



Article original

Étude et Validation d'une méthode de dosage des orthodiphénols dans l'huile d'olive selon la norme française NF T 90-210 Mai 2009

Study and Validation of Orthodiphenols in Olive Oil According to French Standard NF T 90-210 May 2009

Aziz Amine¹, Jihane Mandli¹, Malika Haddam^{1,2}

¹Laboratoire des analyses chimiques et biocapteurs, Université Hassan II Casablanca-Mohammedia, Faculté des sciences et techniques – Mohammedia

²Lesieur Cristal Casablanca, Maroc

Résumé :

Plusieurs méthodes physico-chimiques ont été adoptées pour la détermination des orthodiphénols dans l'huile d'olive mais elles n'ont jamais été sujet d'une validation normalisée. Le présent travail a pour objectif la validation d'une méthode d'extraction des orthodiphénols dans l'huile d'olive ainsi que leur dosage après réaction avec molybdate et mesure d'absorbance selon la Norme Française NF 90-210 Mai 2009, basée sur l'étude de la fonction d'étalonnage. Les résultats obtenus déclarent la méthode valide et fiable pour la détermination des orthodiphénols dans l'huile d'olive à $\lambda=370$ nm. Les résultats préliminaires de la validation à $\lambda=420$ nm sont présentés et interprétés.

MOTS CLÉS : Validation; NF T 90-210, huile d'olive vierge; orthodiphénols; molybdate; absorbance.

Abstract:

Several physical and chemical methods were adopted for the determination of orthodiphenols in olive oil but they have never been subject to validation. This work aims to validate a method for extracting orthodiphenols in olive oil and their determination after reaction with molybdate and absorbance measurement according to French standard NF 90-210 May 2009, based on the study of the calibration function. The results reported valid and reliable method for the determination of orthodiphenols in olive oil at $\lambda = 370$ nm. Preliminary results of the validation to $\lambda = 420$ nm are presented and interpreted.

KEYWORDS: Validation, NF T 90-210, virgin olive oil; orthodiphenols; molybdate; absorbance.

Introduction

L'huile d'olive occupe une place importante dans l'alimentation traditionnelle [1] des pays méditerranéens. Elle est dotée d'une grande richesse en composés phénoliques qui lui confèrent ses qualités organoleptiques et nutritionnelles [2].

L'extrait de l'huile d'olive hydrophile contient un grand nombre des composés phénoliques comprenant; les phénols simples, les lignanes [3.4], qui présentent des propriétés antioxydantes [5.6]. L'activité antioxydante la plus élevée est



généralement attribuée à ceux ayant des structures o-diphénoliques [7]. Par ailleurs, les polyphénols importants tels que l'oleuropéine ont une structure o-diphénolique et sont des marqueurs importants pour le stockage et la préservation des produits oléagineux [8]. En fait, les o-diphénols sont facilement oxydés au cours des longues durées ce qui sera à l'origine de la mauvaise conservation de l'huile d'olive. Les o-diphénols ont été également signalés à jouer un rôle important dans la protection contre les dommages du stress oxydatif du système biologique [9]. Le développement des méthodes analytiques pour la détection sélective de la fraction antioxydante est rendu important pour la valorisation alimentaire. Différentes études ont été rapportées dans la littérature pour le développement des méthodes d'analyse, d'isolement et d'identification des polyphénols dans les olives et les huiles d'olives [10-16].

Ainsi la détermination des critères physico-chimiques recommandés par les normes nationales et internationales n'est plus suffisante pour évaluer la qualité d'une huile d'olive, le dosage de la fraction phénolique devient de plus en plus important bien que non réglementaire à ce jour.

Toutefois, plusieurs études ont rapporté que parmi les composés phénoliques, ce sont les orthodiphénols, notamment l'hydroxytyrosol et l'acide caféique, qui sont les antioxydants les plus puissants dans une huile d'olive [17].

Diverses méthodes ont été adoptées pour le dosage des orthodiphénols ; mais elles sont spécifiquement peu nombreuses. On peut citer, La chromatographie en phase liquide à haute performance HPLC au moyen d'un révélateur UV [18], l'électrochimie basée sur l'oxydation des o-diphénols en présence du molybdate de Na sur électrode à base de carbone [7] et la méthode colorimétrique qui est basée soit sur la nitration des o-, m- et p-diphénols avec le nitrite [19,20], soit sur la formation d'un complexe spécifique entre les o diphénols et les ions molybdate [21,22]. Les protocoles analytiques pour le dosage colorimétrique des orthodiphénols ont été

déterminés pour la première fois par Pridham, J.B (1963) [23] qui a mis en évidence la réaction qui s'établie entre les ions molybdate et les o-diphénols, suivie par R. N. Soni et M. Bartusek (1971) [22] qui ont étudié les différentes formes des complexes formés entre le molybdate et les orthodiphénols tels que (l'acide férulique et l'acide caféique [24-7]) pour former $[\text{MoO}_2\text{L}_2]^2$. Vient ensuite Gutfinger (1981) [25] qui a appliqué cette méthode spectrophotométrique à λ 350 nm pour le dosage des o-diphénols dans l'huile d'olive [26]. A ce jour, cette méthode n'a jamais été sujet d'une validation normalisée.

Le présent travail a pour objectif la validation d'une méthode d'extraction des orthodiphénols dans l'huile d'olive ainsi que leur dosage par spectrophotométrie selon la Norme Française NF 90-210 Mai 2009 [27], basée sur l'étude de la fonction d'étalonnage; la limite de quantification et de détection; l'étude des rendements et l'exactitude. Cette norme fait suite à l'enquête relative à la révision de la norme XP T 90-210 (1999) pour la validation des méthodes d'analyse physico-chimiques appliquées au domaine de l'eau. Mais elle peut être aussi un sujet de différents domaines comme celui des produits de la pêche [28]. Pour notre étude on est intéressé au domaine oléicole, spécifiquement les huiles d'olive.

Matériel et méthodes

I. Matériel et Réactifs

Spectrophotomètre, HACH LANGE, DR 2800, Allemagne ;

Cuvette cylindrique en verre, d'un diamètre de 2.5 cm, et d'un volume de 25 mL;

Ampoule à décantation de 150 mL.

Tous les réactifs utilisés dans ce travail sont de qualité analytique.

II. Procédures

II.1. Extraction des phénols

Pour extraire les orthodiphénols nous avons utilisé la méthode suivante :

25 g de l'huile d'olive extra vierge sont dissoutes dans 25 mL d'Hexane, dans une ampoule à décantation, le mélange est agité vigoureusement



pendant 15 minutes, puis on ajoute 3*15 mL de la solution méthanolique (méthanol/eau; 3/2), la phase méthanolique est récupérée dans une fiole jaugée de 50 mL puis compléter avec de l'eau distillée.


II.2. Dosage des orthodiphénols selon la méthode UV

A 20 mL de la solution extraite sont ajoutés 5 mL d'une solution de molybdate d'ammonium dihydraté 5%, qui nécessite un blanc réactif, ensuite sur 20 mL de solution extraite on ajoute 5 mL d'une solution à base du méthanol/eau (v/v). Le mélange est agité vigoureusement et après 15 minutes, l'absorbance des solutions phénoliques est mesurée à 370 nm.

La droite d'étalonnage est obtenue en utilisant une solution mère d'acide caféique à 5 mg/50 mL, diluée 10 fois dans l'eau distillée et utilisée pour préparer les étalons. A chaque niveau de concentration en acide caféique (n=5) est ajouté 5 mL d'une solution de molybdate d'ammonium dihydraté 5%, puis on complète avec une solution méthanolique (v/v) jusqu'au trait de la fiole jaugée de 25 mL.

L'absorbance des étalons de chaque niveau de concentration, est mesurée à 370 nm contre un blanc réactif (méthanol/eau, molybdate). Par contre l'absorbance des extraits est mesurée contre un blanc échantillon (méthanol/eau, extrait).

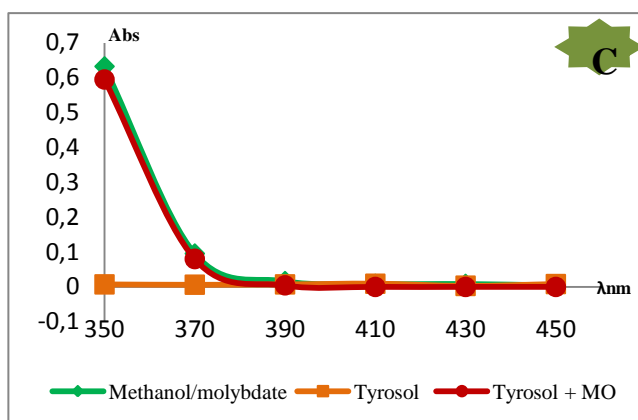
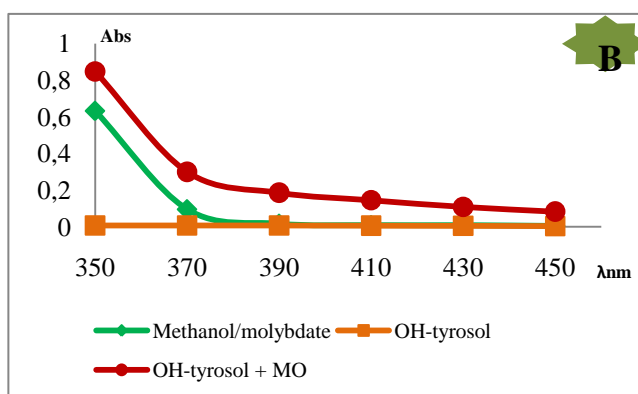
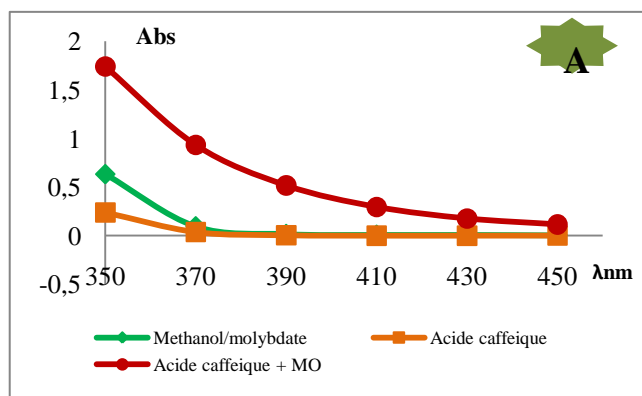
Pour fortifier les échantillons, 5 mL de solution standard d'acide caféique (0.5 mg/50 mL) sont ajoutés à 25 g de l'huile d'olive lampante, qui date depuis 2002, et qui ne contient pas des orthophénols, sont dissoutes dans 25 mL d'Hexane, dans une ampoule à décantation, le mélange est agité vigoureusement pendant 30 minutes, puis on ajoute 3*15 mL de la solution méthanolique (méthanol/eau; 3/2), la phase méthanolique est récupérée dans une fiole jaugée de 50 mL puis compléter avec de l'eau distillée.

Tous les calculs statistiques (les grandeurs retrouvées, la moyenne des biais, l'écart type des biais,...) sont réalisés en utilisant Excel  de 2007 qui est une marque commerciale de Microsoft.

III. Résultats et discussions

I. Etude de spectre d'absorbance du complexe o diphénols -molybdate

Les spectres d'absorbance de l'acide caféique, de l'hydroxytyrosol et du tyrosol, ont été collectés à l'aide d'un spectrophotomètre à différentes longueurs d'ondes allant de 350 à 450 nm (figure 1).



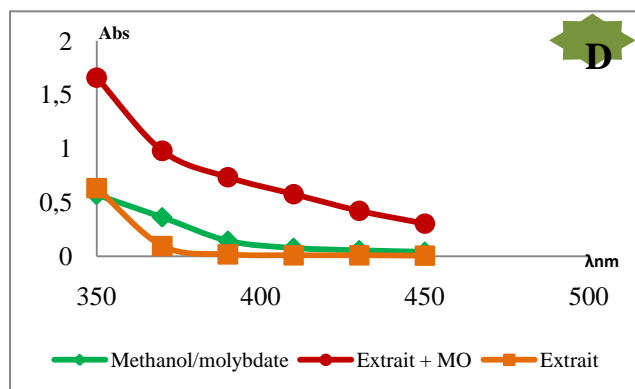


Figure 1: Absorbance de l'acide caféique (figure 1; A), de l'hydroxytyrosol (figure 1; B), de tyrosol (figure 1; C) et de l'extrait de l'huile d'olive extra vierge (figure 1; D) en présence et en absence de molybdate d'ammonium à différentes longueurs d'ondes

L'acide caféique (figure 1; A) a affiché un large spectre, et une absorbance relativement intense quand il est additionné de molybdate d'ammonium. Cependant, en absence du molybdate d'ammonium, on a constaté que l'absorbance du spectre a sensiblement diminué.

D'après cette figure, on observe que le réactif molybdate seul absorbe à 350 nm, ce qui nous a permis de déduire que cette longueur d'onde est à éviter. L'absorbance du molybdate d'ammonium, commence à s'annuler relativement vite à partir de 370 nm, grâce à cette constatation nous avons décidé de travailler à une longueur d'onde supérieure ou égale à 370 nm. La même interprétation est également valable pour l'hydroxytyrosol (figure 1; B).

Cependant, le tyrosol (figure 1; C) n'a montré aucune absorbance quand il est additionné du molybdate d'ammonium, c'est pour cette raison que la figure 1; C indique qu'il n'y a aucune réaction qui peut avoir lieu entre le molybdate et le tyrosol. D'après cette figure, on constate que les phénols, spécifiquement le tyrosol, n'absorbent pas dans la gamme étudiée de longueur d'ondes (350 à 450 nm). Ce qui justifie que la méthode spectrophotométrique en utilisant le réactif du molybdate semblait être spécifique pour le dosage des orthodiphénols.

L'absorbance de l'extrait (figure 1; D) peut être déterminée dans toutes les longueurs d'ondes du spectre allant de 350 à 450 nm. L'extrait additionné du molybdate d'ammonium a affiché une absorbance entre 410 et 430 nm, qui correspond à une coloration jaune plus ou moins intense.

On observe que plus on va vers les faibles longueurs d'ondes, l'absorbance de l'extrait ainsi que celle des orthodiphénols devient plus élevée.

Cependant, il est déconseillé d'effectuer la mesure de l'extrait à 370 nm avec un blanc réactif seulement. On doit tenir compte dans les calculs de la valeur du blanc extrait dont l'absorbance ne devient négligeable qu'à partir de 410 nm, d'où l'intérêt d'effectuer le dosage à cette longueur d'onde. Toutefois les sensibilités sont faibles par rapport à celles mesurées à 370 nm. En effet nos résultats montrent qu'une absorbance de 0.100 de l'extrait à 370 nm correspond à 0.82 mg/L en acide caféique, par contre l'absorbance de 0.100 en extrait à 420 nm correspond à 1.95 mg/L en acide caféique. Donc on peut proposer de travailler avec un simple colorimètre équipé de filtre d'environ 420 nm pour effectuer le dosage des extraits riches en orthodiphénols. Par contre, pour les échantillons très pauvres en o-diphénols le choix de $\lambda=370$ nm est vivement recommandé.

II. Protocole d'évaluation des performances de la méthode de dosage à $\lambda=370$ nm

Les orthodiphénols forment un groupe de composés qui se différencient, par l'enchaînement des noyaux aromatiques, par le nombre et par la position des fonctions hydroxyles, ainsi que par la présence de substituant non phénolique de nature diverse. L'absorbance des orthodiphénols à 370 nm, a montré que ces composés sont dotés d'une grande sensibilité (Figure 2), en comparaison avec les autres composés phénoliques simples, ces composés ont été préparés à des concentrations allant de 4 mg/L à 80 mg/L.

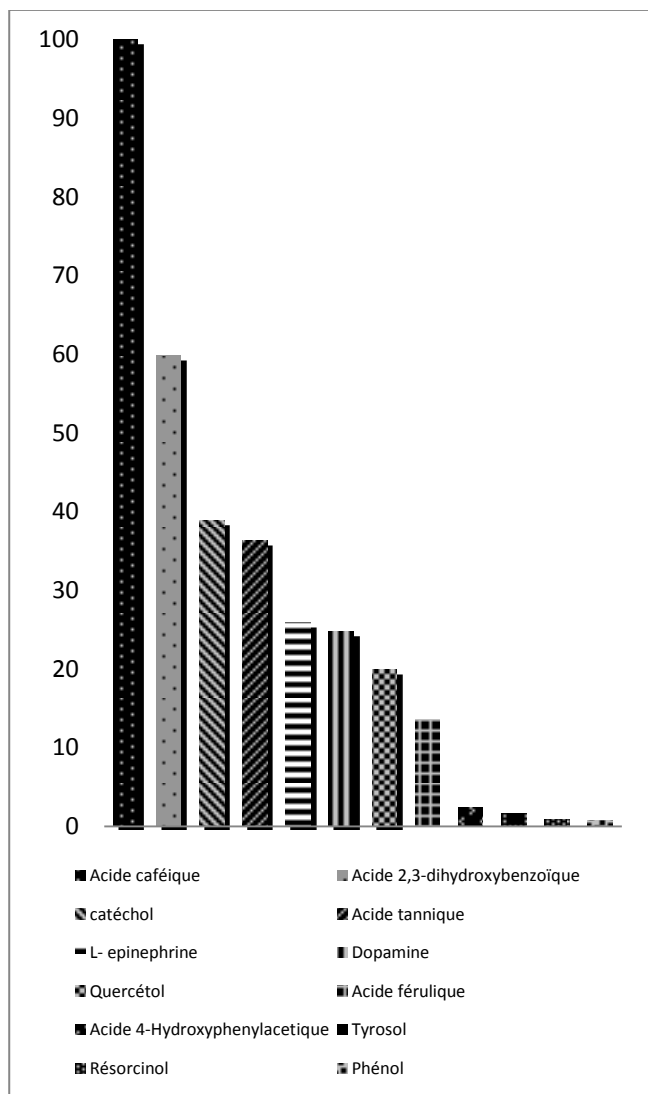


Figure 2: Comparaison de la sensibilité des o-phénols et des phénols par rapport à la réponse de l'acide caféique qu'on lui a attribué 100%

Parmi les paramètres exigés pour le dosage spectrophotométrique, il y a le choix judicieux des étalons et des longueurs d'ondes qui ont été adoptés selon différents auteurs (Tableau 1). Toutefois, la majorité des études sont basées sur l'utilisation de l'acide caféique comme étalon et sur une absorbance de 370 nm. Il est à noter que le Conseil Oléicole International a adopté à titre provisoire cette méthode spectrophotométrique [18].

Tableau 1: Étalons et λ de mesure des orthodiphénols

Étalons	λ mesure nm	Références
Ac. gallique	370	[29]
Ac. caféique	350	[25]
Ac. caféique	350	[30]
Ac. gallique	370	[31]
Ac. caféique	370	[32-33]
Ac. caféique	370	[34]
Ac. caféique	350	[35]
Ac. caféique	370	[36]
Ac. gallique	370	[37-39]
Ac. gallique	370	[40]
Ac. caféique	370	[41]
Ac. gallique	370	[42]
Ac. caféique	370	[43]
Ac. caféique	370	[44]
Ac. caféique	350	[45,46]
Ac. gallique	370	[47]
Ac. caféique	370	[48]
Ac. caféique	370	[49]
Ac. caféique	370	[50-53]

II.1. Validation de la méthode spectrophotométrique à $\lambda=370$ nm selon la norme NF T 90-210

II.1.1. Etude de la fonction d'étalonnage : plan d'expérience de type A

Le plan d'expérience de type A permet d'évaluer la fonction d'étalonnage, cinq étalons indépendants sont préparés pendant 5 jours ($p=5$), dans les conditions de répétabilité (tableau 2).



Tableau 2: Signal obtenu en Mili absorbance à ($\lambda = 370\text{nm}$) sur des étalons préparés à des jours différents pour l'évaluation d'une fonction linéaire de type $y = a x + b$

jours	Ni v1	Ni v2	Ni v3	Ni v4	Ni v5	Y = a x + b	
	0.8 mg/L	1.6 mg/L	2.4 mg/L	3.2 mg/L	4 mg/L	a	b
23-03-2012	130	195	242	326	397	83,12	58,5
24-03-2012	109	182	255	303	417	92,12	32,1
26-03-2012	83	154	215	281	378	89,62	7,1
27-03-2012	123	214	281	344	407	87,25	64,4
28-03-2012	124	202	261	346	414	90,5	63,2

L'ordonnée à l'origine « b » et la pente « a » sont estimées lors de chaque jour d'étalonnage et permettent de calculer les grandeurs retrouvées de chaque étalon ($\bar{x} = \frac{y-b}{a}$).

Les grandeurs théorique et grandeurs retrouvée sont calculés est représentés dans la figure 3.

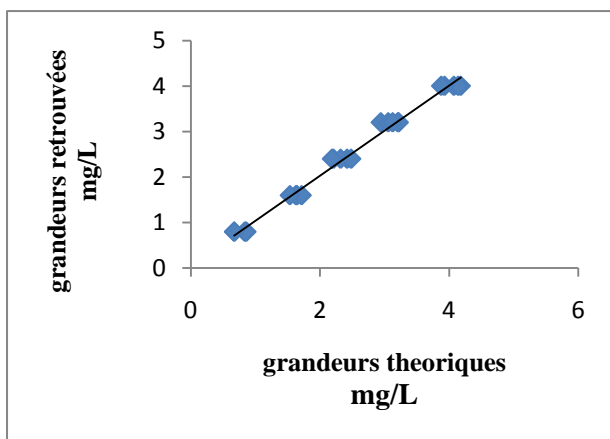


Figure 3: Représentation graphique des grandeurs retrouvées par rapport aux grandeurs théoriques à 370 nm.

Les valeurs correspondantes aux biais relatifs par rapport aux valeurs théoriques sont mentionnées dans le tableau 3, on constate d'après le tableau

que la valeur maximal obtenue comme erreur correspond à 16%.

Tableau 3: Biais relatifs par rapport aux valeurs théoriques

Différents jours	Niv1 0.8 mg/L	Niv2 1.6 mg/L	Niv3 2.4 mg/L	Niv4 3.2 mg/L	Niv5 4 mg/L
23-03-2012	7,5%	2,6%	-8 %	0,6%	1,8%
24-03-2012	4,3%	1,7%	0,8 %	-8,1%	4,4%
26-03-2012	5,9%	2,4 %	-3,3%	-4,5%	3,5%
27-03-2012	-16 %	7,2%	3,4%	0,1%	-1,8%
28-03-2012	-16%	-4,1%	-8,9%	-2,3%	-3,1%

1.Etude de la fonction d'étalonnage de la méthode d'analyse avec un test d'adéquation

Le tableau 4 indique que le critère calculé est égal à 1.42, et la valeur critique de Fisher avec un risque de 1%, F (5 ; 20 ; 1%) est égale à 4.10. On constate que le critère observé est inférieur à la valeur critique.

Tableau 4: Test d'adéquation au modèle d'étalonnage à 370 nm

Source de variation	Source des carrés d'écart	Degrés de liberté	Variances	Critère calculé	Valeur critique au risque $\alpha = 1\%$
Modèle	0,08600712	5	0,01720142	1.42	4.10
Expérimentale	0,24290806	20	0,01214540		
Total	0,32891518	25			

En conclusion, la fonction d'étalonnage peut être validée sur le domaine étudié avec un risque de 1%, car l'erreur de modèle est significativement négligeable par rapport à l'erreur expérimentale observée.



EMA étalonnage = 20 % pour l'étalon 0.8 mg/L et 10% pour les étalons 1.6 mg/L, 2.4 mg/L, 3.2 mg/L et 4 mg/L (figure 4).

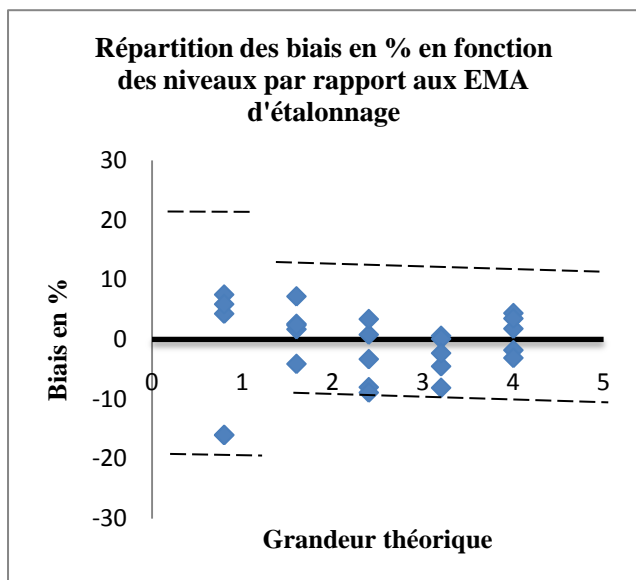


Figure 4: Les biais relatifs par rapports aux grandeurs théoriques

II.2. Étude de la limite de quantification pré-supposée : Plan B

II.2.1.Extraction des o-diphénols

L'extraction liquide-liquide est considérée comme étant la méthode la plus utilisée dans le domaine d'extraction des composés phénoliques à partir des huiles d'olives extra vierges [4]. La majorité des études sont basées sur l'utilisation d'une prise d'essai à base d'huile d'olive qu'on dissout dans un volume de solvant qui est généralement l'hexane. Le mélange est mis dans une ampoule à décantation est agité vigoureusement pendant quelques minutes, puis on ajoute 2 ou 3 fois un volume d'une solution méthanolique (méthanol/eau; v/v). La phase méthanolique est récupérée dans une fiole jaugée puis complétée avec de l'eau distillée. Le tableau 5 indique les divers protocoles d'extraction liquide-liquide des o-diphénols cité dans la littérature.

Tableau 5: Conditions d'extraction des orthodiphénols

Prise d'essai (g)	Solvant d'extraction/mL	Extraction liquide-liquide V/V	Références
10	Hexane/50	3x20ml; MeOH/H ₂ O; 6/4	[25]
10	non	3x10ml; MeOH/H ₂ O; 8/2	[54]
50	Hexane/50	3x30ml; MeOH/H ₂ O; 6/4	[55]
2	Hexane/1	3x2ml; MeOH/H ₂ O; 6/4	[56]
2,5	Hexane/2,5	3x2,5ml; MeOH/H ₂ O; 8/2	[57]
50	Hexane/50	3x30ml; MeOH/H ₂ O; 6/4	[58]
40	non	20ml; MeOH/H ₂ O; 8/2	[59]
10	Hexane/20	3x10ml ; MeOH/H ₂ O; 6/4	[60]
30	Hexane /30	3x30ml; MeOH/H ₂ O; 6/4	[61]
100	Hexane /20	methanol/ H ₂ O; 8/2	[62,63]
10	non	3x10ml; MeOH/H ₂ O; 8/2	[34]
	Hexane/50	3x30ml; MeOH/H ₂ O; 6/4	[32,33]
100	Hexane /20	methanol/ H ₂ O; 8/2	[65]
10	Hexane/50	3x20ml; MeOH/H ₂ O; 6/4	[37-39]
10	Hexane/50	3x20ml;MeOH/H ₂ O;6/4	[47]
10	Hexane/20	3x10ml; MeOH/H ₂ O; 6/4	[50-53]
2	Hexane/1	3x2ml; MeOH/H ₂ O; 6/4	[23]
10	Hexane/50	3x10ml; MeOH/H ₂ O; 6/4	[42]
10	Hexane/50	3x20ml; MeOH/H ₂ O; 6/4	[44]
25	Hexane/25	3x15ml; MeOH/H ₂ O; 6/4	Le présent travail



Récemment une nouvelle méthode d'extraction des orthodiphénols sur phase solide en utilisant des cartouches diol a été proposée [64].

II.2.2. Données expérimentales du Plan B

Cinq échantillons ont été préparés de manière indépendante à partir d'une matrice à base de l'huile d'olive lampante très ancienne et qui date depuis l'année 2002, ne contenant pas les orthodiphénols. Cette préparation est effectuée en vue de déterminer la performance de la méthode d'extraction utilisée pour la récupération des orthodiphénols présent dans l'huile d'olive. Ces échantillons sont dopés par une valeur qui correspond à la limite de quantification présumée à 2mg/kg qui correspond au premier niveau de la gamme d'étalonnage (0.8 mg/L), puis sont analysés dans les conditions de fidélité intermédiaire (Tableau 6).

Tableau 6: Tableau des résultats

Série	Répétitions		Statistiques élémentaires	
	1	2	Moyenne	S ² série
26-03-2012	2.6	1.8	2,24	0,354
27-03-2012	2.8	1.9	2,32	0,401
28-03-2012	1.8	1.9	1,84	0,001
29-03-2012	1.8	2.3	2,06	0,094
30-03-2012	2.4	1.7	2,07	0,230

II.2.3. Étude des rendements : plan C

Cinq échantillons d'une huile d'olive lampante datant de 2002, ne contenant pas d'orthophenols sont fortifiés avec l'acide caféique à une valeur de 4 mg/kg et 8 mg/kg qui correspondent respectivement aux niveaux de la gamme d'étalonnage (1.6 et 3.2 mg/L) (tableau 7 et 8) puis sont analysés dans des conditions de fidélité intermédiaire. Chaque analyse est répétée deux fois dans les conditions de répétabilité.

Tableau 7: Résultats pour un ajout à 4mg/kg

Série	Teneur initiale avant ajout	Teneur ajoutée	Teneur retrouvée		Rendement en pourcentage		Statistiques élémentaires	
			1	2	1	2	Moyenne	S ² séries
30/03/2012	0	4	3.5	3.9	78.5	97.5	3,729	0,106
02/04/2012	0	4	4.5	4.2	112.5	105	4,339	0,037
03/04/2012	0	4	4.5	4.6	112.5	115	4,570	0,009
04/04/2012	0	4	3.9	3.7	97.5	92.5	3,824	0,053
05/04/2012	0	4	4.1	3.3	102.5	82.5	3,713	0,313

Tableau 8: Résultats pour un ajout à 8mg/kg

Série	Teneur initiale avant ajout	Teneur ajoutée	Teneur retrouvée		Rendement en pourcentage		Statistiques élémentaires	
			1	2	1	2	Moyenne	S ² séries
30/03/2012	0	8	6.1	6.1	67.25	67.25	6,128	0,001
02/04/2012	0	8	7.6	7.0	95	87.5	7,322	0,167
03/04/2012	0	8	8.5	7.4	106.25	92.5	7,977	0,541
04/04/2012	0	8	7.0	7.7	87.5	96.25	7,351	0,243
05/04/2012	0	8	8.7	7.6	108.75	95	8,139	0,589

II.2.4. Etude de l'exactitude pour un niveau à 2mg/kg, 4mg/kg et 8mg/kg : plan D



L'exactitude de la méthode est étudiée sur des échantillons de valeur de référence d'acide caféique par kg d'huile d'olive (2, 4 et 8 mg/kg). Les valeurs expérimentales utilisées pour l'étude de l'exactitude (plan D) à ces trois niveaux de concentration sont issues des plan B (étude de la LQ) et C (étude des rendements). Les résultats sont interprétés pour la vérification de la justesse et de l'exactitude de la méthode par rapport à un écart maximal acceptable autour de chaque valeur de référence fixée par le laboratoire.

Tableau 9: Estimation des paramètres d'exactitude de la méthode pour trois niveaux

	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
Valeur de référence	2	4	8
$U_{réf}$	0.04	0.08	0.16
EMA en % de Réf	60%	20%	20%
EMA	1,2	80	160
Nombre de séries	5	5	5
Moyenne	2,10	4,03	7,38
Ecart-type de fidélité intermédiaire	0,46	2,01	2,72
CV de fidélité intermédiaire	0,2%	0,5%	0,4%

Tableau 10: Interprétation des paramètres d'exactitude de la méthode pour trois niveaux et conclusion

Formules de calculs :

$$\text{Ecart normalisé EN} = \frac{|\bar{z} - \text{Réf}|}{\sqrt{\frac{S2FI}{n} + U2Réf}}$$

	Niveau1	Niveau2	Niveau3
Ecart normalisé EN	0,51	0,04	0,53
Critère	2	2	2
La justesse de la méthode	Vérifiée	vérifiée	vérifiée
Réf + EMA	3,2	84	168
$\bar{Z} + (2 * S_{LQ})$	3,03	8,05	12,82
$\bar{Z} - (2 * S_{LQ})$	1,18	0,02	1,95
Réf - EMA	0,8	-76	-152
L'exactitude de la méthode	Vérifiée	vérifiée	vérifiée

II.2.5. Résumé des caractéristiques expérimentales

Le tableau 11 résume les différentes caractéristiques expérimentales qui ont été traitées lors de la validation selon la norme NF T 90-210.

Tableau 11: Résumé des caractéristiques expérimentales



LES TECHNOLOGIES DE LABORATOIRE - 2012, Volume 7, N°28

Caractéristiques de la méthode	Performances attendues	Valeur observée	Conclusion
<u>Etalonnage</u>			
Fonction			Linéaire
Domaine des solutions étalons	[0.8mg/l ; 4mg/l]	Max= -16 %	Vérifié
Biais en % pour l'étalon1=0.8mg/l	20%	Max= -16 %	Vérifié
Biais en % pour l'étalon1=1.6mg/l	10%	Max= 7.2%	Vérifié
Biais en % pour l'étalon1=2.4mg/l	10%	Max= -8,9%	Vérifié
Biais en % pour l'étalon1=3.2mg/l	10%	Max= -8,1%	Vérifié
Biais en % pour l'étalon1=4mg/l	10%	Max= 4,4%	Vérifié
Teste de Fisher	4.10	1,42	Vérifié
<u>Limite de quantification présumée</u>			
Ecart maximal acceptable	2mg/kg		
	60%		
Inégalité (1) : $\overline{ZLQ} + 2 * S_{LQ} < LQ + 60 \% * LQ$	3,2 mg/kg	3,03 mg/kg	Vérifié
Inégalité (2) : $\overline{ZLQ} - 2 * S_{LQ} > LQ - 60 \% * LQ$	0,8 mg/kg	1,18 mg/kg	Vérifié
<u>Rendement</u>			
Valeur de l'échantillon 1	0 mg/kg		
Ajout 1	4mg/kg		
Valeur de l'échantillon 2	0 mg/kg		
Ajout 2	8 mg/kg		
Rendement de l'échantillon 1	[87.5% ; 115%]	4,03%	Vérifié
Rendement de l'échantillon 2	[76.25% ; 108.75%]	7,38%	Vérifié
<u>Exactitude de l'échantillon 1</u>			
Valeur de référence	2 mg/kg		Acceptable
$U_{réf}$	0.04		
Ecart maximal acceptable	60%		
Ecart normalisé EN	2	0,51	Vérifié
Inégalité (1): $\overline{ZLQ} + 2 * S_{LQ} < LQ + 60 \% * LQ$	3,2 mg/kg	3,03 mg/kg	Vérifié
Inégalité (2): $\overline{ZLQ} - 2 * S_{LQ} > LQ - 60 \% * LQ$	0,8 mg/kg	1,18 mg/kg	Vérifié
<u>Exactitude de l'échantillon 2</u>			
Valeur de référence	4 mg/kg		Acceptable
$U_{réf}$	0.08		
Ecart maximal acceptable	20%		
Ecart normalisé EN	2	0,04	Vérifié
Inégalité (1): Réf + EMA	84	8,05	Vérifié
Inégalité (2): Réf - EMA	-76	0,02	Vérifié
<u>Exactitude de l'échantillon 3</u>			
Valeur de référence	8 mg/kg		Acceptable
$U_{réf}$	0.16		
Ecart maximal acceptable	20 %		
Ecart normalisé EN	2	0,53	Vérifié
Inégalité (1): Réf + EMA	168	12,8182245	Vérifié
Inégalité (2): Réf - EMA	-152	1,9490755	Vérifié



II.3. Absorbance des différentes huiles d'olive extra vierge collectées du marché local

Le tableau 12 présente les teneurs en mg/kg, des o-diphénols contenus dans 10 échantillons d'huile d'olive, en tenant compte de la procédure d'extraction, et de la méthode spectrophotométrique décrite dans ce travail.

Tableau 12: Teneurs en o-diphénols en mg/kg dans les échantillons analysés à 370 nm

Extraits N°	Milli-absorbance	Teneurs en o-diphénols (mg acide caféique/kg)
1	464	10.9
2	564	13.4
3	637	15.2
4	453	10.6
5	780	18.8
6	134	2.6
7	757	18.2
8	334	7.6
9	625	14.9
10	128	2.5

III. Protocole d'évaluation des performances de la méthode de dosage colorimétrique à $\lambda = 420$ nm

III.1. Étude de la fonction d'étalonnage

Pour évaluer la fonction d'étalonnage, cinq étalons indépendants sont préparés dans les conditions de répétabilité (tableau 13).

Tableau 13: Signal obtenu en Mili absorbance (420nm) sur des étalons pour l'évaluation d'une fonction linéaire de type $y = a x + b$

	Niv1	Niv2	Niv3	Niv4	Niv5	Y= ax+b	
	3 mg/L	6 mg/L	9 mg/L	12 mg/L	16 mg/L	a	b
Répétitio n 1	126	235	309	411	536	31,1	36,9
Répétitio n 2	163	241	348	451	552	30,7	67,7

L'ordonnée à l'origine « b » et la pente « a » sont estimés lors de l'étalonnage et permettent de calculer les grandeurs retrouvées de chaque étalon : $\bar{x} = \frac{y-b}{a}$

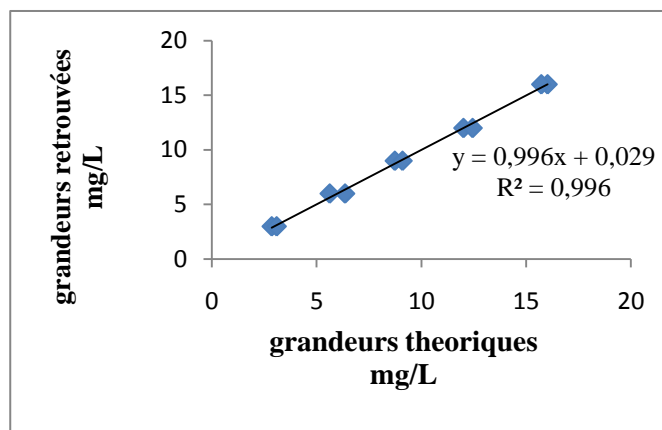


Figure 5 : Représentation graphique des grandeurs retrouvées par rapport aux grandeurs théoriques à 420nm.

Les grandeurs théorique et retrouvée sont calculées et représentées dans la figure 5.

Les biais relatifs calculé des grandeurs retrouvée et théorique ne dépasse pas 6%.

Test d'adéquation au modèle d'étalonnage à 420 nm, indique que le critère calculé est égal à 0,30, et la valeur critique de Fisher avec un risque de 1% est égale à F (5 ; 20 ; 1%) correspondant à 99.

En conclusion, nos résultats préliminaires, révèle qu'il y a une forte probabilité de validation de la fonction d'étalonnage sur le domaine étudié à une $\lambda = 420$.



Conclusion

Le balayage de longueur d'onde allant de 350 à 450 nm, de trois composés phénoliques standards (l'acide caféique, le tyrosol, et l'hydroxytyrosol), et d'un extrait d'une huile d'olive extra vierge, a permis de mettre la lumière sur deux longueurs d'onde 370 nm et 420 nm pour la détermination des orthodiphénols. Toutefois, la longueur d'onde de 420 nm serait spécifique pour le dosage des huiles riches en orthodiphénols provenant d'olive

fraichement cueillies, et constituerait par la suite un indicateur adéquat de la date optimale de la récolte des olives.

La méthode d'extraction et de dosage des orthodiphénols à $\lambda=370$ nm, proposée dans ce travail, a montré des rendements d'extraction autour de 100%, et une limite de quantification égale à 2 mg/kg, ce qui a été vérifié lors de la validation selon la norme NF 90-210 Mai 2009.

REFERENCES

- [1]. [Pierre Besançon](#); et al, (2000), Alimentation méditerranéenne et santé : actualités et perspectives, édition : *JL John Libbey eurotext*
- [2]. Ben tekaya, Hassouma M. (2005). Étude de la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge extra tunisienne au cours de son stockage. Volume 12, Number 5, 447-54.
- [3]. María Isabel Alarcón Flores, Roberto Romero-González, Antonia Garrido, Frenich, José Luis Martínez Vidal. (2012). Analysis of Phenolic Compounds in Olive Oil by Solid-Phase Extraction and Ultra High Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Food Chemistry*, [Volume 134, Issue 4, Pages 2465–2472](#)
- [4]. Youssef Ouni, Ameni Taamalli, Ana Maria Gomez-Caravaca, Antonio Segura-Carretero, Alberto Fernandez-Gutiérrez, Mokhtar Zarrouk. (2011). Characterisation and quantification of phenolic compounds of extra-virgin olive oils according to their geographical origin by a rapid and resolute LC–ESI-TOF MS method. *Food Chemistry* 127,1263–1267
- [5]. A. Nakbi, M. Issaoui, S. Dabbou, N. Koubaa, A. Echbili, M. Hammami, N. Attia. (2010). Evaluation of antioxidant activities of phenolic compounds from two extra virgin olive oils. *Journal of Food Composition and Analysis* 23, 711–715
- [6]. Theodora-Ioanna Lafka, Andriana E. Lazou, Vassilia J. Sinanoglou, Evangelos S. Lazos. (2011). Phenolic and antioxidant potential of olive oil mill wastes. *Food Chemistry* 125, 92–98.
- [7]. M. Del Carlo, A. Amine, M. Haddam, F. della Pelle, G. C. Fusella, D. Compagnone. (2012). Selective Voltammetric Analysis of o-Diphenols from Olive Oil, volume 24, page : 889-896.
- [8]. Wieland Peschel, Wilfried Dieckmann, Marlies Sonnenschein, Andreas Plescher. (2007). High antioxidant potential of pressing residues from evening primrose in comparison to other oilseed cakes and plant antioxidants. *Industrial Crops and Products*, 25, 44–54.
- [9]. Peter Moller, Steffen Loft. (2004). Interventions with antioxidants and nutrients in relation to oxidative DNA damage and repair. *Mutation Research*, 551, 79–89
- [10]. Nick Kalogeropoulos, Antonia Chiou, Anastasia Mylona, Maria S. Ioannou, Nikolaos K. Andrikopoulos. (2007). Recovery and distribution of natural antioxidants (a-tocopherol, polyphenols and terpenic acids) after pan-frying of Mediterranean finfish in virgin olive oil. *Food Chemistry*, 100, 509–517
- [11]. Luis Carlos Matos a,b, Jose A. Pereira c, Paula B. Andrade b, Rosa M. Seabra b,M. Beatriz P.P. Oliveira. (2007). Evaluation of a numerical method to predict the polyphenols content in monovarietal olive oils. *Food Chemistry*, 102, 976–983
- [12]. Vassiliki T. Papoti, Maria Z. Tsimidou. (2009). Looking through the qualities of a fluorimetric assay for the total phenol content estimation in virgin olive oil, olive fruit or leaf polar extract. *Food Chemistry*, 112, 246–252
- [13]. Sabiha Achat, Valérie Tomao, Khodir Madani, Mohamed Chibane, Mohamed Elmaataoui, Olivier Dangles, Farid Chemat. (2012). Direct enrichment of olive oil in oleuropein by ultrasound-assisted maceration at laboratory and pilot plant scale. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19, 777–786
- [14]. Guillermo Rodriguez-Gutiérrez, Sharon Wooda, Juan Fernandez-Bolaos Guzmán, Garry G. Duthie, Baukje de Roos. (2011). Determination of 3,4-dihydroxyphenylglycol, hydroxytyrosol and tyrosol purified from olive oil by-products with HPLC in animal plasma and tissues. *Food Chemistry*, 126, 1948–1952
- [15]. Peggy Knickerboker. (1998). Olive oil from the tree to the table. chronicle books.
- [16]. Alessandra Bendini, Lorenzo Cerretani, Alegria Carrasco-Pancorbo, Ana Maria Gómez-Caravaca, Antonio Segura-Carretero, Alberto Fernández-Gutiérrez and Giovanni Lercker. (2007). Phenolic Molecules in Virgin Olive Oils: a Survey of Their Sensory Properties, Health Effects, Antioxidant Activity and Analytical Methods. *An Overview of the Last Decade, Molecules*, 12, 1679-1719



REFERENCES

- [17]. Caterina Manna, Stefania D'angelo, Valentina Migliardi, Evelina Loffredi, Orazio Mazzoni, Patrizia Morrica, Patrizia Galletti, and Vincenzo Zappa. (2002). Protective Effect of the Phenolic Fraction from Virgin Olive Oils against Oxidative Stress in Human Cells. *J. Agric. Food Chem*, 50, 6521-6526.
- [18]. <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/224-testing-methods?lang=es> ES COI/T.20/DOC. (29-2009). Détermination des biophénols des d'olives par HPLC
- [19]. Dennis W. Barnum. (1977). Spectrophotometric determination of catechol, epinephrine, dopa, dopamine and other aromatic vic-diols. *Analytica Chimica Acta*, Volume 89, Issue 1, Pages 157-166.
- [20]. P. Nagaraja, R.A. Vasantha, K.R. Sunitha. 2001. A new sensitive and selective spectrophotometric method for the determination of catechol derivatives and its pharmaceutical preparations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 25(3-4): 417-24.
- [21]. M. Polasek, I. Petriska, M. Pospisilova, L. Jahodar. (2006). *Talanta*, 69, 192.
- [22]. R. N. Soni, M. Bartusek. (1971). *J. Inorg. Nucl. Chem.* 33, 2557.
- [23]. Pridham, J.B. (1963). Methods in Polyphenol Chemistry. *Pergamon Press, London*, p. 138.
- [24]. Miroslav Polasek, Ivan Petriska, Marie Pospisilova, Ludek Jahoda. (2006). Use of molybdate as novel complex-forming selector in the analysis of polyhydric phenols by capillary zone electrophoresis. *M. Polasek et al. / Talanta*, 69, 192-198.
- [25]. T. Gutfinger. (1981). [Polyphenols in olive oils](#). *Journal of the american oil chemistry society*, Volume 58, Page : 966.
- [26]. A. K. Duhmer-Klair, D. C. L. De Alwis, F. A. (2003). *Schultz, Inorg. Chim. Acta*, 351, 150.
- [27]. La norme française NF T 90-210, Qualité de l'eau protocole d'évaluation initiale des performances d'une méthode dans un laboratoire, Mai 2009.
- [28]. Abderrazzak Rachidi, Dina Baghdadi Mazini, Said Barrijal, Guillaume Duflos, Philippe Caillaud, (2010), Validation de la méthode du dosage de l'histamine dans les produits de la pêche par HPLC, *LES TECHNOLOGIES DE LABORATOIRE* -, Volume 5, N°20, page 04-10.
- [29]. Alessandra Bendini, Matteo Bonoli, Lorenzo Cerretani, Barbara Biguzzi, Giovanni Lercker, Tullia Gallina, (2003), Liquid-liquid and solid-phase extractions of phenols from virgin olive oil and their separation by chromatographic and electrophoretic methods, *Journal of Chromatography A*, 985, 425-433
- [30]. Danielle Ryan and Kevin Robards. (1998). Phenolic compounds in olives. *Analyst*, Vol. 123 (31R-44R)
- [31]. Lorenzo Cerretani, Alessandra Bendini, Annalisa Rotondi, Giovanni Lercker, Tullia Gallina Toschi, (2005), Analytical comparison of monovarietal virgin olive oils obtained by both a continuous industrial plant and a low-scale mill, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 107, 93-100
- [32]. Salvador M. D., Aranda F., Gomez-Alonso S., Fregapane G., (2001). Cornicabra virgin olive oil: a study of five crop seasons. Composition, quality and oxidative stability. *Food Chemistry*, 74, 267-274.
- [33]. M.D. Salvador, F. Aranda, S. Gomez-Alonso, G. Fregapane. (2003). Influence of extraction system, production year and area on Cornicabra virgin olive oil: a study of five crop seasons. *Food Chemistry*, 80, 359-36.
- [34]. Bechir Baccouri, Wissem Zarrouk, Olfa Baccouri, Mokhtar Guerfel, Issam Nouairi, (2008), Douha Krichene, Douja Daoud and Mokhtar Zarrouk, Composition, quality and oxidative stability of virgin olive oils from some selected wild olives (*Olea europaea* L. subsp. *Oleaster*), *GRASAS Y ACEITES*, 59, 346-351.
- [35]. Blekas G., Psomiadou E., Tsimidou M., Boskou D. (2002). On the importance of total polar phenols to monitor the stability of greek virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(6), 340-346.
- [36]. Gomez-Alonso S.; Salvador M. D.; Fregapane G. (2002). Phenolic Compounds Profile of Cornicabra Virgin Olive Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(23), 6812-6817.
- [37]. Bendini A., Bonoli M., Cerretani L., Biguzzi B., Lercker G., Toschi T. G. (2003). liquid-liquid and solid phase extractions of phenols from virgin olive oil and their separation by chromatographic and electrophoretic methods. *J. of Chromatography A*, 985, 425-433.
- [38]. Bendini, A., Cerretani, L., Carrasco-Pancorbo, A., Gómez-Caravaca, A.M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., Lercker, G., (2007) a. Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade. *Molecules* 12, 1679-1719.
- [39]. Bendini, A., Gómez-Caravaca, A.M., Cerretani, L., Del Carlo, M., Segura-Carretero, A., Compagnone, D., Cichelli, A., Lercker, G., (2007) b. Evaluation of contribution of micro and macro components to oxidative stability on virgin oils obtained from olives characterized by different health quality. *Progr. Nutr.* 9, 210-215.
- [40]. Matteo Bonoli, Marina Montanucci, Tullia Gallina Toschi, Giovanni Lercker. (2003). Fast separation and determination of tyrosol, hydroxytyrosol and other phenolic compounds in extra-virgin olive oil by capillary zone electrophoresis with ultraviolet-diode array detection, *Journal of chromatography A*, 1011, 163-172
- [41]. [M. Paz Romero, M. Jesús Tovar, Tomas Ramo and M. José Motilva](#). (2003). [Effect of crop season on the composition of virgin olive oil with protected designation of origin "Les garrigues"](#). *JOURNAL OF THE AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY*, Volume 80, Number 5, 423-430.



REFERENCES

- [42]. Tullia Gallina-Toschi, Lorenzo Cerretani, Alessandra Bendini, Matteo Bonoli-Carognin, Giovanni Lercker. (2005). Oxidative stability and phenolic content of virgin olive oil: An analytical approach by traditional and high resolution techniques. *J. Sep. Sci.*, 28, 859–870.
- [43]. Sonia Ben Temime, Elisabetta Campeol, Pier Luigi Cioni, Douja Daoud, Mokhtar Zarrouk. (2006). Volatile compounds from Chétoui olive oil and variations induced by growing area. *Food Chemistry*, 99, 315–325.
- [44]. Piergiorgio Comuzzo, Lara Tat, Andrea Tonizzo, Franco Battistutta. (2006). Yeast derivatives (extracts and autolysates) in volatile compounds and effects on wine aroma volatily. *Food chemistry*, 99, 217-230.
- [45]. Bahar Aliakbarian, Fariba Dehghani, Patrizia Perego (2009). The effect of citric acid on the phenolic contents of olive oil. *Food Chemistry*, [Volume 116, Issue 3](#), Pages 617–623.
- [46]. Bahar Aliakbarian, Alessandro A. Casazza, Patrizia Perego. (2011). Valorization of olive oil solid waste using high pressure–high temperature reactor. *Food Chemistry*, [Volume 128, Issue 3](#), Pages 704–710.
- [47]. [Victor R. Preedy; Ronald R. Watson](#), (2010). Chapitre : Lorenzo Cerretani and Alessandra Bendini. Rapid Assays to Evaluate the Antioxidant Capacity of Phenols in Virgin Olive Oil. *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention.*; Académie Presse.
- [48]. D. Iconomou, D. Arapoglou and C. Israilides. (2010). Improvement of phenolic antioxidants and quality characteristics of virgin olive oil with the addition of enzymes and nitrogen during olive paste processing. *GRASAS Y ACEITES*, 61 (3), 303-311.
- [49]. Tanouti K., Serghini-Caid H., Chaieb E, Benali A., Harkous M, Elamrani A. (2011). Amelioration qualitative d'huiles d'olive produites dans le maroc oriental. *LES TECHNOLOGIES DE LABORATOIRE*, Volume 6, N°22, page : 01-12.
- [50]. Ouni Youssef, Flamini Guido, Douja Daoud and Zarrouk Mokhtar. (2011). Effect of cultivar on minor components in Tunisia olive fruits cultivated in microclimate. *Journal of Horticulture and Forestry*, Vol. 3(1), pp. 13-20.
- [51]. Ouni Youssef, Flamini Guido, Issaoui Manel, Nabil Ben Youssef Cioni Pier Luigi, Hammami Mohamed, Douja Daoud, Zarrouk Mokhtar. (2011). Volatile compounds and compositional quality of virgin olive oil from Oueslati variety: Influence of geographical origin. *Food Chemistry*, [Volume 124, Issue 4](#), Pages 1770–1776.
- [52]. Ouni Youssef, Flamini Guido, Guerfel Mokhtar, Ben Youssef Nabil, Douja Daoud, Zarrouk Mokhtar. (2011). The compositional quality and volatile compounds of samples from the blend of monovarietal olive oils cultivated in Tunisia. *International Journal of Food Science & Technology*, [Volume 46, Issue 4](#), pages 678–686.
- [53]. Ouni Youssef, Nabil Ben Youssef, Zarrouk Mokhtar, Flamini Guido. (2011). Influence of olive storage period on volatile compounds and oil quality of two Tunisian cultivars of *Olea europea*, Chemlali and Chetoui. *International Journal of Food Science & Technology*, [Volume 46, Issue 6](#), pages 1245–1252.
- [54]. Montedoro G.F., Servili M., Baldioli M and Miniati E. (1992). Simple and hydrolysable phenolic compounds in virgin olive oil. Their extraction, separation, and quantitative and semi quantitative evaluation by HPLC. *J. Agric. Food Chem.* 40, 1571-1576.
- [55]. Tsimidou M., Papadopoulos G., Boskou D. (1992). Determination of phenolic compounds in virgin olive oil by reversed phase HPLC with emphasis on UV detection. *Food Chem.* 44, 53-60.
- [56]. Cioni F., Modi G., Simiani I. G., Yracchi S. (1998). Evoluzione dei componenti minori polari in oli extravergini di oliva durante la conservazione. *Boll. Chim. Igien*, 49, 115-118.
- [57]. Capannesi C., Palchetti I., Mascini M., Parenti A. (2000). Electrochemical senso and biosensor for polyphenols detection in olive oil. *Food Chemistry*, 71, 553-562.
- [58]. Giacometti J., Milin C., (2001), composition and qualitative characteristics of virgin olive oils produced in northern Adriatic region, Republic of Croatia. *Grasas y Aceites* Vol. 52, Fasc. 6, 397-402.
- [59]. Lo Curto S., Saitta M., di Bella G., Mavrogeni E., Salvo F., Dugo G. (2001). Caratterizzazione di oli di oliva vergini siciliani. Nota VII. L'olio da cv. Ogliarola messinese. *Riv. Ital. Sostanze Grasse*. Vol. LXXVII, 511-524.
- [60]. Youssef Ouni, Ameni Taamalli, Mokhtar Guerfel, Chedly Abdely, Mokhtar Zarrouk and Guido Flamini, (2012), The phenolic compounds and compositional quality of Chétoui virgin olive oil: Effect of altitude African Journal of Biotechnology Vol. 11(55), pp. 11842-11850.
- [61]. Nemanja Miletic, Aleksandra Nastasovic, Katja Loos. (2012). Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilities, advantages, applications, *Bioresource Technology*, [Volume 115](#), Pages 126–135
- [62]. G. Montedoro, C. Cantarelli, Riv. (1969). *Ital. Sost. Grasse*, 46, 3–12.
- [63]. C. Vazquez Roncero, L. Janer del Valle, C. (1978). *Janer del Valle, Grasas Aceites*, 27, 185–191.
- [64]. Ranalli, A., Ferrante, M.L., DeMattia, G., Costantini, N. (1999). Analytical evaluation of virgin olive oil of first and second extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 417–424.
- [65]. A.K. Ajay, Divesh N. Srivastava. (2007). Microtubular conductometric biosensor for ethanol detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 23, 281–284.