



# RIDASCREEN<sup>®</sup> Nitrofuran (AOZ)

**REF** **R3703**

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung  
von 3-Amino-2-oxazolidinon (AOZ)

Enzyme immunoassay for the quantitative determination  
of 3-amino-2-oxazolidinon (AOZ)

In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C  
Storage at 2 - 8 °C (36 - 47 °F)



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 (AOZ) (Art. Nr. R3703) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von AOZ in Shrimps, Fleisch (Huhn, Schwein, Rind), Leber (Rind und Schwein), Fisch, Vollei und Milch (siehe Kapitel 1. Verwendungszweck).

Alle Reagenzien für die Durchführung des Enzymimmunoassays, inkl. Standards, sind im Testkit enthalten. Der Testkit ist ausreichend für max. 96 Bestimmungen (einschließlich Standardbestimmungen). Zur Auswertung benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

Probenvorbereitung: homogenisieren (Milchproben: fällen), 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.

Zeitbedarf: Probenvorbereitung für 10 Proben und Testdurchführung

### Variante I (kurz):

Probenvorbereitung Teil 1..... ca. 1,5 h  
Inkubation ..... 3 h  
Probenvorbereitung Teil 2..... ca. 1,5 h  
Testdurchführung (Inkubationszeit)..... 1 h 15 min

### Variante II (lang):

Probenvorbereitung Teil 1..... ca. 1,5 h  
Inkubation (über Nacht) ..... ca. 16 h  
Probenvorbereitung Teil 2..... ca. 1,5 h  
Testdurchführung (Inkubationszeit)..... 1 h 15 min

Nachweisgrenze (LoD): Shrimps, Fisch, Milch..... ca. 50 ng/kg (ppt)  
(Bezogen auf die Fleisch, Vollei..... ca. 100 ng/kg (ppt)  
Standardsubstanz) Leber ..... ca. 200 ng/kg (ppt)

Nachweisvermögen (CC $\beta$ ): Shrimps ..... 250 ng/kg  
(Bezogen auf die  
Standardsubstanz)

Wiederfindungsrate: in künstlich kontaminierten Proben  
(Bezogen auf die Standardsubstanz)

Vollei .....	ca. 90 - 100 %
Shrimps, Fisch .....	ca. 85 - 100 %
Fleisch (Huhn, Rind), Leber, Milch .....	ca. 80 - 100 %
Fleisch (Schwein) .....	ca. 75 - 100 %

Spezifität:

NP-AOZ (Standardsubstanz) .....	100 %
NP-AHD, NP-AMOZ .....	< 0,01 %
Nitrofurantoin .....	< 0,01 %
Furazolidon .....	1,2 %
AMOZ, AHD, SEM .....	< 0,01 %

Die Spezifität des RIDASCREEN® Nitrofurantoin (AOZ) 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.

## Weitere Produkte und Zubehör für den Nachweis von Nitrofurantoin

RIDASCREEN® Nitrofurantoin (AHD) (Art. Nr. R3713)  
RIDASCREEN® Nitrofurantoin (AMOZ) (Art. Nr. R3722)  
RIDASCREEN® Nitrofurantoin (SEM) (Art. Nr. R3724)  
RIDA® Nitrofurantoin (AOZ) Dotierlösung (Art. Nr. R3798)  
RIDA® Nitrofurantoin (AHD) Dotierlösung (Art. Nr. R3796)  
RIDA® Nitrofurantoin (AMOZ) Dotierlösung (Art. Nr. R3799)  
RIDA® Nitrofurantoin (SEM) Dotierlösung (Art. Nr. R3797)

## 1. Verwendungszweck

RIDASCREEN® Nitrofurantoin (AOZ) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von AOZ in Shrimps, Fleisch (Huhn, Schwein, Rind), Leber (Rind und Schwein), Fisch, Vollei und Milch.

## 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 Nitrofuran-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 Nitrofuran-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 ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit Fänger-Antikörpern gegen anti-AOZ-Antikörper beschichtet. Zugegeben werden Standards bzw. Probelösung, enzymmarkiertes AOZ (Konjugat) und anti-AOZ-Antikörper. Freies und enzymmarkiertes AOZ konkurrieren um die AOZ-Antikörperbindungsstellen (kompetitiver

Enzymimmunoassay). Gleichzeitig werden auch die anti-AOZ-Antikörper von den immobilisierten Fänger-Antikörpern gebunden. Nicht gebundenes, enzymmarkiertes AOZ 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 zur AOZ-Konzentration in der Probe.

#### 4. Packungsinhalt

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

Komponente	Deckelfarbe	Zustand		Inhalt
<b>Microtiter plate</b> Mikrotiterplatte	-	Gebrauchsfertig		96 Kavitäten
<b>2-Nitrobenzaldehyde</b> 2-Nitrobenzaldehyd		Feststoff		100 mg
<b>Standard 1</b> Standard 1	Weiß	Gebrauchsfertig	0 ng/l	1,3 ml
<b>Standard 2</b> Standard 2	Weiß	Gebrauchsfertig	25 ng/l	1,3 ml
<b>Standard 3</b> Standard 3	Weiß	Gebrauchsfertig	50 ng/l	1,3 ml
<b>Standard 4</b> Standard 4	Weiß	Gebrauchsfertig	100 ng/l	1,3 ml
<b>Standard 5</b> Standard 5	Weiß	Gebrauchsfertig	200 ng/l	1,3 ml
<b>Standard 6</b> Standard 6	Weiß	Gebrauchsfertig	400 ng/l	1,3 ml
<b>Wash buffer salt Tween</b> Waschpuffer (Salz) Tween		Salz zum Auflösen		
<b>Conjugate</b> Konjugat	Rot	Gebrauchsfertig		6 ml
<b>Antibody</b> Antikörper	Schwarz	Gebrauchsfertig		6 ml
<b>Substrate/Chromogen</b> Substrat/Chromogen Red Chromogen Pro	Braun	Gebrauchsfertig		10 ml
<b>Stop solution</b> Stopplösung	Gelb	Gebrauchsfertig		14 ml

## 5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

### 5.1 Geräte

- Laborhandschuhe
- Waage
- Zentrifuge + zentrifugierbare Reagenzröhrchen mit Verschluss (z. B. 50 ml centrifuge tubes von Greiner Art. Nr. 227261)
- Schüttler (Vortex)
- Mixer (Stomacher, Ultraturrax)
- Evaporator
- Magnetrührer
- Pasteurpipetten
- Messpipetten
- Variable 20 - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten
- Optional: Multistepper- oder 8-Kanalpipette für 50 bzw. 100 µl
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Optional: RIDASOFT® Win.NET (Art. Nr. Z9996FF)

### 5.2 Reagenzien

- Destilliertes oder deionisiertes Wasser

Reagenz	Shrimps	Fleisch, Fisch, Leber, Vollei	Milch
1 M HCl	•	•	•
1 M NaOH	•	•	•
0,1 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	•	•	•
Ethylacetat	•	•	•
n-Hexan (oder n-Heptan)	•	•	•
Dimethylsulfoxid (DMSO)	•	•	•
Carrez I: 0,36 M Kaliumhexacyanoferrat(II) x 3 H <sub>2</sub> O			•
Carrez II: 1,04 M Zinksulfat x 7 H <sub>2</sub> O			•

## 6. Vorsichtsmaßnahmen

Das Produkt / der Test ist ausschließlich zur Anwendung im Rahmen der Zweckbestimmung geeignet.

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).

Die Kavitäten der Mikrotiterstreifen (beschichtete Mikrotiterplatte aus dem Kit, siehe Kapitel 10.2. Testdurchführung) dürfen nicht wiederverwendet werden. Für jeden Standard und jedes Probenextrakt separate Pipettenspitzen verwenden, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch unter Beachtung des Schutzes von Mensch und Umwelt eigenverantwortlich verwertet oder beseitigt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften (z. B. Kreislaufwirtschaftsgesetz, Gefahrenstoffverordnung etc.).

## 7. Reagenzien und ihre Lagerung

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

Für die Entnahme von Mikrotiterstreifen den Folienbeutel erst nach Erreichen der Raumtemperatur (20 - 25 °C) öffnen, um die Bildung von Kondenswasser in den Kavitäten zu vermeiden.

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 Substrates/Chromogens vor Zugabe in die Kavitäten
- Extinktion kleiner 0,6 ( $E_{450\text{ nm}} < 0,6$ ) für Standard 1



## 9. Probenvorbereitung

Die Proben kühl und lichtgeschützt lagern.

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

### 9.1. Shrimps, Fleisch (Huhn, Schwein, Rind), Leber (Rind und Schwein), Fisch und Vollei (frisch gequirktes Ei)

- Probe zerkleinern und mit einem Mixer oder Pürierstab homogenisieren

#### Shrimps:

- 1 g homogenisierte Masse mit 4 ml destilliertem Wasser, 0,5 ml 1 M HCl und 100 µl 10 mM 2-Nitrobenzaldehyd (in DMSO) kräftig mischen.

Hinweis: Der pH-Wert sollte zwischen 1 und 2 liegen; gegebenenfalls durch Zugabe von weiterer 1 M HCl einstellen.

- Fortfahren wie in Kapitel 9.3. beschrieben

#### Fleisch (Rind), Leber (Rind und Schwein), Fisch und Vollei (frisch gequirktes Ei):

- 1 g homogenisierte Masse mit 3,9 ml destilliertem Wasser, 0,5 ml 1 M HCl und 200 µl 10 mM 2-Nitrobenzaldehyd (in DMSO) kräftig mischen
- Fortfahren wie in Kapitel 9.3. beschrieben

#### Fleisch (Huhn, Schwein):

- 1 g homogenisierte Masse mit 3,8 ml destilliertem Wasser, 0,5 ml 1 M HCl und 300 µl 10 mM 2-Nitrobenzaldehyd (in DMSO) kräftig mischen
- Fortfahren wie in Kapitel 9.3. beschrieben

### 9.2. Milch

- 5 ml Milch in ein Zentrifugen-Glasröhrchen überführen
- 250 µl Carrez I und 250 µl Carrez II (siehe Kapitel 5.2.) hinzugeben
- Kräftig mischen (Vortex) und zentrifugieren: 10 min / 3000 g / 4 - 12 °C (Hinweis: ist keine Kühlzentrifuge vorhanden, sollten die Proben vorher auf ca. 8 °C gekühlt werden.)
- 1,1 ml Überstand mit 3,8 ml destilliertem Wasser, 0,5 ml 1 M HCl und 300 µl 10 mM 2-Nitrobenzaldehyd (in DMSO) kräftig mischen
- Fortfahren wie in Kapitel 9.3. beschrieben

### 9.3. Derivatisierung

- Bei 50 °C für 3 Stunden inkubieren oder bei 37 °C über Nacht (ca. 16 h) inkubieren
- 5 ml 0,1 M  $K_2HPO_4$ , 0,4 ml 1 M NaOH und 5 ml Ethylacetat zugeben, 30 s kräftig schütteln  
Optional: Proben bis max. 50 °C zur besseren Phasentrennung erwärmen
- Zentrifugieren: 10 min / 3000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 2,5 ml der Ethylacetatphase (obere Phase) in ein frisches Gefäß überführen und bei 60 °C bis zur Trockene evaporieren
- Den Rückstand in 1 ml n-Hexan (oder n-Heptan) lösen und mit 1 ml Probenpuffer (siehe Kapitel 10.1.) gründlich mischen
- Zentrifugieren: 10 min / 3000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- Von der unteren, wässrigen Phase 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

## 10. Testdurchführung

### 10.1 Testvorbereitungen

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

Als **Proben- und Waschpuffer** wird ein PBS-Tween - Puffer benötigt, benutzen Sie dazu bitte das beiliegende Waschpuffer-Salz (siehe Kapitel 4.). Zur Herstellung des Puffers den gesamten Inhalt des Beutels in 1 l destilliertem Wasser lösen. 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). Die Lösung ist ca. 8 - 12 Wochen bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) haltbar. Um die gebrauchsfertige Lösung herzustellen, 1 Teil des 10-fach Konzentrats mit 9 Teilen dest. Wasser mischen.

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.

Es wird empfohlen das Konjugat, das Substrat/ Chromogen und die Stopp-Lösung mit einer Mehrkanal- oder einer Multistepper-Pipette zu pipettieren, um eine Zeitverzögerung über die Platte zu vermeiden.

Bei allen Inkubationen direkte Sonneneinstrahlung vermeiden und die Mikrotiterplatte abdecken.

1. So viele Kavitäten in den Halterahmen einsetzen, wie für alle Standards und Proben in Doppelbestimmung benötigt werden. Die Positionen der Standards und der Proben protokollieren.
2. Je 50 µl der Standards bzw. der vorbereiteten Proben als Doppelbestimmung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren. Für jeden Standard bzw. jede Probe eine neue Pipettenspitze benutzen.
3. Je 50 µl Konjugat (roter Verschluss) in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.
4. Je 50 µl Antikörper (schwarzer Verschluss) in die entsprechenden Kavitäten pipettieren, vorsichtig manuell mischen und 1 h bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) 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 Kapitel 10.1.) waschen. Diesen Vorgang zweimal wiederholen.
6. Je 100 µl Substrat/Chromogen (brauner Verschluss) in die entsprechenden Kavitäten pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 15 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
7. Je 100 µl Stopplösung (gelber Verschluss) in jede Kavität pipettieren und vorsichtig manuell mischen. Die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stopplösung messen.

## 11. Auswertung

Für die Auswertung ist bei R-Biopharm optional eine speziell für die RIDASCREEN® Enzymimmunoassays entwickelte Software, die **RIDASOFT® Win.NET (Art. Nr. Z9996FF)**, erhältlich.

Für die Auswertung ist abzuklären, dass für den aktuellen Testlauf alle Qualitätskriterien erfüllt sind. Der Verlauf der Standardkurve kann dem beigefügten Qualitätssicherheitszertifikat (Analysezertifikat) 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 halblogarithmischen Koordinatensystem gegen die AOZ-Konzentration [ng/l] auftragen.

## 12. Interpretation der Ergebnisse

Um die in den Proben enthaltene tatsächliche Konzentration in ng/l (ng/kg) zu erhalten, muss die aus der Standardkurve abgelesene Konzentration noch mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden. Beim Arbeiten nach der angegebenen Vorschrift gilt der **Verdünnungsfaktor 2**. Dieser Verdünnungsfaktor wurde verwendet, um die Leistungsdaten zu ermitteln.

## 13. Grenzen der Methode

Testergebnisse können in Abhängigkeit von der Matrix, der Testdurchführung und den Laborbedingungen schwanken.

Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sind abhängig von der jeweiligen Probenmatrix, dem Grad der Prozessierung und dem Extraktionsverfahren.

## 14. Empfehlung

Um eine hohe analytische Sicherheit zu gewährleisten wird empfohlen, jede Probe als Doppelbestimmung zu analysieren. Jedes Labor kann für sich nach einer qualifizierten Risiko-Management-Analyse entscheiden, den Test in Einzelbestimmung durchzuführen. Dies hat keinen Einfluss auf die Funktion des Testkits. Es ist aber zu beachten, dass sich hierdurch das Risiko erhöht, Fehler in der Durchführung des Tests (z. B. Pipettierfehler) zu übersehen. Außerdem ist eine höhere Schwankung der Ergebnisse bei Einzelbestimmungen zu erwarten.

Um eine hohe analytische Sicherheit zu gewährleisten wird außerdem empfohlen:

- Pipettenspitzen vor dem Pipettieren jeweils mit Standard oder Probenextrakt vorzuspülen.
- Bei der Analyse mittels Automaten (z. B. ThunderBolt® / Bolt™) sich an [info@r-biopharm.de](mailto:info@r-biopharm.de) zu wenden.

## 15. Weitere Applikationen

Applikationen sind auf Anfrage erhältlich.









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

## Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2007-11-08	Freigabeversion
2016-12-30	Generelle Überarbeitung
2022-10-27	Generelle Überarbeitung Vorgenommene Änderungen: <ul style="list-style-type: none"><li>– „Kurzinformation“, Kapitel 6, 7 und 10: aktualisiert und inhaltlich ergänzt</li><li>– Kapitel 13, 14, 15 hinzugefügt</li></ul>
2023-10-24	Aktuelle Version Vorgenommene Änderungen: <ul style="list-style-type: none"><li>– „Kurzinformation“: Aktualisierung der LoD für Leber.</li><li>– Kapitel 6 und 12: inhaltlich ergänzt</li></ul>

## 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 ausbessern, 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 (AOZ)

## Brief information

RIDASCREEN® Nitrofuran (AOZ) (Art. No. R3703) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of AOZ in shrimp, meat (chicken, pork, beef), liver (beef and pork), fish, whole egg and milk.

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 96 determinations (including standards). A microtiter plate spectrophotometer is required for quantification.

Sample preparation: Homogenization (milk samples: precipitation), derivatization, extraction, centrifugation, evaporation and degreasing

Time requirement: Sample preparation for 10 samples and test procedure

### Option I (short):

Sample preparation part 1 ..... approx. 1.5 h  
Incubation ..... 3 h  
Sample preparation part 2 ..... approx. 1.5 h  
Test implementation (incubation time).. 1 h 15 min

### Option II (long):

Sample preparation part 1 ..... approx. 1.5 h  
Incubation (overnight)..... approx. 16 h  
Sample preparation part 2 ..... approx. 1.5 h  
Test implementation (incubation time).. 1 h 15 min

Limit of detection (LoD): Shrimp, fish, milk ..... approx. 50 ng/kg (ppt)  
(corresponding to the Meat, whole egg ..... approx. 100 ng/kg (ppt)  
standard substance) Liver ..... approx. 200 ng/kg (ppt)

Detection capability (CC $\beta$ ): Shrimp ..... 250 ng/kg  
(corresponding to the standard substance)

Recovery rate: (corresponding to the standard substance)	in spiked samples Whole egg ..... approx. 90 - 100 % Shrimp, fish..... approx. 85 - 100 % Meat (chicken, beef), liver, milk... approx. 80 - 100 % Meat (pork) ..... approx. 75 - 100 %
Specificity:	NP-AOZ (standard substance)..... 100 % NP-AHD, NP-AMOZ..... < 0.01 % Nitrofurantoin ..... < 0.01 % Furazolidone ..... 1.2 % AMOZ, AHD, SEM ..... < 0.01 %

The specificity of the RIDASCREEN® Nitrofurantoin (AOZ) 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).

## Related products and accessories for nitrofurantoin determination

- RIDASCREEN® Nitrofurantoin (AHD) (Art. No. R3713)
- RIDASCREEN® Nitrofurantoin (AMOZ) (Art. No. R3722)
- RIDASCREEN® Nitrofurantoin (SEM) (Art. No. R3724)
- RIDA® Nitrofurantoin (AOZ) Spiking Solution (Art. No. R3798)
- RIDA® Nitrofurantoin (AHD) Spiking Solution (Art. No. R3796)
- RIDA® Nitrofurantoin (AMOZ) Spiking Solution (Art. No. R3799)
- RIDA® Nitrofurantoin (SEM) Spiking Solution (Art. No. R3797)



## 1. Intended use

RIDASCREEN® Nitrofuran (AOZ) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of AOZ in shrimp, meat (chicken, pork and beef), liver (beef and pork), fish, whole egg and milk.

## 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. However, the tissue bound nitrofuran metabolites are present for a long time after administration and they are used to detect nitrofuran 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 directed against anti-AOZ antibodies. AOZ standards or sample solution, AOZ conjugate and anti-AOZ antibodies are added. Free AOZ and AOZ conjugate compete for the AOZ antibody binding sites (competitive enzyme immunoassay). At the same time, the anti-AOZ

antibodies are also bound by the immobilized capture antibodies. Any unbound conjugate is then removed in a washing step.

Substrate/chromogen is added to the wells and incubated. 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 AOZ concentration in the sample.

#### 4. Reagents provided

Each kit contains sufficient materials for a maximum of 96 determinations (including standard analyses). Each test kit contains:

Component	Cap color	Format	Volume
<b>Microtiter plate</b>	-	Ready to use	96 wells
<b>2-Nitrobenzaldehyde</b>		solid	100 mg
<b>Standard 1</b>	White	Ready to use	0 ng/L 1.3 mL
<b>Standard 2</b>	White	Ready to use	25 ng/L 1.3 mL
<b>Standard 3</b>	White	Ready to use	50 ng/L 1.3 mL
<b>Standard 4</b>	White	Ready to use	100 ng/L 1.3 mL
<b>Standard 5</b>	White	Ready to use	200 ng/L 1.3 mL
<b>Standard 6</b>	White	Ready to use	400 ng/L 1.3 mL
<b>Wash buffer salt Tween</b>		For dissolving	
<b>Conjugate</b>	Red	Ready to use	6 mL
<b>Antibody</b>	Black	Ready to use	6 mL
<b>Substrate/Chromogen</b> Red Chromogen Pro	Brown	Ready to use	10 mL
<b>Stop solution</b>	Yellow	Ready to use	14 mL

#### 5. Reagents required but not provided

##### 5.1 Equipment

- Gloves
- Scale
- Centrifuge + centrifugal vials with cap (e.g. 50 mL centrifuge tubes from Greiner Art. No. 227261)
- Shaker (Vortex)
- Mixer (Stomacher, Ultraturrax)
- Evaporator
- Magnetic stirrer

- Pasteur pipettes
- Graduated pipettes
- Variable 20 - 200 µL and 200 - 1000 µL micropipettes
- If necessary: Multistepper or 8-channel pipette for 50 and 100 µL
- Microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- Optional: RIDASOFT® Win.NET (Art. No. Z9996FF)

## 5.2 Reagents

- Distilled or deionized water

Reagent	Shrimp	Meat, Fish, Liver, whole egg	Milk
1 M HCl	•	•	•
1 M NaOH	•	•	•
0.1 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	•	•	•
Ethyl acetate	•	•	•
n-Hexane (oder n-Heptane)	•	•	•
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	•	•	•
Carrez I: 0.36 M Potassium ferrocyanide (II) x 3 H <sub>2</sub> O			•
Carrez II: 1.04 M Zinc sulfate x 7 H <sub>2</sub> O			•

## 6. Warnings and precautions for the users

The product / test is only suitable within the scope of its intended use.

This test should only be carried out by trained laboratory personnel. 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 (SDS) for this product, available online at [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

Do not reuse wells of the microtiter strips (coated microtiter plate, see chapter 10.2.). Use separate pipette tips for each standard and each sample extract to avoid cross contamination.

All reagents and materials must be recovered or disposed after use at customers own responsibility according to the protection of human health and the environment. Please observe the applicable national regulations concerning waste disposal (e.g. Waste Management Act, Regulations on Dangerous Chemicals, etc.).

## 7. Storage instructions

Store the kit at 2 - 8 °C (35 - 46 °F). Do not freeze any test kit components.

To avoid moisture inside the wells, open the foil bag for withdrawal of microwells only after having reached room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).

Return any unused microwells to their original foil bag, reseal them together with the desiccant provided and further store at 2 - 8 °C (35 - 46 °F).

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

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 0.6 absorbance units ( $A_{450\text{ nm}} < 0.6$ ) for standard

## 9. Preparation of Samples

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

Prepare 10 mM 2-nitrobenzaldehyde (see chapter 4.) in dimethyl sulfoxide (DMSO).

(Note: this solution has to be prepared directly before use, i.e. dissolve 7.6 mg 2-nitrobenzaldehyde in 5 mL DMSO.)

9.1. Shrimp, meat (chicken, pork and beef), liver (bovine and porcine), fish, and whole egg (freshly whisked egg)

- homogenize the sample, use stomacher or mixer

### Shrimp:

- 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) by shaking vigorously

Note: pH value at this point should be between 1 and 2, if necessary adjust it by adding more 1 M HCl.

- Continue as described in chapter 9.3.

### Meat (beef), liver (bovine, porcine), fish and whole egg (fresh whisked egg):

- mix 1 g of the homogenized sample with 3.9 mL distilled water, 0.5 mL 1 M HCl and 200 µL 10 mM 2-nitrobenzaldehyde (in DMSO) by shaking vigorously
- Continue as described in chapter 9.3.

### Meat (chicken, pork):

- Mix 1 g of the homogenized sample with 3.8 mL distilled water, 0.5 mL 1 M HCl and 300 µL 10 mM 2-nitrobenzaldehyde (in DMSO) by shaking vigorously
- Continue as described in chapter 9.3.

## 9.2. Milk

- Transfer 5 mL of milk into a centrifugal glass vial
- Add 250 µL Carrez I and 250 µL Carrez II (see chapter 5.2.)
- Mix thoroughly (vortex) and centrifuge: 10 min / 3000 g / 4 - 12 °C (39 - 54 °F)

Note: if a refrigerated centrifuge is not available, chill sample to approx. 8 °C (46 °F) prior to centrifugation.

- Mix 1.1 mL of the supernatant with 3.8 mL distilled water, 0.5 mL 1 M HCl and 300 µL 10 mM 2-nitrobenzaldehyde (in DMSO) by shaking vigorously
- Continue as described chapter 9.3.

## 9.3. Derivatization

- Incubate at 50 °C (122 °F) for 3 hours or at 37 °C (98.6 °F) overnight (approx. 16 h)
- Add 5 mL 0.1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.4 mL 1 M NaOH and 5 mL ethyl acetate, shake vigorously for 30 s
- Optional: sample incubation up to 50 °C (122 °F) can be used for better phase separation
- Centrifuge: 10 min / 3000 g / at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- Transfer 2.5 mL of the ethyl acetate layer (upper layer) into a new vial and evaporate to dryness at 60 °C
- Dissolve the residue in 1 mL n-hexane (or n-heptane) and mix properly with 1 mL sample buffer (see chapter 10.1.)
- Centrifuge: 10 min / 3000 g / at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- Use 50 µL of the lower, aqueous phase 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.

A PBS-Tween buffer is needed as **sample and wash buffer**, please use the wash buffer salt (see 4.) contained in the kit. Dissolve the entire buffer salt in one liter of distilled water. The ready to use buffer expires after approx. 4 weeks at 2 - 8 °C (36 - 46 °F).

Alternative: Dissolve the contents of the pouch in only 100 ml of distilled water to obtain a 10fold concentrated buffer. This solution expires after approx. 8 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 buffer.

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

## 10.2 Test procedure

Carefully follow the recommended washing procedure to obtain unambiguous results. Do not allow microwells to dry between work steps.

It is recommended to pipette the conjugate, the substrate/chromogen and the stop solution with a multi-channel or stepper pipette to avoid a time shift over the plate.

Avoid direct sunlight during all incubations. Therefore, cover the microtiter plates.

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. Use a new pipette tip for each standard or sample.
3. Add 50 µL of the conjugate (red cap) to the bottom of each well.
4. Add 50 µL of the antibody (black cap) to each well, mix gently by shaking the plate manually and incubate for 1 h at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
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 chapter 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat 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 at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark.
7. Add 100 µL of the stop solution (yellow cap) to each well. Mix gently by shaking the plate manually and measure the absorbance at 450 nm. Read within 30 min after addition of stop solution.

## 11. Results

Special software, **RIDASOFT® Win.NET (Art. No. Z9996FF)**, is optional available for evaluation of the RIDASCREEN® enzyme immunoassays.

For the evaluation it should be clarified, that all quality criteria are fulfilled for the current test run. The course of the standard curve is shown in the Quality Assurance Certificate (certificate of analysis) 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 semi-logarithmic plot against the AOZ concentration [ng/kg].

## 12. Result interpretation

In order to obtain the AOZ 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 factor is 2**. The dilution factor was used to determine the performance data.

## 13. Limits of the method

Test results may vary depending on the sample matrix, the actual test procedure and the laboratory environment.

Detection and quantification limits depend on the respective sample matrix, the degree of processing and the extraction method.

## 14. Recommendation

In order to ensure a high analytical performance we recommend to analyze each sample material in duplicates. Each laboratory may decide to perform the test in single determinations after a qualified risk management analysis. This has no influence on the function of the test kit. However, it should be noted that this increases the risk of overlooking errors in the performance of the test (e.g. pipetting errors). Moreover, a higher result variation will occur when pipetting in single determinations.

In order to ensure a high analytical performance we recommend:

- Pre-flush pipette tips with standard or sample extract prior to pipetting.
- To contact [sales@r-biopharm.de](mailto:sales@r-biopharm.de) if automates (e.g. ThunderBolt® / Bolt™) are used.

## 15. Further application notes

Application notes 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
2007-11-08	Release version
2016-12-30	General revision
2022-10-27	General revision Changes made: <ul style="list-style-type: none"><li>– “Brief information”, chapter 6, 7 and 10: updated and supplemented in content</li><li>– Chapters 13, 14, 15 added</li></ul>
2023-10-24	Current version Changes made: <ul style="list-style-type: none"><li>– “Brief information”: LoD updated for liver</li><li>– Chapters 6 and 12: supplemented in content</li></ul>



## 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),

Ute Salzbrenner, Dr. Frank Apostel,

Dr. Frank Vitzthum

Handelsregister / Commercial Register:

Amtsgericht Darmstadt HRB 8321