

EASI-EXTRACT[®] T-2 & HT-2

Product Code: P43 / P43B

Immunoaffinity columns for use in conjunction with HPLC or LC-MS/MS.
For in vitro use only.

P43/V17/30.06.21

www.r-biopharm.com



R-BIOPHARM
RHÔNE LTD

Contents

	Page
Test Principle.....	4
Reagents Not Provided	4
Accessory Products	4
Recommended Methods and Application Notes	4
Hazards	5
Decontamination	5
Storage & Shelf Life	5
Sampling	5
Sensitivity.....	5
Recoveries	5
Column Preparation.....	6
Elution	6
Preparation of D-MAP Reagent (325 µg/ml)	7
Preparation of 1-AN Reagent (300 µg/ml)	7
HPLC Information.....	8
• Sample preparation - Cereal	8
HPLC Information.....	9
• Preparation of Standards	9
• Combined Working Standard	9
Calibration Curve.....	9
HPLC Information.....	10
• Recommended HPLC Conditions	10
Example HPLC chromatogram for cereal	10
• Maize	10
LC-MS/MS information.....	11
• Sample Preparation - Cereal	11
LC-MS/MS Information	12
• Preparation of standards.....	12
• Combined Working Standard	12
Calibration Curve.....	12
LC-MS/MS information.....	13
• Recommended LC-MS/MS Conditions	13
Example chromatogram for cereal.....	14
• Maize	14
Quality	15
Technical Support.....	15
Warranty	15

Test Principle

The procedure is based on monoclonal antibody technology, which makes the test highly specific, sensitive, rapid and simple to perform.

The columns contain a gel suspension of monoclonal antibody specific to the toxins of interest. Following extraction of the toxins the sample extract is filtered, diluted and passed slowly through the immunoaffinity column. Any toxins which are present in the sample are retained by the antibody within the gel suspension. The column is washed to remove unbound material and the toxins are then released from the column following elution with solvent. The eluate is collected prior to analysis by HPLC or LC-MS/MS. T-2 and HT-2 toxins require to be derivatised when analysed by HPLC.

The total extraction and clean-up time takes approximately 20 minutes to perform. The result is improved clean-up and concentration of the toxins from food and feed samples giving a much cleaner chromatogram and therefore providing more accurate and sensitive detection. The columns also have the added advantage that they can be automated for large scale analysis of samples.

Reagents Not Provided

- Distilled / Deionised Water (suitable for use with HPLC, e.g. MilliQ)
- Solvents (HPLC Grade Methanol and Acetonitrile)
- Phosphate Buffered Saline (PBS) (RP202)*
- T-2 and HT-2 Standards (Please refer to Preparation of Standards section)
- Sodium Chloride
- Sodium Hydroxide (to pH filtrate if required)
- 4-dimethylaminopyridine (DMAP)
- 1-anthrolylnitrile (1-AN)
- Toluene for residue analysis

Accessory Products

- Whatman No. 113 or No. 4 Filter Paper
- Glass Microfiber Filter Paper
- Immunoaffinity Column Rack (CR1)*
- Immunoaffinity Column Accessory Pack (AP01)*

* Available from R-Biopharm. Please contact your local R-Biopharm distributor for further information.

Recommended Methods and Application Notes

Methods are available for all matrices covered by legislation as well as additional commodities. Deviation from the methods described in our Instructions For Use and Application Notes may not achieve optimum results. Please contact your local R-Biopharm distributor for further information.

Hazards

Mycotoxins are very hazardous substances. Only laboratories equipped to handle toxic materials and solvents should perform analyses. Suitable protective clothing, including gloves, safety glasses and lab coats should be worn throughout the analysis.

Flammable solvents should be stored in an explosion-proof cabinet. Use a chemical hood and protective equipment as applicable.

Contact your local R-Biopharm distributor for a Material Safety Data Sheet for further information if required.

Decontamination

Prior to disposal, excess standard solutions should be treated with at least one-tenth their volume of 5 % sodium hypochlorite. Labware and contaminated waste should be immersed in 5 % sodium hypochlorite solution for 30 minutes followed by the addition of 5 % acetone for 30 minutes. Flush with copious amounts of water before disposal. After decontamination labware should be thoroughly washed. Incinerate waste if regulations permit.

Storage & Shelf Life

The columns expire 18 months from date of manufacture if stored at 2 - 8 °C or 12 months from date of manufacture if stored at 21 - 25 °C. Do not freeze.

Ensure the column has not dried out and contains buffer above the gel. It is important to note the antibody included in the immunoaffinity column can be denatured by extreme temperature or pH change.

Sampling

A representative sample should be obtained by following one of the officially recognised sampling procedures. It is recommended that a minimum of 1 kg of representative sample is finely ground and a portion (5 - 50 g dependent on method used) of this is removed and extracted.

Sensitivity

The sensitivity is dependent on the final detection system employed by the analyst. However the test sensitivity may be improved if required by increasing the volume of sample passed through the immunoaffinity column. Please note the ratio of solvent to phosphate buffered saline (PBS) should be maintained.

Recoveries

If an analyst wishes to account for losses during extraction it is recommended a spiked sample of the same commodity type as the material being tested is analysed following the complete procedure as a reference standard. The recoveries obtained with the spiked sample can be used to correct the results obtained with the test sample.

Column Preparation

Immunoaffinity columns should be at ambient temperature before use. Remove the cap from the top of the column and discard. Firmly attach the column to a glass syringe barrel using an adapter and place in an immunoaffinity column rack or clamp stand.

Elution

In order to fully elute the toxin/s from the immunoaffinity column it is vital that the solvent is in contact with the antibody within the gel suspension for a sufficient period of time. This ensures that all of the bonds between the antibody and the toxin are broken, ultimately releasing all of the toxin from the column for analysis with the detection system of choice

To ensure that the solvent is in contact with the antibody gel for a sufficient period of time any of the following elution methods can be used: -

Backflushing (this is the preferred method of choice at R-Biopharm): backflush by gently raising and lowering the syringe plunger during passage of the solvent through the column. This process will reverse the direction of flow of the eluate through the gel. This should be repeated 3 times before collecting the eluate. Proceed to the next step in the method.

Application of small volumes of solvent: apply the volume of solvent required for elution in two or three smaller aliquots. Allow each aliquot to remain in contact with the gel suspension for a minimum of 30 seconds before allowing each to pass fully through the gel suspension for collection. Proceed to the next step in the method.

Incubation with solvent: apply the full volume of solvent required for elution and allow 2-3 drops of the solvent to pass through the column for collection. Allow the remainder of the solvent to remain in contact with the gel suspension for a minimum of 60 seconds before allowing it to pass through the gel suspension for collection. Proceed to the next step in the method.



Preparation of D-MAP Reagent (325 µg/ml)

The reagent can be kept for 6 months if stored at -20 °C. The diluted stock solution should be prepared fresh on the day of analysis and used within a 24 hour period.

1. Weigh 20 mg of D-MAP into a glass jar.
2. Add 20 ml of toluene (equivalent to 1 mg/ml).
3. Measure 1 ml of toluene into a glass tube.
4. Remove 325 µl to waste.
5. Add 325 µl of 1 mg/ml D-MAP stock solution to give a 325 µg/ml working solution.

Preparation of 1-AN Reagent (300 µg/ml)

The reagent can be kept for 6 months if stored at -20 °C. The diluted stock solution should be prepared fresh on the day of analysis and used within a 24 hour period.

1. Weigh 20 mg of 1-AN into a glass jar.
2. Add 20 ml of toluene (equivalent to 1 mg/ml).
3. Measure 1 ml of toluene into a glass tube.
4. Remove 300 µl to waste.
5. Add 300 µl of 1 mg/ml 1-AN stock solution to give a 300 µg/ml working solution.

HPLC Information

• Sample Preparation - Cereal

This method has been tested on a number of cereals including wheat, barley, maize and cereal based products.

Note: An alternative Application Note is available for Oats.

1. Weigh 50 g of ground sample and 5 g of sodium chloride into a 1 litre capacity, solvent resistant blender jar.
2. Add 250 ml of 90 % methanol and blend at high speed for 2 minutes.
3. Filter the sample through Whatman No. 113 or No. 4 filter paper, or centrifuge at 4,000 rpm for 10 minutes.
4. Dilute 7 ml of filtrate with 28 ml of water.
5. Filter the diluted extract through a glass microfibre filter paper.
6. Pass 25 ml of the diluted filtrate (equivalent to 1 g of sample) through the column at a flow rate of 2 ml per minute (or the sample can be allowed to pass through the column by gravity if preferred). A slow, steady flow rate is essential for the capture of the toxin by the antibody.
7. Wash the column by passing 20 ml of water through at a flow rate of approximately 5 ml per minute. Pass air through the column to remove residual liquid.
8. Elute the toxins from the column at a flow rate of 1 drop per second using 1.5 ml of 100 % methanol and collect in a glass tube. Please refer to the Elution section for further information.
9. Evaporate the eluate to dryness under air at 50 - 60 °C.
10. Reconstitute with 50 µl of D-MAP and 50 µl of 1-AN. Vortex for 1 minute.
11. Leave the mixture to react at 50 °C in a heating block for 15 minutes.
12. Cool the mixture in an iced bath for 15 minutes.
13. Evaporate to dryness under air at 50 - 60 °C
14. Reconstitute in 1 ml of 70 % acetonitrile. Vortex for 20 seconds.
15. Inject 100 µl onto the HPLC system.

HPLC Information

Preparation of Standards

- **T-2 and HT-2 Stock Solution**

It is advised to start with 100,000 ng/ml T-2 and HT-2 stock solutions.

Combined Working Standard

1. Take 0.5 ml of 100,000 ng/ml T-2 solution and add 0.5 ml of 100,000 ng/ml HT-2 solution (equivalent to 50,000 ng/ml T-2 and 50,000 ng/ml HT-2 solution, or 100,000 ng/ml total solution).
2. Take 100 µl of 100,000 ng/ml total solution and make up to 1 ml with 100 % acetonitrile (equivalent to 10,000 ng/ml total solution).

Calibration Curve

It is recommended to run at least a 3 - 6 point calibration curve. In constructing a suitable curve the levels of the calibration standards should bracket or include the range of expected results. The diluted standard solutions should be prepared fresh on the day of analysis and used within a 24 hour period.

Example of how to prepare a five point calibration curve (can be modified according to legislative requirements or contamination levels):

1. Standard 5: Take 200 µl of 10,000 ng/ml total solution.
 - Evaporate to dryness under air at 50 - 60 °C.
 - Reconstitute with 50 µl of D-MAP (325 µg/ml) and 50 µl of 1-AN (300 µg/ml). Vortex for 1 minute.
 - Leave the mixture to react at 50 °C in a heating block for 15 minutes.
 - Cool the mixture in an iced bath for 15 minutes.
 - Evaporate to dryness under air at 50 - 60 °C.
 - Reconstitute in 2 ml of 70 % acetonitrile. Vortex for 20 seconds (equivalent to 1,000 ng/ml total solution).
2. Standard 4: Take 1 ml of 1,000 ng/ml total solution and add 1 ml of 70 % acetonitrile (equivalent to 500 ng/ml total solution).
3. Standard 3: Take 1 ml of 500 ng/ml total solution and add 1 ml of 70 % acetonitrile (equivalent to 250 ng/ml of total solution).
4. Standard 2: Take 1 ml of 250 ng/ml total solution and add 1 ml of 70 % acetonitrile (equivalent to 125 ng/ml of total solution).
5. Standard 1: Take 1 ml of 125 ng/ml total solution and add 1 ml of 70 % acetonitrile (equivalent to 62.5 ng/ml of total solution).
6. Inject 100 µl of each standard onto the HPLC system.

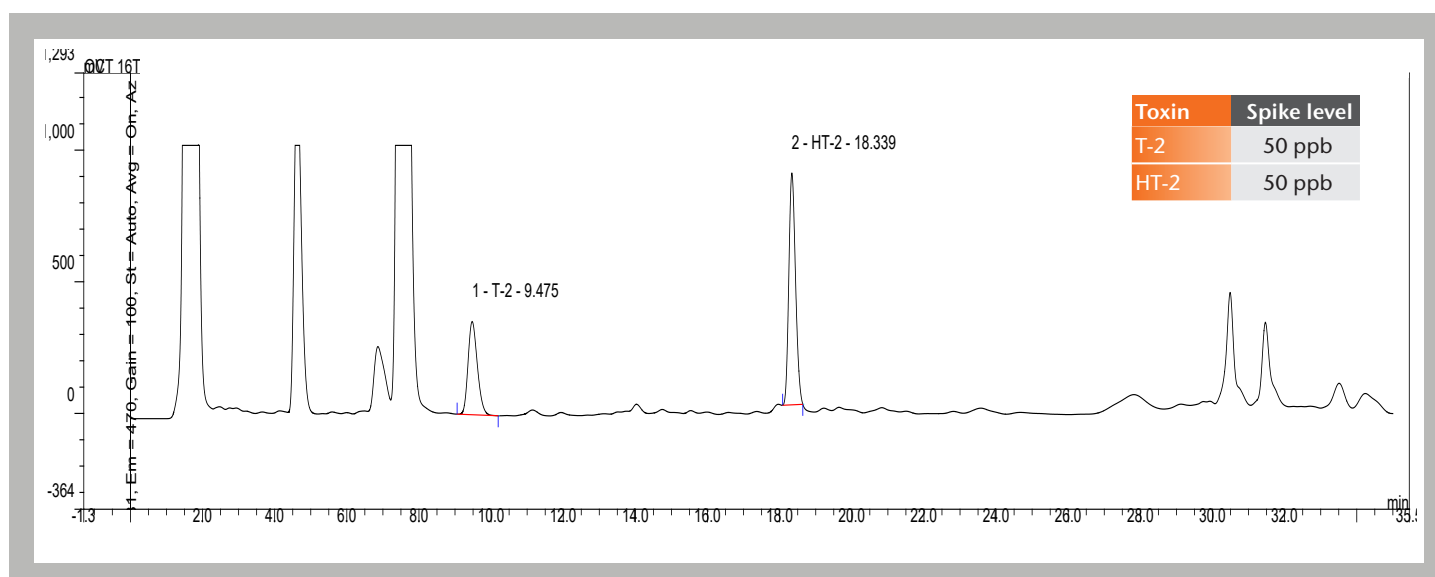
HPLC Information

- Recommended HPLC Conditions

HPLC Conditions			
Derivatisation	D-MAP and 1-AN		
Guard Cartridge	Supelco guard filter (0.5 µm)		
Analytical Column	Phenyl-Hexyl Luna 5 µm, 4.6 mm x 150 mm particles		
Mobile Phase	Solution A: Acetonitrile Solution B: Water Prepare fresh on day of analysis.		
Gradient Conditions	Time (min)	% Solution A	% Solution B
	0	70	30
	5	70	30
	15	85	15
	25	85	15
	27	100	0
	32	100	0
	35	70	30
HPLC Pump	To deliver mobile phase		
Flow Rate	1.0 ml per minute		
Fluorescence Detector	Excitation: 381 nm		
	Emission: 470 nm		
Column Heater	Maintain guard and analytical column at 40 °C		
Integrator / Data Control System	From preferred supplier		
Injector	Autosampler / Rheodyne valve		
Injection Volume	100 µl		

Example HPLC chromatogram for cereal

- Maize



LC-MS/MS Information

• Sample Preparation - Cereal

This method has been tested on a number of cereals including wheat, barley, maize and cereal based products.

Note: An alternative Application Note is available for Oats.

1. Weigh 50 g of ground sample and 5 g of sodium chloride into a 1 litre capacity, solvent resistant blender jar.
2. Add 250 ml of 90 % methanol and blend at high speed for 2 minutes.
3. Filter the sample through Whatman No. 113 or No. 4 filter paper, or centrifuge at 4,000 rpm for 10 minutes.
4. Dilute 7 ml of filtrate with 28 ml of water.
5. Filter the diluted extract through a glass microfibre filter paper.
6. Pass 25 ml of the diluted filtrate (equivalent to 1 g of sample) through the column at a flow rate of 2 ml per minute (or the sample can be allowed to pass through the column by gravity if preferred). A slow, steady flow rate is essential for the capture of the toxin by the antibody.
7. Wash the column by passing 20 ml of water through at a flow rate of approximately 5 ml per minute. Pass air through the column to remove residual liquid.
8. Elute the toxins from the column at a flow rate of 1 drop per second using 1.5 ml of 100 % methanol and collect in a glass tube. Please refer to the Elution section for further information.
9. Following elution pass 1.5 ml of water through the column and collect in the same vial to give a 3 ml total volume
10. Inject 25 μ l onto the LC-MS/MS system.

LC-MS/MS Information

Preparation of Standards

- **T-2 and HT-2 Stock Solution**

It is advised to start with 100,000 ng/ml T-2 and HT-2 stock solutions.

Combined Working Standard

1. Take 0.5 ml of 100,000 ng/ml T-2 solution and add 0.5 ml of 100,000 ng/ml HT-2 solution (equivalent to 50,000 ng/ml T-2 and 50,000 ng/ml HT-2 solution, or 100,000 ng/ml total solution).
2. Take 100 µl of 100,000 ng/ml total solution and make up to 1 ml with 100 % acetonitrile (equivalent to 10,000 ng/ml total solution).

Calibration Curve

It is recommended to run at least a 3 - 6 point calibration curve. In constructing a suitable curve the levels of the calibration standards should bracket or include the range of expected results. The diluted standard solutions should be prepared fresh on the day of analysis and used within a 24 hour period.

Example of how to prepare a five point calibration curve (can be modified according to legislative requirements or contamination levels):

1. Standard 5: Take 2 mL of 50% methanol and remove 200 µL. Add 200 µL of 10,000 ng/mL total solution (equivalent to 1,000 ng/mL total solution)
2. Standard 4: Take 1 ml of 1,000 ng/ml total solution and add 1 ml of 50 % methanol (equivalent to 500 ng/ml total solution).
3. Standard 3: Take 1 ml of 500 ng/ml total solution and add 1 ml of 50 % methanol (equivalent to 250 ng/ml of total solution).
4. Standard 2: Take 1 ml of 250 ng/ml total solution and add 1 ml of 50 % methanol (equivalent to 125 ng/ml of total solution).
5. Standard 1: Take 1 ml of 125 ng/ml total solution and add 1 ml of 50 % methanol (equivalent to 62.5 ng/ml of total solution).
6. Inject 25 µl of each standard onto the LC-MS/MS system

LC-MS/MS Information

- Recommended LC-MS/MS Conditions

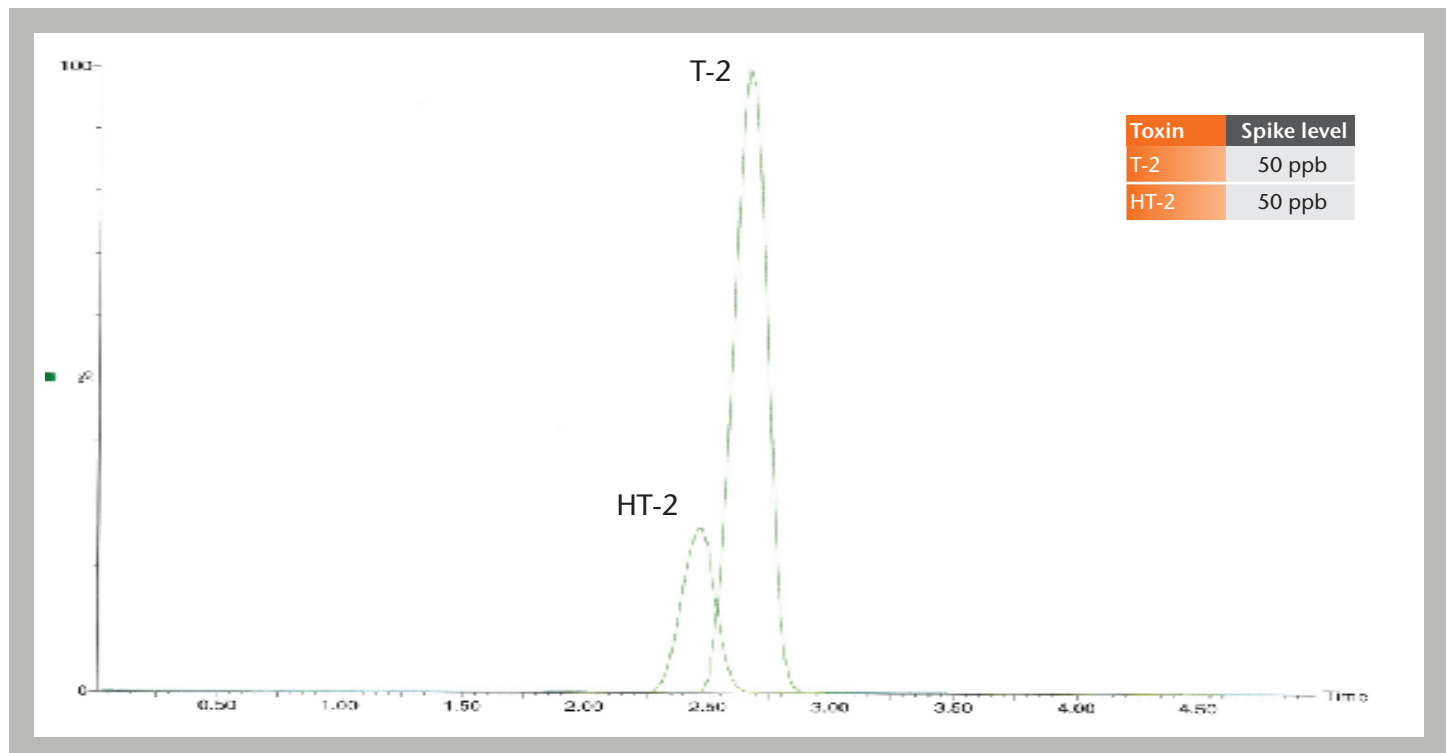
LC Conditions			
Analytical Column	ACE® ULTRA CORE 2.5 SUPER C18, 50 x 2.1 mm		
Mobile Phase A	1 mM Ammonium Formate + 0.1 % Formic Acid in 95 : 5 water : methanol		
Mobile Phase B	1 mM Ammonium Formate + 0.1 % Formic Acid in 2 : 98 water : methanol		
Gradient Conditions	Time (min)	% Solution A	% Solution B
	0	80	20
	0.1	80	20
	2.5	10	90
	3.75	10	90
	3.85	80	20
	5.0	80	20
Flow Rate	0.3 ml per minute		
Column Heater	Maintain analytical column at 40 °C		
Integrator / Data Control System	From preferred supplier		
Injector	Autosampler / Rheodyne valve		
Injection Volume	25 µl		

Mass Spectrometry Conditions	
Instrument	SCIEX QTRAP® 4500
Mode	Multiple Reaction Monitoring (MRM)
IonSpray	3500 Volts
IonSource Gas 1	50 psi
IonSource Gas 2	55 psi
Curtain Gas	50 psi

Instrument Setting						
Toxin	RT (min)	Precursor Ion (m/z)	Product Ions (m/z)	Dwell Time (s)	Cone Voltage (V)	Collision Voltage (eV)
HT-2	0 - 5	442.21	263.16 (Quantifier)	0.328	18	12
			215.10 (Qualifier)		18	14
T-2	0 - 5	484.21	305.14 (Quantifier)	0.328	26	14
			245.12 (Qualifier)		26	14

Example chromatogram for cereal

- Maize



Quality

RBR products are developed, manufactured, tested and dispatched under an ISO 9001 registered Quality Management System, guaranteeing a consistent product, which always meets our performance specifications. Our products have been used in many collaborative studies to develop standard European and International Methods and are widely used by key institutions, food companies and government laboratories. Customer references for RBR products are available on request.

Technical support

RBR understand that from time to time users of our products may need assistance or advice. Therefore, we are pleased to offer the following services to our customers:

- Analysis of problem samples.
- Application notes for difficult samples.
- References from the RBR library.
- Installation and support of the KOBRA® CELL.
- Advice on detection parameters.
- Advice on preparation and handling of standards.
- Updates on legislation, sampling and other news by e-mail.
- Provision of spiked samples.

Please contact your local R-Biopharm distributor for further information.

Warranty

R-Biopharm Rhône Ltd makes no warranty of any kind, express or implied, except that all products made by R-Biopharm Rhône Ltd are made with materials of suitable quality. If any materials are defective, R-Biopharm Rhône Ltd will provide a replacement product. The user assumes all risk and liability resulting from the use of R-Biopharm Rhône Ltd products and procedures. R-Biopharm Rhône Ltd shall not be liable for any damages, including special or consequential damages, loss or expense arising directly or indirectly from the use of R-Biopharm Rhône Ltd products or procedures.

EASI-EXTRACT® T-2 & HT-2

Art. Nr.: RBRP43 / RBRP43B

Immunaффinitätssäulen zur Verwendung in Kombination mit HPLC oder LC-MS/MS.
Nur zum In-vitro-Gebrauch.

Inhalt	Seite
Testprinzip	18
Nicht im Lieferumfang enthaltene Reagenzien	18
Zubehörprodukte.....	18
Gefahren	18
Empfohlene Methoden und Applikationen.....	19
Dekontamination	19
Lagerung und Haltbarkeit	19
Probennahme	19
Sensitivität	19
Wiederfindung.....	19
Säulenvorbereitung.....	20
Elution	20
Vorbereitung des D-MAP-Reagenz (325 µg/ml).....	21
Vorbereitung des 1-AN-Reagenz (300 µg/ml).....	21
HPLC-Informationen.....	22
• Probenvorbereitung – Zerealie.....	22
HPLC-Informationen.....	23
• Vorbereitung von Standards	23
• Kombiniertes Arbeitsstandard	23
Kalibrierkurve.....	23
HPLC-Informationen.....	24
• Empfohlene HPLC-Bedingungen.....	24
Beispiel-HPLC-Chromatogramm für Zerealie.....	24
• Mais	24
LC-MS/MS-Informationen	25
• Probenvorbereitung – Zerealie.....	25
LC-MS/MS-Informationen	26
• Vorbereitung von Standards	26
• Kombiniertes Arbeitsstandard	26
Kalibrierkurve.....	26
LC-MS/MS-Informationen	27
• Empfohlene HPLC-Bedingungen.....	27
Beispiel-Chromatogramm für Zerealie.....	28
• Mais	28
Qualität.....	29
Technische Unterstützung.....	29
Garantie.....	29

Testprinzip

Das Verfahren basiert auf monoklonaler Antikörpertechnologie, die den Test hochspezifisch, sensitiv, schnell und einfach durchführbar macht.

Die Säulen enthalten eine Gelsuspension des monoklonalen Antikörpers, der spezifisch für die jeweiligen Toxine ist. Im Anschluss an die Extraktion der Toxine wird der Probenextrakt gefiltert, verdünnt und langsam durch die Immunaффinitätssäule geleitet. Die in der Probe vorhandenen Toxine werden vom Antikörper in der Gelsuspension gebunden. Die Säule wird gewaschen, um ungebundene Substanzen zu entfernen, und die Toxine werden mit einem geeigneten Lösungsmittel von der Säule eluiert. Das Eluat wird vor der HPLC LC-MS/MS Analyse gesammelt. Wenn die T-2 und HT-2 Toxine mit HPLC analysiert werden sollen, müssen sie vorher derivatisiert werden.

Die Extraktion und Reinigung dauert insgesamt ca. 20 Minuten. Das Ergebnis ist eine verbesserte Reinigung und Konzentration der Toxine aus Lebensmittel- und Futterproben, wodurch man ein viel saubereres Chromatogramm und somit eine genauere und sensitivere Detektion erhält. Die Säulen haben außerdem den Vorteil, dass sie für eine große Anzahl von Proben automatisiert werden können.

Nicht im Lieferumfang enthaltene Reagenzien

- Destilliertes / deionisiertes Wasser (geeignet für die HPLC, z. B. MilliQ)
- Lösungsmittel (Methanol und Acetonitril mit HPLC-Qualität)
- Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) (RBRRP202)*
- T-2- und HT-2-Standards (siehe Abschnitt „Vorbereitung von Standards“)
- Natriumchlorid
- Natriumhydroxid (zur pH-Einstellung, falls erforderlich)
- 4-Dimethylaminopyridin (DMAP)
- 1-Anthroylnitril (1-AN)
- Toluol für die Residualanalyse

Zubehörprodukte

- Whatman Nr. 113 oder Nr. 4 Filterpapier*
- Glasmikrofaserfilterpapier*
- Immunaффinitätssäulenständer (RBRCR1)*
- Immunaффinitätssäulen-Zubehörpaket (RBRAP01)*

* Erhältlich bei R-Biopharm AG.

Gefahren

Mykotoxine sind sehr gefährliche Stoffe. Analysen sollten nur von Laboren durchgeführt werden, die über die entsprechende Ausrüstung zur Handhabung toxischer Substanzen und Lösungsmittel verfügen. Während der Analyse ist geeignete Schutzkleidung einschließlich Handschuhe, Schutzbrille und Laborkittel zu tragen.

Entzündliche Lösungsmittel müssen in einem explosions sicheren Schrank aufbewahrt werden. Je nach Anwendung ist eine Abdeckhaube und Schutzausrüstung zu verwenden.

Bitte wenden Sie sich an die R-Biopharm AG, wenn Sie ein Sicherheitsdatenblatt erhalten möchten.

Empfohlene Methoden und Anwendungshinweise

Es sind Methoden für alle gesetzlich vorgeschriebenen Matrizen sowie für zusätzliche Erzeugnisse verfügbar. Für weitere Informationen wenden Sie sich bitte an Ihren R-Biopharm Vertriebspartner vor Ort.

Dekontamination

Überschüssige Standardlösungen müssen vor der Entsorgung mit mindestens einem Zehntel ihres Volumens mit einer 5 %igen Natriumhypochloritlösung behandelt werden. Laborzubehör und kontaminierter Abfall sollte 30 Minuten lang in eine 5 % Natriumhypochloritlösung eingetaucht werden, gefolgt von der Zugabe einer 5 % Acetonlösung für 30 Minuten. Vor der Entsorgung mit unbedingt mit reichlich Wasser nachspülen. Laborzubehör sollte nach einer Dekontamination gründlich gewaschen werden. Abfall verbrennen, wenn die Vorschriften es zulassen.

Lagerung und Haltbarkeit

Die Säulen haben eine Mindesthaltbarkeit von 18 Monaten ab dem Herstellungsdatum, wenn sie bei 2 - 8 °C gelagert werden, bzw. von 12 Monaten ab dem Herstellungsdatum, wenn sie bei 21 - 25 °C gelagert werden. Die Säulen nicht einfrieren.

Es sollte sichergestellt werden, dass die Säulen nicht austrocknen und sich Puffer über dem Gel befindet. Wichtiger Hinweis! Der Antikörper in der Immunaффinitätssäule kann durch extreme Temperatur- oder pH-Änderungen denaturiert werden.

Probennahme

Eine repräsentative Probe sollte durch Befolgung einer der offiziell anerkannten Probennahmeverfahren entnommen werden. Es wird empfohlen, dass mindestens 1 kg einer repräsentativen Probe fein gemahlen und ein Teil (10 - 50 g abhängig von der verwendeten Methode) hiervon abgenommen und extrahiert wird.

Sensitivität

Die Sensitivität ist abhängig vom verwendeten Detektionssystem, das zur Analyse verwendet wird. Die Testsensitivität kann bei Bedarf verbessert werden, indem das Volumen der durch die Immunaффinitätssäule geleiteten Probe erhöht wird. Bitte beachten sie, dass das Verhältnis der Lösung mit der Phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) beibehalten wird.

Wiederfindung

Wenn ein Sie Verluste während der Extraktion berücksichtigen wollen, wird empfohlen, dass eine gespikete Probe der gleichen Matrix wie die zu analysierende Probe gemäß dem kompletten Verfahren wie ein Referenzstandard analysiert wird. Die mit der gespikten Probe erhaltene Wiederfindung kann dann verwendet werden, um die mit der Testprobe erhaltenen Ergebnisse zu korrigieren.

Säulenvorbereitung

Die Immunaффinitätssäulen sollten vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht werden.

Eine Lücke zwischen dem Gel und der Fritte ist normal und ist keine Beeinträchtigung der Funktionalität. Gelegentlich kann sich hier während des Transports eine Blase bilden. Falls dies passiert, kann die Blase durch leichtes Klopfen der Säule mit der Unterseite gegen eine harte Oberfläche entfernt werden.

Entfernen Sie die Kappe von der Oberseite der Säule und werfen Sie sie weg. Die Säule fest an einem Glasspritzenzylinder anbringen und in einen Immunaффinitätssäulen- oder einen Klemmständer stellen.

Elution

Um das/die Toxine/e vollständig aus der Immunaффinitätssäule 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.



Vorbereitung des D-MAP-Reagenz (325 µg/ml)

Das Reagenz kann für 6 Monate aufbewahrt werden, wenn es bei -20 °C gelagert wird. Die verdünnte Stammlösung sollte frisch am Tag des Einsatzes vorbereitet und innerhalb eines Zeitraums von 24 Stunden verwendet werden.

1. 20 mg D-MAP in einen Glasbecher einwiegen.
2. 20 ml Toluol zugeben (äquivalent zu 1 mg/ml).
3. 1 ml Toluol in einem Glasröhrchen abmessen.
4. 325 µl entfernen und verwerfen.
5. 325 µl 1 mg/ml D-MAP-Stammlösung zugeben, um eine Arbeitslösung von 325 µg/ml zu erhalten.

Vorbereitung des 1-AN-Reagenz (300 µg/ml)

Das Reagenz kann für 6 Monate aufbewahrt werden, wenn es bei -20 °C gelagert wird. Die verdünnte Stammlösung sollte frisch am Tag des Einsatzes vorbereitet und innerhalb eines Zeitraums von 24 Stunden verwendet werden.

1. 20 mg 1-AN in einen Glasbecher einwiegen.
2. 20 ml Toluol zugeben (äquivalent zu 1 mg/ml).
3. 1 ml Toluol in einem Glasröhrchen abmessen.
4. 300 µl entfernen und entsorgen.
5. 300 µl 1 mg/ml 1-AN-Stammlösung zugeben, um eine Arbeitslösung von 300 µg/ml zu erhalten.

HPLC-Informationen

• Probenvorbereitung – Zerealie

Diese Methode wurde an verschiedenen Getreidesorten, darunter Weizen, Gerste und Mais, sowie an getreidebasierten Produkten getestet.

Hinweis: Ein alternativer Anwendungshinweis ist für Hafer verfügbar.

1. 50 g gemahlene Probe und 5 g Natriumchlorid in einen lösungsmittelresistenten Becher mit einer Kapazität von 1 Liter einwiegen.
2. 250 ml 90 % Methanol zugeben und 2 min bei hoher Geschwindigkeit in einem Mixer mischen.
3. Die Probe filtrieren (z. B. Whatman Nr. 113 oder Nr. 4) oder bei 4.000 U/min 10 min zentrifugieren.
4. 7 ml des Filtrats mit 28 ml Wasser verdünnen.
5. Den verdünnten Extrakt durch ein Glasmikrofaserfilterpapier filtern.
6. 25 ml des verdünnten Filtrats (äquivalent zu 1 g der Probe) auf die Säule aufgeben und mit einer Flussrate von 2 ml pro Minute durch die Säule laufen lassen (oder die Probe durch Schwerkraft durch die Säule laufen lassen, wenn dies bevorzugt wird). Eine langsame, stetige Flussrate ist wichtig, damit das Toxine vom Antikörper gebunden wird.
7. Die Säule mit 20 ml Wasser und einer Flussrate von etwa 5 ml pro Minute waschen. Luft durch die Säule drücken, um Restflüssigkeit zu entfernen.
8. Die Toxine aus der Säule mit einer Flussrate von 1 Tropfen pro Sekunde mittels 1,5 ml 100 % Methanol eluieren und in einem Glasröhrchen auffangen. Weitere Informationen finden Sie im Abschnitt „Elution“.
9. Das Eluat bis zur vollständigen Trockene unter einem Luftstrom bei 50 - 60 °C evaporieren.
10. Mit 50 µl D-MAP und 50 µl 1-AN rekonstituieren und 1 min vortexen.
11. Das Gemisch 15 min bei 50 °C in einem Heizblock reagieren lassen.
12. Das Gemisch 15 min in einem Eisbad abkühlen.
13. Bis zur vollständigen Trockene unter einem Luftstrom bei 50 - 60 °C evaporieren.
14. In 1 ml 70 % Acetonitril rekonstituieren und 20 sek vortexen.
15. 100 µl in das HPLC-System injizieren.

HPLC-Informationen

Vorbereitung von Standards

- **T-2 und HT-2 Stammlösung**

Es wird geraten, mit 100.000 ng/ml T-2 und HT-2 Stammlösungen zu beginnen.

Kombinierter Arbeitsstandard

1. 0,5 ml von der 100.000 ng/ml T-2-Lösung nehmen und 0,5 ml der 100.000 ng/ml HT-2-Lösung zugeben (äquivalent zu 50.000 ng/ml T-2- und 50.000 ng/ml HT-2-Lösung oder 100.000 ng/ml Gesamtlösung).
2. 100 µl von der 100.000 ng/ml Gesamtlösung nehmen und bis auf 1 ml mit 100 % Acetonitril auffüllen (äquivalent zu 10.000 ng/ml Gesamtlösung).

Kalibrierkurve

Es wird empfohlen, mindestens eine 3 bis 6-Punkt-Kalibrierkurve zu erstellen. Bei der Erstellung einer geeigneten Kurve sollten die Werte der Kalibrierstandards den Bereich oder Abschnitte der erwarteten Ergebnisse umfassen. Die verdünnten Standardlösungen sollten frisch am Tag des Einsatzes vorbereitet und innerhalb eines Zeitraums von 24 Stunden verwendet werden.

Vorbereitung einer 5-Punkt-Kalibrierkurve:

1. Standard 5: 200 µl von der 10.000 ng/ml Gesamtlösung nehmen.
 - Bis zur vollständigen Trockene unter einem Luftstrom bei 50 - 60 °C evaporieren.
 - Mit 50 µl D-MAP (325 µg/ml) und 50 µl 1-AN (300 µg/ml) rekonstituieren und 1 min vortexen.
 - Das Gemisch 15 min bei 50 °C in einem Heizblock reagieren lassen.
 - Das Gemisch 15 min in einem Eisbad abkühlen.
 - Bis zur vollständigen Trockene unter einem Luftstrom bei 50 - 60 °C evaporieren.
 - In 2 ml 70 % Acetonitril rekonstituieren. 20 sek vortexen (äquivalent zu 1.000 ng/ml Gesamtlösung).
2. Standard 4: 1 ml von der 1.000 ng/ml Gesamtlösung nehmen und 1 ml 70 % Acetonitril (äquivalent zu 5.000 ng/ml der Gesamtlösung) zugeben.
3. Standard 3: 1 ml von der 500 ng/ml Gesamtlösung nehmen und 1 ml 70 % Acetonitril (äquivalent zu 250 ng/ml der Gesamtlösung) zugeben.
4. Standard 2: 1 ml von der 250 ng/ml Gesamtlösung nehmen und 1 ml 70 % Acetonitril (äquivalent zu 125 ng/ml der Gesamtlösung) zugeben.
5. Standard 1: 1 ml von der 125 ng/ml Gesamtlösung nehmen und 1 ml 70 % Acetonitril (äquivalent zu 62.5 ng/ml der Gesamtlösung) zugeben.
6. 100 µl jedes Standards in das HPLC-System injizieren.

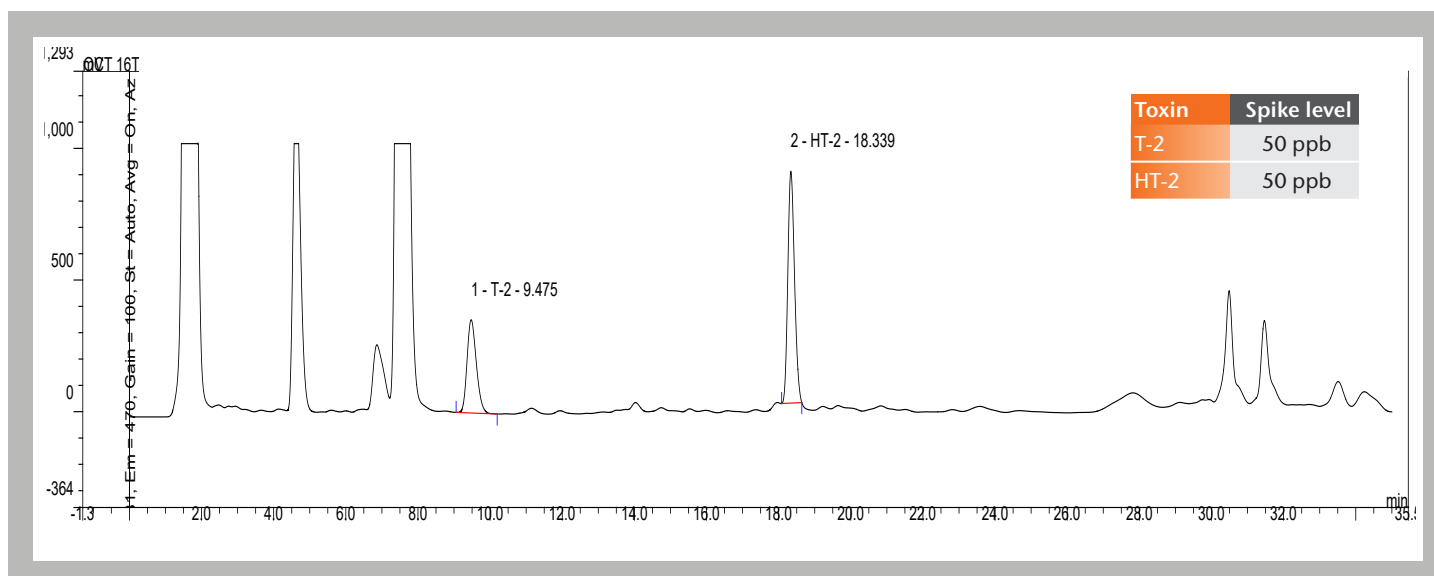
HPLC-Informationen

- Empfohlene HPLC-Bedingungen

HPLC-Bedingungen			
Vorsäule	D-MAP und 1-AN		
Guard Cartridge	Supelco-Vorfilter (0,5 µm)		
Analytische Säule	Luna Phenyl-Hexyl 5 µm, 4,6 mm x 150 mm Partikel		
Mobile Phase	Lösung A: Acetonitril Lösung B: Wasser Frisch am Tag vorbereiten.		
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	Für mobile Phase		
Flussrate	1,0 ml pro Minute		
Fluoreszenzdetektor	Erregung: 381 nm		
	Emission: 470 nm		
Säulenheizung	Hält die Vor- und die Analytische Säule bei 40 °C		
Integrator/ Datenkontrollsystem	Von bevorzugtem Anbieter		
Injektor	Autosampler / Rheodyne-Ventil		
Injektionsvolumen	100 µl		

Beispiel-HPLC-Chromatogramm für Zerealie

- Mais



LC-MS/MS-Informationen

• Probenvorbereitung – Zerealie

Diese Methode wurde bei einer Reihe von Zerealien getestet, darunter Weizen, Gerste, Mais und zerealienbasierte Produkte.

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 diese 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 (oder Sie können die Probe kann mittels Schwerkraft durch die Säule laufen lassen, falls bevorzugt). Eine langsame, gleichmäßige Flussrate ist für die Erfassung 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 hindurch laufen lassen. Blasen Sie Luft durch die Säule, um restliche Flüssigkeit zu entfernen.
8. Eluieren Sie die Toxine aus der Säule mit einer Flussrate von 1 Tropfen pro Sekunde mithilfe von 1,5 ml einer 100%igen Methanol-Lösung und sammeln Sie dies in einem Glasröhrchen. Weitere Informationen finden Sie im Abschnitt „Elution“.
9. Lassen Sie nach der Elution 1,5 ml Wasser durch die Säule laufen und sammeln sie dies im selben Gefäß, sodass es ein Gesamtvolumen von 3 ml ergibt
10. Injizieren Sie 25 µL in das LC-MS/MS System.

LC-MS/MS-Informationen

Vorbereitung von Standards

- **T-2 und HT-2 Stammlösung**

Es wird geraten, mit 100.000 ng/ml T-2 und HT-2 Stammlösungen zu beginnen.

Kombinierter Arbeitsstandard

1. Nehmen Sie 0,5 ml der 100.000 ng/ml T-2 Lösung und fügen Sie 0,5 ml der 100.000 ng/ml HT-2 Lösung hinzu (entspricht 50.000 ng/ml T-2 und 50.000 ng/ml HT-2 Lösung oder 100.000 ng/ml Gesamtlösung).
2. Nehmen Sie 100 µl der 100.000 ng/ml Gesamtlösung und setzen Sie sie mit 100%iger Acetonitril-Lösung an (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):

1. Standard 5: Nehmen Sie 2 mL einer 50%igen Methanol-Lösung und entfernen Sie 200 µL. Fügen Sie 200 µL der 10.000 ng/mL Gesamtlösung hinzu (entspricht 1.000 ng/mL Gesamtlösung)
2. Standard 4: Nehmen Sie 1 ml der 1.000 ng/ml Gesamtlösung und fügen Sie 1 ml der 50%igen Methanol-Lösung hinzu (entspricht 500 ng/ml Gesamtlösung).
3. Standard 3: Nehmen Sie 1 ml der 500 ng/ml Gesamtlösung und fügen Sie 1 ml der 50%igen Methanol-Lösung hinzu (entspricht 250 ng/ml Gesamtlösung).
4. Standard 2: Nehmen Sie 1 ml der 250 ng/ml Gesamtlösung und fügen Sie 1 ml der 50%igen Methanol-Lösung hinzu (entspricht 125 ng/ml Gesamtlösung).
5. Standard 1: Nehmen Sie 1 ml der 125 ng/ml Gesamtlösung und fügen Sie 1 ml der 50%igen Methanol-Lösung hinzu (entspricht 62,5 ng/ml Gesamtlösung).
6. Injizieren Sie 25 µL jedes Standards in das LC-MS/MS System

LC-MS/MS-Informationen

• Empfohlene LC-MS/MS-Bedingungen

LC-Bedingungen

Analytische Trennsäule	ACE® ULTRA CORE 2.5 SUPER C18,50 x 2,1 mm		
Mobile Phase A	1 mM Ammoniumformat + 0.1 % Ameisensäure in 95 : 5 Wasser : Methanol		
Mobile Phase B	1 mM Ammoniumformat + 0.1 % Ameisensäure in 2 : 98 Wasser : Methanol		
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	Analytische Trennsäule bei 40 °C halten		
Integrator/ Datenkontrollsystem	Vom bevorzugten Lieferanten		
Injektor	Autosampler/Rheodyn-Ventil		
Injektionsvolumen	25 µL		

Massenspektrometriebedingungen

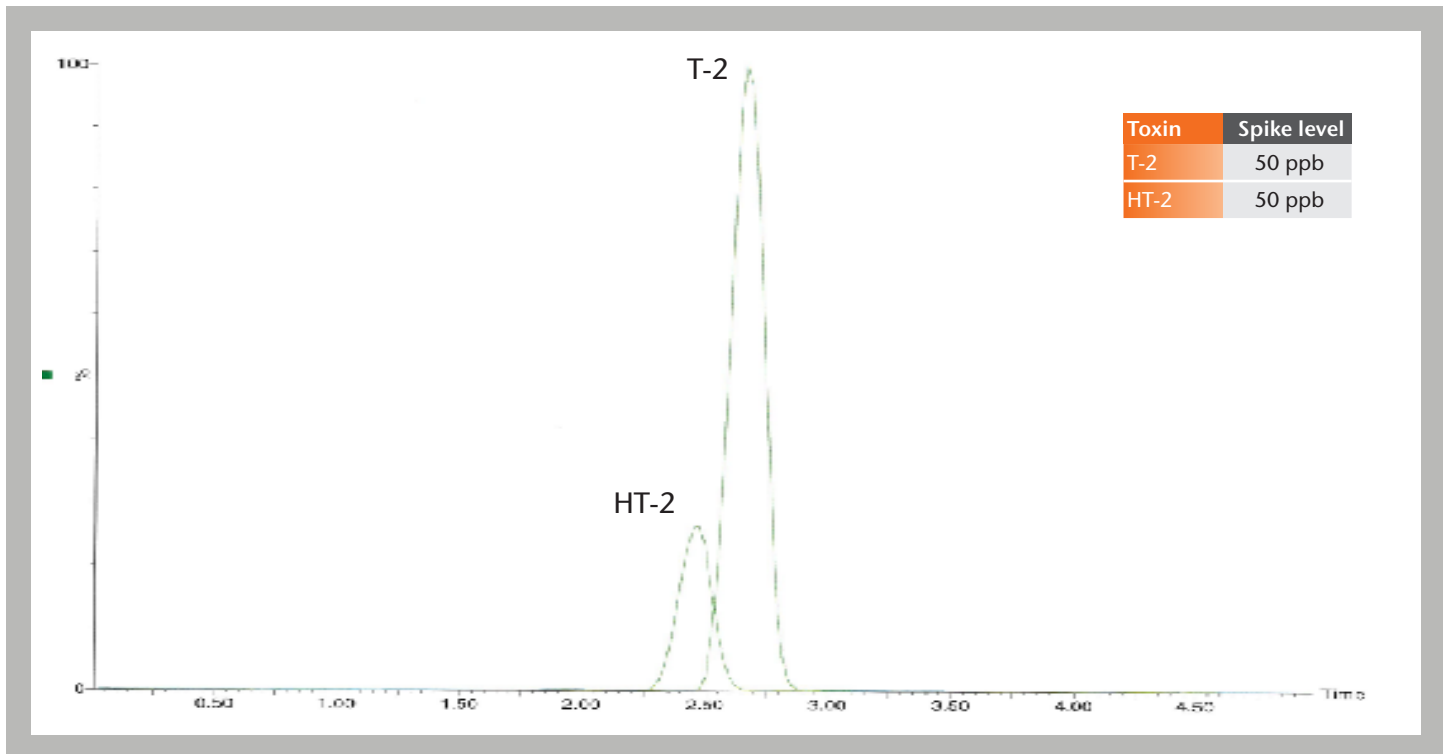
Gerät	SCIEX QTRAP® 4500
Modus	Multiple Reaction Monitoring (MRM)
IonSpray	3500 Volt
IonSource Gas 1	50 psi
IonSource Gas 2	55 psi
Courtagen-Gas	50 psi

GeräteEinstellung

Toxin	RT (min)	Vorläufer-Ion (m/z)	Produktionen (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-Chromatogramm für Zerealie

- Mais



Qualität

RBR-Produkte werden unter einem ISO 9001- registrierten Qualitätsmanagementsystem entwickelt, hergestellt, getestet und ausgeliefert, wodurch ein konsistentes Produkt gewährleistet wird, das stets unsere Leistungsspezifikationen erfüllt. Unsere Produkte wurden in vielen kollaborativen Studien eingesetzt, um europäische und internationale Standardmethoden zu entwickeln, und werden von vielen Schlüsselinstitutionen, Lebensmittelunternehmen und staatlichen Laboren verwendet. Kundenreferenzen für RBR-Produkte sind auf Anfrage erhältlich.

Technische Unterstützung

RBR versteht, dass Benutzer unserer Produkte von Zeit zu Zeit Hilfe oder Beratung benötigen. Wir freuen uns daher, unseren Kunden die folgenden Serviceleistungen anbieten zu können:

- Analyse problematischer Proben.
- Anwendungshinweise für schwierige Proben.
- Referenzen aus der RBR-Bibliothek.
- Installation und Unterstützung der KOBRA® CELL.
- Beratung zu Detektionsparametern.
- Beratung zur Vorbereitung und Handhabung von Standards.
- Aktuelle Informationen zur Gesetzgebung, Probenentnahme und andere Neuigkeiten per E-Mail.
- Bereitstellung gespikter Proben.

Bitte wenden Sie sich an R-Biopharm AG, wenn Sie weitere Informationen erhalten möchten.

Garantie

R-Biopharm Rhône Ltd gibt keine Garantie gleich welcher Art, weder ausdrücklich noch stillschweigend, mit Ausnahme der, dass alle von R-Biopharm Rhône Ltd hergestellten Produkte mit Materialien von geeigneter Qualität hergestellt sind. Sollten Materialien fehlerhaft sein, stellt R-Biopharm Rhône Ltd ein Ersatzprodukt bereit. Der Benutzer übernimmt sämtliche Risiken und Haftung, die sich aus der Verwendung von R-Biopharm Rhône Ltd-Produkten und Verfahren ergeben. R-Biopharm Rhône Ltd haftet für keinerlei Schäden, einschließlich spezieller oder Folgeschäden, Verlust oder Kosten, die direkt oder indirekt aus der Verwendung von R-Biopharm Rhône Ltd-Produkten oder Verfahren entstehen.

R-Biopharm Rhône Ltd
Block 10 Todd Campus
West of Scotland Science Park
Acre Road, Glasgow G20 0XA
www.r-biopharm.com