

Esercitazione di laboratorio del \_\_\_\_\_

## Estrazione di Aflatossine da integratori alimentari

Ad ogni gruppo verrà affidato:

- ❖ Integratore alimentare (Campione)
- ❖ 1 Colonnina di immunoaffinità Aflaprep (R-Biopharm)
- ❖ Soluzione standard interno (SI) aflatossina M<sub>1</sub> a concentrazione 1 ppm
- ❖ Soluzione madre di aflatossine B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> standards alla concentrazione di 10 ppm per costruire la retta di calibrazione
- ❖ Micropipette
- ❖ Vial da HPLC
- ❖ Manifold per estrazione SPE con pompa
- ❖ NaCl
- ❖ PBS soluzione
- ❖ Materiale di laboratorio (falcon da 15 mL, eppendorf da 2 mL, puntali...)

### Preparazione del campione

Pesare accuratamente il campione 2.5 g ed aggiunta una soluzione pari a 5 mL di una miscela acqua/metanolo 80/20 (v/v).

Estrarre/ solubilizzare il campione per 3 min mediante vortex

Centrifugare il campione a 4000 rpm per 10 minuti

Recuperare il surnatante, aggiungere lo standard interno e purificare in colonna:

- Aggiungere a 1 mL di campione estratto 100 µl di standard interno aflatossina M1 alla concentrazione di 100 ppb e diluirlo con 7 mL di phosphate saline buffer (PBS).
- Caricare il campione in colonna
- Lavare gli interferenti e la matrice con 20 ml di PBS
- Eluire gli analiti in eppendorf con aggiunte consecutive di 1 mL di metanolo e 1mL di acqua. (Considerare quindi il fattore di diluizione applicato complessivo del campione pari a 1:2)
- Prelevare 1 mL dalla eppendorf e trasferirla in vial per HPLC.

### Costruzione della curva dose risposta

Costruzione della retta di Calibrazione. Aggiungere ad ogni punto della calibrazione lo SI alla medesima concentrazione del campione estratto. Calcolare la concentrazione di internal standard da aggiungere.

Calcolare la quantità di SI da mettere nella retta di calibrazione.

Preparare le concentrazioni per la curva di Calibrazione (vedi tabella) da una soluzione a 10 ppm di mix di standard in metanolo considerando il volume finale per ogni punto della retta di 200 µL. per ogni punto della calibrazione, aggiungere un volume costante di 100 µL. Valutare se fare delle diluizioni intermedie della mix a d10 ppm.

ppb	Mix standard	SI soluzione a 1 mg/L	Solvente (metanolo)
50			
25			
12.5			
6.25			
3.125			
1.5			
0.75			
0.375			

Formule UTILI:

### The Dilution Equation

$$M_1V_1 = M_2V_2$$

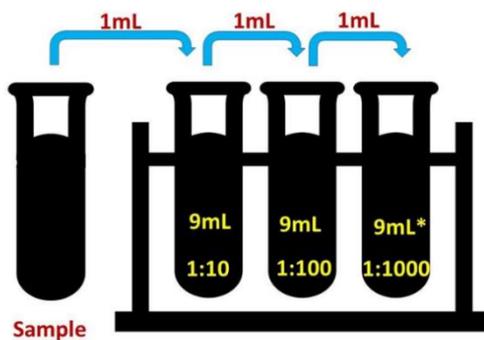
$M_1$  = initial molarity ("stock solution")

$V_1$  = initial volume (Liters)

$M_2$  = final (desired) molarity

$V_2$  = final volume (Liters)

This equation is used when you have a "stock solution" of higher molarity than you need and you need to dilute it to a lower molarity by adding additional solvent.



\*Dilution tubes begin with 9mL. 1mL is added, mixed then 1mL is transferred to next tube. The ending volume in last tube would be 10mL.