

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**UNIVERSITÉ BLIDA 1****Faculté des Sciences****Département de Chimie****Mémoire Présenté par****Melle SI MOHAMED Aicha****En vue d'obtenir le diplôme de Master**

Domaine Science de la matière
 Filière Chimie
 Option **Chimie des substances naturelles**

Titre

***Comparaison entre la calibration monovariante et
 multivariante (PLS-IRTF) : Détermination simultanée du
 Thymol, Eucalyptol, Camphre et Menthol***

Soutenu le 28 Septembre 2014, devant le jury composé de :

M. EI HATTAB	Pr	Président	Université de Blida
Z. CHEMAT	MCB	Examinatrice	Université de Blida
K. BOUTEMAK	MCB	Examinatrice	Université de Blida
Y. DAGHBOUCHE	Pr	Promotrice	Université de Blida
N. BOUZIDI	MCB	Co-Promotrice	Université de Blida

الحمد لله رب العالمين

Remerciements

Avant tout nous remercions "Allah" tout puissant qui nous a donné le courage, la volonté et la force pour accomplir ce travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

J'adresse mes plus vifs remerciements à ma promotrice Mme DAGHBOUCH. Y., Professeur à l'université Saad Dahleb de Blida, pour son aide, ses conseils précieux, sa patience et sa disponibilité qui ont donné vie à ce travail malgré ses charges professionnelles.....Merci.

Un immense Merci à ma co-promotrice Mme Dr. BOUZIDI. N., maître de conférences à l'Université Saad Dahlab de Blida, pour sa gentillesse, sa patience et sa disponibilité, à qui j'exprime ici mon profond respect.....Merci.

Je tiens à remercier le Pr. M. ELHATTAB de m'avoir accueillie. Merci de m'avoir offert la possibilité de travailler dans un domaine qui me passionne.

Je désire aussi remercier Mme S. KASMI pour toute sa disponibilité et son aide.

Je tiens à remercier vivement Monsieur le président et tous les membres de jury pour l'honneur qu'ils me font d'avoir accepté de juger ce travail.

Finalement, je remercie tous ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce mémoire. A vous tous, un grand Merci.





Dédicace

Je dédie cet événement marquant de ma vie :

*A celui qui m'a indiqué la bonne voie en me rappelant que
la volonté fait toujours les grandes femmes : à ma mère.*

A celui qui m'a donné la force : à mon père

A celle qui me comble de tendresse : ma grande mère

A mes chères sœurs et frères

A toute ma famille

A mes chères amies

*Et enfin, à tous mes amies et camarades chimistes de
l'équipe « Chimie des Substances Naturelles »*

TABLE DES MATIERES

Résumé (Arabe, Français, Anglais)	i
Liste des abréviations	iv
Liste des figures	v
Liste des tables	ix
Introduction générale	01
Chapitre I: Partie théorique	
I. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)	02
I.1 Principe	02
I.2 Analyse qualitative	03
I.3 Analyse quantitative	03
II Les méthodes d'analyse quantitative	04
II.1 La méthode de calibration monovariante	05
II.2 La méthode de calibration multivariante	05
II.2.1 La chimiométrie	05
II.2.2 La calibration multivariée	06
II.2.3 Les méthodes de régressions usuelles pour le calibrage multivariante	07

II.2.4	Régression des moindres carrées partielle (PLS : Partial least squares)	07
II.2.4.1	Présentation	07
II.2.4.2	Historique	08
III	Description des monoterpènes utilisés comme étalons	09
III.1	Le classement des monoterpènes	09
III.2	Propriétés physico-chimiques des étalons utilisés	11
III.2.1	Thymol	11
III.2.2	Eucalyptol	12
III.2.3	Camphre	12
III.2.4	Menthol	13
IV	Thymol, camphre, eucalyptol et menthol dans le miel	14
V	Monoterpènes dans les algues	15
VI	Synthèse des travaux antérieurs PLS-IRTF	16
VI.1	Travaux antérieurs PLS-IRTF dans les substances naturelles	16
VI.2	Travaux antérieurs réalisés sur le thymol, l'eucalyptol, le camphre et le menthol dans le miel	17
Chapitre II : Partie expérimentale		
I	Introduction	18
II	Instrumentation et réactifs	18

II.1	Spectrophotométrie Infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)	18
II.2	Réactifs	19
III	Caractéristiques analytiques des quatre étalons dans les deux modes de calibration	20
III.1	Définition des gammes d'intégration	20
III.2	Caractéristiques analytiques des quatre étalons dans la calibration monovariante	20
III.2.1	Caractéristiques analytiques du thymol préparé directement dans CH ₂ Cl ₂	20
III.2.2	Caractéristiques analytiques d'eucalyptol préparé directement dans CH ₂ Cl ₂	24
III.2.3	Caractéristiques analytiques du camphre préparé directement dans CH ₂ Cl ₂	26
III.2.4	Caractéristiques analytiques du menthol préparé directement dans CH ₂ Cl ₂	28
III.3	La calibration multivariante	29
III.3.1	Optimisation du modèle PLS (Quant 1)	30
III.3.1	Optimisation du modèle PLS (Quant 1)	31
III.3.1.2	Préparation de la matrice de calibration	31
III.3.1.3	Les différentes étapes de l'éditeur de méthode Quant 1	31
III.3.1.4	Paramètres d'intégration de chaque composante	33
III.3.2	Paramètres analytiques de l'analyse Quant 1 des quatre composantes	33
IV	Détermination de Thymol, Eucalyptol, Camphre et Menthol dans les échantillons réels par PLS-IRTF	37

IV.1	Détermination de Thymol, Eucalyptol, Camphre et Menthol dans les échantillons réels par PLS-FTIR	47
IV.1.1	Procédure générale de préparation des échantillons	47
IV.1.2	Spectre IRTF du miel d'Algérie dilué dans le CH ₂ Cl ₂	47
IV.1.3	Analyse PLS-IRTF des échantillons enrichis et dilué directement dans CH ₂ Cl ₂	49
IV.1.3.1	Spectre IRTF des échantillons réels enrichis et dilués directement dans CH ₂ Cl ₂	49
IV.1.3.2	Analyse PLS-IRTF des échantillons enrichis	49
IV.2	Préconcentration par extraction liquide-liquide (ELL)	52
IV.2.1	Calibration PLS-IRTF après traitement par ELL	54
IV.2.1	Calibration PLS-IRTF après traitement par ELL	58
IV.2.2.1	Analyse PLS-IRTF du miel (d'Algérie) après ELL	58
IV.2.2.2	Analyse PLS-IRTF du miel de (France) après ELL	59
IV.2.2.3	Analyse PLS-IRTF de l'extrait d'algue brune (<i>C.Tamaisrcifolia</i>) après ELL	61
IV.3	Analyse IRTF des échantillons après extraction en phase solide (EPS)	63
IV3.1	Spectres IRTF des échantillons enrichis après extraction (EPS)	64
IV.3.2	Analyse PLS-IRTF des échantillons enrichis après EPS	66
	Conclusion générale	67
	Références bibliographiques	69

Résumé

Après l'exécution, pour la première fois au sein de notre équipe de recherche, d'un nouveau logiciel de calibration multivariée PLS-FTIR, le développement d'un module de calibration, moyennant ce logiciel est réalisé.

Pour mettre en évidence l'intérêt pratique d'un tel logiciel et la simplicité et la rapidité du modèle développé, une étude comparative entre les deux modes de calibration monovariante et multivariante est effectuée.

Pour établir le modèle de calibration multivariante, huit solutions étalons contenant les quatre analytes (thymol, eucalyptol, camphre et menthol) dans des proportions différentes sont utilisées.

Les résultats de la modélisation indiquent que le modèle PLS-FTIR est adéquat pour la détermination simultanée des quatre analytes en fournissant un coefficient de corrélation compris entre 1 et 0.995 et une précision d'analyse faible.

Mots clés : Calibration multivariante et multicomposée, spectrométrie IRTF, PLS, thymol, eucalyptol, camphre, menthol, miel, algue brune (*C. Tamariscifolia*).

Abstract

After the execution, for the first time in our research team, a new calibration software multivariate PLS-FTIR, the development of a calibration module, with this software is made.

To demonstrate the practical relevance of such software and the simplicity and speed of the developed model, a comparative study between the two methods of calibration univariate and multivariate is performed.

To establish the calibration model multivariate eight standard solutions containing the four compounds (thymol, eucalyptol, camphor and menthol) in different proportions are used. The modeling results indicate that the PLS-FTIR model is adequate for the simultaneous determination of the four compounds by providing a correlation coefficient between 1 and 0.995 and a low accuracy analysis.

Keywords: Multivariate Calibration and multicomponents, FTIR spectrometry, PLS, thymol, eucalyptol, camphor, menthol, honey, brown algae (*C. tamariscifolia*).

ملخص

بعد التنفيذ ولأول مرة في فريق أبحاثنا، لبرنامج جديد لمعايرة متعددة المتغيرات PLS-FTIR و تطوير وحدة المعايرة المتمثلة في هذا برنامج

للتدليل على الأهمية العملية لمثل هذه البرامج وبساطة وسرعة النموذج المطور، تم تنفيذ دراسة مقارنة بين طريقتين للمعايرة احيدة و متعددة المتغير .

لإنشاء نموذج المعايرة لمتعدد المتغيرات تم استخدام ثمانية محاليل قياسية التي تحتوي على المركبات الأربعة (الثيمول، لوكالبيتول، الكافور والمنثول) بنسب مختلفة .

للتحديد في ان واحد الاربع مركبات السابقة من خلال توفير مناسب PLS-FTIR , نتائج النمذجة تشير إلى أن نموذج معامل الارتباط المحدود بين 1 و 0995 ودقة تحليل منخفضة

الكلمات المفتاحية : المعايرة متعددة المتغيرات والمتعددة المكونات , الثيمول، لوكالبيتول، الكافور و المنثول، العسل , الطحلب البني.(C tamariscifolia) PLS

Liste des abbreviations

CLHP : Chromatographie Liquide à Haute Performance

IRTF : Infrarouge à Transformée de Fourier

CH₂Cl₂ : Dichlorométhane

LD : Limite de Détection

DSR : Déviation Standard Relative

DC : Domaine de Concentration

EPS : Extraction en Phase Solide

ELL : Extraction Liquide Liquide

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Schéma d'un spectromètre IR à transformée de Fourier	03
Figure 2	Schéma représentative de la chimiométrie	07
Figure 3	Classement des monoterpènes	11
Figure 4	Structures de monoterpènes et leurs sources	12
Figure 5	Thymol	13
Figure 6	Eucalyptol	13
Figure 7	Camphre	14
Figure 8	Menthol	14
Figure 9	Les plaques de « Apilife VAR »	16
Figure 10	Montage IRTF utilisé pour l'introduction des solutions	22
Figure 11	Définition des gammes d'intégration	23
Figure 12	Spectres IRTF d'absorbance d'une série d'étalons de thymol préparée directement dans CH_2Cl_2	24
Figure 13	Spectres IRTF d'absorbance d'une série d'étalons d'eucalyptol préparée directement dans CH_2Cl_2 , pour un domaine de concentration compris entre 0,5- 5 mg. ml^{-1}	27
Figure 14	Spectres IRTF d'absorbance d'une série d'étalons de camphre préparée directement dans CH_2Cl_2	29
Figure 15	Spectres IRTF d'absorbance d'une série d'étalons de menthol préparée directement dans CH_2Cl_2	31

Figure 16	Fenêtres de l'logiciel Quant 1 d'OPUS 6.5	33
Figure 17	Assistant de l'éditeur de méthodes Quant 1	36
Figure 18	Spectres IRTF de (1) thymol, (2) Eucalyptol, (3) Camphre, et (4) Menthol (la concentration de chaque composante est de 5 mg.ml ⁻¹) et d'une solution étalons (5) contenant (25% thymol, 25% eucalyptol, 25% camphre et 25% menthol)	39
Figure 19	Représentation graphiques des paramètres analytiques pour le thymol	42
Figure 20	Représentation graphiques des paramètres analytiques pour l'eucalyptol	44
Figure 21	Représentation graphiques des paramètres analytiques pour le camphre	46
Figure 22	Représentation graphiques des paramètres analytiques pour le menthol	48
Figure 23	Protocole de la dilution directe des échantillons dans CH ₂ Cl ₂	50
Figure 24	Spectre IRTF du miel d'Algérie préparé directement dans le CH ₂ Cl ₂	51
Figure 25	Spectres IRTF d'absorbance des échantillons réels enrichis, miel d'Algérie (A), miel de France (B), extrait d'algue (C), solution étalon de (70% Thymol, 10% Eucalyptol, 10% Camphre, 10% Menthol) (D).	52
Figure 26	Protocole d'extraction par ELL	55
Figure 27	Spectres d'absorbance des solutions étalons après ELL et dilution dans CH ₂ Cl ₂	58
Figure 28	Spectres IRTF d'absorbance du miel (d'Algérie) enrichi (A) après ELL dans CH ₂ Cl ₂ et d'une solution étalon (B) contenant les 4 composés dans une proportion de (70% thymol, 10% eucalyptol, 10% camphre et 10% menthol)	60

Figure 29	Spectres IRTF d'absorbance du miel (de France) enrichi (A) après ELL dans CH ₂ Cl ₂ et d'une solution étalon (B) contenant les 4 composés dans une proportion de (70% thymol, 10% eucalyptol, 10% camphre et 10% menthol)	62
Figure 30	Spectres IRTF d'absorbance de l'extrait d'algue brune (<i>C.Tamariscifolia</i>) enrichi (A) après ELL dans CH ₂ Cl ₂ et d'une solution étalon (B) contenant les 4 composés dans une proportion de (70% thymol, 10% eucalyptol, 10% camphre et 10% menthol)	64
Figure 31	Protocole d'extraction en phase solide l'EPS	66
Figure 32	Spectres IRTF d'absorbance des échantillons enrichis (A) miel (d'Algérie), (B) miel de (France) , (C) extrait d'algue brune (<i>C.Tamariscifolia</i>) après EPS dans CH ₂ Cl ₂ et d'une solution étalon (D) contenant les 4 composés dans une proportion de (70% thymol, 10% eucalyptol, 10% camphre et 10% menthol)	68

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Propriétés physico-chimiques de thymol, eucalyptol, camphre, et menthol	15
Tableau 2	Les calculs d'intégration pour la bande 1151 (1200-1132) cm^{-1} avec un seul mode d'intégration R	25
Tableau 3	Caractéristiques analytiques du thymol préparé directement dans CH_2Cl_2 dans un domaine de 0.5 – 5 mg.ml^{-1}	26
Tableau 4	Caractéristiques analytiques de l'eucalyptol préparé directement dans CH_2Cl_2 dans un domaine de 0.5 – 5 mg.ml^{-1}	28
Tableau 5	Caractéristiques analytiques du camphre préparé directement dans CH_2Cl_2 dans un domaine de 0.5 – 5 mg.ml^{-1} .	30
Tableau 6	Caractéristiques analytiques du menthol préparé directement dans CH_2Cl_2 dans un domaine de 0.5 – 5 mg.ml^{-1} .	32
Tableau 7	Composition des solutions étalons (matrice de la calibration)	35
Tableau 8	Détermination des bandes communes et séparées pour les quatre composantes : thymol, eucalyptol, camphre et menthol	37
Tableau 9	Les résultats de calibrage pour le Thymol	41
Tableau 10	Les résultats de calibrage pour l'eucalyptol	43
Tableau 11	Les résultats de calibrage pour le Camphre	45
Tableau 12	Les résultats de calibrage pour le Menthol	47
Tableau 13	Résultats de prédiction des 4 composés dans les trois échantillons : enrichis.	54
Tableau 14	Préparation des solutions étalons pour établir la droite de calibration	58
Tableau 15	Caractéristiques analytiques et résultats de l'analyse Quant 1 du thymol, eucalyptol, camphre et menthol obtenues après traitement	60

II	Instrumentation et réactifs	18
II.1	Spectrophotométrie Infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)	18
II.2	Réactifs	19
III	Caractéristiques analytiques des quatre étalons dans les deux modes de calibration	20
III.1	Définition des gammes d'intégration	20
III.2	Caractéristiques analytiques des quatre étalons dans la calibration monovariante	20
III.2.1	Caractéristiques analytiques du thymol préparé directement dans CH ₂ Cl ₂	20
III.2.2	Caractéristiques analytiques d'eucalyptol préparé directement dans CH ₂ Cl ₂	24
III.2.3	Caractéristiques analytiques du camphre préparé directement dans CH ₂ Cl ₂	26
III.2.4	Caractéristiques analytiques du menthol préparé directement dans CH ₂ Cl ₂	28
III.3	La calibration multivariante	29
III.3.1	Optimisation du modèle PLS (Quant 1)	30
III.3.1	Optimisation du modèle PLS (Quant 1)	31
III.3.1.2	Préparation de la matrice de calibration	31
III.3.1.3	Les différentes étapes de l'éditeur de méthode Quant 1	31
III.3.1.4	Paramètres d'intégration de chaque composante	33
III.3.2	Paramètres analytiques de l'analyse Quant 1 des quatre composantes	33

Introduction

Introduction générale

La calibration monovariante est la méthode de mesure la plus usuelle, son principe théorique est simple à comprendre mais très laborieuse et nécessitant un temps très important pour la validation afin d'atteindre l'information chimique recherchée [1].

En parallèle, l'apparition de la nouvelle méthode de calibration multivariante a facilité l'exploitation et l'obtention des différents paramètres analytiques de validation en un temps très rapide bien que, le principe théorique de cette méthode d'analyse est assez complexe.

La méthode de calibration multivariante la plus utilisée pour le traitement des données spectroscopiques IRTF est la régression des moindres carrés partiels (PLS). Les travaux réalisés dans ce domaine de recherche (PLS-IRTF) s'intéressent généralement, au développement de modèles dans les différentes zones de spectres de l'infrarouge (PIR-MIR, LIR), ou à la détermination simultanée d'analytes dans des matrices complexes.

Le développement de modèle d'analyse quantitative par PLS-FTIR, estimé simple, rapide, précis et disponible, s'avère nécessaire dans notre laboratoire du fait de l'orientation de son axe de recherche vers les substances naturelles qui ont une composition complexe et variable.

L'objectif de ce travail est double :

D'un côté l'étude, concerne l'exécution, d'un nouveau logiciel de calibration multivariante PLS-IRTF pour la première fois au sein de notre équipe de recherche, et de l'autre côté, elle est orientée sur le développement d'un modèle de calibration, moyennant ce logiciel.

Le contenu de ce mémoire s'organise en deux chapitres:

Le premier chapitre présente une partie théorique générale sur les connaissances de bases de cette étude.

Le deuxième chapitre comporte une partie expérimentale qui a pour objet d'une part de développer un modèle de calibration multivariante et multicomposé pour la détermination simultanée de Thymol, Eucalyptol, Camphre et Menthol dans des échantillons réels enrichis (deux variétés de miel produits en Algérie et en France ou dans l'extrait d'algue brune (*C.Tamariscifolia*), et d'autre part illustrer la simplicité et la rapidité de cette procédure quantitative en comparaison avec le mode de calibration monovariante.

Enfin, une conclusion générale qui résume les principaux résultats obtenus.

Chapitre I

Partie théorique

I. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

Le rayonnement infrarouge (IR) fut découvert en 1800 par Frédéric Wilhelm Hershel. Ces radiations localisées au-delà des longueurs d'onde dans le rouge, sont situées dans le domaine infrarouge entre 14000 et 10 cm^{-1} .

A cause de sa grande extension et de la différence en application et instrumentation la région de l'infrarouge est divisée en 3 zones, le proche infrarouge (NIR) s'étend de 14000 à 4000 cm^{-1} le moyen infrarouge (MIR) s'étend de 4000 jusqu'à 380 cm^{-1} et le lointain infrarouge (FIR) s'étend de 380 à 10 cm^{-1} [2].

I.1. Principe

La spectrométrie IRTF est une technique d'analyse physico-chimique, utilisant un faisceau infrarouge qui provoque une vibration spécifique des groupements fonctionnels de chacune des molécules qui lui est exposée. Au moyen d'un traitement algorithmique (transformée de Fourier), ces vibrations se traduisent par la construction d'un spectre dont le profil correspond à la présence spécifique d'une ou plusieurs molécules. Ainsi, la spectrométrie IRTF a été utilisée pour analyser qualitativement et quantitativement plusieurs types de composés chimiques et biologiques [3].

Grâce à un système optique appelé interféromètre de Michelson (figure 1), des balayages rapides, permettant l'accumulation d'un grand nombre de spectres, sont devenus possibles et, par conséquent la qualité des spectres s'est bien perfectionnée par l'amélioration du rapport signal / bruit, de la précision photométriques et ce, en un temps de mesure court (un spectre IR est acquis en 30 secondes environ par accumulation de 10 spectres) [4].

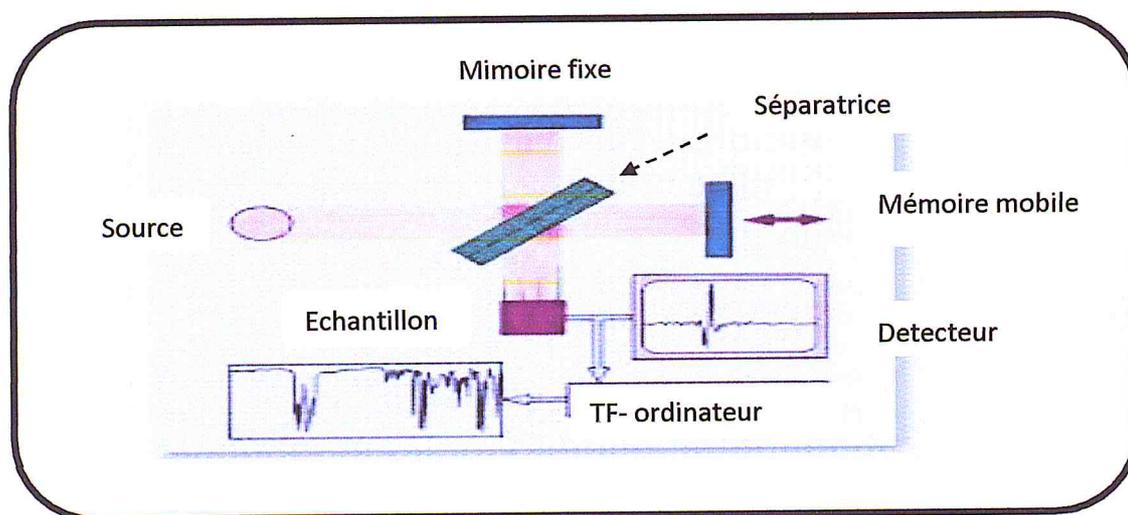


Figure 1 : Schéma d'un spectromètre IR à transformée de Fourier

I.2. Analyse qualitative

L'analyse qualitative par spectrométrie infrarouge est la méthode la plus universelle vu la quantité d'information obtenue. Le spectre infrarouge d'une molécule est une fonction des atomes constituant cette molécule et des forces de liaison qui les lient. Une molécule non linéaire constituée de N atomes présente un spectre pouvant comporter jusqu'à $(3N-6)$ bandes d'absorption. En général, ce nombre est inférieur pour des raisons de symétrie.

On conçoit bien que ce spectre sera très sensible aux modifications de structure, donc très spécifique de la molécule ; on considère d'ailleurs la section de droite inférieure à 1500 cm^{-1} du spectre infrarouge comme empreinte digitale de la molécule. En particulier, les isomères cis et trans des alcènes, les isomères ortho, méta, para des hydrocarbures aromatiques se différencient aisément. Il existe toutefois une limitation dans une série homologue, les composés de haut poids moléculaire ont des spectres pratiquement identiques [5].

I.3. Analyse quantitative

L'analyse quantitative par infrarouge est basée sur l'utilisation de la loi de Beer-Lambert qui établit une relation entre les mesures d'absorbances et la concentration des espèces à déterminer. Des analyses quantitatives à 10% sont relativement aisées à obtenir, pour des analyses plus précises (moins de 1% en solution) il est nécessaire de s'assurer que les spectres sont enregistrés dans les conditions optimales [6]. Différentes méthodes analytiques peuvent être choisies selon le cas. On peut citer la méthode de calibration externe ou la méthode des additions standards.

La spectrométrie IRTF présente plusieurs avantages, tel que : le caractère non destructif, la bonne résolution des spectres, l'identification spécifique, liens chimiques, ainsi que la rapidité et la simplicité. Bien que la spectrométrie IRTF est devenue l'une des techniques d'analyse quantitative utilisée dans le plus grand nombre de disciplines scientifiques, elle présente des inconvénients, à savoir sa grande sensibilité à l'eau et au CO_2 en plus, l'absence d'indication sur la localisation des molécules. Cette technique a été utilisée dans plusieurs travaux scientifiques [7,8].

II. Méthodes d'analyse quantitative

Une analyse chimique peut être définie comme une suite d'opérations élémentaires, statistiquement indépendantes les unes des autres (c.à.d. que l'erreur expérimentale associée à chaque opération élémentaire est sans influence sur les autres ; par exemple, l'erreur de lecture sur un appareil de mesure ne dépend pas de l'erreur de pesée et inversement), qui commencent au moment de la prise d'essai et aboutissent à l'expression d'un résultat d'analyse qu'il faudra valider pour pouvoir disposer enfin d'une donnée analytique, exprimé le plus souvent sous forme d'une concentration.

Pour la mesure, on dispose d'un très grand nombre de méthodes qu'on trouvera décrites dans des ouvrages généraux [9]. Des ouvrages consacrés à un domaine d'application particulier [10], qui permettent d'approfondir l'étude de telle ou telle méthode. Mais il est important de remarquer que la méthode d'analyse correspond à une combinaison de l'étape de traitement de l'échantillon analytique et de l'étape de la mesure, ces deux étapes sont interdépendantes et si l'on est confronté au choix d'une méthode d'analyse une réflexion devra donc simultanément porter sur ces 2 étapes et il faut les prendre globalement en compte pour valider la méthode.

Pour la méthode de mesure, on a pour habitude d'utiliser la **méthode de calibration monovariante**, méthode dont le principe théorique est simple à comprendre mais très laborieuse et nécessitant un temps très important pour la validation (c.à.d. la détermination des différents paramètres analytiques à savoir : domaine de linéarité et sensibilité, limites de détection et de quantification, précision et fidélité (répétabilité) ; exactitude et reproductibilité, rapidité et coût) et pour atteindre enfin l'information chimique recherchée.

La **méthode de calibration multivariante** est une méthode analytique assez nouvelle, mais elle a déjà eu un impact énorme sur le terrain spectroscopique, à un point tel que le logiciel de chimiométrie est aujourd'hui intégré avec l'instrumentation en tant que norme de développement. Cette approche est une réflexion sur la façon dont peuvent s'appliquer quelques notions statistiques bien connues à un ensemble de résultats d'analyses chimiques. Le principe théorique de cette méthode d'analyse est assez complexe mais son exploitation et utilisation est très facile et rapide.

II.1. Méthode de calibration monovariante

La calibration monovariante consiste à modéliser le signal de sortie du capteur (appelé X variable) en fonction de la variable mesurée (appelée Y variable). Pendant l'étalonnage, les Y variables, considérées comme étalons, sont évaluées, ainsi que les X variables associées.

Le modèle est alors une fonction $F: Y = F(X)$

On peut alors évaluer la fonction f qui est généralement une droite de régression, on fait alors l'hypothèse de linéarité [11].

II.2. Méthode de calibration multivariante

II.2.1. Chimométrie

La chimométrie est la discipline qui combine les mathématiques et les méthodes statistiques pour sélectionner les procédures expérimentales optimales et pour extraire le maximum d'information des données issues d'analyse chimique [12]. La chimométrie regroupe l'ensemble des méthodes de planification des expériences, des méthodes d'extraction de l'information (modélisation, classification et test d'hypothèse et des techniques permettant de comprendre des mécanismes chimiques (relation structure / activité des molécules) ou de modéliser un procédé [13,14]. La chimométrie est encore en évolution et la définition peut être modifiée de temps à autre afin d'y inclure tous les nouveaux développements. La chimométrie a été introduite à la fin des années 1960 par un certain nombre d'études de recherches en chimie, principalement dans le domaine de la chimie organique, analytique et physique. Les raisons de développement de la chimométrie sont liées principalement à :

- l'introduction d'instruments donnant des réponses à plusieurs variables pour chaque échantillon analysé.
- la disponibilité des ordinateurs puissants et sophistiqués [15].

La chimométrie consiste à modéliser les variations d'un certain nombre de variables, que nous appellerons Y variables dont l'obtention est délicate (nécessitant une analyse chimique par exemple) en fonction d'autres variables appelées X variables mesurables, et on distingue 2 opérations:

1- **L'étalonnage** : en laboratoire (modélisation) où toutes les mesures de variables doivent être réalisées et où le modèle « prédictif » est calculé.

2- La **prédiction** : utilisation courante « sur le terrain », où seules les variables X sont mesurées, les autres, Y, étant calculées à l'aide du modèle (Figure 2) [16,17].

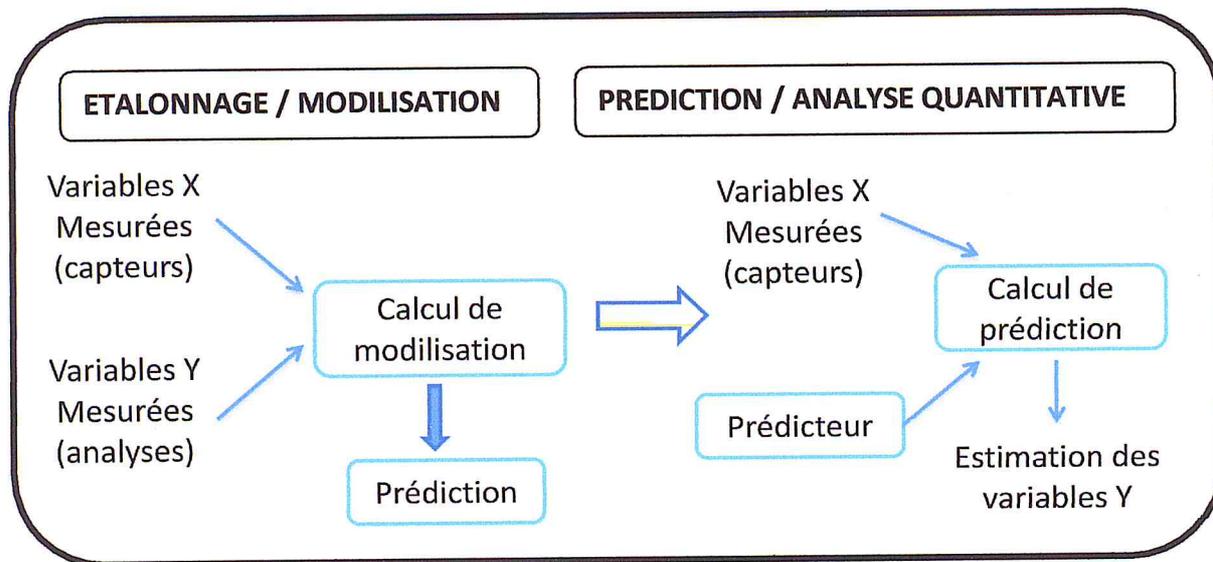


Figure 2 : Schéma représentative de la chimimétrie

II.2.2. Calibration multivariée

La calibration multivariée est l'application la plus réussie de la combinaison de la chimimétrie et des données spectrales [15].

Les modèles multivariés de calibration sont d'importance pour beaucoup de mesures analytiques, en particulier pour des données spectroscopiques [18].

La calibration multivariée a toujours été une pierre angulaire majeure de la chimimétrie appliquée à la chimie analytique. Cependant, il ya un grand nombre de raisonnements de diverses écoles. Pour certains, la chimimétrie implique la calibration multivariée. Certains groupes scandinaves et nord-américains ont fondé une grande partie de leur développement au cours des deux dernières décennies principalement sur les applications des algorithmes des régressions des moindres carrés partiels (PLS), alors que le texte classique par Massart et les collègues ne mentionne pas l'expérience PLS. L'étalonnage multivarié est considéré par certains comme une grande batterie d'approches à l'interprétation des données analytiques [19].

II.2.3. Méthodes de régressions usuelles pour le calibrage multivariable

Il a été proposé plusieurs méthodes pour le calibrage multivariable, il s'avère que plusieurs de ces méthodes ne s'exécutent que pareillement pour éviter la confusion due à l'utilisation de beaucoup de différentes méthodes :

- Régression linéaire multiple (MLR)
- Régression de composant principal (PCR)
- Régression des moindres carrés partielle (PLS)
- Régression de réseaux neurologiques (NN)
- Régression localement pesée (LWR)
- Fonctions de base radiales combinées avec PLS (RBF-PLS)

II.2.4. Régression des moindres carrés partielle (PLS : Partial least squares)

II.2.4.1. Présentation

La régression des moindres carrés partiels (PLS) en anglais (Partial Least Squares régression) est parmi les méthodes de chimiométrie de la calibration multivariable les plus utilisées.

La régression PLS est donc une extension du modèle de régression linéaire multiple. Dans sa forme la plus simple, un modèle linéaire spécifie la relation (linéaire) entre une (ou des) variables dépendantes (réponses) Y et un ensemble de variables prédictives X telles que :

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + \dots + b_pX_p$$

Où les b_i sont les coefficients de régression [20].

Dans beaucoup de problèmes d'analyse de données, l'estimation de la relation linéaire entre deux variables est adéquate pour décrire les données observées et pour faire de bonnes prévisions pour de nouvelles observations.

La régression PLS est basée sur un modèle bilinéaire et donne les solutions satisfaisantes dans la plupart des cas, où un rapport linéaire ou quasi linéaire existe entre les spectres expérimentalement mesurés et la propriété de cible à déterminer (par exemple, concentration). Cependant, le PLS n'est pas toujours la meilleure méthode, particulièrement dans les situations où un modèle non linéaire complexe est exigé pour modéliser le rapport entre les spectres mesurés et la propriété à déterminer [21]. Le PLS peut être un outil utile quand il y a une connaissance partielle des données [22].

Il est, cependant, important de savoir que la force historique (et économique) majeur dans ce domaine est liée à l'utilisation de PLS dans la spectroscopie proche infrarouge (NIR), à un point tel que de nombreux paramètres statistiques NIR et chimiométrie sont presque indissociables, et ce notamment, dans le contrôle des processus industriels et de la chaîne de production où le nombre de variables peut atteindre une certaine [6]. Du fait que, chaque type de spectroscopie et de chromatographie a ses propres caractéristiques et problèmes, des logiciels ont été développés pour faire face aux situations spécifiques qui ne sont pas nécessairement très applicables à d'autres techniques comme la chromatographie ou RMN ou MS. En conclusion, les approches chimiométriques à l'étalonnage ont un très large potentiel d'application dans tous les domaines de la chimie analytique quantitative et recherche dans ce domaine ne cesse de croître pour découvrir de nouveaux modèles d'analyses [23].

Comparé à d'autres méthodes de régression pour des données colinéaires, il a été établi que le plus grand avantage de PLSR est que "l'information dans la variable Y est utilisée", mais c'est une notion qu'il est difficile d'établir statistiquement. Un avantage plus évident est que la méthode rend possible la combinaison de la prédiction avec l'étude d'une structure latente dans les variables X et Y . Ainsi, la méthode demande souvent moins de composantes que PCR pour donner une bonne prédiction. Avec la facilité d'implémentation, cela a rendu cette méthode très populaire en chimie, en particulier en spectroscopie, mais les applications dans d'autres domaines sont aussi très répandues.

II.2.4.2. Historique

1966 : Herman Wold [24] publie un ouvrage introduisant le PLS, alors appelée NonLinear Iterative Partial Least Squares NIPALS. Un modèle conçu pour l'estimation des modèles d'équations structurelles sur les variables latentes. Il en résulte une représentation "classique" de la régression PLS sous la forme d'un algorithme.

1983 : Svante Wold (le fils d'Herman) et Harold Mertens [25] adaptent NIPALS au problème de régression avec trop de prédicteurs et appellent PLS cette adaptation de l'algorithme.

1990 : Stone et Brooks [26] introduisent le PLS dans le contexte du "Continuum Regression" (elle ajoute un paramètre continu λ autorisant la méthode de modélisation à varier continuellement entre MLR "Multiple Linear Regression" ($\lambda = 0$), PLS ($\lambda = 0.5$) et PCR "Principal Component Regression" ($\lambda = 1$)). Ce qui signifie une première projection sériuse du PLS dans un contexte statistique.

1998 : Tenenhaus [27] écrit un ouvrage entièrement en français dédié à cette méthode. Plus récemment la littérature concernant la méthode PLS s'est largement étoffée, surtout dans le journal "Chemometric".

III. Description des monoterpènes utilisés comme étalons

III.1. Classement des monoterpènes

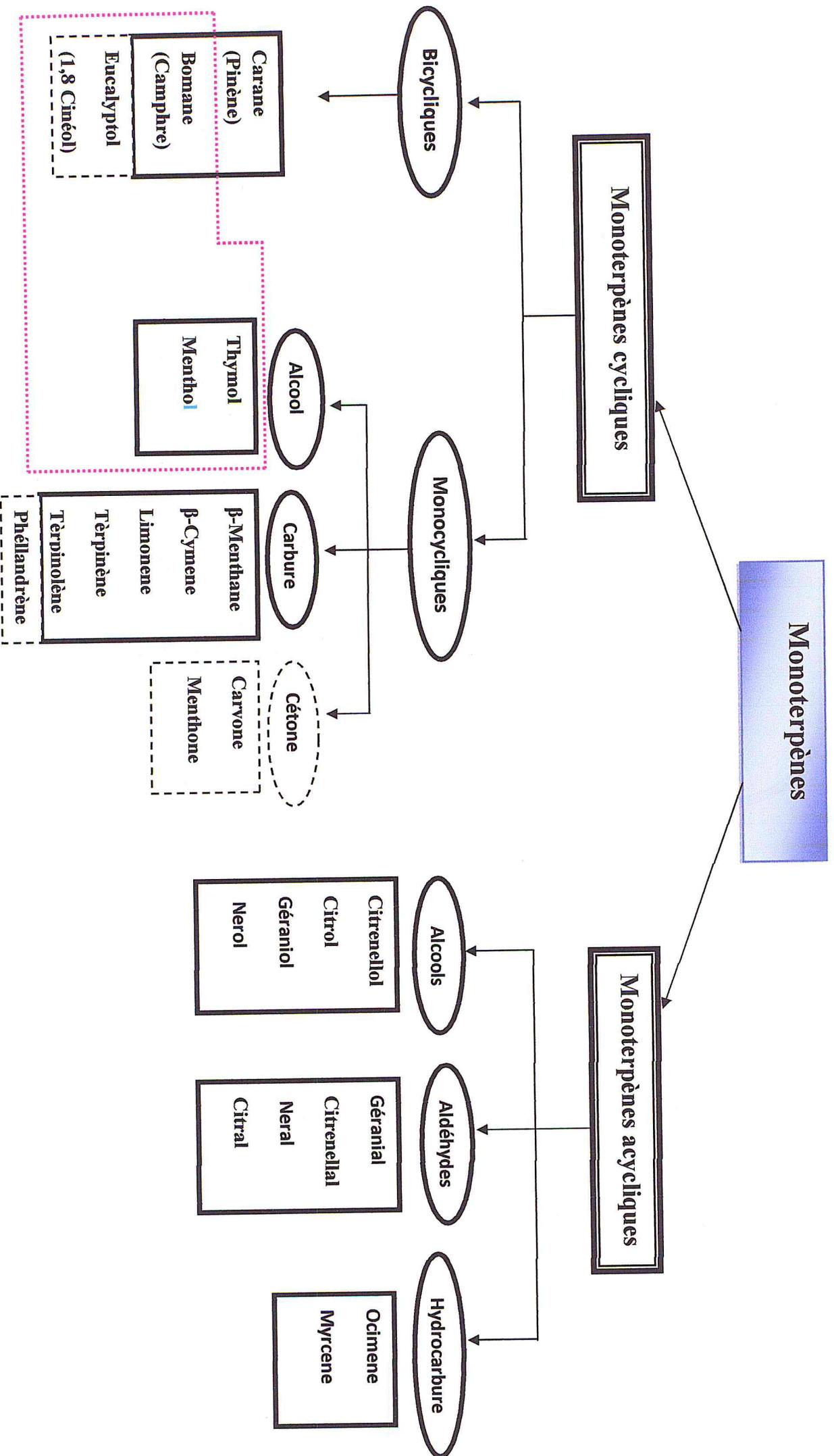
Les métabolites secondaires des végétaux peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes, par opposition aux métabolites primaires (protéines lipides et glucides) qui alimentent les grandes voies du métabolisme basal. Ces métabolites secondaires exercent cependant une action déterminante sur l'adaptation des plantes à leur environnement. Ils participent ainsi, de manière très efficace, à la tolérance des végétaux à des stress variés (attaques de pathogènes, prédateurs d'insectes, sécheresse, lumière UV).

On trouve des métabolites secondaires dans toutes les parties des plantes, mais ils sont distribués différemment selon leurs rôles défensifs. Cette distribution varie d'une plante à l'autre.

On peut classer les métabolites secondaires en plusieurs grands groupes : parmi ceux-ci, les composés phénoliques, les terpènes, les stéroïdes et les composés azotés dont les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine [28].

Les terpénoïdes possèdent un rôle écologique lors des interactions végétales, comme agents allélopatiques, c'est-à-dire inhibiteurs de la germination, mais aussi lors des interactions végétal-animal, comme agent de protection contre les prédateurs tels que les insectes [29].

Les monoterpènes sont une classe de terpènes constitués de deux molécules d'isoprène (C_5H_8). Ils peuvent être linéaires, monocycliques, (thymol, menthol) ou bicycliques (camphre, eucalyptol ou « cinéole ») (Figure 3). Les fonctions des monoterpènes sont multiples. Certains protègent les plantes des prédateurs, inhibent la multiplication des bactéries et/ou champignons.



*Les lignes en pointillé (noir) ont été ajoutées par rapport à la référence

*Les lignes en pointillé (rouge), les standards utilisés dans cette étude

Figure 3 : Classement des monoterpenes [30]

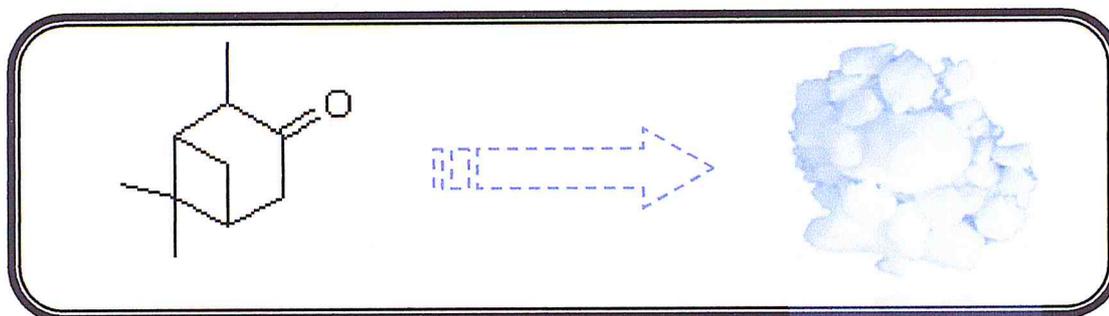


Figure 7 : Camphre

Il est inflammable mais non explosif (il entre cependant dans la composition de mélanges explosifs). Par contre, ses vapeurs mélangées à l'air peuvent exploser [35].

III.2.4. Menthol

Le menthol est un composé organique (Figure 8) covalent obtenu soit par la synthèse, soit depuis l'extraction à partir de l'huile essentielle de menthe poivrée ou d'autres huiles essentielles de menthe. Il appartient à la famille des monoterpènes. A température ambiante (20 à 25 C°), il se trouve sous forme solide, d'une couleur d'un blanc cireux. Il fond si l'on augmente légèrement la température. Le menthol a des propriétés anti-inflammatoires et antivirales. Il est d'ailleurs utilisé pour soulager les irritations mineures de la gorge. Il est également un anesthésique local [36, 37].

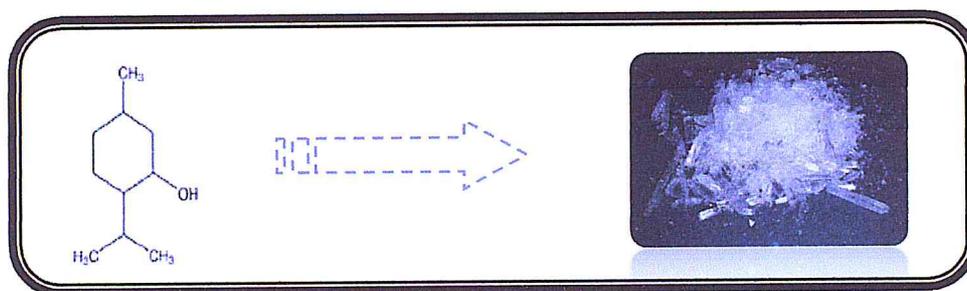


Figure 8 : Menthol

Le tableau 1 récapitule quelques propriétés physico-chimiques des monoterpènes considérés dans ce travail.

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques de thymol, eucalyptol, camphre, et menthol

Monoterpènes	Nom UCPA	Formule brute	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Température d'ébullition (C°)	Masse volumique (g.cm ⁻³)
Thymol	5-méthyl-2-(propan-2-yl)-phénol	C ₁₀ H ₁₄ O	150.2	233	0.97 – 0.93
Eucalyptol (Cinéole)	1,3,3-triméthyl-2-oxabicyclo[2,2,2]octane	C ₁₀ H ₁₈ O	154.2	176 à 177	0.9225
Camphre	1,7,7-Triméthylbicyclo(2,2,1)heptan-2-one	C ₁₀ H ₁₆ O	152,3	204	0.992
Menthol	(1R,2S,5R)-5-méthyl-2-(propane-2-yl)cyclohexanol	C ₁₀ H ₂₀ O	156.2	212	0.903

IV. Thymol, camphre, eucalyptol et menthol dans le miel

Le miel est la substance naturelle sucrée produite par l'abeille *Apis mellifera* à partir soit du nectar de plantes, soit de sécrétions provenant de parties vivantes de plantes ou soit d'excrétions d'insectes butineurs laissées sue les parties vivantes de plantes. C'est ainsi que les abeilles butinent, transforment en les combinant avec des substances spécifiques qu'elles sécrètent elles-mêmes, déposent, déshydratent, emmagasinent et laissent affiner et murir dans les rayons de la ruche [38].

Depuis le début des années 80, les apiculteurs sont confrontés à l'apparition du *Varroa destructor*, acarien parasite de l'abeille, responsable de l'affaiblissement des colonies d'abeilles.

L'Apilife VAR dont le thymol est constitué la principale matière active, est un varroacide efficace enregistré depuis 1996 en Suisse dans la lutte contre l'acarien *Varroa* [39].

L'Apilive VAR se compose d'une plaque de vermiculite (mousse céramique poreuse) d'une dimension de 5 x 9 x 1 cm, imprégnée d'un mélange de thymol (76 %), d'eucalyptol (16.4%), camphre (3.8%), et de menthol (3.8%) (Figure 9). L'effet varroacide de la substance active principale soit le thymol, a déjà été décrit il y a plusieurs années dans des travaux effectués en Italie et en Russie [40].

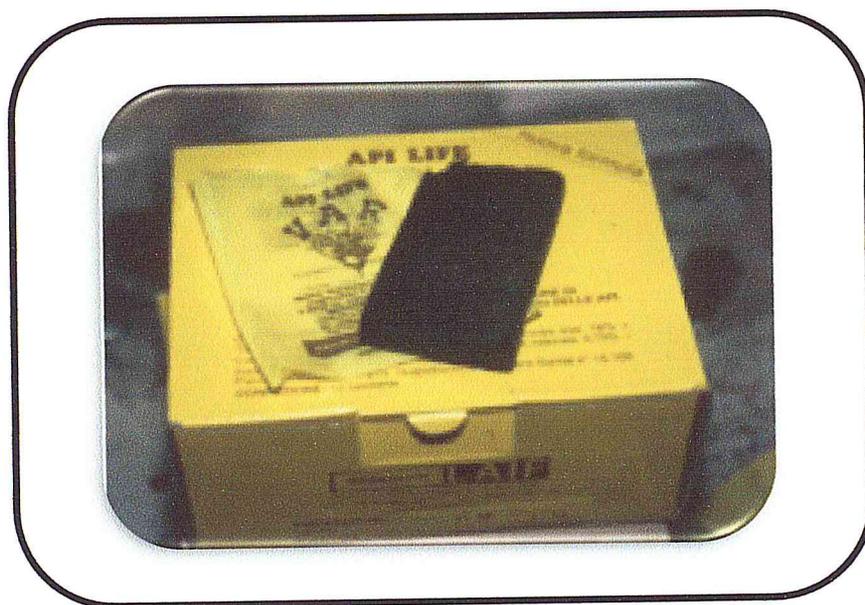


Figure 9 : Les plaques de « Apilife VAR »

V. Monoterpènes dans les algues

Les algues sont le plus souvent des végétaux chlorophylliens et réalisent la photosynthèse. Elles sont présentes dans tous les milieux, marins, dulçaquicole et même aérien. Elles ont des formes et des dimensions très diverses. La composition chimique des algues est variable, elles contiennent généralement des pigments (chlorophylles, carotènes, xanthophylles*...), des polysaccharides, des acides gras, des stérols, des dérivés terpéniques, des composés phénoliques et d'autres dérivés [41-42].

Plusieurs travaux ont porté sur l'étude des dérivés terpéniques dans les algues. Au même titre que les composés diterpéniques et les sesquiterpènes, les monoterpènes constituent une classe de composés isopréniques chez les macroalgues, les rhodophycées en renferment le pourcentage le plus élevé [43, 44]. Une étude a montré l'existence du 1,8 cinéole dans les algues avec une concentration qui varie de 2-3 $\mu\text{g.L}^{-1}$ [45].

VI. Synthèse des travaux antérieurs PLS-IRTF

VI.1. Travaux antérieurs PLS-IRTF dans les substances naturelles

Différents travaux ont été menés en utilisant le PLS-IRTF et en s'intéressant d'un côté aux régions spectrales de mesure dans les différentes zones de l'infrarouge IRTF (PIR – MIR - LIR) et d'autre côté aux matrices ciblées

❖ D'après A. Kohman et al [46]

Le but de ce travail était de développer une méthode de spectroscopie infrarouge moyen pour une détermination simultanée rapide et précise de sucre et d'acides organiques contenus dans le fruit d'abricot, en utilisant la réflexion totale atténuée (ATR). Le potentiel de cette méthode couplée à des techniques de chimiométrie basé sur la méthode des moindres carrés partiels (PLS) a été évalué par comparaison avec la détermination enzymatique actuellement utilisée par le saccharose, le glucose, le fructose, l'acide malique et l'acide citrique. Les fruits récoltés à différents stades de maturation et au hasard répartis dans un ensemble d'étalonnage (505 abricots) et un ensemble de validation (252 abricots). Les bonnes performances de prédiction ont été obtenues ($R^2 \geq 0,74$ et 18% de RMSEP).

❖ D'après N. Nicolaou et al [47]

L'intérêt de cette étude était de vérifier la précision et la validité de la spectroscopie IRTF pour la détection et la quantification de l'adultération du lait de chèvre, de brebis et de vache dans les deux mélanges binaires et ternaires. L'analyse par spectroscopie IRTF combinée avec des méthodes statistiques multivariées, telle que la régression des moindres carrés partiels (PLS) et la régression non linéaire des moindres carrés partiels (KPLS), ont été utilisés pour l'étalonnage multivariable pour quantifier les différentes concentrations de lait. Les spectres IRTF ont montré une valeur prédictive, pour les mélanges binaires, avec un niveau de 0,5 à 8 % d'erreur. Des excellentes prédictions étaient réalisées par les deux méthodes de PLS et KPLS avec des erreurs de 3,4 à 4,9% et de 3,9 à 6,4%, respectivement, ces résultats montrent que la spectroscopie IRTF a un excellent potentiel pour une utilisation dans l'industrie laitière et ce, comme un procédé rapide dans la quantification de l'adultération du lait.

❖ **D'après Iola F. Duarte et al [48]**

L'objectif principal de ce travail était de développer une procédure de spectroscopie IRTF-ATR-PLS pour la quantification des sucres dans les jus de mangue en fonction de la maturation. L'étalonnage a été basé sur des mélanges de saccharose / glucose / fructose, avec six niveaux de concentration. La régression PLS a donné les meilleurs résultats, ce qui permet la quantification de la teneur en fructose, le saccharose, le glucose et avec 1,4, 1,4, et 4,9% d'erreurs de prédiction, respectivement. Tout au long de la maturation, le saccharose et le fructose ont été quantifiés avec précision par PLS-IRTF.

❖ **D'après M. E. S. Mirghani et al [49]**

Le but de cette étude consistait à comparer deux techniques différentes d'étalonnage multivariées FTIR-PLS et FTIR-PCR pour la détermination quantitative de l'acide thiobarbiturique (TBARS) contenu dans les huiles de palmes.

Les méthodes ont été comparées pour le nombre de facteurs, les coefficients de détermination (R^2), ainsi que la précision de l'estimation. Les erreurs standards de prédiction (SEP) ont été calculées afin de comparer leur capacité prédictive. Les modèles calibrés de PLS et PCR produits trois à huit facteurs, R^2 de 0,9414 à 0,9803, l'erreur-type d'estimation (SEE) de 0,0063 à 0,0680, et le SEP de 1,20 à 6,67 respectivement.

VI.2. Travaux antérieurs réalisés sur le thymol, l'eucalyptol, le camphre et le menthol dans le miel

❖ **D'après M.J. Nozal et al [50]**

L'objectif de ce travail était de développer une méthode d'analyse par chromatographie gaz pour déterminer le thymol, le camphre, l'eucalyptol et le menthol dans le miel et les cires d'abeilles. Trois méthodes d'extractions (extraction liquide-liquide (ELL), extraction en phase solide (EPS) et la distillation) ont été utilisées pour isoler les quatre composés. La méthode a été appliquée pour différentes origines de miel et des échantillons de ruches qui ont été traitées avec le thymol solide et le mélange de l'Apilife VAR.

Chapitre II

Partie expérimentale

I. Introduction

La chimiométrie est une méthode analytique assez nouvelle, mais elle a déjà eu un impact énorme sur le terrain spectroscopique, à un point tel que le logiciel de chimiométrie est aujourd'hui intégré avec l'instrumentation en tant que norme de développement [4].

L'objectif de ce travail est double. La première partie concerne l'exécution, pour la première fois au sein de notre équipe de recherche, d'un nouveau logiciel de calibration multivariée PLS-IRTF acquis le mois de décembre 2013. La deuxième partie est orientée justement sur le développement d'un modèle de calibration, moyennant ce logiciel.

Pour mettre en évidence l'intérêt pratique d'un tel logiciel, une étude comparative entre les deux modes de calibration monovariante et multivariante est réalisée.

L'application considérée dans cette étude concerne la détermination des monoterpènes (thymol, eucalyptol, camphre et menthol) dans deux variétés de miel, produites en Algérie et en France ou dans l'extrait d'algue brune (*Cystoseira Tamarcifolia*).

Ce travail a été réalisé au laboratoire de chimie des substances naturelles du département de chimie et au laboratoire des plantes médicinales et aromatiques du département d'agronomie, Université de Blida.

II. Instrumentation et réactifs

II.1. Spectrophotométrie Infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

Un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) de marque Bruker type Tensor 27, équipé d'un détecteur sulfate triglycine deutéré DTGS à température ambiante, d'une source infrarouge moyen (4000-400 cm^{-1}), d'un rayonnement de laser et un diviseur de faisceau KBr a été utilisé. L'acquisition des spectres a été effectuée avec une résolution de 4 cm^{-1} et un nombre de scan égal à 10 spectres. Le traitement des spectres est réalisé avec le logiciel OPUS 6.5 sous le système d'exploitation Microsoft Windows XP.

Les fenêtres utilisées pour l'analyse de la phase liquide sont en fluorure de baryum (BaF_2) avec une entretoise en téflon de 0.1 mm d'épaisseur. Les tubes de connections sont en téflon avec un diamètre intérieur de 0.8 mm et le chargement est réalisé en employant des tubes de chlorure de polyvinyle de diamètre intérieur de 2.79 mm.

L'introduction des solutions se fait avec un système à écoulement bloqué avec une cellule de flux, l'avantage d'une telle cellule est d'éviter les inconvénients relatifs au nettoyage et au remplissage des cellules conventionnelles et de minimiser la consommation des solvants organique est de réduire le temps d'analyse (15- 60 s).

Le système d'écoulement est effectué en utilisant une pompe péristaltique, le flux est stoppé momentanément une fois la cellule est remplie. On obtient le spectre et on rétablit le flux pour rincer la cellule avec le solvant et la remplir à nouveau avec une autre solution (Figure 10).

Les spectres enregistrés sont traités à l'aide d'une macro qui a été construite à partir de l'option « Evaluation » dans le cas de la calibration monovariante et grâce au logiciel intégré Quant 1 d'OPUS dans le cas de la calibration multivariante.

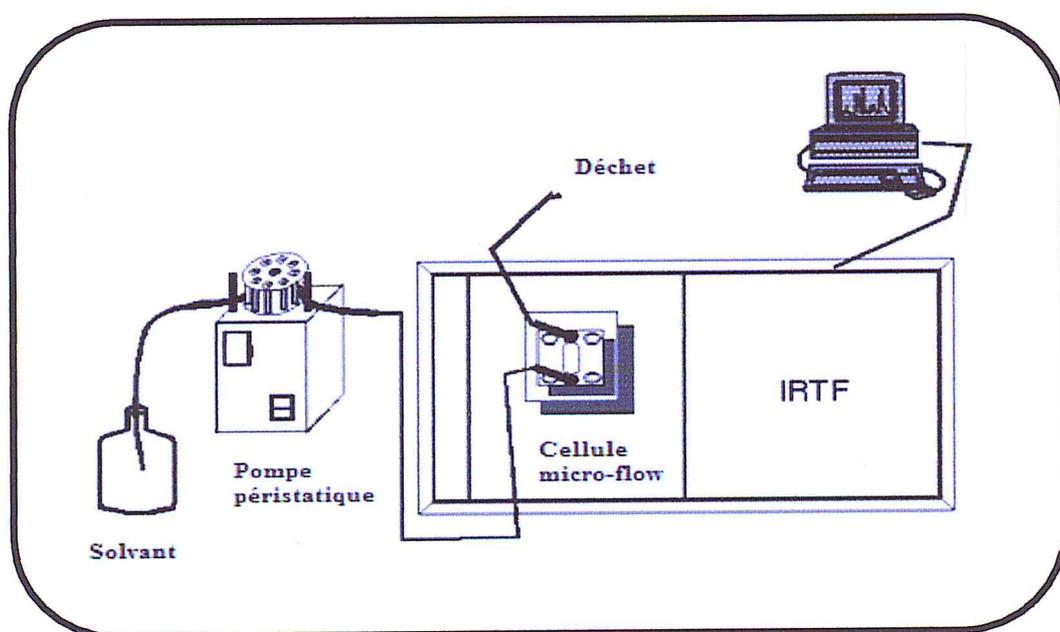


Figure 10 : Montage IRTF utilisé pour l'introduction des solutions dans la cellule

II.2. Réactifs

Tous les réactifs utilisés dans cette étude ; le dichlorométhane stabilisé avec l'amylène, méthanol, sont de grade analytique.

III. Caractéristiques analytiques des quatre étalons dans les deux modes de calibration

III.1. Définition des gammes d'intégration

Il est important de signaler qu'un assistant OPUS nous permet de sélectionner une gamme d'intégration pour chacun des pics du spectre IR, dont la hauteur ou l'aire (intégrale) servira au calibrage. Le logiciel dispose de 19 modèles (figure 11) dont la description est montrée ci- dessous.

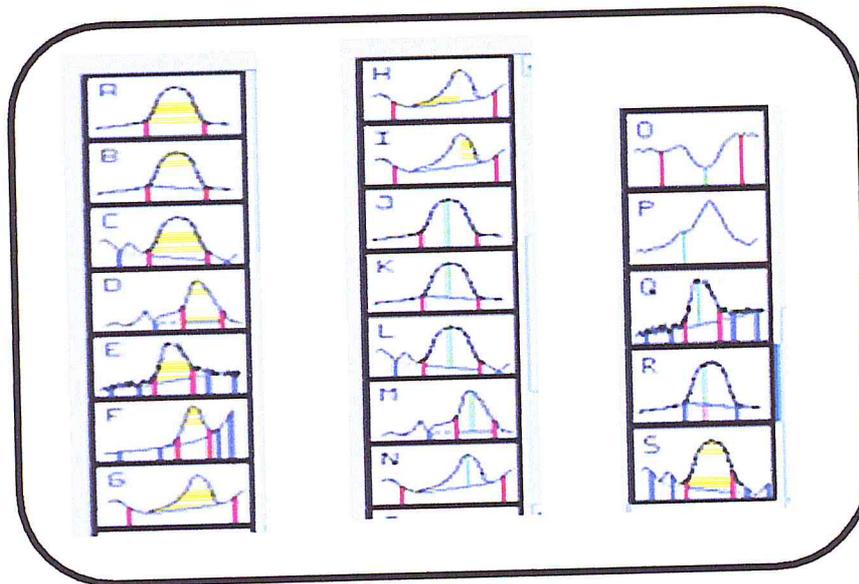


Figure 11 : Définition des gammes d'intégration

III.2. Caractéristiques analytiques des quatre étalons dans la calibration monovariante

Il y a lieu de noter que le niveau de tolérance des additifs dans le miel est de 50 mg. Kg⁻¹ [50]. Par rapport à cette valeur référence, un domaine dynamique de 0.005 – 0.2 mg.ml⁻¹ a été testé dans cette étude mais, seulement le domaine de concentration compris entre 0.5 et 5 mg.ml⁻¹ a vérifié la linéarité.

III.2.1. Caractéristiques analytiques du thymol préparé directement dans CH₂Cl₂

La figure 12 illustre les spectres d'absorbance d'une série de solution de thymol préparé directement dans CH₂Cl₂, et ce, dans un domaine de concentration allant de 0,5 à 5 mg.ml⁻¹ dans le domaine spectral compris entre 4000 et 850 cm⁻¹.

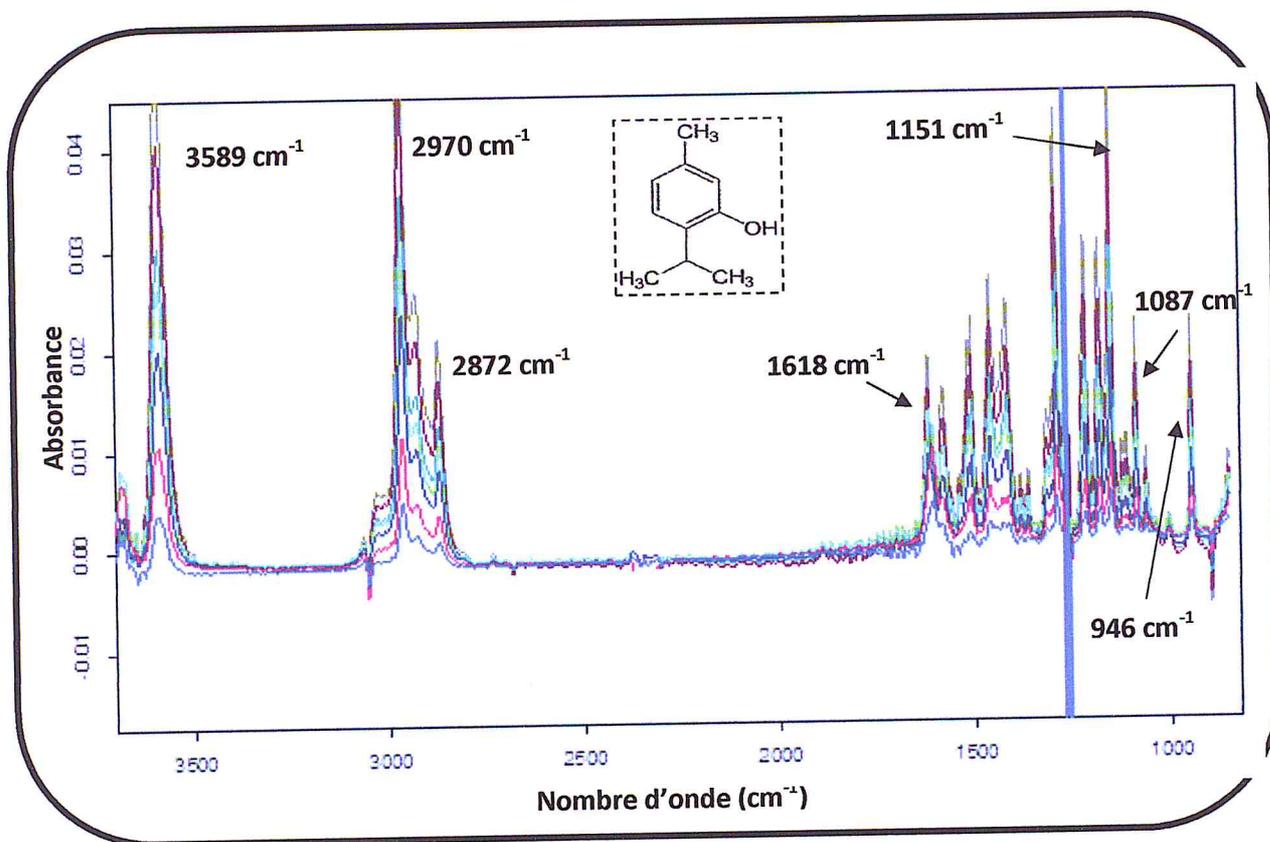


Figure 12 : Spectres IRTF d'absorbance d'une série d'étalons de thymol préparée directement dans CH_2Cl_2

Les bandes d'intégration utilisées pour le thymol sont situées à 3589 cm^{-1} bande d'élongation de la liaison O-H, ainsi que les bandes intenses dans la région entre 2970 et 2872 cm^{-1} à cause des groupes CH_2 et CH_3 , on peut constater la présence d'une bande vers 1618 cm^{-1} caractéristique de C=C aromatiques. Des bandes vers 1216 cm^{-1} et 1151 cm^{-1} caractéristique de la fonction C-O d'élongation. Le thymol présente également la bande 1087 cm^{-1} correspondant à C-OH d'un l'alcool, et la bande de 946 cm^{-1} caractéristique de la fonction isopropyl.

Avant de montrer les tables des caractéristiques analytiques des quatre étalons aux différentes bandes d'intégration, il nous a semblé judicieux de montrer la quantité des données manipulées et ce, pour un seul mode d'intégration (tableau 2).

Tableau 2 : Les calculs d'intégration pour la bande 1151 (1200-1132) cm^{-1} avec un seul mode d'intégration R

Concentrations (mg.ml^{-1})	Abs à 1151 (1200-1132) Modèle R	$\bar{A} \pm \sigma$	Paramètres analytiques
0	0.000339 _ 0.000003 -0.000090 _ -0.000019 -0.000080 _ -0.000041 -0.000011 _ -0.000104 -0.000111 _ -0.000019	$0.00004 \pm 3.40.10^{-5}$	Droite d'étalonnage : $A = f(C)$ (On utilise l'Excel) $A = 0.00810 C +$ 0.00024
0.5	0.004953 _ 0.004268 0.004226 _ 0.004164 0.004056	$0.00433 \pm 3.20.10^{-4}$	
1	0.008369 _ 0.008416 0.008307 _ 0.008318 0.008397	$0.00837 \pm 3.70.10^{-5}$	Coefficient de corrélation : $R = 0.9998$
2	0.016496 _ 0.016492 0.016506 _ 0.016405 0.016478 _ 0.016462 0.016485 _ 0.016492 0.016443 _ 0.016481	$0.01647 \pm 2.86.10^{-5}$	
2.5	0.020470 _ 0.020476 0.020430 _ 0.020431 0.020511	$0.02047 \pm 2.86.10^{-5}$	Limite de Détection $(LD) = \frac{3\sigma}{a}$
3	0.024797 _ 0.024719 0.024903 _ 0.024888 0.024871	$0.02484 \pm 6.87.10^{-5}$	
4	0.033026 _ 0.033031 0.033002 _ 0.033074 0.032945	$0.033016 \pm 4.22.10^{-5}$	Déviatiion Standard Relative (D.S.R%) ($C = 2 \text{ mg.ml}^{-1}$) $RSD = \frac{\sigma}{X} \times 100$
5	0.040228 _ 0.040238 0.040194 _ 0.040288 0.040269	$0.04024 \pm 3.27.10^{-5}$	

Bien que la méthode de calibration monovariante est la plus utilisée dans les travaux des déterminations quantitatives, mais comme le montre le (tableau 2) la méthode est laborieuse et nécessite un temps considérable pour effectuer tout les calculs, toutes les vérifications et établir enfin la table finale des caractéristiques analytiques avec le nombre de chiffres significatifs correct.

Les caractéristiques analytiques de la série des solutions du thymol préparées directement dans CH_2Cl_2 , sont résumées dans le tableau 3

Tableau 3 : Caractéristiques analytiques du thymol préparé directement dans CH_2Cl_2 dans un domaine de $0.5 - 5 \text{ mg.ml}^{-1}$

Paramètres analytiques		Droite d'étalonnage (A)	Coefficient de corrélacion (R)	L.D ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	D.S.R.% (n=10)
Max (ligne de base)	Mode d'intégration				
3589 (3640-3499)	B	$A = 0,01051C + 0,00016$	0.9983	25.8	0.40
2965 (2995-2830)	R	$A = 0,01046C + 0,00032$	0.9997	13.7	0.37
1216 (1242-1200)	B	$A = 0.08666C + 0.00036$	0.9997	23.2	0.43
1151 (1200-1132)	R	$A = 0.00810C + 0.00024$	0.9998	12.6	0.18
1618 (1642-1595)	R	$A = 0.00288C + 0.00064$	0.9903	27.8	0.75
1087 (1099-1072)	K	$A = 0.00346C + 0.00014$	0.9996	21.5	0.54
946 (971-921)	K	$A = 0.00464C + 0.00005$	0.9997	24.2	0.37

C : Concentration en mg.ml^{-1} , DSR (%) : Déviation Standard Relative (pour $C = 2 \text{ mg.ml}^{-1}$), LD : Limite de détection en $\mu\text{g.ml}^{-1}$.

Conditions expérimentales : Chemin optique 0.1 mm, Résolution nominale 4 cm^{-1} , Nombre de balayage 10 scans, Background de la cellule remplie de CH_2Cl_2 .

Les résultats montrent une linéarité moyenne aux bandes d'absorbance considérées, mais qui peut être améliorées en considérant d'autres corrections, et des limites de détections acceptables avec une bonne précision environ de 1 %.

III.2.2. Caractéristiques analytiques d'eucalyptol préparé directement dans CH_2Cl_2

La figure 13 illustre les spectres d'absorbance d'une série de solution d'eucalyptol préparé directement dans CH_2Cl_2 , et ce, dans un domaine de concentration allant de 0,5 à 5 mg. ml^{-1} dans le domaine spectral compris entre 3000 et 850 cm^{-1} .

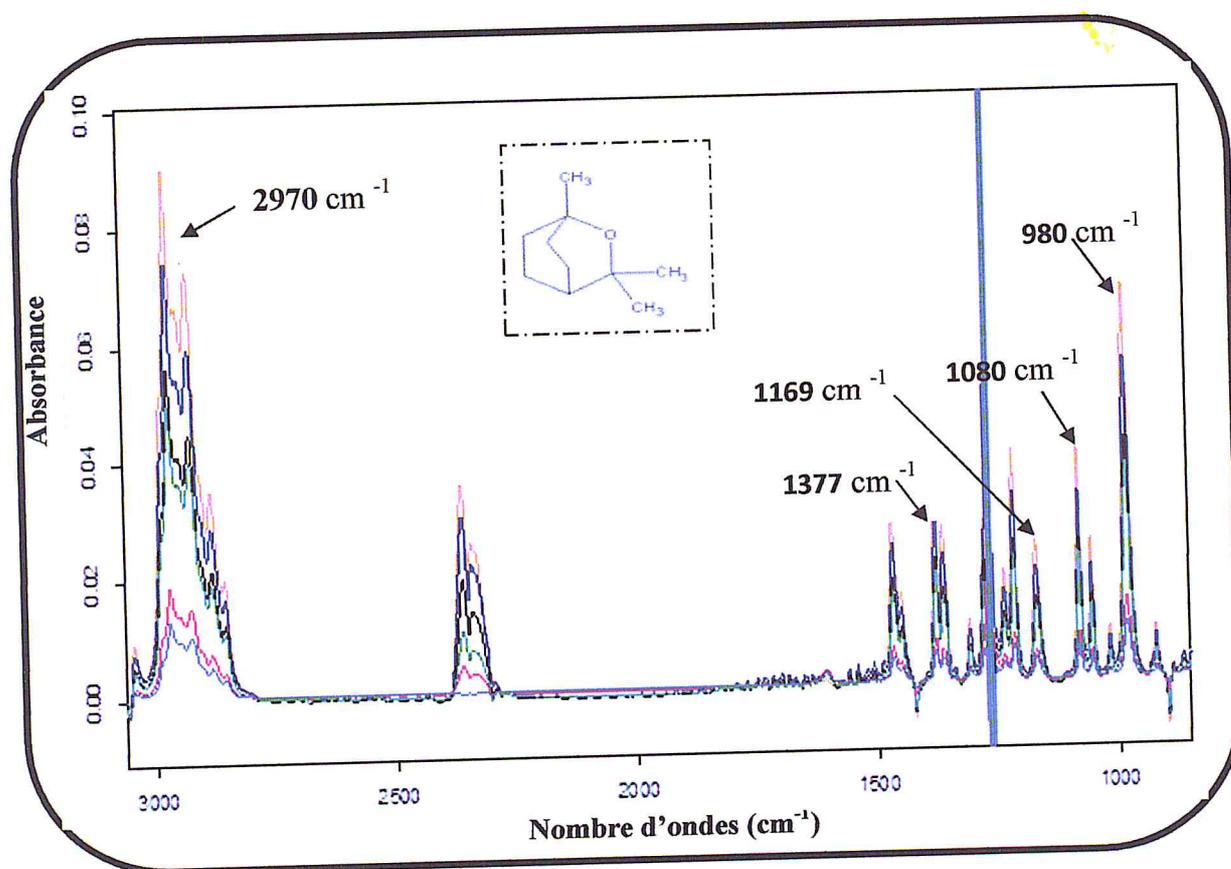


Figure 13 : Spectres IRTF d'absorbance d'une série d'étalons d'eucalyptol préparée directement dans CH_2Cl_2 , pour un domaine de concentration compris entre 0,5- 5 mg. ml^{-1}

Le spectre montre des bandes dans la région entre 2970 cm^{-1} et 2870 cm^{-1} liées aux vibrations d'élongation des groupes CH_2 et CH_3 , la région entre 1377 présente les vibrations de déformation des groupes CH et CH_3 , Les bandes situées vers 1169 cm^{-1} et 1080 cm^{-1} caractéristique de groupement C-O d'un éther, l'eucalyptol présente également une bande à 980 cm^{-1} caractéristique de la fonction isopropyl.

Les caractéristiques analytiques de la série des solutions de l'eucalyptol préparée directement dans CH_2Cl_2 , sont résumées dans le tableau 4.

Tableau 4 : Caractéristiques analytiques de l'eucalyptol préparé directement dans CH_2Cl_2 dans un domaine de $0.5 - 5 \text{ mg.ml}^{-1}$

Paramètres analytiques		Droite d'étalonnage (A)	Coefficient de corrélation (R)	L.D ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	D.S.R.% (n=10)
Max (ligne de base)	Mode d'intégration				
2970 (3038-2743)	B	$A=1.32468C+0.15255$	0.9967	32.1	0.23
1377 (1403-1325)	B	$A=0.15931C+0.0184$	0.9962	15.7	0.30
1169 (1192-1135)	B	$A=0.07405C+0.00474$	0.9986	10.9	0.58
1080 (1120-1035)	B	$A=0.13730C+0.01475$	0.9967	13.3	0.37
980 (995-965)	R	$A=0.01156C+0.00122$	0.9967	0.92	0.72

C : Concentration en mg.ml^{-1} , DSR (%) : Déviation Standard Relative (pour $C= 2.5 \text{ mg.ml}^{-1}$),
LD : Limite de détection en mg.ml^{-1} .

Conditions expérimentales : Chemin optique 0.1 mm, Résolution nominale 4 cm^{-1} , Nombre de balayage 10 scans, Background de la cellule remplie de CH_2Cl_2 .

Les résultats montrent une linéarité moyenne aux bandes d'absorbance considérées, mais qui peut être améliorées en considérant d'autres corrections, et des limites de détections acceptables avec une bonne précision environ de 1 %.

III.2.3. Caractéristiques analytiques du camphre préparé directement dans CH_2Cl_2

La figure 14 illustre les spectres d'absorbance d'une série de solutions de camphre préparée directement dans CH_2Cl_2 , et ce, dans un domaine de concentration allant de 0,5 à 5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ dans le domaine spectral compris entre 4000 et 850 cm^{-1} .

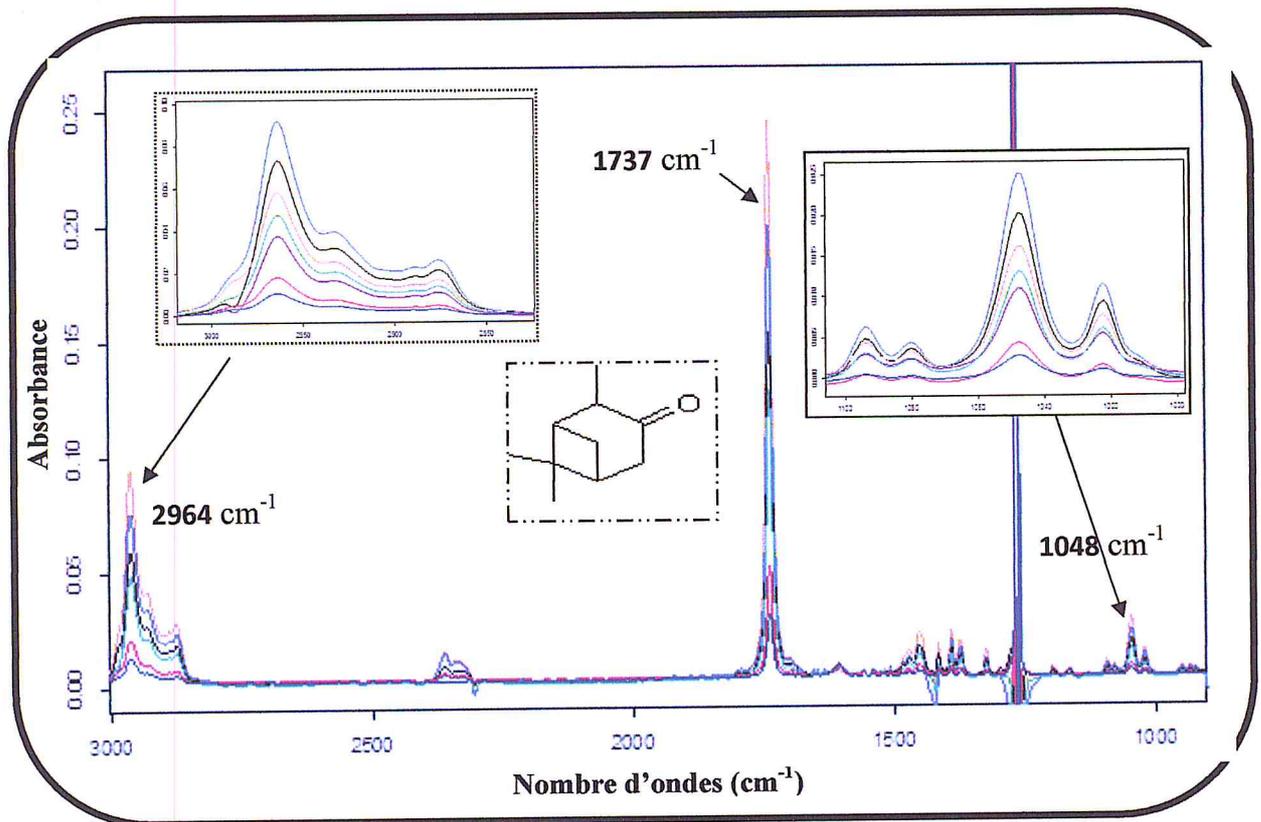


Figure 14 : Spectres IRTF d'absorbance d'une série d'étalons de camphre préparée directement dans CH_2Cl_2

Le spectre présente des bandes dans la région entre 2964 et 2868 cm^{-1} caractéristiques des groupes CH_2 et CH_3 , et une bande très intense située à 1737 cm^{-1} caractéristique de la fonction $\text{C}=\text{O}$ d'une cétone.

Les caractéristiques analytiques de la série des solutions du camphre préparée directement dans CH_2Cl_2 , sont résumées dans le tableau 5.

Tableau 5 : Caractéristiques analytiques du camphre préparé directement dans CH_2Cl_2 dans un domaine de $0.5 - 5 \text{ mg.ml}^{-1}$.

Paramètres analytiques		Droite d'étalonnage	Coefficient de corrélation	LD ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	D.S.R% (n=10)
Max (ligne de base)	Mode d'intégration				
2964 (3030-2792)	B	$A=0.99009C+0.01979$	0.9998	2.1	6.5
1738 (1842-1668)	R	$A=0.04683C+0.00188$	0.9996	20	1.2
1048 (1070-995)	B	$A=0.09744C+0.00349$	0.9997	8.9	1.8

C : Concentration en mg.ml^{-1} , DSR (%) : Déviation Standard Relative (pour $C= 2 \text{ mg.ml}^{-1}$),
LD : Limite de détection en mg.ml^{-1} .

Conditions expérimentales : Chemin optique 0.1 mm, Résolution nominale 4 cm^{-1} , Nombre de balayage 10 scans, Background de la cellule remplie de CH_2Cl_2 .

Les résultats montrent une linéarité moyenne aux bandes d'absorbance considérées, mais qui peut être améliorée en considérant d'autres corrections, et des limites de détections acceptables avec une bonne précision entre 1 et 6.5 %.

III.2.4. Caractéristiques analytiques du menthol préparé directement dans CH_2Cl_2

La figure 15 illustre les spectres d'absorbance d'une série de solutions du menthol préparé directement dans CH_2Cl_2 , et ce, dans un domaine de concentration allant de 0,5 à 5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ dans le domaine spectral compris entre 4000 et 850 cm^{-1} .

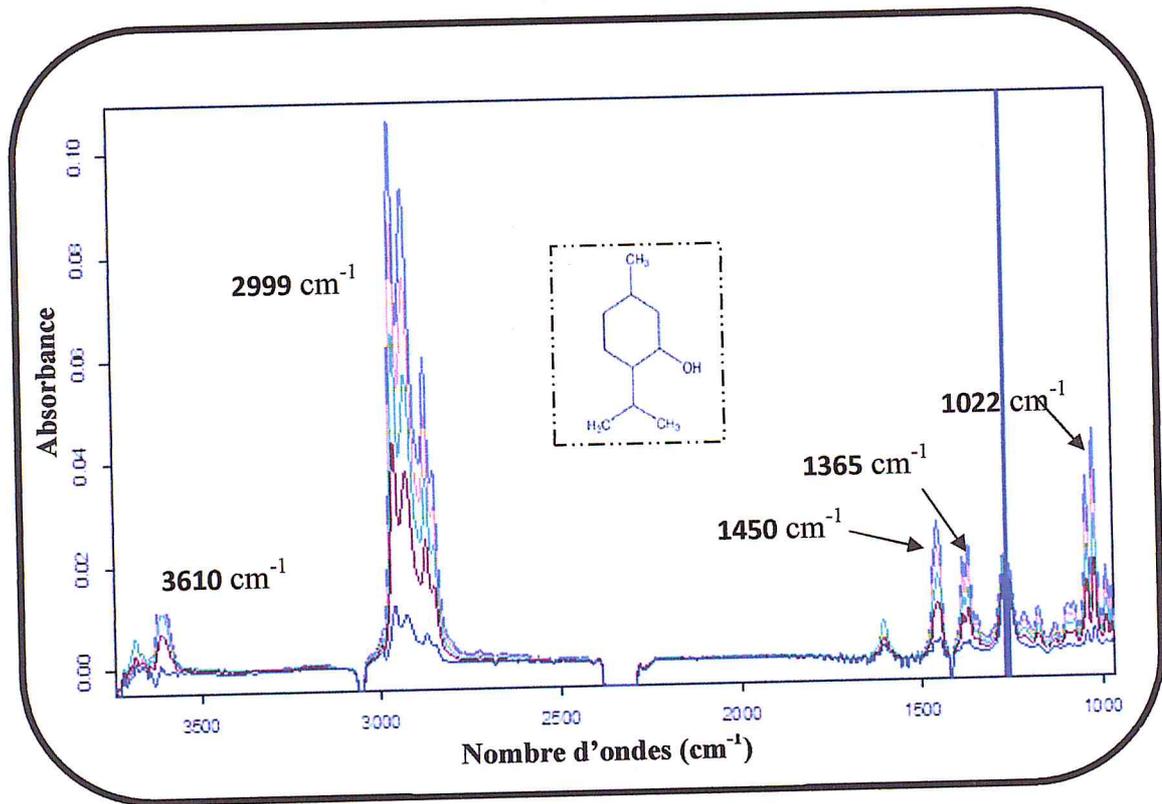


Figure 15 : Spectres IRTF d'absorbance d'une série d'étalons de menthol préparée directement dans CH_2Cl_2

On constate que le spectre présente une bande intense à 3610 cm^{-1} caractéristique du groupement O-H, il montre aussi des bandes dans la région entre 2980 et 2870 cm^{-1} liées aux vibrations des groupes CH_2 et CH_3 , les bandes entre 1450 cm^{-1} et 1365 cm^{-1} présentent la déformation des groupes CH , CH_2 et CH_3 . Le menthol présente une bande vers 1022 cm^{-1} , caractéristique de la fonction C-OH d'un alcool,

Les caractéristiques analytiques de la série des solutions du menthol préparée directement dans CH_2Cl_2 , sont résumées dans le tableau 6.

Tableau 6 : Caractéristiques analytiques du menthol préparé directement dans CH_2Cl_2 dans un domaine de $0.5 - 5 \text{ mg.ml}^{-1}$.

Paramètres analytiques		Droite d'étalonnage	Coefficient de corrélation	LD ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	D.S.R% (n=10)
Max (ligne de base)	Mode d'intégration				
3610 (3672-3535)	R	$A=0.00331C+0.00074$	0.9947	11.6	1.7
2980 (3033-2765)	B	$A=1.69953C+0.04772$	0.9998	11.2	1.1
1450 (1493-1431)	B	$A=0.12779C+0.01305$	0.9993	40	2.0
1365 (1408-1324)	B	$A=0.10929C+0.00473$	0.9997	56.8	1.7
1023 (1065-1004)	B	$A=0.16485C+0.00002$	0.9998	11	1.8
1023 (1030-1014) (1050-1005)	C	$A=0.06484C+0.00046$	0.9997	6.8	0.2

C : Concentration en mg.ml^{-1} , DSR (%) : Déviation Standard Relative (pour $C= 2 \text{ mg.ml}^{-1}$),
LD : Limite de détection en mg.ml^{-1}

Conditions expérimentales : Chemin optique 0.5 mm, Résolution nominale 4 cm^{-1} , Nombre de balayage 10 scans, Background de la cellule remplie de CH_2Cl_2 .

Les résultats montrent une linéarité moyenne aux bandes d'absorbance considérées, mais qui peut être amélioré en considérant d'autres corrections des limites de détections acceptables avec une bonne précision environ de 2 %.

III.3. La calibration multivariable

Nous allons, à travers cette étude d'une part développer un modèle de calibration multivariable et multicomposé pour la détermination simultanée de Thymol, Eucalyptol, Camphre et Menthol et d'autre part montrer la simplicité et la rapidité de cette procédure quantitative.

L'utilisation du modèle de calibration PLS se fait à travers le logiciel Quant d'OPUS (figure 16), ce dernier dispose de deux modèles Quant 1 et Quant 2.

Si les spectres des étalons présentent des pics séparés et spécifiques on fait appel au Quant 1, mais si les spectres sont exclusivement constitués de pics superposés, la méthode Quant 1 n'est pas indiquée. Dans ce cas, il faut utiliser le logiciel intégré Quant 2 d'OPUS. Le spectrophotomètre Tensor- 27 dispose de Quant 1 seulement, mais l'équipe compte se procurer du Quant 2 dans le futur.

Pour mener à bien cette étude, le logiciel intégré Quant 1 d'OPUS nous permet d'analyser la concentration des composantes chimiques contenues dans l'échantillon. Le calcul des valeurs de concentration présuppose en tout état de cause un calibrage préalable.

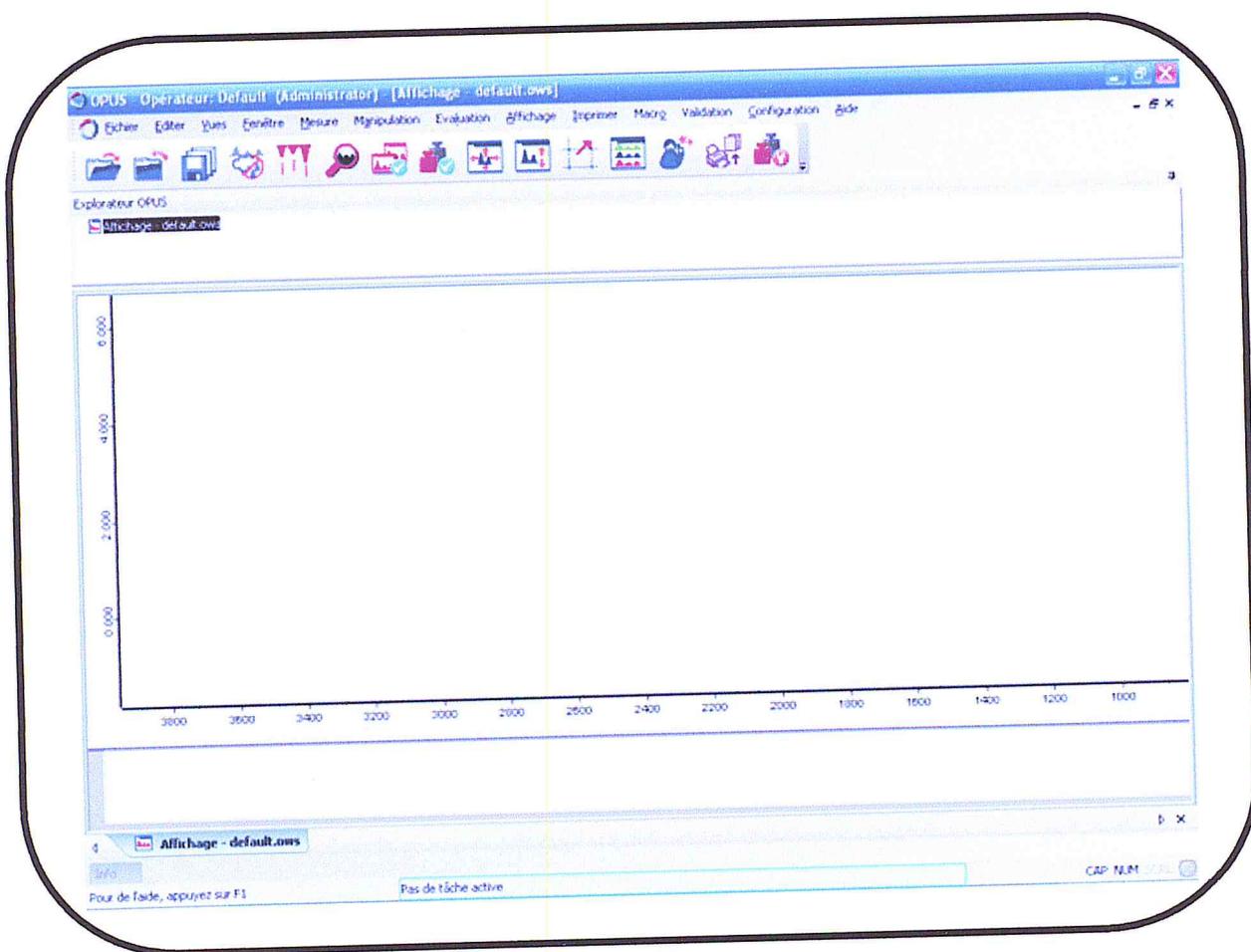


Figure 16 : Fenêtres de l'logiciel Quant 1 d'OPUS 6.5

III.3.1. Optimisation du modèle PLS (Quant 1)

III.3.1.1. Définition de la méthode de calibrage Quant 1

Pour procéder au calibrage et obtenir les meilleures valeurs de prédiction, nous devons disposer d'un jeu d'échantillons de calibrage. Chacun des échantillons de calibrage doit contenir une concentration différente de la composante qui nous intéresse. Les concentrations doivent être connues. Procédez au calibrage à l'aide des quantités de composantes connues et à l'aide des spectres des échantillons de calibrage. Pour ce faire, on apparie à chacune des composantes une bande (un pic) spécifique du spectre.

III.3.1.2. Préparation de la matrice de calibration

Dans cette étude huit solutions étalons ont été préparées afin de construire le modèle. Les limites inférieures et supérieures des concentrations considérées dans la calibration ont été sélectionnées par rapport à la composition commerciale Apilife VAR : (Thymol 74.08 %, Eucalyptol 16 %, Camphre 3.7 % et Menthol 3.7 %) [50].

Au domaine de concentration linéaire compris entre 0.5 et 5 mg.ml⁻¹ correspond un domaine de pourcentage compris entre 10 et 100% respectivement.

Les huit (08) solutions étalons ont été préparées à partir des quatre solutions mères de concentration de 20 mg.ml⁻¹ de chaque composé (thymol, eucalyptol, camphre et menthol).

Les compositions des huit solutions étalons en terme de concentrations et pourcentage, sont regroupées dans le tableau 7.

Tableau 7 : Composition des solutions étalons (matrice de la calibration)

Solution étalon	Thymol			Eucalyptol			Camphre			Menthol		
	C (mg.ml ⁻¹)	P (%)	V (ml)	C (mg.ml ⁻¹)	P (%)	V (ml)	C (mg.ml ⁻¹)	P (%)	V (ml)	C (mg.ml ⁻¹)	P (%)	V (ml)
solution 1	5	100	2.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
solution 2	3.5	70	1.75	0.5	10	0.25	0.5	10	0.25	0.5	10	0.25
solution 3	3	60	1.5	1	20	0.5	0.5	10	0.25	0.5	10	0.25
solution 4	2.5	50	1.25	0.5	10	0.25	1	20	0.5	1	20	0.5
solution 5	2	40	1	1	20	0.5	1	20	0.5	1	20	0.5
solution 6	1.5	30	0.75	1.5	30	0.75	1.5	30	0.75	0.5	10	0.25
solution 7	1.5	30	0.75	1.5	30	0.75	0.5	10	0.25	1.5	30	0.75
solution 8	1.25	25	0.625	1.25	25	0.625	1.25	25	0.625	1.25	25	0.625

C : Concentration de l'étalon dans l'échantillon synthétique en mg.ml⁻¹, P : Pourcentage % d'un étalon dans la solution étalon, V : Volume prélevé de la solution mère en ml, (un volume finale de 10 ml est considéré).

III.3.1.3. Etapes de l'éditeur de la méthode Quant 1

Les différentes étapes de l'éditeur ou de la création de méthodes Quant 1 sont très faciles et pratiques à exécuter grâce à un assistant OPUS qui nous guide dans chaque étape (Figure 17) une fois les spectres des solutions étalons sont enregistrées.

Cet assistant va vous aider à définir une méthode d'analyse quantitative Quant 1

Les étapes suivantes sont à parcourir

- Sélection des spectres pour le calibrage
- Spécification de la désignation et des unités des composantes
- Entrée des concentrations des composantes
- Choix d'un pic spectral correspondant à chaque composante (mode d'intégration)
- Sélection du type de courbe de calibrage (régressions linéaire, cubique ou carrés) Pour la courbe de calibrage, nous pouvons choisir entre une droite ou une parabole (carrée ou cubique). En choisissant une parabole comme courbe de calibrage, il est éventuellement possible de prendre en compte les écarts par rapport à la loi de Beer-Lambert.
- Calcul de calibrage
- Affichage et impression des résultats de calibrage (tableau et diagrammes)

Cliquez sur « Suite » pour définir une nouvelle méthode

Cliquez sur « Sélection de méthode Quant 1 » pour éditer une méthode existante

Sélection de méthode Quant 1

Figure 17 : Assistant de l'éditeur de méthodes Quant 1

III.3.1.4. Paramètres d'intégration de chaque composante

Pour exécuter correctement Quant 1, il est indispensable de considérer des bandes séparées de chaque composante. Pour ce faire on a résumé les résultats de la calibration monovariante (section III.2) dans le tableau 8.

Tableau 8 : Détermination des bandes communes et séparées pour les quatre composantes : thymol, eucalyptol, camphre et menthol.

Etalon Ligne de base de correction (cm^{-1})	Thymol	Eucalyptol	Camphre	Menthol
	Mode d'intégration			
3030 – 2730	Aire de pic	Aire de pic	Aire de pic	Aire de pic
1820 -1600			Max 1738	
1642 -1550	Max 1618			
1493 -1430	Aire de pic			Aire de pic
1408 – 1325		Aire de pic		Aire de pic
1242 – 1200	Aire de pic			
1200 -1132	Max 1150	Aire de pic		
1132 – 1100	Aire de pic			
1120 – 1035		Aire de pic		
1120 – 1070	Max 1087			
1110 – 1035		Aire de pic		
1070 – 1000			Aire de pic	Aire de pic
995 – 965		Max 980		
970 – 920	Max 946			



Bandes sélectionnées pour le développement du modèle

Différents modèles PLS ont été construits en considérant les bandes séparées de chaque composante et des différents modèles d'intégrations. Les spectres IRTF de la figure 18 illustre le modèle d'intégration utilisé pour chaque composante pour construire enfin le modèle de calibration.

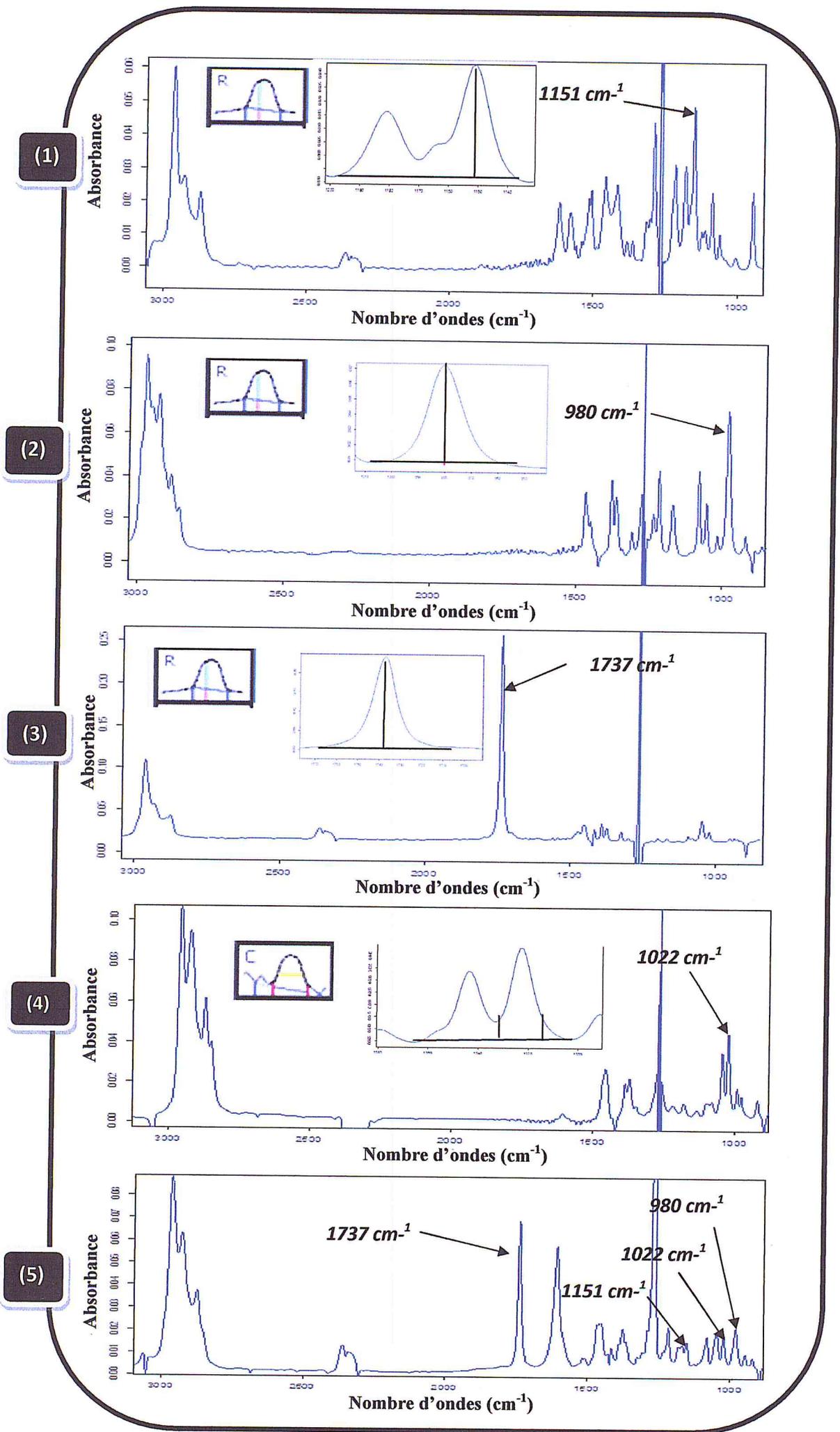


Figure 18 : Spectres IRTF de (1) thymol, (2) Eucalyptol, (3) Camphre, et (4) Menthol (la concentration de chaque composante et de 5 mg.ml^{-1}) et d'une solution étalons (5) contenant (25% thymol, 25% eucalyptol, 25% camphre et 25% menthol)

On a constaté que, le modèle adéquat pour le thymol, le camphre et l'eucalyptol est le modèle R, et que, le modèle C est adéquat pour le menthol.

III.3.2. Paramètres analytiques de l'analyse Quant 1 des quatre composantes

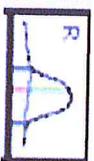
Les tableaux 9-12 résument les résultats de l'analyse Quant 1 pour les quatre composantes (thymol, eucalyptol, camphre et menthol).

Chaque tableau contient toutes les données relatives à la composante choisie de la solution de calibrage, la valeur réelle, la valeur calculée (la valeur de prédiction) à partir des résultats de calibrage, la différence « absolue » entre ces deux valeurs, la position X, qui constitue la valeur d'intégration du pic, et enfin l'erreur relative.

Tableau 9 : Les résultats de calibrage pour le Thymol

THYMOL

régression : linéaire



L'intégration : modèle R : 1151 (1200-1132)

Droite d'étalonnage : $Y = 3.0052 + 2451.7 X$

$\left\{ \begin{array}{l} Y : \text{Valeur pour la composante en (\%)} \\ X : \text{Valeur d'intégration} \end{array} \right.$

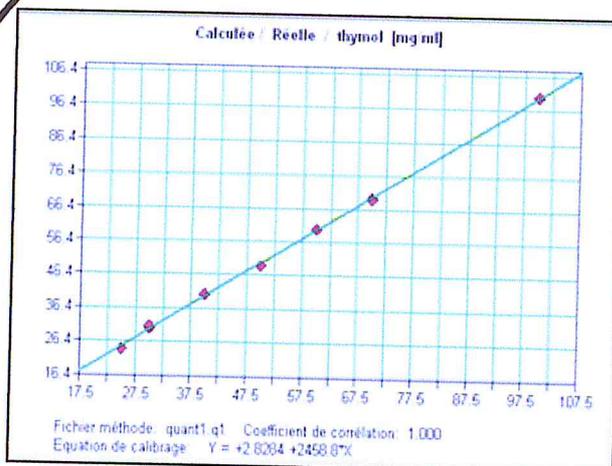
Coefficient de corrélation (r) : 1.000

Sigma = 0.638 : est la différence entre la quantité réelle (Valeur Réelle) et la prédiction (Valeur Calculée) ou le domaine de confiance à l'intérieur duquel se situe la valeur, moyennant le degré de probabilité de 1σ ($\sim 68\%$).

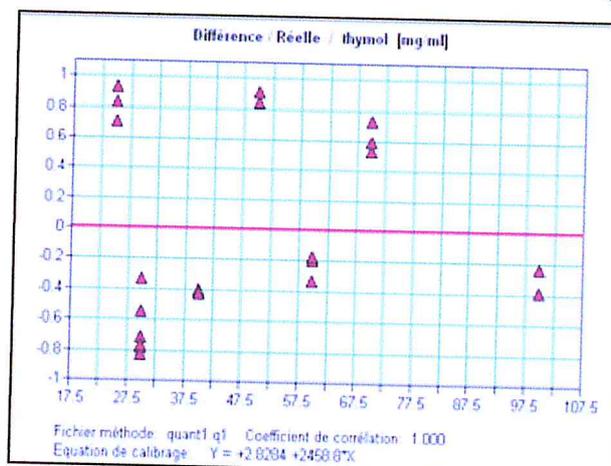
($x \pm \delta$) : Valeur moyenne \pm déviation standard pour ($n=3$), trois valeurs dépendantes.

Différence : Valeur réelle – valeur calculée (valeur de prédiction)

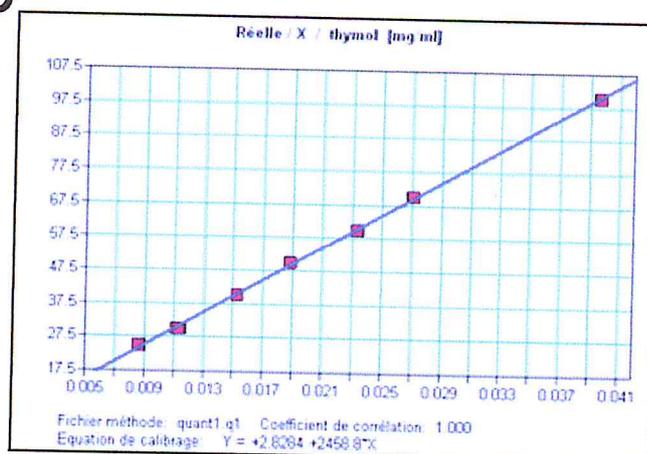
Solution étalon	Valeur réelle	Valeur calculée ($x \pm \delta$)	Différence ($x \pm \delta$)	Valeur d'intégration ($x \pm \delta$)
Solution étalon 1	100	100.27 \pm 0.125	-0.26 \pm 0.096	0.040 \pm 4.2.10 ⁻⁵
Solution étalon 2	70	69.7 \pm 0.070	0.53 \pm 0.069	0.027 \pm 2.9.10 ⁻⁵
Solution étalon 3	60	60.28 \pm 0.069	-0.28 \pm 0.068	0.023 \pm 2.9.10 ⁻⁵
Solution étalon 4	50	49.18 \pm 0.033	0.82 \pm 0.033	0.019 \pm 1.1.10 ⁻⁵
Solution étalon 5	40	40.45 \pm 0.048	-0.45 \pm 0.048	0.015 \pm 2.2.10 ⁻⁵
Solution étalon 6	30	30.27 \pm 0.40	-0.27 \pm 0.39	0.011 \pm 1.6.10 ⁻⁴
Solution étalon 7	30	30.90 \pm 0.026	-0.90 \pm 0.028	0.011 \pm 1.3.10 ⁻⁵
Solution étalon 8	25	24.20 \pm 0.056	0.80 \pm 0.056	0.0092 \pm 2.3.10 ⁻⁵



A



B

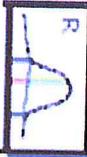


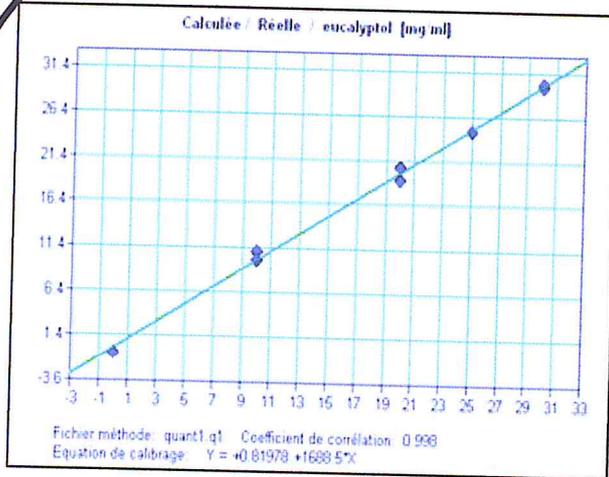
C

Figure 19 : Représentations graphiques des paramètres analytiques pour le thymol

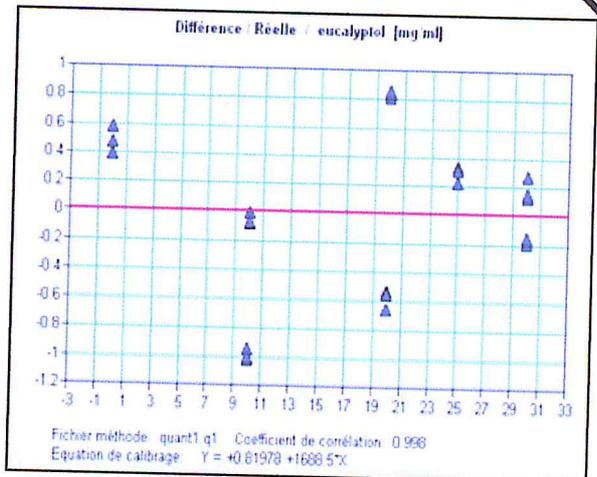
Les figures 19-22 montrent les représentations graphiques de chaque paramètre analytique calculé pour le thymol, l'eucalyptol, le camphre et le menthol respectivement. Les diagrammes (A) illustrent l'adaptation aux valeurs paramétrées, c.à.d. la corrélation entre la valeur calculée et réelle, les diagrammes (B) représentent la différence par rapport aux valeurs paramétrées, c.à.d. la dispersion de l'erreur absolue par rapport à la valeur réelle et les diagrammes (C) qui montrent la corrélation entre les valeurs paramétrées (% de la composante) et la réponse analytique (valeur d'intégration des pics). Les trois diagrammes obtenus permettent d'apprécier la qualité de la série de calibrage et de décaler d'éventuels dérivés.

Tableau 10 : Les résultats de calibrage pour l'eucalyptol

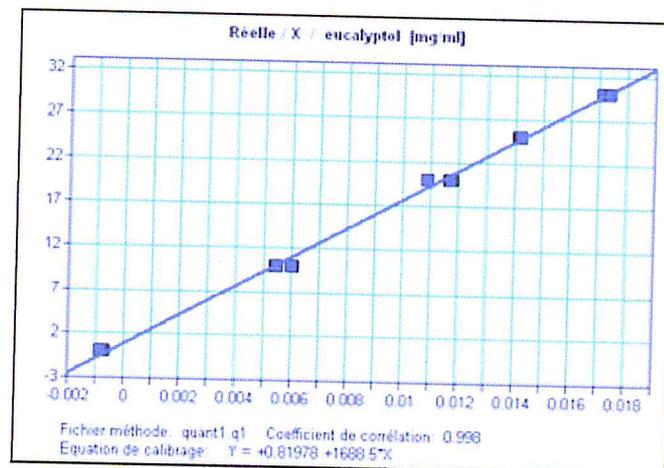
<u>EUCALYPTOL</u>				régression : linéaire	
L'intégration : modèle R : 980 (995-965)					
Droite d'étalonnage : $Y = 0.81604 + 1689.7 X$				$\left\{ \begin{array}{l} Y : \text{Valeur pour la composante} \\ X : \text{Valeur d'intégration} \end{array} \right.$	
Coefficient de corrélation (r) : 0.999					
Sigma = 0.567 : est la différence entre la quantité réelle (Valeur Réelle) et la prédiction (Valeur Calculée) ou le domaine de confiance à l'intérieur duquel se situe la valeur, moyennant le degré de probabilité de 1σ ($\sim 68\%$)					
$(x \pm \delta)$: Valeur moyenne \pm déviation standard pour ($n=3$), trois valeurs dépendantes.					
Différence : Valeur réelle – valeur calculée (valeur de prédiction)					
Solution étalon	Valeur réelle	Valeur calculée ($x \pm \delta$)	Différence ($x \pm \delta$)	Valeur d'intégration ($x \pm \delta$)	
Solution étalon 1	0	-0.50 \pm 0.065	0.50 \pm 0.065	-7.8.10 ⁻⁴ \pm 3.9.10 ⁻⁵	
Solution étalon 2	10	10.050 \pm 0.028	-0.050 \pm 0.028	0.0052 \pm 1.7.10 ⁻⁵	
Solution étalon 3	20	19.20 \pm 0.046	0.80 \pm 0.047	0.011 \pm 2.9.10 ⁻⁵	
Solution étalon 4	10	10.99 \pm 0.031	-0.99 \pm 0.030	0.0064 \pm 1.8.10 ⁻⁵	
Solution étalon 5	20	20.57 \pm 0.029	-0.57 \pm 0.028	0.012 \pm 1.7.10 ⁻⁵	
Solution étalon 6	30	29.78 \pm 0.068	0.22 \pm 0.065	0.017 \pm 3.9.10 ⁻⁵	
Solution étalon 7	30	30.17 \pm 0.029	-0.17 \pm 0.028	0.017 \pm 9.4.10 ⁻⁶	
Solution étalon 8	25	24.74 \pm 0.034	0.26 \pm 0.033	0.014 \pm 2.2.10 ⁻⁶	



A



B



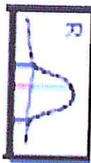
C

Figure 20 : Représentations graphiques des paramètres analytiques pour l'eucalyptol

Tableau 11 : Les résultats de calibrage pour le Camphre

CAMPHERE

régression : linéaire



L'intégration : modèle R : 1737 (1842-1668)

Droite d'étalonnage : $Y = -0.38637 + 397.46 X$

$\left\{ \begin{array}{l} Y : \text{Valeur pour la composante} \\ X : \text{Valeur d'intégration} \end{array} \right.$

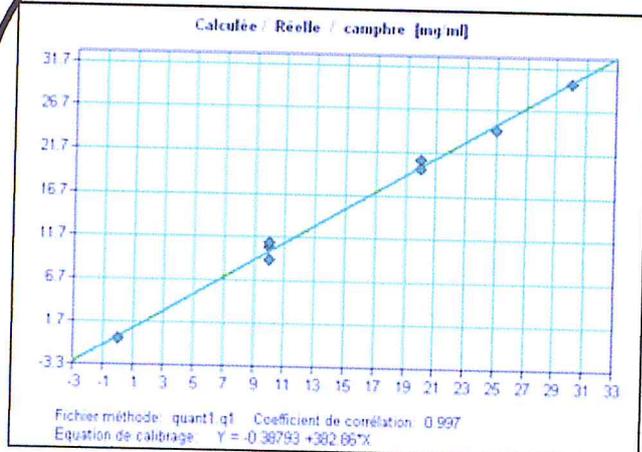
Coefficient de corrélation : 0.997

Sigma = 0.716 : est la différence entre la quantité réelle (Valeur Réelle) et la prédiction (Valeur Calculée) ou le domaine de confiance à l'intérieur duquel se situe la valeur, moyennant le degré de probabilité de 1σ ($\sim 68\%$)

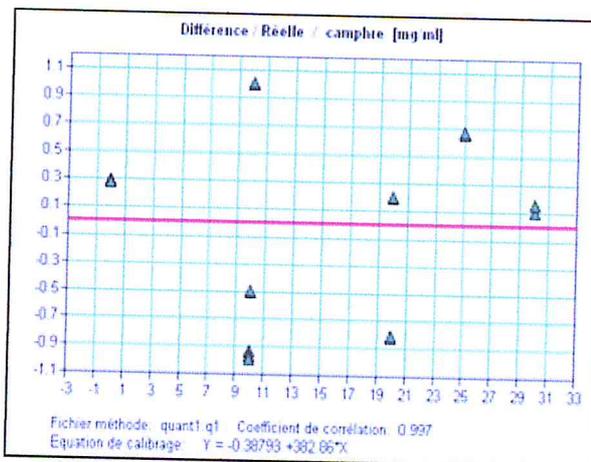
($x \pm \delta$) : Valeur moyenne \pm déviation standard pour ($n=3$), trois valeurs dépendantes.

Différence : Valeur réelle – valeur calculée (valeur de prédiction)

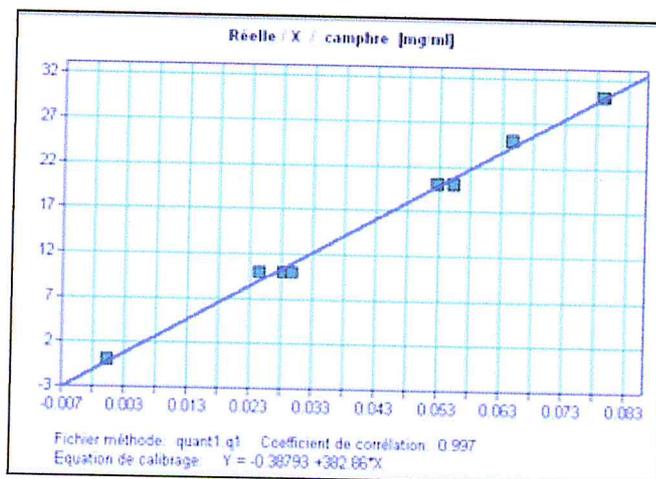
Solution étalon	Valeur réelle	Valeur calculée ($x \pm \delta$)	Différence ($x \pm \delta$)	Valeur d'intégration ($x \pm \delta$)
Solution étalon 1	0	-0.32 \pm 0.002	0.32 \pm 0.0014	1.64.10 ⁻⁴ \pm 3.0.10 ⁻⁶
Solution étalon 2	10	8.98 \pm 0.0050	1.023 \pm 0.0041	0.024 \pm 8.2.10 ⁻⁶
Solution étalon 3	10	11.01 \pm 0.0090	-1.016 \pm 0.0093	0.027 \pm 2.4.10 ⁻⁵
Solution étalon 4	20	19.83 \pm 0.0060	0.17 \pm 0.0050	0.051 \pm 8.2.10 ⁻⁶
Solution étalon 5	20	20.86 \pm 0.0060	-0.85 \pm 0.0044	0.053 \pm 8.2.10 ⁻⁶
Solution étalon 6	30	29.86 \pm 0.088	0.14 \pm 0.0862	0.076 \pm 2.2.10 ⁻⁴
Solution étalon 7	10	10.52 \pm 0.0054	-0.52 \pm 0.0083	0.027 \pm 1.9.10 ⁻⁵
Solution étalon 8	25	24.27 \pm 0.0051	0.73 \pm 0.0070	0.062 \pm 2.1.10 ⁻⁵



A



B



C

Figure 21 : Représentations graphiques des paramètres analytiques pour le camphre

Tableau 12 : Les résultats de calibrage pour le Menthol

MENTHOL

régression : linéaire



L'intégration : modèle C : (1030-1014) (1050-1005)

$\left\{ \begin{array}{l} Y : \text{valeur pour la composante} \\ X : \text{résultat d'intégration} \end{array} \right.$

Droite d'étalonnage : $Y = 9.9228 + 254.71 X$

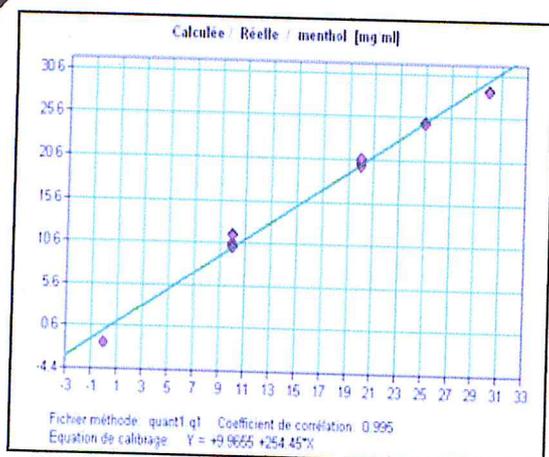
Coefficient de corrélation (r) : 0.995

Sigma = 0.975 : est la différence entre la quantité réelle (Valeur Réelle) et la prédiction (Valeur Calculée) ou le domaine de confiance à l'intérieur duquel se situe la valeur, moyennant le degré de probabilité de 1σ ($\sim 68\%$)

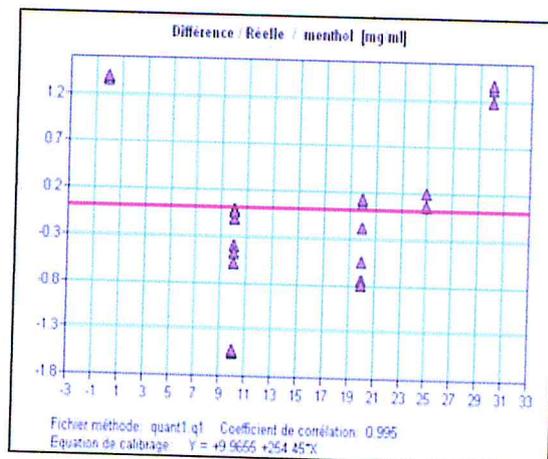
$(x \pm \delta)$: Valeur moyenne \pm déviation standard pour ($n=3$), trois valeurs dépendantes.

Différence : Valeur réelle – valeur calculée (valeur de prédiction)

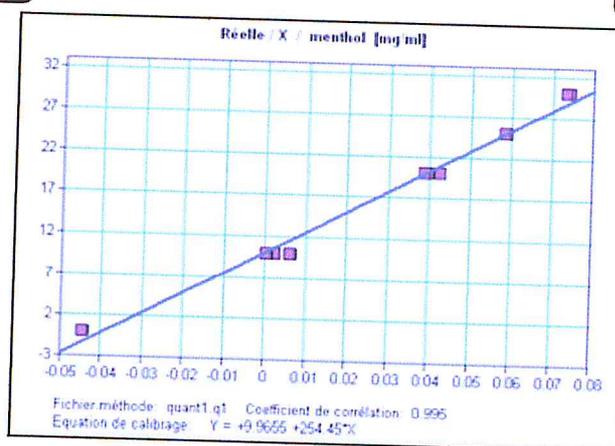
Solution étalon	Valeur réelle (%)	Valeur calculée (%) ($x \pm \delta$)	Différence ($x \pm \delta$)	Valeur d'intégration ($x \pm \delta$)
Solution étalon 1	0	-1.41 \pm 0.028	1.41 \pm 0.028	-0.044 \pm 1.1.10 ⁻⁴
Solution étalon 2	10	10.010 \pm 0.033	-0.0032 \pm 0.031	3.2.10 ⁻⁴ \pm 1.2.10 ⁻⁴
Solution étalon 3	10	11.52 \pm 0.031	-1.52 \pm 0.030	0.0062 \pm 3.2.10 ⁻⁴
Solution étalon 4	20	20.66 \pm 0.10	-0.66 \pm 0.10	0.042 \pm 4.0.10 ⁻⁴
Solution étalon 5	20	19.98 \pm 0.12	0.024 \pm 0.13	0.039 \pm 4.9.10 ⁻⁴
Solution étalon 6	10	10.65 \pm 0.23	-0.65 \pm 0.23	0.0032 \pm 0.0014
Solution étalon 7	30	28.69 \pm 0.07	1.31 \pm 0.073	0.074 \pm 2.9.10 ⁻⁴
Solution étalon 8	25	24.91 \pm 0.11	0.093 \pm 0.11	0.059 \pm 9.2.10 ⁻⁴



A



B



C

Figure 22 : Représentations graphiques des paramètres analytiques pour le menthol

Les résultats de ces analyses consécutives démontrent que le modèle PLS développé est adéquat pour la détermination simultanée des quatre étalons.

Le modèle donne un coefficient de corrélation (r) permettant d'estimer la bonne qualité de calibrage, une précision d'analyse faible (< 1), cette dernière est appréciée au regard du facteur sigma.

Les meilleurs paramètres analytiques sont obtenus pour le thymol dû probablement à sa concentration relativement élevée par rapport aux autres étalons.

Il est important de signaler la rapidité de l'exécution de ce logiciel car il suffit d'introduire les spectres obtenus, de sélectionner le mode d'intégration et d'un simple click pour accéder à toutes les tables des résultats ainsi que tous les diagrammes du calibrage effectués.

IV.1.2. Spectre IRTF du miel d'Algérie dilué dans le CH_2Cl_2

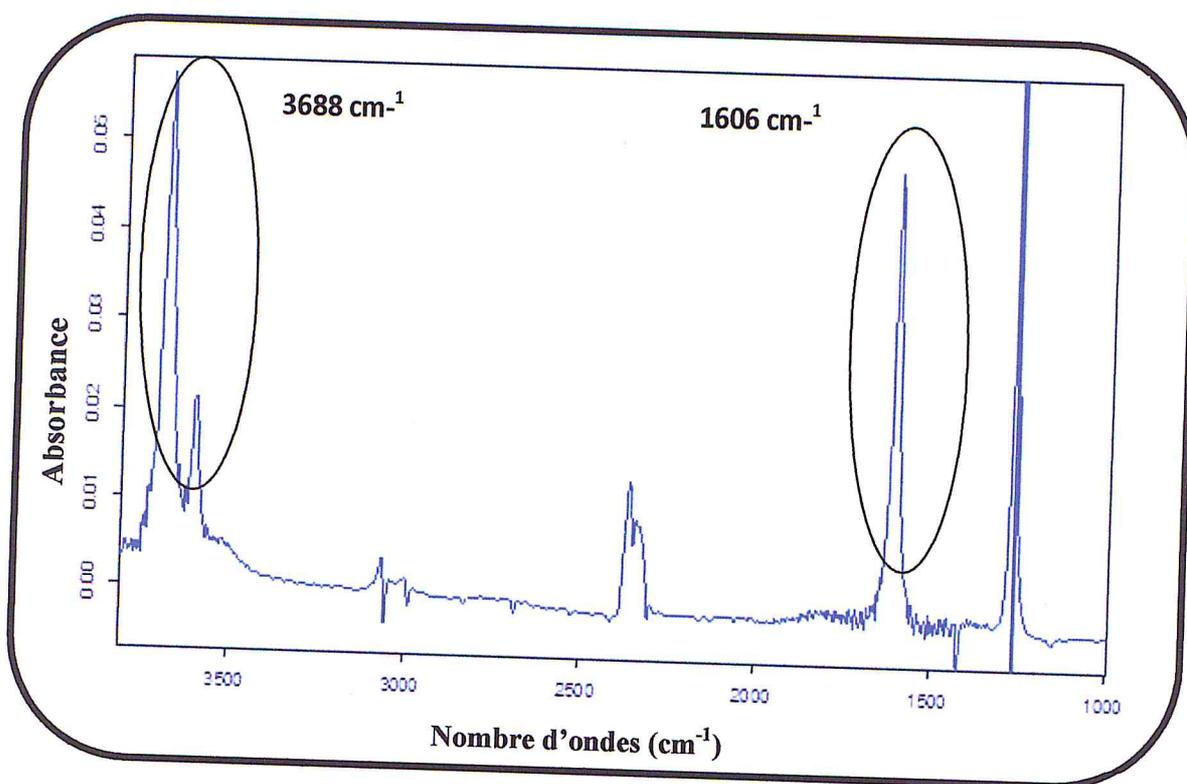


Figure 24 : Spectre IRTF du miel d'Algérie préparé directement dans le CH_2Cl_2

L'allure du spectre de la figure 24 fournit trois informations à savoir : (i) L'absence des 4 composés dans le miel, (ii) La composition principale du miel est polaire, (iii) La présence de la faible bande à 1606 cm^{-1} indique la présence de trace d'eau

Sachant que les deux échantillons de miels ne contiennent pas les 4 additifs, on les a ajoutés dans une proportion de (70% thymol, 10% eucalyptol, 10% camphre et 10% menthol), proportion proche de la composition Apilive VAR et ce, pour enrichir les échantillons et pouvoir tester correctement le modèle PLS-IRTf.

IV.1.3. Analyse PLS-IRTf des échantillons enrichis et dilués directement dans CH_2Cl_2

L'objectif principal de cette manipulation est l'analyse directe des échantillons enrichis avec une solution étalon contenant 70% thymol, 10% eucalyptol, 10% camphre et 10% menthol.

IV.1.3.1. Spectres IRTf des échantillons réels enrichis et dilués directement dans CH_2Cl_2

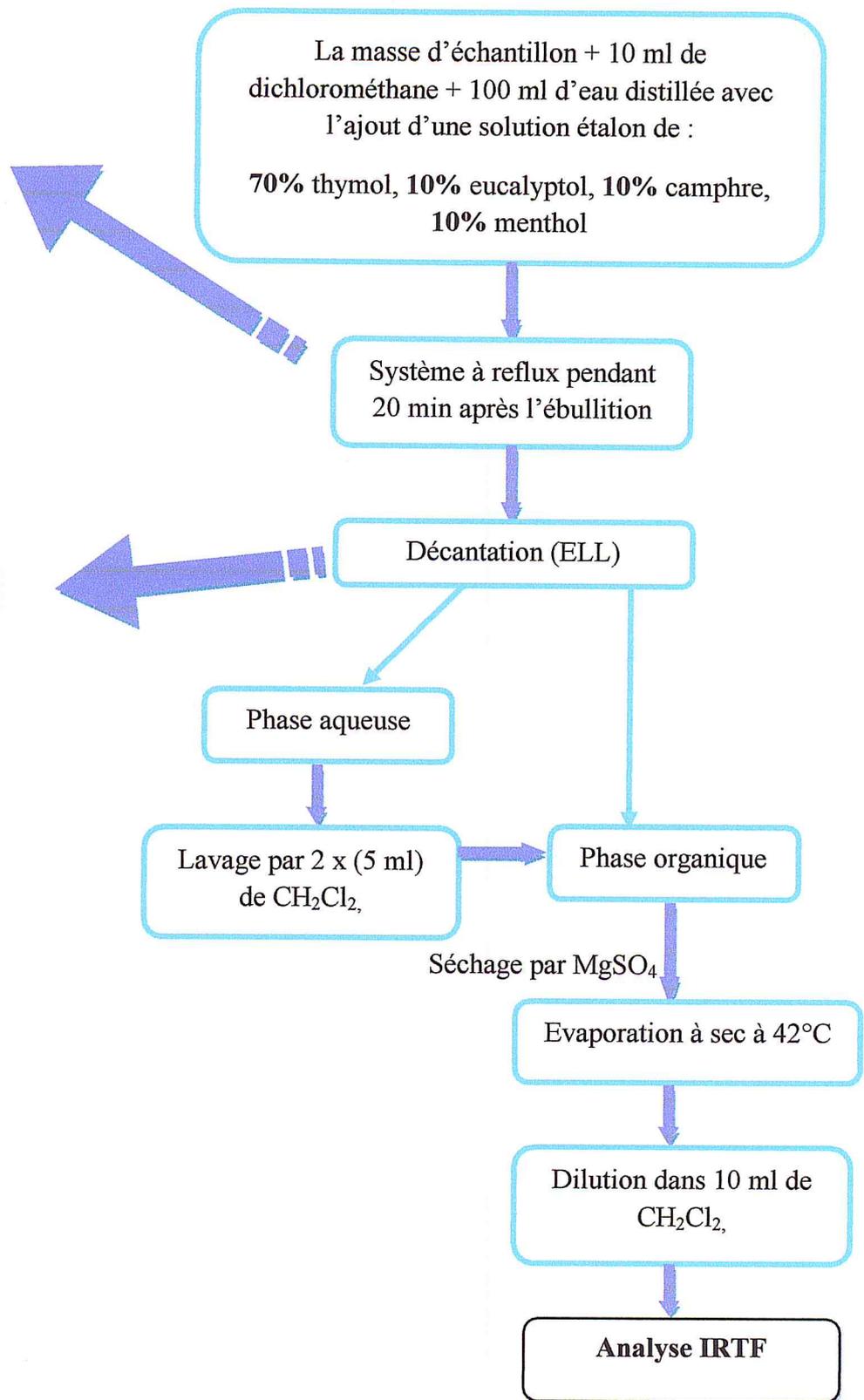


Figure 26 : Protocole d'extraction par ELL

IV.2.1. Calibration PLS-IRTF après traitement par ELL

La première étape consiste à établir une droite de calibration des solutions étalons traitées de la même manière que les échantillons réels et selon le protocole précédent (figure 26). Pour cela, nous avons considéré trois solutions étalons représentant trois pourcentages différents comme l'illustre le tableau 14.

Tableau 14 : Préparation des solutions étalons pour établir la droite de calibration

	Thymol			Eucalyptol			Camphre			Menthol		
	C (mg.ml ⁻¹)	P (%)	V (ml)	C (mg.ml ⁻¹)	P (%)	V (ml)	C (mg.ml ⁻¹)	P (%)	V (ml)	C (mg.ml ⁻¹)	P (%)	V (ml)
Solution étalon												
Solution étalon 1	5	100	2.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Solution étalon 2	3.5	70	1.75	0.5	10	0.25	0.5	10	0.25	0.5	10	0.25
Solution étalon 3	1.25	25	0.63	1.25	25	0.63	1.25	25	0.63	1.25	25	0.63

Les volumes sont prélevés à partir des solutions mères de 20 mg.ml⁻¹ (voir section III.3.1.2)

Les spectres infrarouge des solutions des étalons après traitement et extraction liquide-liquide avec une dilution dans CH_2Cl_2 à des concentrations allant de 0.5 à 5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ dans le domaine spectral compris entre 4000 à 850 cm^{-1} sont représentés dans la figure 27.

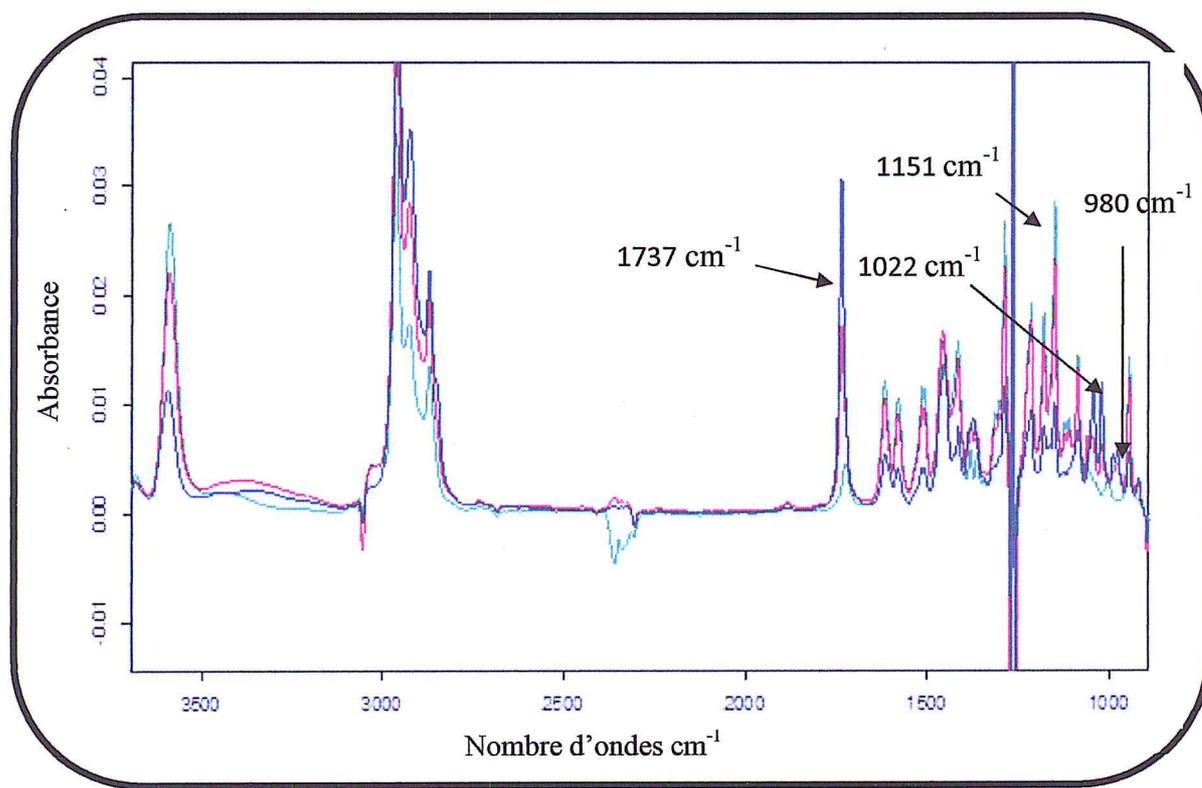


Figure 27 : Spectres d'absorbances des solutions étalons après ELL et dilution dans CH_2Cl_2

Une fois qu'on a enregistré les spectres des trois solutions des étalons nous avons suivi les étapes de l'analyse Quant 1, pour exécuter le modèle PLS-IRTF comme indiqué ci-dessous

- Analyser Quant.
- Ajouter les composantes (nous avons introduit les pourcentages de chaque étalon dans la solution).
- Ajouter les spectres IRTF.
- Définir les intégrations de chaque composante.

Modèle R : 1151 (1200-1132) —> **Thymol**

Modèle K : 980 (1005 -956) —> **Eucalyptol**

Modèle R : 1737 (1842-1668) —> **Camphre**

Modèle C : (1030-1014) (1050-1005) —> **Menthol**

- Courbe de calibrage..

Les résultats de l'analyse Quant 1 sont résumés dans le tableau 15.

Tableau 15 : Caractéristiques analytiques et résultats de l'analyse Quant 1 du thymol, eucalyptol, camphre et menthol obtenues après traitement ELL

Paramètres	Thymol			Eucalyptol			Camphre			Menthol			
	Etalon												
Droite d'étalonnage		-4.0771+4669.2X			0.42445+7788.5X			-4.3662+960.07X			7.0174+299.27X		
Coefficient de corrélation		0.996			0.999			0.997			0.999		
Valeur réelle		100	70	25	0	10	25	0	10	25	0	10	25
Valeur calculée		97.3	73.9	23.8	0.42	9.34	25.2	-0.62	11.2	24.5	0.49	9.2	25.3
Sigma		4.9			0.88			0.90			0.94		

Les résultats obtenus donnent de bonnes valeurs de prédiction avec une erreur de prédiction de 4.9 pour le thymol et une erreur inférieure à 1 pour les autres composés. On peut conclure que le procédé d'ELL permet l'isolement quantitatif des 4 composés.

IV.2.2. Analyse PLS-IRTF des échantillons réels après ELL

IV.2.2.1. Analyse PLS-IRTF du miel (d'Algérie) après ELL

La figure 28 montre les spectres comparatifs du miel (d'Algérie) enrichi après ELL dans CH_2Cl_2 et d'une solution étalon contenant les 4 composés dans une proportion de (70% thymol, 10% eucalyptol, 10% camphre et 10% menthol).

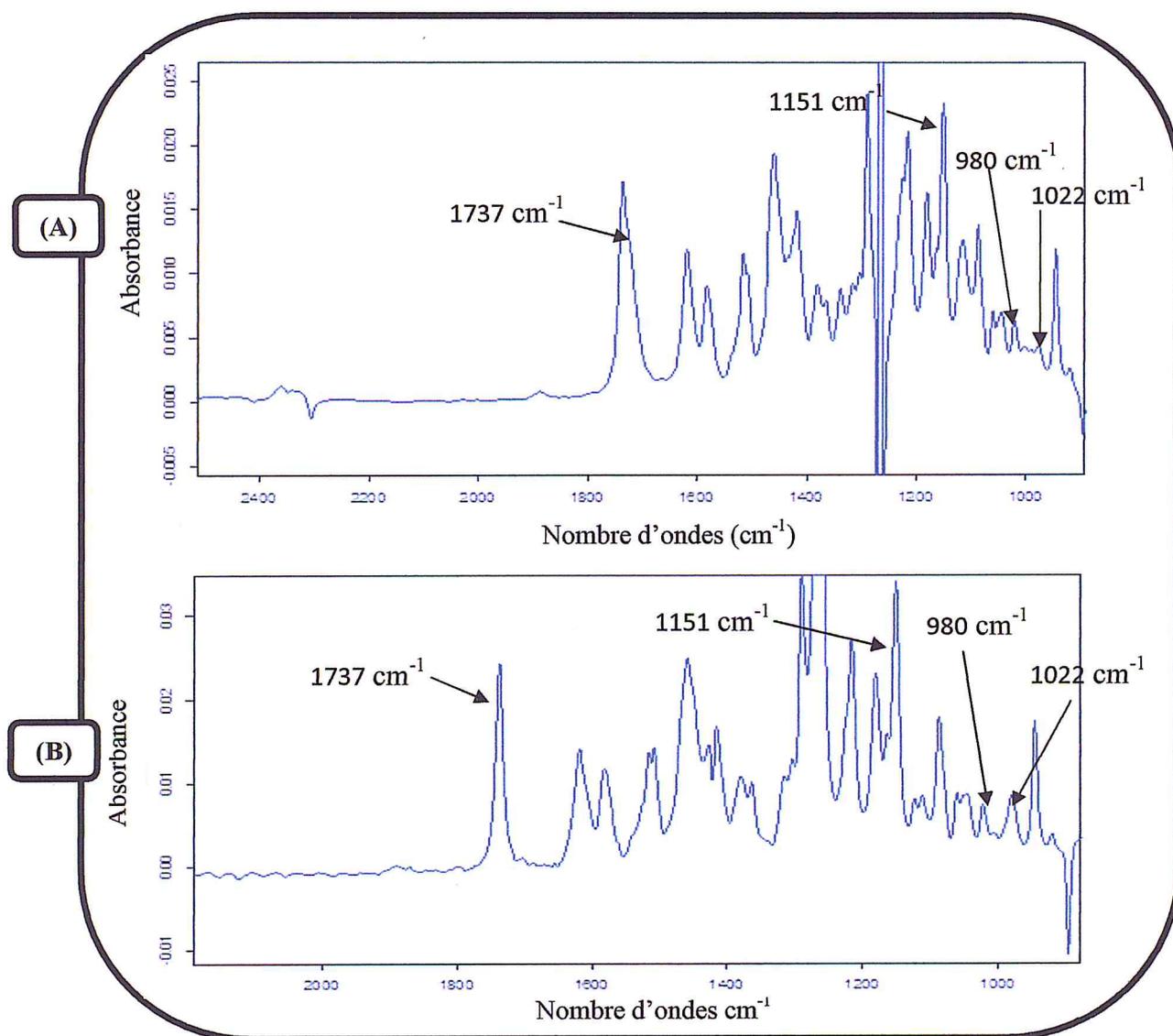


Figure 28 : Spectres IRTF d'absorbance du miel (d'Algérie) enrichi (A) après ELL dans CH_2Cl_2 et d'une solution étalon (B) contenant les 4 composés dans une proportion de (70% thymol, 10% eucalyptol, 10% camphre et 10% menthol).

Les résultats de l'analyse quantitative du miel (d'Algérie) enrichi obtenu après ELL par PLS-IRTF sont résumés dans le tableau 16.

Tableau 16 : L'analyse quantitative du miel (d'Algérie) obtenu après ELL par PLS-IRTF

Etalon Echantillon	Valeur ajoutée (%)	Thymol	Eucalyptol	Camphre	Menthol
		70	10	10	10
Miel (d'Algérie)	Valeur Prédiction trouvée (%) $\pm \delta^*$	67.64 \pm 0.320	5.43 \pm 0.017	10.96 \pm 0.050	8.07 \pm 0.017

* : Valeur moyenne \pm déviation standard de trois mesures dépendantes

Les résultats montrent de bonnes valeurs de prédictions dans tous les étalons à l'exception de l'eucalyptol où la perte est d'environ 50%. Les valeurs obtenues indiquent que le miel d'Algérie ne contient pas les 4 additifs.

IV.2.2.2. Analyse PLS-IRTF du miel de (France) après ELL

La figure 29 présente les spectres comparatifs du miel (de France) enrichi après ELL dans CH₂Cl₂ et d'une solution étalon contenant les 4 composés dans une proportion de (70% thymol, 10% eucalyptol, 10% camphre et 10% menthol).

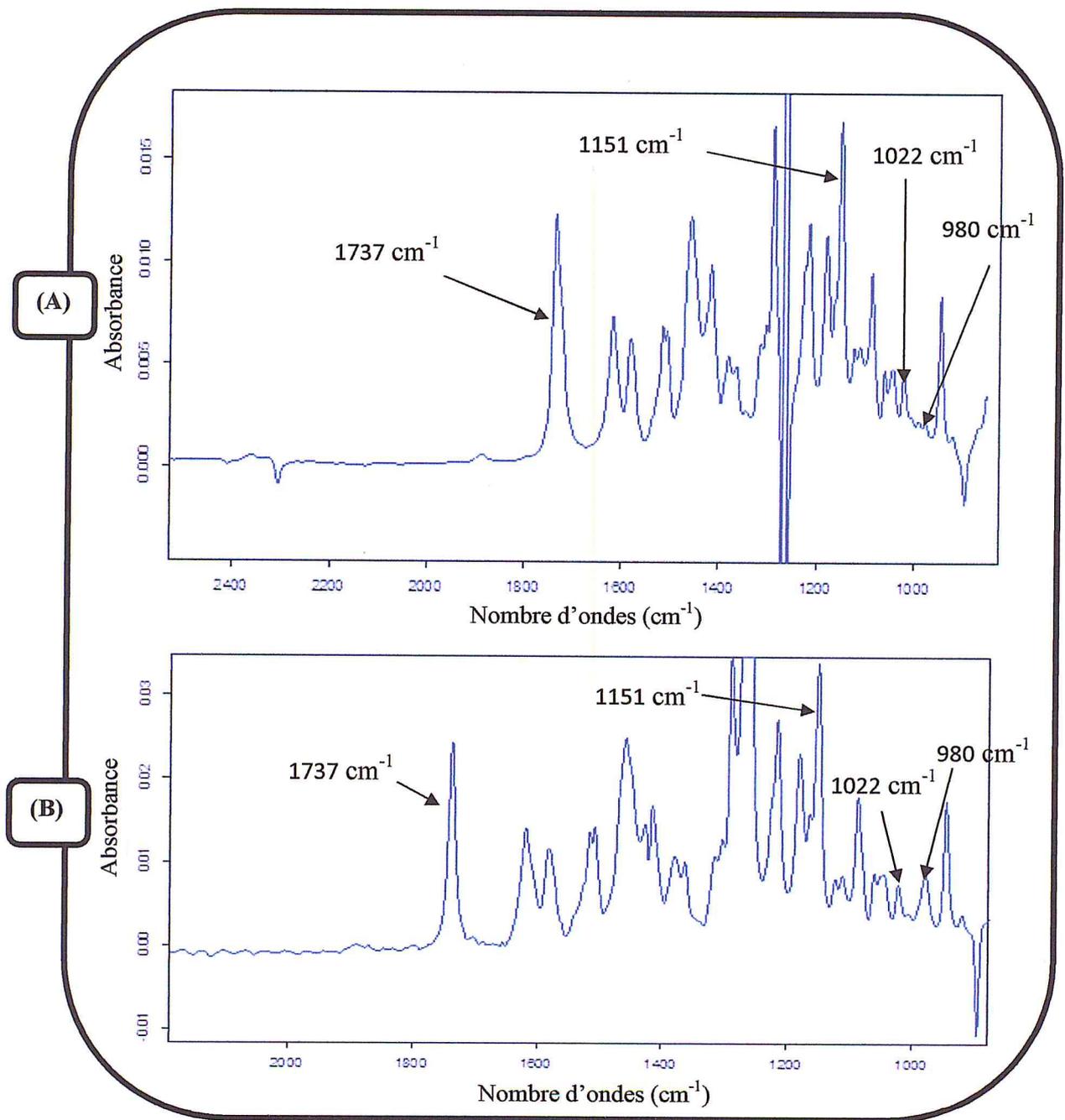


Figure 29 : Spectres IRTF d'absorbance du miel (de France) enrichi (A) après ELL dans CH₂Cl₂ et d'une solution étalon (B) contenant les 4 composés dans une proportion de (70% thymol, 10% eucalyptol, 10% camphre et 10% menthol).

Les résultats de l'analyse quantitative du miel (de France) enrichi obtenu après ELL par PLS-IRTF sont résumés dans le tableau 17.

Tableau 17 : L'analyse quantitative du miel (de France) obtenu après ELL par PLS-IR

Etalon Echantillon		Thymol	Eucalyptol	Camphre	Menthol
	Valeur ajoutée (%)	70	10	10	10
Miel (de France)	Valeur Prédiction trouvée (%) $\pm \delta$	50.69 \pm 0.37	0.42 \pm 0.00	6.68 \pm 0.06	9.39 \pm 0.01

* : Valeur moyenne \pm déviation standard de trois mesures dépendantes

Les résultats montrent une bonne prédiction pour le menthol et des valeurs de prédictions par défaut pour les trois autres étalons notamment pour l'eucalyptol. Ces valeurs indiquent aussi l'absence des additifs dans le miel de France.

IV.2.2.3. Analyse PLS-IRTF de l'extrait d'algue brune (*C.Tamariscifolia*) après ELL

La figure 30 présente les spectres comparatifs de l'extrait de *C.Tamariscifolia* enrichi après ELL dans CH₂Cl₂ et d'une solution étalon contenant les 4 composés dans une proportion de (70% thymol, 10% eucalyptol, 10% camphre et 10% menthol).

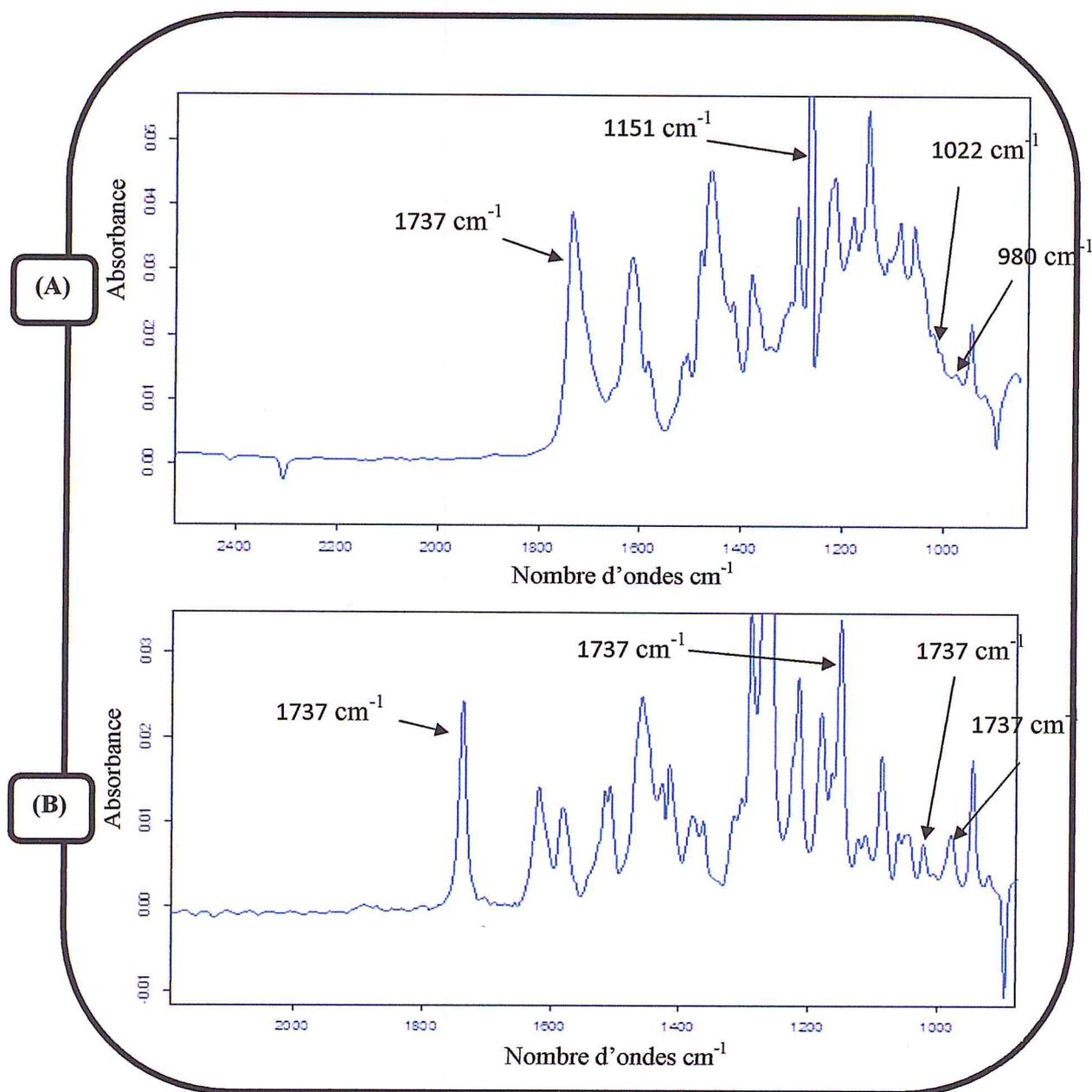


Figure 30 : Spectres IRTF d'absorbance de l'extrait d'algue brune (*C.Tamariscifolia*) enrichi (A) après ELL dans CH₂Cl₂ et d'une solution étalon (B) contenant les 4 composés dans une proportion de (70% thymol, 10% eucalyptol, 10% camphre et 10% menthol).

Les résultats de l'analyse quantitative l'extrait d'algue brune (*Tamarcifolia*) enrichi obtenu après ELL par PLS-IRTF sont résumés dans le tableau 18.

Tableau 18 : Analyse quantitative de l'extrait d'algue brune (*Tamarcifolia*) obtenu après ELL par PLS-IR

Etalon Echantillon	Valeur ajoutée (%)	Thymol	Eucalyptol	Camphre	Menthol
		70	10	10	10
l'extrait d'algue (<i>Tamarcifolia</i>)	Valeur Prédiction trouvée (%) $\pm \delta$	97.79 \pm 2.30	0.42 \pm 0.00	25.92 \pm 0.69	-4.51 \pm 0.30

* : Valeur moyenne \pm déviation standard de trois mesures dépendantes

IV.3. Analyse IRTF des échantillons après une extraction en phase solide (EPS)

Des expériences complémentaires faisant appel à l'EPS ont été réalisées a fin de vérifier la possibilité d'améliorer les valeurs de prédictions obtenues par ELL.

Selon la référence [50] la phase solide de type Lichrolut RP-18 a été utilisée, dans ce travail nous avons utilisé la phase C18 pour sa disponibilité.

Nous avons chargé les échantillons à travers des cartouches contenant 100 mg de phase solide de type C18 de capacité 5ml, préalablement conditionnées avec 5 ml de méthanol suivie de 5ml d'eau distillée. L'élution est réalisée avec 3 fois la fraction de 1ml de dichlorométhane. La solution des échantillons sont passés à traves le (MgSO₄) afin d'éliminer toute trace d'eau. Par la suite les échantillons sont analysés par IRTF.

Une quantité de 2.5 g du miel ou de 100 mg d'extrait d'algue est considérée le protocole suivi est détaillée sur la figure 31.

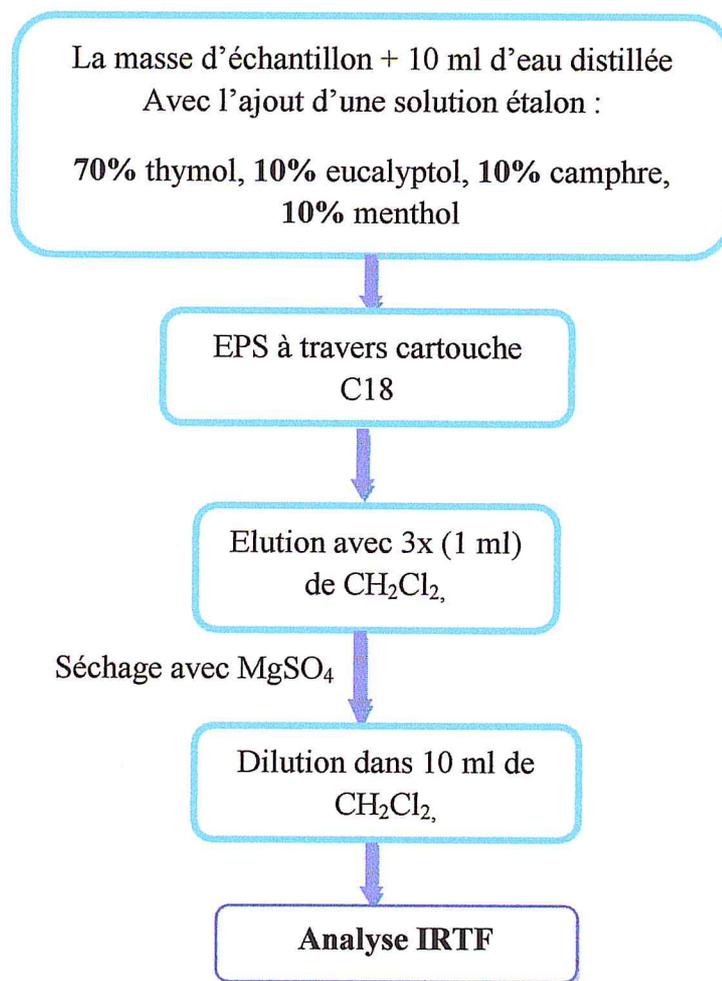


Figure 31 : Protocole d'extraction en phase solide l'EPS

IV3.1. Spectres IRTF des échantillons enrichis après extraction (EPS)

La figure 32 illustre les spectres comparatifs du miel (d'Algérie), miel de (France) et l'extrait d'algue brune (*Tamarcifolia*) enrichis après EPS et d'une solution étalon contenant les 4 composés dans une proportion de (70% thymol, 10% eucalyptol, 10% camphre et 10% menthol).

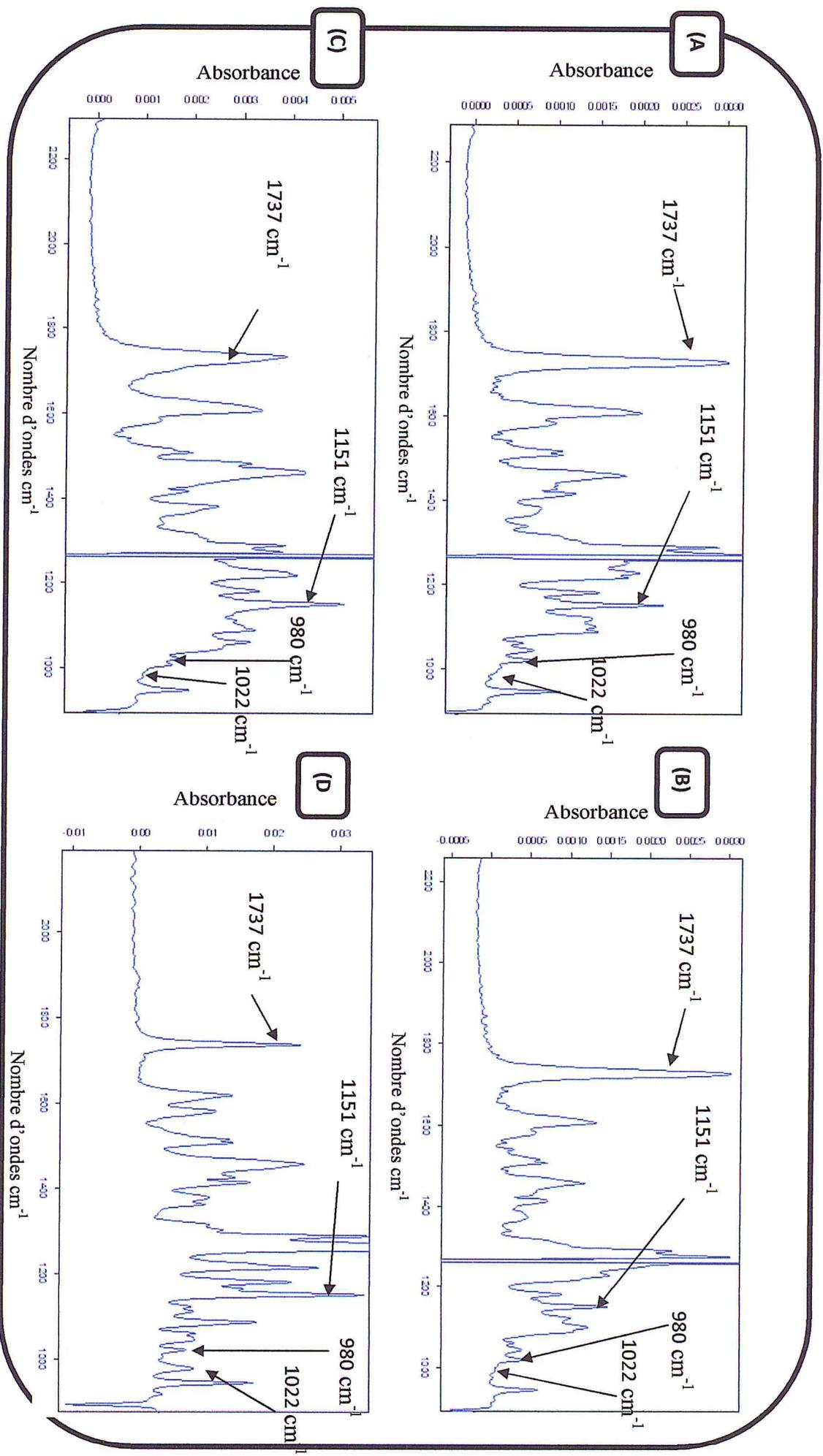


Figure 32 : Spectres IRTF d'absorbance des échantillons enrichis (A) miel (d'Algérie), (B) miel de (France), (C) extrait d'algue brune (*Tamarcfolia*) après EPS dans CH₂Cl₂ et d'une solution étalon (D) contenant les 4 composés dans une proportion de (70% thymol, 10% eucalyptol, 10% camphre et 10% menthol)

IV.3.2. Analyse PLS-IRTF des échantillons enrichis après EPS

Tableau 19 : Analyse quantitative des échantillons enrichis obtenu après EPS par PLS-IR

Etalon Echantillon		Thymol	Eucalyptol	Camphre	Menthol
	Valeur ajoutée (%)	70	10	10	10
Miel (d'Algérie)	Valeur Prédiction trouvée (%) $\pm \delta^*$	6.13 \pm 0.03	0.78 \pm 0.00	0.39 \pm 0.00	10.58 \pm 0.014
Miel de (France)		4.91 \pm 0.031	0.81 \pm 0.008	0.30 \pm 0.012	10.57 \pm 0.012
Extrait d'algue (<i>C.Tamariscifolia</i>)		8.28 \pm 0.14	0.81 \pm 0.008	0.86 \pm 0.03	8.52 \pm 0.03

* : Valeur moyenne \pm déviation standard de trois mesures dépendantes

Les résultats obtenus montrent des valeurs de prédictions très faibles, ceci est du surement au type de phase solide utilisée.

Suite à cela, l'isolement quantitatif des 4 composés est obtenu par l'utilisation de l'ELL. Cependant même pour cette dernière l'optimisation du modèle PLS-IRTF développé est nécessaire pour améliorer d'avantage les valeurs de prédiction.

Conclusion

Conclusion générale

L'exploitation du logiciel de calibration multivariable Quant 1 d'OPUS est correctement lancée pour la première fois, au sein de notre équipe de recherche suite à cette étude.

A travers une étude comparative on a illustré d'un côté, la quantité d'informations et l'importance de temps nécessaires pour obtenir les paramètres de validation lors d'une calibration monovariante et de l'autre côté, on a montré la simplicité et la rapidité de la calibration multivariable pour l'obtention des paramètres analytiques.

Pour procéder à la calibration PLS-FTIR et obtenir les meilleures valeurs de prédiction, nous avons considéré huit solutions étalons contenant les quatre analytes (thymol, eucalyptol, camphre et menthol). Les limites inférieures et supérieures des concentrations ont été sélectionnées par rapport à la composition commerciale Apilife VAR tout en respectant le domaine de linéarité dans la zone spectrale considérée.

Différents modèles PLS ont été construits en considérant les bandes séparées de chaque composante et différents modèles d'intégrations. On a sélectionné le modèle R pour le thymol, l'eucalyptol et le camphre en considérant le maximum des bandes à 1151 cm^{-1} , 980 cm^{-1} , et 1737 cm^{-1} respectivement, et le modèle C pour le menthol en considérant l'aire du pic entre $1070\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$.

Les résultats des analyses consécutives démontrent que le modèle PLS développé est adéquat pour la détermination simultanées des quatre analytes, en fournissant un coefficient de corrélation compris entre 1 et 0.995, permettant d'estimer la bonne qualité de calibrage et une précision d'analyse faible (<1).

L'analyse directe (sans traitement préalable) des échantillons réels enrichis avec une solution étalon contenant 70% thymol, 10% eucalyptol, 10% camphre et 10% menthol donne des valeurs de prédiction par excès pour le menthol et des valeurs par défaut pour les trois autres étalons.

Pour améliorer les valeurs de prédiction, on a procédé par ELL pour isoler les quatre analytes et éliminer l'effet matrice. Effectivement, les valeurs de prédiction sont nettement améliorées notamment pour le thymol, le camphre et le menthol dans le miel. Toutefois les valeurs de prédiction dans l'extrait d'algue sont erronés, ceci est du probablement à l'importance de l'effet matrice.

Les expériences préliminaires faisant appel à l'EPS montrent des valeurs de prédiction très faibles et non satisfaisantes. De ce fait, les valeurs de prédiction peuvent être améliorées ou bien par l'optimisation du protocole d'isolement ou bien par la considération d'autres variables spectrales (résolution, assouplissement, spectres dérivés...) avec le nombre de répliques nécessaires.

A partir de cette étude, on peut conclure qu'un « bon » modèle pour les échantillons d'étalonnage n'en est pas forcément un pour d'autres échantillons (de prédiction). En effet, il est toujours possible, en augmentant suffisamment la complexité du modèle, de faire en sorte que celui-ci reproduise aussi bien qu'on le voudra les variations des paramètres d'étalonnage. On aura alors modélisé non seulement les phénomènes physiques, mais aussi les bruits de mesure et autres sources d'incertitude.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. W. F. de Carvalho Rocha, G. P. Sabin, P. H. Março, R. J. Poppi « Quantitative analysis of piroxicam polymorphs pharmaceutical mixtures by hyperspectral imaging and chemometrics » *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 106 (2011)198–204
2. A.I. Vogel, J. Mendham, J. Toullec, M. Mottet, «Analyse chimique quantitative de vogel », Ed. De Boech, Bruxelles, 2006.
3. L. Benezzeddine-Boussaidi, G. Cazorla, C-Y. Guezennec, E. Fantena, P. Burnat, «Contrôle biologique de l'entraînement sportif par spectrométrie IR-TF», *Science & sports*, 23 (2008) 283-291.
4. M. Dubernet, «Analyse instantanée de la qualité des raisins et des mouts par IR-TF», *Cursos Rioja,France*, (2002).
5. «Méthodes spectrométriques d'analyse et de la caractérisation », *Génie des Procédés*, centre SPIN, Ecole des Mines de Saint-Etienne
6. N. Bouzidi, « Détermination des stérols de l'algue rouge *Asparagopsis Armata* par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier en employant l'EPS: Etude comparative avec la chromatographie liquide à haute performance», *Mémoire de magister, USTBD, Algérie*, (2003).
7. A.H. Lettington. , «Infred Technology and Application » *SPIE-proceedings*, Ed Bellingham WA, London, UK, V. 1320, (1990).
8. N. Bouzidi, Y. Daghbouche, M. El Hattab, G. Culioli, I. Piovetti, S. Garrigues, M. De la Gardia., « Determination of total sterols in brown algae by infrared spectroscopy », *Analytica Chimica Acta*, 616, (2008), 185-189.
9. F. Rouessac, A. Rouessac. « Analyse chimique–Méthodes et techniques instrumentales modernes », *Dunod, Paris*, (2000).
10. C.J. Ducauze « Méthodes d'analyse pour la recherche des fraudes alimentaires », In : *Fraudes alimentaires –Approche réglementaire et méthodologie analytique*, Tech et Doc Lavoisier, Paris, (2003) 107-134.
11. P. Breuil, D. Di Benedetto « Incertitude et étalonnage », (2000)203-214.
12. B. Kowalski « Chemometrics », *Chem. Ind.*, 22 (1978) 882
13. G. Vandeginste, D. Massart, L. Buydens, S. De Jong, P.Lewi et J. Smeyers-

- Verbeke « Handbook of chemestrics and qualimetrics », part A, Elsevier, New York, (1988) 207.
14. L. Bokobza, J. Near, « Infrared spectroscopy », 61 (1998) 206-220.
 15. F. Despagne, D. L. Massart, « Neural networks in multivariate calibration. Analyst », 123(1998) 157–178.
 16. W. F. de Carvalho Rocha, G. P. Sabin, P. H. Março, R. J. Poppi « Quantitative analysis of piroxicam polymorphs pharmaceutical mixtures by hyperspectral imaging and chemometrics », Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 106 (2011), 198–204.
 17. Stephen John Haswell « Practical Guide to Chemometrics », ed: Marcel Dekker, Inc (2000) .
 18. S.D. Brown, « Transfer of Multivariate Calibration Models », Comprehensive Chemometrics, 143 (2009) 345-378.
 19. P. Geladi, B. Kowalski, « Partial least squares regression »: A tutorial Analytica Chimica Acta, 185(1986) 1-17.
 20. Severine Vancolen, « La regression PLS », Diplôme poste garde en statistique Université de Neuchâtel Suisse (2004).
 21. P. Geladi, « Chimiométrie en spectroscopie. Partie 1. Chimiométrie classique », Spectrochimica Acta Partie B: Spectroscopie, 58(2003) 767-782.
 22. B.G. Osborne, T. Fearn, « la spectroscopie proche infrarouge dans l'analyse des aliments », Longman, London, (1986).
 23. D.L. Massart, BGM. Vandeginste, SN. Deming, Y. Michotte et L. Kaufman, « Chimiométrie », A Textbook ., Elsevier, Amsterdam, 445(1988)59.
 24. H. Wold,. « Estimation of principal component and related models by iterative least squares, Multivariate Analysis », ed. P.R. Krishnaiah, Newyork : Academic Press, (1966) 391-420.
 25. Wold, S., Martens, H. & Wold, H, « The multivariate calibration problem in chemistry solved by the PLS method », in Proc. Conf. Matrix Pencils, Ruhe A. & Kagstrm B. Ed, Lecture Notes in Mathematics, (1983)286-293.
 26. Stone, M. & Brooks, R., « Continuum regression : Cross-validated sequentially constructed prediction embracing ordinary least squares, partial least squares, and principal components regression », Journal of the Royal Statistical Society,

Journal of the American Oil Chemists' Society, 90 (2001), 1127-1131.

50. M.J. Nozal, J.J. Jiménez, M.J. Gonzalez, M. Higes « Extraction of thymol, eucalyptol, menthol, and camphor residues from honey and beeswax Determination by gas chromatography with flame ionization detection », Journal of chromatography A, 954 (2002) 207-215.