

r-biopharm®



RIDASCREEN® Nitrofuran AHD

REF R3713

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung
von AHD

Enzyme immunoassay for the quantitative determination
of AHD

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

Auftragsannahme

Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20

E-Mail: orders@r-biopharm.de

Marketing & Vertrieb

E-Mail: info@r-biopharm.de

R-Biopharm AG switchboard

Phone: +49 (0) 61 51 - 81 02-0

Order department

Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20

E-mail: orders@r-biopharm.de

Marketing & sales

E-mail: sales@r-biopharm.de

RIDA[®], RIDASCREEN[®] und RIDASOFT[®]
sind eingetragene Marken der R-Biopharm AG.
Hersteller: R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

RIDA[®], RIDASCREEN[®] and RIDASOFT[®]
are registered trademarks of R-Biopharm AG.
Manufacturer: R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

Kurzinformation

RIDASCREEN® Nitrofurantoin (AHD) (Art. Nr. R3713) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von AHD in Shrimps und Fisch (siehe Kapitel 1. Verwendungszweck).

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

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

Zeitbedarf: Probenvorbereitung für 10 Proben
Probenvorbereitung Teil 1.....ca. 1,5 h
Inkubation..... 3 h
Probenvorbereitung Teil 2.....ca. 1,5 h
Testdurchführung (Inkubationszeit)..... 1 h 15 min

Nachweisgrenze: Shrimps ca. 200 ng/kg (ppt)
(Bezogen auf die Fisch..... ca. 76 ng/kg (ppt)
Standardsubstanz)

Nachweisvermögen (cc β): Shrimps 250 ng/kg
(Bezogen auf die Standardsubstanz)

Wiederfindungsrate: Shrimps ca. 94 %
(bezogen auf die Fisch..... ca. 82 %
Standardsubstanz)

Spezifität: Nitrophenyl- (NP) AHD (Standardsubstanz)
..... 100 %
NP-AMOZ, NP-AOZ, NP-SEM < 1 %
Nitrofurantoin ca. 32 %
Furaltadon, Furazolidon, Nitrofurazon..... < 2 %
AHD, AMOZ, AOZ, SEM..... < 1 %

Die Spezifität des RIDASCREEN® Nitrofurantoin (AHD) 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 <https://food.r-biopharm.com/media/technical-guides/> abgerufen, gedruckt und gespeichert werden.

Weitere Produkte und Zubehör für den Nachweis von Nitrofurantoin

RIDASCREEN® Nitrofurantoin (AMOX) (Art. Nr. R3722)
RIDASCREEN® Nitrofurantoin (AOZ) (Art. Nr. R3703)
RIDASCREEN® Nitrofurantoin (SEM) (Art. Nr. R3724)
RIDA® Nitrofurantoin (AHD) Dotierlösung (Art. Nr. R3796)
RIDA® Nitrofurantoin (AMOX) Dotierlösung (Art. Nr. R3799)
RIDA® Nitrofurantoin (AOZ) Dotierlösung (Art. Nr. R3798)
RIDA® Nitrofurantoin (SEM) Dotierlösung (Art. Nr. R3797)

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN® Nitrofurantoin (AHD) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung des Nitrofurantoin Metaboliten AHD in Shrimp und Fisch.

2. Allgemeines

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

Muttersubstanz	Metabolit	nach Derivatisierung	
Nitrofurantoin	1-Aminohydantoin	AHD	NP-AHD
Furaltadon	3-Amino-5-morpholino methyl-2-oxazolidinon	AMOZ	NP-AMOZ
Furazolidon	3-Amino-2-oxazolidinon	AOZ	NP-AOZ
Nitrofurazon	Semicarbazid	SEM	NP-SEM

3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit Fänger-Antikörpern gegen anti-AHD-Antikörper beschichtet. Zugegeben werden Standards bzw. Probelösung, enzymmarkiertes AHD (Konjugat) und anti-AHD-Antikörper. Freies und enzymmarkiertes AHD konkurrieren um die AHD-Antikörperbindungsstellen (kompetitiver Enzymimmunoassay). Gleichzeitig werden auch die anti-AHD-Antikörper von den immobilisierten Fänger-Antikörpern gebunden. Nicht gebundenes, enzymmarkiertes AHD 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 Stopp Lösung führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Messung erfolgt photometrisch bei 450 nm; die Extinktion der Lösung ist umgekehrt proportional zur AHD-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
Microtiter plate Mikrotiterplatte	-	Gebrauchsfertig	96 Kavitäten
2-Nitrobenzandehyd 2-Nitrobenzaldehyde	-	Feststoff	100 mg
Standard 1 Standard 1	Weiß	Gebrauchsfertig	0 ng/l 1,3 ml
Standard 2 Standard 2	Weiß	Gebrauchsfertig	100 ng/l 1,3 ml
Standard 3 Standard 3	Weiß	Gebrauchsfertig	300 ng/l 1,3 ml
Standard 4 Standard 4	Weiß	Gebrauchsfertig	900 ng/l 1,3 ml
Standard 5 Standard 5	Weiß	Gebrauchsfertig	2700 ng/l 1,3 ml
Standard 6 Standard 6	Weiß	Gebrauchsfertig	8100 ng/l 1,3 ml
Wash buffer salt Tween Waschpuffer (Salz) Tween	-	Salz zum Auflösen	
Conjugate Konjugat	Rot	Konzentrat	11x 0,7 ml
Antibody Antikörper	Schwarz	Konzentrat	11x 0,7 ml
Substrate/Chromogen Substrat/Chromogen Red Chromogen Pro	Braun	Gebrauchsfertig	10 ml
Stop solution Stopp Lösung	Gelb	Gebrauchsfertig	14 ml

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1 Geräte

- Laborhandschuhe
- Waage
- Mixer (Stomacher, Ultraturrax)
- Zentrifuge + zentrifugierbare Reagenzröhrchen mit Verschluss (z. B. 50 ml centrifuge tubes von Greiner Art. Nr. 227261)
- Schüttler (Vortex)
- Evaporator
- Magnetrührer
- Pasteurpipetten
- Messpipetten

- Variable 20 - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten
- Gegebenenfalls: Multistepper- oder 8-Kanalpipette für 50 bzw. 100 µl
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Optional: RIDASOFT® Win.NET (Art. Nr. Z9996FF)

5.2 Reagenzien

- Destilliertes Wasser (dest. Wasser) oder deionisiertes Wasser
- 1 M HCl
- 1 M NaOH
- 0,1 M K₂HPO₄
- 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.

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, Gefahrstoffverordnung 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 Substrat/Chromogen 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.

- Probe mit einem Mixer oder Pürierstab homogenisieren
- 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

- 1 g homogenisierte Probe mit 4 ml demineralisiertem Wasser, 0,5 ml 1 M HCl und 100 µl 10 mM 2-Nitrobenzaldehyd (in DMSO) kräftig mischen
- Derivatisieren wie in Kapitel 9.3 beschrieben

9.2. Fisch

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

9.3 Derivatisierung

- Bei 50 °C für 3 Stunden inkubieren
- 5 ml 0,1 M K₂HPO₄, 0,4 ml 1 M NaOH und 5 ml Ethylacetat zugeben, 30 s kräftig schütteln
- Optional: Probe 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 evaporieren
- Den Rückstand in 1 ml n-Hexan 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.

Die **anti-AHD-Antikörper** liegen als Konzentrat vor. Da die rekonstituierte Antikörperlösung nur begrenzte Haltbarkeit aufweist, immer nur soviel Antikörper-Konzentrat mit Waschpuffer verdünnen, wie unmittelbar benötigt wird. Das Antikörper-Konzentrat vor Entnahme gut mischen. Um die gebrauchsfertige Antikörperlösung herzustellen, muss das Konzentrat 1:11 (1+10) mit Waschpuffer verdünnt werden (z. B. 200 µl Konzentrat + 2 ml Waschpuffer, ausreichend für 4 Mikrotiterstreifen).

Das **AHD-Konjugat** liegt als Konzentrat vor. Da die rekonstituierte Konjugatlösung nur begrenzte Haltbarkeit aufweist, immer nur so viel Konjugat-Konzentrat mit Waschpuffer verdünnen, wie unmittelbar benötigt wird. Das Konjugat-Konzentrat vor Entnahme vorsichtig mischen. Um die gebrauchsfertige Konjugatlösung herzustellen, muss das Konzentrat 1:11 (1+10) mit Waschpuffer verdünnt werden (z. B. 200 µl Konzentrat + 2 ml Waschpuffer, ausreichend für 4 Mikrotiterstreifen).

Als **Wasch-, Proben-, Antikörper- und Konjugatpuffer** 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 demineralisiertem Wasser lösen. Der gelöste Waschpuffer ist ca. 4 Wochen bei 2 - 8 °C haltbar.

Alternativ: Inhalt des Beutels in 100 ml demineralisiertem Wasser lösen um ein 10fach Konzentrat herzustellen. Um die gebrauchsfertige Lösung herzustellen das 10-fach-Konzentrat 1:10 (1+9) mit demineralisiertem Wasser verdünnen. Die Lösung ist ca. 8 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.

Es wird empfohlen das Konjugat, den Antikörper, 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 verdünntes Konjugat in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.
4. Je 50 µl verdünnten Antikörper 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 rot gefärbtes Substrat/Chromogen in die entsprechenden Kavitäten pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 15 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
7. Je 100 µl Stopp Lösung in jede Kavität pipettieren und vorsichtig manuell mischen. Die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stopp Lösung 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:

$$\frac{\text{Extinktion Standard (bzw. Probe)}}{\text{Extinktion Nullstandard}} \times 100 = B/B_0 (\%)$$

Den Nullstandard somit gleich 100 % setzen und die Extinktionswerte in Prozent angeben. Die errechneten Werte für die Standards in einem Koordinatensystem halblogarithmisch gegen die AHD-Konzentration [ng/kg] auftragen.

12. Interpretation der Ergebnisse

Um die in den Proben enthaltene tatsächliche AHD-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**.

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 zu wenden.

15. Weitere Applikationen

Applikationen sind auf Anfrage erhältlich.









Für weitere Produktinformationen und Applikationen kontaktieren Sie bitte info@r-biopharm.de.

Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2010-10-20	Freigabeversion
2015-10-01	Generelle Überarbeitung
2022-10-26	Aktuelle Version Generelle Überarbeitung Vorgenommene Änderungen: <ul style="list-style-type: none">– Kurzinformation: Nachweisvermögen ergänzt– Kapitel 6 und „Weitere Produkte und Zubehör für den Nachweis von Nitrofurantoin“ aktualisiert– Kapitel 13, 14 und 15 hinzugefügt

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® Nitrofurantoin (AHD)

Brief information

RIDASCREEN® Nitrofurantoin (AHD) (Art. No. 3713) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of the nitrofurantoin metabolite AHD in shrimp and fish (see chapter 1. Intended use).

All reagents required for the enzyme immunoassay, including 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, derivatization, extraction, centrifugation, evaporation and defatting
Time requirement:	Sample preparation for 10 samples Sample preparation part 1.....approx. 1.5 h Incubation.....3 h Sample preparation part 2approx. 1.5 h Test implementation (incubation time) .. 1 h 15 min
Detection limit: (corresponding to the standard substance)	Shrimp approx. 200 ng/kg (ppt) Fish..... approx. 76 ng/kg (ppt)
Detection capability (cc β): (corresponding to the standard substance)	Shrimp 250 ng/kg
Recovery rate: (corresponding to the standard substance)	Shrimp 94 % Fish..... 82 %
Specificity:	Nitrophenyl- (NP) AHD 100 % NP-AMAZ, NP-AOZ, NP-SEM < 1 % Nitrofurantoin approx. 32 % Furaltadone, furazolidone, nitrofurazone..... < 2 % AHD, AMAZ, AOZ, SEM..... < 1 %

The specificity of the RIDASCREEN® Nitrofurantoin (AHD) test was determined by analyzing the cross reactivities to corresponding substances in buffer system. In samples, the specificity may deviate from those determined in the buffer system due to matrix effects. Prior to the analysis of cross-reactive substances, the user has to determine the Limit of Detection and the Recovery for the substance in the respective sample matrix. The test cannot discriminate between analytes and cross-reactive substances.

In order to increase the quality of assessment when performing ELISA procedures, we refer additionally to our Good ELISA Practice brochure. It lists minimum standards and conditions that are required when using test kits of R-Biopharm AG to perform ELISA analysis. The brochure can be retrieved, printed and downloaded from the website

<https://food.r-biopharm.com/media/technical-guides/>.

Related products and accessories for nitrofurantoin determination

RIDASCREEN® Nitrofurantoin (AOZ) (Art. No. R3703)

RIDASCREEN® Nitrofurantoin (AMTZ) (Art. No. R3722)

RIDASCREEN® Nitrofurantoin (SEM) (Art. No. R3724)

RIDA® Nitrofurantoin (AMTZ) Spiking Solution (Art. No. R3799)

RIDA® Nitrofurantoin (AOZ) Spiking Solution (Art. No. R3798)

RIDA® Nitrofurantoin (AHD) Spiking Solution (Art. No. R3796)

RIDA® Nitrofurantoin (SEM) Spiking Solution (Art. No. R3797)

1. Intended use

RIDASCREEN® Nitrofurantoin (AHD) (Art. No. 3713) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of the nitrofurantoin metabolite AHD in shrimp and fish.

2. General information

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 Shrimp, 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 nitrofuran metabolites however are present for a long time after administration and they are used to detect nitrofuran abuse. Prior to analysis, the metabolites have to be derivatized by incubation with 2-Nitrobenzaldehyde (2NBA) into Nitrophenyl- (NP) AHD, NP-AMOZ, NP-AOZ and NP-SEM.

parent compound	metabolite		after derivatization
Nitrofurantoin	1-Aminohydantoin	AHD	NP-AHD
Furaltadon	3-Amino-5-morpholino methyl-2-oxazolidinon	AMOZ	NP-AMOZ
Furazolidon	3-Amino-2-oxazolidinon	AOZ	NP-AOZ
Nitrofurazon	Semicarbazide	SEM	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-AHD antibodies. AHD standards or sample solutions, AHD conjugate and anti-AHD antibodies are added. Free AHD and AHD conjugate compete for the anti-AHD antibody binding sites (competitive enzyme immunoassay). At the same time, the anti-AHD 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 AHD concentration in the sample.

4. Reagents provided

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

Component	Cap Colour	Format	Volume
Microtiter plate	-	Ready to use	96 wells
2-Nitrobenzandehyd	-	solid	100 mg
Standard 1	White	Ready to use	0 ng/L 1.3 mL
Standard 2	White	Ready to use	100 ng/L 1.3 mL
Standard 3	White	Ready to use	300 ng/L 1.3 mL
Standard 4	White	Ready to use	900 ng/L 1.3 mL
Standard 5	White	Ready to use	2700 ng/L 1.3 mL
Standard 6	White	Ready to use	8100 ng/L 1.3 mL
Wash buffer salt Tween	-	Salt for dissolving	
Conjugate	Red	Concentrate	11x 0.7 mL
Antibody	Black	Concentrate	11x 0.7 mL
Substrate/Chromogen Substrat/Chromogen Red Chromogen Pro	Brown	Ready to use	10 mL
Stop solution	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)
- Rotary 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 water (dist. water) or deionized water
- 1 M HCl
- 1 M NaOH
- 0.1 M K₂HPO₄
- Ethyl acetate
- n-Hexane
- Dimethylsulfoxide (DMSO)

6. Warnings and precautions for the users

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.

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 reddish substrate/chromogen prior to test implementation
- Value of less than 0.6 absorbance units ($A_{450\text{ nm}} < 0.6$) for standard 1

9. Sample preparation

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

- Homogenize the sample completely, use stomacher or mixer
- 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

- Mix 1 g of the homogenized sample with 4 mL demineralized water, 0.5 mL 1 M HCl and 100 μ L 10 mM 2-nitrobenzaldehyde (in DMSO) by shaking vigorously
- Derivatize as described in chapter 9.3

9.2. Fish

- Mix 1 g of the homogenized sample with 3.9 mL demineralized water, 0.5 mL 1 M HCl and 200 μ L 10 mM 2-Nitrobenzaldehyde (in DMSO) by shaking vigorously
- Derivatize as described in chapter 9.3

9.3. Derivatization

- Incubate at 50 °C (122 °F) for 3 hours
- Add 5 mL 0.1 M K_2HPO_4 , 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 / 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
- Dissolve the residue in 1 mL n-hexane and mix properly with 1 mL sample buffer (see chapter 10.1)
- Centrifuge: 10 min / 3000 g / room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- Use 50 μ L of the lower, aqueous phase per well in the assay

10. Test procedure

10.1 Test preparation

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

The **anti-AHD antibody** is provided as a concentrate. Since the diluted antibody solution has a limited stability, only the amount which actually is needed should be reconstituted. Before pipetting, the antibody concentrate should be shaken thoroughly. For reconstitution, the antibody concentrate is diluted 1:11 (1+10) in wash buffer (e. g. 200 µL concentrate + 2 mL wash buffer, ready to use sufficient for 4 microtiter strips).

The **AHD conjugate** is provided as a concentrate. Since the diluted conjugate solution has a limited stability, only the amount which actually is needed should be reconstituted. Before pipetting, the conjugate concentrate should be shaken carefully. For reconstitution, the conjugate concentrate is diluted 1:11 (1+10) in wash buffer (e. g. 200 µL concentrate + 2 mL wash buffer, ready to use sufficient for 4 microtiter strips).

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

Alternative: Dissolve the contents of the pouch in 100 mL of demineralized water to obtain a 10-fold concentrated wash buffer. Dilute the 10-fold concentrated wash buffer 1:10 (1+9) with demineralized water to obtain the ready to use wash buffer. This solution expires after approx. 8 weeks, stored at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).

Components should be stored immediately at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) when no longer required.

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 antibody, 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 diluted conjugate to the bottom of each well.
4. Add 50 µL of the diluted antibody 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 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 to each well. Mix gently by shaking the plate manually and measure the absorbance at 450 nm. Read within 30 minutes after addition of stop solution.

11. Evaluation

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:

$$\frac{\text{absorbance standard (or sample)}}{\text{absorbance zero standard}} \times 100 = B/B_0 (\%)$$

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

12. Result interpretation

In order to obtain the AHD concentration in ng/L (ng/kg) actually contained in a sample, the concentration read from the calibration curve must be further multiplied by the corresponding dilution factor. When working in accordance with the regulation stated, the **dilution factor is 2**.

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 if automates (e.g. ThunderBolt® / Bolt™) are used.

15. Further application notes

Application notes are available on request.

For further product information and applications, please contact your local distributor or R-Biopharm at this address: sales@r-biopharm.de.

Version overview

Version number	Chapter and title
2010-10-20	Release version
2015-10-01	General revision
2022-10-26	Current version General revision Changes made: <ul style="list-style-type: none">– Brief information: detection capability supplemented– Chapter 6 and section “Related products and accessories for nitrofurans determination” updated– Chapters 13, 14 and 15 added

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

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,

Ute Salzbrenner, Dr. Peter Schubert

Handelsregister / Commercial Register:

Amtsgericht Darmstadt HRB 8321