

TP 1. Préparation des courbes d'étalonnage des composés phénoliques, flavonoïdes et caroténoïdes

1. Introduction

La réalisation d'une courbe d'étalonnage revêt une importance cruciale dans les calculs de concentrations lors d'un dosage. Cette démarche constitue une étape fondamentale dans la détermination des teneurs en molécules à intérêt fonctionnel présentes dans un échantillon. Elle assure la précision, la fiabilité et la validité des résultats obtenus, fournissant ainsi une base solide pour les calculs de concentrations dans le cadre de l'analyse quantitative.

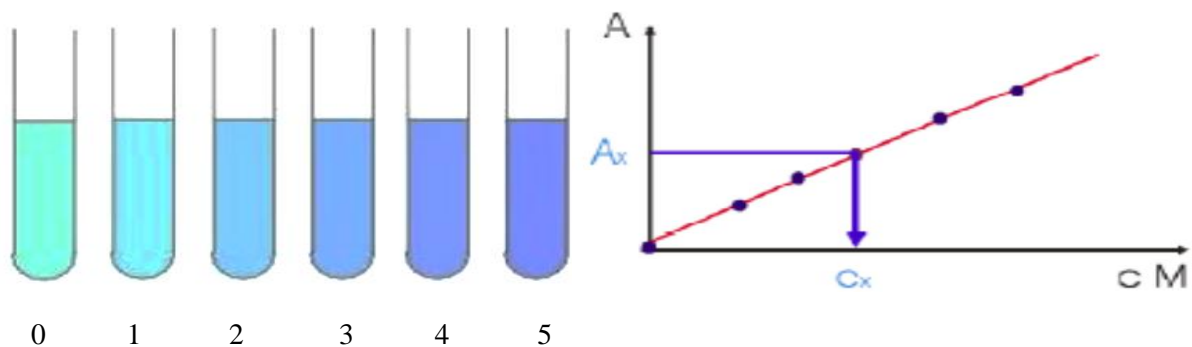
Objectifs :

- Réaliser une courbe d'étalonnage des **composés phénoliques** en utilisant l'**acide gallique**.
- Réaliser une courbe d'étalonnage des **flavonoïdes** en utilisant la **quercétine**.
- Réaliser une courbe d'étalonnage des **caroténoïdes** en utilisant le **β -carotène**.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Principe :

Il consiste à réaliser des gammes de concentrations différentes en standard (acide gallique/ quercétine/ β -carotène) et à observer l'évolution de la couleur en fonction de la concentration du standard utilisé, tout en respectant le protocole de dosage des composés (composés phénoliques/flavonoïdes/ caroténoïdes) dans l'échantillon analysé.



2.2. Mode opératoire :

2.2.1. Préparation de la courbe d'étalonnage des composés phénoliques

- ☒ Préparer une solution mère de l'**acide gallique** avec une concentration connue (**0,1 mg/mL**)
- ☒ Préparer dans un portoir une série de 6 tubes à essais numérotés de 0 à 5 ;
- ☒ Réaliser une gamme d'étalonnage selon le **tableau 1** ;

- ☒ Mettre le volume nécessaire d'acide gallique et d'eau distillée dans chaque tube à essai ;
- ☒ Agiter les tubes au vortex ;
- ☒ Ajouter immédiatement à l'aide d'une micropipette **1 mL** de **folin-ciocalteu** et **800 µL** de **carbonate de sodium (7,5%)** ;
- ☒ Boucher les tubes, puis les homogénéiser au vortex. Ensuite, les incuber pendant 15 min à l'obscurité ;
- ☒ Mesurer l'absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre à **765 nm**.

Tableau 1 : Gamme d'étalonnage d'acide gallique à utiliser pour le dosage des composés phénoliques.

Tubes	0	1	2	3	4	5
Acide gallique (µL)	0	100	200	300	400	500
Eau distillée (µL)	500	400	300	200	100	0
Folin-Ciocalteu (µL)	1000					
Carbonate de sodium (µL)	800					
[Acide gallique] (mg/ml)						0,1
Absorbance ($\lambda = 765\text{nm}$)

2.2.2. Préparation de la courbe d'étalonnage des flavonoïdes

- ☒ Préparer une solution mère de **la quercétine** avec une concentration connue (**0,05 mg/mL**)
- ☒ Préparer dans un portoir une série de 6 tubes à essais numérotés de 0 à 5 ;
- ☒ Réaliser une gamme d'étalonnage (série de dilution) selon le **tableau 2** ;
- ☒ Mettre le volume nécessaire de quercétine et de méthanol dans chaque tube à essai ;
- ☒ Agiter les tubes au vortex ;
- ☒ Ajouter immédiatement à l'aide d'une micropipette **1 mL** de **chlorure d'aluminium (2%)** ;
- ☒ Boucher les tubes, puis les homogénéiser au vortex. Ensuite, les incuber pendant 10 min à l'obscurité.
- ☒ Mesurer l'absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre à 430 nm.

Tableau 2 : Gamme d'étalonnage de quercétine à utiliser pour le dosage des flavonoïdes

Tubes	0	1	2	3	4	5
Quercétine (µL)	0	200	400	600	800	1000
Méthanol (µL)	1000	800	600	400	200	0
Chlorure d'aluminium (µL)	1000					
Absorbance ($\lambda = 430\text{ nm}$)	
[Quercétine] (mg/mL)						0,05

2.2.3. Préparation de la courbe d'étalonnage des caroténoïdes

- ☒ Préparer une solution mère du β -carotène, avec une concentration connue (0,04 mg/mL)
- ☒ Préparer dans un portoir une série de 6 tubes à essais numérotés de 0 à 5 ;
- ☒ Réaliser une gamme d'étalonnage (série de dilution) selon le **tableau 3** ;
- ☒ Mettre le volume nécessaire de β -carotène, et de l'hexane dans chaque tube à essai ;
- ☒ Agiter les tubes au vortex ;
- ☒ Mesurer l'absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre à **450 nm**.

Tableau 3 : Gamme d'étalonnage du β -carotène à utiliser pour le dosage des caroténoïdes

Tubes	blanc	1/5	2/5	3/5	4/5	SM
SM (μL)	0	200	400	600	800	1000
Hexane (μL)	1000	800	600	400	200	0
[β-Carotène] (mg/mL)						0,04
Absorbance à 450 nm						

3. Résultats & Discussion

- ✓ Tracer les courbes d'étalonnage ($Abs = f([standard])$) des composés phénoliques et des flavonoïdes sur Excel (fichier à télécharger sur la Plateforme) ;
- ✓ Déterminer l'équation de la courbe d'étalonnage ($y = ax$) et le coefficient de détermination (R^2) à l'aide d'Excel.