyces cerevisiae* ist auf die Anwesenheit von Vitamin B6 angewiesen. Nach Zugabe von Vitamin B6 als Standard oder als in einer Probe enthaltenes Vitamin wächst der Keim solange, bis das Vitamin aufgebraucht ist. Die Inkubation erfolgt bei 30 °C für 44 - 48 h.

Das Wachstum von *Saccharomyces cerevisiae* in Abhängigkeit vom extrahierten Vitamin B6 wird als Trübung gemessen und mit einer Standard-Konzentrationsreihe verglichen. Die Messung erfolgt im Mikrotiterplatten-photometer 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 *Saccharomyces cerevisiae*
- 3 x bidestilliertes, steriles Wasser (30 ml) für die Herstellung der Standards, Ansatz des Mediums und Verdünnung der Proben
- 3 x Vitamin B6 Assay-Medium (fest)
- 3 x Vitamin B6 (Pyridoxinhydrochlorid)-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, 30 °C
- Wasserbad beheizbar auf 95 °C
- Autoklav
- pH-Meter
- Zentrifuge > 8000 x g (falls sich Probe nicht filtrieren lässt)
- sterile Mikropipettenspitzen für Mikropipetten 20 - 200 µl und 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
- Natronlauge konzentriert (40 g NaOH in 100 ml dest. oder deionisiertem Wasser)
- Natronlauge 2 mol / l (8 g NaOH in 100 ml dest. oder deionisiertem Wasser)

#### **Reagenzien zur Bestimmung des natürlichen Vitamin B6-Gehaltes**

- Taka diastase, *Aspergillus oryzae* (z. B. Fluka 86250)
- Phosphatase, Acid, Type II: from potato (z. B. Sigma P3752)
- Schwefelsäure H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 mol / l
- Natriumacetatlösung 2,5 mol / l (34 g Natriumacetat Trihydrat, z. B. Fluka 71190, in 100 ml dest. oder deionisiertem Wasser)
- Citratpuffer pH 4,5 (in ein 100 ml Becherglas mit Magnetrührer 1,5 g Citronensäure-Monohydrat (z. B. Roth 5110.3) einwiegen und mit ca. 50 ml dest. oder deionisiertem Wasser unter Rühren lösen; anschließend 12 ml NaOH 1 mol / l (bzw. 0,48 g NaOH) zugeben; 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 3 Tage bei 2 - 8 °C lagerbar)

## 4. Vorsichtsmaßnahmen

- 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

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

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

## 6. Probenvorbereitung

In Lebensmitteln wird Vitamin B6 als Pyridoxinhydrochlorid oder als Pyridoxin-5-phosphat zugesetzt. Vitamin B6 kann auch nativ als Pyridoxin-5-phosphat vorliegen. Die phosphorylierte Vitamin B6-Form wird vom eingesetzten Testkeim nicht erkannt. Oft ist nicht bekannt, welche Form des Vitamin B6 zugesetzt ist. Daher ist es notwendig, die Probe enzymatisch mit saurer Phosphatase zu behandeln.

Zur Bestimmung des **zugesetzten Vitamin B6** in mit Vitamin angereicherten Fest- und Flüssigproben wird die Probe mit saurer Phosphatase behandelt und anschließend heiß extrahiert. Zur Bestimmung des **Gesamtgehaltes an Vitamin B6 (zugesetztes und natürliches)** muss die Probe mit Takadiastase und Phosphatase behandelt werden.

Originalproben bis zur Analyse lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahren. Es wird eine Dreifachbestimmung von Standard- und Probelösung 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 bzw. 1 ml homogener Probe in 40 ml dest. oder deionisiertes Wasser bzw. Aufschlusslösung. Dies entspricht einem **Extraktionsverdünnungsfaktor von 40**. Dieser Faktor ist bereits in der Standardkurve (siehe Quality Assurance Certificate) berücksichtigt. **Bei niedrigen Vitamin B6-Konzentrationen kann die Probeneinwaage auf bis zu 5 g (ml) erhöht werden** (bei der Auswertung zu berücksichtigen).

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 3 mg / 100 g aktives Vitamin B6 / 100 g (vom Hersteller angegeben)

Auf dem Etikett ist die Vitamin aktive Form (Pyridoxin) gekennzeichnet (Sollwert). Der Test wird mit Pyridoxinhydrochlorid kalibriert. Um mit der Verdünnung des Extraktes in den mittleren Bereich der Standardkurve zu gelangen, wird der Sollwert mit dem Faktor 1,22 auf Pyridoxinhydrochlorid umgerechnet und durch die Konzentration des Standard 2 dividiert.



## **Berechnung:**

3 mg aktives Vitamin / 100 g x 1,22 = 3,66 mg Pyridoxinhydrochlorid / 100g

3,66 mg Pyridoxinhydrochlorid / 0,004 mg = 915  
→ also ein Verdünnungsfaktor von 1000 (1 : 1000)

## **Verdünnungsschritte:**

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

## **6.1. Zugewetztes Vitamin B6 in flüssigen Proben (Multivitaminsäfte, Fitnessgetränke)**

1 ml Probe exakt in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführen, mit dest. oder deionisiertes Wasser auf ca. 20 ml auffüllen und einen pH-Wert von 4,5 einstellen.

**Alternativ** kann anstelle von Wasser auch ein Citratpuffer verwendet werden (dies erfordert keine pH-Einstellung); zur Probe ca. 20 ml Citratpuffer pH 4,5 zugeben und schütteln.

10 mg saure Kartoffelphosphatase zugeben, schütteln und bei 37 °C 1 h im Dunkeln inkubieren (gelegentlich leicht umschwenken). Danach mit dest. oder deionisiertem Wasser auf 40 ml auffüllen, schütteln 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. Anschließend die Probelösung schnell auf unter 30 °C abkühlen, wenn trüb dann 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.

## 6.2. Zugewetztes Vitamin B6 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 und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführen. Mit dest. oder deionisiertem Wasser auf ca. 20 ml auffüllen und einen pH-Wert von 4,5 einstellen.

**Alternativ** kann anstelle von Wasser auch ein Citratpuffer pH 4,5 verwendet werden (dies erfordert keine pH Wert-Einstellung).

10 mg saure Kartoffelphosphatase zugeben, schütteln und bei 37 °C 1 h im Dunkeln inkubieren (gelegentlich leicht umschwenken). Anschließend mit dest. oder deionisiertem Wasser exakt 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. Anschließend die Probelösung schnell auf unter 30 °C abkühlen, wenn trüb dann 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.

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 B6 in Tabletten, Kapseln und Vitaminmischungen

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 deionisiertes Wasser versetzen, gut schütteln und einen pH-Wert von 4,5 einstellen. 50 mg saure Kartoffelphosphatase zugeben, schütteln und bei 37 °C 1 h im Dunkeln inkubieren (gelegentlich leicht umschwenken). Danach 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 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, gut schütteln und einen pH-Wert von 4 - 5 einstellen. 10 mg saure Kartoffelphosphatase zugeben, schütteln und bei 37 °C 1 h im Dunkeln inkubieren (gelegentlich leicht umschwenken). 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 B6 in Cerealien, Kindernährmitteln, Broten, Mehlen, Fleisch und Fleischerzeugnissen**

1 g (ml) homogenisierte Probe in ein steriles 50 ml Zentrifugenröhrchen genau einwiegen, mit ca. 20 ml dest. oder deionisiertem Wasser versetzen, gut schütteln und mit HCl einen pH-Wert von 4,5 einstellen.

**Alternativ** kann anstelle von Wasser auch ein Citratpuffer verwendet werden (dies erfordert keine pH-Einstellung); zur Probeneinwaage ca. 20 ml Citratpuffer pH 4,5 zugeben und schütteln.

10 mg saure Kartoffelphosphatase zuwiegen, schütteln und bei 37 °C 1 h im Dunkeln inkubieren (gelegentlich leicht umschwenken) Anschließend mit dest. oder deionisiertem Wasser exakt auf 40 ml auffüllen. Danach 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. 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.

#### **6.5. Gesamtvitamingehalt (natürliches und zugewetztes Vitamin B6) in Milchprodukten, Cerealien, Kindernährmitteln, Fleisch und Fleischerzeugnissen**

Um gebundenes, natürliches Vitamin B6 mit zu erfassen oder bei nicht vitaminisierten Untersuchungsmatrices zu bestimmen, muss die Probe 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 versetzen, schütteln und mit HCl einen pH-Wert von 4,5 einstellen.

**Alternativ** kann anstelle mit Wasser mit einem Citratpuffer extrahiert werden (dies erfordert keine pH-Einstellung der verschiedenen Proben); zur Probeneinwaage 20 ml Citratpuffer pH 4,5 zugeben und schütteln.

300 mg Taka Diastase und 10 mg saure Phosphatase zuwiegen, gut schütteln und 1 h bei 37 °C im Dunkeln inkubieren (gelegentlich leicht umschwenken). Danach mit dest. oder deionisiertem Wasser 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.

## **6.6. Gesamtvitamingehalt (natürliches und zugesetztes Vitamin B6) in Hefe und Hefeprodukten**

1 g (ml) homogenisierte Probe in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen genau einwiegen, mit ca. 10 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 mol / l versetzen, gut schütteln und 30 min bei 121 °C autoklavieren (Schraubverschluss des Zentrifugenröhrchens nicht fest verschließen). Anschließend schnell abkühlen auf unter 30 °C, 3 ml Natriumacetatlösung 2,5 mol / l zugeben, schütteln und 300 mg Takadiastase und 10 mg saure Kartoffelphosphatase zuwiegen. Den Ansatz gut schütteln und über Nacht 12 - 16 Stunden im Dunkeln bei 37 °C inkubieren. 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-B6-Standards** vor der Testdurchführung frisch lösen und verdünnen. Jede Verdünnungsstufe ist ausreichend für 3 Kavitäten.

- Vitamin B6-Standardflasche öffnen, Schraubverschluss mit der Öffnung nach oben ablegen
- zur Vitamin B6-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 mg / 100 g (ml)	Steriles Wasser in µl		Standard- konzentrat in µl		Gesamt- volumen in µl
Leerwert : 0	900	+	0	=	900
Standard 1: 0,002	900	+	100	=	1000
Standard 2: 0,004	400	+	100	=	500
Standard 3: 0,006	350	+	150	=	500
Standard 4: 0,008	300	+	200	=	500
Standard 5: 0,012	200	+	300	=	500

\* Die Standardkurve enthält bereits den Extraktionsverdünnungsfaktor 1 : 40.

Eine **Vitamin B6 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. Probenverdünnungen wie folgt pipettieren:**

- 150 µl Vitamin B6 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 **30 °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.

Die Kalibration erfolgt mit Pyridoxinhydrochlorid. Für die **Umrechnung auf das Vitamin aktive Pyridoxin (Vitamin B6) muss der Faktor 0,822** berücksichtigt werden.

$$\text{Vitamin B6} = \frac{\text{Konz. Standardkurve} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 0,822}{\text{Probemenge in g (ml)}}$$

(in mg / 100 g)  
(in mg / 100 ml)

### Beispiel für Auswertung:

Einwaage: 1 g  
Extraktionsverdünnungsfaktor: **1 : 40 (wird nicht berücksichtigt)**  
Verdünnungsfaktor (des Probenextraktes):  
1 : 1000 (muss berücksichtigt werden)  
Gemessene Konz. aus Standardkurve:  
0,004 mg Vitamin B6 / 100 g (ml)

$$0,004 * 1000 * 0,822 / 1 = 3,3 \text{ mg actives Vitamin B6 (Pyridoxin) / 100 g (ml)}$$

### Auswertung für Tabletten, Kapseln und Vitaminmischungen

Vitamin B6 in mg/ Tablette bzw. Kapsel =

$$\frac{\text{Konz. Standardkurve} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Tabletten- bzw. Kapselgewicht in g} \times 0,822}{\text{Einwaage in g} \times 100}$$



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 B6 (Pyridoxin)

### Brief information

Easy to use microbiological microtiter plate test for the quantification of total vitamin B6 (added and natural vitamin B6) in food, animal feed 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 B6):

enzymatic treatment, extraction, sterile filtration and dilution

Solid samples (added vitamin B6):

sample homogenization, enzymatic treatment, extraction, centrifugation and dilution

Liquid and solid samples (native and added vitamin B6):

sample homogenization, enzymatic treatment, extraction, centrifugation and dilution

Time requirement: Test conduction .....approx. 60 min  
Evaluation.....2 min

Incubation: 44 - 48 h in the dark at 30 °C (86 °F)

Standard range: 0.002 - 0.012 mg / 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 B6 (Pyridoxin) microtiter plate test is a microbiological method for the quantitative determination of total vitamin B6 (added and natural vitamin B6) in food, animal feed and in pharmaceutical products. The microbiological test system is in accordance with international norms.

Vitamin B6 is extracted from the sample and the extract is diluted. The diluted extract and the vitamin B6 assay medium are pipetted into the wells of a microtiter plate which is coated with *Saccharomyces cerevisiae*. The growth of *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on the supply of vitamin B6. Following the addition of vitamin B6 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 30 °C (86 °F) for 44 - 48 h.

The intensity of metabolism or growth of *Saccharomyces cerevisiae* in relation to the extracted vitamin B6 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 - 550 nm).

## 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 *Saccharomyces cerevisiae*
- 3 x redist., sterile water (30 ml) for the preparation of assay medium, standards and dilution of extracted samples
- 3 x vitamin B6 assay medium (solid)
- 3 x vitamin B6 (pyridoxine hydrochloride) 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, 30 °C (86 °F)
- water bath heatable to 95 °C (203 °F)
- autoclave
- pH meter
- centrifuge > 8,000 x g (in the case that the extracted 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 vials 1.5 or 2.0 ml
- 500 ml screw glass jar, 100 and 1000 ml volumetric flask, 100 ml beaker
- sterile filters polyethersulfon 0.2 µm 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
- NaOH concentrated (40 g NaOH ad 100 ml redist. or deionized water)
- NaOH 2 mol / l (8 g NaOH ad 100 ml redist. or deionized water)

#### **Reagents for the determination of total vitamin B6**

- taka diastase, aspergillus oryzae; (e. g. Fluka 86250)
- phosphatase, acid, Type II: from potato (e. g. Sigma P3752)
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1 mol / l
- sodium acetate 2.5 mol / l (solve 34 g sodium acetate trihydrate, e. g. Fluka 71190, in 100 ml redist. or deionized water)
- citrate buffer pH 4.5 (weigh 1.5 g citric acid monohydrate (e. g. Roth 5110.3) in a 100 ml beaker with magnetic stirrer; solve the citric acid with about 50 ml redist. or. deionised water under stirring; thereafter add 12 ml NaOH 1 mol / l (or 0.48 g NaOH); the pH should be 4.5 (correct with HCl 0.1 mol / l); transfer the solution quantitatively with redist. or deionized water in a 100 ml volumetric flask and fill up with redist. or deionized water to the mark; the buffer can be stored 3 days at 2 - 8 °C (35.6 - 46.4 °F)

#### 4. Warning and precautions for the user

- the assay medium can evoke irritations of mucosa, eyes and skin
- after running the test the strips used 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

In food vitamin B6 is added as pyridoxine hydrochloride or pyridoxine-5-phosphate. Pyridoxine-5-phosphates can also be present as a native vitamin B6 derivate. The phosphorylated vitamin B6 derivate is not recognised by the microorganism employed in the kit. Often it is unknown which vitamin B6 derivate is added to the sample. Therefore it is necessary to treat the sample with acid phosphatase.

For the determination of the **added vitamin B6** a treatment with acid phosphatase and a subsequent heating step is necessary. For the determination of the **total vitamin B6 (native and added)** content, the sample has to be hydrolyzed with taka diastase and acid phosphatase.

Samples should be stored protected from light at 4 °C (39.2 °F). Standard and samples should be run in triplicate (note: official norms recommend triplicate determination). Unknown sample matrices should be analyzed with two dilutions of the extract.

**Sample extraction** is carried out with 1g or 1ml 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 B6 concentrations a sample weight of up to 5 g (5 ml) can be used** (this has to be considered in the evaluation).

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 highly are 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 3 mg active vitamin B6 / 100 g

The dilution of the extract should be in the middle of the standard curve. The test is calibrated with pyridoxine hydrochloride. The active vitamin (pyridoxine) is labeled. Therefore, the expected concentration is converted with factor 1.22 into pyridoxine hydrochloride and divided by standard 2.

### Calculation:

$3 \text{ mg active vitamin B6} / 100 \text{ g} \times 1.22 = 3.66 \text{ mg pyridoxine hydrochloride} / 100 \text{ g}$

$3.66 \text{ mg pyridoxine hydrochloride} / 0.004 \text{ mg} = 915$   
→ dilution factor 1000 (1 : 1000)

### Dilution steps:

- a) 1 : 10 (0.1 ml sample extraction solution + 0.9 ml sterile water from the test kit)
- b) 1 : 10 (0.1 ml from a) + 0.9 ml sterile water from the test kit)
- c) 1 : 10 (0.1 ml from b) + 0.9 ml sterile water from the test kit)

## 6.1. Added vitamin B6 in liquid samples (multivitamin juices, fitness drinks)

Add 1 ml sample into a 50 ml sterile centrifuge vial, fill up to 20 ml with redist. or deionized water and adjust pH to 4.5.

**Alternatively** instead of water a citrate buffer can be used (no pH adjustment is necessary); to 1 g sample add 20 ml citrate buffer pH 4.5 and shake.

Add 10 mg acid phosphatase of potato and shake well. Incubate 1 h in the dark at 37 °C (98.6 °F), shake at times. Fill up to 40 ml with redist. or deionized water and shake. Thereafter, 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), centrifuge if the extract is turbid, and depending on the concentration range, further dilute with sterile water from the test kit.

## 6.2. Added vitamin B6 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 approx. 20 ml with redist. or deionized water and adjust pH to 4.5.

**Alternatively** instead of water a citrate buffer pH 4.5 can be used (no pH adjustment is necessary)

Add 10 mg acid phosphatase of potato and shake well. Incubate 1 h in the dark at 37 °C (98.6 °F), shake at times. Fill up to 40 ml with redist. or deionized water and shake. Thereafter, 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), centrifuge if the extract is turbid, 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:  $100 \text{ ml} / 17 \text{ g sample weight} = 5.88 \text{ ml} / \text{g}$

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

## 6.3. Added vitamin B6 in capsules, pills or vitamin mixes

First the capsule or pill weight has to be determined (average of 5 - 10 capsules or pills). Then pills are 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 into a 500 ml screw glass jar, add about 400 ml redist. or deionized water, shake well and adjust pH 4.5 with HCl. Add 50 mg acid phosphatase of potato, shake and incubate 1 h in the dark at 37 °C (98.6 °F), shake at times. Thereafter, 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 sample solution with redist. or deionized water quantitatively into a 1000 ml volumetric flask, fill up to the mark with redist. or deionized water and shake. Transfer 1 ml 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.

**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, shake well and adjust to pH 4 – 5. Add 10 mg acid phosphatase of potato, shake and incubate 1 h in the dark at 37 °C (98.6 °F), shake at times. Fill up to 40 ml with redist. or deionized water and 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 B6 in cereals, baby food, bread, flour and meat products**

Weigh 1 g (ml) homogenized sample into a 50 ml centrifuge vial, fill up to 20 ml with redist. or deionized water, shake well and adjust pH 4.5 with HCl.

**Alternatively** instead of water a citrate buffer can be used for the extraction (no pH adjustment is necessary); to 1 g sample add 20 ml citrate buffer pH 4.5 and shake.

Add 10 mg acid phosphatase of potato and shake well. Incubate 1 h in the dark at 37 °C (98.6 °F), shake at times. Fill up to 40 ml with redist. or deionized water and shake. Thereafter, 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 B6) in milk products, cereals, baby food, meat and meat products**

To extract the bound, native vitamin B6 as well, or to determine it in non-fortified samples, the sample has to be extracted with enzyme. Procedures with additional treatments using enzymes are described in the literature. The following extraction procedure has proved itself:

Weigh 1 g (ml) of sample into a 50 ml sterile centrifuge vial, add 20 ml redist. or deionized water, shake and adjust pH 4.5 with HCl.

**Alternatively** instead of water a citrate buffer can be used for the extraction (no pH adjustment is necessary); to 1 g sample add 20 ml citrate buffer pH 4.5 and shake.

Add 300 mg taka diastase and 10 mg acid phosphatase of potato, shake well and incubate 1 h at 37 °C (98.6 °F) in the dark (shake at times). Fill up exactly to 40 ml with redist. or deionized water. Thereafter, heat the extract for 30 min 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.

## 6.6. Total vitamin content (native and added vitamin B6) in yeasts and yeast products)

Weigh 1 g (ml) homogenized sample into a 50 ml sterile centrifuge vial, add about 10 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1 mol / l, shake well and autoclave 30 min at 121 °C (249.8 °F) (do not close the screw cap totally). Chill down quickly to below 30 °C (86 °F), add 3 ml sodium acetate solution 2.5 mol / l and shake. Add to the sample solution 300 mg taka diastase and 10 mg acid phosphatase of potato and shake again. Incubate over night 12 - 16 hours at 37 °C in the dark. Thereafter fill up to the mark 40 ml with dest. or redist. 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.

## 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 B6 standards** should be dissolved and diluted freshly. Each dilution is sufficient for three wells.

- open the vitamin B6 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 mg / 100 g (ml)	sterile water in µl		standard concentrate in µl		total volume in µl
blank: 0	900	+	0	=	900
standard 1: 0.002	900	+	100	=	1000
standard 2: 0.004	400	+	100	=	500
standard 3: 0.006	350	+	150	=	500
standard 4: 0.008	300	+	200	=	500
standard 5: 0.012	200	+	300	=	500

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

The **vitamin B6 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 B6 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 B6 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 **30 °C (86 °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<sup>®</sup> SOFT Win from R-Biopharm.

The test evaluation is correct on 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.

The calibration is carried out with **pyridoxine hydrochloride**. For the calculation of **vitamin active pyridoxine (vitamin B6)** the factor of 0.822 must be considered.

$$\text{vitamin B6} = \frac{\text{conc. standard curve} \times \text{dilution factor} \times 0.822}{\text{amount of sample in g (ml)}}$$

(in mg / 100 g)  
(in mg / 100 ml)

### Example:

Sample weight: 1 g  
Sample extraction dilution: **1 : 40 (must not be considered)**  
Dilution of the sample extraction: 1 : 1000 (has to be considered)  
Measured concentration from the standard curve: 0.004 mg vitamin B6 / 100 g (ml)

$$0.004 * 1000 * 0.822 / 1 = 3.3 \text{ mg active vitamin B6 (pyridoxine) / 100 g (ml).}$$

### Evaluation for capsules, pills, vitamin mixes

vitamin B6 in mg/ pill or capsule =

$$\frac{\text{conc. standard curve} \times \text{dilution factor} \times \text{pill or capsule weight in g} \times 0.822}{\text{sample weight in g} \times 100}$$

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 / 8.2.2
- (Prenorm) DIN V ENV 14166, Editione: 2002 - 02, Food - Microbiological Determination of Vitamin B6
- AOAC 961.15 Vitamin B6 (Pyridoxine, Pyridoxal, Pyridoxamine) in Food Extracts, Microbiological Methods (1975)
- AOAC 985.32 Vitamin B6 (Pyridoxine, Pyridoxal, Pyridoxamine) in Ready-to-Feed Milk Based Infant Formula, Microbiological Method (1988)
- Tanner & Barnett: J. Assoc. Off. Anal. Chem. (Vol. 68, No. 3, 1985), Methods of analysis for Infant Formula: Food and Drug Administration and Infant Formula Council Collaborative Study
- 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.Bertin

