

DETERMINAZIONE DI ACIDO ASCORBICO

Ilaria Marchioni
Laura Pistelli

Dipartimento Scienze
Agrarie, alimentari e
agro-ambientali
Università di Pisa
Via del Borghetto 80,
56124 PISA

Estrazione

1. *Materiale vegetale fresco (> 200 mg)*
2. *Omogeneizzare a freddo con mortaio e pestello opportunamente preraffreddato*
3. *Aggiungere immediatamente 0,6 ml di TCA 6%,*
4. *Portare a volume 2 ml con TCA al 6%*
5. *Si centrifuga a 14000-15000 rpm per 10 min a 4 °C*
6. *Viene poi recuperato il supernatante e usato per analisi*

Determinazione

1. *Preparare una soluzione buffer 0,2 M Buffer fosfato (pH 7.4)*
2. *Preparare soluzioni di 6% e 10% TCA*
3. *Preparare una soluzione di acido ascorbico disciolto in 6% TCA per la retta di taratura*
4. *Preparare una soluzione di 10mM DTT, (in 0,2 M Buffer fosfato pH 7.4)*
5. *Soluzione al 0,5 % (p/v) NEM (N-Ethylmaleimide)*
6. *Soluzione al 42% (v/v) di acido ortofosforico H₃PO₄*
7. *Soluzione al 4% (p/v) di 2,2 -dipiridile, disciolto in 70% Etanolo*
8. *Soluzione 0,3 % (p/v) di FeCl₃*
9. *Aggiungere le soluzioni come in Tabella*
10. *Incubare come descritto in Tabella*
11. *Leggere l'assorbanza a 525 nm*

	ASA (Acide ascorbique)		DAsA (Acide déshydroascorbique)	
	Test	Blanc	Test	Blanc
Echantillon	0,2		0,2	
DTT 10 mM			0,2	0,2
TCA 6%		0,2		0,2
Tampon P 0,2 M	0,6	0,6	0,4	0,4
Mélanger et incuber pendant 20 min à 42°C dans un bain thermostaté				
NEM 0,5%			0,2	0,2
Mélanger et incuber pendant 1 min à T°C ambiante				
H ₂ O	0,2	0,2		
TCA 10%	1,0	1,0	1,0	1,0
H ₃ PO ₄ 42%	0,8	0,8	0,8	0,8
2,2'-Dipyridyle 4%	0,8	0,8	0,8	0,8
FeCl ₃ 3%	0,4	0,4	0,4	0,4
Incuber à 42°C dans un bain thermostaté pendant 40 minutes				
Mesurer l'absorbance à 525 nm				

Referenze Bibliografiche

Kampfenkel, K., Vanmontagu, M., & Inze, D. (1995). Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. *Analytical biochemistry*, 225(1), 165-167