



RIDASCREEN®FAST Biotin

REF R2202

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung
von Biotin

Enzyme immunoassay for the quantitative determination
of biotin

In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C
Storage at 2 - 8 °C (36 - 47 °F)



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt, Germany

Phone: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Fax: +49 (0) 61 51 81 02-20

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Please contact for questions and further information:

R-Biopharm AG Zentrale

Tel.: +49 (0) 61 51 - 81 02-0

R-Biopharm AG switchboard

Phone: +49 (0) 61 51 - 81 02-0

Auftragsannahme

Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20

E-Mail: orders@r-biopharm.de

Order department

Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20

E-mail: orders@r-biopharm.de

Marketing & Vertrieb

E-Mail: info@r-biopharm.de

Marketing & sales

E-mail: sales@r-biopharm.de

RIDA®, RIDASCREEN® und RIDASOFT®
sind eingetragene Marken der R-Biopharm AG.
Hersteller: R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

RIDA®, RIDASCREEN® and RIDASOFT®
are registered trademarks of R-Biopharm AG.
Manufacturer: R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

Kurzinformation

RIDASCREEN®FAST Biotin (Vitamin B7) (Art. No. R2202) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Biotin (Vitamin B7) in Milch, Milchpulver, Lebensmitteln für besondere medizinische Zwecke*, Müsli und Getreideflocken, angereicherten Getreidemehlen, Vitaminpulver, Vitaminmischungen, Vitamintabletten und Vitaminsäften.

Alle Reagenzien für die Durchführung des Enzymimmunoassays, inkl. Standards, sind im Testkit enthalten. Ein Testkit ist ausreichend für maximal 48 Bestimmungen (einschließlich Standardbestimmungen). Zur Auswertung benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

Probenvorbereitung: Milch: Verdünnung und Neutralisation
 Vitaminwässer und Säfte: Verdünnung, pH
 Anpassung
 Vitamin-Tabletten/Gummi: Extraktion,
 Verdünnung
 Milchpulver und Cerealien: Extraktion,
 Neutralisation, Verdünnung

Zeitbedarf: Probenvorbereitung (10 Proben).....10 - 60 min
 Testdurchführung (Inkubationszeit).....25 min

Nachweisgrenze: 1,3 µg/l (ppb) (in der Messlösung**)
(bezogen auf die Standardsubstanz)

Spezifität: Biotin..... 100 %
 Biocytin.....ca. 250 %
 Biotin-PABA.....ca. 130 %
 Biotin (S)-Sulfoxidca. 35 %
 Biotinsulfonca. 14 %
 Desthiobiotin.....ca. 7 %

Die Spezifität des RIDASCREEN®FAST Biotin Tests wurde durch die Bestimmung der Kreuzreaktivität zu den entsprechenden Substanzen im Puffersystem ermittelt. In Proben kann die Spezifität aufgrund von Matrixeffekten von den im Puffersystem ermittelten Ergebnissen abweichen.

Vor der Analyse von kreuzreaktiven Substanzen muss deren Nachweisgrenze und Wiederfindungsrate in der jeweiligen Matrix durch den Anwender bestimmt werden. Der Test kann nicht zwischen Analyten und kreuzreaktiven Substanzen diskriminieren.

Hinweis: Der Test zeigt eine Kreuzreaktivität mit Biocytin, einem Biotin-Metaboliten. Biocytin ist ein Biotin-Lysin-Konjugat, das vorwiegend an Proteine gebunden ist. Der natürliche Biotingehalt in Vitaminsäften und Wasser ist gering oder vernachlässigbar; daher ist auch das Vorkommen seines Metaboliten Biocytin minimal. Für Proben von Säuglingsmilchpulver, Flüssigmilch und Getreideprodukten hat eine umfassende Validierungsstudie bestätigt, dass die Störung durch Biocytin vernachlässigbar ist. Dies ermöglicht eine genaue Quantifizierung von Biotin in diesen Proben mittels des Biotin-ELISA. Diese Schlussfolgerung steht im Einklang mit den Ergebnissen von Joseph G. et al. (2018), „Determination of Total Biotin by Liquid Chromatography Coupled with Immunoaffinity Column Cleanup Extraction: Multilaboratory Testing, Final Action 2016.02“. J AOAC Int, 101(3):831–842. In dieser Studie wurde in keiner Probe von Säuglingsmilchpulver freies Biocytin nachgewiesen.

Zur Erhöhung der Prüfungsqualität bei ELISA-Verfahren verweisen wir zusätzlich auf unser ELISA-Handbuch. Dieses führt Mindeststandards hinsichtlich der Rahmenbedingungen auf, die bei der Verwendung von Testsystemen der R-Biopharm AG und der Durchführung von ELISA-Analysen mit diesen Testsystemen zu beachten sind. Das Handbuch kann unter der Webseite <https://food.r-biopharm.com/media/technical-guides/> abgerufen, gedruckt und gespeichert werden.

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN®FAST Biotin (Vitamin B7) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Biotin in Milch, Milchpulvern, Lebensmitteln für besondere medizinische Zwecke, Getreide und Getreideprodukten, Vitaminpräparaten, Vitaminkombinationen, Vitaminpulvern, Vitamin-Gummis, Vitaminwassern und Vitamin-Säften.

2. Allgemeines

Biotin gehört zur Gruppe der wasserlöslichen Vitamine. Es kann vom menschlichen Körper nicht produziert werden und muss daher über die Nahrung aufgenommen werden. Obwohl Biotin nur in geringen Mengen benötigt wird, spielt es eine entscheidende Rolle im Stoffwechsel. Als Coenzym unterstützt Biotin die Umwandlung von Kohlenhydraten und Proteinen in Energie und erleichtert die Synthese von Fettsäuren. Darüber hinaus ist Biotin für das Wachstum und die Reparatur von Haut, Haaren und Nägeln von großer Bedeutung. Obwohl ein Biotinmangel bei gesunden Erwachsenen mit ausgewogener Ernährung selten vorkommt, können genetische Erkrankungen bei fehlendem Biotin zu ernsthaften Gesundheitsproblemen führen.

3. Testprinzip

Grundlage ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Kavitäten der Mikrotiterplatte sind mit spezifischen Antikörpern gegen Biotin beschichtet. Bei Zugabe von Standard bzw. Probe und Konjugat konkurrieren freies und enzymmarkiertes Biotin um die Biotin-Antikörperbindungsstellen (kompetitiver Enzymimmunoassay). Nicht gebundenes enzymmarkiertes Biotin wird anschließend in einem Waschschrift wieder entfernt. Der Nachweis erfolgt durch Zugabe von Substrat/Chromogen. Gebundenes Konjugat wandelt das Chromogen in ein blaues Endprodukt um. Die Zugabe der Stopp-Lösung führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Messung erfolgt photometrisch bei 450 nm; die Extinktion der Lösung ist umgekehrt proportional zur Biotin-Konzentration in der Probe.

4. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien einer Packung können max. 48 Bestimmungen durchgeführt werden (einschließlich Standardbestimmungen). Jeder Testkit enthält:

Komponente	Deckelfarbe	Zustand		Inhalt
Microtiter plate Mikrotiterplatte	-	gebrauchsfertig		48 Kavitäten
Sample buffer Probenpuffer	transparent	2-fach Konzentrat	2x	125 ml
Standard 1 Standard 1	weiß	gebrauchsfertig	0 µg/l (ppb)	1,3 ml
Standard 2 Standard 2	weiß	gebrauchsfertig	3 µg/l (ppb)	1,3 ml
Standard 3 Standard 3	weiß	gebrauchsfertig	10 µg/l (ppb)	1,3 ml
Standard 4 Standard 4	weiß	gebrauchsfertig	30 µg/l (ppb)	1,3 ml
Standard 5 Standard 5	weiß	gebrauchsfertig	100 µg/l (ppb)	1,3 ml
Standard 6 Standard 6	weiß	gebrauchsfertig	300 µg/l (ppb)	1,3 ml
Wash buffer salt Tween Waschpuffer (Salz)	-	Salz zum Auflösen		
Conjugate Konjugat	rot	gebrauchsfertig		3 ml
Substrate/Chromogen Substrat/Chromogen Red Chromogen Pro	braun	gebrauchsfertig		10 ml
Stop solution Stopp-Lösung	gelb	gebrauchsfertig		14 ml
Neutralisation buffer Neutralisationspuffer				3 ml

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1. Geräte

- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Schlagmühle, Mörser, Ultra-Turrax oder Homogenisator
- Zentrifuge + Zentrifugenröhrchen
- Schüttler
- Optional: Faltenfilter und Trichter
- Messpipetten
- Variable 20 - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten
- Optional: Mehrfachdispenser oder 8-Kanalpipette
- Optional: Mikrotiterplatten-Washer

5.2. Reagenzien

- Destilliertes Wasser oder demineralisiertes Wasser
- 1 M NaOH

6. Vorsichtsmaßnahmen

Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.

Dieser Kit kann gesundheitsgefährdende Substanzen enthalten. Sicherheitshinweise zu den enthaltenen Komponenten entnehmen Sie bitte den Sicherheitsdatenblättern (SDS) zu diesem Produkt auf unserer Internetseite www.r-biopharm.de.

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch unter Beachtung des Schutzes von Mensch und Umwelt eigenverantwortlich verwertet oder beseitigt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften (z. B. Kreislaufwirtschaftsgesetz, Gefahrenstoffverordnung etc.).

7. Reagenzien und ihre Lagerung

Die Reagenzien bei 2 - 8 °C lagern. Komponenten des Testkits auf keinen Fall einfrieren.

Nicht benötigte Kavitäten zusammen mit dem Trockenmittel im Folienbeutel gut verschlossen aufbewahren und weiterhin bei 2 - 8 °C lagern.

Die Standards, das Konjugat und das Substrat/Chromogen sind lichtempfindlich, deshalb direkte Lichteinwirkung vermeiden.

Nach Ablauf des Verfallsdatums (siehe Testkit-Außenetikett) darf das Testkit nicht mehr verwendet werden.

Ein Austausch von Einzelreagenzien zwischen Kits verschiedener Chargennummern ist nicht zulässig (Ausnahmen: Probenpuffer, Waschpuffer (Salz), Stopp-Lösung).

8. Anzeichen für Reagenzienverfall

- Bläuliche Färbung des rötlichen Substrat/Chromogens vor Zugabe in die Kavitäten
- Extinktion kleiner 0,6 ($E_{450\text{ nm}} < 0,6$) für den Nullstandard

9. Probenvorbereitung

Die Proben kühl und lichtgeschützt lagern. Die Proben sollten vor der Probenvorbereitung auf 20 - 25 °C temperiert werden. Zur Qualitätskontrolle wird empfohlen, Kontrollproben mitzuführen.

Anmerkung: Die Proben sollten am Tag der Extraktion gemessen werden.

Hinweis: Der Probenpuffer ist auch zur Probenvorbereitung von folsäure- oder Vitamin B12-haltigen Proben in Verbindung mit dem RIDASCREEN®FAST Folsäure (Folic Acid) (Art. Nr. R3203) bzw. RIDASCREEN®FAST Vitamin B12 (Art. Nr. R2103) verwendbar.

9.1. Milch, Milchpulver und Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke

Milch:

- 10 ml der Probe in ein Reagenzgefäß geben.
- Zentrifugieren (oder alternativ filtrieren), um ungelöste Bestandteile zu entfernen.
- 200 µl des Überstands entnehmen. 50 µl des Neutralisationspuffers und 350 µl des Probenpuffers hinzufügen. Gut mischen.
- Die Probe kann nun direkt analysiert werden. 50 µl pro Vertiefung in den Assay geben. Der Berechnungsfaktor beträgt 3.
- Die Probe kann auch mit dem Probenpuffer weiter verdünnt werden, um sie an den Messbereich des Assays anzupassen. Beachten Sie, dass sich der Berechnungsfaktor ändert!

Milchpulver, Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke:

- 1 g Probe in ca. 5 ml destilliertem Wasser suspendieren, mit destilliertem Wasser auf 10 ml auffüllen.
- 10 Minuten lang schütteln/mischen.
- Die verdünnte Probe 3 Minuten lang bei 100 °C (212 °F) im Wasserbad erhitzen, schnell abkühlen lassen (Eisbad).
- Zentrifugieren (oder alternativ filtrieren), um ungelöste Bestandteile zu entfernen.
- 200 µl des Überstands entnehmen. 50 µl des Neutralisationspuffers und 350 µl des Probenpuffers hinzufügen. Gut mischen.
- Die Probe kann nun direkt analysiert werden. 50 µl pro Kavität in den Assay geben. Der Berechnungsfaktor beträgt 30.
- Die Probe kann auch mit dem Probenverdünnungspuffer weiter verdünnt werden, um sie an den Messbereich des Assays anzupassen. Beachten Sie, dass sich der Berechnungsfaktor ändert!

9.2. Getreide und Getreideprodukte

- 1 g der gemahlten Probe in ein geeignetes Fläschchen einwiegen, mit ca. 5 ml Probenpuffer suspendieren und mit Probenpuffer auf 10 ml auffüllen (Verdünnungsfaktor = 10).
- 10 Minuten schütteln/mischen.
- Zentrifugieren (oder alternativ filtrieren), um ungelöste Bestandteile zu entfernen.
- Den Überstand entnehmen; falls der Überstand noch trüb ist, filtrieren
- 200 µl des klaren Überstands entnehmen und 50 µl des Neutralisationspuffers sowie 350 µl des Probenpuffers hinzufügen.
- Die Probe kann nun direkt analysiert werden. Geben Sie 50 µl pro Kavität in den Assay. Der Berechnungsfaktor beträgt 30. Die Probe kann auch mit Probenpuffer weiter verdünnt werden, um sie an den Messbereich des Assays anzupassen. Beachten Sie, dass sich der Berechnungsfaktor ändert!

Hinweis: Wenn die Probe nach dem Zentrifugieren eine gelartige Konsistenz aufweist, lässt sich die obere Schicht nur schwer pipettieren. Die Probe sollte mit bis zu 15 ml oder 20 ml des Probenpuffers erneut extrahiert werden, um eine bessere Trennung der Phasen zu ermöglichen. Beachten Sie, dass sich der Berechnungsfaktor dadurch ändert!

9.3. Vitaminpulver, Vitaminmischungen, Vitamintabletten und Vitamin-Gummibärchen

Vitaminpulver / Vitaminmischungen:

- 1 g Vitaminpulver / Vitaminmischung in 5 ml Probenpuffer auflösen und mit Probenpuffer auf 10 ml auffüllen (Verdünnungsfaktor = 10).

Vitamintabletten:

- Zerkleinern Sie die Tabletten und lösen Sie 1 g in 5 ml Probenpuffer auf und füllen Sie mit Probenpuffer auf 10 ml auf (Verdünnungsfaktor = 10).

Vitamin-Gummibärchen:

- Lösen Sie 1 Gummibärchen im Probenpuffer auf, um 1 g in 10 ml Lösung zu erhalten. Wenn das Gummibärchen beispielsweise 2,2 g wiegt, füllen Sie auf 22 ml auf (Verdünnungsfaktor = 10).

Erhitzen Sie die Mischung in einem Wasserbad bei 50 °C oder auf einem Thermostat Rührer (50 °C) mit Temperaturregelung, bis sie vollständig aufgelöst ist.

Fahren Sie mit diesen Proben wie unten beschrieben fort:

- 10 Minuten lang schütteln/mischen.
- Zentrifugieren (oder alternativ filtrieren), um ungelöste Bestandteile zu entfernen.
- Den Überstand oder das Filtrat bei Bedarf mit dem Probenpuffer auf den Testbereich verdünnen (eine Neuberechnung des Verdünnungsfaktors ist erforderlich!).
- 50 µl pro Kavität in den Assay geben.

9.4. Vitaminsäfte:

- Zentrifugieren (oder alternativ filtrieren), um ungelöste Bestandteile zu entfernen.
- Mindestens 5-fach im Probenpuffer verdünnen, beispielsweise 2 ml Saft mit 8 ml Probenpuffer (Verdünnungsfaktor = 5).
- Den pH-Wert mit 1 M NaOH auf 8,0 einstellen.
- Verdünnen Sie den Überstand oder das Filtrat bei Bedarf mit dem Probenpuffer in den Testbereich (eine Neuberechnung des Verdünnungsfaktors ist erforderlich!).
- Geben Sie 50 µl pro Vertiefung in den Assay.

9.5. Vitaminwasser

- Zentrifugieren (oder alternativ filtern), um ungelöste Bestandteile zu entfernen.
- Mindestens 5-fach mit dem Probenpuffer verdünnen, beispielsweise 2 mL Probe mit 8 ml Probenpuffer (Verdünnungsfaktor = 5).
- 50 µl pro Kavität in den Assay geben.

Anmerkung: Saure Vitaminwasserproben (wie kohlenensäurehaltige Energy-Drinks) erfordern das gleiche Verfahren (pH-Einstellung auf 8,0) wie Vitaminsäfte.

10. Testdurchführung

10.1. Testvorbereitungen

Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) bringen.

Der **Probenpuffer** liegt als 2-fach Konzentrat vor. Das Konzentrat 1:2 mit destilliertem Wasser verdünnen (z. B. 50 ml Pufferkonzentrat + 50 ml dest. Wasser). Der verdünnte Probenpuffer hat eine Haltbarkeit von 4 - 6 Wochen bei 2 - 8 °C.

Als **Waschpuffer** wird ein PBS-Tween-Puffer benötigt, benutzen Sie dazu bitte den beiliegenden Waschpuffer (Salz) (siehe Kapitel 4. Packungsinhalt). Zur Herstellung des Puffers den gesamten Inhalt des Beutels in 1 Liter dest. Wasser lösen. Der gelöste Waschpuffer ist ca. 4 - 6 Wochen bei 2 - 8 °C haltbar.

Alternativ: Inhalt des Beutels in 100 ml dest. Wasser lösen (10-fach Konzentrat). Die Lösung ist ca. 8 - 12 Wochen bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) haltbar. Um die gebrauchsfertige Lösung herzustellen, 1 Teil des 10-fach Konzentrats mit 9 Teilen dest. Wasser mischen.

10.2. Testdurchführung

Standards und Proben müssen zeitgleich auf derselben Mikrotiterplatte abgearbeitet werden. Sorgfältiges Waschen ist sehr wichtig. Ein Eintrocknen der Kavitäten zwischen den Arbeitsschritten ist zu vermeiden.

1. So viele Kavitäten in den Halterahmen einsetzen, wie für alle Standards und Proben in Doppelbestimmung benötigt werden. Die Positionen der Standards und der Proben protokollieren.
2. Je 50 µl des Standards bzw. der vorbereiteten Proben in die entsprechenden Kavitäten pipettieren; für jeden Standard oder Probe eine neue Pipettenspitze benutzen.
3. Je 50 µl Konjugat in die entsprechenden Kavitäten pipettieren (eventuell einen Mehrfachdispenser oder eine 8-Kanalpipette verwenden) und 15 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) lichtgeschützt inkubieren.
4. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf saugfähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit Hilfe einer 8-Kanalpipette mit gebrauchsfertigem Waschpuffer (siehe Kapitel 10.1.) waschen (250 µl pro Kavität), die Kavitäten leeren und die Restflüssigkeit entfernen. Diesen Vorgang noch zweimal wiederholen.
5. Je 100 µl Substrat/Chromogen in jede Kavität pipettieren (eventuell einen Mehrfachdispenser oder eine 8-Kanalpipette verwenden) und 10 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
6. Je 100 µl Stopp-Lösung in jede Kavität pipettieren (eventuell einen Mehrfachdispenser oder eine 8-Kanalpipette verwenden). Die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 5 min nach Zugabe der Stopp-Lösung messen.

11. Auswertung

Für die Auswertung ist bei R-Biopharm eine speziell für die RIDASCREEN® Enzymimmunoassays entwickelte Software, die **RIDASOFT® Win.NET** (Art. Nr. Z9996FF), erhältlich. Diese Software gibt das Ergebnis sowohl in µg/kg bzw. µg/l als auch in µg/100 g bzw. µg/100 ml an.

Der Verlauf der Standardkurve kann dem beigefügten Analysenzertifikat entnommen werden.

Hinweis für die Berechnung ohne Software:

$$\frac{\text{Extinktion Standard (bzw. Probe)}}{\text{Extinktion Nullstandard}} \times 100 = \% \text{ Extinktion}$$

Der Nullstandard somit gleich 100 % gesetzt und die Extinktionswerte in Prozent (%) angeben werden. Die für die Standards errechneten Werte können dann in einem Koordinatensystem auf halblogarithmischem Millimeterpapier gegen die Biotin-Konzentration (µg/kg bzw. µg/l) auftragen werden.

Um die in den Proben enthaltene tatsächliche Biotin-Konzentration zu erhalten, muss die aus der Standardkurve abgelesene Konzentration noch mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

12. Grenzen der Methode

Testergebnisse können in Abhängigkeit von der Matrix, der Testdurchführung und den Laborbedingungen schwanken.

Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sind abhängig von der jeweiligen Probenmatrix, dem Grad der Prozessierung und dem Extraktionsverfahren.

13. Empfehlung

Um eine hohe analytische Sicherheit zu gewährleisten wird empfohlen, jede Probe als Doppelbestimmung zu analysieren. Jedes Labor kann für sich nach einer qualifizierten Risiko-Management-Analyse entscheiden, den Test in Einzelbestimmung durchzuführen. Dies hat keinen Einfluss auf die Funktion des Testkits. Es ist aber zu beachten, dass sich hierdurch das Risiko erhöht, Fehler in der Durchführung des Tests (z. B. Pipettierfehler) zu übersehen. Außerdem ist eine höhere Schwankung der Ergebnisse bei Einzelbestimmungen zu erwarten.

Für weitere Produktinformationen und Applikationen kontaktieren Sie bitte info@r-biopharm.de.

Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
1.0	Freigabeversion

Symbolerklärung

Allgemeine Symbole:

	Gebrauchsanweisung beachten
	Chargennummer
	Verfallsdatum (YYYY-MM-DD)
	Lagertemperatur
	Artikelnummer
	Anzahl Testbestimmungen
	Herstelldatum (YYYY-MM-DD)
	Hersteller + Adresse

Haftungsausschluss

1. Grundsätzlich leistet R-Biopharm für Sach- und Rechtsmängel über einen Zeitraum von 12 Monaten (bzw. im Falle von Produkten, die eine kürzere Haltbarkeit haben, bis zum Ablauf des Haltbarkeitsdatums oder bei limitierter Verwendung bis zum Erreichen der Anzahl der Verwendungen) Gewähr, gerechnet vom Tag des Gefahrübergangs gemäß Incoterm, vorbehaltlich einer frist- und formgerechten Rüge durch den Kunden, wobei die vereinbarte Beschaffenheit und Eignung für die vertraglich vorausgesetzte oder vereinbarte Verwendung und Übergabe mit vereinbartem Zubehör und vereinbarten Anleitungen („subjektiven Anforderungen“) entscheiden, ob eine Sache mangelhaft ist.
2. Die R-Biopharm AG übernimmt keine Gewährleistung für
 - a) Folgen aus der Versäumnis die Gebrauchs- oder Sicherheitsanweisungen eines Produktes zu lesen, zu verstehen oder zu befolgen;
 - b) Nutzungen oder Abarbeitungen, die nicht dem vertraglich vereinbarten Bestimmungszweck entsprechen oder nicht mit der Produktsicherheit vereinbar sind;
 - c) den Einsatz von ungeschultem oder unqualifiziertem Personal;
 - d) fehlender Anwendung von Industriestandards und -Praktiken (z.B. Good Laboratory Practices);
 - e) der Versäumnis für das Produkt geeignete Kontroll-/Proben-/Probenmatrices oder Abarbeitungsverfahren/Prozesse einzusetzen;
 - f) sonstige fehlerhafte Benutzung;
 - g) Veränderung oder Bearbeitungen der Produkte;
 - h) unsachgemäße Lagerung oder Transport durch den Kunden oder Dritte;
 - i) Folgen aus chemischen, elektromagnetischen, mechanischen oder elektrolytischen Einflüssen außerhalb der Nutzung gemäß Dokumentation;
 - j) Schäden und Störungen, die durch von R-Biopharm nicht zu vertretende äußere Einwirkungen entstanden sind (z.B. Einbruch, Diebstahl, Blitzschlag, Feuer, Wasser, höhere Gewalt).
3. Sachmängelgewährleistung beschränkt sich auf Nacherfüllung. Wenn die R-Biopharm AG den Sachmangel zu vertreten hat, wird nach eigenem Ermessen Ersatz geliefert, nachgebessert oder eine Gutschrift ausgestellt. Insbesondere wenn eine Reparatur unwirtschaftlich ist, darf die Ware vernichtet werden. Ersatz erfolgt nach Produktcode, Anspruch auf Ersatz aus der gleichen Lot besteht nicht. Nur wenn Ersatzlieferung, Nachbesserung oder Gutschrift unmöglich, unverhältnismäßig oder zweimal fehlgeschlagen sind, kann der Kunde den Kaufpreis mindern. Weitergehende Gewährleistungsrechte wegen eines Sachmangels sind ausgeschlossen, es sei denn, es liegt Vorsatz oder grobe Fahrlässigkeit der R-Biopharm AG vor oder ein anderer gesetzlich zwingender Fall.
4. Die Haftung der R-Biopharm AG ist beschränkt auf Vorsatz, grobe Fahrlässigkeit, Schäden aus der Verletzung von Leben, Körper oder Gesundheit, im Falle des Verzuges, soweit ein fixierter Liefertermin vereinbart wurde, Haftung bei Übernahme einer Garantie für die Beschaffenheit oder Vorhandensein eines bestimmten Leistungserfolges, Haftung bei Übernahme eines Beschaffungsrisikos sowie auf gesetzlich zwingende Haftungstatbestände, insbesondere dem Produkthaftungsgesetz und Arglist. Die Haftung der R-Biopharm AG für die leicht fahrlässige Verletzung wesentlicher Vertragspflichten (Pflichten, die für die Erreichung des Vertragszwecks wesentlich sind und auf deren Einhaltung der Vertragspartner regelmäßig vertrauen darf) ist auf den vertragstypisch vorhersehbaren Schaden begrenzt. Die Haftung der R-Biopharm AG für die leicht fahrlässige Verletzung anderer Pflichten ist ausgeschlossen.

5. ALLE ANDEREN AUSDRÜCKLICHEN ODER STILLSCHWEIGENDEN GEWÄHRLEISTUNGEN ODER GARANTIEEN JEDLICHER ART SIND AUSGESCHLOSSEN, UNABHÄNGIG DAVON, OB SIE DURCH GEWOHNHEITEN, PRAXIS, DEN GESCHÄFTSVERLAUF ZWISCHEN DEN PARTEIEN ODER ANDERWEITIG STILLSCHWEIGEND VORAUSGESETZT WERDEN. Insbesondere übernimmt die R-Biopharm AG übernimmt keine Haftung für Folgeschäden wie z.B. entgangenen Gewinn., Produktionsrückstände oder sonstige mittelbare Schäden.
6. Vorstehende Haftungsregelungen gelten auch für die Haftung der gesetzlichen Vertreter, Angestellte und Erfüllungsgehilfen der R-Biopharm AG.

RIDASCREEN®FAST Biotin

Brief information

RIDASCREEN®FAST Biotin (Art. No. R2202) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative determination of biotin in milk, milk powders, food for special medical purpose, grain and cereals, vitamin tablets, vitamin mixtures, vitamin powders, vitamin gummies, vitamin waters and vitamin juices.

All reagents required to perform the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), including standards, are included in the test kit. One test kit is sufficient for up to 48 measurements (including standard measurements). A microplate reader is required for data analysis.

Sample preparation:	liquid milk: dilution and neutralisation vitamin waters and juices: dilution, pH adjustment vitamin tablets/gummies: extraction, dilution milk powders and cereals: extraction, neutralisation, dilution
Time required:	Sample preparation (10 samples).....10 - 60 min Test execution (Incubation time)25 min
Limit of detection:	1.3 µg/L (ppb) (in standard solution*) (corresponding to standard substance)
Specificity:	Biotin (Vitamin B7)..... 100 % Biocytin...approx. 250 % Biotin-PABA.....approx. 130 % Biotin (S)-sulfoxide.....approx. 35 % Biotin-sulfone.....approx. 14 % Desthiobiotin.....approx. 7 %

The specificity of the RIDASCREEN®FAST Biotin test was determined by assessing cross-reactivity with the corresponding substances in the buffer system.

In samples, specificity may differ from the results determined in the buffer system due to matrix effects. Before analyzing cross-reactive substances, the user must determine their limit of detection and recovery rate in the respective matrix. The test cannot distinguish between analytes and cross-reactive substances.

Note: The test exhibits cross-reactivity with biocytin, a biotin metabolite. Biocytin is a biotin-lysine conjugate that is primarily bound to proteins. Natural levels of biotin in vitamin juices and water are low or negligible; therefore, the presence of its metabolite, biocytin is also minimal. For infant milk powder, liquid milk, and cereal samples, an extensive validation study confirmed that interference from biocytin is negligible. This enables accurate quantification of biotin in these samples using the Biotin ELISA.

This conclusion aligns with the findings of Joseph G. et al. (2018), *Determination of Total Biotin by Liquid Chromatography Coupled with Immunoaffinity Column Cleanup Extraction: Multilaboratory Testing, Final Action 2016.02. J AOAC Int*, 101(3):831–842. In that study, no samples of infant milk powder were found to contain free biocytin.

In order to increase the quality of assessment when performing ELISA procedures, we refer additionally to our Good ELISA Practice brochure. It contains minimum standards and conditions that are required when using test kits of R-Biopharm AG to perform ELISA analysis. The brochure can be retrieved, printed and downloaded from the website

<https://food.r-biopharm.com/media/technical-guides/>.

1. Intended use

RIDASCREEN®FAST Biotin is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative determination of biotin in milk, milk powders, food for special medical purpose, grain and cereals, vitamin tablets, vitamin mixtures, vitamin powders, vitamin gummies, vitamin waters and vitamin juices.

2. General

Biotin belongs to the group of water-soluble vitamins. It cannot be produced by the human body and must, therefore, be obtained through one's diet. While biotin is required in only small amounts, it plays a crucial role in metabolism. Serving as a coenzyme, biotin assists in the conversion of carbohydrates and proteins into energy and facilitates the synthesis of fatty acids. Additionally, biotin is vital for the growth and repair of skin, hair, and nails. Although biotin deficiency rarely occurs in healthy adults with a balanced diet, genetic conditions can lead to serious health problems when there is a lack of biotin.

3. Test principle

The basis of the test is the antigen-antibody reaction. The microtiter wells are coated with capture antibodies directed against anti-biotin antibodies. Biotin standards or sample solutions, biotin enzyme conjugate and anti-biotin antibodies are added. Free biotin and biotin enzyme conjugate compete for the biotin antibody binding sites (competitive enzyme immunoassay). At the same time, the anti-biotin antibodies are also bound by the immobilized capture antibodies. Any unbound enzyme conjugate is then removed in a washing step. Substrate/chromogen is added to the wells, bound enzyme conjugate converts the chromogen into a blue product. The addition of the stop solution leads to a color change from blue to yellow. The measurement is made photometrically at 450 nm. The absorbance is inversely proportional to the biotin concentration in the sample.

4. Reagents provided

The reagents in one package are sufficient for up to 48 tests (including standard tests). Each test kit contains:

Component	Lid color	Condition		Volume
Microtiter plate	-	ready to use		48 wells
Sample buffer Probenpuffer	transparent	2x concentrate	2x	125 mL
Standard 1	white	ready to use	0 µg/L (ppb)	1.3 mL
Standard 2	white	ready to use	3 µg/L (ppb)	1.3 mL
Standard 3	white	ready to use	10 µg/L (ppb)	1.3 mL
Standard 4	white	ready to use	30 µg/L (ppb)	1.3 mL
Standard 5	white	ready to use	100 µg/L (ppb)	1.3 mL
Standard 6	white	ready to use	300 µg/L (ppb)	1.3 mL
Wash buffer salt Tween	-	salt for dissolving		
Conjugate	red	ready to use		3 mL
Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro	brown	ready to use		10 mL
Stop solution	yellow	ready to use		14 mL
Neutralisation buffer	blue	ready to use		3 mL

5. Materials required but not provided

5.1. Equipment:

- Microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- Laboratory mincer / grinder, mortar, ultra-turrax or homogenizer
- Centrifuge + centrifugal vials
- Shaker
- Optional: paper filter and funnel
- Graduated pipettes
- Variable 20 - 200 µL and 200 - 1000 µL micropipette
- Optional: multi-dispenser or 8-channel pipette
- Optional: microtiter plate washer

5.2. Reagents:

- Distilled or demineralized water
- 1 M NaOH

6. Warnings and precautions for the users

This test should only be carried out by trained laboratory employees. The instruction for use must be strictly followed.

This kit may contain hazardous substances. For hazard notes on the contained substances please refer to the appropriate material safety data sheets (SDS) for this product, available online at www.r-biopharm.com.

All reagents and materials must be recovered or disposed after use at customers own responsibility according to the protection of human health and the environment. Please observe the applicable national regulations concerning waste disposal (e.g. Waste Management Act, Regulations on Dangerous Chemicals, etc.).

7. Storage instructions

Store the kit at 2 - 8 °C (36 - 46 °F). Do not freeze any test kit components.

Return any unused microwells to their original foil bag, reseal them together with the desiccant bag provided and further store at 2 - 8 °C (36 - 46 °F).

The standards, the conjugate and the substrate/chromogen are light sensitive; therefore, avoid exposure to direct light.

Do not use the test kit after the expiration date (see test kit label).

Do not interchange individual reagents between kits of different lot numbers (exception: sample buffer, wash buffer (salt), stop solution).

8. Indication of instability or deterioration of reagents

- Bluish coloration of the red stained substrate/chromogen prior to test implementation
- An absorption smaller than 0.6 ($A_{450\text{ nm}} < 0.6$) for the zero standard

9. Preparation of samples

The samples should be stored in a cool place, protected from light. The samples should be brought to room temperature before analysis (20 - 25 °C / 68 - 77 °F). For quality control, it is recommended to analyse control samples.

Remark: The samples should be measured at the day of extraction.

Note: The sample buffer can also be used for the sample preparation of folic acid or vitamin B12 containing samples in combination with the RIDASCREEN®FAST Folic Acid (Art. No. R3203) or RIDASCREEN®FAST Vitamin B12 (Art. No. R2103), respectively.

9.1. Milk, milk powder and food for special medical purpose

Milk:

- Collect 10 mL of the sample in a tube.
- Centrifuge for (or alternatively filter) in order to remove undissolved components.
- Collect 200 µL of the supernatant. Add 50 µL of the neutralisation buffer and 350 µL of the sample buffer. Mix well.
- The sample can be now analysed directly. Add 50 µL per well in the assay. The calculation factor is 3.
- The sample can be also diluted further with the sample buffer to fit within the testing range of the assay. Note that the calculation factor will change!

Milk powder, food for special medical purpose:

- Suspend 1 g sample in approx. 5 ml distilled water, fill up to 10 ml with distilled water.
- Shake / mix for 10 min.
- Heat the diluted sample for 3 min at 100 °C (212 °F) in a water bath, cool down quickly (ice bath).
- Centrifuge (or alternatively filter) in order to remove undissolved components.
- Collect 200 µL of the supernatant. Add 50 µL of the neutralisation buffer and 350 µL of the sample buffer. Mix well.
- The sample can be now analysed directly. Add 50 µL per well in the assay. The calculation factor is 30.
- The sample can be also diluted further with the sample dilution buffer to fit within the testing range of the assay. Note that the calculation factor will change!

9.2. Grain and cereals

- Weigh 1 g of ground sample into a suitable vial, suspend with approx. 5 mL of sample buffer and fill up to 10 mL with sample buffer (dilution factor = 10).
- Shake / mix for 10 min.
- Centrifuge (or alternatively filter) in order to remove undissolved components.
- Take supernatant, if supernatant is still turbid, filtrate.
- Collect 200 µL of the clear supernatant and add 50 µL of the neutralisation buffer and 350 µL of the sample buffer.
- The sample can be now analysed directly. Add 50 µL per well in the assay. The calculation factor is 30.
- The sample can be also diluted further with sample buffer to fit within the testing range of the assay. Note that the calculation factor will change!

Remark: If the sample has a gel-like consistency after centrifugation it is difficult to pipette the upper layer. The sample should be re-extracted with up to 15 mL or 20 mL of the sample buffer allowing for the better separation of the phases. Note that the calculation factor will change!

9.3. Vitamin powders, vitamin mixtures, vitamin tablets, and vitamin gummies

Vitamin powders / vitamin mixtures:

- Dissolve 1 g of vitamin powder / vitamin mixture in 5 mL sample buffer and fill up to 10 mL with sample buffer (dilution factor = 10).

Vitamin tablets:

- Crush the tablets and dissolve 1 g in 5 mL sample buffer and fill up to 10 mL with sample buffer (dilution factor = 10).

Vitamin gummies:

- Dissolve 1 gummy in the sample buffer to obtain 1 g in 10 mL solution. For instance, if the gummy weighs 2.2 g, add up to 22 mL (dilution factor = 10).
- Heat the mixture in a water bath at 50°C or on a hot plate stirrer (50°C) with controlled temperature until fully dissolved

Continue with these samples as described below:

- Shake / mix for 10 min.
- Centrifuge (or alternatively filter) in order to remove undissolved components.
- Dilute the supernatant or filtrate if necessary with the sample buffer into the testing range (new calculation of the dilution factor is necessary!).
- Add 50 µL per well in the assay.

9.4. Vitamin juices

- Centrifuge (or alternatively filter) in order to remove undissolved components.
- Dilute at least 5 times in the sample buffer, for example 2 mL of juice with 8 mL of the sample buffer (dilution factor = 5).
- Adjust the pH to 8.0 using 1 M NaOH.
- Dilute the supernatant or filtrate if necessary with the sample buffer into the testing range (new calculation of the dilution factor is necessary!).
- Add 50 µL per well in the assay.

9.5. Vitamin waters

- Centrifuge (or alternatively filter) in order to remove undissolved components.
- Dilute at least 5 times with the sample buffer, for example 2 mL of sample with 8 mL of the sample buffer (dilution factor = 5).
- Add 50 µL per well in the assay.

Remark: acidic vitamin water samples (such as carbonated energy drinks) require the same procedure (pH adjustment to 8.0) as vitamin juices.

10. Test implementation

10.1. Test preparation

Bring all reagents to room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) before use.

The **sample buffer** is provided as a 2-fold concentrate. The concentrate is diluted 1:2 with distilled water (e.g. 50 mL sample buffer concentrate + 50 mL distilled water). The diluted sample buffer expires after approx. 4 - 6 weeks at 2 - 8 °C (36 - 46 °F).

A PBS-Tween buffer is required as **wash buffer**, please use the wash buffer salt (pouch) contained in the kit (see chapter 4. Reagents provided). Dissolve the total content of the pouch in one liter of distilled water. The ready to use wash buffer expires after approx. 4 - 6 weeks at 2 - 8 °C (36 - 46 °F).

Alternatively: Dissolve the content of the pouch in 100 mL of distilled water to obtain a 10-fold concentrated wash buffer. This solution expires after approx. 8 - 12 weeks, stored at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F). Use one part of this concentrate and dissolve with 9 parts of distilled water to obtain the ready to use washing buffer.

10.2. Test procedure

Standards and samples must be tested on one microtiter plate at one time. Carefully follow the recommended washing procedure. Do not allow microwells to dry between working steps.

1. Insert a sufficient number of wells into the microwell holder for all standards and samples to be run in duplicate. Record standard and sample positions.
2. Add 50 µL of each standard or prepared sample in duplicate to the wells; use a new pipette tip for each standard or sample.
3. Add 50 µL of conjugate to each well (multi-dispenser or 8-channel pipette) and incubate for 15 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark.
4. Pour the liquid out of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times in a row) against absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Using an 8-channel pipette, fill the wells with ready to use wash buffer (250 µL per well) (see chapter 10.1). Empty the wells again and remove all remaining liquid. Repeat the washing step two more times.

5. Add 100 µL of the substrate/chromogen to each well (multi-dispenser or 8-channel pipette) and incubate for 10 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark.
6. Add 100 µL of stop solution to each well (multi-dispenser or 8-channel pipette) and measure the absorbance at 450 nm within 5 min after addition of stop solution.

11. Results

A special software, the **RIDASOFT® Win.NET** (Art. No. Z9996FF), is available for evaluation of the RIDASCREEN® enzyme immunoassays. The results are given in µg/kg respectively µg/L and µg/100 g respectively µg/100 mL.

The course of the standard curve is shown in the Certificate of analysis (CoA) enclosed in the test kit.

Remark for the calculation without software:

$$\frac{\text{absorbance standard (or sample)}}{\text{absorbance zero standard}} \times 100 = \% \text{ absorbance}$$

The zero standard is thus made equal to 100 % and the absorbance values are quoted in percentages (%). The values calculated for the standards are entered in a system of coordinates on semi-logarithmic graph paper against the biotin concentration (µg/kg or µg/L).

In order to obtain the biotin concentration actually contained in a sample, the concentration read from the standard curve must be further multiplied by the corresponding dilution factor.

12. Limitations of the method

Test results may vary depending on the sample matrix, the actual test procedure and the laboratory environment.

Detection and quantification limits depend on the respective sample matrix, the degree of processing and the extraction method.

13. Recommendation

In order to ensure a high analytical performance we recommend to analyze each sample material in duplicates. Each laboratory may decide to perform the test in single determinations after a qualified risk management analysis. This has no influence on the function of the test kit. However, it should be noted that this increases the risk of overlooking errors in the performance of the test (e.g. pipetting errors). Moreover, a higher result variation will occur when pipetting in single determinations.

For further product information and applications, please contact your local distributor or R-Biopharm at this address: sales@r-biopharm.de.

Version overview

Version number	Chapter and title
1.0	Release version

Explanation of symbols

General symbols:

	Follow the instructions for use
	Batch number
	Expiry date (YYYY-MM-DD)
	Storage temperature
	Article number
	Number of test determinations
	Manufacturing date (YYYY-MM-DD)
	Manufacturer + address

Disclaimer

1. R-Biopharm AG provides a limited statutory warranty ("Gewährleistung") as mandated and pursuant to German law against defects in title and material. For products with a defined shelf life, the warranty applies for the stated shelf life. For use cycle limited products, it applies until the stated cycle limit is reached, but not beyond the general warranty period. For all other products, the general warranty period is twelve (12) months from the date the risk transfers.
Such warranty is subject to timely notice of the alleged defect, giving sufficient detail to assess the claim. A product's defectiveness is assessed based on the specifically agreed quality, its suitability for the contractually stated purpose, and whether all agreed-upon accessories, documentation, and instructions were provided.
2. R-Biopharm AG is not liable for issues arising from:
 - a) The failure to read, understand, or follow product instructions and information for use or safety
 - b) The use of unqualified personnel
 - c) The failure to follow industry standards such as Good Laboratory Practices
 - d) The use of unsuitable controls, sample matrices, or procedures
 - e) Other misuse
 - f) unilateral product modifications
 - g) Improper storage by others
 - h) External chemical, electromagnetic, mechanical, or electrolytic influences that exceed the defined parameters.
 - i) Harm caused by external events beyond R-Biopharm's control, including but not limited to burglary, theft, lightning, fire, water, or acts of nature.
3. R-Biopharm AG's liability is limited to foreseeable, contract-typical losses in case of negligent breaches of obligations that are essential to achieving the agreement's purpose and that the other party could reasonably rely on (material contract obligations). R-Biopharm AG is not liable for losses resulting from non-material contract obligations.
4. ALL OTHER WARRANTIES OR GUARANTEES OF ANY KIND, EXPRESS OR IMPLIED, ARE EXCLUDED, WHETHER IMPLIED BY CUSTOM, PRACTICE, COURSE OF DEALINGS BETWEEN THE PARTIES OR OTHERWISE. R-Biopharm AG assumes no liability for consequential damages, in particular loss of profit, interruptions, or other indirect damages.
5. The foregoing is not intended to limit liability to the extent such liability cannot be excluded or limited under applicable German law or convention, including cases of intent, willful misconduct, or gross negligence, personal injury or death, express warranties or assumptions of procurement risks, strict liability, or other non-waivable legal mandates.
6. The foregoing liability provisions apply equally to R-Biopharm AG, its directors, officers, employees, and agents.

R-Biopharm AG

Postanschrift / Postal Address:

An der neuen Bergstraße 17

64297 Darmstadt, Germany

Sitz / Corporate Seat: Pfungstadt

Tel.: +49 (0) 61 51 - 81 02-0

Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-40

E-mail: info@r-biopharm.de

www.r-biopharm.com

Vorsitzender des Aufsichtsrats /

Chairman of Supervisory Board:

Dr. Ralf M. Dreher

Vorstand / Board of Management:

Christian Dreher (Vorsitzender / Chairman),

Ute Salzbrenner, Dr. Frank Apostel,

Dr. Frank Vitzthum

Handelsregister / Commercial Register:

Amtsgericht Darmstadt HRB 8321