

RIDASCREEN[®] Chloramphenicol

Art. No. R1511

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung
von Chloramphenicol

Enzyme immunoassay for the quantitative determination
of chloramphenicol

In vitro Test

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

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Please contact for questions and further information:

Zentrale/Switchboard

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

Auftragsannahme/Order department

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

E-Mail: orders@r-biopharm.de

Marketing & Vertrieb/Marketing & sales

Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-40

E-Mail : info@r-biopharm.de

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

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

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

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

Kurzinformation

RIDASCREEN® Chloramphenicol (Art. Nr.: R1511) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Chloramphenicol in Milch, Milchpulver und Milchprodukten, Honig und Gelée Royal, Fleisch, Fisch, Shrimps, Eiern, Urin (auch Chloramphenicol-Glucuronid), Plasma/Serum und Futtermittel. Alle Reagenzien für die Durchführung des Enzymimmunoassays - inkl. Standards - sind im Testkit enthalten.

Ein Testkit ist ausreichend für 96 Bestimmungen (einschl. Standardbestimmungen). Zur Auswertung benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

Probenvorbereitung: Milch: direkter Einsatz
 Milchpulver: Rekonstitution oder alternativ: Fällung, Extraktion, Evaporation, Rekonstitution
 Joghurt, Kefir, Buttermilch, Sahne: Fällung, Extraktion, Evaporation, Rekonstitution
 Quark, Schmand, Creme fraîche: Homogenisierung, Entfettung, Extraktion, Evaporation, Rekonstitution
 Butter: Entfettung, Extraktion, Evaporation, Rekonstitution
 Käse: Homogenisierung, Extraktion, Evaporation, Rekonstitution
 Honig: Extraktion, Evaporation, Rekonstitution
 Gelée Royal: Extraktion, Evaporation, Rekonstitution
 Fleisch, Fisch, Shrimps, Eier: Homogenisierung, Extraktion, Evaporation, Rekonstitution, Entfettung
 Urin: Direkter Einsatz oder Hydrolyse, Extraktion, Evaporation, Rekonstitution
 Serum/Plasma: Extraktion, Evaporation, Rekonstitution
 Futtermittel: Vermahlen, Extraktion, Evaporation, Entfettung, Rekonstitution

Zeitbedarf: Probenvorbereitung (für 10 Proben)
 Je nach Probenmatrix ca. 5 min bis 2 h
 Testdurchführung (Inkubationszeit) 45 min

Nachweisgrenze:	Milch.....	ca. 24 ng/L
(bezogen auf die	Milchpulver (nach Rekonstitution).....	ca. 240 ng/kg
Standardsubstanz)	Milchpulver (Extraktion).....	ca. 24 ng/kg
	Joghurt, Kefir, Buttermilch, Sahne.....	ca. 12 ng/kg
	Quark, Schmand, Creme fraîche.....	ca. 15 ng/kg
	Butter	ca. 61 ng/kg
	Käse.....	ca. 16 ng/kg
	Honig.....	ca. 25 ng/kg
	Gelée Royal	ca. 23 ng/kg
	Fleisch (Rind, Schwein, Geflügel).....	ca. 5 ng/kg
	Fisch	ca. 8 ng/kg
	Shrimps.....	ca. 8 ng/kg
	Shrimps (5 in 1 Nitrofurantol-Probenvorbereitung) ..	ca. 34 ng/kg
	Eier.....	ca. 15 ng/kg
	Urin, direkt (Chloramphenicol-Glucuronid).....	ca. 138 ng/L
	Urin, hydrolysiert (Chloramphenicol).....	ca. 196 ng/L
	Plasma/Serum.....	ca. 18 ng/L
	Futtermittel	ca. 107 ng/kg

Wiederfindungsrate:	Milch.....	ca. 93 %
(bezogen auf die	Milchpulver (nach Rekonstitution).....	ca. 101 %
Standardsubstanz)	Milchpulver (Extraktion).....	ca. 78 %
	Joghurt, Kefir, Buttermilch, Sahne.....	ca. 104 %
	Quark, Schmand, Creme fraîche.....	ca. 92 %
	Butter	ca. 82 %
	Käse.....	ca. 74 %
	Honig.....	ca. 106 %
	Gelée Royal	ca. 77 %
	Fleisch.....	ca. 91 %
	Fisch	ca. 97 %
	Shrimps.....	ca. 92 %
	Shrimps (5in1 Nitrofurantol-Probenvorbereitung)	ca. 98 %
	Eier.....	ca. 83 %
	Urin direkt (Chloramphenicol-Glucuronid).....	ca. 113 %
	Urin hydrolysiert (Chloramphenicol).....	ca. 101 %
	Plasma/Serum.....	ca. 96 %
	Futtermittel	ca. 104 %

Die Spezifität des RIDASCREEN® Chloramphenicol-Tests wurde durch die Bestimmung der Kreuzreaktivität zu den entsprechenden Substanzen im Puffersystem ermittelt. In Proben kann die Spezifität aufgrund von Matrixeffekten von der im Puffersystem ermittelten 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.

Spezifität:	Chloramphenicol (RR-para-Stereoisomer)
im Puffersystem	(Standardsubstanz) 100 %
	Dexamycilin (SS-para-Stereoisomer)..... < 1 %
	alle anderen Stereoisomere nicht getestet
	Chloramphenicol-Base < 1%
	Florfenicol < 1%
	Thiamphenicol < 1%
	Nitrofurantoin, AHD, NP-AHD < 1%
	Furaltadon, AMOZ, NP-AMOZ < 1%
	Furazolidon, AOZ, NP-AOZ < 1%
	Nitrofurazon, SEM, NP-SEM < 1%
	Chloramphenicol-Glucuronid ca. 68 %

Spezifität:	
in Rinderurin	Chloramphenicol-Glucuronid ca. 51 %
in Schweineurin	Chloramphenicol-Glucuronid ca. 68 %

Zur Erhöhung der Prüfungsqualität bei ELISA-Verfahren verweisen wir zusätzlich auf unser ELISA-Handbuch in der jeweiligen Fassung. 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 abgerufen, gedruckt und gespeichert werden.

Produktangebot

RIDA® Chloramphenicol Dotierlösung (R1599)

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN® Chloramphenicol ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Chloramphenicol in Milch, Milchpulver und Milchprodukten, Honig und Gelée Royal, Fleisch, Fisch, Shrimps, Eiern, Urin (auch Chloramphenicol-Glucuronid), Plasma/Serum und Futtermittel.

Im September 1998 wurde ein Suchverfahren auf das Vorhandensein von Chloramphenicol-Rückständen in Milch nach §64 LFGB (01.00-68) zugelassen. Bei diesem Verfahren handelt es sich um ein Screeningverfahren im Mikrotiterplattensystem (ELISA).

2. Allgemeines

Chloramphenicol ist ein Breitbandantibiotikum, das wegen seiner hervorragenden antibakteriellen und pharmakokinetischen Eigenschaften in der Tierproduktion häufig eingesetzt wird. Beim Menschen können allerdings hämatotoxische Nebenwirkungen hervorgerufen werden, vor allem die Chloramphenicol-induzierte aplastische Anämie, für die bisher keine Dosis-Wirkungsbeziehung abgeleitet werden konnte. Dies führte zu einem generellen Verbot, Chloramphenicol zur Behandlung von Nutztieren einzusetzen. Für Testsysteme gilt eine Mindestleistungsgrenze von 300 ng/kg.

3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte sind mit Fänger-Antikörpern gegen anti-Chloramphenicol-Antikörper beschichtet. Die Mikrotiterplatte ist bereits funktionalisiert mit anti-Chloramphenicol-Antikörpern, welche an die immobilisierten Fänger-Antikörper gebunden sind. Durch Zugabe von Standards bzw. Probe und enzymmarkiertem Chloramphenicol (Konjugat) konkurrieren freies und enzymmarkiertes Chloramphenicol um die Chloramphenicol-Antikörperbindungsstellen (kompetitiver Enzymimmunoassay). Nicht gebundenes enzymmarkiertes Chloramphenicol 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 zu der Chloramphenicol-Konzentration in der Probe.

4. Packungsinhalt

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

Komponente	Deckelfarbe	Zustand	Inhalt
Microtiter plate Mikrotiterplatte	-	gebrauchsfertig	96 Kavitäten
Standard 1 Standard 1	weiß	gebrauchsfertig	0 ng/L 1,3 ml
Standard 2 Standard 2	weiß	gebrauchsfertig	25 ng/L 1,3 ml
Standard 3 Standard 3	weiß	gebrauchsfertig	50 ng/L 1,3 ml
Standard 4 Standard 4	weiß	gebrauchsfertig	100 ng/L 1,3 ml
Standard 5 Standard 5	weiß	gebrauchsfertig	250 ng/L 1,3 ml
Standard 6 Standard 6	weiß	gebrauchsfertig	750 ng/L 1,3 ml
Wash buffer salt Tween Waschpuffer (Salz) Tween		Salz zum Auflösen	
Conjugate Konjugat	rot	gebrauchsfertig	7,5 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:

Gerät	Milch Urin	Milch- pulver, Milch- produkte	Honig	Royal Jelly	Fleisch Fisch Shrimps Eier	Urin nach Hydro- lyse	Plasma Serum	Futter- mittel
Mikrotiterplatten- Photometer (450 nm)	•	•	•	•	•	•	•	•
Messpipetten variable 20 - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten	•	•	•	•	•	•	•	•
Mixer		•			•			•
Schüttler		•	•	•	•	•		•
Zentrifuge		•	•	•	•	•	•	•
Evaporator		•	•	•	•	•	•	•
Vortex	•	•	•	•	•	•	•	•
Inkubator						•		
Wasserbad		•						

5.2. Reagenzien:

Reagenz	Honig	Royal Jelly	Fleisch Fisch Shrimps	Eier	Urin nach Hydrolyse	Plasma Serum	Futter- mittel
destilliertes Wasser	•		•				
Etylacetat p.a.	•	•	•	•		•	•
n-Hexan ≥ 95 %			•	•			•
<i>E. coli</i> β-Glucuronidase					•		
75 mM Kaliumphosphat- puffer pH 6,8					•		
0,5 M NaOH		•					

Reagenz	Joghurt, Kefir, Buttermilch, Sahne	Milch- pulver	Quark, Schmand, Creme fraîche	Butter	Käse
20 mM PBS	•				
Carrez	•	•			
Ethylacetat p.a.	•	•	•		•
n-Hexan ≥ 95 %		•		•	
20 % (v/v) Methanol				•	
10 % (v/v) Methanol			•	•	•

Escherichia coli β-Glucuronidase (Sigma-Aldrich; Art. Nr.: G7646):

- das Lyophilisat auf eine Endkonzentration von 1 mg/ml rekonstituieren

75 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,8:

- Puffer A: 10,2 g KH_2PO_4 einwiegen; mit dest. Wasser auf 1000 ml auffüllen
- Puffer B: 13,06 g K_2HPO_4 einwiegen; mit dest. Wasser auf 1000 ml auffüllen
- durch Mischen von Puffer A und B im Verhältnis 1:1 auf pH 6,8 einstellen

0,5 M NaOH:

- 20 g NaOH einwiegen, mit dest. Wasser auf 1000 ml auffüllen

20 mM PBS:

- 0,55 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ + 2,85 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ + 8,77 g NaCl; mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen, mit NaOH auf pH 7,4 einstellen

Carrez:

- Carrez I: 15,21 g Kaliumhexacyanoferrat(II) $\times 3 \text{H}_2\text{O}$ in 100 ml destilliertem Wasser lösen
- Carrez II: 29,90 g Zinksulfat $\times 7 \text{H}_2\text{O}$ in 100 ml destilliertem Wasser lösen

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 (MSDS) zu diesem Produkt auf unserer Internetseite www.r-biopharm.de.

7. Reagenzien und ihre Lagerung

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

Nicht benötigte Kavitäten zusammen mit dem Trockenmittel im Folienbeutel gut verschlossen aufbewahren und weiterhin bei 2 - 8 °C lagern.

Das Substrat-/Chromogen ist lichtempfindlich, deshalb direkte Lichteinwirkung vermeiden.

Nach Ablauf des Verfallsdatums (siehe Testkit-Außenetikett) kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.

Ein Austausch von Einzelreagenzien zwischen Kits verschiedener Chargennummern ist nicht zulässig.

8. Anzeichen für Reagenzienverfall

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

9. Probenvorbereitung

Die Proben kühl und lichtgeschützt lagern.

9.1. Kuhmilch (Roh-, Frisch-, H-, Mager- und Vollmilch) sowie nach Herstellerangabe rekonstituiertes Milchpulver

- eine repräsentative Probenmenge bis zur Homogenität kurz vortexen
- 50 µl Milch pro Kavität im Test einsetzen

Um eine bessere Sensitivität für den Nachweis in Milchpulver zu erreichen, kann alternativ die Probenvorbereitung (Extraktion) nach 9.2. durchgeführt werden.

9.2. Milchpulver (Magermilch und Vollmilch): Extraktion

- 1 g Milchpulver mit 10 ml dest. Wasser in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen durch kräftiges Schütteln suspendieren
- 1 ml Carrez I (siehe 5.2.) hinzugeben und vortexen
- 1 ml Carrez II (siehe 5.2.) vortexen
- zentrifugieren: 10 min / 3000 g / 4 - 12 °C
(ist keine Kühlzentrifuge vorhanden, sollten die rekonstituierten Milchpulverproben auf ca. 8 °C vorgekühlt werden)
- von dem Überstand 7,2 ml in ein neues 50 ml Zentrifugenröhrchen überführen
- 6 ml Ethylacetat hinzufügen und 10 min über Kopf schütteln
- zentrifugieren: 10 min / 3000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 4 ml Ethylacetat-Überstand in ein neues Glasgefäß überführen und unter einem Stickstoff- oder Luftstrom bei ca. 60 °C bis zur Trockene evaporieren. Sollten nach dem Trocknen noch Fettrückstände vorhanden sein, wie unten angegeben verfahren*
- sind keine Fettrückstände vorhanden, den trockenen Rückstand in 400 µl Waschpuffer (siehe 10.1.) aufnehmen und vortexen
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

* bei Fettrückständen nach dem Evaporieren:

- 400 µl n-Hexan zugeben und vortexen
- 400 µl Waschpuffer zugeben und vortexen
- zentrifugieren: 10 min / 3000 g / Raumtemperatur (20 – 25 °C)
- 50 µl der unteren wässrigen Phase pro Kavität im Test einsetzen

9.3. Milchprodukte

9.3.1 Joghurt, Kefir, Buttermilch, Sahne

- 10 g Probe in ein Zentrifugenröhrchen einwiegen
- 8 ml 20 mM PBS zugeben und mischen
- 1 ml Carrez I (siehe 5.2.) zugeben und intensiv vortexen
- 1 ml Carrez II (siehe 5.2.) zugeben und 10 min über Kopf schütteln
- zentrifugieren: 10 min / 4.000 g / 4 °C
- 4 ml Überstand in ein neues Gefäß überführen
- 8 ml Ethylacetat zugeben und 10 min über Kopf schütteln
- zentrifugieren: 10 min / 3.000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 4 ml Überstand in ein neues Gefäß überführen und unter einem Stickstoff- oder Luftstrom bei ca. 60 °C bis zur Trockene evaporieren
- den trockenen Rückstand in 500 µl Waschpuffer (siehe 10.1) rekonstituieren
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

9.3.2 Quark, Schmand, Creme fraîche

- 5 g Probe zu 15 ml 10 % Methanol geben und 1 min kräftig vortexen
- zentrifugieren: 15 min / 4.000 g / 4 °C
- Fettphase durchstechen und 4 ml Probe in ein neues Glasgefäß überführen
- 8 ml Ethylacetat hinzugeben
- 10 min über Kopf schütteln
- zentrifugieren: 10 min / 3.000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 4 ml Überstand in ein neues Glasgefäß überführen und unter einem Stickstoff- oder Luftstrom bei ca. 60 °C bis zur Trockene evaporieren
- den trockenen Rückstand in 500 µl Waschpuffer rekonstituieren
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

9.3.3 Butter

- 1 g Butter in ein 10 ml Zentrifugenröhrchen einwiegen
- Butter bei ca. 40 °C im Wasserbad schmelzen
- 1 ml Hexan zugeben und 10 s kräftig vortexen
- 1 ml 20 % Methanol zugeben und 10 s kräftig vortexen
- 10 min über Kopf schütteln
- zentrifugieren: 10 min / 2.000 g / 4 °C
- 700 µl der unteren wässrigen Phase in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen
- 10 min auf Eis legen
- zentrifugieren: 5 min / 20.000 g / Raumtemperatur (20 – 25 °C)
- die untere Phase 1:4,5 (1+3,5) mit Waschpuffer verdünnen
(z.B. 200 µl untere Phase + 700 µl Waschpuffer)
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

9.3.4 Käse

- eventuell vorhandenen Edelschimmel entfernen
- 10 g Käse mit 30 ml 10 % Methanol komplett homogenisieren
- im Wasserbad bei 40 °C für 10 min inkubieren, zwischendurch mindestens 3x kräftig schütteln
- zentrifugieren: 15 min / 4.000 g / 4 °C
- 3,5 ml der unteren Phase in ein neues Gefäß überführen und 7 ml Ethylacetat hinzugeben
- 10 min über Kopf schütteln
- zentrifugieren: 10 min / 3.000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 3,5 ml Überstand in ein neues Gefäß überführen und unter einem Stickstoff- oder Luftstrom bei ca. 60 °C bis zur Trockene evaporieren
- den trockenen Rückstand in 500 µl Waschpuffer rekonstituieren
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

9.4. Honig

- 2 g Honig in 4 ml dest. Wasser in einem Zentrifugenröhrchen lösen
- 4 ml Ethylacetat hinzufügen und 10 min über Kopf schütteln
- zentrifugieren: 10 min / 3.000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 1 ml Überstand in ein neues Gefäß überführen und unter einem Stickstoff- oder Luftstrom bei ca. 60 °C bis zur Trockene evaporieren
- den trockenen Rückstand in 500 µl Waschpuffer rekonstituieren und vortexen
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

9.5. Gelée Royal

- 2 g Gelée Royal in ein Zentrifugenröhrchen einwiegen und 3 ml 0,5 M NaOH hinzugeben
- schütteln bis das Gelée Royal komplett gelöst ist
- 8 ml Ethylacetat hinzugeben und 1 min kräftig vortexen
- 10 min über Kopf schütteln
- zentrifugieren: 10 min / 3.000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 2 ml des Überstands in eine neues Glasgefäß überführen und unter einem Stickstoff- oder Luftstrom bei ca. 60 °C bis zur Trockene evaporieren
- den trockenen Rückstand in 500 µl Waschpuffer rekonstituieren
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

9.6. Fleisch (Rind, Schwein, Geflügel), Fisch, Shrimps

- eine repräsentative Probenmenge mit einem geeigneten Gerät vollständig homogenisieren
- zu 3 g homogenisierter Probe 3 ml dest. Wasser und 6 ml Ethylacetat geben
- 10 min über Kopf schütteln
- zentrifugieren: 10 min / 3.000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 4 ml Überstand (entspricht 2 g Probe) in ein neues Gefäß überführen und unter einem Stickstoff- oder Luftstrom bei ca. 60 °C bis zur Trockene evaporieren
- trockenen Rückstand in 1 ml n-Hexan rekonstituieren
- 500 µl Waschpuffer hinzugeben und 1 min vortexen
- zentrifugieren: 10 min / 3.000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 50 µl der unteren wässrigen Phase pro Kavität im Test einsetzen

Chloramphenicol kann aus Shrimp-Proben auch zusammen mit den Metaboliten (AHD, AMOZ, AOZ und SEM) der Nitrofurant Antibiotika in einer einzigen Probenvorbereitung extrahiert werden. Das Extrakt kann danach sowohl in RIDASCREEN® Chloramphenicol als auch in allen RIDASCREEN® Nitrofurant ELISA-Tests eingesetzt werden. Der Arbeits- und Zeitaufwand wird dadurch wesentlich verringert. Eine ausführliche Applikation ist auf Anfrage erhältlich.

9.7. Ei (Vollei, Eiweiß, Eigelb) vom Huhn

- eine repräsentative Probenmenge mit einem geeigneten Gerät vollständig homogenisieren
- zu 2 g homogenisierter Probe 8 ml Ethylacetat geben
- 10 min über Kopf schütteln
- zentrifugieren: 10 min / 3.000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 4 ml Überstand (entspricht 1 g Probe) in ein neues Gefäß überführen und unter einem Stickstoff- oder Luftstrom bei ca. 60 °C bis zur Trockene evaporieren
- trockenen Rückstand in 1 ml n-Hexan rekonstituieren
- 1 ml Waschpuffer hinzugeben und 1 min vortexen
- zentrifugieren: 10 min / 3.000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 50 µl der unteren wässrigen Phase pro Kavität im Test einsetzen

9.8. Urin (Rind, Schwein)

Nach der Applikation von Chloramphenicol an Nutztiere, findet in der Leber eine Metabolisierung in Form einer Konjugation mit Glucuronsäure statt. Das dabei entstehende Chloramphenicol-Glucuronid wird über die Niere mit dem Urin wieder ausgeschieden. Zur Analyse von Chloramphenicol in Urin muss die Urinprobe vor der Analyse hydrolysiert werden. Dabei wird Chloramphenicol-Glucuronid durch das Enzym Glucuronidase dekonjugiert und Chloramphenicol kann als freies Molekül analysiert werden. Da der im Test verwendete Antikörper eine Kreuzreaktivität für Chloramphenicol-Glucuronid im Urin besitzt, ist es möglich, die Konzentration von Chloramphenicol-Glucuronid im Urin durch direkten Einsatz einer Urinprobe im Test zu bestimmen. Zur Auswertung bitte die Hinweise unter 11. Auswertung beachten.

9.8.1 direkter Einsatz zur Analyse von Chloramphenicol-Glucuronid in Urin

- Urinproben gut mischen (vortexen)
- bei Trübung zentrifugieren: 10 min / 3.000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 50 µl Urin pro Kavität im Test einsetzen
- wenn Konzentrationen gemessen werden, die über dem Bereich der Standardkurve liegen, kann die Urinprobe mit Waschpuffer verdünnt werden

9.8.2 Hydrolyse zur Analyse von Chloramphenicol im Urin

- 100 µl Urin in ein Zentrifugenröhrchen geben
- 1 ml 75 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,8 und 10 µl *Escherichia coli* β-Glucuronidase zugeben und mischen
- 3 h bei 37 °C hydrolysieren
- 2 ml Ethylacetat zugeben und 10 min über Kopf schütteln
- zentrifugieren: 5 min / 1.000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 1 ml der oberen Phase in ein neues Gefäß überführen und unter einem Stickstoff- oder Luftstrom bei ca. 60 °C bis zur Trockene evaporieren
- den trockenen Rückstand in 500 µl Waschpuffer rekonstituieren und vortexen
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

9.9. Plasma/Serum (Rind, Schwein)

- in einem 2 ml Reaktionsgefäß 1 ml Ethylacetat zu 0,5 ml Plasma/Serum geben
- 1 min vortexen
- zentrifugieren: 5 min / 3.000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 700 µl der oberen Phase in ein neues Glasgefäß überführen und unter einem Stickstoff- oder Luftstrom bei ca. 60 °C bis zur Trockene evaporieren
- trockenen Rückstand in 350 µl Waschpuffer rekonstituieren
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

9.10. Futtermittel

- Proben fein vermahlen
- 4 ml Ethylacetat zu 1 g fein vermahlener Probe in ein Zentrifugenröhrchen geben
- 1 min intensiv vortexen
- zentrifugieren: 10 min / 3.000 g / Raumtemperatur (20 – 25 °C)
- 2 ml der oberen Phase in ein neues Gefäß überführen und unter einem Stickstoff- oder Luftstrom bei ca. 60 °C bis zur Trockene evaporieren
- den trockenen Rückstand in 1 ml Hexan rekonstituieren
- 1 ml Waschpuffer hinzugeben und 1 min intensiv vortexen
- zentrifugieren: 10 min / 3.000 g / Raumtemperatur (20 – 25 °C)
- 50 µl der unteren wässrigen Phase 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, benutzen Sie dazu bitte das beiliegende Puffersalz (siehe 4.). Zur Herstellung des Puffers wird der gesamte Inhalt des Beutels in 1 Liter destilliertem Wasser gelöst. Der gelöste Waschpuffer ist ca. 4 - 6 Wochen bei 2 - 8 °C haltbar.

Alternativ: Inhalt des Beutels in 100 ml dest. Wasser lösen (10fach Konzentrat). Die Lösung ist ca. 8 - 12 Wochen bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) haltbar.

Um die gebrauchsfertige Lösung herzustellen 1 Teil des 10fach Konzentrats mit 9 Teilen dest. Wasser mischen.

10.2. Testdurchführung

Sorgfältiges Waschen ist sehr wichtig. Ein Eintrocknen der Kavitäten zwischen den Arbeitsschritten vermeiden.

1. So viele Kavitäten in den Halterahmen einsetzen, wie für alle Standards und Proben 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 in die entsprechenden Kavitäten pipettieren, vorsichtig manuell mischen und 30 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) 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 10.1.) waschen. Diesen Vorgang zweimal wiederholen.
5. 100 µl Substrat-/Chromogen 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 in jede Kavität pipettieren und vorsichtig manuell mischen. Die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe des Stopp-Reagenzes messen.

11. Auswertung

Für die Auswertung ist bei R-Biopharm eine speziell für die RIDASCREEN® Enzymimmunoassays entwickelte Software, die RIDA®SOFT Win.NET (Art. Nr. Z9996), erhältlich.

Der Verlauf der Standardkurve kann dem beigefügten Analysenzertifikat entnommen werden.

Hinweis für die Berechnung ohne Software:

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

Den Nullstandard somit gleich 100 % setzen und die Extinktionswerte in Prozent angeben. Die errechneten Werte für die Standards in einem Koordinatensystem auf halblogarithmischem Millimeterpapier gegen die Chloramphenicol-Konzentration [ng/L] auftragen.

Um die in einer Probe enthaltene tatsächliche Chloramphenicol-Konzentration in ng/L bzw. ng/kg (ppt) oder µg/L bzw. µg/kg (ppb) zu erhalten, muss die aus der Standardkurve abgelesene Konzentration noch mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden. Beim Arbeiten nach der angegebenen Vorschrift gelten folgende Verdünnungsfaktoren:

Milch	1
Milchpulver (nach Rekonstitution)..... Herstellerangabe	
Milchpulver (Extraktion).....	1
Joghurt, Kefir, Buttermilch, Sahne.....	0,5
Quark, Schmand, Creme fraîche.....	1
Butter	5,2
Käse.....	1
Honig	1
Gelée Royal	1
Fleisch, Fisch, Shrimps	0,25
Eier	1
Urin direkt.....	1
Urin nach Hydrolyse.....	10
Plasma/Serum.....	1
Futtermittel	2

Auswertung von Urinproben

In Urinproben liegt fast ausschließlich glucuronidiertes Chloramphenicol vor. Durch direkten Einsatz einer Urinprobe im Test kann dieses bestimmt werden. Der ermittelte Konzentrationswert muss anschließend noch mit der Kreuzreaktivität des Antikörpers für Chloramphenicol-Glucuronid in Rinder- oder Schweineurin korrigiert werden.

Zur Berechnung gilt die folgende Formel:

$$\text{Konzentration Chloramphenicol Glucuronid} = \frac{\text{Konzentration}}{\text{Kreuzreaktivität}}$$

Die der Konzentration von Chloramphenicol-Glucuronid entsprechende Konzentration Chloramphenicol kann durch die Berücksichtigung des molaren Verhältnisses zwischen Chloramphenicol und Glucuronsäure berechnet werden. Dieses beträgt 0,65.

Zur Berechnung gilt die folgende Formel:

$$\begin{aligned} \text{Konzentration Chloramphenicol} \\ = \text{Konzentration Chloramphenicol Glucuronid} * 0,65 \end{aligned}$$

Die Berechnung eines Konzentrationswertes für Chloramphenicol ist durch die Korrektur um die Kreuzreaktivität und das molare Verhältnis ungenau. **Zur exakten Konzentrationsbestimmung von Chloramphenicol in Urin ist eine Hydrolyse daher zwingend erforderlich.**

Der nach der Hydrolyse von Urinproben ermittelte Konzentrationswert gibt nach Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors der Probenvorbereitung direkt die Konzentration von Chloramphenicol in der Urinprobe an.

Diese Angaben entsprechen dem heutigen Stand unserer Kenntnisse und sollen über unsere Produkte und deren Anwendungsmöglichkeiten informieren. Sie haben somit nicht die Bedeutung, bestimmte Eigenschaften der Produkte oder deren Eignung für einen konkreten Einsatzzweck zuzusichern. R-Biopharm übernimmt keine Gewährleistung, außer für die standardisierte Qualität der Reagenzien. Defekte Produkte werden ersetzt. Für darüber hinaus gehende direkte, indirekte Schäden oder sonstige Kosten im Zusammenhang mit der Nutzung der Produkte haftet R-Biopharm nicht.

RIDASCREEN® Chloramphenicol

Brief information

RIDASCREEN® Chloramphenicol (Art. No.: R1511) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of chloramphenicol in milk, milk powder, dairy products, honey and royal jelly, meat, fish, shrimp, eggs, urine (also chloramphenicol glucuronide), plasma/serum and feed.

All reagents required for the enzyme immunoassay - including standards - are contained in the test kit.

The test kit is sufficient for 96 determinations (including standards).

A microtiter plate spectrophotometer is required for quantification.

Sample preparation:

- milk: direct use
- milk powder: reconstitution, or alternatively: precipitation, extraction, evaporation, reconstitution
- yoghurt, kefir, buttermilk, cream: precipitation, extraction, evaporation, reconstitution
- curd, sour cream: homogenization, defatting, extraction, evaporation, reconstitution
- butter: defatting, extraction, evaporation, reconstitution
- cheese: homogenization, extraction, evaporation, reconstitution
- honey: extraction, evaporation, reconstitution
- royal jelly: extraction, evaporation, reconstitution
- meat, fish, shrimp, eggs: homogenization, extraction, evaporation, reconstitution, de-fattening
- urine: direct use or hydrolysis, extraction, evaporation, reconstitution
- plasma/serum: extraction, evaporation, reconstitution
- feed: grinding, extraction, evaporation, reconstitution, defatting

Time requirement:

- sample preparation (for 10 samples)
- according to sample matrix..... 5 min to 2 h
- test implementation (incubation time) 45 min

Limit of Detection (corresponding to the standard substance)	milk.....	approx. 24 ng/L
	milk powder (reconstitution).....	approx. 240 ng/kg
	milk powder (extraction)	approx. 24 ng/kg
	yoghurt, kefir, buttermilk, cream	approx. 12 ng/kg
	curd, sour cream	approx. 15 ng/kg
	butter.....	approx. 61 ng/kg
	cheese	approx. 16 ng/kg
	honey	approx. 25 ng/kg
	royal jelly	approx. 23 ng/kg
	meat (beef, pork, poultry)	approx. 5 ng/kg
	fish	approx. 8 ng/kg
	shrimp	approx. 8 ng/kg
	shrimp (5 in 1 nitrofurans sample prep.)	approx. 34 ng/kg
	eggs	approx. 15 ng/kg
	urine, direct (CAP-glucuronide)	approx. 138 ng/L
	urine, hydrolyzed (chloramphenicol).....	approx. 196 ng/L
	plasma/serum.....	approx. 18 ng/L
feed.....	approx. 107 ng/kg	

Recovery (corresponding to the standard substance)	milk.....	approx. 93 %
	milk powder (reconstitution).....	approx. 101 %
	milk powder (extraction)	approx. 78 %
	yoghurt, kefir, buttermilk, cream	approx. 104 %
	curd, sour cream	approx. 92 %
	butter.....	approx. 82 %
	cheese	approx. 74 %
	honey	approx. 106 %
	royal jelly	approx. 77 %
	meat (beef, pork, poultry)	approx. 91 %
	fish	approx. 97 %
	shrimp	approx. 92 %
	shrimp (5in1 nitrofurans sample prep.).....	approx. 98 %
	eggs	approx. 83 %
	urine, direct (chloramphenicol glucuronide) .	approx. 113 %
	urine, hydrolyzed (chloramphenicol)	approx. 101 %
	plasma/serum.....	approx. 96 %
feed.....	approx. 104 %	

The specificity of the RIDASCREEN® Chloramphenicol 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.

Specificity:	Chloramphenicol (RR-para-stereoisomer)	
in buffer system	(standard substance).....	100 %
	Dextramycin (SS-para-stereoisomer)	< 1 %
	all other stereoisomers	not determined
	Chloramphenicol base.....	< 1%
	Florfenicol	< 1%
	Thiamphenicol.....	< 1%
	Nitrofurantoin, AHD, NP-AHD.....	< 1%
	Furaltadone, AMOZ, NP-AMOZ	< 1%
	Furazolidone, AOZ, NP-AOZ.....	< 1%
	Nitrofurazone, SEM, NP-SEM	< 1%
	Chloramphenicol glucuronide	approx. 68 %

Specificity:		
in bovine urine	Chloramphenicol glucuronide	approx. 51 %
in porcine urine	Chloramphenicol glucuronide	approx. 68 %

In order to increase the quality of assessment when performing ELISA-procedures, we refer additionally to our Good ELISA Practice (GEP) – Manual in the respective version. 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.

Related products

RIDA® Chloramphenicol Spiking Solution..... (R1599)

1. Intended use

RIDASCREEN® Chloramphenicol is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of chloramphenicol in milk, milk powder and dairy products, honey and royal jelly, meat, fish, shrimp, eggs, urine (also chloramphenicol glucuronide), plasma/serum and feed.

In September 1998 a screening method for Chloramphenicol-residues in milk samples, §64 LFGB (01.00-68) has been licensed officially for Germany. This screening method is an ELISA in microtiter plate format.

2. General

Chloramphenicol is a broad spectrum antibiotic which is frequently employed in animal production for its excellent antibacterial and pharmacokinetic properties. However, in humans it leads to hematotoxic side effects, in particular chloramphenicol-induced aplastic anaemia for which a dosage-effect relationship has not yet been established. This has led to a prohibition of chloramphenicol for the treatment of animals used for food production. For test systems, a minimum required performance limit of 300 ng/kg was established.

3. Test principle

The basis of the test is the antigen-antibody reaction. The microtiter wells are coated with capture antibodies directed against anti-Chloramphenicol antibodies. The microtiter plate is already functionalized with anti-Chloramphenicol antibodies, which are bound by the immobilized capture antibodies. Standards or sample and Chloramphenicol conjugate are added into the wells. Free and enzyme conjugated Chloramphenicol competes for the antibody binding sites (competitive enzyme immunoassay). Any unbound conjugate is then removed in a washing step. The Conjugate converts the chromogen into a blue product. The addition of the stop solution leads to a color change from blue to yellow. The measurement is made photometrically at 450 nm. The absorption is inversely proportional to the Chloramphenicol concentration in the sample.

4. Reagents provided

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

Component	Cap color	Format		Volume
Microtiter plate	-	Ready to use		96 wells
Standard 1	white	Ready to use	0 ng/L	1.3 ml
Standard 2	white	Ready to use	25 ng/L	1.3 ml
Standard 3	white	Ready to use	50 ng/L	1.3 ml
Standard 4	white	Ready to use	100 ng/L	1.3 ml
Standard 5	white	Ready to use	250 ng/L	1.3 ml
Standard 6	white	Ready to use	750 ng/L	1.3 ml
Wash buffer salt Tween		Salt for dissolving		
Conjugate	red	Ready to use		7.5 ml
Substrate/Chromogen	brown	Ready to use		10 ml
Stop solution	yellow	Ready to use		14 ml

5. Materials required but not provided

5.1. Equipment:

Equipment	milk urine	milk powder, dairy products	honey	royal jelly	meat fish shrimp eggs	urine after hydrolysis	plasma serum	feed
microtiter plate spectrophotometer (450 nm)	•	•	•	•	•	•	•	•
graduated pipettes	•	•	•	•	•	•	•	•
variable 20 - 200 µl and 200 - 1000 µl micropipettes	•	•	•	•	•	•	•	•
mixer		•			•			•
shaker		•	•	•	•	•		•
centrifuge		•	•	•	•	•	•	•
evaporator		•	•	•	•	•	•	•
vortex	•	•	•	•	•	•	•	•
incubator						•		
waterbath		•						

5.2. Reagents:

Reagent	honey	royal jelly	meat fish shrimp	eggs	urine after hydrolysis	plasma serum	feed
distilled water	•		•				
ethyl acetate p.a.	•	•	•	•		•	•
n-hexane ≥ 95 %			•	•			•
<i>E. coli</i> β-Glucuronidase					•		
75 mM potassium phosphate buffer pH 6.8					•		
0.5 M NaOH		•					

Reagent	yoghurt, kefir, buttermilk, cream	milk powder	curd sour cream	butter	cheese
20 mM PBS	•				
Carrez	•	•			
ethyl acetate p.a.	•	•	•		•
n-hexane ≥ 95 %		•		•	
20 % (v/v) Methanol				•	
10 % (v/v) Methanol			•	•	•

β-Glucuronidase from *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich Art. No. G7646):

- reconstitute the lyophilized powder to 1 mg/ml

75 mM potassium phosphate buffer, pH 6.8:

- buffer A: 10.2 g KH_2PO_4 ; fill up to 1000 ml with distilled water
- buffer B: 13.06 g K_2HPO_4 ; fill up to 1000 ml with distilled water
- adjust pH to 6.8 by mixture of buffer A and B (ratio 1:1)

0.5 M NaOH:

- 20 g NaOH, fill up to 1000 ml with distilled water

20 mM PBS:

- 0.55 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ + 2.85 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ + 8.77 g NaCl; fill up to 1000 ml with distilled water; adjust pH to 7.4 with NaOH

Carrez:

- Carrez I: 15.21 g Potassium ferrocyanide(II) $\times 3 \text{H}_2\text{O}$; fill up to 100 ml with distilled water
- Carrez II: 29.90 g Zinc sulfate $\times 7 \text{H}_2\text{O}$; fill up to 100 ml with distilled water

6. Warnings and precautions for the users

This test should only be carried out by trained laboratory employees. The instruction for use must be strictly followed.

This kit may contain hazardous substances. For hazard notes on the contained substances please refer to the appropriate material safety data sheets (MSDS) for this product, available online at www.r-biopharm.com.

7. Storage instructions

Store the kit at 2 - 8 °C. Do not freeze any test kit components.

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

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

No quality guarantee is accepted after expiry of the kit (see kit label).

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

8. Indication of deterioration of reagents

- any bluish coloration of the reddish substrate/chromogen prior to test implementation
- a value of less than 0.6 absorbance units ($A_{450\text{ nm}} < 0.6$) for the zero standard

9. Preparation of Samples

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

9.1. Milk (raw, fresh, pasteurized, skimmed, full cream) from cow, and milk powder reconstituted according to manufacturer's instruction

- vortex a representative sample amount for homogenization
- use 50 µl milk per well in the assay

To achieve a better sensitivity for the detection in milk powder, alternatively the sample preparation (extraction) described in 9.2. can be performed.

9.2. Milk powder (skimmed and full cream): Extraction

- dissolve 1 g of milk powder with 10 ml distilled water into a 50 ml centrifugal vial by shaking thoroughly
 - add 1 ml Carrez I (see 5.2.) vortex
 - add 1 ml Carrez II (see 5.2.) vortex
 - centrifuge: 10 min / 3000 g / 4 - 12 °C (if a refrigerated centrifuge is not available, chill sample to approx. 8 °C prior to centrifugation)
 - transfer 7.2 ml of the supernatant into a new 50 ml centrifugal vial
 - add 6 ml ethyl acetate and shake upside down for 10 min
 - centrifuge: 10 min / 3000 g / room temperature (20 - 25 °C)
 - transfer 4 ml of ethyl acetate supernatant into a new glass vial and evaporate to complete dryness at 60 °C under nitrogen or air stream
- If fatty residues remain after evaporation: continue as described below*
- If there are no fatty residues, dissolve the dried residue in 400 µl wash buffer (see 10.1.) and vortex
 - use 50 µl per well in the assay

* In case of fatty residues after evaporation:

- add 400 µl n-hexane and vortex
- add 400 µl wash buffer and vortex
- centrifuge: 10 min / 3000 g / room temperature (20 - 25 °C)
- use 50 µl of the lower aqueous phase per well in the assay

9.3. Dairy products

9.3.1. Yoghurt, kefir, buttermilk, cream

- weigh 10 g of sample into a centrifugal vial
- add 8 ml 20 mM PBS and mix
- add 1 ml Carrez I (see 5.2.) and vortex vigorously
- add 1 ml Carrez II (see 5.2.) and shake for 10 min upside down
- centrifuge: 10 min / 4,000 g / 4 °C
- transfer 4 ml of the supernatant into a new vial
- add 8 ml of ethyl acetate and shake for 10 min upside down
- centrifuge: 10 min / 3,000 g / room temperature (20 - 25 °C)
- transfer 4 ml of the supernatant into a new vial and evaporate at 60 °C to complete dryness under nitrogen or air stream
- dissolve the dried residue in 500 µl wash buffer (see 10.1.)
- use 50 µl per well in the assay

9.3.2. Curd, sour cream

- add 15 ml 10 % Methanol to 5 g of sample and vortex vigorously for 1 min
- centrifuge: 15 min / 4,000 g / 4 °C
- puncture through cream layer and transfer 4 ml of sample into a new glass vial
- add 8 ml ethyl acetate
- shake upside down for 10 min
- centrifuge: 10 min / 3,000 g / room temperature (20 - 25 °C)
- transfer 4 ml of the supernatant into a new vial and evaporate at 60 °C to complete dryness by nitrogen or air
- dissolve the dried residue in 500 µl wash buffer (see 10.1.)
- use 50 µl per well in the assay

9.3.3. Butter

- weigh 1 g butter into a 10 ml centrifugal vial
- melt the butter in a water bath at approx. 40 °C
- add 1 ml n-hexane and vortex vigorously for 10 s
- add 1 ml 20 % methanol and vortex vigorously for 10 s
- shake upside down for 10 min
- centrifuge: 10 min / 2,000 g / 4 °C
- transfer 700 µl of the lower aqueous layer into a 1.5 ml vial
- put the vial on ice for 10 min
- centrifuge: 5 min / 20.000 g / room temperature (20 - 25 °C)
- dilute lower aqueous phase 1:4.5 (1+3.5) with wash buffer (see 10.1.)
(e.g.: 200 µl lower phase + 700 µl wash buffer)
- use 50 µl per well in the assay

9.3.4. Cheese

- remove existing noble rot
- homogenize completely 10 g of cheese with 30 ml 10 % methanol
- incubate in a water bath at approx. 40 °C for 10 min, shake vigorously at least 3 times during the incubation
- centrifuge: 15 min / 4,000 g / 4 °C
- transfer 3.5 ml of the lower aqueous phase into a new centrifugal vial and add 7 ml ethyl acetate
- shake upside down for 10 min
- centrifuge: 10 min / 3,000 g / room temperature (20 - 25 °C)
- transfer 3.5 ml of the supernatant into a new vial and evaporate at 60 °C to complete dryness by nitrogen or air
- dissolve the dried residue in 500 µl wash buffer (see 10.1.)
- use 50 µl per well in the assay

9.4. Honey

- dissolve 2 g of honey in 4 ml distilled water in a centrifugal vial
- add 4 ml ethyl acetate and shake for 10 min upside down
- centrifuge: 10 min / 3,000 g / room temperature (20 - 25 °C)
- transfer 1 ml of supernatant into a new vial and evaporate at 60 °C to complete dryness by nitrogen or air
- reconstitute the dried residue in 500 µl wash buffer (see 10.1.) and vortex
- use 50 µl per well in the assay

9.5. Royal Jelly

- weigh 2 g Royal Jelly into a centrifugal vial and add 3 ml 0.5 M NaOH
- shake until Royal Jelly is dissolved completely
- add 8 ml ethyl acetate and vortex vigorously for 1 min
- shake 10 min upside down
- centrifuge: 10 min / 3,000 g / room temperature (20 - 25 °C)
- transfer 2 ml of the supernatant into a new glass vial and evaporate to complete dryness at 60 °C by nitrogen or air
- dissolve the dry residue in 500 µl wash buffer
- use 50 µl per well in the assay

9.6. Meat (beef, pork, poultry), fish, shrimp

- homogenize a representative sample amount completely
- add 3 ml of distilled water and 6 ml ethyl acetate to 3 g of homogenized sample and mix
- shake for 10 min upside down
- centrifuge: 10 min / 3,000 g / room temperature (20 - 25 °C)
- transfer 4 ml of supernatant (corresponding to 2 g of sample) into a new vial and evaporate at 60 °C to complete dryness by nitrogen or air
- reconstitute the dried residue in 1 ml n-hexane
- add 500 µl wash buffer and vortex for 1 min
- centrifuge: 10 min / 3,000 g / room temperature (20 - 25 °C)
- use 50 µl of the lower aqueous phase per well in the assay

Chloramphenicol can be extracted from shrimp also together with the metabolites (AHD, AMOZ, AOZ and SEM) of the nitrofurans antibiotics in a single sample preparation. The extract can then be used both in RIDASCREEN®

Chloramphenicol and in all RIDASCREEN® Nitrofurans ELISAs. The labor and time is thereby significantly reduced. A detailed application is available on request.

9.7. Eggs (whole egg, egg white, egg yolk) from chicken

- homogenize a representative sample amount completely
- add 8 ml ethyl acetate to 2 g of homogenized sample
- shake for 10 min upside down
- centrifuge: 10 min / 3,000 g / room temperature (20 - 25 °C)
- transfer 4 ml of supernatant (corresponding to 1 g of sample) into a new vial and evaporate at 60 °C to complete dryness by nitrogen or air
- reconstitute the dried residue in 1 ml n-hexane
- add 1000 µl wash buffer and vortex for 1 min
- centrifuge: 10 min / 3,000 g / room temperature (20 - 25 °C)
- use 50 µl of the aqueous lower phase per well in the assay

9.8. Urine (bovine and porcine)

After administration of chloramphenicol to farm animals, chloramphenicol is metabolized in the liver in form of a conjugation to glucuronic acid. The resulting chloramphenicol glucuronide is then excreted by urine through the kidneys. For the analysis of chloramphenicol in urine, the sample has to be hydrolyzed prior to analysis. Here, chloramphenicol glucuronide is deconjugated by the enzyme glucuronidase and released chloramphenicol can be analyzed. As the antibody used in the test shows cross-reactivity for chloramphenicol glucuronide in urine, it is possible to determine the concentration of chloramphenicol glucuronide in urine by direct testing of urine without sample preparation. For evaluation of the test results, please see further notes under 11. Results.

9.8.1 Direct use for the analysis of chloramphenicol glucuronide in urine

- mix sample well (vortex)
- if urine is turbid, centrifuge: 10 min / 3,000 g / room temperature (20 - 25 °C)
- use 50 µl urine per well in the assay
- if obtained results are above standard range, urine samples can be diluted with wash buffer

9.8.2 Hydrolysis for the analysis of chloramphenicol in urine

- add 1 ml 75 mM potassium phosphate buffer pH 6.8 und 10 µl Escherichia coli β-Glucuronidase to 0.1 ml urine in a centrifugal vial and mix
- hydrolyze for 3 h at 37 °C
- add 2 ml of ethyl acetate and shake for 10 min upside down
- centrifuge: 5 min / 1,000 g / room temperature (20 - 25 °C)
- transfer 1000 µl supernatant into a new vial and evaporate to dryness at 60 °C by nitrogen or air
- reconstitute the dried residue in 500 µl wash buffer and vortex
- use 50 µl per well in the assay

9.9. Plasma/Serum (bovine, porcine)

- add 1 ml ethyl acetate to 500 µl plasma/serum in a 2 ml reaction vial
- vortex for 1 min
- centrifuge: 5 min / 3,000 g / room temperature (20 - 25 °C)
- transfer 700 µl of supernatant into a new vial and evaporate to complete dryness at 60 °C by nitrogen or air
- reconstitute the dried residue in 350 µl wash buffer and vortex
- use 50 µl per well in the assay

9.10. Feed

- grind sample completely
- add 4 ml ethyl acetate to 1 g of grinded sample in a centrifugal vial
- vortex for 1 min
- centrifuge: 10 min / 3,000 g / room temperature (20 - 25 °C)
- transfer 2 ml of supernatant into a new vial and evaporate at 60 °C to complete dryness by nitrogen or air
- reconstitute the dried residue in 1 ml hexane
- add 1000 µl wash buffer and vortex for 1 min
- centrifuge: 10 min / 3,000 g / room temperature (20 - 25 °C)
- use 50 µl of the aqueous lower phase per well in the assay

10. Test implementation

10.1. Preliminary comments

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 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 - 6 weeks at 2 - 8 °C (36 - 46 °F).

Alternative: Dissolve the contents of the pouch in 100 ml of distilled water to obtain a 10fold concentrated washing buffer. This solution expires after approx. 8 - 12 weeks, store at room temperature (20 - 25 °C). Use 1 part 10fold concentrate and dissolve with 9 parts of distilled water to obtain the ready to use washing buffer.

10.2. Test procedure

Carefully follow the recommended washing procedure. Do not allow microwells to dry between working steps.

1. Insert a sufficient number of wells into the microwell holder for all standards and samples to be run in duplicate. Record standard and sample positions.
2. Add 50 µl of each standard or prepared sample to separate duplicate wells.
3. Add 50 µl of the conjugate to the bottom of each well, mix gently by shaking the plate manually and incubate for 30 min at room temperature (20 - 25 C).
4. Pour the liquid out of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times in a row) against absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all the wells with 250 µl washing buffer (see 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat two more times.
5. Add 100 µl of substrate/chromogen solution to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 15 min at room temperature (20 - 25 °C) in the dark.
6. Add 100 µl of the stop solution to each well. Mix gently by shaking the plate manually and measure the absorbance at 450 nm. Read within 30 minutes after addition of stop solution.

11. Results

A special software, the RIDA[®]SOFT Win.NET (Art. No. Z9996), is available to evaluate the RIDASCREEN[®] enzyme immunoassays. The course of the standard curve is shown in the Quality Assurance Certificate enclosed in the test kit.

Remark for the calculation without software:

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

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

In order to obtain the chloramphenicol concentration in ng/L / ng/kg (ppt) or µg/L / µg/kg (ppb) 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 factors are as follows:

milk	1
milk powder (reconstitution)..... manufacturer's instructions	
milk powder (extraction)	1
yoghurt, kefir, butter milk, cream	0.5
curd, sour cream	1
butter.....	5.2
cheese	1
honey	1
royal jelly.....	1
meat, fish, shrimp.....	0.25
eggs	1
urine, direct	1
urine after hydrolysis	10
plasma/serum	1
feed.....	2

Analysis of urine samples

Urine samples contain almost exclusively chloramphenicol glucuronide. Chloramphenicol glucuronide can be determined by the direct use of urine in the test. The concentration value obtained needs to be corrected by the cross reactivity of the antibody for chloramphenicol glucuronide in bovine or porcine urine.

The following formula can be used for calculation:

$$\text{concentration chloramphenicol glucuronide} = \frac{\text{concentration}}{\text{cross reactivity}}$$

The theoretical concentration of chloramphenicol corresponding to the measured concentration of chloramphenicol glucuronide can be calculated by considering the molar ratio between chloramphenicol and glucuronic acid. The molar ratio is 0.65.

The following formula can be used for calculation:

$$\begin{aligned} \text{concentration chloramphenicol} \\ = \text{concentration chloramphenicol glucuronide} * 0.65 \end{aligned}$$

Due to the correction for the cross-reactivity and the molar ratio, the calculation of the concentration value for chloramphenicol is inaccurate. **To determine the exact concentration of chloramphenicol in urine, hydrolysis of the urine sample is mandatory.**

After taking into account the dilution factor of the sample preparation, the concentration value determined after hydrolysis represents the concentration of chloramphenicol in the urine sample.

The data corresponds to our present state of technology and provides information on our products and their uses. R-Biopharm makes no warranty of any kind, either expressed or implied, except that the materials from which its products are made are of standard quality. Defective products will be replaced. There is no warranty of merchantability of this product, or of the fitness of the product for any purpose. R-Biopharm shall not be liable for any damages, including special or consequential damage, or expense arising directly or indirectly from the use of this product.

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:

Dietrich Mollat

Vorstand / Board of Management:

Dr. Ralf M. Dreher (Vorsitzender / Chairman),

Dr. Carsten Bruns, Jochen Hirsch, Dr. Peter Schubert

Handelsregister / Commercial Register:

Amtsgericht Darmstadt HRB 8321