

# **RIDASCREEN<sup>®</sup> Aflatoxin B<sub>1</sub> 30/15**

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von  
Aflatoxin B<sub>1</sub>

Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of  
Aflatoxin B<sub>1</sub>

Art. No.: R1211

In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C

Storage at 2 - 8 °C

R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Telefax: +49 (0) 61 51 81 02-20

Anschrift:

R-Biopharm AG  
An der neuen Bergstraße 17  
D-64297 Darmstadt  
[www.r-biopharm.de](http://www.r-biopharm.de)

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Telefon:

Zentrale / Auftragsannahme (0 61 51) 81 02-0

Telefax / E-Mail:

Auftragsannahme (0 61 51) 81 02-20  
[orders@r-biopharm.de](mailto:orders@r-biopharm.de)

Marketing

(0 61 51) 81 02-40  
[info@r-biopharm.de](mailto:info@r-biopharm.de)

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

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

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

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

## Kurzinformation

RIDASCREEN® Aflatoxin B<sub>1</sub> 30/15 (Art. Nr.: R1211) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Aflatoxin B<sub>1</sub> in Getreide 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:	Getreide und Futtermittel: zerkleinern, extrahieren, filtrieren und verdünnen
Zeitbedarf:	Probenvorbereitung (für 10 Proben) Getreide und Futtermittel ..... ca. 30 min Testdurchführung (Inkubationszeit)..... 45 min
Nachweisgrenze:	1 ppb
Wiederfindungsrate:	80 - 100 % bei künstlich kontaminierten Getreideproben (Variationskoeffizient ca. 8 %)
Spezifität:	Die Spezifität des RIDASCREEN® Aflatoxin B <sub>1</sub> 30/15-Tests wurde durch die Bestimmung der Kreuzreaktivität zu den entsprechenden Substanzen ermittelt.  Aflatoxin B <sub>1</sub> ..... 100 % Aflatoxin G <sub>1</sub> .....ca. 29 % Aflatoxin B <sub>2</sub> .....ca. 13 % Aflatoxin G <sub>2</sub> .....ca. 3,2 % Aflatoxin M <sub>1</sub> .....ca. 1,5 %

## 1. Verwendungszweck

RIDASCREEN® Aflatoxin B<sub>1</sub> 30/15 ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Aflatoxin B<sub>1</sub> in Getreide und Futtermitteln.

## 2. Allgemeines

Aflatoxine sind sekundäre Stoffwechselprodukte der Schimmelpilze *Aspergillus flavus*, *parasiticus* und *nomius*. Diese Pilzarten kommen in feuchten tropischen Gebieten vor und die Kontamination der pflanzlichen Lebensmittel erfolgt in den Anbauländern. Aflatoxine gehören zu den stärksten natürlich vorkommenden kanzerogenen Substanzen.

Aflatoxin B<sub>1</sub>, das fast immer gemeinsam mit Aflatoxin B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> und G<sub>2</sub> vorkommt, ist das Aflatoxin mit der größten toxischen Bedeutung. Man findet es vor allem in Mais, Erdnüssen, Paranüssen, Baumwollsaamen und Pistazien.

Aufgrund der Toxizität dieser Mykotoxine gelten EU-weite Höchstmengen, 2 ppb für Aflatoxin B<sub>1</sub> und 4 ppb für Gesamtaflatoxin.

## 3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit Fänger-Antikörpern gegen anti-Aflatoxin-Antikörper beschichtet. Zugegeben werden Standards bzw. Probelösung, enzymmarkiertes Aflatoxin (Enzymkonjugat) und anti-Aflatoxin-Antikörper. Freies und enzymmarkiertes Aflatoxin konkurrieren um die Aflatoxin-Antikörperbindungsstellen (kompetitiver Enzymimmunoassay). Gleichzeitig werden auch die anti-Aflatoxin-Antikörper von den immobilisierten Fänger-Antikörpern gebunden. Nicht gebundenes, enzymmarkiertes Aflatoxin wird anschließend in einem Waschschrift wieder entfernt. Der Nachweis erfolgt durch Zugabe von Substrat/Chromogenlösung. Gebundenes Enzymkonjugat wandelt das Chromogen in ein blaues Endprodukt um. Die Zugabe von Stopp-Reagenz führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Messung erfolgt photometrisch bei 450 nm; die Extinktion der Lösung ist umgekehrt proportional zur Aflatoxin Konzentration in der Probe.

## 4. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien einer Packung können 96 Bestimmungen durchgeführt werden (einschließlich Standardbestimmungen). Jeder Testkit enthält:

- 1 x Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten (12 Streifen à 8 Einzelkavitäten)  
beschichtet mit Fänger-Antikörpern
- 6 x Aflatoxin B<sub>1</sub> Standards \*), je 1,3 ml  
0 ppb (Nullstandard), 1 ppb, 5 ppb, 10 ppb, 20 ppb, 50 ppb  
Aflatoxin B<sub>1</sub> in Methanol/Wasser  
gebrauchsfertig
- 1 x Konjugat (6 ml) .....roter Verschluss  
Peroxidase-konjugiertes Aflatoxin B<sub>1</sub>  
gebrauchsfertig
- 1 x Anti-Aflatoxin-Antikörper (6 ml).....schwarzer Verschluss  
gebrauchsfertig
- 1 x Substrat-/Chromogenlösung (10 ml).....brauner Verschluss  
rötlich gefärbt
- 1 x Stopp-Reagenz (14 ml)..... gelber Verschluss  
enthält 1 N Schwefelsäure
- 1 x Puffersalz (Briefchen) = Waschpuffer  
zur Herstellung eines 10 mM Phosphatpuffers (pH 7,4)  
enthält 0,05 % Tween 20

\*) Die Konzentrationsangaben berücksichtigen bereits den Verdünnungsfaktor 10, der sich aus der Probenvorbereitung ergibt. So können Aflatoxin B<sub>1</sub>-Konzentrationen der Proben direkt aus der Standardkurve abgelesen werden.

## 5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

### 5.1. Geräte:

- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Messzylinder (Plastik oder Glas) 100 ml
- zur Probenvorbereitung: Filtertrichter und Auffanggefäß (50 ml) aus Glas
- Labor- oder Getreidemühle
- optional: Schüttler
- Filterpapier: Whatman No. 1 oder Vergleichbares
- Messpipetten
- variable 20 µl - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten

## 5.2. Reagenzien:

- Methanol
- 70 % Methanol: 70 ml Methanol (100 %) mit 30 ml dest. Wasser mischen
- destilliertes oder deionisiertes Wasser

## 6. Vorsichtsmaßnahmen

Die Standards enthalten Aflatoxin B<sub>1</sub>, besondere Vorsicht ist geboten. Hautkontakt mit dem Reagenz vermeiden (Handschuhe verwenden).

Die Dekontamination von Glasgeräten und toxischen Lösungen erfolgt am zweckmäßigsten mit einer Natriumhypochlorit-Lösung (10 % (v/v)) über Nacht (Lösung mit HCl auf pH 7 einstellen).

Das Stopp-Reagenz enthält 1 N Schwefelsäure (R36/38, S2-26).

## 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.

Aflatoxin B<sub>1</sub> ist lichtempfindlich, deshalb die Aflatoxin B<sub>1</sub>-Standards vor direkter Lichteinwirkung schützen.

Die Substrat-/Chromogenlösung 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 der rötlich gefärbten Substrat-/Chromogenlösung vor Zugabe in die Kavitäten
- Extinktion kleiner 0,6 ( $E_{450\text{ nm}} < 0,6$ ) für den Nullstandard

## 9. Probenvorbereitung

Die Proben kühl und lichtgeschützt lagern.

Eine repräsentative Probe (eine unter offiziellen Probenahme-Vorschriften gezogene Probe) vor dem Extrahieren zerkleinern und mischen.

- 5 g der zerkleinerten Probe einwiegen und 25 ml 70 % Methanol \*) hinzufügen
- 3 min kräftig schütteln (manuell oder mittels Schüttler)
- den Extrakt durch einen Whatman No. 1 Papierfilter (oder vergleichbaren Filter) filtrieren
- 1 ml des Filtrats mit 1 ml destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen
- 50 µl des verdünnten Filtrats pro Kavität im Test einsetzen

\*) die Probeneinwaage kann entsprechend vergrößert werden, aber dazu muss das Volumen des Methanol/Wasser-Gemisches angepasst werden z. B. 10 g in 50 ml 70 % Methanol

### Anmerkung:

**Sind höhere Aflatoxin-Konzentrationen zu erwarten, müssen die Proben weiter verdünnt werden. Bitte beachten Sie, dass die Proben zum Einsatz in den Test immer in einer Methanol/Wasser-Lösung (35/65) vorliegen müssen!**

## 10. Testdurchführung

### 10.1. Testvorbereitungen

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

**Die Aflatoxin B<sub>1</sub>-Standardlösungen** liegen gebrauchsfertig vor. Der Verdünnungsfaktor 10 für die Proben wurde beim Etikettieren der Standardfläschchen bereits berücksichtigt. Deshalb kann die Aflatoxin B<sub>1</sub>-Konzentration der Proben direkt aus der Standardkurve abgelesen werden.

Als **Waschpuffer** wird ein PBS-Tween-Puffer benötigt, benutzen Sie dazu bitte das beiliegende Pufferbriefchen (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.

## 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 benötigt werden. Die Positionen der Standards und der Proben protokollieren.
2. 50 µl Standard oder vorbereitete Probe in die entsprechenden Kavitäten pipettieren; für jeden Standard oder Probe neue Pipettenspitzen benutzen.
3. Je 50 µl Enzymkonjugat (roter Verschluss) in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.
4. 50 µl der anti-Aflatoxin-Antikörperlösung (schwarzer Verschluss) in jede Kavität pipettieren. Vorsichtig durch leichte manuelle Bewegung der Platte mischen und 30 min (+/- 1) bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubieren.
5. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf sauberen, saugfähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit jeweils 250 µl Waschpuffer (siehe 10.1.) waschen. Diesen Waschvorgang zweimal wiederholen.
6. 100 µl Substrat/Chromogen (brauner Verschluss) in jede Kavität pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 15 min (+/- 1) bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
7. 100 µl Stopp-Reagenz (gelber Verschluss) in jede Kavität pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 15 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 RIDA®SOFT Win (Art. Nr. Z9999), erhältlich.

Wir empfehlen für Einzelbestimmungen die Auswertung mit Logit/log und für Doppel- oder Mehrfachbestimmungen sollte Cubic Spline verwendet werden.

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 Aflatoxin B<sub>1</sub>-Konzentration [µg/kg] auftragen.

Die Aflatoxin B<sub>1</sub>-Konzentration in µg/kg (ppb) kann entsprechend der Extinktion jeder Probe aus der Eichkurve abgelesen werden.

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. Darüber hinaus gehende Ansprüche für direkte oder indirekte Schäden oder Kosten aus der Nutzung der Produkte entstehen nicht.

# RIDASCREEN<sup>®</sup> Aflatoxin B<sub>1</sub> 30/15

## Brief information

RIDASCREEN<sup>®</sup> Aflatoxin B<sub>1</sub> 30/15 (Art. No.: R1211) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of Aflatoxin B<sub>1</sub> in cereals 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: cereals and feed: grinding, extraction, filtration and dilution

Time requirement: sample preparation (for 10 samples)  
cereals and feed ..... approx. 30 min  
test implementation (incubation time) ..... 45 min

Detection limit: 1 ppb

Recovery rate: 80 - 100 % in spiked cereal samples (coefficient of variation approx. 8 %)

Specificity: The specificity of the RIDASCREEN<sup>®</sup> Aflatoxin B<sub>1</sub> 30/15 test was determined by analyzing the cross-reactivities to corresponding substances.

Aflatoxin B <sub>1</sub> .....	100 %
Aflatoxin G <sub>1</sub> .....	approx. 29 %
Aflatoxin B <sub>2</sub> .....	approx. 13 %
Aflatoxin G <sub>2</sub> .....	approx. 3.2 %
Aflatoxin M <sub>1</sub> .....	approx. 1.5 %

## 1. Intended use

RIDASCREEN® Aflatoxin B<sub>1</sub> 30/15 is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of aflatoxin B<sub>1</sub> in cereals and feed.

## 2. General

Aflatoxins are secondary metabolites of the fungi species *Aspergillus flavus*, *parasiticus* and *nomius*. These fungi occur in humid tropical areas and the contamination of vegetable food takes place in the cultivable countries. Aflatoxins belong to the strongest natural occurring carcinogenic substances.

Aflatoxin B<sub>1</sub> appears nearly in all cases together with Aflatoxin B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> and it is the analyte with the highest toxic significance. It is commonly found in corn, peanuts, brazil nuts, cotton seed and pistachios.

Depending on the toxicity of these mycotoxins in the countries of the EU equal limits are valid for aflatoxins, 2 ppb for aflatoxin B<sub>1</sub> and 4 ppb for all aflatoxins in total.

## 3. Test principle

The basis of the test is the antigen-antibody reaction. The microtiter wells are coated with capture antibodies directed against anti-aflatoxin antibodies.

Aflatoxin standards or sample solutions, aflatoxin enzyme conjugate and anti-aflatoxin antibodies are added. Free aflatoxin and aflatoxin enzyme conjugate compete for the aflatoxin antibody binding sites (competitive enzyme immunoassay). At the same time, the anti-aflatoxin antibodies are also bound by the immobilized capture antibodies. Any unbound enzyme 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 absorbance is inversely proportional to the aflatoxin concentration in the sample.

## 4. Reagents provided

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

- 1 x Microtiter plate (12 strips with 8 removable wells each)  
coated with capture antibodies
- 6 x Aflatoxin B<sub>1</sub> standards <sup>\*)</sup>, 1.3 ml each  
0 ppb (zero standard), 1 ppb, 5 ppb, 10 ppb, 20 ppb, 50 ppb  
aflatoxin B<sub>1</sub>, in methanol/water  
ready to use
- 1 x Conjugate (6 ml) .....red cap  
peroxidase conjugated aflatoxin B<sub>1</sub>  
ready to use
- 1 x Anti-aflatoxin antibody (6 ml) ..... black cap  
ready to use
- 1 x Substrate/chromogen (10 ml) ..... brown cap  
stained red, contains urea peroxide
- 1 x Stop solution (14 ml) .....yellow cap  
contains 1 N sulfuric acid
- 1 x Buffer salt (envelope) = washing buffer  
for preparation of a 10 mM phosphate buffer (pH 7.4)  
contains 0.05 % Tween 20

\*) The dilution factor 10 for the sample has already been considered. Therefore, the aflatoxin B<sub>1</sub> concentrations of samples can be read directly from the standard curve.

## 5. Reagents required but not provided

### 5.1. Equipment:

- microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- graduated cylinder (plastic or glass) 100 ml
- glassware for preparing sample extract: filter funnel and 50 ml flask
- grinder (mill)
- optional: shaker
- filter paper: Whatman No. 1 or equivalent
- graduated pipettes
- variable 20 µl - 200 µl und 200 - 1000 µl micropipettes

## 5.2. Reagents:

- methanol
- 70 % methanol solution: prepare 70 % methanol solution by mixing 70 ml methanol (100 %) with 30 ml distilled or deionized water
- distilled or deionized water

## 6. Warnings and precautions for the users

The standard solutions contain aflatoxin B<sub>1</sub>, particular care should be taken. Avoid contact of the reagent with the skin (use gloves).

Decontamination of glassware and aflatoxin B<sub>1</sub> solutions is best carried out using a sodium hypochlorite (bleach) solution (10 % (v/v)), adjust solution with HCl to pH 7) overnight.

The stop solution contains 1 N sulfuric acid (R36/38, S2-26).

## 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).

Aflatoxin B<sub>1</sub> is light sensitive, therefore, protect the aflatoxin B<sub>1</sub> standards from exposure to direct light.

The substrate/chromogen solution 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 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 zero standard

## 9. Preparation of Samples

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

A representative sample (according to accepted sampling techniques) should be ground and thoroughly mixed prior to proceeding with the extraction procedure.

- weigh 5 g of ground sample into a suitable container and add 25 ml of 70 % methanol \*)
- shake vigorously for three minutes (manually or with shaker)
- filter the extract through Whatman No. 1 filter (or equivalent)
- dilute 1 ml of the obtained filtrate with 1 ml of distilled or deionized water
- use 50 µl of the diluted filtrate per well in the test

\*) sample size may be increased if required, but the volume of methanol/water must be adapted accordingly, e.g.: 10 g in 50 ml of 70 % methanol

### Remark:

**If the aflatoxin concentration is expected to be higher, the sample must be diluted again. Please note that the samples ready to use in the assay have to be in methanol/water (35/65) solution!**

## 10. Test implementation

### 10.1. Preliminary comments

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

**The aflatoxin B<sub>1</sub> standards** are provided ready to use. The dilution factor 10 for the sample has been considered when labeling. Therefore, the aflatoxin B<sub>1</sub> concentration of samples can be read directly from the standard curve.

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

Alternative: Dissolve the contents of the envelope in only 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 / 68 - 77 °F).

Use 1 part of this concentrate and dissolve with 9 parts of distilled water to obtain the ready to use washing 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. Record standard and sample positions.
2. Pipet 50 µl of standard or prepared sample into separate wells; use a new pipette tip for each standard or sample.
3. Add 50 µl of enzyme conjugate (red cap) to the bottom of each well.
4. Add 50 µl of anti-aflatoxin antibody solution (black cap) to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 30 min (+/- 1) at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
5. Pour the liquid out of the wells into a sink and tap the microwell holder upside down vigorously (three times in a row) onto a clean paper towel to remove all remaining liquid from the wells. Fill all the wells with 250 µl washing buffer (see 10.1.). Empty the wells again and remove all remaining liquid. Repeat the washing step two more times.
6. Add 100 µl of substrate/chromogen (brown cap) to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 15 min (+/- 1) at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark.
7. Add 100 µl of stop solution (yellow cap) 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<sup>®</sup>SOFT Win (Art. No. Z9999), is available for evaluation of the RIDASCREEN<sup>®</sup> enzyme immunoassays.

For single determinations we recommend logit/log evaluation and for double or multiple determinations cubic spline should be used.

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 the aflatoxin B<sub>1</sub> concentration [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ].

The aflatoxin B<sub>1</sub> concentration in  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (ppb) corresponding to the absorbance of each sample can be read from the calibration curve.

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. If any materials are defective, R-Biopharm will provide a replacement product. 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.