

Esercitazione 4: FLUORIMETRIA Protocollo 3b (modificato 30/04/2021 Scocchi-Di Stasi)

Protocollo 3b estrazione del chinino da campioni di urina (ogni studente analizza il proprio campione)

Materiali

- Soluzione di H_2SO_4 50 mM
- Soluzione NH_3 3.7 M
- Soluzione cloroformio-isopropanolo (2:1 V/V)
- Provette di tipo eppendorf da 2 ml e 15 ml
- Pipette da 20, 200, e 1000 μ l
- Pipette graduate da 5 o 10 ml (meglio in vetro)
- Cuvette per fluorescenza e per assorbimento
- Cartina Tornasole (misure del pH).
- Centrifuga con adattatori per provette da 15 ml.

Raccolta dei campioni

Il giorno prima della esercitazione raccogli un campione di urina (circa 10 ml, minimo 4 ml) e successivamente bevi circa 200-300 ml di bevanda contenente chinino (acqua tonica o brillante: verifica che la presenza del chinino sia indicata nell'etichetta). La mattina dell'esercitazione raccogli un secondo campione di urina (circa 10 ml, minimo 4 ml). Avvolgi i campioni in carta stagnola (il chinino è sensibile alla luce) e portali in laboratorio per l'analisi.

Estrazione organica

1. Prepara i seguenti campioni (A, B, C e D) in provette da 15 ml:
 - A) 2 ml di urina prelevata PRIMA di assumere la bevanda con il chinino (controllo negativo).
 - B) 2 ml di urina prelevata PRIMA di aver assunto la bevanda e aggiungi 20 μ L di chinino 100 μ g/ml (standard interno).
 - C) e D), 2 ml di urina prelevata DOPO aver assunto chinino.
2. Aggiusta il pH dei campioni a pH =9-10 aggiungendo ad ognuno una goccia di NH_3 3.7 M (concentrato) e controllando il pH con una cartina tornasole.
3. Aggiungi ad ognuno 4 ml di una soluzione cloroformio-isopropanolo (2:1 V/V)
4. Mescola vigorosamente per 30 sec e lascia che le due fasi si separino. Eventualmente centrifuga i campioni per migliorare e accelerare la separazione.
5. Preleva 2 ml della **fase inferiore** (fase organica) e trasferiscili in una nuova serie di provette da 15 ml
6. Aggiungi 2 ml della soluzione H_2SO_4 50 mM e mescola bene per 30 sec
7. Lascia che le due fasi si separino (eventualmente usa la centrifuga) e preleva **la fase superiore** (fase acquosa)
8. Trasferisci i campioni in 4 cuvette per fluorescenza per misurare la fluorescenza come descritto nel protocollo 3a.