

RIDASCREEN® Sulfamethazin

REF R3011

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung
von Sulfamethazin

Enzyme immunoassay for the quantitative determination
of sulfamethazine

In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C
Storage at 2 - 8 °C



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® Sulfamethazin (R3011) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Sulfamethazin in Milch, Fleisch, Honig, Leber, Niere, Fisch, Shrimps und Ei.

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

| | |
|--|--|
| Probenvorbereitung: | <u>Milch</u> : direkter Einsatz <u>Fleisch</u> : Homogenisierung, Zentrifugation <u>Honig</u> : Extraktion, Aufreinigung über RIDA® C18 Säule, Evaporation, Rekonstitution, Fällung <u>Leber, Niere, Fisch</u> : Homogenisierung, Zentrifugation, Fällung <u>Shrimps, Ei</u> : Homogenisierung, Extraktion, Evaporation, Rekonstitution. |
| Zeitbedarf: | Probenvorbereitung für 10 Proben Je nach Probenmatrix 5 min - 2 h Testdurchführung (Inkubationszeit) 45 min |
| Nachweisgrenze: (bezogen auf die Standardsubstanz) | Milch ca. 4 µg/l Fleisch (Rind, Schwein) ca. 5 µg/kg Fleisch (Geflügel) ca. 10 µg/kg Honig* ca. 10 µg/kg Leber ca. 6 µg/kg Niere ca. 10 µg/kg Fisch ca. 7 µg/kg Shrimps ca. 15 µg/kg Ei ca. 16 µg/kg |

*Bei Honig kann die Nachweisgrenze matrixbedingt abweichen.

| | | |
|-------------------------|-------------------------------|----------|
| Nachweisvermögen (CCβ): | Milch | 10 µg/l |
| (bezogen auf die | Fleisch (Rind, Schwein) | 10 µg/kg |
| Standardsubstanz) | Fleisch (Geflügel) | 15 µg/kg |
| | Honig | 20 µg/kg |
| | Leber | 15 µg/kg |
| | Niere | 15 µg/kg |
| | Fisch | 20 µg/kg |
| | Shrimps | 20 µg/kg |
| | Ei | 15 µg/kg |

| | | |
|---------------------|-------------------------------|-----------|
| Wiederfindungsrate: | Milch | ca. 110 % |
| (bezogen auf die | Fleisch (Rind, Schwein) | ca. 94 % |
| Standardsubstanz) | Fleisch (Geflügel) | ca. 115 % |
| | Honig | ca. 88 % |
| | Leber | ca. 89 % |
| | Niere | ca. 96 % |
| | Fisch | ca. 88 % |
| | Shrimps | ca. 111 % |
| | Ei | ca. 107 % |

Die Spezifität des RIDASCREEN® Sulfamethazin 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 Werten 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.

| | | |
|-----------------|---|---------|
| Spezifität: | Sulfamethazin (Standardsubstanz) | 100 % |
| im Puffersystem | Sulfamerazin | ca. 4 % |
| | Sulfacetamid, Sulfachloropyridazin, Sulfachloropyridazin-(phenyl- ¹³ C6), Sulfadiazin, Sulfadimethoxin, Sulfadoxin, Sulfaguanidin, Sulfamethoxazol, Sulfamethoxypyridazin, Sulfamethizol, Sulfamoxol, Sulfanilamid, Sulfaphenazol, Sulfapyridin, Sulfaquinoxalin, Sulfisoxazol | < 1 % |

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 www.r-biopharm.com/de/produkte/lebensmittel-futtermittelanalytik abgerufen, gedruckt und gespeichert werden.

Produktangebot

RIDA® Sulfamethazin Dotierlösung (R3098)

RIDASCREEN® Sulfonamide (R3004)

RIDA® Sulfonamide/ Sulfamethoxypridazin Dotierlösung (R3099)

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN® Sulfamethazin (R3011) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Sulfamethazin in Milch, Fleisch, Honig, Leber, Niere, Fisch, Shrimps und Ei.

2. Allgemeines

Sulfonamide werden in der Kälber- und Schweinemast häufig als Futtermittelzusatzstoffe eingesetzt. Zusammen mit Antifolaten wie z. B. Trimethoprim werden sie in der Veterinärmedizin auch häufig zur Behandlung von Darminfektionen, Mastitiden, Lungenentzündungen und anderen systemischen Infektionen verwendet. Die Kontamination von Lebensmitteln tierischen Ursprungs mit Sulfonamiden ist deshalb möglich und wurde weltweit auch häufig nachgewiesen. Insbesondere das Vorkommen des karzinogenen Sulfamethazins ist im Hinblick auf den Verbraucherschutz problematisch. Laut EU-Recht gilt die Höchstmenge für alle Stoffe der Sulfonamidgruppe von 100 µg/kg in Muskulatur, Fett, Leber, Niere und Milch.

3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte sind mit Fänger-Antikörpern gegen anti-Sulfamethazin-Antikörper beschichtet. Die Mikrotiterplatte ist bereits funktionalisiert mit anti-Sulfamethazin-Antikörpern, die an die immobilisierten Fänger-Antikörper gebunden sind. Durch Zugabe von Standards bzw. Probe und enzymmarkiertem Sulfamethazin

(Konjugat) konkurrieren freies und enzymmarkiertes Sulfamethazin um die Sulfamethazin-Antikörperbindungsstellen (kompetitiver Enzymimmunoassay). Nicht gebundenes enzymmarkiertes Sulfamethazin 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 Stopplösung führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Messung erfolgt photometrisch bei 450 nm; die Extinktion der Lösung ist umgekehrt proportional zu der Sulfamethazin-Konzentration in der Probe.

4. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien einer Packung können max. 96 Bestimmungen durchgeführt werden (einschließlich Standardbestimmungen). Jeder Testkit enthält:

| Komponente | Deckelfarbe | Zustand | Inhalt |
|---|-------------|----------------------|--------------------|
| Microtiter plate Mikrotiterplatte | - | Gebrauchsfertig | 96 Kavitäten |
| Standard 1 Standard 1 | Weiß | Gebrauchsfertig | 0 µg/l 1,3 ml |
| Standard 2 Standard 2 | Weiß | Gebrauchsfertig | 3 µg/l 1,3 ml |
| Standard 3 Standard 3 | Weiß | Gebrauchsfertig | 9 µg/l 1,3 ml |
| Standard 4 Standard 4 | Weiß | Gebrauchsfertig | 27 µg/l 1,3 ml |
| Standard 5 Standard 5 | Weiß | Gebrauchsfertig | 81 µg/l 1,3 ml |
| Standard 6 Standard 6 | Weiß | Gebrauchsfertig | 162 µg/l 1,3 ml |
| Wash buffer salt Tween Waschpuffer | - | Salz zum Auflösen | |
| Conjugate Konjugat | Rot | Gebrauchsfertig | 6 ml |
| Substrate/Chromogen Substrat/Chromogen Red Chromogen Pro | Braun | Gebrauchsfertig | 10 ml |
| Stop solution Stopp-Lösung | Gelb | Gebrauchsfertig | 14 ml |

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1 Geräte

| Gerät | Milch | Fleisch | Honig | Leber | Niere | Fisch | Shrimps Ei |
|--|-------|---------|-------|-------|-------|-------|---------------|
| Mikrotiterplatten- Photometer (450 nm) | • | • | • | • | • | • | • |
| Messpipetten | | • | • | • | • | • | • |
| Variable 2 - 10 µl Mikropipette | | | • | | • | • | |
| variable 20 - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten | • | • | • | • | • | • | • |
| Mixer | | • | | • | • | • | • |
| Schüttler | | • | | • | • | • | • |
| Zentrifuge | | • | • | • | • | • | • |
| Evaporator | | | • | | | | • |
| Vortex | • | • | • | • | • | • | • |
| RIDA® C-18 Säule | | | • | | | | |

5.2 Reagenzien

| Reagenz | Milch | Fleisch | Honig | Leber | Niere | Fisch | Shrimps Ei |
|-------------------|-------|---------|-------|-------|-------|-------|---------------|
| Extraktionspuffer | | | • | | | | |
| Methanol | | | • | | | | • |
| Carrez I | | | • | • | • | • | |
| Carrez II | | | • | • | • | • | |

Extraktionspuffer für Honig: 50 mM Natriumacetatpuffer, pH 5:

4,1 g Natriumacetat (CH₃COONa) in 900 ml dest. Wasser lösen, mit HCl auf pH 5 einstellen und auf 1000 ml auffüllen

Carrez-Reagenz I:

1,52 g Kaliumhexacyanoferrat(II) x 3 H₂O in 10 ml dest. Wasser lösen

Carrez-Reagenz II:

2,99 g Zinksulfat x 7 H₂O in 10 ml dest. Wasser lösen

6. Vorsichtsmaßnahmen

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

Dieses 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 sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften.

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.

Das rötlich gefärbte Substrat/Chromogen ist lichtempfindlich, deshalb direkte Lichteinwirkung vermeiden.

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

Ein Austausch von Einzelreagenzien zwischen Kits verschiedener Chargennummern ist nicht zulässig.

8. Anzeichen für Reagenzienverfall

- Bläuliche Färbung des rötlichen Substrats/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.

9.1 Milch

- Eine repräsentative Probenmenge bis zur Homogenität vortexen
- 50 µl Milch pro Kavität im Test einsetzen

9.2 Fleisch (Rind, Schwein, Geflügel)

- Eine repräsentative Probenmenge von Fett befreien und mit einem geeigneten Gerät vollständig homogenisieren
- Zu 1 g homogenisierter Probe 2 ml Waschpuffer (siehe 10.1.) zugeben
- 10 sec vortexen, dann 5 min kräftig mischen (Über-Kopf-Schüttler)
- Zentrifugieren: 10 min / 4000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- Eventuell vorhandene obere Fettschicht komplett absaugen (z.B. mit einer Pasteurpipette)
- 50 µl des Überstandes pro Kavität im Test einsetzen

9.3 Honig

- 1 g Honig in 6 ml Extraktionspuffer (siehe 5.2.) lösen
- Zentrifugieren: 10 min / 3.000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)

Den kompletten Probenextrakt mittels RIDA® C18 column (Art. Nr. R2002) aufreinigen:

- Säule mit 2 ml Methanol waschen
- Säule mit 2 ml Extraktionspuffer äquilibrieren
- Den gesamten Probenextrakt aufbringen
- Säule mit 8 ml Extraktionspuffer waschen
- Durch Nachdrücken von Luft oder N₂ die Flüssigkeit vollständig aus der Säule entfernen
- Probe langsam mit 1 ml Methanol (100%) eluieren (ca. 15 Tropfen/min)
- Eluat unter schwachem Luft- oder N₂-Strom bei 60 °C bis zur Trockene evaporieren
- Trockenem Rückstand in 1 ml Waschpuffer aufnehmen
- 10 µl Carrez I hinzugeben, vortexen
- 10 µl Carrez II hinzugeben, vortexen
- Zentrifugieren: 10 min / 4000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 50 µl des Überstandes pro Kavität im Test einsetzen

9.4 Leber

- Eine repräsentative Probenmenge von Fett befreien und mit einem geeigneten Gerät homogenisieren
- Zu 1 g homogenisierter Probe 2 ml Waschpuffer (siehe 10.1.) zugeben
- 10 sec vortexen, dann 5 min kräftig mischen (Über-Kopf-Schüttler)
- Zentrifugieren: 10 min / 4000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)

- 1 ml Überstand abnehmen
- 20 µl Carrez I zugeben, vortexen
- 20 µl Carrez II zugeben, vortexen
- Zentrifugieren: 10 min / 4000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 50 µl des Überstandes pro Kavität im Test einsetzen

9.5 Niere

- Eine repräsentative Probenmenge von Fett befreien und mit einem geeigneten Gerät vollständig homogenisieren
- Zu 1 g homogener Probe 2 ml Waschpuffer zugeben
- 10 sec vortexen, dann 5 min kräftig mischen (Über-Kopf-Schüttler)
- Zentrifugieren: 10 min / 4000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 1 ml Überstand abnehmen
- 10 µl Carrez I zugeben, vortexen
- 10 µl Carrez II zugeben, vortexen
- Zentrifugieren: 10 min / 4000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 50 µl des Überstandes pro Kavität im Test einsetzen

9.6 Fisch

- Eine repräsentative Probenmenge von Haut und Fett befreien und mit einem geeigneten Gerät vollständig homogenisieren
- Zu 1 g homogener Probe 2 ml Waschpuffer zugeben
- 10 sec vortexen, dann 5 min kräftig mischen (Über-Kopf-Schüttler)
- Zentrifugieren: 10 min / 4000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 1 ml Überstand abnehmen
- 5 µl Carrez I zugeben, vortexen
- 5 µl Carrez II zugeben, vortexen
- Zentrifugieren: 10 min / 4000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 50 µl des Überstandes pro Kavität im Test einsetzen

9.7 Shrimps/ Ei

- Eine repräsentative Probenmenge mit einem geeigneten Gerät homogenisieren
- Zu 1 g homogener Probe 2 ml Methanol zugeben
- 30 sec kräftig vortexen
- Zentrifugieren: 10 min / 4000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 1 ml Überstand in ein neues Röhrchen überführen und bei 60 °C unter

- schwachem Luft- oder N₂-Strom bis zur Trockene evaporieren
- Den trockenen Rückstand in 1 ml Waschpuffer (siehe 10.1.) aufnehmen
- 50 µl des Überstandes pro Kavität im Test einsetzen

10. Testdurchführung

10.1 Testvorbereitungen

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

Als Waschpuffer wird ein PBS-Tween-Puffer benötigt, dazu bitte das beiliegende Puffersalz (siehe 4. Packungsinhalt) nutzen. Zur Herstellung des Puffers wird der gesamte Inhalt des Beutels in 1 Liter destilliertem Wasser gelöst. Der gelöste Waschpuffer ist ca. 4 - 6 Wochen bei 2 - 8 °C haltbar.

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

Nicht verwendete Reagenzien sofort wieder bei 2 - 8 °C lagern.

10.2 Testdurchführung

Sorgfältiges Waschen ist sehr wichtig. Ein Eintrocknen der Kavitäten zwischen den Arbeitsschritten vermeiden.

1. So viele Kavitäten in den Halterahmen einsetzen, wie für alle Standards und Proben benötigt werden. Die Positionen der Standards und der Proben protokollieren.
2. Je 50 µl der Standards bzw. vorbereiteten Proben (siehe Abschnitt 9. Probenvorbereitung) als Doppelbestimmung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren. Für jeden Standard oder Probe neue Pipettenspitzen verwenden.
3. Je 50 µl Konjugat in die entsprechenden Kavitäten pipettieren, vorsichtig manuell mischen und 30 min bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
4. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf saugfähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit jeweils 250 µl verdünntem Waschpuffer (siehe 10.1. Testvorbereitungen) waschen. Diesen Vorgang zweimal wiederholen.

5. Je 100 µl Substrat/Chromogen die Kavitäten pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 15 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
6. Je 100 µl Stopp-Lösung in jede Kavität pipettieren und vorsichtig manuell mischen. Die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stopp-Lösung messen.

11. Auswertung

Für die Auswertung ist bei R-Biopharm optional eine speziell für die RIDASCREEN® Enzymimmunoassays entwickelte Software, die **RIDASOFT® Win.NET Food & Feed** (Art. Nr. Z9996FF), erhältlich.

Der Verlauf der Standardkurve kann dem beigefügten Qualitätssicherheitszertifikat (Analysenzertifikat) entnommen werden.

Hinweis für die Berechnung ohne Software:

Extinktion Standard (bzw. Probe)
 Extinktion Nullstandard x 100 = % Extinktion

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

Den Nullstandard somit gleich 100 % setzen und die Extinktionswerte in Prozent angeben. Die errechneten Werte für die Standards in einem Koordinatensystem auf halblogarithmischem Millimeterpapier gegen die Sulfamethazin-Konzentration [µg/l] auftragen.

Interpretation der Ergebnisse

Um die in den Proben enthaltene tatsächliche Sulfamethazin-Konzentration in µg/l (µg/kg) zu erhalten, muss die aus der Standardkurve abgelesene Konzentration noch mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden. Beim Arbeiten nach der angegebenen Vorschrift gelten folgende Verdünnungsfaktoren:

| | |
|---------------|---|
| Milch | 1 |
| Fleisch | 3 |
| Honig | 1 |
| Leber..... | 3 |
| Niere | 3 |
| Fisch | 3 |
| Shrimps | 3 |
| Ei | 3 |

Empfehlung

Um eine hohe analytische Sicherheit zu gewährleisten wird empfohlen:

- Zur Prüfung auf richtige und störungsfreie Durchführung der Bestimmung Dotierungsversuche durchzuführen.









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

Versionsübersicht

| Versionsnummer | Kapitel und Bezeichnung |
|----------------|---|
| 2017-02-10 | Freigabeversion |
| 2021-01-11 | Kurzinformation, Produktangebot, 4. Packungsinhalt, 6. Vorsichtsmaßnahmen 7. Reagenzien und ihre Lagerung |

Symbolerklärung

- Allgemeine Symbole:

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

Haftungsausschluss

Der Anwender trägt das alleinige Risiko bei der Verwendung der Produkte und Dienstleistungen der R-Biopharm AG.

Die R-Biopharm AG gewährleistet, dass ihre Produkte und Dienstleistungen allen von ihr festgelegten Qualitätskontrollstandards entsprechen. Die R-Biopharm AG wird nach ihrer Wahl Komponenten, Produkte oder wiederkehrende Dienstleistungen austauschen oder ausbessern, die sich innerhalb produktspezifischer Gewährleistungsfristen oder Ablaufdaten als mangelhaft in der Verarbeitung oder im Material erweisen und die sich nach der Prüfung und im Ermessen der R-Biopharm AG als mangelhaft erweisen.

Diese Gewährleistung tritt an die Stelle jeglicher Gewährleistungen hinsichtlich Qualität, Beschreibung, Eignung für einen bestimmten Zweck, Marktgängigkeit, Produktivität oder anderer Spezifikationen. Die R-Biopharm AG ist in keiner Weise verantwortlich für jegliche Nutzung ihrer Produkte und weist hiermit alle anderen ausdrücklichen oder stillschweigenden Rechtsbehelfe ab, bzw. übernimmt ausdrücklich keine, Garantien, Gewährleistungen oder Haftungen, die sich aus dem Gesetz oder anderweitig ergeben. Die R-Biopharm AG übernimmt des Weiteren keine Haftung für entgangenen Gewinn oder Schäden – direkt, indirekt oder anderweitig – an Personen oder Eigentum im Zusammenhang mit der Verwendung ihrer Produkte oder Dienstleistungen.

Diese Haftungsregelung kann nur durch ein schriftliches, von einem autorisierten Vertreter der R-Biopharm AG unterzeichnetes Dokument verlängert, geändert oder ausgetauscht werden.

RIDASCREEN® Sulfamethazin

Brief information

RIDASCREEN® Sulfamethazin (R3011) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of sulfamethazine in milk, meat, honey, liver, kidney, fish, shrimp and egg.

All reagents required for performing the enzyme immunoassay, including the standards, are contained in the test kit. The test kit is sufficient for a maximum of 48 duplicate determinations (including standards). A microtiter plate spectrophotometer is required for quantification.

Sample preparation: Milk: direct use
 Meat: homogenization, centrifugation
 Honey: extraction, clean-up with RIDA® C18 column, evaporation, reconstitution, precipitation
 Liver, kidney, fish: homogenization, centrifugation, precipitation
 Shrimp, egg: homogenization, extraction, evaporation, reconstitution

Time requirement: sample preparation (for 10 samples)
 according to sample matrix 5 min to 2 h
 test implementation (incubation time) 45 min

Limit of detection: Milk approx. 4 µg/l
(corresponding to the Meat (bovine, porcine) approx. 5 µg/kg
standard substance) Meat (poultry) approx. ca. 10 µg/kg
 Honey* approx. ca. 10 µg/kg
 Liver approx. ca. 6 µg/kg
 Kidney approx. ca. 10 µg/kg
 Fish approx. ca. 7 µg/kg
 Shrimp approx. ca. 15 µg/kg
 Egg approx. ca. 16 µg/kg

* For honey the LOD can deviate due to matrix effects.

| | | |
|---|------------------------|-----------------------|
| Detection capability (CC β): (corresponding to the standard substance) | Milk | approx. 10 μ g/l |
| | Meat (bovine, porcine) | approx. 10 μ g/kg |
| | Meat (poultry) | approx. 15 μ g/kg |
| | Honey | approx. 20 μ g/kg |
| | Liver | approx. 15 μ g/kg |
| | Kidney | approx. 15 μ g/kg |
| | Fish | approx. 20 μ g/kg |
| | Shrimp | approx. 20 μ g/kg |
| | Egg | approx. 15 μ g/kg |

| | | |
|--|------------------------|---------------|
| Recovery rate: (corresponding to the standard substance) | Milk | approx. 110 % |
| | Meat (bovine, porcine) | approx. 94 % |
| | Meat (poultry) | approx. 115 % |
| | Honey | approx. 88 % |
| | Liver | approx. 89 % |
| | Kidney | approx. 96 % |
| | Fish | approx. 88 % |
| | Shrimp | approx. 111 % |
| | Egg | approx. 107 % |

The specificity of the RIDASCREEN[®] Sulfamethazine assay was determined by analyzing the cross-reactivity to the respective substances in the buffer system. In samples, the specificity may differ from the values determined in the buffer system due to matrix effects. Prior to the analysis of cross-reactive substances, the user has to determine the limit of detection and the recovery rate in the relevant matrix. The test cannot distinguish between analytes and cross-reactive substances.

| | | |
|----------------------------------|---|-------------|
| Specificity: in buffer system | Sulfamethazine (standard substance) | 100 % |
| | Sulfamerazine | approx. 4 % |
| | Sulfacetamide, Sulfachloropyridazine, Sulfachloropyridazine-(phenyl- ¹³ C6), Sulfadiazine, Sulfadimethoxine, Sulfadoxine, Sulfaguandine, Sulfamethoxazole, Sulfamethoxypyridazine, Sulfamethizole, Sulfamoxole, Sulfanilamide, Sulphaphenazole, Sulfapyridine, Sulfaquinoxaline, Sulfisoxazole | < 1 % |

In order to increase the quality of assessment when performing ELISA procedures, we refer additionally to our Good ELISA Practice manual. It lists minimum standards concerning the framework conditions when using test kits of R-Biopharm AG and performing ELISA analyses with them. The manual can be retrieved, printed and downloaded from www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis.

Product offer

RIDA® Sulfamethazin Spiking Solution (R3098)

RIDASCREEN® Sulfonamide (R3004)

RIDA® Sulfonamide-Sulfamethoxypyridazin Spiking Solution (R3099)

1. Intended use

RIDASCREEN® Sulfamethazin (R3011) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of sulfamethazine in milk, meat, honey, liver, kidney, fish, shrimp and egg.

2. General information

Sulfonamides are widely used as feed additives, mainly for fattening of calves and pigs. Combined with inhibitors of dihydrofolate reductase such as trimethoprim, tetroxoprim, or pyrimethamine sulfonamides are also used in veterinary medicine for the treatment of intestinal infections, mastitis, pneumonitis and other (systemic) diseases. Sulfonamide residues may therefore occur in food of animal origin such as meat and milk. Particularly the transmission of the carcinogenic sulfamethazine represents a threat to human health. The EU established a maximum residue limit (MRL) for all substances of the sulfonamide-group of 100 µg/kg (ppb) in muscle, fat, liver, kidney and milk.

3. Test principle

The basis of the test is the antigen-antibody reaction. The microtiter wells are coated with capture antibodies directed against anti-sulfamethazine antibodies. The microtiter plate is already functionalized with anti-sulfamethazine antibodies, which are bound by the immobilized capture antibodies. Standards or sample and sulfamethazine conjugate are added into the wells. Free and enzyme conjugated sulfamethazine competes for the antibody binding sites (competitive enzyme immunoassay). Any unbound conjugate is then removed in a washing step. The 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 absorption is inversely proportional to the sulfamethazine concentration in the sample.

4. Reagents provided

Each kit contains sufficient materials for a max. 96 duplicate determinations (including standard analyses). Each test kit contains:

| Component | Cap color | Format | Volume |
|---|-----------|---------------------|--------------------|
| Microtiter plate | - | Ready-to-use | 96 wells |
| Standard 1 | White | Ready-to-use | 0 µg/l 1.3 ml |
| Standard 2 | White | Ready-to-use | 3 µg/l 1.3 ml |
| Standard 3 | White | Ready-to-use | 9 µg/l 1.3 ml |
| Standard 4 | White | Ready-to-use | 27 µg/l 1.3 ml |
| Standard 5 | White | Ready-to-use | 81 µg/l 1.3 ml |
| Standard 6 | White | Ready-to-use | 162 µg/l 1.3 ml |
| Wash buffer salt Tween | - | Salt for dissolving | |
| Conjugate | Red | Ready-to-use | 6 ml |
| Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro | Brown | Ready-to-use | 10 ml |
| Stop solution | Yellow | Ready-to-use | 14 ml |

5. Reagents required but not provided

5.1 Equipment

| Equipment | milk | meat | honey | liver | kidney | fish | shrimp egg |
|---|------|------|-------|-------|--------|------|------------|
| microtiter plate spectrophotometer (450 nm) | • | • | • | • | • | • | • |
| graduated pipettes | | • | • | • | • | • | • |
| variable 5 - 10 µl micropipettes | | | • | | • | • | |
| variable 20 - 200 µl and 200 - 1000 µl micropipettes | • | • | • | • | • | • | • |
| mixer | | • | | • | • | • | • |
| shaker | | • | | • | • | • | • |
| centrifuge | | • | • | • | • | • | • |
| evaporator | | | • | | | | • |
| vortex | • | • | • | • | • | • | • |
| RIDA® C-18 column | | | • | | | | |

5.2 Reagents

| Reagent | milk | meat | honey | liver | kidney | fish | shrimp egg |
|-------------------|------|------|-------|-------|--------|------|------------|
| extraction buffer | | | • | | | | |
| methanol | | | • | | | | • |
| Carrez I | | | • | • | • | • | |
| Carrez II | | | • | • | • | • | |

Extraction buffer for honey: 50 mM sodium acetate buffer, pH 5

- Dissolve 4.1 g sodium acetate (CH_3COONa) in 900 ml distilled water, adjust pH to 5 with HCl and fill up to 1000 ml with distilled water

Carrez I:

- Carrez I: 1.52 g Potassium ferrocyanide(II) x 3 H_2O ; fill up to 10 ml with distilled water

Carrez II:

- Carrez II: 2.99 g Zinc sulfate x 7 H_2O ; fill up to 10 ml with distilled water

6. Warnings and precautions for the users

Only trained laboratory employees should carry out this test. 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 safety data sheets (SDS) for this product, available online at www.r-biopharm.com.

Ensure the proper and responsible disposal of all reagents and materials after their use. For disposal, please adhere to national regulations.

7. Storage instructions

Store the kit at 2 - 8 °C (35 - 46 °F). Do not freeze any test kit components.

Return any unused microwells to their original foil bag, reseal them together with the desiccant provided and further store at 2 - 8 °C (35 - 46 °F).

The red-colored substrate/chromogen is photosensitive, therefore avoid direct exposure to 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.

8. Indication of instability or deterioration of reagents

- Bluish coloration of the red-stained substrate/chromogen prior to test implementation
- A value of less than 0.6 absorbance units ($A_{450\text{ nm}} < 0.6$) for the zero standard

9. Sample preparation

The samples should be stored in a cool place, protected against light.

9.1 Milk

- Vortex a representative sample amount for homogenization
- Use 50 µl milk per well in the assay

9.2 Meat (beef, pork, poultry)

- Remove fat from a representative amount of meat and homogenize the meat with an Ultra-Turrax or a mixer
- Add 2 ml washing buffer (see 10.1.) to 1 g of homogenized sample
- Vortex for 10 seconds and then shake vigorously upside down for 5 minutes
- Centrifuge: 10 min / 4000 g / room temperature (20 - 25 °C)
- If there is an upper fat layer, remove it completely (e.g. with a pasteur pipette)
- Use 50 µl of the supernatant per well in the assay

9.3 Honey

- Dissolve 1 g of honey in 6 ml of extraction buffer (see 5.2)
- Centrifuge: 10 min / 3,000 g / room temperature (20 - 25 °C)

Purify all of the sample extract with RIDA® C-18 column (Art. No. R2002):

- Wash the column with 2 ml methanol
- Equilibrate the column with 2 ml of extraction buffer
- Apply all of the sample extract and wash with 8 ml extraction buffer
- Completely remove any fluid from the column by flushing the column with N₂ or air
- Elute sample slowly with 1 ml of 100 % methanol (approx. 15 drops per second)

- Evaporate the eluate to dryness under an nitrogen or air stream at 60 °C
- Reconstitute the dry residue in 1 ml washing buffer
- Add 10 µl of Carrez I, vortex
- Add 10 µl of Carrez II, vortex
- Centrifuge: 10 min / 4,000 g / room temperature
- Use 50 µl of the supernatant per well in the assay

9.4 Liver

- Remove fat from a representative amount of sample and homogenize the liver with an Ultra-Turrax or a mixer
- Add 2 ml washing buffer (see 10.1.) to 1 g of homogenized sample
- Vortex vigorously for 10 seconds and then shake upside down for 5 minutes
- Centrifuge: 10 min / 4,000 g / room temperature (20 - 25 °C)
- To 1 ml of the supernatant add 20 µl Carrez I, vortex
- Add 20 µl Carrez II, vortex
- Centrifuge: 10 min / 4,000 g / room temperature (20 - 25 °C)
- Use 50 µl of the supernatant per well in the assay

9.5 Kidney

- Remove fat from the sample and homogenize the kidney with an Ultra-Turrax or a mixer
- Add 2 ml washing buffer (see 10.1.) to 1 g of homogenized sample
- Vortex for 10 seconds and then shake vigorously upside down for 5 minutes
- Centrifuge: 10 min / 4,000 g / room temperature (20 - 25 °C)
- To 1 ml of the supernatant add 10 µl Carrez I, vortex
- Add 10 µl Carrez II, vortex
- Centrifuge: 10 min / 4,000 g / room temperature (20 - 25 °C)
- Use 50 µl of the supernatant per well in the assay

9.6 Fish

- Remove fat and skin from a representative amount of the sample and homogenize the fish with an Ultra-Turrax or a mixer
- Add 2 ml washing buffer (see 5.1.) to 1 g of homogenized sample
- Vortex for 10 seconds and then shake vigorously upside down for 5 minutes
- Centrifuge: 10 min / 4,000 g / room temperature (20 - 25 °C)
- To 1 ml of the supernatant add 5 µl Carrez I, vortex
- Add 5 µl Carrez II, vortex
- Centrifuge: 10 min / 4,000 g / room temperature (20 - 25 °C)
- Use 50 µl of the supernatant per well in the assay

9.7 Shrimp/ egg

- Homogenize the sample with an Ultra-Turrax or a mixer
- Add 2 ml methanol to 1 g of homogenized sample
- Vortex vigorously for 30 seconds
- Centrifuge: 10 min / 4,000 g / room temperature (20 - 25 °C)
- Transfer 1 ml of the supernatant into a new vial and evaporate to complete dryness under nitrogen or air stream at 60 °C
- Reconstitute the dried residue in 1 ml washing buffer (see 10.1.)
- Use 50 µl of the supernatant per well in the assay

10. Test implementation

10.1 Test preparation

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

As wash buffer PBS Tween buffer is needed; please use the enclosed buffer salt (see section 4. Reagents provided). To prepare the buffer, dissolve the entire contents of the pouch in 1 l distilled water. The dissolved wash buffer can be stored for approximately 4 to 6 weeks at 2 - 8 °C.

Alternative: Dissolve the contents of the pouch in 100 ml distilled water (10-fold concentrate). The solution can be stored for approximately 8 - 12 weeks at room temperature (20 - 25 °C). To prepare the ready-to-use solution, mix 1 part of the 10-fold concentrate with 9 parts of distilled water.

Return all reagents to 2 - 8 °C immediately after use.

10.2 Test procedure

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 for run in duplicate. Record standard and sample positions.
2. Pipette 50 µl each of the standard and the samples (see section 9. Preparation of Samples) as duplicates into the respective wells. Use new pipette tips for each standard or sample.
3. Pipette 50 µl each of conjugate into the respective wells, mix carefully by shaking the plate per hand, and incubate in the dark for 30 minutes at room temperature (20 - 25 °C).
4. Pour the liquid out of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times) against absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Wash each well using 250 µl diluted wash buffer (see 10.1 Test preparation). Repeat the washing step another two times.
5. Pipette 100 µl each of substrate/chromogen into the wells. Mix carefully by hand and incubate in the dark for 15 minutes at room temperature (20 - 25 °C).
6. Pipette 100 µl stop solution into each well and mix carefully by hand. Measure the absorbance at 450 nm within 30 minutes after adding the stop solution.

11. Results

A special software, the **RIDASOFT® Win.NET Food & Feed** (Art. No. Z9996FF) is optionally available for evaluation of the RIDASCREEN® enzyme immunoassays. The course of the standard curve is shown in the Quality Assurance Certificate (certificate of analysis) enclosed in the test kit.

Remark for the calculation without software:

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

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 semilogarithmic graph paper against the sulfamethazine concentration [µg/l].

Interpretation of results

In order to obtain the sulfamethazine concentration in µg/l (µg/kg) actually contained in a sample, the concentration read from the standard curve must be further multiplied by the corresponding dilution factor. When working according to the instructions, the dilution factors are as follows:

| | |
|--------------|---|
| Milk | 1 |
| Meat | 3 |
| Honey | 1 |
| Liver | 3 |
| Kidney | 3 |
| Fish | 3 |
| Shrimp | 3 |
| Egg | 3 |

Recommendation

In order to ensure a high analytical performance we recommend:

- To do spike experiments to ensure an accurate and correct test procedure

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 |
|----------------|--|
| 2017-02-10 | Release version |
| 2021-01-11 | Brief information, Product offer, 4. Reagents provided, 6. Warnings and precautions for the users, 7. Storage instructions |

Explanation of symbols

- General symbols:



Follow the instructions for use



Batch number



Expiry date (YYYY-MM)



Storage temperature



Article number



Number of test determinations



Manufacturing date (YYYY-MM)



Manufacturer + address

Disclaimer

The user assumes all risk in using R-Biopharm AG's products and services.

R-Biopharm AG will warrant that its products and services meet all quality control standards set by R-Biopharm AG, and R-Biopharm AG will, at its option, replace or repair any components, product or repeat services which prove to be defective in workmanship or material within product specific warranty periods or expiration dates and which our examination shall disclose to our satisfaction to be defective as such.

This warranty is expressly in lieu of all other warranties, expressed or implied, as to quality, description, fitness for any particular purpose, merchantability, productiveness, or any other matter. R-Biopharm AG shall be in no way responsible for the proper use of its products and hereby disclaims all other remedies, warranties, guarantees or liabilities, expressed or implied, arising by law or otherwise, and it shall have no liability for any lost profits or damage, direct, indirect or otherwise, to person or property, in connection with the use of any of its products or services.

This warranty shall not be extended, altered or varied except by a written instrument signed by an authorized representative of R-Biopharm AG.

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.dewww.r-biopharm.com

Vorsitzender des Aufsichtsrats /

Chairman of Supervisory Board:

Dr. Ralf M. Dreher

Vorstand / Board of Management:

Christian Dreher (Vorsitzender / Chairman),

Dr. Hans Frickel, Jochen Hirsch, Dr. Peter Schubert

Handelsregister / Commercial Register:

Amtsgericht Darmstadt HRB 8321