

## RIDASCREEN® Nitrofurantoin (SEM)

**REF R3724**

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung  
von Semicarbazid (SEM)

Enzyme immunoassay for the quantitative determination  
of semicarbazide (SEM)

In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C  
Storage at 2 - 8 °C



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt, Germany  
Phone: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Fax: +49 (0) 61 51 81 02-20

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Please contact for questions and further information:

R-Biopharm AG Zentrale  
Tel.: +49 (0) 61 51 - 81 02-0

R-Biopharm AG switchboard  
Phone: +49 (0) 61 51 - 81 02-0

Auftragsannahme  
Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20  
E-Mail: [orders@r-biopharm.de](mailto:orders@r-biopharm.de)

Order department  
Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20  
E-mail: [orders@r-biopharm.de](mailto:orders@r-biopharm.de)

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

Marketing & sales  
E-mail: [sales@r-biopharm.de](mailto:sales@r-biopharm.de)

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

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

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

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

## Kurzinformation

RIDASCREEN® Nitrofurantol (SEM) (R3724) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Semicarbazid (SEM) in Shrimps, Fleisch (Huhn, Schwein, Rind) und Fisch.

Alle Reagenzien für die Durchführung des Enzymimmunoassays, inkl. Standards, sind im Testkit enthalten. Der Testkit ist ausreichend für max. 48 Doppelbestimmungen (einschließlich Standardbestimmungen). Zur Auswertung benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

Probenvorbereitung: homogenisieren, derivatisieren, extrahieren, zentrifugieren, evaporieren und entfetten

Je nach Arbeitsablauf im Labor können eine 3-stündige oder eine Über-Nacht Derivatisierung durchgeführt werden. Für die höchste Präzision wird die Über-Nacht Methode empfohlen. Alle angegebenen Mittelwerte (für LOD, CC $\beta$ , Wiederfindung und Spezifität) beziehen sich auf diese Methode. Details zur 3-stündigen Derivatisierung sind dem Validierungsbericht zu entnehmen.

Zeitbedarf: Variante I (über-Nacht)  
Probenvorbereitung: ..... ca. 3 h  
Derivatisierung ..... ca. 16 h bei 37 °C

Variante II (3 h):  
Probenvorbereitung: ..... ca. 3 h  
Derivatisierung ..... ca. 3 h bei 50 °C

Testdurchführung (Inkubationszeit) ..... 45 min

Nachweisgrenze (LOD): Shrimps ..... ca. 300 ng/kg (ppt)  
Fleisch ..... ca. 200 ng/kg  
Fisch ..... ca. 200 ng/kg

Nachweisvermögen (CC $\beta$ ): Shrimps ..... 350 ng/kg  
(Bezogen auf die Fleisch ..... 350 ng/kg  
Standardsubstanz) Fisch ..... 350 ng/kg

Wiederfindungsrate:	Shrimps .....	ca. 100 %
(Bezogen auf die	Fleisch .....	ca. 116 %
Standardsubstanz)	Fisch .....	ca. 85 %

Spezifität:	Nitrophenyl-(NP) SEM (Standardsubstanz) ....	100 %
	Nitrofurazon .....	1,37 %
	Semicarbazid (SEM) .....	0,02 %
	Furaltadon, Furazolidon, Nitrofurantoin .....	< 0,01 %
	Chloramphenicol, AMOZ, AOZ, AHD .....	< 0,01 %
	2-NP-AMOZ, 2-NP-AOZ, 2-NP-AHD .....	< 0,01 %

Die Spezifität des RIDASCREEN® Nitrofurantoin (SEM) 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 Werten 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.

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

## Produktangebot

RIDA® Nitrofurantoin (SEM) Dotierlösung .....	(R3797)
RIDASCREEN® Nitrofurantoin (AOZ) .....	(R3703)
RIDASCREEN® Nitrofurantoin (AHD) .....	(R3713)
RIDASCREEN® Nitrofurantoin (AMOZ) .....	(R3722)
RIDASCREEN® Chloramphenicol .....	(R1511)
RIDA® Nitrofurantoin (AOZ) Dotierlösung .....	(R3798)
RIDA® Nitrofurantoin (AHD) Dotierlösung .....	(R3796)
RIDA® Nitrofurantoin (AMOZ) Dotierlösung .....	(R3799)
RIDA® Chloramphenicol Dotierlösung .....	(R1599)

## 1. Verwendungszweck

RIDASCREEN® Nitrofurantoin (SEM) (R3724) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von SEM in Shrimps, Fleisch (Huhn, Schwein, Rind) und Fisch.

## 2. Allgemeines

Nitrofurane sind synthetische Breitbandantibiotika, die aufgrund ihrer hervorragenden antibakteriellen und pharmakokinetischen Eigenschaften häufig in der Tierproduktion eingesetzt werden. Sie werden aber auch zur Wachstumsbeschleunigung in der Shrimps-, Geflügel- und Schweineproduktion eingesetzt. In Langzeitversuchen mit Labortieren wurden bei der Muttersubstanz und deren Metaboliten karzinogene und mutagene Eigenschaften beobachtet. Dies führte zu einem Anwendungsverbot von Nitrofuranen bei Tieren, die der Lebensmittelgewinnung dienen. Die Behandlung von Nutztieren mit den Nitrofurantoin-Antibiotika Furaltadon, Nitrofurantoin und Nitrofurazon wurde 1993 in der EU verboten, das Verbot von Furazolidon folgte 1995.

Die Rückstandsanalytik von Nitrofuranen basiert auf der Detektion der gewebegebundenen Metabolite der Muttersubstanzen. Da die Muttersubstanzen sehr schnell metabolisiert werden, sind sie nach kurzer Zeit nicht mehr nachweisbar. Die Nitrofurantoin-Metabolite sind jedoch noch lange nach Verabreichung nachweisbar und werden deshalb zur Rückstandskontrolle von Nitrofuranen bestimmt.

Muttersubstanz	Metabolit	Abkürzung
Nitrofurantoin	1-Aminohydantoin	AHD
Furaltadon	3-Amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinon	AMOZ
Furazolidon	3-Amino-2-oxazolidinon	AOZ
Nitrofurazon	Semicarbazid	SEM

Vor der Analyse müssen die Metabolite mittels Inkubation mit 2-Nitrobenzaldehyd (2-NBA) zu NP-AHD, NP-AMOZ, NP-AOZ und NP-SEM derivatisiert werden.

### 3. Testprinzip

Grundlage des ELISA-Testsystems ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit Fänger-Antikörpern und anti-SEM-Antikörpern beschichtet. Zugegeben werden Standards bzw. Probelösung und enzymmarkiertes SEM (Enzymkonjugat). Freies und enzymmarkiertes SEM konkurrieren um die SEM-Antikörperbindungsstellen (kompetitiver Enzymimmunoassay). Nicht gebundenes, enzym-markiertes SEM 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 des Stopp-Reagenzes führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Messung erfolgt photometrisch bei 450 nm; die Extinktion der Lösung ist umgekehrt proportional zur SEM-Konzentration in der Probe.

### 4. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien einer Packung können max. 48 Doppelbestimmungen durchgeführt werden (einschließlich Standardbestimmungen). Jeder Testkit enthält:

Komponente	Deckelfarbe	Zustand		Inhalt
<b>Microtiter plate</b> Mikrotiterplatte	-	Gebrauchsfertig		96 Kavitäten
<b>Standard 1</b> Standard 1	Weiß	Gebrauchsfertig	0 µg/L	1,3 ml
<b>Standard 2</b> Standard 2	Weiß	Gebrauchsfertig	100 ng/L	1,3 ml
<b>Standard 3</b> Standard 3	Weiß	Gebrauchsfertig	300 ng/L	1,3 ml
<b>Standard 4</b> Standard 4	Weiß	Gebrauchsfertig	900 ng/L	1,3 ml
<b>Standard 5</b> Standard 5	Weiß	Gebrauchsfertig	2700 ng/L	1,3 ml
<b>Standard 6</b> Standard 6	Weiß	Gebrauchsfertig	8100 ng/L	1,3 ml
<b>Wash buffer salt</b> <b>Tween</b> Waschpuffer	-	Salz zum Auflösen		
<b>Conjugate</b> Konjugat	Rot	Gebrauchsfertig		7,5 ml
<b>Substrate/ Chromogen</b> Substrat/ Chromogen Red Chromogen Pro	Braun	Gebrauchsfertig		13 ml
<b>Stop solution</b> Stopp-Lösung	Gelb	Gebrauchsfertig		14 ml
<b>2-Nitrobenzaldehyde</b> 2-Nitrobenzaldehyd		Feststoff		100 mg

## 5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

### 5.1 Geräte

- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Zentrifuge
- Schüttler (Vortex)
- Mixer (Stomacher, Ultraturrax)
- Evaporator
- Magnetrührer
- Pasteurpipetten
- Messpipetten
- Variable 20 - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten

### 5.2 Reagenzien

- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- 1 M HCl
- 1 M NaOH
- 0,1 M  $K_2HPO_4$
- Ethylacetat
- n-Hexan
- Dimethylsulfoxid (DMSO)

## 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 (SDS) zu diesem Produkt auf unserer Internetseite [www.r-biopharm.de](http://www.r-biopharm.de).

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften.

## 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) darf das Testkit nicht mehr verwendet 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 0,8 ( $E_{450\text{ nm}} < 0,8$ ) für den Nullstandard (Standard 1)

## 9. Probenvorbereitung

- Proben kühl und lichtgeschützt lagern
- 10 mM 2-Nitrobenzaldehyd (siehe Kapitel 4.) in Dimethylsulfoxid (DMSO) ansetzen  
(die Lösung muss jeweils vor Gebrauch frisch angesetzt werden, z. B. 7,6 mg 2-Nitrobenzaldehyd in 5 ml DMSO lösen)

### 9.1 Shrimps

- Shrimpsprobe zerkleinern und mit einem Mixer oder Pürierstab homogenisieren
- 1 g der homogenisierten Masse mit 4 ml destilliertem Wasser, 0,5 ml 1 M HCl und **100 µl** 10 mM 2-Nitrobenzaldehyd (in DMSO) kräftig vortexen

### Derivatisierung

- 3 h bei 50 °C inkubieren bzw. über Nacht (ca. 16 h) bei 37 °C inkubieren
- 5 ml 0,1 M  $K_2HPO_4$ , 0,4 ml 1 M NaOH und 10 ml Ethylacetat zugeben, 30 s vortexen



- Zentrifugieren: 10 min / 4000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 5 ml der Ethylacetatphase (obere Phase) in ein neues Gefäß überführen und bei ca. 60 °C bis zur Trockene evaporieren

Anmerkung: Bei fettreichen Shrimps können ölige, nicht evaporierbare Rückstände entstehen. Sollte lediglich ein öliger Rückstand zu erkennen sein, kann die Probe als fertig evaporiert betrachtet werden.

- Den Rückstand mit 1 ml n-Hexan lösen, 10 s vortexen und mit 1 ml Waschpuffer 30 s vortexen
- Zentrifugieren: 10 min / 4000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- Von der unteren, wässrigen Phase 750 µl abnehmen und 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

## 9.2 Fleisch

- Fleischprobe zerkleinern und mit einem Mixer oder Pürierstab homogenisieren
- 1 g der homogenisierten Masse mit 4 ml destilliertem Wasser, 0,5 ml 1 M HCl und **300 µl** 10 mM 2-Nitrobenzaldehyd (in DMSO) vortexen

### Derivatisierung

- 3 h bei 50 °C inkubieren bzw. über Nacht (ca. 16 h) bei 37 °C inkubieren
- 5 ml 0,1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,4 ml 1 M NaOH und 10 ml Ethylacetat zugeben, 30 s vortexen
- Zentrifugieren: 10 min / 4000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 5 ml der Ethylacetatphase (obere Phase) in ein neues Gefäß überführen und bei ca. 60 °C bis zur Trockene evaporieren

Anmerkung: Bei fettreichem Fleisch können ölige, nicht evaporierbare Rückstände entstehen. Sollte lediglich ein öliger Rückstand zu erkennen sein, kann die Probe als fertig evaporiert betrachtet werden.

- Den Rückstand mit 1 ml n-Hexan lösen, 10 s vortexen und mit 1 ml Waschpuffer 30 s vortexen
- Zentrifugieren: 10 min / 4000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- Von der unteren, wässrigen Phase 750 µl abnehmen und 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

## 9.3 Fisch

- Fischprobe zerkleinern und mit einem Mixer oder Pürierstab homogenisieren
- 1 g der homogenisierten Masse mit 4 ml destilliertem Wasser, 0,5 ml 1 M HCl und **200 µl** 10 mM 2-Nitrobenzaldehyd (in DMSO) vortexen

## Derivatisierung

- 3 h bei 50 °C inkubieren bzw. über Nacht (ca. 16 h) bei 37 °C inkubieren
- 5 ml 0,1 M  $K_2HPO_4$ , 0,4 ml 1 M NaOH und 10 ml Ethylacetat zugeben, 30 s vortexen
- Zentrifugieren: 10 min / 4000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 5 ml der Ethylacetatphase (obere Phase) in ein neues Gefäß überführen und bei ca. 60 °C bis zur Trockene evaporieren

Anmerkung: Bei fettreichen Fischen können ölige, nicht evaporierbare Rückstände entstehen. Sollte lediglich ein öliger Rückstand zu erkennen sein, kann die Probe als fertig evaporiert betrachtet werden.

- Den Rückstand mit 1 ml n-Hexan lösen, 10 s vortexen und mit 1 ml Waschpuffer 30 s vortexen
- Zentrifugieren: 10 min / 4000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- Von der unteren, wässrigen Phase 750 µl abnehmen und 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

## 10. Testdurchführung

### 10.1 Testvorbereitungen

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

Als Waschpuffer wird ein PBS-Tween-Puffer benötigt, dazu bitte das dem Kit beiliegende Puffersalz benutzen. 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 (10-fach Konzentrat). Um die gebrauchsfertige Lösung herzustellen 1 Teil des 10-fach Konzentrats mit 9 Teilen dest. Wasser mischen. Die Lösung ist ca. 8 - 12 Wochen bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) haltbar.

Nicht verwendete Reagenzien sofort wieder bei 2 - 8 °C lagern.

### 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. 50 µl Proben- bzw. Standardlösungen in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.
3. 50 µl Konjugatlösung (roter Verschluss) in jede Kavität pipettieren. Vorsichtig durch leichte manuelle Bewegung der Platte 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 waschen. Diesen Vorgang zweimal wiederholen.
5. 100 µl Red Chromogen Pro (brauner Verschluss) in jede Kavität pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 15 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
6. 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 optional eine speziell für die RIDASCREEN® Enzymimmunoassays entwickelte Software, die **RIDASOFT® Win.NET Food & Feed** (Art. Nr. Z9996FF), erhältlich. Der Verlauf der Standardkurve kann dem beigefügten Qualitätssicherheitszertifikat (Analysenzertifikat) entnommen werden. Um die Matrixeffekte der Proben zu kompensieren wurde die Standardkonzentration angepasst.

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 halblogarithmischen Koordinatensystem gegen die SEM-Konzentration [ng/L] auftragen.

## Interpretation der Ergebnisse

Um die in den Proben enthaltene tatsächliche 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 gelten folgende Verdünnungsfaktoren:

Shrimps:	2
Fleisch:	2
Fisch:	2

## Empfehlung

Um eine hohe analytische Sicherheit zu gewährleisten wird empfohlen:

- Jede Probe als Doppelbestimmung zu analysieren
- Zur Prüfung auf richtige und störungsfreie Durchführung der Bestimmung Dotierungsversuche durchzuführen


Für weitere Produktinformationen und Applikationen kontaktieren Sie bitte [info@r-biopharm.de](mailto:info@r-biopharm.de).

## Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2021-03-23	Freigabeversion

## Symbolerklärung

- Allgemeine Symbole:

	Gebrauchsanweisung beachten
	Chargennummer
	Verfallsdatum (YYYY-MM)
	Lagertemperatur
	Artikelnummer
	Anzahl Testbestimmungen
	Herstelldatum (YYYY-MM)
	Hersteller + Adresse

## Haftungsausschluss

Der Anwender trägt das alleinige Risiko bei der Verwendung der Produkte und Dienstleistungen der R-Biopharm AG.

Die R-Biopharm AG gewährleistet, dass ihre Produkte und Dienstleistungen allen von ihr festgelegten Qualitätskontrollstandards entsprechen. Die R-Biopharm AG wird nach ihrer Wahl Komponenten, Produkte oder wiederkehrende Dienstleistungen austauschen oder verbessern, die sich innerhalb produktspezifischer Gewährleistungsfristen oder Ablaufdaten als mangelhaft in der Verarbeitung oder im Material erweisen und die sich nach der Prüfung und im Ermessen der R-Biopharm AG als mangelhaft erweisen.

Diese Gewährleistung tritt an die Stelle jeglicher Gewährleistungen hinsichtlich Qualität, Beschreibung, Eignung für einen bestimmten Zweck, Marktgängigkeit, Produktivität oder anderer Spezifikationen. Die R-Biopharm AG ist in keiner Weise verantwortlich für jegliche Nutzung ihrer Produkte und weist hiermit alle anderen ausdrücklichen oder stillschweigenden Rechtsbehelfe ab, bzw. übernimmt ausdrücklich keine, Garantien, Gewährleistungen oder Haftungen, die sich aus dem Gesetz oder anderweitig ergeben. Die R-Biopharm AG übernimmt des Weiteren keine Haftung für entgangenen Gewinn oder Schäden – direkt, indirekt oder anderweitig – an Personen oder Eigentum im Zusammenhang mit der Verwendung ihrer Produkte oder Dienstleistungen.

Diese Haftungsregelung kann nur durch ein schriftliches, von einem autorisierten Vertreter der R-Biopharm AG unterzeichnetes Dokument verlängert, geändert oder ausgetauscht werden.



# RIDASCREEN® Nitrofuran (SEM)

## Brief information

RIDASCREEN® Nitrofuran (SEM) (R3724) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of semicarbazide (SEM) in shrimp, meat (bovine, porcine and chicken) and fish.

All reagents required for performing the enzyme immunoassay, including the standards, are contained in the test kit. The test kit is sufficient for a maximum of 48 duplicate determinations (including standards). A microtiter plate spectrophotometer is required for quantification.

**Sample preparation:** Homogenization, derivatization, extraction, centrifugation, evaporation, defatting  
Depending on the workflow in the laboratory, a 3-hour or an over-night derivatization may be performed. For highest precision, the over-night method is recommended. All mean values in this manual (for LOD, CC $\beta$ , recovery rate and specificity) were determined using this sample preparation. Details on the 3-hour method are published in the validation report.

**Time requirement:**

Method I (over-night)  
Sample preparation ..... approx. 3 h  
Derivatization ..... approx. 16 h at 37 °C

Method II (3 hour)  
Sample preparation ..... approx. 3 h  
Derivatization ..... approx. 3 h at 50 °C

Test implementation ..... 45 min

**Limit of detection:** Shrimp ..... approx. 300 ng/kg (ppt)  
(corresponding to the standard substance) Meat ..... approx. 200 ng/kg  
Fish ..... approx. 200 ng/kg

**Detection capability (CC $\beta$ ):** Shrimp ..... 350 ng/kg  
(corresponding to the standard substance) Meat ..... 350 ng/kg  
Fish ..... 350 ng/kg

Recovery rate:	Shrimp.....	approx. 100 %
(corresponding to the standard substance)	Meat.....	approx. 116 %
	Fish.....	approx. 85 %

Specificity:	Nitrophenyl-(NP) SEM (Standard substance)	100 %
	Nitrofurazon .....	1.37 %
	Semicarbazide (SEM) .....	0.02 %
	Furaltadon, Furazolidon, Nitrofurantoin .....	< 0.01 %
	Chloramphenicol, AMOZ, AOZ, AHD .....	< 0.01 %
	2-NP-AMOZ, 2-NP-AOZ, 2-NP-AHD .....	< 0.01 %

The specificity of the RIDASCREEN® Nitrofurantoin (SEM) 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.

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

## Product offer

RIDA® Nitrofurantoin (SEM) Spiking Solution .....	(R3797)
RIDASCREEN® Nitrofurantoin (AOZ) .....	(R3703)
RIDASCREEN® Nitrofurantoin (AHD) .....	(R3713)
RIDASCREEN® Nitrofurantoin (AMOZ) .....	(R3722)
RIDASCREEN® Chloramphenicol .....	(R1511)
RIDA® Nitrofurantoin (AOZ) Spiking Solution .....	(R3798)
RIDA® Nitrofurantoin (AHD) Spiking Solution .....	(R3796)
RIDA® Nitrofurantoin (AMOZ) Spiking Solution .....	(R3799)
RIDA® Chloramphenicol Spiking Solution.....	(R1599)



## 1. Intended use

RIDASCREEN® Nitrofurantoin (SEM) (R3724) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of semicarbazide (SEM) in shrimp, fish, meat (bovine, porcine and chicken).

## 2. General

Nitrofurans are synthetic broad-spectrum antibiotics, which are frequently used in animal production due to their excellent antibacterial and pharmacokinetic properties. They have also been used as growth promoters during the production of shrimps, poultry and pigs. Long term animal experiments have shown that the parent compounds and their metabolites have carcinogenic and mutagenic characteristics. This led to the prohibition of nitrofurans for the treatment of animals used for food production. In 1993, the EU banned the nitrofurans furaltadone, nitrofurantoin and nitrofurazone for use in animals used as sources of food, and in 1995 the use of furazolidone was also prohibited. The analysis of nitrofurans are based on the detection of the tissue bound metabolites of nitrofurans. The parent compounds are difficult to detect accurately since they are metabolized very rapidly after treatment. The tissue bound nitrofurantoin metabolites however are present for a long time after administration and they are used to detect nitrofurantoin abuse.

Parent compound	Metabolite	Abbreviation
Nitrofurantoin	1-Aminohydantoin	AHD
Furaltadone	3-Amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone	AMTZ
Furazolidone	3-Amino-2-oxazolidinone	AOZ
Nitrofurazone	Semicarbazide	SEM

Prior to analysis, the metabolites have to be derivatized by incubation with 2-Nitrobenzaldehyde (2-NBA) into NP-AHD, NP-AMTZ, NP-AOZ and NP-SEM.

## 3. Test principle

The basis of the test is the antigen-antibody reaction. The microtiter wells are coated with capture antibodies and anti-SEM antibodies. Standards or sample and SEM conjugate are added into the wells. Free and enzyme conjugated SEM compete for the antibody binding sites (competitive enzyme immunoassay). Any unbound conjugate is then removed in a washing step.

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 SEM concentration in the sample.

#### 4. Reagents provided

Each kit contains sufficient materials for a maximum of 48 duplicate determinations (including standard analyses). Each test kit contains:

Component	Cap color	Format		Volume
<b>Microtiter plate</b>	-	Ready-to-use		96 wells
<b>Standard 1</b>	White	Ready-to-use	0 µg/L	1.3 ml
<b>Standard 2</b>	White	Ready-to-use	100 ng/L	1.3 ml
<b>Standard 3</b>	White	Ready-to-use	300 ng/L	1.3 ml
<b>Standard 4</b>	White	Ready-to-use	900 ng/L	1.3 ml
<b>Standard 5</b>	White	Ready-to-use	2700 ng/L	1.3 ml
<b>Standard 6</b>	White	Ready-to-use	8100 ng/L	1.3 ml
<b>Wash buffer salt Tween</b>	-	Salt for dissolving		
<b>Conjugate</b>	Red	Ready-to-use		7.5 ml
<b>Substrate/ Chromogen</b> Red Chromogen Pro	Brown	Ready-to-use		13 ml
<b>Stop solution</b>	Yellow	Ready-to-use		14 ml
<b>2-Nitrobenzaldehyde</b>		Solid		100 mg

#### 5. Reagents required but not provided

##### 5.1 Equipment

- Microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- Centrifuge
- Shaker (Vortex)
- Mixer (Stomacher, Ultraturrax)
- Rotary evaporator
- Magnetic stirrer
- Pasteur pipettes
- Graduated pipettes
- Variable 20 - 200 µl and 200 - 1000 µl micropipettes

## 5.2 Reagents

- Distilled or deionized water
- 1 M HCl
- 1 M NaOH
- 0.1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- Ethyl acetate
- n-Hexane
- Dimethyl sulfoxide (DMSO)

## 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 safety data sheets (SDS) for this product, available online at [www.r-biopharm.de](http://www.r-biopharm.de).

Ensure the proper and responsible disposal and cleanup of all reagents and materials after their use. For disposal, please adhere to national regulations.

## 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 red-colored substrate / chromogen is photosensitive, therefore, avoid direct exposure to light.

Do not use the test kit after the expiration date (see test kit label).

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

## 8. Indication of instability or deterioration of reagents

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

## 9. Preparation of Samples

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

For the derivatization step, a solution of 10 mM 2-nitrobenzaldehyde (see chapter 4.) in dimethyl sulfoxide (DMSO) has to be prepared directly before use (i.e. dissolve 7.6 mg 2-nitrobenzaldehyde in 5 ml DMSO).

### 9.1 Shrimps

- Homogenize the sample, use stomacher or mixer
- Prepare 10 mM 2-nitrobenzaldehyde in dimethyl sulfoxide (DMSO) (see chapter 5.2.)
- Mix 1 g of the homogenized sample with 4 ml distilled water, 0.5 ml 1 M HCl and 100 µl 10 mM 2-nitrobenzaldehyde in DMSO (see chapter 5.2) by vortexing

#### Derivatization

- Incubate for 3 h at 50 °C (122 °F) or over-night (approx. 16 h) at 37 °C (98.6 °F)
- Add 5 ml 0.1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.4 ml 1 M NaOH and 10 ml ethyl acetate, vortex for 30 sec
- Centrifuge: 10 min / 4000 g / at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- Transfer 5 ml of the ethyl acetate layer (upper layer) into a new vial and evaporate to dryness at 60 °C (140 °F)

#### Note:

If the sample has a high fat content, oily residues that cannot be evaporated may occur. In this case, the evaporation step is completed and sample preparation can be continued.

- Dissolve the residue in 1 ml n-hexane and vortex with 1 ml wash buffer for 30 sec
- Centrifuge: 10 min / 4000 g / at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- Remove 750 µl from the lower, aqueous phase and use 50 µl per well in the assay.

### 9.2 Meat and poultry

- Homogenize the sample, use stomacher or mixer
- Prepare 10 mM 2-nitrobenzaldehyde in dimethyl sulfoxide (DMSO) (see chapter 5.2.)

- Mix 1 g of the homogenized sample with 4 ml distilled water, 0.5 ml 1 M HCl and 300 µl 10 mM 2-nitrobenzaldehyde in DMSO (see chapter 5.2) by vortexing

### Derivatization

- Incubate for 3 h at 50 °C (122 °F) or over-night (approx. 16 h) at 37 °C (98.6 °F)
- Add 5 ml 0.1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.4 ml 1 M NaOH and 10 ml ethyl acetate, vortex for 30 sec
- Centrifuge: 10 min / 4000 g / at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- Transfer 5 ml of the ethyl acetate layer (upper layer) into a new vial and evaporate to dryness at 60 °C (140 °F)

#### Note:

If the sample has a high fat content, oily residues that cannot be evaporated may occur. In this case, the evaporation step is completed and sample preparation can be continued.

- Dissolve the residue in 1 ml n-hexane and vortex with 1 ml wash buffer for 30 sec
- Centrifuge: 10 min / 4000 g / at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- Remove 750 µl from the lower, aqueous phase and use 50 µl per well in the assay.

## 9.3 Fish

- Homogenize the sample, use stomacher or mixer
- Prepare 10 mM 2-nitrobenzaldehyde in dimethyl sulfoxide (DMSO) (see chapter 5.2.)
- Mix 1 g of the homogenized sample with 4 ml distilled water, 0.5 ml 1 M HCl and 200 µl 10 mM 2-nitrobenzaldehyde in DMSO (see chapter 5.2) by vortexing

### Derivatization

- Incubate for 3 h at 50 °C (122 °F) or over-night (approx. 16 h) at 37 °C (98.6 °F)
- Add 5 ml 0.1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.4 ml 1 M NaOH and 10 ml ethyl acetate, vortex for 30 sec
- Centrifuge: 10 min / 4000 g / at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- Transfer 5 ml of the ethyl acetate layer (upper layer) into a new vial and evaporate to dryness at 60 °C (140 °F)

#### Note:

If the sample has a high fat content, oily residues that cannot be evaporated may occur. In this case, the evaporation step is completed and sample preparation can be continued.

- Dissolve the residue in 1 ml n-hexane and vortex with 1 ml wash buffer for 30 sec
- Centrifuge: 10 min / 4000 g / at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- Remove 750 µl from the lower, aqueous phase and use 50 µl per well in the assay.

## 10. Test implementation

### 10.1 Test preparation

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 enclosed buffer salt (see chapter 4. Reagents provided). To prepare the buffer, dissolve the entire contents of the pouch in 1 L distilled water. The dissolved wash buffer can be stored for approximately 4 to 6 weeks at 2 - 8 °C.

Alternative: Dissolve the contents of the pouch in 100 ml distilled water (10-fold concentrate). The solution can be stored for approximately 8 - 12 weeks at room temperature (20 - 25 °C). To prepare the ready-to-use solution, mix 1 part of the 10-fold concentrate with 9 parts of distilled water.

Return all reagents to 2 - 8 °C immediately after use.

### 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 conjugate 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 chapter 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat two more times.

5. Add 100 µl of substrate/chromogen 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.
6. 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 **RIDASOFT® Win.NET Food & Feed** (Art. No. Z9996FF) is optionally available for evaluation of the RIDASCREEN® enzyme immunoassays. The course of the standard curve is shown in the Quality Assurance Certificate (certificate of analysis) enclosed in the test kit. In order to compensate for the matrix effects, the standard concentration was adjusted.

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 semi-logarithmic plot against the SEM concentration [ng/L].

### Interpretation of results

In order to obtain the SEM concentration in ng/kg actually contained in a sample, the concentration read from the standard curve must be further multiplied by the corresponding dilution factor. When working according to the instructions, the dilution factors are as follows:

Shrimp:	2
Meat:	2
Fish:	2

## Recommendation

In order to ensure a high analytical performance we recommend:

- To analyze each sample material in duplicates
- To do spike experiments to ensure an accurate and correct test procedure

## Further application notes

A verification report for the analyzer instruments are available on request.









**Further product information and applications, please contact your local distributor or R-Biopharm at this address: [sales@r-biopharm.de](mailto:sales@r-biopharm.de).**

## Version overview

Version number	Chapter and title
2021-03-23	Release version

## Explanation of symbols

- General symbols:

	Follow the instructions for use
	Batch number
	Expiry date (YYYY-MM)
	Storage temperature
	Article number
	Number of test determinations
	Manufacturing date (YYYY-MM)
	Manufacturer + address



## Disclaimer

The user assumes all risk in using R-Biopharm AG's products and services.

R-Biopharm AG will warrant that its products and services meet all quality control standards set by R-Biopharm AG, and R-Biopharm AG will, at its option, replace or repair any components, product or repeat services which prove to be defective in workmanship or material within product specific warranty periods or expiration dates and which our examination shall disclose to our satisfaction to be defective as such.

This warranty is expressly in lieu of all other warranties, expressed or implied, as to quality, description, fitness for any particular purpose, merchantability, productiveness, or any other matter. R-Biopharm AG shall be in no way responsible for the proper use of its products and hereby disclaims all other remedies, warranties, guarantees or liabilities, expressed or implied, arising by law or otherwise, and it shall have no liability for any lost profits or damage, direct, indirect or otherwise, to person or property, in connection with the use of any of its products or services.

This warranty shall not be extended, altered or varied except by a written instrument signed by an authorized representative of R-Biopharm AG.

### **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:

Dr. Ralf M. Dreher

Vorstand / Board of Management:

Christian Dreher (Vorsitzender / Chairman),

Dr. Hans Frickel, Jochen Hirsch, Dr. Peter Schubert

Handelsregister / Commercial Register:

Amtsgericht Darmstadt HRB 8321