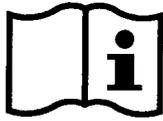


# Product information

Information about other products is available at: [www.demeditec.com](http://www.demeditec.com)

de  
medi  
tec

EN ISO 9001  
certified company



## User's Manual

# Biotin (Vitamin H) ELISA

Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of Biotin (Vitamin H) in food

REF

DEBIOE01



96

Sensitivity	0.5 ng/mL
Recovery (spiked samples)	98 %
Incubation Time	90 min

## 1. GENERAL INFORMATION

Biotin serves as the prosthetic group of enzymes, which catalyze carboxylations in the organism. For this purpose, biotin is bound via its carboxy group to lysin residues of carboxylases, and the transfer of carbon dioxide takes place after its attachment to a nitrogen atom of biotin, forming the so-called active carbon dioxide.

The awareness of the population for a good health and its interest in healthy nutrition has increased significantly during the last years. After the content of vitamins in his nourishment has gained importance for the consumer, food has partially been vitaminized by the manufacturer.

When there exists a lack of biotin, seborrhoea, dermatitis, anorexia, muscle pain, tiredness and nervous disorders can appear. As biotin is synthesized by the human intestinal flora, deficiency symptoms are rare, appear however after excessive ingestion of raw egg white, which can be explained by its content of biotin-binding avidin.

## 2. PRINCIPLE OF THE TEST

The **Biotin (Vitamin H)** quantitative test is based on the principle of the enzyme linked immunosorbent assay. Avidin, which shows a high affinity to biotin, is bound on the surface of a microtiter plate. Biotin containing samples or standards and a biotin-alkaline phosphatase conjugate are given into the wells of the microtiter plate. Enzyme labeled and free biotin compete for the binding sites. After one hour incubation at room temperature, the wells are washed with diluted washing solution to remove unbound material. A substrate solution is added and incubated for 30 minutes, resulting in the development of a yellow colour. The colour development is inhibited by the addition of a stop solution. The yellow colour is measured photometrically at 405 nm. The concentration of biotin 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. Microtiter plate consisting of 12 strips with 8 breakable wells each, coated with avidin.
2. Biotin Standards (0; 1; 2.5; 5; 10; 25 ng/mL): 6 vials with 0.5 mL each, ready-to-use. If stored in a refrigerator, crystals could precipitate, which can be redissolved by a 15 minutes incubation in a water bath to 37°C.
3. Conjugate (Biotin-Alkaline Phosphatase): 15 mL, contains 0.1% sodium azide, dyed red, ready-to-use.
4. Substrate Solution (PNPP): 15 mL; ready-to-use.
5. Stop Solution (1 M NaOH): 15 mL; ready-to-use.
6. Standard/Sample Diluent (PBS): 2 x 50 mL, contains 0.1% sodium azide, ready-to-use. If stored in a refrigerator, crystals could precipitate, which can be redissolved by 15 minutes incubation in a water bath to 37°C.
7. Washing Solution (PBS + Tween 20): 30 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.
8. Two plastic foils to cover the strips during the incubation.
9. Plastic bag to store unused microtiter strips.
10. Instruction Manual.

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

### Instrumentation

- 50, 100 and 1000 µL-micropipets
- Volumetric flask
- Mortar, mixer
- Centrifuge
- ELISA reader (405 nm)

### Reagents

- Potassiumhexacyanoferrate(II)-3-hydrate (150 g/L; Carrez I)
- Zinc sulfate-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>·2H<sub>2</sub>O, 2.90 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<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) und Carrez II (300 g/L Zinxsulfate-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. The sample solutions must be diluted such, that the concentrations lie within the linear range of the calibration curve.

### Multivitamin Tablets and Capsules

2 grams of crushed tablets or capsules are dissolved in 50 mL 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 100 mL by double-distilled water. The solid matter is separated by centrifugation, and 100 µL of the upper phase is diluted with 900 µL of sample diluent (total dilution factor 500) and used in the test. To dissolve the capsules, heating to 30-40°C is recommended.

### Multivitamin and Orange Juices

10 mL juice is diluted in a beaker with 20 mL of double-distilled water and adjusted to pH 6-7. 0.5 mL each of Carrez I and Carrez II are added, and the solution is filled up to 50 mL by double-distilled water. The solid matter is separated by centrifugation, and 100 µL of the upper phase is diluted with 900 µL of sample diluent (total dilution factor 50) and used in the test.

### Multivitamin Jam

5 grams of marmalade are weighed into a beaker and homogenised with 30 mL of double-distilled water in a mixer. 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 50 mL with double-distilled water. The solid matter is separated by centrifugation, and 100 µL of the upper phase is diluted with 900 µL of sample diluent (total dilution factor 100) and used in the test.

### Grain Products (Corn Flakes and Muesli)

5 grams of sample are homogenised by a mortar or a mixer and extracted by 50 mL of double-distilled water. After centrifugation, 20 mL of the supernatant is adjusted to pH 6-7, and 0.5 mL each of Carrez I and Carrez II are added. Afterwards the solution is filled up to 25 mL by double-distilled water. The solid matter is separated by centrifugation, and 100 µL of the upper phase is diluted with 900 µL of sample diluent (total dilution factor 100) and used in the test.

### Multivitamin Sweets

2 grams of crushed sweets are dissolved by gentle heating (if necessary) in 50 mL of 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 100 mL with double-distilled water. The solid matter is separated by centrifugation, and 50 µL of the upper phase is diluted with 950 µL of sample diluent (total dilution factor 1000) and used in the test.

### Isotonic Powder

2 grams of isotonic powder are dissolved in 50 mL of 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 100 mL with double-distilled water. The solid matter is separated by centrifugation, and 100 µL of the upper phase is diluted with 900 µL of sample diluent (total dilution factor 500) and used in the test.

### 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 50  $\mu\text{L}$  standards or prepared samples in duplicate into the appropriate wells of the microtiter plate. Immediately add 100  $\mu\text{L}$  biotin-AP conjugate 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 substrate solution into each well.
6. Allow the reaction to develop in the dark (e.g. cupboard or drawer; the chromogen is light-sensitive) for 30 minutes at room temperature.
7. Stop enzyme reaction by adding 100  $\mu\text{L}$  of stop solution (1 M NaOH) into each well. The yellow colour will darken upon addition.
8. After thorough mixing, measure absorbance at 405 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 405 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 biotin (Vitamin H) 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. The factor is dependent on the sample preparation procedure employed. Applying the procedure for dry milk instant formula the dilution factor is 25.

## 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.

Biotin (ng/mL)	% binding of 0 ng/mL
0	100
1.0	91
2.5	77
5.0	38
10	12
25	4

## 11. PERFORMANCE

### Sensitivity

The sensitivity of the **Biotin (Vitamin H) ELISA** is 0.5 ng/mL (based on the standard curve).

### Recovery

The recovery of spiked samples was determined to 98 %.

### Intra-assay Precision

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

## 12. REFERENCES

1. Du Vigneaud, V., Dittmer, K., Hague, E. et al; Science 96, 186 (1942).
2. Falbe, J., Regitz, M. (Hrsg.); Römpp Chemie Lexikon (9. Auflage), Georg Thieme Verlag, 430 (1989).
3. Lehninger, A. L.; Biochemie, 2. Auflage, 279 (1979).

Empfindlichkeit	0,5 ng/mL
Wiederfindung (aufgestockte Proben)	98 %
Inkubationszeit	90 min

## 1. ALLGEMEINES

Biotin dient als prosthetische Gruppe von Enzymen, die Carboxylierungen im Organismus katalysieren. Dabei ist Biotin über seine Carboxy-Gruppe an Lysinreste der Carboxylasen gebunden, und die Übertragung des Kohlendioxids geschieht über dessen Anlagerung an ein N-Atom des Biotins zum sogenannten aktiven Kohlendioxid.

Das Gesundheitsbewusstsein der Bevölkerung und damit das Interesse an gesunder Ernährung hat in den letzten Jahren deutlich zugenommen. Da der Gehalt von Vitaminen in Lebensmitteln für den Verbraucher an Bedeutung gewonnen hat, werden Lebensmittel teilweise von den Herstellern vitaminisiert. Bei Biotinmangel können Seborrhoe, Dermatitis, Appetitlosigkeit, Muskelschmerzen, Müdigkeit und nervöse Störungen auftreten. Da Biotin von der menschlichen Darmflora synthetisiert wird, treten Mangelerscheinungen selten auf, wohl jedoch bei übermäßigem Genuss von rohem Hühnereiklar, was auf dessen Gehalt an Biotin-bindendem Avidin zurückzuführen ist.

## 2. TESTPRINZIP

Der **Biotin (Vitamin H) Test** basiert auf dem Prinzip des Enzymimmunoassay (EIA). Avidin, das eine hohe Affinität gegenüber Biotin aufweist, ist auf der Oberfläche der Mikrotiterplatte gebunden. Darauf wird die Biotin enthaltende Probe sowie ein Alkalische-Phosphatase-Biotin-Konjugat in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Es findet eine Konkurrenz zwischen markiertem und unmarkiertem Biotin statt. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wird die Platte mit verdünnter Waschlösung gewaschen, um nichtgebundenes Material zu entfernen. Eine Substratlösung wird hinzupipettiert und 30 Minuten inkubiert, wodurch in den Vertiefungen ein gelber Farbstoff entwickelt wird. Die Farbentwicklung wird durch Zugabe einer Stopp-Lösung beendet. Die resultierende Farbe wird spektrophotometrisch bei 405 nm gemessen. Die Biotin-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. Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten (12 Streifen mit je 8 Vertiefungen), beschichtet mit Avidin.
2. Biotin Standards: 6 Fläschchen mit je 0,5 mL (0; 1; 2,5; 5; 10; 25 ng/mL), gebrauchsfertig. Falls bei der gekühlten Lagerung Kristalle ausfallen sollten, die Standards 15 Minuten im Wasserbad (37°C) erwärmen.
3. Konjugat (Biotin-AP): 15 mL, enthält 0,1% Natriumazid, rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
4. Substratlösung (PNPP), 15 mL, gebrauchsfertig.
5. Stopp-Lösung (1 M NaOH): 15 mL, gebrauchsfertig.
6. Probenverdünnungspuffer: 2 x 50 mL, gebrauchsfertig, enthält 0,1% Natriumazid. Falls bei der gekühlten Lagerung Kristalle ausfallen sollten, den Puffer 15 Minuten im Wasserbad (37°C) erwärmen.
7. Waschlösung (PBS + Tween 20), 30 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.
8. Zwei Plastikfolien zur Abdeckung der Streifen während der Inkubation.
9. Ein wiederverschließbarer Plastikbeutel für die Lagerung unbenutzter Streifen.
10. Arbeitsanleitung.

#### 6. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE GERÄTE UND REAGENZIEN

##### Geräte

- 10, 100 und 1000 µL-Mikropipetten
- Messkolben
- Mörser, Mixer
- Zentrifuge
- Mikrotiterplatten-Photometer (405 nm)

##### 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. Die Verdünnung sollte so gewählt werden, dass die Probenwerte im linearen Bereich der Standardkurve liegen.

### **Multivitamin-tabletten und -kapseln**

2 g zerkleinerte Tabletten werden in etwa 50 mL destilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert auf 6-7 eingestellt. Anschließend werden Trübstoffe mit je 0,5 mL Carrez I und Carrez II gefällt und der Extrakt mit bidestilliertem Wasser in einem Messkolben auf 100 mL aufgefüllt. Nach dem Abzentrifugieren des Niederschlags werden 100 µL der Lösung mit 900 µL Probenverdünnungspuffer gemischt und im Test eingesetzt (Faktor 500). Zum Lösen von Kapseln wird eine Erwärmung auf 30-40°C empfohlen.

### **Multivitamin-säfte**

10 mL Saft werden in einem Becherglas mit 20 mL destilliertem Wasser verdünnt und der pH-Wert auf 6-7 eingestellt. Anschließend werden Trübstoffe mit je 0,5 mL Carrez I und Carrez II gefällt und der Extrakt mit bidestilliertem Wasser in einem Messkolben auf 50 mL aufgefüllt. Nach dem Abzentrifugieren des Niederschlags werden 100 µL der Lösung mit 900 µL Probenverdünnungspuffer gemischt und im Test eingesetzt (Faktor 50).

### **Multivitamin-marmelade**

5 g Marmelade werden in einem Becherglas eingewogen, mit 30 mL destilliertem Wasser vermischt, der pH-Wert auf 6-7 eingestellt und Trübstoffe mit je 0,5 mL Carrez I und Carrez II gefällt. Die Lösung wird mit destilliertem Wasser auf 50 mL aufgefüllt. Nach dem Abzentrifugieren des Niederschlags werden 100 µL des Überstands mit 900 µL Probenverdünnungspuffer gemischt und im Test eingesetzt (Faktor 100).

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

Die Flocken werden in einer Schlagmühle oder einem Mixer homogenisiert, 5 g mit 50 mL destilliertem Wasser versetzt, 5 Minuten lang im Ultraschallbad behandelt und 20 Minuten intensiv geschüttelt. Der Ansatz wird zentrifugiert, 20 mL des Überstandes auf einen pH-Wert von 6-7 eingestellt, mit je 0,5 mL Carrez I und Carrez II versetzt und dann auf 25 mL aufgefüllt. Nach dem Abzentrifugieren des Niederschlags werden 100 µL der Lösung mit 900 µL Probenverdünnungspuffer gemischt und im Test eingesetzt (Faktor 125).

### **Multivitamin-bonbons**

2 g zerkleinerte Bonbonmasse werden (falls notwendig unter Erwärmen) in 50 mL destilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert auf 6-7 eingestellt und je 0,5 mL Carrez I und Carrez II zugegeben. Anschließend wird mit destilliertem Wasser auf 100 mL aufgefüllt. Nach dem Abzentrifugieren des Niederschlags werden 50 µL der Lösung mit 950 µL Probenverdünnungspuffer gemischt und im Test eingesetzt (Faktor 1000).

### **Isotonisches Getränkepulver**

2 g des Pulvers werden in 50 mL destilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert auf 6-7 eingestellt und je 0,5 mL Carrez I und Carrez II zugegeben. Anschließend wird mit destilliertem Wasser auf 100 mL aufgefüllt. Nach dem Abzentrifugieren des Niederschlags werden 100 µL der Lösung mit 900 µL Probenverdünnungspuffer gemischt und im Test eingesetzt (Faktor 500).

### **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 in 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. 50 µL Standards bzw. vorbehandelte Proben im Doppelansatz in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte geben. Sofort im Anschluss in jede Vertiefung 100 µL des Biotin-AP-Konjugates 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 Substratlösung zugeben.
6. Platte abdecken und 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
7. Substratreaktion durch Zugabe von 100 µL Stopp-Lösung (1 M NaOH) beenden.
8. Nach sorgfältigem Mischen erfolgt die Messung der Extinktion bei 405 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 Biotin (Vitamin H) abgelesen.
4. Um die in einer Probe tatsächlich enthaltene Konzentration zu errechnen, muss der aus der Eichkurve abgelesene Wert noch mit einem entsprechenden Verdünnungsfaktor (siehe Probenvorbereitung), multipliziert werden. Bei Anwendung der Probenvorbereitungsmethode für Säuglingsnahrung ist der Verdünnungsfaktor 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.

Biotin (ng/mL)	OD-% von 0 ng/mL
0	100
1,0	91
2,5	77
5,0	38
10	12
25	4

## 11. TECHNISCHE DATEN

### Empfindlichkeit

Die mittlere untere Nachweisgrenze des **Biotin (Vitamin H) Tests** beträgt 0,5 ng/mL bezogen auf die Standardkurve.

### Wiederfindung

Die Wiederfindung aufgestockter Proben wurde mit 98% bestimmt.

### Intraassay-Präzision

Der Intraassay-Variationskoeffizient des Vitamin B<sub>12</sub>-Tests wurde mit 3% bestimmt.

## 12. LITERATUR

1. Du Vigneaud, V., Dittmer, K., Hague, E. et al; Science 96, 186 (1942).
2. Falbe, J., Regitz, M. (Hrsg.); Römpp Chemie Lexikon (9. Auflage), Georg Thieme Verlag, 430 (1989).
3. Lehninger, A. L.; Biochemie, 2. Auflage, 279 (1979).

**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