



## **RIDASCREEN® Nitrofuran (DNSH)**

**REF R3725**

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung  
von 3,5-Dinitrosalicylsäurehydrazid (DNSH)

Enzyme immunoassay for the quantitative determination  
of 3,5-dinitrosalicylic acid hydrazide (DNSH)

In vitro Test

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



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](mailto:orders@r-biopharm.de)

Marketing & Vertrieb

E-Mail: [info@r-biopharm.de](mailto: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](mailto:orders@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® Nitrofurantoin (DNSH) (Art. Nr. R3725) ist ein Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung des Nitrofurantoin Metaboliten 3,5-Dinitrosalicylsäurehydrazid (DNSH) in Shrimps (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 wird ein Mikrotiterplatten-Photometer benötigt.

Probenvorbereitung: Homogenisieren und extrahieren

Zeitbedarf: Probenvorbereitung (für 10 Proben) ..... ca. 3 h  
Derivatisierung..... 3 h bei 50 °C  
Testdurchführung (Inkubationszeit)..... 45 min

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

Wiederfindungsrate: Shrimps ( $\emptyset$ ) ..... ca. 82 %  
(bezogen auf die  
Standardsubstanz)

Spezifität:

NP-DNSH (Standardsubstanz).....	100 %
Nitrofurantoin.....	122 %
DNSH.....	10 %
DNSA .....	0,5 %
DNSHA.....	55 %
SEM .....	< 0,1 %
AMOZ .....	< 0,1 %
AOZ .....	< 0,1 %
AHD .....	< 0,1 %
Nitrofurazon .....	< 0,1 %
Furaltadon .....	< 0,1 %
Furazolidon .....	< 0,1 %
Chloramphenicol .....	< 0,1 %
Nitrofurantoin .....	< 0,1 %

Die Spezifität des RIDASCREEN® Nitrofurant (DNSH) 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 Nitrofuranen**

RIDA® Nitrofurant (DNSH) Spiking Solution	(Art. Nr. R3795)
RIDASCREEN® Nitrofurant (AHD)	(Art. Nr. R3713)
RIDASCREEN® Nitrofurant (AMÖZ)	(Art. Nr. R3722)
RIDASCREEN® Nitrofurant (AOZ)	(Art. Nr. R3703)
RIDASCREEN® Nitrofurant (SEM)	(Art. Nr. R3724)
RIDA® Nitrofurant (AHD) Spiking Solution	(Art. Nr. R3796)
RIDA® Nitrofurant (AMÖZ) Spiking Solution	(Art. Nr. R3799)
RIDA® Nitrofurant (AOZ) Spiking Solution	(Art. Nr. R3798)
RIDA® Nitrofurant (SEM) Spiking Solution	(Art. Nr. R3797)

## 1. Verwendungszweck

RIDASCREEN® Nitrofurantoin (DNSH) (Art. Nr. R3725) ist ein Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung des Nitrofurantoin Metaboliten 3,5-Dinitrosalicylsäurehydrazid (DNSH) in Shrimps.

## 2. Allgemeines

Nitrofurantoin ist ein Nitrofurantoin-Antibiotikum, das in der Europäischen Union und anderen Ländern als Futtermittelzusatzstoff verboten ist. Nitrofurantoin wird in lebenden Organismen zu 3,5-Dinitrosalicylsäurehydrazid (DNSH) metabolisiert. DNSH ist ein Marker für den Nachweis der illegalen Verwendung von Nitrofurantoin in der Tierhaltung.

Gemäß der Verordnung (EU) 2019/1871 der Kommission gilt ab dem 28. November 2022 ein Referenzwert für Maßnahmen (*reference point for action*, RPA) von 0,5 µg/kg für DNSH und andere Nitrofurantoinmetabolite.

Die Rückstandsanalytik von Nitrofurantoinen basiert auf der Detektion der gewebegebundenen Metabolite der Muttersubstanzen. Da die Muttersubstanzen 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 Nitrofurantoinen bestimmt.

Muttersubstanz	Metabolit	Abkürzung
Nitrofurantoin	3,5-Dinitrosalicylsäurehydrazid	DNSH
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-DNSH, NP-AHD, NP-AMOZ, NP-AOZ und NP-SEM derivatisiert werden.

## 3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatten sind mit Fänger-Antikörpern und spezifischen Antikörpern gegen DNSH beschichtet. Zugegeben werden Standards bzw. Probelösung und enzym-markiertes DNSH (Enzymkonjugat). Freies und enzym-markiertes

DNSH konkurrieren um die Bindungsstellen am anti-DNSH Antikörper (kompetitiver Enzymimmunoassay). Nicht gebundenes enzym-markiertes DNSH 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 DNSH-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	100 ng/l	1,3 ml
<b>Standard 3</b> Standard 3	Weiß	Gebrauchsfertig	250 ng/l	1,3 ml
<b>Standard 4</b> Standard 4	Weiß	Gebrauchsfertig	625 ng/l	1,3 ml
<b>Standard 5</b> Standard 5	Weiß	Gebrauchsfertig	1563 ng/l	1,3 ml
<b>Standard 6</b> Standard 6	Weiß	Gebrauchsfertig	3906 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

## 5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

### 5.1 Geräte

- Laborhandschuhe
- Waage (Messbereich mindestens bis zu 50 g, Genauigkeit von  $\pm 0,01$  g) und Einwaageschalen
- Schüttler (Vortex)
- Schlagmühle, Mörser, Ultra-Turrax oder Homogenisator
- Evaporator
- Zentrifuge (mind. 4000 x g) + zentrifugierbare Reagenzröhrchen mit Verschluss (z. B. 50 ml centrifuge tubes von Greiner)
- Messpipetten
- Variable 20 - 200  $\mu$ l und 200 - 1000  $\mu$ l Mikropipetten
- Gegebenenfalls: 8-Kanalpipetten für 50  $\mu$ l, 100  $\mu$ l und 250  $\mu$ l
- 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  $K_2HPO_4$
- Ethylacetat
- n-Hexan
- Dimethylsulfoxid (DMSO)

Für die Probenvorbereitung ist die Herstellung einer Derivatisierungslösung erforderlich: 10 mM 2-Nitrobenzaldehyd (siehe Kapitel 4.) in Dimethylsulfoxid (DMSO). Die Lösung jeweils vor Gebrauch frisch ansetzen, z. B. 7,6 mg 2-Nitrobenzaldehyd in 5 ml DMSO lösen.

## 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.

Die Standards enthalten Nitrofuran (DNSH), Vorsicht ist geboten, Hautkontakt vermeiden (Handschuhe tragen).

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.

Substrat/Chromogen sowie das Konjugat sind 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 Substrat/Chromogen vor Zugabe in die Kavitäten
- Extinktion kleiner 0,8 ( $E_{450\text{ nm}} < 0,8$ ) für den Nullstandard

## 9. Probenvorbereitung

Die Proben kühl und lichtgeschützt lagern.

- 10 mM 2-Nitrobenzaldehyd (siehe Kapitel 5.2) 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 (3 Stunden Aufarbeitung)

- Probe 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
- 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 Proben 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, 30 s vortexen und mit 1 ml Waschpuffer (siehe Kapitel 10.1) nochmals 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 beiliegende Puffersalz (siehe Kapitel 4.) nutzen. Zur Herstellung des Puffers wird der gesamte Inhalt des Beutels in 1 Liter destilliertem Wasser gelöst. Der gelöste Waschpuffer ist ca. 4 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 Multikanal- oder einer Multistep-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.
3. Je 50 µl Konjugat (roter Verschluss) in die entsprechenden Kavitäten pipettieren, vorsichtig manuell 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 (siehe Kapitel 10.1.) waschen. Diesen Vorgang zweimal wiederholen.
5. 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.
6. Je 100 µl Stopp-Reagenz (gelber Verschluss) in jede Kavität pipettieren und vorsichtig manuell mischen. 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.

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 DNSH-Konzentration [ng/l] auftragen.

## 12. Interpretation der Ergebnisse

Um die in den Proben enthaltene tatsächliche DNSH-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 Risikoanalyse 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.
- Zur Prüfung auf richtige und störungsfreie Durchführung der Bestimmung Dotierungsversuche in Matrix durchzuführen.
- Bei der Analyse mittels Automaten (z. B. ThunderBolt® / Bolt™) sich an [info@r-biopharm.de](mailto:info@r-biopharm.de) zu wenden.

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

### Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2023-11-28	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 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® Nitrofurazone (DNSH)

## Brief information

RIDASCREEN® Nitrofurazone (DNSH) (Art. No. R3725) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of nitrofurazone metabolite 3,5-dinitrosalicylic acid hydrazide (DNSH) in shrimps (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 and extraction

Time requirement: Sample preparation (for 10 samples) ..... approx. 3 h  
Derivatisation ..... approx. 3 h at 50 °C  
Test implementation (incubation time)..... 45 min

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

Recovery rate: Shrimps ..... approx. 82 %  
(corresponding to the standard substance)

Specificity:

NP-DNSH (standard substance).....	100 %
Nitrofurazone.....	122 %
DNSH .....	10 %
DNSA .....	0.5 %
DNSHA.....	55 %
SEM .....	< 0.1 %
AMOZ .....	< 0.1 %
AOZ .....	< 0.1 %
AHD .....	< 0.1 %
Nitrofurazone .....	< 0.1 %

Furaltadon .....	< 0.1 %
Furazolidon .....	< 0.1 %
Chloramphenicol .....	< 0.1 %
Nitrofurantoin .....	< 0.1 %

The specificity of the RIDASCREEN® Nitrofurantoin (DNSH) 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 (LoD) 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 product and accessories for nitrofurantoin determination**

RIDA® Nitrofurantoin (DNSH) Spiking Solution	(Art. No. R3795)
RIDASCREEN® Nitrofurantoin (AHD)	(Art. No. R3713)
RIDASCREEN® Nitrofurantoin (AMOZ)	(Art. No. R3722)
RIDASCREEN® Nitrofurantoin (AOZ)	(Art. No. R3703)
RIDASCREEN® Nitrofurantoin (SEM)	(Art. No. R3724)
RIDA® Nitrofurantoin (AHD) Spiking Solution	(Art. No. R3796)
RIDA® Nitrofurantoin (AMOZ) Spiking Solution	(Art. No. R3799)
RIDA® Nitrofurantoin (AOZ) Spiking Solution	(Art. No. R3798)
RIDA® Nitrofurantoin (SEM) Spiking Solution	(Art. No. R3797)

## 1. Intended use

RIDASCREEN® Nitrofurantoin (DNSH) (Art. No. R3725) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of nitrofurantoin metabolite 3,5-dinitrosalicylic acid hydrazide (DNSH) in shrimps.

## 2. General information

Nitrofurantoin is a nitrofurantoin antibiotic banned as a feed additive in the European Union and other countries. Nitrofurantoin is metabolized to 3,5-dinitrosalicylic acid hydrazide (DNSH) in living organisms. DNSH is a marker for the detection of illegal use of nitrofurantoin in animal husbandry. In accordance with Commission Regulation (EU) 2019/1871 a reference point for action (RPA) of 0.5 µg/kg for DNSH and other nitrofurantoin metabolites applies from 28 November 2022.

Parent compound	Metabolite	Abbreviation
Nitrofurantoin	3,5-dinitrosalicylic acid hydrazide	DNSH
Nitrofurantoin	1-Aminohydantoin	AHD
Furaltadone	3-Amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone	AMOZ
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-DNSH, NP-AHD, NP-AMOZ, 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 specific anti-DNSH antibodies. Standards or samples and enzyme-conjugated DNSH are added into the wells. Free and enzyme-conjugated DNSH compete for the anti-DNSH antibody binding sites. Any unbound enzyme conjugate is then removed in a washing step. Substrate/chromogen is added to the wells and bound enzyme-conjugate converts the chromogen into a blue product. The addition of the stop solution leads to a color change from blue to yellow. The measurement is made photometrically at 450 nm. The absorbance is inversely proportional to the DNSH 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 color	Format		Volume
Microtiter plate	-	Ready to use		96 wells
2-Nitrobenzaldehyd	-	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	250 ng/L	1.3 mL
Standard 4	White	Ready-to-use	625 ng/L	1.3 mL
Standard 5	White	Ready-to-use	1563 ng/L	1.3 mL
Standard 6	White	Ready-to-use	3906 ng/L	1.3 mL
Wash buffer salt Tween		Salt for dissolving		
Conjugate	Red	Ready-to-use		7.5 mL
Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro	Brown	Ready-to-use		13 mL
Stop solution	Yellow	Ready to use		14 mL

## 5. Reagents required but not provided

### 5.1 Equipment

- Gloves
- Scale (measurement range at least up to 50 g and precision of  $\pm 0.01$  g) and weighing vessels
- Vortex mixer
- Laboratory mincer / grinder, mortar, ultra-turrax or homogenizer
- Centrifuge (at least 4,000 x g) + centrifugal vials with cap (e.g. 50 mL centrifuge tubes from Greiner)
- Rotary evaporator
- Magnetic stirrer
- Graduated pipettes
- Variable 20 - 200  $\mu$ L and 200 - 1000  $\mu$ L micropipettes
- If available: 8-channel micropipettes for 50  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, and 250  $\mu$ L
- 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 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- Ethyl acetate
- n-Hexane
- Dimethyl sulfoxide (DMSO)

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).

## 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.

The standards contain nitrofuran metabolite (NP-DNSH). Particular care should be taken. Avoid contact of the reagent with the skin (use gloves).

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 (36 - 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 (36 - 46 °F).

The substrate/chromogen and conjugate are 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 substrate/chromogen prior to test implementation
- Value of less than 0.8 absorbance units ( $A_{450\text{ nm}} < 0.8$ ) for the zero standard

## 9. Sample preparation

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) by vortexing.

### Derivatization

- Incubate for 3 h at 50 °C (122 °F)
- Add 5 mL 0.1 M  $K_2HPO_4$ , 0.4 mL 1 M NaOH and 10 mL ethyl acetate
- Vortex for 30 s
- 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 (see chapter 10.1) for 30 s

- 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 procedure

### 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 wash buffer salt (see chapter 4.) contained in the kit. Dissolve the entire buffer salt in one liter of distilled water. The ready to use washing buffer expires after approx. 4 weeks at 2 - 8 °C (36 - 46 °F).

Alternative: Dissolve the contents of the pouch in 100 mL of distilled water to obtain a 10-fold concentrated washing buffer. This solution expires after approx. 8 weeks, store at room temperature (20 - 25 °C). Use 1 part 10-fold concentrate and dissolve with 9 parts of distilled water to obtain the ready to use washing buffer.

Components should be stored immediately at 2 - 8 °C (36 - 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 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 extract to separate duplicate wells.
3. Add 50 µL of the conjugate (red cap) to the bottom of each well, mix gently by shaking the plate manually and incubate for 30 min at room temperature (20 - 25 °C) in the dark.

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 (brown cap) 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 (yellow cap) to each well. Mix gently by shaking the plate manually and measure the absorbance at 450 nm. Read within 15 minutes after addition of stop solution.

## 11. Evaluation

Special software, **RIDASOFT® Win.NET Food & Feed (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 semi-logarithmic against the DNSH concentration [ng/L].

## 12. Result interpretation

In order to obtain the DNSH 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 do spike experiments in matrix to ensure an accurate and correct test procedure.
- To contact [sales@r-biopharm.de](mailto:sales@r-biopharm.de) if automates (e.g. ThunderBolt® / Bolt™) are used.









**For 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
2023-11-28	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),

Ute Salzbrenner, Dr. Frank Apostel,

Dr. Frank Vitzthum

Handelsregister / Commercial Register:

Amtsgericht Darmstadt HRB 8321