

Analisi dei Medicinali

Corso di Laurea in Farmacia

PARTE STRUMENTALE

SPETTROSCOPIA UV VISIBILE

Spiegazione del funzionamento ed addestramento col personale tecnico/docente in laboratorio sullo strumento.

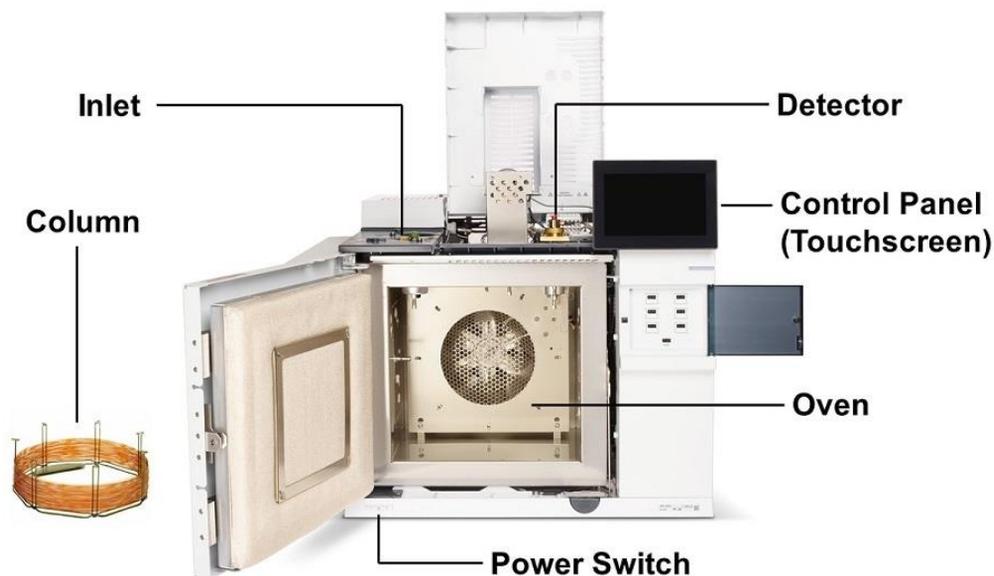
Si preparano le soluzioni utilizzando il solvente più opportuno

Se il composto non si scioglie in acqua è inutile tentare di registrare lo spettro UV

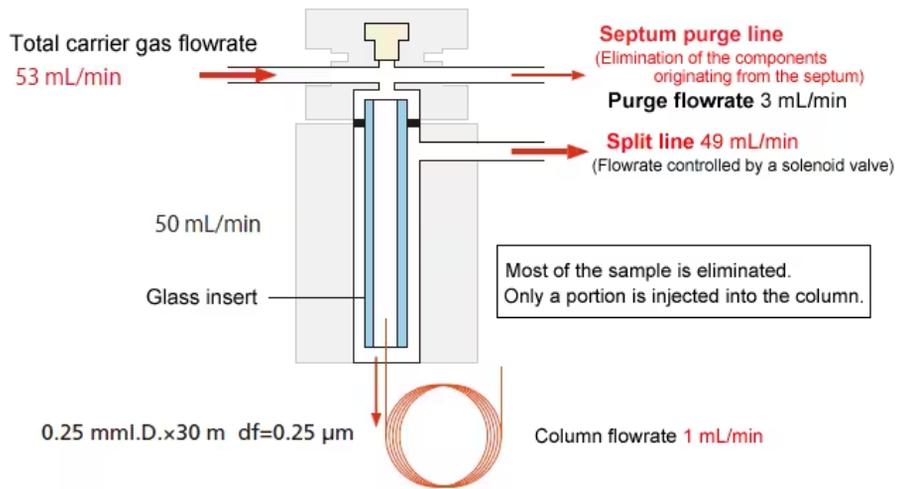
Le cuvette hanno due lati opachi (che servono per prenderle in mano) e due lati lucidi (che non vanno toccati e che servono a far passare la luce)

GC-FID

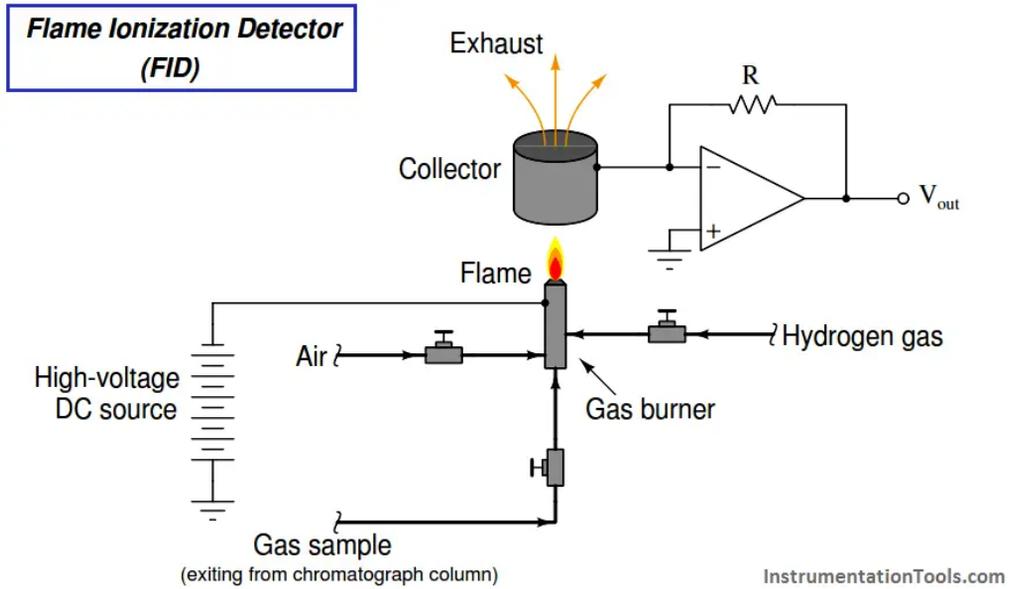
Spiegazione del funzionamento ed addestramento col personale tecnico/docente in laboratorio sugli strumenti.



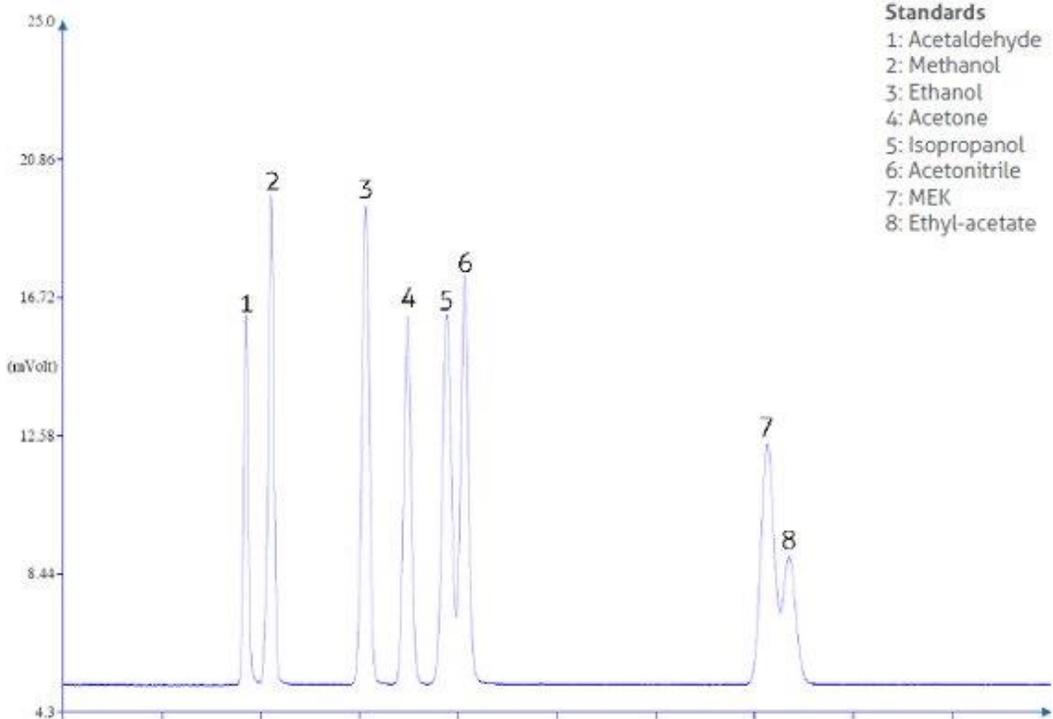
Iniettore



Detector FID (Flame Ionization Detector)

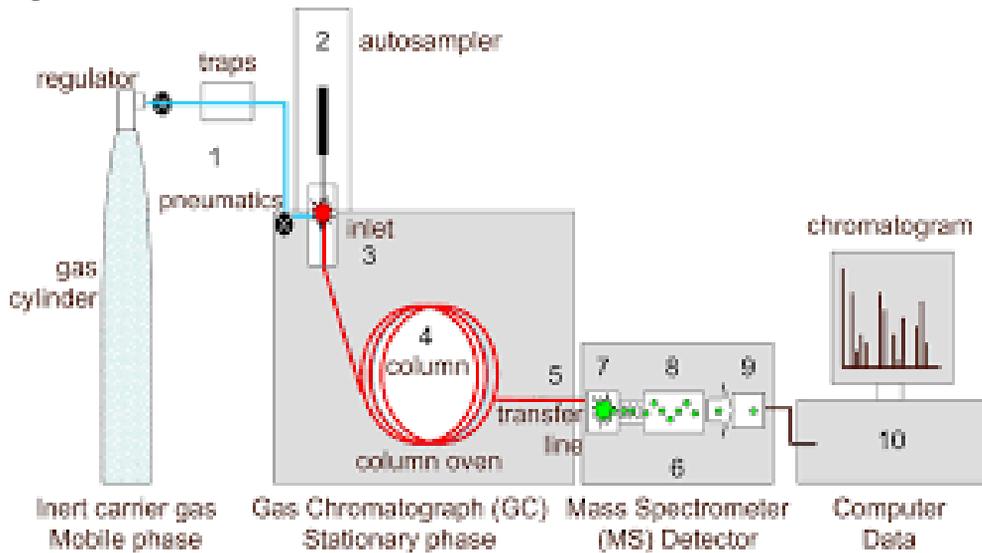


CROMATOGRAMMA DI ESEMPIO



GC-MS

Spiegazione del funzionamento col personale tecnico/docente in laboratorio sugli strumenti.



Libreria Spettri UV;

Esperienza Riconoscimento da formulazione

Cristallizzazione: ACIDO BENZOICO contaminato

L'acido benzoico in acqua ha una solubilità di 0.29 g/100 mL a 20 °C. La solubilità aumenta molto in acqua bollente.

Per eseguire l'esperienza assicurarsi di avere a disposizione:

- Un imbuto e un porta imbuto
- Un becker di diametro sufficiente a contenere, al suo interno, l'imbuto
- Un becker da 100 ml
- Un becker per il bagno di ghiaccio
- Due beute da 50 ml
- Carta da filtro
- Spatolina

Prima di tutto, nel becker che può ospitare l'imbuto mettere a scaldare dell'acqua deionizzata fino quasi all'ebollizione, servirà poi per scaldare l'imbuto.

Portare ad ebollizione anche circa 50 mL di acqua deionizzata nel becher da 100 mL.

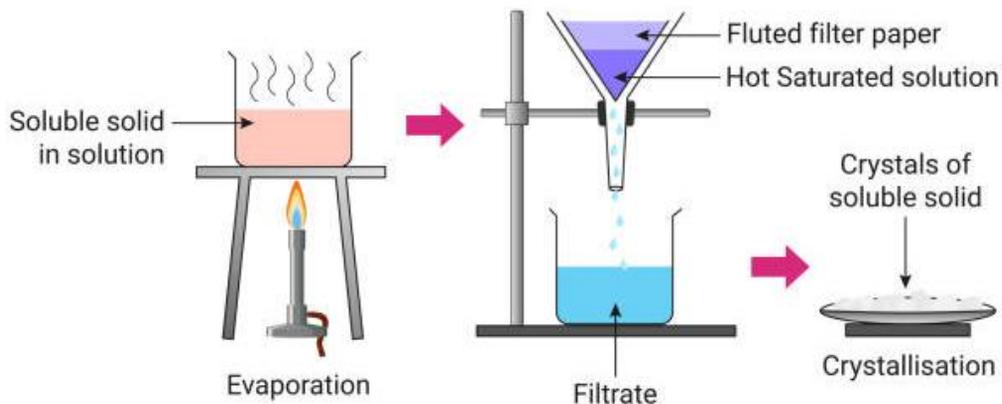
Nel frattempo, preparare due filtri a pieghe, un imbuto ed una beuta da 50 mL pulita ed asciutta, per la raccolta della soluzione filtrata.

Non appena l'acqua del becker da 100 mL sarà arrivata ad ebollizione, pesare 500 mg di acido benzoico, porli nell'altra beuta da 50 mL pulita e portare in soluzione aggiungendo, poco alla volta, circa 25 mL di acqua. Riportare ad ebollizione facendo attenzione che la soluzione non esca dalla beuta stessa. Agitare eventualmente con una bacchetta di vetro. Le impurità (colorate in scuro) non si scioglieranno.

Immergere per 2-3 minuti l'imbuto nel becker contenente l'acqua calda per scaldarlo. Una volta caldo, posizionarlo sul porta imbuto, porvi sopra il filtro a pieghe e filtrare subito la soluzione di acido benzoico mentre è ancora calda, raccogliendola nella beuta pulita ed asciutta. Verificare che le impurità insolubili nell'acqua rimangano sul filtro.

Preparare un bagno di ghiaccio.

Porre la beuta di raccolta della soluzione filtrata in bagno di ghiaccio ed attendere la cristallizzazione. Preparare l'imbuto con il filtro a pieghe pulito e filtrare a freddo i cristalli ottenuti. Spostare il filtro in un piccolo becker lasciarlo asciugare all'aria fino al giorno seguente.



Misurare il punto di fusione dei cristalli ottenuti. Ottenere uno spettro UV sciogliendo parte dei cristalli ottenuti in solvente opportuno. Disegnare la struttura del composto ottenuto e Prevedere lo spettro H-NMR dei cristalli ottenuti

Acquisizione dello spettro H-NMR

-Disciogliere la polvere ottenuta per evaporazione di 2mL di soluzione di estrazione in esattamente 600 uL di D₂O o DMSO-d₆ in una microprovetta di plastica.

Trasferire esattamente i 600 uL in un tubo NMR.

Acquisire lo spettro con la supervisione del personale del laboratorio al NMR 80MHz.

Attribuire i segnali osservati ai protoni della struttura in questione.

Sublimazione:

Per eseguire l'esperienza assicurarsi di avere a disposizione:

- Capsula di porcellana
- Mortaio e pestello
- Imbuto di diametro uguale o leggermente maggiore di quello della capsula
- Batuffolo di cotone
- Carta da filtro
- Becco Bunsen, treppiede e retina spargifiamma

Porre due spatolate di acido benzoico non puro nel mortaio e ridurlo a polvere fine con il pestello. Trasferire la polvere in una capsula di porcellana. Ricavare un copri-capsula ritagliando opportunamente della carta da filtro a cerchio di diametro appena inferiore dell'apertura della capsula e coprire, quindi, l'apertura della capsula con questo. Prendere un imbuto che abbia un'apertura di diametro uguale o superiore alla capsula e mettere un batuffolo di cotone nell'imbuto. Porre l'imbuto rovesciato sopra la capsula in modo che l'apertura dell'imbuto combaci con la capsula stessa. Accendere un bunsen, porre la retina e porre la capsula con l'imbuto a riscaldare (molto CAUTAMENTE). Attenzione a non fare cadere l'imbuto!!

Attendere fino a che l'imbuto sia riempito di vapore, interrompere il riscaldamento e osservare cosa succede. Il composto in grado di sublimare passa dallo stato solido a quello gassoso, poi incontrando la parete dell'imbuto (fredda) e il cotone che rallenta la sua uscita dall'imbuto, risolidifica sulle pareti dell'imbuto stesso.

Raccogliere i cristalli. Misurare il punto di fusione dei cristalli ottenuti.

-Acquisire spettro IR con parte dei cristalli

-Acquisire spettro NMR con parte dei cristalli

Separazione di due composti con caratteristiche chimiche differenti mediante Estrazione liquido/liquido:

Per eseguire l'esperienza assicurarsi di avere a disposizione:

- Becker da 50 o 100 ml
- 3 beute di piccolo volume
- 2 palloni per evaporatore
- Cartina tornasole
- Imbuto separatore, anello porta imbuto e colonna
- Soluzioni di acidi e di basi da Day1
- Etile acetato

NOTA: uso di solventi organici, esperienza da eseguire sotto cappa aspirata

Portare in soluzione/sospensione la miscela di polveri costituita da: glucosio, acido benzoico, chinina cloridrato con acqua deionizzata (20 mL totali).

Portare a pH acido con acido cloridrico diluito, verificare il pH con la cartina di tornasole. Porre la soluzione in imbuto separatore ed aggiungere 10 mL di etile acetato (densità circa 0.9). Agitare, sfiatare sotto cappa, posizionare l'imbuto sul porta imbuto e attendere la separazione. Raccogliere la fase acquosa in una beutina (identificata con FA) e la fase organica in un'altra beutina (identificata con FO1).

ATTENZIONE: meglio che vada un po' di fase organica nell'acqua piuttosto che rimanga dell'acqua nella fase organica perchè diventerebbe difficile l'operazione di portare a secco.

Ricaricare la fase acquosa nell'imbuto e ripetere l'operazione con altri 10 mL di etile acetato. Raccogliere ed unire le soluzioni corrispondenti.

Portare ora a pH alcalino la FASE ACQUOSA con ammoniaca. Ripetere l'estrazione come prima, raccogliendo in un'altra beutina (identificata come FO2) ottenendo una FASE ORGANICA 2.

Trasferire le due fasi organiche in altrettanti palloncini riconoscibili, accorpandoli con le due fasi di un altro bancone (ogni 2 banconi dovranno esserci un palloncino con 40 mL di FO1 e un secondo palloncino con 40 mL di FO2) e portare all'evaporatore rotante.

Scrivere le strutture delle sostanze che avete nella miscela iniziale

Quale sostanza avrete nella FASE ORGANICA 1 e quale nella FASE ORGANICA 2? Spiegare il perchè

Acquisire gli spettri UV delle sostanze isolate, portando in soluzione pochissima polvere in 4÷5 ml di acqua deionizzata.

Riconoscimento di principi attivi tramite TLC:

Per eseguire l'esperienza assicurarsi di avere a disposizione:

- Lastrine TLC pretagliate
- Matita e righello
- Capillari finissimi aperti
- Provette da saggio pulite e asciutte
- Spatolina
- Mineral light (installate ai lati del laboratorio)

Solubilizzare, in provetta da saggio pulita e asciutta, una piccola quantità di sostanza incognita "x" in circa 3 mL di acetone puro.

Su una lastra cromatografica di gel di silice segnare esclusivamente con una matita una linea parallela alla base, lato corto, a circa 1.5 cm dalla base stessa e segnare su questa 4 punti equidistanti (lasciare almeno 1 cm dai lati della lastrina). Identificare questi punti con Ra, Rb, Rc, x.

Deporre con un capillare pulito, di volta in volta, una goccia di ogni soluzione nella relativa posizione sulla linea a matita e attendere la completa asciugatura. Controllare il caricamento delle sostanze mediante osservazione alla lampada mineral light e se necessario caricare ulteriore soluzione.

Porre la lastrina in camera cromatografica, dove è già presente l'eluente acido (circa 1 cm) costituito da una miscela di Acetato di Butile:Metanolo:Acido acetico:Acqua in rapporto 6,5:2,0:0,5:0,5 già pronto. Chiudere bene la camera con l'apposito coperchio e lasciare eluire il solvente fino a che il livello di questo non sia arrivato a circa 1 cm dalla sommità della lastrina (tempo stimato circa 30÷40 minuti). Estrarre quindi la lastrina e segnare con la matita il livello raggiunto dall'eluente, asciugare la lastrina all'aria o con l'aiuto di un phon.

Illuminare la lastrina con la mineral light e segnare le macchie eluite.

Identificare i componenti della sostanza incognita x sapendo che Ra = Chinina cloridrato; Rb = Teofillina e Rc = Lidocaina.

Compresa Bianca

Procedura:

1. Polverizzare finemente una compressa con mortaio e pestello.
2. Nel frattempo, riscaldare un bagnomaria SOTTO CAPPA portandolo a ebollizione. Raggiunta l'ebollizione SPEGNERE IL BUNSEN.
3. Trasferire in un bicchiere (non troppo grande) la polvere e aggiungere 20 ml di acetone R.
4. Filtrare la sospensione su carta da filtro dividendo il filtrato in due o tre provette. (NB Usare Acetone per bagnare la carta filtro)
5. Portare a secco le provette contenente l'analita a bagnomaria precedentemente riscaldato sotto cappa (BUNSEN SPENTO)
6. Una volta secco, disciogliere un minimo quantitativo di polvere in acqua per registrare lo spettro UV
7. Analogamente, prelevare un po' di polvere e discioglierla in esattamente 600 μL di D_2O (tramite micropipetta) in una microprovetta di plastica che vi verrà fornita e trasferire attentamente tutti i 600 μL in un tubo NMR.

Registrare lo spettro NMR allo strumento indicando il nome del bancone data e compressa.

8. Con una parte della polvere registrare lo spettro IR.
9. Con la polvere rimanente misurare il punto di fusione.
10. Conservate tutti i dati per la relazione in cui verranno commentati.

Compresa azzurra

Procedura

-Rimozione del film gastroprotettivo: porre due compresse in un piccolo bicchiere con 15 mL di metanolo e attendere che il rivestimento si stacchi. Appena questo accade, recuperare le compresse versando tutto su un imbuto dotato di carta da filtro o usando delicatamente la pinza.

-Nel frattempo, riscaldare un bagnomaria SOTTO CAPPa portandolo a ebollizione e quindi SPEGNERE IL BUNSEN.

-Trasferire le compresse priva di film in un piccolo bicchiere con 30 mL di metanolo e attendere dissoluzione (dissoluzione lenta, potete aiutarvi con una bacchetta di vetro per velocizzare il processo).

-Filtrare la soluzione su carta mantenendo il filtrato in un bicchiere non troppo grande. (N.B. Usare MeOH per bagnare la carta filtro)

-Prelevare 2 ml di soluzione e metterlo in una provetta che verrà destinato per registrare lo spettro ¹H NMR. Lasciare evaporare SOTTO CAPPa la provetta contenente il nostro analita usando l'evaporatore a aria e tenendo a bagnomaria. La provetta contenente 2 mL va portata a secco.

-Nel frattempo, con il restante volume del filtrato procedere alla preparazione del campione UV: prelevare con la micropipetta PRECISAMENTE 250 µL di soluzione e trasferirli con altrettanta precisione in un matraccio da 25 mL stando attenti che tutti i 250 microlitri siano effettivamente stati trasferiti (diluizione 1 a 100). Portare a volume il matraccio con metanolo.

-Acquisire lo spettro UV in metanolo usando la soluzione diluita (fare il Bianco in metanolo). Se lo spettro non è chiaramente visibile si possono fare ulteriori diluizioni in cuvetta (ATT. La diluizione in provetta vale solo per l'identificazione dell'analita e non per la determinazione della concentrazione).

-Comparare lo spettro ottenuto con gli spettri forniti specificatamente per questa esperienza (dispensa apposita) per identificare il principio attivo.

- Quantificare la concentrazione della soluzione tramite legge di Lambert Beer. Scegliere un picco ben visibile nello spettro della soluzione diluita nel matraccio e misurare l'assorbanza a quel picco. L'assorbanza va considerata quando è compreso tra 0.1 e 1 di assorbanza. Se non vi sono picchi in questa condizione fare una diluizione differente (e.s. 1 a 50; 1 a 25; ...ecc). Calcolare la concentrazione molare del filtrato di partenza ricordandosi di considerare la diluizione.

Le costanti di estinzione molare ai relativi picchi di massimo sono riportate nel set di spetti UV forniti in questa esperienza. L'equazione che lega la concentrazione all'assorbanza è:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot d$$

ϵ = coefficiente di estinzione molare; c = concentrazione molare; d = cammino ottico(1 cm)

Misura del potere ottico rotatorio

-Misurare il potere rotatorio al polarimetro (il primo gruppo farà il bianco, la prima volta) e utilizzando la soluzione del filtrato e non quello del matraccio (passare da concentrazione Molare a concentrazione g/L) riportare il potere rotatorio specifico. -Riportare il valore ottenuto e la concentrazione usata

$$[\alpha]_{20D} = \frac{1000 \cdot \alpha}{\text{conc}(\text{g}/\text{L})_{\text{misurato}} \cdot 1 \text{ (dm)}}$$

Acquisizione dello spettro H-NMR

-Disciogliere la polvere ottenuta per evaporazione di 2mL di soluzione di estrazione in esattamente 600 uL di D₂O o DMSO-d₆ in una microprovetta di plastica.

Trasferire esattamente i 600 uL in un tubo NMR.

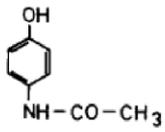
Acquisire lo spettro con la supervisione del personale del laboratorio al NMR 80MHz.

Attribuire i segnali osservati ai protoni della struttura in questione.

- Conservate tutti i dati ottenuti per la relazione.

Acetaminophen

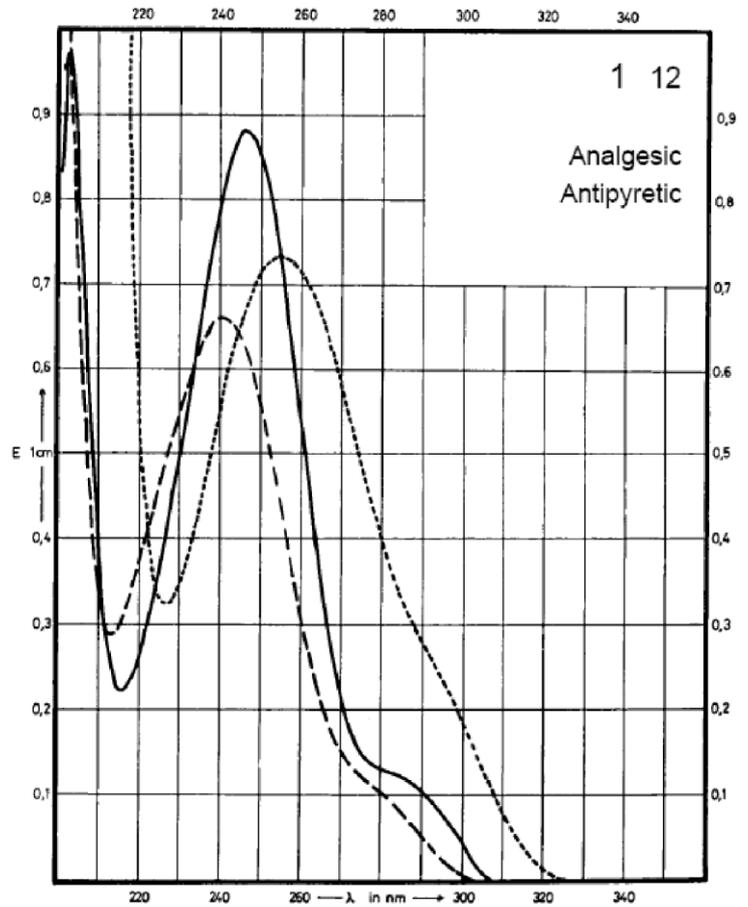
Name PARACETAMOL



M_r 151.2

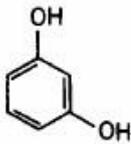
Concentration 1 mg / 100 ml

| Solvent Symbol | Methanol | Water | 0.1 M HCl | 0.1 M NaOH |
|-----------------------|----------|-------|-----------|------------|
| Maximum of absorption | 247 nm | | 240 nm | 255 nm |
| E 1% 1cm | 850 | | 642 | 710 |
| ε | 12850 | | 9710 | 10740 |



Resorcinol

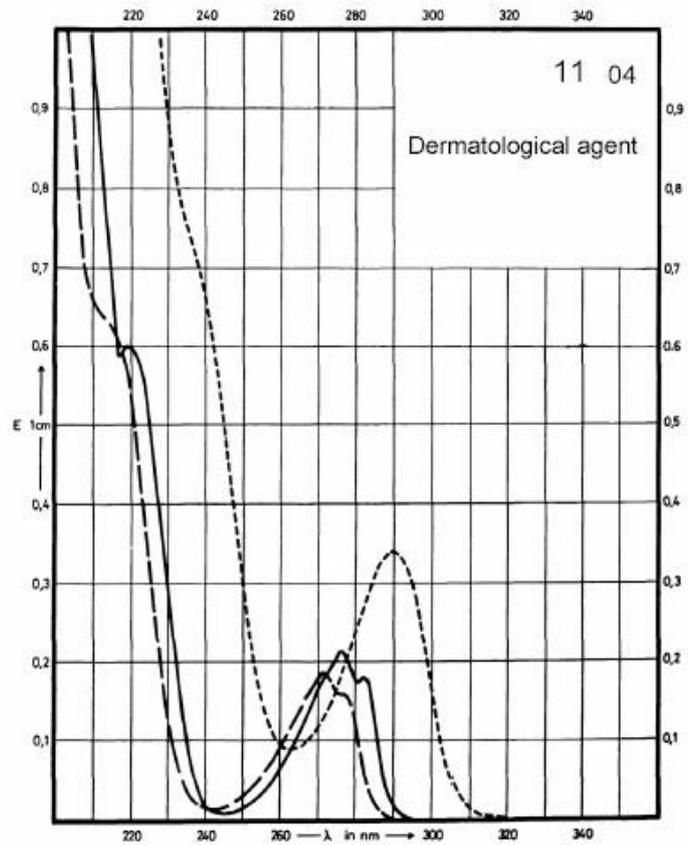
Name RESORCINOL



M_r 110.1

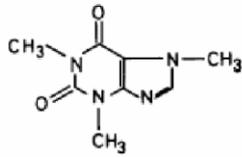
Concentration 1 mg / 100 ml

| Solvent Symbol | Methanol | Water | 0.1 M HCl | 0.1 M NaOH |
|-----------------------|----------|-------|-----------|------------|
| Maximum of absorption | 276 nm | | 272 nm | 289 nm |
| $E_{1\%}^{1cm}$ | 194 | | 169 | 312 |
| ϵ | 2140 | | 1880 | 3440 |



Caffeine

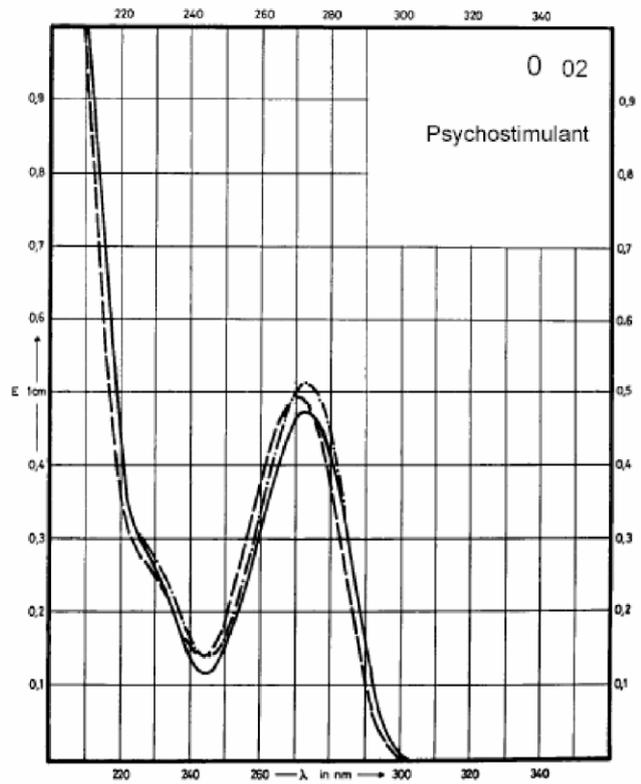
Name CAFFEINE



M_r 194.2

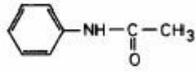
Concentration 1 mg / 100 ml

| Solvent Symbol | Methanol | Water | 0.1 M HCl | 0.1 M NaOH |
|-----------------------|----------|--------|-----------|------------|
| Maximum of absorption | 273 nm | 273 nm | 270 nm | 273 nm |
| ϵ 1% 1cm | 475 | 515 | 495 | 510 |
| ϵ | 9220 | 10000 | 9610 | 9900 |



Acetanilide

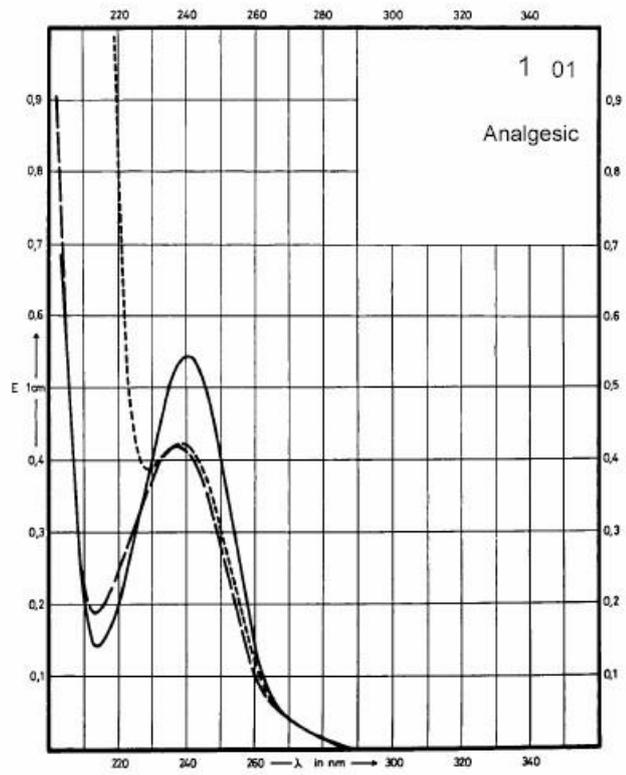
Name ACETANILIDE



M_r 135.2

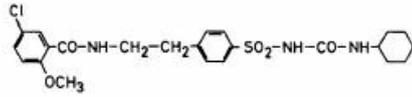
Concentration 0.5 mg / 100 ml

| Solvent Symbol | Methanol | Water | 0.1 M HCl | 0.1 M NaOH |
|-----------------------|----------|-------|-----------|------------|
| Maximum of absorption | 241 nm | | 237 nm | 239 nm |
| $E_{1\%}^{1cm}$ | 1080 | | 815 | 820 |
| ϵ | 14330 | | 11020 | 11080 |



Glibenclamide

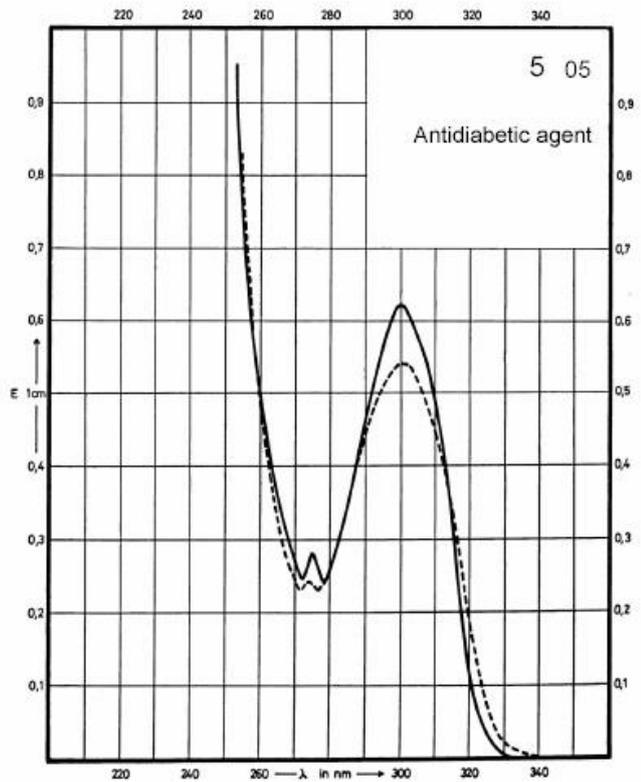
Name GLIBENCLAMIDE



M_r 494.0

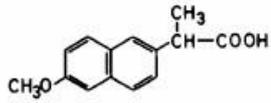
Concentration 10 mg / 100 ml

| Solvent Symbol | Methanol | Water | 0.1 M HCl | 0.1 M NaOH |
|------------------------|------------------|-------|-----------|------------------|
| Maximum of absorption | 300 nm 274 nm | | | 301 nm 274 nm |
| 1% E _{1cm} | 62.4 28.2 | | | 54.3 24.1 |
| E | 3080 1380 | | | 2680 1190 |



Naproxen

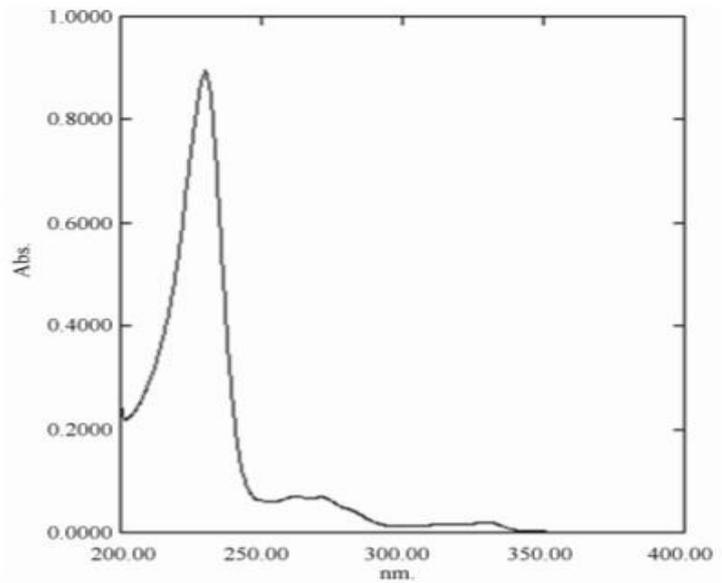
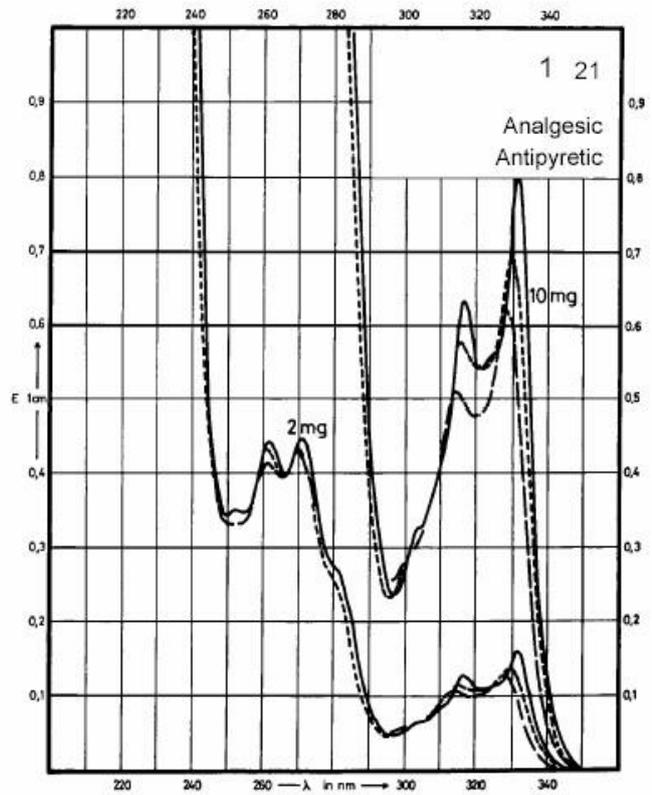
Name NAPROXEN



M_r 230.3

Concentration 2 mg / 100 ml
10 mg / 100 ml

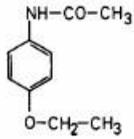
| Solvent Symbol | Methanol | Water | 0.1 M HCl | 0.1 M NaOH |
|-----------------------|--------------------|-------|--------------------|--------------------|
| Maximum of absorption | 331 nm 316 nm | | 328 nm 315 nm | 330 nm 316 nm |
| E 1% 1cm | 80 63 | | 63 52 | 70 52 |
| ϵ | 1840 5180, 5070 | | 1450 4850, 4780 | 1610 5020, 5020 |



| Maximum of Absorption (nm) | ϵ_{max} (Methanol) |
|----------------------------|------------------------------------|
| 230 | 22900 |
| 262 | 5070 |
| 271 | 5180 |
| 316 | 1450 |
| 331 | 1840 |

Phenacetin

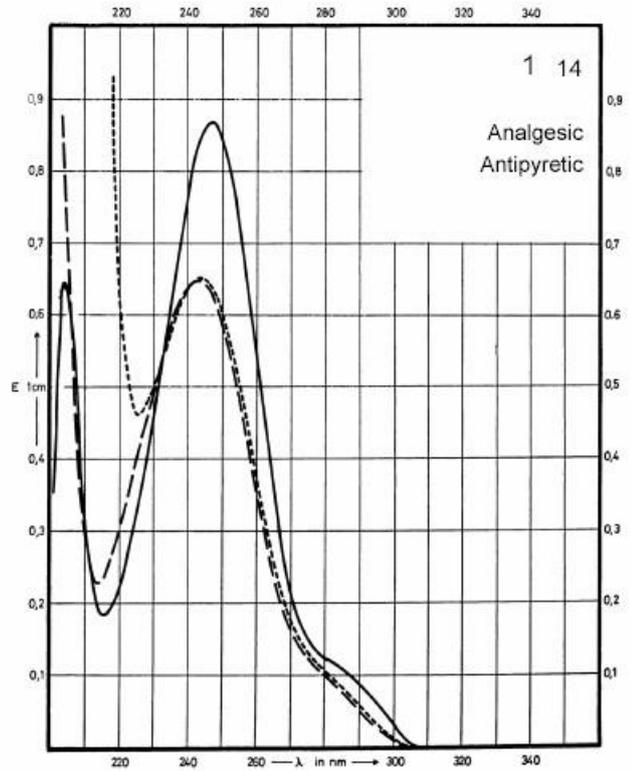
Name PHENACETIN



M_r 179.2

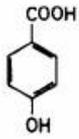
Concentration 1 mg / 100 ml

| Solvent Symbol | Methanol | Water | 0.1 M HCl | 0.1 M NaOH |
|-----------------------|----------|-------|-----------|------------|
| Maximum of absorption | 249 nm | | 244 nm | 245 nm |
| $E_{1\%}^{1cm}$ | 864 | | 647 | 657 |
| ϵ | 15480 | | 11590 | 11770 |



4-Hydroxybenzoic acid

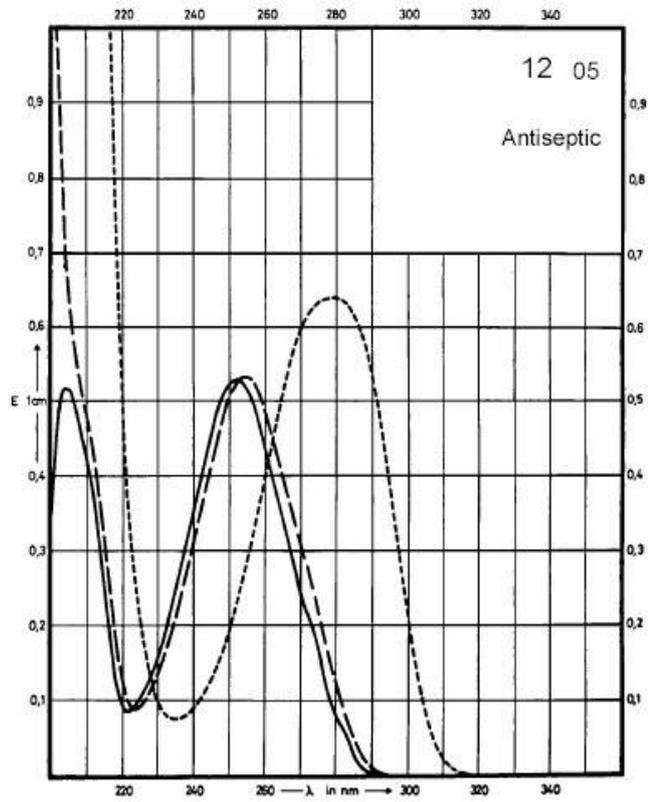
Name 4-HYDROXYBENZOIC ACID



M_r 138.1

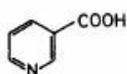
Concentration 0.5 mg / 100 ml

| Solvent Symbol | Methanol | Water | 0.1 M HCl | 0.1 M NaOH |
|-----------------------|----------|-------|-----------|------------|
| Maximum of absorption | 252 nm | | 255 nm | 279 nm |
| $E_{1\%}^{1cm}$ | 1088 | | 1078 | 1290 |
| ϵ | 14750 | | 14090 | 17010 |



Nicotinic acid

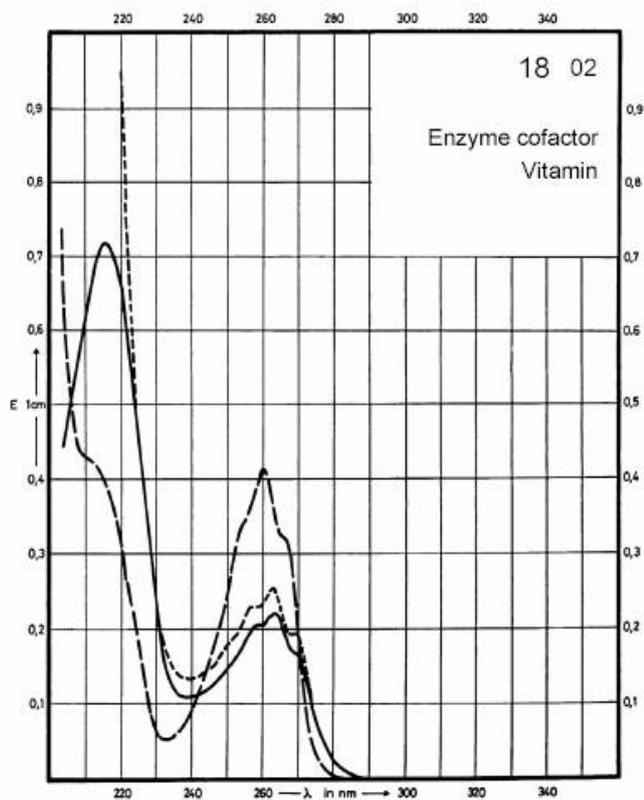
Name NICOTINIC ACID



M_r 123.1

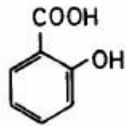
Concentration 1 mg / 100 ml

| Solvent Symbol | Methanol | Water | 0.1 M HCl | 0.1 M NaOH |
|-----------------------|----------|-------|-----------|------------|
| Maximum of absorption | 263 nm | | 260 nm | 262 nm |
| $E_{1\%}^{1cm}$ | 225 | | 420 | 260 |
| ϵ | 2770 | | 5170 | 3200 |



Salicylic acid

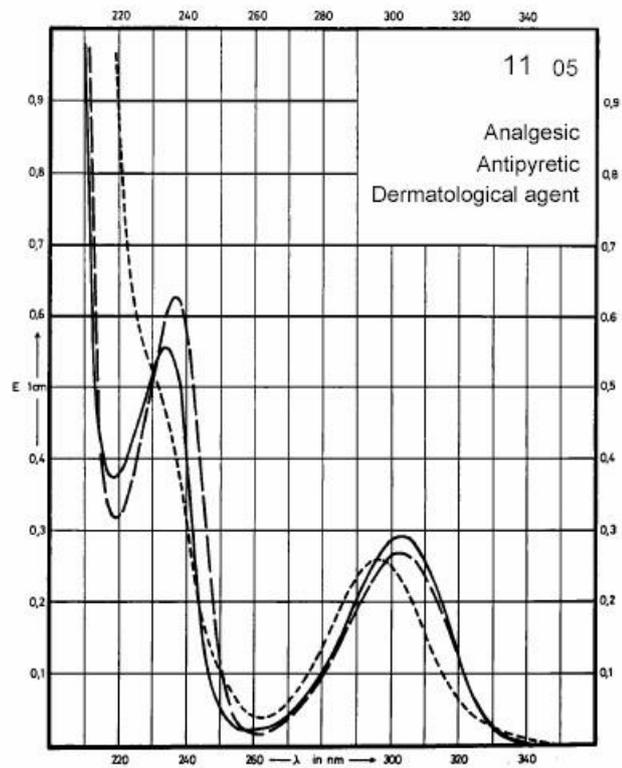
Name SALICYLIC ACID



M_r 138.1

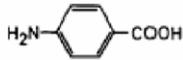
Concentration 1 mg / 100 ml

| Solvent Symbol | Methanol | Water | 0.1 M HCl | 0.1 M NaOH |
|-----------------------|------------------|-------|------------------|------------|
| Maximum of absorption | 302 nm 234 nm | | 303 nm 237 nm | 296 nm |
| E 1% 1cm | 285 547 | | 262 613 | 254 |
| E | 3940 7550 | | 3620 8470 | 3510 |



Aminobenzoic acid

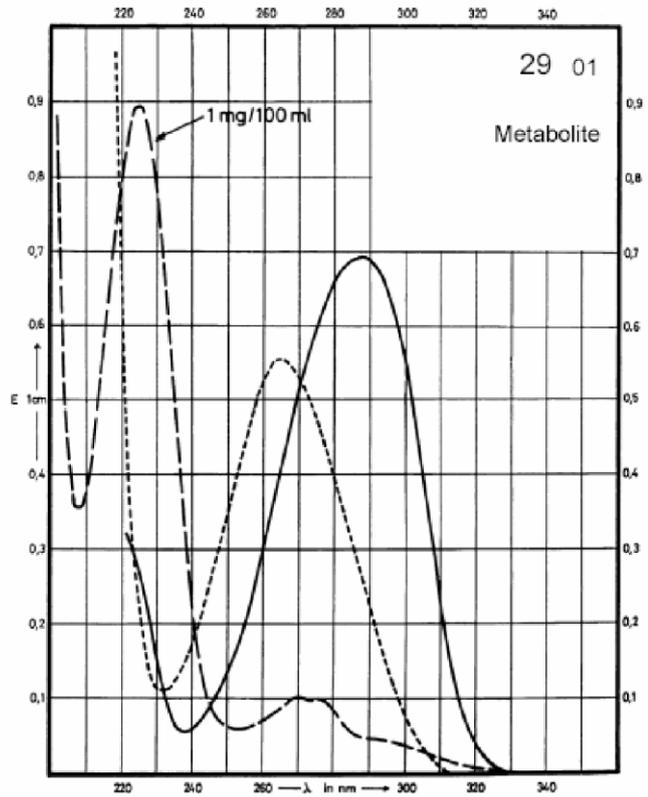
Name AMINOBENZOIC ACID



M_r 137.1

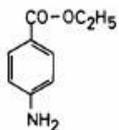
Concentration 0.5 mg / 100 ml
1 mg / 100 ml

| Solvent Symbol | Methanol | Water | 0.1 M HCl | 0.1 M NaOH |
|-----------------------|----------|-------|------------------|------------|
| Maximum of absorption | 288 nm | | 270 nm 225 nm | 275 nm |
| E 1% 1cm | 1335 | | 95 854 | 1087 |
| ϵ | 18300 | | 1300 11710 | 14630 |



Benzocaine

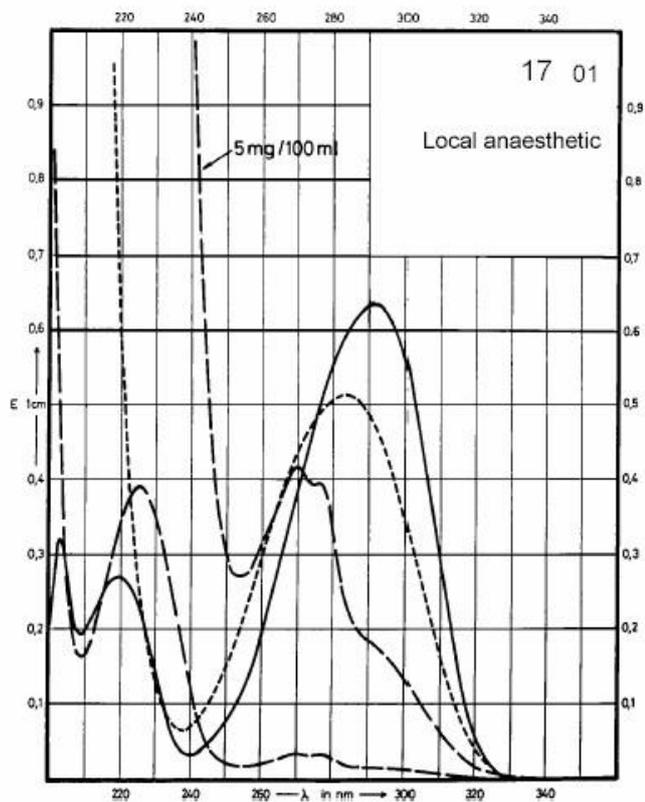
Name BENZOCAINE



M_r 165.2

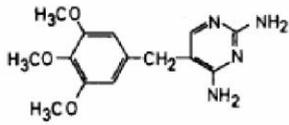
Concentration 0.5 mg / 100 ml
5 mg / 100 ml

| Solvent Symbol | Methanol | Water | 0.1 M HCl | 0.1 M NaOH |
|-----------------------|------------------|-------|------------------|------------|
| Maximum of absorption | 292 nm 220 nm | | 270 nm 226 nm | 284 nm |
| E 1% 1cm | 1246 538 | | 79 770 | 1002 |
| ε | 20580 8890 | | 1310 12720 | 16550 |



Trimethoprim

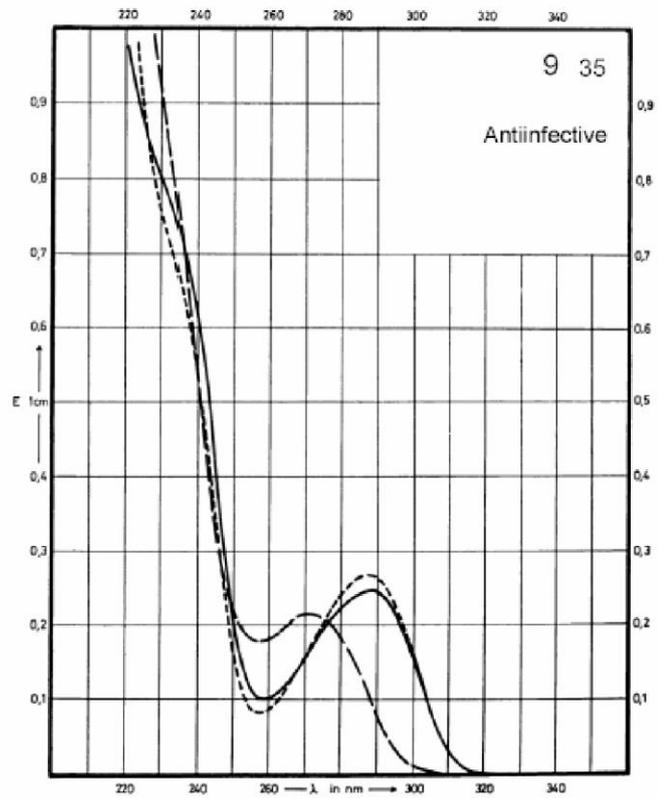
Name TRIMETHOPRIM



M_r 290.3

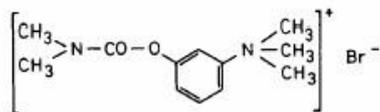
Concentration 1 mg / 100 ml

| Solvent Symbol | Methanol | Water | 0.1 M HCl | 0.1 M NaOH |
|-----------------------|----------|-------|-----------|------------|
| Maximum of absorption | 288 nm | | 271 nm | 288 nm |
| 1% E _{1cm} | 232 | | 208 | 252 |
| ϵ | 6730 | | 6040 | 7320 |



Neostigmine bromide

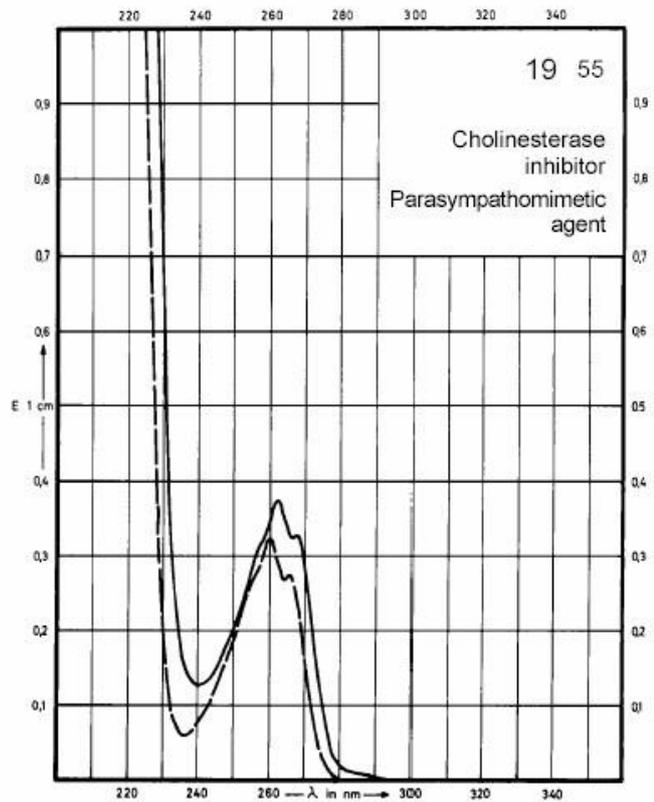
Name **NEOSTIGMINE BROMIDE**



M_r 303.2

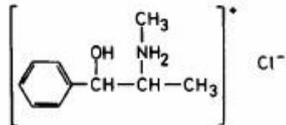
Concentration 20 mg / 100 ml

| Solvent Symbol | Methanol | Water | 0.1 M HCl | 0.1 M NaOH |
|-----------------------|------------------|-------|------------------|------------------------|
| Maximum of absorption | 267 nm 261 nm | | 266 nm 260 nm | Decomposition observed |
| 1% E 1cm | 16.2 18.5 | | 13.8 15.9 | |
| ϵ | 490 590 | | 410 480 | |



Ephedrine hydrochlorid

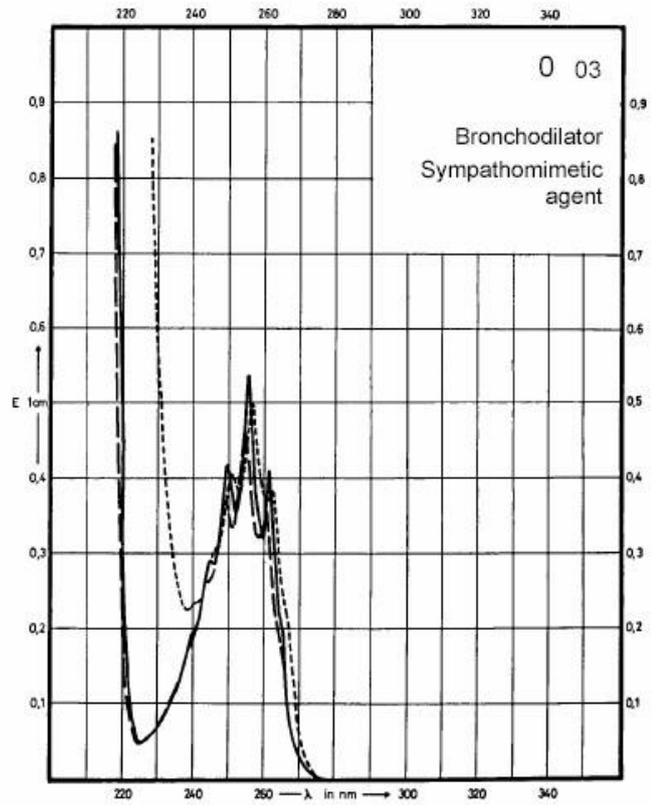
Name EPHEDRINE
HYDROCHLORIDE



M_r 201.7

Concentration 50 mg / 100 ml

| Solvent Symbol | Methanol | Water | 0.1 M HCl | 0.1 M NaOH |
|-----------------------|----------------------------|-------|----------------------------|----------------------------|
| Maximum of absorption | 262 nm 256 nm 250 nm | | 262 nm 256 nm 250 nm | 263 nm 257 nm 251 nm |
| E 1% 1cm | 8.2 10.8 8.4 | | 7.2 9.4 7.4 | 7.4 9.7 7.8 |
| ε | 185 220 170 | | 145 190 150 | 150 195 160 |

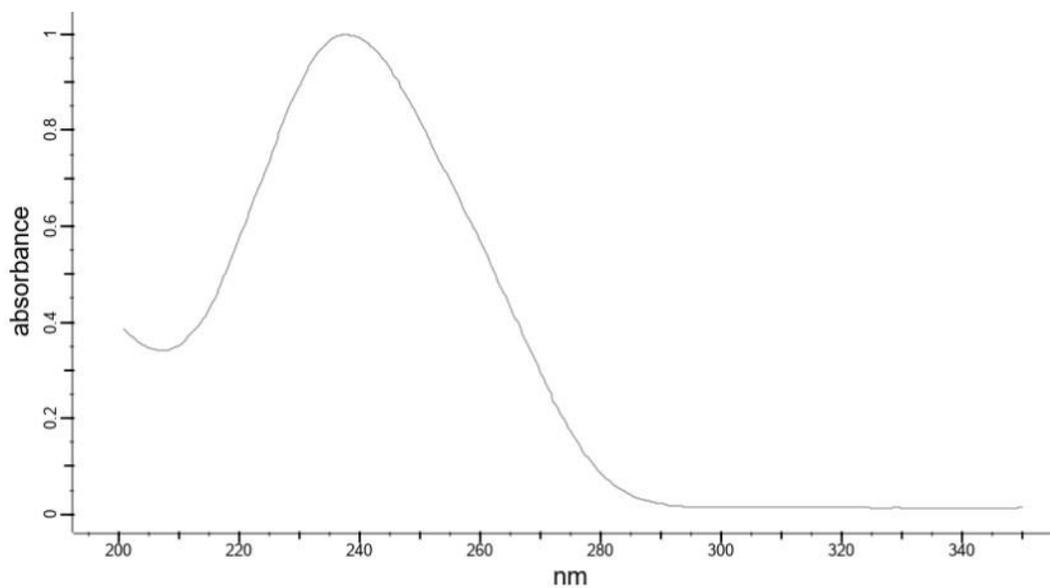
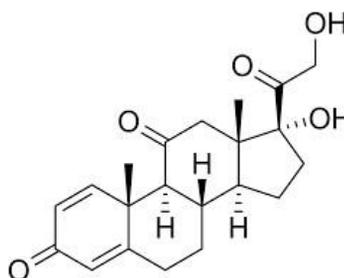


Prednisone

Name: Prednisone

Max: 238 nm

$\epsilon = 15500$



Determinazione del potere antiossidante di acido ascorbico tramite saggio con DPPH:

Facendo reagire il DPPH• (2,2-difenil-1-picrilidrazile) con un composto antiossidante in grado di cedere un radicale idrogeno, si verifica una decolorazione della soluzione da viola a giallo, dovuta alla scomparsa del radicale DPPH, che può essere monitorata nel tempo per via spettrofotometrica alla lunghezza d'onda del massimo di assorbimento $\lambda_{\text{max}} = 517 \text{ nm}$.

La soluzione madre di DPPH è già pronta ed è stata preparata nel seguente modo: circa 4 mg di polvere esattamente pesati sono sciolti e portati al volume di 100 mL con metanolo.

La soluzione di acido ascorbico va preparata sciogliendo 4.1 mg di sostanza in 50 mL di metanolo, esattamente misurati, e diluendo 5 mL di questa soluzione con 5 mL di metanolo.

Per l'analisi di acido ascorbico si procede aggiungendo ad un volume costante di soluzione radicalica (3 mL) volumi crescenti di soluzione madre e portando al volume di 5 mL con metanolo. Si segua lo schema sotto riportato e si calcolino le concentrazioni finali di acido ascorbico nelle soluzioni 1, 2 e 3:

| Soluzione | Madre Ac. Ascorb. | DPPH | Metanolo |
|------------------|--------------------------|-------------|-----------------|
| BLANK | 0,0 mL | 0 mL | 5 mL |
| STD | 0,0 mL | 3 mL | 2,0 mL |
| 1 | 0,1 mL | 3 mL | 1,9 mL |
| 2 | 0,2 mL | 3 mL | 1,8 mL |
| 3 | 0,3 mL | 3 mL | 1,7 mL |

Una volta preparate le soluzioni, le si lasciano riposare al buio per 30 minuti e poi si procede alla lettura allo strumento.

Azzerare lo spettrofotometro con la soluzione BLANK di solo metanolo. Successivamente leggere e registrare sul quaderno per prima l'assorbanza della soluzione STD di DPPH standard e quindi quella delle soluzioni di Acido Ascorbico 1, 2 e 3.

Il potere antiossidante dell'acido ascorbico viene espresso come EC50, cioè come la concentrazione di acido ascorbico in grado di diminuire del 50% l'assorbanza iniziale del radicale a 517 nm. Per calcolare questo valore è necessario costruire una retta di taratura in cui si rapporta il calo % di assorbanza della soluzione di DPPH dopo reazione con acido ascorbico (delta%; in ascissa) con la concentrazione delle soluzioni 1, 2 e 3 (espressa in mg/mL; in ordinata). delta% è calcolato come segue:

$$\text{delta\%} = \frac{[\text{Abs}(\text{soluzione DPPH STD}) - \text{Abs}(\text{soluzione ascorbico})]}{\text{Abs}(\text{soluzione DPPH STD})} \times 100$$

Il valore di EC50 è estrapolato dall'equazione della retta ottenuta, stabilendo $y = 50$. Esprimere il valore in $\mu\text{g/mL}$.