



Витамин В1 (Тиамин)

Микробиологический тест для количественной оценки
витамина В1 (тиамин)

Арт. No. P1006

Анализ *in vitro*

Хранить при 2-8°C



Пожалуйста, обращайтесь по вопросам технической поддержки и дополнительной информации к официальным дистрибьюторам на территории Вашей страны:

**Официальный дистрибьютор
в России:**

ООО "НеоТест"

ул. Растопчина, 1Г, г. Владимир

+7 499 649 02 01

info@neo-test.ru

www.neo-test.ru

Техническая поддержка

support@neo-test.ru

+7 499 704 05 50



**Официальный дистрибьютор
в Беларуси:**

ОДО "КомПродСервис"

ул. Филимонова, 25Г, г. Минск

+375 17 336 50 54

info@komprod.com

www.komprod.com

Техническая поддержка

support@komprod.com

+375 17 336 50 54



VitaFast®

является зарегистрированным товарным знаком ifp Institut für Produktqualität GmbH. ifp.

VitaFast®

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

VitaFast® Витамин В1 (Тиамин)

Описание

Просто проводимая микробиологическая титриметрическая проба для определения содержания витамина В1 (добавленного и естественного витамина В1) в продуктах питания, кормах и фармацевтической продукции. Все необходимые реактивы и стандарт содержатся в тесте. С помощью теста можно провести 96 определений, включая градуировку. Для оценки необходим микропланшетный фотометр (610 - 630 нм, альтернативно 540 - 550 нм).

Пробоподготовка: Жидкие пробы (добавленный витамин В1): ферментативный гидролиз, экстрагировать, стерильно профильтровать и разбавить

Твердые пробы (добавленный витамин В1): гомогенизировать пробу, ферментативный гидролиз, экстрагировать, центрифугировать, разбавить

Жидкие пробы и твердые пробы (добавленный и естественный витамин В1): гомогенизировать пробу, ферментативный гидролиз, экстрагировать, центрифугировать и разбавить

Время выполнения: Постановка теста.....ок. 60 мин
Измерения.....2 мин

Инкубация:44-48 ч в темноте при 37°C (98,6°F)

Диапазон градуировочных растворов:0,012 – 0,060 мг / 100 г (мл)

Степень извлечения:90-105%

Внутренний коэффициент вариации для градуировочных растворов: <10%

Внешний коэффициент вариации для градуировочных растворов: <10%

1. Принцип теста

VitaFast® витамин В1 (тиамин) является микробиологическим методом определения общего содержания витамина В1 (добавленного и естественного витамина В1) в продуктах питания, кормах и фармацевтических изделиях. Микробиологическая тест-система опирается на международные нормы.

Витамин В1 экстрагируется из материала проб и экстракт разбавляется. Разбавленный экстракт и средство для анализа витамина В1 вносятся в лунки микротитровального планшета, которые покрыты *Lactobacillus fermentum*. Рост *Lactobacillus fermentum* зависит от наличия витамина В1. После добавления витамина В1 как градуировочного раствора или как содержащегося в пробе витамина В1 зародыш растет до тех пор, пока витамин не будет израсходован. Инкубация происходит в темноте при 37 °С в течение 24 ч.

Рост *Lactobacillus fermentum* в зависимости от экстрагированного витамина В1 наблюдается как помутнение и сравнивается с концентрационным рядом градуировочного раствора. Измерение происходит на микропланшетном фотометре при 610 - 630 нм (альтернативно при 540 - 550 нм).

2. Содержимое набора

Упаковка для проведения теста содержит реактивы для проведения 96 определений, включая градуировочные растворы. В каждой упаковке содержатся:

- 1 x микротитровальный планшет с 96 лунками, покрытыми *Lactobacillus fermentum*
- 3 x бидистиллированная стерильная вода (30 мл) для приготовления градуировочных растворов, средства для анализа, а также разбавления экстрактов проб
- 3 x средство для анализа витамина В1 (тверд.)
- 3 x стандарт витамина В1 (гидрохлорид тиамин) (тверд.)
- 3 x клеящаяся пленка
- 1 x запасная рамка для закрепления стрипов

Примечание: по окончании срока годности производитель не несет гарантии по качеству

3. Дополнительно требуемые реактивы и устройства

- стерильный бокс (рекомендуется стерильная работа)
- микропланшетный фотометр 610 - 630 нм (540 - 550 нм)
- инкубатор с темной камерой инкубации, 37 °С
- водяная баня с подогревом до 95 °С,
- автоклав
- рН-метр
- центрифуга, выше 8 000 x g (если пробу нельзя профильтровать)

- стерильные наконечники для пипет-дозаторов 20 – 200 мкл; 100 – 1000 мкл

- стерильные пробирки для центрифуги с завинчивающейся крышкой и градуировкой, 15 и 50 мл, стерильные реакционные сосуды 1,5 или 2,0 мл

- стерильные закручивающиеся емкости 500 мл, мерные колбы 100 и 1000 мл, химический стакан 100 мл

- стерильный фильтр полиэфирсульфон 0,2 мкм со стерильным шприцем

- дистиллированная или деионизированная вода для экстракции проб

- HCl 1,0 моль / л и 0,1 моль / л

- едкий натр концентрированный (40г NaOH на 100 мл дистиллированной или деионизированной воды) и раствор 2 моль / л (8 г NaOH на 100 мл дистиллированной или деионизированной воды)

Реактивы для определения общего содержания витамина В1

- така диастаза, *Aspergillus oryzae* (напр. Fluka 86250)

- Кислая картофельная фосфатаза (напр. Sigma P3752)

- Серная кислота H₂SO₄, концентрация 0,1 моль/л

- раствор ацетата натрия 2,5 моль/л (34 г ацетата натрия тригидрата, напр. Fluka 71190, растворить в 100 мл дистиллированной или деионизированной воды)

- Цитратный буфер, рН 4,5 (в химический стакан на 100 см³ с магнитной мешалкой помещают 1,5 г моногидрата лимонной кислоты, растворяют в 50 мл дистиллированной либо деионизированной воды при помешивании, затем добавляют 12 мл раствора NaOH концентрации 1 моль/л (либо 0,48 г NaOH), проверяют уровень рН, Уровень рН раствора должен быть 4,5 (при необходимости корректировку производят с помощью раствора HCl концентрации 0,1 моль/л). Раствор перемешивают и переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³ и доводят дистиллированной водой до метки. Буфер хранят не более 3 дней при температуре от плюс 2°С до плюс 8°С.

4. Меры предосторожности

- средство для анализа может вызывать раздражения слизистых оболочек, глаз и кожи

- после окончания теста стрипы должны быть правильно утилизированы (например, автоклавированы)

5. Хранение

Тест-систему / реактивы хранить при температуре 2 - 8 °С.

Приготовленные реактивы (стандарт, средство для анализа) должны сразу же использоваться, а остатки утилизироваться после использования.

6. Подготовка проб

Для определения добавленного витамина В1 в пробах, обогащенных витамином, как правило, достаточно горячей кислотной экстракции. Жидкие пробы можно стерильно профильтровать без предварительного нагрева и разбавить стерильной водой из тест-набора.

Для определения общего содержания витамина В1 (добавленного и естественного) проба должна растворяться с помощью ферментного гидролиза.

Оригинальные пробы хранить до анализа в защищенном от света месте при 4 °С. Рекомендуется определение градуировочного раствора и раствора пробы в триплетах (указание: в соответствии с официальными предписаниями). При неизвестных матрицах проб необходимо работать всегда с 2 этапами разбавления экстракта проб. Экстракты проб должны быть использованы в день изготовления и должны храниться в темном месте до тестирования.

Экстракция проб осуществляется с 1 г или 1 мл гомогенизированной пробы в 40 мл деминерализованной воды или реакционного раствора. Это соответствует фактору разбавления проб 40. Этот фактор учтен уже в градуировочной кривой (смотри сертификат качества на партию). При низком содержании витамина В1 возможно увеличение навески пробы до 5 г (мл) (необходимо учесть при оценке результатов).

На микропланшет можно вносить только стерильные экстракты проб либо стерильно разбавленные экстракты проб. Их разведения могут использоваться в тесте. Разведения изготавливаются с использованием стерильной воды из тест-набора (=фактор разведения), поэтому после экстракции проб необходимо соблюдать стерильные условия работы и использовать стерильные расходные материалы. Стерильная фильтрация пробы либо экстракта необходима всегда в следующих случаях:

- пробы (напр. фруктовые соки и энергетические напитки), которые не нагреваются в процессе пробоподготовки (за исключением нагрева в течение 30 минут при 95°С).

- пробы, содержащие травы и специи, а также чай и мед.

- смесь витаминов, премиксы, таблетки (высоко обогащены пробы по 6.3.) (за исключением нагрева в течение 30 минут при 95°С).

- ярко окрашенные пробы с низким содержанием витаминов, их окраска может повлиять на окрашивание в процессе теста.

- при невозможности фильтрации из-за присутствия твердых частиц либо помутнения, рекомендуется предварительное центрифугирование (выше 8000 x g в течение 5-10 минут).

Пробу можно не фильтровать, если в пробоподготовке присутствует шаг нагрева в течение 30 минут при 95°С. Несмотря на это разбавление проб производится стерильной водой из тест-набора (среда для анализа всегда должна стерильно фильтроваться).

Пример расчета по факторам разбавления экстракта проб

а. Твердая проба с заданным значением 2 мг активного витамина В1/ 100 г (по данным производителя)

На этикетке указывается активная форма витамина В1 (тиамин). тест калибруется с использованием гидрохлорида тиамин. Чтобы с разведением экстракта попасть припл. на середину градуировочной кривой, заданное значение пересчитывается на гидрохлорид тиамин (коэффициент 1,27) и делится на концентрацию градуировочного раствора 3.

2 мг активного витамина В1/ 100 г x 1,27 = 2,54 мг гидрохлорида тиамин/100 г.

2,54 мг гидрохлорида тиамин/100 г / 0,036 мг = 71.

→фактор разбавления примерно 70.

Шаги разбавления:

1-й шаг: разбавление 1: 10 (0,1 мл подготовленной пробы + 0,9 мл воды),

2-й шаг: разбавление предварительно разбавленной в шаге 1 пробы 1: 7 (0,1 мл пробы + 0,6 мл воды)

6.1. Жидкие пробы (мультивитаминные соки, спортивные напитки)

1 мл пробы налить в 50 мл-пробирку для центрифуги, развести дистиллированной либо деионизированной водой точно до 40 мл, встряхнуть, стерильно профильтровать (либо нагреть в течение 30 минут при 95°C на водяной бане, затем быстро охладить до температуры ниже 30°C), в зависимости от концентрации произвести дальнейшее разведение в реакционных сосудах объемом 1,5 либо 2 мл стерильной водой из тест-набора.

6.2. Добавленный витамин В1 в жевательных конфетах и сладостях

15-20 г жевательных конфет/сладостей отвесить в 50 мл-пробирку для центрифуги, добавить припл. 40 мл дистиллированной либо деионизированной воды, растворить на водяной бане в течение 30 минут при 95°C, периодически встряхивая, затем быстро охладить до температуры ниже 30°C. Раствор перенести в мерную колбу вместимостью 100 мл и довести дистиллированной либо деионизированной водой до метки. Отобрать объем раствора, соответствующий 1 г пробы, и перенести в 50 мл-пробирку для центрифуги, долить дистиллированной либо деионизированной водой до метки 40 мл, встряхнуть. Раствор стерильно профильтровать (либо нагреть в течение 30 минут при 95°C на водяной бане, затем быстро охладить до температуры ниже 30°C), в зависимости от концентрации произвести дальнейшее разведение в реакционных сосудах объемом 1,5 либо 2 мл стерильной водой из тест-набора.

Например: навеска пробы 17 г жевательных конфет

расчет 100 мл/17 г навески = 5,88 мл/г

1 г пробы содержится в 5,88 мл. Следовательно в 50 мл-пробирку для центрифуги переносят 5,88 мл и готовят как описано выше.

6.3. Добавленный витамин В1 в таблетках, капсулах и витаминных смесях
Вначале устанавливается вес таблеток и капсул (средний 5-10 таблеток или капсул). Таблетки хорошо гомогенизировать в ступке или миксере. Капсулы разрезать и разрезанные экстрагировать.

6.3.1 Пробоподготовка образца 1 г и предварительная экстракция

Точно отвесить 1 г таблетки, витаминной смеси либо премикса или разрезанной капсулы в стерильный закручивающийся 500 мл-сосуд, добавить прибл. 400 мл дистиллированной либо деионизированной воды, встряхнуть, отрегулировать уровень рН 4,5. Экстрагировать в течение 30 минут при 95°C на водяной бане. В течение этого времени встряхнуть минимум 5 раз. Затем быстро охладить раствор пробы до температуры ниже 30 °С, перенести в мерную колбу на 1000 мл и долить дистиллированной либо деионизированной водой до метки. От раствора отобрать 1 мл, перенести в 50 мл-пробирку для центрифуги, долить дистиллированной либо деионизированной водой до метки 40 мл, встряхнуть. Раствор стерильно профильтровать (либо нагреть в течение 30 минут при 95°C на водяной бане, затем быстро охладить до температуры ниже 30°C), произвести дальнейшее разведение 1:20 в реакционных сосудах объемом 1,5 либо 2 мл стерильной водой из тест-набора.

Внимание: при расчете результата необходимо учитывать фактор разведения 1000 (1 г до 1000 мл и разведение 1:20). Шаг разведения 1 мл на 40 мл уже учтен на градуировочной кривой.

6.3.2 Пробоподготовка образца 0,2 г

Взвесьте 0,2 г пиллюль, витаминной смеси, премикса или разрезанных капсул (с учетом веса) во флакон для центрифугирования на 50 мл, добавьте еще примерно 20 мл бидист.или деионизированной воды, хорошо взболтайте, доведите рН до 4-5 и долейте до 40 мл редист. или деионизированной водой. Экстрагируйте в течение 30 минут при 95 °С на водяной бане. Во время экстракции флакон необходимо хорошо встряхнуть не менее пяти раз. Важно убедиться, что флакон плотно закрыт. Быстро охладите до температуры ниже 30 ° С. После этого центрифугируйте и, в зависимости от диапазона концентраций, дополнительно разбавьте прозрачный супернатант в стерильных реакционных флаконах на 1,5 мл (или 2,0 мл) стерильной водой из набора для тестирования.

Примечание: для оценки необходимо учитывать вес образца.

6.4. Добавленный витамин в крупах, детском питании, хлебе, муке

Взвесьте 1 г (мл) гомогенизированного образца в стерильный флакон для центрифугирования на 50 мл, заполните до 30 мл 0,1 моль/л HCl и хорошо встряхните. Экстрагируйте в течение 30 минут при 95 °С на водяной бане. Во время экстракции флакон необходимо хорошо встряхнуть не менее пяти раз. Важно убедиться, что флаконы плотно закрыты. Быстро охладите до температуры ниже 30 °С и доведите рН до 4-5 с помощью 2 моль/л NaOH.

Долейте редист. или деионизированной воды ровно до 40 мл. Встряхните образец. Отфильтруйте образец в стерильных условиях (или нагревайте образец 30 мин при 95 °С на водяной бане, после этого быстро охладите до температуры ниже 30 °С). В зависимости от диапазона концентраций, дополнительно разбавьте в 1,5 мл (или 2,0 мл) стерильных реакционных флаконах стерильной водой из тестового набора.

6.5. Общее содержание витамина В1 (естественный и добавленный витамин В1) в молочных продуктах, крупах, детском питании

Взвесьте 1 г (мл) гомогенизированного образца в стерильную центрифужную пробирку на 50 мл, добавьте 20 мл редист. или деионизированной воды, встряхните и доведите рН до 4,5 с помощью HCl.

В качестве альтернативы вместо воды для экстракции можно использовать цитратный буфер (регулировка рН не требуется): к 1 г образца добавить 20 мл цитратного буфера рН 4,5 и встряхнуть.

Добавьте 300 мг така диастазы, хорошо встряхните и инкубируйте 1 час в темноте при 37 °С (инкубатор или водяная баня, время от времени встряхивайте). Долейте редист. или деионизированной воды ровно до 40 мл. После этого нагрейте экстракт в течение 30 минут на водяной бане при 95 °С. Во время экстракции флакон необходимо хорошо встряхнуть не менее пяти раз. Важно убедиться, что флакон центрифуги плотно закрыт. Быстро охладите до температуры ниже 30 °С. После этого центрифугируйте. В зависимости от диапазона концентраций разведите прозрачный супернатант в стерильных реакционных флаконах на 1,5 мл (или 2,0 мл) стерильной водой из набора для тестирования.

6.6 Общее содержание витамина В1 (естественный и добавленный витамин В1) в дрожжах и дрожжевых продуктах

1 г гомогенизированной пробы точно отвесить в 50 мл флакон для центрифуги. К пробе долить припл. 10 мл H₂SO₄ (концентрация 0,1 моль/л), хорошо встряхнуть и автоклавировать в течение 30 минут при 121 °С (пробирку плотно не закручивать). Затем быстро охладить до температуры ниже 30 °С, добавить 3 мл раствора ацетата натрия концентрации 2,5 моль/л, встряхнуть, добавить 300 мг така диастазы и 10 мг кислой картофельной фосфатазы. Смесь хорошо встряхнуть, инкубировать в течение ночи (12-16 часов) в темноте. Затем долить водой до 40 мл и экстрагировать в течение 30 минут на водяной бане при 95°С. В течение этого времени встряхнуть минимум 5 раз. Необходимо следить за тем, чтобы флакон был плотно закрыт. Затем быстро охладить до температуры ниже 30 °С, центрифугировать. В зависимости от концентрации произвести дальнейшее разведение прозрачной фазы в реакционных сосудах объемом 1,5 или 2 мл стерильной водой из тест-набора.

7. Проведение анализа

7.1. Подготовка теста

Бутылка со стерильной водой: цветную крышку поднять вверх, оттянуть назад до края стекла и затем, поворачивая, снять крышку.

Каждого **стандарта витамина В1** достаточно как минимум для 3 лунок. Градуировочные растворы должны готовиться заново перед каждым проведением теста.

- Бутылку со стандартом витамина В1 открыть, навинчивающуюся крышку снять, перевернув глухой частью вниз.

- Добавить в бутылку со стандартом витамина В1 x мл (x – см. сертификат качества на партию) стерильной воды из бутылки, бутылку закрыть и встряхнуть (= концентрат градуировочного раствора).

- в 6 стерильных реакционных сосудов (объемом 1,5 – 2,0 мл) добавить стерильную воду и затем пипеткой добавить концентрат градуировочного раствора по следующей схеме:

Градуировочная кривая * в мг / 100 г (мл)	Стерильная вода в мкл		Концентрат градуировочного раствора в мкл		Общий объем в мкл
Нулевая величина	850	+	0	=	850
Градуировочный раствор 1: 0,012	850	+	150	=	1000
Градуировочный раствор 2: 0,024	700	+	300	=	1000
Градуировочный раствор 3: 0,036	370	+	300	=	670
Градуировочный раствор 4: 0,048	200	+	300	=	500
Градуировочный раствор 5: 0,060	200	+	600	=	800

*В градуировочной кривой уже учтен фактор разведения 1:40.

Бутылка средства для анализа витамина В1 достаточна для минимум 6 стрипов. Бутылку открыть, осушитель достать с помощью пинцета и отбросить.

- 10 мл стерильной воды из набора для теста добавить в бутылку средства для анализа

- бутылку средства для анализа хорошо закрыть и встряхнуть

- бутылку средства для анализа нагреть на водяной бане в течение 5 минут при 95 °С, в течение этого времени встряхнуть минимум 2 раза, обратить внимание на то, чтобы бутылка была плотно закрыта.

- бутылку средства для анализа быстро охладить до температуры ниже 30°С.

- средство для анализа стерильно профильтровать в 15 мл-пробирку для центрифуги через фильтр 0,2 мкм.

7.2. Постановка теста

На микропланшет можно вносить только стерильные пробы, приготовленные с использованием воды из тест-набора.

- извлечь необходимое количество стрипов из планшета, закрепить их в дополнительной рамке. (Остальные стрипы хранить в рамке вместе с осушителем в фольгированном пакете при температуре 2-8°C).

Пипетируйте сначала среду, а затем стандартные или разбавленные образцы.

- внести по 150 мкл среды для анализа витамина В1 в лунки.

- внести по 150 мкл градуировочных растворов и растворов проб в соответствующие лунки (кончики пипеток предварительно ополоснуть раствором градуировочного раствора либо соотв. пробы).

- аккуратно заклеить стрипы / лунки пленкой: снять защитный слой пленки, расправить пленку и плотно приложить к лункам, затем рукой аккуратно и плотно прижать либо приклеить ее к краям лунок.

- инкубация при 37 °С в темноте в течение 44-48 ч в инкубаторе.

7.3. Измерение

• еще раз прижмите липкую пленку, поместите микротитровальный планшет вверх дном на стол и тщательно растворите микроорганизмы, встряхивая планшет на поверхности стола;

• переверните планшет в обычное положение и снимите липкую пленку по диагонали, на 180 градусов назад, начиная с верхнего правого угла;

• пленка обладает прочной адгезией, поэтому снимать ее с микротитровального планшета необходимо с особой осторожностью: крепко удерживайте стрипы в рамке одной рукой, пока вы снимаете пленку;

• уберите пузырьки на поверхности жидкости в лунках (с помощью наконечника пипетки или иглы);

• измерьте мутность образцов с помощью ридера для микротитровальных планшетов при 610-630 нм (альтернативно при 540-550 нм).



Примечание:

- микротитровальный планшет после 44-48 ч. инкубации может сохраняться также максимум 48 ч в холодильнике для последующего измерения;

- чтобы избежать потерь времени из-за выходных или праздников, микротитровальный планшет можно проверить через 60 часов. Рекомендуется использовать таймер для выключения инкубатора через 44-48 часов.

8. Оценка

Для оценки рекомендуется программное обеспечение RidaSoft.WIN (по запросу в R-Biopharm). Расчет производится на основе 4-параметрической оценки. Программное обеспечение RIDA ® SOFT Win и инструкцию к нему Вы можете бесплатно скачать на сайте официальных дистрибьюторов:

ООО «Неотест», Россия	https://neo-test.ru/programmnoe-obespechenie/	
ОДО «КомПродСервис», Беларусь	https://komprod.com/programmnoe-obespechenie/	

Тест был проведен правильно при выполнении следующих условий:

оптическая плотность нулевого градуировочного раствора < оптическая плотность градуировочного раствора 1.

оптическая плотность градуировочного раствора 5 > 0,6

Фактор разбавления проб 40 уже учтен при изображении градуировочной кривой. В ниже указанных формулах должно учитываться лишь дальнейшее разбавление экстракта проб (фактор разбавления), а также отклоняющаяся навеска пробы.

$$\text{витамин B1 (в мг/100г или мг/100мл)} = \frac{\text{конц. на градуир. кривой} \cdot 0,787}{\text{объем пробы в г (мл)}}$$

Пример:

Масса образца:	1 г
Фактор разведения при экстрагировании:	1:40 (не учитывается)
Фактор разведения (экстракта пробы):	1:70 (должен учитываться)
Измеренная концентрация по градуировочной кривой:	0,055 мг гидрохлорида тиамина / 100г

$$0,055 \cdot 70 \cdot 0,787 / 1 = 3,03 \text{ мг активного витамина B1 / 100 г}$$

Оценка для капсул, таблеток, витаминных смесей:

$$\text{витамин B1 (в мг/таблетку (капсулу))} = \frac{\text{конц. на градуир. кривой} \cdot 0,787}{\text{объем пробы в г} \cdot 100}$$

R-Biopharm не дает никаких гарантий, явных или подразумеваемых, за исключением того, что материалы, из которых изготовлены ее продукты, имеют стандартное качество. Если какие-либо материалы имеют дефекты, R-Biopharm обеспечит замену продукта. Нет никаких гарантий товарной пригодности этого продукта или пригодности продукта для каких-либо целей. R-Biopharm не несет ответственности за любой ущерб, в том числе фактический или косвенный ущерб, или расходы, возникающие прямо или косвенно в результате использования этого продукта.