



Inositol

Mikrobiologischer Mikrotiterplatten-Test zur quantitativen Bestimmung von Inositol

Microbiological microtiter plate test to quantitate inositol

Art. No.: P1009

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 Inositol (zugeseztes und natürliches Inositol) 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 Mikrotiter -plattenphotometer (610 - 630 nm alternativ bei 540 - 550 nm) notwendig.

Probenaufarbeitung

Flüssige und feste Proben (zugeseztes und natürliches Inositol):

Probe homogenisieren, enzymatischer Aufschluss,
zentrifugieren und verdünnen

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

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

Standardbereich: 0,5 - 5,0 mg / 100 g

Wiederfindungsrate: 80 - 120 %

Intra-assay VK für Standards: < 10 %

Inter-assay VK für Standards: < 10 %

1. Testprinzip

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

Inositol wird aus dem Probenmaterial extrahiert und der Extrakt verdünnt. Der verdünnte Extrakt und das Inositol Assay-Medium werden in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte gegeben, die mit *Saccharomyces cerevisiae* beschichtet sind. *Saccharomyces cerevisiae* ist auf die Anwesenheit von Inositol angewiesen. Nach Zugabe von Inositol als Standard oder Probe wächst der Keim solange, bis das Inositol aufgebraucht ist. Die Inkubation erfolgt bei 30 °C für 44 - 48 h. Das Wachstum von *Saccharomyces cerevisiae* in Abhängigkeit vom extrahierten Inositol 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 *Saccharomyces cerevisiae*
- 3 x bidestilliertes, steriles Wasser (30 ml) für die Herstellung der Standards, Ansatz des Mediums und Verdünnung der Proben
- 3 x Inositol Assay-Medium (fest)
- 3 x Inositol-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
- 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 Mikropipette 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
- 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 Inositol-Gehaltes

- Taka Diastase, *Aspergillus oryzae* (z. B. Fluka 86250)
- Pepsin vom Schwein (Merck 1.07185.0100)
- Citratpuffer pH 4,5 (in ein 100 ml Becherglas mit Magnetrührer werden 1,5 g Citronensäure-Monohydrat (z. B. Roth 5110.3) eingewogen und mit ca. 50 ml dest. oder deionisiertem Wasser unter Rühren gelöst; anschließend werden 12 ml NaOH 1 mol / l (bzw. 0,48 g NaOH) 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 überführt 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

Zur Bestimmung des **Gesamtgehaltes an Inositol** muss die Probe enzymatisch aufgeschlossen werden.

Originalproben bis zur Analyse lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahren. Es wird eine Dreifachbestimmung von Standard- und Probenlösung empfohlen. Bei **unbekannten Probenmatrices** 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 homogener Probe in 40 ml Aufschlusslösung. Dies entspricht einem **Extraktionsverdünnungsfaktor von 40**. Dieser Faktor ist bereits in der Standardkurve (siehe Quality Assurance Certificate) berücksichtigt. **Bei niedrigen Inositol-Konzentrationen kann die Probeneinwaage auf bis zu 5 g 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, die Kräuter und Gewürze enthalten
- niedrig konzentrierte 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 50 mg / 100 g (Angabe Etikett)

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

Berechnung:

$$50 \text{ mg} / 1,0 \text{ mg} = 50$$

→ also ein Verdünnungsfaktor von 50 (1 : 50)

Verdünnungsschritt:

- a) 1 : 10 → 0,1 ml Probenextrakt + 0,9 ml steriles Wasser aus dem Testkit
- b) 1 : 5 → 0,2 ml aus a) + 0,8 ml steriles Wasser aus dem Testkit

6.1. Gesamtgehalt an Inositol (zugesetztes und natürliches Inositol)

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.

100 mg Taka Diastase und 100 mg Pepsin (Merck) 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.

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

- Inositol-Standardflasche öffnen, Schraubverschluss mit der Öffnung nach oben ablegen
- zur Inositol-Standardflasche **x ml (x = siehe Quality Assurance Certificate und Etikett Standardflasche)** steriles Wasser aus der Wasserflasche zugeben, Standardflasche 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	950	+	0	=	950
Standard 1: 0,5	950	+	50	=	1000
Standard 2: 1,0	900	+	100	=	1000
Standard 3: 2,0	400	+	100	=	500
Standard 4: 3,0	350	+	150	=	500
Standard 5: 5,0	250	+	250	=	500

*Die Standardkurve enthält bereits den Extraktionsverdünnungsfaktor von 1 : 40

Eine **Inositol 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 150 µl Inositol Assay-Medium in die Kavitäten geben
- dann 150 µl Standard bzw. verdünnten Probe in die Kavitäten geben (Pipettenspitzen jeweils mit Standard- und Probenlösung 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.

$$\text{Inositol (in mg / 100 g)} = \frac{\text{Konz. Standardkurve} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Probemenge in g}}$$

Beispiel für Auswertung:

Einwaage: 1 g

Extraktionsverdünnungsfaktor: **1 : 40 (wird nicht berücksichtigt)**

Verdünnungsfaktor (des Probenextraktes):

1 : 50 (muss berücksichtigt werden)

Gemessene Konz. aus Standardkurve:

1,0 mg Inositol / 100 g

$$1,0 \cdot 50 / 1 = 50 \text{ mg Inositol / 100 g}$$

Wenn bei einer Probe zwei Verdünnungsstufen verwendet wurden, sollte die Abweichung kleiner 10 % sein. Ergibt die höhere Verdünnung einen höheren Messwert, können Hemmstoffe wie Schwermetalle und Antibiotika vorliegen.

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® Inositol

Brief information

Easy to use microbiological microtiter plate test for the quantification of total inositol (added and native inositol) 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 and solid samples (native and added inositol):

Sample homogenization, enzymatic extraction,
centrifugation and dilution

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

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

Standard range: 0.5 - 5.0 mg / 100 g

Recovery: 80 - 120 %

Intra-assay CV for standards: < 10 %

Inter-assay CV for standards: < 10 %

1. Principle of the test

The VitaFast[®] Inositol microtiter plate test is a microbiological method for the quantitative determination of total inositol (added and native inositol) in food, animal feed and in pharmaceutical products. The microbiological test system is in accordance with the international norms.

Inositol is extracted from the sample and the extract is diluted. The diluted extract and the inositol 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 inositol. Following the addition of inositol as a standard or as a compound of the sample, the bacteria grow until the inositol 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 inositol 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 inositol assay medium (solid)
- 3 x inositol 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 (recommended for sterile working)
- microtiter plate reader 610 - 630 nm (540 - 550 nm)
- incubator with dark chamber, 30 °C (86 °F)
- incubator with dark chamber, 37 °C (98 °F)
- water bath heatable 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
- 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 sample extraction

- redist. or deionized water for sample extraction
- taka diastase, aspergillus oryzae; (e.g. Fluka 86250)
- Pepsin from pork (Merck 1.07185.0100)
- 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 deionised water in a 100 ml volumetric flask and fill up with redist. or deionised 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 could 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

For the determination of the **total inositol** content, the sample has to be treated by enzymatic extraction.

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 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 homogenized sample in 40 ml 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 inositol concentrations a sample weight of up to 5 g 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 containing herbs and spices
- samples with low concentrations of inositol 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 50 mg / 100 g

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

Calculation:

50 mg / 1.0 mg = 50
→ dilution factor 50 (1 : 50)

Dilution steps:

- a) 1 : 10 → 0.1 ml sample extraction solution + 0.9 ml sterile water from the test kit
- b) 1 : 5 → 0.2 ml from a) + 0.8 ml sterile water from the test kit

6.1. Total inositol content (native and added inositol)

Weigh exactly 1 g (ml) homogenized sample into a 50 ml centrifuge vial, add 20 ml redist. or deionized water. Shake and adjust pH to 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 100 mg taka diastase and 100 mg pepsin, shake well and incubate for 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 and 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.

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

- open the inositol 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 standard 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	950	+	0	=	950
standard 1: 0.5	950	+	50	=	1000
standard 2: 1.0	900	+	100	=	1000
standard 3: 2.0	400	+	100	=	500
standard 4: 3.0	350	+	150	=	500
standard 5: 5.0	250	+	250	=	500

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

The **inositol 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 Inositol 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 inositol 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® 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.

$$\text{Inositol (in mg / 100 g)} = \frac{\text{conc. standard curve} \times \text{dilution factor}}{\text{amount of sample in g}}$$

Example:

Sample weight:	1 g
Sample extraction dilution:	1 : 40 (must not be considered)
Dilution of the sample extraction:	1 : 50 (has to be considered)
Measured concentration from the standard curve:	1.0 mg inositol / 100 g

$$1.0 * 50 / 1 = 50 \text{ mg inositol / 100 g}$$

Unknown sample matrices should be analyzed with two dilutions of the extract (the deviation should be lower than 10 %). If the Inositol content of the higher dilution is elevated, inhibitors such as heavy metals and antibiotics could be present.

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 / 16 - 16.1
- Atkin, Schultz, Williams and Frey. 1943. End. & Eng. Chem., Ann. Ed. 15 : 141.
- 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

