

# EASI-EXTRACT<sup>®</sup> T-2 & HT-2

Codice prodotto: P43 / P43B

Colonne di immunoaffinità per l'uso in associazione all'HPLC o LC-MS/MS.  
Solo per uso in vitro.

P43/V17/30.06.21





# Indice

## Pagina

Principio del test .....	4
Reagenti non forniti .....	4
Prodotti accessori .....	4
Metodi raccomandati e note applicative .....	4
Rischi .....	5
Decontaminazione .....	5
Conservazione e durata .....	5
Campionamento .....	5
Sensibilità .....	5
Recuperi .....	5
Preparazione delle colonne .....	6
Eluizione .....	6
Preparazione del Reagente D-MAP (325 µg/ml) .....	7
Preparazione del Reagente 1-AN (300 µg/ml) .....	7
Informazioni sull'HPLC .....	8
• Preparazione dei campioni - Cereali .....	8
Informazioni sull'HPLC .....	9
• Preparazione degli standard .....	9
• Standard di lavoro combinato .....	9
Curva di calibrazione .....	9
Informazioni sull'HPLC .....	10
• Condizioni raccomandate per l'HPLC .....	10
Esempio cromatogramma in HPLC per cereali .....	10
• Mais .....	10
Informazioni su LC-MS/MS .....	11
• Preparazione dei campioni - Cereali .....	11
Informazioni su LC-MS/MS .....	12
• Preparazione degli standard .....	12
• Standard di lavoro combinato .....	12
Curva di calibrazione .....	12
Informazioni su LC-MS/MS .....	13
• Condizioni raccomandate per LC-MS/MS .....	13
Esempio cromatogramma per cereali .....	14
• Mais .....	14
Qualità .....	15
Assistenza tecnica .....	15
Garanzia .....	15

## Principio del test

La procedura si basa sulla tecnologia dell'anticorpo monoclonale, il che rende il test altamente specifico, sensibile, rapido e semplice da eseguire.

Le colonne contengono una sospensione in gel di anticorpi monoclonali specifici per le tossine di interesse. Dopo l'estrazione delle tossine il campione estratto viene filtrato, diluito e fatto passare lentamente attraverso la colonna di immunoaffinità. Tutte le tossine presenti nel campione vengono trattenute dall'anticorpo all'interno della sospensione in gel. La colonna viene lavata per rimuovere tutto il materiale non legato e le tossine vengono poi rilasciate dalla colonna a seguito di eluizione con solvente. L'eluato viene raccolto prima dell'analisi mediante HPLC o LC-MS/MS. Quando sono analizzate mediante HPLC, le tossine T-2 e HT-2 devono essere derivatizzate.

Il tempo totale necessario per l'estrazione e la purificazione è di circa 20 minuti. Ne risulta un miglioramento della purificazione e della concentrazione delle tossine dai campioni di alimenti e mangimi ottenendo un cromatogramma più pulito e quindi offrendo un rilevamento più preciso e sensibile. Le colonne hanno anche l'ulteriore vantaggio di poter essere automatizzate per analisi di campioni su vasta scala.

## Reagenti non forniti

- Acqua distillata / deionizzata (adatta per l'uso con HPLC, ad es. MilliQ)
- Solventi (metanolo e acetonitrile per HPLC)
- Soluzione salina tamponata con fosfato (PBS) (RP202)\*
- Standard T-2 e HT-2 (fare riferimento alla sezione Preparazione degli standard)
- Cloruro di sodio
- Idrossido di sodio (pH filtrato se richiesto)
- 4-dimetilaminopiridina (DMAP)
- 1-antrolnitrile (1-AN)
- Toluene per analisi di residui

## Prodotti accessori

- Carta da filtro Whatman N. 113 o N. 4
- Carta da filtro in microfibra di vetro
- Rack per colonne di immunoaffinità (CR1)\*
- Pacchetto di accessori per colonne di immunoaffinità (AP01)\*

\* Disponibile presso R-Biopharm. Per ulteriori informazioni contattare il distributore R-Biopharm locale.

## Metodi raccomandati e note applicative

Sono disponibili metodi per tutte le matrici a norma di legge nonché per altri prodotti. Eventuali variazioni dei metodi descritti nelle nostre Istruzioni per l'uso e Note applicative potrebbero non garantire un risultato ottimale. Per ulteriori informazioni contattare il distributore R-Biopharm locale.

## Rischi

Le micotossine sono sostanze molto pericolose. Le analisi devono essere eseguite solo da laboratori attrezzati per la gestione di materiali e solventi. Durante l'analisi è necessario indossare indumenti protettivi adatti, fra cui guanti, occhiali di sicurezza e camici da laboratorio.

Conservare i solventi infiammabili in un armadietto antiesplorazione. Operare sotto cappa chimica e utilizzare attrezzature protettive come da protocollo.

Qualora servano ulteriori informazioni contattare il distributore R-Biopharm locale per richiedere la scheda dei dati di sicurezza dei materiali.

## Decontaminazione

Prima dello smaltimento, le soluzioni standard in eccesso devono essere trattate con almeno un decimo del loro volume di ipoclorito di sodio al 5%. Gli strumenti di laboratorio e il materiale residuo contaminato devono essere immersi in una soluzione di ipoclorito di sodio al 5% per 30 minuti, poi aggiungere acetone al 5% e tenere in ammollo per altri 30 minuti. Lavare con abbondante acqua prima dello smaltimento. Dopo la decontaminazione lavare scrupolosamente l'attrezzatura di laboratorio utilizzata. Incenerire i rifiuti se consentito dai regolamenti.

## Conservazione e durata

Le colonne hanno una durata di 18 mesi dalla data di produzione se conservate a 2 - 8 °C o di 12 mesi dalla data di produzione se conservate a 21 - 25 °C. Non congelare.

Assicurarsi che le colonne non si siano asciugate e che contengano il tampone sopra al gel. È importante tenere presente che gli anticorpi contenuti nelle colonne di immunoaffinità possono essere denaturati da estreme variazioni di temperatura o pH.

## Campionamento

È necessario ottenere un campione rappresentativo seguendo una delle procedure di campionamento ufficialmente riconosciute. Si raccomanda di tritare finemente almeno 1 kg di campione rappresentativo e di prelevare ed estrarre una parte di esso (5 - 50 g in base al metodo utilizzato).

## Sensibilità

La sensibilità dipende dal sistema di rilevazione finale utilizzato dall'analista. Tuttavia, se necessario la sensibilità del test può essere migliorata aumentando il volume del campione che viene fatto passare attraverso la colonna di immunoaffinità. Notare che è necessario mantenere il rapporto fra solvente e soluzione salina tamponata con fosfato (PBS).

## Recuperi

Se un analista desidera tener conto delle perdite che possono avvenire durante l'estrazione, si raccomanda di analizzare un campione arricchito dello stesso tipo di prodotto del materiale testato seguendo la procedura completa come per uno standard di riferimento. I valori di recupero ottenuti con il campione arricchito possono essere utilizzati per correggere i risultati ottenuti dall'analisi del campione.

## Preparazione delle colonne

Le colonne di immunoaffinità devono essere a temperatura ambiente prima dell'uso. Rimuovere il tappo dalla sommità della colonna e poi eliminarlo. Fissare saldamente la colonna a una siringa di vetro con un adattatore e collocarla in un rack della colonna di immunoaffinità o sul supporto.

## Eluizione

Al fine di eluire completamente la tossina o le tossine dalla colonna di immunoaffinità è fondamentale che il solvente rimanga a contatto con l'anticorpo contenuto nella sospensione in gel per un periodo di tempo sufficiente. Questo assicura che tutti i legami tra l'anticorpo e la tossina siano spezzati, e garantisce infine il rilascio di tutta la tossina dalla colonna per l'analisi con il sistema di rivelazione prescelto

Per garantire che il solvente rimanga a contatto con gli anticorpi in sospensione nel gel per un periodo di tempo sufficiente, è possibile utilizzare uno qualsiasi dei seguenti metodi di eluizione: -

**Backflushing (metodo preferito da R-Biopharm):** lavare in controcorrente sollevando e abbassando delicatamente lo stantuffo della siringa durante il passaggio del solvente attraverso la colonna. Questo processo inverte la direzione del flusso dell'eluato attraverso il gel. La procedura dovrebbe essere ripetuta 3 volte prima di raccogliere l'eluato. Procedere alla fase successiva del metodo.

**Applicazione di piccoli volumi di solvente:** applicare il volume di solvente necessario per l'eluizione in due o tre aliquote più piccole. Attendere che ogni aliquota rimanga a contatto con la sospensione in gel per almeno 30 secondi prima di lasciarla passare completamente attraverso la sospensione in gel per la raccolta. Procedere alla fase successiva del metodo.

**Incubazione con solvente:** applicare l'intero volume di solvente necessario per l'eluizione e lasciar passare 2-3 gocce di solvente attraverso la colonna per la raccolta. Attendere che la parte restante del solvente resti a contatto con la sospensione in gel per almeno 60 secondi prima di lasciarla passare completamente attraverso la sospensione in gel per la raccolta. Procedere alla fase successiva del metodo.



## **Preparazione del Reagente D-MAP (325 µg/ml)**

Il reagente può essere conservato per 6 mesi se conservato a -20 °C. La soluzione stock diluita deve essere preparata fresca il giorno stesso dell'analisi e utilizzata entro 24 ore.

1. Pesare 20 mg di D-MAP in una barattolo di vetro.
2. Aggiungere 20 ml di toluene (equivalente a 1 mg/ml).
3. Misurare 1 ml di toluene in una fiala di vetro.
4. Rimuovere 325 µl e scartarli.
5. Aggiungere 325 µl di soluzione stock di D-MAP da 1 mg/ml per ottenere una soluzione di lavoro da 325 µg/ml.

## **Preparazione del Reagente 1-AN (300 µg/ml)**

Il reagente può essere conservato per 6 mesi a -20 °C. La soluzione stock diluita deve essere preparata fresca il giorno stesso dell'analisi e utilizzata entro 24 ore.

1. Pesare 20 mg di 1-AN in una barattolo di vetro.
2. Aggiungere 20 ml di toluene (equivalente a 1 mg/ml).
3. Misurare 1 ml di toluene in una fiala di vetro.
4. Rimuovere 300 µl e scartarli.
5. Aggiungere 300 µl di soluzione stock 1-AN da 1 mg/ml per ottenere una soluzione di lavoro da 300 µg/ml.

## Informazioni sulla HPLC

### • Preparazione dei campioni - Cereali

Questo metodo è stato verificato su numerosi cereali, fra cui grano, orzo, mais e prodotti a base di cereali.

Nota: una nota applicativa alternativa è disponibile per l'avena.

1. Pesare 50 g di campione macinato e 5 g di cloruro di sodio in un contenitore di miscelazione da 1 litro resistente ai solventi.
2. Aggiungere 250 ml di metanolo all'90% e miscelare ad alta velocità per 2 minuti.
3. Filtrare il campione attraverso carta da filtro Whatman n° 113 o n° 4 oppure centrifugare a 4.000 rpm per 10 minuti.
4. Diluire 7 ml di filtrato con 28 ml di acqua.
5. Filtrare l'estratto diluito attraverso una carta da filtro in microfibra di vetro.
6. Passare 25 ml di filtrato diluito (equivalente a 1 g di campione) attraverso la colonna a una velocità di flusso di 2 ml al minuto (oppure se lo si preferisce lasciarlo scendere lungo la colonna per gravità). Per consentire all'anticorpo di catturare le tossine è essenziale una velocità di flusso lenta e costante.
7. Lavare la colonna facendovi passare 20 ml di acqua con una velocità di flusso di circa 5 ml al minuto. Far passare aria attraverso la colonna per rimuovere il liquido residuo.
8. Eluire le tossine della colonna a una velocità di flusso di 1 goccia al secondo utilizzando 1,5 ml di metanolo al 100% e raccogliere in una fiala di vetro. Per ulteriori informazioni consultare la sezione Eluizione.
9. Far evaporare completamente l'eluato sotto aria a 50 - 60 °C.
10. Ricostituire con 50 µl di D-MAP e 50 µl di 1-AN. Vorticare per 1 minuto.
11. Lasciare la miscela a reagire a 50 °C in un blocco di riscaldamento per 15 minuti.
12. Raffreddare il composto in un bagno ghiacciato per 15 minuti.
13. Far evaporare completamente sotto aria a 50 - 60 °C.
14. Ricostituire con 1 ml di acetonitrile al 70%. Vorticare per 20 secondi.
15. Introdurre 100 µl nel sistema HPLC.



## Informazioni sulla HPLC

### Preparazione degli standard

- **Soluzione stock T-2 e HT-2**

È consigliabile iniziare con soluzioni stock di T-2 e HT-2 da 100.000 ng/ml.

### Standard di lavoro combinato

1. Prelevare 0,5 ml dai 100.000 ng/ml della soluzione T-2 e aggiungere 0,5 ml della soluzione HT-2 da 100.000 ng/ml (equivalente a 50.000 ng/ml di soluzione T-2 e a 50.000 ng/ml di soluzione HT-2, o a 100.000 ng/ml di soluzione totale).
2. Prelevare 100 µl di soluzione totale da 100.000 ng/ml e preparare fino a 1 ml con acetonitrile al 100% (equivalente a 10.000 ng/ml di soluzione totale).

### Curva di calibrazione

Si raccomanda di realizzare una curva di calibrazione di almeno 3-6 punti. Nella realizzazione di una curva di calibrazione adatta, i livelli degli standard di calibrazione devono raggruppare o includere la gamma dei risultati attesi. Le soluzioni standard diluite devono essere preparate fresche il giorno stesso dell'analisi e utilizzate entro 24 ore.

Esempio della preparazione di una curva di calibrazione a cinque punti (è possibile apportare variazioni in base alle norme di legge o ai livelli di contaminazione):

1. Standard 5: Prelevare 200 µl di soluzione totale da 10.000 ng/ml.
  - Far evaporare completamente sotto aria a 50 - 60 °C.
  - Ricostituire con 50 µl di D-MAP (325 µg/ml) e 50 µl di 1-AN (300 µg/ml). Vorticare per 1 minuto.
  - Lasciare la miscela a reagire a 50 °C in un blocco di riscaldamento per 15 minuti.
  - Raffreddare il composto in un bagno ghiacciato per 15 minuti.
  - Far evaporare completamente sotto aria a 50 - 60 °C.
  - Ricostituire con 2 ml di acetonitrile al 70%. Vorticare per 20 secondi (equivalente a 1.000 ng/ml di soluzione totale).
2. Standard 4: Prelevare 1 ml di soluzione totale da 1.000 ng/ml e aggiungere 1 ml di acetonitrile al 70% (equivalente a 500 ng/ml di soluzione totale).
3. Standard 3: Prelevare 1 ml dai 500 ng/ml di soluzione totale e aggiungere 1 ml di acetonitrile al 70% (equivalente a 250 ng/ml di soluzione totale).
4. Standard 2: Prelevare 1 ml dai 250 ng/ml di soluzione totale e aggiungere 1 ml di acetonitrile al 70% (equivalente a 125 ng/ml di soluzione totale).
5. Standard 1: Prelevare 1 ml dai 125 ng/ml di soluzione totale e aggiungere 1 ml di acetonitrile al 70% (equivalente a 62,5 ng/ml di soluzione totale).
6. Introdurre 100 µl di ogni standard nel sistema HPLC.

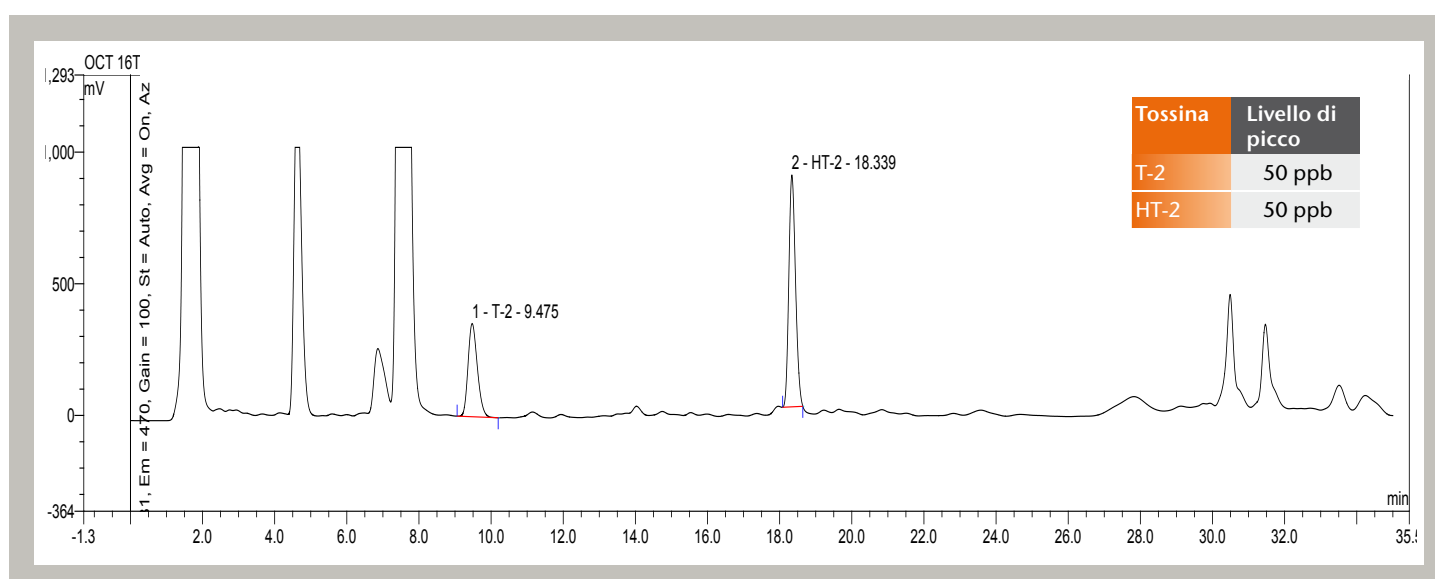
## Informazioni sulla HPLC

- Condizioni raccomandate per l'HPLC

Condizioni per HPLC			
Derivatizzazione	D-MAP e 1-AN		
Cartuccia di protezione	Filtro di protezione Supelco (0,5 µm)		
Colonna analitica	Fenil-esile Luna 5 µm, particelle di 4,6 mm x 150 mm		
Fase mobile	Soluzione A: acetonitrile Soluzione B: Acqua Preparare fresca il giorno dell'analisi.		
Raccomandazioni per il gradiente	Tempo (min)	% soluzione A	% soluzione B
	0	70	30
	5	70	30
	15	85	15
	25	85	15
	27	100	0
	32	100	0
	35	70	30
Pompa per HPLC	Per la fase mobile		
Velocità di flusso	1,0 ml al minuto		
Rilevatore a fluorescenza	Eccitazione: 381 nm		
	Emissione: 470 nm		
Riscaldatore colonna	Mantenere protezione e colonna analitica a 40 °C		
Integratore / sistema di controllo dei dati	Del fornitore di preferenza		
Iniettore	Autocampionatore / valvola Rheodyne		
Volume di iniezione	100 µl		

## Esempio cromatogramma in HPLC per cereali

- Mais



## Informazioni sulla LC-MS/MS

### • Preparazione dei campioni - Cereali

Questo metodo è stato verificato su numerosi cereali, fra cui grano, orzo, mais e prodotti a base di cereali.

Nota: una nota applicativa alternativa è disponibile per l'avena.

1. Pesare 50 g di campione macinato e 5 g di cloruro di sodio in un contenitore di miscelazione da 1 litro resistente ai solventi.
2. Aggiungere 250 ml di metanolo all'90% e miscelare ad alta velocità per 2 minuti.
3. Filtrare il campione attraverso carta da filtro Whatman n° 113 o n° 4 oppure centrifugare a 4.000 rpm per 10 minuti.
4. Diluire 7 ml di filtrato con 28 ml di acqua.
5. Filtrare l'estratto diluito attraverso una carta da filtro in microfibra di vetro.
6. Passare 25 ml di filtrato diluito (equivalente a 1 g di campione) attraverso la colonna a una velocità di flusso di 2 ml al minuto (oppure se lo si preferisce lasciarlo scendere lungo la colonna per gravità). Per consentire all'anticorpo di catturare le tossine è essenziale una velocità di flusso lenta e costante.
7. Lavare la colonna facendovi passare 20 ml di acqua con una velocità di flusso di circa 5 ml al minuto. Far passare aria attraverso la colonna per rimuovere il liquido residuo.
8. Eluire le tossine della colonna a una velocità di flusso di 1 goccia al secondo utilizzando 1,5 ml di metanolo al 100% e raccogliere in una fiala di vetro. Per ulteriori informazioni consultare la sezione Eluizione.
9. Dopo l'eluizione far passare 1,5 ml di acqua attraverso la colonna e raccoglierla nella stessa fiala per un volume totale di 3 ml.
10. Introdurre 25 µl nel sistema per LC-MS/MS.

## Informazioni sulla LC-MS/MS

### Preparazione degli standard

- **Soluzione stock T-2 e HT-2**

È consigliabile iniziare con soluzioni stock di T-2 e HT-2 da 100.000 ng/ml.

### Standard di lavoro combinato

1. Prelevare 0,5 ml dai 100.000 ng/ml della soluzione T-2 e aggiungere 0,5 ml della soluzione HT-2 da 100.000 ng/ml (equivalente a 50.000 ng/ml di soluzione T-2 e a 50.000 ng/ml di soluzione HT-2, o a 100.000 ng/ml di soluzione totale).
2. Prelevare 100 µl di soluzione totale da 100.000 ng/ml e preparare fino a 1 ml con acetonitrile al 100% (equivalente a 10.000 ng/ml di soluzione totale).

### Curva di calibrazione

Si raccomanda di realizzare una curva di calibrazione di almeno 3-6 punti. Nella realizzazione di una curva di calibrazione adatta, i livelli degli standard di calibrazione devono raggruppare o includere la gamma dei risultati attesi. Le soluzioni standard diluite devono essere preparate fresche il giorno stesso dell'analisi e utilizzate entro 24 ore.

Esempio della preparazione di una curva di calibrazione a cinque punti (è possibile apportare variazioni in base alle norme di legge o ai livelli di contaminazione):

1. Standard 5: Prelevare 2 mL di metanolo al 50% e rimuovere 200 µL. Aggiungere 200 µL di soluzione totale da 10.000 ng/mL (equivalente a 1.000 ng/mL di soluzione totale)
2. Standard 4: Prelevare 1 ml di soluzione totale da 1.000 ng/ml e aggiungere 1 ml di metanolo al 50% (equivalente a 500 ng/ml di soluzione totale).
3. Standard 3: Prelevare 1 ml di soluzione totale da 500 ng/ml e aggiungere 1 ml di metanolo al 50% (equivalente a 250 ng/ml di soluzione totale).
4. Standard 2: Prelevare 1 ml di soluzione totale da 250 ng/ml e aggiungere 1 ml di metanolo al 50% (equivalente a 125 ng/ml di soluzione totale).
5. Standard 1: Prelevare 1 ml di soluzione totale da 125 ng/ml e aggiungere 1 ml di metanolo al 50% (equivalente a 62,5 ng/ml di soluzione totale).
6. Introdurre 25 µl di ogni standard nel sistema per LC-MS/MS.

## Informazioni sulla LC-MS/MS

### • Raccomandazioni per la LC-MS/MS

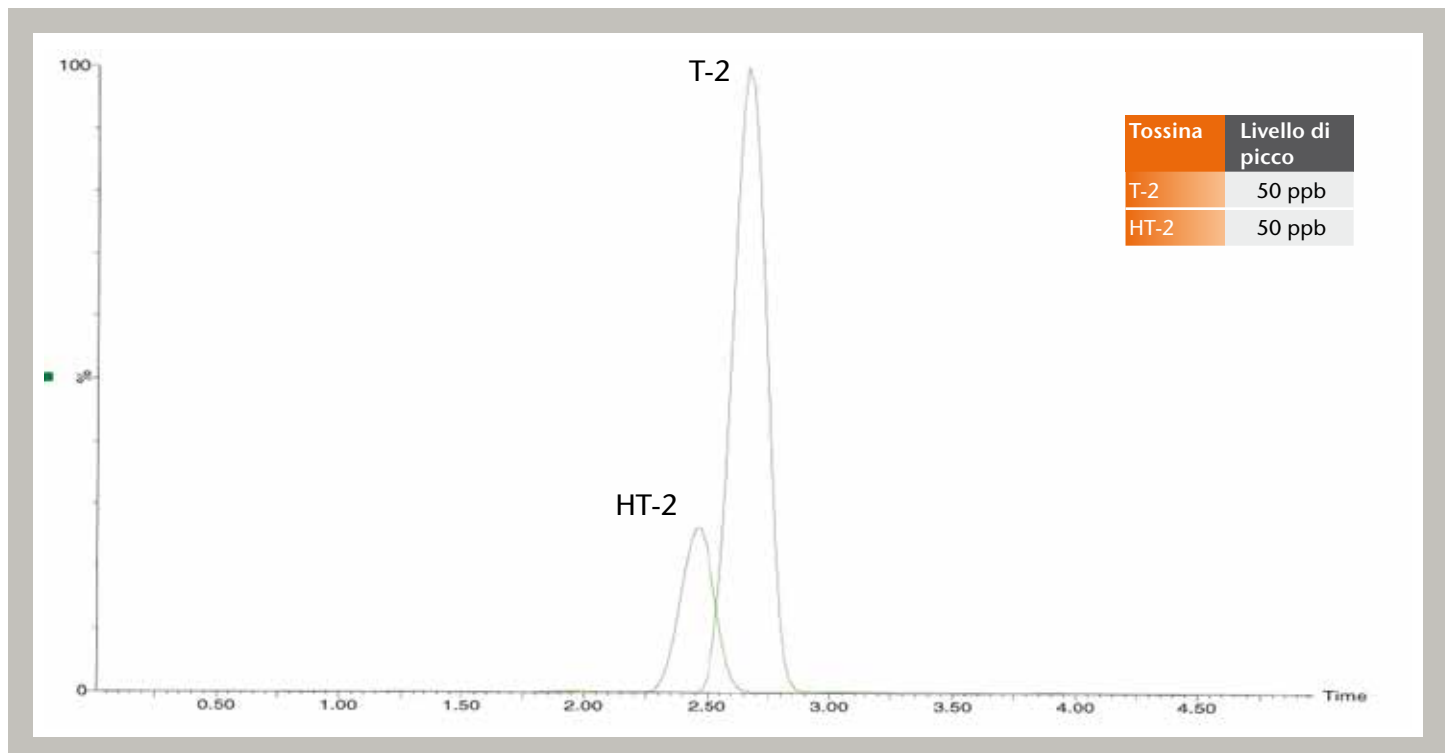
Raccomandazioni per la LC			
Colonna analitica	ACE® ULTRA CORE 2.5 SUPER C 18,50 x 2,1 mm		
Fase mobile A	1 mM di formiato di ammonio e acido formico allo 0,1% in 95: 5 acqua: metanolo		
Fase mobile B	1 mM di formiato di ammonio e acido formico allo 0,1% in 2: 98 acqua: metanolo		
Raccomandazioni per il gradiente	Tempo (min)	% soluzione A	% soluzione B
	0	80	20
	0,1	80	20
	2,5	10	90
	3,75	10	90
	3,85	80	20
	5,0	80	20
Velocità di flusso	0,3 ml al minuto		
Riscaldatore colonna	Mantenere la colonna analitica a 40 °C		
Integratore / sistema di controllo dei dati	Del fornitore di preferenza		
Iniettore	Autocampionatore / valvola Rheodyne		
Volume di iniezione	25 µl		

Raccomandazioni per la spettrometria di massa	
Dispositivo	SCIEX QTRAP® 4500
Modalità	Multiple Reaction Monitoring (MRM)
Spray ionizzante	3500 Volt
Gas sorgente di ioni 1	50 psi
Gas sorgente di ioni 2	55 psi
Gas di cortina	50 psi

Impostazione del dispositivo						
Tossina	RT (min)	Ione precursore (m/z)	Ioni prodotto (m/z)	Tempo di permanenza (s)	Tensione cono (V)	Tensione di collisione (eV)
HT-2	0 - 5	442,21	263,16 (Quantificatore)	0,328	18	12
			215,10 (Qualificatore)			
T-2	0 - 5	484,21	305,14 (Quantificatore)	0,328	26	14
			245,12 (Qualificatore)			

## Esempio di cromatogramma per cereali

- Mais



## Qualità

I prodotti RBR sono sviluppati, prodotti, verificati e spediti conformemente a un sistema di gestione della qualità registrato ISO 9001, che garantisce un prodotto costante sempre rispondente alle nostre specifiche prestazionali. I nostri prodotti sono stati impiegati in molti studi collaborativi per lo sviluppo di metodi standard europei e internazionali e sono ampiamente utilizzati dai principali enti, da aziende del settore alimentare e da laboratori statali. I riferimenti per i prodotti RBR per i clienti sono disponibili su richiesta.

## Supporto tecnico

RBR sa che talvolta gli utenti dei nostri prodotti possono avere bisogno di assistenza e suggerimenti. A tale scopo offriamo ai nostri clienti i seguenti servizi:

- Analisi dei campioni problematici.
- Procedure per campioni difficili.
- Riferimenti della libreria RBR.
- Installazione di KOBRA® CELL e relativo supporto.
- Consulenza per i parametri di rilevazione.
- Consulenza per la preparazione e manipolazione degli standard.
- Aggiornamenti sulle normative, sul campionamento e altre notizie via e-mail.
- Fornitura di campioni arricchiti.

Per ulteriori informazioni contattare il distributore R-Biopharm locale.

## Garanzia

R-Biopharm Rhône Ltd non fornisce alcuna garanzia, implicita o esplicita, oltre a quella relativa al livello idoneo di qualità dei materiali di cui sono costituiti tutti i prodotti realizzati da R-Biopharm Rhône. Se uno qualsiasi di detti materiali presenta un difetto, R-Biopharm Rhône Ltd fornirà un prodotto di ricambio. L'utente si assume qualsiasi rischio e responsabilità derivante dall'utilizzo dei prodotti e delle procedure di R-Biopharm Rhône Ltd. R-Biopharm Rhône Ltd non sarà ritenuta responsabile per eventuali danni, compresi danni speciali o conseguenti, perdite o spese derivanti direttamente o indirettamente dall'utilizzo dei prodotti o delle procedure di R-Biopharm Rhône Ltd.





