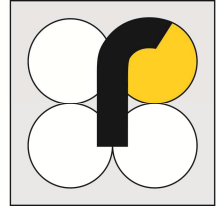


r-biopharm<sup>®</sup>



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

**Art. No. R1721**

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung  
von Zilpaterol

Enzyme immunoassay for the quantitative determination  
of zilpaterol

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® 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® Zilpaterol (Art. Nr.: R1721) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Zilpaterol in Milch, Fleisch (Rind, Schwein, Geflügel), Leber, Niere, Serum/Plasma (Rind) und 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:        Milch: Carrez-Fällung, Zentrifugation, Verdünnung  
                                 Fleisch (Rind, Schwein): Homogenisierung, wässrige Extraktion, Zentrifugation  
                                 Fleisch (Geflügel): Homogenisierung, wässrige Extraktion, Zentrifugation  
                                 Leber, Niere: Homogenisierung, wässrige Extraktion, Zentrifugation  
                                 Urin (Rind): Carrez-Fällung, Zentrifugation, Verdünnung  
                                 Urin (Schwein): Direkter Einsatz nach Zugabe von NaCl  
                                 Serum/Plasma (Rind): Behandlung mit RIDA® Sample Decolorant (Art. Nr. R1699)

Zeitbedarf:                    Probenvorbereitung (für 10 Proben)  
   Je nach Probenmatrix ..... ca. 5 bis 45 min  
   Testdurchführung (Inkubationszeit) ..... 60 min

Nachweisgrenze:            Milch..... ca. 150 ng/L  
(bezogen auf die            Fleisch (Rind, Schwein)..... ca. 150 ng/kg  
Standardsubstanz)        Fleisch (Geflügel) ..... ca. 240 ng/kg  
                                 Leber/Niere ..... ca. 310 ng/kg  
                                 Urin (Rind)..... ca. 550 ng/L  
                                 Urin (Schwein)..... ca. 180 ng/L  
                                 Serum/Plasma (Rind) ..... ca. 240 ng/L

Wiederfindungsrate:	Milch.....	ca. 82 %
(bezogen auf die	Fleisch (Rind, Schwein).....	ca. 103 %
Standardsubstanz)	Fleisch (Geflügel) .....	ca. 104 %
	Leber/Niere .....	ca. 97 %
	Urin (Rind).....	ca. 90 %
	Urin (Schwein).....	ca. 100 %
	Serum/Plasma.....	ca. 107 %

Die Spezifität des RIDASCREEN® Zilpaterol-Tests wurde durch die Bestimmung der Kreuzreaktivität zu den entsprechenden Substanzen im Puffersystem ermittelt. In Proben kann die Spezifität aufgrund von Matrixeffekten von der 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:

im Puffersystem	Zilpaterol (Standardsubstanz) .....	100 %
	Cimbuterol.....	< 1 %
	Clenbuterol.....	< 1 %
	Fenoterol.....	< 1 %
	Mabuterol .....	< 1 %
	Ractopamin .....	< 1 %
	Salbutamol .....	< 1 %
	Tolubuterol .....	< 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 <https://food.r-biopharm.com/de/technologien/elisa/> abgerufen, gedruckt und gespeichert werden.

## **Produktangebot**

RIDA <sup>®</sup> Zilpaterol Dotierlösung .....	(R1796)
RIDA <sup>®</sup> Sample Decolorant.....	(R1699)
RIDASCREEN <sup>®</sup> Clenbuterol.....	(R1711)
RIDASCREEN <sup>®</sup> $\beta$ -Agonisten .....	(R1704)
RIDA <sup>®</sup> $\beta$ -Agonisten Clenbuterol Dotierlösung.....	(R1799)

### **1. Verwendungszweck**

RIDASCREEN<sup>®</sup> Zilpaterol ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Zilpaterol in Milch, Fleisch, Leber, Niere, Urin und Serum/Plasma.

### **2. Allgemeines**

Der Einsatz des Wirkstoffs Zilpaterol aus der Gruppe der  $\beta$ -Agonisten ist in einigen Ländern als Futtermittelzusatzstoff zugelassen. Die Verabreichung führt zu einer deutlichen Erhöhung der durchschnittlichen täglichen Gewichtszunahme in der Endmast. In der EU und vielen weiteren Regionen ist der Einsatz bei Lebensmittelliefernden Tieren jedoch strikt untersagt. Durch illegale oder falsche Anwendung, sowie durch Handel kann es weltweit zu Rückständen von Zilpaterol in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs kommen.

### **3. Testprinzip**

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte sind mit einem Zilpaterol-Protein-Konjugat beschichtet. Zugegeben werden Standards bzw. Probelösung sowie anti-Zilpaterol-Antikörper. Freies und immobilisiertes Zilpaterol konkurrieren um die Zilpaterol-Antikörperbindungsstellen (kompetitiver Enzymimmunoassay). Nach einem Waschschrift wird enzymmarkierter Sekundärantikörper hinzugegeben, der an die gebundenen anti-Zilpaterol-Antikörper bindet. Nicht gebundener Sekundärantikörper wird anschließend in einem Waschschrift entfernt. Der Nachweis erfolgt durch Zugabe von Substrat/Chromogen. Gebundenes Konjugat wandelt das Chromogen in ein blaues Endprodukt um. Die Zugabe der Stopplösung führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Messung erfolgt photometrisch bei 450 nm; die Extinktion der Lösung ist umgekehrt proportional zu der Zilpaterol-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>Standard 1</b> Standard 1	weiß	gebrauchsfertig	0 ng/L 1,3 ml
<b>Standard 2</b> Standard 2	weiß	gebrauchsfertig	75 ng/L 1,3 ml
<b>Standard 3</b> Standard 3	weiß	gebrauchsfertig	250 ng/L 1,3 ml
<b>Standard 4</b> Standard 4	weiß	gebrauchsfertig	750 ng/L 1,3 ml
<b>Standard 5</b> Standard 5	weiß	gebrauchsfertig	2500 ng/L 1,3 ml
<b>Standard 6</b> Standard 6	weiß	gebrauchsfertig	7500 ng/L 1,3 ml
<b>Wash buffer salt Tween</b> Waschpuffer (Salz) Tween		Salz zum Auflösen	2 x
<b>Conjugate</b> Konjugat	rot	gebrauchsfertig	11 ml
<b>Antibody</b> Antikörper	blau	gebrauchsfertig	6 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:

Gerät	Milch	Fleisch (Rind, Schw.)	Fleisch (Gefl.)	Leber/ Niere	Urin (Rind)	Urin (Schw.)	Serum/ Plasma
<b>Mikrotiterplatten- Photometer (450 nm)</b>	•	•	•	•	•	•	•
<b>Variable 2 - 10 µl Mikropipette</b>	•				•		
<b>Variable 20 - 200 µl bzw. 200 - 1000 µl Mikropipetten</b>	•	•	•	•	•	•	•
<b>Mixer (Homogenisator)</b>		•	•	•			
<b>Schüttler</b>		•	•	•			
<b>Zentrifuge</b>	•	•	•	•	•		•
<b>Vortex</b>	•		•	•	•	•	•

## 5.2. Reagenzien:

Reagenz	Milch	Fleisch (Rind, Schw.)	Fleisch (Gefl.)	Leber /Niere	Urin (Rind)	Urin (Schw.)	Serum/ Plasma
HCl (1 M)	•				•		
HCl (2 M)		•	•	•			
NaOH (1 M)		•					
NaOH (2 M)			•	•			
NaCl (Salz)			•		•	•	
Carrez I	•				•		
Carrez II	•				•		
RIDA® Sample Decolorant (R1699)							•

### Carrez-Reagenz I:

1,52 g Kaliumhexacyanoferrat(II) x 3 H<sub>2</sub>O in 10 ml dest. Wasser lösen

### Carrez-Reagenz II:

2,99 g Zinksulfat x 7 H<sub>2</sub>O in 10 ml dest. Wasser lösen

## 6. Vorsichtsmaßnahmen

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

Dieses Kit kann gesundheitsgefährdende Substanzen enthalten. Sicherheitshinweise zu den enthaltenen Komponenten entnehmen Sie bitte den Sicherheitsdatenblättern (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.

Die Substrat-/Chromogenlösung ist lichtempfindlich, deshalb direkte Lichteinwirkung vermeiden.

Nach Ablauf des Verfallsdatums (siehe Testkit-Außenetikett) kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.

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

## 8. Anzeichen für Reagenzienverfall

- bläuliche Färbung des rötlich gefärbten Substrat/Chromogen vor Zugabe in die Kavitäten
- Extinktion kleiner 0,8 ( $E_{450\text{ nm}} < 0,8$ ) für den Nullstandard

## 9. Probenvorbereitung

Die Proben kühl und lichtgeschützt lagern.

### 9.1. Milch

- eine repräsentative Probenmenge gut durchmischen
- zu 2 ml der Probe 100 µl HCl (1 M) und 10 µl Carrez I geben
- kurz vortexen, 10 µl Carrez II zugeben und erneut vortexen
- zentrifugieren: 10 min / 4000 x g / Raumtemperatur (20 – 25 °C)
- 450 µl Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführen, 400 µl Waschpuffer (8-fach, siehe 10.1.) zugeben und gut durchmischen
- 50 µl im Test einsetzen

### 9.2. Fleisch (Rind, Schwein)

- eine repräsentative Probenmenge Muskelfleisch mit einem geeigneten Gerät vollständig homogenisieren
- zu 2 g homogenisierter Probe 1,7 ml Waschpuffer (4-fach, siehe 10.1.) und 150 µl HCl (2 M) zugeben
- 15 min über Kopf schütteln
- zentrifugieren: 15 min / 4000 x g / Raumtemperatur
- 960 µl Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführen, 40 µl NaOH (1 M) zugeben und gut durchmischen
- 50 µl pro Kavität in den Test einsetzen

### 9.3. Fleisch (Geflügel)

- eine repräsentative Probenmenge Muskelfleisch mit einem geeigneten Gerät vollständig homogenisieren
- zu 4 g homogenisierter Probe 3,4 ml Waschpuffer (4-fach, siehe 10.1) und 300 µl HCl (2 M) zugeben
- 15 min über Kopf schütteln
- Zentrifugieren: 15 min / 4000 x g / **4 °C** (steht keine Kühlzentrifuge zur Verfügung, die Probe vor dem Zentrifugieren für 10 min auf Eis stellen)



- 960 µl Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführen, 30 µl NaOH (2 M) sowie eine Spatelspitze NaCl zugeben und gut durchmischen
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

#### 9.4. Leber/Niere

- eine repräsentative Probenmenge mit einem geeigneten Gerät homogenisieren
- zu 3 g homogenisierter Probe 3,4 ml Waschpuffer (2-fach siehe 10.1.) sowie 350 µl HCl (2 M) zugeben, kurz vortexen
- 15 min über Kopf schütteln
- zentrifugieren: 15 min / 4000 x g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 960 µl Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführen, 40 µl NaOH (2 M) zugeben
- zentrifugieren: 5 min / 10000 x g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 50 µl Überstand pro Kavität im Test einsetzen

#### 9.5. Urin (Rind)

- zu 1 ml der Probe 100 µl HCl (1 M) und 10 µl Carrez I geben
- kurz vortexen, 10 µl Carrez II zugeben und erneut vortexen
- zentrifugieren: 10 min / 4000 x g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 450 µl Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführen, 400 µl Waschpuffer (8-fach, siehe 10.1) sowie eine Spatelspitze NaCl zugeben und gut durchmischen
- 50 µl des pro Kavität in den Test einsetzen

#### 9.6. Urin (Schwein)

- eine Spatelspitze NaCl (ca. 50 mg) zu 1 ml Urin geben, kurz durchmischen
- 50 µl des pro Kavität in den Test einsetzen

#### 9.7. Plasma/Serum (Rind)

- zu 0,6 ml Serum oder Plasma 0,6 ml RIDA<sup>®</sup> Sample Decolorant Reagenz 1 zugeben und kurz vortexen
- 0,4 ml RIDA<sup>®</sup> Sample Decolorant Reagenz 2 zugeben und gut durchmischen
- zentrifugieren: 5 min / 4000 x g / Raumtemperatur
- 0,2 ml RIDA<sup>®</sup> Sample Decolorant Reagenz 3 zugeben, durch vorsichtiges Invertieren mischen
- zentrifugieren: 5 min / 4000 x g / Raumtemperatur
- 50 µl des Überstandes pro Kavität in den Test einsetzen

## 10. Testdurchführung

### 10.1. Testvorbereitungen

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

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

Alternativ: Inhalt des Beutels in 100 ml dest. Wasser lösen (10fach Konzentrat). Die Lösung ist ca. 8 - 12 Wochen bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) haltbar.

Um die gebrauchsfertige Lösung herzustellen 1 Teil des 10fach Konzentrats mit 9 Teilen dest. Wasser mischen.

Für einige Probenaufarbeitungen wird ein **konzentrierterer Waschpuffer** benötigt, benutzen sie dazu bitte den zweiten beiliegenden Waschpufferbrief.

Zur Herstellung des konzentrierteren Waschpuffers wird der gesamte Inhalt des Beutels in 125 ml (8-fach), 250 ml (4-fach) oder 500 ml (2-fach) destilliertem Wasser gelöst. Werden verschiedene Konzentrationen benötigt, einen Teil des 8-fach Konzentrats entsprechend weiterverdünnen.

### 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 Standards bzw. der vorbereiteten Proben als Doppelbestimmung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.
3. Je 50 µl Anti-Zilpaterol-Antikörper in die entsprechenden Kavitäten pipettieren, vorsichtig manuell mischen und 30 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
4. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf saugfähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit jeweils 250 µl Waschpuffer (siehe 10.1.) waschen. Diesen Vorgang zweimal wiederholen.

5. Je 100 µl Konjugat in die entsprechenden Kavitäten pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 15 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln 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 entsprechenden Kavitäten pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 15 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
8. Je 100 µl Stopp-Reagenz in jede Kavität pipettieren und vorsichtig manuell mischen. Die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe des Stopp-Reagenzes messen.

## 11. Auswertung

Für die Auswertung ist bei R-Biopharm eine speziell für die RIDASCREEN® Enzymimmunoassays entwickelte Software, die RIDASOFT® Win.NET (Art. Nr. Z9996), erhältlich.

Der Verlauf der Standardkurve kann dem beigefügten Analysenzertifikat entnommen werden.

Hinweis für die Berechnung ohne Software:

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

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

Um die in einer Probe enthaltene tatsächliche Zilpaterol-Konzentration in ng/L bzw. ng/kg (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:

Milch .....	2
Fleisch (Rind/Schwein).....	2
Fleisch (Geflügel) .....	2
Leber/Niere .....	2
Urin (Rind).....	2
Urin (Schwein).....	1
Plasma/Serum.....	3

**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> Zilpaterol

## Brief information

RIDASCREEN<sup>®</sup> Zilpaterol (Art. No.: R1721) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative determination of zilpaterol in milk, meat (porcine, bovine, poultry), liver, kidney serum/plasma (bovine) and 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:

- milk: precipitation, centrifugation, dilution
- meat (bovine, porcine): homogenization, aqueous extraction, centrifugation
- meat (poultry): homogenization, aqueous extraction, centrifugation
- liver, kidney: homogenization, aqueous extraction, centrifugation
- urine (bovine): Carrez-precipitation, centrifugation, dilution
- urine (porcine): direct use after addition of NaCl
- serum/plasma (bovine): treatment with RIDA<sup>®</sup> Sample Decolorant (Art. No. R1699)

Time requirement:

- sample preparation (for 10 samples)
- according to sample matrix..... 5 to 45 min
- test implementation (incubation time) ..... 60 min

Limit of Detection  
(corresponding to the  
standard substance)

- milk..... approx. 150 ng/L
- meat (bovine, porcine)..... approx. 150 ng/kg
- meat (poultry) ..... approx. 240 ng/kg
- liver/kidney ..... approx. 310 ng/kg
- urine (bovine) ..... approx. 550 ng/L
- urine (porcine) ..... approx. 180 ng/L
- serum/plasma (bovine) ..... approx. 240 ng/L

Recovery	milk.....	approx. 82 %
(corresponding to the standard substance)	meat (bovine, porcine).....	approx. 103 %
	meat (poultry) .....	approx. 104 %
	liver/kidney .....	approx. 97 %
	urine (bovine) .....	approx. 90 %
	urine (porcine).....	approx. 100 %
	serum/plasma.....	approx. 107 %

The specificity of the RIDASCREEN® Zilpaterol test was determined by analyzing the cross-reactivities to corresponding substances in buffer system. In samples, the specificity may deviate from the values determined in the buffer system due to matrix effects. Prior to the analysis of cross-reactive substances, the user has to determine the limit of detection and the recovery for the substance in the respective sample matrix. The test cannot discriminate between analytes and cross-reactive substances.

#### Specificity:

in buffer system	Zilpaterol (standard substance) .....	100 %
	Cimbuterol.....	<1 %
	Clenbuterol.....	<1 %
	Fenoterol.....	<1 %
	Mabuterol .....	<1 %
	Ractopamin.....	<1 %
	Salbutamol .....	<1 %
	Tolubuterol .....	<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 on the website <https://food.r-biopharm.com/technologies/elisa/>

## Related products

RIDA <sup>®</sup> Zilpaterol Spiking Solution.....	(R1796)
RIDA <sup>®</sup> Sample Decolorant.....	(R1699)
RIDASCREEN <sup>®</sup> Clenbuterol.....	(R1711)
RIDASCREEN <sup>®</sup> $\beta$ -Agonisten.....	(R1704)
RIDA <sup>®</sup> $\beta$ -Agonisten Clenbuterol Dotierlösung.....	(R1799)

### 1. Intended use

RIDASCREEN<sup>®</sup> Zilpaterol is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative determination of zilpaterol in milk, meat, liver, kidney, urine and serum/plasma.

### 2. General

Use of zilpaterol is approved for use as feed additive in some countries. Administering of this  $\beta$ -agonist during final fattening leads to an increased average daily gain of weight and improved meat/fat ratio. In the European Union and many other countries the use in food producing animals is illegal.

### 3. Test principle

The basis of the test is the antigen-antibody reaction. The microtiter wells are coated with a zilpaterol-protein conjugate. Standards or sample and anti-zilpaterol antibody are added into the wells. Free and immobilized zilpaterol compete for the antibody binding sites (competitive enzyme immunoassay). After a washing step secondary enzyme-labelled antibody is added, binding to the primary antibody. Any unbound secondary antibody is then removed in a washing step. Detection is performed by adding substrate/chromogen. The conjugate converts the chromogen into a blue product. The addition of the stop solution leads to a color change from blue to yellow. The measurement is made photometrically at 450 nm. The absorption is inversely proportional to the zilpaterol concentration in the sample.

## 4. Reagents provided

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

Component	Cap color	Format		Volume
Microtiter plate	-	Ready-to-use		96 Kavitäten
Standard 1	White	Ready-to-use	0 ng/L	1,3 ml
Standard 2	White	Ready-to-use	75 ng/L	1,3 ml
Standard 3	White	Ready-to-use	250 ng/L	1,3 ml
Standard 4	White	Ready-to-use	750 ng/L	1,3 ml
Standard 5	White	Ready-to-use	2500 ng/L	1,3 ml
Standard 6	White	Ready-to-use	7500 ng/L	1,3 ml
Wash buffer salt Tween		Salt for dissolving		2 x
Conjugate	Red	Ready-to-use		11 ml
Antibody	Blue	Ready-to-use		6 ml
Substrate/Chromogen	Brown	Ready-to-use		10 ml
Stop solution	Yellow	Ready-to-use		14 ml

## 5. Materials required but not provided

### 5.1. Equipment:

Equipment	milk	meat (bovine, porcine)	meat (poultry)	liver/ kidney	urine (bovine)	urine (porcine)	serum/ plasma
Microtiter plate- spectrophotometer (450 nm)	•	•	•	•	•	•	•
Micropipettes: 2 - 10 µl variable 20 - 200 µl and 200 - 1000 µl mikropipettes	•				•		
Mixer (homogenizer)		•	•	•			
Shaker		•	•	•			
Centrifuge	•	•	•	•	•		•
Vortex	•		•	•	•	•	•



## 5.2. Reagents:

Reagent	milk	meat (bovine, porcine)	meat (poultry)	liver/ kidney	urine (bovine)	urine (porcine)	serum/ plasma
HCl (1 M)	•				•		
HCl (2 M)		•	•	•			
NaOH (1 M)		•					
NaOH (2 M)			•	•			
NaCl (Salt)			•		•	•	
Carrez I	•				•		
Carrez II	•				•		
RIDA <sup>®</sup> Sample Decolorant (R1699)							•

### Carrez I:

Weigh in 1.52 g Potassium ferrocyanide(II) x 3 H<sub>2</sub>O and dissolve it in 10 ml distilled water

### Carrez II:

Weigh in 2.99 g Zinc sulfate x 7 H<sub>2</sub>O and dissolve it in 10 ml distilled 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](http://www.r-biopharm.com).

## 7. Storage instructions

Store the kit at 2 - 8 °C. 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.

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

No quality guarantee is accepted after expiry of the kit (see kit label).

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

## 8. Indication of deterioration of reagents

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

## 9. Preparation of Samples

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

### 9.1. Milk

- vortex a representative sample amount for homogenization
- add 100  $\mu\text{l}$  HCl (1 M) and 10  $\mu\text{l}$  Carrez I (see 5.2) to 2 ml of sample
- vortex, add 10 ml Carrez II (see 5.2) and vortex again
- centrifuge: 10 min / 4000 x g / room temperature (20 - 25 °C)
- transfer 450  $\mu\text{l}$  of supernatant to a new vial, add 400  $\mu\text{l}$  washing buffer (8fold concentrate, see 10.1.) and mix well
- use 50  $\mu\text{l}$  per well in the assay

### 9.2. Meat (bovine, porcine)

- homogenize a representative amount of meat
- add 1.7 ml washing buffer (4fold concentrate, see 10.1.) and 150  $\mu\text{l}$  HCl (2 M) to 2 g of homogenized sample
- shake upside-down for 15 min
- centrifuge: 15 min / 4000 x g / room temperature (20 - 25 °C)
- transfer 960  $\mu\text{l}$  of supernatant to a new vial, add 40  $\mu\text{l}$  NaOH (1 M) and mix well
- use 50  $\mu\text{l}$  per well in the assay

### 9.3. Meat (poultry)

- homogenize a representative amount of meat
- add 3.4 ml washing buffer (4fold concentrate, see 10.1.) and 300  $\mu\text{l}$  HCl (2 M) to 4 g of homogenized sample
- shake upside-down for 15 min
- centrifuge: 15 min / 4000 x g / **4 °C** (if no refrigerated centrifuge is available, put the samples on ice for 10 minutes before centrifugation)
- transfer 960  $\mu\text{l}$  of supernatant to a new vial, add 30  $\mu\text{l}$  NaOH (**2 M**), a spatula tip of NaCl and mix well
- use 50  $\mu\text{l}$  per well in the assay

#### 9.4. Liver/Kidney

- homogenize a representative amount of sample with an Ultra-Turrax or a mixer
- add 3.4 ml washing buffer (2fold, see 10.1.) and 350 µl HCl (2 M) to 3 g of sample, vortex
- shake upside-down for 15 min
- centrifuge: 15 min / 4000 x g / room temperature (20 - 25 °C)
- transfer 960 µl of supernatant to a new vial, add 40 µl NaOH (2 M) and mix well
- centrifuge: 5 min / 10000 x g / room temperature (20 - 25 °C)
- use 50 µl of the supernatant per well in the assay

#### 9.5. Urine (bovine)

- add 100 µl HCl (1 M) and 10 µl Carrez I (see 5.2) to 1 ml of sample
- vortex, add 10 ml Carrez II (see 5.2) and vortex again
- centrifuge: 10 min / 4000 x g / room temperature (20 - 25 °C)
- transfer 450 µl of supernatant to a new vial, add 400 µl washing buffer (8fold concentrate, see 10.1.) and mix well
- use 50 µl per well in the assay

#### 9.6. Urine (porcine)

- add a spatula tip of NaCl (approx. 50 mg) to 1 ml of urine, mix well
- use 50 µl per well in the assay

#### 9.7. Plasma/serum (bovine)

- add 0.6 ml RIDA<sup>®</sup> Sample Decolorant Reagent 1 to 0.6 ml of serum or plasma, vortex
- add 0.4 ml RIDA<sup>®</sup> Sample Decolorant Reagent 2, mix well
- centrifuge: 5 min / 4000 x g / room temperature (20 - 25 °C)
- add 0.2 ml RIDA<sup>®</sup> Sample Decolorant Reagent 3, mix by gently turning upside down
- centrifuge: 5 min / 4000 x g / room temperature (20 - 25 °C)
- use 50 µl of the supernatant 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.

As **wash buffer** a PBS tween buffer is needed. Please use the wash buffer salt (see 4.) contained in the kit. Dissolve the entire buffer salt in one liter of distilled water. The ready to use washing buffer expires after approx. 4 - 6 weeks at 2 - 8 °C (36 - 46 °F).

Alternative: 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, store at room temperature (20 - 25 °C). Use 1 part 10fold concentrate and dissolve with 9 parts of distilled water to obtain the ready to use washing buffer.

For some of the sample preparations, a **more concentrated wash buffer** is needed; please use the second wash buffer bag included in the kit. Dissolve the entire buffer salt in 125 ml (8fold), 250 ml (4fold) or 500 ml (2fold) distilled water. Should different concentrations be needed, further dilute a part of the 8fold 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.
3. Add 50 µl of the anti-zilpaterol-antibody to the bottom of each well, mix gently by shaking the plate manually and incubate for 30 min at room temperature (20 - 25 C).
4. 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 washing buffer (see 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat two more times.
5. Add 100 µl of the conjugate to each well, mix gently by shaking the plate manually and incubate for 15 minutes at room temperature in the dark.
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 the wells with 250 µl washing buffer (see 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat two more times.

7. Add 100 µl of substrate/conjugate solution to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 15 min at room temperature (20 - 25 °C) 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 RIDASOFT® 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:

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

The zero standard is thus made equal to 100 % and the absorbance values are quoted in percentages. The values calculated for the standards are entered in a system of coordinates on semilogarithmic graph paper against the zilpaterol concentration [ng/L].

In order to obtain the zilpaterol concentration in ng/L / 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:

milk .....	2
meat (bovine/porcine) .....	2
meat (poultry) .....	2
liver/kidney .....	2
urine (bovine) .....	2
urine (porcine) .....	1
plasma/serum .....	3

**For further information or applications please contact your local distributor or [sales@r-biopharm.de](mailto:sales@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, Christian Dreher, Dr. Hans Frickel

Jochen Hirsch, Dr. Peter Schubert

Handelsregister / Commercial Register:

Amtsgericht Darmstadt HRB 8321