



Ce document a été mis en ligne par l'organisme [FormaV®](#)

Toute reproduction, représentation ou diffusion, même partielle, sans autorisation préalable, est strictement interdite.

Pour en savoir plus sur nos formations disponibles, veuillez visiter :

www.formav.co/explorer

ÉPREUVE E3. UNITÉ U31**Biochimie et technologies d'analyse****L'ALIMENT FONCTIONNEL**

Le lien entre alimentation et santé est de plus en plus étudié. A côté des recherches sur les effets négatifs de certains aliments, des programmes de recherche récents étudient les effets bénéfiques et protecteurs de certains constituants alimentaires.

Un aliment sera dit « fonctionnel » s'il renferme un composant pour lequel on dispose de résultats scientifiques démontrant des interactions bénéfiques avec une fonction dans l'organisme.

On se propose d'aborder quelques aspects du dosage ou du rôle de deux composants : la vitamine A et les acides gras polyinsaturés.

1 - Dosage de la vitamine A dans les aliments. (27 points)

La vitamine A ou rétinol est un alcool cyclique dont la formule est présentée dans le **document 1**. Sa transformation dans l'organisme conduit à des composés ayant des rôles essentiels dans la vision, la différenciation cellulaire et la croissance.

Le **document 2** extrait de la norme française décrit une méthode de dosage de la vitamine A dans les aliments d'origine animale (produits laitiers par exemple) dans lesquels le rétinol est présent essentiellement sous forme d'un ester : le palmitate de rétinol.

1.1 - Étapes d'hydrolyse et d'extraction (12 points)

1.1.1 - Pourquoi y a-t-il nécessité d'une étape d'hydrolyse ? Écrire l'équation de la réaction avec formules chimiques des réactifs et des produits formés.

Donnée : Acide palmitique est aussi appelé acide hexadécanoïque.

1.1.2 - L'étiquette du réactif 7 comporte la mention « Corrosif ».

1.1.2.1 - Quels sont les risques présentés par un réactif corrosif ?

1.1.2.2 - L'institut National de Recherche et de Sécurité mentionne dans ses cahiers documentaires qu'une préparation est considérée comme corrosive quand la somme des concentrations des substances corrosives présentes dépasse 5 % en masse.

Justifier avec précision pourquoi le réactif 7 est corrosif.

Déterminer à partir de quelle concentration molaire une solution d'hydroxyde de potassium est considérée comme corrosive. Comment est dénommé son caractère de dangerosité en dessous de cette concentration ?

Données : Masses molaires atomiques : K : $39,1 \text{ g.mol}^{-1}$, O : 16 g.mol^{-1} , H : 1 g.mol^{-1}

1.1.3 - L'étape d'hydrolyse est suivie d'une étape d'extraction.

1.1.3.1 - À partir du **document 2**, expliquer le principe et les différents temps de cette extraction. Justifier le choix du solvant d'extraction.

1.1.3.2 - Quel est le matériel utilisé ? Montrer son intérêt.

1.2 - Analyse par chromatographie liquide haute performance (10 points)

1.2.1 - Conditions chromatographiques.

1.2.1.1 – Donner les caractéristiques du système chromatographique utilisé (**document 2**).

1.2.1.2 - Préciser les caractéristiques de polarité de la phase stationnaire, celles de la phase mobile.

1.2.2 - Les chromatogrammes obtenus pour l'analyse d'un aliment de type beurre et pour l'étalonnage sont présentés dans le **document 3**.

1.2.2.1 - En partant de la relation de base :

quantité d'un composé X injecté = F_x Aire du pic de X

avec F_x = Facteur de réponse du détecteur pour ce composé

Déterminer la concentration en équivalent rétinol dans la solution extrait injectée.

Données : Afin de tenir compte des facteurs de réponse différents pour le *trans*-rétinol et le 13-*cis*-rétinol formé par vieillissement, on utilisera, pour appliquer la relation de base, la somme des aires ($\text{Aire}_{\text{trans}} + 0,815 \text{ Aire}_{\text{cis}}$). Ce calcul permet d'obtenir le résultat directement en équivalent rétinol par cm^3 .

1.2.2.2 - En déduire la teneur en vitamine A de l'aliment testé, exprimée en équivalent rétinol par gramme sachant que la masse d'échantillon de beurre n° 952 testé est de 3,50 g. Rendre le résultat à 5 % près.

1.2.2.3 - L'aliment peut-il porter une de ces allégations nutritionnelles sur son étiquette sachant que le fournisseur a le droit d'indiquer :

« Source de ... »	si l'aliment apporte plus de 15 % des apports journaliers recommandés dans 100 g
« Riche en ... »	Si l'aliment apporte plus de 2 fois la valeur requise pour « source de ... »

Données : Apport journalier recommandé : adolescent et adulte : 0,8 à 1 mg de rétinol.

1.3 - Essai d'une nouvelle technique de micro-extraction en phase solide (SPME) (5 points)

L'appareillage utilisé est décrit dans le **document 4**.

1.3.1 - Mettre en évidence les avantages que présente cette technique par rapport à la technique classique.

1.3.2 - Lister tous les critères qui doivent être pris en compte pour une étude comparative de coût entre la technique d'extraction classique et la technique SPME.

2 - Importance des acides gras polyinsaturés dans l'alimentation. (33 points)

Les corps gras font partie d'une alimentation saine car ils apportent les acides gras essentiels et fournissent de l'énergie. La supplémentation en acides gras essentiels est extrêmement efficace pour combattre divers troubles car elle permet :

- de réduire l'hypertension artérielle et les risques cardiaques,
- de diminuer les risques d'inflammation,
- d'améliorer les capacités cérébrales,
- de ralentir l'évolution de certains cancers.

2.1 - Structure et propriétés des acides gras insaturés (10 points)

2.1.1 - Le document 5 donne les modèles moléculaires de différents acides gras.

2.1.1.1 - Les acides oléique, élaïdique, α -linoléique sont des formes insaturées de l'acide stéarique :

- acide gras saturé (C 18:0) ou acide stéarique,
- acide gras monoinsaturé C18:1, Δ 9 *cis* (Z) ou acide oléique,
- acide gras monoinsaturé C18:1, Δ 9 *trans* (E) ou acide élaïdique,
- acide gras polyinsaturé C18: 3, Δ 9,12,15 *cis* (Z) ou acide α -linoléique.

Expliquer la notion d'isomérisation *cis-trans* (ou Z-E). Quelle en est la conséquence sur la structure spatiale des acides gras insaturés.

En déduire à quel acide gras correspond chaque modèle moléculaire m_1 , m_2 , m_3 , représenté dans le **document 5**.

2.1.1.2 - Expliquer le lien entre cette géométrie et la température de fusion de ces acides gras. En déduire les conséquences physiques.

Données : T_{fusion} de l'acide stéarique et l'acide élaïdique : environ 70°C ;
 T_{fusion} de l'acide oléique : 16°C ; de l'acide linoléique : - 5° C.

2.1.2 - Les acides gras sont des éléments constitutifs des glycérophospholipides membranaires.

2.1.2.1 - Indiquer à partir de quelles molécules de base sont constitués les glycérophospholipides et écrire une formule chimique générale. Donner ses caractères de polarité.

2.1.2.2 - Justifier l'importance des acides gras insaturés de configuration *cis* dans la structure et les propriétés de la membrane cellulaire.

2.2 - Les acides gras polyinsaturés ou acides gras essentiels (12 points)**2.2.1 - Dosage des acides gras essentiels dans les aliments**

Il y a deux familles d'acides gras essentiels qui sont les oméga-6 ($\omega 6$) et les oméga-3 ($\omega 3$) :

- le chef de file des $\omega 6$ est l'acide linoléique C 18:2 Δ 9,12,
- le chef de file des $\omega 3$ est l'acide α -linoléique C 18:3 Δ 9,12,15.

Toutes les doubles liaisons sont de configuration *cis* (Z).

2.2.1.1 - Définir la notion d'acides gras essentiels.

Les apports nutritionnels journaliers conseillés sont de 1,5 à 3 g pour l'acide α -linoléique et de 9 à 17 g pour l'acide linoléique. Le rapport entre les quantités des deux familles $\omega 6/\omega 3$ doit être préférentiellement de l'ordre de 6.

Le dosage des acides gras dans les huiles alimentaires se fait par méthode chromatographique en phase gazeuse après saponification des triacylglycérols et méthylation des acides gras libérés.

2.2.1.2 - Indiquer deux points essentiels qui différencient la chromatographie en phase gazeuse et la chromatographie liquide. Expliquer un des rôles de la température en chromatographie en phase gazeuse.

2.2.1.3 - Quel est l'intérêt de l'étape de méthylation des acides gras ?

2.2.1.4 - Le chromatogramme du **document 6** correspond à l'analyse d'une huile de soja. À partir de ces résultats, et en admettant que le facteur de réponse du détecteur est identique pour tous les acides gras méthylés, justifier que l'on peut évaluer l'ordre de grandeur du rapport $\omega 6/\omega 3$. Déterminer sa valeur pour l'huile de soja testée. Conclure.

2.2.2 - Protection des acides gras essentiels et dosage de la vitamine E.

Les acides gras polyinsaturés doivent être protégés de l'oxydation qui conduit à la formation dans les membranes de radicaux libres très toxiques. Les tocophérols, ou Vitamine E, sont des composés lipidiques inclus dans les membranes et ayant un rôle protecteur anti-oxydant. Ceux-ci peuvent être dosés par spectrofluorimétrie.

2.2.2.1 - Donner le principe de la spectrofluorimétrie.

2.2.2.2 - Déterminer les conditions de mesures à partir des spectres d'absorbance et des spectres de fluorescence donnés dans le **document 7**. Justifier.

2.3 - Rôle énergétique des acides gras (11 points)

Les acides gras saturés et les acides gras insaturés *trans* interviennent essentiellement en tant que métabolites énergétiques de diverses cellules.

2.3.1 - Activation des acides gras :

2.3.1.1 - Dans quel compartiment cellulaire se produit cette activation ?

2.3.1.2 - La réaction est catalysée par une enzyme de la classe des ligases (ou synthétases) et conduit à la formation d'acyl-Coenzyme A.

Écrire l'équation de la réaction en détaillant les groupements réagissant.

Définir ce qu'est une transformation exergonique et expliquer les aspects énergétiques au cours de la réaction écrite.

2.3.2 - Catabolisme des acyl-Coenzyme A :

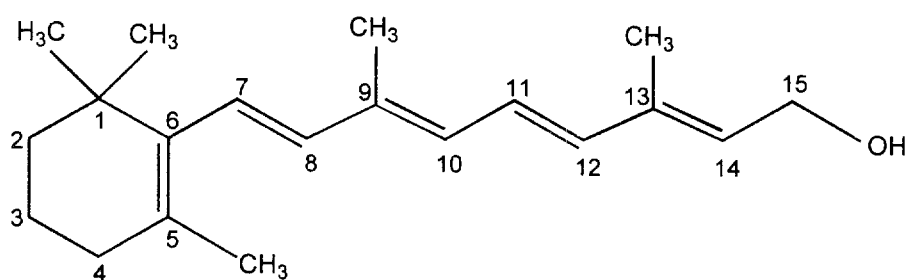
2.3.2.1 - Dans quel compartiment cellulaire se produit ce catabolisme ?

2.3.2.2 - Compléter le schéma des quatre réactions successives présentées dans le **document 8**.

2.3.2.3 - Établir le bilan (avec justifications) de la dégradation complète de l'acide gras saturé à 18 carbones jusqu'au stade éthanoyl-Coenzyme A.

DOCUMENT 1 : FORMULE DU RÉTINOL

Le *trans*-rétinol ou Vitamine A1 présente la formule suivante :



Par vieillissement, il peut se former une petite quantité de son isomère, le rétinol 13-*cis*.

DOCUMENT 2 : DOSAGE DE LA VITAMINE A

1 - Principe

Hydolyse à chaud d'une prise d'essai par une solution d'hydroxyde de potassium en milieu éthanolique.
Extraction par un solvant approprié. Dosage du rétinol par chromatographie liquide haute performance sur colonne de gel de silice avec détection UV permettant de séparer les formes *trans* et *13-cis* du rétinol.

2 - Appareillage

- A.1 Chromatographe liquide haute performance équipé d'un détecteur à UV.
- A.2 Colonne de chromatographie pour CLHP de 300 mm de long et 4 mm de diamètre intérieur, remplie de gel de silice de granulométrie 10 μm .
- A.3 Évaporateur rotatif.
- A.4 Appareil de chauffage de type chauffe ballon.
- A.5 Ballon de 1 dm^3 , à col rodé avec réfrigérant à reflux adaptable.
- A.6 Ampoule à décanter de 500 cm^3 .

et toute verrerie courante de laboratoire.

3 - Réactifs

- R.1 Éthanol à 95 % (V/V).
- R.2 Ether de pétrole de point d'ébullition compris entre 40 et 65°C.
- R.3 Heptane.
- R.4 Phase mobile : triméthylpentane - propan-2-ol, mélange 99+1 (V/V).
- R.5 Sulfure de sodium, solution à 0,5 mol.dm^{-3} dans le glycérol à 70 % (V/V).
- R.6 Pyrogallol, solution à 200 g.dm^{-3} dans l'éthanol à 95 % (V/V).
- R.7 Hydroxyde de potassium, solution à 500 g.dm^{-3} .
- R.8 Ethanoate de trans-rétinol, solution étalon à $(4,96 \pm 0,05) \text{ ER.cm}^{-3}$.

Donnée : 1 équivalent rétinol = 1 ER correspond à 1 μg de rétinol.

4 - Mode opératoire

4.1 - Préparation de l'échantillon pour essai :

Homogénéiser si nécessaire les aliments humides à l'aide d'un hachoir.

La détermination doit être effectuée immédiatement après la préparation de l'échantillon pour essai.

4.2 - Prise d'essai :

Peser, à 0,01 g près, la masse nécessaire d'échantillon pour essai et les introduire dans le ballon (A.5).

La détermination doit être effectuée immédiatement après la préparation de l'échantillon pour essai.

4.3 - Étape non détaillée conduisant à un volume total d'hydrolysate de 200 cm^3 (le solvant de l'hydrolysate est l'éthanol).

4.4 - Extraction :

Prélever à la pipette 100 cm^3 d'hydrolysate et les introduire dans l'ampoule à décanter (A.6). Ajouter 80 cm^3 d'eau et 100 cm^3 d'éther de pétrole (R.2). Agiter pendant 1 à 2 minutes et laisser décanter. Soutirer la phase hydro-éthanolique dans une seconde ampoule à décanter et procéder ensuite à deux extractions de cette phase aqueuse, à l'aide, à chaque fois, de 100 cm^3 d'éther de pétrole, en récupérant les phases étherées dans la première ampoule à décanter. Procéder ensuite à un ou plusieurs lavages successifs de la phase étherée avec des fractions de 100 cm^3 d'eau jusqu'à neutralité, vérifiée à la phénolphthaleïne. Éliminer les traces d'eau par filtration sur du sulfate de sodium.

Évaporer à sec à l'aide de l'évaporateur rotatif (A.3). Ajouter à la pipette 25 cm^3 d'heptane (R.3).

4.5 - Analyse par chromatographie liquide à haute performance :

Régler le débit de la phase mobile à 2 $\text{cm}^3.\text{min}^{-1}$.

Injecter dans l'appareil 100 mm^3 de la solution étalon préparée (R.8).

Injecter dans l'appareil un volume identique de la solution essai obtenue en 4.4.

DOCUMENT 3 : DOSAGE DE LA VITAMINE A

Chromatogrammes

a - Injection de la solution étalon R.8

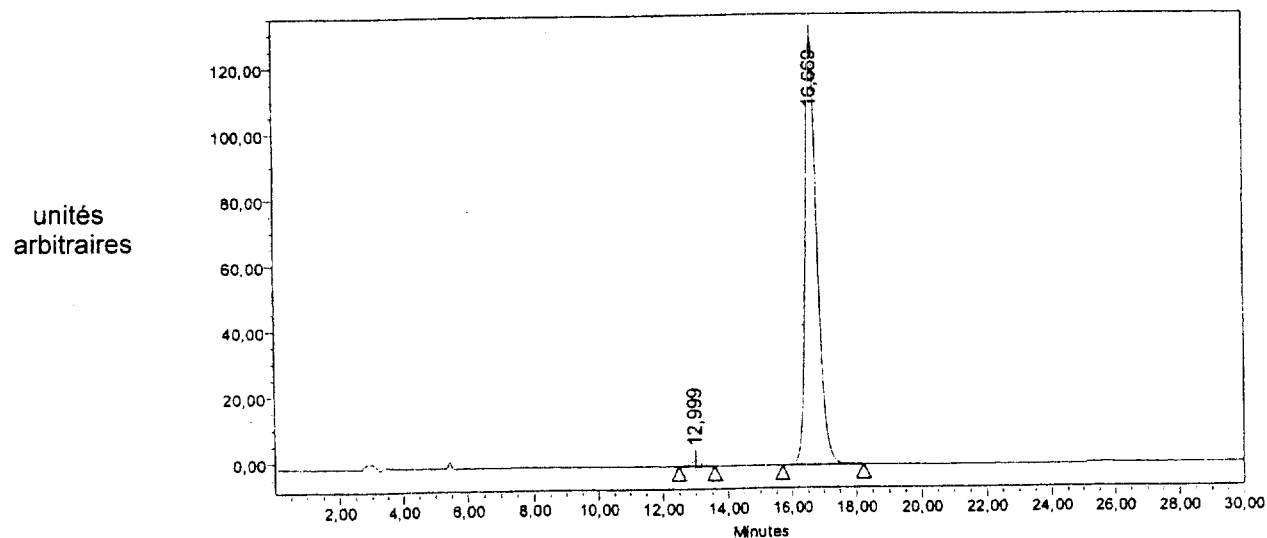


Table de résultats

<i>Nom</i>	<i>RT (min)</i>	<i>Aire (unités arbitraires)</i>
13-cis rétinol	12,999	33216
trans-rétinol	16,669	3355187

b - Injection de l'échantillon beurre n° 952

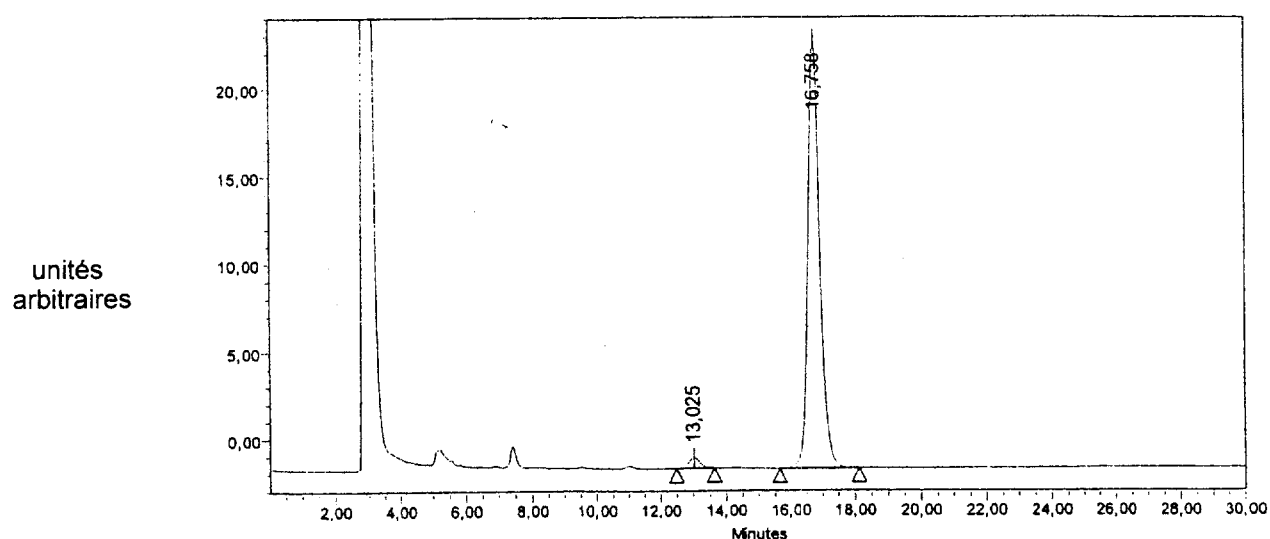


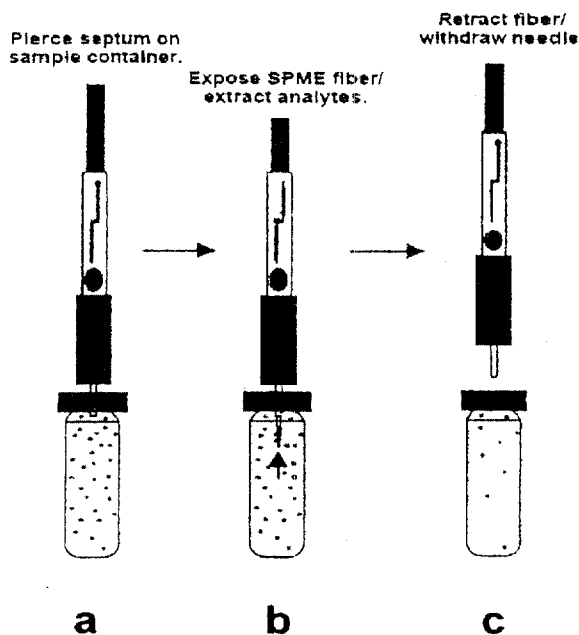
Table de résultats

<i>Nom</i>	<i>RT (min)</i>	<i>Aire (unités arbitraires)</i>
	13,025	13800
	16,758	629766

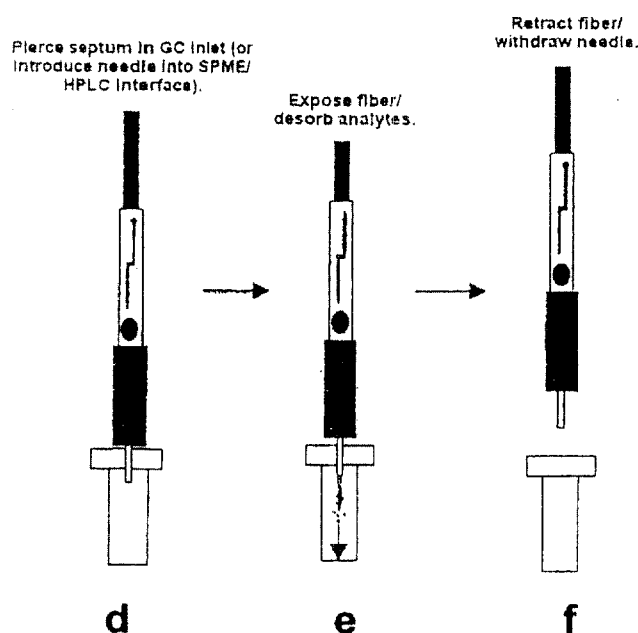
DOCUMENT 4 :**Technique de micro-extraction en phase solide ou SPME**

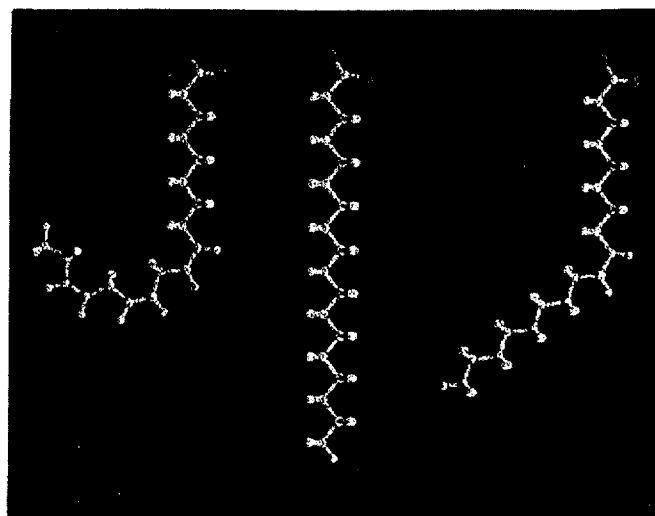
L'appareillage d'extraction est une seringue modifiée de la façon suivante : à l'intérieur de l'extrémité de l'aiguille se trouve une courte fibre en silice recouverte d'une phase solide constituée d'un polymère adsorbant, par exemple le polydiméthylsiloxane (PDMS).

En position d'attente, la fibre est rétractée à l'intérieur de l'aiguille. Lors d'une analyse, l'aiguille permet de percer le septum assurant l'étanchéité du tube contenant l'échantillon **(a)**. La fibre est alors sortie de son aiguille et exposée à l'échantillon **(b)** pendant une durée convenable et sous agitation par ultrasons. Pour retirer la fibre de l'échantillon, elle est à nouveau rétractée dans son aiguille **(c)**.



C'est le plus souvent ensuite une analyse par chromatographie qui est effectuée. Pour une analyse par chromatographie en phase gazeuse, les analytes sont désorbés directement dans l'injecteur chauffé de l'appareil. En revanche, pour une analyse par HPLC, un adaptateur est nécessaire pour extraire les composés de la fibre et les remettre en solution **(d, e, f)**.

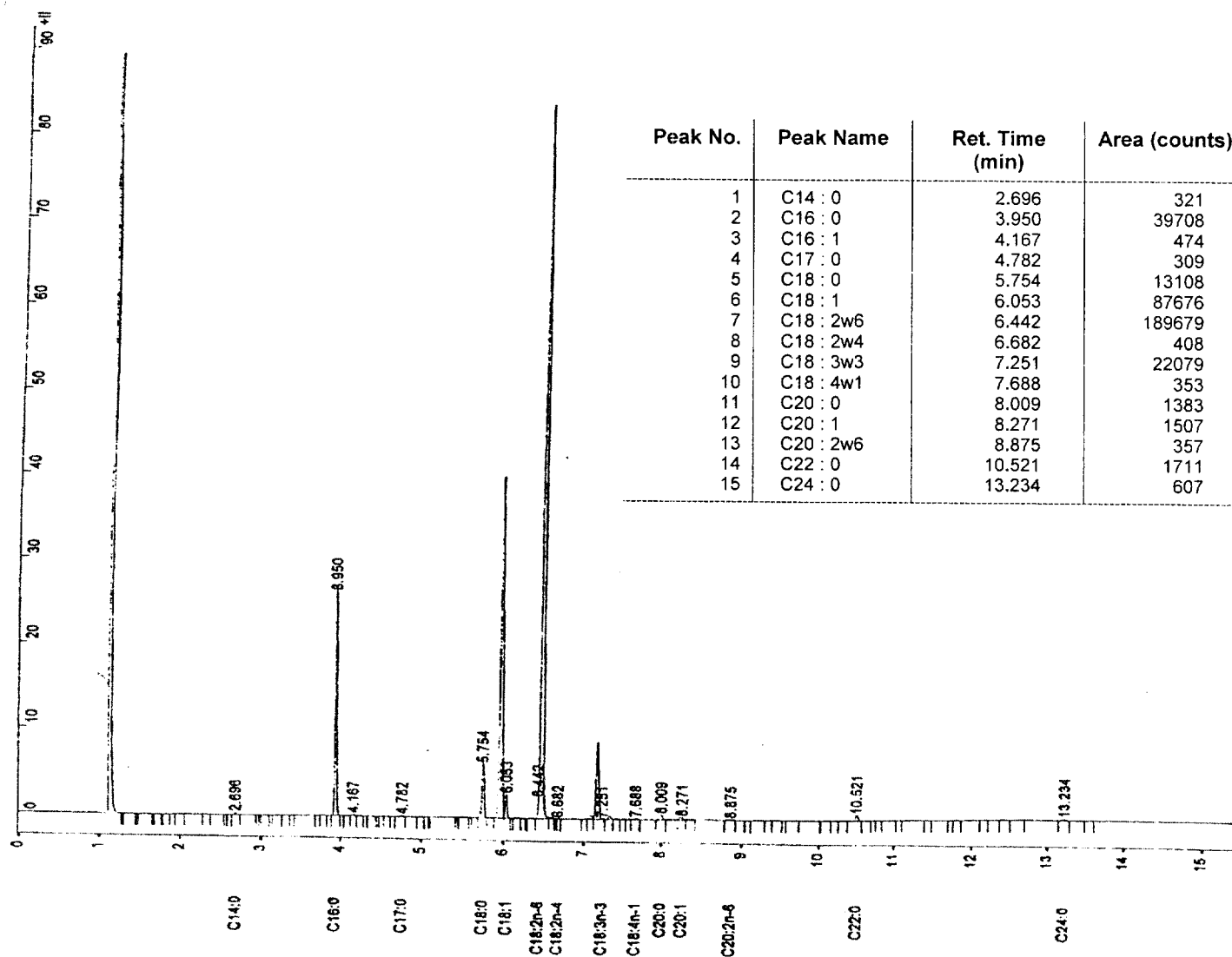


DOCUMENT 5 :Modèles moléculaires d'acides gras

m1

m2

m3

DOCUMENT 6 :

DOCUMENT 7 :**Informations pour le dosage de la Vitamine E par spectrofluorimétrie**

Spectres d'absorption de l'hexane (a), du blanc réactifs (b), de la vitamine E (c).

Spectres de fluorescence de la vitamine E (d), de l'hexane (e) obtenus par excitation à la longueur d'onde appropriée.

