



User's Manual

# **Folic Acid ELISA Kit**

Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of Folic Acid in food

**BGT-KET-376**

Sensitivity	2 ng/mL
Recovery (spiked samples)	90-110 %
Incubation Time	140 min

### 1. GENERAL INFORMATION

Folates play an important role in the synthesis of nucleic acids and some amino acids and gained recently increased interest because they belong to the group of antioxidative vitamins. In the last years the influence of folic acid supplementation to avoid abortion and dysraphism was a topic of research increasingly. Folic acid as the most stable representative of the group of folates is added to a broad range of food.

Traditional methods are mostly microbiological ones, but also TLC and HPLC are applied. These methods are time consuming and need complex equipment.

This test kit allows the detection (2.5 to 4 hrs. incl. sample preparation) of folic acid in supplemented food which is more rapid compared to traditional techniques (24-48 hrs).

### 2. PRINCIPLE OF THE TEST

The **Folic Acid** quantitative test is based on the principle of the enzyme linked immunosorbent assay. A folic acid conjugate is bound on the surface of a microtiter plate. Folic acid containing samples or standards and an antibody directed against folic acid are given into the wells of the microtiter plate. Immobilized and free folic acid compete for the antibody binding sites. After one hour incubation at room temperature, the wells are washed with diluted washing solution to remove unbound material. A peroxidase conjugate against the antibody is given into the wells and after another hour incubation, the plate is washed again. Then a substrate solution is added and incubated for 20 minutes, resulting in the development of a blue colour. The colour development is inhibited by the addition of a stop solution, and the colour turns yellow. The yellow colour is measured photometrically at 450 nm. The concentration of folic acid is indirectly proportional to the colour intensity of the test sample.

### 3. PRECAUTIONS

Full compliance of the following good laboratory practices (GLP) will determine the reliability of the results:

1. Prior to beginning the assay procedure, bring all reagents to room temperature (20-25°C).
2. All reagents should be mixed by gentle inversion or swirling prior to use. Do not induce foaming.
3. Once the assay has been started, all subsequent steps should be completed without interruption and within the recommended time limits.
4. Replace caps in all the reagents immediately after use. Do not interchange vial stoppers.
5. Use a separate disposable tip for each specimen to prevent cross-contamination.
6. All specimens and standards should be run at the same time, so that all conditions of testing are the same.
7. Do not mix components from different batches.
8. Do not use reagents after expiration date.
9. Check both precision and accuracy of the laboratory equipment used during the procedure (micro-pipets, ELISA reader etc.).

### 4. HEALTH AND SAFETY INSTRUCTIONS

1. Do not smoke or eat or drink or pipet by mouth in the laboratory.
2. Wear disposable gloves whenever handling patient specimens.
3. Avoid contact of substrate and stop solution with skin and mucosa (possible irritation, burn or toxicity hazard). In case of contact, rinse the affected zone with plenty of water.
4. Handling and disposal of chemical products must be done according to good laboratory practices (GLP).

## 5. REAGENTS

The kit contains reagents for 96 determinations. They have to be stored at 2-8°C. Expiry data are found on the labels of the bottles and the outer package.

1. **SORB** **MT** Microtiter plate consisting of 12 strips with 8 breakable wells each, coated with folic acid conjugate.
2. **CAL** **1** – **6** Folic Acid Standards (0; 4; 10; 40; 100; 400 ng/mL): 6 vials with 1.0 mL each, ready-to-use.
3. **Ab** Anti-Folic Acid Antibody (mouse): 6 mL, dyed red, ready-to-use.
4. **ENZ** **CONJ** Conjugate (anti-mouse-IgG-HRP): 15 mL, dyed red, ready-to-use.
5. **SUB** **TMB** Substrate Solution (TMB): 15 mL; ready-to-use.
6. **STOP** **SOLN** Stop Solution (1 N acidic solution): 15 mL; ready-to-use.
7. **SAM** **DIL** Sample Diluent (PBS): 2 x 60 mL, dyed red, ready-to-use.
8. **WASH** **SOLN** **10x** Washing Solution (PBS + Tween 20): 60 mL as 10x concentrate, dyed blue. Dilute 1+9 with distilled water. If during the cold storage crystals precipitate, the concentrate should be warmed up to 37°C for 15 minutes.
9. Instruction Manual.

## 6. ADDITIONAL INSTRUMENTATION AND REAGENTS (NOT PROVIDED)

### Instrumentation

- 10 - 1000 µL-micropipets
- ELISA reader (450 nm)
- Volumetric flask
- Mortar, mixer
- Centrifuge
- Two plastic foils to cover the strips during the incubation
- Plastic bag to store unused microtiter strips

### Reagents

- Potassiumhexacyanoferrate(II)-3-hydrate (150 g/L; Carrez I)
- Zinculfate-7-hydrate (300 g/L; Carrez II)
- Double-distilled water
- 1 M caustic soda solution
- 1 M hydrochloric acid
- PBS (8.77 g/L NaCl, 0.70 g/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>x2H<sub>2</sub>O, 2.90 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>x2H<sub>2</sub>O)

## 7. SAMPLE PREPARATION

The vitamin is extracted from the sample by double-distilled water. After the dissolution, the pH is adjusted by 1 M caustic soda solution or 1 M hydrochloric acid to 6-7. Afterwards potential turbid matter is precipitated by Carrez I (150 g/L Potassiumhexacyanoferrate(II)-3-hydrate) and Carrez II (300 g/L Zincsulfate-7-hydrate). The extract is filled up to a defined volume and is centrifuged. Samples which are difficult to dissolve in cold water can be brought in solution by gentle warming. After the centrifugation, the samples are further diluted by the supplied sample diluent. To exclude interfering matrix or pH effects, a minimal dilution of 1 in 10 should be followed. We recommend a dilution to 4-100 ng/mL, in order to obtain an optimal accuracy during the measurement.

Grain products normally contain low concentrations of folic acid. In order to avoid high dilutions, the sample can be extracted directly by sample diluent instead of double-distilled water. The amount of sample diluent supplied in the kit is not sufficient in this case. The buffer can however be ordered separately from Demeditec.

### **Multivitamin Tablets and Capsules**

The tablets and capsules are dissolved in double-distilled water, and the pH value is adjusted to 6-7. Then 0.5 mL each of Carrez I and Carrez II are added, and the solution is filled up to a defined volume by double-distilled water. The solid matter is separated by centrifugation, and the upper phase is further diluted by sample diluent. To dissolve the capsules, heating to 30-40°C is recommended.

### **Multivitamin Juices**

The juice is adjusted to pH 6-7, 0.5 mL each of Carrez I and Carrez II are added, and the solution is filled up to a defined volume by double-distilled water. The solid matter is separated by centrifugation, and the upper phase is further diluted by sample diluent.

### **Multivitamin Jam**

The jam is homogenised in a mixer, and approximately 8 grams are extracted by double-distilled water, the pH is adjusted to 6-7 and 0.5 mL each of Carrez I and Carrez II are added. Afterwards the solution is filled up to a defined volume by double-distilled water. The solid matter is separated by centrifugation, and the upper phase is further diluted by sample diluent.

### **Grain Products (Corn Flakes and Muesli)**

3-5 grams of sample are homogenised by a mortar or a mixer, extracted by double-distilled water, the pH is adjusted to 6-7, and 0.5 mL each of Carrez I and Carrez II are added. Afterwards the solution is filled up to a defined volume by double-distilled water. The solid matter is separated by centrifugation, and the upper phase is further diluted by sample diluent. Grain products normally contain low concentrations of folic acid. In order to avoid high dilutions, the sample can be extracted directly by sample diluent instead of double-distilled water.

### **Multivitamin Sweets**

The sweets are dissolved by gentle heating (if necessary) in double-distilled water, the pH is adjusted to 6-7, and 0.5 mL each of Carrez I and Carrez II are added. Afterwards the solution is filled up to a defined volume by double-distilled water. The solid matter is separated by centrifugation, and the upper phase is further diluted by sample diluent.

### **Milk**

5 mL of a fresh milk sample (full-cream milk or skim milk) are pipetted into a test tube and refrigerated for 30 minutes at 2-8°C. Afterwards the sample is centrifuged for 10 min at 3000 g. The upper fat layer is aspirated and discarded. The remaining aqueous layer is diluted 1:5 in sample diluent.

### **Dry Milk Instant Formula**

10 g of dry milk instant formula are suspended in 25 mL PBS and filled up to 50 mL. The mixture is vortexed intensely for 10 min and heated for 3 min in boiling water afterwards. After cooling to 20-25°C it is centrifuged for 10 min at 3000 g. The upper fat layer is aspirated and discarded. The remaining aqueous layer is diluted 1:5 in sample diluent.

**8. PROCEDURE**

1. Prepare samples as described above.
2. Pipet 100  $\mu\text{L}$  standards or prepared samples in duplicate into the appropriate wells of the microtiter plate. Immediately add 50  $\mu\text{L}$  folic acid antibody into each well.
3. Cover the microtiter plate with a plastic foil and incubate for 60 minutes at room temperature on a microtiter plate shaker (or 90 minutes without shaker).
4. Wash the plate three times as follows: Discard the contents of the wells (dump or aspirate). Pipet 300  $\mu\text{L}$  of diluted washing solution into each well. After the third repetition empty the wells again and remove residual liquid by striking the plate against a paper towel. The wash procedure is critical. Insufficient washing will result in poor precision and falsely elevated absorbencies.
5. Pipet 100  $\mu\text{L}$  of conjugate (anti-mouse-IgG-HRP) into each well.
6. Cover the microtiter plate with a plastic foil and incubate for 60 minutes at room temperature on a microtiter plate shaker (or 90 minutes without shaker).
7. Wash the plate as outlined in 4.
8. Pipet 100  $\mu\text{L}$  of substrate solution into each well.
9. Allow the reaction to develop in the dark (e.g. cupboard or drawer; the chromogen is light-sensitive) for 20 minutes at room temperature.
10. Stop enzyme reaction by adding 100  $\mu\text{L}$  of stop solution (1 N acidic solution) into each well. The blue colour will turn yellow upon addition.
11. After thorough mixing, measure absorbance at 450 nm (reference wavelength 620 nm), using an ELISA reader. The colour is stable for 30 minutes.

**9. CALCULATION OF RESULTS**

1. Calculate the average optical density (OD 450 nm) for each set of reference standards or samples.
2. Construct a standard curve by plotting the mean optical density obtained for each reference standard against its concentration in ng/mL on semi-log graph paper with the optical density on the vertical (y) axis and the concentration on the horizontal (x) axis.
3. Using the mean optical density value for each sample, determine the corresponding concentration of folic acid in ng/mL from the standard curve. Depending on experience and/or the availability of computer capability, other methods of data reduction may be employed.
4. The diluted samples must be further converted by the appropriate dilution factor according to the sample preparation procedure as described above.

Example:

A vitamin tablet was extracted according to the described method. After Carrez precipitation the solution was filled up to 50 mL and the supernatant was diluted 1:500 with sample diluent. In the test a concentration of 40 ng/mL was determined. The resulting factor "F" is calculated as follows:

$$F = A \times B$$

A: Dilution factor 1 (in this case 50, since the tablet was dissolved in 50 mL)

B: Dilution factor 2 (in this case 500, since the supernatant was diluted after centrifugation 1:500)

The dilution factor has the dimension mL/tablet. The measured concentration is multiplied by the factor to get the real concentration.

Real concentration = 40 ng/mL  $\times$  25,000 mL/tablet = 1,000,000 ng/Tablette = 1 mg/tablet

Applying the procedures for milk and dry milk instant formula the dilution factors are 5 or 25 respectively.

## 10. TYPICAL STANDARD VALUES

The following table contains an example for a typical standard curve. The binding is calculated as percent of the absorption of the 0 ng/mL standard. These values are only an example and should not be used instead of the standard curve which has to be measured in every new test.

Folic acid (ng/mL)	% binding of 0 ng/mL
0	100
4	80
10	60
40	25
100	11
400	4

## 11. PERFORMANCE

### Sensitivity

The sensitivity of the **Folic Acid ELISA** is 2 ng/mL (based on the standard curve).

### Recovery

The recovery of spiked samples was determined to 90-110 %.

### Intra-assay Precision

The intra-assay variation of the folic acid test was determined to 3 %.

### Cross-reactivity

Cross-reactivity	relative to folic acid (=100 %)
Dihydrofolic acid	18 %
Tetrahydrofolic acid	5 %
5-Formyltetrahydrofolic acid	0.1 %

Empfindlichkeit	2 ng/mL
Wiederfindung (aufgestockte Proben)	90-110 %
Inkubationszeit	140 min

## 1. ALLGEMEINES

Folate spielen bei der Synthese von Nukleinsäuren und einigen Aminosäuren eine entscheidende Rolle und haben neuerdings wegen ihrer Zugehörigkeit zur Gruppe antioxidativ wirkender Vitamine verstärktes Interesse gefunden. In den letzten Jahren wurde zunehmend der Einfluss der Folsäurezufuhr auf die Vermeidung von Fehlgeburten und Neuralrohrdefekten untersucht. Als stabilster Vertreter der Folat-Gruppe wird Folsäure zahlreichen Lebensmitteln zugesetzt.

Die bisherigen Nachweisverfahren sind überwiegend mikrobiologische Methoden, aber auch HPLC und Dünnschichtchromatographie, wobei die genannten Verfahren mit großem Zeit- und Geräteaufwand verbunden sind.

Mit dem vorliegenden Test kann Folsäure deutlich schneller (2,5 bis 4 Stunden incl. Probenvorbereitung) quantitativ in vitaminisierten Lebensmitteln bestimmt werden als z.B. mit einem mikrobiologischen Nachweis (24-48 Stunden).

## 2. TESTPRINZIP

Der **Folsäure Test** basiert auf dem Prinzip des Enzymimmunoassay (EIA). Ein Folsäure-Konjugat ist auf der Oberfläche der Mikrotiterplatte gebunden. Darauf wird die Folsäure enthaltende Probe bzw. Standards, sowie ein Folsäure-Antikörper in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Es findet eine Konkurrenz zwischen festphasengebundener Folsäure und Folsäure der Probe um die freien Bindungsstellen des Antikörpers statt. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wird die Platte mit verdünntem Waschpuffer gewaschen, um nichtgebundenes Material zu entfernen. Ein gegen den Folsäure-Antikörper gerichtetes Konjugat wird in die Vertiefungen pipettiert. Nach einer weiteren einstündigen Inkubation wird erneut gewaschen. Eine Substratlösung wird hinzupipettiert und 20 Minuten inkubiert, wodurch in den Vertiefungen ein blauer Farbstoff entwickelt wird. Die Farbreaktion wird durch Zugabe einer Stopp-Lösung beendet, wobei ein Farbumschlag von blau nach gelb stattfindet. Die resultierende Farbe wird spektrophotometrisch bei 450 nm gemessen. Die Folsäure-Konzentration ist der Intensität der Färbung umgekehrt proportional.

## 3. VORSICHTSMAßNAHMEN

Die volle Übereinstimmung mit den folgenden Regeln für eine gute Laborpraxis (GLP) wird zu vertrauenswürdigen Ergebnissen führen:

1. Vor der Testdurchführung müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht werden (20°C-25°C).
2. Alle Reagenzien sollten vor der Verwendung durch leichtes Kippen oder Schwenken gemischt werden. Die Erzeugung von Schaum sollte dabei vermieden werden.
3. Wenn mit der Testdurchführung einmal begonnen ist, sollten alle nachfolgenden Schritte ohne Unterbrechung und innerhalb der empfohlenen Zeitgrenzen vollzogen werden.
4. Unmittelbar nach Entnahme der Reagenzien sollten die Flaschen wieder mit ihren Stopfen verschlossen werden. Die Verschlüsse dürfen nicht verwechselt werden!
5. Für jede Probe muss eine separate Einmal-Pipettenspitze verwendet werden, um eine Verschleppung bzw. Kreuzkontamination zu vermeiden.
6. Alle Proben und Standards sollten gleichzeitig getestet werden, so dass die Bedingungen für alle identisch sind.
7. Komponenten von verschiedenen Chargen dürfen nicht verwendet oder gemischt werden.
8. Reagenzien dürfen nach der Verfallszeit nicht benutzt werden.
9. Es sollten ständig die Präzision und die Richtigkeit für die Laborgeräte kontrolliert werden, die man für das Testverfahren benutzt (Mikropipetten, Washer, ELISA-Reader, etc.).

#### 4. GESUNDHEITS- UND SICHERHEITSVORSCHRIFTEN

1. Im Laboratorium darf nicht geraucht, gegessen und getrunken werden. Das Pipettieren mit dem Mund ist nicht zulässig.
2. Beim Einsatz von Proben menschlichen Ursprungs müssen Einmalhandschuhe getragen werden.
3. Der Kontakt der Stopp-Lösung mit Haut und Schleimhäuten sollte vermieden werden, da mögliche Reizungen, Verbrennungen oder Vergiftungsgefahr auftreten können. Sollte ein Kontakt entstehen, muss der betroffene Bereich mit ausreichend Wasser abgespült werden.
4. Die Handhabung und die Beseitigung von chemischen Produkten muss nach den Richtlinien für eine gute Laborpraxis (GLP) erfolgen.

#### 5. REAGENZIEN

Der Kit enthält Reagenzien für 96 Bestimmungen. Sie müssen bei 2-8°C gelagert werden. Das Verfallsdatum ist auf jeder Komponente sowie auf der Verpackung angegeben.

1. **SORB** **MT** Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten (12 Streifen mit je 8 Vertiefungen, einzeln abbrechbar), beschichtet mit Folsäure-Konjugat.
2. **CAL** **1** – **6** Folsäure-Standards: 6 Fläschchen mit je 1,0 mL (0; 4; 10; 40; 100; 400 ng/mL), gebrauchsfertig.
3. **Ab** Anti-Folsäure Antikörper (Maus): 6 mL, rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
4. **ENZ** **CONJ** Konjugat (anti-Maus-IgG-Peroxidase), 15 mL, rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
5. **SUB** **TMB** Substratlösung (TMB), 15 mL, gebrauchsfertig.
6. **STOP** **SOLN** Stopp-Lösung (1 N saure Lösung), 15 mL, gebrauchsfertig.
7. **SAM** **DIL** Probenverdünner (PBS), 2 x 60 mL, rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
8. **WASH** **SOLN** **10x** Waschlösung (PBS + Tween 20), 60 mL als 10x-Konzentrat, blau eingefärbt. Gebrauchslösung: 1+9 mit dest. Wasser verdünnen. Falls bei der gekühlten Lagerung Kristalle ausfallen sollten, das Konzentrat 15 Minuten im Wasserbad (37°C) erwärmen.
9. Arbeitsanleitung.

#### 6. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE GERÄTE UND REAGENZIEN

##### Geräte

- 10 - 1000 µL-Mikropipetten
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Messkolben
- Mörser, Mixer
- Zentrifuge
- Zwei Plastikfolien zur Abdeckung der Streifen während der Inkubation
- Wiederverschließbarer Plastikbeutel für die Lagerung unbenutzter Streifen

##### Reagenzien

- Kaliumhexacyanoferrat(II)-3-hydrat (150 g/L; Carrez I)
- Zinksulfat-7-hydrat (300 g/L; Carrez II)
- bidestilliertes Wasser
- 1 M Natronlauge
- 1 M Salzsäure
- PBS (8.77 g/L NaCl, 0.70 g/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>x2H<sub>2</sub>O, 2.90 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>x2H<sub>2</sub>O)



## 7. PROBENVORBEREITUNG

Das Vitamin wird aus der Probe mit bidestilliertem Wasser extrahiert. Nach dem Lösen wird der pH-Wert mit 1 M Natronlauge oder 1 M Salzsäure auf 6-7 eingestellt. Anschließend werden eventuell vorhandene Trübstoffe mit Carrez I (150 g/L Kaliumhexacyanoferrat(II)-3-hydrat) und Carrez II (300 g/L Zinksulfat-7-hydrat) gefällt. Der Extrakt wird auf ein definiertes Volumen aufgefüllt und anschließend zentrifugiert. In kaltem Wasser schwer lösliche Proben können durch leichtes Erwärmen in Lösung gebracht werden. Nach der Zentrifugation werden die Proben im mitgelieferten Probenverdünnungspuffer weiter verdünnt. Um störende Matrix- oder pH-Effekte auszuschließen, sollte hierbei mindestens 1:10 verdünnt werden. Empfohlen wird eine Verdünnung auf etwa 4-100 ng/mL, da hier die größtmögliche Genauigkeit bei der Messung erzielt wird.

Getreideprodukte enthalten üblicherweise geringe Konzentrationen an Folsäure. Um hohe Verdünnungen zu vermeiden, kann die Probe statt mit bidestilliertem Wasser direkt mit Probenverdünnungspuffer extrahiert werden. Die im Kit mitgelieferte Menge an Probenverdünnungspuffer ist hierfür nicht ausreichend. Der Puffer kann bei Demeditec separat bestellt werden.

### **Multivitaminsäften und -kapseln**

Die Tabletten bzw. Kapseln werden in bidestilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert auf 6-7 eingestellt. Anschließend werden je 0,5 mL Carrez I und Carrez II zugegeben und auf ein definiertes Volumen aufgefüllt. Die Feststoffe werden abzentrifugiert und der Überstand mit Probenverdünnungspuffer weiter verdünnt. Zum Lösen der Kapseln empfiehlt sich eine Erwärmung auf 30-40°C.

### **Multivitaminsäfte**

Der Saft wird auf pH 6-7 eingestellt, je 0,5 mL Carrez I und II zugegeben und mit bidestilliertem Wasser auf ein definiertes Volumen aufgefüllt. Die Feststoffe werden abzentrifugiert und der Überstand mit Probenverdünnungspuffer weiter verdünnt.

### **Multivitaminmarmelade**

Die Marmelade wird im Mixer homogenisiert, ca. 8 g werden mit bidestilliertem Wasser versetzt, der pH-Wert auf 6-7 eingestellt und je 0,5 mL Carrez I und II zugegeben. Anschließend wird auf ein definiertes Volumen aufgefüllt. Die Feststoffe werden abzentrifugiert und der Überstand mit Probenverdünnungspuffer weiter verdünnt.

### **Getreideprodukte (Frühstücksflocken, Müsli)**

3-5 g Probe werden mit einem Mörser oder einem Mixer homogenisiert, mit bidestilliertem Wasser versetzt, der pH-Wert auf 6-7 eingestellt und je 0,5 mL Carrez I und II zugegeben. Anschließend wird auf ein definiertes Volumen aufgefüllt. Die Feststoffe werden abzentrifugiert und der Überstand mit Probenverdünnungspuffer weiter verdünnt. Da die in diesen Proben enthaltenen Folsäure-Konzentrationen üblicherweise sehr gering sind, kann die Probe auch in Probenverdünner aufgenommen und direkt im Test eingesetzt werden.

### **Multivitaminbonbons**

Die Bonbons werden unter eventuellem Erwärmen in bidestilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert auf 6-7 eingestellt und je 0,5 mL Carrez I und II zugegeben. Anschließend wird auf ein definiertes Volumen aufgefüllt. Die Feststoffe werden abzentrifugiert und der Überstand mit Probenverdünnungspuffer weiter verdünnt.

### **Milch**

5 mL einer frischen Milchprobe (Vollmilch oder fettarme Milch) werden in ein Reagenzröhrchen pipettiert und 30 Minuten bei 2-8°C gekühlt. Anschließend wird 10 Minuten bei 3000 g zentrifugiert. Die obere Fettphase wird abgesaugt und verworfen. Die zurück bleibende wässrige Phase wird 1:5 in Probenverdünner verdünnt.

### **Säuglingsnahrung**

10 g Säuglingsnahrung werden in 25 mL PBS suspendiert und auf 50 mL aufgefüllt. Die Mischung wird 10 min intensiv gerührt und anschließend 3 min im kochenden Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlen auf 20-25°C wird die Mischung 10 min bei 3000 g zentrifugiert. Die obere Fettphase wird abgesaugt und verworfen. Die zurück bleibende wässrige Phase wird 1:5 in Probenverdünner verdünnt.

**8. TESTDURCHFÜHRUNG**

1. Proben nach Vorschrift vorbereiten.
2. 100 µL Standards bzw. vorbehandelte Proben im Doppelansatz in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte geben. Sofort im Anschluss in jede Vertiefung 50 µL des Folsäure Antikörpers pipettieren.
3. Platte abdecken und 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (oder 90 Minuten ohne Schüttler) inkubieren.
4. Platte wie folgt dreimal waschen: Vertiefungen der Platte entleeren (auskippen oder absaugen) und 300 µL endverdünnte Waschlösung dazugeben. Nach der dritten Wiederholung Vertiefungen erneut leeren und Flüssigkeitsreste durch Ausschlagen der Mikrotiterplatte auf einem Papiertuch entfernen. Der Waschvorgang ist ein kritischer Schritt. Ungenügendes Waschen führt zu einer geringen Präzision und fälschlicherweise erhöhten Extinktionen.
5. 100 µL Konjugat (anti-Maus-IgG-Peroxidase) in die Vertiefungen pipettieren.
6. Platte abdecken und 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (oder 90 Minuten ohne Schüttler) inkubieren.
7. Vertiefungen wie in Punkt 4 beschrieben waschen.
8. 100 µL Substratlösung zugeben.
9. Platte abdecken und 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
10. Substratreaktion durch Zugabe von 100 µL Stopp-Lösung (1 N saure Lösung) beenden.
11. Nach sorgfältigem Mischen erfolgt die Messung der Extinktion bei 450 nm (eventuell Referenzwellenlänge 620 nm). Die Farbe ist maximal 30 Minuten stabil.

**9. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE**

1. Für jede Probe bzw. jeden Standard wird die gemittelte Extinktion berechnet.
2. Aus den gemittelten Werten der Standardreihe wird graphisch auf halblogarithmischem Millimeterpapier oder über ein EDV-Programm eine Eichkurve erstellt. Die Extinktion jedes Standards (y-Achse) wird gegen die Konzentration in ng/mL (x-Achse) aufgetragen.
3. Mit Hilfe dieser Kurve wird für die gemittelten Extinktionen der Proben der Wert in ng/mL für Folsäure abgelesen.
4. Um die in einer Probe tatsächlich enthaltene Konzentration zu errechnen, muss der aus der Eichkurve abgelesene Wert noch mit einem entsprechenden Verdünnungsfaktor, der sich aus der Probenvorbereitung ergibt, multipliziert werden.

Rechenbeispiel:

Eine Multivitamin-tablette wurde nach der oben beschriebenen Probenvorbereitung behandelt. Hierfür wurde nach der Carrez-Fällung der Extrakt auf 50 mL aufgefüllt und der Überstand nach der Zentrifugation 1:500 in Probenverdünner verdünnt. Im Test wurde für diese Probe eine Konzentration von 40 ng/mL gemessen. Der für die Berechnung zu verwendende Faktor setzt sich wie folgt zusammen:

$$F = A \times B$$

- A: Verdünnungsfaktor 1 (für dieses Rechenbeispiel 50, da eine Tablette in 50 mL gelöst wurde)  
B: Verdünnungsfaktor 2 (für dieses Rechenbeispiel 500, da der Überstand nach der Zentrifugation 1:500 weiterverdünnt wurde)

Der Verdünnungsfaktor trägt die Dimension mL/Tablette. Die gemessene Konzentration wird mit dem Faktor multipliziert, um den tatsächlichen Gehalt zu bestimmen.

tatsächlicher Gehalt = 40 ng/mL x 25.000 mL/Tab. = 1.000.000 ng/Tablette = 1 mg/Tab.

Bei Anwendung der Probenvorbereitungsmethode für Milch und Säuglingsnahrung ist der Verdünnungsfaktor 5 bzw. 25.

## 10. TYPISCHE STANDARDKURVE

Die folgende Tabelle enthält ein Beispiel für eine Standardreihe. Die Extinktionen sind in Prozent der Extinktion des 0 ng/mL-Standards angegeben. Die Werte dieser Standardkurve sind nur als Beispiel bestimmt und dürfen nicht an Stelle der in jedem Test neu zu erstellenden Kurve verwendet werden.

Folsäure (ng/mL)	OD-% von 0 ng/mL
0	100
4	80
10	60
40	25
100	11
400	4

## 11. TECHNISCHE DATEN

### Empfindlichkeit

Die mittlere untere Nachweisgrenze des **Folsäure Tests** beträgt 2 ng/mL bezogen auf die Standardkurve.

### Wiederfindung

Die Wiederfindung aufgestockter Proben wurde mit 90-110 % bestimmt.

### Intraassay-Präzision

Der Intraassay-Variationskoeffizient des Folsäure-Tests wurde mit 3 % bestimmt.

### Kreuzreaktionen

Kreuzreaktionen	relativ zu Folsäure (=100%)
Dihydrofolsäure	18 %
Tetrahydrofolsäure	5 %
5-Formyltetrahydrofolsäure	0,1 %

**SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS**

Symbol	English	Deutsch	Français	Español	Italiano
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conformité aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Para uso Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Numéro de catalogue	Número de catálogo	Numero di Catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	Numéro de lot	Número de lote	Numero di lotto
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
Distributed by	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
Content	Content	Inhalt	Conditionnement	Contenido	Contenuto
Volume/No.	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantité	Volumen/Número	Volume/Quantità