

RIDASCREEN[®] Clenbuterol

Art. No. R1711

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung
von Clenbuterol

Enzyme immunoassay for the quantitative determination
of clenbuterol

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® Clenbuterol (Art. Nr.: R1711) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Clenbuterol in Milch, Fleisch, Leber, Niere, Urin, Plasma/Serum, Haaren, Auge und Futtermittel.

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: direkter Einsatz
 Fleisch: Homogenisierung, Extraktion, Evaporation
 Leber: Homogenisierung, Extraktion, Behandlung mit
 RIDA® Sample Decolorant (R1699)
 Niere: Homogenisierung, Extraktion
 Urin, Plasma/Serum: direkter Einsatz
 Haare: Waschen, Kochen
 Auge: Präparation (Sektion), Extraktion
 Futtermittel: Vermahlen, Extraktion, Behandlung mit
 RIDA® Sample Decolorant (R1699)

Zeitbedarf: Probenvorbereitung (für 10 Proben)
 Fleisch (Rind, Schwein)..... ca. 1,5 h
 Fleisch (Geflügel) ca. 2 h
 Leber..... ca. 1,5 h
 Niere ca. 1 h
 Urin, Plasma/Serum ca. 15 min
 Haare (exklusive Trocknung)..... ca. 1 h
 Auge..... ca. 1,5 h
 Futtermittel ca. 1 h
 Testdurchführung (Inkubationszeit) 1 h

Nachweisgrenze: Milch..... ca. 50 ng/L (ppt)
(bezogen auf die Fleisch..... ca. 100 ng/kg (ppt)
Standardsubstanz) Leber..... ca. 150 ng/kg (ppt)
 Niere ca. 200 ng/kg (ppt)
 Urin ca. 100 ng/L (ppt)
 Plasma/Serum..... ca. 250 ng/L (ppt)
 Haare ca. 2 µg/kg (ppb)
 Auge..... ca. 200 ng/kg (ppt)
 Futtermittel ca. 600 ng/kg (ppt)

Wiederfindungsrate:	Milch.....	ca. 81 %
(bezogen auf die	Fleisch (Rind, Schwein).....	ca. 106 %
Standardsubstanz)	Fleisch (Geflügel)	ca. 99 %
	Leber.....	ca. 87 %
	Niere	ca. 102 %
	Urin (Rind).....	ca. 73 %
	Urin (Schwein).....	ca. 91 %
	Plasma/Serum.....	ca. 106 %
	Haare	ca. 111 %
	Auge.....	ca. 89 %
	Futtermittel	ca. 92 %

Die Spezifität des RIDASCREEN® Clenbuterol 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)	100 %
	Mabuterol.....	ca. 95 %
	Brombuterol	ca. 87 %
	Bromchlorbuterol	ca. 85 %
	Terbutalin.....	ca. 23 %
	Salbutamol.....	ca. 20 %
	Carbuterol.....	ca. 15 %
	Adrenalin, Boldenon, Cimaterol, Clenproperol, Isoproterenol, Phenylbutazon, Ractopamin, Triamcinolonhexacetonid, Zilpaterol.....	< 1 %

Zur Erhöhung der Prüfungsqualität bei ELISA-Verfahren verweisen wir zusätzlich auf unser ELISA-Handbuch in der jeweiligen Fassung. Dieses führt Mindeststandards hinsichtlich der Rahmenbedingungen auf, die bei der Verwendung von Testsystemen der R-Biopharm AG und der Durchführung von ELISA-Analysen mit diesen Testsystemen zu beachten sind. Das Handbuch kann unter der Webseite www.r-biopharm.com/de/produkte/lebensmittel-futtermittelanalytik abgerufen, gedruckt und gespeichert werden.

Produktangebot

RIDA® Clenbuterol Dotierlösung(R1799)

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN® Clenbuterol (Art. Nr.: R1711) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Clenbuterol in Milch, Fleisch, Leber, Niere, Urin, Plasma/Serum, Haaren, Auge und Futtermittel.

2. Allgemeines

Clenbuterol gehört zur Gruppe der β -Agonisten. Es ist bekannt, dass β -Agonisten sich als Leistungssteigerer im Rahmen der Tierproduktion eignen. Insbesondere kann das Fleisch-/Fettverhältnis von Masttieren verbessert bzw. das Wachstum beschleunigt werden. Derartige Verbindungen sind jedoch nicht als Masthilfsmittel zugelassen. Clenbuterol besitzt neben seiner lipolytischen und anabolen Wirkung eine relaxierende Wirkung auf die glatte Muskulatur, worauf die therapeutische Anwendung als Antiasthmatikum und Tokolytikum beruht. Als Masthilfsmittel wird Clenbuterol, verglichen zur therapeutischen Anwendung, in 5- bis 10-fach höherer Dosierung eingesetzt. Es ist somit nicht auszuschließen, dass Clenbuterol-Rückstände nach illegaler Praxis zu einer Verbrauchergefährdung führen können.

3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte sind mit Fänger-Antikörpern gegen anti-Clenbuterol-Antikörper beschichtet. Die Mikrotiterplatte ist bereits funktionalisiert mit anti-Clenbuterol-Antikörpern, welche an die immobilisierten Fänger-Antikörper gebunden sind. Durch Zugabe von Standards bzw. Probe und enzymmarkiertem Clenbuterol (Konjugat) konkurrieren freies und enzymmarkiertes Clenbuterol um die Clenbuterol-Antikörperbindungsstellen (kompetitiver Enzymimmunoassay). Nicht gebundenes enzymmarkiertes Clenbuterol wird anschließend in einem Waschschrift wieder entfernt. Der Nachweis erfolgt durch Zugabe von Substrat/Chromogen. Gebundenes Konjugat wandelt das Chromogen in ein blaues Endprodukt um. Die Zugabe der Stopplösung führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Messung erfolgt photometrisch bei 450 nm; die Extinktion der Lösung ist umgekehrt proportional zu der Clenbuterol-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 1,3 ml
Standard 2 Standard 2	weiß	gebrauchsfertig	75 ng/L 1,3 ml
Standard 3 Standard 3	weiß	gebrauchsfertig	150 ng/L 1,3 ml
Standard 4 Standard 4	weiß	gebrauchsfertig	300 ng/L 1,3 ml
Standard 5 Standard 5	weiß	gebrauchsfertig	900 ng/L 1,3 ml
Standard 6 Standard 6	weiß	gebrauchsfertig	2700 ng/L 1,3 ml
Wash buffer salt Tween Waschpuffer (Salz) Tween		Salz zum Auflösen	
Conjugate Konjugat	rot	gebrauchsfertig	7,5 ml
Substrate/Chromogen Substrat/Chromogen Red Chromogen Pro	braun	gebrauchsfertig	10 ml
Stop solution Stopp Lösung	gelb	gebrauchsfertig	14 ml

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1. Geräte:

Gerät	Milch	Fleisch	Leber	Niere	Urin Plasma Serum	Haare	Auge	Futter- mittel
Mikrotiterplatten- Photometer (450 nm)	•	•	•	•	•	•	•	•
Messpipetten	•	•	•	•	•	•	•	•
variable 20 - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten	•	•	•	•	•	•	•	•
Zentrifuge		•	•	•		•	•	•
Schüttler		•					•	•
Mixer		•	•	•			•	•
Evaporator		•						
Vortex		•	•	•			•	•
Wasserbad oder Heizplatte						•		
Trockenschrank (optional)						•		

5.2. Reagenzien:

Reagenz	Rind-/ Schweine- fleisch	Geflügel	Leber	Niere	Haare	Auge	Futter- mittel
≥ 99 % Acetonitril	•	•	•	•			
50 % Acetonitril in dest. Wasser							•
Hexan		•					
RIDA® Sample Decolorant (R1699)			•				•
0,2 M HCl					•	•	
0,2 M NaOH					•	•	
0,5 M Na ₂ HPO ₄ , pH 7,0					•	•	
dest. Wasser mit 0,2 % Tween 20					•		

6. Vorsichtsmaßnahmen

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

Dieses Kit kann gesundheitsgefährdende Substanzen enthalten.

Sicherheitshinweise zu den enthaltenen Komponenten entnehmen Sie bitte den Sicherheitsdatenblättern (MSDS) zu diesem Produkt auf unserer Internetseite www.r-biopharm.de.

7. Reagenzien und ihre Lagerung

Die Reagenzien bei 2 - 8 °C lagern. Komponenten des Testkits auf keinen Fall einfrieren.

Nicht benötigte Kavitäten zusammen mit dem Trockenmittel im Folienbeutel gut verschlossen aufbewahren und weiterhin bei 2 - 8 °C lagern.

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

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

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

8. Anzeichen für Reagenzienverfall

- bläuliche Färbung des rötlichen Substrat/Chromogen vor Zugabe in die Kavitäten
- Extinktion kleiner 0,6 (E450 nm < 0,6) für Standard 1

9. Probenvorbereitung

Die Proben kühl lagern.

9.1. Kuhmilch (Roh-, Frisch-, H-, Voll-, fettarm, Laktose-frei)

- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

9.2. Fleisch (Rind, Schwein, Geflügel)

- Muskelfleisch vollständig homogenisieren
- 6 ml Acetonitril zu 2 g homogenisiertem Fleisch geben und 10 s intensiv vortexen
- 15 min über Kopf schütteln
- zentrifugieren: 10 min / 3.000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 4 ml des Überstands in ein neues Glasgefäß überführen und unter einem milden Luft- oder Stickstoffstrom bei maximal 60 °C bis zur Trockene evaporieren
- trockenen Rückstand in 2 ml Waschpuffer aufnehmen

Rind- und Schweinefleisch

- 50 µl der Probe pro Kavität im Test einsetzen

Geflügelfleisch

- 1 ml Hexan zugeben und 10 s vortexen
- zentrifugieren: 10 min / 3.000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 50 µl der unteren Phase pro Kavität im Test einsetzen

9.3. Leber (Rind, Schwein)

- RIDA® Sample Decolorant (R1699) Reagenz 1 1:4 (1+3) mit dest. Wasser verdünnen
- Leber vollständig homogenisieren
- 1,5 ml Acetonitril zu 3 g homogenisierter Leber geben und 10 s intensiv vortexen
- 10 min ruhend inkubieren
- 10 s vortexen
- zentrifugieren: 10 min / 4.000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 250 µl des Überstands in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen
- 350 µl verdünntes RIDA® Sample Decolorant Reagenz 1 zugeben und kurz vortexen
- 100 µl RIDA® Sample Decolorant Reagenz 2 hinzu geben und kurz vortexen
- 5 min ruhend inkubieren
- zentrifugieren: 2 min / 12.000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 50 µl RIDA® Sample Decolorant Reagenz 3 hinzu geben und durch vorsichtiges invertieren mischen
- 5 min ruhend inkubieren
- zentrifugieren: 2 min / 12.000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 50 µl des Überstands pro Kavität im Test einsetzen

9.4. Niere (Rind, Schwein)

- Niere vollständig homogenisieren
- 1,5 ml Acetonitril zu 3 g homogenisierter Niere geben und 10 s intensiv vortexen
- 10 min ruhend inkubieren
- 10 s vortexen
- zentrifugieren: 10 min / 4.000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 300 µl Überstand in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen und mit 600 µl Waschpuffer vermischen
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

9.5. Urin, Plasma/Serum (Rind, Schwein)

- 25 µl pro Kavität im Test einsetzen

9.6. Haare (vom Rind)

- Haare in reichlich dest. Wasser einweichen
- Haare insgesamt 3 mal in Wasser mit 0,2 % Tween 20 waschen
- Haare mit dest. Wasser spülen
- Haare trocknen (z. B. 24 - 48 h im Trockenschrank bei 60 °C)
- 0,5 g Haar einwiegen und mit 5 ml 0,2 M HCl für 30 min bei 100 °C kochen
- zentrifugieren: 10 min / 3.000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 200 µl Überstand in ein neues Gefäß überführen
- 100 µl 0,2 M NaOH und 200 µl 0,5 M Na₂HPO₄, pH 7,0 zugeben und gut mischen
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

9.7. Auge (Rind, Schwein)

- das Auge zur Präparation in geeignetes Gefäß (z. B. Petrischale, Wägeschale) legen und Fett, Sehnen etc. entfernen
- mit Blick auf die Pupille, das Skalpell seitlich am Auge ansetzen und einen radialen Schnitt durch die äußere Augenhaut setzen bis Glaskörper und Augenkammerwasser austreten.
- Glaskörper und Augenkammerwasser auffangen
- die Linse aus dem Glaskörper entfernen und werfen
- das pigmentierte Epithel der Retina mit dem Skalpell abschaben und zusammen mit Augenkammerwasser und Glaskörper in ein neues Gefäß überführen
- Augenkammerwasser, Glaskörper und Retinaepithel vollständig homogenisieren
- 0,5 g homogenisierte Probe in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß einwiegen
- 0,5 ml 0,2 M HCl zugeben und 30 min schütteln
- zentrifugieren: 3 min / 12.000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 300 µl Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführen
- mit 50 µl 0,2 M NaOH neutralisieren
- 100 µl 0,5 M Na₂HPO₄ pH 7 zugeben und gut mischen
- 50 µl der Probe pro Kavität in den Test einsetzen

9.8. Futtermittel (für Rinder, Schweine, Geflügel)

- RIDA[®] Sample Decolorant (R1699) Reagenz 1 1:4 (1+3) mit dest. Wasser verdünnen
- Futtermittel fein vermahlen
- 5 ml 50 % Acetonitril zu 2 g fein gemahlenem Futtermittel geben und kurz vortexen
- 15 min über Kopf schütteln
- Proben 10 min auf Eis stellen
- zentrifugieren: 10 min / 4.000 g / 4 °C
(wenn keine Kühlzentrifuge vorhanden ist, dann die Proben vor der Zentrifugation insgesamt 15 min auf Eis stellen)
- 200 µl der oberen Phase in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen
- 300 µl verdünntes RIDA[®] Sample Decolorant Reagenz 1 und 200 µl RIDA[®] Sample Decolorant Reagenz 2 zugeben
- kurz vortexen und 5 min ruhend inkubieren
- zentrifugieren: 2 min / 12.000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 100 µl von RIDA[®] Sample Decolorant Reagenz 3 zugeben und durch vorsichtiges invertieren mischen
- 5 min ruhend inkubieren
- zentrifugieren: 2 min / 12.000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 50 µl des Überstands pro Kavität in Test einsetzen

10. Testdurchführung

10.1. Testvorbereitungen

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

Als **Waschpuffer** wird ein PBS-Tween-Puffer benötigt, benutzen Sie dazu bitte das beiliegende Waschpuffer-Salz (siehe 4.). Zur Herstellung des Puffers den gesamten Inhalt des Beutels in 1 L destilliertem Wasser lösen. Der gelöste Waschpuffer ist bei 2 - 8 °C ca. 4 - 6 Wochen haltbar.

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

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 in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.
3. Urin- / Plasmaproben:
25 µl Waschpuffer in jede Probenkavität vorlegen. 25 µl Urin- / Plasmaprobe als Doppelbestimmung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.
Alle anderen Proben:
50 µl vorbereitete Probe als Doppelbestimmung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.
4. 30 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
5. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf saugfähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit jeweils 250 µl Waschpuffer (siehe 10.1.) waschen. Diesen Vorgang zweimal wiederholen.
6. Je 50 µl Konjugat in die entsprechenden Kavitäten pipettieren, vorsichtig manuell mischen und 15 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
7. 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.
8. Je 100 µl Substrat/Chromogenlösung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 15 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
9. Je 100 µl Stopp Lösung in jede Kavität pipettieren und vorsichtig manuell mischen. Die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 15 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.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 Clenbuterol-Konzentration [ng/L] auftragen.

Um die in einer Probe enthaltene tatsächliche Clenbuterol-Konzentration in ng/l oder ng/kg bzw. µg/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:

Milch.....	1
Fleisch.....	2
Leber, Niere	4,5
Urin	2
Plasma/Serum.....	2
Haare	25
Auge.....	3
Futtermittel	10

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[®] Clenbuterol

Brief information

RIDASCREEN[®] Clenbuterol (Art. No.: R1711) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of clenbuterol in milk, meat, liver, kidney, urine, plasma/serum, hair, eyeball 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:

- Milk: direct use
- Meat: homogenization, extraction, evaporation
- Liver: homogenization, extraction, treatment with RIDA[®] Sample Decolorant (R1699)
- Kidney: homogenization, extraction
- Urine, plasma/serum: direct use
- Hair: washing, boiling
- Eyeball: dissection, extraction
- Feed: grinding, extraction, treatment with RIDA[®] Sample Decolorant (R1699)

Time requirement:

sample preparation (for 10 samples)	
Beef / pork.....	approx. 1.5 h
Poultry.....	approx. 2 h
Liver.....	approx. 1.5 h
Kidney.....	approx. 1 h
Urine, plasma/serum.....	approx. 15 min
Hair (without drying).....	approx. 1 h
Eyeball.....	approx. 1.5 h
Feed.....	approx. 1 h
test implementation (incubation time).....	1 h

Limit of Detection
(corresponding to the
standard substance)

Milk.....	approx. 50 ng/L (ppt)
Meat.....	approx. 100 ng/kg (ppt)
Liver.....	approx. 150 ng/kg (ppt)
Kidney.....	approx. 200 ng/kg (ppt)
Urine.....	approx. 100 ng/L (ppt)
Plasma/Serum.....	approx. 250 ng/L (ppt)
Hair.....	approx. 2 µg/kg (ppb)
Eyeball.....	approx. 200 ng/kg (ppt)
Feed.....	approx. 600 ng/kg (ppt)

Recovery rate:	Milk.....	approx. 81 %
(corresponding to the	Beef/pork.....	approx. 106 %
standard substance)	Poultry.....	approx. 99 %
	Liver	approx. 87 %
	Kidney	approx. 102 %
	Urine (bovine).....	approx. 73 %
	Urine (porcine)	approx. 91 %
	Plasma/serum	approx. 106 %
	Hair	approx. 111 %
	Eye ball	approx. 89 %
	Feed.....	approx. 92 %

The specificity of the RIDASCREEN® Clenbuterol 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)	100 %
	Mabuterol.....	approx. 95 %
	Brombuterol	approx. 87 %
	Bromchlorbuterol	approx. 85 %
	Terbutaline.....	approx. 23 %
	Salbutamol.....	approx. 20 %
	Carbuterol.....	approx. 15 %
	Adrenalin, Boldenone, Cimaterol, Clenproperol, Isoproterenol, Phenylbutazone, Ractopamin, Triamcinolonhexacetonide, Zilpaterol.....	< 1 %

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

Related products

RIDA[®] Clenbuterol Spiking Solution.....(R1799)

1. Intended use

RIDASCREEN[®] Clenbuterol (Art. No.: R1711) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative determination of clenbuterol in milk, meat, liver, kidney, urine, plasma/serum, hair, eyeball and feed.

2. General

Clenbuterol belongs to the group of β -agonists. 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 accelerated. However, such compounds have not been authorized as fattening adjuvants up to now. In addition to its lipolytic and anabolic effect, clenbuterol has a relaxing effect on non-striated musculature, on which its therapeutic employment as an antiasthmatic and a tocolytic agent is based. In comparison to therapeutic use clenbuterol is administered at 5 to 10 times higher dosages, when employed as a fattening adjuvant. Therefore, it is possible that clenbuterol residues, after use in illegal practice, may lead to a risk for consumers.

3. Test principle

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

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 Clenbuterol 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	1.3 ml
Standard 2	White	Ready to use	75 ng/L	1.3 ml
Standard 3	White	Ready to use	150 ng/L	1.3 ml
Standard 4	White	Ready to use	300 ng/L	1.3 ml
Standard 5	White	Ready to use	900 ng/L	1.3 ml
Standard 6	White	Ready to use	2700 ng/L	1.3 ml
Wash buffer salt Tween		Salt for dissolving		
Conjugate	Red	Ready to use		7.5 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:

Equipment	milk	meat	liver	kidney	urine plasma serum	hair	eyeball	feed
microtiter plate spectrophotometer (450 nm)	•	•	•	•	•	•	•	•
graduated pipettes	•	•	•	•	•	•	•	•
variable 20 µl - 200 µl and 200 - 1000 µl micropipettes	•	•	•	•	•	•	•	•
centrifuge		•	•	•		•	•	•
shaker		•					•	•
mixer		•	•	•			•	•
evaporator		•						
vortex		•	•	•			•	•
water bath or heating plate						•		
drying oven (optional)						•		

5.2. Reagents:

Reagent	beef pork	poultry	liver	kidney	hair	eyeball	feed
≥ 99 % acetonitrile	•	•	•	•			
50 % acetonitrile in distilled water							•
hexane		•					
RIDA® Sample Decolorant (R1699)			•				•
0.2 M HCl					•	•	
0.2 M NaOH					•	•	
0.5 M Na ₂ HPO ₄ , pH 7.0					•	•	
distilled water with 0.2 % Tween 20					•		

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

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

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

8. Indication of instability or deterioration of reagents

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

9. Preparation of Samples

The samples should be stored in a cool place.

9.1. Bovine milk (raw, fresh, pasteurized, full cream, skimmed, lactose-free)

- use 50 µl per well in the assay

9.2. Meat (beef, pork, poultry)

- homogenize meat completely
- add 6 ml of acetonitrile to 2 g of homogenized meat and vortex vigorously for 10 s
- shake 15 min upside down
- centrifuge: 10 min / 3,000 g / room temperature (20 - 25 °C)
- transfer 4 ml of supernatant into a new glass vial and evaporate to complete dryness under a weak air or nitrogen stream at 60 °C
- reconstitute dry residue in 2 ml of wash buffer

beef and pork

- use 50 µl per well in the assay

poultry

- add 1 ml of hexane and vortex for 10 s
- centrifuge: 10 min / 3,000 g / room temperature (20 - 25 °C)
- use 50 µl of lower phase per well in the assay

9.3. Liver (bovine, porcine)

- dilute RIDA[®] Sample Decolorant (R1699) Reagent 1 1:4 (1+3) with dist. water
- homogenize liver completely
- add 1.5 ml of acetonitrile to 3 g of homogenized liver and vortex vigorously for 10 s
- incubate for 10 min on the bench
- vortex for 10 s
- centrifuge: 10 min / 4,000 g / room temperature (20 - 25 °C)
- transfer 250 µl of the supernatant into a 1.5 ml reaction vial
- add 350 µl of diluted RIDA[®] Sample Decolorant Reagent 1 and vortex shortly
- add 100 µl of RIDA[®] Sample Decolorant Reagent 2 and vortex shortly
- incubate for 5 min on the bench
- centrifuge: 2 min / 12,000 g / room temperature (20 - 25 °C)
- add 50 µl RIDA[®] Sample Decolorant Reagent 3 and mix carefully by inverting
- incubate for 5 min on the bench
- centrifuge: 2 min / 12,000 g / room temperature (20 - 25 °C)
- use 50 µl of the supernatant per well in the assay

9.4. Kidney (bovine, porcine)

- homogenize kidney completely
- add 1.5 ml of acetonitrile to 3 g of homogenized kidney and vortex vigorously for 10 s
- incubate for 10 min on the bench
- vortex for 10 s
- centrifuge: 10 min / 4,000 g / room temperature (20 - 25 °C)
- transfer 300 µl of the supernatant into a 1.5 ml reaction vial, add 600 µl of wash buffer and mix
- use 50 µl per well in the assay

9.5. Urine, plasma/serum (bovine, porcine)

- use 25 µl per well in the assay

9.6. Hair (bovine)

- soak hair in plenty of distilled water
- wash hair 3 times in water containing 0,2 % Tween 20
- rinse hair with distilled water
- dry hair (e.g. in drying oven at 60 °C for 24 to 48 h)
- add 5 ml of 0.2 M HCl to 0.5 g of hair and boil for 30 min at 100 °C
- centrifuge: 10 min / 3.000 g / room temperature (20 - 25 °C)
- transfer 200 µl of supernatant into a new vial
- add 100 µl 0.2 M NaOH and 200 µl 0.5 M Na₂HPO₄, pH 7.0 and mix
- use 50 µl per well in the assay

9.7. Eyeball (bovine and porcine)

- for preparation, place eyeball into a suitable container (e.g. petri dish, scale pan) and remove fat, sinews, etc.
- facing the pupil, position the scalpel on the side of the eyeball and perform a radial cut through the outer eye layer until vitreous body and aqueous humor leak out
- collect vitreous body and aqueous humor
- remove the lens from the vitreous body and discard lens
- scrape off the pigmented retina epithelium with a scalpel and transfer along with the vitreous body and aqueous humor to a new vial
- homogenize vitreous body, aqueous humor and retina epithelium completely
- transfer 0.5 g of homogenized sample into a 1.5 ml reaction vial
- add 0.5 ml 0.2 M HCl and shake for 30 min
- centrifuge: 3 min / 12,000 g / room temperature (20 - 25 °C)
- transfer 300 µl of supernatant to a new vial
- neutralize with 50 µl 0.2 M NaOH
- add 100 µl 0.5 M Na₂HPO₄ pH 7 and mix well
- use 50 µl per well in the assay

9.8. Feed (cattle, pig, broiler)

- dilute RIDA[®] Sample Decolorant (R1699) Reagent 1 1:4 (1+3) with dist. water
- grind feed finely
- add 5 ml of 50 % acetonitrile to 2 g of grinded feed and vortex shortly
- shake for 15 min upside down
- chill on ice for 10 min
- centrifuge: 10 min / 4,000 g / 4 °C
- (if no refrigerated centrifuge is available, chill samples on ice ahead of centrifugation for a total of 15 min)
- transfer 200 µl of the upper phase into a new 1.5 ml reaction vial
- add 300 µl of diluted RIDA[®] Sample Decolorant Reagent 1 and 200 µl RIDA[®] Sample Decolorant Reagent 2
- vortex shortly and incubate for 5 min on the bench
- centrifuge: 2 min / 12,000 g / room temperature (20 - 25 °C)
- add 100 µl of RIDA[®] Sample Decolorant Reagent 3 and mix carefully by inverting
- incubate for 5 min on the bench
- centrifuge: 2 min / 12,000 g / room temperature (20 - 25 °C)
- use 50 µl of the supernatant per well in the assay

10. Test implementation

10.1. Test preparation

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

A PBS-Tween buffer is needed as **wash buffer**, please use the wash buffer salt contained in the kit (see 4.). Dissolve the total content of the pouch in one liter of distilled water. The ready to use wash buffer expires after approx. 4 - 6 weeks at 2 - 8 °C.

Alternatively: Dissolve the contents of the pouch in 100 ml of distilled water to obtain a 10fold concentrated washing buffer. Use one part of this concentrate and dissolve with 9 parts of distilled water to obtain the ready to use wash buffer.

This 10fold concentrate expires after approx. 8 - 12 weeks, stored at room temperature (20 - 25 °C).

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 to separate duplicate wells.
3. Urine / plasma samples:
Add 25 µl wash buffer to each sample well. Add 25 µl urine or plasma sample to separate duplicate wells.
All other samples:
Add 50 µl of each prepared sample to separate duplicate wells.
4. Incubate for 30 min at room temperature (20 - 25 °C) and in the dark.
5. Pour the liquid out of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times in a row) against absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all the wells with 250 µl wash buffer (see 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat two more times.
6. Add 50 µl of conjugate to each well, mix gently by shaking the plate manually and incubate in the dark for 15 min at room temperature (20 - 25 °C).
7. Pour the liquid out of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times in a row) against absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all the wells with 250 µl wash buffer (see 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat two more times.
8. 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) in the dark.
9. 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 15 minutes after addition of stop solution.

11. Results

A special software, the 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 Clenbuterol concentration [ng/L].

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

milk.....	1
meat, urine	2
liver, kidney	4.5
urine	2
plasma/serum.....	2
hair	25
eyeball.....	3
feed.....	10

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