

II - PARTIE EXPÉRIMENTALE

II.1 – Equipements, Réactifs et Conditions préliminaires :

II.1.1 - Equipements :

- Les spectres et les mesures d'absorption ont été enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible, Spectronic-Unicam model UV 500, qui fournit une interface à un système informatique avec un logiciel Vision 32 pour la commande des opérations de l'instrument, la collecte des données et leur traitement. Il est doté d'un monochromateur à réseau et d'un détecteur photomultiplicateur et équipé de deux cuvettes en quartz (Hellman) de 1cm de trajet optique.
- Les calculs des statistiques et les graphes ont été traités avec les logiciels : «Excel», «Origin 6.0 Professional» et «Graph».
- Les mesures de pH ont été effectuées à l'aide d'un ph-mètre DENVER Instrument model 215.
- Un appareil à ultrason Nahita model 611/2 a été utilisé pour secouer les solutions des analytes préparées avant utilisation.
- Les pesées ont été réalisées sur une balance analytique de marque Sartorius BP 211 D, de portée max 210 g (précision 0,1 mg) et de portée min 80 g (précision 0,01 mg).
- Un four à moufle CARBOLITE, type CWF 12/5, T° max 1200 °C, avec programmation du temps et de la température.
- Etuve de séchage Memmert.
- Hotte d'aspiration sous laquelle toutes les manipulations, à risque de contamination par les particules de l'air, ont été faites.

II.1.2 - Réactifs :

Tous les réactifs utilisés sont de qualité analytique (Merck, Prolabo). L'eau ultra pure (système de purification d'eau MilliQ Gradient A10) est utilisée dans la mise en solution des échantillons et la préparation des solutions aqueuses.

II.1.3 - Conditions préliminaires :

Un nettoyage préliminaire de décontamination pour la verrerie utilisée a été exécuté à l'acide nitrique 10% et l'eau ultra-pure [108].

II.2 - Préparation de l'échantillon :

II.2.1 - Préparation de l'état solide :

Les plantes médicinales utilisées (Tableau II.1) ont été achetées chez un herboriste local, à leur état sec et la nomenclature est faite grâce aux références [109,110].

Les feuilles et les graines ont été ensuite lavées avec de l'eau de robinet dans une passoire en plastique afin d'éliminer d'éventuelles poussières superficielles, puis rincées à l'eau ultra pure. La durée du lavage et du rinçage a été aussi courte que possible. Les échantillons ont été mis immédiatement dans une étuve réglée à 60 °C pour une nuit de 16 h.

Après séchage, les échantillons ont été moulus en poudre fine, à l'aide d'un mortier/pilon en porcelaine émaillé.

Les échantillons ont été ensuite homogénéisés et des parties aliquotes ont été retirées pour l'analyse et le stockage. Le reste a été stocké dans des flacons en polyéthylène scellés puis mis au frais (Réfrigérateur), un environnement sec et obscur.

Tableau II.1 : Plantes médicinales étudiées

N° éch.	<i>Nom Vernaculaire</i>	<i>Nom Scientifique</i>	<i>Partie utilisée</i>
1	Ronce	<i>Rubus Ulmifolus Schott</i>	Feuilles
2	Remt	<i>Arthrophytum Scoparium</i>	Feuilles
3	Nigelle	<i>Nigella Sativa Arvensis L.</i>	Graines
4	Pouliot	<i>Mentha Pulegium L.</i>	Feuilles
5	Henné	<i>Lawsonia alba</i>	Feuilles
6	Helhal	<i>Lavandula Officinalis</i>	Fleurs
7	Ammoïdes	<i>Ammoïdes verticillata</i>	Fleurs
8	Chebra	<i>Globularia alypum L.</i>	Feuilles
9	Ivette	<i>Ajuga Iva</i>	Feuilles

II.2.2 - Détermination de la matière sèche dans un tissu végétal :

a) - Portée et Application :

Cette méthode détermine quantitativement le pourcentage de matière sèche dans les tissus végétaux basée sur la perte gravimétrique de l'eau libre liée, par un chauffage à 105 °C pendant 2 heures. La détermination de la matière sèche est utile pour corriger la concentration d'un élément de l'échantillon à une base absolue de matière sèche. Cette méthode n'élimine pas l'eau de liaison moléculaire et elle est généralement reproductible à $\pm 7\%$.

b) - Procédure [22]:

(1) - Environ 2 g d'une partie aliquote précédemment stockée, est pesée dans un creuset en porcelaine taré (soit P_0 le poids de la tare à 0,001 g). P_1 est le poids de l'échantillon.

(2) - le creuset avec l'échantillon a été placé dans l'étuve préchauffée à 105 °C pour 2 heures.

(3) - le creuset est alors enlevé de l'étuve et placé dans un dessiccateur pour ½ heure.

(4) - le creuset a été aussitôt pesé à 0,001 g près, soit P_2 ce poids.

(5) - une fois les mesures sont faites, l'échantillon utilisé pour la détermination de la matière sèche ne pourra être réutilisé pour l'analyse inorganique parce que le séchage des échantillons à 105 °C peut laisser échapper quelques composants comme le carbone, l'azote, et le soufre.

c) - Calcul :

$$MS = \frac{(P_2 - P_0)}{P_1} * 100 \quad (\text{éq.1})$$

MS = teneur en matière sèche, rapportée à 0.1% près.

$$m_a = \frac{MS * m_0}{100} \quad (\text{éq.2})$$

m_a = base absolue de matière sèche de l'échantillon.

m_0 = base humide de matière de l'échantillon.

II.2.3 - Préparation de l'état liquide :

II.2.3.1 - Mise en solution [24]:

- On a pesé 500 mg environ de la poudre de chaque échantillon dans un creuset en porcelaine (préalablement nettoyé), soit m_0 .
- On a ensuite placé les creusets dans un four à moufle (Carbolite) à la température ambiante (+ un creuset pour l'essai à blanc). La rampe de température a été programmée pour atteindre progressivement 450 °C en 4 heures environ.
- Le maintien de la température de consigne a aussi été programmé pour une durée de 16 heures.
- Une fois le temps écoulé, le chauffage a été automatiquement éteint et le refroidissement a commencé aussitôt. On a retiré alors les échantillons, on a humidifié chaque résidu de 1 ml d'eau, et on y a ajouté 1,5 ml d'acide nitrique concentré.
- Une lente évaporation, sur plaque chauffante, est alors tenue et arrêtée à sec.
- L'étape précédente est répétée une deuxième fois avec addition de 1 ml d'acide nitrique concentré.
- le résidu a été dissous avec 2 ml d'une solution d'acide nitrique 0,25% et chauffé à douce ébullition. Après refroidissement, La solution est transférée quantitativement dans une fiole jaugée de 10 ml à travers un papier filtre. L'opération de rinçage du creuset est poursuivie plusieurs fois ainsi que le papier filtre. La solution est finalement complétée à la jauge et stockée dans des tubes en plastique initialement nettoyés et rincés avec la solution de dilution.
- Les tubes scellés ont été conservés au frais (Réfrigérateur) dans leur boîte à tube.

II.2.3.2 - Séparation, préconcentration et détermination [57]:

A - Cas du cuivre: - Méthode au Diéthylthiocarbamate de sodium (Na- DDTC).

A - 1 - Préparation des Réactifs :

- **Solution de Diéthylthiocarbamate de sodium (Na-DDTC) 0,1% :** Une solution de 100 ml est préparée et ajustée à pH ~ 8,5 avec l'ammoniaque.
- **Solution standard de cuivre :** Une solution standard (1 mg/ml) est utilisée.

- **Solution de sel disodique de l'acide EDTA 0.1M (~ 3,7%) :** Une solution de 100 ml est préparée.
- **Solution Tartrate de sodium-potassium 20% :** Une solution de 100 ml est préparée puis épurée par extraction des traces de cuivre avec la solution Na-DDTC, utilisant quelques ml de CCl_4 pour l'extraction.

A - 2 - Procédure de préparation du chélate standard :

3 ml de la solution de tartrate et 3 ml de la solution d'EDTA ont été pipetés dans un bécher de 100 ml. Le pH de la solution résultante, mesuré à l'aide du pH-mètre, a été ajusté à ~ 8,5 avec de l'ammoniaque. La solution a été ensuite transvasée dans une ampoule de 50 ml, préalablement nettoyée avec HNO_3 et rincée à l'eau. Une quantité de 60 μg de Cu (soit 60 μl , à partir de la solution standard) y a été ajoutée puis 3 ml de la solution Na-DDTC. Le mélange a été ensuite secoué pendant environ 1 minute avec chacune des quatre portions de 1 ml de CCl_4 . Les extraits combinés ont été récupérés et dilués à 25 ml avec le solvant. Un essai à blanc a été exécuté de la même manière pour servir de référence.

A - 3 - Procédure de préparation du chélate des échantillons :

Le même mode opératoire que celui du standard a été suivi sauf que le volume prélevé des échantillons est différent (3 ml).

A - 4 - Courbe d'étalonnage :

Un balayage de la zone UV-visible a été exécuté sur le spectrophotomètre (bande passante = 1,5 nm) pour déterminer λ_{max} . Des dilutions ont été ensuite faites pour tracer la courbe d'étalonnage ($A = f(c)$) à λ_{max} fixe.

A - 5 - Mesure des absorbances des échantillons :

La mesure de l'absorbance a été faite pour chaque échantillon tout en respectant les règles de manipulation de l'instrument et des accessoires.

B - Cas du Zinc : - Méthode au Dithizone.

B - 1 - Préparation des Réactifs :

- **Solution du Dithizone 0,002% dans CCl₄** : Une solution 0,01% peut être préparée et purifiée suivant le mode de la section 46.2.1. ou tout simplement celui de la section 4.5 du [57]. Ce dernier a été adopté, puis une dilution appropriée de la solution a été ensuite faite pour préparer une solution de travail à 0,002%.
- **Solution standard de zinc** : Une solution standard (1 mg/ml) est utilisée.
- **Solution tampon d'acétate, pH 5** : La solution a été préparée à partir de l'acétate de sodium anhydre et de l'acide acétique glacial dans l'eau. L'ajustement est guidé à travers la mesure du pH-mètre. La solution a été épurée des traces de métaux en la secouant avec des portions de la solution du dithizone dans CCl₄, puis stockée dans un flacon en polyéthylène.
- **Solution à 10% de Thiosulfate de sodium** : La solution a été préparée puis épurée des traces de métaux, en la secouant avec la solution du dithizone dans CCl₄, puis maintenue dans un flacon en polyéthylène.
- **Solution de lavage** : 1 ml de la solution tampon d'acétate et 1 ml de la solution de thiosulfate diluées avec de l'eau à 10 ml. La solution a été préparée juste avant l'utilisation.
- **Solution d'ammoniaque** : 1 goutte de la solution concentrée de NH₃ dans 25 ml d'eau.

B - 2 - Procédure de préparation du chélate standard :

Dans une ampoule à décanter de 50 ml, préalablement nettoyée avec HNO₃ et rincée à l'eau, on a transvasé le mélange (5 ml de la solution tampon d'acétate + 5 ml de la solution de thiosulfate). On y a ajouté 10 µg de Zn (soit 10 µl, à partir de la solution standard). On a secoué la solution avec des portions de 1 ml chacune de la solution du dithizone dans CCl₄ jusqu'à ce que la couche verte de CCl₄ ne change plus de couleur. A chaque fois, on a secoué pendant 3 minutes environ (cinétique de la réaction). Les extraits combinés ont été ensuite secoués avec deux portions de 5 ml chacune de la solution de lavage. Le dithizone excédentaire de la couche de CCl₄ est enfin éliminé par un lavage avec la solution d'ammoniaque. La solution rose de Zn(HDz)₂ a été aussitôt diluée à 25 ml avec le CCl₄. La solution résultante,

légèrement trouble, a été filtrée avec un papier filtre précédemment lavé avec la solution diluée du dithizone et avec le CCl_4 . Un essai à blanc a été exécuté de la même manière pour servir de référence.

B - 3 - Procédure de préparation du chélate des échantillons :

Le même mode opératoire que celui du standard a été suivi sauf que le volume prélevé des échantillons est différent (1 ml).

B - 4 - Courbe d'étalonnage :

Un balayage de la zone UV-visible a été exécuté sur le spectrophotomètre (bande passante = 1,5 nm) pour déterminer λ_{\max} . Des dilutions ont été ensuite faites pour tracer la courbe d'étalonnage ($A = f(c)$) à λ_{\max} fixe.

B - 5 - Mesure des absorbances des échantillons :

La mesure de l'absorbance a été faite pour chaque échantillon tout en respectant les règles de manipulation de l'instrument et des accessoires.

II.2.4 – Calculs statistiques :

Les calculs des paramètres statistiques sont effectués sur la base du protocole de la référence [107] :

1- La limite de détection :

La détermination de la limite de détection d'une méthode s'effectue selon les étapes suivantes : Estimation de la LDM, établissement de la LDM, évaluation du ratio de conformité.

♦ **L'estimation de la LDM :** La limite de détection estimée (LDM_{est}) est calculée à partir de la détermination de la limite instrumentale de détection (LID).

La limite instrumentale de détection (LID) est établie par l'addition du composé analysé dans le solvant approprié sans la présence de matrice de façon à obtenir une concentration finale du composé analysé correspondant à environ 5 fois la LID estimée. Cette solution est introduite directement dans le système instrumental pour analyse. Par la suite, l'écart type est calculé sur les 10 replicats et la LID est égale à 3 fois l'écart type.

♦ **L'établissement de la LDM** : Les limites de détection sont déterminées à partir de l'analyse de dix réplicats d'un même échantillon. La concentration de l'analyte dans cet échantillon doit se situer dans un intervalle entre 5 et 7 fois la limite de détection estimée pour s'assurer de ne pas surestimer ou sous-estimer la limite de détection.

La limite de détection est définie comme étant trois fois la valeur de l'écart-type des concentrations des dix réplicats.

♦ **L'évaluation du ratio de conformité (\mathfrak{R})** : Pour établir efficacement la limite de détection, la démarche de validation comporte la détermination d'un ratio de conformité \mathfrak{R} . Ainsi, la détermination de la LDM est jugée valide si la valeur de \mathfrak{R} est située entre 4 et 10. Une valeur de \mathfrak{R} inférieure à 4 signifie que la valeur de LDM obtenue est statistiquement plus basse que la valeur de LDM réelle. Dans le cas d'une valeur de \mathfrak{R} supérieure à 10, la limite de détection obtenue est statistiquement plus élevée que la limite de détection réelle.

$$\mathfrak{R} = \frac{\overline{X}}{LDM} \quad (\text{éq.3})$$

\mathfrak{R} = Ratio de conformité, \overline{X} = Concentration moyenne pour les 10 réplicats de l'établissement de la LDM

LDM = Limite de détection de la méthode.

2- La limite de quantification :

La limite de quantification est la concentration équivalente à 10 fois l'écart type obtenu lors de l'établissement de la limite de détection de la méthode (LDM).

$$LQM = 10 * S \quad (\text{éq.4})$$

LQM = Limite de quantification d'une méthode

S = Écart type.

3- Réplicabilité : Elle correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels successifs obtenus sur le même échantillon soumis à l'essai dans le même laboratoire et dans les conditions suivantes : même analyste, même appareil, même jour. La valeur sera déterminée à partir de l'équation suivante :

$$\frac{t_{(0.975;n-1)} * S}{\sqrt{n}} \quad (\text{éq.5})$$

Où : s = écart type d'une série de mesures se référant à la réplicabilité

$t_{(0.975;n-1)}$ = valeur du t de student pour un intervalle bilatéral à un seuil de confiance à 95 %.

4- Répétabilité : Elle correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels obtenus sur le même échantillon soumis à l'essai dans le même laboratoire et dont au moins l'un des éléments suivants est différent : l'analyste, l'appareil, le jour. La valeur sera déterminée à partir de l'équation suivante :

$$\frac{t_{(0.975;n-1)} * s}{\sqrt{n}} \quad (\text{éq.6})$$

Où : s = écart type d'une série de mesures se référant à la répétabilité

$t_{(0.975;n-1)}$ = valeur du t de student pour un intervalle bilatéral à un seuil de confiance à 95 %.

En pratique, la réplicabilité et la répétabilité s'effectuent de la façon suivante :

Dans la zone quantifiable de la méthode, on choisit une concentration d'un échantillon et on fait 10 replicats. Chaque échantillon doit subir toutes les étapes de la méthode d'analyse en respectant les conditions spécifiées à l'égard de la réplicabilité et la répétabilité.

5- Sensibilité : La sensibilité à une concentration donnée correspond au rapport de la variable de la grandeur mesurée à la valeur correspondante de la concentration de l'élément à doser.

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

$$p = \frac{A_2 - A_1}{C_2 - C_1} \quad (\text{éq.7})$$

A_1, A_2 = absorbances, C_1, C_2 = concentrations correspondantes

6- Limite de Linéarité (LL): C'est le plus haut niveau fiable de mesure qu'on puisse utiliser en tenant compte de tous les facteurs à considérer dans une méthode. Le coefficient de corrélation doit être supérieur à 0,995 pour respecter le critère de la limite de linéarité.