

# **RIDASCREEN<sup>®</sup> Ractopamin**

**Art. No. R9901**

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung  
von Ractopamin

Enzyme immunoassay for the quantitative determination  
of ractopamine

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](mailto:orders@r-biopharm.de)

Marketing & Vertrieb/Marketing & sales

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

E-Mail : [info@r-biopharm.de](mailto:info@r-biopharm.de)

RIDA<sup>®</sup> und RIDASCREEN<sup>®</sup>  
sind eingetragene Marken der R-Biopharm AG  
Hersteller: R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

RIDA<sup>®</sup> and RIDASCREEN<sup>®</sup>  
are registered trademarks of R-Biopharm AG  
Manufacturer: R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

## Kurzinformation

RIDASCREEN® Ractopamin (Art. Nr.: R9901) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Ractopamin in Urin, Fleisch und Leber und zur qualitativen Bestimmung von Ractopamin-Glucuronid in Urin.

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:	Urin (direkt): ohne Probenvorbereitung Urin (mit Hydrolyse): hydrolysieren, extrahieren, zentrifugieren und evaporieren Fleisch, Leber: homogenisieren, extrahieren, zentrifugieren, evaporieren und zentrifugieren
Zeitbedarf:	Probenvorbereitung (für 10 Proben) Urin (für evtl. Zentrifugation / Filtration) ..... ca. 10 min Urin (mit Hydrolyse) ..... ca. 3 h Fleisch, Leber ..... ca. 1,5 h Testdurchführung (Inkubationszeit)..... 1 h 30 min
Nachweisgrenze: (bezogen auf die Standardsubstanz)	Urin (mit Hydrolyse) ..... ca. 700 ng/l (ppt) Fleisch (Rind, Schwein) ..... ca. 200 ng/kg (ppt) Leber ..... ca. 300 ng/kg (ppt)
Wiederfindungsrate: (bezogen auf die Standardsubstanz)	Urin (mit Hydrolyse) ..... ca. 90 % Fleisch (Rind, Schwein) ..... ca. 75 - 90 % Leber ..... ca. 73 %

Die Spezifität des RIDASCREEN® Ractopamin-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:	Ractopamin (Standardsubstanz).....	100 %
	Der anti-Ractopamin-Antikörper bindet auch glucuronidiertes Ractopamin. Die Spezifität des Antikörpers zu Ractopamin-Glucuronid A, B, C in Schweineurin beträgt ca. 10 - 20 %.	
	Dobutamine .....	ca. 5 %
	Mabuterol.....	ca. 5 %
	Ritodrine .....	ca. 1 %
	Clenpropanol, Cimaterol, Cimbuterol, Clenpenterol, Mapenterol, Terbutaline, Bromchlorbuterol, Salbutamol, Clenbuterol, Brombuterol, Carbuterol.....	< 0,1 %

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](http://www.r-biopharm.com/de/produkte/lebensmittel-futtermittelanalytik) abgerufen, gedruckt und gespeichert werden.

## Produktangebot

RIDA® Ractopamin Dotierlösung .....	(R9999)
RIDASCREEN® Clenbuterol.....	(R1705)
RIDASCREEN® Clenbuterol Fast.....	(R1701)
RIDA® Clenbuterol Dotierlösung....	(R1798)
Clenbuterol Testkontrolle (negativ).....	(R1708)
Clenbuterol Testkontrolle (positiv) .....	(R1707)
RIDASCREEN® β-Agonists.....	(R1704)
RIDA® β-Agonists Clenbuterol Dotierlösung.....	(R1799)

## 1. Verwendungszweck

RIDASCREEN® Ractopamin ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Ractopamin in Urin, Fleisch und Leber und zur qualitativen Bestimmung von Ractopamin-Glucuronid in Urin.

## 2. Allgemeines

Ractopamin gehört zu der Gruppe der  $\beta$ -Agonisten. Es ist bekannt, dass  $\beta$ -Agonisten sich als Leistungssteigerer im Rahmen der Tierproduktion eignen. Insbesondere verringert Ractopamin den Fettanteil, erhöht den durchschnittlichen täglichen Gewichtszuwachs und verbessert die Futtermittelverwertung sowie die Effizienz der Futtermittelumwandlung (feed conversion ratio = FCR) bei Masttieren. Jedoch sind  $\beta$ -Agonisten als Masthilfsmittel von der Europäischen Union (EU) nicht zugelassen.

Ractopamin besitzt neben seiner lipolytischen und anabolen Wirkung eine relaxierende Wirkung auf die glatte Muskulatur, worauf die therapeutische Anwendung als Antiasthmatikum beruht. Es ist nicht auszuschließen, dass Ractopamin-Rückstände nach illegaler Praxis zu einer Verbrauchergefährdung führen können. In vielen Ländern ist der Einsatz von Ractopamin daher verboten.

## 3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit Fänger-Antikörpern gegen anti-Ractopamin-Antikörper beschichtet. Zugegeben werden anti-Ractopamin-Antikörper, die von den immobilisierten Fänger-Antikörpern gebunden werden. Nach einem Inkubations- und Waschschrift werden Standards bzw. Probe und enzymmarkiertes Ractopamin (Konjugat) hinzugegeben. Freies und enzymmarkiertes Ractopamin konkurrieren um die Ractopamin-Antikörperbindungsstellen (kompetitiver Enzymimmunoassay). Nicht gebundenes, enzymmarkiertes Ractopamin wird anschließend in einem Waschschrift wieder entfernt. Der Nachweis erfolgt durch Zugabe von Substrat/Chromogen. Gebundenes Konjugat wandelt das Chromogen in ein blaues Endprodukt um. Die Zugabe der Stopp Lösung führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Messung erfolgt photometrisch bei 450 nm. Die Extinktion der Lösung ist umgekehrt proportional zu der Ractopamin-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
<b>Microtiter plate</b> Mikrotiterplatte	-	gebrauchsfertig	96 Kavitäten
<b>Sample buffer</b> Proben Puffer	weiß	gebrauchsfertig	110 ml
<b>Standard 1</b> Standard 1	weiß	gebrauchsfertig	0 ng/l 1,3 ml
<b>Standard 2</b> Standard 2	weiß	gebrauchsfertig	100 ng/l 1,3 ml
<b>Standard 3</b> Standard 3	weiß	gebrauchsfertig	300 ng/l 1,3 ml
<b>Standard 4</b> Standard 4	weiß	gebrauchsfertig	900 ng/l 1,3 ml
<b>Standard 5</b> Standard 5	weiß	gebrauchsfertig	2700 ng/l 1,3 ml
<b>Standard 6</b> Standard 6	weiß	gebrauchsfertig	8100 ng/l 1,3 ml
<b>Wash buffer salt</b> <b>Tween</b> Waschpuffer (Salz) Tween	-	Salz zum Auflösen	
<b>Conjugate</b> Konjugat	rot	gebrauchsfertig	12 ml
<b>Antibody</b> Antikörper	schwarz	gebrauchsfertig	12 ml
<b>Substrate/Chromogen</b> Substrat/Chromogen Red Chromogen Pro	braun	gebrauchsfertig	10 ml
<b>Stop solution</b> Stopp Lösung	gelb	gebrauchsfertig	14 ml

## 5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

### 5.1. Geräte:

- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Mixer
- Schüttler
- Rotationsverdampfer (Evaporator)
- Zentrifuge und Zentrifugenröhrchen (50 ml)
- Messpipetten
- variable 20 µl - 200 µl und 200 - 1000 µl-Mikropipetten

## 5.2. Reagenzien:

- Acetonitril
- Ethylacetat
- n-Hexan (oder n-Heptan)
- $\beta$ -Glucuronidase von *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich Art. Nr.: G7646)  
aus dem Lyophilisat eine Stammlösung von 1 mg/ml in deionisiertem Wasser, entsprechend den Herstellerangaben von Sigma-Aldrich, herstellen; 10  $\mu$ l der Lösung (ca. 53 units) für die Hydrolyse der  $\beta$ -Glucuronide im Urin einsetzen
- 75 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,8:  
Puffer A: 10,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ad 1000 ml dest. Wasser und  
Puffer B: 13,06 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ad 1000 ml dest. Wasser  
durch die Mischung von Puffer A und Puffer B (im Verhältnis 1:1) den pH-Wert auf 6,8 einstellen
- 25 mM Boratpuffer, pH 9,0:  
9,5 g di-Natriumtetraborat Decahydrat ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$ ) ad 1000 ml dest. Wasser
- 1 N NaOH

## 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](http://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

### 9.1. Urin

Nach der oralen Applikation von Ractopamin an Nutztiere, findet in der Leber eine Metabolisierung in Form einer Konjugation mit Glucuronsäure statt. Die dabei entstehenden Ractopamin-Glucuronide A, B und C werden anschließend über die Niere mit dem Urin wieder ausgeschieden. Im Urin ist fast ausschließlich glucuronidiertes Ractopamin enthalten [1].

Um die Applikation von Ractopamin bei Nutztieren mit Hilfe des Urins zu überprüfen, kann der Urin durch direkten Einsatz im Test **qualitativ** auf Ractopamin-Glucuronid untersucht werden.

Zur **quantitativen** Analyse von Ractopamin in Urin muss dieser vor der Analyse hydrolysiert werden. Dabei werden die Ractopamin-Glucuronide durch das Enzym Glucuronidase dekonjugiert und Ractopamin kann als freies Molekül analysiert werden.

#### 9.1.1. Urin, direkter Einsatz zum qualitativen Screening von Ractopamin-Glucuronid

Falsch oder zu lange bei 4 °C gelagerte, stark gefärbte oder konzentrierte Urine von dehydrierten Tieren können bei direktem Einsatz hohe Hintergrundsignale erzeugen und somit zu falsch-positiven Ergebnissen führen. In solch einem Fall wird eine Analyse von Ractopamin nach Hydrolyse (siehe 9.1.2.) empfohlen.

Falls der Urin trüb sein sollte oder einen Niederschlag enthält, muss vor der Analyse eine Zentrifugation oder Filtration erfolgen.

- 20 µl Urin direkt im Test einsetzen

[1] Weilin L. Shelver, and David J. Smith: *Application of a Monoclonal Antibody-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Determination of Ractopamine in Incurred Samples from Food Animal*; J. Agric. Food Chem., 2002, 50 (10), 2742-2747



### 9.1.2. Urin, nach Hydrolyse zum quantitativen Screening von Ractopamin

- 0,5 ml Urin in ein verschraubbares Zentrifugenröhrchen überführen und mit 3 ml 75 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,8 (siehe 5.2.) verdünnen
- 10 µl β-Glucuronidase von *Escherichia coli* (siehe 5.2.) hinzu pipettieren
- 2 h bei 37 °C hydrolysieren (alternativ bei Raumtemperatur über Nacht)
- 2 ml 25 mM Boratpuffer, pH 9,0 (siehe 5.2.) hinzugeben
- pH-Wert der Probe kontrollieren und gegebenenfalls den pH-Wert mit 1 N NaOH zwischen 8 - 9 einstellen
- Probe zweimal mit je 3 ml Ethylacetat ausschütteln, d.h. ca. 30 s vortexen
- zentrifugieren: 10 min / 4000 g / 20 - 25 °C
- Überstände (ca. 6 ml) in ein neues Zentrifugenröhrchen überführen und bis zur Trockene bei 60 °C evaporieren
- den trockenen Rückstand in 0,5 ml Probenpuffer (siehe 4.) aufnehmen
- 20 µl pro Kavität im Test einsetzen

### 9.2. Fleisch (Rind, Schwein) und Leber

- Fett entfernen und die Probe mit einem Mixer oder Pürierstab zu einer feinen Masse homogenisieren
- 3 g der homogenisierten Probe in ein verschraubbares Zentrifugenröhrchen überführen, 8 ml Acetonitril und 1 ml Ethylacetat zugeben und gut mischen (vortexen)
- 30 min schütteln (Über-Kopf-Schüttler)
- zentrifugieren: 10 min / 4000 g / 20 - 25 °C
- 4 ml des Überstandes (entspricht 1 g Probe) in ein neues Zentrifugenröhrchen überführen und bis zur Trockene bei 60 °C evaporieren
- den Rückstand in 2 ml n-Hexan (oder n-Heptan) aufnehmen, 1 ml Probenpuffer zugeben und 30 sec vortexen
- 10 min bei 50 °C im Wasserbad zur besseren Phasentrennung inkubieren
- zentrifugieren: 10 min / 4000 g / 20 - 25 °C
- die untere Phase vorsichtig in ein neues Gefäß überführen
- 20 µl der unteren Phase 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 Pufferbriefchen (siehe 4.). Zur Herstellung des Puffers den gesamten Inhalt des Beutels in 1 l destilliertem Wasser lösen. Der gelöste Waschpuffer ist bei 4 °C ca. 4 - 6 Wochen 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 100 µl Antikörper in die entsprechenden Kavitäten pipettieren, vorsichtig manuell mischen und 15 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubieren.
3. 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 Waschpuffer (siehe 10.1.) waschen. Diesen Vorgang zweimal wiederholen.
4. Je 20 µl der Standards bzw. der vorbereiteten Proben als Doppelbestimmung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.
5. Je 100 µl Konjugat in die entsprechenden Kavitäten pipettieren, vorsichtig manuell mischen und 60 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubieren.
6. 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 Waschpuffer (siehe 10.1.) waschen. Diesen Vorgang zweimal wiederholen.
7. 100 µl Substrat/Chromogen in die Kavitäten pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 15 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
8. 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 Ractopamin-Konzentration [ng/kg] auftragen.

Um die in den Proben enthaltene tatsächliche Ractopamin-Konzentration in ng/kg oder ng/l (ppt) 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:

Urin (direkt und mit Hydrolyse) .....	1
Fleisch.....	1
Leber.....	1

### Qualitative Auswertung von Ractopamin-Glucuronid im Urin

Liefert die Auswertung einer direkt eingesetzten Urinprobe eine Konzentration kleiner 600 ng/l, bedeutet dies, dass kein Ractopamin-Glucuronid in der Probe enthalten ist oder dass die Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze liegt.

Liefert die Auswertung einer direkt eingesetzten Urinprobe eine Konzentration größer 600 ng/l, bedeutet dies, dass aufgrund der Kreuzreaktivität des Antikörpers von 10 - 20 % für Ractopamin-Glucuronid die Konzentration des Ractopamin-Glucuronids in der Probe ca. zwischen 3.000 ng/l (600 ng/l x (100 % / 20 %)) und 6.000 ng/l (600 ng/l x (100 % / 10 %)) beträgt. Zur Quantifizierung von Ractopamin in der Urinprobe ist eine Hydrolyse des Urins vor der Analyse notwendig.

Weiterführende Informationen sind im Validierungsreport enthalten.

**Für weitere Produktinformationen und Applikationen kontaktieren Sie bitte [info@r-biopharm.de](mailto: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<sup>®</sup> Ractopamin

## Brief information

RIDASCREEN<sup>®</sup> Ractopamin (Art. No.: R9901) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of ractopamine in urine, meat and liver and for the qualitative analysis of ractopamin glucuronide in urine.

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:      urine (direct): without sample preparation  
                                  urine (with hydrolysis): hydrolisation, extraction,  
                                  centrifugation and evaporation  
                                  meat, liver: homogenization, extraction, centrifugation,  
                                  evaporation and centrifugation

Time requirement:        sample preparation (for 10 samples)  
                                  urine (for centrifugation or filtration) ..... approx. 10 min  
                                  urine (with hydrolysis) ..... approx. 3 h  
                                  meat, liver ..... approx. 1.5 h  
                                  test implementation (incubation time)..... 1h 30 min

Detection limit:         urine (with hydrolysis) ..... approx. 700 ng/l (ppt)  
(corresponding to the   meat (beef, pork) ..... approx. 200 ng/kg (ppt)  
standard substance)   liver ..... approx. 300 ng/kg (ppt)

Recovery rate:          urine (with hydrolysis) ..... approx. 90 %  
(corresponding to the   meat (beef, pork) ..... approx. 75 - 90 %  
standard substance)   liver ..... approx. 73 %

The specificity of the RIDASCREEN® Ractopamin-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: Ractopamine (standard substance) .....100 %

The anti-ractopamine antibody binds also glucuronidated ractopamine. The specificity of the antibody for ractopamine glucuronide A, B and C in swine urine is approx. 10 - 20 %.

Dobutamine .....approx. 4.7 %

Mabuterol.....approx. 4.4 %

Ritodrine .....approx. 1.4 %

Clenpropanol, Cimaterol, Cimbuterol,

Clenpenterol, Mapenterol, Terbutaline,

Bromchlorbuterol, Salbutamol, Clenbuterol,

Brombuterol, Carbuterol..... < 0.1 %

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](http://www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis).

## Related products

RIDA® Ractopamin Spiking Solution .....(R9999)

RIDASCREEN® Clenbuterol.....(R1705)

RIDASCREEN® Clenbuterol Fast.....(R1701)

RIDA® Clenbuterol Spiking Solution.....(R1798)

Clenbuterol Testkontrolle (negativ).....(R1708)

Clenbuterol Testkontrolle (positiv) .....(R1707)

RIDASCREEN® β-Agonists.....(R1704)

RIDA® β-Agonists Clenbuterol Spiking Solution.....(R1799)

## 1. Intended use

RIDASCREEN® Ractopamin is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of ractopamine in urine, meat and liver and for the qualitative analysis of ractopamin glucuronide in urine.

## 2. General

Ractopamine belongs to the group of  $\beta$ -agonists. It is known that  $\beta$ -agonists are suitable for use as performance improvers within the field of livestock production. In particular, ractopamine reduces fat, increases average daily weight gain, and improves feed conversion ratio (FCR) in fattened animals. However,  $\beta$ -agonists have not been authorized as growth promoters in livestock in the European Union (EU).

In addition to its lipolytic and anabolic effect, ractopamine has also a relaxing effect on non-striated musculature, on which its therapeutic use as antiasthmatic agent is based. It is possible that ractopamine residues, after use in illegal practice, may lead to a risk for consumers. Consequently, the use of ractopamine has been banned in most countries.

## 3. Test principle

The basis of the test is the antigen-antibody reaction. The microtiter wells are coated with capture antibodies directed against anti-ractopamine antibodies. Anti-ractopamine antibodies are added which are bound by the immobilized capture antibodies. After an incubation and washing step standards or sample and ractopamine conjugate are added. Free and conjugated ractopamine compete for the antibody binding sites (competitive enzyme immunoassay). 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 ractopamine 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
Sample buffer	White	Ready to use	110 ml
Standard 1	White	Ready to use	0 ng/l 1.3 ml
Standard 2	White	Ready to use	100 ng/l 1.3 ml
Standard 3	White	Ready to use	300 ng/l 1.3 ml
Standard 4	White	Ready to use	900 ng/l 1.3 ml
Standard 5	White	Ready to use	2700 ng/l 1.3 ml
Standard 6	White	Ready to use	8100 ng/l 1.3 ml
Wash buffer salt Tween	-	Salt for dissolving	
Conjugate	Red	Ready to use	12 ml
Antibody	Black	Ready to use	12 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)
- mixer
- shaker
- rotary evaporator
- centrifuge and centrifugal vials (50 ml)
- graduated pipettes
- variable 20 µl – 200 µl and 200 - 1000 µl micropipettes



## 5.2. Reagents:

- acetonitrile
- ethyl acetate
- n-hexane (or n-heptane)
- $\beta$ -Glucuronidase from *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich Art. No.: G7646):  
reconstitute the lyophilized powder to 1 mg/ml in deionized water according to the product information of Sigma Aldrich, use 10  $\mu$ l of the stock solution (approx. 53 units) for the hydrolysis of  $\beta$ -glucuronides in urine
- 75 mM Potassium phosphate buffer, pH 6.8:  
buffer A: 10.2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  fill up to 1000 ml distilled water and  
buffer B: 13.06 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  fill up to 1000 ml distilled water  
adjust pH to 6.8 by mixture of buffer A and B (ratio 1:1)
- 25 mM borate buffer, pH 9.0:  
9.5 g sodium tetraborate decahydrate ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{H}_2\text{O}$ ) fill up to 1000 ml  
dist. water
- 1 N NaOH

## 6. Warnings and precautions for the users

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

This kit may contain hazardous substances. For hazard notes on the contained substances please refer to the appropriate material safety data sheets (MSDS) for this product, available online at [www.r-biopharm.com](http://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 red stained substrate/chromogen prior to test implementation
- a value of less than 0.6 absorbance units ( $A_{450\text{ nm}} < 0.6$ ) for standard 1

## 9. Preparation of Samples

- store the samples in a cool place, protected against light

### 9.1. Urine

After oral administration of ractopamine to farm animals, a conjugation with glucuronic acid takes place in the liver. The resulting ractopamine glucuronides A, B and C are then excreted through the kidneys by urine. In urine, almost exclusively glucuronidated ractopamine is contained [1].

To verify the application of ractopamine in farm animals, the urine can be **qualitatively** analyzed for the presence of ractopamine glucuronide by direct use in the test.

For the **quantitative** analysis of ractopamine in urine, it must be hydrolyzed prior to analysis. The ractopamine glucuronides are deconjugated by the enzyme glucuronidase and ractopamine can be analyzed as an unbound molecule.

#### 9.1.1. Urine, direct use for the qualitative screening of ractopamine glucuronide

High background signals can be expected, when urine was stored improperly or stored for a long period at 4 °C (39.2 °F). Also dark colored or concentrated urine samples (as a consequence of dehydration of the animal) may lead to high background values. These background values can result in false-positive results. In such a case, an analysis of ractopamine after hydrolysis is recommended (see 9.1.2).

If the urine is turbid or contains a precipitate, a centrifugation or filtration step is mandatory.

- use 20 µl urine directly in the test

[1] Weilin L. Shelver, and David J. Smith: *Application of a Monoclonal Antibody-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Determination of Ractopamine in Incurred Samples from Food Animals*; J. Agric. Food Chem., 2002, 50 (10), 2742-2747

### 9.1.2. Urine, after hydrolysis for the quantitative screening of ractopamine

- transfer 0.5 ml urine into a centrifugal screw cap vial and add 3 ml of 75 mM potassium phosphate buffer, pH 6.8 (see 5.2.)
- add 10 µl of β-glucuronidase from *Escherichia coli* (see 5.2.)
- for hydrolysis incubate the solution for 2 h at 37 °C / 98 °F (alternatively over night at room temperature)
- add 2 ml of 25 mM borate buffer, pH 9.0 (see 5.2.)
- check the pH value of the sample and adjust pH to 8 - 9 using 1 N NaOH
- extract the sample 2 times with 3 ml of ethyl acetate by mixing (vortex) for 30 s
- centrifuge: 10 min / 4000 g / 20 - 25 °C (68 - 77 °F)
- transfer the supernatants (approx. 6 ml) into a new centrifugal vial and evaporate to dryness at 60 °C
- dissolve the dried residue in 0.5 ml sample buffer (see 4.)
- use 20 µl per well in the assay

### 9.2. Meat (beef, pork) and liver

- remove fat and homogenize sample to a fine mass, use stomacher or mixer
- transfer 3 g of the homogenized sample into a centrifugal screw cap vial, add 8 ml of acetonitrile, 1 ml ethyl acetate and mix well (vortex)
- shake for 30 min (with up-side-down shaker)
- centrifuge: 10 min / 4000 g / 20 - 25 °C (68 - 77 °F)
- transfer 4 ml of supernatant (corresponding to 1 g of sample) into a new centrifugal vial and evaporate to dryness at 60 °C
- dissolve the residue in 2 ml n-hexane (or n-heptane), add 1 ml of sample buffer and vortex for 30 s
- incubate 10 min at 50 °C (122 °F) in the waterbath for improved phase separation
- centrifuge: 10 min / 4000 g / 20 - 25 °C (68 - 77 °F)
- transfer the lower phase carefully into a new vial
- use 20 µl of the lower phase per well in the test

## 10. Test implementation

### 10.1. Preliminary comments

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.). The content is dissolved in one liter of distilled water. The ready to use wash buffer expires after approx. 4 - 6 weeks at 4 °C (39 °F).

Alternatively: Dissolve the contents of the pouch in 100 ml of distilled water to obtain a 10fold concentrated wash buffer. This solution expires after approx. 8 - 12 weeks, stored at room temperature (20 -25 °C / 68 - 77 °F).

Use one part of this concentrate and dissolve with 9 parts of distilled water to obtain the ready to use 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 100 µl of antibody to each well, mix gently by shaking the plate manually and incubate for 15 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
3. 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 wells with 250 µl of wash buffer (see 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat two more times.
4. Add 20 µl of standard or prepared sample to separate duplicate wells.
5. Add 100 µl of conjugate to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 60 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
6. 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 wells with 250 µl of wash buffer (see 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat two more times.
7. 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.
8. 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<sup>®</sup>SOFT Win / RIDA<sup>®</sup>SOFT Win.net (Art. No. Z9996), is available for evaluation of the RIDASCREEN<sup>®</sup> 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 ractopamine concentration [ng/kg].

In order to obtain the ractopamine concentration in ng/kg (ppt) actually contained in a sample, the concentration read from the calibration curve must be further multiplied by the corresponding dilution factor. When working in accordance with the regulation stated, the dilution factors are as follows:

urine (direct and incl. hydrolysis ) .....	1
meat .....	1
liver .....	1

### Qualitative evaluation of ractopamine glucuronide in urine

If the calculation of a directly tested urine sample results in a concentration lower than 600 ng/l, no ractopamine glucuronide is present in the sample or its concentration is below the limit of detection.

If the calculation of a directly tested urine sample results in a concentration higher than 600 ng/l, ractopamine glucuronide is present in a concentration between approx. 3,000 ng/l (600 ng/l x (100 % / 20 %)) and 6,000 ng/l (600 ng/l x (100 % / 10 %)), due to the cross reactivity of the antibody of 10 - 20 % for ractopamine glucuronide. In such a case, a subsequential quantitative analysis of ractopamine after hydrolysis is mandatory.

Further information can be found in the validation report.

**For further information or applications please contact your local distributor or [info@r-biopharm.de](mailto:info@r-biopharm.de)**

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](mailto:info@r-biopharm.de)

[www.r-biopharm.com](http://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