



## Инозитол

Микробиологический тест для количественной оценки  
инозитола

Арт. No. P1009

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](http://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](http://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® Инозитол

## Описание

Просто проводимая микробиологическая проба для определения содержания инозитола (добавленного и естественного инозитола) 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 и твердые пробы: гомогенизировать пробу, центрифугировать и разбавить	экстрагировать,
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:	0,5 – 5 мг / 100 г	
Степень извлечения:	80-120%	
Внутренний коэффициент вариации для градуировочных растворов:		<10%
Внешний коэффициент вариации для градуировочных растворов:		<10%

## 1. Принцип теста

Тест представляет собой микробиологический метод определения общего содержания инозитола (добавленного и естественного инозитола) в продуктах питания, кормах и фармацевтических изделиях. Микробиологическая тест-система опирается на международные нормы.

Инозитол извлекается из образца, а экстракт разбавляется. Разбавленный экстракт и среда для анализа инозитола переносятся в лунки микротитровального планшета, поверхность лунок покрыта *Saccharomyces cerevisiae*. Рост *Saccharomyces cerevisiae* зависит от внесения инозитола. После добавления инозитола в виде стандарта или образца бактерии растут до тех пор, пока инозитол не будет израсходован. Инкубацию проводят в темноте при 30 °C (86 °F) в течение 44 – 48 часов. Интенсивность метаболизма или рост *Saccharomyces cerevisiae* оценивают по мутности и сравнивают со стандартной кривой. Измерение выполняется 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 планшет для микротитрования с 96 лунками, покрытыми *Saccharomyces cerevisiae*
- 3 x бидистиллированная стерильная вода (30 мл) для приготовления градуировочных растворов, средства для анализа, а также разбавления экстрактов проб
- 3 x среда для анализа (твердое вещество)
- 3 x стандарта инозитола (твердое вещество)
- 3 x клейкая фольга (1 полная и 2 половинки клейкой фольги, достаточная для проведения 3 тестов)
- 1 x дополнительный держатель для стрипов микротитровального планшета

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

## 3. Дополнительно требуемые реактивы и устройства

- стерильный бокс (рекомендуется для стерильной работы),
- микропланшетный фотометр 610 - 630 нм (540 - 550 нм),
- инкубатор с темной камерой инкубации, 37 °C,
- инкубатор с темной камерой инкубации, 30 °C,
- водяная баня с подогревом до 95 °C,
- pH-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,
- стерильный полиэфирсульфоновый фильтр 0,2 мкм со стерильным шприцем,
- дистиллированная или деионизированная вода для экстракции проб,
- HCl 1,0 моль/л и 0,1 моль/л,
- NaOH 1,0 моль/л и 0,1 моль/л,
- NaOH концентрированный (40 г NaOH на 100 мл дистиллированной или деионизированной воды),
- NaOH 2 моль/л (8 г NaOH на 100 мл дистиллированной или деионизированной воды).

### **Реагенты для экстракции образцов**

редистиллированная или деионизированная вода для отбора проб;  
taka diastase, aspergillus oryzae; (например, Fluka 86250);  
пепсин из свинины (Merck 1.07185.0100);  
цитратный буфер pH 4,5 (1,5 г моногидрата лимонной кислоты взвесьте в стакане на 100 мл с магнитной мешалкой; растворить лимонную кислоту в 50 мл воды при перемешивании; после этого добавьте 12 мл NaOH 1 моль/л (или 0,48 г NaOH); pH должен быть 4,5 (доведите pH до нужных значений HCl 0,1 моль/л); перенесите раствор количественно редистиллированной или деионизированной водой в мерную колбу объемом 100 мл доведите объем раствора до метки редистиллированной или деионизированной водой; буфер может храниться 3 дня при 2 – 8 °C).

### **4. Меры предосторожности**

- среда может вызывать раздражения слизистых оболочек и кожи
- после окончания теста стрипы должны быть правильно утилизированы (например, автоклавированы)

### **5. Хранение**

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

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

### **6. Подготовка проб**

Для определения общего содержания инозита образец должен подвергнуться ферментативной экстракции. Образцы должны храниться в защищенном от света месте при температуре 4 °C. Стандарты и образцы

должны анализироваться трехкратно (примечание: официально рекомендовано трехкратное определение). Неизвестные матрицы необходимо анализировать в двух разведениях экстракта. Экстракты должны быть использованы в течение одного дня, их следует хранить в темноте до анализа.

Экстрагирование проводят с 1 г гомогенизированного образца в 40 мл экстракционного раствора. Коэффициент разбавления – 40. Это учтено при построении стандартной кривой (см. сертификат качества). Для образцов с низкой концентрацией инозита вес образца может превышать 5 г (это следует учитывать в расчетах). Только стерильные экстракты или их стерильные разведения следует наносить на планшет. Разведения должны быть выполнены на стерильной воде, входящей в состав набора.

Работы необходимо проводить в стерильных условиях и с использованием стерильных материалов. Стерильная фильтрация образца или экстракта всегда необходима для:

- образцов, содержащих травы и специи;
- образцов с низкой концентрацией инозита, которые сильно окрашены, фильтрация снижает интенсивность окраски;
- если фильтрация образца невозможна из-за крупных частиц, следует сначала отцентрифугировать образцы (больше 8000 g в течение 5 мин).

**Стерильная фильтрация образца не требуется, если экстракцию образца проводят при 95 °С в течение 30 мин. Тем не менее, экстракты образцов должны быть разбавлены стерильной водой из набора для анализа (среда анализа всегда должна быть отфильтрована).**

### **Пример расчета по факторам разбавления экстракта проб**

Твердая проба с заданным значением 50 мг/100 г

Чтобы с разведением экстракта попасть прил. на середину градуировочной кривой, заданное значение делится на концентрацию градуировочного раствора 2.

$50 \text{ мг}/1,0 \text{ мг} = 50 \rightarrow$  фактор разбавления 50 (1:50)

Этапы разбавления:

1-й шаг: разбавление 1:10 (0,1 мл экстракта + 0,9 мл стерильной воды из набора),

2-й шаг: разбавление предварительно разбавленной в шаге 1 пробы 1:5 (0,2 мл предварительно разбавленной пробы + 0,8 мл стерильной воды из набора).

### **6.1. Общее содержание инозита (нативный и добавленный инозит)**

Взвесить ровно 1 г (мл) гомогенизированного образца в 50 мл центрифужной пробирке, добавить 20 мл редист. или деионизированной воды. Встряхните и отрегулируйте pH до 4,5 с помощью HCl. В качестве альтернативы

вместо воды для экстракции можно использовать цитратный буфер (регулировка pH не требуется): к 1 г образца добавляют 20 мл цитратного буфера pH 4,5 и встряхивают.

Добавить 100 мг taka diastase и 100 мг пепсина, хорошо встряхнуть и инкубировать для 1 час при 37 °C в темноте (время от времени встряхивать). Заполнить ровно до 40 мл редист. или деионизированной водой и экстрагировать в течение 30 минут на водяной бане при 95 °C. Во время извлечения флакон необходимо хорошо встряхнуть не менее пяти раз. Важно убедиться, что флакон плотно закрыт. Охладить быстро до температуры ниже 30 °C. После этого необходимо центрифугировать и, в зависимости от концентрации, развести прозрачный супернатант в 1,5 мл (или 2,0 мл) стерильных реакционных флаконах стерильной водой из тест-набора.

## 7. Проведение анализа

### 7.1. Подготовка теста

Бутылка со стерильной водой: отодвиньте цветную крышку вверх, потяните вверх до стеклянного края и поверните всю крышку, чтобы снять ее.

Стандарты инозитола необходимо использовать после приготовления. Каждое разведение достаточно для трех лунок.

- Откройте бутылку со стандартом инозитола, поверните крышку, чтобы отверстие оказалось сверху.

- Добавьте x мл (x = смотри Сертификат качества и этикетку стандарта) стерильной воды (из набора для тестирования) в стандартную бутылку. Закройте бутылку с крышкой и растворите стандарт, встряхивая концентрат.

- Возьмите 6 стерильных флаконов (1,5 или 2,0 мл) и приготовьте из растворенного стандартного концентрата растворы для построения стандартной кривой в соответствии со следующей схемой:

Градуировочная кривая* в мг/100 г (мл)	Стерильная вода в мкл		Концентрация стандарта в мл		Общий объем в мл
Бланк: 0	950	+	0	=	950
Градуировочный раствор 1:0,5	950	+	50	=	1000
Градуировочный раствор 2:1,0	900	+	100	=	1000
Градуировочный раствор 3:2,0	400	+	100	=	500
Градуировочный раствор 4:3,0	350	+	150	=	500
Градуировочный раствор 5:5,0	250	+	250	=	500

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

Среды достаточно для проведения анализа в 6 стрипах. Открой бутылку со средой для анализа и удалить пинцетом влагопоглотитель.

Среды достаточно для проведения анализа в 6 стрипах. Открой бутылку со средой для анализа и удалить пинцетом влагопоглотитель.

- добавить 10 мл стерильной воды из набора для анализа в среду для анализа бутылка;
- тщательно закройте бутылку со средой для анализа и хорошо встряхните;
- нагрейте бутылку на водяной бане до 95 °С в течение 5 минут при встряхивании. по крайней мере, дважды; обращайтесь внимание на то, чтобы бутылка была плотно закрыта;
- быстро охладите бутылку до комнатной температуры ниже 30 °С;
- отфильтруйте среду через фильтр 0,2 мкм в стерильный центрифужный флакон на 15 мл.

## **7.2. Тестовая процедура**

Только стерильные образцы, разбавленные стерильной водой из набора для анализа, следует использовать для проведения анализа.

Достаньте из рамки стрипы для проведения анализа, поместите их в дополнительную рамку; верните неиспользованные стрипы вместе с осушителем в пакет из фольги, плотно закройте пакет, храните неиспользованные стрипы при 2 - 8 °С.

Внесите реагенты как указано ниже:

1. Внесите в лунки 150 мкл среды для анализа.
2. Внесите в лунки 150 мкл стандартного или разбавленного образца.
3. Запечатайте стрипы полосками клейкой фольги: снимите защитный слой с фольги, закройте фольгой стрипы, плотно прижмите фольгу к стрипам, важно убедиться, что лунки герметично закрыты фольгой.
4. Инкубируйте в инкубаторе при температуре 30 °С в темноте в течение 44 - 48 ч.

## **7.3. Измерение**

Прижмите клейкую фольгу к планшету, переверните планшет, растворите микроорганизмы, осторожно передвигая планшет по поверхности стола. Верните планшет в обычное положение и удалите клейкую фольгу круговым движением, начиная с верхнего правого угла; фольга очень адгезивна, поэтому необходимо снимать ее с большой осторожностью, крепко удерживая стрипы в рамке. Удалите пузырьки на поверхности жидкости в лунках (с помощью кончика пипетки или иглы). Измерьте мутность с помощью ридера для микротитровального планшета при 610 – 630 нм (альтернативно при 540 – 550 нм).

Примечание:

После 44-48 ч инкубации планшет можно хранить макс. 48 ч в холодильнике, затем следует провести измерение.

Чтобы избежать потерь времени из-за выходных или праздников, измерения можно провести через 60 часов. Рекомендуется использовать таймер для выключения инкубатора через 44 – 48 ч.

## 8. Оценка

Для оценки рекомендуется программное обеспечение на основе 4 параметров (по запросу в R-Biopharm).

Программное обеспечение RIDA ® SOFT Win и инструкцию к нему Вы можете бесплатно скачать на сайте официальных дистрибьюторов:

ООО «Неотест», Россия	<a href="https://neo-test.ru/programmnoe-obespechenie/">https://neo-test.ru/programmnoe-obespechenie/</a>	
ОДО «КомПродСервис», Беларусь	<a href="https://komprod.com/programmnoe-obespechenie/">https://komprod.com/programmnoe-obespechenie/</a>	

Тест выполнен правильно, если:

- оптическая плотность Blank < Оптической плотности стандарта 1,
- оптической плотности стандарта 5 > 0,6.

Коэффициент разведения образца 40 уже включен в стандартную кривую (см. Сертификат качества). В приведенной ниже формуле учитывается дополнительный коэффициент разбавления экстракта и различный вес образца.

$$\text{Инозитол (в мг/100г)} = \frac{\text{конц. на градуир. кривой} \cdot \text{фактор разведения}}{\text{объем пробы в г}}$$

Пример:

Вес образца: 1 г.

Разведение образца экстракции: 1 : 40 (не должно учитываться).

Разведение экстракта образца: 1 : 50 (необходимо учитывать).

Измеренная концентрация по стандартной кривой: 1,0 мг инозитола/100 г.

$$1,0 * 50/1 = 50 \text{ мг инозита/100 г.}$$

Неизвестные матрицы должны быть проанализированы с двумя разведениями экстракта (отклонение должно быть ниже 10%). Если содержание

инозитола с разведением увеличивается, то вероятно присутствуют ингибиторы, такие как тяжелые металлы или антибиотики.

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.