

*Université de Jijel*

*Faculté des sciences exactes & sciences de la nature et de la vie*

*Département de microbiologie appliquée & sciences alimentaires*

*3<sup>ème</sup> année contrôle de qualité*

*Module de Biochimie alimentaire*

*Année universitaire 2023-2024*

## **TP 5 : Dosage des acides gras dans une huile d'olive par CG-MS**

### **Réactifs**

#### **Hydroxyde de sodium dans eau/méthanol 1/4 :**

Hydroxyde de sodium	70 g
Eau distillée	q.s.p.100 ml

#### **Laisser refroidir**

Méthanol	q.s.p.500 ml
----------	--------------

#### **Solution mère de BHT (antioxydant) :**

BHT	100 mg
Méthanol	q.s.p.100 ml

**Les solutions que l'on veut protéger sont à 0,5 ppm de BHT**

**(0,5 ml de la solution mère/l de solvant).**

#### **Solution de potasse méthanolique (dans méthanol 2 M) :**

Hydroxyde de potassium	11.2 g
Méthanol	q.s.p.100 ml.

### **1. Séparation des acides gras totaux et de l'insaponifiable**

#### **Saponification des lipides**

Dans un flacon à couvercle vissant introduire de 10 à 50 mg d'**huile d'olive**.

- Ajouter 0,5 ml de **potasse méthanolique 2 M (KOH-MeOH)**.
- Mettre **sous atmosphère d'azote**.
- Fermer le flacon hermétiquement.
- Laisser 3 minutes au bain-marie à **90 °C**.

#### **Extraction de l'Insaponifiable**

Ajouter 0,5 ml d'**eau distillée**, et 0,4 ml d'**éthanol**.

- (\*) Ajouter 2 ml d'**hexane**.
- Fermer le flacon.
- Agiter au vortex.
- Centrifuger 10 minutes à **630 G**.
- Prélever la **phase supérieure (hexane)**.
- Déposer le **surnageant** dans un tube à hémolyse préalablement taré.
- Recommencer une **deuxième**, et éventuellement une **troisième fois** l'opération à partir de (\*) avec 1ml d'**hexane**.
- Evaporer l'**hexane** au bain-marie, puis essuyer le tube.
- Laisser revenir à la température ambiante dans un dessiccateur, puis peser.

### Extraction des acides gras

Ajouter 0,5 ml d'**acide chlorhydrique 6 N**.

- Agiter au vortex.
- (\*) Ajouter 2 ml d'**hexane**.
- Fermer le flacon.
- Agiter au vortex.
- Centrifuger 10 minutes à **630 G**.
- Prélever la **phase supérieure (hexane)**.
- Déposer le surnageant dans une fiole tarée avec un bouchon avec un joint « téflonné ».
- Recommencer une **deuxième**, et éventuellement une **troisième fois** l'opération à partir de (\*) avec 1ml d'**hexane**.
- Evaporer au bain-marie, puis essuyer le tube.
- Laisser revenir à la température ambiante dans un dessiccateur, puis peser.
- Mettre sous atmosphère d'azote et conserver au congélateur.

## 2. Préparation des esters méthylés d'acides gras

### Réactifs

### **Acide chlorhydrique 2,5 % (0,7 M) dans du méthanol**

Acide chlorhydrique 37 % (Merck 317)	.....6.76 ml
Méthanol (Prolabo Normapur)	.....q.s.p.100 ml

### **Mode opératoire**

- Ajouter 1 ml d'**acide chlorhydrique 2,5 %** dans du **méthanol** aux acides gras après les avoir pesés ;
- Laisser au bain-marie à 90 °C pendant 3 minutes ;
- Ajouter 1 ml d'**eau Milli-Q** ;
- Ajouter 2 ml d'**hexane** ;
- Fermer le flacon ;
- Agiter au vortex ;
- Centrifuger 10 minutes à **630 G** ;
- Prélever au moins 90 % de la **phase supérieure (hexane)** ;
- Déposer le surnageant dans une **fiole de Wheaton** préalablement tarée ;
- Evaporer au **bain-marie**, puis essuyer le tube ;
- Laisser revenir à la **température ambiante** dans un dessiccateur, puis peser ;
- Diluer dans 0.5 ou 1 ml d'**hexane**. Ou encore 1ml d'**hexane** pour 60 mg d'**E.M.A.G** ;
- L'échantillon est prêt à être passé en **CPG** ;
- Conserver sous atmosphère d'azote au congélateur.

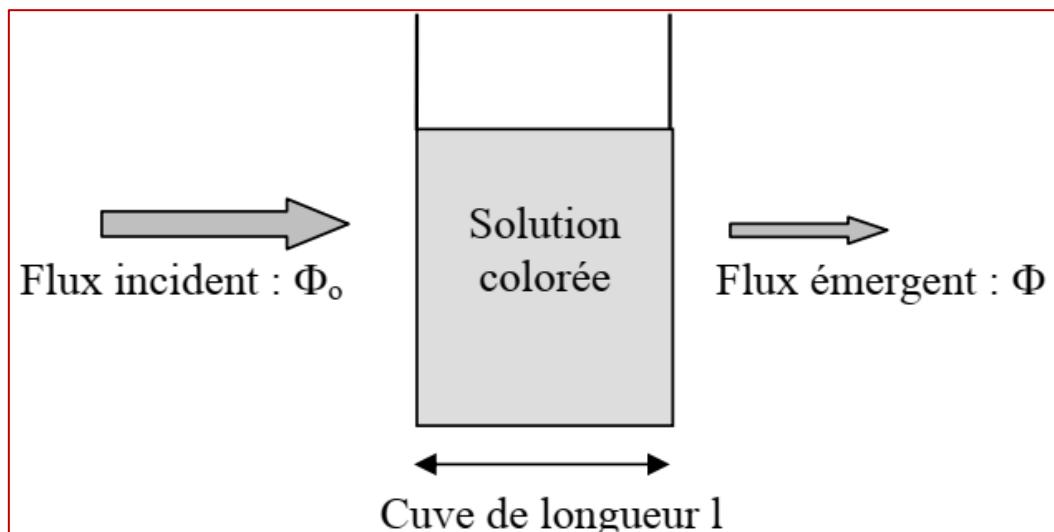
**Caractéristiques de GC/MS-QP2010 (Shimadzu)**

<b>RF Filter</b>	<b>GCMS-QP2010</b>
• Resolution:	• 2M or unity mass
• Mass Range–Daltons:	• 1.5 to 1024
• Mass Stability:	• 0.15 daltons in 12 hrs
• Mass Defect Measurement:	• 0.05 daltons
• Scan Rate:	• 10000 daltons/second
• SIM Mode:	• 64 ions and 64 ion sets
• Scan and SIM:	• 64 time interleaved full scan or 64 ions
• Quadrupole Offset:	• 0-15V
<b>Ion Source</b>	
• Ionization Modes:	• EI, PCI and NCI
• Electron Energy:	• Settable from -10 to -200eV
• Source Temperature:	• Settable from 40-260°C
• Mass Acceleration Voltage:	• Settable from 0-50V
• Emission Current:	• Settable from 10-250 $\mu$ A
• Filament:	• Dual rhodium coil type
<b>Detector</b>	
• Detector Voltage:	• Settable from 500-3000V, time programmable
• Dynode Detector Voltage:	• Settable from ±1000 to 10,000V
<b>Vacuum System</b>	
• Pump(s):	• Dual Differential Turbo: 260 L/sec and 70 L/sec 15 mL/min. max.
• Fore Pump	• 117 L/min N <sub>2</sub>
<b>Tuning</b>	
• Automatic Tuning:	• Mass Pattern–up to 8 tuning masses/user selected • Sensitivity–optimizes one mass • Automatic Tuning-selectable from Batch, System checking or Peak monitor
<b>Column Oven</b>	
• Temperature Range:	• (Ambient + 4°C)-450°C, -50°C-450°C
• Inner Dimensions and Volume:	• 28 x 17.5 x 28 (13720cm <sup>3</sup> )
• Temperature Accuracy:	• ±1% (0.01°C step calibration possible)
• Temperature Variation Coefficient:	• 0.01°C/C
• Number of Temperature Programming Steps:	• 20 and 21 holds (heating or cooling ramps)
• Programming Rate Setting:	• 250-250°C/min
• Total System Time:	• 9999.99 min
<b>Injection Port</b>	
• Maximum split/splitless injector units:	• 2 with optional additional wide bore injector unit, single Split/Splitless standard
• Direct (without split) injection unit (option):	• 2 WBI injectors optional
• On-column/PTV (Programmable Temperature Vaporizer) injection unit (option):	• 2 OCI/PTV units optional
<b>Advanced Flow Controller (AFC)</b>	
• Pressure Range:	• 0-970 kPa
• Number of Pressure Ramps:	• 7 Positive or Negative pressure ramps
• Pressure Program Rate Setting Range:	• -400-400 kPa/min
• Split Ratio Range:	• 0-1500/1
• Total Flow Rate Setting Range:	• 0-1200 mL/min
<b>Constant Linear Velocity</b>	• Yes
<b>Sensitivity</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• EI Scan Octafluoronaphthalene 1pg&gt;60/1 RMS m/z 272</li> <li>• EI SIM Octafluoronaphthalene 100 fg &gt;60/1 RMS m/z 272</li> <li>• PCI Benzophenone Scan 100 pg &gt;150/1 m/z 183</li> <li>• NCI Octafluoronaphthalene scan 100 fg &gt;100/1 RMS m/z 272</li> </ul>

## TP 5 : Spectrophotométrie

La spectrophotométrie permet l'*étude de solutions colorées* dans l'infrarouge (1 100 nm au maximum), dans le visible et dans l'ultraviolet (190 nm).

### 1) Grandeurs spectrophotométriques



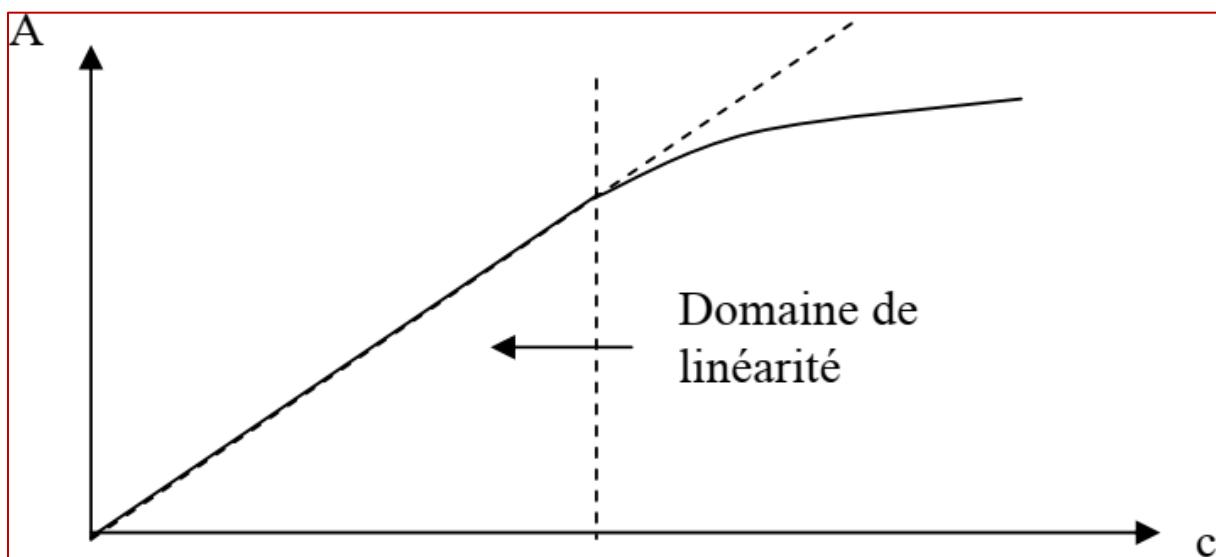
- **Transmission** :  $T = \Phi/\Phi_0$  (%)
- **Opacité** :  $O = \Phi_0/\Phi$
- **Absorbance** (ou *densité optique D.O*) :  $A = \log_{10} \frac{\phi}{\phi_0} = -\log_{10}(T)$ .

### 2) Loi de Beer-Lambert : $A = \varepsilon c l$

- $l$  = longueur de la cuve (1 cm en général, avec une précision de 1 %)
- $c$  = concentration de la solution
- $\varepsilon$  = absorbance linéaire décimale ou coefficient d'extinction spécifique qui dépend de la longueur d'onde.  $\varepsilon$  varie également en fonction des forces intermoléculaires et donc du solvant utilisé.

### Conditions de validité de la loi de Beer-Lambert

- la lumière utilisée est **monochromatique**
- la concentration n'est pas trop élevée :  $c \approx 10^{-2}$  mol.L<sup>-1</sup> en général pour que les interactions entre molécules soient négligeables.



- la solution n'est pas fluorescente : pas de réémission de lumière dans toutes les directions
- la solution n'est pas trop concentrée en sels incolores
- la dilution n'entraîne pas un déplacement de l'équilibre chimique :



- la solution doit être limpide (pas de précipité ou de trouble qui entraîneraient une diffusion de la lumière)

*Il faut travailler en lumière monochromatique* car  $\varepsilon$  est fonction de la nature du corps absorbant, de la température et de la longueur d'onde.

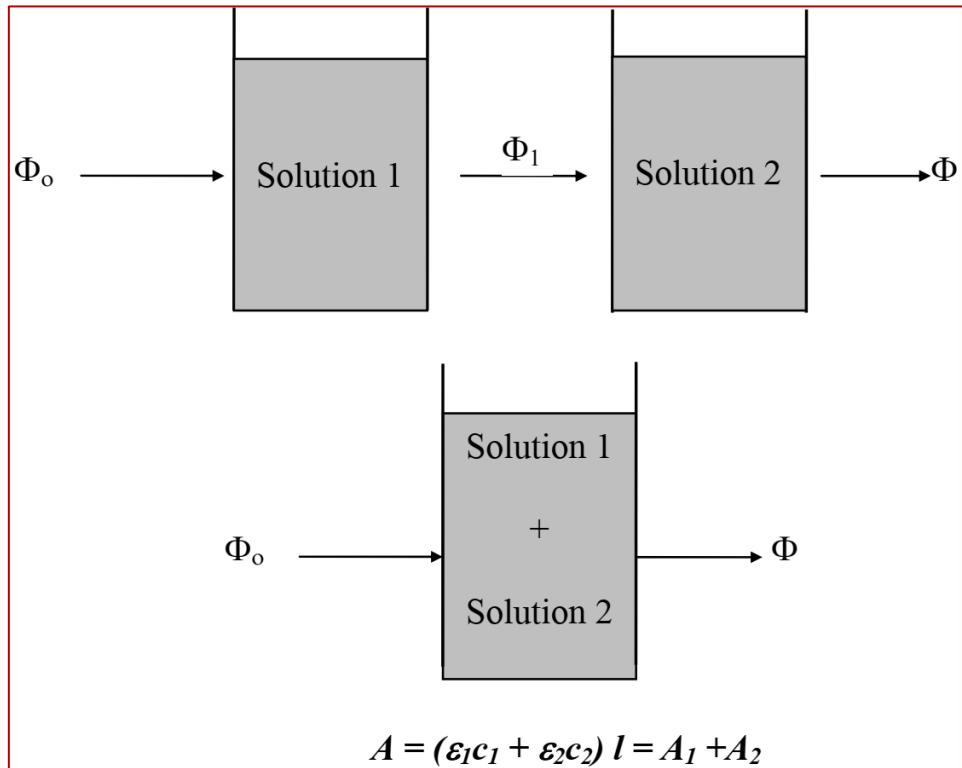
Pour avoir une bonne sensibilité, il faut déterminer la longueur d'onde que la solution absorbe le plus, c'est à dire la longueur d'onde dont la teinte est complémentaire de celle de la solution.

Deux couleurs sont complémentaires lorsqu'elles donnent du blanc par *addition*.

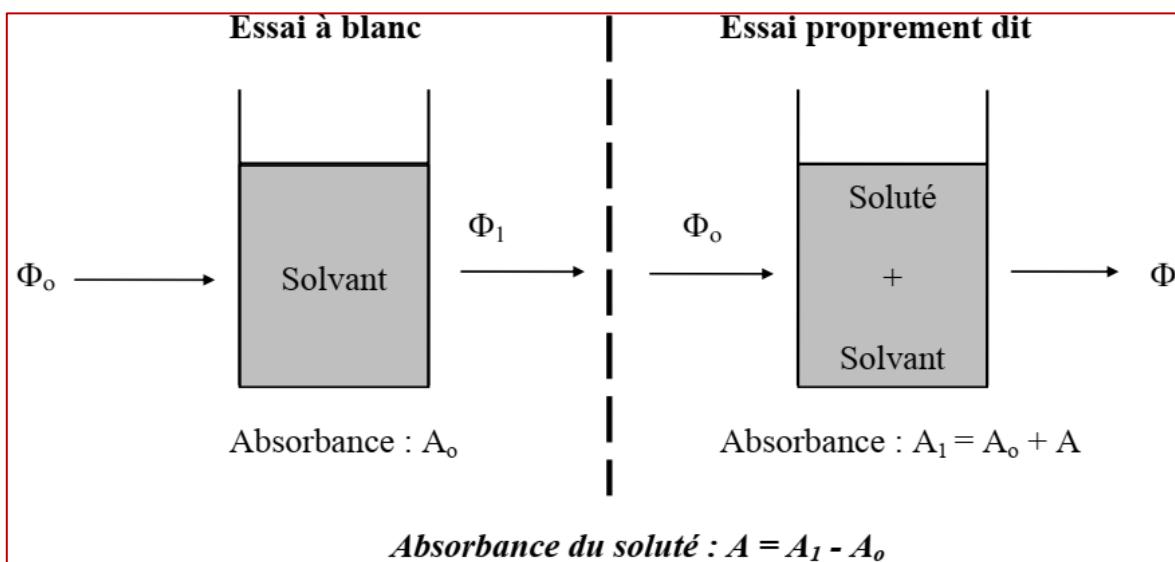
<b>Couleurs primaires</b>	<b>Couleurs complémentaires</b>
Rouge (650 nm)	Cyan (vert-bleu) (500 nm)
Vert (550 nm)	Magenta (rouge violacé) (420 nm)
Bleu (480 nm)	Jaune (580 nm)

### 3) Additivité des absorbances

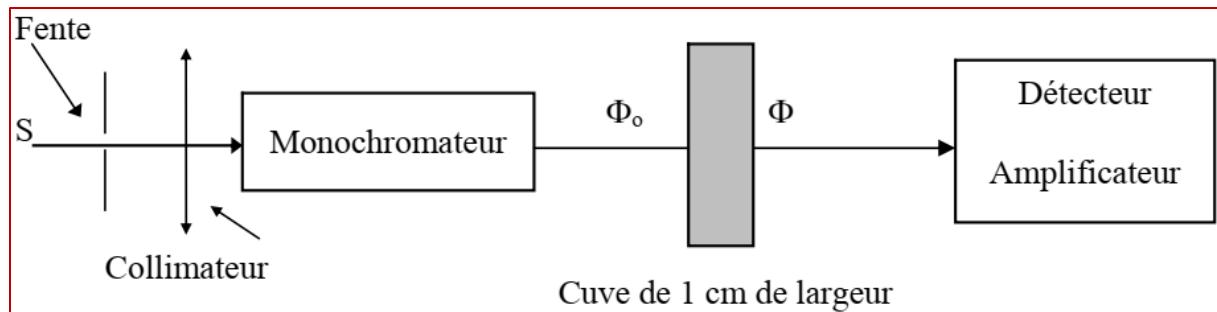
Si 2 solutions absorbent à la même longueur d'onde, l'absorbance du mélange est égale à la somme de leurs absorbances :  $A = A_1 + A_2$



#### 4) Mesure de l'absorbance d'une solution



#### 5) Principe du spectrophotomètre



*S : source lumineuse à spectre continu :*

- lampe à filament de tungstène utilisable entre 300 nm et 1 100 nm,
- lampe à décharge dans le deutérium, utilisable en UV entre 190 nm et 350 nm.

Le **monochromateur à réseau** permet de sélectionner une longueur d'onde et de balayer l'ensemble du spectre lorsque l'on fait tourner le réseau.

Si  $A = 1$ ,  $\frac{\Phi_0}{\Phi} = 10$ , c'est à dire que 90 % de la lumière incidente a été absorbée par l'échantillon contenu dans la cuve.

Si  $A = 2$ ,  $\frac{\Phi_0}{\Phi} = 100$ , c'est à dire que 99 % de la lumière incidente a été absorbée par l'échantillon contenu dans la cuve.

On est donc limité par la *sensibilité du détecteur*.

Détecteurs utilisés :

- Cellule photoélectrique
- Barette de diodes CCD
- Photomultiplicateur

Les meilleurs spectrophotomètres mesurent des absorbances maximales égales à 3.

Université de Jijel

Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département de Microbiologie Appliquée et Sciences des aliments

Licence : Microbiologie

Année universitaire 2019-2020

## TP 2 : Réalisation d'une courbe d'étalonnage de la tyrosine

Il s'agit d'établir un rapport numérique entre la densité optique (DO) et la concentration de la solution de tyrosine.

Pour y parvenir, des mesures de DO seront effectuées sur série de solution étalons de la tyrosine et les résultats obtenus seront portés en graphiques.

### Réactifs

- **Solution mère de Tyrosine à 0.01 %**
- **Solution de TCA à 4 %**
- **Solution de Carbonate de sodium (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) à 0.2 % dans le NaOH 0.1 N**
- **Réactif de Folin-ciocalteu à 50 % dans l'eau distillée**
- **Eau distillée.**

### Protocole expérimental

Réaliser des dilutions de la solution mère de tyrosine :

Tubes	1	2	3	4	5	6
<b>Solution mère de Tyrosine à 0.01 % (ml)</b>	<b>0.0</b>	<b>0.1</b>	<b>0.2</b>	<b>0.3</b>	<b>0.4</b>	<b>0.5</b>
<b>TCA à 4 % (ml)</b>	<b>0.5</b>	<b>0.4</b>	<b>0.3</b>	<b>0.2</b>	<b>0.1</b>	<b>0</b>
<b>Carbonate de sodium à 0.2 % dans le NaOH 0.1 N (ml)</b>	<b>2.5</b>	<b>2.5</b>	<b>2.5</b>	<b>2.5</b>	<b>2.5</b>	<b>2.5</b>
<b>Agiter et incuber pendant 10 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière</b>						
<b>Réactif de Folin-ciocalteu à 50 % (ml)</b>	<b>0.5</b>	<b>0.5</b>	<b>0.5</b>	<b>0.5</b>	<b>0.5</b>	<b>0.5</b>
<b>Incubation variant de 30 minutes à 45 minutes, à la température ambiante et à l'obscurité</b>						

- A la longueur d'onde  $\lambda = 750 \text{ nm}$ , lire la **DO** des solutions étalon de la tyrosine ;
- Porter en **graphique** la **DO** de chacune des solutions étalon en fonction de sa **concentration**.

*Université de Jijel*

*Faculté des sciences de la nature et de la vie*

*Département de Microbiologie Appliquée et Sciences des aliments*

*Licence : Microbiologie*

*Année universitaire 2019-2020*

## **TP 5 : Dosage du Zn dans une semoule par SAAF**

### **La semoule**

L'extraction se fait avec l'eau régale.

### **1. Principe**

Dans une première étape, l'échantillon est séché et homogénéisé. Il est ensuite minéralisé avec l'eau régale dont le grand pouvoir de dissolution est du à l'effet combiné d'un acide oxydant  $\text{HNO}_3$  et des ions  $\text{Cl}^-$  complexant (HCl), dans un bain de sable qui maintient la température constante à 150 °C. Du peroxyde d'hydrogène est ajouté pour détruire la matière organique.

Les résultats sont par la suite reportés à l'échantillon en  $\mu\text{g/kg}$  poids humide. Cette méthode permet aussi la détermination de la quantité totale de toute une série d'éléments traces métalliques (ETM).

### **2. Matériel et réactifs**

Hotte

Bain de sable

Balance

Mortier

Tamis (2mm)

$\text{HNO}_3$  concentré

$\text{HCl}$  concentré

$\text{H}_2\text{O}_2$  (30 %)

Eau déminéralisée

Eau distillée

Erlenmeyer rodé (250 ml)

Bécher (100 ml)

### **3. Protocole d'analyse**

### a) Préparation des échantillons

- Prélever environ 5 g de l'échantillon ;
- Broyer jusqu'à ce que l'échantillon soit pulvérisée et homogène.

### b) Minéralisation de l'échantillon

- Prélever environ 1 g de l'échantillon sec et noter le poids.
- Déposer dans un bécher.
- Ajouter 6 ml de  $\text{HNO}_3$  concentré 2 ml de  $\text{HCl}$  concentré et laisser reposer environ 30 minutes sous la hotte.
- Chauffer les contenants de bécher dans le bain de sable (à environ  $150^\circ\text{C} \pm 10^\circ\text{C}$ ) jusqu'à ce que le volume atteigne environ 0,5 à 1,0 ml. La durée du chauffage pourra être près de 45 minutes.
- Ajouter 2 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30 %) et laisser évaporer de moitié sans porter à sec. La durée du chauffage sera d'environ 30 minutes.
- Ajouter 3 ml de  $\text{HNO}_3$  concentré et 1 ml de  $\text{HCl}$  concentré.
- Laisser le gaz s'échapper pendant quelques minutes en agitant légèrement.
- Refermer hermétiquement et déposer dans le bain de sable. Laisser chauffer durant 1 heure.
- Transférer le tout dans un tube de polypropylène de 50 ml.
- Refermer le tube et agiter afin de rendre homogène.

## 4. Dosage

Le spectromètre utilisé est de type **Shimadzu AA 6200**, équipé d'une lampe à cathode creuse de l'élément à analyser, d'une lampe au deutérium pour correction de bruit de fond, et d'un ensemble nébuliseur-brûleur-air-acétylène.

La mesure d'intensité lumineuse est faite à une longueur d'onde spécifique de l'élément analysé, elle correspond au rapport des intensités incidente et transmise, est mesurée à l'aide d'un prisme dispersif et d'une cellule photoélectrique : elle est directement proportionnelle à la concentration de l'élément « **loi de Beer-Lambert** ». La lecture a été effectuée à la longueur d'onde suivante :

Élément	Longueur d'onde	Limites de détection
Zn	283.3 nm	2 $\mu\text{g/L}$