

# EASI-EXTRACT<sup>®</sup> T-2 & HT-2

Cod. Prodotto: P43 / P43B

Colonne ad immunoaffinità da utilizzare in associazione all'HPLC oppure LC-MS/MS.  
Solo per uso in vitro.

P43/V15/17.01.20

[www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com)



**R-BIOPHARM**  
**RHÔNE LTD**



## Contenuto

	Pag
Principio del Test.....	4
Reagenti Non Forniti .....	4
Prodotti Accessori.....	4
Rischi .....	4
Metodi raccomandati e note applicative.....	5
Decontaminazione.....	5
Conservazione e Durata .....	5
Campionamento .....	5
Sensibilità.....	5
Recupero .....	5
Preparazione della Colonna .....	6
Eluizione .....	6
Note Applicative Disponibili .....	6
Preparazione del Reagente D-MAP (325 µg/ml).....	7
Preparazione del Reagente 1-AN (300 µg/ml).....	7
Preparazione del Campione .....	8
• Cereali .....	8
Preparazione degli Standard.....	9
• Preparazione dello Standard Combinato T-2 e HT-2.....	9
Curva di Calibrazione.....	9
Raccomandazioni per l'HPLC.....	10
Tracciato Tipico dell' HPLC per l'Analisi dell' Aflatossina Mediante l'Uso delle Colonne ad Immunoaffinità EASI-EXTRACT® T-2 & HT-2 .....	10
• Cereali .....	10
Qualità .....	11
Supporto Tecnico.....	11
Garanzia.....	11

## Principio del Test

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

Le colonne contengono una sospensione in gel di anticorpi monoclonali specifici per la tossina di interesse. La tossina presente nel campione è estratta secondo le procedure di estrazione raccomandate. L'estratto viene poi filtrato, diluito e fatto passare lentamente attraverso la colonna ad immunoaffinità. La tossina presente nel campione è trattenuta dall'anticorpo nella sospensione in gel. La colonna viene lavata per rimuovere il materiale non legato e successivamente le tossine sono rilasciate dalla colonna mediante una eluizione con solvente. L'eluato viene raccolto prima dell'analisi mediante HPLC o LC-MS/MS. Le tossine T-2 e HT-2, se analizzate mediante HPLC, devono prima essere derivatizzate.

Il tempo totale necessario per l'estrazione e la purificazione è di circa 20 minuti. Lo scopo è quello di migliorare la purificazione e la concentrazione della tossina da alimenti e mangimi per ottenere un cromatogramma più preciso e quindi una determinazione più accurata e sensibile. Le colonne hanno l'ulteriore vantaggio di poter essere utilizzate per l'analisi di una vasta gamma di campioni.

## Reagenti Non Forniti

- Acqua distillata / deionizzata (adatta per HPLC, es. MilliQ)
- Solventi (metanolo e acetonitrile per HPLC)
- Tampone fosfato PBS (RP202)\*
- Standard di T-2 e HT-2 (si prega di far riferimento al paragrafo corrispondente)
- Cloruro di sodio
- Idrossido di sodio
- Ascorbato di sodio (a pH filtrato se richiesto)
- 4-dimetilamminopiridina (DMAP)
- 1-antrolnitrile (1-an)
- Toluene per i residui delle analisi

## Prodotti Accessori

- Carta da filtro Whatman No. 113 oppure No 4
- Carta da filtro in microfibra di vetro (P68)\*
- Supporto per colonne ad immunoaffinità (CR1)\*
- Pacchetto di accessori per colonne ad immunoaffinità (AP01)\*

\* Disponibili presso R-Biopharm. Per ulteriori informazioni, si prega di contattare il vostro distributore locale.

## Rischi

Le micotossine sono sostanze molto pericolose. Solo laboratori attrezzati possono eseguire questo tipo di analisi, durante le quali è necessario indossare indumenti protettivi come camici, guanti e occhiali protettivi.

Conservare i solventi infiammabili in un armadietto antiesplorazione. Se possibile, operare sotto cappa chimica ed utilizzare attrezzature protettive.

Per ulteriori informazioni, è possibile contattare il distributore locale R-Biopharm e richiedere la scheda di sicurezza.

## **Metodi raccomandati e note applicative**

I metodi sono disponibili per tutte le matrici a norma di legge, oltre che per altri prodotti. Per ulteriori informazioni contattare il distributore R-Biopharm.

## **Decontaminazione**

Le soluzioni standard in eccesso devono essere trattate, prima dello smaltimento, con almeno un decimo del loro volume di ipoclorito di sodio al 5 %. Immergere la strumentazione e il materiale residuo contaminato in una soluzione di ipoclorito di sodio al 5 % per 30 minuti, poi aggiungere il 5 % di acetone e lasciare in ammollo per altri 30 minuti. Sciacquare abbondantemente con acqua prima dello smaltimento. Dopo la decontaminazione lavare scrupolosamente tutta l'attrezzatura di laboratorio utilizzata. Incenerire ove consentito dai regolamenti.

## **Conservazione e Durata**

Le colonne hanno una durata di 18 mesi dalla data di produzione se conservate a 2 - 8 °C oppure 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. Si tenga presente che gli anticorpi contenuti nelle colonne possono essere denaturati da forti variazioni di temperatura o pH.

## **Campionamento**

E' necessario ottenere un campione sufficientemente 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 (10 - 50 g in base al metodo utilizzato).

## **Sensibilità**

La sensibilità dipende dal sistema di rilevazione finale utilizzato dall'analista. Tuttavia, se richiesto, la sensibilità del test può essere migliorata aumentando il volume del campione che viene fatto passare attraverso la colonna ad immunoaffinità. La proporzione tra estratto e tampone (PBS) deve essere mantenuta.

## **Recupero**

Se un analista desidera tenere in considerazione le perdite che possono avvenire durante l'estrazione, si raccomanda di analizzare un campione arricchito dello stesso tipo di matrice testata seguendo la procedura completa come per uno standard di riferimento. I valori di recupero ottenuti con il campione arricchito possono essere successivamente utilizzati per correggere i risultati ottenuti dall'analisi del campione.

## Preparazione della Colonna

Le colonne ad immunoaffinità devono trovarsi a temperatura ambiente prima dell'uso.

E' normale che ci sia dello spazio tra il gel ed il setto poroso. Talvolta, durante il trasporto, si può formare una bolla in questo spazio. In questi casi, per rimuovere la bolla, basta semplicemente picchiare la base della colonna su una superficie rigida.

Rimuovere il cappuccio dalla parte superiore della colonna ed eliminarlo. Fissare saldamente la colonna ad un serbatoio in vetro da siringa mediante adattatore, quindi inserirla nel supporto per colonne o nel supporto a morsetto.

## 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 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: -

Backflush (metodo preferito da R-Biopharm): backflush 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 completamente passare attraverso la sospensione 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 completamente passare attraverso la sospensione per la raccolta. Procedere alla fase successiva del metodo.

## Note Applicative Disponibili

Sono disponibili procedure di analisi per tutte le matrici richieste a livello legislativo nonché per ulteriori campioni aggiuntivi. Per maggiori informazioni potete contattare il distributore locale R-Biopharm.



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

La soluzione si conserva per 6 mesi se mantenuta a -20 °C. La soluzione stock diluita deve essere preparata fresca nel giorno dell'analisi ed utilizzata entro 24 ore.

1. Pesare 20 mg di D-MAP in un flacone di vetro.
2. Aggiungere 20 ml di toluene (equivalente a 1 mg/ml).
3. Misurare 1 ml di toluene in una provetta in vetro.
4. Rimuovere ed eliminare 325 µl.
5. Aggiungere 325 µl della soluzione stock di D-MAP da 1 mg/ml per avere una soluzione di lavoro finale da 325 µg/ml.

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

La soluzione si conserva per 6 mesi se mantenuta a -20 °C. La soluzione stock diluita deve essere preparata fresca nel giorno dell'analisi ed utilizzata entro 24 ore.

1. Pesare 20 mg di 1-AN in un flacone di vetro.
2. Aggiungere 20 ml di toluene (equivalente a 1 mg/ml).
3. Misurare 1 ml di toluene in una provetta in vetro.
4. Rimuovere ed eliminare 300 µl.
5. Aggiungere 300 µl della soluzione stock di 1-AN da 1 mg/ml per avere una soluzione di lavoro finale da 300 µg/ml.

## Preparazione del Campione

### • Cereali

Questa procedura è stata testata su un certo numero di cereali tra cui grano, orzo, mais e prodotti a base di cereali.

1. Pesare 50 g di campione tritato e 5 g di cloruro di sodio in un contenitore per miscelatore resistente ai solventi dalla capacità di 1 litro.
2. Aggiungere 250 ml di metanolo al 90 % e mescolare ad alta velocità per 2 minuti.
3. Filtrare il campione utilizzando carta da filtro Whatman N. 113 oppure N. 4. In alternativa centrifugare a 4000 rpm per 10 minuti.
4. Diluire 7 ml di filtrato con 28 ml di acqua.
5. Filtrare l'estratto diluito attraverso la carta da filtro in fibra di vetro.
6. Far passare 25 ml del filtrato diluito (equivalente a 1 g di campione) attraverso la colonna con un flusso di 2 ml al minuto (in alternativa è possibile far passare la soluzione attraverso la colonna per gravità). Per la "cattura" della tossina da parte dell'anticorpo è essenziale applicare una pressione lenta e costante.
7. Lavare la colonna facendo passare 20 ml di acqua con un flusso di circa 5 ml al minuto. Far passare aria attraverso la colonna per rimuovere ogni residuo di liquido rimasto.
8. Eluire la tossina dalla colonna con un flusso di 1 goccia al secondo utilizzando 1.5 ml di metanolo al 100 % e raccoglierlo in una provetta di vetro ambrata. Per ulteriori informazioni consultare la sezione Eluizione.
9. Lasciare evaporare l'eluato a secco sotto aria a 50 - 60 °C.
10. Ricostituire con 50 µl di D-MAP e 50 µl di 1-AN. Mescolare tramite vortex per 1 minuto.
11. Lasciare reagire la miscela a 50 °C in un blocco riscaldante per 15 minuti.
12. Raffreddare la miscela in un bagno di ghiaccio per 15 minuti.
13. Lasciare evaporare a secco sotto aria a 50 - 60 °C.
14. Ricostituire in 1 ml di acetonitrile al 70 %. Mescolare tramite vortex per 20 secondi.
15. Iniettare 100 µl nel sistema HPLC.



## Preparazione dello Standard

Preparazione della soluzione di stock da 100,000 ng/ml di tossina T-2 e HT-2:

1. E' possibile acquistare tossina T-2 e HT-2 cristallina in polvere. Per maggiori informazioni potete contattare il distributore locale R-Biopharm. La polvere deve essere ricostituita seguendo le istruzioni fornite e lasciata per tutta la notte a temperatura ambiente e al buio per ottenere una soluzione stock.
2. Utilizzarla per preparare una soluzione stock da 100,000 ng/ml di tossina T-2 o HT-2.

### • Preparazione dello Standard Combinato T2 e HT-2

1. Prelevare 0.5 ml della soluzione da 100.000 ng/ml di T-2 ed aggiungere 0.5 ml della soluzione da 100.000 ng/ml di HT-2 (equivalente a 50.000 ng/ml di T-2 e 50.000 ng/ml di HT-2, oppure 100.000 ng/ml di soluzione totale).
2. Prelevare 100 µl della soluzione totale da 100.000 ng/ml e portare ad 1 ml con acetonitrile al 100 % (equivalente a 10.000 ng/ml di soluzione totale).

## Curva di calibrazione

Si raccomanda di costruire una curva di calibrazione di almeno 3 - 6 punti. In una curva ideale i livelli degli standard di calibrazione devono raggruppare o includere la gamma dei risultati attesi. La soluzione standard diluita deve essere preparata fresca nel giorno dell'analisi e deve essere utilizzata entro 24 ore.

Per la realizzazione di una curva di calibrazione a cinque punti:

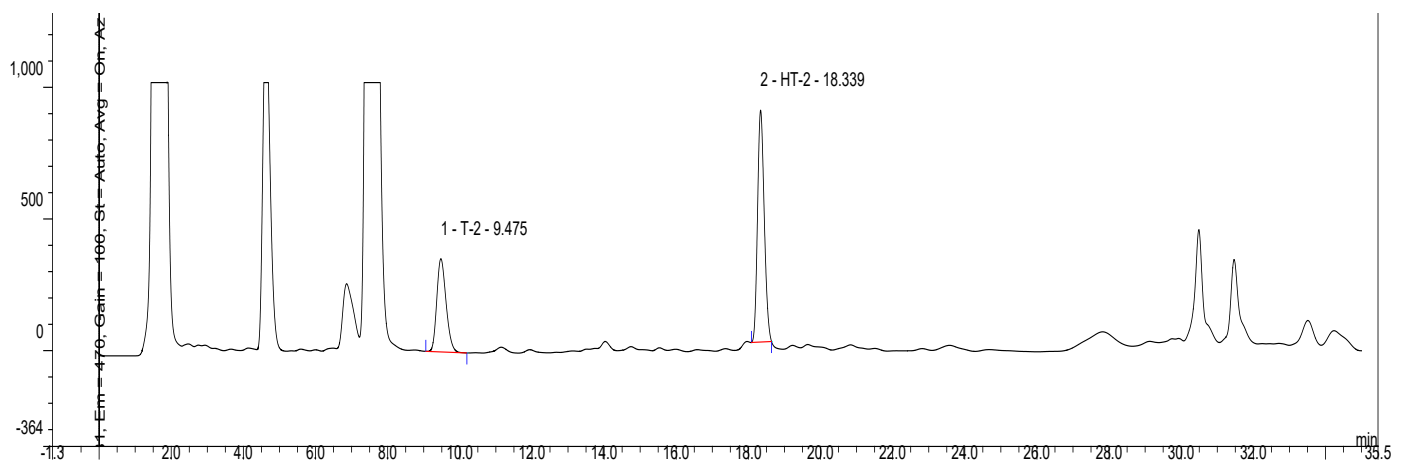
1. Standard 5: Prelevare 200 µl della soluzione totale da 100,000 ng/ml.
  - Evaporare a secco sotto aria a 50 - 60 °C.
  - Ricostituire con 50 µl di D-MAP (325 µg/ml) e 50 µl di 1-AN (300 µg/ml). Mescolare tramite vortex per 1 minuto.
  - Lasciare reagire la miscela a 50 °C in un blocco riscaldante per 15 minuti.
  - Raffreddare la miscela in un bagno di ghiaccio per 15 minuti.
  - Lasciare evaporare a secco sotto aria a 50 - 60 °C.
  - Ricostituire in 2 ml di acetonitrile al 70 %. Mescolare tramite vortex per 20 secondi (equivalente a 1.000 ng/ml di soluzione totale).
2. Standard 4: Prelevare 1 ml della 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 della soluzione totale da 500 ng/ml e aggiungere 1 ml di acetonitrile al 70 % (equivalente a 250 ng/ml di soluzione totale).
4. Standard 2: Prelevare 1 ml della soluzione totale da 250 ng/ml e aggiungere 1 ml di acetonitrile al 70 % (equivalente a 125 ng/ml di soluzione totale).
5. Standard 1: Prelevare 1 ml della soluzione totale da 125 ng/ml e aggiungere 1 ml di acetonitrile al 70 % (equivalente a 62.5 ng/ml di soluzione totale).
6. Iniettare 100 µl di ciascuna soluzione nel sistema HPLC.

## Raccomandazioni per l'HPLC

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		

## Tracciato Tipico dell' HPLC per l'Analisi della Tossina T-2 e HT-2 Utilizzando le Colonne ad Immunoaffinità EASI-EXTRACT® T-2 & HT-2

- Cereali



## Qualità

I prodotti RBR sono sviluppati, prodotti, verificati e spediti in accordo con le normative dei sistemi registrati di gestione della qualità ISO 9001 e ISO 13485 che ne assicurano l'alta e costante qualità e la rispondenza ai requisiti di performance da noi stabiliti. I nostri prodotti sono stati impiegati in molti studi collaborativi per l'elaborazione di metodi standard europei e internazionali e sono largamente utilizzati dai principali enti, industrie alimentari e laboratori governativi. Referenze sui prodotti RBR per i clienti sono disponibili su richiesta.

## Supporto tecnico

Sensibile alle richieste di assistenza e suggerimenti che possono emergere da parte della clientela, RBR offre i seguenti servizi:

- Analisi dei campioni problematici
- Procedure per campioni difficili
- Referenze dalla letteratura della biblioteca RBR
- Installazione e supporto della KOBRA® CELL
- Consulenza per i parametri di rilevazione
- Consulenza per la preparazione e la manipolazione degli standard
- Aggiornamenti sulle normative e sulla preparazione dei campioni e altre notizie via e-mail
- Fornitura di campioni arricchiti

Contattare il rivenditore R-Biopharm di zona per ulteriori informazioni.

## Garanzia

R-Biopharm Rhône Ltd non fornisce alcuna garanzia, esplicita o implicita, oltre a quella relativa alla qualità standard dei materiali di cui sono costituiti i suoi prodotti. Nel caso tali materiali risultasse difettosi, R-Biopharm Rhône Ltd si impegna a fornire prodotti sostitutivi. L'utilizzatore si assume qualsiasi rischio e responsabilità derivante dall'impiego dei prodotti e delle procedure R-Biopharm Rhône Ltd. R-Biopharm Rhône Ltd non è da ritenersi responsabile per danni, ivi compresi danni speciali o indiretti, o spese derivanti direttamente o indirettamente dall'utilizzo dei prodotti o delle procedure R-Biopharm Rhône Ltd.

Prodotto da:  
**R-Biopharm Rhône Ltd**  
Scozia

Distribuito da:  
**R-Biopharm Italia Srl**  
Via Morandi, 10  
20077 Melegnano MI  
Tel: 02 9823 3330  
Fax: 02 9834 100  
info@r-biopharm.it