



Licence Sciences et Techniques (LST)

Technique d'Analyse et Contrôle de Qualité
« TACQ »

PROJET DE FIN D'ETUDES

**Validation de la méthode de dosage du phosphore total par
spectrophotométrie UV\Vis**

Présenté par :

◆ **BAKOUR IKRAM**

Encadré par :

- ◆ **Mme.MECHATTE ASMAE (ALf EL Maghreb)**
- ◆ **Pr.ALILOU EL HOUSSINE (FST)**

Soutenu Le 06 Juin 2017 devant le jury composé de:

- **Pr. ALILOU EL HOUSSINE**
- **Pr. CHAKROUNE SAID**
- **Pr. TOUZANI HANANE**

Stage effectué à ALF EL Maghreb

Année Universitaire 2016 / 2017

- **Remerciement :**

Je tiens à remercier dans un premier temps, toute l'équipe pédagogique de la **faculté des sciences et techniques de Fès** .Je remercie également le professeur **EL HOUSSINE ALILOU** pour l'aide et les conseils concernant les missions évoquées dans ce rapport, qu'il m'a apporté lors des différents suivis.

Je tiens à remercier tout particulièrement et à témoigner toute ma reconnaissance aux personnes suivantes, pour l'expérience enrichissante et pleine d'intérêt qu'elles m'ont fait vivre durant ma période de stage au sein de l'entreprise **ALF EL Maghreb** :

Madame **A.MECHATTE**, responsable du laboratoire de la société **ALF EL Maghreb**, pour m'avoir intégré rapidement au sein de laboratoire et m'avoir accordé toute sa confiance ; pour le temps qu'elle m'a consacré tout au long de cette période, sachant répondre à toutes mes interrogations; Madame **EL Montaser KAOUTAR** ainsi que l'ensemble du personnel d'**ALF EL Maghreb** pour leur accueil sympathique et leur coopération professionnelle tout au long de ces 2 mois.

Mes remerciements vont aussi aux membres du jury à savoir, Mr. Le professeur **CHAKROUNE SAID**, et Mme le professeur **TOUZANI HANANE**, de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'évaluer ce modeste travail.

Je remercie en particulier Mademoiselle Bouchra responsable des ressource humaine de m'avoir donné l'occasion extraordinaire de réaliser un travail au siens de laboratoire de la société **ALF EL Maghreb**.

- **Dédicace :**

Je dédie ce travail, comme preuve de respect, de gratitude, et de reconnaissance à :

Ma chère famille, pour son affection, sa patience, et ses prières.

Mes meilleurs amis pour leur aide, leur temps, leur encouragements, leur assistance et soutien.

Personnel de « **ALF EL Maghreb** ». Qui m'a aidé à améliorer mes connaissances en me donnant informations et conseils.

Mes encadrants, je serais vaniteuse si je me devais énumérer en quelques lignes vos remarquables qualités humaines et professionnelles. A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Merci infiniment.

• **Sommaire :**

Introduction générale :	1
Partie 1 : Partie théorique	
Chapitre 1 : Présentation de la société ALF EL Maghreb :	
I-Présentation de la société ALF EL Maghreb :	1
1-Fiche technique de la société :	1
II- Processus de fabrication :	2
1-Formulation et la recherche de la meilleure recette :	2
2-Réception :	2
3-Stockage :	2
4-Dosage :	3
5-Pré-mélange statique :	3
6-Broyage :	3
7-Mélange :	4
8-Distribution :	4
9-Pressage :	4
10-Refroidissement :	4
11-Emiettement :	4
12-Tamissage :	4
13-Ensachage :	4
14-Expédition :	4
III-Alimentation animale :	5
1-A chaque animal son aliment composé :	5
2-Contrôle qualité au laboratoire de la société :	5
a-Les analyses physico-chimiques.....	5
b-Les analyses bactériologiques :	5
Chapitre 2 : Validation d'une méthode analytique :	
I-Validation d'une méthode analytique :	6
1-Définition :	7
2-Objectif :	9
3-Les types de validation :	9
II-Comment décrire les performances d'une méthode analytique :	9
1-Domaine d'application :	9

2- Capacité de détection :	9
a-limite de détection :	10
b-Méthode de calcul du ratio de conformité(R) :	10
c-Limite de quantification :	10
3-Fidélité :	11
a-Répètabilité :	11
b-Reproductibilité :	11
c-Intervalle de confiance :	11
4-Justesse :	11
a-Méthode de calcul de la justesse :	12
5-Linéarité :	12
6-Sensibilité :	12
7-Spécificité :	12
a-Méthode des ajouts dosés :	13
b-Présentation graphique :	13
III-Contrôle statistique :	14
1-Notions statistiques :	15
2-Carte de contrôle :	15
Partie 2 : Partie expérimentale :	17
I-Dosage de phosphore total :	17
1-Principe :	17
a-Réactifs :	18
b-Préparation :	18
c-Développement de la coloration et mesurage de l'absorbance :	18
d-Etablissement de la courbe d'étalonnage :	19
II-Résultats :	19
1-Etablissement de la courbe d'étalonnage :	19
a-Expression des résultats :	20
2-Domaine d'application :	20
3-Linéarité :	20
4-Sensibilité :	20
5-Limite de détection et limite de quantification.....	21
6-Fidélité :	21

a-Répétabilité.....	22
b-Reproductibilité :	22
7-Justesse :	23
8- Spécificité :	23
a-Mise en œuvre expérimental de la méthode des ajouts dosés :	23
b-Détermination de la concentration inconnue en analyte Cx :	23
c-Traçage de la courbe :	24
III-Carte de contrôle.....	25
Conclusion :	27

- **Liste des figures :**

Figure 1	La composition moyenne d'un aliment
Figure 2	Représentation graphique de l'étalonnage par ajouts dosée
Figure 3	la représentation graphique de concentration introduction en fonction de concentration retrouvée, visualisant l'effet de matrice sous ces différents aspects, additifs et multiplicatifs
Figure 4	Ballon de kjeldahl de 250ml
Figure 5	Courbe d'étalonnage pour le phosphore
Figure 6	présentation graphique de la concentration introduite en fonction de la concentration retrouvée
Figure 7	Carte de contrôle de dosage de phosphore total

- **Liste des tableaux :**

Tableau 1	Fiche technique de la société
Tableau 2	Les mycotoxines dans les graines et graines de base
Tableau 3	Quelques notions de statistiques utilisées
Tableau 4	<i>Résultats de l'essai à blanc de phosphore</i>
Tableau 5	<i>Résultats de répétabilité pour le phosphore</i>
Tableau 6	<i>Résultats de reproductibilité pour le phosphore</i>
Tableau 7	les résultats de justesse pour le phosphore
Tableau 8	Différentes concentrations des solutions des étalons
Tableau 9	les concentrations et volumes utilisés pour la méthode des ajouts dosés
Tableau 10	Résultats de % de phosphore obtenus pendant 25 jours

Introduction générale :

La production des aliments sains et sûres commence par l'alimentation saine et sûre des animaux. Le phosphore minéral ajouté aux aliments composés volailles coûte fréquemment de 2 à 2,5 % de la formule totale. Apporté en excès, il peut occasionner divers troubles - dyschondroplasie des poulets, fragilité de coquille des œufs - et contribue à la pollution de l'environnement.

Toute possibilité d'utilisation réelle du phosphore contenu dans les graines sous forme pythique mérite donc d'être connue, et analysée.

La confiance dans les données d'analyse obtenue est un préalable pour parvenir à cet objectif ; il faut donc toujours démontrer que la méthode mise en œuvre par le laboratoire est apte à l'emploi prévu (besoins de client).

C'est à ce stade qu'on fait appel à la validation, elle permet d'assurer la fiabilité et la traçabilité d'un résultat d'une analyse en laboratoire, sur une matrice donnée.

C'est dans ce cadre que s'inscrit l'objectif de mon travail qui concerne la validation de méthode d'analyse de phosphore total par spectrophotométrie UV\Vis.

Le présent rapport va présenter un aperçu général sur la société ALF AL MAGHREB, et puis traiter la notion de validation d'une méthode analytique et les résultats de l'étude effectué sur la méthode candidate.

PARTIE 1 :

Partie théorique

Chapitre 1 : Présentation de la société ALF EL Maghreb

I. Présentation de la société ALF EL Maghreb:

La société ALF EL Maghreb, est l'une des principales entreprises agricoles à Fès, qui se spécialise dans la fabrication et la commercialisation des aliments de bétails et volailles .C'est une société anonyme créée en 1974 par le groupe Chawni à SIDI BRAHIM à Fès avant de se déplacer au nouveau site, situé au lotissement ENNAMAÉ au quartier industriel BEN SOUDA. La société se décompose en 3 grandes unités :

- La production : pour la fabrication d'aliments composés équilibrés, présentés sous forme de farine, miettes ou granulés et adaptés pour chaque type d'animal.
- Laboratoire : pour les analyses physicochimiques et microbiologiques
- Le prémix : pour la fabrication d'un pré mélange appelé prémix ; ce sont des Concentrés d'oligoéléments, de vitamines et de minéraux. Ils sont associés en faible pourcentage aux différentes matières premières pour constituer l'aliment complet à destination du bétail.

1. Fiche technique de la société :

Raison sociale	Société EL ALF
Forme juridique	Société anonyme (S.A)
Directeur de l'entreprise	Mr Ali BERBICH
Date de création	1974
Capital	50.000.000 DH
Tél	035728895
Fax	0 55 65 56 08
Siège social	Lotissement ENNAMAÉ, Quartier industriel BENSOUDA, Fès
Superficie	6000 m ² dont 2500 couverts
Activités	Fabrication des aliments composés pour bovins, ovins et volailles.
Capacité de production	700 tonnes
Destination des produits	Fermes propres à l'entreprise, Revendeurs et Eleveurs
effectifs	144 permanentes 52 temporaires
Certification	ISO 9001 version 2008 et OHSAS 18001
Positionnement	Parmi les leaders nationaux

Tableau 1 : Fiche technique de la société

II. Processus de fabrication :

Le processus de fabrication des aliments composés peut se décomposer en plusieurs étapes principales : la réception des matières premières, la fabrication et l'expédition. Elles sont précédées d'une étape de recherche et de formulation pour déterminer les besoins alimentaires des animaux et les caractéristiques des matières premières sont rigoureusement étudiés dans les laboratoires et les centres de recherche afin d'assembler les ingrédients dans des proportions adaptées :

1. Formulation et recherche de la meilleure recette :

Les animaux doivent trouver dans leur alimentation des apports quotidiens en énergie, en protéines, en vitamines, en minéraux et en fibres végétales. Ils les trouvent dans les aliments composés où les différentes matières premières sont assemblées en fonction de ce qu'elles apportent dans un dosage équilibré. C'est cet assemblage, convenablement dosé et proportionné, qui constitue l'étape de la formulation, c'est à dire la détermination de la meilleure recette possible.

Pour tous les animaux d'élevage, les céréales constituent la base énergétique de la ration alimentaire. Elles représentent en moyenne près de 50% des matières premières mises en œuvre dans les aliments composés.

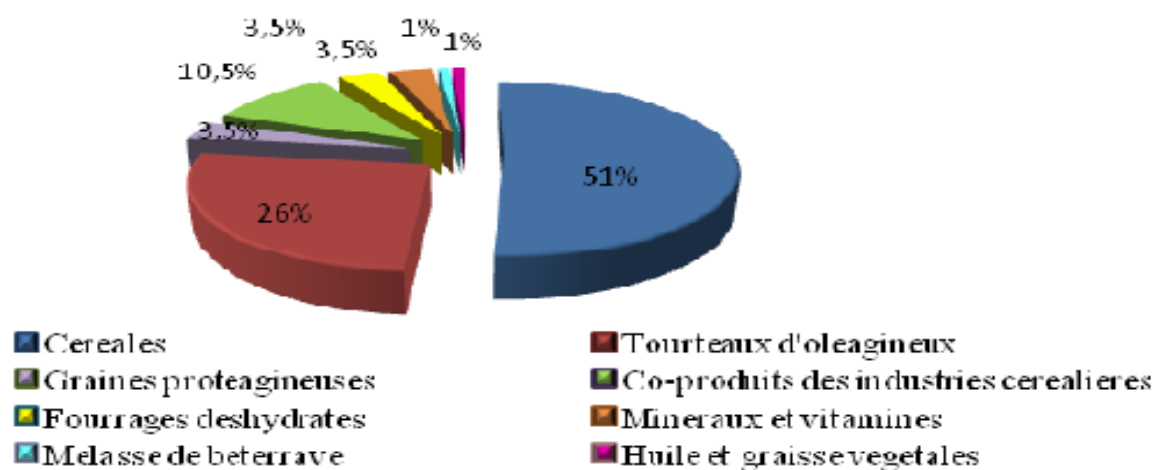


Figure 1: La composition moyenne d'un aliment

2. Réception :

La majorité des matières premières utilisées dans la fabrication d'aliments composés est importée. A la réception deux types de contrôles sont effectués : Un contrôle du poids net, par des ponts bascules, permettant de s'assurer de la quantité livrée. Un contrôle de qualité réalisé selon une méthode d'échantillonnage préétablie.

3. Stockage :

Le contenu des camions est déchargé en vrac dans deux fosses de capacités différentes, ensuite la matière première est transportée par des élévateurs et transporteurs vers des silos de stockage de capacités différentes. La société dispose de 26 silos destinés au stockage.

4. Dosage et pré-mélange :

Cette étape consiste à peser la quantité de la matière première par le biais de deux bennes peseuses. Cette opération est déterminée par une formule préétablie par le responsable formulation, elle prend en considération la destination du produit fini.

5. Pré-mélange statique :

Une fois le dosage de la matière première effectué, cette dernière passe par une trémie assurant un premier mélange grossier. Une telle étape permet d'obtenir un mélange homogène de cette matière première avant le broyage.

6. Broyage :

Le pré-mélange passe par un broyeur à marteaux forçant les particules à travers un tamis afin de réduire la matière première à une granulométrie très petite.

7. Mélange :

La matière broyée passe ensuite par une mélangeuse qui reçoit à la fois : Un pré-mélange (produit semi fini) : mélange homogène de plusieurs ingrédients. Des additifs : des apports liquides (la choline, l'huile de soja, la méthionine liquide, la mélasse) ou des macroéléments qui sont préalablement dosés à l'aide d'une troisième benne peseuse.

8. Distribution :

Le produit sortant de la mélangeuse ayant un aspect farineux est par la suite transporté vers des silos de stockage de produit fini (cellules de vidange : CV) ou bien vers des cellules de presse (CP) dans le cas de produit sous forme de granulé ou miette.

9. Pressage (granulation):

Cette étape concernant principalement les produits sous forme granulés ou miettes, est réalisée grâce à deux presses. Le mélange passe dans une presse alimentée par une injection de la vapeur d'eau, une telle opération constitue le siège d'un traitement thermique et permet d'humidifier les particules granulées.

10. Refroidissement :

Le produit pressé subit ensuite un refroidissement afin d'éliminer l'excès d'eau et empêcher la formation d'agglomérats. A ce stade, le produit obtenu est granulé et sera destiné vers des silos de stockage du produit fini en attendant son expédition.

11. Emiettement :

Cette étape est réservée aux produits sous forme de miettes et consiste en un fractionnement des granules en particules de tailles définies en fonction de l'animal concerné et de son stade physiologique (grande, moyenne et petite miette).

12. Tamisage :

Cette opération permet de séparer les granules des poussières par l'intermédiaire des grilles. Les produits émiettés connaissent par la suite des destinations variées : les produits farineux retournent vers la presse. Les grosses particules seront retournées vers l'émetteur. Les particules de taille conforme sont stockées dans les silos de produit fini.

13. Ensachage :

Les produits finis sont mis en sac par une ensacheuse assurant une précision de poids.

14. Expédition :

Selon les commandes, l'expédition est réalisée en vrac ou en sac.

III. Alimentation animale :

Les animaux doivent trouver dans leur alimentation des apports quotidiens en énergie, en protéines, en vitamines, en minéraux et en fibres végétales. Ils les trouvent dans les aliments composés où les différentes matières premières sont assemblées en fonction de ce qu'elles apportent dans un dosage équilibré. Pour tous les animaux d'élevage, les céréales constituent la base énergétique de la ration alimentaire. Elles représentent en moyenne près de 50% des matières premières mises en œuvre dans les aliments composés.

1. A chaque animal son aliment composé :

Les besoins nutritionnels des animaux dépendent de l'espèce, de l'âge, du sexe et de ce qu'ils produisent.

En fonction de ces besoins, le formulateur, compose pour chacun une recette adaptée : un assemblage spécifique de matières premières...Un aliment nutritionnellement équilibré doit aussi être facile à consommer. Pour cela les fabricants adaptent la forme de présentation de l'aliment: farine (poussin, poule), miette (volaille), petit ou gros granulé (porc, bovin) sont distribués aux animaux en fonction de leur taille et de leur morphologie.

Pour élaborer des aliments équilibrés pour tous les animaux, en fonction de leur spécificité, les fabricants doivent très bien connaître :

- _ Les besoins des animaux. Cette connaissance doit être très détaillée et très précise
- _ La composition des matières premières, en allant jusqu'à chaque nutriment en qualité et en quantité.

2. Contrôle qualité au laboratoire de la société :

Le contrôle de la qualité fait partie des bonnes pratiques de fabrication ; il concerne l'échantillonnage, les spécifications, le contrôle, ainsi que les procédures d'organisation, de documentation et de libération qui garantissent que les analyses nécessaires et appropriées ont réellement été effectuées et que les matières premières, et les produits finis ne sont pas libérés pour l'utilisation, la vente ou l'approvisionnement sans que leur qualité n'ait été jugée satisfaisante.

La qualité des matières premières et des produits finis est contrôlée en permanence. Ces contrôles peuvent porter sur la qualité des produits finis, ou celle des matières premières utilisées, les différentes analyses de contrôle de qualité du laboratoire sont les suivantes :

a. Les analyses physico-chimiques:

Pour chaque matière première et produit fini le service qualité définit des paramètres d'analyse (humidité, température, activité d'eau..) qui vise la valeur nutritionnelle du produit, accompagnée des fréquences d'analyse pour les comparer avec des normes prédéfinies.

➤ Détermination de l'humidité:

Après broyage et conditionnement éventuels, la méthode consiste à un séchage du produit à une température de 103°C(ou autre selon le produit) pendant quatre heures.

➤ Dosage des cendres brutes:

On entend par cendres brutes, le résidu obtenu après incinération dans les conditions de la norme.

La teneur en matière minérale d'une substance est conventionnellement le résidu de la substance après incinération dans un four pendant six heures à une température de 550°C.

➤ La teneur en cellulose:

Cellulose brute: résidu organique obtenu après un double hydrolyse réalisée successivement avec une solution acide et une solution basique. C'est une estimation par excès de la cellulose, car le résidu contient aussi une fraction variable de la lignine et des hémicelluloses

➤ Détermination de la teneur en protéine brute selon la méthode de Kjeldahl:

La méthode Kjeldahl consiste à doser la teneur en protéine brute après une minéralisation effectuée à l'aide d'un excès d'acide sulfurique concentré, en présence de catalyseurs pour accélérer la réaction de décomposition.

Après minéralisation, tout l'azote se trouve dans le minéralisât sous une même forme minérale,

Après une alcalinisation des produits de la réaction puis distillation, l'azote est ensuite dosé par une solution titrée d'acide sulfurique.

- Dosage de la matière grasse selon la méthode de Soxhlet :

C'est la méthode de référence utilisée pour la détermination de la matière grasse dans les aliments solides déshydratés. C'est une méthode gravimétrique qui consiste à une extraction préliminaire à l'éther de pétrole de la matière grasse des échantillons.

- Détermination de l'activité de l'eau :

La méthode Consiste à déterminer l'eau libre dans l'échantillon à l'aide d'un activimètre.

- Dosage de calcium selon la méthode titrimétriques :

La méthode permet de déterminer la teneur en calcium total des aliments des animaux. L'échantillon est incinéré, les cendres sont traitées par l'acide chlorhydrique et le calcium est précipité sous forme d'oxalate de calcium. Après une dissolution de précipité dans l'acide sulfurique, l'acide oxalique formé est titré par une solution de permanganate de potassium.

- Activité uréasique :

La méthode permet de déterminer l'activité de l'uréase des produits dérivés du Soja et déterminer le degré de cuisson de ces produits. Cette méthode ne s'applique que sur les Tourteaux de Soja et ces dérivés.

- Azote ammoniacal :

Détermination de la teneur en bases azotées volatils, exprimées en ammoniac, des farines de poisson ne contenant pratiquement pas d'urée. Elle concerne les farines de poisson.

- Détermination des chlorures solubles :

La méthode permet le dosage du chlore des chlorures solubles dans l'eau, conventionnellement exprimé en chlorure de sodium. Elle s'applique à tous les aliments volailles et les farines de poissons.

- Dosage du phosphore total par spectrophotométrie :

La méthode permet de déterminer le phosphore total dans les aliments des animaux. Minéralisation d'une prise d'essai, soit par voie sèche et mise en solution dans l'acide (dans le

cas des aliments organiques), soit par voie humide (dans les composés minéraux et des aliments liquides). Traitement de la solution par le réactif vanado-molybdique et mesurage de l'absorbance de la solution jaune ainsi obtenue, au spectrophotomètre, à 430 nm.

b. Les analyses bactériologiques :

➤ Recherche des moisissures :

La méthode consiste à un dénombrement de moisissures en ensemençant des échantillons sur la gélose Sabourand des différentes dilutions préparées dans l'eau péptonée.

➤ Recherche des salmonelles :

On procède à la recherche de salmonelle par :

La méthode classique en passant par le pré-enrichissement dans l'eau péptonée tamponnée et enrichissement dans le bouillon sélénite, puis l'ensemencement sur le vert brillant.

➤ Recherche des mycotoxines:

Ce sont des métabolites secondaires hautement toxiques produits principalement par les champignons des espèces *Fusarium*, *Aspergillus*, et *Penicillium*. Ce sont des petites molécules de durée de vie dans l'aliment bien plus longue que celles des champignons les ayant synthétisés. Elles sont chimiquement et thermiquement stables. Le laboratoire de la société s'intéresse à la recherche de trois types de mycotoxine :

L'aflatoxine Total ou AFT, Le déoxynivalénol ou DON et Fumonisine FUM.

Mycotoxine	Denrées	Champignon producteur	Conséquence de l'ingestion
Aflatoxine	Mais, Arachides	<i>Aspergillus</i>	Potentiellement cancérogènes chez l'homme. Effets néfastes sur divers animaux et en particuliers les poulets.
Déoxynivalénol	Blé, Mais et Orge	<i>Fusarium culmorum</i>	Intoxications humaines. Toxiques pour les animaux et en particuliers les porcs.

Tableau 2: Les mycotoxines dans les graines et graines de base

Chapitre 2 : Validation d'une méthode analytique

I. Validation d'une méthode analytique :

1. Définition :

La validation d'une méthode analytique est l'opération par laquelle on s'assure que ses résultats répondant au problème de manière satisfaisante pour l'utilisateur. Elle s'efforce de détecter et contrôler les sources d'erreurs possibles liées à la méthode étudiée : sa définition dans les normes « Valider une méthode consiste à démontrer, avec un degré de confiance élevé et sous une forme documentée, que la méthode permet d'obtenir un résultat analytique qui atteint les spécifications définis à l'avance »

2. Objectif :

La validation des méthodes analytiques a pour principal objectif de s'assurer qu'une méthode analytique donnée donnera des résultats suffisamment fiables et reproductibles, compte tenu du but de l'analyse. Il faut donc définir correctement à la fois les conditions dans lesquelles la méthode sera utilisée et le but dans lequel elle sera employée.

Autrement dit : «Le but de la validation d'une procédure analytique est de démontrer qu'elle correspond à l'usage pour lequel elle est prévue».

3. Les types de la validation :

Ils existent deux types de validation :

- Validation intra-laboratoire : elle est universelle et obligatoire pour toutes les méthodes.
- Validation inter-laboratoire : elle n'intéresse que les méthodes qui seront utilisées par plusieurs laboratoires.

II. Comment décrire les performances d'une méthode analytique :

Depuis de très nombreuses années, l'approche des analystes a été de caractériser les performances des méthodes d'analyse en évaluant au travers des travaux expérimentaux des caractéristiques.

Les caractéristiques de validation les plus souvent cités :

- Domaine d'application.
- Linéarité.
- capacité de détection : limite de détection, limite de quantification.

- Sensibilité.
- Fidélité : Reproductibilité, Répétabilité.
- Justesse.
- Spécificité.

1. Domaine d'application :

Pour une analyse quantitative, le domaine d'application d'une méthode est déterminé en examinant des échantillons ayant des concentrations différentes en un analyte, et en déterminant l'intervalle de concentration pour lequel la fidélité et la justesse peuvent être atteintes.

2. Capacité de détection :

a. Limite de détection :

Plus petite concentration ou teneur de l'analyte pouvant être détectée à l'aide d'une méthode d'analyse avec une fiabilité définie.

À partir d'une mesure faite sur un blanc analytique, on calcule l'écart type du signal. La limite de détection LD correspond à la concentration qui conduit à un signal dont l'intensité est égale à 3 fois celle de l'écart type du blanc.

b. Méthode de calcul du ratio de conformité (R) :

Le calcul du ratio de conformité nous permet de déterminer la validité d'une démarche pour l'établissement d'une limite de détection. En général, si le résultat du calcul pour un ratio R qui sert à l'établissement d'une limite de détection n'est pas supérieur à 4, il faut recommencer la procédure d'établissement de la limite de détection avec un échantillon qui a une concentration plus haute.

Si :

$$R = \frac{\bar{x}}{LD \text{ calculé}} = \frac{\bar{x}}{3S}$$

Ou : R : ratio de conformité ;

x : moyenne arithmétique de *n* réplique ;

S : écart type de *n* réplique.

❖ Interprétation de la valeur du ratio de conformité (R) :

- $4 < R < 10$: La concentration utilisée est adéquate.
- $R < 4$: Ce ratio indique que la limite réelle de détection de la méthode est plus élevée que la limite de détection estimée lors des essais. Reprendre les essais en révisant la limite de détection estimée et la concentration de l'échantillon utilisé.

- $R > 10$: Ce ratio indique que la limite réelle de détection de la méthode est plus basse que la limite de détection estimée lors des essais.

c. Limite de quantification :

Concentration minimale qui peut être quantifiée à l'aide d'une méthode d'analyse avec fiabilité définie.

Elle est équivalente à 10 fois l'écart type S calculé à partir d'au moins 10 mesures effectuées sur des solutions témoins ou des étalons ayant une concentration aussi près que possible de la limite de détection.

3. Fidélité :

La fidélité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats obtenus en appliquant le procédé expérimental à plusieurs reprises ($n = 10$ réplica) dans des conditions déterminées. Selon les conditions d'exécution de l'essai, cette caractéristique s'exprime sous forme de réplabilité, de répétabilité ou de reproductibilité pour une méthode.

a. Répétabilité:

Cette mesure de la variation des résultats au sein d'un même laboratoire caractérise la précision obtenue lorsque la méthode est répétée par le même analyste dans les mêmes conditions (réactifs, matériel, réglage, laboratoire) dans un court intervalle de temps. La répétabilité d'une méthode est évaluée en procédant à des déterminations complètes et distinctes sur des échantillons identiques provenant du même lot homogène de produit. Cela permet d'évaluer la précision de la méthode dans les conditions opératoires normales

b. Reproductibilité (inter-laboratoire) :

C'est la précision de la méthode lorsqu'elle est appliquée dans des conditions différentes - généralement dans des laboratoires différents - à des échantillons distincts, théoriquement identiques, prélevés sur le même lot homogène de produit à analyser. Afin de pouvoir comparer des résultats obtenus par différents analystes, avec un matériel différent, ou à des dates différentes.

c. Détermination de l'intervalle de confiance :

Les deux termes précédents de la fidélité s'expriment à l'aide d'un intervalle: de confiance à une concentration donnée, en fonction de l'écart type ($s(n)$), à un niveau de confiance spécifié et pour un nombre donné de déterminations rapportant ($n = 10$ réplica). Le niveau de confiance habituellement retenu est de 95 %.

L'intervalle de confiance bilatéral de la moyenne arithmétique d'une série de mesures à un niveau de confiance de 95 % est défini par la double inégalité suivante :

$$\bar{x} \pm \frac{t(0,975; n-1) \times S}{\sqrt{n}}$$

Lorsque $n \geq 30$, $t(0,975; n-1) = 2$. Pour $n < 30$, il faut se référer à une table statistique de la distribution de Student pour connaître la valeur de $t(0,975; n-1)$ correspondant à la probabilité au dépassement bilatéral.

4. Justesse :

La justesse à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre la valeur certifiée par un organisme reconnu et le résultat moyen qui serait obtenu en appliquant dix fois le procédé expérimental ($n = 10$ réplica). La justesse se mesure, à un niveau donné de concentration, dans la zone quantifiable pratique de la méthode. Elle s'exprime par l'erreur relative.

a. Méthode de calcul de la justesse :

Dans la zone quantifiable de la méthode, appliquer 10 fois le procédé expérimental ($n = 10$ réplica) sur un échantillon dont la valeur suggérée est fournie par un organisme reconnu (matériaux de référence).

$$\text{Justesse}(\%) = 100 - |\text{erreur systématique}(\%)|$$

$$\text{Erreur relative}(\%) = \frac{V_0 - V_S}{V_S} \times 100$$

V_0 : moyenne des valeurs observées;

V_S : valeur suggérée.

5. Linéarité :

Capacité dans un intervalle donné d'obtenir des résultats de dosage directement proportionnels à la concentration ou à la quantité de l'analyte.

L'étendue de concentration des étalons qui se situe entre la LQM et la LL est la zone quantifiable utilisée dans une méthode d'analyse. Le coefficient de corrélation doit être supérieur à 0,995 pour respecter le critère de la limite de linéarité.

6. Sensibilité :

La sensibilité à une concentration donnée correspond au rapport de la variation de la grandeur mesurée à la valeur correspondante de la concentration de l'élément à doser.

On l'exprime par le rapport entre le signal obtenu et la concentration d'un étalon à l'intérieur de la plage pratique de la courbe :

$$S = (\Delta A) / (\Delta C) = \frac{y_1 - y_2}{x_1 - x_2}$$

7. Spécificité :

La spécificité est la propriété d'une méthode d'analyse de convenir exclusivement à la caractéristique ou à l'analyte, avec la garantie que le résultat de l'analyse ne provient que de

l'analyte ; en effet elle permet de vérifier que le signal mesuré correspond bien à l'analyte recherché.

Très souvent la spécificité se fonde sur l'absence des interférences. Lorsque l'on ne peut pas évaluer l'influence de chaque constituant de la matrice, une technique commode d'emploi, permettent d'évaluer l'influence de certaines interférences est la méthode de ajouts dosés.

a-Méthode des ajouts dosés :

Elle consiste à ajouter dans l'échantillon avant, pendant ou après sa préparation des quantités connues de l'analyte .On examine alors si la réponse de l'instrument de mesure correspond au signal initial augmenté du signal correspondant à la quantité ajoutée.

Dans ce cas, la matrice va être analysée seule puis avec des supplémentaire –ou ajouts- connues en substance à doser. La droite de réponse du détecteur en fonction de la concentration sur la figure. Son équation est la suivante :

$$Réponse_{totale} = a \times C_{ajout} + Réponse_x$$

Avec :

a : pente de la droite d'étalonnage

C_{ajout} : Concentration de l'ajout réalisé

$Réponse_{totale}$: Réponse du détecteur

$Réponse_x$: Réponse du détecteur pour la solution inconnue sans ajout

Par ailleurs, la concentration totale des solutions dosées est égale à la concentration de la solution inconnue à laquelle il faut ajouter la concentration de l'ajout.

Soit :

Sur cette droite, pour le point particulier A, où la réponse du détecteur est nulle, la concentration totale est également nulle :

$$Reponse_{totale} = 0 \text{ Et } C = 0$$

Soit :

$$a \times C_{ajout} + Reponse_x = 0 \text{ Et } C_x + C_{ajout} = 0.$$

soit donc :

$$C_{ajout} = - Réponse_x/a \quad \text{et} \quad C_x = -C_{ajout}$$

il vient donc :

$$C_x = Réponse_x/a$$

Soit donc :

$$C_{ajout} = -Reponse_x/a \text{ Et } C_x = -C_{ajout}$$

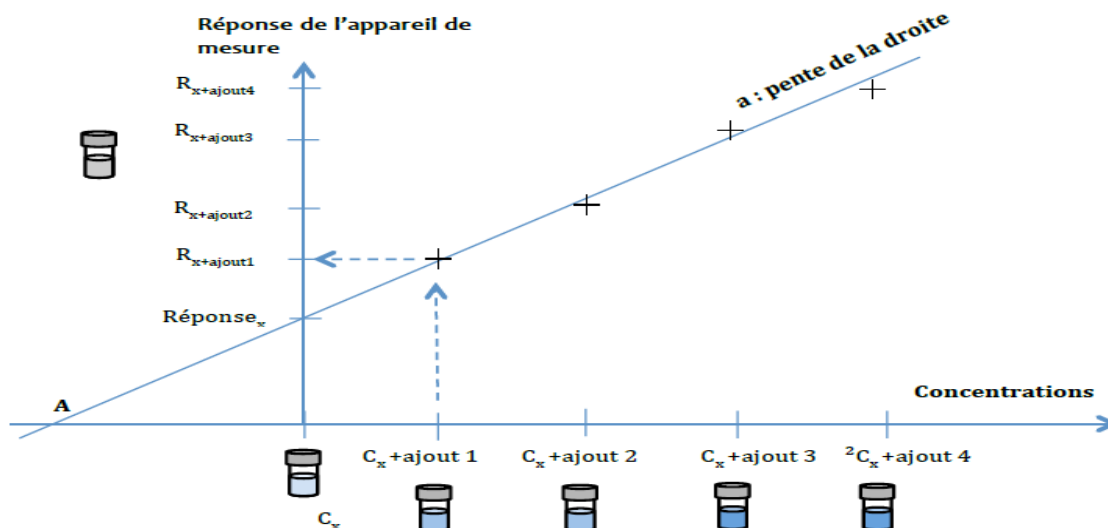


Figure 2: Représentation graphique de l'étalonnage par ajouts dosés

a.

Présentation graphique :

Dans le cas d'un dosage dans une matrice qu'on ne maîtrise pas des composantes, la méthode graphique reste la meilleure solution pour démontrer l'absence d'interférences.

On trace une courbe de concentration retrouvéé par la méthode des ajouts dosés en fonction des concentrations des étalons :

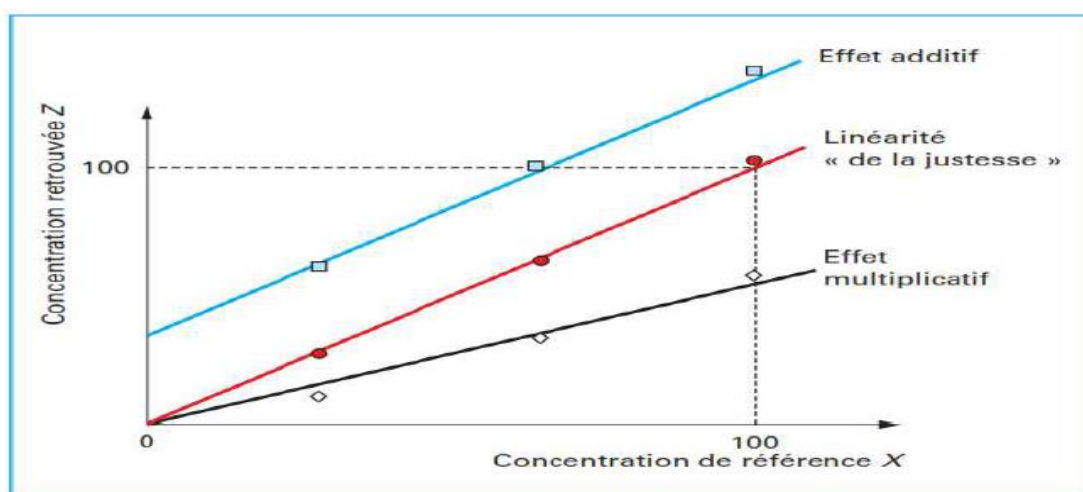


Figure 3: la représentation graphique de concentration introduction en fonction de concentration retrouvée, visualisant l'effet de matrice sous ces différents aspects, additifs et multiplicatifs.

La figure illustre un exemple de cette droite de justesse selon trois situations hypothétiques :

- ✓ Les cercles pleins produisent une droite confondue avec la première bissectrice ; la spécificité est parfaite ;

- ✓ Les carrés illustrent un décalage systématique des concentrations retrouvées ; on parle d'effet additif ;
- ✓ Les losanges illustrent une situation dans laquelle le biais est proportion à la concentration ; on parle d'effet multiplicatif.

Soit X la valeur introduction (gamme d'étalonnage) et Z la concentration retrouvée par étalonnage inverse, ces trois droites correspondent aux équations suivantes :

- Absence d'effet : $Z = X$
- Effet multiplicatif : $Z = b X$
- Effet additif : $Z = a + X$

III-Contrôle statistique :

Le mot "contrôle" signifie que nous gardons une chose entre certaines limites, ou que nous conduisons une chose à se comporter comme nous le voulons.

Le mot "statistique" signifie que nous avons affaire à des nombres, et plus particulièrement que nous traitons des nombres pour en tirer des conclusions.

1-Notions statistiques :

<i>Moyenne</i>	<i>L'étendue</i>	<i>L'écart-type</i>	<i>Coefficient de variation</i>
$m = \sum \frac{Xi}{n}$	$R = X_{\max} - X_{\min}$	$\sqrt{\frac{\sum (Xi - m)^2}{n - 1}}$	$CV = \frac{s}{m} \times 100$

Tableau 3 : Quelques notions de statistiques utilisées

2-Carte de contrôle :

Il est très important que tous les processus de mesure soient sous contrôle statistique, ceci permet à l'analyste d'avoir une certaine assurance sur la fiabilité des résultats. Une méthode simple et rapide permet de vérifier si un procédé est sous contrôle statistique, elle consiste à reproduire ce qu'on appelle carte de contrôle. La carte de contrôle est une méthode graphique qui permet de visualiser la progression d'un processus pendant une longue période, elle

définit des limites de contrôle à l'intérieur desquelles doivent être situées les mesures, ces limites jouent un rôle d'alerte en cas d'anomalie dans le système.

PARTIE 2 :

Partie expérimentale

I. Dosage de phosphore total :

Ce travail consiste à examiner les facteurs de validation analytique tout en passant par un mode opératoire bien déterminé avec des conditions expérimentales prédéfinies à l'avance.

Pour la réalisation des essais on a adopté le mode opératoire suivant :

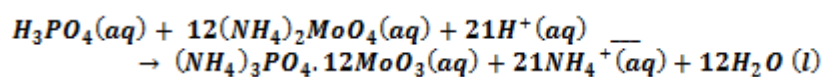
1. Principe :

- Minéralisation d'une prise d'essai, par voie humide : une minéralisation de l'échantillon par un mélange d'acide sulfurique + acide nitrique conduit à la destruction de toute la matière organique, et la transformation de tout le phosphore présent en ions phosphate PO_4^- .



Figure 4: Ballon de kjeldahl de 250ml

- Traitement de la solution par le réactif vanado-molybdique : les ions PO_4^- forment en milieu acide avec les ions molybdates un complexe phosphomolybdique de coloration jaune suivant une réaction quantitative :



Complexe jaune

- Plus la concentration de ce complexe est grande, plus l'intensité de la couleur jaune est importante

- mesurage de l'absorbance de la solution jaune ainsi obtenue, au spectrophotomètre, à 430 nm.

a-Réactifs :

- Acide nitrique concentré $d=1.38\text{g/ml}$.
- Acide sulfurique concentré $d=1.84\text{g/ml}$.
- Réactifs vanado-molybdique.
- Hyptamolybdate d'ammonium solution.

- Monovanadate d'ammonium solution.
- Solution étalon de phosphore.

b-Préparation :

- Peser à 1 mg près, 1 g ou plus de l'échantillon. Introduire la prise d'essai dans un matras de Kjeldahl.
- Ajouter 20 ml d'acide sulfurique, agiter pour imprégner complètement la matière d'acide et éviter qu'elle n'adhère aux parois du ballon.
- Chauffer et maintenir pendant 10 min à ébullition. Laisser refroidir légèrement, ajouter 2 ml d'acide nitrique concentré.
- Chauffé doucement, laissé refroidir légèrement, ajouter à nouveau un peu d'acide nitrique concentré et porter à ébullition.
- Répéter ces opérations jusqu'à obtention d'une solution incolore.
- Refroidir, ajouter un peu d'eau, transvaser le liquide dans un ballon jaugé de 500 ml en rinçant le matras à l'eau chaude. Laisser refroidir, compléter au volume avec de l'eau, homogénéiser et filtrer.

c-Développement de la coloration et mesurage de l'absorbance :

- Diluer une partie aliquote du filtrat obtenu. Pour obtenir une concentration en phosphore atteignant au maximum 40 μ g/ml.
- Introduire 10 ml de cette solution dans un tube à essai et y ajouter 10 ml du réactif vanadomolybdique.
- Homogénéiser et laisser reposer 10 min au moins à la température de 20°C(en général à la température du laboratoire).
- Mesurer la densité optique au spectrophotomètre à 430 nm par comparaison avec une solution obtenue par addition de 10 ml de réactif vanadomolybdique à 10 ml d'eau.

d-Etablissement de la courbe d'étalonnage :

- Préparer à partir de la solution étalon des solutions contenant respectivement 5, 10, 20, 30, 40 μ g de phosphore par ml.
- Prélever 10 ml de chacune de ces solutions et y ajouter 10 ml du réactif vanadomolybdique.
- Homogénéiser et laisser reposer 10 min au moins à la température de 20°C(en général à la température du laboratoire).

- Mesurer la courbe d'étalonnage en portant en ordonnée les valeurs de la densité optique et en abscisse les quantités correspondantes de phosphore. La courbe est linéaire pour les concentrations comprises entre 0 et 40µg/ml.

II. Résultats :

1. Etablissement de la courbe d'étalonnage:

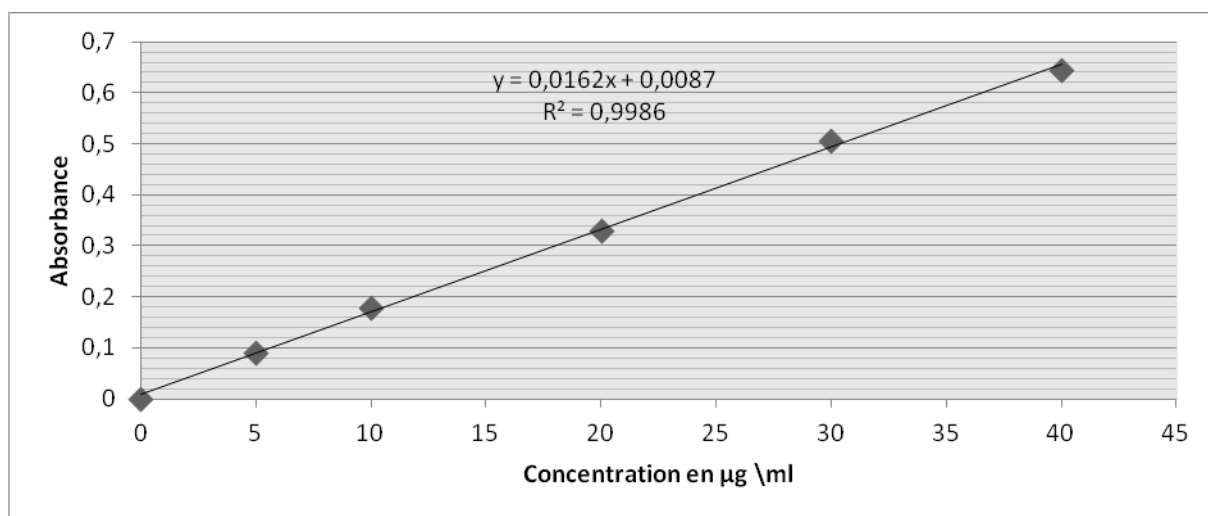


Figure 5 : Courbe d'étalonnage pour le phosphore

a. Expression des résultats :

A partir de la courbe d'étalonnage du dosage du phosphore ; on déduit la concentration massique en µg/ml (ppm) et on calcul la teneur en Phosphore% à partir de l'expression suivante :

$$\frac{X \times 500 \times F \times 100}{m \times 10}$$

X : est la teneur en phosphore, en microgrammes par millilitre, de la partie aliquote de la solution d'essai, déterminée à partir de la courbe d'étalonnage.

m : est la masse, en gramme, de la prise d'essai.

F : est l'inverse du facteur de dilution de la partie aliquote.

❖ Etude des critères de validation de la méthode :

2. Domaine d'application :

Le domaine d'application de dosage de phosphore total par spectrophotométrie UV\vis est : de 0 µg/ml à 40 µg/ml en phosphore.

3. Linéarité :

La courbe d'étalonnage Abs = f (Cm) est linéaire dans le domaine de concentration considérée : de 0 à 40 µg/ml en phosphore, avec un coefficient de corrélation de 0,9986 $\geq 0,995$.

4. Sensibilité :

La sensibilité est la pente de la droite d'étalonnage ; elle égale à 16200 unités de signal \g .ml⁻¹. Donc la méthode est sensible, elle peut détecter une petite variation de concentration.

5-Limite de détection et limite de quantification :

On a effectué 10 mesures sur un essai à Blanc les résultats trouvés sont représentés par le tableau suivant :

N° d'échantillon	Concentration (µg/ml)
1	0,51
2	0,50
3	0,52
4	0,57
5	0,53
6	0,56
7	0,58
8	0,53
9	0,53
10	0,55

Tableau 4 : Résultats de l'essai à blanc de phosphore

Concentration de phosphore(/µg/ml)	moyenne	Ecart type	Limite de détection	Limite de quantification
	0,538	0,02616189	0,0784	0,2616

a-Calcul du ratio de conformité (R) :

$$R = \frac{0,538}{0,0784} = 6,86.$$

- $4 < R < 10$: La concentration utilisée est adéquate.

6-Fidélité :

a-Répètabilité :

Une série de mesures a été effectuée dans des conditions de répètabilité (même laboratoire, même appareil, même jour, même analyste), le tableau suivant représente les résultats trouvés :

<i>N° d'échantillon</i>	<i>absorbance</i>	<i>Concentration de Phosphore ($\mu\text{g/ml}$)</i>	<i>% phosphore</i>
1	0,278	16,62	0,82%
2	0,288	17,24	0,85%
3	0,265	15,82	0,78%
4	0,292	17,48	0,87%
5	0,289	17,30	0,86%
6	0,285	17,05	0,85%
7	0,290	17,36	0,86%
8	0,279	16,68	0,83%
9	0,270	16,12	0,80%
10	0,285	17,05	0,85%

Tableau 5 : Résultats de répètabilité pour le phosphore

Coefficient de variance :

<i>Moyenne</i>	<i>Ecart type</i>	<i>Coefficient de variation</i>
0,83%	0,029007844	3,47%

Interprétation : les valeurs sont proches les unes des autres, et le coefficient de variation CV=3,47% inférieur à 5%, donc la répètabilité est atteinte.

b-Reproductibilité :

Une série de mesures a été effectuée sur le même échantillon dans des conditions de reproductibilité : (jours différents, analystes différents), voici les résultats trouvés :

<i>N° d'échantillon</i>	<i>absorbance</i>	<i>Concentration en phosphore ($\mu\text{g/ml}$)</i>	<i>% Phosphore</i>
1	0,294	17,61	0,87%
2	0,284	16,99	0,84%
3	0,270	16,12	0,80%

4	0,288	17,24	0,85%
5	0,285	17,05	0,85%
6	0,279	16,68	0,83%
7	0,292	17,48	0,87%
8	0,290	17,36	0,86%
9	0,287	17,17	0,85%
10	0,285	17,05	0,85%

Tableau 6 : Résultats de reproductibilité pour le phosphore

<i>moyenne</i>	<i>Ecart type</i>	<i>Coefficient de variation %</i>
0,84%	0,02057507	2,42%



Interprétation : les valeurs sont voisines et le coefficient de variation est $CV = 2,42\% < 5\%$ donc la méthode est reproductible.

c-Détermination de l'intervalle de confiance



Limite_{max} : $0,86 \pm 0,01$

L'intervalle de confiance est $[0,83 ; 0,86]$



Limite_{min} : $0,83 \pm 0,02$

Toute valeur à l'extérieur de cet intervalle doit être rejetée.

7.

Justesse :

Moyenne globale	Valeur de référence	L'erreur relative
0,84%	0,85%	1,19%

Tableau 7 : les résultats de justesse pour le phosphore

Interprétation :

L'erreur relative est de $1,19\% \leq 8\%$, donc le critère de justesse est validé

8-Spécificité :

La spécificité est estimée par la méthode des ajouts dosés.

a-Mise on œuvre expérimental de la méthode des ajouts dosés :

La méthode consiste à ajouter des quantités connues d'une solution étalon à des prélèvements identiques d'échantillon. Chaque solution est ensuite diluée jusqu'à un volume donné avant d'effectuer la mesure.

Cette méthode permet de savoir si l'espèce dosée se comporte de la même manière dans le milieu d'analyse et dans la gamme.

b-Détermination de la concentration inconnue en analyte : Cx

Supposons que plusieurs prélèvements identiques V_x de solution inconnue de concentration C_x soient transférés dans des fioles jaugées de volume V_t . À chacune de ces fioles, on ajoute un volume variable V_s de solution étalon de l'analyte de concentration C_s . On ajoute ensuite, éventuellement, les réactifs qui permettent de rendre absorbant ou fluorescent l'espèce à doser. Chaque solution est enfin diluée jusqu'au trait de jauge.

Le tableau suivant représente les différents volumes et concentrations considérés :

➤ Gamme d'étalonnage :

Niveau	0	1	2	3	4	5
Cs :Concentration phosphore(mg\ml)	0	0,005	0,01	0,02	0,03	0,04

Tableau 8 : Différentes concentrations des solutions des étalons

➤ Gamme de validation :

Niveau	0	1	2	3	4	5
V_x (ml)	5	5	5	5	5	5
V_s (ml)	0	0,0207	0,041	0,082	0,124	0,165
V de réactif (ml)	10	10	10	10	10	10
V de l'eau (ml)	5	4,97	4,95	4,95	4,87	4,83
V_t (ml)	20	20	20	20	20	20

Tableau 9 : les concentrations et volumes utilisés pour la méthode des ajouts dosés.

c-Traçage de la courbe :

En mesurant l'absorbance de la gamme d'étalonnage et validation, on trace la courbe de concentration retrouvée en fonction de la concentration des étalons :

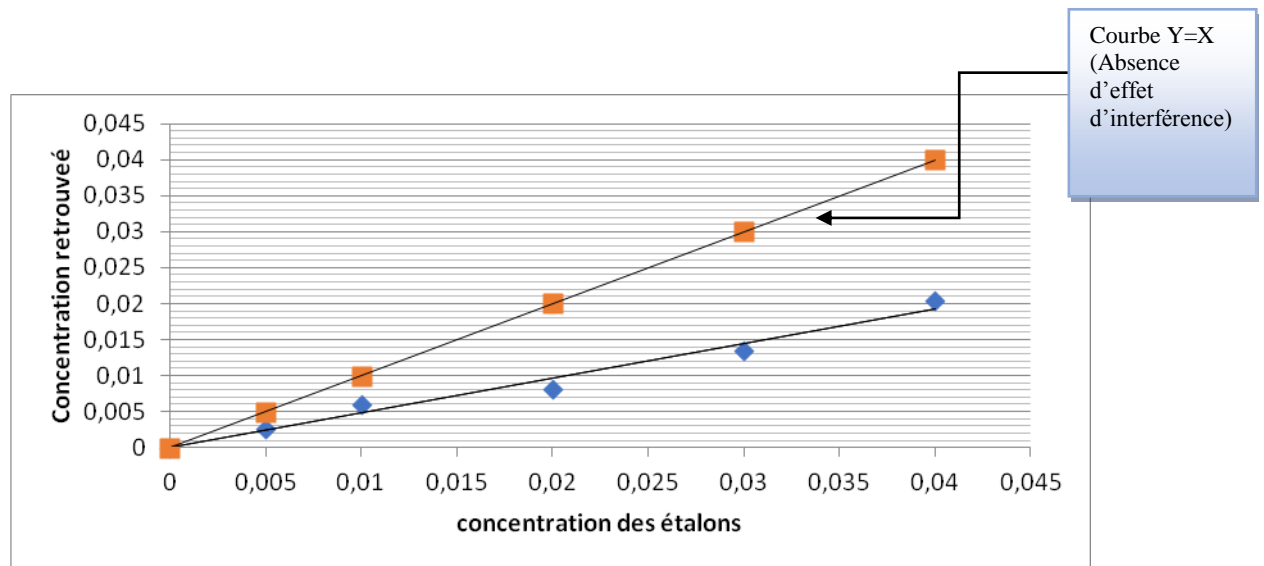


Figure 6 : présentation graphique de la concentration introduite en fonction de la concentration retrouvée

- ❖ Interprétation : On observe un décalage systématique entre la concentration retrouvée et la concentration introduite (effet multiplicatif), qui conduit à une diminution de la sensibilité de la méthode.

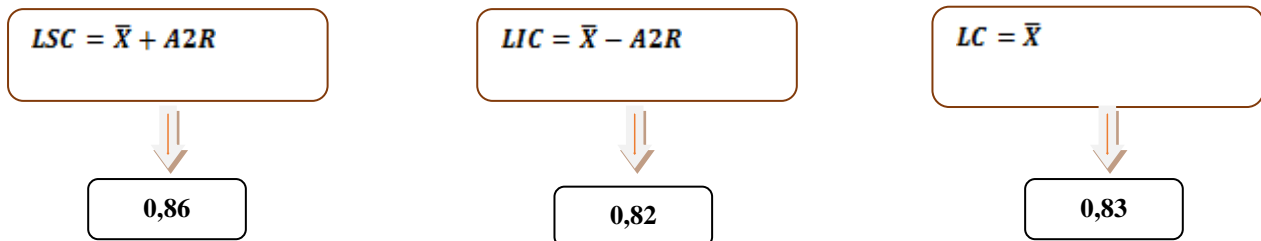
II. Carte de contrôle :

On a rassemblé les moyennes des mesures quotidiennes de la teneur en phosphore dans l'échantillon de contrôle ; ce qui nous a permis de faire une carte de contrôle pour visualiser la progression du procédé le long des 25 jours :

Jour	essai 1	essai 2	essai 3	MOYENNE	ETENDUE
1	0,82	0,83	0,82	0,82333333	0,01
2	0,87	0,84	0,86	0,85666667	0,03
3	0,82	0,83	0,84	0,83	0,02
4	0,86	0,85	0,85	0,85333333	0,01
5	0,8	0,82	0,84	0,82	0,04

6	0,81	0,83	0,82	0,82	0,02
7	0,84	0,86	0,85	0,85	0,02
8	0,86	0,85	0,86	0,85666667	0,01
9	0,84	0,85	0,83	0,84	0,02
11	0,86	0,86	0,85	0,85666667	0,01
12	0,83	0,82	0,81	0,82	0,02
13	0,85	0,85	0,86	0,85333333	0,01
14	0,85	0,86	0,84	0,85	0,02
15	0,84	0,83	0,84	0,83666667	0,01
16	0,82	0,83	0,83	0,82666667	0,01
17	0,83	0,83	0,82	0,82666667	0,01
18	0,85	0,84	0,85	0,84666667	0,01
19	0,82	0,84	0,83	0,83	0,02
20	0,87	0,85	0,85	0,85666667	0,02
21	0,83	0,82	0,84	0,83	0,02
22	0,84	0,85	0,82	0,83666667	0,03
23	0,83	0,83	0,82	0,82666667	0,01
24	0,85	0,83	0,82	0,83333333	0,03
25	0,85	0,85	0,86	0,85333333	0,01

Tableau 10 : Résultats de % de phosphore obtenus pendant 25 jours



- Carte de contrôle :

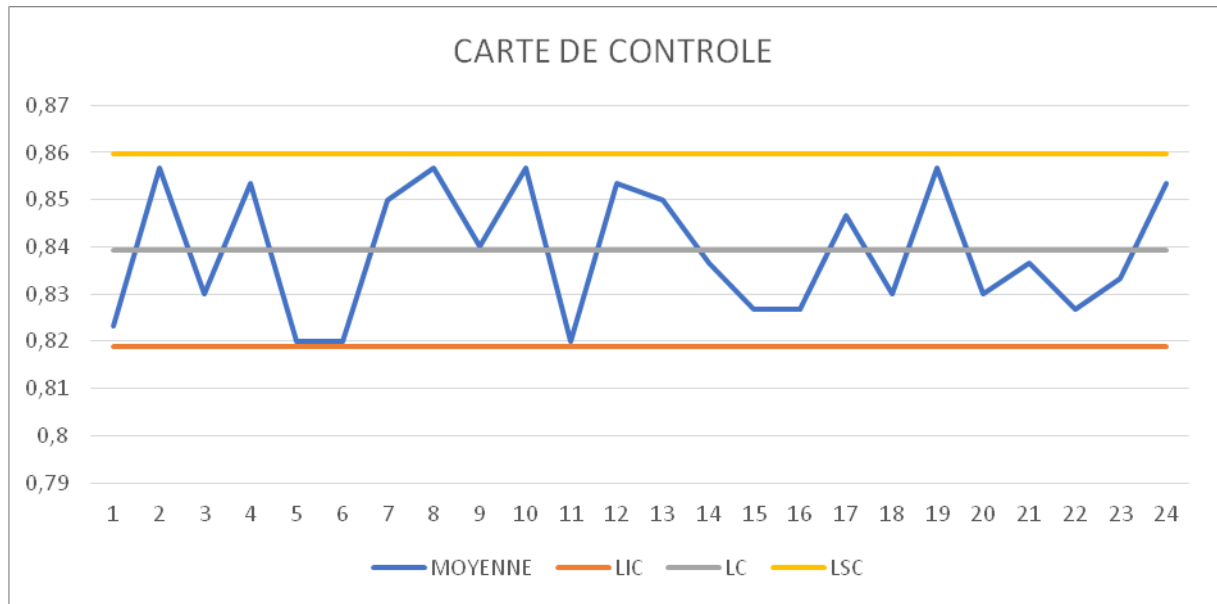


Figure 7 : Carte de contrôle de dosage de phosphore total

- ❖ **Interprétation :** La présentation graphique montre que le procédé était sous contrôle statistique et ne présente aucun problème durant cette période, car tous les points sont entre les limites supérieures et inférieures.

Conclusion :

Dans le cadre du projet de fin d'études, réalisé au laboratoire de la société ALF AL Maghreb, nous avons travaillé sur la validation analytique du dosage de phosphore par spectrophotométrie, Afin de garantir la qualité de produits finie (alimentation animale).

La connaissance et l'étude des caractéristiques des méthodes est une information tout à fait pertinente pour l'évaluation de l'incertitude des résultats d'analyse.

Les résultats obtenus montrent que les différents critères de validation analytique ont été acceptables ce qui a permis de prendre la décision que la méthode du dosage est validée.

Ce stage nous a permis de mieux comprendre la validation analytique et avoir une idée réelle sur l'application des études statistiques à l'échelle industrielle.

Finalement je tiens à exprimer ma satisfaction d'avoir pu travaillé dans de bonnes conditions matérielles et un environnement agréable et d'avoir des riches contacts humains avec tout le personnel professionnel de la société. Sera, sans doute, une énorme opportunité pour mon futur parcours professionnel.

Référence :

[1] Max Feinberg, La validation des méthodes d'analyse, Masson, 1996

[2] ISO/DTS 21748 Application of statistics—Guide to the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty estimation

[3] file:///C:/Users/accent/Desktop/DR12VMC_protocole_val_chimie.pdf

[4] file:///C:/Users/accent/Downloads/117_mayor_valid%20(5).pdf

[5] PROTOCOLE POUR LA VALIDATION D'UNE MÉTHODE D'ANALYSE EN CHIMIE