

## **EASI-EXTRACT® T-2/HT-2**

### **Арт. No. P43/P43B**

Иммуноаффинные колонки для использования вместе  
с ВЭЖХ или ЖХ-МС/МС

Только для использования *in vitro*

P43V18/27.05.22



**R-BIOPHARM**  
**RHÔNE LTD**

Пожалуйста, обращайтесь по вопросам технической поддержки и дополнительной информации к официальным дистрибьюторам на территории Вашей страны:

**Официальный дистрибьютор  
в России:**

**ООО "НеоТест"**

ул. Растопчина, 1Г, г. Владимир

+7 499 649 02 01

info@neo-test.ru

[www.neo-test.ru](http://www.neo-test.ru)

***Техническая поддержка***

support@neo-test.ru

+7 499 704 05 50



**Официальный дистрибьютор  
в Беларуси:**

**ОДО "КомПродСервис"**

ул. Филимонова, 25Г, г. Минск

+375 17 336 50 54

info@komprod.com

[www.komprod.com](http://www.komprod.com)

***Техническая поддержка***

support@komprod.com

+375 17 336 50 54



# EASI-EXTRACT® T-2/HT-2

## Принцип работы

Принцип работы основан на использовании моноклональных антител, которые обеспечивают высокую специфичность, чувствительность, скорость и простоту выполнения процедуры.

Колонка содержит гель, насыщенный моноклональными антителами специфичными в отношении искомого токсина. Токсин экстрагируется из образца, фильтруется, разводится и медленно пропускается через иммуноаффинную колонку. Токсин, присутствующий в образце, задерживается антителами и остается внутри геля. Колонка промывается для удаления не связавшихся компонентов, затем токсин элюируется из колонки растворителем. Элюат собирается, растворитель выпаривается, образец восстанавливается. Далее образец анализируют ВЭЖХ или ЖХ-МС/МС.

Процедура экстракции и очистки занимает примерно 20 минут. Результат – высокая чистота и концентрация токсинов, экстрагированных из пищи и кормов, что дает более четкую хроматограмму и, следовательно, обеспечивает более точную и чувствительную детекцию токсина в продукте. При большом количестве образцов работу с колонками можно автоматизировать.

## Необходимые, но не предоставленные реагенты

- дистиллированная/деионизированная вода (вода пригодная для использования в ВЭЖХ, например MilliQ);
- растворители (метанол или ацетонитрил, чистота – HPLC grade);
- стандарты T2 и TH2 (см. раздел подготовка стандартов);
- раствор фосфатно-солевого буфера (ФСБ) (RP202\*);
- хлорид натрия;
- гидроксид натрия;
- 4-диметиламинопиридин (DMAP);
- 1-антроилнитрил (1-AN);
- толуол.

## Вспомогательные материалы

- Whatman № 113 или фильтровальная бумага № 4;
- фильтровальная бумага из стекловолокна;
- стойка для иммуноаффинных колонок (CR1\*);
- набор аксессуаров для иммуноаффинных колонок (AP01\*);

\*продукты доступные в R-Biopharm. Пожалуйста, для получения дополнительной информации и приобретения свяжитесь с местным дистрибьютером.

## **Меры предосторожности**

Микотоксины являются очень опасными веществами. Только лаборатории, оснащенные для работы с токсическими веществами и растворителями, должны проводить анализ на микотоксины. Соответствующая защитная одежда, включающая перчатки, защитные очки и лабораторные накидки должна использоваться в ходе проведения анализа. Работы должны выполняться в вытяжном шкафу с использованием защитного экрана. Огнеопасные растворители должны храниться в специальной комнате, при соблюдении правил хранения огне- и взрывоопасных веществ.

Для получения дополнительной информации и Листов безопасности (MSDS) свяжитесь с местным дистрибьютером R-Biopharm.

## **Деконтаминация**

Перед утилизацией, оставшиеся после анализа стандартные растворы, должны быть обработаны 5% гипохлоритом натрия, минимальное соотношение стандартного раствора и 5% гипохлорита натрия 10:1. Лабораторное оборудование и загрязненные отходы должны быть погружены в 5% раствор гипохлорита натрия на 30 мин и затем в 5% ацетон на 30 мин, далее загрязненные предметы необходимо обильно сполоснуть водой. После деконтаминации лабораторное оборудование необходимо тщательно вымыть. Отходы, при наличии соответствующего разрешения, сожгите.

## **Условия и сроки хранения**

Колонки могут использоваться на протяжении 18 месяцев с даты их производства, если хранятся при 2-8°C или 12 месяцев с даты их производства, если хранятся при 21-25°C. Колонки нельзя замораживать. Убедитесь, что колонка в процессе хранения не высохла и содержит буфер над гелем. Важно заметить, что антитела, входящие в состав колонки могут быть денатурированы, если колонка подвергалась воздействию экстремальных температур или pH.

## **Образцы**

Представленные образцы должны быть получены в ходе официально установленной процедуры. Рекомендуются, как минимум 1 кг представленного образца измельчить и отобрать порцию (10-50 г в зависимости от используемого метода) для экстракции.

## **Чувствительность**

Чувствительность метода зависит от чувствительности оборудования, на котором выполняется анализ. Тем не менее, чувствительность теста может быть улучшена, если увеличить объем образца пропускаемого через

иммуноаффинную колонку. Пожалуйста, обратите внимание, что необходимо поддерживать соотношение растворителя и ФСБ.

### Степень извлечения материала

Если необходимо учесть потери при проведении экстракции токсинов из определенного образца, рекомендуется в качестве референс стандарта использовать, контаминированный спайк-раствором, заведомо чистый аналогичный образец. Степень извлечения, обнаруженная в ходе анализа контаминированного референс образца, может быть использована при корректировке результатов анализа неизвестных образцов.

### Подготовка колонки

Перед использованием температуру иммуноаффинной колонки необходимо довести до температуры окружающей среды. Удалите крышку с верхней части колонки. Надежно прикрепите колонку к цилиндру стеклянного шприца, используя адаптер и поместите в подставку или стойку для иммуноаффинных колонок.

### Элюция

Для полной элюции токсина/токсинов из иммуноаффинной колонки важно, чтобы растворитель находился в контакте с антителом в гелевой суспензии в течение достаточного времени. Это гарантирует разрыв всех связей между антителом и токсином высвобождение всего токсина из колонки для анализа с выбранной системой обнаружения.

Чтобы убедиться, что растворитель находится в контакте с гелем антител в течение достаточного времени, можно использовать любой из следующих методов элюирования:

**Обратная промывка (этот метод рекомендует R-Biopharm):** обратная промывка путем осторожного подъема и опускания поршня шприца во время прохождения растворителя через колонку. Этот процесс изменит направление потока элюата через гель. Это следует повторить 3 раза перед сбором элюата. Перейдите к следующему шагу метода.

**Применение малых объемов растворителя:** нанесите объем растворителя, необходимый для элюирования, двумя или тремя меньшими аликвотами. Позвольте каждой аликвоте оставаться в контакте с гелевой суспензией в течение как минимум 30 секунд, прежде чем



дать каждой аликвоте полностью пройти через гелевую суспензию для сбора. Перейдите к следующему шагу метода.

**Инкубация с растворителем:** нанесите полный объем растворителя, необходимый для элюирования, и дайте 2-3 каплям растворителя пройти через колонку для сбора. Позвольте остатку растворителя оставаться в контакте с гелевой суспензией в течение как минимум 60 секунд, прежде чем позволить ему пройти через гелевую суспензию для сбора. Перейдите к следующему шагу метода.

### **Дериватизация перед ВЭЖХ**

#### **• Подготовка D-МАР реагента (325 мкг/мл)**

Реагент можно хранить в течение 6 месяцев при -20°C. Разведение стокового раствора должно быть свежим, в день анализа, хранить разведенный реагент можно не более 24 часов.

1. Взвесьте 20 мг D-МАР в стеклянной емкости.
2. Добавьте 20 мл толуола (концентрация D-МАР 1 мг/мл).
3. Отмерьте 1 мл толуола (чистого) в стеклянную емкость.
4. Удалите 325 мкл раствора.

5. Добавьте 325 мкл раствора D-МАР 1 мг/мл, получите рабочий раствор с концентрацией 325 мкг/мл.

#### **• Подготовка 1-АН реагента (300 мкг/мл)**

Реагент можно хранить в течение 6 месяцев при -20°C. Разведение стокового раствора должно быть свежим, в день анализа, хранить разведенный реагент можно не более 24 часов.

6. Взвесьте 20 мг 1-АН в стеклянной емкости.
7. Добавьте 20 мл толуола (концентрация 1-АН 1 мг/мл).
8. Отмерьте 1 мл толуола (чистого) в стеклянную емкость.
9. Удалите 300 мкл раствора.

10. Добавьте 300 мкл раствора 1-АН 1 мг/мл, получите рабочий раствор с концентрацией 300 мкг/мл.

### **Пробоподготовка**

#### **• зерновые**

Метод был протестирован на пшенице, ячмене, маисе, а также на продуктах, основанных на зерновых культурах.

**Примечание.** Для овса доступна дополнительная инструкция по запросу.

1. Взвесьте 50 г измельченного образца и 5 г хлорида натрия в емкость блендера объемом 1 л, устойчивую к воздействию растворителей.

2. Добавьте 250 мл 90 % метанола и перемешивайте на высокой скорости в течение 2 минут.

3. Отфильтруйте образец через фильтровальную бумагу Whatman №113 или №4 или отцентрифугируйте при 4000 об/мин в течение 10 минут.

4. Разбавьте 7 мл фильтрата 28 мл воды.

5. Отфильтруйте разбавленный экстракт через фильтровальную бумагу из стеклянного микроволокна.

6. Пропустите 25 мл разбавленного фильтрата (эквивалентно 1 г пробы) через колонку со скоростью потока 2 мл в минуту (или, если предпочтительнее, проба может пройти через колонку под действием силы тяжести). Медленная, постоянная скорость потока необходима для захвата токсина антителом.

7. Промойте колонку, пропуская через нее 20 мл воды со скоростью приблизительно 5 мл в минуту. Пропустите воздух через колонку, чтобы удалить остаточную жидкость.

8. Элюируйте токсины из колонки со скоростью потока 1 капля в секунду, используя 1,5 мл 100 % метанола, и соберите в соответствующий сосуд. Пожалуйста, посмотрите раздел «Элюция» для получения дополнительной информации.

#### **ВЭЖХ:**

9. Выпарите элюат досуха на воздухе при температуре 50–60 °С.

10. Восстановите с помощью 50 мкл D-MAP и 50 мкл 1-AN. Перемешивайте на вортексе в течение 1 минуты.

11. Оставьте смесь реагировать при 50 °С в нагревательном блоке на 15 минут.

12. Остудите смесь на бане со льдом в течение 15 минут.

13. Выпарите досуха на воздухе при температуре 50-60°С.

14. Восстановить в 1 мл 70 % ацетонитрила. Перемешивайте на вортексе 20 секунд.

15. Введите 100 мкл в систему ВЭЖХ.

#### **ЖХ-МС/МС:**

9. После элюирования пропустите через колонку 1,5 мл воды и соберите в тот же сосуд, чтобы получить 3 мл общего объема.

10. Введите 25 мкл в систему ЖХ-МС/МС.

### **Подготовка стандартов**

#### **• Стандартный раствор Т-2 и НТ-2**

Рекомендуется начинать с маточного раствора 100 000 нг/мл как для токсинов Т-2, так и для НТ-2.

#### **• Разведение стандартных растворов Т-2 и НТ-2**

1. Возьмите по 0,5 мл каждого стандарта Т-2 и НТ-2 с концентрацией 100 000 нг/мл, чтобы получить общий раствор Т-2 и НТ-2 с концентрацией 100 000 нг/мл (1:1).

2. Возьмите 100 мкл раствора Т-2 и НТ-2 с концентрацией 100 000 нг/мл и доведите до 1 мл 100 % ацетонитрила (эквивалентно общему раствору 10 000 нг/мл).

### **Калибровочная кривая**

Рекомендуется провести как минимум калибровочную кривую по 3–6 точкам. При построении подходящей кривой уровни калибровочных стандартов должны охватывать или включать диапазон ожидаемых результатов. Разведенные стандартные растворы следует приготовить свежими в день проведения анализа и использовать в течение 24 часов.

Пример подготовки калибровочной кривой по пяти точкам (может быть изменена в соответствии с законодательными требованиями или уровнями загрязнения):

#### **ВЭЖХ:**

1. Стандарт 5: Возьмите 200 мкл общего раствора с концентрацией 10 000 нг/мл.

- Выпарить досуха на воздухе при температуре 50 - 60 °С.
- Восстановите с помощью 50 мкл D-MAP (325 мкг/мл) и 50 мкл 1-AN (300 мкг/мл). Перемешайте на вортексе в течение 1 минуты.
- Оставьте смесь реагировать при 50 °С в нагревательном блоке на 15 минут.
- Охладите смесь на бане со льдом в течение 15 минут.
- Выпарите досуха на воздухе при температуре 50 - 60 °С.
- Восстановите в 2 мл 70 % ацетонитрила. Перемешайте на вортексе в течение 20 секунд (эквивалентно общей концентрации раствора 1000 нг/мл).

2. Стандарт 4: Возьмите 1 мл Стандарта 5 и добавьте 1 мл 70 % ацетонитрила (эквивалентно 500 нг/мл).

3. Стандарт 3: Возьмите 1 мл Стандарта 4 и добавьте 1 мл 70 % ацетонитрила (эквивалентно 250 нг/мл).

4. Стандарт 2: Возьмите 1 мл Стандарта 3 и добавьте 1 мл 70 % ацетонитрила (эквивалентно 125 нг/мл).

5. Стандарт 1: Возьмите 1 мл Стандарта 2 и добавьте 1 мл 70 % ацетонитрила (эквивалентно 62,5 нг/мл).

6. Введите по 100 мкл каждого стандарта в систему ВЭЖХ.

#### **ЖХ-МС/МС:**

1. Стандарт 5: Возьмите 2 мл 50 % метанола и удалите 200 мкл в отходы. Добавьте 200 мкл общего раствора 10 000 нг/мл (эквивалентно общему раствору 1 000 нг/мл)

2. Стандарт 4: Возьмите 1 мл Стандарта 5 и добавьте 1 мл 50 % метанола (эквивалентно 500 нг/мл).



3. Стандарт 3: Возьмите 1 мл Стандарта 4 и добавьте 1 мл 50 % метанола (эквивалентно 250 нг/мл).

4. Стандарт 2: Возьмите 1 мл Стандарта 3 и добавьте 1 мл 50 % метанола (эквивалентно 125 нг/мл).

5. Стандарт 1: Возьмите 1 мл Стандарта 2 и добавьте 1 мл 50 % метанола (эквивалентно 62,5 нг/мл).

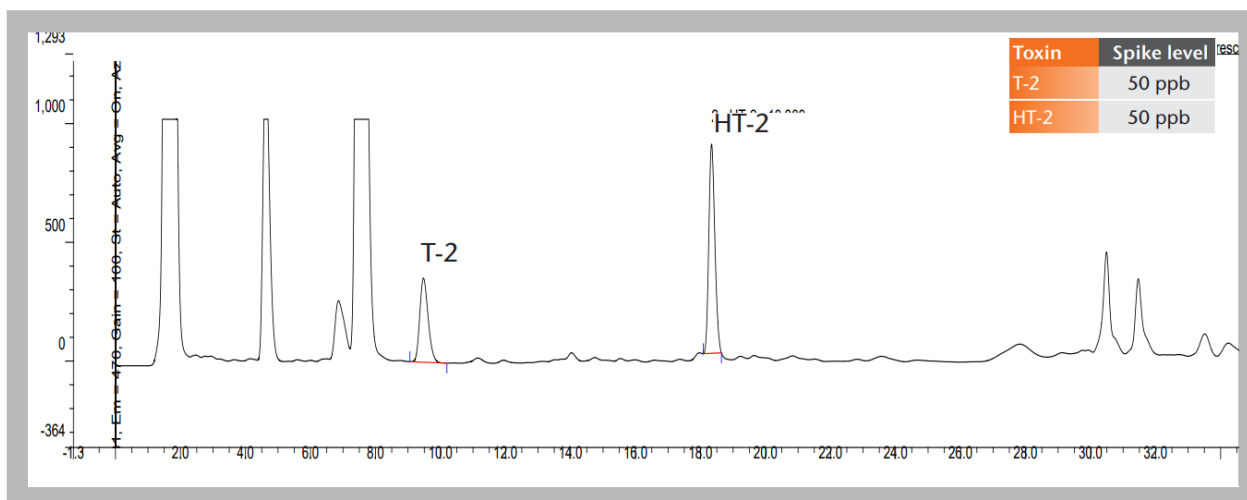
6. Введите по 25 мкл каждого стандарта в систему ЖХ-МС/МС.

### Рекомендуемые условия ВЭЖХ

Условия ВЭЖХ			
Дериватизация	D-МАР и 1-АН		
Защитный картридж (Guard Cartridge)	Supelco guard filter (0,5 мкм)		
Аналитическая колонка	Phenyl-Hexyl Luna Частицы 5 мкм, 4,6 мм x 150 мм		
Подвижная фаза	Раствор А: ацетонитрил Раствор В: вода Готовить в день анализа		
Градиент	Время, мин	% Раствор А	% Раствор В
	0	70	30
	5	70	30
	15	85	15
	25	85	15
	27	100	0
	32	100	0
	35	70	30
Насос HPLC	Для доставки мобильной фазы		
Скорость потока	1 мл/мин		
Флуоресцентный детектор	Возбуждение: 381 нм Испускание: 470 нм		
Нагреватель колонки	Поддерживающий картридж (maintain guard) и аналитическую колонку до 40°C		
Интегратор/Система управления данными	По предпочтению потребителя		
Инжектор	Автосамплер/клапан Rheodyne		
Вводимый объем	100 мкл		

## Пример ВЭЖХ хроматограммы:

- Кукуруза



## Рекомендуемые условия ЖХ-МС/МС

### Условия ЖХ

Аналитическая колонка	ACE® ULTRA CORE 2.5 SUPER C18,50 x 2.1 mm		
Подвижная фаза	<b>Раствор А:</b> 1 мМ формиат аммония и 0,1% муравьиная кислота в воде: метаноле (95: 5) <b>Раствор В:</b> 1 мМ формиат аммония и 0,1% муравьиная кислота в воде: метанол (2:98). Приготовьте свежий в день анализа		
Градиент	Время, мин	% Раствор А	% Раствор В
	0	80	20
	0,1	80	20
	2,5	10	90
	3,75	10	90
	3,85	80	20
5,0	80	20	
Скорость потока	0,3 мл в минуту		
Нагрев колонки	Поддерживайте аналитическую колонку при температуре 40°C		
Интегратор / Система управления данными	От предпочтительного поставщика		
Инжектор	Автосамплер / Реодиновый клапан		
Объем впрыска	25 мкл		

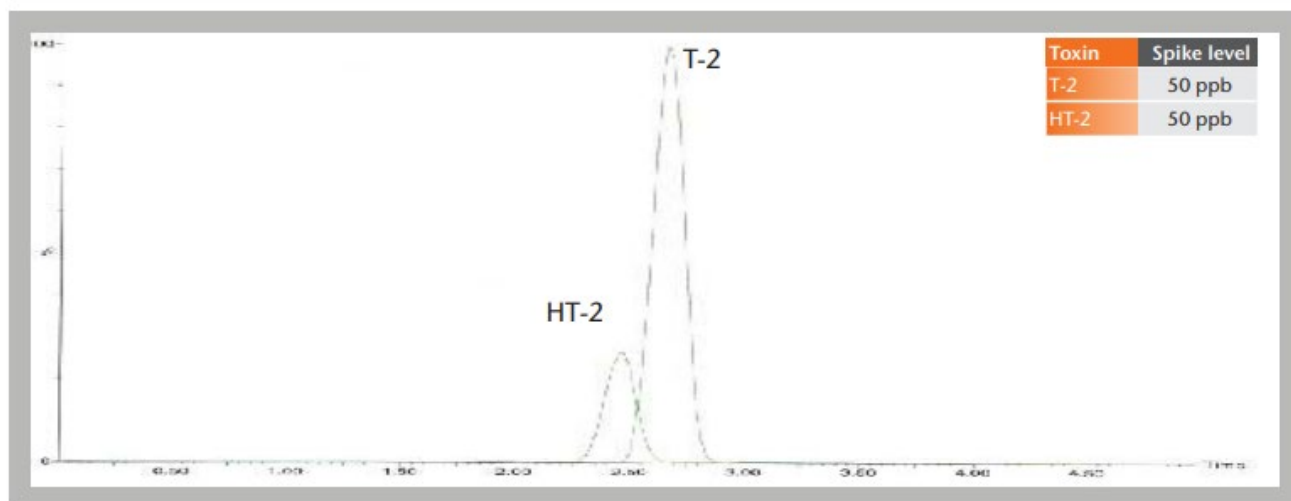
### Условия МС

Инструмент	SCIEX QTRAP® 4500
Режим	Мониторинг множественных реакций (MRM)
Ионный спрей	3500 вольт
Ионный источник газа 1	50 psi
Ионный источник газа 2	55 psi
Столкновительный газ	50 psi

Настройки прибора						
Токсин	RT (мин)	Ион прекурсор (m/z)	Исслед. ион (m/z)	Время пребывания (с)	Напряжение конуса (В)	Напряжение столкновения (эВ)
HT-2	0-5	442.21	263.16 (квантификатор)	0.328	18	12
			215.10 (квалификатор)		18	14
T-2	0-5	484.21	305.14 (квантификатор)	0.328	26	14
			245.12 (квалификатор)		26	14

## Пример хроматограммы ЖХ-МС/МС

- Кукуруза



## Качество

Продукты R-Biopharm разработаны, произведены, протестированы и отправлены в соответствии с системой управления качеством ISO 9001, гарантирующей постоянство качества изделия. Наши изделия использовались во многих исследованиях, лежащих в основе разработки европейских и международных стандартных методов, и широко используются ключевыми институтами, пищевыми компаниями и правительственными лабораториями. Отзывы потребителей изделий R-Biopharm доступны по запросу.

## Техническая поддержка

R-Biopharm понимает, что время от времени, пользователи нашей продукции могут нуждаться в помощи или совете. Следовательно, мы с удовольствием предлагаем следующие сервисы для наших пользователей.

1. Анализ проблем с образцами.
2. Практические рекомендации по работе со сложными образцами.
3. Доступ к библиотеке R-Biopharm.
4. Инсталляция и поддержка KOBRA®CELL.
5. Советы по параметрам детекции.
6. Советы по приготовлению стандартов.
7. Информирование об изменениях в законодательстве, пробоподготовке или других новостях по e-mail.

8. Обеспечение спайкованными образцами.

**Официальный дистрибьютор  
в России:  
ООО "НеоТест"**

***Техническая поддержка***  
support@neo-test.ru  
+7 499 704 05 50

**Официальный дистрибьютор  
в Беларуси:  
ОДО "КомПродСервис"**

***Техническая поддержка***  
support@komprod.com  
+375 17 336 50 54

### **Гарантия**

R-Biopharm не дает никаких гарантий, явных или подразумеваемых, за исключением того, что все изделия произведены R-Biopharm. Материалы, из которых произведена продукция, соответствующего качества. Дефектные продукты будут заменены. Потребитель берет на себя все риски и ответственность за использование изделий и процедур предлагаемых R-Biopharm. R-Biopharm не несет ответственности за любой ущерб, включая специальный или косвенный ущерб, или расходы, возникающие непосредственно или косвенно от использования продукта и процедур R-Biopharm.