



African Food Tradition rEvisited by Research  
FP7 n°245025

Start date of project: **01/09/2010**  
Duration: **45 months**

**Deliverable number : D.1.2.3.13.**

**Title of deliverable: Biochemical and nutritional analysis for Group 3**

Deliverable type (Report, Prototype, Demonstration, Other): Report

Dissemination level (PU, PP, RE, CO)\*: PU

Contractual date of delivery: February 2011

Actual date of delivery: October 2011

Work-package contributing to the deliverable: WP1

Organisation name of lead contractor for this deliverable: CIRAD

Authors: are indicated on the appropriate SOPs.

**This document has been send to :**

The coordinator by WP Leader	Date: September 2011
To the Commission by the Coordinator	Date: October 2011

\* PU: Public; PP: Restricted to other programme participants (including the Commission Services); RE: Restricted to a group specified by the consortium (including the Commission Services); CO: Confidential, only for members of the consortium (including the Commission Services)

## **Methodology for the development of SOPs for this deliverable.**

This deliverable consists of several SOPs. SOPs related to Biochemical and nutritional analysis for one Group of product.

The SOP's come from four sources:

1. The literature by searching the analysis method for similar components we want to determine in the African fermented and functional products. In this case several articles are combined according to their precisions.
2. Standards from the international Organization Standardization (ISO) or AACC the International Approved methods. In this case, the method is used like that or after minor modifications. And the modifications are then precised in the document, with the ISO or AACC joined in the annex. To be in agreement with intellectual property rules the project coordination purchased and distributed to partners all the standards referenced in SOP
3. The SOP's can come from the laboratory that developed the methods for the specific analysis.
4. Case of the kit enzymatic method developed by the vendors of the kit materials.

After writing, the SOP's are approved by the Work Package Leader (WPL) related to the group of product concerned (Group 1: WP2; Group 2: WP3; Group 3: WP4).

The WPL is in charge to send the SOP's to the concerned partners for validation. Each partner, according to his laboratory facilities, validates the method and informs one of the following alternatives in his laboratory:

- R - The laboratory makes the analysis in routine (= R codification in the table joined)
- P - The laboratory is able to make this analysis (= possible P)
- B - The laboratory can make the analysis after buying equipment (= B)
- I - The laboratory can't make the analysis ( I= impossible or sub-contracting).

The WPL decides the end of the validation step. He accepts the final SOP version. He completes the table with the last revision date.

**BIOCHEMICAL AND NUTRITIONAL ANALYSIS**

*(R=routine; P=possible ; B=After buying equipment ; I=impossible or sub-contracting)*

Characteristic type	Character	Bissap	Baobab	Jujube	UCAD	ENSAI	CVG	CIRAD	Méthode	Principe	Source	
<b>Deliverable 1.2.3.13 Biochemical and nutritional analysis</b>												
1	Nutritional factors	Vitamin C	*	*	*	R	P	P	R	UCAD	Dosage volumétrique par le 2,6-dichlorophénol-indophénol, qui sert également d'indicateur coloré.	<a href="#">SOPS Groupe 3-Vitamine C.doc</a>
2	Nutritional factors	Vitamin C	*	*	*	R	P	P	R	CIRAD	La vitamine C est extraite de l'échantillon à analyser en utilisant une solution d'acide métaphosphorique (MPA) dont le rôle est également de ralentir l'oxydation de la vitamine C à l'air. Ensuite une solution réductrice tris(2-carboxyéthyl)phosphine hydrochloride (TCEP) est utilisée pour transformer l'acide L(+)-déshydroascorbique (DHAA) en acide L(+)-ascorbique.	<a href="#">SOP Groupe 3-Vitamine C HPLC.doc</a>

3	Nutritional factors	Free amino acids	*	*	*	B	I	I	R	CIRAD	Les acides aminés libres sont extraits par un tampon citrate (pH 2.2) en présence d'un standard interne (norleucine). Ils sont analysés par HPLC en utilisant une résine d'échange cationique. Des tampons de différents pH ainsi qu'un gradient de température (four à effet Peltier) permettent de séparer les différents acides aminés.	<a href="#">SOP Groupe 3- Acides aminés libres.doc</a>
4	Nutritional factors	Total amino acids									Les protéines sont hydrolysées à l'aide d'acide Méthane sulfoxyde 4N à 150°C pendant 2h.	<a href="#">SOP Groupe 3- Acides aminés totaux.doc</a>
5	Biochemical characteristics	Polyphénols totaux	*	*	*	P	P	R	R	CIRAD	Après extraction des polyphénols à l'acétone/eau, les polyphénols sont dosés par la méthode de Folin.	<a href="#">SOP Groupe 3- Polyphénols totaux.doc</a>
6	Biochemical characteristics	Anthocyanes totaux	*	*	*	P	P	P	R	CIRAD	Le principe est basé sur la modification de la coloration des anthocyanes en fonction du pH.	<a href="#">SOPS Groupe 3- Anthocyanes totaux.doc</a>

7	Biochemical characteristics	Capacité antioxydante (DPPH)	*	*	*	B	P	P	R	ENSAI	La méthode est basée sur la dégradation du radical DPPH. Un antioxydant aura la capacité de donner un électron singulet au radical synthétique DPPH de coloration violette pour le stabiliser en DPPH de coloration jaune-verte. La mesure de la décroissance de coloration violette au cours du temps permet de déterminer la EC <sub>50</sub> , temps au bout duquel 50% de coloration est perdue.	<a href="#">SOPS Groupe 3-DPPH.doc</a>
8	Biochemical characteristics	Capacité antioxydante (FRAP)	*	*	*	B	P	P	R	ENSAI	Ce test repose sur la capacité que possède une solution antioxydante à réduire le complexe ferrique-tripyridyltriazine (Fe <sup>3+</sup> -TPTZ) en cation ferreux tripyridyltriazine ([Fe(II)(TPTZ) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup> , qui absorbe dans le spectre UV à 593 nm.	<a href="#">SOPS Groupe 3-FRAP.doc</a>
9	Biochemical characteristics	Capacité antioxydante (ORAC)	*	*	*	I	I	I	R	CIRAD	La mesure du pouvoir antioxydant par la méthode ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) est basée sur la détection de la chute de fluorescence de la fluorescéine (FL), due à sa réaction avec le radical peroxy ROO●, dans une matrice alimentaire contenant des composés antioxydants.	<a href="#">SOP Groupe 3-Orac.doc</a>

10	Biochemical characteristics	Composés d'arôme	*	*	*	I	I	I	R	CIRAD	<p>Piégeage des composés volatils émis, après génération d'un espace de tête contrôlé, sur une fibre SPME. Injection, séparation et analyse sur un système CG-SM, avec semi quantification grâce à un étalonnage interne.</p>	<p><a href="#">SOPS Groupe 3-Composés d'arômes.doc</a></p>
----	-----------------------------	------------------	---	---	---	---	---	---	---	-------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------



**African Food Tradition rEvisited by Research**

**FP7 n°245025**



**Deliverable D.1.2.3.13: SOP for biochemical and nutritional analysis for Group 3**

**Procédure pour la détermination de la vitamine C dans les fruits, légumes et produits dérivés**

**SOP : Nutri-ExtPlantes-01-fr**

Date de creation: 15/06/2011

Révision: 1, CISSE, 27/10/2011

Ecrit par : Ale KANE

Pour plus d'information sur ce SOP, contactez :

- Mady CISSE ([macisse73@hotmail.com](mailto:macisse73@hotmail.com)) / WP4 Leader
- ...
- 
- 

**Ce document a été approuvé par :**

Partenaire	Noms des personnes l'ayant approuvé	Date DD/MM/YY
CIRAD		
CVG		
ENSAI	Robert NDJOUENKEU	02/07/2011
UCAD	Mady CISSE	03/07/2011

Dosage de la vitamine C  
SOP : **Bioch-ExtPlantes-01**

Date de creation: 15/06/2011

Révision : 1, CISSE, 27/10/2011

## Table des matières

<b>1</b>	<b>Domaine et application .....</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Références .....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Définitions .....</b>	<b>3</b>
<b>4</b>	<b>Principe .....</b>	<b>3</b>
<b>5</b>	<b>Réactifs .....</b>	<b>4</b>
<b>6</b>	<b>Appareillage .....</b>	<b>4</b>
<b>7</b>	<b>Procédure .....</b>	<b>5</b>
<b>8</b>	<b>Expression des résultats .....</b>	<b>6</b>
<b>8.1</b>	<b>Mode de calcul et formules .....</b>	<b>6</b>
<b>8.1.1</b>	<b><i>Calculs</i> .....</b>	<b>6</b>
<b>8.1.2</b>	<b><i>Formules</i> .....</b>	<b>6</b>
<b>9</b>	<b>Rapport d'essai .....</b>	<b>7</b>
<b>10</b>	<b>Enregistrement des Révisions .....</b>	<b>7</b>



Dosage de la vitamine C SOP : <b>Bioch-ExtPlantes-01</b>	
Date de creation: 15/06/2011	Révision : 1, CISSE, 27/10/2011

## 1 DOMAINE ET APPLICATION

Applicable aux fruits, légumes et produits dérivés.

## 2 REFERENCES

Méthode volumétrique au Dichlorophénol Indophénol (DCPIP).

## 3 DEFINITIONS

L'acide ascorbique est un solide blanc cristallisé, très soluble dans l'eau. C'est dérivé des hexoses. Il en existe deux formes :

- acide D ascorbique (sans propriété vitaminique),
- acide L ascorbique, qui est la vitamine C.

Elle est sensible à la chaleur et à l'oxydation. On la trouve dans les aliments frais, surtout si le milieu est acide, ce qui stabilise la vitamine C.

## 4 PRINCIPE

La vitamine C, composant essentiel de l'alimentation de l'homme, se trouve à l'état naturel dans les fruits et les légumes.

Il s'agit d'acide ascorbique qui, du point de vue chimique, est un composé réducteur, On pourra donc la doser au moyen d'un oxydant, par exemple le 2,6-dichlorophénol-indophénol, qui sert également d'indicateur coloré.

Les solutions d'acide ascorbique sont incolores ; une goutte en excès de 2,6-DCPIP donnera à la solution une coloration rose,

Remarque : Il est nécessaire de rajouter dans les solutions d'acide ascorbique, de l'acide oxalique qui a un effet stabilisant et qui maintient le milieu acide et réducteur.

Dosage de la vitamine C  
SOP : **Bioch-ExtPlantes-01**

Date de creation: 15/06/2011

Révision : 1, CISSE, 27/10/2011

## 5 REACTIFS

- Solution de dichloro-2.6 phénolindophénol DCPIP

### Préparation :

- 50 mg dichloro-2.6 phénolindophénol dans 50 ml d'eau distillée contenant 42 mg de bicarbonate de soude ( $\text{NaHCO}_3$ ) ;
- Compléter à 200 ml avec de l'eau distillée ;
- Acide oxalique pur ( $\text{H}_2\text{CO}_4$ ) sous forme cristalline ;
- Solution d'acide oxalique ( $\text{H}_2\text{CO}_4$ ) à 4 g/L dans de l'eau distillée ;
- Sulfate d'ammonium ( $\text{NH}_4$ ) $_2$  $\text{SO}_4$  ;
- Solution d'extraction (prête à l'emploi):  
Pour 5 l de solution, dissoudre à chaud 100g d'acide, métaphosphorique dans 500ml d'eau distillée environ, Ajouter 2 kg de sulfate d'ammonium R,I et compléter avec de l'eau distillée à 5l, Mélanger, Placer la solution au congélateur à 10°C ;
- Solution étalon de vitamine C (acide ascorbique) à 0,5 g/L dans de l'acide oxalique à 4 g/L : cette solution est préparée extemporanément ;
- Ethanol 96°.

## 6 APPAREILLAGE

- Balance analytique ;
- Burette à robinet ;
- Fiole à erlenmeyer ;
- Fiole jaugée de 200 mL.
- Pipette jaugée de 5 mL ;
- Verre fritté de porosité n°4 (Büchner) ;
- Papier filtre ;
- Broyeur mécanique

Dosage de la vitamine C  
SOP : **Bioch-ExtPlantes-01**

Date de creation: 15/06/2011

Révision : 1, CISSE, 27/10/2011

## 7 PROCEDURE

### 1- EXTRACTION

Peser, à 0,01 près, une masse  $P_E$  de produit végétal et broyer dans environ 125 ml de solution d'extraction froide. Le broyat est versé dans une fiole jaugée de 200 ml.

Compléter à 200 ml avec la solution d'extraction, La mousse formée lors du broyage peut être éliminée par addition de quelques ml d'alcool à 96 °. Agiter. Filtrer sous vide sur entonnoir à plaque en verre fritté de porosité n°4 (Büchner), (La filtration est difficile, il suffit de récupérer 20 à 30 ml de filtrat pour les dosages). Le filtrat obtenu est utilisé pour le dosage.

### 2- DOSAGE

#### - Etalonnage

Dans une fiole d'erenmeyer, introduire :

- Un volume de 5 mL de la solution étalon de vitamine C ;
- 10 mL d'eau distillée refroidie ;
- Verser à la burette la solution de 2,6-DCPIP jusqu'à apparition d'une coloration rose pâle persistante pendant 30 secondes. Soit  $V_1$  la moyenne arithmétique des volumes versés avec les différents essais (deux au minimum).

#### - Dosage de la vitamine C dans l'extrait filtré:

Doser, comme précédemment, 5 ml du filtrat en ayant soin de rajouter dans le bécher de dosage environ 50 mg d'acide oxalique. Soit  $V_2$  la moyenne arithmétique des volumes versés avec les différents essais (deux au minimum).

Dosage de la vitamine C  
SOP : **Bioch-ExtPlantes-01**

Date de creation: 15/06/2011

Révision : 1, CISSE, 27/10/2011

## 8 EXPRESSION DES RESULTATS

### 8.1 Mode de calcul et formules

#### 8.1.1 Calculs

V : volume en millilitre de solution de 2,6-DCPIP utilisé pour titrer la solution étalon de vitamine C ;

V<sub>2</sub> : volume en millilitre de solution de 2,6-DCPIP utilisé pour titrer l'extrait vitaminé ;

C : la concentration de la solution étalon de vitamine C exprimée en gramme par litre ;

P<sub>E</sub> : la prise d'essai en gramme (si l'échantillon est solide) ;

V : la prise d'essai en millilitre (si l'échantillon est liquide) ;

T<sub>c</sub> : la teneur en vitamine C.

#### 8.1.2 Formules

##### - Produits solides

La teneur en vitamine C, T<sub>c</sub>, exprimée en gramme pour 100 grammes de produit est donnée par la relation :

$$T_c = C \times \frac{V_2}{V_1} \times \frac{0,2}{P_E} \times 100$$

##### - Produits liquides

La teneur en vitamine C, T<sub>c</sub>, exprimée en gramme par litre de produit est donnée par la relation :

$$T_c = C \times \frac{V_2}{V_1} \times \frac{200}{V}$$

Dosage de la vitamine C  
SOP : **Bioch-ExtPlantes-01**

Date de creation: 15/06/2011

Révision : 1, CISSE, 27/10/2011

## 9 RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit indiquer la méthode utilisée et les résultats obtenus. En outre seront détaillés toute condition opératoire non indiquée dans le SOP, ou optionnelle, et les circonstances particulières qui auraient pu affecter les résultats.

Le rapport d'essai doit inclure tous les détails nécessaires à une identification précise de l'échantillon.

## 10 ENREGISTREMENT DES REVISIONS

Date	Personne responsable	Description de la modification



**African Food Tradition rEvisited by Research**

**FP7 n°245025**



**Deliverable D.1.2.3.13: SOP biochemical and functional analysis for Group 3**

**Procédure pour la détermination de la vitamine C dans les extraits de plantes par HPLC**

**SOP : Nutri-ExtPlantes-02-fr**

Date : **26/08/2011**

Version: **1**

Ecrit par : Laetitia MESTRES

Pour plus d'information sur ce SOP, contactez :

- Mady CISSE ([macisse73@hotmail.com](mailto:macisse73@hotmail.com)) / WP4 Leader
- 
- 
- 

**Ce document a été approuvé par :**

Partenaire	Noms des personnes l'ayant approuvé	Date DD/MM/YY
CIRAD	Laetitia MESTRES	
CVG		
ENSAI	Robert NDJOUENKEU	02/10/2011
UCAD	Mady CISSE	01/10/2011

## **Table des matières**

<b>1</b>	<b>Domaine et application .....</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Références .....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Définitions .....</b>	<b>3</b>
<b>4</b>	<b>Principe .....</b>	<b>3</b>
<b>5</b>	<b>Réactifs .....</b>	<b>4</b>
<b>6</b>	<b>Appareillage .....</b>	<b>4</b>
<b>7</b>	<b>Procédure .....</b>	<b>5</b>
<b>8</b>	<b>Expression des résultats .....</b>	<b>6</b>
<b>8.1</b>	<b>Mode de calcul et formules .....</b>	<b>6</b>
<b>8.1.1</b>	<b><i>Calculs .....</i></b>	<b>6</b>
<b>8.1.2</b>	<b><i>Formules .....</i></b>	<b>7</b>
<b>8.2</b>	<b>Répétabilité.....</b>	<b>7</b>
<b>9</b>	<b>Points critiques et Note sur la procedure.....</b>	<b>7</b>
<b>10</b>	<b>Rapport d'essai .....</b>	<b>8</b>
<b>11</b>	<b>Enregistrement des Révisions.....</b>	<b>8</b>
<b>12</b>	<b>Annexe .....</b>	<b>8</b>

# Détermination de la vitamine C dans les extraits de plantes par HPLC

## SOP : Nutri-ExtPlantes-02

Date: 27/10/2011

Version : 1

## 1 DOMAINE ET APPLICATION

La présente méthode spécifie une méthode de chromatographie liquide à haute performance (CLHP) qui permet de doser l'acide dehydroascorbique dans les fruits, par utilisation d'une solution réductrice tris(2-carboxyéthyl)phosphine hydrochloride (TCEP) dans une solution d'acide métaphosphorique.

## 2 REFERENCES

Y. Sato, T. Uchiki, M. Iwama, Y. Kishimoto, R. Takahashi, A. Ishigami. (2010). Determination of dehydroascorbic acid in mouse tissues and plasma by using tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride as reductant in metaphosphoric acid/ethylenediaminetetraacetic acid solution. *Biological pharmaceutical bulletin*, **33**(3) 364-369.

Mertz C., Brat P., Caris-Veyrat C., Günata Z. (2010). Characterization and thermal lability of carotenoids and vitamin C of tamarillo fruit (*Solanum betaceum* Cav.). *Food chemistry*, **119** (2) 653-659.

## 3 DÉFINITIONS

La vitamine C ou acide ascorbique intervient dans de grandes fonctions de l'organisme telles que : la défense contre les infections virales et bactériennes, la protection de la paroi des vaisseaux sanguins, l'assimilation du fer, la détoxification de substances cancérigènes, cicatrisation. Cette vitamine hydrosoluble est également un antioxydant puissant qui agit en synergie avec la vitamine E, le coenzyme Q10 et le glutathion pour éliminer les dérivés toxiques de l'oxygène. La vitamine C est présente dans tous les végétaux mais à des quantités variables.

## 4 PRINCIPE

La vitamine C est extraite de l'échantillon à analyser en utilisant une solution d'acide métaphosphorique (MPA) dont le rôle est également de ralentir l'oxydation de la vitamine C à l'air. Ensuite une solution réductrice tris(2-carboxyéthyl)phosphine hydrochloride (TCEP) est utilisée pour transformer l'acide L(+)-déhydroascorbique (DHAA) en acide L(+)-ascorbique. Les équations de la réaction sont présentées sur la **figure 1**. La teneur totale en acide L(+)-ascorbique est déterminée par CLHP à l'aide d'une détection UV à 265 nm après différence des aires des pics après et avant réduction.



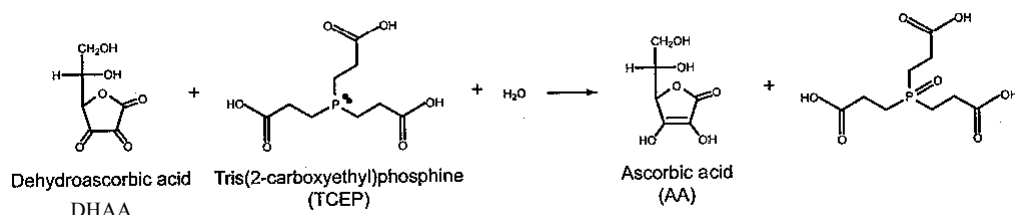
# Détermination de la vitamine C dans les extraits de plantes par HPLC

## SOP : Nutri-ExtPlantes-02

Date: 27/10/2011

Version : 1

- Acide ascorbique (végétal) + MPA  $\rightarrow$   $2H^+ + 2e^-$  + acide déhydroascorbique (DHAA)



**Figure 1 :** Réduction de l'acide dehydroascorbique (DHAA) en acide ascorbique (AA) par le tris(2-carboxyéthyl)phosphine hydrochloride (TCEP) Sato et al., 2010

## 5 REACTIFS

1. Acide ascorbique (AA) commercial
2. Acide métaphosphorique (MPA) 4%
3. Tris(2-carboxyéthyl)phosphine hydrochloride (TCEP) 10 mM préparée dans du MPA 4%.
4. Acide sulfurique 0,1%

## 6 APPAREILLAGE

1. Matériel courant de laboratoire, verrerie
2. HPLC : système DIONEX composé de pompes P680, d'un injecteur automatique ASI 100 et d'un détecteur à barrettes de diodes UVD (DIONEX, France)
3. Colonne Lichrospher ODS-2 C18 (250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m) (INTERCHIM, Montluçon, France) thermostatée à 30°C. Cette colonne est un exemple de produit approprié disponible dans le commerce.

# Détermination de la vitamine C dans les extraits de plantes par HPLC

## SOP : Nutri-ExtPlantes-02

Date: 27/10/2011

Version : 1

## 7 PROCÉDURE

### 7.1 Généralités

Il convient de réaliser les solutions étalons et les solutions d'échantillon aussi rapidement que possible et de les maintenir à une température inférieure à 25°C pendant l'analyse. Elles ne doivent pas être analysées au-delà de 8 heures. Homogénéiser l'échantillon pour essai. Broyer les matières grossières au moyen d'un moulin approprié et de nouveau mélanger. Procéder à l'analyse immédiatement après homogénéisation.

### 7.2 Préparation de la solution d'échantillon pour essai

#### 7.2.1 Extraction

- Dans une fiole jaugée de 50ml et protégée par du papier aluminium, peser 10g d'échantillon fraîchement broyé.
- Ajouter 40ml de solution d'acide métaphosphorique (MPA) 4%
- Agiter durant 5min à 4°C à l'abri de la lumière
- Centrifuger 5 min à 4 °C (10000 rpm) et filtrer le surnageant (filtre Millipore 0.45µm)
- Ajouter 40ml de solution de MPA au culot et agiter 5min à 4°C à l'abri de la lumière
- Centrifuger 5 min à 4 °C (10000 rpm) et filtrer le surnageant (filtre Millipore 0.45µm)
- Rassembler les deux surnageants que nous appelons **la solution d'extrait de l'échantillon**. Elle contient l'acide déhydroascorbique (DHAA) (voir 4-Principe).

#### 7.2.2 Étape de réduction

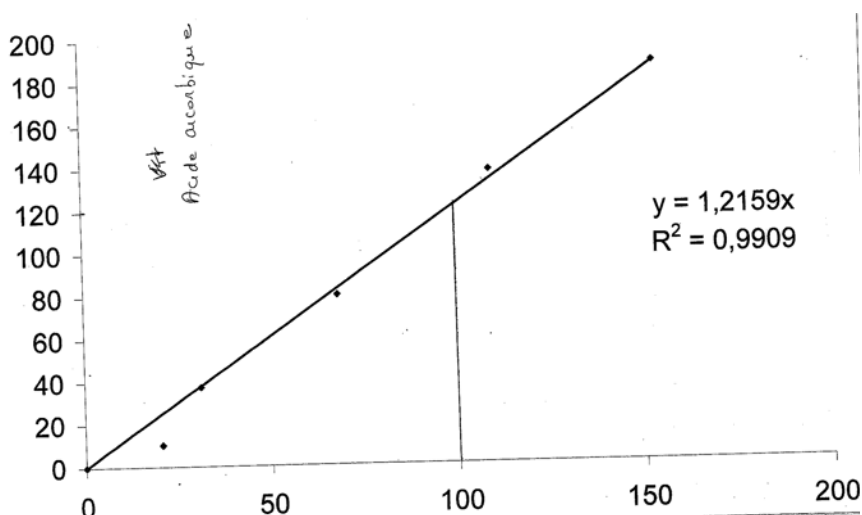
Dans un vial ambré, additionner 500µl de la solution d'extrait de l'échantillon et 500µl d'une solution de tris (2-carboxyéthyl) phosphine hydrochloride (TCEP) à 10 mM dans du MPA 4%. Agiter pendant 60 min à 30°C dans le noir. Ce mélange est utilisé pour la chromatographie.

### 7.3 Conditions HPLC

- Phase mobile : acide sulfurique à 0,01 % (pH = 2,6)
- Débit : 0,8 ml/min, Isocratique
- Four : 30°C
- Détection : 245 nm.
- Injection : 20µl

### 7.4 Solution de calibration

- Réaliser une gamme (10 à 150 mg/L), de l'étalon commercial d'acide ascorbique et tracer la courbe de calibration d'équation  $Y_{\text{aire du pic}} = ax$ , avec Y en mAU, x en mg/L et  $R^2 > 0,99$ . Un exemple de courbe d'étalonnage externe est présenté sur la **figure 2**.



### 7.5 Identification et dosage

Les solutions avant et après réduction sont injectées en HPLC. L'acide ascorbique présent dans les extraits est identifié par comparaison de ses caractéristiques spectrales dans l'UV et par co-injection avec un standard commercial. La quantité de DHAA est déterminée par différence entre l'aire du pic d'acide ascorbique (AA) après et avant réduction.

*NOTE :* Pour réaliser un dosage par étalonnage externe, intégrer les aires de pics ou les hauteurs de pics et comparer les résultats avec les valeurs correspondantes obtenues pour l'étalon. Une autre solution consiste à utiliser une courbe d'étalonnage, auquel cas il faut en vérifier la linéarité.

## 8 EXPRESSION DES RÉSULTATS

### 8.1 Mode de calcul et formules

#### 8.1.1 Calculs

Utiliser l'équation de la droite d'étalonnage  $Y = ax$  et bien appliquer les différents volumes et dilution après et avant réduction. Calculer la fraction massique, de l'acide ascorbique en mg/100g présent dans l'échantillon en tenant compte de tous les éléments

# Détermination de la vitamine C dans les extraits de plantes par HPLC

## SOP : Nutri-ExtPlantes-02

Date: 27/10/2011

Version : 1

### 8.1.2 Formules

1. A partir de la courbe d'étalonnage on calcule la concentration en vitamine C **mg/l** contenue dans l'essai (volume d'injection 20 $\mu$ l).

$$[\text{vitC}] \text{ mg/l} = \Delta\text{DO} / a \dots\dots\dots (1)$$

Où :

- **[vitC]** est la concentration en acide ascorbique exprimée en **mg/l**
- **$\Delta\text{DO}$**  est la différence des densités optiques après et avant l'étape de réduction (cf. 7.2.1) exprimée en unités de surface ou de hauteur;
- **a** est le coefficient directeur de la droite d'étalonnage

2. Calculer la quantité en vitamine C dans l'échantillon de départ, en mg/100g de matière fraîche

$$\text{Acide Ascorbique en mg/100g} = [\text{vitC}] \text{ mg/l} * F * V * 10^{-3} * (100 / m) \dots\dots\dots (2)$$

Où :

- **V** est le volume total de la solution d'échantillon définie en 7.2.1 avant l'étape de réduction, exprimé en millilitres (ml) (**en l'occurrence 80ml**);
- **$10^{-3}$**  est le facteur de conversion de millilitre en litre
- **F** est le facteur de dilution de l'étape de réduction (**en l'occurrence 2**);
- **m** : est la masse de l'échantillon, exprimée en grammes (g) ;
- **100** le coefficient utilisé pour calculer la teneur en mg par 100g
- **100 / m** est pour exprimer la vitamine C en mg/100g
- **Consigner les résultats obtenus pour la vitamine C en mg/100g.**

### 8.2 Répétabilité

## 9 POINTS CRITIQUES ET NOTE SUR LA PROCEDURE

La vitamine C est facilement oxydable en milieu basique mais relativement stable en milieu acide. Pour un meilleur dosage il est impératif de réaliser l'analyse le plus rapidement possible après l'extraction.

# Détermination de la vitamine C dans les extraits de plantes par HPLC

## SOP : Nutri-ExtPlantes-02

Date: 27/10/2011

Version : 1

### 10 RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit au moins indiquer les informations suivantes :

- toutes les informations nécessaires à l'identification complète de l'échantillon;
- une référence à la présente Norme européenne ou à la méthode utilisée;
- le type de mode opératoire d'échantillonnage utilisé et la date (si ces informations sont connues);
- la date de réception de l'échantillon;
- la date de l'essai;
- les résultats ainsi que les unités dans lesquelles ils sont exprimés;
- toute observation digne d'intérêt faite au cours de l'essai;
- toutes les opérations qui ne sont pas spécifiées dans la méthode ou qui sont considérées comme facultatives, ayant pu avoir une incidence sur les résultats.

### 11 ENREGISTREMENT DES REVISIONS

Date	Personne responsable	Description de la modification

### 12 ANNEXE



**African Food Tradition rEvisited by**  
**Research**  
**FP7 n°245025**



**Deliverable D.1.2.3.13: SOP for Biochemical and nutritional analysis for Group 3**

**Procédure pour la détermination des acides aminés libres dans les produits végétaux**

**SOP : Nutri-ExtPlantes-03-fr**

Date : **18/08/201**

Version: **1**

Ecrit par : Gilles MOREL

Pour plus d'information sur ce SOP, contactez :

- Mady CISSE ([macisse73@hotmail.com](mailto:macisse73@hotmail.com)) / WP4 Leader
- ...
- 

**Ce document a été approuvé par :**

Partenaires	Noms des personnes l'ayant approuvé	Date DD/MM/YY
CIRAD		
CVG		
ENSAI	Robert NDJOUENKEU	10/10/2011
UCAD	Mady CISSE	10/10/2011

# Procédure pour la détermination des acides aminés libres dans les produits céréaliers fermentés

SOP : Nutri-ExtPlantes-03.fr

Date: 18/08/2011

Version : 1

## Table des matières

<b>1</b>	<b>Domaine et application .....</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Références .....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Définitions .....</b>	<b>3</b>
<b>4</b>	<b>Principe .....</b>	<b>3</b>
<b>5</b>	<b>Réactifs .....</b>	<b>4</b>
5.1	Consommables et réactifs pour l'analyseur (Biochrom, 30+) .....	4
5.2	Acides aminés .....	4
<b>6</b>	<b>Appareillage .....</b>	<b>5</b>
<b>7</b>	<b>Procédure .....</b>	<b>5</b>
7.1	Extraction des acides amines libres .....	5
7.2	Dosage .....	6
<b>8</b>	<b>Expression des résultats .....</b>	<b>6</b>
8.1	Mode de calcul et formules .....	6
8.2	Répétabilité.....	8
<b>9</b>	<b>Points critiques et Note sur la procedure.....</b>	<b>9</b>
<b>10</b>	<b>Rapport d'essai .....</b>	<b>9</b>
<b>11</b>	<b>Enregistrement des Révisions .....</b>	<b>9</b>
<b>12</b>	<b>Annexe.....</b>	<b>9</b>

# Procédure pour la détermination des acides aminés libres dans les produits céréaliers fermentés

SOP : Nutri-ExtPlantes-03.fr

Date: 18/08/2011

Version : 1

## 1 DOMAINE ET APPLICATION

Cette procédure vise à la détermination des teneurs en acides aminés libres dans les produits végétaux secs, et en particulier les produits céréaliers fermentés.

## 2 REFERENCES

## 3 DEFINITIONS

Lorsque les acides aminés ne sont pas liés ensemble comme peptides ou comme protéines, ils sont appelés "forme libre" ou "acides aminés "libre"

## 4 PRINCIPE

Les acides aminés libres sont extraits par un tampon citrate (pH 2.2) en présence d'un standard interne (norleucine). Ils sont analysés par HPLC en utilisant une résine d'échange cationique. Des tampons de différents pH ainsi qu'un gradient de température (four à effet Peltier) permettent de séparer les différents acides aminés.

L'éluant de colonne est mélangé à du réactif de ninhydrine passant par un serpentini chauffé à haute température formant avec les acides aminés une coloration directement proportionnelle à la quantité d'acides aminés.

Le mélange éluât/ninhydrine passe ensuite dans le photomètre. L'absorption lumineuse est mesurée à deux longueurs d'onde 570 et 440 nm (proline).

Après chaque analyse, la colonne est régénérée par une base forte puis équilibrée avec le tampon de départ avant une prochaine analyse. La séquence d'analyse dure plus de 90 minutes.

La détection limite est de 9 pico moles/l d'acide aminé.



# Procédure pour la détermination des acides aminés libres dans les produits céréaliers fermentés

SOP : Nutri-ExtPlantes-03.fr

Date: 18/08/2011

Version : 1

## 5 REACTIFS

### 5.1 Consommables et réactifs pour l'analyseur (Biochrom, 30+)

- Tampon Citrate de sodium (0,2 M) pH 2.65
- Tampon Citrate de sodium (0,2 M) pH 3.35
- Tampon Citrate de sodium (0,2 M) pH 4.25
- Tampon Borate/ Citrate de sodium (0,5 M) pH 8.6
- Sodium hydroxyde (0,4 M) pH 14
- Tampon de dilution Citrate de sodium pH 2.2
- Réactif Ultra Ninhydrine

**Attention : toujours porter des lunettes de sécurité et des gants protecteurs pour manipuler ces produits chimiques.**

**Les déchets produits par l'analyseur d'acides aminés sont classés comme nocifs et doivent être traités comme tels.**

### 5.2 Acides aminés

- Acides Aminés Standard (Sigma AA-S18): contient 18 acides aminés à 2.5  $\mu$ moles/ml, exceptée la L-Cystine à 1.25  $\mu$ mole/ml

7 autres acides aminés seront ajoutés (cette liste n'est pas exhaustive). Pour plus de confort de pesée ces solutions seront effectuées à 25  $\mu$ moles/ml :

- Solution d'Acide Cystéique (Fluka 30170, M = 112.76 g/mole). Peser précisément environ 0.015 g, Ajouter V ml de HCl 0.1N avec  $V = (\text{mpesée}/2.819)$
- Solution de Methionine Sulfoxide (Aldrich 64430, M = 165.21 g/mole). Peser précisément environ 0.015 g, Ajouter V ml de HCl 0.1N avec  $V = (\text{mpesée}/4.13)$
- Solution de Methionine Sulfone (Aldrich 64410 M, = 181.21.g/mole). Peser précisément environ 0.015 g, Ajouter V ml de HCl 0.1N avec  $V = (\text{mpesée}/4.53)$
- Solution d'Asparagine (Sigma A-0884, M = 132.1. g/mole). Peser précisément environ 0.015 g, Ajouter V ml de HCl 0.1N avec  $V = (\text{mpesée}/3.30)$
- Solution de Norleucine (Merck, M = 131.18g/mole). Peser précisément environ 0.015 g, Ajouter V ml de HCl 0.1N avec  $V = (\text{mpesée}/3.279)$
- Solution d'Acide  $\gamma$ -Aminobutyrique (Sigma A 2129, M = 103.12 g/mole). Peser précisément environ 0.015 g, Ajouter V ml de HCl 0.1N avec  $V = (\text{mpesée}/2.578)$

# Procédure pour la détermination des acides aminés libres dans les produits céréaliers fermentés

SOP : Nutri-ExtPlantes-03.fr

Date: **18/08/2011**

Version : **1**

- Solution de Tryptophane (Sigma T0254, M = 204.23 g/mole). Peser précisément environ 0.015 g, Ajouter V ml de HCl 0.1N avec  $V = (m_{\text{pesée}} / 5.106)$
- Solution d'Ornitine (Sigma O-2375, M = 168.62 g/mole). Peser précisément environ 0.015 g, Ajouter V ml de HCl 0.1N avec  $V = (m_{\text{pesée}} / 4.215)$
- Solution HCl à 0.1 N (solubilisation des acides aminés) : 1.65 ml de HCl 37% (pur, 12 N) qsp 200ml d'eau qualité HPLC

**Pour préparer une solution de standard d'acide aminés à 0.25µmole/ml.** Dans une fiole jaugée de 5 ml, placer :

- 500 µl du Standard AAS-18
- 50µl de chaque acide aminé à 25 µmole/ml
- qsp 5 ml avec Tampon de dilution Citrate de sodium pH 2.2.

## 6 APPAREILLAGE

Analyseur d'acides aminés Biochrom 30 +, équipé d'une colonne Na+

Balance de précision (0.01 mg)

## 7 PROCÉDURE

### 7.1 Extraction des acides aminés libres

- Dans un tube à hémolyse, peser environ exactement 200 mg de matériel à analyser (poudre broyée, lyophilisat)
- Ajouter 50 µL de solution de Norleucine (à 25 µmoles/ml)
- Ajouter 4950 µl de Tampon de dilution Citrate de sodium pH 2.2
- Boucher hermétiquement, disperser au Vortex, puis par renversement pendant 60mn (roue d'extraction)
- Filtrer avec un filtre seringue 0.45 µm (filtre en Acétate de cellulose, Minisart NML, ref : 16555Q)
- Doser directement cette solution, ou conserver au congélateur (-20°C).

# Procédure pour la détermination des acides aminés libres dans les produits céréaliers fermentés

SOP : Nutri-ExtPlantes-03.fr

Date: 18/08/2011

Version : 1

## 7.2 Dosage

Les échantillons sont placés dans des vials de 1,5 ml, bouchés hermétiquement et disposés en attente dans le passeur (réfrigéré à 4°C).

20 µl sont injectés et élués selon un diagramme d'éluion qui dure 95 minutes.

## 8 EXPRESSION DES RÉSULTATS

### 8.1 Mode de calcul et formules

Les acides aminés sont repérés par leur temps de rétention, et les calculs effectués à partir des aires mesurés à 570 nm (Figure 1a) pour tous les acides aminés, à l'exception de la proline ou la détection est réalisée à 440 nm (Figure 1b).

1-Cysteic Acid	2-Met sulphoxide 1	3-Met sulphoxide 2	4-Met sulphone
5Aspartic acid	6-Threonine	7-Asparagine	8-Serine
9-Glutamique acid	10-Glycine	11-Alanine	12-Cysteine
13-Valine	14-Methionine	15Isoleucine	16Leucine
17-Norleucine ISTD	18-Tyrosine	19-Phenylalanine	20-Gaba ( $\gamma$ Aminobutyrique)
21-Histidine	22-tryptophane	23-Ornitine	24-Lysine
25-Ammonium Cl	26-Arginine		

# Procédure pour la détermination des acides aminés libres dans les produits céréaliers fermentés

SOP : Nutri-ExtPlantes-03.fr

Date: 18/08/2011

Version : 1

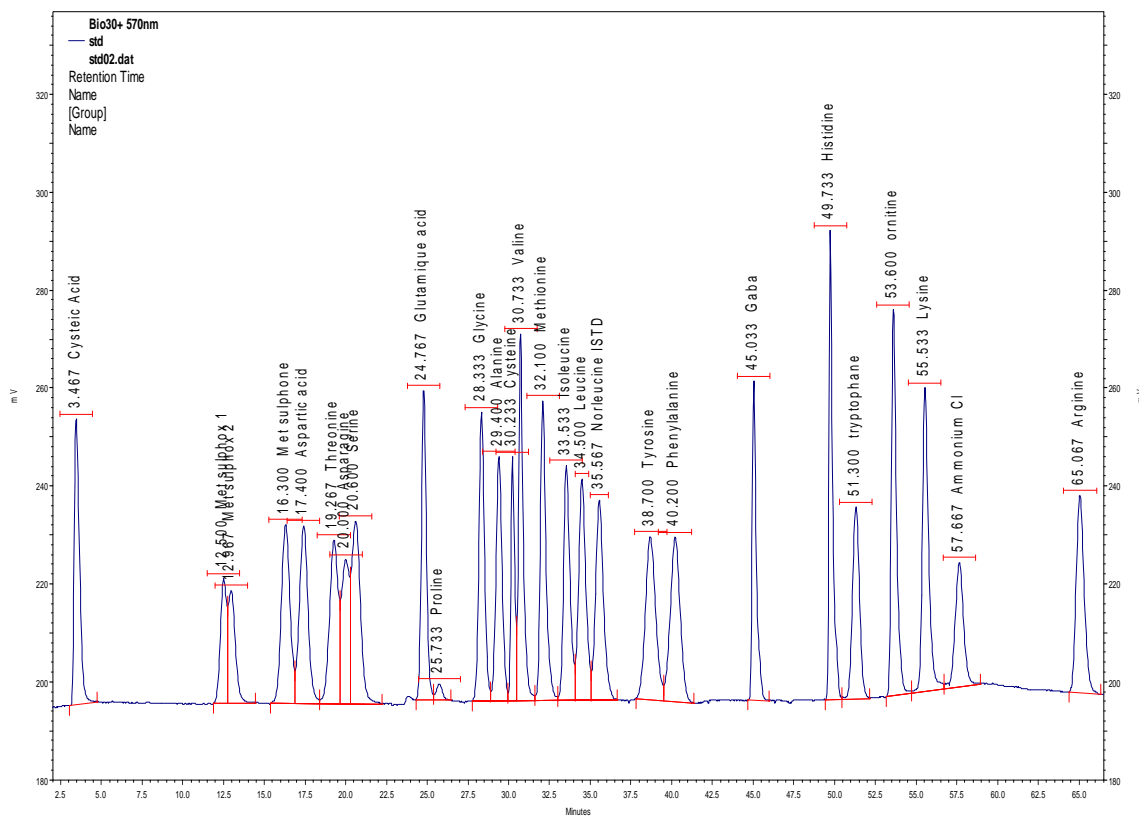


Figure 1a. Liste des standards, classés par ordre d'élution, et chromatogramme à 570 nm

# Procédure pour la détermination des acides aminés libres dans les produits céréaliers fermentés

SOP : Nutri-ExtPlantes-03.fr

Date: 18/08/2011

Version : 1

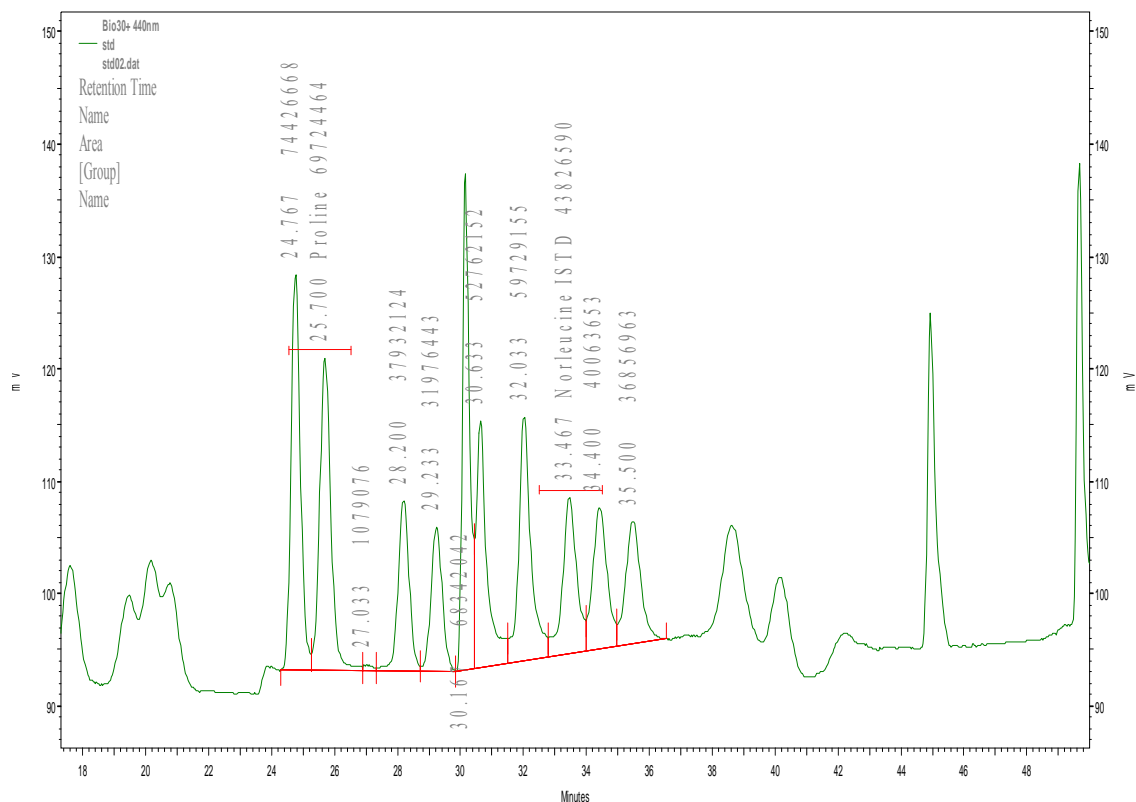


Figure 1b. Chromatogramme des standards à 440 nm

Les teneurs en acides aminés sont calculées à l'aide de la formule :

$$\text{Conc} = \frac{\text{Cu}}{\text{Sample Amt}} \times \text{MF}$$

Où :

- Conc = Teneur en composé dans l'échantillon
- Sample Amt = Quantité d'échantillon
- Cu = Quantité du composé calculée à partir de l'aire mesurée
- MF = facteur de dilution ou de multiplication

## 8.2 Répétabilité

La différence acceptable entre deux déterminations réalisées simultanément par le même analyste pour un échantillon ne devra pas excéder une valeur de 8% (coefficient de variation)

# Procédure pour la détermination des acides aminés libres dans les produits céréaliers fermentés

SOP : Nutri-ExtPlantes-03.fr

Date: 18/08/2011

Version : 1

## 9 POINTS CRITIQUES ET NOTE SUR LA PROCEDURE

- Re-préparer l'ensemble des étalons pour chaque nouvelle solution de norleucine
- Ne pas laisser les échantillons à 4°C au-delà de quelques jours (< 5).
- Vérifier l'intégration (automatique) ; reprendre le calcul « manuellement » pour les pics mal calculés (problème souvent lié à la ligne de base).

## 10 RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit indiquer la méthode utilisée et les résultats obtenus. En outre seront détaillés toute condition opératoire non indiquée dans le SOP, ou optionnelle, et les circonstances particulières qui auraient pu affecter les résultats.

Le rapport d'essai doit inclure tous les détails nécessaires à une identification précise de l'échantillon.

## 11 ENREGISTREMENT DES REVISIONS

Date	Personne responsable	Description de la modification

## 12 ANNEXE



**African Food Tradition rEvisited by Research**

**FP7 n°245025**



**Deliverable D.1.2.3.13: SOP for Biochemical and nutritional analysis for Group 3**

**Procédure pour la détermination des acides aminés totaux dans les produits végétaux**

**SOP : Nutri-ExtPlantes-04-fr**

Date : **18/08/201**

Version: **1**

Ecrit par : Gilles MOREL

Pour plus d'information sur ce SOP, contactez :

- Mady CISSE ([macisse73@hotmail.com](mailto:macisse73@hotmail.com)) / WP4 Leader
- ...
- 

**Ce document a été approuvé par :**

Partenaire	Noms des personnes l'ayant approuvé	Date DD/MM/YY
CIRAD		
CVG		
ENSAI	Robert NDJOUENKEU	10/10/2011
UCAD	Mady CISSE	10/10/2011

# Procédure pour la détermination des acides aminés totaux dans les produits céréaliers fermentés

SOP : Nutri-ExtPlantes-04.fr

Date: 18/08/2011

Version : 1

## Table des matières

<b>1</b>	<b>Domaine et application .....</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Références .....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Définitions .....</b>	<b>3</b>
<b>4</b>	<b>Principe .....</b>	<b>3</b>
<b>5</b>	<b>Réactifs et consommables .....</b>	<b>4</b>
<b>6</b>	<b>Appareillage .....</b>	<b>4</b>
<b>7</b>	<b>Procédure .....</b>	<b>4</b>
7.1	Pesée et dégazage .....	4
7.2	Hydrolyse des protéines.....	5
7.3	Dosage des acides aminés totaux .....	6
<b>8</b>	<b>Expression des résultats .....</b>	<b>6</b>
8.1	Mode de calcul et formules .....	6
8.2	Répétabilité.....	6
<b>9</b>	<b>Points critiques et Note sur la procédure.....</b>	<b>6</b>
<b>10</b>	<b>Rapport d'essai .....</b>	<b>7</b>
<b>11</b>	<b>Enregistrement des Révisions .....</b>	<b>7</b>
<b>12</b>	<b>Annexe .....</b>	<b>7</b>



# Procédure pour la détermination des acides aminés totaux dans les produits céréaliers fermentés

SOP : Nutri-ExtPlantes-04.fr

Date: 18/08/2011

Version : 1

## 1 DOMAINE ET APPLICATION

Cette procédure vise à la détermination des teneurs en acides aminés libres dans les produits végétaux secs, et en particulier les produits céréaliers fermentés.

## 2 REFERENCES

SOP : Nuri-Cere-002.FR

## 3 DEFINITIONS

Lorsque les acides aminés ne sont pas liés ensemble comme peptides ou comme protéines, ils sont appelés "forme libre" ou "acides aminés "libre"

## 4 PRINCIPE

Les protéines sont hydrolysées à l'aide d'acide Méthane sulfoxide 4N à 150°C pendant 2h. Ce protocole d'hydrolyse est rapide, facile à mettre en œuvre et protège certains acides aminés.

A noter que :

- L'Asparagine et la Glutamine ne peuvent pas être quantifiés tels quels car pendant l'hydrolyse ils sont respectivement convertis en Acide Aspartique et en Acide Glutamique (Ozols, 1990). De même, la Cystéine est oxydée en cystine lors d'une hydrolyse acide : 2 moles de Cystéine sont oxydées en 1 mole de Cystine. C'est donc la Cystine qui sera dosée.
- Certains acides aminés sont très labiles : tyrosine (Blackburn,1976; Chiou, 1988; Ozols, 1990), sérine et thréonine. Ils sont détruits pendant une incubation prolongée (Chiou, 1988)
- Certains acides aminés sont difficilement quantifiables car certaines liaisons sont difficiles à hydrolyser : ILE-ILE, VAL-VAL, VAL-ILE (Ozols, 1990 ; Fountoulakis, 1998). Une hydrolyse prolongée de 48 à 72h à 110°C (Fountoulakis, 1998) ou de 4h à 160°C (Chiou, 1988) peut être nécessaire pour hydrolyser totalement ces liaisons
- La présence de métaux, de sels peuvent affecter la quantification de certains acides aminés (Blackburn, 1978 ; Ozols, 1990).
- Le Tryptophane est souvent totalement détruit et demande un protocole particulier.

L'hydrolysats est analysé par HPLC en utilisant une résine d'échange cationique et une détection après réaction à la ninhydrine (cf SOP : Nuri-Cere-002-fr).

# Procédure pour la détermination des acides aminés totaux dans les produits céréaliers fermentés

SOP : Nutri-ExtPlantes-04.fr

Date: 18/08/2011

Version : 1

## 5 REACTIFS ET CONSOMMABLES

- Tampon de dilution Citrate de sodium pH 2.2
- Solution de NaOH à 4N (conservée à température ambiante) : 16.3 g de NaOH en pastilles /100 ml d'ED
- Acide méthane sulfonique AMS 4M SIGMA (ref M-4141 : 10x2mL, MM=96.10g/mol, d=1.48g/ml) ;
- Solution de Norleucine (Merck, M = 131.18g/mole). Peser précisément environ 0.015 g, Ajouter V ml de HCl 0.1N avec V= (mpesée/3.279)
- Tubes à hydrolyse en verre (diamètre 1 cm, hauteur 10 cm), avec évent de dégazage et bouchon à vis teflon

## 6 APPAREILLAGE

- Système de dégazage avec vanne de commutation (azote/vide)
- Bloc chauffant, exemple : Reacti Therm Heating Module (PIERCE, ref 18790)
- Balance de précision (0.01 mg)

## 7 PROCÉDURE

### 7.1 Pesée et dégazage

Peser une masse d'échantillon correspondant à 6 à 9 mg environ de protéines (environ 15mg d'échantillon si cette information est manquante). L'introduire dans un tube à hydrolyse (penser à utiliser les entonnoirs adéquats)

Dans ce tube à hydrolyse, ajouter :

- 50 µl de Norleucine (standard Interne) à 25 µmole/ml.
- 450 µl AMS 4N.

Visser le bouchon du tube à hydrolyse.

Chaque prise d'essai doit être dégazée immédiatement après sa préparation. Connecter le tuyau de la trompe à vide au système de dégazage (Figure 1) et ouvrir le robinet d'eau au maximum. Mettre le robinet du système de dégazage sur la position azote, ouvrir la bouteille d'azote et régler la pression de l'azote à 1 bar

# Procédure pour la détermination des acides aminés totaux dans les produits céréaliers fermentés

SOP : Nutri-ExtPlantes-04.fr

Date: 18/08/2011

Version : 1

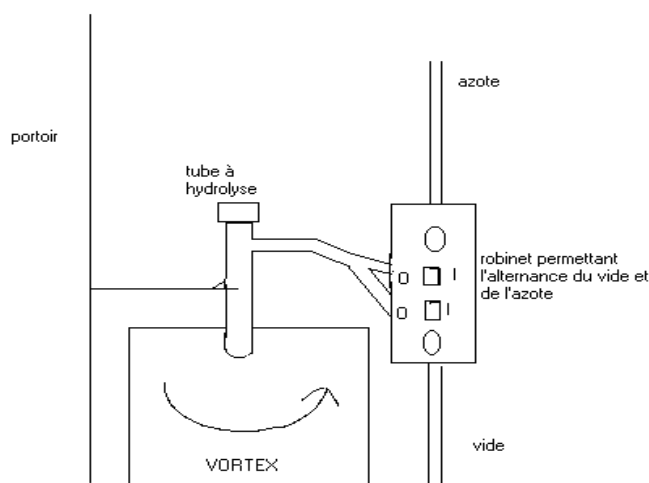


Figure 1 : Montage du système de dégazage de l'hydrolysate

Brancher le tube à hydrolyse, ouvrir légèrement le bouchon du tube tout en vortexant doucement (bouton sur 3/4), régler le robinet du système de dégazage en alternance azote et vide plusieurs fois successivement.

Revisser complètement le bouchon du tube à hydrolyse lorsqu'il est sous azote et déconnecter le tuyau

## 7.2 Hydrolyse des protéines

Allumer le bloc chauffant, réglé à 150°C, au minimum 30 minutes avant utilisation

Les tubes dégazés sont placés dans le bloc chauffant pendant 120 min.

Après hydrolyse, sortir les tubes et les laisser refroidir 5 min à température ambiante

Ajouter 450µl de NaOH 4N pour arrêter la réaction.

Le milieu réactionnel est ensuite prélevé avec une pipette Pasteur et placé dans une fiole jaugée de 5 ml. Le tube est rincé 3 fois avec le tampon de dilution (Citrate de sodium pH 2,2). Le volume de la fiole est ajusté à 5 ml avec ce tampon.

L'extrait est filtré à l'aide de filtre seringue (diamètre de pore 0.45 µm)

# Procédure pour la détermination des acides aminés totaux dans les produits céréaliers fermentés

SOP : Nutri-ExtPlantes-04.fr

Date: 18/08/2011

Version : 1

## 7.3 Dosage des acides aminés totaux

Les échantillons sont placés dans des vials de 1,5 ml, bouchés hermétiquement et disposés en attente dans le passeur (réfrigéré à 4°C).

20 µl sont injectés et élués selon un diagramme d'élution qui dure 95 minutes (cf SOP : Nutri-ExtPlantes-002-fr). Préparer comme indiqué dans ce SOP les solutions de standard.

## 8 EXPRESSION DES RÉSULTATS

### 8.1 Mode de calcul et formules

Les acides aminés sont repérés par leur temps de rétention, et les calculs effectués à partir des aires mesurés à 570 nm pour tous les acides aminés, à l'exception de la proline ou la détection est réalisée à 440 nm (cf SOP : Nutri-ExtPlantes-002-fr).

Les teneurs en acides aminés sont calculées à l'aide de la formule :

$$\text{Conc} = \frac{\text{Cu}}{\text{Sample Amt}} \times \text{MF}$$

Où :

- Conc = Teneur en composé dans l'échantillon
- Sample Amt = Quantité d'échantillon
- Cu = Quantité du composé calculée à partir de l'aire mesurée
- MF = facteur de dilution ou de multiplication

### 8.2 Répétabilité

La différence acceptable entre deux déterminations réalisées simultanément par le même analyste pour un échantillon ne devra pas excéder une valeur de 5% (coefficient de variation).

## 9 POINTS CRITIQUES ET NOTE SUR LA PROCEDURE

- La durée d'hydrolyse doit être scrupuleusement respectée, et le dégazage réalisé rapidement après préparation de l'échantillon.

# Procédure pour la détermination des acides aminés totaux dans les produits céréaliers fermentés

SOP : Nutri-ExtPlantes-04.fr

Date: 18/08/2011

Version : 1

## 10 RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit indiquer la méthode utilisée et les résultats obtenus. En outre seront détaillés toute condition opératoire non indiquée dans le SOP, ou optionnelle, et les circonstances particulières qui auraient pu affecter les résultats.

Le rapport d'essai doit inclure tous les détails nécessaires à une identification précise de l'échantillon.

## 11 ENREGISTREMENT DES REVISIONS

Date	Personne responsable	Description de la modification

## 12 ANNEXE

SOP : Nutri-ExtPlantes-002.FR



**African Food Tradition rEvisited by Research**  
**FP7 n°245025**



**Deliverable D.1.2.3.11: SOP for Biochemical and nutritional analysis for Group 3**

**Dosage des composés phénoliques totaux dans les produits céréaliers fermentés**

**SOP : Bioch-ExtrPlantes-05-fr**

Date : **23/09/2011**

Version : **1**

Ecrit par : Laetitia MESTRES

Pour plus d'information sur ce SOP, contactez :

- Christian MESTRES ([christian.mestres@cirad.fr](mailto:christian.mestres@cirad.fr)) / WP2 Leader
- ...
- 
- 

**Ce document a été approuvé par :**

Partenaire	Noms des personnes l'ayant approuvé	Date DD/MM/YY
CIRAD	Christian MESTRES	23/09/2011
UAC		
CSIR		
FAAU		
ESB		
FRI		
NRC		

## Table of contents

<b>1</b>	<b>Domaine et application .....</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>References .....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Définitions .....</b>	<b>3</b>
<b>4</b>	<b>Principe .....</b>	<b>3</b>
<b>5</b>	<b>Reactifs .....</b>	<b>4</b>
<b>6</b>	<b>Appareillage .....</b>	<b>4</b>
<b>7</b>	<b>Procédure .....</b>	<b>5</b>
7.1	Extraction.....	5
7.1.1	<i>Extraction des phénols totaux .....</i>	<i>5</i>
7.1.2	<i>Réalisation du blanc pour le dosage des phénols totaux .....</i>	<i>5</i>
7.1.3	<i>Purification et dosage des composés interférents.....</i>	<i>5</i>
	<u>Conditionnement des cartouches .....</u>	<u>5</u>
	<u>Purification des composés interférents .....</u>	<u>6</u>
	<u>Réalisation du blanc des composés interférents .....</u>	<u>6</u>
7.2	Dosage au Folin-Ciocalteu.....	6
7.3	Réalisation de la courbe d'étalonnage .....	7
<b>8</b>	<b>Expression des résultats .....</b>	<b>7</b>
8.1	Mode de calcul et formules .....	7
8.2	Répétabilité.....	8
<b>9</b>	<b>Points critiques et Note sur la procédure.....</b>	<b>8</b>
<b>10</b>	<b>Rapport d'essai .....</b>	<b>9</b>
<b>11</b>	<b>Enregistrement des Révisions.....</b>	<b>9</b>

## 1 DOMAINE ET APPLICATION

Cette méthode s'applique au dosage des phénols totaux dans les produits végétaux.

## 2 REFERENCES

Ribéreau-Gayon P. **1968**. Les composés phénoliques des végétaux. Editions Dunod, Paris 254 pp.

Georgé S, Brat P., Alter P., and Amiot M-J. **2005**. Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, pp 1370–1373.

Boizot N., Charpentier J-P. **2006**. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Méthodes et outils pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques. In le Cahier des techniques de l'INRA - Amélioration Génétique et Physiologie Forestières, Laboratoire d'Analyses Biochimiques. Numéro spécial, 79-82.

## 3 DEFINITIONS

**Composés phénoliques** : Les composés phénoliques ou polyphénols sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des graines ou la maturation des fruits. Les plus représentés sont les anthocyanes, les flavonoïdes et les tannins.

**Le réactif de Folin-Ciocalteu** : est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ).

**Composés interférents** : lors du dosage des composés phénoliques en présence du réactif de Folin, d'autres composés réducteurs, tels que l'acide ascorbique (vitamine C) les acides aminés, les sucres, également extraits par le solvant, sont aussi dosés avec les polyphénols. Ainsi pour se prémunir de leur interférence lors du dosage, on réalise l'adsorption des polyphénols puis on dose les composés interférents non retenus sur la colonne d'adsorption.

## 4 PRINCIPE

Les phénols sont extraits à l'aide d'un mélange acétone/eau, puis dosés par mesure spectrophotométrique après réaction avec le réactif de Folin-Ciocalteu. En milieu basique, le réactif de Folin oxyde les **groupements oxydables des phénols** présents dans l'échantillon. Les produits de réduction de couleur bleue, sont un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de



# Dosage des composés phénoliques totaux dans les produits céréaliers fermentés

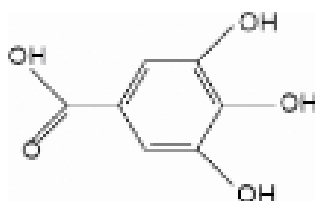
## SOP : Bioch-ExtrPlantes-05-fr

Date : 23/09/2011

Version: 1

molybdène (Ribéreau-Gayon, 1968), présentant un maximum d'absorption comprise entre 620 et 760 nm, dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon.

Les résultats sont corrigés des substances interférentes (vitamine C, protéines, acides aminés...), dosées spécifiquement, et les teneurs en phénols totaux sont exprimés en équivalents d'acide gallique (**acide 3,4,5-trihydroxybenzoïque, figure 1**)



**Figure 1:** L'acide gallique (Acide 3,4,5-trihydroxybenzoïque).

## 5 REACTIFS

- Réactif de Folin-Ciocalteu, dilué au dixième avec de l'eau distillée (la solution diluée se conserve maximum **1 semaine** à 4°C)
- Solution aqueuse de carbonate de sodium  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  75 g/L, (se conserve maximum **1 semaine** à 4°C et surtout éviter l'évaporation)
- Méthanol qualité HPLC
- Acétone qualité analytique
- Acide gallique anhydre 5 mg/mL. Solution à **préparer et doser le jour même.**

## 6 APPAREILLAGE

- Agitateur magnétique
- Micropipette,
- Spectrophotomètre pouvant mesurer à 760 nm
- Cartouche Oasis HLB 6cc 200mg extraction cartridges (hydrophilic-lipophilic balance, **Waters Corporation Milford, Massachusetts USA**, contenant une phase solide qui est un copolymère [poly (divinylbenzene-co-N-vinylpyrrolidone)].
- Système porte cartouche, SUPELCO 20" Hg Vacuum, VISIPREP 24™ DL, USA
- Tubes coniques gradués de 15 ml KIMBLE GLASS Inc. Art N° 45165-15
- Cuvette: volume minimum 4 mL
- Bêchers
- Tubes à vis
- Agitateur magnétique

## 7 PROCEDURE

### 7.1 Extraction

#### *7.1.1 Extraction des phénols totaux*

- Dans un bécher de 100 mL, peser environ exactement 100 mg de poudre (échantillon)
- Ajouter 10 mL d'acétone/eau 70/30 (v/v)
- Agiter pendant 30 min à température ambiante sur un agitateur magnétique
- Filtrer sur papier Wathman n°1 Ø150 mm. Le filtrat est appelé **extrait brut**.
- Conserver les extraits bruts à -20°C si l'analyse est différée
- L'extrait brut est dosé en triple.
  
- Dans un tube à vis de 10ml ajouter 50 µL de l'extrait brut et 450 µL de méthanol pour le dosage au Folin (cf. 7.2).

#### *7.1.2 Réalisation du blanc pour le dosage des phénols totaux*

- Déposer 50 µL du solvant d'extraction (acétone/eau 70 :30 v/v) dans un tube à vis
- Ajouter 450 µL de méthanol.
- Faire le dosage de Folin cf. 7.2.

#### *7.1.3 Purification et dosage des composés interférents*

Si le dosage de Folin-Ciocalteu est simple à mettre en œuvre et très sensible, il n'est cependant pas spécifique des polyphénols. Le réactif de Folin-Ciocalteu réagit avec les acides aminés, tyrosine et tryptophane des protéines, les sucres réducteurs comme le glucose et le fructose, l'acide ascorbique, l'acide tartrique et les sulfites. Pour éviter que ces composés ne surestiment la vraie valeur des phénols totaux, il faut procéder au dosage des composés interférents après fixation des polyphénols, sur des cartouches Oasis, par exemple. La différence des valeurs obtenues donne la valeur réelle des phénols totaux de l'échantillon.

#### *Conditionnement des cartouches*

- Déposer 4 fois 3 mL de méthanol sur des cartouches neuves
- Rincer avec 2 fois 3 mL d'eau distillée
- Après adsorption des composés phénoliques, passer 4 fois 3 mL de méthanol et 2 fois 2 mL d'eau distillée pour nettoyer la cartouche.
- Fermer avec du parafilm et stocker à température ambiante pour une prochaine analyse

**Ces étapes sont à effectuées avant et après chaque analyse, ou en passant d'un échantillon à un autre.**

**La cartouche peut être utilisée dans ces conditions 5 à 8 fois, si elle n'est pas encrassée.**

# Dosage des composés phénoliques totaux dans les produits céréaliers fermentés

## SOP : Bioch-ExtrPlantes-05-fr

Date : 23/09/2011

Version: 1

### Purification des composés interférents

Pour favoriser l'adsorption des composés phénoliques sur la colonne, il est impératif de réaliser une dilution et **d'abaisser ainsi la teneur en acétone de 70% à 8,8 % dans l'extrait brut.**

- Disposer les cartouches Oasis sur le système porte cartouche SUPELCO
- Soulever le couvercle du système et disposer les tubes coniques gradués de 15 mL sous chaque sortie de colonne Oasis
- Dans une fiole, déposer 500 µL de l'extrait brut
- Ajouter 3,5 mL d'eau distillée
- Soit  $FD_1$  le facteur de dilution (8)
- Pipeter 2 mL du mélange et déposer sur une cartouche Oasis préalablement conditionnée (**cf. paragraphe 7.1.3.1**)
- Rincer avec 2 fois 1 mL d'eau distillée
- Mesurer exactement le volume de la solution dans le tube conique
- Soit  $FD_2$  le facteur de dilution (2) dans le tube conique
- Prélever 500 µL (=  $V_1$ ) de cette solution pour le dosage au Folin-Ciocalteu (**cf. 7.2**)
- Dosage à réaliser en triple.

**Il faut noter que d'autres études réalisent une dilution pour une teneur en acétone finale de 14% dans l'extrait brut. Cette approche sera nécessaire si la teneur de 8,8 % n'est pas satisfaisante.**

### Réalisation du blanc des composés interférents

- Dans un tube à vis de 10 mL, déposer 30 µL de solvant d'extraction (acétone/eau 70/30v/v)
- Ajouter 470 µL d'eau distillée ceci afin de réaliser la dilution 16 réalisée au total dans le lavage des composés interférents.
- Réaliser le dosage de Folin\_Ciocalteu (**cf. 7.2**)
- Dosage à réaliser en triple.

## 7.2 Dosage au Folin-Ciocalteu

- Dans chacun des tubes à vis contenant 500 µL de mélange pour les composés phénoliques, les différents blancs et les composés interférents, ajouter 2,5 mL de réactif Folin-Ciocalteu (dilué 1/10e dans eau distillée)
- Agiter au Vortex, incuber 2 min à température ambiante
- Ajouter 2,5 mL de carbonate de sodium
- Agiter au Vortex, et incuber immédiatement dans un bain-marie à 50°C pendant 15 min
- Refroidir rapidement les tubes dans l'eau froide
- Faire le zéro du spectromètre avec de l'eau distillée
- Mesurer l'absorbance à la longueur d'onde de 760 nm contre de l'eau distillée.

**Le risque chimique lié à la mise en œuvre du protocole de dosage par le réactif de Folin-Ciocalteu devient acceptable à condition de réaliser toutes les manipulations sous sorbonne / hotte à parois latérales et fermeture frontale.**

### 7.3 Réalisation de la courbe d'étalonnage

**Il est impératif de réaliser les dilutions et de manipuler le méthanol sous la hotte**

- Préparer une solution d'acide gallique de concentration massique à 5 mg/mL dans du méthanol
- Réaliser une **dilution 10<sup>5</sup>** de cette solution initiale. **C'est la solution-mère.**
- Prélever dans 10 tubes à vis 0, 20, 30, 50, 100, 150, 200, 300, 400 et 500 µL de cette solution-mère.
- Compléter à 500 µL le contenu de chaque tube à vis avec du méthanol.
- Réaliser le dosage au Folin-Ciocalteu (cf. 7.2)
- A partir des valeurs des absorbances obtenues, calculer la droite d'étalonnage de l'acide gallique. :

$$Y = \alpha X$$

où X est la concentration massique g/L en équivalent acide gallique  
Y l'absorbance à 760 nm  
 $\alpha$  la pente de la droite.

## 8 EXPRESSION DES RESULTATS

### 8.1 Mode de calcul et formules

Noter les absorbances (Abs) de chaque solution :

- Abs solution échantillon : **E**
- Abs solution Blanc échantillon : **Be**
- Abs solution interférents : **I**
- Abs solution Blanc interférents : **Bi**
- **V<sub>E</sub>** le volume initial d'Extraction (10 mL)
- **V<sub>I</sub>** le volume d'essai pour le dosage au Folin
- **FD<sub>1</sub>** et **FD<sub>2</sub>** facteurs de dilution pour la purification des composés interférents

# Dosage des composés phénoliques totaux dans les produits céréaliers fermentés

## SOP : Bioch-ExtrPlantes-05-fr

Date : 23/09/2011

Version: 1

La concentration en phénols totaux brut est calculée (en équivalent acide gallique) de la manière suivante :

$$\text{Phénols totaux bruts} = ((E - Be) / \text{pente}) * V_E / V_1$$

Calculer de même la teneur en composés interférents en équivalent acide gallique en tenant compte des dilutions :

$$\text{Interférents} = (I - Bi) / \text{pente} * FD_1 * FD_2 * V_E / V_1$$

La différence des valeurs en phénols totaux brut et en composés interférents donne la teneur en phénols totaux réels de l'échantillon, exprimée **mg acide gallique/ 100g de matière fraîche**.

$$\text{Phénols totaux réels} = \text{Phénols totaux bruts} - \text{Interférents}$$

## 8.2 Répétabilité

Dans une double détermination, essayer d'obtenir une différence d'absorbance (Abs) qui varie de 0.050 à 0.100 unités maximum.

## 9 POINTS CRITIQUES ET NOTE SUR LA PROCEDURE

Il est important que les échantillons soient réduits en fine poudre (taille des particules environ 40 µm) car la finesse de la poudre conditionne la qualité de l'extraction.

Nous utilisons un solvant acétonique plutôt que le méthanol ou l'éthanol pour extraire les polyphénols, car il a l'avantage de précipiter les protéines et d'extraire faiblement les sucres.

Il convient d'évaluer au préalable pour chaque type de tissu la quantité de composés non phénoliques pouvant interférer avec le réactif de Folin-Ciocalteu. En effet si la teneur en composés non phénoliques des extraits est inférieure à 1% alors on peut s'affranchir du dosage de correction des composés interférents.

Pour cela, on réalise un dosage différentiel avant et après passage de l'extrait sur une colonne Oasis sur laquelle vont s'adsorber spécifiquement les polyphénols.

La gamme est réalisée avec de l'acide gallique, composé de coût peu élevé et qui se solubilise facilement dans l'eau. De plus, la gamme une fois préparée se conserve environ 1 mois à 4°C. Il peut-être toutefois préférable de choisir le polyphénol témoin en fonction de la composition de l'extrait à analyser, car l'intensité de la réaction varie en fonction du nombre de groupements hydroxyles (-OH) portés par les noyaux benzéniques des molécules.

# Dosage des composés phénoliques totaux dans les produits céréaliers fermentés

## SOP : Bioch-ExtrPlantes-05-fr

Date : 23/09/2011

Version: 1

### 10 RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit indiquer la méthode utilisée et les résultats obtenus. En outre seront détaillés toute condition opératoire non indiquée dans le SOP, ou optionnelle, et les circonstances particulières qui auraient pu affecter les résultats.

Le rapport d'essai doit inclure tous les détails nécessaires à une identification précise de l'échantillon.

### 11 ENREGISTREMENT DES REVISIONS

Date	Personne responsable	Description de la modification



**African Food Tradition rEvisited by Research**

**FP7 n°245025**



**Deliverable D.1.2.3.1: SOP for sensory: Physical and Textural analysis for Group 1**

**Procédure pour la détermination de la teneur en anthocyanes totaux dans les végétaux**

**SOP : Bioch-ExtPlantes-06-fr**

Date de creation: 30/9/2010

Révision: 1, CISSE, 27/10/2011

Ecrit par : Mady CISSE

Pour plus d'information sur ce SOP, contactez :

- Mady CISSE ([macisse73@hotmail.com](mailto:macisse73@hotmail.com)) / WP4 Leader
- ...
- 
- 

**Ce document a été approuvé par :**

Partenaire	Noms des personnes l'ayant approuvé	Date DD/MM/YY
CIRAD		
CVG		
ENSAI	Robert NDJOUENKEU	19/10/2010
UCAD	Mady CISSE	19/10/2010

# Détermination de la teneur en anthocyanes totaux dans les végétaux

SOP : Bioch-ExtPlantes-06-fr

Date de création: 30/09/2010

Révision : 1, 19/10/2010

## Table des matières

<b>1</b>	<b>Domaine et application .....</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Références .....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Définitions .....</b>	<b>3</b>
<b>4</b>	<b>Principe .....</b>	<b>3</b>
<b>5</b>	<b>Réactifs .....</b>	<b>3</b>
<b>6</b>	<b>Appareillage .....</b>	<b>3</b>
<b>7</b>	<b>Procédure .....</b>	<b>4</b>
<b>8</b>	<b>Expression des résultats .....</b>	<b>4</b>
8.1	Calculs .....	4
8.2	Formules .....	5
<b>9</b>	<b>Rapport d'essai .....</b>	<b>5</b>
<b>10</b>	<b>Enregistrement des Révisions .....</b>	<b>5</b>



# Détermination de la teneur en anthocyanes totaux dans les végétaux

## SOP : Bioch-ExtPlantes-06-fr

Date de création: 30/09/2010

Révision : 1, 19/10/2010

### 1 DOMAINE ET APPLICATION

Applicable aux fruits, légumes et produits dérivés.

### 2 REFERENCES

Wrolstad, R. E., Symposium 12: Interaction of natural colors with other ingredients Anthocyanin pigments - Bioactivity and coloring properties. *Journal of Food Science* **2004**, 69, (5), C419-C421.

### 3 DEFINITIONS

Le terme anthocyane dérive des mots grecs anthos (fleur) et cyan (bleu). Ce sont des pigments flavonoïdes qui colorent les plantes en bleu, rouge, mauve, rose ou orange. Généralement localisés dans les vacuoles des cellules épidermiques, ils absorbent dans le visible et sont hydrosolubles.

### 4 PRINCIPE

Le principe est basé sur la modification de la coloration des anthocyanes en fonction du pH (méthode pH-différentiel) (WROLSTAD, 1982). Après dilution de l'extrait de calices dans deux solutions tampon à pH 1,0 et pH 4,5, l'absorbance est mesurée à 500 et à 700 nm.

### 5 REACTIFS

- Tampon pH1 ;
- Tampon pH4,5 ;

Préparation des solutions tampon

### 6 APPAREILLAGE

Matériel courant de laboratoire, notamment :

- Balance de Précision 1/1000 g ;
- Evaporateur sous vide type ROTAVAPOR
- Verre fritté porosité 4 ;

# Détermination de la teneur en anthocyanes totaux dans les végétaux

## SOP : Bioch-ExtPlantes-06-fr

Date de création: 30/09/2010

Révision : 1, 19/10/2010

- Spectrophotomètre UV-Visible
- Verrerie de laboratoire.

## 7 PROCEDURE

### ✓ Dans les calices

Peser une masse d'environ 0,5 g de calices d'*Hibiscus sabdariffa* broyés finement ont été mélangé à 20 ml de méthanol/ HCl 1,5 M (85 :15, v/v) sous agitation magnétique pendant 10 minutes. Cette opération est répétée au moins 3 fois jusqu'à obtenir un résidu plus ou moins blanchâtre. L'ensemble est alors filtré sur verre fritté de porosité n° 4 et évaporé à sec sous vide à 30 °C. Les anthocyanes sont alors repris dans de l'eau distillée et dosés suivant la méthode du pH différentiel.

### ✓ Dans les extraits

Le dosage se fait directement après une éventuelle filtration des extraits anthocyaniques.

## 8 EXPRESSION DES RESULTATS

### 8.1 Calculs

$m$  : la masse en gramme de l'échantillon solide (calices)

$V$  : volume en litre final utilisé pour reprendre l'extrait concentré (cas des calices)

$C_a$  : concentration en anthocyanes en mg/L dans l'extrait liquide

$C_{as}$  : concentration en anthocyanes en mg/g de calice

$P_m$  : poids moléculaire de l'anthocyane. Dans ce cas,  $C_a$  est exprimé par rapport au *Sambubioside* de *Delphinidine* qui est l'anthocyane majoritaire dans les calices de *Hibiscus sabdariffa*. Son poids moléculaire est égal à 597 g/mol.

$\epsilon$  : coefficient d'extinction moléculaire et est égal à 26 000 L. mol<sup>-1</sup>. cm<sup>-1</sup>.

$F_d$  : facteur de dilution

$A$  : absorbance, calculée grâce à la formule :

# Détermination de la teneur en anthocyanes totaux dans les végétaux

## SOP : Bioch-ExtPlantes-06-fr

Date de création: 30/09/2010

Révision : 1, 19/10/2010

$A_1$  = absorbance mesurée à pH 1 à 510 nm

$A_2$  = absorbance mesurée à pH 1 à 700 nm

$A_3$  = absorbance mesurée à pH 4,5 à 510 nm

$A_4$  = absorbance mesurée à pH 4,5 à 700 nm

### 8.2 Formules

$$A = (A_1 - A_2) - (A_3 - A_4)$$

La concentration en anthocyanes dans les extraits est donnée par la formule suivante :

$$Ca = \frac{P_m \times A \times F_d \times 1000}{\varepsilon}$$

La concentration en anthocyanes dans les calices est donnée par la formule suivante :

$$Cas = \frac{P_m \times A \times F_d \times 1000}{\varepsilon} \times \frac{V}{m}$$

## 9 RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit indiquer la méthode utilisée et les résultats obtenus. En outre seront détaillés toute condition opératoire non indiquée dans le SOP, ou optionnelle, et les circonstances particulières qui auraient pu affecter les résultats.

Le rapport d'essai doit inclure tous les détails nécessaires à une identification précise de l'échantillon.

## 10 ENREGISTREMENT DES REVISIONS

Date	Personne responsable	Description de la modification

# Détermination de la teneur en anthocyanes totaux dans les végétaux

SOP : Bioch-ExtPlantes-06-fr

Date de création: 30/09/2010

Révision : 1, 19/10/2010



**African Food Tradition rEvisited by Research**  
**FP7 n°245025**



**Deliverable D.1.2.3.13: SOP for Biochemical and nutritional for Group 3**

**Procédure pour la détermination de l'activité antioxydante par la méthode DPPH dans les fruits, légumes et extraits de plantes**

**SOP : Bioch-ExtPlantes-07-fr**

Date de creation: 30/9/2010

Révision: 2, NDJOUENKEU, 27/10/2011

Ecrit par : Pierre BIYANZI

Pour plus d'information sur ce SOP, contactez :

- Robert NDJOUENKEU ([rndjoudenkeu@yahoo.fr](mailto:rndjoudenkeu@yahoo.fr)), Co-Leader WP4...
- 
- 

**Ce document a été approuvé par :**

Partenaire	Noms des personnes l'ayant approuvé	Date DD/MM/YY
CIRAD		
CVG		
ENSAI	Robert NDJOUENKEU	24/05/2011
UCAD	Mady CISSE	30/06/2011

**Procédure pour la détermination de l'activité antioxydante par la méthode DPPH**  
**SOP : Bioch-ExtPlantes-07**

Date de creation: 27/10/2011

Révision : 2, master, 27/10/2011

## Table des matières

<b>1</b>	<b>Domaine et application .....</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Références .....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Définitions.....</b>	<b>3</b>
<b>4</b>	<b>Principe .....</b>	<b>3</b>
<b>5</b>	<b>Réactifs .....</b>	<b>3</b>
<b>6</b>	<b>Appareillage .....</b>	<b>4</b>
<b>7</b>	<b>Procédure.....</b>	<b>4</b>
<b>8</b>	<b>Expression des résultats .....</b>	<b>4</b>
<b>8.1</b>	<b>Mode de calcul et formules .....</b>	<b>4</b>
<b>8.1.1</b>	<b>Calculs .....</b>	<i>Erreur ! Signet non défini.</i>
<b>8.1.2</b>	<b>Formules.....</b>	<i>Erreur ! Signet non défini.</i>
<b>8.2</b>	<b>Répétabilité.....</b>	<b>4</b>
<b>9</b>	<b>Points critiques et Note sur la procedure.....</b>	<b>4</b>
<b>10</b>	<b>Rapport d'essai .....</b>	<b>4</b>
<b>11</b>	<b>Enregistrement des Révisions.....</b>	<b>5</b>
<b>12</b>	<b>Annexe .....</b>	<b>5</b>

# Procédure pour la détermination de l'activité antioxydante par la méthode DPPH

## SOP : Bioch-ExtPlantes-07

Date de creation: 27/10/2011

Révision : 2, master, 27/10/2011

### 1 DOMAINE ET APPLICATION

Cette technique est applicable aux fruits, légumes, épices, et éventuellement les sons des céréales.

### 2 REFERENCES

**Ozgen M, Reese RN, Tulio AZ, Scheerens JC, Miller AR (2006).** Modified 2,2-azino-bis-3 Ethylbenzothiazoline 6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-diphenyl-1 Picrylhydrazyl (DPPH) methods. *J Agric Food Chem* 54:1151-1157.

### 3 DEFINITIONS

- La méthode DPPH (2,2-diphényl 1-pyrcrilhydrazyle), rapportée comme la capacité d'un antioxydant à céder l'hydrogène ou l'électron pour piéger les radicaux DPPH<sup>•</sup> comparée à celle du Trolox ou d'un autre antioxydant témoin tels que la catéchine, quercétine ou le BHT (butylhydroxytoluène).

- L'activité antiradicalaire est définie comme la quantité d'extrait pouvant réduire le DPPH de 50%.

### 4 PRINCIPE

La méthode est basée sur la dégradation du radical DPPH<sup>•</sup>. Un antioxydant aura la capacité de donner un électron singulet au radical synthétique DPPH<sup>•</sup> de coloration violette pour le stabiliser en DPPH de coloration jaune-verte. La mesure de la décroissance de coloration violette au cours du temps permet de déterminer la EC<sub>50</sub>, temps au bout duquel 50% de coloration est perdue.

### 5 REACTIFS

- Méthanol 99,9%
- Trolox
- Quercétine ou catéchine

# Procédure pour la détermination de l'activité antioxydante par la méthode DPPH

## SOP : Bioch-ExtPlantes-07

Date de creation: 27/10/2011

Révision : 2, master, 27/10/2011

## 6 APPAREILLAGE

- Spectrophotomètre

## 7 PROCEDURE

Dans le protocole d'analyse, 2 ml de DPPH (0,1 mM préparé dans le méthanol) sont introduits dans un tube à essai contenant 0,5 ml d'extrait. Bien agiter le mélange pendant 5 min et l'incuber à l'obscurité pendant 30 min à température ambiante (25°C). L'absorbance est lue à 517 nm contre un blanc (0,5ml d'extrait et 2 ml de méthanol) à l'aide d'un spectrophotomètre. La solution de référence est composée de 0,5ml de méthanol et 2 ml de DPPH.

## 8 EXPRESSION DES RESULTATS

### 8.1 Mode de calcul et formules

L'activité antiradicalaire (AAR) est exprimée en pourcentage de DPPH réduit selon la formule :

$$AAR(\%) = \frac{\text{Absorbance}_{\text{contrôle}} - \text{Absorbance}_{\text{échantillon}}}{\text{Absorbance}_{\text{contrôle}}} \times 100$$

La concentration d'extrait réduisant 50% de DPPH (IC<sub>50</sub>) est obtenue à partir de la courbe donnant l'AAR en fonction de la concentration d'extrait.

### 8.2 Répétabilité

Effectuer au moins deux déterminations sur le même échantillon. La différence entre les résultats des deux essais effectués simultanément ou rapidement l'un après l'autre, par le même analyste, ne doit pas dépasser 5%.

## 9 POINTS CRITIQUES ET NOTE SUR LA PROCEDURE

L'avantage de cette technique réside dans le fait qu'elle est facile et exacte ; cependant, elle est moins sensible pour les antioxydants hydrophiles.

## 10 RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit indiquer la méthode utilisée et les résultats obtenus. En outre seront détaillés toute condition opératoire non indiquée dans le SOP, ou optionnelle, et les circonstances particulières qui auraient pu affecter les résultats.



# Procédure pour la détermination de l'activité antioxydante par la méthode DPPH

## SOP : Bioch-ExtPlantes-07

Date de creation: 27/10/2011

Révision : 2, master, 27/10/2011

Le rapport d'essai doit inclure tous les détails nécessaires à une identification précise de l'échantillon.

## 11 ENREGISTREMENT DES REVISIONS

Date	Personne responsable	Description de la modification

## 12 ANNEXE



**African Food Tradition rEvisited by Research**

**FP7 n°245025**



**Deliverable D.1.2.3.13: SOP for Biochemical and nutritional for Group 3**

**Procédure pour la détermination de l'activité antioxydante par la méthode FRAP dans les fruits, légumes et extraits de plantes**

**SOP : Bioch-ExtPlantes-8-fr**

Date de creation: 30/9/2010

Révision: 2, NDJOUENKEU, 27/10/2011

Ecrit par : Pierre BIYANZI

Pour plus d'information sur ce SOP, contactez :

- Robert NDJOUENKEU ([rndjouenkeu@yahoo.fr](mailto:rndjouenkeu@yahoo.fr)), Co-Leader WP4...
- 
- 

**Ce document a été approuvé par :**

Partenaire	Noms des personnes l'ayant approuvé	Date DD/MM/YY
CIRAD		
CVG		
ENSAI	Robert NDJOUENKEU	24/05/2011
UCAD	Mady CISSE	31/06/2011

**Procédure pour la détermination de l'activité antioxydante par la méthode FRAP**  
**SOP : Bioch-ExtPlantes-8**

Date de creation: 27/10/2011

Révision : 2, master, 27/10/2011

## Table des matières

<b>1</b>	<b>Domaine et application .....</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Références .....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Définitions.....</b>	<b>3</b>
<b>4</b>	<b>Principe .....</b>	<b>3</b>
<b>5</b>	<b>Réactifs .....</b>	<b>3</b>
<b>6</b>	<b>Appareillage .....</b>	<b>4</b>
<b>7</b>	<b>Procédure.....</b>	<b>4</b>
<b>8</b>	<b>Expression des résultats .....</b>	<b>4</b>
<b>8.1</b>	<b>Mode de calcul et formules .....</b>	<b>4</b>
<b>8.1.1</b>	<i>Calculs .....</i>	<i>Erreur ! Signet non défini.</i>
<b>8.1.2</b>	<i>Formules.....</i>	<i>Erreur ! Signet non défini.</i>
<b>8.2</b>	<b>Répétabilité.....</b>	<b>5</b>
<b>9</b>	<b>Points critiques et Note sur la procedure.....</b>	<b>5</b>
<b>10</b>	<b>Rapport d'essai .....</b>	<b>5</b>
<b>11</b>	<b>Enregistrement des Révisions.....</b>	<b>5</b>
<b>12</b>	<b>Annexe .....</b>	<b>6</b>

# Procédure pour la détermination de l'activité antioxydante par la méthode FRAP

## SOP : Bioch-ExtPlantes-8

Date de creation: 27/10/2011

Révision : 2, master, 27/10/2011

### 1 DOMAINE ET APPLICATION

Cette technique est applicable aux fruits, légumes, épices, et éventuellement les céréales. Elle est aussi applicable aux produits de pâtisserie.

### 2 REFERENCES

**Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1999).** The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70–76.

**Ozgen M, Reese RN, Tulio AZ, Scheerens JC, Miller AR (2006).** Modified 2,2-azino-bis-3-Ethylbenzothiazoline 6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *J Agric Food Chem* 54:1151-1157.

### 3 DEFINITIONS

Le test FRAP (ferric reducing ability of plasma) est une méthode qui évalue le pouvoir réducteur des composés.

### 4 PRINCIPE

Ce test repose sur la capacité que possède une solution antioxydante à réduire le complexe ferrique-tripyridyltriazine ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) en cation ferreux tripyridyltriazine ( $[\text{Fe}(\text{II})(\text{TPTZ})_2]^{2+}$ ), qui absorbe dans le spectre UV à 593 nm.

### 5 REACTIFS

- Méthanol 99,9%
- Trolox
- TPTZ

# Procédure pour la détermination de l'activité antioxydante par la méthode FRAP

## SOP : Bioch-ExtPlantes-8

Date de creation: 27/10/2011

Révision : 2, master, 27/10/2011

- HCl
- FeCl<sub>3</sub>, 6H<sub>2</sub>O
- tampon acétate

## 6 APPAREILLAGE

- Pipette de précision
- Bain-Marie
- Spectrophotomètre

## 7 PROCEDURE

Dans un tube à essai, 900 µl de réactif FRAP, fraîchement préparé et incubé à 37°C, sont mélangés avec 90 µl d'eau distillée et 100 µl d'échantillon test ou du méthanol (réactif pour le blanc). Le tout est incubé pendant 30 minutes à 37°C dans un bain-marie. Le réactif FRAP est constitué de 2,5 ml d'une solution de TPTZ 20 mmol/l dans du HCl 40 mmol/l, plus 2,5 ml de FeCl<sub>3</sub>, 6H<sub>2</sub>O, 20 mmol/l et 2,5 ml de tampon acétate 0,3 mol/l, pH 3,6.

A la fin de l'incubation, l'absorbance est immédiatement lue à 593 nm au spectrophotomètre.

## 8 EXPRESSION DES RESULTATS

### 8.1 Mode de calcul et formules

Le taux de FRAP est calculé par ajustement à une courbe standard de l'absorbance contre la concentration de Trolox.

$$C(\%) = \frac{c * d}{M * Ci} * 100$$

Avec :

C : Concentration en composés réducteurs, en mM Equivalent Trolox/g d'extrait sec

c : Concentration de l'échantillon lue obtenue à partir de la courbe d'étalonnage du Trolox

# Procédure pour la détermination de l'activité antioxydante par la méthode FRAP

## SOP : Bioch-ExtPlantes-8

Date de creation: 27/10/2011

Révision : 2, master, 27/10/2011

d : Facteur de dilution de la solution mère d'extrait

Ci : Concentration de la solution mère d'extrait

M : Masse molaire du trolox (250 g/mol).

### 8.2 Répétabilité

Effectuer au moins deux déterminations sur le même échantillon. La différence entre les résultats des deux essais effectués simultanément ou rapidement l'un après l'autre, par le même analyste, ne doit pas dépasser 5%.

## 9 POINTS CRITIQUES ET NOTE SUR LA PROCEDURE

Le test FRAP est présenté comme une nouvelle méthode pour évaluer la capacité antioxydante d'un produit. C'est une méthode moins chère, les réactifs sont simples à préparer, les résultats sont hautement reproductibles et la procédure est simple et rapide.

## 10 RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit indiquer la méthode utilisée et les résultats obtenus. En outre seront détaillés toute condition opératoire non indiquée dans le SOP, ou optionnelle, et les circonstances particulières qui auraient pu affecter les résultats.

Le rapport d'essai doit inclure tous les détails nécessaires à une identification précise de l'échantillon.

## 11 ENREGISTREMENT DES REVISIONS

Date	Personne responsable	Description de la modification

**Procédure pour la détermination de l'activité antioxydante par la méthode FRAP**  
**SOP : Bioch-ExtPlantes-8**

Date de creation: 27/10/2011

Révision : 2, master, 27/10/2011

## **12 ANNEXE**



**African Food Tradition rEvisited by Research**

**FP7 n°245025**



**Deliverable D.1.2.3.13: SOP biochemical and nutritional analysis for Group 3**

**Procédure ORAC pour la mesure de la capacité antioxydante dans les extraits de plantes**

**SOP : Nutri-ExtPlantes-9-fr**

Date : **30/09/2011**

Revision:

Ecrit par : Adrien SERVENT

Pour plus d'information sur ce SOP, contactez :

- Mady CISSE ([macisse73@hotmail.com](mailto:macisse73@hotmail.com)) / WP4 Leader
- 
- 
- 

**Ce document a été approuvé par :**

Partenaire	Noms des personnes l'ayant approuvé	Date DD/MM/YY
CIRAD	Adrien SERVENT	30/09/2011
CVG		
ENSAI	Robert NDJOUENKEU	10/10/2011
UCAD	Mady CISSE	10/10/2011



## **Table des matières**

<b>1</b>	<b>Domaine et application .....</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Références .....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Définitions .....</b>	<b>3</b>
<b>4</b>	<b>Principe .....</b>	<b>3</b>
<b>5</b>	<b>Réactifs .....</b>	<b>4</b>
<b>6</b>	<b>Appareillage .....</b>	<b>4</b>
<b>7</b>	<b>Procédure .....</b>	<b>4</b>
<b>8</b>	<b>Expression des résultats .....</b>	<b>11</b>
<b>8.1</b>	<b>Mode de calcul et formules .....</b>	<b>11</b>
<b>8.1.1</b>	<b><i>Calculs .....</i></b>	<b>11</b>
<b>8.1.2</b>	<b><i>Formules .....</i></b>	<b>12</b>
<b>8.2</b>	<b>Répétabilité .....</b>	<b>12</b>
<b>9</b>	<b>Points critiques et Note sur la procedure.....</b>	<b>12</b>
<b>10</b>	<b>Rapport d'essai .....</b>	<b>12</b>
<b>11</b>	<b>Enregistrement des Révisions.....</b>	<b>12</b>
<b>12</b>	<b>Annexe .....</b>	<b>13</b>

# Procédure ORAC pour la mesure de la capacité antioxydante

## SOP : Bioch-ExtPlantes-9

Date: 30/09/2011

Révision : 1

## 1 DOMAINE ET APPLICATION

La méthode ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) a été adaptée pour la spectrofluorimétrie à plaques. Elle permet de déterminer le pouvoir antioxydant, en équivalent Trolox, des fruits et des produits dérivés de fruits en utilisant la spectrophotométrie de fluorescence.

## 2 REFERENCES

Huang D., Ou B., Hampsch-Woodill M., Flanagan J. A., et PRIOR R. L. **2002**. High-Throughput Assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using a Multichannel Liquid Handling System Coupled with a Microplate Fluorescence Reader in 96-Well Format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 4437-4444.

## 3 DÉFINITIONS

La méthode ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) mesure la capacité antioxydante des fruits en suivant la cinétique d'une réaction par spectrophotométrie de fluorescence.

## 4 PRINCIPE

La mesure du pouvoir antioxydant est basée sur la détection de la chute de fluorescence de la fluorescéine (FL), due à sa réaction avec le radical péroxyle ROO●, dans une matrice alimentaire contenant des composés antioxydants. Plus l'activité antioxydante est élevée, plus lente sera la chute de fluorescence. L'effet protecteur des antioxydants est évalué en mesurant l'aire sous la courbe de décroissance de la fluorescéine.

Ainsi une solution de fluorescéine (**substance chimique complexe composée de deux molécules de phénols liées à un cycle pyrane lui même relié à un acide benzoïque**) est attaquée par un radical libre, ce qui cause une diminution de l'intensité de fluorescence de cette solution. L'échantillon avec pouvoir antioxydant résiste à l'attaque du radical libre en protégeant ainsi la solution de fluorescéine.

La présente méthode utilise une solution de Trolox comme solution témoin d'antioxydant et l'AAPH [le 2-2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochlorure (AAPH)] comme source de radicaux libres. Lorsque la concentration du Trolox augmente, la diminution de l'intensité de fluorescence se produit moins rapidement. Le Trolox s'oxyde plus facilement que la fluorescéine, en donnant du proton phénolique.

Comme l'aire sous la courbe (AUC) de la diminution de fluorescence est proportionnelle à la concentration Trolox, on construit un graphique de l'aire sous la courbe (AUC<sub>net</sub>) en fonction de la concentration de Trolox. Par extrapolation, on détermine la concentration de l'échantillon inconnu. Le résultat est exprimé en micromoles d'équivalent Trolox par gramme d'échantillon (μmol TE/g d'échantillon).

# Procédure ORAC pour la mesure de la capacité antioxydante

## SOP : Bioch-ExtPlantes-9

Date: 30/09/2011

Révision : 1

## 5 REACTIFS

- AAPH :  $\alpha,\alpha'$ -azodiisobutyramidine dihydrochloride (purum >98.0%, CAS 2997-92-4, FLUKA).
- Fluorescéine C.I. 45365, CAS 2321-07-5, ALDRICH.
- Trolox: ( $\pm$ ) 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (97%, CAS 53188-07-1, ALDRICH).
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , (Sodium dihydrogen phosphate cryst. purum p.a., FLUKA).
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , Sodium phosphate dibasique anhydre (99%, CAS 7558-79-4, CARLO ERBA).
- Acétone :  $\text{CH}_3\text{COCH}_3$  ACS
- Ethanol

## 6 APPAREILLAGE

- Spectrofluorimètre TECAN Infinite 200 (TECAN Austria GMBH)
- Plaques Sero Well, 96 puits (pour mesure de fluorescence, noir à fond noir)
- Centrifuge Beckman Coulter
- Pipettes 0-200 $\mu\text{L}$
- Seringue à aiguille amovible 0-50 $\mu\text{L}$
- Shaker Heidolph Multi Reax
- Agitateur magnétique
- Balance analytique
- pH-mètre
- Fioles jaugées de 10 mL, 50 mL, 100 mL, 500 mL et 1000 mL
- Tubes Eppendorf
- Flacons ambrés de 50 mL, 100 mL et 1 L
- Eprouvettes de 100 mL et 500 mL
- Gants jetables

## 7 PROCÉDURE

Les essais ORAC ont été réalisés selon la méthode utilisée par Huang *et al.* (2002). Toutes les solutions ont été préparées dans du tampon phosphate 75 mM (pH = 7,4).

### 7.1 Tampon phosphate 75 mM pH 7,4.

**Solution A** : 1,17 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  dans 100 mL d'eau distillée (dans fiole jaugée).

**Solution B** : 5,35 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  dans 500 mL d'eau distillée (dans fiole jaugée).

**Dissoudre sous agitation.**

**Tampon phosphate :**

## Procédure ORAC pour la mesure de la capacité antioxydante

### SOP : Bioch-ExtPlantes-9

Date: 30/09/2011

Révision : 1

95 ml de solution A + 405 ml de solution B (éprouvette) QSP 1000 ml (dans fiole jaugée)  
Mesurer le pH pour vérifier le pH 7,4  
Mettre la solution dans un flacon ambré et stocker à +4°C pour 2 mois maximum

#### 7.2 Fluorescéine (M= 332,31 g/mol) 78,75 nM

$S_{FL}$  : 13,08 mg de fluorescéine (FL) dans 50 mL de tampon phosphate (fiole jaugée)  
Peser dans un bécher et ajouter gouttes de éthanol pour dissoudre  
Transférer dans une fiole jaugée qsp 50 mL avec le tampon phosphate.  
Mettre la solution dans un flacon ambré et stocker à +4°C pour 2 semaines maximum ou mesurer l'intensité de fluorescence pendant le période d'utilisation.

$S_1$  : 100  $\mu$ L de  $S_M$  qsp 10 mL tampon (fiole jaugée)  
**Solution de travail** : 500 $\mu$ L  $S_1$  qsp 50 mL tampon  
 $S_1$  et  $S_T$  sont préparés le jour d'analyse.

#### 7.3 Solution de AAPH (M= 271,17 g/mol) à 178 mM

**Solution de travail** : 482,6 mg dans 10 mL de tampon phosphate  
Utiliser des gants pendant la manipulation.  
Couvrir avec papier aluminium et réfrigérer.  
Préparer et utiliser seulement le jour d'analyse.

#### 7.4 Solution de Trolox (M : 250, 29 g/mol) à 500 $\mu$ M

$S_M$  : 12,51 mg dans 100 mL de tampon phosphate  
Utiliser des gants pendant la manipulation  
Peser dans tube eppendorf (avec base plastique) et annoter la masse (balance analytique 0,01 mg, Lab. Biochimie 2ème étage)  
Ajouter quelques gouttes d'éthanol pour dissoudre  
Transférer dans une fiole jaugée qsp 100 mL.  
Mettre la solution dans un flacon ambré et stocker à 4°C.  
Préparer et utiliser seulement le jour d'analyse. Jeter le reste dans la poubelle spécifique.

## Procédure ORAC pour la mesure de la capacité antioxydante

### SOP : Bioch-ExtPlantes-9

Date: 30/09/2011

Révision : 1

#### Solutions de travail :

Préparer solutions diluées dans tubes eppendorf en utilisant une micro seringue et une pipette automatique.

Concentration de Trolox ( $\mu\text{M}$ )	Volume Trolox ( $\mu\text{L}$ )	Volume Tampon ( $\mu\text{L}$ )
40,0	40	460
30,0	30	470
20,0	20	480
10,0	10	490
5,0	5	495
0,0	0	500

## 7.5 Préparation des extraits

### 7.5.1 Extraction d'échantillon lyophilisé

- 0,5 g d'échantillons lyophilisés dans 20 mL de solution acétone – eau (50% – 50%). Cette extraction doit être testée pour chaque produit.
- Agiter pendant 60 – 120 minutes dans un shaker à 1900 rpm.
- Centrifuger pendant 15 minutes à 14000 rpm et 10°C.
- Utiliser le surnageant pour les analyses suivantes.

### 7.5.2 Extraction d'échantillon frais

3 g de matière fraîche sont extraits durant 15 min avec 7 ml d'acétone. La solution est filtrée et le résidu est lavé avec 10 ml d'un mélange acétone/eau (70/30 : v/v). Le filtrat est concentré sous vide à 40°C puis complété à 10 ml avec de l'eau. 5 ml de cette solution sont lavés avec deux fois 5 ml d'hexane et la fraction aqueuse obtenue constitue l'extrait acétone/eau (AE). 3 ml de AE sont déposés sur une colonne de XAD-7 (BV = 3 ml) qui est ensuite lavée avec 10 ml d'eau. Les composés phénoliques sont désorbés avec 10 ml de MeOH/H<sub>2</sub>O (80/20 : v/v). Après concentration sous vide, le volume de solution est ajusté à 10 ml et constitue l'extrait XAD-7 E.

## Procédure ORAC pour la mesure de la capacité antioxydante

### SOP : Bioch-ExtPlantes-9

Date: 30/09/2011

Révision : 1

#### 7.5.3 Extraction d'échantillon liquide

- Centrifuger 20 mL pendant 15 minutes (14000 rpm)
- Utiliser le surnageant pour les analyses suivantes.

#### 7.5.4 Préparation des dilution pour l'échantillon

- Définir la dissolution de la solution mère. Ex : Pour l'échantillon lyophilisé peut être une dilution 1/10 (50  $\mu$ L échantillon / 450  $\mu$ L tampon).
- À partir de la solution-mère, préparer les solutions dans les tubes eppendorf en utilisant une micro seringue et une pipette automatique.

Solutions	Volume SM ( $\mu$ L)	Volume Tampon ( $\mu$ L)
1/5	50	200
1/10	50	450
1/25	20	480
1/50	20	980
1/75	10	740
1/100	10	990

#### 7.6 Préparation de la plaque pour la détermination de la dilution d'échantillon

*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
													+ Conc	
A														
B		40	40							40	40			
C		30	30							30	30			

# Procédure ORAC pour la mesure de la capacité antioxydante

## SOP : Bioch-ExtPlantes-9

Date: 30/09/2011

Révision : 1

D		20	20						20	20		
E		10	10						10	10		
F		5	5						5	5		
G		0	0						0	0		
H												

- Conc

	Eau	180 µL
	Trolox	20 µL + 160 µL solution fluorescéine (FL)
	Echantillon 1	20 µL + 160 µL FL
	Echantillon 2	20 µL + 160 µL FL
*	Bord arrondi	

**Après avoir fait l'analyse on doit choisir la dilution d'échantillon qui est dans la courbe de calibrage de Trolox.**

### 7.7 Préparation de la plaque pour l'analyse d'échantillon

Il est possible d'analyser 12 échantillons différents avec trois répétitions.

*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		40	40							40	40	

## Procédure ORAC pour la mesure de la capacité antioxydante

### SOP : Bioch-ExtPlantes-9

Date: 30/09/2011

Révision : 1

C		30	30							30	30	
D		20	20							20	20	
E		10	10							10	10	
F		5	5							5	5	
G		0	0							0	0	
H												

## 7.8 Mesure de l'intensité de la fluorescence (Spectrofluorimètre)

- Allumer l'équipement dans la partie arrière et l'ordinateur (Icontrol1 / Infinite 200)
- Chauffer l'équipement à 37°C, 15 minutes
  - *Instrument* → *Heating* → 37°C (Set / On / X)
- Nettoyer le système
  - Mettre un bécet avec l'eau dans l'alimentation et un autre vide sous l'injecteur
  - *Settings* → *Injector* → *Wash* → 10 mL \* 3 (*Piston stroke*) → *Start*
- Arrangement de l'injecteur avec AAPH
  - Placer le tuyau d'alimentation dans la fiole avec AAPH et un bécet vide sous l'injecteur
  - *Settings* → *Injector* → *Wash* → 10 mL \* 1 (*Piston stroke*) → *Start*
  - *Settings* → *Injector* → *Prime* → *Start Prime*



# Procédure ORAC pour la mesure de la capacité antioxydante

## SOP : Bioch-ExtPlantes-9

Date: 30/09/2011

Révision : 1

➤ Démarrer le programme

- *File* → *Open* → *Orac (Sero Well)* → *Ouvrir*
- Choisir les conditions à utiliser

Part of plate	Kinetic cycle
Sélectionner les puits utilisés	Cycles <ul style="list-style-type: none"><li>• Number of cycles :61</li></ul> Kinetic interval :
<b>Wait (Timer)</b> 00 :15 :00	<ul style="list-style-type: none"><li>• <input checked="" type="checkbox"/> Use kinetic interval</li><li>• Time : 00 :01 :00</li></ul>
<b>Dispense</b> Fill wells Select injector :	<b>Fluorescence intensity</b> Wavelengths <ul style="list-style-type: none"><li>• Excitation <math>485 \pm 9</math> nm</li><li>• Emission <math>520 \pm 20</math> nm</li></ul> Read
<ul style="list-style-type: none"><li>• Injector A</li><li>• Volume : 20 <math>\mu</math>L</li><li>• Speed : 200 <math>\mu</math>L/sec</li><li>• Refill speed : 100 <math>\mu</math>L/sec</li></ul> Refill mode	<ul style="list-style-type: none"><li>• Number of reads : 10</li><li>• Settle time : 0 ms</li></ul> Mode
<ul style="list-style-type: none"><li>• Standard</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Top</li></ul> Gain
<b>Shaking</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Duration : 5 sec</li><li>• Amplitude : 2 mm</li></ul> Mode : Orbital	<ul style="list-style-type: none"><li>• Manual gain : 100</li></ul> Integration <ul style="list-style-type: none"><li>• Lag time : 0 <math>\mu</math>s</li><li>• Integration time : 20 <math>\mu</math>s</li></ul> Label
	Name : Label 1

➤ Démarrer l'analyse

- *Ouvrir le support de la plaque (rouge: OUT)*
- *Placer la plaque et fermer (verte: IN)*
- *Mettre l'injecteur*
- *START*

# Procédure ORAC pour la mesure de la capacité antioxydante

## SOP : Bioch-ExtPlantes-9

Date: 30/09/2011

Révision : 1

- Fin de l'analyse
  - Enregistrer le fichier Excel
  - Retirer la plaque et l'injecteur
- Nettoyer le système
  - Placer un bécher avec l'eau dans l'alimentation et un autre vide sous l'injecteur
  - Settings → Inject → Wash → 3 fois, 10 mL \* 10 (Piston stroke) → Start
- Eteindre l'équipement dans la partie arrière et l'ordinateur

## 8 EXPRESSION DES RÉSULTATS

### 8.1 Mode de calcul et formules

#### 8.1.1 Calculs

- Modifier les valeurs de la fluorescence pour chaque échantillon de telle sorte qu'à  $t_0$ , la fluorescence soit égale à 1.
- $f_0$  devient  $f_0/f_0$ ,  $f_1$  devient  $f_1/f_0$ ...
- L'aire sous la courbe (AUC) est calculée en faisant la somme de toutes les valeurs obtenues.

$$AUC = 0.5 + (f_1 / f_0 + \dots f_i / f_0 + \dots) + 0.5 (f_n / f_0)$$

Où  $i = 2, 3, \dots, n-1$

- On calcule ensuite  $AUC_{net} = AUC - AUC_{blanc}$
- Pour le trolox, pour chaque concentration, on fait la moyenne des AUC net calculées et on trace la courbe étalon  $AUC_{net} = f(\text{Concentration})$

$$C_n = m AUC_{net} + b$$

- Pour l'échantillon, on calcule la concentration à partir de l'équation étalon et on corrige des facteurs de dilution pour revenir à la solution initiale. Ci-dessous l'expression des résultats.

$$C_{nech} = (m AUC_{net} + b) * FD * (V_{ext} / m_{ech})$$

Où:

$C_n$ : Concentration équivalente de Trolox contenu dans l'échantillon ( $\mu\text{mol/g}$ )

$AUC_{net}$ : Aire sous la courbe de l'échantillon analysé corrigé

$b$ : Interception de la courbe étalon de calibration (Trolox).

$m$ : inclinaison de la courbe étalon de calibration (Trolox).

# Procédure ORAC pour la mesure de la capacité antioxydante

## SOP : Bioch-ExtPlantes-9

Date: 30/09/2011

Révision : 1

FD: Facteur de dilution utilisé.

$V_{\text{ext}}$ : Volume utilisé pendant l'extraction (L)

$m_{\text{ech}}$ : Masse d'échantillon (g)

### 8.1.2 Formules

## 8.2 Répétabilité

Indiquer ici la différence acceptable entre deux déterminations réalisées simultanément par le même analyste pour un échantillon. Cette valeur ne devra pas excéder une valeur limite spécifiée dans ce SOP

## 9 POINTS CRITIQUES ET NOTE SUR LA PROCEDURE

Indiquez ici les points critiques de la procédure. Par exemple, pour la teneur en eau :

- broyer l'échantillon à une taille de particules inférieures à  $< 0.5\mu\text{m}$ ,
- ne jamais placer des échantillons humides dans le four contenant des échantillons en fin d'essai, ce qui entraînerait une re-hydratation partielle de ces derniers.

## 10 RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit indiquer la méthode utilisée et les résultats obtenus. En outre seront détaillés toute condition opératoire non indiquée dans le SOP, ou optionnelle, et les circonstances particulières qui auraient pu affecter les résultats.

Le rapport d'essai doit inclure tous les détails nécessaires à une identification précise de l'échantillon.

## 11 ENREGISTREMENT DES REVISIONS

Date	Personne responsable	Description de la modification

**Procédure ORAC pour la mesure de la capacité antioxydante**

**SOP : Bioch-ExtPlantes-9**

Date: **30/09/2011**

Révision : **1**

**12ANNEXE**



**African Food Tradition rEvisited by Research**

**FP7 n°245025**



**Deliverable D.1.2.3.1: SOP for sensory: Physical and Textural analysis for Group 1**

**Procédure pour l'identification et le dosage des composés d'arôme par CPG dans les fruits, légumes et extraits de plantes**

**SOP : Bioch-ExtPlantes-10-fr**

Date de creation: 30/9/2010

Révision: 2, CISSE, 27/10/2011

Ecrit par : Laetitia MESTRES

Pour plus d'information sur ce SOP, contactez :

- Mady CISSE ([macisse73@hotmail.com](mailto:macisse73@hotmail.com)) / WP4 Leader
- ...
- 
- 

**Ce document a été approuvé par :**

Partenaire	Noms des personnes l'ayant approuvé	Date DD/MM/YY
CIRAD	Laetitia MESTRES	
CVG		
ENSAI	Robert NDJOUENKEU	10/10/2011
UCAD	Mady CISSE	10/10/2011

## **Table des matières**

<b>1</b>	<b>Domaine et application .....</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Références .....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Définitions.....</b>	<b>3</b>
<b>4</b>	<b>Principe .....</b>	<b>3</b>
<b>5</b>	<b>Réactifs .....</b>	<b>3</b>
<b>6</b>	<b>Appareillage .....</b>	<b>3</b>
<b>7</b>	<b>Procédure.....</b>	<b>3</b>
<b>8</b>	<b>Expression des résultats .....</b>	<b>5</b>
8.1	Mode de calcul et formules .....	5
8.1.1	<i>Calculs .....</i>	<i>5</i>
8.1.2	<i>Formules.....</i>	<i>5</i>
8.2	Répétabilité.....	5
<b>9</b>	<b>Points critiques et Note sur la procedure.....</b>	<b>5</b>
<b>10</b>	<b>Rapport d'essai .....</b>	<b>6</b>
<b>11</b>	<b>Enregistrement des Révisions.....</b>	<b>6</b>
<b>12</b>	<b>Annexe .....</b>	<b>6</b>

# Procédure pour l'identification et le dosage des composés d'arôme par CPG

## SOP : Bioch-ExtPlantes-10

Date de creation: 27/10/2011

Révision : 2, CISSE, 27/10/2011

### 1 DOMAINE ET APPLICATION

Aromes, parfums, composés volatils

### 2 REFERENCES

### 3 DEFINITIONS

Identification et dosage des composés d'arôme par CPG

### 4 PRINCIPE

Piégeage des composés volatils émis, après génération d'un espace de tête contrôlé, sur une fibre SPME. Injection, séparation et analyse sur un système CG-SM, avec semi quantification grâce à un étalonnage interne.

### 5 REACTIFS

### 6 APPAREILLAGE

#### Balance de précision

#### Passeur d'échantillons GERSTEL MPS2

*Fibre utilisée:* PDMS-DVB polydiméthylsiloxane-divinylbenzène

- température d'incubation 60°C
- temps d'incubation 5 min
- temps d'extraction 30mn
- température de désorption 250°C
- temps de désorption 120 s

#### Chromatographie

#### GC Agilent 6890N Séries:

*Injection :* splitless (30s) insert 0.75mm

# Procédure pour l'identification et le dosage des composés d'arôme par CPG

## SOP : Bioch-ExtPlantes-10

Date de creation: 27/10/2011

Révision : 2, CISSE, 27/10/2011

### *Séparation :*

- colonne capillaire polaire DBWAX J&W 122-7032 (température maximale 260°C)
  - ✓ Longueur : 30m
  - ✓ Diamètre : 0.25mm
  - ✓ Epaisseur du film déposé sur la paroi : 0.25µm
- gaz vecteur He débit constant 1ml/min
- programmation du four : de 40°C (isotherme 1min) à 160°C à 3°C/min puis 10°C /min jusqu'à 240°C

### **Détecteur : spectromètre de masse Agilent MSD 5973N**

- Energie des électrons 70eV
- Gamme de masse de 40 à 450 Da
- Impact électronique
- Température de l'interface 280°C

### **Base de données NIST 2002**

Bibliothèque regroupant 175000 spectres de référence.

### **Logiciel d'acquisition et de retraitements des données :**

MSD Chem revD1

## 7 PROCÉDURE

Pesée d'un aliquote d'échantillon et dilution à l'eau pour constituer une solution de concentration connue.

Introduction, à l'aide d'une pipette de précision, dans un flacon d'espace de tête de 10ml, d'une quantité connue ne dépassant pas la moitié du flacon (soit 5ml).

Introduction d'une quantité d'étalon interne de l'ordre du µg

Sertissage du flacon de 10ml

Pré conditionnement de la fibre SPME (nettoyage)

Piégeage SPME

Analyse CG-SM



# Procédure pour l'identification et le dosage des composés d'arôme par CPG

## SOP : Bioch-ExtPlantes-10

Date de creation: 27/10/2011

Révision : 2, CISSE, 27/10/2011

## 8 EXPRESSION DES RÉSULTATS

Détermination de la composition aromatique à l'aide de la base de données NIST et la comparaison des indices de rétention de KOVATS calculés

Semi quantification des composés par rapport à l'étalon interne introduit et en prenant un coefficient de réponse égale à 1.

Résultats exprimés en µg de composé/100g de matière fraîche ou sèche.

### 8.1 Mode de calcul et formules

#### 8.1.1 Calculs

Surface molécule inconnue= SI

Surface étalon interne= Set

Quantité étalon interne en µg= Qté

Poids prélèvement en grammes=P

Volume de prélèvement en ml=V

Poids aliquote en grammes=Pali

Volume de dilution en ml=Vdil

#### 8.1.2 Formules

$$\frac{P_{ali}}{V_{dil}} * V = P$$

$$\frac{SI}{Set} * \frac{Qté}{P} * 100 = \text{Résultat}$$

### 8.2 Répétabilité

Répétabilité +/- 5%

## 9 POINTS CRITIQUES ET NOTE SUR LA PROCEDURE

- Sertissage rapide
- Attention à la taille des particules pour ne pas boucher la seringue de précision

# Procédure pour l'identification et le dosage des composés d'arôme par CPG

## SOP : Bioch-ExtPlantes-10

Date de creation: 27/10/2011

Révision : 2, CISSE, 27/10/2011

### 10 RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit indiquer la méthode utilisée et les résultats obtenus. En outre seront détaillés toute condition opératoire non indiquée dans le SOP, ou optionnelle, et les circonstances particulières qui auraient pu affecter les résultats.

Le rapport d'essai doit inclure tous les détails nécessaires à une identification précise de l'échantillon.

### 11 ENREGISTREMENT DES REVISIONS

Date	Personne responsable	Description de la modification

### 12 ANNEXE