

# EASI-EXTRACT<sup>®</sup> T-2 & HT-2

Produktcode: P43 / P43B

Immunoaffinitätssäulen für die Verwendung zusammen mit HPLC oder LC-MS/MS.  
Nur für den In-vitro-Gebrauch.

P43/V18/27.05.22



# Inhalt

	Seite
Testprinzip .....	4
Nicht enthaltene Reagenzien .....	4
Zubehörprodukte .....	4
Empfohlene Methoden und Anwendungshinweise .....	4
Gefahren .....	5
Dekontamination .....	5
Lagerung & Mindesthaltbarkeit .....	5
Probennahme .....	5
Sensitivität .....	5
Wiederfindungen .....	5
Säulenvorbereitung .....	6
Elution .....	6
Derivatisierung vor der HPLC-Detektion .....	7
• Zubereitung des D-MAP Reagenzes (325 µg/ml) .....	7
• Zubereitung des 1-AN Reagenzes (300 µg/ml) .....	7
Probenvorbereitung .....	8
• Getreide .....	8
Zubereitung von Standards .....	9
Kalibrierkurve .....	9
Empfohlene Bedingungen für HPLC .....	10
Beispiel für HPLC Chromatogramm .....	10
• Mais .....	10
Empfohlene Bedingungen für LC-MS/MS .....	11
Beispiel für LC-MS/MS Chromatogramm .....	12
• Mais .....	12
Qualität .....	13
Technischer Support .....	13
Garantie .....	13

## Testprinzip

Das Verfahren basiert auf einer monoklonalen Antikörpertechnologie, die für einen äußerst spezifischen, sensitiven, schnellen und einfach durchzuführenden Test sorgt.

Die Säulen enthalten eine Gelsuspension eines monoklonalen Antikörpers, der für das betreffende Toxin spezifisch ist. Nach der Extraktion der Toxine wird der Probenextrakt filtriert, verdünnt und langsam durch die Immunoaffinitätssäule geleitet. Jegliche in der Probe vorhandenen Toxine werden durch den Antikörper in der Gelsuspension gebunden. Die Säule wird gewaschen, um ungebundenes Material zu entfernen, und die Toxine werden dann nach der Elution mit Lösungsmittel aus der Säule freigegeben. Das Eluat wird vor der Analyse mittels HPLC oder LC-MS/MS gesammelt. Die T-2- und HT-2-Toxine müssen für die HPLC-Analyse derivatisiert werden.

Die gesamte Extraktions- und Aufreinigungszeit beträgt etwa 20 Minuten. Das Ergebnis ist verbesserte Reinheit und Konzentration der Toxine von Lebensmittel- und Futterproben, was ein viel reineres Chromatogramm liefert und daher für eine genauere und sensiblere Detektion sorgt. Die Säulen haben außerdem den zusätzlichen Vorteil, dass sie für die umfangreiche Analyse von Proben automatisiert werden können.

## Nicht enthaltene Reagenzien

- Destilliertes / deionisiertes Wasser (geeignet für die Verwendung mit HPLC, z. B. MilliQ)
- Lösungsmittel (Methanol und Acetonitril in HPLC-Qualität)
- Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) (RP202)\*
- T-2 und HT-2-Standard (siehe Abschnitt „Zubereitung von Standards“)
- Natriumchlorid
- Natriumhydroxid (zur pH-Wert-Einstellung des Filtrats, falls erforderlich)
- 4-Dimethylaminopyridin (DMAP)
- 1-Anthroylnitril (1-AN)
- Toluol für die Rückstandsanalyse

## Zubehörprodukte

- Filterpapier Whatman Nr. 113 oder Nr. 4
- Glasmikrofaser-Filterpapier
- Immunoaffinitätssäulenständer (CR1)\*
- Immunoaffinitätszubehörpaket (AP01)\*

\* Erhältlich von R-Biopharm. Für weitere Informationen wenden Sie sich bitte an Ihren R-Biopharm Vertriebspartner vor Ort.

## Empfohlene Methoden und Anwendungshinweise

Es sind Methoden für alle gesetzlich vorgeschriebenen Matrizen sowie für zusätzliche Erzeugnisse verfügbar. Bei Abweichung von den in unserer Arbeitsanweisung und unseren Anwendungshinweisen beschriebenen Methoden werden möglicherweise keine optimalen Ergebnisse erreicht. Für weitere Informationen wenden Sie sich bitte an Ihren R-Biopharm Vertriebspartner vor Ort.

## **Gefahren**

Mykotoxine sind sehr gefährliche Stoffe. Analysen sollten nur von Labors durchgeführt werden, die für die Handhabung toxischer Materialien und Lösungsmittel ausgestattet sind. Während der gesamten Analyse geeignete Schutzkleidung, einschließlich Handschuhe, Schutzbrille und Laborkittel, tragen.

Brennbare Lösungsmittel in einem explosions sicheren Schrank aufbewahren. Ggf. Laborabzug und Schutzausrüstung verwenden.

Ein Sicherheitsdatenblatt mit weiteren Informationen erhalten Sie von Ihrem R-Biopharm Vertriebspartner vor Ort.

## **Dekontamination**

Überschüssige Standardlösung vor der Entsorgung mit mindestens einem Zehntel ihres Volumens Natriumhypochlorit 5 % behandeln. Laborutensilien und kontaminierten Abfall 30 Minuten in 5%ige Natriumhypochloritlösung eintauchen, anschließend 30 Minuten lang 5%iges Aceton hinzufügen. Vor der Entsorgung mit reichlich Wasser spülen. Laborutensilien nach der Dekontamination gründlich abwaschen. Abfall verbrennen, falls es die Vorschriften erlauben.

## **Lagerung und Mindesthaltbarkeit**

Die Säulen können ab Herstellungsdatum 18 Monate bei 2–8 °C oder 12 Monate bei 21–25 °C gelagert werden. Nicht einfrieren.

Achten Sie darauf, dass die Säule nicht ausgetrocknet ist und Puffer über dem Gel enthält. Der in der Immunoaffinitätssäule enthaltene Antikörper kann durch extreme Temperaturen oder Änderungen des pH-Werts denaturiert werden.

## **Probennahme**

Es sollte eine repräsentative Probe durch Befolgung eines der offiziell anerkannten Probennahmeverfahren gewonnen werden. Es wird empfohlen, mindestens 1 kg der repräsentativen Probe fein zu mahlen und einen Teil (5 bis 50 g, je nach verwendeter Methode) davon zu entfernen und zu extrahieren.

## **Sensitivität**

Die Sensitivität hängt vom endgültigen Detektionssystem ab, das vom Analytiker eingesetzt wird. Die Testsensitivität kann jedoch bei Bedarf durch Erhöhung des Volumens der Probe, die durch die Immunoaffinitätssäule geleitet wird, verbessert werden. Das Verhältnis von Lösungsmittel zu phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) muss beibehalten werden.

## **Wiederfindungen**

Wenn ein Analytiker Verluste während der Extraktion berücksichtigen möchte, wird empfohlen, eine dotierte Probe desselben Produkttyps wie das getestete Material nach dem kompletten Verfahren als Referenzstandard zu analysieren. Die mit der dotierten Probe erhaltenen Wiederfindungen können verwendet werden, um die mit der Testprobe erhaltenen Ergebnisse zu korrigieren.

## Säulenvorbereitung

Immunoaffinitätssäulen müssen vor der Verwendung Umgebungstemperatur haben. Kappe von der Säule abnehmen und wegwerfen. Säule fest mithilfe eines Adapters an einem Glasspritzenzylinder anbringen und in einen Immunoaffinitätssäulenständer oder einen Klemmständer platzieren.

## Elution

Um das/die Toxine/e vollständig aus der Immunoaffinitätssäule zu eluieren, muss das Lösungsmittel lange genug mit dem Antikörper in der Gelsuspension in Kontakt sein. Dadurch wird sichergestellt, dass alle Bindungen zwischen dem Antikörper und dem Toxin aufgebrochen werden und so das gesamte Toxin aus der Säule freigesetzt wird, um es mit dem bevorzugten Detektionssystem zu analysieren.

Um sicherzustellen, dass das Lösungsmittel lange genug mit dem Antikörper-Gel in Kontakt ist, kann eine der folgenden Elutionsmethoden verwendet werden: -

**Rückspülung (bevorzugte Methode bei R-Biopharm):** Die Rückspülung wird durchgeführt, indem der Spritzenkolben während des Durchlaufs des Lösungsmittels durch die Säule sanft angehoben und abgesenkt wird. Dadurch wird die Richtung des Eluatflusses durch das Gel umgekehrt. Dieser Prozess sollte vor der Sammlung des Eluats dreimal wiederholt werden. Fahren Sie mit dem nächsten Schritt der Methode fort.

**Anwendung kleiner Lösungsmittelmengen:** Fügen Sie die für die Elution erforderliche Lösungsmittelmenge in zwei oder drei kleineren Aliquoten hinzu. Belassen Sie jedes Aliquot mindestens 30 Sekunden lang mit der Gelsuspension in Kontakt, bevor Sie es zur Sammlung vollständig durch die Gelsuspension laufen lassen. Fahren Sie mit dem nächsten Schritt der Methode fort.

**Inkubation mit Lösungsmittel:** Fügen Sie die für die Elution erforderliche gesamte Lösungsmittelmenge hinzu und lassen Sie 2–3 Tropfen des Lösungsmittels zur Sammlung durch die Säule laufen. Belassen Sie den Rest des Lösungsmittels mindestens 60 Sekunden lang mit der Gelsuspension in Kontakt, bevor Sie es zur Sammlung durch die Gelsuspension laufen lassen. Fahren Sie mit dem nächsten Schritt der Methode fort.



## Derivatisierung vor der HPLC-Detektion

- **Zubereitung des D-MAP Reagenzes (325 µg/ml)**

Das Reagenz ist 6 Monate lang haltbar, wenn es bei -20°C gelagert wird. Die verdünnte Stammlösung sollte am Tag der Analyse frisch zubereitet und innerhalb von 24 Stunden verwendet werden.

1. Wiegen Sie 20 mg D-MAP in ein Glasgefäß ab.
2. Geben Sie 20 ml Toluol (entspricht 1 mg/ml) hinzu.
3. Messen Sie 1 ml Toluol in ein Glasröhrchen ab.
4. Schütten Sie 325 µl weg.
5. Geben Sie 325 µl von 1 mg/ml D-MAP Stammlösung hinzu, um 325 µg/ml Arbeitslösung zu erhalten.

- **Zubereitung des 1-AN Reagenzes (300 µg/ml)**

Das Reagenz ist 6 Monate lang haltbar, wenn es bei -20°C gelagert wird. Die verdünnte Stammlösung sollte am Tag der Analyse frisch zubereitet und innerhalb von 24 Stunden verwendet werden.

1. Wiegen Sie 20 mg 1-AN in ein Glasgefäß ab.
2. Geben Sie 20 ml Toluol (entspricht 1 mg/ml) hinzu.
3. Messen Sie 1 ml Toluol in ein Glasröhrchen ab.
4. Schütten Sie 300 µl weg.
5. Geben Sie 300 µl von 1 mg/ml 1-AN Stammlösung hinzu, um 300 µg/ml Arbeitslösung zu erhalten.

## Probenvorbereitung

### • Getreide

Diese Methode wurde an Getreide getestet, darunter Weizen, Gerste, Mais, sowie an Produkten auf Getreidebasis.

**Hinweis:** Eine alternative Application Note ist für Hafer verfügbar.

1. Wiegen Sie 50 g gemahlene Probe und 5 g Natriumchlorid in einem lösungsmittelbeständigen Mischglas mit einem Fassungsvermögen von 1 Liter ab.
2. Fügen Sie 250 ml 90%ige-Methanol-Lösung hinzu und mischen Sie mit hoher Geschwindigkeit für 2 Minuten.
3. Filtrieren Sie die Probe durch Filterpapier (Whatman Nr. 113 oder Nr. 4) oder zentrifugieren Sie für 10 Minuten bei 4.000 RPM.
4. Verdünnen Sie 7 ml des Filtrats mit 28 ml Wasser.
5. Filtern Sie das verdünnte Extrakt durch ein Glasmikrofaser-Filterpapier.
6. Lassen Sie 25 ml des verdünnten Filtrats (entspricht 1 g der Probe) mit einer Flussrate von 2 ml pro Minute durch die Säule laufen (die Probe kann auch mittels Schwerkraft durch die Säule laufen, falls bevorzugt). Eine langsame, gleichmäßige Flussrate ist für die Bindung des Toxins durch den Antikörper unerlässlich.
7. Waschen Sie die Säule, indem Sie 20 ml Wasser mit einer Flussrate von ca. 5 ml pro Minute durchlaufen lassen. Blasen Sie Luft durch die Säule, um restliche Flüssigkeit zu entfernen.
8. Eluieren Sie das Toxin aus der Säule bei einer Flussrate von 1 Tropfen pro Sekunde mithilfe von 1,5 ml 100%igem Methanol und sammeln Sie es in einem geeigneten Gefäß. Weitere Informationen finden Sie im Abschnitt „Elution“.

### **HPLC:**

9. Lassen Sie das Eluat an der Luft bei 50–60 °C bis zur Trockene eindampfen.
10. Mit 50 µl D-MAP und 50 µl 1-AN rekonstituieren. 1 Minute lang vortexen.
11. Lassen Sie die Mischung 15 Minuten lang bei 50 °C in einem Heizblock reagieren.
12. Kühlen Sie die Mischung 15 Minuten lang in einem Eisbad ab.
13. Lassen Sie sie an der Luft bei 50–60 °C bis zur Trockene eindampfen.
14. In 1 ml 70%igem Acetonitril rekonstituieren. 20 Sekunden lang vortexen.
15. Injizieren Sie 100 µl in das HPLC-System.

### **LC-MS/MS:**

9. Lassen Sie nach der Elution 1,5 ml Wasser durch die Säule laufen und sammeln Sie es im selben Gefäß, sodass sich ein Gesamtvolumen von 3 ml ergibt.
10. Injizieren Sie 25 µl in das LC-MS/MS System.



## Zubereitung von Standards

### • T-2 und HT-2 Stammlösung

Es wird empfohlen, mit 100.000 ng/ml Stammlösung für beide Toxine (T-2 und HT-2) zu beginnen.

### • T-2 & HT-2 Gesamt-Standardverdünnung

1. Nehmen Sie 0,5ml von jedem 100.000 ng/ml T-2 & HT-2 Standard, um 100.000 ng/ml T-2 & HT-2 Gesamtlösung (1:1) zu erhalten.
2. Nehmen Sie 100 µl der 100.000 ng/ml T-2 & HT-2 Gesamtlösung und füllen Sie mit 100 % Acetonitril auf 1 ml auf (entspricht 10.000 ng/ml Gesamtlösung).

## Kalibrierkurve

Es wird empfohlen, mindestens eine 3- bis 6-Punkt-Kalibrierkurve auszuführen. Bei Erstellung einer geeigneten Kurve sollten die Gehalte der Kalibrierstandards den Bereich der erwarteten Ergebnisse um- oder einschließen. Die verdünnten Standardlösungen sollten frisch am Tag der Analyse vorbereitet und innerhalb von 24 Stunden verwendet werden.

Beispiel für die Vorbereitung einer Fünf-Punkt-Kalibrierkurve (kann gemäß gesetzlichen Anforderungen oder Kontaminationsgraden geändert werden):

### **HPLC:**

1. Standard 5: Nehmen Sie 200 µl der 10.000 ng/ml Gesamtlösung.
  - Lassen Sie sie an der Luft bei 50–60 °C bis zur Trockene eindampfen.
  - Mit 50 µl D-MAP (325 µg/ml) und 50 µl 1-AN rekonstituieren (300 µg/ml). 1 Minute lang vortexen.
  - Lassen Sie die Mischung 15 Minuten lang bei 50 °C in einem Heizblock reagieren.
  - Kühlen Sie die Mischung 15 Minuten lang in einem Eisbad ab.
  - Lassen Sie sie an der Luft bei 50–60 °C bis zur Trockene eindampfen.
  - In 2 ml 70%igem Acetonitril rekonstituieren. 20 Sekunden lang vortexen (entspricht 1.000 ng/ml Gesamtlösung).
2. Standard 4: Nehmen Sie 1 ml Standard 5 und fügen Sie 1 ml 70%iges Acetonitril hinzu (entspricht 500 ng/ml).
3. Standard 3: Nehmen Sie 1 ml Standard 4 und fügen Sie 1 ml 70%iges Acetonitril hinzu (entspricht 250 ng/ml).
4. Standard 2: Nehmen Sie 1 ml Standard 3 und fügen Sie 1 ml 70%iges Acetonitril hinzu (entspricht 125 ng/ml).
5. Standard 1: Nehmen Sie 1 ml Standard 2 und fügen Sie 1 ml 70%iges Acetonitril hinzu (entspricht 62,5 ng/ml).
6. Injizieren Sie 100 µl eines jeden Standards in das HPLC-System.

### **LC-MS/MS:**

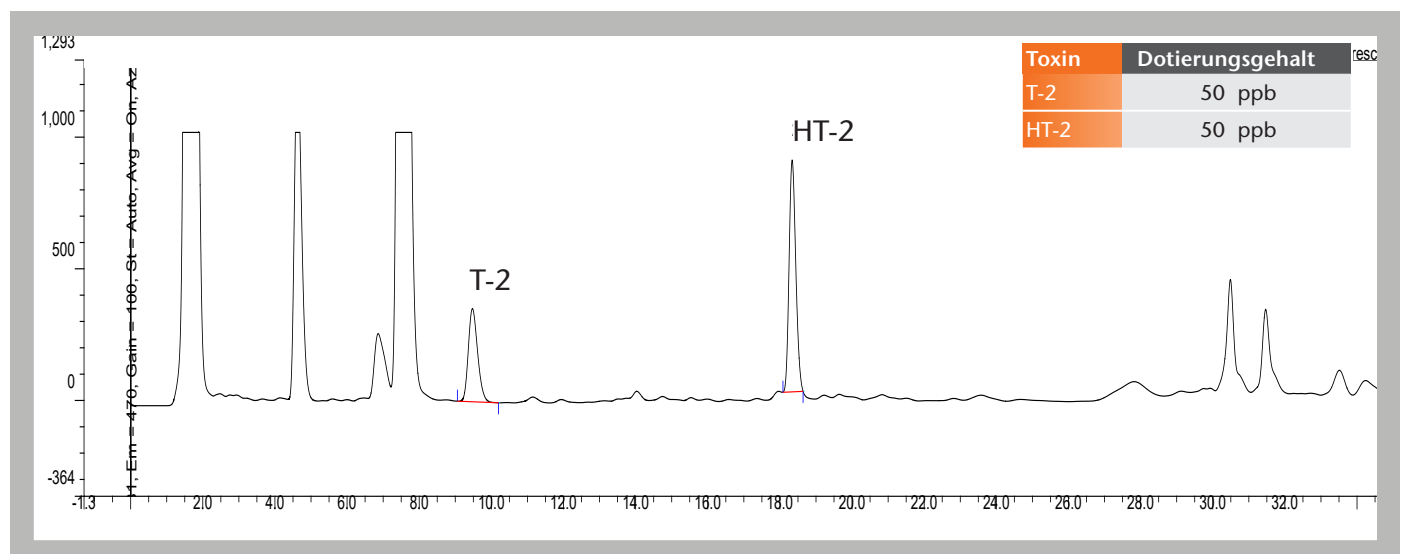
1. Standard 5: Nehmen Sie 2 ml 50%iges Methanol und schütten Sie 200 µl weg. Fügen Sie 200 µl der 10.000 ng/ml Gesamtlösung hinzu (entspricht 1.000 ng/ml Gesamtlösung).
2. Standard 4: Nehmen Sie 1 ml Standard 5 und fügen Sie 1 ml 50%iges Methanol hinzu (entspricht 500 ng/ml).
3. Standard 3: Nehmen Sie 1 ml Standard 4 und fügen Sie 1 ml 50%iges Methanol hinzu (entspricht 250 ng/ml).
4. Standard 2: Nehmen Sie 1 ml Standard 3 und fügen Sie 1 ml 50%iges Methanol hinzu (entspricht 125 ng/ml).
5. Standard 1: Nehmen Sie 1 ml Standard 2 und fügen Sie 1 ml 50%iges Methanol hinzu (entspricht 62,5 ng/ml).
6. Injizieren Sie 25 µl eines jeden Standards in das LC-MS/MS-System.

## Empfohlene Bedingungen für HPLC

HPLC-Bedingungen			
Derivatisierung	D-MAP und 1-AN		
Vorläufersäulenkartusche	Supelco Guardfilter (0,5 µm)		
Analysesäule	Luna Phenyl-Hexyl 5 µm, 4,6 mm x 150 mm Partikel		
Mobile Phase	<b>Mobile Phase A:</b> Acetonitril <b>Mobile Phase B:</b> Wasser Am Tag der Analyse frisch zubereiten		
Gradientenbedingungen	Zeit (min)	% Lösung A	% Lösung B
	0	70	30
	5	70	30
	15	85	15
	25	85	15
	27	100	0
	32	100	0
35	70	30	
HPLC-Pumpe	Zur Lieferung der mobilen Phase		
Flussrate	1,0 ml pro Minute		
Fluoreszenzdetektor	Erregung: 381 nm		
	Emission: 470 nm		
Säulenofen	Vorläufer und Analysensäule bei 40 °C halten		
Integrator/ Datenkontrollsystem	Vom bevorzugten Lieferanten		
Injektor	Autosampler/Rheodyn-Ventil		
Injektionsvolumen	100 µl		

## Beispiel für HPLC Chromatogramm

- Mais



## Empfohlene Bedingungen für LC-MS/MS

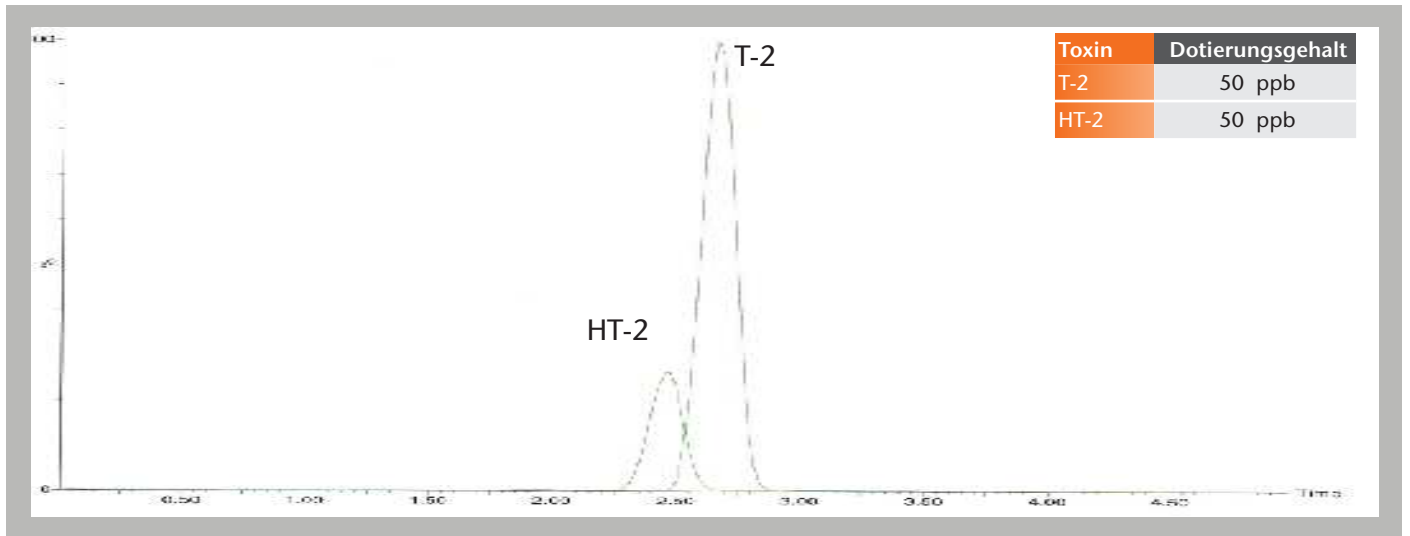
LC-Bedingungen			
Analysesäule	ACE® ULTRA CORE 2.5 SUPER C18,50 x 2,1 mm		
Mobile Phase	<b>Mobile Phase A:</b> 1 mM Ammoniumformat und 0,1 % Ameisensäure in Wasser : Methanol (95: 5 v/v) <b>Mobile Phase B:</b> 1 mM Ammoniumformat und 0,1 % Ameisensäure in Wasser: Methanol (2: 98 v/v) Am Tag der Analyse frisch zubereiten		
Gradientenbedingungen	Zeit (min)	% Lösung A	% Lösung B
	0	80	20
	0,1	80	20
	2,5	10	90
	3,75	10	90
	3,85	80	20
	5,0	80	20
Flussrate	0,3 ml pro Minute		
Säulenofen	Analysesäule bei 40 °C halten		
Integrator/ Datenkontrollsystem	Vom bevorzugten Lieferanten		
Injektor	Autosampler/Rheodyn-Ventil		
Injektionsvolumen	25 µl		

Massenspektrometriebedingungen	
Gerät	SCIEX QTRAP® 4500
Modus	Multiple Reaction Monitoring (MRM)
IonSpray	3500 Volt
Ionenquelle Gas 1	50 psi
Ionenquelle Gas 2	55 psi
Curtain Gas	50 psi

Geräteeinstellung						
Toxin	RT (min)	Vorläufer-Ion (m/z)	Produkt-Ionen (m/z)	Verweilzeit (s)	Konusspannung (V)	Kollisionsspannung (eV)
HT-2	0–5	442,21	263,16 (Quantifizierer)	0,328	18	12
			215,10 (Qualifizierer)		18	14
T-2	0–5	484,21	305,14 (Quantifizierer)	0,328	26	14
			245,12 (Qualifizierer)		26	14

# Beispiel für LC-MS/MS Chromatogramm

- Mais



## Qualität

Die Produkte von RBR werden unter einem nach ISO 9001 zertifizierten Qualitätsmanagementsystem entwickelt, gefertigt, getestet und geliefert. Dies garantiert ein konsistentes Produkt, das stets Ihren Leistungsanforderungen entspricht. Unsere Produkte wurden in mehreren Ringversuchen zur Entwicklung europäischer und internationaler Standardmethoden verwendet und finden in wichtigen Einrichtungen, Lebensmittelunternehmen und staatlichen Labors Anwendung. Kundenreferenzen für Produkte von RBR sind auf Anfrage erhältlich.

## Technischer Support

RBR weiß, dass Benutzer unserer Produkte von Zeit zu Zeit Unterstützung oder Rat benötigen. Daher bieten wir unseren Kunden die folgenden Serviceleistungen:

- Analyse von Problemproben.
- Anwendungshinweise für schwierige Proben.
- Literatur aus der RBR-Bibliothek.
- Installation und Support der KOBRA® CELL.
- Rat zu Detektionsparametern.
- Rat zur Vorbereitung und Handhabung von Standards.
- Neueste Informationen zu Gesetzgebung, Probennahme und andere Neuigkeiten per E-Mail.
- Bereitstellung von dotierten Proben.

Für weitere Informationen wenden Sie sich bitte an Ihren R-Biopharm Vertriebspartner vor Ort.

## Garantie

R-Biopharm Rhône Ltd übernimmt keinerlei Gewähr, ob ausdrücklich oder stillschweigend, außer dass alle von R-Biopharm Rhône Ltd hergestellten Produkte aus Materialien geeigneter Qualität bestehen. Sollten irgendwelche Materialien einen Defekt aufweisen, liefert R-Biopharm Rhône Ltd ein Ersatzprodukt. Der Benutzer übernimmt alle Risiken und sämtliche Haftung, die sich aus der Verwendung von Produkten und Verfahren von R-Biopharm Rhône Ltd ergeben. R-Biopharm Rhône Ltd übernimmt keine Haftung für Schäden, einschließlich besonderer und Folgeschäden, Verlust oder Kosten, die sich direkt oder indirekt aus der Verwendung von Produkten und Verfahren von R-Biopharm Rhône Ltd ergeben.





**R-Biopharm Rhône Ltd**  
Block 10 Todd Campus  
West of Scotland Science Park  
Acre Road, Glasgow G20 0XA  
[www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com)