



Licence Es-Sciences et Techniques (LST)

**TECHNIQUES D'ANALYSE CHIMIQUE ET
CONTROLE DE QUALITE
(TACCQ)**

PROJET DE FIN D'ETUDES

**Validation d'une méthode d'analyse (Dosage des composés
phénoliques par la méthode de Folin-Ciocalteu)**

Présenté par :

◆ Idouchen Amina

Encadré par :

◆ Pr ERRACHIDI FAOUZI (LPN)

◆ Pr BEN TAMA ABDESLAM

Soutenu Le 11 Juin 2014 devant le jury composé de:

- Pr. BEN TAMA ABDESLAM

- Pr. BOULAHNA AHMED

- Pr. CHAKROUNE SAID

Stage effectué au laboratoire de physiopathologie et nutrition

Année Universitaire 2013 / 2014

Table des matières

Introduction	1
Laboratoire de physiopathologie et nutrition.....	2
I. Présentation du lieu du stage.....	3
I. 1. Le laboratoire de physiopathologie et nutrition.....	3
I. 2. Objectifs généraux de l'équipe de recherche physiopathologie et nutrition.....	3
I. 3. Equipement du laboratoire.....	4
I. 4. Collaboration nationale et international avec le LPN.....	4
Chapitre 1 : Etude bibliographique	
I. La validation d'une méthode d'analyse.....	6
I. 1. Définition et but de la validation.....	6
I. 2. Cycle de vie d'une méthode d'analyse.....	6
I. 2.1. la sélection de la méthode.....	7
I. 2.2. Le développement de la méthode.....	7
I. 2.3. la validation.....	7
I. 2.4. Utilisation en routine.....	7
I. 3. Intérêt et démarche de la validation.....	7
I. 4. Les critères de la validation.....	8
I. 4. 1. Linéarité.....	8
I. 4. 2. La limite de détection.....	8
I. 4. 3. Limite de quantification.....	8
I. 4. 4. La justesse.....	9
I. 4. 5. La fidélité.....	9
I. 4. 5. 1. La répétabilité.....	9
I. 4. 5. 2. La reproductibilité.....	10
I. 4. Importance des essais inter-laboratoire dans la validation.....	11
I. 5. Quelques notions statistiques.....	12
I. 5. 1. La moyenne.....	12
I. 5. 2. L'étendue.....	12
I. 5. 3. L'écart-type.....	12
I. 5. 4. Coefficient de variation.....	12
I. 5. 5 Limite de confiance	12
II. Notions de base sur les composés phénoliques.....	14
II. 1. Définition, origine végétale.....	14
II. 2. Rôle de polyphénols.....	14
II. 3. Diversité des composés phénoliques.....	14

II. 4. Utilisation des composés phénoliques.....	15
II. 5. Activité antioxydante.....	15

Chapitre 2 : Etude expérimentale

Introduction	18
I. Dosage des composés phénoliques par la méthode de folin-ciocalteu.....	18
I. 1. Principe de la méthode.....	18
I. 2. Matériels et réactifs.....	18
I. 3. Mode opératoire.....	19
I. 3. 1. extraction des phénols.....	19
I. 3. 2. Préparation de la gamme d'étalonnage.....	19
I. 3. 3. Détermination de la teneur proprement dite.....	21
II. Résultats et interprétation.....	21
II. 1. Linéarité.....	21
II. 2. Limite de détection et de quantification.....	21
II. 3. Fidélité.....	22
II. 3. 1. Teste de répétabilité.....	22
II. 3. 2. Teste de reproductibilité.....	24
Teste de Q.....	26
II. 4. Justesse.....	26
Conclusion	27
Référence bibliographique	28

introduction

La validation des méthodes figure parmi les mesures universellement reconnues comme faisant nécessairement partie d'un système exhaustif d'assurance qualité dans le domaine de la chimie analytique.

La norme ISO 17025 porte plus particulièrement sur le fait que La validation de méthode est ainsi une composante essentielle des mesures qu'un laboratoire devrait mettre en œuvre pour lui permettre de produire des données analytiques fiables.

L'originalité de l'équipe de travail du LPN est de mettre au point des techniques fiable et reproductible des méthodes d'extraction et de quantification des micronutriments (vitamine C vitamine E **polyphénols**....) dans les aliments largement consommés dans le Maroc.

Parmi ces techniques nous allons particulièrement nous intéresser dans ce travail de Projet de Fin d'Etude (PFE) à la méthode de **FOLIN CIOLTEU** appliquée sur des échantillons d'olive dans le but de déterminé leur teneur en polyphénols.

Ce rapport est composé de trois parties :

Dans la première partie sera présenté le LPN, ses différentes activités et les services qu'il offre.

La deuxième partie est consacrée à l'étude bibliographique qui porte sur les notions de base des composés phénoliques, l'étude expérimentale des composés phénoliques, ainsi que sur la démarche méthodologique généralement adopté pour la validation d'une méthode d'analyse.

La troisième partie exposera l'aspect expérimental de la validation de la méthode de Folin Ciocalteu, les résultats obtenus et leur discussion.

Laboratoire de physiopathologie et nutrition

I. PRESENTATION DU LIEU DU STAGE :

Notre stage de fin d'étude de licence à été réalisé dans le laboratoire de physiopathologie et nutrition, c'est un laboratoire universitaire situé dans la faculté de médecine et de pharmacie, Université Sidi Mohammed Ben Abdallah, Fès.

I. 1. *Le laboratoire de physiopathologie et nutrition :*

Il s'agit d'un laboratoire de l'équipe de recherche physiopathologie et nutrition qui fait partie du laboratoire de recherche biologie des cancers.

I. 2. Objectifs généraux de l'équipe de recherche physiopathologie et nutrition :

Les objectifs généraux de l'équipe de recherche physiopathologie et nutrition sont les suivants:

- La mise au point des techniques fiable et reproductible des méthodes d'extraction et de quantification des micronutriments (vitamine C vitamine E polyphénols....) dans les aliments largement consommés dans le Maroc.
- La quantification de la plupart des vitamines à activité antioxydante sérique.
- L'étude in vivo et vitro de l'activité antioxydante des différents nutriments identifiés sur le développement et la prévention des cancers et maladies cardiovasculaires.
- Etude de l'impact de la pollution sur la dualité nutritionnelle de certains aliments cultivés près des zones polluées.
- Etude de l'impact de l'apiculture sur la qualité biochimique et nutritionnelle de certains échantillons du miel marocain.

I. 3. Equipement du laboratoire :

Le laboratoire est équipé d'un appareillage de pointe qui permet de faire le dosage aussi bien quantitatif que qualitatif des micros et macronutriments et la caractérisation de la qualité microbiologique et physico-chimique de l'eau et d'aliments.

I. 4. Collaboration nationale et international ave le LPN :

Le laboratoire de physiopathologie et nutrition mène ses travaux de recherche en collaboration avec plusieurs institutions et organismes nationaux et internationaux.

- Centre Hospitalier, Université Sidi Mohammed Ben Abdellah, Fès, Maroc.

- Laboratoire d'alimentation et de nutrition département de biologie, faculté des sciences, université Ibn Tofaïl, Kénitra, Maroc.
- Institut National de recherche agronomique, Laboratoire d'amélioration et de technologie des agrumes.
- Laboratoire d'amélioration et de qualité CIRAD France.
- Centre CURI Université Sidi Mohammed Ben Abdellah.

CHAPITRE 1

ETUDE

BIBLIOGRAPHIQUE

II. La validation d'une méthode d'analyse :

I. 1. Définition et but de la validation :

La norme ISO 17025 [1] définit la validation des méthodes d'analyse comme étant : la confirmation par examen et l'apport de preuves objectives du fait que les exigences particulières en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies.

C'est une démonstration assurant, avec un grand degré de certitude et preuves à l'appui, qu'un procédé permettra d'atteindre les résultats attendus, de façon uniforme et continue.

La validation est fondée sur une analyse statistique basée sur un certain nombre de critères aboutissants à des méthodes analytiques permettant de donner des résultats fiables. Donc elle a pour but de démontrer qu'elles correspondent à l'utilisation pour laquelle elles sont proposées.

I. 2. Cycle de vie d'une méthode d'analyse :

Comme tout procédé de production, les méthodes d'analyse naissent, évoluent et meurent. Pour clairement comprendre le rôle et la place de la validation dans la vie d'une méthode d'analyse, il est intéressant de décrire son cycle de vie depuis le moment où elle est choisie jusqu'au moment où on l'abandonne.

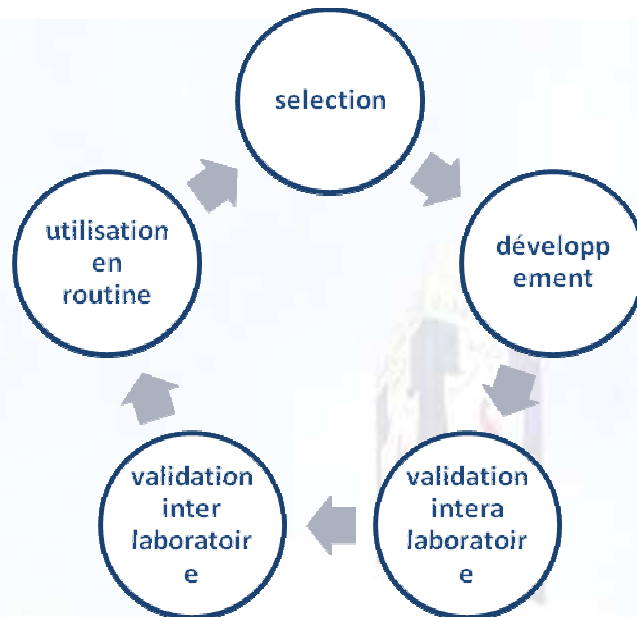


Figure1 : Schéma de cycle de vie d'une méthode d'analyse

II.2.1. la sélection de la méthode :

Elle permet de choisir parmi toutes les méthodes physico-chimiques connues par le laboratoire celle qui doit permettre de déterminer un ou plusieurs analytes représentatifs du problème analytique.

L'introduction de méthode d'analyse et d'essais développés par le laboratoire à son propre usage doit être confié à du personnel qualifié, doté de ressources adéquat.

II. 2.2. Le développement de la méthode :

C'est la mise au point du mode opératoire et l'adaptation de la méthode aux conditions pratiques où elle va être utilisée et en particulier il faut préciser le domaine d'application de la méthode c'est-à-dire l'ensemble des matrices auxquelles elle s'applique ainsi que la gamme de concentration utilisables.

Lorsque cette mise au point est terminée, on dispose alors de ce que l'on appelle dans le cadre Bonne Pratique de Laboratoire (BPL) un mode opératoire normalisé.

II. 2.3. la validation :

Il existe deux types de validation :

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

I. 2.4. Utilisation en routine :

Le cycle de vie se poursuit, si la validation se révèle conforme.

Au bout d'un certain temps la méthode peut être abandonnée ou améliorée pour entamer un autre cycle.

Dans d'autre cas, une simple revalidation peut régénérer le cycle de vie d'une méthode d'analyse.

I. 3. Intérêt et démarche de la validation :

La validation d'une méthode d'analyse fait partie des exigences essentielles du système d'assurance qualité dans le domaine de la chimie analytique.

Il convient d'appliquer l'une ou bien une combinaison des techniques suivante pour déterminer la performance d'une méthode :

- ✓ Etalonnage à l'aide d'étalon de référence ou de matériaux de référence ;
- ✓ Comparaison des résultats obtenus avec d'autres méthodes ;
- ✓ Comparaison entre laboratoire ;
- ✓ Evaluation systématique des facteurs influençant le résultat ;
- ✓ Evaluation de l'incertitude des résultats sur la base d'une connaissance scientifique des principes théoriques de la méthode et d'une expérience pratique.
- ✓ Evaluation des critères de performance de la méthode.

II. 4. Les critères de la validation :

Les critères de la validation d'une méthode d'analyse sont les suivants :

- Linéarité ;
- Limite de détection ;
- Limite de quantification ;
- Justesse ;
- Fidélité ;

II. 4. 1. Linéarité :

Capacité d'une méthode d'analyse, à l'intérieur d'un certain intervalle de concentration, à fournir une réponse instrumentale ou des résultats proportionnels à la quantité en analyte à doser dans l'échantillon.

II. 4. 2. La limite de détection :

La plus petite quantité à doser pouvant être détectée mais non nécessairement quantifiée comme exacte, dans les conditions expérimentales décrite de la méthode, [Feinberg, 2010]. Elle est équivalente à 3 fois l'écart-type S calculé à partir au moins 10 mesures effectuées sur des solutions étalons.

II. 4. 3. Limite de quantification :

La plus petite concentration ou teneur en analyte qui peut être quantifiée avec une fiabilité définie, dans les conditions expérimentales décrite de la méthode. Par définition la limite de quantification est égale à 10 fois l'écart-type.

I. 4. 4. La justesse :

La justesse d'un instrument, d'un procédé, d'une méthode, exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne trouvée à partir d'une large série de résultats et la valeur qui est reconnue soit comme valeur conventionnelle, soit comme valeur de référence. [Louvet, 2006] .

I. 4. 5. La fidélité :

C'est l'étroitesse de l'accord entre les résultats obtenus en appliquant le procédé expérimentale à plusieurs reprises dans des conditions déterminées. Selon les conditions d'exécution de l'essai, cette caractéristique s'exprime sous forme de **répétabilité et reproductibilité**.

I. 3. 5. 1. La répétabilité :

La norme ISO 5725/86 [2] définit la répétabilité comme étant l'étroitesse de l'accord entre les résultats d'analyse indépendants entre eux obtenus avec la méthode considérée, dans le même laboratoire, par le même analyste utilisant le même matériel et dans un court intervalle de temps

La répétabilité est la fidélité sous les conditions de répétabilité, c'est une variabilité aléatoire des résultats d'une série de déterminations d'un même échantillon effectuée dans des conditions très proches : même analyste, même laboratoire, même matériels... et donc généralement dans un temps court.

➤ **limite de répétabilité :**

Limite de répétabilité r : écart maximum au niveau de confiance 95% entre 2 résultats obtenus sur un même échantillon pour une même méthode, un même analyste, un même appareil.

C'est la valeur en dessous de laquelle on peut estimer la différence absolue entre deux résultats d'analyse unique, obtenus dans les conditions de répétabilité et avec une probabilité de 95%.

La limite de répétabilité est obtenue en appliquant l'équation suivante :

$$r = S_r \times 2 \times \sqrt{2}$$

I. 3. 5. 2. La reproductibilité :

Selon La norme ISO5725/86[2] la reproductibilité est l'étroitesse de l'accord entre les résultats d'essais, indépendants entre eux, obtenus dans les conditions de réplicabilité c.à.d. dans le même laboratoire mais avec un analyste différent.

C'est la fidélité sous les conditions de reproductibilité. C'est une variabilité aléatoire des résultats de plusieurs déterminations d'un même échantillon, effectuées de manière espacée dans le temps, donc dans des conditions qui peuvent être expérimentalement légèrement différentes : même méthode, différent laboratoire, avec différents analystes et utilisant des équipements différents.

➤ **limite de reproductibilité :**

La limite de reproductibilité R est écart maximum au niveau de confiance 95% entre 2 résultats obtenus sur un même échantillon, pour une même méthode, par 2 analystes ou 2 laboratoires différents, sur des appareils différents.

C'est la valeur en dessous de laquelle on peut espérer que la différence absolue entre deux résultats unique, obtenus dans les conditions de réplicabilité avec une probabilité de 95%
La limite de réplicabilité est calculée en appliquant l'équation suivant :

$$R=SR \times 2\sqrt{2}$$

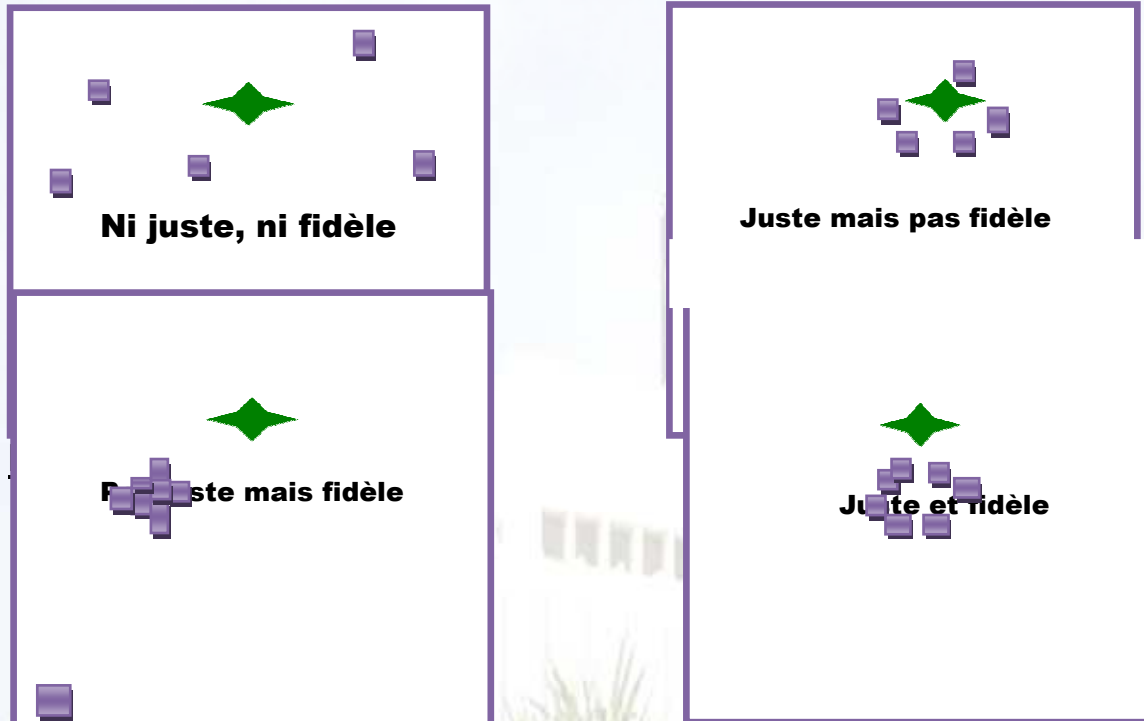


Figure 2 : représentation de la fidélité et de la justesse.

I. 4. Importance des essais inter-laboratoire dans la validation :

Lorsque toutes les mesures nécessaires ont été prises dans un laboratoire pour poser les fondations d'un bon contrôle de qualité, il doit alors démontrer la justesse de ces mesures en participant à des essais inter-laboratoires.

Objectifs des essais inter-laboratoires :

- ♥ Détecter des sources d'erreurs dans une méthode usuelle, et évaluer sa performance en pratique.
- ♥ Mesurer la qualité d'un laboratoire ou d'une partie d'un laboratoire (par exemple audits pour les laboratoires accrédités).
- ♥ Améliorer la qualité d'un laboratoire en collaboration avec d'autres laboratoires en un processus d'apprentissage mutuel.

I. 5. Quelques notions statistiques :

I. 5.1. La moyenne :

Dans le cas où une analyse sur un échantillon est répétée un certain nombre de fois n , la valeur moyenne de ces mesures est un nombre important. Elle se calcule en divisant la somme des valeurs trouvées sur le nombre d'essais.

$$m = \frac{\sum Xi}{n}$$

I. 5.2. L'étendue :

C'est la différence entre la valeur maximale et la valeur minimale des résultats de mesures :

$$R = X_{\max} - X_{\min}$$

II. 5.3. L'écart-type :

La mesure de la dispersion des valeurs autour de la moyenne pour un nombre limité d'échantillons.

L'écart-type de l'échantillon ($n < 20$) :

$$S = \sqrt{\frac{\sum (Xi - m)^2}{(n-1)}}$$

I. 5.4. Coefficient de variation :

Le coefficient de variation est obtenu en divisant l'écart-type par la moyenne et en multipliant par 100.

$$CV = \frac{S}{m} \times 100$$

I. 5.5 Limite de confiance :

Pour être confiant que la moyenne déterminée est la vraie moyenne, des limites de confiances doivent être fixées et ce en relation avec le degré de confiance que l'analyste souhaite avoir pour son analyse.

La limite de confiance est l'intervalle autour de la moyenne qui contient probablement la vraie moyenne. Le degré de confiance est la probabilité (en %) pour que la moyenne apparaisse dans un intervalle donné.

Un degré de 95% signifie que l'analyste est confiant que 95% des mesures seront à l'intérieur de l'intervalle de confiance.

$$\mu = m \pm \frac{t \cdot S}{\sqrt{n}}$$

Avec t : constante dépendant du degré de confiance désiré.

n : le nombre de mesures effectuées.

S : l'écart-type.

m : la moyenne.

II. Notions de base sur les composés phénoliques :

II. 1. Définition, origine végétale :

En chimie organique, les phénols sont des composés chimiques aromatiques portant une fonction hydroxyle [OH]

Les composés phénoliques constituent une famille de molécules organiques largement présente dans le règne végétal. Ils sont caractérisés, par la présence de plusieurs groupements phénoliques associés en structures plus ou moins complexes généralement de haut poids moléculaire. Ces composés sont les produits du métabolisme secondaire des plantes (Guignard, 2000).

II. 2. Rôle de polyphénols :

Ils nous protègent contre de nombreuses maladies, comme le cancer et les maladies cardio-vasculaires. En fait, ils luttent contre la formation des radicaux libres, vous savez, ces petites bêtes qui veulent nous faire vieillir avant l'heure et qui provoquent le vieillissement cellulaire, semant ainsi la désolation dans notre corps. L'ostéoporose est une manifestation inéluctable de ce vieillissement et certains polyphénols comme les isoflavones du soja par exemple protègent contre cette diminution de notre si précieux capital osseux. Contre le cancer les antioxydants préviennent la formation des tumeurs et empêchent la formation des agents qui sont à l'origine des mutations nocives. Dans les maladies cardio-vasculaires les polyphénols luttent contre le mauvais cholestérol, le LDL, et permettent ainsi d'éviter la formation de ces plaques d'athérome dans nos artères à l'origine de l'infarctus et d'autres maladies cardiaques.

II. 3. Diversité des composés phénoliques:

Une structure chimique identique, un ou plusieurs noyaux aromatiques hydroxylés. Ils sont classés en plusieurs groupes en fonction du nombre de noyaux aromatiques :

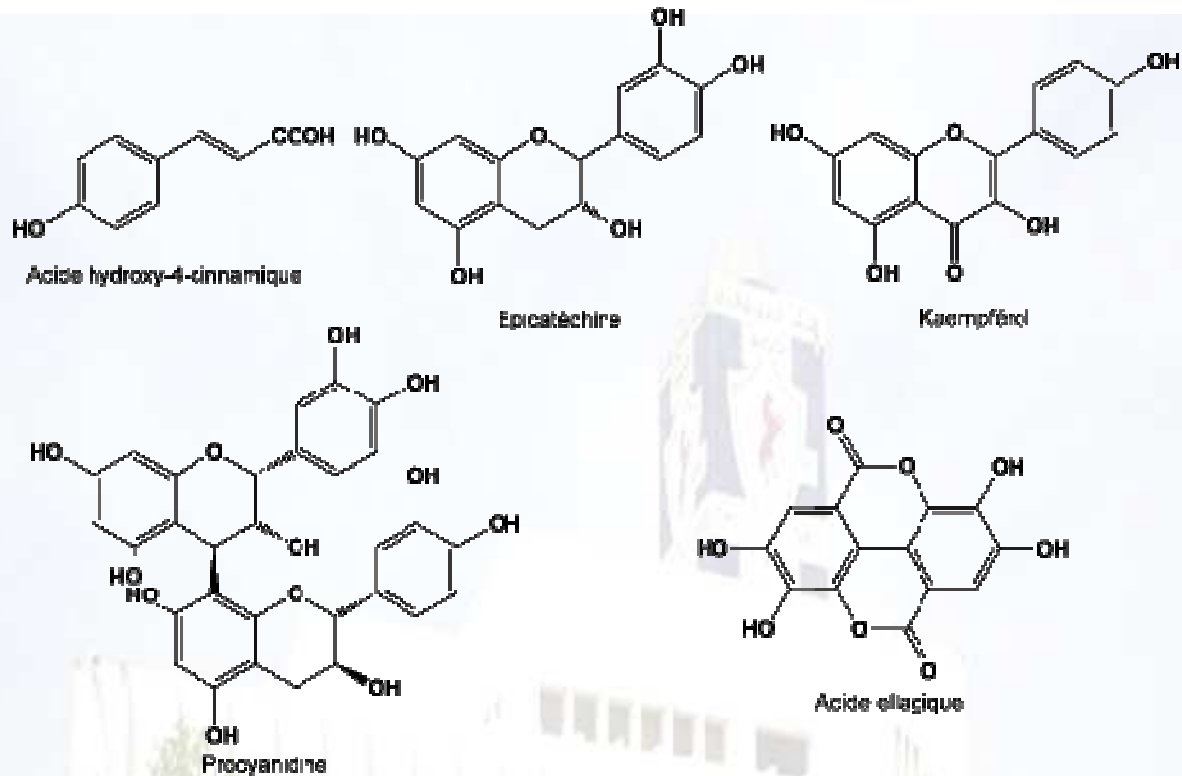


Figure3 : exemples de composés phénoliques

II. 4. Utilisation des composés phénoliques :

Le phénol est largement utilisé par la chimie organique et industrielle, par exemple pour produire des composés plus complexes (ex : alkylphénols, caprolactame, acide salicylique, chlorophénols, nitrophénols, acide picrique, acide adipique...) eux-mêmes utilisés pour produire des plastifiants, résines, adhésifs, durcisseurs, dissolvants, isolants, explosifs, etc.

Les polyphénols jouent un grand rôle dans la quantité nutritive et hygiénique des aliments, certain d'entre eux ont des propriétés vitaminiques utilisées par l'industrie pharmaceutique. Ils interviennent également dans la digestibilité des aliments, dans l'utilisation physiologique des protéines (avec les quelles les tanins se combinent).

II.5. Activité antioxydante :

L'organisme génère en permanence des radicaux libres, qui sont des dérivés du fonctionnement normal du corps mais qui sont aussi produits en plus grand nombre lorsque le corps est agressé (cigarette, pollution, infections...). A cause de leur réactivité (ils possèdent un ou plusieurs électrons libres), les radicaux libres endommagent les cellules en les oxydant

(stress oxydatif). Les antioxydants sont des composés réducteurs capables de piéger ces radicaux libres et ainsi d'aider le corps à prévenir l'oxydation.

Bien que le corps soit capable de produire ses propres antioxydants, ils ne suffisent souvent pas à neutraliser toute la quantité de radicaux libres. Il faut donc que les antioxydants proviennent de l'alimentation. De nombreux aliments comme les fruits et les légumes comportent de grandes quantités d'antioxydants.

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les polyphénols. Ces derniers, notamment les flavonoïdes, grâce à leur capacité antioxydante, interviendraient comme agents préventifs contre de nombreuses maladies, tout comme les acides phénoliques.

Chapitre 2

Etude expérimentale

Introduction :

Les polyphénols jouent un grand rôle dans la quantité nutritive et hygiénique des aliments, certains d'entre eux ont des propriétés vitaminiques utilisées par l'industrie pharmaceutique. Ils interviennent également dans la digestibilité des aliments, la détermination de leur teneur dans certains produits alimentaires quotidiennement consommés fait appel à un dosage colorimétrique par la méthode de folin ciocalteu.

II. Dosage des composés phénoliques par la méthode de folin-ciocalteu :

I. 1. Principe de la méthode :

La méthode de folin-ciocalteu est une méthode colorimétrique c.à.d. la teneur en polyphénols va être déterminé par la lecture des densités optiques à l'aide d'un spectrophotomètre.

Le dosage colorimétrique est une technique qui repose sur la loi de **BEER-LAMBERT**, qui exprime la proportionnalité entre l'absorbance de la lumière à une longueur d'onde donnée et la concentration de la substance qui absorbe.

Le principe de la technique est le suivant : on réalise une gamme étalon constituée d'une série de solutions de concentrations connues du composé à doser et on mesure l'absorbance de chaque solution. On reporte les résultats de mesure sur un graphe avec en abscisses la concentration (ou la quantité) de substance et en ordonnées la valeur d'absorbance correspondante.

Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). L'oxydation des phénols réduit ce réactif en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène.

I. 2. Matériels et réactifs :

- Echantillon d'olives
- spectrophotomètre
- Tubes à essais.
- Balance a 0,1 de precision

- Acide gallique
- Ethanol
- réactif de Folin-Ciocalteu
- Carbonate de sodium



Figure 4 : échantillon d'olive noire



Figure 5 : spectrophotomètre



Figure 6 : balance de précision

II. 3

I. 3. 1. extraction des phénols :



I. 3. 2. Préparation de la gamme d'étalonnage :

- ✓ Peser 2g d'acide gallique;
- ✓ Les dissoudre dans 10 ml d'éthanol, soit une solution (S1) avec une concentration de 200 mg/ml ;
- ✓ Diluer la solution mère comme suivant :

- ✓ Prélever 5ml de la solution mère puis ajouter 5 ml d'eau distillée et l'en obtient la dilution S/2 (Refaire la même procédure pour les autres dilutions).

Dilutions	S	S/2	S/4	S/8	S/16	S/32	S/64	S/128	S/256	S/512
Concentrations (mg/ ml)	200	100	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39

Tableau 1 : Préparation des dilutions de l'acide gallique pour la réalisation de la courbe standard des poly phénols totaux.

Loi de beer-lambert :

La forme utilisée est la suivante : $A = \epsilon \times l \times C$

- A : absorbance de la solution sans unité
- ϵ : coefficient d'extinction molaire en $L \times mol^{-1} \times cm^{-1}$
- l : longueur de cuve traversée par la lumière en cm
- C : concentration molaire en mg/ml

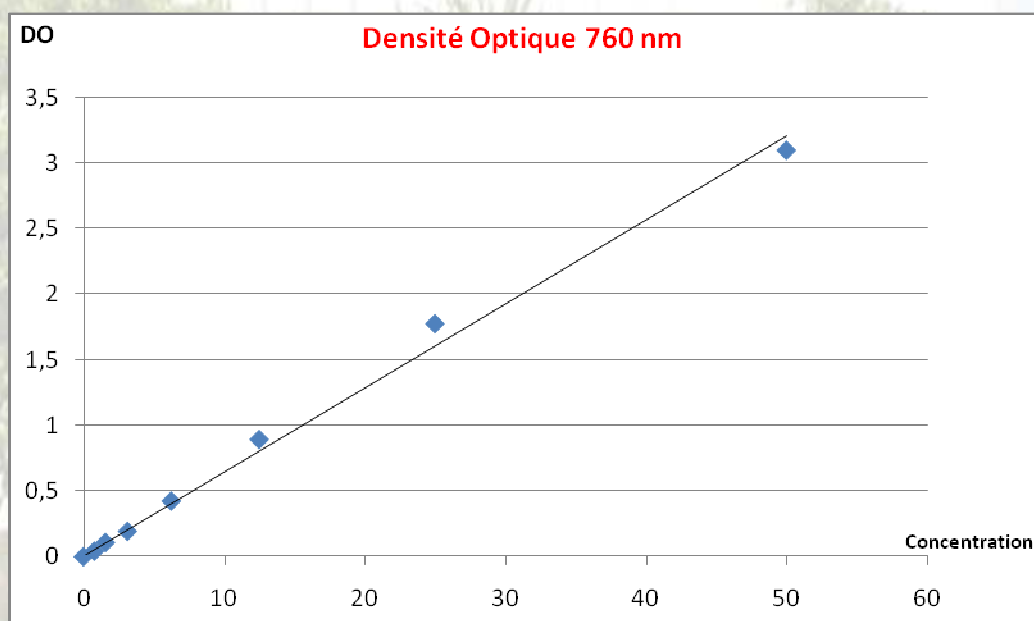


Figure 7 : l'absorbance d'acide gallique à 765 nm obtenus par extraction à l'aide d'eau distillée

L'absorbance d'acide gallique à 765 nm obtenus par extraction à l'aide d'eau distillée

$$A = aC$$

A: absorbance (densité optique)

a : la pente= 15,572

C : concentration des composés phénoliques

III. 3. 3. Détermination de la teneur proprement dite :

- Prélever 0.5 ml de chaque dilution d'échantillon dans des tubes à essais ;
- Ajouter 5 ml d'eau distillée dans chaque tube ;
- Ajouter 0.5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu;
- Après 3 mn, ajouter 0.5 ml de carbonate de sodium à 20 % ;
- Laisser incuber pendant une heure à température ambiante et à l'abri de la lumière.

Le blanc est représenté par 5 ml d'eau distillée additionné de 0.5 ml de Folin-Ciocalteu et 0.5 ml de carbonate de sodium à 20 %.

La lecture des absorbances est faite à 760 nm, après agitation et repos d'une heure. La Concentration en composés phénoliques totaux est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnages obtenus en utilisant l'acide gallique comme standard d'étalonnage.

IV. Résultats et interprétation :

III.1. Linéarité :

La courbe d'étalonnage $A=f(C)$ est linéaire dans le domaine de concentration considéré [0,39-200mg/ml].

III. 2. Limite de détection et de quantification:

10 mesures ont été effectuées sur un essai à blanc et les résultats trouvés sont représenté dans le tableau suivant :

N°d'essai	Concentration (en mg/ml)
1	11,61
2	11,75
3	11,23
4	11,10
5	11,62
6	11,05
7	11 ,42
8	11,12

Moyenne	Valeur max	Valeur min	Ecart-type S	Limite de détection	Limite de quantification
11,364	11,75	11,05	0,24	0,72	3,6
9			11,44		
10			11,30		

Tableau 2 : limite de détection et de quantification

II.3. Fidélité :

II.3. 1. Teste de répétabilité :

une série de mesure a été effectuée dans des conditions de répétabilité(même laboratoire, même appareil, même jour, même analyste),sur des échantillons d'olives noires, les tableau suivant représente les résultats trouvés :

Échantillon 1

N° d'essai	Concentration en (mg/ml)
1	13,16
2	13,07
3	13,04
4	13 ,5
5	13,22
6	13,02
7	13,17
8	13,00
9	13,45
10	13,33

Moyenne	13,196
Valeur Max	13,45
Valeur Min	13
Ecart-type	0,178
Coefficient de variation	1,35%
Lim r	0,5

Tableau 3 : résultats de répétabilité échantillon

★ Limite de confiance

$$\mu = m \pm \frac{t.S}{\sqrt{n}}$$
$$\mu = [13,07; 13,32]$$

Échantillon 2

N° d'essai	Concentration en mg/ml
1	7,45
2	8

3	7,19
4	7,33
5	7,12
6	7,08
7	7,40
8	7,25
9	7,38
10	7,27

Moyenne	7,347
Valeur max	8
Valeur min	7,08
Ecart-type	0,258
Coefficient de variation	3,51
Lim r	0,73

Tableau 4 : résultats de répétabilité échantillon 2

* **Limite de confiance :**

$$\mu = m \pm \frac{t.S}{\sqrt{n}}$$

$$\mu = [7,18 ; 7,55]$$

❖ **Interprétation :**

Tout les valeurs sont incluses dans l'intervalle de confiance ;

Le coefficient de variation CV est inférieur à 5% donc la répétabilité est atteinte

II.3. 2. Teste de reproductibilité :

Sur un même échantillon d'olive on a effectué une série de mesure dans les conditions de reproductibilité : jours différents et analystes différents, les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau suivant :

Echantillon 1

N° d'essai	Concentration en (mg/ml)
1	10,23
2	10,00
3	9,98
4	10,50

5	10,18
6	10,02
7	10,33
8	10,45
9	9,70
10	9,50
Moyenne	10,089
Valeur Max	10,500
Valeur Min	9,500
Ecart-type	0,317
Coefficient de variation	3,14%
Lim R	0,896

Tableau 5 : résultats de reproductibilité échantillon 1

* Limite de confiance :

$$\mu = m \pm \frac{t.S}{\sqrt{n}}$$

$$\mu = [9,86; 10,32]$$

Échantillon 2 :

N° d'essai	Concentration en mg/ml
1	10,09
2	10,19
3	11
4	10,66
5	10,45
6	10,78
7	10,17
8	10,43
9	10,28
10	10,14
Moyenne	10,419
Valeur max	11
Valeur min	10,09

Ecart-type	0,486
Coefficient de variation	4,66
LimR	1,37

Tableau 6 : résultats de reproductibilité échantillon 2

★ Limite de confiance :

$$\mu = m \pm \frac{t.S}{\sqrt{n}}$$

$$\mu = [10,07 ; 10,76]$$

❖ Interprétation :

Le coefficient de variation est inférieur à 5% donc la méthode est reproductible.

Les valeurs sont voisines et incluses dans l'intervalle de confiance, sauf pour l'échantillon 2 dont le résultat de l'essai N° 3 est à l'extérieur du domaine de confiance.

Cette donnée aberrante implique un teste qui s'appelle Teste Q qui va nous permettre de juger s'elle mérite d'être rejetée ou conservée.

Teste de "Q"

Dans ce teste la valeur de Q est calculée et comparée à des valeurs de Q_{th} relative à un certain degré de confiance. Si Q_{cal} est plus grande que Q_{th} , la valeur suspecte est rejetée, si par contre Q_{cal} est inférieur à Q_{th} cette valeur sera conservée.

$$Q_{cal} = \frac{Gsp}{segment}$$

Gsp : est la différence entre la valeur suspecte et la valeur la plus proche d'elle.

Segment : est la différence entre la plus grande et la plus petite valeur de la série de mesures.

$$Q_{cal} = \frac{11 - 10,78}{11 - 10,09}$$

$$Q_{cal} = 0,24$$

à 95% : $Q_{th} = 0,466 > 0,24$

Donc la valeur ne doit pas être rejetée.

II. 4. Justesse :

Puisque toutes les valeurs obtenues dans les mesures appliquées sont incluses dans les domaines de confiance et qu'elles présentent un faible écart à chaque répétition on peut dire que la justesse de la méthode ainsi que de l'instrument de mesure est atteinte.

Conclusion

Mon stage de fin d'étude de la Licence des sciences et techniques en techniques d'analyses chimique et contrôle de qualité effectué au sein du LPN m'a permis de:

Mettre en pratique mes connaissances théoriques acquises durant ma formation;

Stimuler mon ouverture d'esprit et ma curiosité;

Enrichir mon expérience dans le domaine de contrôle de qualité;

Se familiariser avec les conditions de travail dans les laboratoires de recherche.

D'après l'étude statistique de cette méthode, on déduit que cette dernière est fidèle, ayant un bon seuil de détection et donnant des résultats stables dans le temps, donc c'est une méthode validées et apte à l'utilisation.

Référence bibliographique

NF EN ISO/CEI 17025-2005 : exigences générales concernant La compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais.

Norme NF ISO 5725 : 1986-fidélité des méthodes d'essai- Détermination de la répétabilité et de la reproductibilité d'une méthode d'essai normalisée par essais inter-laboratoire

Krimou A., Rapport de stage validation d'une méthode d'analyse des sucres, 2012.

