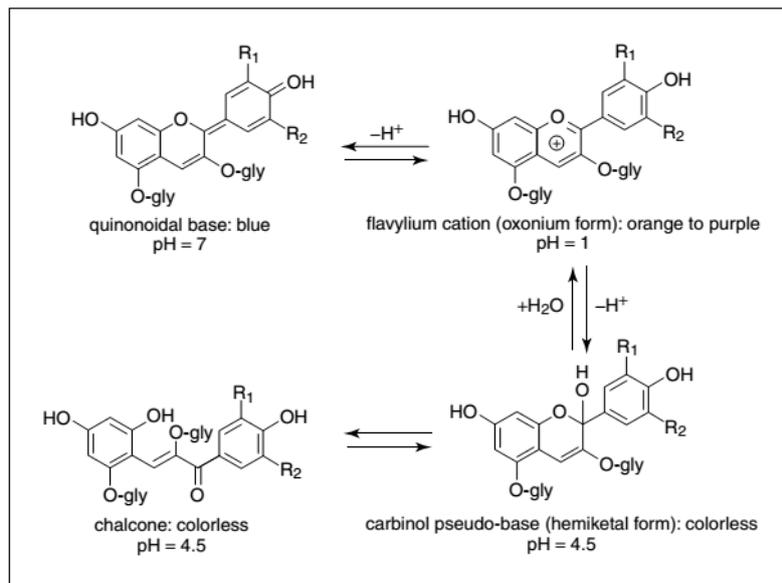
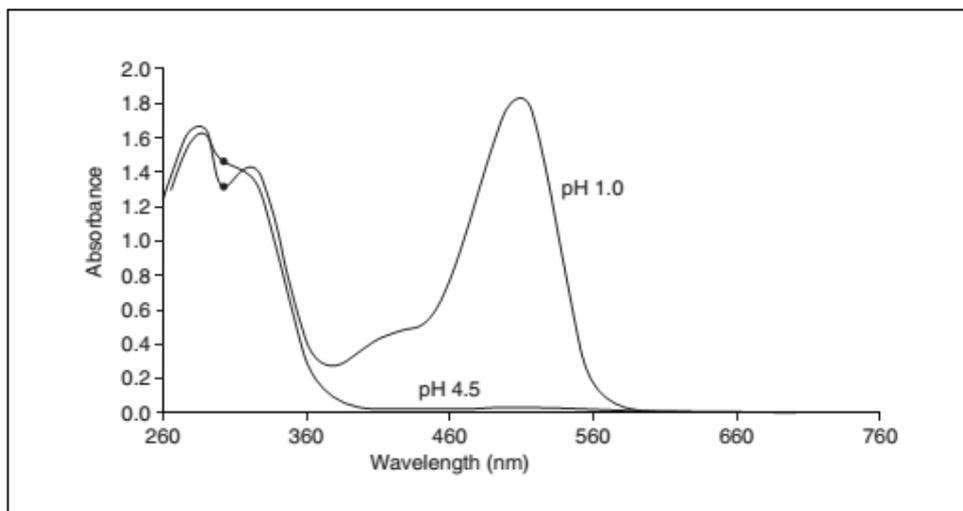


DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO IN ANTOCIANI TOTALI

Gli antociani, oltre alle clorofille e ai carotenoidi, rappresentano un'altra importante classe di pigmenti presenti all'interno del regno vegetale. La loro struttura e conseguentemente il loro grado di colorazione sono strettamente connesse alle condizioni di pH all'interno della cellula, e soprattutto del vacuolo, all'interno del quale queste molecole sono preferenzialmente accumulate.



L'estrazione e la determinazione spettrofotometrica degli antociani vengono realizzate, quindi, in ambiente fortemente acido allo scopo di massimizzare l'assorbanza nel visibile (500-540 nm).



PROCEDIMENTO

- 200 mg di tessuto fogliare fresco vengono omogenati a freddo con una aliquota di sabbia e successivamente addizionati 2 mL metanolo acidificato 0.1 % con HCl puro (MeOH: HCl; v:v)
- Al termine dell'estrazione il surnatante viene raccolto in Eppendorf e centrifugato a 10000 rpm per 10' utilizzando una centrifuga da tavolo
- 100 μL di surnatante vengono posti in cuvette in polistirene UV-vis ed addizionati di 900 μL della stessa soluzione precedentemente preparata di metanolo acidificato 0.1 % con HCl puro (MeOH: HCl; v:v). L'assorbimento massimo è valutata a 536 nm. Il bianco è realizzato solo con 1 mL metanolo acidificato 0.1 %
- Per la concentrazione si utilizza il coefficiente di estinzione molare della cianidina-3-glucoside valutato nello stesso solvente ($30400 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

ESEMPIO NUMERICO

$ABS_{530 \text{ nm}}: 0,5$ V_i estrazione: 2mL V_{ext} cuvetta 100 μL V_{fin} cuvetta 1 mL

- Se $A = \epsilon \cdot [M] \cdot d$ (cm^{-1}) $[M] = A / \epsilon$ (elimino d perché le cuvette misurano 1 cm)
Quindi $0,5 / 34300 = 1,46 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ concentrazione in cuvetta
- Ma poiché l'estratto in cuvetta è diluito 10 volte ($f_d = v_{\text{fin} \text{cuv}} / v_{\text{ext} \text{cuv}} = 1000 / 100$) rispetto all'estratto originale:
 $1,46 \cdot 10^{-5} \cdot 10 = 1,46 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ concentrazione in estratto originale
- Se $1,46 \cdot 10^{-4}$ moli le ho in 1 L di soluzione in 2 mL avrò:
 $1,46 \cdot 10^{-4} / (1000 \cdot 2) = 2,92 \cdot 10^{-7} \text{ moli} = 100 \text{ nmoli}$ cianidina-3-glucoside in 2 mL
- Poiché ho estratto gli antociani contenuti in 0,2 g di materiale vegetale, per riportarlo a nmoli di cianidina-3-glucoside per g di materiale risolvo semplicemente la proporzione:
 $100 \text{ nmol} : 0,2 \text{ g} = x : 1 \text{ g}$ $x = 100 / 0,2 = 100 \cdot 5 = \underline{500 \text{ nmoli g}^{-1} \text{ materiale fresco}}$