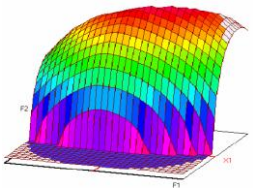
كلية العلوم و التقنيات فاس
ⵜⴰⵖⵉⵡⴰⵏⵜ ⵏ ⵜⵎⴰⵙⵙⴰⵏⵉⵏ ⴷ ⵜⵙⵏⵉⵜⵉⵏ
Faculté des Sciences et Techniques de Fès

جامعة سيدي محمد بن عبد الله
ⵜⴰⵙⴷⴰⵡⵉⵜ ⵙⵉⴷⵉ ⵎⵓⵃⵎⵎⴰⴷ ⴱⵏ ⵄⴰⴱⴷⵍⵍⴰⵀ
Université Sidi Mohamed Ben Abdellah

Année Universitaire : 2017-2018



Master Sciences et Techniques CAC Ageq

Chimiométrie et Analyse Chimique : Application à la gestion de la qualité

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

Validation analytique par le profil d'exactitude de la méthode de dosage du benzo [à] pyrène par chromatographie

Présenté par:

TAJRI KHADIJA

Encadré par:

- Pr. A. HARRACH (FSTF)

- Mme FATIMA EL FARROUDI (SIOF)

Soutenu Le 13 Juin 2018 devant le jury composé de:

- Pr. A. HARRACH

- Pr. O. SQALLI

- Pr. Adiba KANDRI RODI

Stage effectué à : La Société Industrielle Oléicole de Fès (SIOF)

Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 35 60 82 14

Remerciements

Au terme de ce travail, J'ai le plaisir d'exprimer mes profonds remerciements à :

Mr ERRAFIK Younes, Directeur adjoint de la société industrielle oléicole de Fès pour nous avoir donné l'opportunité de réaliser ce stage.

A mon encadrant de stage **Mme EL FARROUDI Fatima**, pour la qualité de l'encadrement scientifique et méthodologique dont elle m'a bénéficié avec un suivi d'une grande rigueur intellectuelle, je ne pourrais jamais cesser de lui dire merci.

A Mr le doyen de la Faculté des Sciences Techniques, ainsi qu'à tous mes enseignants.

Mes plus vifs remerciements vont aussi à Monsieur **Pr. A. HARRACH** pour sa collaboration, et pour sa disponibilité. Sa grande expérience, sa gentillesse et ses grandes qualités scientifiques et humaines qui ont constitué un support permanent à ma réflexion.

Je remercie vivement **Pr. B. IHSSAN** pour son soutien et ses bénéfiques consignes.

Pr. EL HADRAMI, je tiens à vous remercier pour m'avoir accueilli dans votre master. Je suis très reconnaissant pour la confiance que vous m'avez accordée, votre gentillesse, votre disponibilité, et vos encouragements m'ont été indispensables.

Je remercie également les membres de jury **Pr. O. SQALLI** et **Pr. Adiba KANDRI RODI** d'avoir accepté de juger ce travail.

dédicace

A mes très chers parents

Mr. TAJRI Mohammed et ER-RAIS Rachida

Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, ni la gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être.

J'espère avoir répondu aux espoirs que vous avez fondés en moi. Je vous rends hommage par ce modeste travail en guise de ma reconnaissance éternelle et de mon infini amour. Que DIEU vous prête longue vie afin que je puisse toujours vous combler.

A mes frères Salah eddine et youssef.

A tous les membres de ma famille, petits et grands.

A toute mes ami(e)s.

A tous ceux qui me sont chers.

Veuillez trouvez dans ce modeste travail l'expression de mon affection.

Sommaire

I. Introduction 1
II. Présentation de l'entreprise 2
1. Historique 2
2. Carte d'identification 2
3. Produits de la SIOF 3
4. Organigramme de la SIOF 3

Partie bibliographique

I. Huile de grignon 5
1. Définition 5
2. Composition 5
3. Procédé du raffinage 5
3.1 Démucilagination 6
3.2 Neutralisation 7
3.3 Lavage 7
3.4 Séchage 7
3.5 Décoloration 8
3.6 Filtration 8
3.7 Désodorisation 8
4. Analyses effectuées au sein de laboratoire 9
4.1 Analyses à la réception 9
4.2 Analyses au cours du raffinage 10
II. Généralité sur les benzo à pyrène 11
III. Rappel sur la chromatographie 11
IV. Validation analytique 13
1. Méthode analytique 13
2. Cycle de vie d'une méthode analytique 13
3. Validation analytique 14
4. Critères de validation 14
4.1 Spécificité 14
4.2 Exactitude 14
4.3 Justesse 15
4.4 Fidélité 15
4.5 Limite de détection 15
4.6 Limite de quantification 16
4.7 Linéarité 16
4.8 Intervalle de mesure 16

4.9 Robustesse 16
5. Validation analytique basée sur le profil d'exactitude et la notion de l'erreur totale 16
5.1 Généralité 16
5.2 Avantage de l'approche de l'erreur totale 17
5.3 Etapes d'établissement du profil d'exactitude 18
5.3.1 Fonctions de réponse 18
5.3.2 Prédiction inverse 19
5.3.3 Calcul de la justesse 20
5.3.4 Calcul de la fidélité 20
5.3.5 Intervalles de tolérance 21

Partie expérimentale

I. Dosage du benzo à pyrène 23
1. Domaine d'application 23
2. Principe 23
3. Réactifs et matériels 23
4. Mode opératoire 24
5. Condition chromatographie (HPLC) 24
II. Validation statistique de la méthode de dosage du benzo à pyrène 25
1. Spécificité / sélectivité 25
2. Profil d'exactitude 25
2.1 Choix du matériau de validation 25
2.2 Choix du domaine de validation 26
2.3 Plan expérimental 26
2.3.1 Plan d'étalonnage 26
2.3.2 Plan de validation 26
2.4 Sélection des limites d'acceptation 27
2.5 Choix du modèle d'étalonnage le plus adéquat 27
2.6 Calcul des critères de la validation 33
2.6.1 Calcul des concentrations retrouvées après correction 33
2.6.2 Calcul de la justesse 33
2.6.3 Calcul de la fidélité 34
2.6.4 Calcul des intervalles de tolérances 34
2.7 Profil d'exactitude après correction 35
3. Calcul de la limite de quantification et de détection 36
Conclusion 38

liste des figures

Figure 1 : Organigramme *de la société SIOF* 3
Figure 2: Diagramme de fabrication de l'huile de grignon raffinée 6
Figure 3: Structure du benzo[a]pyrène. 11
Figure 4: Système de chromatographie liquide 13
Figure 5: cycle de vie d'une méthode analytique 14
Figure 6: exemple d'un profil d'exactitude 17
Figure 7: profil d'exactitude pour un modèle linéaire simple 29
Figure 8: profil d'exactitude pour un modèle linéaire simple pondéré 1/X 29
Figure 9: profil d'exactitude pour un modèle linéaire simple pondéré $1/X^2$ 29
Figure 10: profil d'exactitude pour un modèle linéaire 0 – max 30
Figure 11: profil d'exactitude pour un modèle racine carrée 30
Figure 12: profil d'exactitude pour un modèle racine carrée pondéré 1/X 30
Figure 13: profil d'exactitude pour un modèle logarithmique 31
Figure 14 : profil d'exactitude pour un modèle logarithmique pondéré 1/X 31
Figure 15: profil d'exactitude pour un modèle quadratique 31
Figure 16: profil d'exactitude pour un modèle quadratique pondéré 1/X 32
Figure 17: profil d'exactitude corrigé avec LA ±20% 35
Figure 18: profil d'exactitude corrigé avec LA ±15% 35
Figure 19: profil d'exactitude corrigé avec LA ±25% 36
Figure 20: droite de régression aire = f (concentration) 37

liste des tableaux

Tableau 1: Carte d'identification de la SIOF 2
Tableau 2: Types de chromatographie de partage 12
Tableau 3: principales fonctions de réponse 19
Tableau 4: fonctions inverse 19
Tableau 5: gamme d'étalonnage 26
Tableau 6: gamme de validation 27
Tableau 7: coefficients des différents modèles d'étalonnage 28
Tableau 8: concentrations retrouvées après correction du modèle linéaire simple 33
Tableau 9: calcul de la justesse pour un modèle linéaire simple 33
Tableau 10: Critères de fidélité pour les six niveaux de concentration 34
Tableau 11: calcule des intervalles de tolérances 34
Tableau 12: les intervalles de tolérances 34
Tableau 13: données de calcul de la limite de quantification et de détection 36

I. Introduction

Les huiles ont toujours constituées une part importante de l'alimentation humaine. Elles offrent un large choix tant au niveau du goût, de l'utilisation, du prix, que de la qualité. Cependant les industriels font preuve d'originalité en proposant des produits de plus en plus axés d'une part sur la praticité d'utilisation, et d'autre part, sur le côté naturel et authentique.

Parmi ces produits, l'huile de grignon qui provient d'une huile brute et qui nécessite, pour obtenir une huile comestible, le passage obligatoire par le traitement de raffinage. Ce traitement doit garantir au consommateur un produit d'aspect engagent, neutre de goût, résistant à l'oxydation, adapté à l'emploi désiré et débarrassé de ses substances toxiques ou nocives (tel que le benzo à pyrène).

La Société Industrielle Oléicole de Fès (SIOF) occupe les premières places au sein des sociétés agro-industrielles marocaines. L'entreprise produit et commercialise une gamme étendue d'huiles de grande qualité, à travers des marques qui ont pu conquérir la fidélité de millions de consommateurs depuis plusieurs années.

Dans ce cadre, j'ai effectuée un stage de fin d'étude au laboratoire de contrôle de qualité au sein de la société SIOF dont l'objectif est de valider la technique de dosage du benzo à pyrène dans l'huile de grignon par l'approche de l'erreur totale.

Dans le présent rapport, nous avons commencé par la réalisation d'une synthèse sur la société SIOF, ensuite en deuxième partie, l'étude bibliographique qui a porté sur l'huile de grignon, les benzo à pyrènes et la méthodologie de validation analytique plus précisément celle qui nous permet la construction du profil d'exactitude. Ainsi, en troisième partie, nous avons vérifié la spécificité. Pour passer par la suite à l'élaboration des plans d'étalonnage et de validation, ce qui nous a permis de choisir le modèle d'étalonnage adéquat auprès de plusieurs modèles générés, pour pouvoir enfin calculer les différents critères de validité de cette méthode.

II. Présentation de l'entreprise

1. Historique

Créée en 1961 sous forme d'une société à responsabilité limitée(SARL), la SIOF est une réalisation familiale qui n'a pas cessé de développer ses moyens, de diversifier et d'améliorer la qualité de ses produits.

Au départ, l'activité initiale de la société était simplement la pression des olives, l'extraction d'huile de grignon et la conserve des olives.

- En 1966, SIOF a pu installer une raffinerie d'huile de table (tournesol, soja), avec une capacité de 12000 tonnes/ an.
- En 1972, la société a intégré dans ses activités une usine de fabrication des emballages en plastique et un nouvel atelier pour les matériaux nécessaires au conditionnement (remplissage, capsulage et étiquetage des bouteilles (1/2, 1, 2et 5L).
- A partir de 1985, la SIOF s'est transformée en une société anonyme avec un capital de 30.000.000 DH, dont les actions sont reparties entre la famille LAHBABI.
- En 2002-2003, la société a installé deux chaînes de production pour la fabrication de PET (polyéthylène téréphtalate) et pour le conditionnement des huiles en format ½, 2 et 5 L.

Dans le souci de vouloir être continuellement dans la course des nouvelles techniques, SIOF choisit rigoureusement ses moyens humains et matériels et pousse toujours plus loin à l'innovation et la qualité de ses produits.

2. Carte d'identification

Tableau 1: Carte d'identification de la SIOF

Raison social	SIOF : société industrielle oléicole deFès
Siège social	▪ 29, Rue Pictet Q.I Dokkarat - 30000 Fès ▪ rue 806, q.i., Sidi Brahim –Fès
Capital social	52.000.000 DH
Forme juridique	Société anonyme
Date de création	1961
Domaine d'activité	Extraction, raffinage, conditionnement des huiles alimentaires et des conserves des olives.
Superficie de l'usine	▪ Zone industrielle de Dokkarrat, occupe une surface de 12000 m^2 pour le raffinage d'huile alimentaire. ▪ Zone industrielle Sidi Brahim : une surface de 20000 m^2, assurant la trituration des olives, la production de conserves d'olives et l'extraction d'huile de grignon.
Effectifs	320 personnes dans les deux sites industriels

3. Produits de la SIOF

La SIOF produit une large gamme des huiles qui lui permettent de toucher un grand nombre de consommateurs, elle est régulièrement exposée à une forte concurrence de la part du premier sur le marché des huileries au Maroc LESIEUR CRISTAL.

L'usine de DOKKARAT produit quatre types d'huiles alimentaires qui sont destinées au marché local mais également à l'exportation. On distingue les marques suivantes :

- **SIOF** : huile de table raffinée à base de soja.
- **SIOF** : huile de tournesol raffinée.
- **MOULAY IDRISS** : huile d'olive vierge courante.
- **ANDALOUSSIA** : huile de grignon raffinée.

4. Organigramme de la SIOF

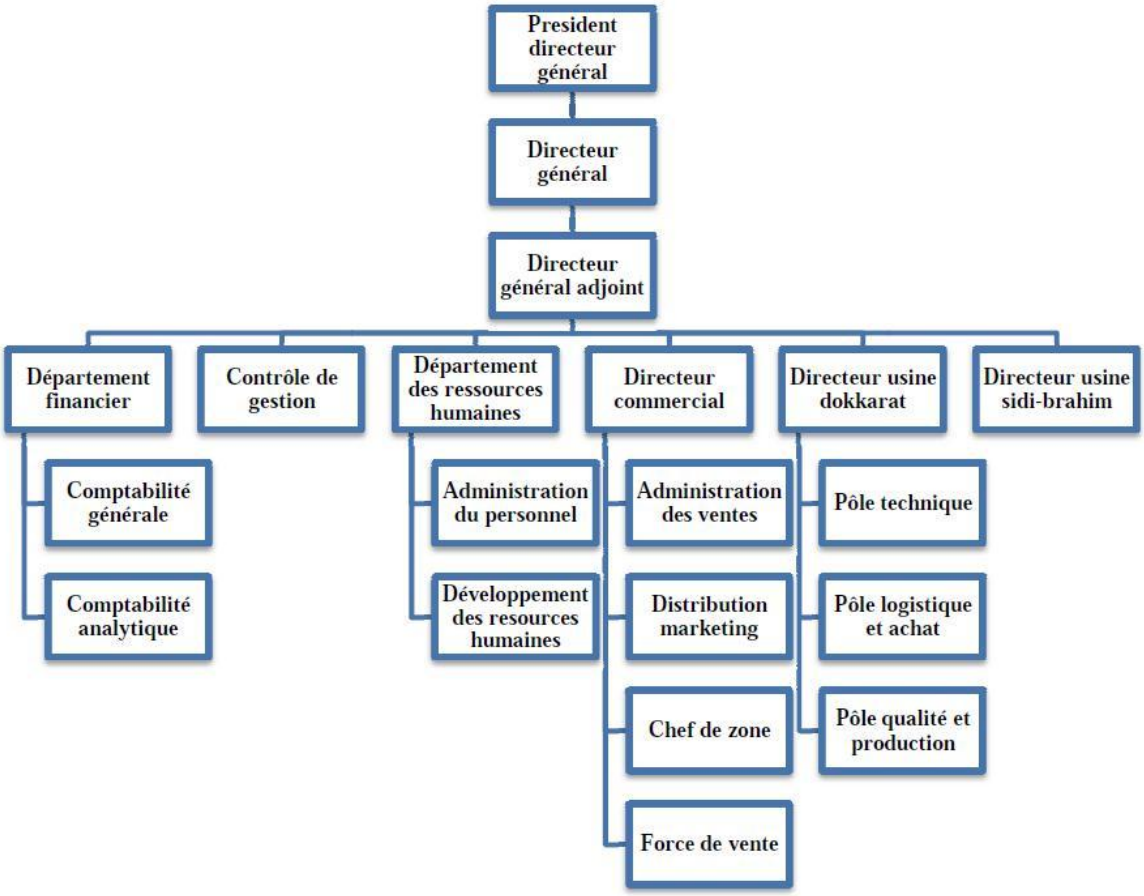


Figure 1 : Organigramme ***de la société SIOF***

Etude bibliographique

I. Huile de grignon

1. Définition

Les grignons sont un sous-produit du processus d'extraction de l'huile d'olive composé des peaux, des résidus de la pulpe et des fragments des noyaux. Les grignons sont les résidus solides résultant de l'extraction d'huile, alors que les résidus liquides sont dénommés margines. Les grignons sont séchés, broyés et traités par des solvants pour obtenir l'huile de grignon [1].

2. Composition

Les grignons bruts sont pauvres en matières azotées et riches en cellulose brute. Ils restent relativement riches en matières grasses.

La matière grasse des grignons est très riche en acides gras notamment C16 et C18 insaturés qui constituent 96% du total des acides gras [2].

3. Procédé du raffinage

Les huiles de pression et les huiles d'extraction sont généralement mélangées et désignées sous le terme général (huile brute). La plupart des huiles brutes doivent être débarrassées des impuretés qu'elles renferment afin d'améliorer leur conservation, leur gout, leur aspect et leur digestibilité.

Le but du raffinage est de préserver les substances nobles comme les antioxydants (par exemple les tocophérols) ou certaines propriétés techniques et d'éliminer les éléments mineurs indésirables qui peuvent être :

- des constituants mineurs de l'huile tels que les acides gras libres, les phospholipides, les cires, les pigments, les produits d'oxydations etc….
- des contaminants tels que des traces de métaux ou de solvants, des pesticides qui peuvent provenir des pratiques culturales ou de l'environnement [2].

Le raffinage effectué au niveau de SIOF est un raffinage chimique qui se fait selon les opérations élémentaires suivantes :

- **La Démucilagination :** c'est une opération qui consiste à éliminer les composés hydratables tels que les phospholipides.
- **La neutralisation :** les acides gras libres sont les impuretés les plus présentes dans les huiles à raffiner. L'étape de neutralisation sert à éliminer ces composés susceptibles d'accélérer l'oxydation de l'huile. Elle se fait à l'aide de la soude caustique, suivie d'un lavage à l'eau et d'un séchage.

- **La décoloration :** L'huile neutre est traitée par une terre absorbante pour éliminer les dernières traces des agents colorants : chlorophylle, caroténoïdes et les agents toxiques.
- **La désodorisation :** cette étape permet de débarrasser, l'huile de son odeur désagréable par distillation sous vide poussée à température élevée (180°C-200°C) [2].

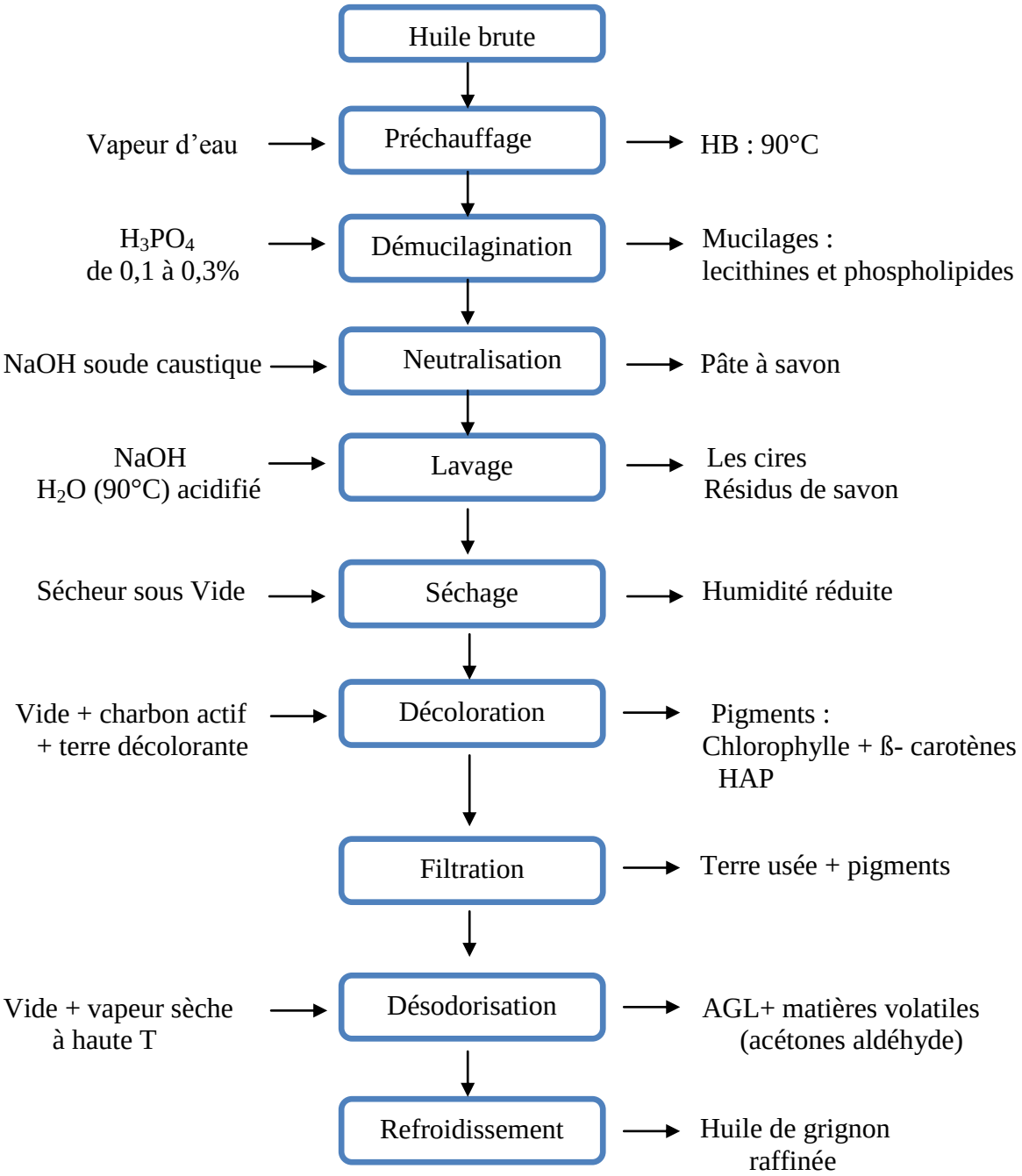


Figure 2: Diagramme de fabrication de l'huile de grignon raffinée

3.1 Démucilagination

Le procédé de la démucilagination de SIOF se fait comme suit : L'huile venant du bac de lancement est filtrée dans un filtre à tamis puis chauffée à 90°C dans un échangeur à spiral.

Ensuite, l'opération se poursuit par injection de l'acide phosphorique commercial par une pompe doseuse. L'huile et l'acide passent alors dans un premier mélangeur, puis dans un bac de contact où ils restent pendant 15 à 20 minutes. (Temps de séjours) pour la séparation des phospholipides. Le mélange est ensuite envoyé à l'étape de neutralisation.

3.2 Neutralisation

A l'aide d'une pompe doseuse, la soude est injectée dans l'huile provenant du bac de contact : 20° baumés pour l'huile de grignon. Le mélange d'huile et de soude passe dans un mixeur à grande vitesse pour éliminer tout risque de saponification parasite avant d'être envoyé vers le séparateur à bol auto-débordeur (RSA 150) destiné à séparer les pâtes de neutralisation. Le mélange est divisé en deux phases :

- Phase lourde : pâte de neutralisation.
- Phase légère : huile neutre.

3.3 Lavage

Il est important de noter que les huiles de grignon subissent un lavage peu différent (décirage). Après la neutralisation, on les refroidit dans un premier échangeur huile-huile (huile froide qui sort de décirage va refroidir l'huile chaude qui sort de neutralisation) puis dans un second échangeur huile-eau jusqu'à 11°C.

L'huile refroidit est injectée par NaOH (2éme soude) 15 à 16 degré baumé pour créer des savons qui vont jouer le rôle de combinaison des cires.

L'huile est conduite vers un premier maturateur où on peut ajouter l'eau pour bien cristalliser les cires sous forme de graines pour faciliter leur élimination. Après l'huile passe d'un second maturateur à un troisième dans un circuit plus long pour garantir un temps de séjour plus long.

Dés le 3éme maturateur l'huile est pompée vers un échangeur huile-eau à 25°C qui va augmenter la température d'huile à 15-16°C tout en évitant la rupture des cires cristallisées. À l'aide de la force centrifugeuse du séparateur les cires sont éliminées de l'huile. L'huile décirée est chauffée par l'échangeur huile-huile (huile chaude qui sort de neutralisation va chauffée l'huile froide qui sort de décirage) et aussi par échangeur huile-vapeur jusqu'à 90°C. L'huile provenant du séparateur reçoit une eau acidifiée avec l'acide citrique, passe dans un mélangeur rapide puis le mélange est séparé par centrifugation. L'huile lavée doit contenir moins de 50 ppm de savon et une acidité inférieure à 0,04%. Les eaux de lavages contiennent encore de l'huile qu'on récupère par décantation (environ 1à 3 % de matière grasse).

3.4 Séchage

L'huile décirée sortante du lavage avec une température de 90°C, est pulvérisée dans une tour verticale maintenue sous vide appelée sécheur.

À la sortie du sécheur on doit avoir :

• Une acidité inferieure à 0,04%.

• Une humidité inferieure à 0,1%(qui était à l'entrée du sécheur entre 0,5 et 0,7 %).

• Des traces du savon inferieure à 50 ppm.

• Un pourcentage en mucilages ne dépassant pas 10 ppm.

3.5 Décoloration

Après le séchage, l'huile passe à la décoloration qui vise à éliminer les peroxydes, les produits secondaires d'oxydation et essentiellement les pigments colorés (les chlorophylles et les carotènes). Elle fait intervenir le phénomène d'adsorption sur la terre décolorante et le charbon actif. Ceci permet aussi d'éliminer les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) qui peuvent être présents en quantités non négligeables dans certaines huiles végétales.

À la sortie du sécheur, l'huile est séparée en 2 conduites :

• Une première conduisant 90% de l'huile directement vers un échangeur thermique à spirale (où elle sera chauffée à 100°C) puis vers le décolorateur.

• Une 2ème conduisant 10% vers un mélangeur de la terre (10% de charbon actif + 0,08% de terre). Après un temps de contact de 20 min (suffisant pour avoir un bon mélange), le mélange rejoint les 90% d'huile dans le décolorateur.

L'opération se fait à une T = 110°C et un vide de 60 mm Hg dans un décolorateur muni d'un agitateur qui assure un bon contact entre l'huile et la terre, empêche les dépôts au fond du décolorateur et permet de limiter le temps de réaction à 20 minutes.

3.6 Filtration

L'huile sortante de la décoloration doit être débarrassée de la terre usée qu'elle contient en suspension. Pour cela, on utilise un filtre à plaque, l'huile passe dans le filtre à une pression de 0 à 3 bars. Quand le filtre est chargé en terre décolorante, il doit être débarrassé de son gâteau. On envoie de la vapeur chaude pour le sécher, après on envoie de l'air comprimé pour réaliser une vibration des plaques qui vont faire tomber le gâteau qui sera envoyé dans un bassin puis vers les déchets.

Après filtration sur plaques, et pour s'assurer que l'huile ne contient plus de terre ou des matières en suspension, on la passe dans l'un des deux filtres à poches (filtration de sécurité), fonctionnant alternativement. L'huile filtrée est ensuite stockée dans un réservoir.

3.7 Désodorisation

La désodorisation est la dernière phase du raffinage des huiles.

L'huile décolorée est stockée dans un bac, ensuite elle est pompée vers le premier échangeur à plaques à contre courant ; elle y entre avec une température de 110°C et sort à

120°C, la quantité d'énergie qu'elle a reçue est fournie par l'huile désodorisée qui subit le refroidissement. L'huile chauffée est ensuite envoyée vers le dégazeur sous vide, celui-ci permet le séchage et la désaération par le système du vide. L'huile séchée passe ensuite dans un deuxième échangeur de chaleur (toujours avec l'huile désodorisée), duquel elle sort à une température de 160°C, puis un dernier chauffage de l'huile avec un échangeur tubulaire augmente sa température jusqu'à 210°C par un échange de chaleur avec un fluide thermique.

L'huile ainsi obtenue à 210°C, est envoyée vers un désodoriseur fonctionnant en système continue de 17 T ,ce dernier est constitué de 4 compartiments, chacun d'eux a sa propre injection de vapeur sèche qui engendre le barbotage de l'huile et facilite l'entraînement des composés volatils vers la phase vapeur sous l'effet du vide .L'huile préchauffée entre par la partie supérieure du désodoriseur ,ensuite l'huile s'écoule par débordement du premier compartiment au deuxième et de la même manière jusqu'au 5ème compartiment où l'huile va être récupérée à une température de 210°C. Pour les acides gras issus de la désodorisation, ils sont aspirés dans un bac sous l'effet du vide, puis ils sont stockés dans des tanks de stockage des acides gras. L'huile désodorisée ainsi récupérée passe par les mêmes échangeurs à plaques qui ont assuré son préchauffage. Sa température baisse de 210°C à 160°C, de 160°C à 110°C et arrive jusqu'à 40°C. À la fin l'huile finie passe dans des filtres en poches pour subir un polissage qui va éliminer toutes les impuretés qui ont persistées dans l'huile.

4. Analyses effectuées au sein de laboratoire

Le rôle de laboratoire dans l'usine est d'effectuer des analyses, à tous les niveaux depuis la réception des huiles brutes jusqu'à l'obtention d'une huile raffinée, par des analyses effectuées soit sur demande dans le cas d'un phénomène anormal, soit dans un intervalle de temps régulier afin de suivre la qualité de raffinage pour améliorer les conduites de l'opération.

4.1 Analyses à la réception

- Détermination de l'acidité et l'indice d'acide :

L'acidité peut être définit comme la teneur en acide gras libres exprimée en pourcentage d'acide ou bien en acidité calculé conventionnellement. L'indice d'acide est calculé par le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaires pour neutraliser les acides gras libres présents dans 1g de corps gras.

La méthode du dosage est une méthode à l'éthanol chaud utilisant un indicateur coloré (phénolphtaléine) et on dose avec KOH [3].

- Détermination de la teneur en eau et en matières volatiles (Humidité) :

Le principe de cette méthode est le chauffage d'une prise d'essai à 103°C ± 2°C jusqu'à l'élimination complète de l'eau et des matières volatiles dans l'étuve. Puis on détermine la perte de masse [3].

- Détermination de la teneur en impuretés insolubles :

Le principe de cette méthode est le traitement d'une prise d'essai par un excès de n-hexane ou d'éther de pétrole, puis on filtre la solution obtenue. La teneur en impuretés insolubles est déterminée par pesage après le lavage du filtre et du résidu avec le même solvant et un séchage à 103°C±2°C [3].

- Détermination du contenu en stérols :

Le principe de cette méthode est comme suit :

Les huiles, additionnées d'α-cholestanol comme étalon interne, sont saponifiées avec de l'hydroxyde de potassium en solution éthanolique, puis l'insaponifiable est extrait avec de l'éther éthylique.

La fraction stérolique et des dialcools tri terpéniques sont séparées de l'extrait insaponifiable par chromatographie sur couche mince sur plaque de gel de silice. Les fractions récupérées dans le gel de silice sont transformées en trimethylsilylethers et analysées par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire [3].

- Détermination de la teneur en cires :

Le principe de cette méthode est comme suit :

L'huile additionnée d'étalons internes appropriés, est fractionnée par chromatographie sur colonne de gel de silice hydraté ; la fraction éluée dans les conditions de l'essai est recueillie puis analysée directement par chromatographie en phase gazeuse [3].

4.2 Analyses au cours du raffinage

- Détermination de l'acidité :

Il est effectué sur l'huile brute, neutralisée, filtrée, séchée, décolorée, et désodorisée.

- Dosage de taux de savon :

C'est la détermination de la quantité de savon contenu dans les huiles raffinées exprimée en milligramme d'oléate de sodium dans un kilogramme de matière grasse, pour savoir si on a une perte d'huile ou non. Il est effectué sur l'huile neutralisée, séchée et désodorisée.

- Dosage de l'acidité de la pâte de neutralisation :

Cette analyse permet de savoir s'il y a une perte d'huile dans la pâte de neutralisation, en déterminant l'acidité de la pâte.

II. Généralité sur les benzo à pyrène

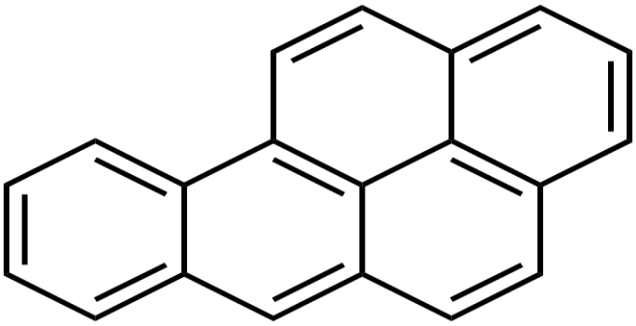


Figure 3: Structure du benzo[a]pyrène.

Le benzo à pyrène est un composé de formule $C_{20}H_{12}$ appartenant à la famille des hydrocarbures aromatiques polycycliques qui se présente sous la forme d'un solide cristallin jaune. Il est noté en abrégé B[a]P.

C'est un polluant persistant préoccupant ; structurellement formé de cinq cycles fusionnés, c'est un agent mutagène très cancérogène car il est capable d'intercalation entre les bases de l'ADN [4].

Propriétés chimiques :

Formule brute : $C_{20}H_{12}$

Masse molaire : 252,3093 ± 0,0168 g/mol

Masse volumique : 1,4 g/cm³

Propriétés physiques :

T° fusion : 179 °C

Solubilité : dans l'eau: nulle

T° ébullition : à 1,3 kPa: 310 à 312 °C

III. Rappel sur la chromatographie

Selon la nature de la phase stationnaire, on peut distinguer les mécanismes suivants :

- Chromatographie d'adsorption
- Chromatographie de partage
- Chromatographie par échange d'ions
- Chromatographie par exclusion de taille [5].

La chromatographie de partage est la technique de chromatographie liquide, la plus utilisée. Ce mécanisme est surtout utile pour la séparation de molécules très polaires de

masses molaires inférieures à 3000 aux homologues d'une même série, mal séparés par chromatographie d'adsorption.

Il y a 2 types de chromatographie de partage (tableau 2) :

- Chromatographie de partage sur phase inversée
- Chromatographie de partage sur phase normale (classique)

Environ 80% des séparations chromatographiques en phases liquides sont effectuées par partage sur des phases inversées.

La chromatographie de partage sur phase inversée utilise une phase stationnaire apolaire et une phase mobile polaire. [5]

Tableau 2: Types de chromatographie de partage

	Phase inversé	Phase normale
Phase stationnaire	Non polaire Exemple : • silice greffée par une chaîne alkyle ou phényle	Polaire Exemple : • C2H4CN • C3H6NH2 • C3H6N(CH3)2 • diol
Phase mobile	Polaire Exemple : • Eau • méthanol • acétonitrile • tetrahydrofurane	Non polaire Exemple : • n-hexane • chloroforme • éther

Principe de la chromatographie liquide (HPLC)

La chromatographie en phase liquide est une méthode d'analyse physico-chimique qui sépare les constituants d'un mélange (les solutés) par entraînement au moyen d'une phase mobile (liquide) le long d'une phase stationnaire (solide) grâce à la répartition sélective des solutés entre ces deux phases. Chaque soluté est donc soumis à une force de rétention (exercée par la phase stationnaire) et force de mobilité (due à la phase mobile). (Figure 4)

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique.

La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique.

Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire.

En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme. [6]

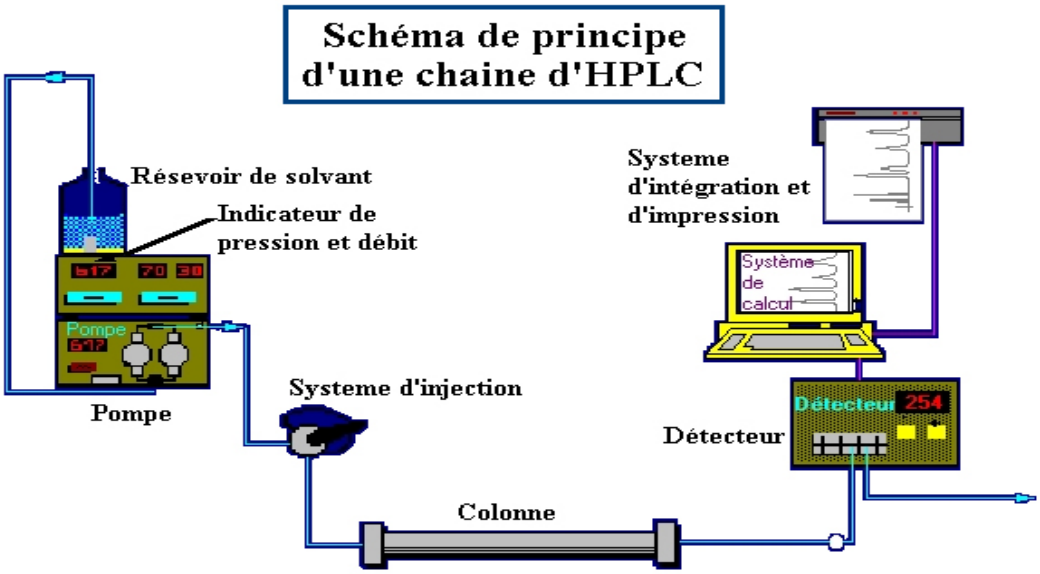


Figure 4: Système de chromatographie liquide

IV. Validation analytique

1. Méthode analytique

Une analyse chimique peut être définie comme une suite d'opérations élémentaires, statistiquement indépendantes les unes des autres, qui commencent au moment de la prise d'essai (prélèvement d'un échantillon analytique sur l'échantillon de laboratoire) et aboutissent à l'expression d'un résultat d'analyse qu'il faudra valider pour pouvoir disposer enfin d'une donnée analytique.

2. Cycle de vie d'une méthode analytique

La mise en œuvre d'une méthode de dosage peut se décomposer en quatre grandes phases :

- Sélection
- développement
- Validation
- routine

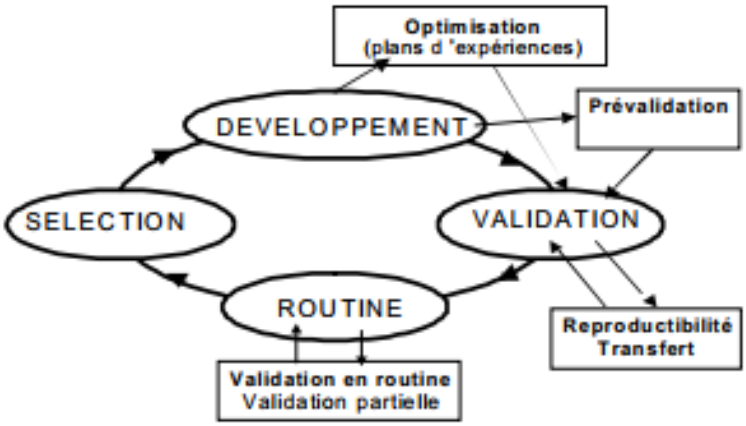


Figure 5: cycle de vie d'une méthode analytique

3. Validation analytique

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.

Le but de la validation d'une procédure analytique est de démontrer qu'elle correspond à l'usage pour lequel elle est prévue [7].

4. Critères de validation

La validation porte sur les critères suivants :

- Spécificité
- Exactitude
- justesse
- Fidélité
  - ✓ Répétabilité
  - ✓ Fidélité intermédiaire
  - ✓ Reproductibilité
- Limite de détection : LOD
- Limite de quantification : LOQ
- Linéarité
- Intervalle de mesure
- Robustesse

4.1 Spécificité

La spécificité d'une procédure analytique est sa capacité à permettre l'évaluation univoque de la substance à analyser, en présence de composés susceptibles de l'accompagner. Ces composés comprennent typiquement les impuretés les produits de dégradations, la matrice, etc [7].

4.2 Exactitude

L'exactitude correspond au degré de concordance entre la valeur de référence ou la valeur considérée comme véritable par convention et la valeur obtenue [7].

4.3 Justesse

La justesse exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une série de résultats d'essais et une valeur qui est acceptée soit comme une valeur conventionnellement vraie, soit comme une valeur de référence acceptée (ex : standard international, standard d'une pharmacopée) [7].

- Indication sur les erreurs systématiques

4.4 Fidélité

La fidélité exprime l'étroitesse de l'accord (degré de dispersion, coefficient de variation) entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène (résultats d'essais indépendants) dans des conditions prescrites.

- Indication sur les erreurs aléatoires

3 niveaux :

- Répétabilité
- Fidélité intermédiaire (intra-laboratoire)
- Reproductibilité (inter-laboratoire)

Répétabilité : Conditions où les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essai identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps.

Fidélité intermédiaire : Conditions où les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essai identiques dans le même laboratoire, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents et pendant un intervalle de temps donné.

Reproductibilité : Conditions où les résultats d'essai sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essais identiques dans différents laboratoires, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents [7].

4.5 Limite de détection

La limite de détection d'une procédure d'analyse est la plus petite quantité à examiner dans un échantillon pouvant être détectée, mais non quantifiée comme une valeur exacte dans les conditions expérimentales décrites de la procédure [7].

La détermination de la LD s'effectue par plusieurs moyens :

- Méthode par détermination sur blanc
- Norme XPT 90
- Méthode par la courbe d'étalonnage
- Approche de l'erreur totale [8]

4.6 Limite de quantification

La limite de quantification est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une exactitude (justesse + fidélité) définie [7].

4.7 Linéarité

La linéarité d'une procédure analytique est sa capacité, à l'intérieur de l'intervalle de dosage, à fournir des résultats directement proportionnels à la concentration (quantité) en substance présente dans l'échantillon [7].

4.8 Intervalle de mesure

L'intervalle de mesure d'une procédure analytique est l'intervalle (limites inférieure et supérieure comprises) de concentration (quantité) de la substance à analyser (dans l'échantillon) sur lequel il a été démontré que la procédure possède une fidélité, une exactitude et une linéarité appropriées [7].

4.9 Robustesse

La robustesse d'une procédure analytique est une mesure de sa capacité à ne pas être affectée par des modifications faibles, délibérées, de facteurs associés à la procédure [7].

5. Validation analytique basée sur le profil d'exactitude et la notion de l'erreur totale

5.1 Généralité

L'approche de l'erreur totale est une démarche harmonisée de validation applicable aux différentes procédures analytiques quantitatives, et indépendamment du secteur d'activité.

Le but principal de cette approche est non uniquement de recadrer les objectifs de la validation en fonction de la finalité de la méthode analytique, de la valider telle qu'elle sera utilisée en routine, mais également d'offrir un outil pratique de décision en distinguant notamment les règles de diagnostic et les règles de décision.

En effet, cette démarche repose sur l'utilisation du profil d'exactitude, qui intègre de façon statistiquement correcte dans un seul graphique l'ensemble des éléments essentiels de la validation, à savoir le bais, la fidélité, le risque et les limites de quantification.

L'objectif d'une bonne procédure analytique est de pouvoir quantifier le plus exactement possible chacune des quantités inconnues que le laboratoire aura à déterminer. Autrement dit, c'est que la différence entre le résultat rendu (x) et la « vraie valeur » inconnue de l'échantillon, qui par ailleurs restera toujours inconnue, soit petit ou du moins inferieure à une limite d'acceptation, c'est-à-dire : $-\lambda < x - \mu_T < \lambda \Longleftrightarrow |x - \mu_T| < \lambda$

Une « bonne procédure analytique » peut être qualifiée d'acceptable si la « garantie » ou la probabilité est suffisamment grande que la différence entre chaque valeur mesurée (x) d'un échantillon et sa « vraie valeur » (μT) soit comprise dans les limites d'acceptation que

l'analyste s'est fixée. La réalisation de ceci avec un risque connu peut se traduire par la relation suivantes : $\mathbf{P\,(|\,x - \mu_T| < \lambda) \geq ß}$

Avec ß la proportion de mesures dans les limites d'acceptation, et λ la grandeur définissant les limites d'acceptation fixées a priori en fonction des contraintes du secteur d'activité. Le risque associé d'une procédure s'évalue par la proportion attendue de mesures en dehors des limites d'acceptation.

Les paramètres l'exactitude, la fidélité, la linéarité, etc…, ne sont plus que des « statistiques » ou « éléments de calcul » permettant de contribuer pour chiffrer la garantie. Ils aident à poser un diagnostic, c'est-à-dire nous renseigner sur un point particulier de la performance de la méthode étudiée, comme par exemple la linéarité ou le passage de l'ordonnée par 0. Dés lors ces paramètres ne sont plus considérés comme outils de décision, mais plutôt outils de diagnostiques.

L'outil de décision ou la règle de décision, à la fois pratique et visuelle, repose sur l'intégration du profil d'exactitude dans des limites d'acceptation (±λ), dont l'intérêt a été démontré par la figure ci-dessous. Le profil d'exactitude, construit à partir des intervalles de tolérance représentants les futurs mesures attendues, permet donc, de décider de la capacité ou non d'une procédure à fournir des résultats dans les limites d'acceptation.

La zone en vert montre l'intervalle de dosage dans lequel la procédure est capable de quantifier avec une exactitude connue et un risque fixé par l'analyste [8].

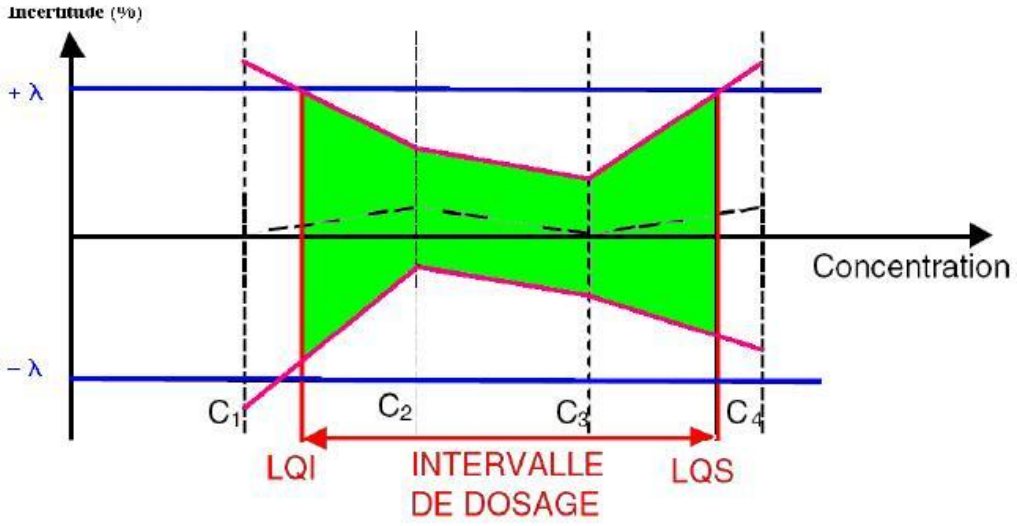


Figure 6: exemple d'un profil d'exactitude

5.2 Avantage de l'approche de l'erreur totale

La méthode de validation reposant sur le concept de l'erreur totale en combinant les deux erreurs, aléatoire et systématique, présente plusieurs avantages par rapport aux approches classiques :

- Elle est considérée comme une approche globale qui peut être appliquée quelque soit le domaine d'activité et la matrice étudiée.
- Cette approche propose une méthode d'interprétation graphique très simple et visuelle qui ne s'embarrasse pas de tests statistiques toujours délicat à décrypter.
- Elle permet de minimiser considérablement le risque d'accepter une procédure qui ne serait pas suffisamment exacte ou, au contraire, de rejeter une procédure qui serait exacte.
- Elle permet non seulement de simplifier l'approche de validation d'une procédure mais aussi l'estimation de l'incertitude de mesure sur la base des données de validation.
- Elle permet de générer différents modèles d'étalonnage et possibilité de choisir le plus adéquat pour calculer, par la prédiction inverse, la concentration en retour [8].

5.3 Etapes d'établissement du profil d'exactitude

1) réalisation des expériences sur deux gammes :

- ✓ Une gamme de standards d'étalonnage.
- ✓ Une gamme de standards de validation.

2) alignement des observations (si pour un niveau de concentration, les quantités introduites ne sont pas identiques pour toutes les séries).

3) sélection des limites d'acceptation en fonction des contraintes du secteur d'activité.

4) choix du modèle adéquat après génération de plusieurs modèles d'étalonnage.

5) calcul des concentrations en retour à partir du modèle sélectionné par prédiction inverse.

6) calcul de la justesse à chaque niveau de concentration.

7) calcul de la fidélité à chaque niveau de concentration.

8) calcul des intervalles de tolérance bilatéraux pour chaque niveau de concentration.

9) établissement du profil d'exactitude ou d'incertitude [8].

5.3.1 Fonctions de réponse

Pour les méthodes indirectes, il est nécessaire d'exprimer la réponse instrumentale Y en fonction des concentrations X des étalons, à l'aide d'un modèle mathématique de la forme :

$$Y = f(x)$$

Les fonctions classiquement utilisées sont regroupées au tableau 3. Les paramètres a_1, a_2,… sont appelés les paramètres du modèle. On calcule les paramètres du modèle d'étalonnage à partir des données recueillies pour chaque série k, de façon à obtenir k ensembles de valeurs des paramètres. Le même type de modèle doit être utilisé pour l'ensemble des données, quelle que soit la série, mais les valeurs des paramètres peuvent être différentes d'une série à l'autre. Cette approche permet de prendre en compte les variations

inter-séries (inter-jours) observées. Le calcul des estimations des coefficients du modèle d'étalonnage peut faire appel aux diverses techniques statistiques classiques détaillées dans la littérature :

- ✓ Régression par la méthode des moindres carrés
- ✓ Régression pondérée
- ✓ Régression non linéaire

Tableau 3: principales fonctions de réponse

Type	Equation	Paramètres
Droite passant par l'origine	**Y= a X**	**a**
Droite linéaire	**Y= a + b X**	**a , b**
Fonction quadratique	**Y= a + b X+ c X²**	**a , b , c**
Transformation logarithmique	**Ln (Y) = a + b Ln (X)**	**a , b**
Transformation racine carrée	**√ Y= a + b √ X**	**a , b**

A partir des données du plan d'étalonnage, il est possible d'estimer plusieurs modèles d'étalonnage puis de construire ainsi plusieurs profils d'exactitude. On pourra alors retenir le modèle qui fournit le profil le plus favorable. Il conviendra alors de modifier le mode opératoire en fonction du modèle choisi, sans modifier les limites d'acceptabilité λ.

5.3.2 Prédiction inverse

Pour les méthodes indirectes, les modèles d'étalonnage servent à calculer les concentrations retrouvées, à partir des données au plan de validation (Tableau 1), en utilisant la fonction inverse du modèle d'étalonnage, selon le modèle mathématique suivant :

$$Z_{cal} = f^{-1}(Y)$$

La fonction inverse est appelée équation de prédiction inverse et les valeurs z ainsi obtenues sont appelées concentrations retrouvées.

Tableau 4: fonctions inverse

Fonction de réponse	Fonction inverse
Droite passant par l'origine	$Z = \frac{Y}{a}$
Droite linéaire	$Z = \frac{Y - a}{b}$
Fonction quadratique	$Z = \frac{-b + \sqrt{b^2 - 4\,C\,(a - Y)}}{2\,C}$
Transformation logarithmique	$Z = 10^{(\frac{\log(Y) - a}{b})}$
Transformation racine carrée	$Z = (\frac{\sqrt{Y} - a}{b})^2$

5.3.3 Calcul de la justesse

Elle fournit une indication sur les erreurs systématiques de la procédure analytique. Il est possible de calculer un ou plusieurs critères exprimant la justesse (sous la forme d'un biais). Ces critères sont les suivants :

- ✓ Biais j = Zj – Xj
- ✓ Biais relatif (biais %) = $\frac{Zj - Xj}{Xj} \times 100$
- ✓ Taux de recouvrement % = $\frac{Zj}{Xj} \times 100$

Avec :
Zj : est la moyenne des réponses à chaque niveau j
Xj : est la moyenne des concentrations introduites

5.3.4 Calcul de la fidélité

La fidélité fournit une indication sur les erreurs aléatoires (dues au hasard). Elle peut être estimée en étudiant la répétabilité et la fidélité intermédiaire à chaque niveau de concentration.

En appliquant l'analyse des variances ANOVA à chaque niveau de concentration, et on passant par des calculs, on peut estimer les valeurs des écart-types inter-séries $\mathbf{S^2_{Between}}$ et intra-séries $\mathbf{S^2_{Withen}}$ ainsi que l'écart type de répétabilité $\mathbf{S^2_r}$ qui nous permet de calculer l'écart type et le coefficient de variation de la fidélité intermédiaire.

Selon les principes décrits de la norme ISO 5725, à savoir une décomposition de la somme des carrés des écarts totale en deux sommes des carrés d'écarts :

$$\mathbf{SCE_t = SCE_B + SCE_r}$$

Où chacune des sommes est définie comme suit pour faciliter l'interprétation :

- ✓ $\mathbf{SCE_t}$: Somme totale des écarts à la moyenne générale du niveau
- ✓ $\mathbf{SCE_B}$: Somme des écarts inter-séries
- ✓ $\mathbf{SCE_r}$: Somme des écarts intra-série

A partir des sommes des carrées des écarts, on estime les différents types des carrées moyennes en divisant par le degré de liberté (ddl), par la suite on calcul l'écart type inter-séries ($S_{between}$) et l'écart type intra-séries (S_{withen}) à partir desquelles on conclut l'écart type de la fidélité intermédiaire (S_{FI}).

$CM_b = \frac{SCEb}{p-1}$ $\quad CM_w = \frac{SCEw}{p(n-1)}$ $\quad S_b^2 = \frac{CMb-CMw}{n}$ $\quad S_w^2 = CM_w$

- Si $CM_w < CM_b$: $S_{répetabilité}{}^2 = CM_w$ et $S_{FI}^2 = S_w^2 + S_b^2$
- Si $CM_w > CM_b$: $S_b^2 = 0$ et $S_{FI} = S_T$

Finalement, on calcule les coefficients de variation de répétabilité et de fidélité intermédiaire

$$CV_r = \left(\frac{Sw}{\bar{X}}\right) * 100 \qquad CV_{FI} = \left(\frac{SFI}{\bar{X}}\right) * 100$$

5.3.5 Intervalles de tolérance

L'intervalle de tolérance est exprimé comme un intervalle symétrique autour de la concentration retrouvée moyenne Z_j.

$$Zj \pm K \times S_{IT}$$

L'écart-type de l'intervalle de tolérance S_{IT} se calcul selon la formule citée au dessous, il servira aussi à l'estimation de l'incertitude de mesure. Il est obtenu grâce aux formules suivantes :

$$S_{IT} = CV_{FI} \times \sqrt{\left(1 + \frac{1}{n \times p \times B^2}\right)} \quad \text{avec } B = \sqrt{\frac{R+1}{n*R+1}} \quad \text{et} \quad R = \frac{SB^2}{Sw^2}$$

La quantité *K* est appelé **facteur de couverture de l'intervalle de tolérance** et vaut:

$$K = Q_t\left[\upsilon, \frac{1+\beta}{2}\right] \quad \text{avec} \quad \upsilon = \frac{(R+1)^2}{\frac{(R+\frac{1}{n})^2}{p-1} + \frac{1-\frac{1}{n}}{np}}$$

$Q_t\left[\upsilon, \frac{1+\beta}{2}\right]$ est le quantile de la distribution t de Student à υ degrés de liberté et β la probabilité du contenu de l'intervalle de tolérance.

$$\mathbf{Lj= biais(\%)} - Q_t\left[\upsilon, \frac{1+\beta}{2}\right] * \sqrt{\left(1 + \frac{1}{n \times p \times B^2}\right)} \times CV_{FI}$$

$$\mathbf{Uj=biais(\%)} + Q_t\left[\upsilon, \frac{1+\beta}{2}\right] * \sqrt{\left(1 + \frac{1}{n \times p \times B^2}\right)} \times CV_{FI}$$

Partie experimentale

I. Dosage du benzo à pyrène

1. Domaine d'application

Elle s'applique aux corps gras comestible bruts ou raffinés.

2. Principe

Adsorption d'une quantité appropriée d'échantillon sur une colonne d'alumine, puis élution à l'éther de pétrole de tout benzo à pyrène présent et analyse consécutive de l'éluant par HPLC à l'aide d'un détecteur fluorimétrique.

3. Réactifs et matériels

- **Réactifs :**
  - Eau distillée
  - Ether de pétrole (point d'ébullition se situant dans une plage comprise entre 40°C et 60°C)
  - Acétonitrile pour HPLC
  - Tétrahydrofurane pour HPLC
  - Toluène pour HPLC
  - Sulfate de sodium anhydre en grains
  - Alumine activité 4, préparée à partir d'oxyde d'aluminium neutre, activité supérieure à 1, désactivée par addition de 10% d'eau. Agiter le conteneur pendant 15 min environ et laisser le contenu parvenir à l'équilibre pendant 24h. conserver l'alumine dans un récipient fermé à température ambiante. (activer l'alumine à 500°C pendant au minimum 4h de 6h à 8h puis ajouter 10% d'eau)
  - Benzo à pyrène pur à 99% : le benzo à pyrène est un carcinogène bien connu.
  - Solution de benzo à pyrène :
    Solution mère : peser, à 0.1mg près, environ 12.5mg de benzo à pyrène dans une fiole jaugée de 25ml les dissoudre dans le toluène et remplir jusqu'au trait. Cette solution contient environ 0.5mg/ml de benzo à pyrène. Il conserve pendant au moins six mois dans l'obscurité à 4°C.
    Solution étalon : préparer solution étalon contenant à peu prés 0.5µg/ml de benzo à pyrène en diluant les parties aliquotes de la solution mère avec acétonitrile.
- **Appareillage :**
  - Balance analytique de la précision requise
  - Colonne de chromatographie en verre, de 300mm de longueur, 15 mm de diamètre intérieur, munie de disques en verre fritté et d'un robinet en polytétrafluoroéthylène (PTFE).
  - Evaporateur rotatif sous vide et un bain d'eau à 40°C.
  - Chromatographe liquide à haute performance, comprenant une pompe HPLC, une vanne d'injection avec boucle d'échantillonnage de 10 µl, une colonne à polarité de phase inversée, un intégrateur électronique et un enregistreur de diagramme.
  - Colonnes d'analyse HPLC : colonne de grade à polarité de phase inversée, pouvant séparer le BAP des coextraits, ainsi que précolonne appropriée.

- Détecteur fluorimétrique, avec une longueur d'onde d'émission à 406nm et une longueur d'onde d'excitation à 384nm.
- Miniflacons à bord serti, d'un volume d'environ 1ml munis de septums recouverts d'une couche de téflon et de bouchons en aluminium.
- Pipettes jetables [9].

4. Mode opératoire

➢ **Récupération de l'échantillon :**

- Peser environ 2g d'échantillon de corps gras, à 0.001g près, et la verser dans une fiole jaugée de 10ml dissoudre dans l'éther de pétrole et diluer jusqu'au trait de jauge.
- Remplir la colonne de chromatographie à moitié. Peser rapidement 22g d'alumine dans un bécher et transvaser immédiatement l'alumine dans la colonne en accélérant la décantation de l'alumine en tapotant doucement la colonne.
- Ajouter le sulfate de sodium anhydre (couche de 30mm environ).
- Ouvrir le robinet jusqu'à ce que l'éther de pétrole affleure le sulfate de sodium.
- Placer une fiole de 20ml sous la colonne.
- A l'aide d'une pipette, verser 2ml de la solution des corps gras dans la colonne. Rincer la colonne avec une quantité minime d'éther de pétrole, en laissant la couche pénétrer dans la couche de sulfate de sodium entre les rinçages.
- Eluer la colonne à l'éther de pétrole à un débit d'environ 1ml/min (20 goutes/min), en éliminant les premiers 20ml d'éluat et en recueillant les 60ml d'éluat suivant dans une fiole rodée de 100ml.
- Evaporer l'éluat dans le bain d'eau réglé à 65°C, jusqu'à environ 0.5ml à 1ml et transvaser la solution concentrée dans un miniflacon à bord serti.
- Poursuivre l'évaporation du miniflacon sous un flux modéré d'azote jusqu'à dessiccation presque totale. Rincer la fiole à fond rond avec environ de 1ml d'éther de pétrole et transvaser quantitativement le liquide de rincage dans le miniflacon, en poursuivant l'évaporation sous azote. Répéter le rinçage et transvaser une nouvelle fois dans le miniflacon.
- Poursuivre l'évaporation jusqu'à dessiccation totale.
- Ajouter 80µl de Tétrahydrofurane dans un microvial tout en évitant tout contact du solvant avec le septum.

➢ **Chromatographie liquide à haute performance :**

- Utiliser comme un solvant d'élution un mélange d'acétonitrile et d'eau à 88/12 (V/V).
- Effectuer une purge du système en utilisant un débit de 5ml/min tout en ouvrant la vanne de l'injecteur
- Fermer la vanne et injecter 20 µl
- Eluer à un débit de 1.2ml/min [9].

5. Condition chromatographie (HPLC)

➢ **Quaternary pump :**

Control: column flow 1.2 ml/min

Stoptime 55.0 min
Posttime off
Pressure limits: minimum 0 bar
Maximum 400 bar

- **Fluorescence detector :**

Signal: excitation 292 nm
Emission 410 nm
Time: stoptime as pump
Posttime off
Peakwidth >0.2 min
PMT-Gain 14

- **Autosampler:**

Injection: injection mode needle wash Wash vial 81
Injector volume 20 µl optimization none [9]

II. Validation statistique de la méthode de dosage du benzo à pyrène

Pour valider cette méthode analytique nous avons appliqué les démarches de l'approche de l'erreur totale.

1. Spécificité / sélectivité

Avant la préparation des deux gammes standard d'étalonnage et standard de validation il faut vérifier la spécificité.

Une procédure d'analyse est dite « spécifique » lorsqu'elle permet de garantir que le signal mesure provient seulement de la substance à analyser ou qu'elle permet de mesurer quantitativement un paramètre physicochimique ou un groupement fonctionnel d'une ou de plusieurs substance dans l'échantillon.

La vérification de ce critère se base sur l'analyse de plusieurs échantillons. A partir de leur chromatogrammes obtenus, on peut conclure si la méthode analytique est sélective et spécifique ou non. En effet, on a réalisé une analyse de deux échantillons différents (étalon interne, et l'huile qui contient le benzo à pyrène).

Le pic du benzo à pyrène est bien isolé à un temps de rétention de Tr=17,89 min.

Conclusion : La méthode est bien sélective.

2. Profil d'exactitude

Pour tracer le profil d'exactitude, on réalise des analyses de deux gammes différentes, une gamme d'étalonnage (principe actif seul), et une gamme de validation (principe actif dans l'huile).

2.1 Choix du matériau de validation

Le matériau de validation choisi est le benzo à pyrène.

2.2 Choix du domaine de validation

Le domaine de validation va de 5 à 125 ng/ml

2.3 Plan expérimental

2.3.1 Plan d'étalonnage

Les solutions de standard d'étalonnage ont été analysées pendant trois jours différents (p=3), avec des niveaux de concentration (m=5), chaque niveau étant répété deux fois (n=2), les concentrations introduits sont exprimer en ng/ml.

On a préparé 5 concentrations reparties sur l'intervalle d'étude avec 2 essais par niveau et on a trouvé les résultats suivants :

Tableau 5: gamme d'étalonnage

niveau j	concentration (ng/ml)	Aire		
		série 1	série 2	série 3
1	5	143,32	153,23	149,73
		125,96	139,56	110,97
2	10	287,23	296,78	275,45
		264,34	259,54	299,07
3	50	1479,48	1399,65	1364,68
		1335,56	1490,63	1411,05
4	100	2918,81	2700,32	2798,47
		2750,52	2899,29	2849,19
5	125	3494,6	3009,89	3490,08
		3556,11	3612,68	3259,5

2.3.2 Plan de validation

Les solutions de standard de validation ont été analysées pendant trois jours différents (p=3), avec des niveaux de concentration (m=6), chaque niveau étant répété trois fois (n=3), les concentrations introduits sont exprimer en ng/ml.

Puisque la concentration du benzo à pyrène est inconnue dans l'échantillon on propose la méthode des ajouts dosés.

On a préparé 6 concentrations reparties sur l'intervalle d'étude avec 3 essais par niveau (dopé par la solution étalon) plus le blanc qui comporte l'échantillon seul (sans ajout) et on a trouvé les résultats suivants :

Tableau 6: gamme de validation

niveau	Concentration (ng/ml)	Aire		
		Série 1	Série 2	Série 3
1	5	668,44	531,82	625,63
		535,3	674,7	496,86
		609,94	593,3	567,51
2	10	786,7	649,72	725,7
		648,03	769,03	659,31
		722,67	687,63	729,96
3	50	1909,6	1683,24	1745,58
		1649,9	1930,77	1701,94
		1724,54	1849,37	1772,59
4	75	2439,2275	2228,83	2399,7525
		2297,23	2434,6075	2347,7825
		2371,87	2453,2075	2418,4325
5	100	3218,93	2853,91	3049,37
		2934,86	3209,43	3010,08
		3009,5	3128,03	3080,73
6	125	3444,72	2813,48	3390,98
		3390,45	3572,82	3070,39
		3465,09	3491,42	3141,04
0	sans ajout	550,12	403,59	500,9
		434,34	560,14	410,89
		508,98	478,74	481,54

2.4 Sélection des limites d'acceptation

Pour une huile les limites d'acceptation sont fixées à ±20. Nous voulons que 80% de futures mesures soient à l'intérieur de ces limites (β=80%) avec un risque de (α=20%).

2.5 Choix du modèle d'étalonnage le plus adéquat

Pour but de choisir le modèle le plus adéquat qui est capable de produire une proportion suffisante de futures mesures qui se situeront à l'intérieur de la zone d'acceptabilité, nous avons générés plusieurs modèles reliant la surface de pic à la concentration. La méthode de calcul est la méthode de régression aux moindres carrés. Un modèle est calculé pour chaque série.

Le tableau suivant regroupe les résultats des calcules statistiques pour tous les modèles générés.

Tableau 7: coefficients des différents modèles d'étalonnage

modèle	Série	a_0	a_1	a_2	R^2
linéaire simple	1	-6,6	28,313	-	99,85%
	2	39,5	26,84	-	98,54%
	3	13	27,376	-	99,72%
linéaire pondérée 1/X	1	-7,1	28,323	-	99,88%
	2	11,5	27,322	-	99,29%
	3	-0,8	27,615	-	99,80%
linéaire pondérée 1/X²	1	-7,03	28,316	-	99,67%
	2	7,59	27,584	-	99,23%
	3	-6,3	27,984	-	99,04%
linéaire 0-max	1	0	28,45	-	100%
	2	0	28,9	-	100%
	3	0	26,08	-	100%
racine carrée	1	-0,324	5,3473	-	99,90%
	2	0,7	5,162	-	99,38%
	3	0,053	5,2465	-	99,83%
racine carrée pondérée 1/X	1	-0,358	5,3533	-	99,84%
	2	0,386	5,213	-	99,63%
	3	-0,279	5,307	-	99,51%
logarithmique	1	1,4222	1,0147	-	99,89%
	2	1,4731	0,983	-	99,73%
	3	1,4245	1,0096	-	99,62%
logarithmique pondérée 1/X	1	1,4178	1,0186	-	99,57%
	2	1,4756	0,9802	-	99,51%
	3	1,3983	1,033	-	98,00%
quadratique	1	-9,8	28,56	-0,0019	99,85%
	2	-29	32,05	-0,0413	98,73%
	3	-22,2	30,05	-0,0212	99,76%
quadratique pondérée 1/X	1	-7,6	28,39	-0,0006	99,88%
	2	-13,5	30,86	-0,0319	99,40%
	3	-13,2	29,36	-0,0157	99,40%

A partir des données de plan de validation et en utilisant les paramètres des différents modèles d'étalonnage, on calcule les concentrations retrouvés par prédiction inverse, et on soustraire le blanc (échantillon seul) de la concentration prédite (échantillon + étalon) d'après la relation suivante : $C_{\text{récupérer}} = C_{\text{prédite}} - C_{\text{blanc}}$

Ces concentrations servent à calculer les valeurs des biais relatifs, les recouvrements, les coefficients de variation de répétabilité et de fidélité intermédiaire des différents niveaux de concentration. Ces paramètres sont nécessaires pour établir le profil d'exactitude.

Les figures suivantes présentent les profils d'exactitude des différents modèles d'étalonnage :

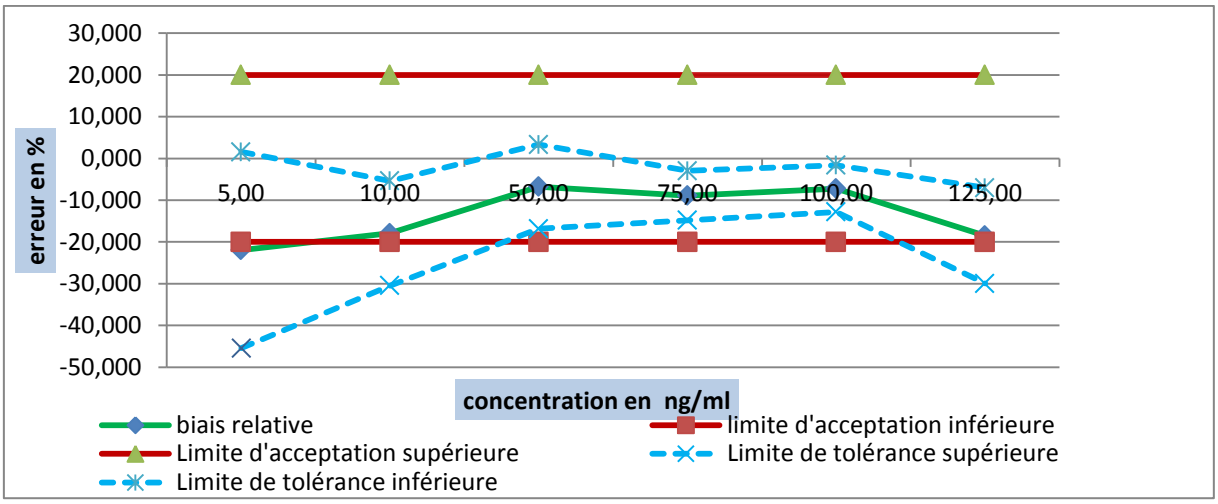


Figure 7: profil d'exactitude pour un modèle linéaire simple

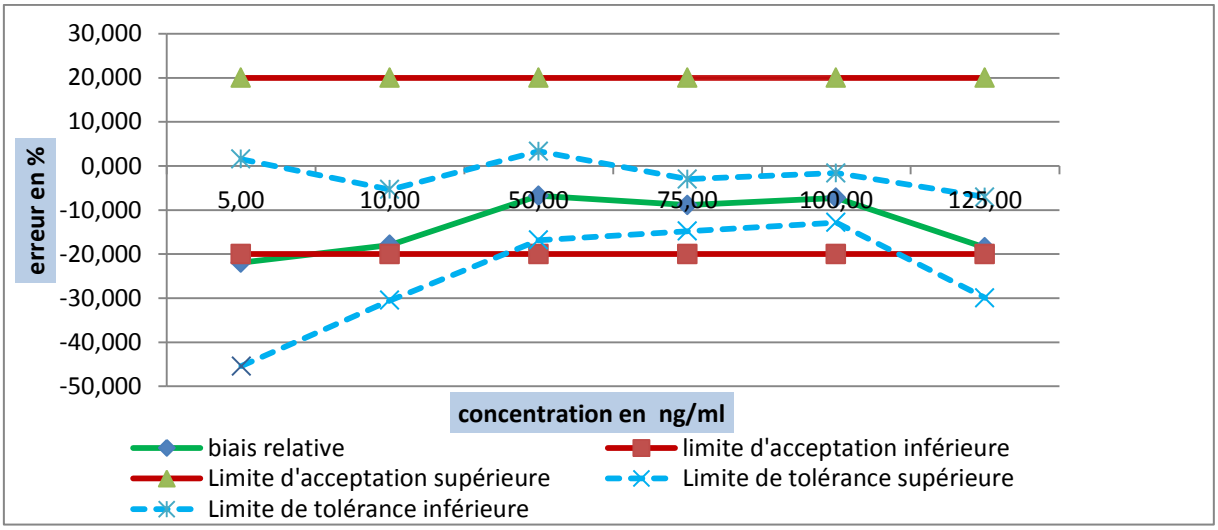


Figure 8: profil d'exactitude pour un modèle linéaire simple pondéré 1/X

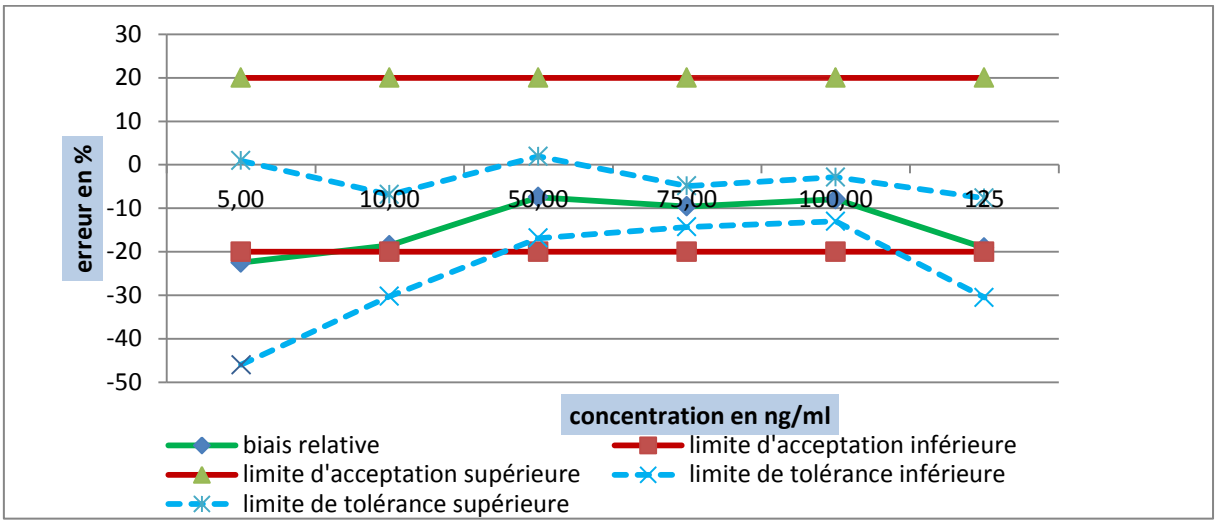


Figure 9: profil d'exactitude pour un modèle linéaire simple pondéré $1/X^2$

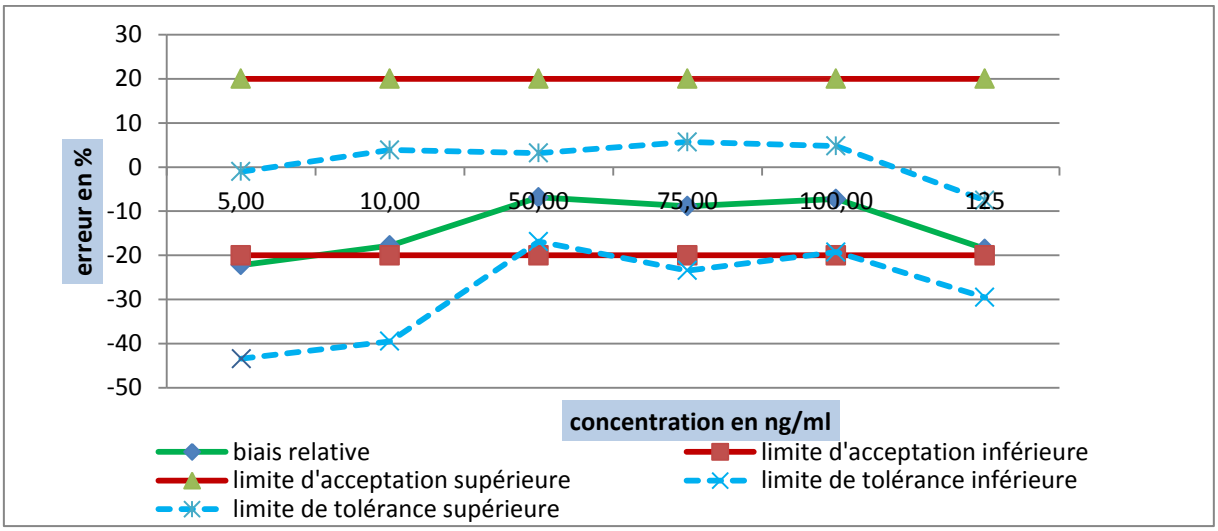


Figure 10: profil d'exactitude pour un modèle linéaire 0 – max

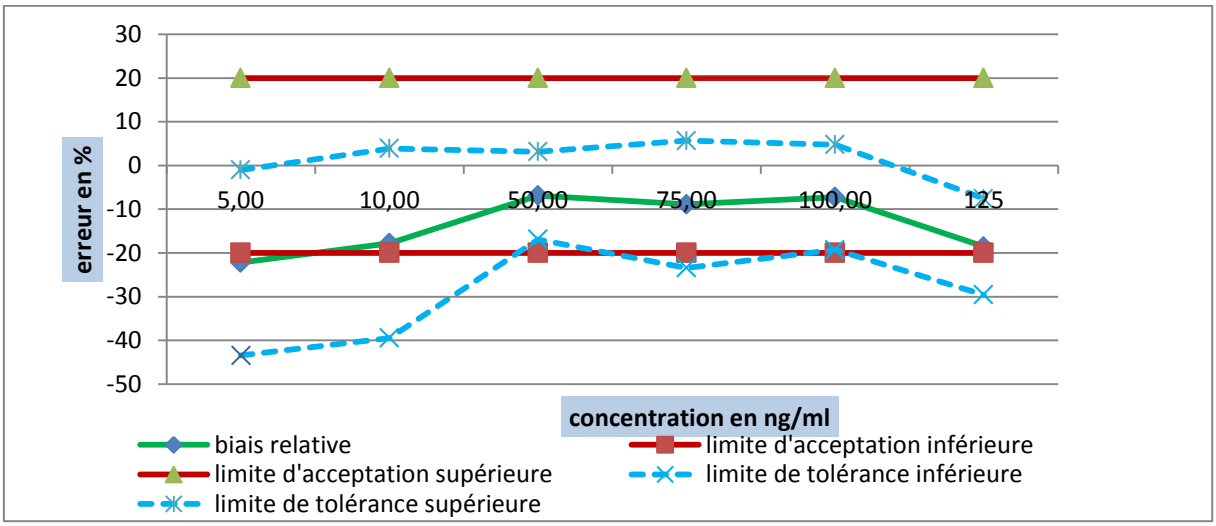


Figure 11: profil d'exactitude pour un modèle racine carrée

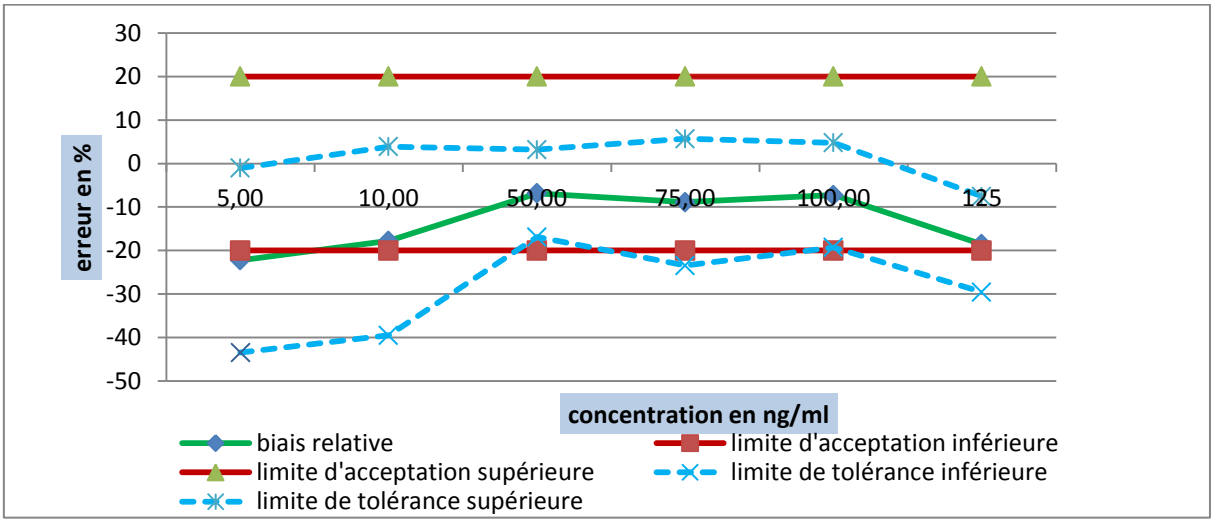


Figure 12: profil d'exactitude pour un modèle racine carrée pondéré 1/X

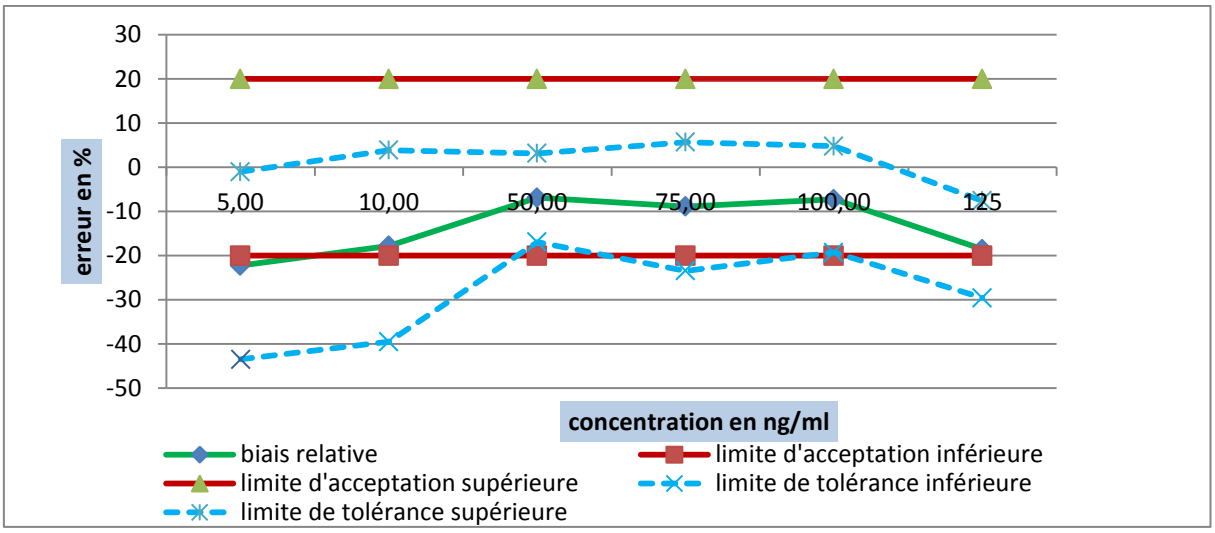


Figure 13: profil d'exactitude pour un modèle logarithmique

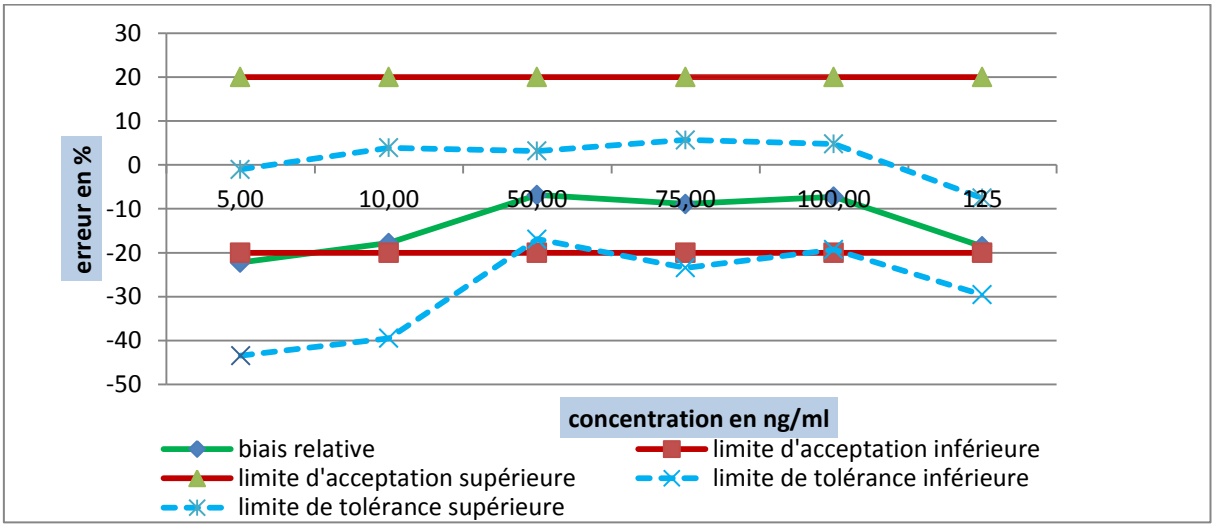


Figure 14 : profil d'exactitude pour un modèle logarithmique pondéré 1/X

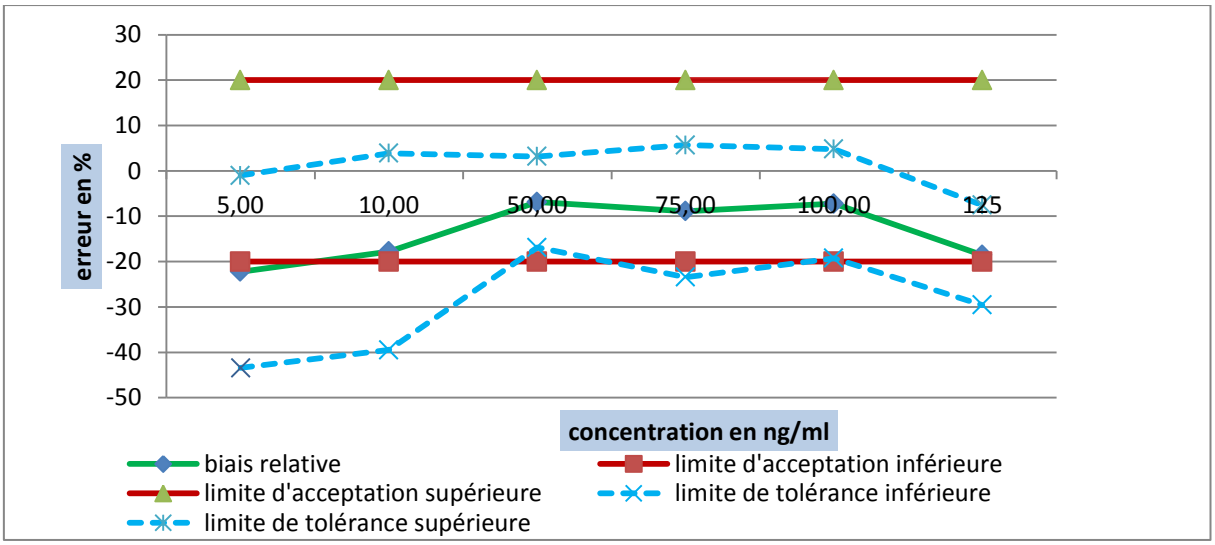


Figure 15: profil d'exactitude pour un modèle quadratique

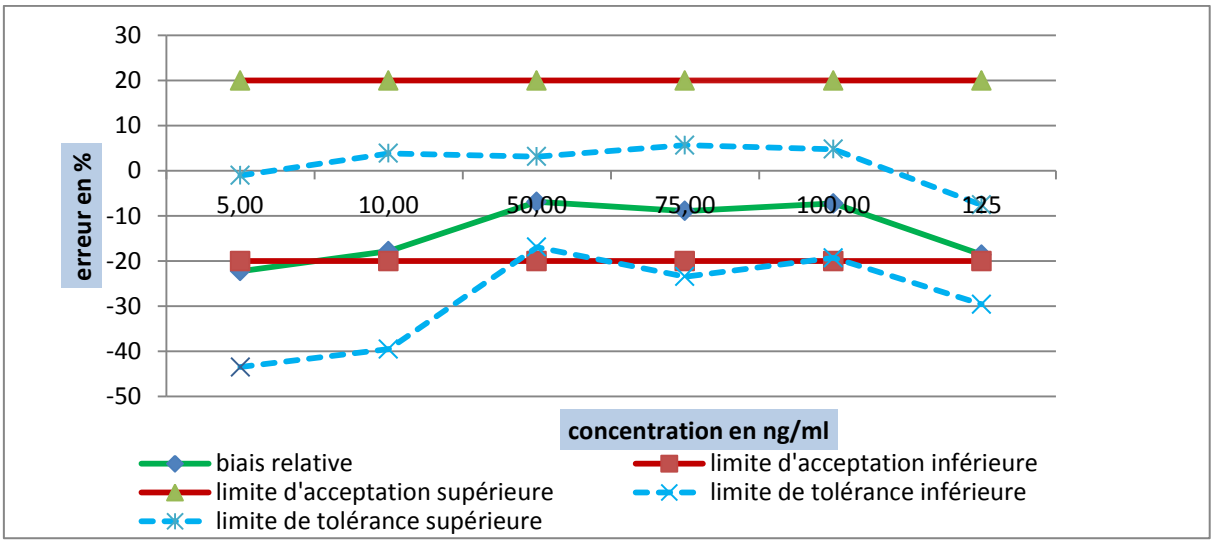


Figure 16: profil d'exactitude pour un modèle quadratique pondéré 1/X

Le choix du profil d'exactitude le plus adéquat est basé sur l'objectif de trouver des recouvrements par niveau, les plus proches possibles à 100% et des bais plus proches à zéro, avec un intervalle de tolérance le plus étroit et situé à l'intérieure des limites d'acceptabilité, pour avoir une méthode valide dans l'intervalle de concentration étudiée.

Après avoir examiné soigneusement les profils des différents modèles, nous avons sélectionné trois modèles les plus adéquats qui répondent à nos objectifs :

- ✓ Modèle linéaire simple
- ✓ Modèle linéaire simple pondéré 1/X
- ✓ Modèle linéaire simple pondéré $1/X^2$

Parmi ces trois modèles, le modèle linéaire simple est le plus adéquat.

On constate que dans l'intervalle de concentration (5-125 ng/ml) le profil d'exactitude du modèle linéaire simple, présente une sous-estimation du biais relatif correspond à un effet de matrice non contrôlé, il est alors possible d'appliquer un facteur de correction pour corriger ce biais.

Ce facteur de correction est calculé en traçant les concentrations retrouvées en fonction des concentrations introduites. Il est égal à l'inverse de la pente de la droite obtenue.

$$FC = \frac{1}{pente} = \frac{1}{0{,}864} = 1{,}1574$$

On calcul à nouveau tous les paramètres nécessaires pour construire le profil d'exactitude final, en tenant compte du facteur de correction. La correction s'effectue sur les concentrations retrouvées par prédiction inverse, en multipliant la valeur de chaque concentration par le FC.

2.6 Calcul des critères de la validation

2.6.1 Calcul des concentrations retrouvées après correction

Tableau 8: concentrations retrouvées après correction du modèle linéaire simple

concentration prédite			concentration prédite corrigé		
Série 1	Série 2	Série 3	série 1	Série2	série3
4,1790	4,7776	4,5562	4,8368	5,5296	5,2734
3,5659	4,2683	3,1403	4,1271	4,9401	3,6347
3,5659	4,2683	3,1403	4,1271	4,9401	3,6347
8,3559	9,1703	8,2116	9,6712	10,6137	9,5041
7,5474	7,7828	9,0744	8,7354	9,0079	10,5027
7,5474	7,7828	9,0744	8,7354	9,0079	10,5027
48,0161	47,6770	45,4661	55,5742	55,1817	52,6228
42,9329	51,0667	47,1599	49,6909	59,1050	54,5832
42,9329	51,0667	47,1599	49,6909	59,1050	54,5832
66,7220	68,0045	69,3618	77,2245	78,7089	80,2799
65,7963	69,8383	70,7514	76,1531	80,8314	81,8882
65,7963	73,5641	70,7514	76,1531	85,1436	81,8882
94,2609	91,2936	93,0914	109,0983	105,6639	107,7447
88,3170	98,7068	94,9441	102,2188	114,2440	109,8890
88,3170	98,7068	94,9441	102,2188	114,2440	109,8890
102,2357	89,7873	105,5698	118,3284	103,9204	122,1873
104,4082	112,2459	97,1471	120,8428	129,9142	112,4388
104,4082	112,2459	97,1471	120,8428	129,9142	112,4388

2.6.2 Calcul de la justesse

La justesse peut être calculée à partir des données du tableau des concentrations retrouvées après correction sous diverses formes, comme un biais moyen absolu ou relatif.

Tableau 9: calcul de la justesse pour un modèle linéaire simple

niveau	Concentration (ng/ml)	concentration prédite corrigé			Z moy	biais abs ng/ml	Biais %	recouvrement %
		série 1	Série2	série3				
1	5	4,8368	5,5296	5,2734	4,5604	-0,4396	-8,7920	91,2080
		4,1271	4,9401	3,6347				
		4,1271	4,9401	3,6347				
2	10	9,6712	10,6137	9,5041	9,5868	-0,4132	-4,1321	95,8679
		8,7354	9,0079	10,5027				
		8,7354	9,0079	10,5027				
3	50	55,5742	55,1817	52,6228	54,4597	4,4597	8,9193	108,9193
		49,6909	59,1050	54,5832				
		49,6909	59,1050	54,5832				

4	75	77,2245	78,7089	80,2799	79,8079	4,8079	6,4105	106,4105
		76,1531	80,8314	81,8882				
		76,1531	85,1436	81,8882				
5	100	109,0983	105,6639	107,7447	108,3567	8,3567	8,3567	108,3567
		102,2188	114,2440	109,8890				
		102,2188	114,2440	109,8890				
6	125	118,3284	103,9204	122,1873	118,9809	-6,0191	-4,8153	95,1847
		120,8428	129,9142	112,4388				
		120,8428	129,9142	112,4388				

2.6.3 Calcul de la fidélité

Le calcul de fidélité à chaque niveau de concentration est donnée le tableau suivant :

Tableau 10: Critères de fidélité pour les six niveaux de concentration

niveau	Répétabilité			Fidélité intermédiaire	
	S rép	CV rép %	SB²	S fidélité int	CV fidélité int %
1	0,6268	13,7455	0,1264	0,7206	15,8022
2	0,7033	7,3361	0,1516	0,8039	8,3851
3	2,4461	4,4915	7,6571	3,6933	6,7817
4	1,9997	2,5056	6,8338	3,2913	4,1240
5	3,7349	3,4468	7,6575	4,6483	4,2898
6	9,2918	7,8095	0,0000	9,2918	7,8095

2.6.4 Calcul des intervalles de tolérances

Les tableaux suivants résument les étapes et résultats des calculs des intervalles de tolérances:

Tableau 11: calcule des intervalles de tolérances

niveau	Concentration	Rj	Bj	ddl	beta	Qt	T(minitab)	K	Lj	Uj
1	5	0,322	0,820	6,053	0,8	0,131	1,438	1,552	-33,321	15,737
2	10	0,306	0,825	6,123	0,8	0,131	1,436	1,549	-17,119	8,855
3	50	1,280	0,686	3,780	0,8	0,137	1,551	1,724	-2,774	20,612
4	75	1,709	0,665	3,398	0,8	0,137	1,587	1,775	-0,911	13,732
5	100	0,549	0,765	5,179	0,8	0,132	1,468	1,601	1,487	15,226
6	125	0	1	7,714	0,8	0,130	1,401	1,477	-16,348	6,718

Tableau 12: les intervalles de tolérances

niveau	Concentration	B%	Lj	Uj	Lim acc inf	Lim acc sup
1	5	-8,792	-33,321	15,737	-20	20
2	10	-4,132	-17,119	8,855	-20	20
3	50	8,919	-2,774	20,612	-20	20
4	75	6,411	-0,911	13,732	-20	20
5	100	8,357	1,487	15,226	-20	20
6	125	-4,815	-16,348	6,718	-20	20

2.7 Profil d'exactitude après correction

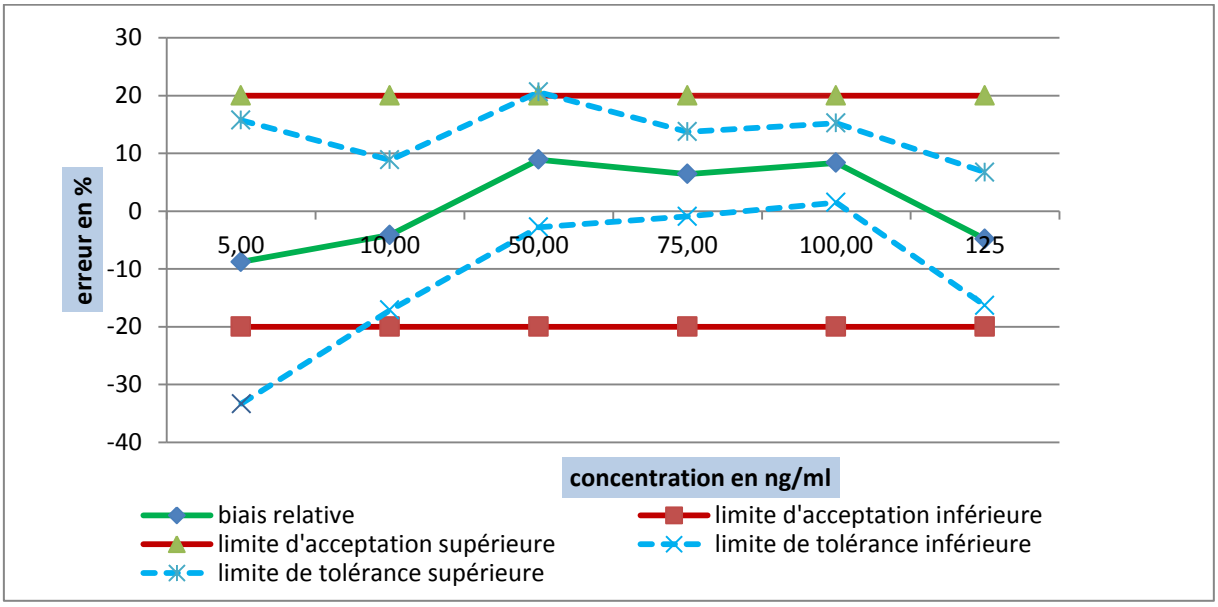


Figure 17: profil d'exactitude corrigé avec LA ±20%

Conclusion : la méthode est validée que dans l'intervalle de concentration 10-125 ng/ml

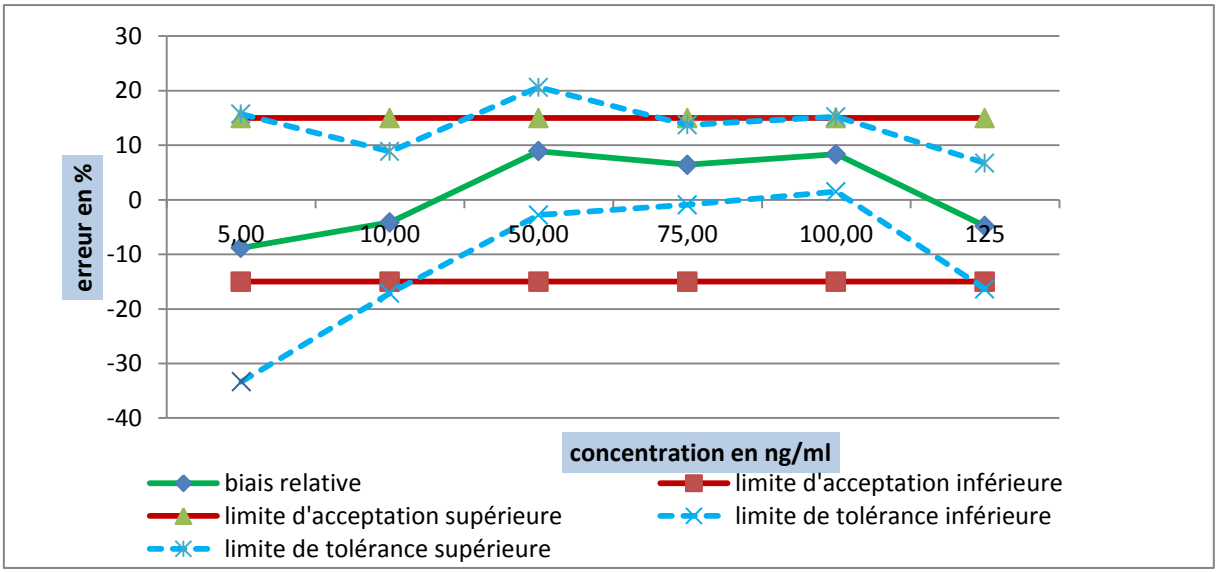


Figure 18: profil d'exactitude corrigé avec LA ±15%

Conclusion : la méthode est validée que dans l'intervalle de concentration 75-125 ng/ml

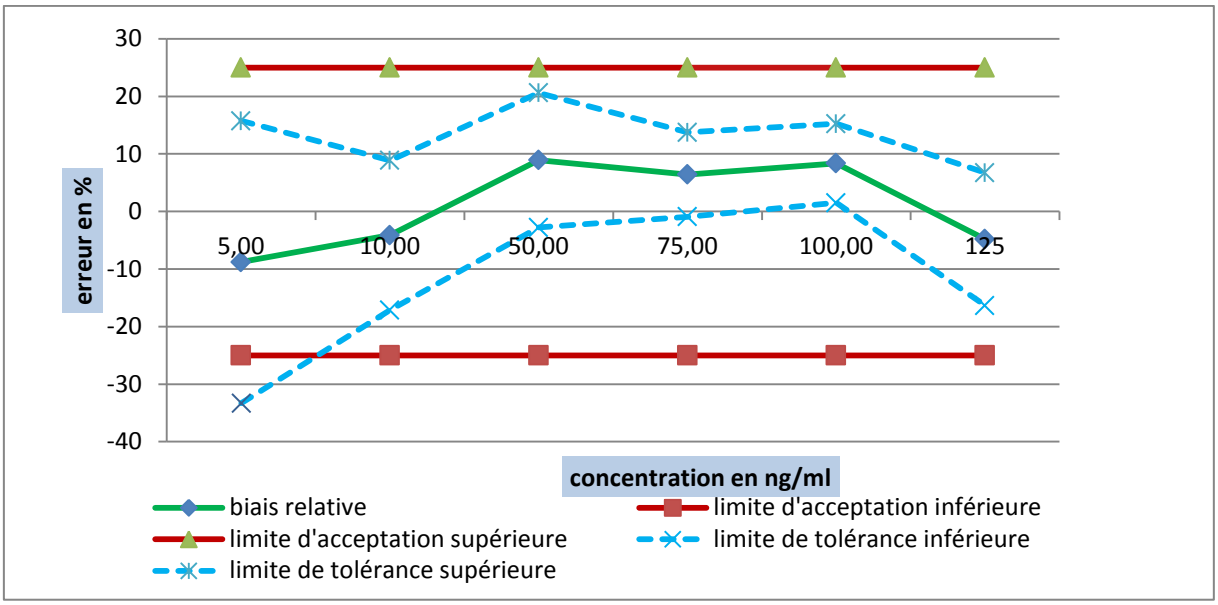


Figure 19: profil d'exactitude corrigé avec LA ±25%

Conclusion : la méthode est validée que dans l'intervalle de concentration 10-125 ng/ml

3. Calcul de la limite de quantification et de détection

On suivant la méthode de la norme XPT 90 :

On a $Y_{LD} = a_0 + 3\ S_{a0} = a_0 + a_1 \times X_{LD}$

Donc la valeur de la limite de détection est :

$$XLD = \frac{3 \times Sa0}{a1}$$

$$XLQ = \frac{10 \times Sa0}{a1}$$

Soit les résultats obtenus suivants :

Tableau 13: données de calcul de la limite de quantification et de détection

Concentration (ng/ml)	aire
5	118,32
5	100,96
5	114,56
10	236,58
10	213,69
10	208,89
50	1359,48
50	1215,56

50	1370,63
75	1889,1075
75	1862,89
75	1974,4675
100	2668,81
100	2500,52
100	2649,29
125	2894,6
125	2956,11
125	3012,68

Pour calculer les coefficients a_0 et a_1, on trace la droite de régression reliant l'aire à la concentration.

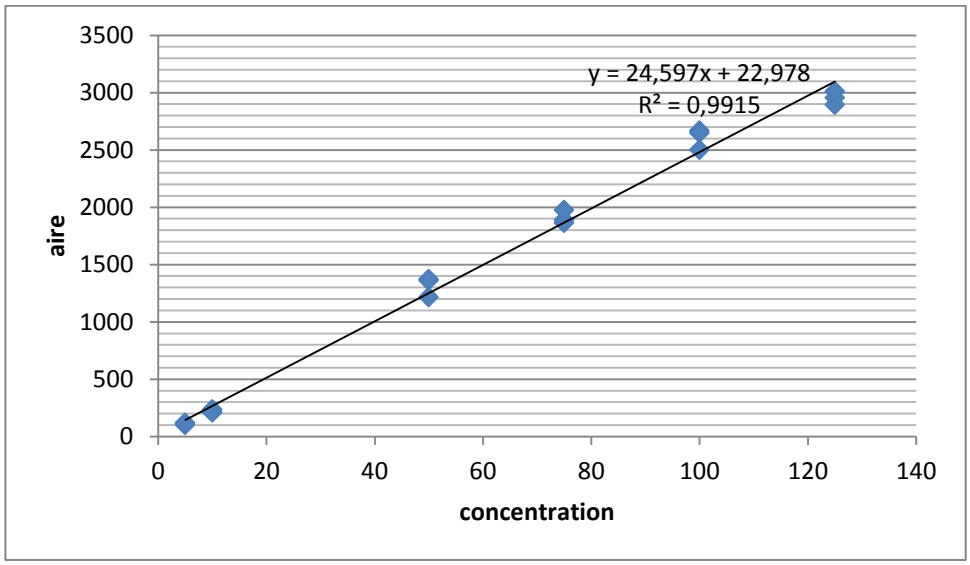


Figure 20: droite de régression aire = f (concentration)

Donc :

a_0	a_1	S_{a0}
22,9779329	24,5968422	42,7288034

X_{LD} = 5,21 ng/ml et **X_{LQ} = 17,37 ng/ml**

Conclusion :

La plus petite quantité à examiner dans l'échantillon pouvant être détectée dans les conditions expérimentales décrites de la procédure est égale à **5,21 ng/ml**

La plus petite quantité de l'analyte dans l'échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une exactitude définie est égale à **17,37 ng/ml**

Conclusion

L'objectif de ce stage est d'étudier la validation de la méthode de dosage du benzo à pyrène par chromatographie liquide à haute performance à polarité de phase inversée au sein du laboratoire de la société SIOF. Nous avons commencés dans un premier temps par une étude bibliographique concernant l'huile et la substance étudiée et l'approche adoptée au cours de la validation de la méthode d'analyse.

Dans la partie pratique, nous avons pu démontrer dans un premier temps la sélectivité de la méthode d'analyse en se basant sur les chromatogrammes obtenus. Ensuite, après réalisation des expériences sur une gamme d'étalonnage et une gamme de validation, on a calculé les différents critères statistiques des différents modèles générés pour pouvoir construire les profils d'exactitude.

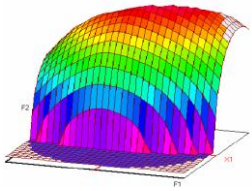
L'analyse des profils d'exactitude nous a permis de sélectionner le modèle linéaire simple qui satisfait nos besoins.

L'existence d'une sous-estimation des biais relatifs, nous a exigés d'introduire un facteur de correction pour corriger la justesse de la méthode dans l'intervalle de concentration étudié. Le profil d'exactitude final obtenu caractérisant la méthode est validé dans l'intervalle de concentration 10 à 125 ng/ml. Tout en gardant à l'esprit qu'on espère avoir 80% des futurs résultats de la méthode qui seront inclus entre les limites d'acceptation fixées à ±20 % avec un risque de 20%.

Références

1) https://fr.wikipedia.org/wiki/Grignon_d%27olive
2) https://www.dissertationsenligne.com/Sante-et-Culture/Presentation-De-La-Societe-Industrielle-Oleicole-De-Fes/43036.html
3) NM ISO 660 , NM ISO 662 , NM ISO 663 , CEE N° 2568/91
4) https://fr.wikipedia.org/wiki/Benzopyr%C3%A8ne
5) http://www.farm.ucl.ac.be/tpao/tpintegres/HPLC/documents/chapitre4.pdf
6) http://biotech.spip.ac-rouen.fr/IMG/article_PDF/HPLC-Principe-et-appareillage_a9.pdf
7) ICH-Q2A / ICH-Q2B:Validation of analytical procedures :definitions and terminology / methodology (1995)
8) Validation des méthodes d'analyse quantitatives au moyen du profil d'exactitude, Max FEINBERG.Publication : 10/12/2012
9) ISO 15302 :1998

Université Sidi Mohammed Ben Abdellah
Faculté des Sciences et Techniques



Master ST CAC Ageq

Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

Nom et prénom: TAJRI KHADIJA

Année Universitaire : 2017/2018

Titre: Validation analytique par l'approche de l'erreur totale d'une méthode de dosage du benzo à pyrène par chromatographie liquide à haute performance à polarité de phase inversée.

Résumé

L'huile de grignon nécessite le passage obligatoire par le traitement de raffinage qui permis d'une part de préserver les substances nobles comme les antioxydants et d'autre part d'éliminer les éléments mineurs indésirables tel que le benzo à pyrène qui est un composé très cancérogène.

Le dosage de ce composé est effectué par Chromatographie liquide à haute performance à polarité de phase inversée.

La validation de la méthode d'analyse est effectué en utilisant l'approche de l'erreur totale qui consiste à combiner les estimés de la justesse (Biais %) et de la fidélité (CV%) pour calculer les deux intervalles de tolérance à une attente de 80% des futurs mesures soient incluses dans les limites d'acceptation de ±20% dans l'intervalle de concentration (5 à 125 ng/l).

Les résultats obtenus montrent que la méthode est validée que dans l'intervalle de concentration 10-125 ng/ml.

Mots clés: validation, erreur totale, benzo à pyrène, HPLC.