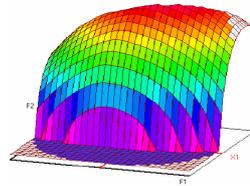




Année Universitaire : 2012-2013



Master Sciences et Techniques CAC Agiq
Chimométrie et Analyse Chimique : Application à la gestion
industrielle de la qualité

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

Validation de la méthode d'analyse des nitrates dans l'eau
potable par Spectrophotométrie U.V-Visible selon le protocole du profil d'exactitude

Présenté par:

FELLAK Somia

Encadré par:

Mme. MEKKOUDI Zahra

Mr. SAFFAJ Taoufiq

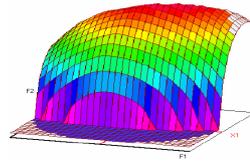
RADEEF

USMBA-Fès

Soutenu Le 20 Juin 2013 devant le jury composé de:

- | | |
|--|-----------|
| - M ^r . BOUAYAD Abdeslam | Examineur |
| - M ^r . KANDRI RODI Youssef | Examineur |
| - M ^r . SAFFAJ Taoufiq | Encadrant |
| - M ^{me} . MEKKOUDI Zahra | Encadrant |

Stage effectué à : La R.A.D.E.E.F (Régie Autonome de Distribution d'Eau et d'Electricité de Fès.)



Master ST CAC Agiq

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

Nom et prénom: FELLAK Somia

Année Universitaire : 2012/2013

Titre: Validation statistique de la méthode d'analyse des nitrates par Spectrophotométrie UV-Visible selon le protocole du profil d'exactitude.

Résumé

Le principe de la validation des procédures analytiques quantitatives est, aujourd'hui largement, répondu dans tous les domaines d'activité où des mesures sont réalisées. La validation est fondée sur une analyse statistique basée sur un certain nombre de critères aboutissant à des méthodes analytiques permettant de donner des résultats fiables. Donc, elle a pour but de démontrer qu'elles correspondent à l'utilisation pour laquelle elles sont proposées.

Le protocole expérimental appliqué dans ce projet de fin d'étude en vue de valider la méthode d'analyse des ions nitrates par spectrophotométrie UV-visible, est basé sur l'application du profil d'exactitude selon les recommandations de la norme ISO 5725, en développant statistiquement les critères de validation telles que la justesse, fidélité et la limite de quantification.

On peut donc conclure à la capacité de la méthode à quantifier exactement les nitrates dans l'eau potable sur le domaine de validité qui s'étend de 0.588 à 5mg/l, mais en dehors de ce domaine, il n'est plus possible de garantir la fiabilité des résultats d'analyse.

Mots clés: Validation analytique, profil d'exactitude, eau, nitrate, spectrophotomètre UV-visible, intervalle de tolérance



Remerciements
Dédicaces
Liste des abréviations
Lise des figures et des tableaux

Sommaire

Introduction générale.....1

Chapitre 1 : Présentation de la société

I. Présentation générale de la RADEEF.....	4
1. Généralités.....	4
2. Historiques.....	4
3. Missions et domaine d'activité.....	4
II. Présentation du laboratoire de contrôle de qualité d'eau potable.....	4
1. Historique.....	4
2. Activités.....	4
3. Missions du laboratoire.....	5
4. Ressources en eau.....	5
5. Organigramme générale du laboratoire.....	6

Chapitre 2 : Revue bibliographique

I. Approche théorique de l'eau potable.....	8
1. Définition.....	8
2. Composition chimique.....	9
II. Analyses quotidiennes du laboratoire.....	9
1. Analyses physique.....	9
2. Paramètres chimiques.....	10
3. Analyses bactériologiques.....	11
III. Généralités sur les nitrates.....	12
1. Définition.....	12
2. Description et origines.....	12
3. Toxicité.....	12
4. Nitrates et normes.....	13
IV. Spectrophotomètre UV-visible.....	14
1. Définition.....	14
2. Principe de fonctionnement.....	14
V. Normes et protocole de validation	15
1. Normes et accréditation.....	15
2. Validation d'une méthode d'analyse.....	17



3. Protocole du profil d'exactitude.....	19
--	----

Chapitre 3 : Partie expérimentale

I. Etablissement de la courbe d'étalonnage.....	30
1. Principe.....	30
2. Réactifs.....	30
3. Mode opératoire	31
4. Courbe d'étalonnage.....	32
II. Validation de la méthode d'analyse des nitrates.....	32
1. Plan d'étalonnage.....	32
2. Plan de validation.....	33
3. Estimation des coefficients d'étalonnage.....	34
4. Concentration retrouvées et justesse.....	34
5. Fidélité.....	36
6. Intervalle de tolérance et limites d'acceptabilité.....	37
7. Construction du profil d'exactitude.....	39
8. Limite de quantification.....	41
Conclusion générale.....	43
Références bibliographiques.....	44
Annexe 1.....	45



Introduction générale



L'EAU est un élément essentiel pour la survie de tous les êtres vivants. Sans la présence de cette ressource naturelle précieuse et vitale, la vie serait extrêmement réduite car les êtres vivants sont composés en grande partie d'eau.



En raison de ses propriétés acido-basiques, ce composé chimique est l'un des principaux solvants qui a besoin d'être protégé contre les effets tordus de la pollution, car un grand pourcentage des maladies enregistrées dans les pays en voie de développement, sont manifestement liées à la consommation de l'eau. « L'eau y étant un vecteur de maladies graves voire mortelles ». [1]

Actuellement, le laboratoire de contrôle de la qualité de l'eau potable de la Régie autonome intercommunale de distribution d'eau et d'électricité de la wilaya de Fès, accorde une nette importance à la validation, par utilisation des procédures de contrôle interne de qualité, dans le but d'obtention d'une accréditation ISO /CEI 17025. Ceci permettra en effet d'adapter une démarche hautement qualifiée visant à assurer la distribution d'une eau saine conforme aux réglementations nationales et internationales.

Parmi les paramètres qui nécessitent un suivi rigoureux, on cite les nitrates, et est dans cette perspective qu'on essayera, à travers ce stage de fin d'étude de valider la méthode du dosage des ions azotés dans l'eau potable par spectrophotomètre UV visible, qui sont considérés comme une cause de contamination de l'eau potable s'ils dépassent la norme prédite par SNIMA(50mg/l selon SNIMA).

Ce dernier point, construit l'objectif principal de ce travail qui vise à valider cette technique de dosage des nitrates dans l'eau par spectromètre U.V-visible, via la stratégie recommandé par la norme ISO 5725 en illustrant une approche mieux adaptée qui débouche sur un autre outil décisionnel graphique appelé profil d'exactitude.

Ce rapport a été organisé comme suit :

- ✦ En premier temps, nous avons donné une présentation générale de la société où nous avons effectué notre stage ainsi que, ses activités et ses missions.
- ✦ Le deuxième chapitre 'revue bibliographique' a pour objet d'élaborer une étude bibliographique qui traite les différents types d'analyses assurant la qualité de l'eau potable, et de fournir une caractérisation initiale de la validation en termes de critères de performance.
- ✦ Finalement, une partie expérimentale dans laquelle on va illustrer les différents calculs indispensables à la construction du profil d'exactitude, ainsi que les performances obtenues et les conclusions déduites.



Chapitre I

Présentation de la société



I. Présentation générale de la RADEEF

1. Généralités

La Régie Autonome intercommunale de Distribution d'Eau et d'Electricité de la wilaya de Fès (R.A.D.E.E.F) est un établissement public à caractère industriel et commercial, doté de la personnalité morale et de l'autonomie financière, elle est chargée de la gestion des services publics d'eau, d'électricité et de l'assainissement liquide. elle joue un rôle important dans le développement du tissu économique de la ville de Fès, elle est tenue de satisfaire de façon continue, dans les meilleures conditions aux besoins croissantes en eau potable et en énergie électrique de la population de la ville de Fès.

2. Historique

La RADEEF a été créée par délibération du conseil municipal de la ville de Fès en date du 30 avril 1969 en vertu du Dahir n° 1.59.315 du 23 Juin 1960 relatif à l'Organisation communale.

3. Missions et domaines d'activités



La régie assure la distribution de l'eau et de l'électricité ainsi que la gestion du réseau d'assainissement liquide à l'intérieur de la ville de Fès et de la commune Ain Chkef. Elle a pour mission de répondre aux besoins de la population en matière d'eau potable, d'électricité et d'assainissement dans les meilleures conditions et au moindre coût.

La R.A.D.E.E.F assure l'alimentation en eau potable pour une population dépassant les 1 .204 .000 personnes à l'intérieur des villes de FES, SEFROU, BHALIL, ainsi que des communes rurales ; Bir Tam-Tam, Ras Tabouda, Sidi Harazem, Ouled Tayeb, Douar Ait Taleb et Douar Ait El Kadi.

II. Présentation du laboratoire de contrôle de qualité d'eau potable

1. Historique

Le laboratoire de contrôle et surveillance de la qualité de l'eau potable de la R.A.D.E.E.F a été créé en 1976 à son siège, puis a été transféré près du réservoir sud à côte de la SIMEF en 1993.

2. Activités

Le contrôle de la qualité de l'eau par la RADEEF a pour but de s'assurer que l'eau du robinet ne présente à aucun moment de risque pour la santé, et qu'elle répond aux différentes limites de qualité fixées par la réglementation.

Pour cela, des analyses physico-chimiques et bactériologiques sont réalisées, afin d'évaluer la qualité, sur :

Les ressources : (eaux superficielles ou captage d'eau souterraine) : les analyses permettent de suivre l'évolution des eaux dans le temps, et de mettre en évidence les problèmes de protection des captages et la nécessité de traiter les eaux.

Les eaux produites par les unités de traitement : les analyses permettent de vérifier l'efficacité du traitement mis en place et de contrôler la qualité des eaux avant distribution.

Les eaux distribuées: les eaux, avant d'arriver sur les lieux de consommation, empruntent des kilomètres de canalisation de matériaux divers, des réservoirs, des installations de surpression. Les analyses réalisées au robinet du consommateur permettent de vérifier si la qualité des eaux n'a pas été altérée pendant ce transport

3. Mission du laboratoire

Le rôle du Laboratoire est de veiller sur la qualité de l'eau livrée par la RADEEF aux consommateurs, ses différentes missions sont essentiellement :



- Contrôler et réaliser des enquêtes sur la qualité de l'eau.
- Contrôler les opérations de nettoyage et de désinfection des réservoirs et des conduites.
- Contrôler quotidiennement la qualité de l'eau par des analyses physico-chimique et bactériologiques.
- Détecter la source d'une fuite au niveau du réseau de distribution.
- Contrôler Chlore résiduel, sur l'ensemble du réseau

Le laboratoire est aussi chargé, de contrôler les opérations de nettoyage et de désinfection des conduites neuves, de réaliser des enquêtes la qualité de l'eau à la suite des réclamations d'abonnés, ainsi que réaliser le contrôle des opérations de nettoyage des réservoirs effectués par le service d'exploitation.

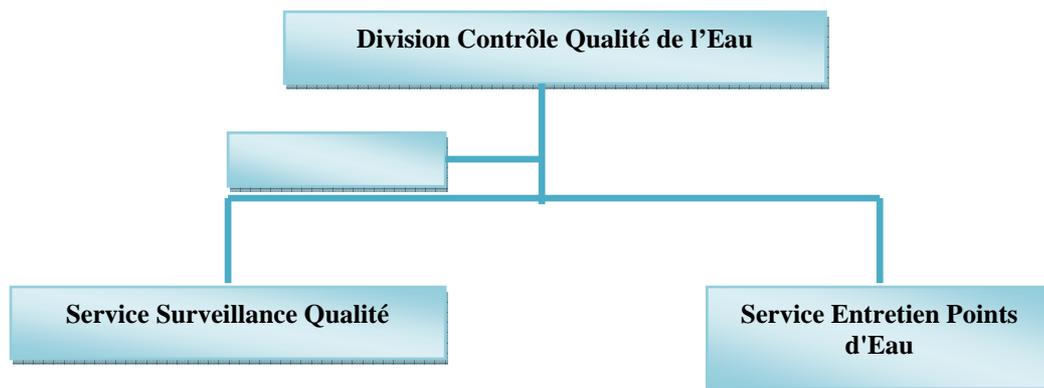
4. Ressources en Eau

Parmi les origines de l'eau consommée à Fès on cite :

- Les Forages qui constituent les eaux souterraines.
- Les Eaux superficielles venants d'Oued Sebou.
- Les sources comme source Aïne Chkef et source bourkeiz...

Ces eaux sont traitées sur le site de pompage à la station de traitement Aïne Nokbi, ensuite acheminées dans des conduites jusqu'au réservoir de stockage de la RADEEF Bab El Hamra.

5. Organigramme général du laboratoire



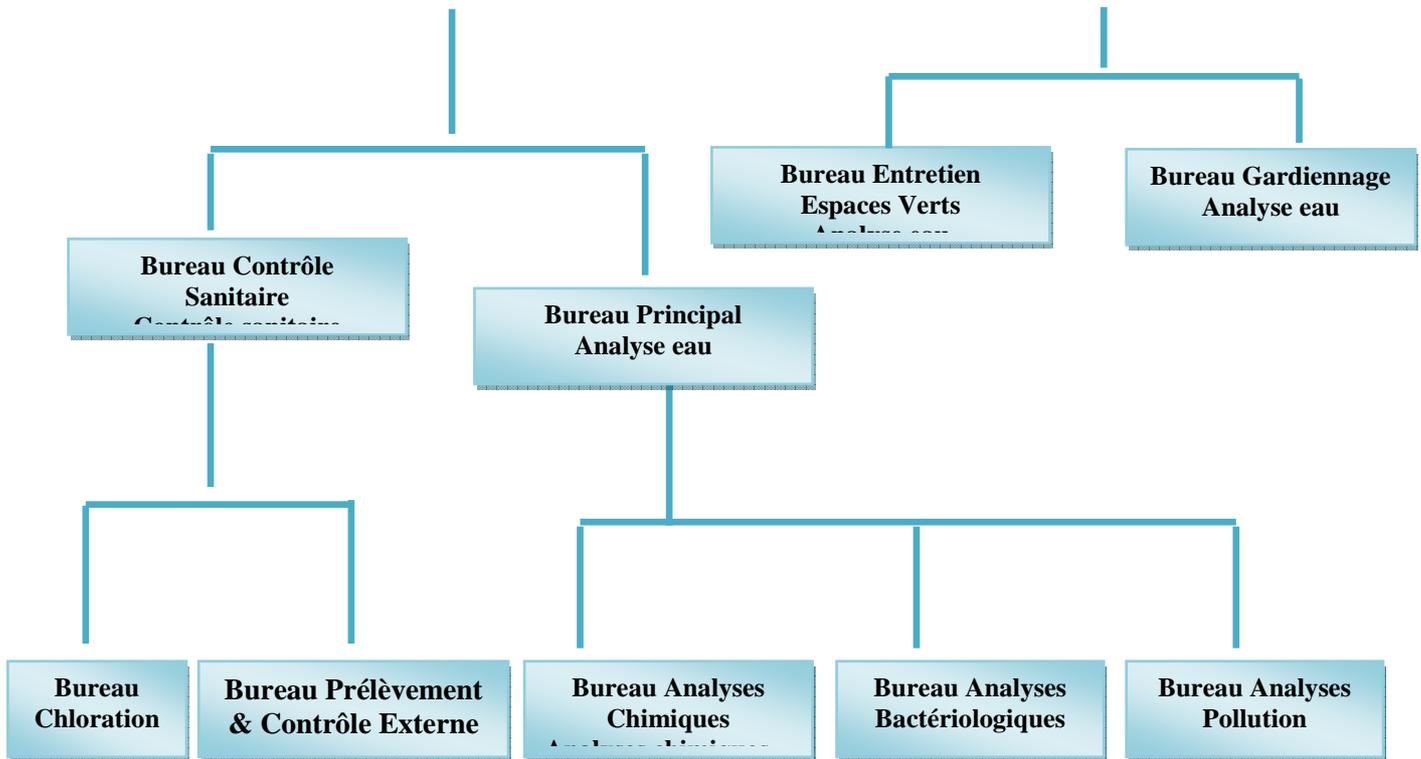


Figure 1 : Organigramme du laboratoire de contrôle de la qualité de l'eau potable



Chapitre II

Revue bibliographique



L'eau est un élément vital pour l'humanité, mais parfois il devient un vecteur de transmission des maladies hydriques. Cependant différents types d'analyses se pratiquent à chaque jour dans les laboratoires pour contrôler de qualité de l'eau potable, et pour confirmer cette qualité, on fait appel à une validation analytique basée sur l'étude d'un ensemble des outils statistiques (justesse, fidélité,...) indispensables pour caractériser une méthode et la validé.

I. Approche théorique de l'eau potable

1. Définition



L'eau est un composé de formule chimique H_2O , Elle se trouve dans la nature soit en état solide, liquide ou vapeur, et en fonction de leur origine sur le globe, elle est classée en trois grands groupes :

➤ **Eau météorique**

Il s'agit de l'eau liquide présente dans l'atmosphère et qui forme les nuages (eau de pluie). Les eaux météoriques sont chargées d'oxygène, et des gaz dissous présents dans l'atmosphère dont la concentration en sels minéraux est (10-100 ppm) et en substances organiques est faible.

➤ **Eau de surface**

L'eau de surface est l'eau qui se trouve à la surface ou proche de la surface du sol. Sa température varie en fonction du climat et de ses saisons. Ses matières en suspension sont variables selon la nature et relief des terres à son voisinage. Sa composition en sels minéraux est variable en fonction du terrain; elle retient peu de nitrates. Une eau de surface est ordinairement riche en oxygène et pauvre en dioxyde de carbone. [2]

➤ **Eau souterraine**

Les eaux souterraines sont toutes les eaux se trouvant sous la surface du sol, dans la zone de saturation et en contact direct avec le sol ou le sous-sol. Ces eaux sont caractérisées par leur conductivité élevée, l'absence de matière en suspension et la présence d'espèces chimiques sous forme réduite. En général elles répondent aux normes de potabilité car elles sont moins sensibles aux pollutions accidentelles. [3]

2. Composition chimique

L'eau est un élément vital qui possède des substances minérales et organiques, et donc il n'est pas considérée comme un composé chimique pur, c'est ainsi que les chimistes utilisent de l'eau distillée pour leurs solutions. Il contient des :

a) Matières minérales

Dont les principaux sont le calcium (Ca^{2+}), le sodium (Na^+), le potassium (K^+), les sulfates (SO_4^{2-}), les chlorures (Cl^-) et les nitrates (NO_3^-)... qui proviennent essentiellement du lessivage des sols par les eaux de pluie, et qui peuvent varier du milligramme par litre au gramme par litre pour les eaux les plus salées, et des éléments qui ne sont présents qu'à l'état de trace (de 0,1 à 100 microgrammes par litre), comme le cuivre, le fer, le zinc, ... Ils proviennent des roches mais aussi parfois des activités industrielles et domestiques.

b) Matières organiques

Les matières organiques peuvent être présentes sous forme dissoute (pigments et composés d'origine artificielle comme les hydrocarbures, ou les pesticides, ...), ou en suspension (déchets végétaux, ...). Elles proviennent essentiellement de la dégradation de la matière organique présente dans le milieu ou dans les sols lessivés par les pluies (décomposition des plantes et des animaux), mais aussi de composés issus de l'activité humaine. Leur concentration peut atteindre quelques dizaines de milligrammes par litre dans les eaux de surface.



II. Analyses quotidiennes du laboratoire

1. Analyses physiques

a) Température

La température est un facteur très important (réduit les teneurs en oxygène), sa mesure doit se faire au moment du prélèvement de l'échantillon à l'aide d'un thermomètre.

b) pH

Le pH est un indicateur de l'acidité ou de l'alcalinité de l'eau. Il dépend de la présence des ions H_3O^+ dans le milieu analysé selon la relation : [4]

$$pH = -\log [H_3O^+]$$

La mesure de pH de l'eau se fait par la méthode potentiométrique à l'aide d'un pH-mètre doté d'une électrode en verre, la mesure se fait directement sur l'échantillon d'eau.

c) Conductivité

La conductivité d'une eau est un critère qui donne une information sur sa composition chimique. Elle dépend de la concentration totale des ions, de leur concentration relative, de leur mobilité, de leur valence et de la température. Elle permet ainsi d'avoir une idée sur la salinité de l'eau. Une conductivité élevée traduit soit des pH anormaux, soit une salinité élevée. La conductivité est exprimée en micro Siemens par Centimètre ($\mu S/cm$) mesurée à la température de $20^\circ C$ à l'aide d'un conductimètre.

d) Turbidité

La turbidité désigne la teneur d'un liquide en matières qui le troublent. Elle est causée par des [particules en suspension](#) qui absorbent, diffusent et/ou réfléchissent la [lumière](#). Elle est mesurée au laboratoire à l'aide d'un turbidimètre. Les unités de mesure sont les UTN (unités de turbidité néphélométriques).

2. Paramètres chimiques

a) Chlorure

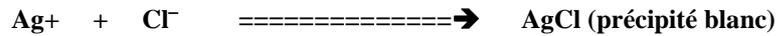
❖ Principe la Méthode de Mohr

On détermine les chlorures présents dans l'eau par la méthode volumétrique de MOHR, qui consiste à doser les ions chlorures en milieu neutre $pH=7$ par une solution titrée de nitrates d'argent ($AgNO_3$) en présence de chromate de potassium K_2CrO_4 . [5]

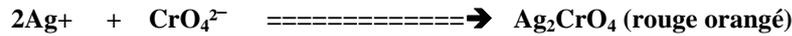
❖ Réaction de dosage



On précipite l'ion Cl^- d'une solution de NaCl par formation d' AgCl (les ions Ag^+ sont issus d'une solution d' AgNO_3) selon la réaction suivante :



Lorsque le milieu est épuisé en Cl^- , les ions Ag^+ réagissent avec CrO_4^{2-} pour donner un complexe coloré (rouge brique) qui caractérise la formation de chromate d'argent qui nous indique le point d'équivalence, d'où le nombre de mole d'ion Cl^- est égale aux nombre de moles d'ions Ag^+ . La réaction produite est la suivante :



b) Nitrites

Le dosage des nitrites se fait par spectrophotométrie à l'aide d'un réactif de Zambelli qui forme en présence de ces ions et des ions NH_4^+ un complexe jaune, dont l'intensité de couleur produite du test est proportionnelle à la concentration des nitrites.

L'acide sulfonique en milieu chlorhydrique et en présence d'ion NH_4^+ et de phénol forme avec les ions NO_2^- un complexe coloré en jaune dont l'intensité est proportionnelle à la concentration NO_2^- .

La lecture au spectromètre s'effectue à la longueur d'onde de 435 nm, ainsi la courbe d'étalonnage est construite pour une prise d'essai de 50 ml. La courbe donne directement la teneur en nitrite NO_2^- exprimée en mg/l d'eau multipliée par 0,305 (azote nitreux en mg/l).

c) Sulfates

❖ Définition

Les ions sulfates sont indicateur de l'eau à traiter car leur présence est liée à la nature des terrains traversés, comme ils peuvent être un témoin de l'existence de rejets industriels. Les concentrations supérieures à 250 mg/l peuvent provoquer des diarrhées chez l'enfant.

❖ Principe

Les ions sulfates se dosent par la méthode néphélométrique son principe consiste à faire précipiter ces ions en milieu chlorhydrique à l'état de sulfate de baryum.



Le précipité ainsi obtenu est stabilisé à l'aide d'une solution de « TWEEN20 ». Les suspensions homogènes sont mesurées au spectrophotomètre à une longueur d'onde 650 nm.



3. Analyses bactériologiques

L'eau potable, selon les normes, doit être exempte de germes pathogènes et d'organismes parasites, car les risques sanitaires liés à ces micro-organismes sont grands. C'est pour cela les analyses bactériologiques sont nécessaires pour définir sa valeur hygiénique.

Les principaux germes pathogènes qu'on doit détecter en analysant une eau sont:

- ➔ **Germes totaux** : Ce sont des micro-organismes aérobies représentant la teneur moyenne en bactéries d'une source naturelle. Ces germes n'ont pas d'effets directs sur la santé mais sous certaines conditions, ils peuvent générer des problèmes. Ce sont des indicateurs qui révèlent la présence possible d'une contamination bactériologique.
- ➔ **Coliformes totaux** : ce sont des bactéries capables de fermenter le lactose avec production d'acide et de gaz à la température de 37 °C. Ils peuvent exister dans les matières fécales et dans certains milieux naturels (sol et végétation).
- ➔ **Coliformes fécaux** : Ou coliformes thermotolérants, qui sont des bactéries capables de fermenter le lactose à une température de 44,5 °C. L'espèce la plus fréquemment associée à ce groupe bactérien est *Escherichia Coli* (*E. Coli*).
- ➔ **Streptocoques fécaux** : c'est un groupe de streptocoques qui ne sont pas tous d'origine fécale (groupe D). Toutefois, leur recherche associée à celle des coliformes fécaux constitue un bon indice de contamination fécale.

III. Généralités sur les nitrates

1. Définition

Les nitrates sont des composés inorganique de formule NO_3^- et de masse moléculaire 62 g/mol. Ils existent naturellement dans les sols et les eaux. Ces ions sont, d'un point de vue chimique, des sels de l'acide nitrique. Ces sels sont caractérisés par la présence de l'ion nitrate NO_3^- , composé d'un atome d'azote et de trois atome d'oxygène comme il est montré dans la figure ci-dessous.

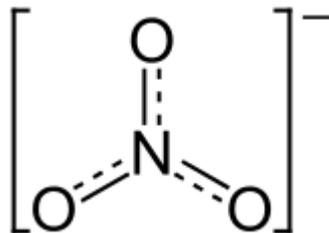


Figure 2 : Structure de l'ion nitrate

2. Description et origines

Le nitrate représente la plus stable des deux formes de l'azote, mais sous l'action microbienne, il peut être réduit en nitrite (NO_2^-), qui est la forme la plus toxique. Il est présent à l'état naturel partout dans l'environnement.



Il est le produit de l'oxydation de l'azote de l'atmosphère (représente 78%) par les microorganismes des plantes, du sol ou de l'eau.

Toutes les sources d'azote sont des sources potentielles de nitrate. Dans l'eau, ces substances peuvent provenir de la décomposition de matières végétales ou animales, d'engrais utilisés en agriculture, du fumier, d'eaux usées domestiques et industrielles, des précipitations ou de formations géologiques renfermant des composés azotés solubles. Normalement, la concentration de nitrates dans les eaux souterraines et les eaux de surface est faible, mais elle peut atteindre des niveaux élevés à cause du lessivage des terres cultivées ou de la contamination par des déchets d'origine humaine ou animale.

3. Toxicité

Des concentrations excessives de nitrates dans l'eau potable peuvent causer des maladies graves et parfois mortelles, notamment chez les jeunes enfants. Chez les adultes et les nourrissons, l'effet néfaste est lié à la conversion de nitrate en nitrite dans l'organisme, ce qui interfère avec la capacité du sang à transporter l'oxygène (pouvoir oxyphorique). Cette condition est connue sous le nom de "méthémoglobinémie" ou de "maladie bleue", parce que les symptômes comprennent l'essoufflement et la cyanose (coloration bleue de la peau). Les nourrissons de moins de trois mois y sont particulièrement vulnérables.

Dans le milieu aquatique, le nitrate est moins toxique que les autres formes de l'azote, comme le nitrite et l'ammoniac. Toutefois, on trouve de plus en plus d'études qui indiquent qu'il peut avoir des effets néfastes sur le développement des organismes aquatiques aux premiers stades de vie en limitant la capacité du sang à transporter l'oxygène ou en perturbant l'équilibre acido-basique. Bien que le nitrate aux concentrations naturelles n'ait généralement pas d'effet mortel sur les organismes, il peut causer des retards de croissance ou une survie limitée en rendant ces organismes léthargiques.

4. Nitrates et normes

Les nitrates dans l'eau potable sont mesurés à la fois en terme de quantité d'azote présent ou en terme d'oxygène et d'azote. Les normes pour le nitrate dans l'eau potable est de 10 mg/L de nitrate-N, ou 50 mg/l de nitrate-NO₃⁻. A part si c'est indiqué, les niveaux en nitrate se réfèrent généralement à la quantité d'azote présente, et la norme habituelle est ainsi de 10 mg/l.

Une exposition à court-terme à l'eau potable avec un niveau de nitrate supérieur à la norme est potentiellement dangereuse pour la santé, notamment pour les bébés. Les bébés boivent de fortes quantités d'eau comparativement à leur poids, spécialement si l'eau est utilisée pour mélanger les poudres ou les recettes ou les jus concentrés. De plus, leur système digestif est immature, et ainsi plus propice à la réduction des nitrates en nitrites. Les nitrites dans les appareils digestifs des bébés peuvent entraîner une méthémoglobinémie.

Selon l'organisation mondiale sur la santé, parmi les constituants qui, s'ils sont présents en quantités excessives dans l'eau, peuvent augmenter le risque de problème on trouve les nitrates, avec :

Tableau 1 : Normes mondiales des nitrates

Substance	Nature du trouble qui peut se produire	Niveau approximatif au-dessus duquel des troubles peuvent apparaître
-----------	--	--



Nitrate (entant que NO_3^-)	Danger de méthémoglobémie infantile si l'eau est consommées par des nouveau-nés.	- Recommandé: moins de 50 mg/l. - Acceptable: 50 à 100 mg/l. - Non recommandé: plus de 100 mg/l
---------------------------------------	--	---

IV. Spectrophotomètre U.V-visible

1. Définition

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée, généralement en solution. Plus l'échantillon est concentré, plus il absorbe la lumière dans les limites de proportionnalité énoncées par la loi de Beer-Lambert.

Toutes les mesures effectuées au sein du laboratoire de la RADEEF, ont été réalisées avec le spectrophotomètre UV-visible mono-faisceau DR 5000 UV-VIS HACH LANGE avec écran tactile, avec détection automatique des erreurs pour une évaluation fiable. (Figure 3).



Figure 3: spectrophotomètre DR 5000

2. Principe de fonctionnement

Lorsqu'une lumière d'intensité I_0 passe à travers une solution, une partie de celle-ci est absorbée par le(s) soluté(s). L'intensité I de la lumière transmise est donc inférieure à I_0 . On définit l'absorbance de la solution comme :

$$A = \log \left(\frac{I_0}{I} \right)$$



On parle aussi de la transmittance définie par la relation suivante :

$$T = \frac{I}{I_0} \quad \text{c'est-à-dire que :} \quad A = -\log T$$

L'absorbance est une valeur positive, sans unité. Elle est d'autant plus grande que l'intensité transmise est faible.

La relation de Beer-Lambert décrit que, à une longueur d'onde λ donnée, l'absorbance d'une solution est proportionnelle à sa concentration, et à la longueur du trajet optique (distance sur laquelle la lumière traverse la solution).

Alors, pour une solution limpide contenant une seule substance absorbante :

$$A_\lambda = \varepsilon_\lambda l c$$

Avec :

A_λ : L'absorbance ou la densité optique (sans unité) de la solution pour une longueur d'onde λ ;

c : La concentration de la substance colorée et absorbée dans la solution (en mol.m^{-3}) ;

l : La longueur du trajet optique traversée par les faisceaux lumineux (en m) ;

ε_λ : Le coefficient d'extinction molaire de la substance absorbante en solution. Il rend compte de la capacité de cette substance à absorber la lumière, à la longueur d'onde λ (en $\text{mol}^{-1}.\text{m}^2$).

V. Normes et protocole de validation

1. Normes et accréditations

a) Normes internationales

➤ Norme ISO 17025

La norme internationale ISO 17025, précise que les laboratoires accrédités doivent, lorsqu'ils mettent en œuvre une méthode analytique usuelle, s'assurer de la qualité des résultats obtenus. Pour cela, elle indique les étapes suivantes :

- Définir les exigences de la clientèle concernant le paramètre considéré, afin de déterminer, par la suite, si la méthode utilisée répond bien à ces exigences.
- Pour les méthodes non normalisées, modifiées ou développées par le laboratoire, une fois la méthode mise en application, les laboratoires doivent employer des moyens de contrôle statistique et de raccordement qui permettent de surveiller la qualité des résultats obtenus

Cette norme (ISO 17025) représente les prescriptions générales concernant la compétence des



laboratoires, des étalonnages et des essais, et contient toutes les exigences que doivent satisfaire ces laboratoires s'ils veulent apporter la preuve qu'ils gèrent bien un système de qualité, et qu'ils sont capables de produire des résultats techniquement valables. [6]

➤ Norme ISO5725

L'ISO 5725 est une norme internationale est de donner des indications sur la façon dont les données d'exactitude peuvent être utilisées dans différentes situations pratiques afin de valider une méthode. La validation se concevait alors surtout pour les méthodes normalisées qui servaient aux échanges commerciaux : c'était le rôle de la norme ISO 5725 de fixer ces critères d'intercomparaison.

Donc but de cette norme internationale est de :

- donner les grandes lignes des principes généraux à comprendre lors de l'estimation de l'exactitude (justesse et fidélité) des méthodes et des résultats de mesure, et dans des applications, et d'établir des estimations pratiques des différentes mesures par l'expérience (ISO 5725-1) ;
- fournir une méthode de base pour l'estimation des mesures extrêmes de la fidélité des méthodes de mesure par l'expérience (ISO 5725-2) ;
- fournir une procédure pour l'obtention des mesures intermédiaires de fidélité donnant les circonstances dans lesquelles elles s'appliquent, et des méthodes pour les estimer (ISO 5725-3) ;
- fournir des méthodes de base pour la détermination de la justesse d'une méthode de mesure (ISO 5725-4) ;
- fournir des alternatives aux méthodes de base données dans l'ISO (5725-2) et l'ISO (5725-4), pour la détermination de la justesse et de la fidélité des méthodes de mesure pour utilisation dans certaines circonstances (ISO 5725-5).

Outre les méthodes statistiques pour calculer les critères d'exactitude, les normes ISO 5725 précisent aussi en détail l'organisation de la collecte des données et les précautions à respecter.

b) Accréditation d'un laboratoire d'analyse selon la norme ISO 17025/2005

L'accréditation est une évaluation de la validation systématique du fonctionnement du laboratoire par rapport à une norme de qualité spécifique à celui-ci. Il s'appuie sur l'évaluation de :

- ◆ La compétence du personnel
- ◆ L'adéquation des équipements de l'organisme et des conditions d'environnement
- ◆ Les méthodes d'analyses utilisées

Au Maroc, l'accréditation correspond à l'aptitude d'un laboratoire à effectuer des essais déterminés ou d'un organisme d'inspection technique spécifique. Pour cela, le laboratoire doit faire une demande officielle précisant l'unité et les essais concernés.

Un audit est réalisé par un auditeur qualifié et un ou plusieurs auditeurs techniques permettant d'évaluer la conformité du laboratoire aux exigences du référentiel NM ISO 17025. Lorsque les conclusions sont satisfaisantes, une attestation d'accréditation signée par le MCI (Ministère chargé du Commerce et de l'Industrie) est remise au laboratoire, qui au bout de chaque année, subit un audit de qualité de suivi, le renouvellement de cette attestation s'effectue chaque trois ans.



Dans le cas du laboratoire de la RADEEF, il a déjà lancé une demande d'accréditation selon la norme ISO 17025, afin de donner plus de confiance aux consommateurs, et actuellement ils cherchent à valider les méthodes d'analyse effectuées au sein du laboratoire.

2. Validation d'une méthode d'analyse

a) Généralités

La validation d'une méthode est le procédé par lequel on confirme que la procédure analytique employée pour mener un test en particulier répond aux exigences de l'usage auquel elle est destinée. Les résultats de la validation de méthodes peuvent être utilisés pour juger la qualité, la fiabilité et la cohérence des résultats analytiques. Ce procédé fait partie intégrante de toute bonne pratique analytique.

Les méthodes analytiques doivent être validées ou revalidées :

- avant leur introduction dans l'usage routinier ;
- en cas de modifications des conditions de validation de méthodes (par exemple, un instrument avec des caractéristiques différentes ou des échantillons avec une matrice différente) ;
- en cas de changement de méthode et de changement en dehors de la portée initiale de la méthode

Il existe plusieurs degrés de validation suivant la nature de la méthode, ce à quoi elle est destinée et le domaine concerné :

- Méthode de contrôle en routine, utilisée sur plusieurs sites, contexte réglementaire fort : validation approfondie
- Méthode utilisée ponctuellement dans un seul laboratoire, contexte réglementaire faible : validation rapide.

b) Définitions

❖ Domaine de validation

Ensemble des types de matrice auquel s'applique la méthode et gamme de concentrations sur laquelle a porté la validation.

❖ Domaine de validité

Ensemble des types de matrice auquel s'applique la méthode et gamme de concentrations sur laquelle a porté la validation et pour lequel les futurs résultats fournis par la méthode sont jugés valides.

❖ Méthode quantitative

Méthode d'analyse qui détermine la quantité ou la fraction pondérale d'un analyte de manière à pouvoir l'exprimer sous forme de valeur numérique dans les unités appropriées.

c) Critères de performance

La validation d'une méthode analytique entraîne la détermination de plusieurs paramètres, parmi lesquels on cite :



❖ Linéarité

C'est l'établissement qu'il existe une relation linéaire entre les quantités retrouvées (ou quantifiées) dans des échantillons et leurs valeurs de référence. La linéarité de la méthode ne doit pas être confondue avec la linéarité de la fonction de réponse de l'appareillage de mesure qui caractérise la seule réponse instrumentale lors de l'étalonnage et qui n'est pas indispensable pour obtenir une quantification exacte. [7]

❖ Justesse

Étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une large série de résultats d'essais et une valeur de référence acceptée. La valeur de référence peut être connue "a priori" parce que l'on utilise un étalon certifié, ou être le résultat d'une méthode de référence reconnue juste. [8]

❖ Fidélité

C'est l'étroitesse de l'accord (degré de dispersion) entre une série de mesures obtenues dans des conditions bien établies. La fidélité d'une méthode comporte trois aspects : répétabilité, fidélité intermédiaire et reproductibilité.

✚ Répétabilité

La répétabilité, à un niveau donné, correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels successifs obtenus par la même procédure opératoire, les mêmes opérateurs, le même système de mesure, les mêmes conditions de fonctionnement et le même lieu, ainsi que des mesurages répétés sur le même objet ou des objets similaires pendant une courte période de temps.

✚ Fidélité intermédiaire

Correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels successifs obtenus dans un ensemble de conditions qui comprennent la même procédure opératoire, le même lieu et des mesurages répétés sur le même objet ou des objets similaires pendant une période de temps étendue, mais peuvent comprendre d'autres conditions que l'on fait varier.

✚ Reproductibilité

Fidélité ou les résultats d'essai sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essais identiques, dans le même laboratoire, avec le même ou différents opérateurs à des jours différents. Donc individus d'essai identiques, laboratoires différents, opérateurs différents, équipements différents ou à des époques différentes.

Lorsque Pour $n < 30$, il faut se référer à une table statistique de la distribution de Fisher.

❖ Limite de quantification

Plus petite et/ou plus grande quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une exactitude définie. Elle correspond à la concentration la plus petite et/ou la plus grande du domaine de validité.

❖ Exactitude

Étroitesse de l'accord entre une valeur mesurée et une valeur vraie du mesurande.



3. Protocole du profil d'exactitude

a) Définition

De nombreux guides, recommandations et guidances plus ou moins officiels ont été publiés par des structures réglementaires, des organismes de normalisation afin de comprendre la philosophie générale qui a été adoptée jusqu'à présent pour conduire une validation.

Dans la plupart des cas, cela consiste en une suite d'études expérimentales qui permettent de calculer des critères de validation, mais rien n'est dit sur le niveau de garantie à atteindre pour l'estimation de ces critères, ni ce qu'on doit en faire par la suite pour effectivement valider, ni comment doit-on faire pour vérifier qu'ils permettent d'atteindre un niveau de qualité donné.

C'est pourquoi, nous avons développé une approche mieux adaptée qui débouche sur un autre outil statistique appelé le profil d'exactitude.

Donc le profil d'exactitude et une combinaison, sous une forme graphique, d'un ou plusieurs intervalles de tolérance d'espérance β calculés à différents niveaux de concentration et d'une ou plusieurs intervalles d'acceptabilité. [9]

Il est basé sur une application directe des principes décrits dans les normes de la série ISO 5725 (1, 2, 3, 4 ; 1994)]. On y propose un modèle statistique pour estimer l'exactitude (justesse et fidélité) d'une méthode ou de résultats. Ce modèle décrit un mesurage z d'un mesurande Z sous la forme :

$$z = m + B + e$$

Avec :

m: est la moyenne générale de l'échantillon homogène

B: la composante du biais du laboratoire sous condition de répétabilité

e : l'erreur aléatoire survenant dans chaque mesurage, sous condition de répétabilité

La construction d'un profil d'exactitude est basée sur les principes généraux :

- définir les objectifs à atteindre ;
- prévoir les plans d'expérience à réaliser ;
- prévoir les quantités et la qualité des matériaux qui seront utilisés ;
- organiser le calendrier des études et celui du personnel qui en sera chargé.

b) Organisation du plan d'expérience

L'obtenir un profil d'exactitude plus adéquat à la méthode à valider implique le choix d'un plan d'expérience bien défini selon les conditions prédites, et pour organiser ce plan, il est impératif de planifier les axes suivants :

i. Détermination de type de la méthode à valider

Cependant il faut faire la distinction entre deux types de méthodes :



- **Méthodes « indirectes ou rationnelles »** qui exigent un étalonnage préalable pour calculer la concentration des échantillons inconnus. Pour ces méthodes, on procède en deux étapes : d'abord construire la courbe d'étalonnage en utilisant le même principe physico-chimique que celui qui sert pour les échantillons ; ensuite faire des mesures sur les échantillons inconnus et calculer leurs concentrations à l'aide d'un modèle d'étalonnage (cas du dosage des ions nitrates).
- **Méthodes « directes ou empiriques »** dont l'analyte est défini par la méthode elle-même. On mesure alors la concentration des échantillons inconnus à l'aide d'une autre méthode de mesure, comme une pesée ou une titrimétrie. Parmi ces méthodes, dites critères ou de type I dans le Codex Alimentarius, on trouve l'azote organique total de Kjeldahl.

ii. Domaine de validation

Le domaine de validation d'une méthode d'analyse est l'ensemble des types de matrice auquel s'applique la méthode et gamme de concentrations sur laquelle a porté la validation. Il doit être choisi sous forme d'une gamme de concentrations absolues ou relatives. Le choix du domaine d'application peut correspondre à une obligation légale.

Pratiquement, c'est à travers les choix effectués pour construire les plans d'expériences, en termes de gamme de concentrations pour un ou plusieurs types de matrice, qu'on démontre dans quel domaine la méthode est effectivement valide, et si elle est capable de fournir des résultats acceptables. Le domaine où cette démonstration est faite est appelé domaine de validité

c) Plan d'étalonnage

Pour les méthodes indirectes, le plan d'étalonnage a pour objectif d'estimer les coefficients du modèle de la courbe d'étalonnage afin de calculer les concentrations retrouvées servant aux calculs des différents critères (justesse, fidélité,...) pour la construction du profil d'exactitude.

Pour réaliser ce plan, on va choisir les paramètres minimums suivants :

- **I** séries (jours) de mesures ($1 \leq i \leq I$) ;
- **J** répétitions ($1 \leq j \leq J$) ;
- **K** niveaux étalons ($1 \leq k \leq K$) de concentrations connues, couvrant la gamme d'étalonnage. Dans ce contexte, on entend par un niveau une valeur de référence.

Le choix du nombre de niveaux **K** dépend du type de fonction de réponse instrumentale attendue, comme l'indique le tableau 3. Ce nombre **K** doit permettre une bonne estimation statistique des paramètres de la fonction de réponse utilisés pour déterminer le plan de validation. ISO 5725-2, comme il est décrit dans Feinberg M. (2010c)

Tableau 2 : principales fonctions de réponse utilisables pour un étalonnage



Type	Équation	Souhaitable pour <i>K</i>	Minimum pour <i>K</i>
Droite passant par l'origine	$Y = a_1x$	2	1
Droite	$Y = a_0 + a_1x$	3	2
Fonction quadratique	$Y = a_0 + a_1x + a_2x^2$	4	3
Fonction logistique à 4 paramètres	$Y = a_0 + \frac{a_3 - a_0}{1 + \left(\frac{a_2}{x}\right)^{a_1}}$	5	5

L'ensemble des essais et mesurages effectués sont rapportés dans un tableau (tableau 4) dont les concentrations des étalons X_{ijk} sont exprimées en quantités absolues (mg, g,...) ou relatives (mg/kg, g/kg, mg/l,...) et les réponses Y_{ijk} notées dans les unités de la méthode instrumentale (surface du pic, hauteur de pic, absorbance,...).

Tableau 3 : organisation des mesures du plan d'étalonnage

Niveaux	Séries (Jours)	Concentrations (valeurs de référence) X_{ijk}	Mesurages (Réponses instrumentales) Y_{ijk}			
			1	2	...	<i>J</i>
1	1	x_{11}	y_{111}	y_{121}	...	y_{1j1}
			
	<i>I</i>		...			
2	1					
	...					
	<i>I</i>					
...				
<i>K</i>	1					
				
	<i>I</i>	x_{iK}				y_{iK}

d) Plan de validation



Ce plan doit rassembler les données brutes selon le modèle du tableau 3. Les valeurs de référence X'_{ijk} des échantillons de validation sont exprimées en quantités absolues (mg, g, log,...) ou relatives (mg/kg, $\mu\text{g}/\text{kg}$, mg/l,...). La réponse Y'_{ijk} est notée dans une unité correspondant à celle de la méthode instrumentale (surface du pic, hauteur de pic, absorbance,...). les paramètres à choisies les suivants :

- prévoir I' séries ($1 \leq i \leq I'$). Ce nombre doit absolument être le même que pour le plan d'étalonnage. On calculera ainsi un modèle d'étalonnage pour chaque jour et non pas un modèle global ;
- pour chaque niveau, effectuer J' mesurages répétés ($1 \leq j \leq J'$). Le nombre de répétitions J' peut être différent du nombre J choisi pour le plan d'étalonnage ;
- pour chaque série prévoir K' niveaux ($1 \leq k \leq K'$). Le nombre de niveaux K' peut être différent du nombre K choisi choisies pour le plan d'étalonnage.

➤ Établir les valeurs de référence

Les échantillons de validation doivent avoir des concentrations connues correspondent aux valeurs de référence et doivent être fixées indépendamment de la méthode à valider, on la

note X'_{jik} . Il existe plusieurs approches possibles pour établir la valeur de référence assignée à un échantillon de validation, parmi lesquelles :

- utiliser des matériaux de référence certifiés (MRC), externes (MRE) ou internes (MRI) ; la traçabilité de ces matériaux décroît en fonction de leur nature ;
- utiliser une méthode de référence, appliquée en interne ou en externe par un laboratoire pair. Si la valeur de référence est estimée par des répétitions de la méthode de référence, il conviendra de sélectionner la valeur la plus représentative, comme la moyenne ou la médiane. Cette approche doit être préférentiellement appliquée dans le cas de la validation d'une méthode alternative par rapport à une méthode de référence ;

➤ Détermination des concentrations retrouvées

Pour les méthodes directes, cette étape de calcul n'existe plus puisqu'elle donne directement la valeur de concentration retrouvée, par contre, les méthodes indirectes nécessitent un ensemble de calculs pour la détermination de cette concentration selon la démarche suivante :

✚ Estimation des coefficients du modèle d'étalonnage

Le calcul des estimations des coefficients du modèle d'étalonnage peut faire appel aux diverses techniques statistiques classiques détaillées dans la littérature :

- Régression par la méthode des moindres carrés (AFNOR, 1996)
- Régression pondérée (Azaïs J.M., Bardet J.M., 2006)
- Régression non linéaire (Huet S.2004)

La réponse instrumentale Y est exprimée en fonction des concentrations x des étalons, à l'aide d'un modèle mathématique f de la forme :



$$Y = f(x)$$

Les fonctions f classiquement utilisées sont regroupées au tableau 5 mais cette liste n'est pas limitative. Les paramètres a_1, a_2, \dots sont appelés les paramètres du modèle.

Tableau 4: principales fonctions de réponse

Type	Equation
Droite passant par l'origine	$Y = \beta X$
Droite	$Y = \alpha + \beta X$
Fonction quadratique	$Y = \alpha + \beta X + \gamma X^2$
Fonction logistique à 4 paramètres	$Y = \alpha + \frac{\delta - \alpha}{1 + \left(\frac{X}{\gamma}\right)^\beta}$
Fonction logistique à 5 paramètres	$Y = \alpha + \frac{\delta - \alpha}{\left[1 + \left(\frac{X}{\gamma}\right)^\beta\right]^\psi}$

Le même type de modèle doit être utilisé pour l'ensemble des données, quelle que soit la série, mais les valeurs des paramètres peuvent être différentes d'une série à l'autre. Cette approche permet de prendre en compte les variations inter-séries (inter-jours) observées.

Calcul de concentration retrouvée

Le calcul de Zijk s'effectue selon le principe décrit dans Feinberg M. (2010c).
Le tableau suivant regroupe les fonctions inverses de méthodes de calcul de concentration retrouvée Zijk.

Tableau 5 : équations de prédiction inverse selon le type de la fonction de réponse



Fonction de réponse	Fonction inverse de calcul de la concentration retrouvée
Droite passant par l'origine	$z = \frac{Y}{a_1}$
Droite	$z = \frac{Y - a_0}{a_1}$
Fonction quadratique	$z = \frac{-a_1 + \sqrt{a_1^2 - 4a_2(a_0 - Y)}}{2a_2}$
Logistique à 4 paramètres	$z = \frac{a_2}{\left(\frac{a_3 - a_0}{Y - a_0} - 1\right)^{\frac{1}{a_1}}}$

e) Critères de construction du profil

Le calcul de des critères impératifs pour la construction du profil d'exactitude doit être effectué indépendamment niveau par niveau, sur les concentrations retrouvées par prédiction inverse dans le cas des méthodes indirectes ou sur les concentrations retrouvées dans le cas des méthodes directes, selon le principe décrit dans la norme ISO 5725-2 ou de sa version Afnor NF X 06-041. Les critères à déterminer sont les suivant :

i. Taux de recouvrement moyen

Le taux de recouvrement moyen est défini comme étant le rapport en pourcentage entre la moyenne des concentrations retrouvées \bar{z}_k et la moyenne des concentrations de référence \bar{x}_k . Ce taux de recouvrement est calculé niveau par niveau comme suit :

$$\frac{\bar{z}_k}{\bar{x}_k} \times 100$$

ii. Intervalle de tolérance

C'est l'intervalle qui contient en moyenne une proportion $\beta\%$ définie de futurs mesurages obtenus selon un mode opératoire donné et pour une concentration donnée. La valeur de β est, généralement, choisie entre 80 % et 95 %. En fait, elle n'intervient que pour situer la limite de quantification de la méthode comme on le verra à la partie expérimentale. Il est obtenu grâce à la formule suivante :

$$\bar{z} \pm k_{tol} \times s_{IT}$$

Avec :

\bar{z} : concentration moyenne retrouvée

k_{tol} : facteur de couverture de l'intervalle de tolérance

s_{IT} : écart-type de tolérance



Ses limites sont obtenues par le calcul, à partir de mesurages répétés.

iii. Intervalle d'acceptabilité

Est défini comme étant la spécification de la performance exigée pour la méthode, exprimée comme un écart acceptable autour de la valeur de référence. Les limites de l'intervalle d'acceptabilité sont fixées par l'utilisateur ou par une obligation réglementaire, parfois en fonction du niveau de concentration. Elles sont notées $\pm \lambda$ en valeurs absolues, et pour avoir les valeurs relatives il faut les calculer selon la formule suivante :

$$(1 \pm \lambda) \times 100$$

f) Profil et règles de décision

Le profil d'exactitude peut être construit de différentes façons, en fonction du type de données traité. Généralement, la méthode la plus étendue est celle basée sur les performances exprimées de façon relative. Ainsi les éléments graphiques entrant dans la construction de ce profil sont les suivants :

- ❖ Sur l'axe horizontal on présente :
 - Les valeurs de référence moyennes.
- ❖ sur l'axe vertical
 - Les limites de tolérance basses relatives ;
 - Les limites de tolérance hautes relatives ;
 - Les taux de recouvrement moyens ;
 - Les limites d'acceptabilité basses relatives ;
 - Les limites d'acceptabilité hautes relatives.

La stratégie d'interprétation de ce graphique est décrite en détail par la suite dans la partie expérimentale.

i. Limite de quantification

C'est la plus petite et/ou plus grande quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une exactitude définie. Elle correspond à la concentration la plus petite et/ou la plus grande du domaine de validité. [10]

Il s'est calculé lorsqu'au moins une des bornes de l'intervalle de tolérance relative coupe une des limites d'acceptabilité selon la formule suivante :

$$x_{LQ} = \frac{a_0 - t_0}{t_1 - a_1}$$

Avec :

a_0 et a_1 : sont successivement l'ordonné à l'origine et la pente de la limite d'acceptabilité

t_0 et t_1 : sont successivement l'ordonné à l'origine et la pente de la limite de tolérance

Les calculs de ces paramètres seront détaillés dans la partie expérimentale.

ii. Facteur de correction



□ Le facteur de correction est un paramètre calculé pour effectuer une correction des résultats non souhaitables dus à un biais systématique important (un taux de recouvrement moyen trop loin de 100%). Il n'est calculé que sous deux conditions:

- il n'existe pas de contrainte réglementaire qui interdise de corriger les résultats avant de les renvoyer au demandeur d'analyse. Le demandeur d'analyse est alors informé du fait que le résultat final est corrigé.
- l'analyste procède à un examen détaillé des mesures collectées lors de l'étude de validation afin de déterminer la nature du biais systématique afin de choisir un facteur de correction approprié.

La méthode de calcul consiste à reporter sur un graphique les concentrations retrouvées en fonction des valeurs de référence. On peut alors calculer, sous la forme d'une droite de régression au moindres carrés, l'équation d'une droite dont la pente représente un taux moyen de recouvrement et l'ordonnée à l'origine un biais systématique. Elle permet ainsi de définir deux facteurs de correction possibles :

- ✚ l'inverse de la pente qui permet de corriger un taux de recouvrement non satisfaisant, si le biais systématique est négligeable.
- ✚ l'ordonnée à l'origine permet de corriger un biais systématique, en retranchant sa valeur de toutes les concentrations retrouvées avant d'effectuer les calculs nécessaires pour la construction du profil.

Par la suite, le facteur de correction choisi sera alors inclus dans le mode opératoire de la méthode, et afin de vérifier la pertinence du facteur de correction choisi, il suffit de recalculer le profil d'exactitude avec les données corrigées. Cependant, pour assurer l'indépendance des mesures, il est préférable d'utiliser deux échantillons de validation et de réaliser l'ensemble des plans d'expérience en parallèle.

La figure 4 illustre l'effet d'un facteur de correction sur un échantillon A dont les mesures n'ont pas été corrigées, et produit un profil d'exactitude qui mène à conclure que la méthode n'est pas valide. En revanche, l'échantillon B correspond à l'échantillon A après correction, et qui conduit à la conclusion que la méthode est valide si les résultats sont corrigés.

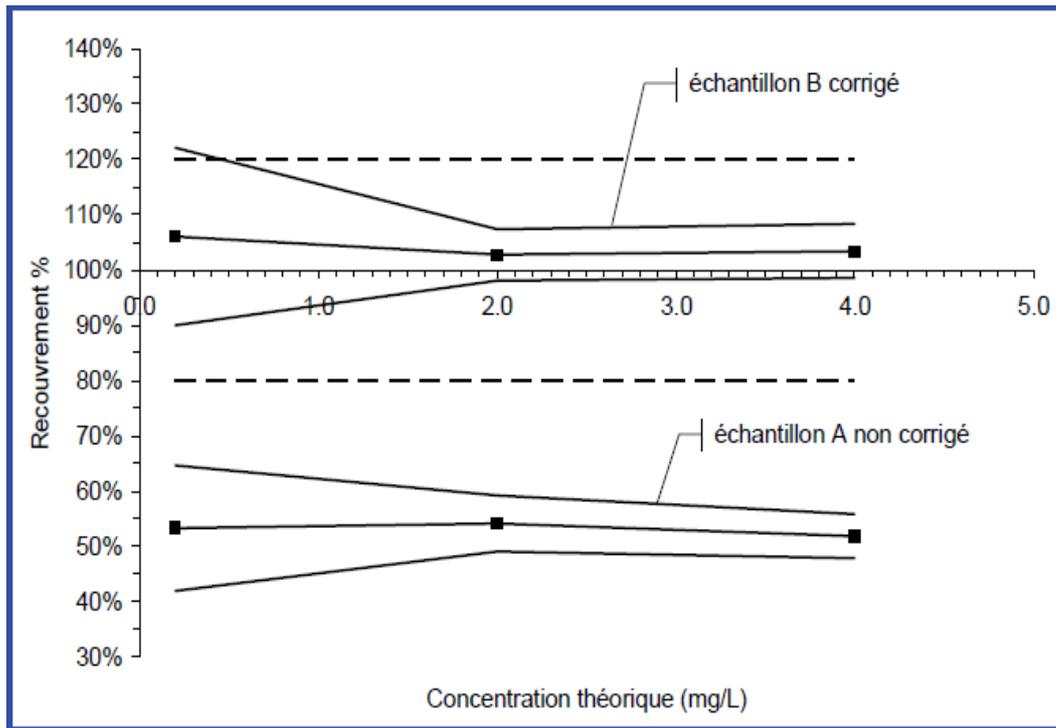


Figure 4 : illustration de l'intérêt du facteur de correction pour valider une méthode



Chapitre III

Partie expérimentale





S'appuyant sur les concepts décrits dans la partie bibliographique consacrée à la validation des méthodes, cette partie concerne la mise en œuvre du profil d'exactitude en présentant différents compléments et, en particulier, le mode de calcul de la répétabilité et de la fidélité, limite de quantification et l'incertitude.

I. Etablissement de la courbe d'étalonnage

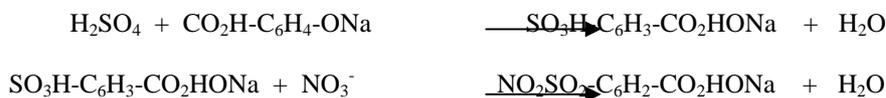
1. Principe

En présence de l'acide sulfosalicylique (formé par réaction entre le salicylate de sodium ($\text{CO}_2\text{H}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{ONa}$) et l'acide sulfurique), les nitrates donnent en présence d'un alcali, un complexe stable coloré en jaune appelé **paranitrosalicylate de sodium**, susceptible d'un dosage spectrophotométrique à la longueur d'onde λ voisine de 415 nm.



Figure 5 : Gamme d'étalonnage des nitrates

Les réactions mises en jeu sont :



2. Réactifs

☞ Solution de salicylate de sodium à 0.5% (renouveler chaque 24h)

☞ Acide sulfurique concentré,

☞ Solution double :

- Hydroxyde de sodium (NaOH) : 400g,
- Tartrate double de Na^+ et de K^+ : 60 g,
- ED (qsp) : 1000 ml,

- ✓ Faire dissoudre les NaOH
- ✓ Ajouter le tartrate double, agiter jusqu'à dissolution complète,
- ✓ Laisser refroidir et compléter à 1000 ml.

☞ Solution mère étalon d'Azote nitrique à 0.1 g/l



- Nitrate de potassium anhydre (KNO_3) : 0.722g,
- E.D (qsp) : 1000 ml,
- Chloroforme pour conserver : 1 ml.

↳ Solution fille étalon d'Azote nitrique à 0.005 mg/l

- Solution mère : 50 ml,
- E.D : (qsp) 1000 ml.

3. Mode opératoire

Dans une série de béchers de 100 ml introduire successivement :

Tableau 6 : Gamme étalon des ions nitrates

N° des tubes	Témoin	I	II	III	IV
Solution fille étalon de nitrate en ml à 5 mg/L	0	1	2	5	10
E.D en ml	10	9	8	5	0
Correspondance en azote nitrique (mg/L)	0	0,5	1	2,5	5
Solution de salicylate de Na^+ en mL	1	1	1	1	1

- ✓ Attendre 5 min, puis évaporer à sec au bain marie ou dans une étuve portée entre **75-80 °C** (ne pas surchauffer ni chauffer trop longtemps). Laisser refroidir,
- ✓ Reprendre le résidu par 2 ml d'acide sulfurique concentré tout en ayant pris soin de l'humecter complètement,
- ✓ Attendre 10 min et ajouter 15 ml d'eau distillée, puis 15 ml de la solution double qui développe la coloration jaune,
- ✓ Effectuer la lecture au spectrophotomètre à la longueur d'onde $\lambda = 415 \text{ nm}$ et construire la courbe d'étalonnage.

4. Courbe d'étalonnage

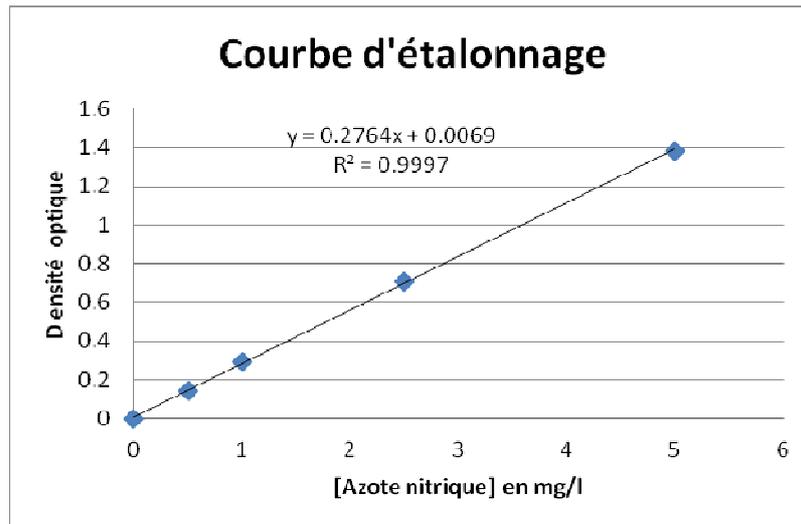


Figure 6: Courbe d'étalonnage du dosage des ions nitrates

➤ **Expression de résultats**

Pour une prise d'essai de 10 ml, la courbe d'étalonnage donne directement la teneur en azote nitrique en mg/l, et pour obtenir la teneur en nitrate NO_3^- on multiplie la valeur obtenue par un facteur de **4,43**.

II. Validation de la méthode d'analyse des nitrates

Pour utiliser le profil d'exactitude en vue de valider la méthode du dosage des nitrates, il faut avoir fixé les paramètres suivants :

- Le domaine de validation qui va de 0,5 à 5 mg/l ;
- Limites d'acceptabilité qui sont fixées à $\pm 20\%$;
- Proportion β est égale à 80 %.

1. Plan d'étalonnage

Le plan d'étalonnage que nous avons effectué a pour objectif d'estimer les coefficients du modèle de la courbe d'étalonnage afin de calculer les concentrations retrouvées. Pour réaliser ce plan nous avons travaillé avec :

- i = 3 séries (jours)
- k = 4 niveaux de concentration
- j = 3 répétitions par jour et par niveau

Les mesures sont regroupées dans le tableau suivant :



Tableau 7 : Plan d'étalonnage

Niveau	Série (jour)	X _{ijk} (en mg/l)	y _{ijk}		
			Répétition 1	Répétition 2	Répétition 3
A	1	0.5	0.175	0.174	0.176
	2	0.5	0.128	0.148	0.143
	3	0.5	0.138	0.124	0.163
B	1	1	0.308	0.347	0.361
	2	1	0.297	0.296	0.333
	3	1	0.329	0.254	0.28
C	1	2.5	0.775	0.789	0.776
	2	2.5	0.766	0.738	0.71
	3	2.5	0.753	0.716	0.702
D	1	5	1.485	1.461	1.484
	2	5	1.456	1.448	1.457
	3	5	1.489	1.43	1.453

Avec :

x_{ijk} : Valeur de référence assignée à l'étalon

y_{ijk} : Réponse expérimentale observée pour l'étalon

2. Plan de validation

Pour réaliser ce plan, on procède de la même façon que le plan d'étalonnage, mais cette fois-ci l'échantillon sur lequel on a travaillé est l'eau potable. Ce plan est formé de :

i = 3 séries (jours)

k = 4 niveaux de concentration

j = 3 répétitions par jour et par niveau

Les résultats obtenus sont fournis dans le tableau suivant :

Tableau 8 : Plan de validation



Niveau	Série (jour)	x'ijk (en mg/l)	y'ijk		
			Répétition 1	Répétition 2	Répétition 3
A	1	0.5	0.177	0.175	0.176
	2	0.5	0.13	0.145	0.149
	3	0.5	0.139	0.143	0.169
B	1	1	0.31	0.349	0.359
	2	1	0.289	0.301	0.298
	3	1	0.31	0.259	0.289
C	1	2.5	0.77	0.785	0.771
	2	2.5	0.756	0.726	0.719
	3	2.5	0.765	0.722	0.709
D	1	5	1.478	1.469	1.479
	2	5	1.449	1.453	1.455
	3	5	1.485	1.437	1.455

Avec :

x'ijk : Valeur de référence assignée à l'échantillon de validation

y'ijk : réponse expérimentale observée pour le témoin de validation

3. Estimation des coefficients du modèle d'étalonnage

La méthode choisie afin d'estimer les coefficients du modèle d'étalonnage est celle de régression linéaire simple où le modèle est une droite de type $y_{ijk} = a_0 + a_1 x_{ijk}$, où a_0 est l'intercepte et a_1 la pente. Un modèle est calculé pour chaque jour en utilisant, soit la fonction de régression DROITEREG (EXCEL), soit la fonction de régression linéaire sous MINITAB.

Tableau 9 : Estimations des coefficients d'étalonnage

	a_0	a_1
Jour 1	0.0442	0.288
Jour 2	0.00762	0.290
Jour 3	-0.0052	0.292

4. Concentrations retrouvées et justesse

a) Calcul des concentrations retrouvées par prédiction inverse

Utilisant les données du plan de validation et des coefficients du tableau 10 estimés à partir du plan d'étalonnage, la concentration retrouvée (z) est calculée pour chaque répétition i, j jour et k niveau (en prenant soin d'utiliser les modèles obtenus pour chaque série a_0 et a_1) selon l'équation de prédiction inverse suivante :

$$z = \frac{Y - a_0}{a_1}$$

Le tableau suivant fournit les résultats de calculs obtenus :

Tableau 10 : Concentrations retrouvées par prédiction inverse



Niveau	Série	x'_{ijk} (en mg/l)	y'_{ijk}	z_{ijk} (en mg/l)
A	Jour 1	0.5	0.177	0.461
		0.5	0.175	0.454
		0.5	0.176	0.458
	Jour 2	0.5	0.130	0.422
		0.5	0.145	0.474
		0.5	0.149	0.488
	Jour 3	0.5	0.139	0.494
		0.5	0.143	0.508
		0.5	0.169	0.597
B	Jour 1	1	0.310	0.923
		1	0.349	1.058
		1	0.359	1.093
	Jour 2	1	0.289	0.970
		1	0.301	1.012
		1	0.298	1.001
	Jour 3	1	0.310	1.079
		1	0.259	0.905
		1	0.289	1.008
C	Jour 1	2.5	0.770	2.520
		2.5	0.785	2.572
		2.5	0.771	2.524
	Jour 2	2.5	0.756	2.581
		2.5	0.726	2.477
		2.5	0.719	2.453
	Jour 3	2.5	0.765	2.638
		2.5	0.722	2.490
		2.5	0.709	2.446
D	Jour 1	5	1.478	4.978
		5	1.469	4.947
		5	1.479	4.982
	Jour 2	5	1.449	4.970
		5	1.453	4.984
		5	1.455	4.991
	Jour 3	5	1.485	5.103
		5	1.437	4.939
		5	1.455	5.001

b) Calcul de la justesse



Le tableau suivant illustre les paramètres de la justesse calculés pour chaque niveau de concentration.

Tableau 11 : récapitulation des critères de la justesse

	Symbole	Niveaux			
		A	B	C	D
Concentration moyenne théorique $\bar{\bar{x}}_k$	$\frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J x_{ij}}{I \times J}$	0.5	1	2.5	5
Concentration moyenne retrouvée ($\bar{\bar{z}}$)	$\frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J z_{ij}}{I \times J}$	0.48	1.01	2.52	4.99
Biais moyen absolu	$\bar{\bar{z}}_k - \bar{\bar{x}}_k$	-0.02	0.01	0.02	-0.01
Biais moyen relatif (%)	$\left(\frac{\bar{\bar{z}}_k - \bar{\bar{x}}_k}{\bar{\bar{x}}_k} \right) \times 100$	-3.24	0.55	0.89	-0.23
Taux de recouvrement moyen (%)	$\frac{\bar{\bar{z}}_k}{\bar{\bar{x}}_k} \times 100$	96.76	100.55	100.89	99.77

➤ **Interprétation statistique**

D'après les résultats obtenus, on peut dire la justesse varie en fonction de la concentration puisque le biais de justesse varie de +0.89 à -3.24 %. Cependant, ce biais n'a pas d'influence importante sur la validité de la méthode.

5. Fidélité

Les calculs des composants de la fidélité dépend de type de plan d'expérience utilisé, et puisqu'on a travaillé avec un plan équilibré (le nombre de répétitions I par série est le même pour toutes les séries et le nombre total de répétitions doit être égal à IJ , les calculs sont effectués niveau par niveau k sur les concentrations retrouvées par prédiction inverse selon le principe décrit dans la norme ISO 5725-2 ou de sa version Afnor NF X 06-041.

Le tableau suivant récapitule les différents paramètres calculés :

Tableau 12 : récapitulation des critères de fidélité

Symbole	Niveaux			
	A	B	C	D



Somme des carrées des écarts intra-séries (SCE_r)	$\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J (z_{ij} - \bar{Z}_i)^2$	0.009	0.033	0.031	0.015
Somme des carrées des écarts de inter-séries (SCE_B)	$\sum_{i=1}^I J \times (\bar{Z}_i - \bar{\bar{Z}})^2$	0.011	0.002	0.002	0.003
Écart-type de répétabilité (S_r)	$\sqrt{\frac{SCE_r}{I(J-1)}}$	0.0014	0.0054	0.0052	0.0025
Écart-type inter-séries (S_B)	$\sqrt{\frac{\frac{SCE_B}{I-1} - S_r^2}{J}}$	0.0018	0.0003	0.0003	0.0005
Écart-type de fidélité (S_F)	$\sqrt{S_B^2 + S_r^2}$	0.057	0.075	0.074	0.055
Coefficient de variation de fidélité	$\frac{S_{kFI}}{\bar{x}_k} \times 100$	11.373	7.549	2.962	1.096

6. Intervalles de tolérance et limites d'acceptabilité

a) Intervalles de tolérance

Dans cette étape les limites de tolérance sont calculées (selon la méthode décrite dans Feinberg M. 2010b) indépendamment pour chaque niveau de concentration k , et pour des raisons de simplification des formules, l'indice k est omis dans les formules utilisées. L'ensemble des calculs sont rassemblé dans le tableau récapitulatif suivant :

Tableau 13 : récapitulation des intervalles de tolérance

	Symbole	Niveaux			
		A	B	C	D
R	$R = \frac{S_B^2}{S_r^2}$	1.247	0.052	0.060	0.221



B	$B = \sqrt{\frac{R+1}{J \times R + 1}}$	0.688	0.954	0.948	0.857
Nombre de degrés liberté	$v = \frac{(R+1)^2}{\left(\frac{R+1}{J}\right)^2 + \frac{1-\frac{1}{J}}{I-1}}$	3.817	7.462	7.418	6.544
Facteur de couverture (ktol)	$k_{tol} = t_{v, \frac{1+\beta}{2}}$	1.638	1.415	1.415	1.440
Écart-type de tolérance (SIT)	$s_{IT} = s_{FI} \left(\sqrt{1 + \frac{1}{I \times J \times B^2}} \right)$	0.063	0.080	0.079	0.059
Limite de tolérance basse	$\bar{\bar{z}} - k_{tol} \times s_{IT}$	0.380	0.892	2.411	4.904
Limite de tolérance haute	$\bar{\bar{z}} + k_{tol} \times s_{IT}$	0.587	1.119	2.633	5.073
Limite intervalle tolérance basse relative (%)	$\left(\frac{\bar{\bar{z}} - k_{tol} \times s_{IT}}{\bar{\bar{x}}} \right) \times 100$	76.063	89.233	96.449	98.076
Limite intervalle tolérance haute relative (%)	$\left(\frac{\bar{\bar{z}} + k_{tol} \times s_{IT}}{\bar{\bar{x}}} \right) \times 100$	117.453	111.863	105.335	101.462

➤ **Remarque**

Le quantile de la distribution t de Student pour v degrés de liberté et $\beta = 80\%$ (probabilité du contenu de l'intervalle de tolérance) est celui de formule :

$$t_{v, \frac{1+\beta}{2}}$$

b) Limites d'acceptabilité

Les limites d'acceptabilité sont calculées en fixant λ à 20% afin d'avoir une interprétation visuelle directe du profil d'exactitude construit.

Le tableau suivant regroupe les résultats des calculs obtenus :

Tableau 14 : récapitulation des limites d'acceptabilité

	Symbole	Niveau			
		A	B	C	D
Limite d'acceptabilité basse	$z_{Bt} = x_A (1 - \lambda)$	0.4	0.8	2	4



Limite d'acceptabilité haute	$z_{At} = x_A(1+\lambda)$	0.60	1.20	3.00	6.00
Limite d'acceptabilité basse en %	$(1-\lambda)\times 100$	80.00	80.00	80.00	80.00
Limite d'acceptabilité haute en %	$(1+\lambda)\times 100$	120.00	120.00	120.00	120.00

7. Construction du profil d'exactitude

Pour construire le graphique qui correspond au profil d'exactitude, il est impératif de reporter les concentrations moyennes théoriques sur l'axe des abscisses et les limites de tolérance et d'acceptabilité relatives sur l'axe des ordonnées. Ainsi les paramètres nécessaires pour la construction sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 15 : récapitulation des éléments du profil d'exactitude

	Niveau A	Niveau B	Niveau C	Niveau D
Concentration moyenne théorique (\bar{x})	0.5	1	2.5	5
Limite intervalle tolérance basse en %	76.06	89.23	96.45	98.08
Limite intervalle tolérance haute en %	117.45	111.86	105.34	101.46
Limite d'acceptabilité basse en %	80	80	80	80
Limite d'acceptabilité haute en %	120	120	120	120

On obtient ainsi la figure suivante :

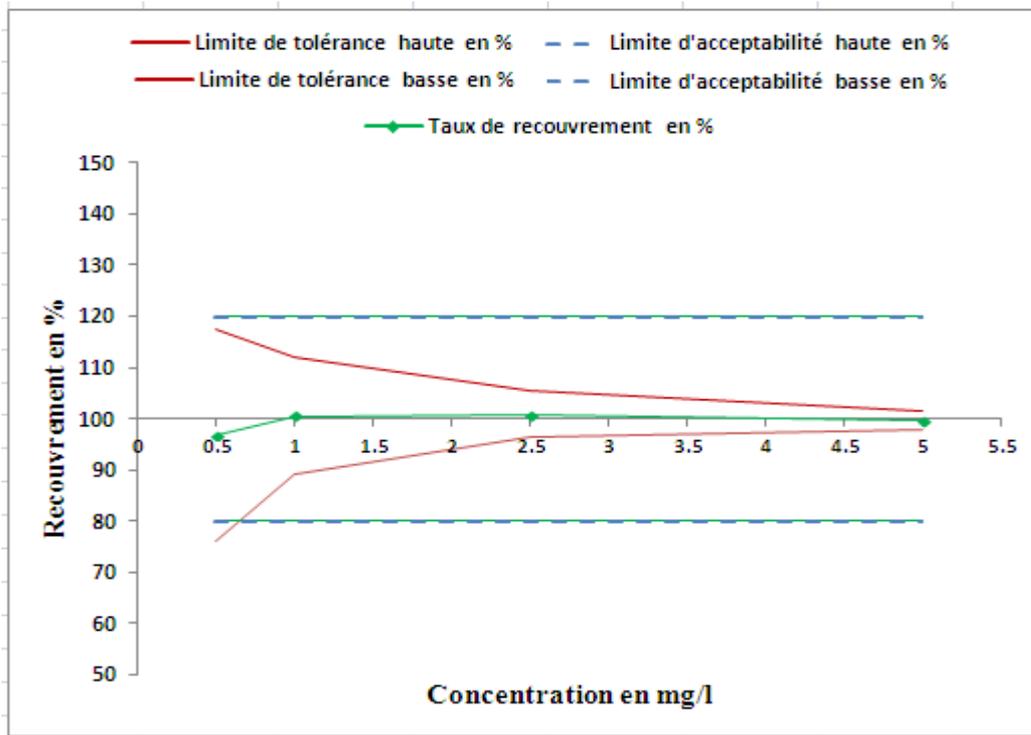


Figure 7 : profil d'exactitude de la méthode d'analyses des ions nitrates

➤ **Interprétation statistique :**

D'après la figure montrée ci-dessus le taux de recouvrement qui l'a traduit une faible justesse est d'environ 97 % aux basses concentrations pour être très proche de 100 % aux concentrations élevées.

Par ailleurs, il apparaît que la fidélité varie aussi en fonction de la concentration puisque son coefficient de variation passe de 11.37 à 1.09 %. Cette remarque souligne l'intérêt de procéder aux calculs niveau par niveau.

D'autre part, le domaine de validité s'étend de 0,6 mg/l (environ) à 5,0 mg/l puisque les intervalles de tolérance sont compris entre les intervalles d'acceptabilité dans ce domaine. Dès que la concentration diminue de la valeur 0.6 mg/l, les limites de tolérance sortent de l'intervalle d'acceptabilité, et donc la méthode n'est plus capable de fournir suffisamment de résultats acceptables, en fonction des choix faits au départ de l'étude.

Cependant, on propose de définir cette valeur de 0.6 mg/l comme étant la limite de quantification (LQ) de cette méthode d'analyse qui sera calculée de façon plus exacte comme il est décrit dans l'axe suivant.

8. Limite de quantification

Dans notre cas, la LQ se situerait entre les niveaux A (0,5 mg/l) et B (5 mg/l) qui sont choisis de façon à encadrer au plus près la LQ supposée. Les calculs réalisés sur les valeurs absolues regroupés dans le tableau suivant à pour objectif de déterminer la valeur de cette limite

Tableau 16 : calcul de limite de quantification

Critère	Niveau	symbole	Valeur
Concentration moyenne théorique	A	x_A	0.5



	B	x_B	1.0
Limite d'acceptabilité basse	A	Z_{Aa}	0.4
	B	Z_{Ba}	0.8
Limite intervalle tolérance basse	A	Z_{At}	0.4
	B	Z_{Bt}	0.9
Pente de Limite de tolérance basse	$t_1 = \frac{Z_{Bt} - Z_{At}}{x_B - x_A}$		1.02
Ordonné à l'origine de limite de tolérance basse	$t_0 = Z_{At} - x_A \times t_1$		-0.138
Pente de Limite de tolérance basse	$a_1 = \frac{Z_{Ba} - Z_{Aa}}{x_B - x_A}$		0.8
Ordonné à l'origine de limite de tolérance basse	$a_0 = Z_{Aa} - x_A \times a_1$		0
Limite de quantification	$x_{LQ} = \frac{a_0 - t_0}{t_1 - a_1}$		0.588

➤ **Interprétation statistique**

Les calculs effectués dans le tableau illustré ci-dessus selon la méthode proposée par la norme ISO 5725-2, nous a donné une valeur de 0.588 mg/l correspond à la limite de quantification qui est presque égale à 0.6mg/l celle déduite du graphe du profil d'exactitude.

Conclusion

On peut donc conclure que la méthode du dosage des nitrates déterminée par la norme ISO 17025 est capable de quantifier exactement la teneur en nitrates dans l'eau potable sur le domaine de validité qui s'étend de 0.588 à 5mg/l.

En dehors de ce domaine, la méthode n'est pas valide et ne permet pas de garantir les objectifs fixés par l'utilisateur.



Conclusion générale

Conclusion générale

La vie active (professionnelle) n'est pas identique à la vie estudiantine, c'est un autre univers dans lequel la personne doit avoir une conscience professionnelle. Il permet en dépit de toutes les difficultés de réaliser et d'assurer les responsabilités qui nous seront confiées avec le maximum de perfection et de dévouement souhaitable.

Le travail que nous avons effectué au sein du laboratoire de contrôle de qualité d'eau potable de la Régie autonome intercommunale de distribution d'eau et d'électricité de la wilaya de Fès, nous a permis d'appliquer les connaissances que nous avons acquies durant notre formation et surtout d'élargir nos connaissances dans le domaine de validation des méthodes d'analyses. Plus précisément, ce projet a porté sur l'étude de validation de la méthode d'analyse des nitrates par spectrophotomètre d'UV visible à partir de la mise en place du profil d'exactitude.

Suite aux résultats obtenus après étude de démarche statistique du profil d'exactitude par utilisation d'Excel, on peut déduire que :



- La justesse varie avec la concentration puisque son biais moyen varie de -3.24 à -0.89 %, cependant, ce biais n'a pas d'influence importante sur la validité de la méthode,
- La fidélité varie aussi en fonction de la concentration, avec un coefficient de variation qui ne dépasse pas les 11.37%,
- La limite de quantification est de 0,588mg/l, puisque la limite de tolérance inférieure coupe la limite d'acceptabilité inférieure relative au niveau de ce point.

Finalement, la réalisation du protocole de profil d'exactitude pour la validation de la méthode d'analyse des nitrates dans l'eau potable par spectrophotomètre d'UV visible, nous a permis de garantir que la méthode est capable de produire une proportion moyenne attendue de résultats égale à $\beta(80\%)$ comprise dans un intervalle varie de 0,588 à 5mg/l.

En conséquence, on peut conclure que notre méthode est valide, et elle peut être appliquée sans problème pour le contrôle routinier des nitrates dans l'eau potable.

Références bibliographique

- [1] Gharb, Maroc, Caractérisation physico-chimique des eaux usées urbaines de la ville de Mechraa Belksiri, Science Lib Editions Mesermses : Volume 3, 2011.
- [2] A.Benabdelfadel, Variabilité et gestion des eaux de surface au Maroc, vol. 21, N° 1, 2010.
- [3] Danielopol, La colonisation d'environnement contraignants. GEOBIOS, M.S. n°21 : 55-66, 1997.
- [4] Gomella et Gerree, Le traitement des eaux publiques, industrielles et privées, Edition Eyrolles Paris, 1978 p262.
- [5] (NM 03.7. 2), Norme Marocaine, qualité des eaux d'alimentation humaine, détermination des chlorures, élaborée par le comité technique de normalisation SNIMA, 2006.
- [6] J. Mothes, Techniques modernes de Contrôle des fabrications DUNOD, 1952.
- [7] (VIM) (Guide ISO/CEI 99:2007)
- [8] (NF ISO 5725-1).



[9] Norme ISO 5725-2 ou version Afnor NF X 06-041, Profil d'exactitude.

[10] Hubert P Nguyen-Huu JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Cohen N, Compagnon PA, Dewé W, Feinberg M, Laurentie M, Mercier N, Muzard G, Valat L Commission SFSTP(2003), Validation des procédures analytiques quantitatives, Harmonisation des démarches : Partie I *STP Pharma Pratiques* 13(3) 101-138



Annexe 1

Spécifications des eaux d'alimentation humaine NM 03.7.001 (SNIMA)

Paramètres	Expression des résultats	VMA
Aluminium	Al : mg /l	0,2
Ammonium	NH ₄ : mg/l	0,5
Arsenic	As : µg/l	10
Baryum	Ba : mg/l	0,7
Bore	B : mg/l	0,3
Cadmium	Cd : µg /l	3
Sélénium	Se : µg/l	10
Chlorure	Cl : mg /l	750
Chrome	Cr : µg	50
Conductivité	µs/cm à 20°C	2700
Cuivre	Cu : mg /l	2
Cyanure	CN : µg/l	70
Fer	Fe : mg /l	0,3
Fluorure	F : mg/l	1,5
Manganèse	Mn : mg/l	0,5
Mercuré	Hg : µg/l	1
Nickel	Ni : µg/l	20
Nitrates	NO ₃ : mg/l	50
Nitrites	NO ₂ : mg/l	0,5
Oxydabilité au KMNO ₄	O ₂ : mg/l	5
Oxygène dissous	O ₂ : mg/l	5<O ₂ <8
pH		6,5<pH<8,5
Plomb	Pb : µg/l	10
Sulfate	SO ₄ : mg/l	400
Zinc	Zn : mg/l	3