

RIDASCREEN[®] β -Agonists

Art. No. R1704

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung
von β -Agonisten

Enzyme immunoassay for the quantitative determination
of β -agonists

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® β -Agonists (Art. Nr.: R1704) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von β -Agonisten in Urin, Serum, Fleisch, Leber, Milch und Futtermitteln.

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, Serum (direkt): Zentrifugation, Verdünnung
Urin (SPE): Hydrolyse, Festphasenextraktion (SPE), Evaporation, Rekonstitution
Fleisch: Homogenisierung, Zentrifugation, Festphasenextraktion (SPE), Evaporation, Rekonstitution
Leber: Homogenisierung, Extraktion, Zentrifugation, Evaporation, Rekonstitution
Milch: Extraktion, Zentrifugation, Evaporation, Rekonstitution
Futtermittel: Homogenisierung, Zentrifugation, Extraktion

Zeitbedarf: Probenvorbereitung (für 10 Proben)
Urin, Serum (direkt) ca. 30 min
Urin (SPE) ca. 4 h
Fleisch ca. 2 h
Leber ca. 1 h
Milch ca. 45 min
Futtermittel ca. 1,5 h
Testdurchführung (Inkubationszeit) 1 h

Nachweisgrenze: Urin (direkt) ca. 200 ng/L (ppt)
(bezogen auf die Urin (SPE) ca. 150 ng/L (ppt)
Standardsubstanz) Serum ca. 900 ng/L (ppt)
Fleisch ca. 100 ng/kg (ppt)
Leber ca. 130 ng/kg (ppt)
Milch ca. 45 ng/L (ppt)
Futtermittel ca. 1000 ng/kg (ppt)

Wiederfindung:	Urin (direkt).....	ca. 94 %
(bezogen auf die	Urin (SPE)	ca. 113 %
Standardsubstanz)	Serum	ca. 102 %
	Fleisch	ca. 76 %
	Leber.....	ca. 89 %
	Milch	ca. 80 %
	Futtermittel.....	ca. 93 %

Die Spezifität des RIDASCREEN® β -Agonists 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:	Clenbuterol (Standardsubstanz)	ca. 100 %
	Salbutamol	ca. 90 %
	Cimbuterol	ca. 90 %
	Brombuterol	ca. 80 %
	Mabuterol	ca. 60 %
	Terbutaline.....	ca. 45 %
	Carbuterol	ca. 40 %
	Mapenterol	ca. 35 %
	Cimaterol	ca. 20 %

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

RIDA® β -Agonists Clenbuterol Dotierlösung	(R1799)
RIDASCREEN® Clenbuterol.....	(R1711)
Clenbuterol Test Kontrolle (positiv).....	(R1707)
Clenbuterol Test Kontrolle (negativ)	(R1708)
RIDASCREEN® Ractopamin	(R9901)
RIDA® Ractopamin Dotierlösung	(R9999)

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN® β -Agonists ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von β -Agonisten in Urin, Serum, Fleisch, Leber, Milch und Futtermitteln.

2. Allgemeines

β -Agonisten, wie z.B. Clenbuterol oder Salbutamol, sind synthetische Derivate der natürlich vorkommenden Catecholamine.

Es ist bekannt, dass β -Agonisten als Leistungssteigerer im Rahmen der Tierproduktion geeignet sind. Insbesondere kann das Fleisch-/Fettverhältnis von Masttieren verbessert bzw. das Wachstum beschleunigt werden. Jedoch sind β -Agonisten als Masthilfsmittel von der Europäischen Union (EU) nicht zugelassen. β -Agonisten besitzen neben der lipolytischen und anabolen Wirkung eine relaxierende Wirkung auf die glatte Muskulatur, worauf die therapeutische Anwendung als Antiasthmatikum und Tokolytikum beruht. Es ist nicht auszuschließen, dass Rückstände von β -Agonisten nach illegaler Anwendung zu einer Verbrauchergefährdung führen können. Deshalb ist der Einsatz von β -Agonisten in der Nahrungsmittelproduktion verboten.

3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit anti- β -Agonisten-Antikörpern beschichtet. Zugegeben werden Standards bzw. Probelösung und enzymmarkierte β -Agonisten (Konjugat). Freie und enzymmarkierte β -Agonisten konkurrieren um die β -Agonisten-Antikörperbindungsstellen (kompetitiver Enzymimmunoassay). Nicht gebundene, enzymmarkierte β -Agonisten werden anschließend in einem Waschschritt wieder entfernt. Der Nachweis erfolgt durch Zugabe von Substrat/Chromogen. Gebundenes Konjugat wandelt das Chromogen in ein blaues Endprodukt um. Die Zugabe der Stopp Lösung führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Messung erfolgt photometrisch bei 450 nm; die Extinktion der Lösung ist umgekehrt proportional zur β -Agonisten-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 ng/L	2 ml
Standard 2 Standard 2	weiß	gebrauchsfertig	62,5 ng/L	1 ml
Standard 3 Standard 3	weiß	gebrauchsfertig	125 ng/L	1 ml
Standard 4 Standard 4	weiß	gebrauchsfertig	250 ng/L	1 ml
Standard 5 Standard 5	weiß	gebrauchsfertig	500 ng/L	1 ml
Standard 6 Standard 6	weiß	gebrauchsfertig	1000 ng/L	1 ml
Standard 7 Standard 7	weiß	gebrauchsfertig	2000 ng/L	1 ml
Wash buffer Waschpuffer	weiß	Konzentrat	20x	30 ml
Conjugate Konjugat	rot	Konzentrat	100x	0,15 ml
Conjugate/sample buffer Konjugat/Probenpuffer	weiß	Konzentrat	4x	20 ml
Substrate/Chromogen Substrat/Chromogen Red Chromogen Pro	braun	gebrauchsfertig		12 ml
Stop solution Stopp Lösung	gelb	gebrauchsfertig		15 ml

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1. Geräte:

- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Mixer
- Über-Kopf-Schüttler
- Vortex
- Evaporator
- Säulenständer
- Zentrifuge
- Messpipetten
- variable 20 µl - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten

5.2. Reagenzien:

Urin (SPE) und Fleisch

- nur Urin: β -Glucuronidase/Arylsulfatase aus *Helix pomatia* (Merck-Chemicals, Art. Nr.: 104114); 1:10 (1+9) in demineralisiertem Wasser verdünnen
- 0,1 M HCl
- 1 M Tris-Base (Sigma-Aldrich, Trizma base: Art. Nr.: T1503)
- 100 % Methanol p.a.
- 0,1 M Essigsäure
- 2 % Ammoniumhydroxid: 6,25 ml 32 % Ammoniumhydroxid-Lösung (Merck-Chemicals, Art. Nr.: 105426) zu 93,75 ml 100 % Methanol p.a. geben
- RIDA[®] C18 column (R-Biopharm, Art. Nr.: R2002)

Leber und Milch

- Acetonitril

Futtermittel

- 1 M NaOH
- 1 M HCl

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 Substrat/Chromogen vor Zugabe in die Kavitäten
- Extinktion kleiner 0,8 ($E_{450\text{ nm}} < 0,8$) für den Standard 1

9. Probenvorbereitung

Die Proben kühl lagern.

9.1. Urin (direkt)

- zentrifugieren: 5 min / 3000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- den Überstand 1:5 (1+4) mit Probenpuffer in einem Glasgefäß verdünnen
z.B. 50 µl Überstand + 200 µl Probenpuffer und gut mischen
- 25 µl pro Kavität in den Test einsetzen

9.2. Urin (SPE)

Falls der Urin trüb sein sollte oder einen Niederschlag enthält, muss vor der Analyse eine Zentrifugation (5 min / 3000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)) oder Filtration (Filterpapier (z.B. Macherey-Nagel, Art. Nr.: MN 615 A)) erfolgen.

- 2 ml Urin in ein sauberes Glasgefäß geben
- 20 µl 1:10 verdünnte *Helix pomatia* β-Glucuronidase/Arylsulfatase hinzugeben
- 7 ml 0,1 M HCl hinzugeben und vortexen
- 2 h bei 50 °C inkubieren
- 1 ml 1 M Tris Base hinzugeben und vortexen
- Festphasenextraktion wie unter 9.4. beschrieben durchführen

9.3. Fleisch

- Fleisch komplett homogenisieren
- 2 g homogenisiertes Fleisch in ein sauberes Glasgefäß geben
- 7 ml 0,1 M HCl hinzugeben und vortexen
- 1 ml 1 M Tris Base hinzugeben und vortexen
- zentrifugieren: 10 min / 2000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- Überstand ohne Beschädigung des Pellets in ein sauberes Glasgefäß überführen
- Festphasenextraktion wie unter 9.4. beschrieben durchführen

9.4. Festphasenextraktion (SPE)

Den Überstand mittels RIDA[®] C18 column (Art. Nr. R2002) reinigen:

- Säule mit 1,2 ml 100 % Methanol p.a. spülen
- 1,2 ml 0,1 M Essigsäure auf die Säule geben
- 3 ml des Filtrats auf die Säule geben (Flussrate: 1 ml/min)
- Probe mit 1 ml 2 %iger Ammoniumhydroxid-Lösung in Methanol eluieren
- Eluatreste durch Nachdrücken bzw. durch Absaugen aus der Säule für 30 s und Trocknung der Säule in einem Luft- oder Stickstoffstrom für 2 min gewinnen
- die eluierte Probe bei 50 °C in einem Luft- oder Stickstoffstrom bis zur Trockene evaporieren
- den trockenen Rückstand in 0,6 ml Probenpuffer rekonstituieren und vortexen
- 25 µl pro Kavität in den Test einsetzen

9.5. Leber

- Leber komplett homogenisieren
- 2 g der homogenisierten Probe in ein Glasgefäß überführen
- 8 ml Acetonitril hinzugeben und gut mischen (vortexen)
- für 10 min mischen (Überkopf-Schüttler)
- zentrifugieren: 10 min / 2000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 1 ml des Überstands in ein neues Glasgefäß überführen
- den Überstand bei 50 °C in einem Luft- oder Stickstoffstrom bis zur Trockene evaporieren
- den trockenen Rückstand in 400 µl Probenpuffer rekonstituieren und vortexen
- 25 µl pro Kavität in den Test einsetzen

9.6. Serum

- zentrifugieren: 5 min / 3000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- den Überstand 1:5 (1+4) in Probenpuffer verdünnen und gut mischen
- 25 µl pro Kavität in den Test einsetzen

9.7. Milch

- 2 ml Milch in ein Glasgefäß überführen
- 8 ml Acetonitril hinzugeben und kräftig mischen (vortexen)
- für 10 min mischen (Überkopf-Schüttler)
- zentrifugieren: 10 min / 2000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 2 ml des Überstands in ein neues Glasgefäß überführen
- den Überstand bei 50 °C in einem Luft- oder Stickstoffstrom bis zur Trockene evaporieren
- den trockenen Rückstand in 250 µl Probenpuffer rekonstituieren und vortexen
- 25 µl pro Kavität in den Test einsetzen

9.8. Futtermittel

- 50 - 100 g der Futtermittelprobe zu einem feinem Pulver vermahlen
- 2 ml 1 M HCl und 18 ml demineralisiertes Wasser zu 2 g des vermahlenden Futtermittels hinzugeben
- für 3 min vortexen
- für 15 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) schütteln
- zentrifugieren: 20 min / 2000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- den Überstand in ein neues Gefäß überführen und 1 ml 1 M NaOH hinzugeben
- den pH mit 1 M HCl auf 7,0 - 7,8 einstellen und 1 min vortexen
- zentrifugieren: 20 min / 2000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 25 µl pro Kavität in den Test einsetzen

10. Testdurchführung

10.1. Testvorbereitungen

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

Eventuell vorhandene Präzipitate im Konzentrat vor Verdünnung durch Schütteln bei Raumtemperatur auflösen.

Das enthaltene Pufferkonzentrat wird als **Konjugat- und Probenpuffer** benötigt. Das Puffer-Konzentrat 1:4 (1+3) mit demineralisiertem Wasser verdünnen (z.B. 20 ml Konzentrat + 60 ml demineralisiertes Wasser). Der endverdünnte Puffer kann bei 2 - 8 °C bis zum Ablauf des Verfallsdatums des Konzentrats gelagert werden.

Das **Waschpufferkonzentrat** 1:20 (1+19) mit demineralisiertem Wasser verdünnen (z.B. 2 ml Konzentrat + 38 ml demineralisiertes Wasser, ausreichend für 4 Mikrotiterstreifen). Der endverdünnte Puffer kann bei 2 - 8 °C bis zum Ablauf des Verfallsdatums des Konzentrats gelagert werden.

Das **β-Agonists-Konjugat** (Flasche mit rotem Verschluss) liegt als Konzentrat vor. Da die rekonstituierte Konjugatlösung nur begrenzte Haltbarkeit aufweist, immer nur so viel Konjugat-Konzentrat mit Konjugatpuffer verdünnen, wie unmittelbar benötigt wird. Das Konjugat-Konzentrat vor der Entnahme zentrifugieren (1 min / 1000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)). Um die gebrauchsfertige Konjugatlösung herzustellen, muss das Konzentrat 1:100 (1+99) mit endverdünntem Konjugatpuffer verdünnt werden (z.B. 30 µl Konzentrat + 2970 µl endverdünntem Konjugatpuffer, ausreichend für 4 Mikrotiterstreifen).

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 25 µl der Standard bzw. der vorbereiteten Proben als Doppelbestimmung und je 75 µl verdünntes Konjugat in die entsprechenden Kavitäten pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und die Platte 30 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln 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 300 µl Waschpuffer (siehe 10.1.) waschen. Diesen Vorgang zweimal wiederholen.
4. 100 µl Substrat/Chromogen in die Kavitäten pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 30 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
5. 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 beigegeführten 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 β-Agonisten-Konzentration [ng/L] auftragen.

Um die in einer Probe enthaltene tatsächliche β -Agonisten-Konzentration in ng/kg zu erhalten, muss die aus der Standardkurve abgelesene Konzentration noch mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden. Beim Arbeiten nach der angegebenen Vorschrift gilt folgender Verdünnungsfaktor:

Urin (direkt).....	5
Urin (SPE)	1
Serum	5
Fleisch	1
Leber	2
Milch	0,625
Futtermittel.....	11

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® β -Agonists

Brief information

RIDASCREEN® β -Agonists (Art. No.: R1704) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of β -agonists in urine, serum, meat, liver, milk and feed.

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, serum (direct): centrifugation, dilution
 urine (SPE): hydrolysis, solid phase extraction (SPE),
 evaporation, reconstitution
 meat: homogenization, centrifugation, solid phase
 extraction (SPE), evaporation, reconstitution
 liver: homogenization, extraction, centrifugation,
 evaporation, reconstitution
 milk: extraction, centrifugation, evaporation,
 reconstitution
 feed: homogenization, centrifugation, extraction

Time requirement: sample preparation (for 10 samples)
 urine, serum (direct)approx. 30 min
 urine (SPE)approx. 4 h
 meatapprox. 2 h
 liverapprox. 1 h
 milkapprox. 45 min
 feedapprox. 1.5 h
 test implementation (incubation time) 1 h

Detection limit: urine (direct) approx. 200 ng/L (ppt)
(corresponding to the urine (SPE) approx. 150 ng/L (ppt)
standard substance) serum approx. 900 ng/L (ppt)
 meat approx. 100 ng/kg (ppt)
 liver approx. 130 ng/kg (ppt)
 milk approx. 45 ng/L (ppt)
 feed approx. 1000 ng/kg (ppt)

Recovery rate:	urine (direct)	approx. 94 %
(corresponding to the	urine (SPE)	approx. 113 %
standard substance)	serum.....	approx. 102 %
	meat.....	approx. 76 %
	liver	approx. 89 %
	milk	approx. 80 %
	feed.....	approx. 93 %

The specificity of the RIDASCREEN® β -Agonists 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:	Clenbuterol (standard substance)	approx. 100 %
	Salbutamol	approx. 90 %
	Cimbuterol	approx. 90 %
	Brombuterol	approx. 80 %
	Mabuterol	approx. 60 %
	Terbutaline.....	approx. 45 %
	Carbuterol	approx. 40 %
	Mapenterol	approx. 35 %
	Cimaterol	approx. 20 %

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

RIDA® β -Agonists Clenbuterol Spiking Solution	(R1799)
RIDASCREEN® Clenbuterol.....	(R1711)
Clenbuterol test control (positive)	(R1707)
Clenbuterol test control (negative).....	(R1708)
RIDASCREEN® Ractopamin	(R9901)
RIDA® Ractopamin Spiking Solution	(R9999)

1. Intended use

RIDASCREEN® β -Agonists is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of β -Agonists in urine, serum, meat, liver, milk and feed.

2. General

β -Agonists, such as clenbuterol or salbutamol, are synthetic derivatives of the naturally occurring catecholamines.

It has been known that β -agonists are suitable for use as performance improvers within the field of livestock production. In particular, the meat/fat ratio in fattened animals can be improved or the growth may be accelerated. However, such compounds have not been approved in the EU for use as fattening adjuvants. In addition to lipolytic and anabolic effects, β -agonists have relaxing effects on non-striated musculature. Thus they can be used as antiasthmatic and tocolytic agents. It is possible that β -agonists residues, after use in illegal practice, may lead to a risk for consumers. Therefore the use of β -agonists use in food production was prohibited.

3. Test principle

The basis of the test is the antigen-antibody reaction. The microtiter wells are coated with antibodies directed against β -Agonists. β -Agonists standards or sample and β -Agonists conjugate are added. Free β -Agonists and β -Agonists conjugate compete for the β -Agonists antibody binding sites (competitive enzyme immunoassay). Any unbound conjugate is then removed in a washing step. Substrate/chromogen is added to the wells, bound enzyme conjugate converts the chromogen into a blue product. The addition of the stop solution leads to a color change from blue to yellow. The measurement is made photometrically at 450 nm. The absorption is inversely proportional to the β -Agonists 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 ng/L	2 ml
Standard 2	White	Ready to use	62,5 ng/L	1 ml
Standard 3	White	Ready to use	125 ng/L	1 ml
Standard 4	White	Ready to use	250 ng/L	1 ml
Standard 5	White	Ready to use	500 ng/L	1 ml
Standard 6	White	Ready to use	1000 ng/L	1 ml
Standard 7	White	Ready to use	2000 ng/L	1 ml
Wash buffer	White	Concentrate	20x	30 ml
Conjugate	Red	Concentrate	100x	0.15 ml
Conjugate/sample buffer	White	Concentrate	4x	20 ml
Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro	Brown	Ready to use		12 ml
Stop solution	Yellow	Ready to use		15 ml

5. Materials required but not provided

5.1. Equipment:

- microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- mixer
- upside down shaker
- vortex
- evaporator
- column rack stand
- centrifuge
- graduated pipettes
- variable 20 µl - 200 µl and 200 - 1000 µl micropipettes

5.2. Reagents:

Urine (SPE) and meat

- Urine only: β -Glucuronidase/Arylsulfatase from *Helix pomatia* (Merck-Chemicals, Art. No.: 104114); dilute 1:10 (1+9) in demineralized water
- 0.1 M HCl
- 1 M Tris Base (Sigma-Aldrich, Trizma base, Art. No.: T1503)
- 100 % Methanol p.a.
- 0.1 M acetic acid
- 2 % ammonium hydroxide: add 6.25 ml of 32 % ammonia solution (Merck-Chemicals, Art. No.: 105426) to 93.75 ml of 100 % methanol p.a.
- RIDA[®] C18 column (R-Biopharm, Art. No.: R2002)

Liver and milk

- Acetonitrile

Feed

- 1 M NaOH
- 1 M HCl

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 substrate/chromogen prior to test implementation
- a value of less than 0.8 absorbance units ($A_{450\text{ nm}} < 0.8$) for the standard 1

9. Preparation of Samples

The samples should be stored in a cool place.

9.1. Urine (direct)

- centrifuge: 5 min / 3000 g / room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- dilute supernatant 1:5 (1+4) in sample buffer in a glass vial
e.g. 50 µl supernatant + 200 µl sample buffer and mix thoroughly
- use 25 µl per well in the assay

9.2. Urine (SPE)

If the urine is turbid or contains a precipitate, a centrifugation (5 min / 3000 g / room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)) or filtration step (Filter paper (e.g. Macherey-Nagel, Art. No.: MN 615 A)) is mandatory.

- transfer 2 ml of urine into a clean glass vial
- add 20 µl of 1:10 diluted *Helix pomatia* β-Glucuronidase/ Arylsulfatase
- add 7 ml 0.1 M HCl and vortex
- incubate for 2 hours at 50 °C (122 °F)
- add 1 ml 1 M Tris Base and vortex
- continue with solid phase extraction under 9.4.

9.3. Meat

- homogenize completely
- transfer 2 g of homogenized meat into a clean glass vial
- add 7 ml 0.1 M HCl and vortex
- add 1 ml 1 M Tris Base and vortex
- centrifuge: 10 min / 2000 g / room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- transfer supernatant without disturbance of the pellet into a new glass vial
- continue with solid phase extraction under 9.4.

9.4. Solid phase extraction (SPE)

The supernatant is purified by means of RIDA[®] C18 column (Art. No. R2002):

- rinse the column with 1.2 ml 100 % methanol p.a.
- apply 1.2 ml 0.1 M acetic acid to the column
- apply 3 ml of the filtrate to the column (flow 1 ml/min)
- elute sample with 1 ml 2 % ammonium hydroxide solution in methanol
- apply positive pressure or vacuum for 30 s and dry the column for 2 min by floating it with air or nitrogen to collect all liquid
- evaporate the eluted sample to dryness under a mild nitrogen or air flow at 50 °C (122 °F)
- dissolve the dried residue in 0.6 ml sample buffer and vortex
- use 25 µl per well in the assay

9.5. Liver

- homogenize liver completely
- transfer 2 g of homogenized liver in a clean glass vial
- add 8 ml of acetonitrile and mix vigorously (vortex)
- mix for 10 min (upside down shaker)
- centrifuge: 10 min / 2000 g / room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- transfer 1 ml of the supernatant into a new glass vial
- evaporate to dryness under a mild nitrogen or air flow at 50 °C (122 °F)
- dissolve the dried residue in 400 µl sample buffer and vortex
- use 25 µl per well in the assay

9.6. Serum

- centrifuge: 5 min / 3000 g / room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- dilute supernatant 1:5 (1+4) in sample buffer and mix thoroughly
- use 25 µl per well in the assay

9.7. Milk

- transfer 2 ml of milk into a glass vial
- add 8 ml of acetonitrile and mix vigorously (vortex)
- mix for 10 min (upside down shaker)
- centrifuge: 10 min / 2000 g / room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- transfer 2 ml of the supernatant into a glass vial
- evaporate to dryness under a mild nitrogen or air flow at 50 °C (122 °F)
- dissolve the dried residue in 250 µl sample buffer and vortex
- use 25 µl per well in the assay

9.8. Feed

- grind sample (approx. 50 - 100 g) into a fine powder
- add 2 ml of 1 M HCl and 18 ml of demineralized water to 2 g of the ground feed
- vortex for 3 min
- shake for 15 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- centrifuge: 20 min / 2000 g / room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- transfer supernatant into a new vial and add 1 ml of 1 M NaOH
- adjust pH to 7.0 - 7.8 with 1 M HCl and vortex for 1 min
- centrifuge: 20 min / 2000 g / room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- use 25 µl per well in the assay

10. Test implementation

10.1. Preliminary comments

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

Eventually occurring precipitates in the concentrates have to be dissolved by shaking at room temperature before dilution.

Please use the contained buffer concentrate as **conjugate and sample buffer**. Dilute buffer concentrate 1:4 (1+3) with demineralized water (e.g. 20 ml concentrate + 60 ml demineralized water). Diluted buffer can be stored at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) until the shelflife of the concentrate expires.

Dilute **wash buffer** concentrate 1:20 (1+19) with demineralized water (e.g. 2 ml concentrate + 38 ml demineralized water, sufficient for 4 microtiter strips). Diluted buffer can be stored at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) until the shelf life of the concentrate expires.

The **β-agonists conjugate** (bottle with red cap) is provided as a concentrate. Since the diluted conjugate has a limited stability, only the amount which actually is needed should be reconstituted. Centrifuge the conjugate in the vial shortly (1 min / 1000 g / room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)). For reconstitution, the concentrate is diluted 1:100 (1+99) in ready-to-use conjugate buffer (e.g. 30 μl conjugate concentrate + 2970 μl ready-to-use conjugate buffer, sufficient for 4 microtiter strips).

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 25 µl of standard or prepared sample to separate duplicate wells and add 75 µl of diluted conjugate of each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 30 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark.
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 300 µl of wash buffer (see 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat two more times.
4. Add 100 µl of substrate/chromogen to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 30 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark.
5. 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 min 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 β-agonists concentration [ng/L].

In order to obtain the β -agonists 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 factor is as follows:

urine (direct)	5
urine (SPE)	1
serum.....	5
meat.....	1
liver	2
milk	0.625
feed.....	11

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