

RIDASCREEN[®] Sulfonamide

Art. No. R3004

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung
von Sulfonamiden

Enzyme immunoassay for the quantitative determination
of sulfonamides

In vitro Test

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

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Please contact for questions and further information:

Zentrale/Switchboard

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

Auftragsannahme/Order department

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

E-Mail: orders@r-biopharm.de

Marketing & Vertrieb/Marketing & sales

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

E-Mail : info@r-biopharm.de

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

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

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

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

Kurzinformation

RIDASCREEN[®] Sulfonamide (Art. Nr.: R3004) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Sulfonamiden in Ei, Fleisch (Huhn und Schwein), Fisch, Shrimps, Honig und Milch.

Alle Reagenzien für die Durchführung des Enzymimmunoassays - inkl. Standards - sind im Testkit enthalten.

Ein Testkit ist ausreichend für 96 Bestimmungen (einschl. Standardbestimmungen).

Zur Auswertung benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

Probenvorbereitung: Milch: nach 1:5 Verdünnung direkt im Test einsetzen
Fleisch (Schwein und Huhn), Ei, Fisch, Shrimps:
homogenisieren, extrahieren, zentrifugieren, evaporieren
und entfetten
Honig: extrahieren, Säulenreinigung mit RIDA[®] C18
column und verdünnen

Zeitbedarf: Probenvorbereitung (für 10 Proben)
Milch ca. 10 min
Fleisch (Schwein), Ei, Fisch, Shrimps ca. 1,5 h
Fleisch (Huhn) ca. 2,5 h
Honig..... ca. 2 h
Testdurchführung (Inkubationszeit)..... 1,15 h

Nachweisgrenze: Fleisch (Huhn), Ei 1,5 µg/kg (ppb)
(bezogen auf die Fleisch (Schwein), Fisch,
Standardsubstanz) Shrimps, Honig 2 µg/kg (ppb)
Milch 3,5 µg/l (ppb)

Wiederfindungsrate: Ei ca. 88 %
(bezogen auf die Fleisch (Huhn) ca. 70 %
Standardsubstanz) Fleisch (Schwein) ca. 115 %
Fisch ca. 120 %
Shrimps ca. 88 %
Honig ca. 89 %
Milch ca. 101 %

Die Spezifität des RIDASCREEN® Sulfonamide 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 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:	Sulfamethoxypyridazin.....	100 %
	Sulfapyridin.....	> 100 %
	Sulfamethoxydiazin.....	ca. 75 %
	Sulfamethoxazol.....	ca. 58 %
	Sulfadimethoxin.....	ca. 41 %
	Sulfaquinoxalin.....	ca. 34 %
	Sulfachloropyridazin.....	ca. 19 %
	Sulfamerazin.....	ca. 18 %
	Sulfadiazin.....	ca. 15 %
	Sulfamethizol.....	ca. 14 %
	Sulfadoxin.....	ca. 10 %
	Sulfachloropyrazin.....	ca. 9 %
	Sulfaguanidin.....	ca. 5 %
	Sulfaphenazol, Sulfamethazin, Sulfisoxazol, Sulfanilamid.....	ca. 2 %
	Sulfacetamid.....	ca. 1 %

Zur Erhöhung der Prüfungsqualität bei ELISA-Verfahren verweisen wir zusätzlich auf unser ELISA-Handbuch in der jeweiligen Fassung. 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

RIDASCREEN® Sulfamethazin.....	(R3001)
RIDA® Sulfamethazin Dotierlösung.....	(R3098)
RIDA® Sulfonamide Sulfamethoxypyridazin Dotierlösung.....	(R3099)

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN® Sulfonamide ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Sulfonamiden in Ei, Fleisch (Huhn und Schwein), Fisch, Shrimps, Honig und Milch.

2. Allgemeines

Sulfonamide werden in der Kälber- und Schweinemast häufig als Futtermittelzusatzstoffe eingesetzt. Zusammen mit Antifolaten (Dihydrofolat-Reduktase-Hemmer) wie z. B. Trimethoprim und Pyrimethamin werden sie in der Veterinärmedizin auch häufig zur Behandlung von Darminfektionen, Mastitiden, Lungenentzündungen und anderen systemischen Infektionen verwendet.

Die Kontamination von Lebensmitteln tierischen Ursprungs, wie Milch und Fleisch, mit Sulfonamiden ist deshalb möglich und wurde auch häufig (vor allem im Ausland) nachgewiesen. Laut EU-Recht gilt die Höchstmenge für alle Stoffe der Sulfonamidgruppe von 100 µg/kg in Muskel, Fett, Leber und Niere sowie von 100 µg/l in Milch.

3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit Fänger-Antikörpern gegen anti-Sulfonamid-Antikörper beschichtet. Zugegeben werden Standards bzw. Probelösung, enzymmarkiertes Sulfonamid (Konjugat) und anti-Sulfonamid-Antikörper. Freie Sulfonamide und enzymmarkiertes Sulfonamid konkurrieren um die Sulfonamid-Antikörperbindungsstellen (kompetitiver Enzymimmunoassay). Gleichzeitig werden auch die anti-Sulfonamid-Antikörper von den immobilisierten Fänger-Antikörpern gebunden. Nicht gebundenes, enzymmarkiertes Sulfonamid wird anschließend in einem Waschschrift wieder entfernt. Der Nachweis erfolgt durch die Zugabe der Substrat/Chromogen. Gebundenes Konjugat wandelt das Chromogen in ein blaues Endprodukt um. Die Zugabe des 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 Sulfonamid-Konzentration in der Probe.

4. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien einer Packung können 96 Bestimmungen durchgeführt werden (einschließlich Standardbestimmungen). Jedes 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	1 µg/l 1,3 ml
Standard 3 Standard 3	weiß	gebrauchsfertig	3 µg/l 1,3 ml
Standard 4 Standard 4	weiß	gebrauchsfertig	10 µg/l 1,3 ml
Standard 5 Standard 5	weiß	gebrauchsfertig	30 µg/l 1,3 ml
Standard 6 Standard 6	weiß	gebrauchsfertig	100 µg/l 1,3 ml
Wash buffer salt Tween Waschpuffer (Salz) Tween		Salz zum Auflösen	
Conjugate Konjugat	rot	gebrauchsfertig	6 ml
Antibody Antikörper	schwarz	gebrauchsfertig	6 ml
Sample buffer Probenpuffer	weiß	gebrauchsfertig	110 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:

- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Zentrifuge
- Schüttler (Vortex)
- Mixer (Stomacher, Ultraturrax)
- Rotationsverdampfer oder anderes Gerät zur Evaporation
- Pasteurpipetten
- Messpipetten
- variable 20 µl - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten

5.2. Reagenzien:

- Methanol p.a.
- Ethylacetat
- Acetonitril
- n-Hexan (oder n-Heptan)
- NaCl
- 50 mM Natriumazetatpuffer: 4,1 g Natriumazetat (CH_3COONa) in 900 ml dest. Wasser lösen, mit HCl auf pH 5 einstellen und mit dest. Wasser auf 1000 ml auffüllen

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 (MSDS) zu diesem Produkt auf unserer Internetseite www.r-biopharm.de.

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) kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.

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

8. Anzeichen für Reagenzienverfall

- bläuliche Färbung des rötlichen Substrat/Chromogen vor Zugabe in die Kavitäten
- Extinktion kleiner 0,6 ($E_{450 \text{ nm}} < 0,6$) für Standard 1

9. Probenvorbereitung

- Proben kühl und lichtgeschützt lagern
- Probe zerkleinern und mit einem Mixer oder Pürierstab homogenisieren

9.1. Milchproben

- Milchproben 1:5 (1+4) mit Probenpuffer (siehe 4.) verdünnen (z. B. 100 µl Milch + 400 µl Probenpuffer)
- pro Kavität 50 µl im Test einsetzen

9.2. Fleisch (Schwein), Ei, Fisch und Shrimps

- 1 g der homogenisierten Probe in ein verschraubbares Zentrifugenröhrchen einwiegen, 2 ml Methanol zugeben und 30 s vortexen
- zentrifugieren: 10 min / 4000 g / 20 - 25 °C
- 1,5 ml der methanolischen Lösung in ein neues Zentrifugenröhrchen überführen und bis zur Trockene evaporieren
- den Rückstand in 0,5 ml Probenpuffer lösen, danach zur Entfettung mit 1 ml n-Hexan (oder n-Heptan) versetzen und 10 Sekunden vortexen
- zentrifugieren: 10 min / 4000 g / 20 - 25 °C
- von der unteren Phase 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

9.3. Fleisch (Huhn)

- 2 g der homogenisierten Probe in ein verschraubbares Zentrifugenröhrchen einwiegen, 6 ml Acetonitril / Wasser (84:16, v:v) zugeben und 10 min schütteln (Über-Kopf-Schüttler)
- zentrifugieren: 10 min / 3000 g / 15 °C
- 4 ml des Überstandes in ein neues Zentrifugenröhrchen überführen, 2 ml 2 M NaCl, 7 ml Ethylacetat zugeben und 10 min schütteln (Über-Kopf-Schüttler)
- zentrifugieren: 10 min / 3000 g / 15 °C
- den gesamten Überstand in ein neues Zentrifugenröhrchen überführen und bis zur Trockene evaporieren
- den Rückstand in 1 ml Probenpuffer lösen, 1 min vortexen, 1 ml n-Hexan (oder n-Heptan) zugeben und nochmal 2 min vortexen
- zentrifugieren: 10 min / 3000 g / 15 °C
- von der unteren Phase 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

9.4. Honig

- 3 g Honig in ein verschraubbares Zentrifugenröhrchen einwiegen und zur Extraktion mit 6 ml 50 mM Natriumazetatpuffer, pH 5, (siehe 5.2.) mischen
- vortexen bis der Honig vollständig gelöst ist
- zentrifugieren: 10 min / 4000 g / 20 - 25 °C

Den gesamten Extrakt chromatographisch mittels RIDA[®] C18 column (Art. Nr. R2002) reinigen (Flussrate: 1 Tropfen / s):

- Säule mit 2 ml Methanol waschen
- Säule mit 2 ml 50 mM Natriumazetatpuffer (pH 5) äquilibrieren
- den gesamten Probenextrakt auftragen
- Säule mit 8 ml 50 mM Natriumazetatpuffer (pH 5) waschen
- Restflüssigkeit aus der Säule durch Druck entfernen und für 2 min Luft oder Stickstoff durchsaugen
- Probe langsam mit 1 ml Methanol / Probenpuffer (20:80; v:v) eluieren
- Eluat 1:3 (1+2) mit Probenpuffer verdünnen (z.B. 100 µl Eluat + 200 µl Probenpuffer)
- 50 µl 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, benutzen Sie dazu bitte das beiliegende Waschpuffer-Salz (siehe 4.). Zur Herstellung des Puffers den gesamten Inhalt des Beutels in 1 l destilliertem 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 (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.

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 in Doppelbestimmung benötigt werden. Die Positionen der Standards und der Proben protokollieren.
2. Je 50 µl der Standard bzw. der vorbereiteten Proben als Doppelbestimmung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren. Für jeden Standard bzw. jede Probe eine neue Pipettenspitze benutzen.
3. Je 50 µl Konjugat in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.
4. Je 50 µl Antikörper in die entsprechenden Kavitäten pipettieren, vorsichtig manuell mischen und 1 h bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubieren.
5. 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 Waschlösung (siehe 10.1.) waschen. Diesen Vorgang zweimal wiederholen.
6. Je 100 µl Substrat/Chromogen in die entsprechenden Kavitäten pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 15 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
7. 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 eine speziell für die RIDASCREEN® Enzymimmunoassays entwickelte Software, die RIDA®SOFT Win / RIDA®SOFT Win.net (Art. Nr. Z9996), erhältlich.

Der Verlauf der Standardkurve kann dem beigefügten Analysenzertifikat entnommen werden.

Hinweis für die Berechnung ohne Software:

$$\frac{\text{Extinktion Standard (bzw. Probe)}}{\text{Extinktion Nullstandard}} \times 100 = B/B_0 (\%)$$

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 Sulfonamid-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{kg}$] auftragen.

Um die in einer Probe enthaltene tatsächliche Sulfonamid-Konzentration in $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb) 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	5
Fleisch (Schwein), Ei, Fisch, Shrimps.....	1
Fleisch (Huhn)	1
Honig	1

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

Diese Angaben entsprechen dem heutigen Stand unserer Kenntnisse und sollen über unsere Produkte und deren Anwendungsmöglichkeiten informieren. Sie haben somit nicht die Bedeutung, bestimmte Eigenschaften der Produkte oder deren Eignung für einen konkreten Einsatzzweck zuzusichern. R-Biopharm übernimmt keine Gewährleistung, außer für die standardisierte Qualität der Reagenzien. Defekte Produkte werden ersetzt. Für darüber hinaus gehende direkte, indirekte Schäden oder sonstige Kosten im Zusammenhang mit der Nutzung der Produkte haftet R-Biopharm nicht.

RIDASCREEN[®] Sulfonamide

Brief information

RIDASCREEN[®] Sulfonamide (Art. No.: R3004) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of sulfonamides in egg, meat (chicken and pork), fish, shrimp, honey and milk.

All reagents required for the enzyme immunoassay - including standards - are contained in the test kit.

The test kit is sufficient for 96 determinations (including standards).

A microtiter plate spectrophotometer is required for quantification.

Sample preparation: milk: after 1:5 dilution direct use in the assay
meat (chicken and pork), egg, fish, shrimp:
homogenization, extraction, centrifugation, evaporation
and degreasing
honey: extraction, RIDA[®] C18 column purification and
dilution

Time requirement: sample preparation for 10 samples
milk approx. 10 min
meat (pork), egg, fish, shrimp approx. 1.5 h
meat (chicken) approx. 2.5 h
honey approx. 2 h
test implementation (incubation time)..... 1.15 h

Detection limit: meat (chicken), egg 1.5 µg/kg (ppb)
(corresponding to the meat (pork), fish, shrimp, honey 2 µg/kg (ppb)
standard substance) milk 3.5 µg/l (ppb)

Recovery rate: egg approx. 88 %
(corresponding to the meat (chicken) approx. 70 %
standard substance) meat (pork) approx. 115 %
fish approx. 120 %
shrimp approx. 88 %
honey approx. 89 %
milk approx. 101 %

The specificity of the RIDASCREEN® Sulfonamide test was determined by analyzing the cross-reactivities to corresponding substances in buffer system. In samples, the specificity may deviate from those 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 for the substance in the respective sample matrix. The test cannot discriminate between analytes and cross-reactive substances.

Specificity:	Sulfamethoxy pyridazine.....	approx. 100 %
	Sulfapyridine.....	> 100 %
	Sulfamethoxydiazine.....	approx. 75 %
	Sulfamethoxazole.....	approx. 58 %
	Sulfadimethoxine.....	approx. 41 %
	Sulfaquinoxaline.....	approx. 34 %
	Sulfachloropyridazine.....	approx. 19 %
	Sulfamerazine.....	approx. 18 %
	Sulfadiazine.....	approx. 15 %
	Sulfamethizole.....	approx. 14 %
	Sulfadoxine.....	approx. 10 %
	Sulfachloropyrazine.....	approx. 9 %
	Sulfaguanidine.....	approx. 5 %
	Sulfaphenazole, Sulfamethazine, Sulfisoxazole, Sulfanilamide.....	approx. 2 %
	Sulfacetamide.....	approx. 1 %

In order to increase the quality of assessment when performing ELISA-procedures, we refer additionally to our Good ELISA Practice (GEP) – Manual in the respective version. Such lists minimum standards concerning the framework conditions when using test-kits of R-Biopharm AG and performing ELISA-analysis. The manual can be retrieved, printed and downloaded under the website www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis.

Related products

RIDASCREEN® Sulfamethazin.....	(R3001)
RIDA® Sulfamethazin Spiking Solution.....	(R3098)
RIDA® Sulfonamide Sulfamethoxy pyridazin Spiking Solution.....	(R3099)

1. Intended use

RIDASCREEN® Sulfonamide is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of sulfonamides in egg, meat (chicken and pork), fish, shrimp, honey and milk.

2. General

Sulfonamides are widely used as feed additives, mainly for fattening of calves and pigs. Combined with inhibitors of dihydrofolate reductase such as trimethoprim or pyrimethamine sulfonamides are also used in veterinary medicine for the treatment of intestinal infections, mastitis, pulmonitis and other (systemic) diseases. Therefore sulfonamide residues may occur in food of animal origin such as meat and milk and were found frequently abroad. According to the EU-Law a maximum residue limit for all substances of the sulfonamide-group of 100 µg/kg in muscle, fat, liver and kidney and of 100 µg/l in milk is valid.

3. Test principle

The basis of the test is the antigen-antibody reaction. The microtiter wells are coated with capture antibodies directed against anti-sulfonamide antibodies. Standards or sample, sulfonamide conjugate and anti-sulfonamide antibodies are added. Free sulfonamides and sulfonamide conjugate compete for the sulfonamide antibody binding sites (competitive enzyme immunoassay). At the same time, the anti-sulfonamide antibodies are also bound by the immobilised capture antibodies. Any unbound conjugate is then removed in a washing step. Substrate/chromogen is added to the wells and incubated. Bound 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 sulfonamide concentration in the sample.

4. Reagents provided

Each kit contains sufficient materials for 96 measurements (including standard analyses).

Component	Cap Colour	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	1 µg/l 1.3 ml
Standard 3	White	Ready to use	3 µg/l 1.3 ml
Standard 4	White	Ready to use	10 µg/l 1.3 ml
Standard 5	White	Ready to use	30 µg/l 1.3 ml
Standard 6	White	Ready to use	100 µg/l 1.3 ml
Wash buffer salt Tween		Salt for dissolving	
Conjugate	Red	Ready to use	6 ml
Antibody	Black	Ready to use	6 ml
Sample buffer	White	Ready to use	110 ml
Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro	Brown	Ready to use	10 ml
Stop solution	Yellow	Ready to use	14 ml

5. Materials required but not provided

5.1. Equipment:

- microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- centrifuge
- shaker (Vortex)
- mixer (Stomacher, Ultraturrax)
- rotary evaporator or other equipment for evaporation
- pasteur pipettes
- graduated pipettes
- variable 20 µl - 200 µl and 200 - 1000 µl micropipettes

5.2. Reagents:

- methanol p.a.
- ethyl acetate
- acetonitrile
- n-hexane (or n-heptane)
- NaCl
- 50 mM Sodium acetate buffer: dissolve 4.1 g sodium acetate (CH₃COONa) in 900 ml distilled water, adjust pH 5 with HCl and fill up to 1000 ml with dist. water

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 (MSDS) for this product, available online at www.r-biopharm.com.

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 reddish substrate/chromogen is light sensitive, therefore, avoid exposure to direct light.

No quality guarantee is accepted after the expiration date on the kit label.

Do not interchange individual reagents between kits of different lot numbers.

8. Indication of instability or deterioration of reagents

- any bluish coloration of the reddish substrate/chromogen prior to test implementation
- a value of less than 0.6 absorbance units ($A_{450\text{ nm}} < 0.6$) for the standard 1

9. Preparation of Samples

- store the sample in a cool place, protected against light
- homogenize the sample, use stomacher or mixer

9.1. Milk samples

- dilute milk samples 1:5 (1+4) with sample buffer (see 4.);
e. g. 100 µl milk + 400 µl sample buffer)
- use 50 µl per well in the test

9.2. Meat (pork), egg, fish and shrimp

- weigh 1 g of the homogenized sample into a centrifugal screw cap vial, add 2 ml methanol and vortex for 30 s
- centrifuge: 10 min / 4000 g / 20 - 25 °C (68 - 77 °F)
- transfer 1.5 ml of the methanolic solution into a new centrifugal vial and evaporate to dryness
- dissolve the residue in 0.5 ml sample buffer, add 1 ml of n-hexane (or n-heptane) for degreasing and vortex for 10 s
- centrifuge: 10 min / 4000 g / 20 - 25 °C (68 - 77 °F)
- use 50 µl of the lower phase per well in the test

9.3. Meat (chicken)

- weigh 2 g of the homogenized sample into a centrifugal screw cap vial, add 6 ml acetonitrile / water (84:16; v:v) and shake for 10 min (with up-side-down shaker)
- centrifuge: 10 min / 3000 g / 15 °C (59 °F)
- transfer 4 ml of the supernatant into a new centrifugal vial, add 2 ml 2 M NaCl, 7 ml ethylacetate and shake for 10 min (with up-side-down shaker)
- centrifuge: 10 min / 3000 g / 15 °C (59 °F)
- transfer the whole supernatant into a new centrifugal vial and evaporate to dryness
- dissolve the residue in 1 ml sample buffer, vortex for 1 min, add 1 ml n-hexane (or n-heptane) and vortex again for 2 min
- centrifuge: 10 min / 3000 g / 15 °C (59 °F)
- use 50 µl of the lower phase per well in the test

9.4. Honey

- weigh 3 g of honey into a centrifugal screw cap vial and mix for extraction with 6 ml of 50 mM sodium acetate buffer, pH 5, (see 5.2.)
- vortex until complete dissolving of honey
- centrifuge: 10 min / 4000 g / 20 - 25 °C (68 - 77 °F)

Purify the whole extract with RIDA[®] C18 column (Art. No. R2002);
flow rate: 1 drop/s:

- rinse the column with 2 ml methanol
- equilibrate the column with 2 ml 50 mM sodium acetate buffer (pH 5)
- apply the whole sample extract
- rinse the column with 8 ml 50 mM sodium acetate buffer (pH 5)
- remove any excess fluid by pressure and flushing the cartridge with a stream of either air or nitrogen for 2 min
- elute sample with 1 ml methanol / sample buffer (20:80; v:v) slowly
- dilute the eluate 1:3 (1+2) with sample buffer (e.g. 100 µl eluate + 200 µl sample buffer)
- use 50 µl 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.

A PBS-Tween buffer is needed as **wash buffer**, please use the wash buffer salt (pouch) contained in the kit (see 4.). 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 contents of the pouch in 100 ml of distilled water to obtain a 10fold concentrated washing 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 wash buffer.

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 to be run in duplicate. Record standard and sample positions.
2. Add 50 µl of each standard or prepared sample to separate duplicate wells. Use a new pipette tip for each standard or sample.
3. Add 50 µl of conjugate to the bottom of each well.
4. Add 50 µl of antibody to each well, mix gently by shaking the plate manually and incubate for 1 h at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
5. 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. Fill all the wells with 250 µl wash buffer (see 10.1) and pour out the liquid again. Repeat two more times.
6. Add 100 µl of substrate/chromogen to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 15 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark.
7. Add 100 µl of the stop solution to each well. Mix gently by shaking the plate manually and measure the absorbance at 450 nm. Read within 30 minutes after addition of stop solution.

11. Results

A special software, the RIDA[®]SOFT Win / RIDA[®]SOFT Win.net (Art. No. Z9996), is available to evaluate the RIDASCREEN[®] enzyme immunoassays.

The course of the standard curve is shown in the Quality Assurance Certificate enclosed in the test kit.

Remark for the calculation without software:

$$\frac{\text{absorbance standard (or sample)}}{\text{absorbance zero standard}} \times 100 = B/B_0 (\%)$$

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 sulfonamide concentration [µg/kg].

In order to obtain the sulfonamide concentration in µg/kg (ppb) actually contained in a sample, the concentration read from the standard curve must be further multiplied by the corresponding dilution factor. When working in accordance with the regulation stated, the dilution factor is as follows:

Milk	5
Meat (pork), egg, fish, shrimp.	1
Meat (chicken)	1
Honey	1

For further information or applications please contact your local distributor or R-Biopharm AG.

The data corresponds to our present state of technology and provides information on our products and their uses. R-Biopharm makes no warranty of any kind, either expressed or implied, except that the materials from which its products are made are of standard quality. Defective products will be replaced. There is no warranty of merchantability of this product, or of the fitness of the product for any purpose. R-Biopharm shall not be liable for any damages, including special or consequential damage, or expense arising directly or indirectly from the use of this product.

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:

Dietrich Mollat

Vorstand / Board of Management:

Dr. Ralf M. Dreher (Vorsitzender / Chairman),

Dr. Carsten Bruns, Jochen Hirsch, Dr. Peter Schubert

Handelsregister / Commercial Register:

Amtsgericht Darmstadt HRB 8321