

Ilaria Marchioni  
Laura Pistelli

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

## DÉTERMINATION DE L'ACIDE ASCORBIQUE

### Extraction

1. Matériel végétal frais (> 200 mg)
2. Homogénéiser à froid avec un mortier et un pilon préalablement refroidi
3. Rajouter immédiatement 0,6 ml d'acide trichloroacétique (TCA) à 6%,
4. Porter à un volume de 2 ml avec du TCA à 6%
5. Centrifuger à 14000-15000 rpm pendant 10 min à 4 °C
6. Récupérer le surnageant pour analyses

### Détermination

1. Préparer une solution tampon phosphate 0.2 M, pH 7.4
2. Préparer des solutions de TCA à 6% et 10%
3. Préparer une solution d'acide ascorbique dissoute dans du TCA à 6% pour la courbe d'étalonnage
4. Préparer une solution à 10mM de dithiothréitol (DTT) (dans tampon phosphate 0.2 M, pH 7.4)
5. Solution à 0,5% (p/v) de N-Ethylmaleimide (NEM)
6. Solution à 42% (v/v) d'acide phosphorique ( $H_3PO_4$ )
7. Solution à 4% (p/v) de 2,2'-Dipyridyle, dissous dans de l'éthanol à 70%
8. Solution à 0,3% (p/v) de chlorure de Fer III ( $FeCl_3$ )
9. Ajouter les solutions comme indiqué dans le tableau ci-après
10. Incuber comme indiqué dans le tableau ci-après
11. Mesurer l'absorbance à 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 <sub>2</sub> O	0,2	0,2		
TCA 10%	1,0	1,0	1,0	1,0
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 42%	0,8	0,8	0,8	0,8
2,2'-Dipyridyle 4%	0,8	0,8	0,8	0,8
FeCl <sub>3</sub> 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				

### Bibliographie

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