

872

Mémoire du Projet de fin d'étude

2^{ème} Année Master



Département : Génie des Procédés

Spécialité : Génie Chimique

Présenté par :

Koumba Enzoumba Marlyse Betty

Toungou Bermone Jessica

**Validation de la méthode de Zambelli pour le
dosage des nitrites**

Sous la Direction de :
Dr Mouna Nacef

Juin 2017

DÉDICACE

A mon précieux Époux Pour toi a jamais, je te remercie tout ce que tu fais pour moi, je t'aime merci d'être toujours là.

17/3500

Je dédie ce mémoire de fin de cycle master

A mes précieux parents TOUNGOU Simon et TOUNGOU Annie Berthe (j'ai la chance de vous avoir comme parents vous êtes les meilleurs merci)

Aux fleurs de mon cœur Stella, Monsianne, Exaucé, Ange (je vous aime)

A mon Pasteur Massamba et mon conducteur Chadrac Ntsouassouani ainsi qu'à toute l'Épouse de Christ d'Algérie.

Aux frères et sœurs : Rodrigue, Gaïnz, Sande, Michel, Archet, Bienvenu, Jonas, Becky, et Cecilia (merci pour leurs soutiens, prières ainsi que leurs présences).

A mes précieuses : Coco, Francia, Christvie et Georgelie.

A ma binôme KOUMBA Marlyse qui tout au long de ce projet a fait preuve de volonté et de détermination envers ce travail mais aussi de tolérance et surtout de patience envers ma personne je la remercie pour sa gentillesse.

A mon pays le Congo et l'Algérie qui m'a reçu

A tous les enseignants et les étudiants du département de Génie de Procédés.

Sans oublié mon encadreur Mme Nacef MOUNA pour tout son amour, son soutien, ainsi que tous les conseils quelle nous a procurés afin de bien mener ce modeste travail.

Jessica

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à

Notre Seigneur et sauveur JESUS CHRIST de qui nous tenons toute notre existence ;

A mon adorable maman NGOLI CATHERINE parti trop tôt mais présente à jamais dans mon cœur je t'aimerais toujours ma maman, sans oublier mes tantes chéries qui ont quitté ce monde.

A mon honorable oncle OBARA PHILIPPE pour son soutien moral et financier. Aucun remerciement, ni aucune fortune ne sauront être suffisant pour te témoigner ma gratitude pour ton amour et tes sacrifices que tu ne cesses de faire afin que je puisse être quelqu'un de meilleur .Que mon DIEU puisse te bénir et t'accorder la longévité tu seras toujours un père pour moi ;

A mes mamans ALPHONSINE OSSEMBA et MBOUALE MAGUERITE vous représentez pour moi le symbole de la bonté, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi ainsi. Je vous aime ;

A mon cher papa KOUMBA MARCEL qui m'a donné la vie et qu'aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai toujours eu à ton égard ;

A mon aimable papa OSSEMBA ANDRE pour son amour de père qu'il ne cesse de me donner et son éducation qui a fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Que le bon Dieu te bénisse pour tout ;

A mes frères et sœurs : JUVERLY, CARLA, JOLLY ,CHIDERINE , FRESNEL, PRINCE, PATIENCE JULIA, SANDRA, VERDA, MESMIN, MICEME , ANTHONY, JEANCEL et autres membres de la famille pour leur soutien et leur fol en ma personne ;

A mon conducteur frère CHADRAC, à mes frs GAINZ, RODRIQUE, SANDE, MICHEL, ARCHET, JONAS et tous mes bien-aimés de l'épouse d'Algérie pour leur soutien et leur prière ;

A mes amis : MARYLINE, SONIA, LAURNA

A ma famille d'Algérie : GEORGELIE, CORETA, CHRISTVIE, FRANCIA et les autres filles de la cité sans oublier mes sœurs BECKY et CECILIA pour leur soutien.

A ma binôme JESSICA TOUNGOU qui tout au long de ce projet a fait preuve de volonté et de détermination envers ce travail mais aussi de tolérance et surtout de patience envers ma personne je la remercie pour sa gentillesse.

A tous les enseignants et les étudiants du département de Génie de Procédés sans oublier mon encadreur NACEF MOUNA.

MARLYSE

Remerciement

Nous remercions le Dieu tout puissant de nous avoir donné la force et le courage afin de mener à terme ce modeste travail.

A nos chers parents, frères, sœurs et amis pour tout leur amour, leur encouragement et leur soutien.

Nos vifs remerciements vont à notre encadreur **Dr. MOUNA Nacef**, qui a suivi de près le déroulement de notre travail, pour ses précieux conseils, son aide ainsi que toute la documentation qu'elle nous a procurée pour mener à bien cette étude.

Nos vifs remerciements aux enseignants qui nous feront l'honneur d'évaluer ce mémoire

Nos sincères remerciements vont à tous les enseignants du département de Génie de Procédés, les responsables de laboratoire du département Génie Chimique surtout Mr NEMOUCHI de nous avoir permis de travailler dans son laboratoire afin d'effectuer nos analyses et à la technicienne du laboratoire de recherche Génie Civil et d'hydraulique Mme Khabati wahida

Enfin, nous souhaitons chance et réussite à tous nos collègues de la promotion sortante 2017 du Master Génie Chimique.

RÉSUMÉ

Les nitrites font partie des indicateurs de pollution notamment dans l'environnement et sont très dangereux pour la santé humaine. Leur contrôle et l'étude de leur impact ont acquis une importance croissante durant ces dernières années. Il est nécessaire de se munir de méthodes d'analyse fiables nécessaires pour assurer la conformité avec les réglementations nationales et internationales. La validation de méthode est l'une des composantes essentielles dans l'analyse chimique et des activités de mesure qu'un laboratoire devrait mettre en œuvre pour lui permettre de produire des résultats fiables.

Dans cet objectif, les critères de validation de la méthode de Zambelli pour le dosage des nitrites dans l'eau par spectrophotométrie ont été étudiés. De plus, l'application de cette méthode a été menée pour le dosage des nitrites dans un pâté commercial et une eau minérale.

Les résultats obtenus ont montré que cette méthode est valide par rapport aux critères étudiés qui répondent aux limites d'acceptabilité.

L'application de la méthode de Zambelli au dosage des nitrites a confirmé la teneur affichée sur la bouteille d'eau minérale mais a révélé une teneur plus grande que celle qui se trouve sur l'emballage du pâté commercial.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES.....	i
LISTE DES TABLEAUX.....	ii
LISTE DES ABREVIATIONS.....	iii
INTRODUCTION GENERALE	1
PARTIE THEORIQUE	
CHAPITRE I : LES NITRITES	5
I.1 INTRODUCTION	6
I.2 DEFINITION.....	6
I.3 GENERALITES SUR LES NITRITES.....	6
I.3.1 Cycle de l'azote	6
I.3.2 Danger des nitrites	9
I.3.3 Utilisation des nitrites	9
I.4 METHODE DE DOSAGE DES NITRITES	10
I.4.1 Méthode spectrophotométrique	10
I.4.1.1 Principe de la spectrophotométrie visible.....	10
I.4.1.2 Méthode au réactif de Zambelli	13
I.4.1.1 Méthode de diazotation.....	14
I.4.2 Méthode chromatographique ionique	14
I.4.3 Méthodes électrochimiques	15
I.4.3.1 Méthodes voltammétriques.....	15
I.4.3.2 Méthodes potentiométriques.....	15
IV.4 CONCLUSION.....	15
CHAPITRE II : VALIDATION D'UNE METHODE D'ANALYSE	17
II.1 INTRODUCTION.....	18
II.2 CRITERES DE VALIDATION D'UNE METHODE D'ANALYSE	18
II.2.1 Etalonnage	18
II.2.1.1 Définitions.....	18
II.2.1.2 Écart-type et intervalles de confiance(IC).....	21

II.2.1.3	Interprétation des coefficients d'un modèle d'étalonnage.....	25
II.2.1.4	Coefficient de corrélation et de détermination	26
II.2.1.5	Domaine de linéarité de l'étalonnage	27
II.2.1.6	Limite de détection (LDM) et de quantification d'une méthode (LQM)	28
II.2.2	Justesse	31
II.2.3	Fidélité.....	32
II.2.3.1	Calcul de la répétabilité et de la reproductibilité interne.....	33
II.2.3.2	Autres critère dérivés.....	34
II.2.3.3	Signification d'un coefficient de variation (CV).....	35
II.2.4	Interférences	36
II.3	CONCLUSION	36
PARTIE EXPERIMENTALE		
CHAPITRE III : MATERIELS ET METHODES		
III.1	INTRODUCTION	38
III.2	Description de la méthode de Zambelli	39
III.3	Principe de la méthode	39
III.4	Matériel utilisé	39
III.5	Préparation du réactif de Zambelli.....	40
III.6	Préparation des solutions mère et filles des nitrites	40
III.7	Détermination de la longueur d'onde maximale (λ_{max}).....	41
III.8	Stabilité de la couleur.....	41
III.9	Critères de validation	42
III.9.1	Construction de la courbe d'étalonnage (linéarité)	42
III.9.2	Justesse et répétabilité.....	44
III.9.3	Reproductibilité.....	44
III.9.4	Étude des interférences de quelques ions sur le dosage des nitrites	44
III.10	Application de la méthode de Zambelli	45
III.10.1	Dosage des nitrites dans l'eau Ifri.....	45
III.10.2	Dosage des nitrites dans le pâté au fromage Bellat.....	46
III.3	CONCLUSION	48
CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSIONS		
IV.1	INTRODUCTION	49
		50

IV.2 RESULTATS DES ANALYSES	50
IV.2.1 Détermination de la longueur d'onde maximale.....	50
IV.2.2 Stabilité de la couleur	51
IV.2.3 Critères de validation	53
IV.2.3.1 Construction de la courbe d'étalonnage (linéarité).....	53
IV.2.3.2 La justesse.....	55
IV.2.3.3 La répétabilité	56
IV.2.3.4 La reproductibilité.....	57
IV.2.3.5 Limite de détection (LDM) et de quantification (LQM)	58
IV.2.3.6 Interférences.....	58
IV.2.4 Application de la méthode de Zambelli	63
IV.2.4.1 Dosage des nitrites dans l'eau Ifri.....	63
IV.2.4.2 Dosage des nitrites dans le pâté au fromage Bellat.....	64
IV.3 DISCUSSION	65
IV.4 CONCLUSION.....	66
CONCLUSION GENERALE	67
REFERENCES.....	69

LISTE DES FIGURES

Figure I. 1: Cycle de l'azote.....	7
Figure I. 2: Schéma réactionnel de l'azote.....	8
Figure I. 3: Schéma d'un spectromètre [Rodier]	12
Figure I. 4: Composants du réactif de Zambelli.....	13
Figure I. 5: Composants du réactif de la diazotation.....	14
Figure III. 1: Coloration jaune indicatrice de la présence des nitrites dans l'eau.....	39
Figure III. 2: Photalab spektral-WTW.....	40
Figure III. 3: Extraction des ions nitrites dans le pâté.....	47
Figure IV. 1: Variation de l'absorbance des ions nitrites en fonction de la longueur d'onde maximale.	51
Figure IV. 2: Réponse du spectrophotomètre en fonction du temps pour une même solution de nitrite de concentration 0,046 mg/L.....	52
Figure IV. 3: Variation de l'absorbance des ions nitrites en fonction de la concentration.....	53
Figure IV. 4: Courbe d'étalonnage linéaire.....	54
Figure IV. 5: Interférences des phosphates.....	60
Figure IV. 6: Interférences des nitrates.....	61
Figure IV. 7: Interférences des chlorures.....	63

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. 1: Domaine du visible.	13
Tableau III. 1: Les différents composants du réactif de Zambelli.	41
Tableau III. 2: Différentes longueurs d'onde utilisées pour la détermination de λ_{\max}	42
Tableau III. 3: Préparation des solutions étalons pour le dosage des nitrites à partir de la solution S ₁	43
Tableau III. 4: Préparation des solutions étalons pour le dosage des nitrites à partir de la solution S ₂	43
Tableau III. 5: Les espèces chimiques interférentes.	45
Tableau IV. 1: Fonction de linéarité.....	55
Tableau IV. 2: Récapitulatif des résultats relatifs à la mesure de la justesse.	56
Tableau IV. 3: Récapitulatif des résultats relatifs à la mesure de la répétabilité.	56
Tableau IV. 4: Récapitulatif des résultats relatifs à la mesure de la reproductibilité interne.....	57
Tableau IV. 5: LDM et LQM.	58
Tableau IV. 6: Interférences des phosphates.....	59
Tableau IV. 7 : Interférences des nitrates.....	61
Tableau IV. 8: Interférences des chlorures.....	62
Tableau IV. 9: Dosage des nitrites dans l'eau Ifri.	64
Tableau IV. 10: Dosage des nitrites dans le pâté Bellat.	64
Tableau IV. 11: Comparaison des différentes méthodes de dosage des nitrites.	65

LISTE DES ABREVIATIONS

Abréviations	Significations
LL	Limite de linéarité
LDM	Limite de détection
LQM	Limite de quantification
a₁	Sensibilité ou pente
a₀	Blanc analytique
S_{a0}	Écart type du blanc
NC	Niveau critique
α, β	Risques d'erreurs
U_{1-α}	Quantile d'une loi normale centrée réduite
R_I	Reproductibilité interne
r	Répétabilité
S_r	Écart type repétabilité
S_R	Écart type reproductibilité
IC	Intervalle de confiance
CV	Coefficient de variance
V₀	Valeur observée
V_s	Valeur suggérée
B%	Biais relatif
t (student)	Test student
R²	Coefficient de détermination
R	Coefficient de corrélation
k_{ic}	Facteur de couverture
\bar{y}, \bar{x}	Moyenne arithmétique
\hat{y}, z	Valeur prédite
n	Nombre de mesure (réplicat)



**INTRODUCTION
GENERALE**

INTRODUCTION GENERALE

Depuis toujours les composés azotés jouent un rôle important dans la vie des êtres vivants, des plantes et des animaux. Ils constituent l'élément indispensable dans la société humaine qui se retrouve en équilibre dans trois environnements : azote atmosphérique, azote dans le sol et l'eau et enfin azote dans la biomasse. Les nitrites sont contenus dans les eaux de consommation et les produits alimentaires. Leurs fortes teneurs au-delà des seuils rigoureux fixés par la législation du pays mènent à la synthèse des nitrosamines cancérigènes et la formation de la méthémoglobine chez le nourrisson.

Pour suivre cette pollution engendrée par les nitrites, il faut utiliser des méthodes d'analyse validées qui sont nécessaires pour assurer la conformité avec les réglementations nationales et internationales et surtout pour produire des résultats fiables. La validation de ces méthodes est donc l'une des composantes essentielles dans les procédures d'analyse et des mesures. Cependant il existe plusieurs critères qui nous permettent de valider une méthode d'analyse parmi lesquels nous pouvons citer : l'étude de la fonction d'étalonnage ; la limite de quantification et de détection, la justesse, la fidélité (répétabilité, fidélité intermédiaire (reproductibilité interne), reproductibilité).

Dans ce contexte, cette étude s'est intéressée à la validation au dosage des nitrites par la méthode du réactif de Zambelli. En application de cette méthode, nous avons également, effectué le dosage des nitrites dans un pâté commercial et dans une eau minérale. Ce mémoire est divisé en deux parties et s'articule autour de quatre (4) chapitres.

La première partie de ce travail est une étude bibliographique et comporte deux chapitres. Le premier chapitre porte sur quelques généralités sur les nitrites, ^{leurs} son utilisation, ^{leurs} ses dangers et ^{leurs} ses méthodes de dosage. Le deuxième chapitre détaille les différents critères de validation d'une méthode d'analyse.

La deuxième partie est axée sur l'expérimentation et elle est présentée en deux chapitres. Le troisième chapitre détaille le matériel et la méthode utilisé ainsi que les protocoles expérimentaux suivis. Les résultats obtenus sont regroupés dans le quatrième chapitre.

Le mémoire sera clôturé par une conclusion générale qui mettra en lumière les principaux résultats obtenus.

PARTIE THEORIQUE



**CHAPITRE I :
LES NITRITES**

I.1 INTRODUCTION

L'azote est l'un des éléments les plus abondants dans la nature. Environ 80% de l'air que nous respirons est constitué d'azote. Cet élément, composant majeur des protéines, est également présent dans les cellules de toute matière vivante. Les composés azotés sont parmi les paramètres qui sont souvent mesurés et contrôlés. Les nitrites sont classés parmi les paramètres chimiques de qualité de l'eau de consommation humaine. On les trouve, également dans des produits alimentaires où, ils sont utilisés comme additifs de conservation. Leurs teneurs sont limitées par la loi en vigueur dans chaque pays.

I.2 DEFINITION

Les nitrites correspondent aux sels de l'acide nitreux. Symbolisé par la formule NO_2^- , l'ion nitrite se différencie de l'ion nitrate par sa capacité de liaison avec les métaux. Les nitrites alcalins, eux, sont hygroscopiques, c'est-à-dire qu'ils absorbent l'humidité contenue dans l'air, et sont solubles dans l'eau. Parmi les nitrites les plus connus figurent le nitrite de calcium, le nitrite de sodium ou encore le nitrite de potassium [Hordé].

I.3 GENERALITES SUR LES NITRITES

I.3.1 Cycle de l'azote

L'azote est un composé chimique très répandu dans la nature. C'est un élément indispensable à la vie des êtres vivants qui se retrouve en équilibre dans trois compartiments de l'environnement (Figure I.1) :

- Azote atmosphérique ;
- Azote dans le sol et l'eau ;
- Azote dans la biomasse.

Dans l'eau, l'azote se trouve en solution sous forme combinée : nitrates (NO_3^-), azote ammoniacal (NH_3 , NH_4^+), nitrites (NO_2^-) et azote organique. Les échanges complexes entre les trois formes d'azote sont connus sous le nom de cycle de l'azote (Figure I.1).

Les principales étapes du cycle de l'azote sont la fixation, l'assimilation, l'ammonification, la nitrification et la dénitrification :

- **La fixation** correspond au passage de l'azote gazeux atmosphérique (N_2) en azote combiné par certains organismes.
- **L'assimilation** est la transformation de la matière azotée organique inerte ou minérale en matière vivante.
- **L'ammonification** correspond à la libération d'ammoniac à partir de composés azotés organiques.
- **La nitrification** est l'oxydation de l'azote ammoniacal en NO_3^- par l'intermédiaire de bactéries nitrifiantes.

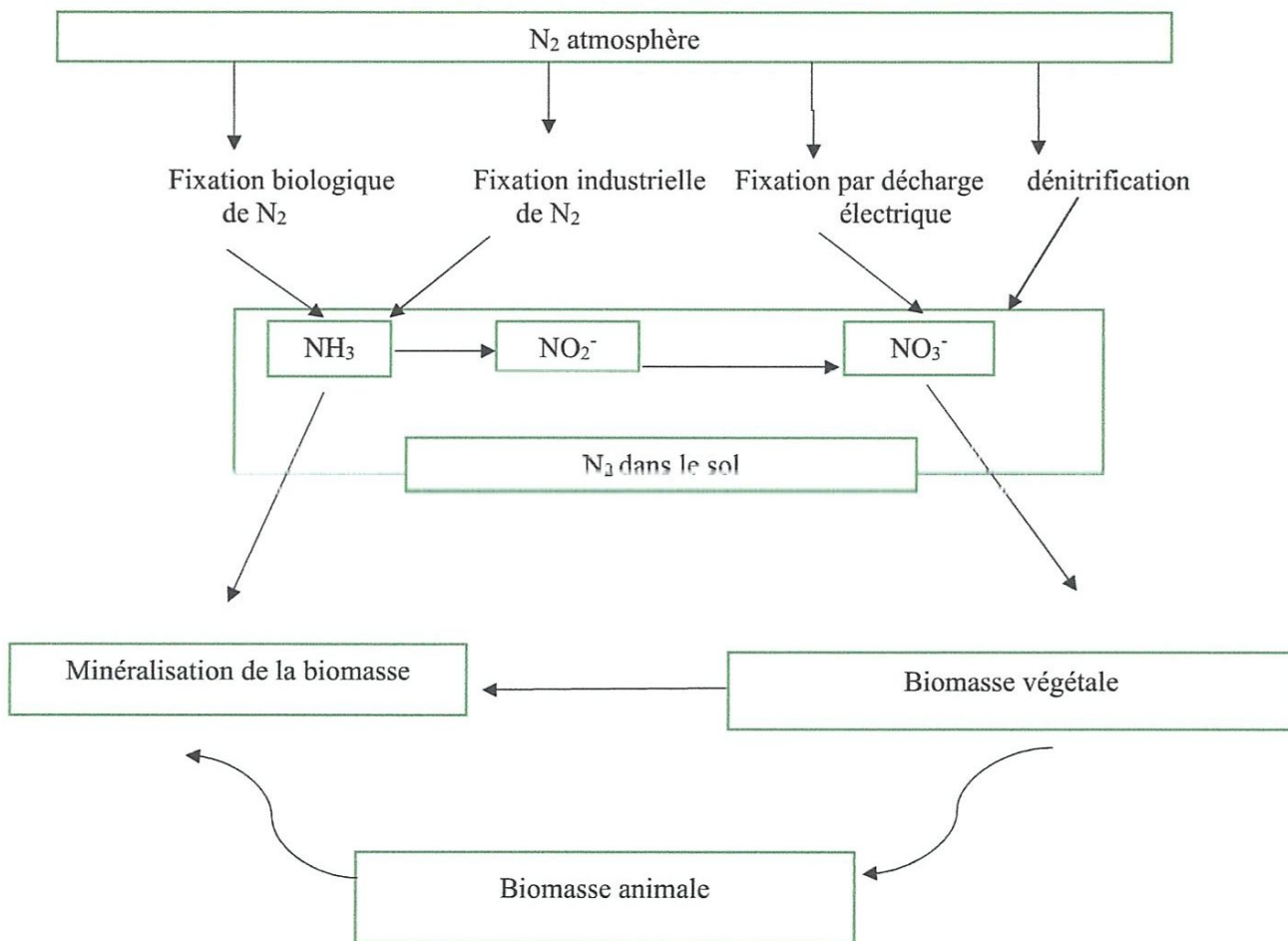


Figure I. 1: Cycle de l'azote

Selon la figure I.1, l'azote passe chez l'animal par les plantes, pour retourner ensuite au sol sous forme de matière organique décomposée ou de déchets. Lors de la décomposition de l'azote organique, ce dernier subit une ammonification, c'est-à-dire une transformation en ammoniacque par voie microbienne. Une partie de l'ammoniacque se volatilise dans l'atmosphère, mais la majorité est recyclée en NO_3^- par certaines bactéries du sol :



Dans un premier temps, les ions ammonium sont oxydés en nitrite (NO_2^-) par des bactéries aérobies du genre (Nitrosomonas et Nitrococcus), et dans un second temps les nitrites sont oxydés en nitrates par des bactéries du genre Nitrobacter.

- **La dénitrification** est la réduction des nitrates en azote gazeux sous l'action de bactéries dénitrifiantes.

Au stade nitrates, des bactéries dénitrifiantes chimiotrophes entrent en compétition avec les plantes, en réduisant en conditions anoxiques les nitrates en diazote gazeux qui retournent ensuite dans l'atmosphère. Le chemin réactionnel est décrit par le schéma ci-dessous. L'état d'oxydation des atomes d'azote de chaque substance est présenté entre parenthèses :

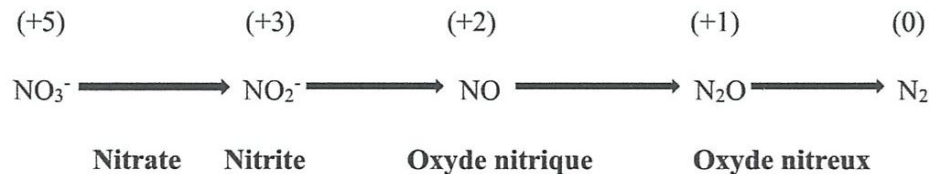


Figure I. 2: Schéma réactionnel de l'azote

La réduction du diazote atmosphérique en ammoniacque (fixation de l'azote) s'effectue par une voie biologique via des organismes vivants. En effet, l'ammoniacque est un composé dont ont besoin tous les organismes pour synthétiser des protéines [Abdallah].

I.3.2 Danger⁹ des nitrites

Lorsque des nitrites sont présents dans le sang humain, ils empêchent l'hémoglobine de fixer les molécules d'oxygène. La méthémoglobinémie, plus communément appelée maladie bleue du nourrisson qui concerne spécialement les femmes enceintes et les nourrissons, est un exemple d'affection causée par les nitrites. Cette intoxication a pour origine l'utilisation d'eau chargée en NO_3^- pour la préparation des biberons [Hordé].

Dans l'estomac de l'enfant en bas âge, le liquide gastrique est insuffisamment acide, ce qui permet le développement des germes réducteurs des ions nitrates qui formeront les nitrites. Une fois passés dans la circulation générale, ces derniers deviennent responsables de la formation de la méthémoglobine. Les symptômes de cette maladie sont principalement la difficulté à respirer, la cyanose (décoloration bleutée de la peau et de la bouche) et la fatigue.

Les agents nitrosants qui proviennent des nitrites sous des conditions gastriques acides, réagissent aisément avec les composés nitrosables, surtout les amines secondaires et les alkyl amides, afin de générer des composés N-Nitrosés. Un grand nombre de composés N-Nitrosés sont cancérogènes.

Il existe des preuves limitées chez l'homme concernant la cancérogénicité des nitrites dans les aliments. Les nitrites dans les aliments sont associés à une augmentation de l'incidence du cancer de l'estomac. D'autres études ont permis de constater une faiblesse du développement et de la reproduction chez les animaux à la suite de l'exposition à de très fortes doses de nitrites [AFSSA].

I.3.3 Utilisation des nitrites

La préservation ou salaison de la viande, de la volaille, du poisson, des fruits de mer et des légumes en les salant remonte à la préhistoire. Le nitrite offre des avantages en salubrité et en qualité des aliments.

Le nitrite est un ingrédient de salaison essentiel qui fixe les couleurs caractéristiques associées aux salaisons, crée un profil de saveur unique, contrôle l'oxydation des lipides et, plus important, sert d'agent antimicrobien efficace, en particulier contre le *Clostridium botulinum*. Le botulisme est rare aujourd'hui parce que les méthodes de transformation et les agents de conservation comme le nitrite de sodium protègent les consommateurs [CMC].

L'utilisation des nitrites est la manière la plus courante et traditionnelle de conserver les produits de charcuterie, qu'ils soient artisanaux ou industriels. Il est ajouté comme additif et a pour symbole E250 ou SIN250 pour les nitrites de sodium puis E249 ou SIN249 pour les nitrites de potassium.

I.4 METHODE DE DOSAGE DES NITRITES

Les ions nitrites peuvent être dosés à partir de plusieurs méthodes parmi lesquelles nous avons :

I.4.1 Méthode spectrophotométrique

I.4.1.1 Principe de la spectrophotométrie visible

La spectrométrie consiste à mesurer l'absorbance d'une solution à une longueur d'onde donnée pour en déduire sa concentration. Cette absorbance est déterminée à l'aide d'un spectromètre, réglé à la longueur d'onde spécifique.

La longueur d'onde mise en œuvre dépend des caractéristiques de la substance chimique concernée par l'absorption. Elle se détermine généralement par le tracé du spectre d'absorption de la substance considérée et par le choix de la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption (λ_{\max}) ou d'une valeur proche de ce maximum en cas de risque d'interférences d'autres substances [Rodier].

Lorsqu'un faisceau lumineux polychromatique rencontre une substance transparente aux radiations lumineuses, une partie du faisceau est réfléchi, une autre partie est absorbée par la substance et transformée en chaleur, enfin la troisième partie traverse la substance. Lorsqu'on effectue un dosage spectrophotométrique, on s'intéresse à la proportion d'énergie lumineuse ayant traversé la substance.

Quand un rayonnement d'une longueur d'onde donnée traverse un milieu, son intensité diminue en fonction de la densité des espèces absorbantes et de l'épaisseur du milieu. Cette propriété est utilisée pour déterminer la concentration des espèces chimiques absorbant à une longueur d'onde déterminée. C'est l'interaction entre les photons de la source lumineuse et les ions ou molécules de l'échantillon qui provoque l'absorption lumineuse [Rodier].

L'atténuation d'un faisceau lumineux monochromatique s'exprime par sa transmittance T (ou pourcentage de transmission), définie comme le rapport entre l'intensité lumineuse transmise (I) et l'intensité incidente (I_0) :

$$T = I/I_0 \quad \text{I.1}$$

On définit également l'absorbance A par :

$$A = \log(I_0/I) = -\log T \quad \text{I.2}$$

Pour un rayonnement monochromatique de longueur d'onde λ , la loi de Beer-Lambert établit une proportionnalité entre la concentration c d'une entité chimique en solution, sa nature chimique (caractérisée par son coefficient d'extinction molaire ϵ), son absorbance A et la longueur du trajet parcouru par la lumière dans la solution :

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c \quad \text{I.3}$$

I_0 : intensité du faisceau incident.

I : intensité du faisceau émergent. (Transmis).

ϵ : coefficient d'extinction molaire.

l : longueur du trajet optique (épaisseur de substance traversée ou plus simplement épaisseur de la cuve).

c : concentration.

Le coefficient d'extinction molaire ϵ dépend de la longueur d'onde λ , de la nature chimique de l'entité, du solvant et de la température. Sa valeur est généralement exprimée au maximum d'absorption du composé.

À une longueur d'onde donnée λ , l'absorbance A d'un mélange de n espèces absorbantes est la somme des absorbances individuelles des n constituants du mélange. Cette propriété est dite loi d'additivité des densités optiques.

Le spectrophotomètre est toujours constitué de quatre éléments de base :

- la source (lampe à filament de tungstène utilisable entre 300 nm et 1 100 nm),
- le monochromateur (permet de sélectionner une longueur d'onde et de balayer l'ensemble du spectre,
- cuve de mesure où se trouve l'échantillon (en verre réutilisable ou en matériaux plastique à usage unique),
- Le détecteur.

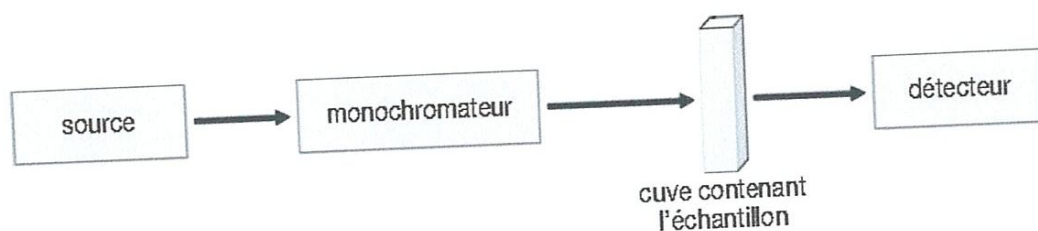


Figure I. 3: Schéma d'un spectromètre [Rodier]

Pour avoir une bonne sensibilité, il faut déterminer la longueur d'onde où la solution absorbe le plus, c'est à dire la longueur d'onde dont la teinte est complémentaire de celle de la solution. Deux couleurs sont complémentaires lorsqu'elles donnent du blanc par addition [Baillet].

Une solution aqueuse de couleur jaune doit sa coloration au fait qu'elle absorbe la couleur bleue du rayonnement blanc qui l'a traversé et transmet la composante jaune de cette lumière. Ainsi, pour la détermination d'un élément qui donnerait une coloration jaune à la solution aqueuse, la variation maximale de l'absorbance en fonction de la concentration a lieu avec la couleur bleue.

La variation de l'absorbance avec la couleur jaune étant négligeable. En général, le rayonnement utilisé pour une analyse colorimétrique doit être la couleur complémentaire de la solution contenant l'analyte à doser. Le tableau I.1 donne pour chaque solution colorée, la couleur complémentaire et la longueur d'onde qui lui est inhérente.

Nous verrons par la suite que les solutions contenant des teneurs en nitrites seront colorées en jaune grâce à un réactif spécifique et seront analysées à une longueur d'onde de 435 nm [Skoog].

Tableau I. 1: Domaine du visible.

Couleurs de la lumière absorbée	Couleurs complémentaires transmises
Violet (400-435) nm	Jaune –vert
Bleu (435-480) nm	Jaune
Bleu-vert (480-490) nm	Orange
Vert-bleu (490-500)	Rouge
Vert (500-560 nm)	Pourpre
Jaune-vert (560-580) nm	Violet
Jaune (480-595)	Bleu
Orange (595-650)	Bleu-vert
Rouge (650-750nm)	Vert-bleu

I.4.1.2 Méthode au réactif de Zambelli

L'acide sulfanilique, en milieu acide en présence d'ion ammonium et de phénol, forme avec les ions NO_2^- un complexe coloré jaune dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en nitrites susceptible d'un dosage spectrophotométrique. L'ensemble des réactifs révélateurs de la coloration jaune de l'échantillon d'eau contenant des nitrites est appelé réactif de Zambelli [Hakmi].

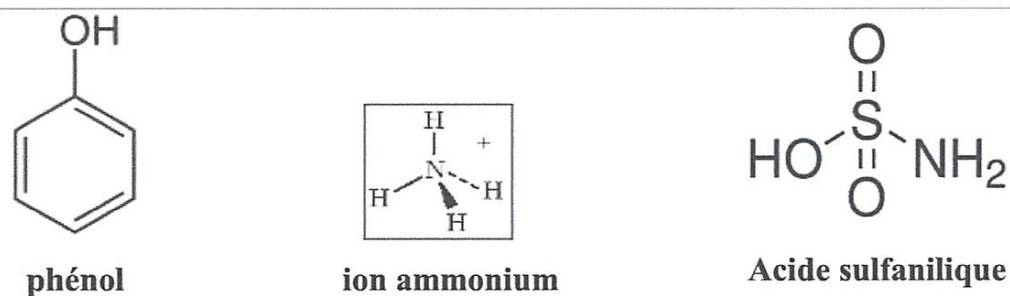


Figure I. 4: Composants du réactif de Zambelli

Suivant l'origine des eaux, la teneur en nitrites est assez variable. La méthode au réactif de Zambelli a une sensibilité de l'ordre de quelques microgrammes par litre.

I.4.1.1 Méthode de diazotation

En milieu acide, les ions nitrite réagissent avec une amine aromatique (composé comprenant une fonction amine $-NH_2$ fixée sur un noyau benzénique $-C_6H_5$), pour former un sel de diazonium selon une réaction appelé diazotation. On peut utiliser le chlorure de N-(naphtyl-1) diamino-1,2-éthane ou NED :



Figure I. 5: Composants du réactif de la diazotation

L'ion diazonium, en présence d'un dérivé de l'acide sulfanilique, l' amino-4-benzenesulfonamide ou sulfanilamide, donne un complexe rose.

Cette réaction est très sensible ; elle permet de détecter de très faibles quantités d'ions nitrite. La limite de détection de la méthode se situe aux environs de $1\mu g/L$ d'ions nitrite.

Elle est applicable directement à des échantillons dont la concentration massique en ions nitrite est inférieures à 1 mg/L [Fiche de TP].

I.4.2 Méthode chromatographique ionique

La chromatographie est une technique de séparation d'espèces dans un mélange par partage entre une phase mobile (gaz ou liquide) et une phase stationnaire (liquide ou solide).

Chaque soluté injecté dans la colonne est soumis à deux effets antagonistes : l'entraînement par la phase mobile dans laquelle il est soluble et la rétention par la phase stationnaire avec laquelle il interagit. La séparation est possible grâce aux différences d'affinités de ces composés pour les phases mobile et stationnaire. La phase stationnaire, la colonne, est un échangeur d'ions constitué de particules de résine [Mayor].

I.4.3 Méthodes électrochimiques

Les technologies utilisées pour détecter le nitrite peuvent être divisées en plusieurs catégories, dont les méthodes voltammétriques et potentiométriques.

I.4.3.1 Méthodes voltammétriques

Une méthode voltammétrique ou ampérométrique fournit un signal de courant pour représenter le taux de réactions sur la surface de la sonde alors qu'un potentiel est appliqué à l'électrode de travail. Le potentiel appliqué à l'électrode de travail est déterminé pour éviter les interférences d'oxygène et obtenir une forte réaction d'électrode à l'oxydation des nitrites, y compris la sensibilité et le temps de réponse. Un système de mesure typique se compose de trois électrodes : une électrode de travail, une électrode de référence et une contre-électrode [Yilong].

I.4.3.2 Méthodes potentiométriques

La méthode potentiométrique détecte les ions à l'aide de membranes organiques qui contiennent un ionophore approprié ou échangeur d'ions avec une affinité de liaison spécifique pour l'ion cible et portent une espèce chargée particulière de l'échantillon dans la zone de l'électrode. Une différence de potentiel est créée entre les électrodes de référence et d'indicateur avec l'apparence d'une espèce chargée, sans courant circulant entre les électrodes, et aucune espèce n'est consommée ou produite.

La différence de potentiel varie avec le logarithme de la concentration sous condition que la concentration de l'ion nitrite soit suffisamment faible pour que les coefficients d'activité puissent être considérés comme constants ; Sinon, la courbe de réponse devrait être calibrée [Yilong].

IV.4 CONCLUSION

Les nitrites étant nocifs sur la santé humaine, il est donc important de respecter la quantité admissible dans des eaux et denrées alimentaires destinées à être consommées surtout chez les nourrissons et les femmes enceintes. Le contrôle des teneurs en nitrites est très important et peut se

II.1 INTRODUCTION

Le dosage d'un analyte dans un échantillon peut se faire via différentes méthodes. De ce fait, une connaissance préalable et précise de la méthode choisie est indispensable. Parmi les points impératifs à élucider sont les conditions de fiabilité et la limite de détection. D'autres critères sont d'autant plus importants et nécessitent une étude détaillée afin de les mettre en lumière. Les critères de validation d'une méthode d'analyse quelconque font l'objet de ce chapitre.

II.2 CRITERES DE VALIDATION D'UNE METHODE D'ANALYSE

Les facteurs connus qui nous permettent d'envisager un choix de méthode parmi plusieurs autres sont : l'étalonnage, la justesse, la fidélité, les interférences.

II.2.1 Etalonnage

Les méthodes d'analyse peuvent être classées en deux catégories, d'une part, celles dites primaires qui mesurent directement la quantité d'analyte et peuvent servir à la traçabilité, d'autre part celles dites directes dont le mode opératoire délimite d'analyte. Mais la majorité des méthodes quantitatives d'analyse ne mesurent pas une quantité absolue de l'analyte recherché et procède par comparaison. Elles nécessitent un étalonnage qui consiste à construire un modèle à prédire les concentrations d'échantillons par analogie avec les concentrations des solutions d'étalonnage [Feinberg].

II.2.1.1 Définitions

L'étalonnage est défini comme l'opération qui, dans des conditions spécifiées, établit en une première étape une relation entre les valeurs et les incertitudes de mesures associées qui sont fournies par des étalons et des indications correspondantes avec les incertitudes associées, puis utilise en une seconde étape cette information pour établir une relation permettant d'obtenir un résultat de mesure à partir d'une indication [Feinberg].

Pratiquement, l'étalonnage se fait en préparant des solutions synthétiques d'étalonnage de concentration connues x_i qu'on introduit dans l'instrument et dont on mesure la réponse observée y_i . D'après ce qu'on vient de dire, chacune de ces réponses est modélisée de la façon suivante [Feinberg] :

$$y_i = f(x_i) + E_i$$

II.1

Où y_i : la réponse instrumentale mesurée ; x_i : la concentration de solution étalon

E_i : bruit de fond ; f : partie déterministe de la fonction de réponse.

Pour bien comprendre l'originalité de l'étalonnage par rapport aux autres modèles de prédiction utilisés en physique, il faut garder à l'esprit cette structure double du modèle :

- D'une part, une fonction de réponse f déterministe, basées sur des lois chimique et/ou physiques et/ou biologiques ;
- D'autre part, un bruit de fond aléatoire qui équivaut à une erreur expérimentale.

Pour marquer cette dualité on introduit une notation spéciale. On note \hat{y} la valeur théorique, aussi appelée valeur prédite, fournie par la partie déterministe du modèle ; elle est prédite mais non mesurée et correspondrait à une réponse en l'absence de tout bruit de fond. La différence entre y et \hat{y} s'appelle le résidu et est égale à E .

$$y = \hat{y} + E \text{ et } x_i = \mu + E_i \quad \text{II.2}$$

$$E = y - \hat{y} \quad \text{II.3}$$

y : réponse observée.

\hat{y} : Valeur prédite.

μ : Valeur vraie et x_i : la valeur de chaque mesure.

Beaucoup de mécanismes physicochimiques d'analyse reposent sur des modèles qui sont rarement linéaires : on va essayer de leur substituer un modèle linéaire plus simple, du type :

$$y = a_0 + a_1 x + E \quad \text{II.4}$$

$$\hat{y} = a_0 + a_1 x \quad \text{II.5}$$

La première étape de l'étalonnage va consister à calculer les valeurs des coefficients de la droite a_0 et a_1 . Pour cela on mesure les réponses de différentes solutions étalons x_i préparées par l'expérimentateur et on utilise la méthode des moindres carrés (MMR qui est la méthode la plus

généralement utilisée pour estimer les coefficients d'un modèle ou régression des moindres carrés RMR) décrite comme suit :

$$a_1 = \frac{SPE_{XY}}{SCE_X} \quad \text{II.6}$$

$$a_0 = \bar{y} - a_1 \bar{x} \quad \text{II.7}$$

Avec a_1 : pente ou sensibilité ; a_0 : intersection à l'origine ou blanc analytique.

Dans ces deux équations, on a utilisé les notations suivantes pour les n couples x_i, y_i ($1 \leq i \leq n$) à savoir :

$$SCE_X = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad \text{II.8}$$

$$SPE_{XY} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) \quad \text{II.9}$$

SPE_{XY} : somme des produits des écarts entre x et y .

SCE_X : somme des carrés des écarts de x .

Avec,

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad \text{II.10}$$

$$\text{Et, } \bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^n y_i}{n} \quad \text{II.11}$$

\bar{x} et \bar{y} : moyennes arithmétiques de x et de y .

Pendant, le but de l'étalonnage n'est pas simplement de connaître les coefficients de la courbe d'étalonnage. Une fois les mesures faites, on va utiliser le modèle inverse pour prédire les concentrations d'échantillons inconnus. Si on note \hat{x} la concentration prédite inverse (et non la réponse prédite), on a alors :

$$\hat{x} = \frac{y - \hat{a}_0}{\hat{a}_1}$$

II.12

\hat{x} : Modèle d'étalonnage linéaire inverse.

Pour comprendre l'importance de cette distinction entre les modèles d'étalonnage direct et d'étalonnage inverse, il faut noter qu'on utilise les valeurs estimées des paramètres notées avec un "hat". Pour simplifier la notation mais bien souligner la différence entre x qui est la concentration contrôlée par l'expérimentateur et \hat{x} la concentration prédite à partir d'un échantillon inconnu, dans le reste du texte on notera z la variable \hat{x} .

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

II.13

Comme l'indique la définition, l'étalonnage est bien une procédure en deux étapes :

- D'abord, on fait des essais qui servent à calculer les coefficients de la droite d'étalonnage, cette étape s'appelle **l'étalonnage direct**,
- Ensuite, on utilise les résultats pour prédire les concentrations d'échantillons inconnues ; c'est **l'étalonnage inverse**.

Pour quelques méthodes particulières pour lesquelles on ne dispose pas de l'analyte sous la forme d'une molécule étalon, la démarche d'étalonnage est différente. On va directement prédire z à partir de y et parler **d'étalonnage indirect**.

II.2.1.2 Écart-type et intervalles de confiance(IC)

L'écart-type est qualifiée de statistique de dispersion par opposition à la moyenne qui est une statistique de position.

Si on définit un certain nombre hypothèses implicite, il est alors possible de calculer des intervalles de confiance des coefficients obtenus par la RMC (régression des moindres carrés). Les deux hypothèses principales sont que :

- Les résidus E_i sont des variables aléatoires distribuées selon des lois normales de moyennes nulles et de variances théoriques S^2 .
- Les variables E_i sont indépendantes, ce qui signifie concrètement qu'elles ne sont pas liées entre elles et que, par exemple, les solutions étalons ont été préparées séparément.

Cette deuxième condition est la plus difficile à réaliser car les solutions étalons sont généralement préparées à partir d'une même solution mère. De plus, une pratique courante qui consiste à faire des dilutions successives, par exemple de moitié, peut aggraver cette dépendance. En complément des coefficients a_0 et a_1 , la méthode des moindres carrés permet d'obtenir d'autres statistiques, en particulier l'écart-type des résidus ou écart-type résiduel, noté S_E . Il est intéressant car il donne une indication sur l'étroitesse de l'ajustement entre la droite calculée et les points expérimentaux, puisque les résidus représentent la distance entre les réponses observées et les réponses théoriques. On démontre que S_E^2 est un estimateur de S^2 , la variance des erreurs expérimentales E_i .

$$S^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{(n-1)} \quad \text{II.14}$$

S^2 : variance.

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}} \quad \text{Où} \quad S = \sqrt{\frac{SCE_X}{n-1}} \quad \text{II.15}$$

$$S_E^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y})^2}{n-2} \quad \text{Où} \quad S_E^2 = \frac{(SCE_Y - a_1 SPE_{XY})}{n-2} \quad \text{II.16}$$

S_E^2 : variance résiduelle.

$$S_E = \sqrt{\frac{\sum (Y - \hat{Y})^2}{(n-2)}} \quad \text{II.17}$$

S_E : écart type résiduel.

S : écart type.

→ A partir de S_E il est possible de calculer d'autres écarts types, comme celui du blanc, de la sensibilité et d'une valeur prédite \hat{y} .

$$S_{a_1} = \frac{S_E}{\sqrt{SCE_X}} \quad \text{II.18}$$

$$S_{a_0} = S_E \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{x^2}{SCE_X}} \quad \text{II.19}$$

S_{a_1} : écart type de la sensibilité.

S_{a_0} : écart type du blanc analytique.

Si $\hat{y}_k = a_0 + a_1 x_k$ représente la réponse prédite pour une valeur x_k donnée, on peut aussi calculer son écart type $S_{\hat{y}_k}$ et, en faisant varier x_k , on obtient écart type d'une réponse prédite quelconque en appliquant l'équation :

$$S_{\hat{y}_k} = S_E \sqrt{\frac{n+1}{n} + \frac{(x_k - \bar{x})^2}{SCE_X}} \quad \text{II.20}$$

$S_{\hat{y}_k}$: Écart type d'une réponse individuelle prédite.

➔ Puisqu'on peut calculer des écart-types, on va aussi pouvoir calculer des intervalles de confiance (IC) pour les coefficients ou les réponses prédites. Rappelons qu'un IC représente un intervalle dans lequel on peut affirmer, avec un risque d'erreur α connu, que se situe la valeur dite vraie (notée par convention par une lettre grecque) d'un paramètre statistique. Chaque formule fait intervenir une variable de student à $\nu=n-2$ degrés de liberté dont le quantile est noté $t_{\nu, 1-\frac{\alpha}{2}}$. Si on appelle α_1 et α_0 les valeurs vraies de la pente et de l'intersection et ζ celle d'une réponse prédite, on a respectivement :

$$\alpha_0 - t_{\nu, 1-\frac{\alpha}{2}} * S_{a_0} \leq \alpha_0 \leq \alpha_0 + t_{\nu, 1-\frac{\alpha}{2}} * S_{a_0} \quad \text{II.21}$$

$$\alpha_1 - t_{\nu, 1-\frac{\alpha}{2}} * S_{a_1} \leq \alpha_1 \leq \alpha_1 + t_{\nu, 1-\frac{\alpha}{2}} * S_{a_1} \quad \text{II.22}$$

$$\hat{y} - t_{\nu, 1-\frac{\alpha}{2}} * S_{\hat{y}} \leq \zeta \leq \hat{y} + t_{\nu, 1-\frac{\alpha}{2}} * S_{\hat{y}} \quad \text{II.23}$$

Avec ces formules, on peut vérifier très facilement si la droite passe effectivement par zéro. Pour cela, on calcule l'intervalle de confiance du blanc. S'il contient la valeur 0, on peut conclure avec un risque d'erreur α que la droite passe par 0. Il est alors possible de se ramener à un modèle plus simple, du type $y = a_1x + E$, et de conduire les calculs comme il est décrit plus loin.

Par ailleurs, on utilise ces écarts types et intervalles de confiance pour proposer des stratégies de contrôle de la qualité d'un étalonnage, lors de l'utilisation de la méthode d'analyse en routine.

• **L'intervalle de confiance de la moyenne** permet, non pas de supprimer ce risque, mais de le quantifier. Pour construire l'intervalle de confiance de la moyenne, on définit un ensemble de valeur parmi lesquelles il y a un faible risque que la valeur vraie μ ne s'y trouve pas. Ce risque d'erreur, compris entre 0 et 1 (ou entre 0% et 100%) est appelé **le risque d'erreur de première espèce** et sera noté α son complément $1-\alpha$ est le niveau de confiance de l'intervalle.

Si α est très petit, par exemple 1%, on peut avoir une confiance élevée dans l'intervalle choisi, il y a peu de chances que la valeur vraie ne s'y trouve pas mais l'intervalle est grand. Inversement, si le risque α est grand, par exemple 10%, on a un risque plus élevé que la valeur vraie ne s'y trouve pas ; alors l'intervalle est plus petit.

Pratiquement, l'intervalle de confiance de la moyenne est compris entre deux limites Let U. Pour les obtenir, on calcule d'abord **l'écart-type de la moyenne** $s_{\bar{x}}$ selon la formule suivante :

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad \text{II.24}$$

$s_{\bar{x}}$: écart-type de la moyenne.

Cet écart type est aussi souvent appelé **erreur standard de la moyenne**. A partir de la formule II.24, on voit que l'écart-type de la moyenne sera d'autant plus petit qu'on augmente le nombre de répétitions. En développant la formule, il apparait clairement qu'il faut diviser deux fois la SCE_X pour calculer l'écart-type de la moyenne, une première fois par $n-1$, puis à nouveau par n .

$$s_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\frac{SCE_X}{n-1}}{n}}$$

II.25

Finalement, on obtient l'intervalle de confiance de la moyenne [L, U] au niveau de confiance $1-\alpha$ à l'aide de la formule suivante :

$$[\bar{x} - t_{n-1;1-\frac{\alpha}{2}} * s_{\bar{x}}; \bar{x} + t_{n-1;1-\frac{\alpha}{2}}] : \text{Intervalle de confiance de la moyenne.}$$

Si on se réfère à la formule, le coefficient k_{IC} est le facteur de couverture de l'intervalle de confiance de la moyenne et vaut :

$$k_{IC} = t_{n-1;1-\frac{\alpha}{2}}$$

II.26

k_{IC} : facteur de couverture de l'IC.

Il définit la probabilité correspondant au niveau de confiance. Dans cette formule, la quantité $t_{n-1;1-\frac{\alpha}{2}}$ correspond au quantile $1 - \frac{\alpha}{2}$ d'une variable de student pour n-1 degrés de liberté, ou n est le nombre de données.

Bien que le niveau de confiance soit $1-\alpha = 95\%$, on note la probabilité $1-(\frac{\alpha}{2})=97,5\%$ pour indiquer que l'IC est bilatéral et que le risque α est réparti de chaque côté. Lorsqu'on calculera le quantile t il faudra tenir compte du fait que le risque est reparti par moitié, à chaque extrémité de l'intervalle. Finalement, la formule devient :

$$[\bar{x} - k_{IC} \times s_{\bar{x}}; \bar{x} + k_{IC} \times s_{\bar{x}}]$$

II.27

II.2.1.3 Interprétation des coefficients d'un modèle d'étalonnage

Le modèle linéaire de l'équation connaît un grand succès en chimie analytique parce que les coefficients sont faciles à interpréter pour un analyste.

Si on définit la **sensibilité** d'une méthode comme l'accroissement de réponse rapportée à l'accroissement de concentration, le coefficient a_1 peut s'interpréter comme la sensibilité.

$$\text{sensibilité} = \lim_{\partial x \rightarrow \infty} \frac{\partial y}{\partial x} = a_1 \quad \text{II.28}$$

Par suite le **blanc analytique** a_0 correspond à la réponse instrumentale en l'absence de l'analyte et à ne pas confondre à un blanc électrique qui permet de remettre l'affichage à zéro et qui est purement instrumental alors celui-ci prend en compte des phénomènes chimiques.

a_0 et a_1 étant des variables aléatoires.

II.2.1.4 Coefficient de corrélation et de détermination

Avant d'aller plus loin, il est intéressant d'évoquer le coefficient de détermination R^2 ou de sa racine carrée, le coefficient de corrélation R , car ils sont souvent présentés comme des critères efficaces pour vérifier si un modèle est bien linéaire et si un étalonnage est de bonne qualité. En utilisant nos notations, leurs formules de calcul sont les suivantes :

$$R = \frac{SPC_{XY}}{\sqrt{SCE_X SCE_Y}} \quad \text{II.29}$$

$$R^2 = \frac{\sum F_{iV}^2}{SCE_X SCE_Y} \quad \text{II.30}$$

Avec

R : coefficient de corrélation.

R^2 : coefficient de détermination.

SCE_Y : somme des carrés des écarts de y et se calcule avec l'équation II.8 en remplaçant les x_i et y_i .

Historiquement, R a été introduit pour mesurer la corrélation, c'est à dire la liaison, entre deux variables x et y . Par construction sa valeur est toujours comprise entre -1 et +1. S'il est positif cela signifie que les deux variables ont tendance à augmenter simultanément, et de façon opposée s'il est négatif. Si l'hypothèse que R est statistiquement égal à zéro est rejetée, on en conclut que les deux variables sont corrélées. Par contre, il n'existe pas de test pour vérifier l'hypothèse que R est égal à 1. Voilà pourquoi on peut conclure que les coefficients de

détermination et de corrélation ne peuvent être utilisés pour affirmer qu'un modèle d'étalonnage est correct.

II.2.1.5 Domaine de linéarité de l'étalonnage

La linéarité associée à l'étalonnage est définie comme :

- Capacité à fournir des réponses instrumentales (que nous avons notées y) proportionnelles à la concentration en analyte à doser (notée x).

Ou bien comme

- Capacité à prédire des concentrations retrouvées (z) proportionnelles aux concentrations d'une série d'échantillons (x).

Dans le premier cas, il s'agit bien d'un critère lié à l'étalonnage, dans le second il s'agit plutôt d'une question de justesse. En fait, c'est cette deuxième définition qui est la plus intéressante pour la validation d'une méthode. Pourtant de très nombreux guides de validation insistent toujours sur la vérification de la linéarité du modèle d'étalonnage. En effet, pour que la sensibilité et le blanc analytique aient un sens pratique il faut que le modèle soit réellement linéaire. Mais l'absence de la linéarité ne veut pas dire qu'une méthode est incapable de quantifier correctement l'analyte.

Si on observe une courbe de la droite d'étalonnage, il existe deux solutions : soit limiter la gamme étalon à un domaine où elle est strictement linéaire ; soit choisir un autre modèle d'étalonnage qui s'adapte mieux aux points expérimentaux. Dans le premier cas, cette limite deviendra une frontière au-delà de laquelle on s'interdira de quantifier. Si pour un échantillon on obtient une réponse instrumentale qui dépasse le seuil de concentration limite, il sera obligatoire de diluer la préparation afin de rester dans la zone prescrite est donc très contraignant alors que le calcul d'un modèle quadratique est très simple.

Le positionnement exact de la limite de linéarité est délicat et, même s'il existe une méthode itérative de recherche le plus simple est de procéder de façon empirique en utilisant l'analyse de variance. Ce qui implique un examen visuel préliminaire de la courbe étalon. C'est pourquoi, la méthode proposée requiert un esprit critique pour son interprétation. De toute façon, il est indispensable, comme préalable, de réaliser une illustration graphique des résultats pour évaluer si un test est nécessaire ou non [Feinberg].

- **Limite de linéarité (LL) :** La limite de linéarité est le plus haut niveau fiable de mesure qu'on puisse utiliser en tenant compte de tous les facteurs à considérer dans une méthode. L'étendue de concentration des étalons qui se situe entre la LQM et la LL est la zone quantifiable utilisée dans

une méthode d'analyse. Le coefficient de corrélation ou de détermination doit être supérieur à 0,995 pour respecter le critère de la limite de linéarité [CEAEQ]_a.

II.2.1.6 Limite de détection (LDM) et de quantification d'une méthode (LQM)

a) Limite de détection d'une méthode (LDM)

Cette notion peut être définie comme étant la concentration la plus faible d'analyte qui donne un pic pouvant être distingué du signal blanc (c'est à dire du spectre pour un échantillon contenant une concentration de l'analyte) avec un niveau de confiance raisonnable. Des différentes façons de comprendre exactement des expressions de « confiance raisonnable » et « signal du blanc » sont à l'origine de définition divergente de la limite de détection [Mendham].

Une façon simple qui est souvent proposée pour calculer la LQM consiste à partir du modèle d'étalonnage, dans le cas où celui-ci est linéaire. Si le modèle d'étalonnage n'est pas linéaire, cette méthode doit être adaptée. Pour tenir compte des deux risques d'erreur introduits dans la définition, l'habitude consiste à définir un niveau critique (NC) comme la plus petite concentration à partir de laquelle on a un risque α de déclarer que l'analyte est présente alors qu'il est absent. Ensuite, la LDM est calculée en tenant compte du risque β qui consiste à déclarer que l'analyte est absent alors qu'il est présent [Feinberg].

Si on considère la partie inférieure d'une droite d'étalonnage, elle coupe l'axe de Y en Y_{a_0} ce qui correspond au blanc. En ce point, on peut dessiner la fonction de probabilité du blanc : rappelons que le coefficient Y_{a_0} n'est pas une constante mais une variable aléatoire. Pour simplifier les choses et en partant de l'idée qu'on a utilisé un grand nombre de mesures pour estimer Y_{a_0} , on va supposer que c'est une loi normale centrée sur Y_B et l'écart type S_{a_0} . On peut ainsi calculer une valeur seuil au-delà de laquelle on risque d'interpréter une réponse comme n'étant plus du blanc alors que c'est bien le blanc qui est mesuré. Si on appelle α ce risque, on définit la réponse instrumentale au niveau critique [Feinberg] :

$$Y_{NC} = Y_{a_0} + u_{1-\alpha} * S_{a_0} \quad \text{II.31}$$

NC : niveau critique.

Y_{a_0} : la moyenne de blanc.

S_{a_0} : l'écart type du blanc.

Dans cette formule $u_{1-\alpha}$ est le quantile d'une loi normale centrée réduite .On peut facilement voir que si $\alpha=5\%$, alors $u_{1-\alpha} = 1,645$. La formule de l'écart type du blanc est fournie par l'équation II.17. Pratiquement ce mode de calcul du recherche NC revient à faire un test d'égalité entre la valeur de Y_{NC} et le blanc Y_{a_0} puis à rechercher la valeur critique à partir de laquelle on rejeterait l'hypothèse, au niveau de confiance $1-\alpha$. Il s'agit d'un test unilatéral car on ne s'intéresse qu'aux valeurs de la réponse supérieures au blanc [Feinberg].

Pour définir la LDM, on va considérer un échantillon dont la concentration vraie serait exactement égale au niveau critique. On peut alors définir la loi de probabilité des réponses qu'on obtient en analysant cet échantillon on peut aussi supposer une loi normale mais il n'y a de raison de considérer que son écart type est égal à celui du blanc .c'est pourquoi il est noté S_{ech} , mais, comme pour les raisons pratiques que nous avons soulignés, on ne dispose pas un tel échantillon, on va supposer que S_{ech} est égal à S_{a_0} . Alors que cet échantillon n'est pas un blanc et contient effectivement l'analyte, il y a un risque β que certaines mesures soient si basses qu'on conclurait à du blanc. En utilisant les notations proposées, la formule de calcul de la réponse à la LDM est alors [Feinberg] :

$$Y_{LDM} - Y_{NC} + u_{1-\beta} * S_{a_0} - Y_{a_0} + (u_{1-\alpha} + u_{1-\beta})S_{a_0} \quad \text{II.32}$$

Avec Y_{LDM} : la réponse à la LDM.

Cependant, les valeurs Y_{NC} ou Y_{LDM} sont exprimées dans les mêmes unités que la réponse alors que ces critères sont supposés être exprimés comme une concentration .Il faut donc les diviser par la sensibilité a_1 [Feinberg].

$$LDM = Z_{LDM} = \frac{Y_{LDM}-Y_{a_0}}{a_1} = \frac{Y_{a_0}+(u_{1-\alpha}+u_{1-\beta})S_{a_0}-Y_{a_0}}{a_1} = \frac{(u_{1-\alpha}+u_{1-\beta})S_{a_0}}{a_1} \quad \text{II.33}$$

De même pour NC :

$$NC = Z_{NC} = \frac{Z_{NC}-Y_{a_0}}{a_1} = \frac{Y_{a_0}+(u_{1-\alpha}S_{a_0})-Y_{a_0}}{a_1} = \frac{(u_{1-\alpha}S_{a_0})}{a_1} \quad \text{II.34}$$

Avec Z_{LDM} : la concentration correspondant à la LDM.

α_1 : La sensibilité de la méthode.

Z_{NC} : La concentration correspondant au niveau critique (NC).

Le fait de revenir à la concentration prédite inverse supprime le coefficient Y_{a_0} , mais cela veut dire qu'il faudra toujours tenir compte du même blanc lorsqu'on prédira en routine des concentrations, sinon on pourrait retrouver des valeurs inférieures à la LDM. C'est pourquoi, il peut être intéressant de vérifier si le blanc est statiquement nul afin de ne pas avoir de mauvaises surprises comme cela arrive dans la recherche de trace, par exemple, où le blanc dû aux réactifs est souvent élevé et variable.

Si on prend $\beta=\alpha=5\%$, les formules de calcul du NC et de la LDM se simplifient [Feinberg] :

$$NC = 1,65 * \frac{S_{a_0}}{\alpha_1} \quad \text{II.35}$$

$$LDM = 3,3 * \frac{S_{a_0}}{\alpha_1} = 2 * NC \quad \text{II.36}$$

b) Limite de quantification d'une méthode (LQM)

C'est la Quantité la plus faible d'analyte dans un échantillon qui peut être déterminée quantitativement avec une fidélité et une exactitude appropriée [Blanchin].

La LQM est généralement définie empiriquement, comme un multiple écart type à définir (écart type d'un blanc, écart type de reproductibilité, etc.). Cependant, quelques soit la méthode employée rare sont les situations qui satisfassent les analystes, entre leurs ressenti et le résultat du calcul.

Nous proposerons une méthode de calcul de la limite de quantification, elle est aussi empirique, mais qui essaye de mieux tenir compte de l'intuition des analystes. Généralement, on l'a prend comme la limite de détection avec $n=10$ [Feinberg].

$$LQM = 10 * \frac{S_{a_0}}{a_1}$$

II.37

Mais c'est juste une convention, d'autres existent.

II.2.2 Justesse

La justesse est définie comme étant l'étroitesse de l'accord entre la moyenne d'un nombre infini de valeurs mesurées répétées et une valeur de référence.

L'estimation de la justesse implique obligatoirement qu'on est capable de définir une valeur de référence définie comme « valeur d'une grandeur, dont l'incertitude de mesure associée est considérée communément comme suffisamment petite pour que la valeur puisse servir de base de comparaison pour les valeurs de grandeurs de même nature », par analogie avec les modèles proposés par les statisticiens ; nous utiliserons aussi le terme de valeur cible. On notera de ce qui suit v_o la valeur de référence du mesurande et la moyenne arithmétique de mesurages répétés sur ce même échantillon noté par v_s [Feinberg].

La justesse se mesure, à un niveau donné de concentration, dans la zone quantifiable pratique de la méthode. Elle s'exprime par l'erreur relative ou biais relatif [CEAEQ]a.

La justesse peut alors s'exprimer de différentes façons. Les trois critères présentés ici sont classiques, même s'ils ne mesurent pas la justesse mais des défauts de justesse [Feinberg].

$$B = v_s - v_o$$

II.38

B : biais absolu.

$$B\% = \left(\frac{v_o - v_s}{v_s} \right) * 100$$

II.39

B% : biais relatif.

$$\text{Justesse}(\%) = 100 - |\text{biais relatif}(\%)|$$

II.40

v_s : valeur cible.

v_o : la moyenne des réplicats [CEAEQ]a.

calculer l'écart-type de répétabilité, noté S_r , et l'écart-type de reproductibilité, noté S_R . Rappelons que le calcul d'un écart-type passe toujours par une étape préliminaire de calcul d'une variance.

Mais, outre ces deux ensembles de conditions extrêmes, il existe aussi d'autres conditions extrêmes, il existe aussi d'autres conditions de mesure dites :

- **Condition intermédiaire de fidélité ou reproductibilité interne** : lorsque le mesurage s'effectue selon 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. On obtient ainsi un écart-type de reproductibilité interne, noté S_R ou S_{FI} .

Comme on l'a vu, les conditions de fidélité intermédiaire consistent à réaliser des mesurages répétés sur l'échantillon en appliquant la même procédure opératoire dans le même lieu mais sur une période de temps qui peut être étendue ou en faisant varier d'autres conditions, comme les opérateurs, les réglages instrumentaux, etc. Ce sont donc des conditions typiquement mises en œuvre lors d'une validation interne .Par exemple, l'étude de la robustesse d'une méthode à l'aide d'un plan expérience est un exemple de répétitions effectuées en conditions de fidélité intermédiaire [Feinberg].

II.2.3.1 Calcul de la répétabilité et de la reproductibilité interne

Les deux termes précédents se rapportant à la fidélité s'expriment à l'aide d'un intervalle de confiance à une concentration donnée, en fonction de l'écart type ($s(n)$), à un niveau de confiance spécifié et pour un nombre donné de déterminations (n répliqués). Le niveau de confiance habituellement retenu est de 95 %.

L'intervalle de confiance bilatéral de la moyenne arithmétique d'une série de mesures à un niveau de confiance de 95 % est défini par la double inégalité suivante :

$$\bar{x} \pm \frac{t_{(0,975;n-1)} * S(n)}{\sqrt{n}} \quad (\text{ II.41 })$$

$S(n)$:

$\frac{n}{\sqrt{n}} = t_{(0,975;n-1)}$: *test* t student pour une IC de confiance de 95%.

Lorsque $n \geq 30$, $t(0,975 ; n-1) = 2$. Pour $n < 30$, il faut se référer à une table statistique de la distribution de student pour connaître la valeur de $t(0,975 ; n-1)$ correspondant à la probabilité au dépassement bilatéral.

En pratique, la répétabilité et la reproductibilité interne s'effectuent de la façon suivante : Dans la zone quantifiable de la méthode, choisir une concentration d'un échantillon et faire n réplicas. Chaque échantillon doit subir toutes les étapes de la méthode d'analyse en respectant les conditions spécifiées à l'égard de la répétabilité et la reproductibilité interne (analyste, appareil, jour et laboratoire). Faire l'ensemble des calculs liés à la méthode et reporter les résultats en utilisant les unités appropriées et le nombre de chiffres significatifs nécessaire [CEAEQ].

II.2.3.2 Autres critères dérivés

a) Limite de répétabilité et de reproductibilité interne

Une fois le calcul des critères de fidélité réalisés selon la méthode décrite précédemment, il reste encore à interpréter les valeurs obtenues. Une première question pratique consiste à calculer à partir des écarts types des différentes maximales « limites » qu'on est en droit d'attendre lorsque des répétitions sont effectuées avec la méthode. Selon qu'on s'intéresse à la répétabilité ou à la reproductibilité, on définit comme suit ces valeurs limites :

- **La limite de répétabilité ou répétabilité « noté r »** qui est l'écart maximal au niveau de confiance de 95% entre deux résultats obtenus, pour une même méthode, par un même opérateur travaillant sur le même appareillage, dans un délai court, c'est à dire selon les conditions de répétabilité [Feinberg].

$$r = \frac{t_{(0,975;n-1)} * S_r}{\sqrt{n}} \quad (II.42)$$

r : limite de répétabilité.

S_r : écart type de répétabilité [CEAEQ].

- **La limite de reproductibilité interne ou reproductibilité interne « noté R_I »** qui est l'écart maximum au niveau de confiance de 95% entre deux résultats obtenues sur un échantillon commun par deux opérateurs ou deux laboratoires différents, sur des appareils différents, parfois

selon des méthodes d'analyses différentes ,c'est à dire selon les conditions de reproductibilité [Feinberg].

$$R_I = \frac{t_{(0,975;n-1)} * S_R}{\sqrt{n}} \quad \text{II.43}$$

R_I : limite de reproductibilité interne.

S_R : écart type de reproductibilité interne [CEAEQ]a.

II.2.3.3 Signification d'un coefficient de variation (CV)

Il existe des documents qui fixent des exigences sur la reproductibilité ou la répétabilité. Généralement, elles sont exprimées comme une valeur seuil pour le coefficient de variation, par exemple $CV_R < 15\%$.

Le coefficient de variation de la reproductibilité pour une analyse inter-laboratoire donnée, exprime en %, est égal à :

$$CV_R = 100 * \frac{S_R}{\bar{x}} \quad \text{II.44}$$

CV_R : Coefficient de variation de la reproductibilité interne.

En ce qui concerne la répétabilité, le coefficient de variation est défini par :

$$CV_r = 100 * \frac{S_r}{\bar{x}} \quad \text{II.45}$$

CV_r : Coefficient de variation de la répétabilité.

Comme l'indiquent les formules, le CV est l'écart-type ramené à la moyenne, c'est à dire qu'il mesure le nombre de fois où on trouve l'écart-type dans la moyenne. Ainsi par exemple un CV de 100% veut dire que la moyenne et l'écart-type sont égaux.

Le CV permet de plus à exprimer la variabilité d'une méthode. On y trouve plusieurs avantages :

- Il est facile à calculer ;
- Il permet de comparer facilement deux méthodes qui n'auraient pas été appliquées sur un même échantillon sans tenir compte des niveaux de concentrations ;
- Il permet d'ajouter des sources de variation [**Feinberg**].

Pour valider une méthode, il faut que les CV dans des conditions de fidélité intermédiaire soient inférieurs à une valeur de tolérance 10 % et pour qu'une méthode est une bonne répétabilité il faut que le CV soit inférieure à 5% [**Mayor**].

II.2.4 Interférences

L'interférence peut intervenir lorsqu'un composant est en forte concentration (cas d'un médicament, de la concentration en bilirubine, en triglycérides, de l'hémolyse...), ce qui a pour effet d'interférer sur le résultat du dosage de l'analyte. Le résultat peut ainsi être inexact [**Wikipédia**].

Les principales interférences sont les sulfures, les chlorures, les ions ferriques, les ions phosphates et les ions nitrates [**CEAEQ**]_b.

II.3 CONCLUSION

En définitive, nous pouvons dire que la validation d'une méthode d'analyse nécessite le calcul de plusieurs critères en tenant compte de leurs limites d'acceptabilité.

PARTIE EXPERIMENTALE



**CHAPITRE III :
MATERIELS ET
METHODES**

III.1 INTRODUCTION

Les critères de validation de la méthode de Zambelli sont déterminés à l'aide des analyses spécifiques. D'où l'objectif principal de ce chapitre, la description du matériel utilisé et les techniques d'analyses du dosage des nitrites.

III.2 Description de la méthode de Zambelli

Quel que soit la solution concernée par le dosage des ions nitrites, nous avons suivi généralement le même protocole expérimental.

→ Pour une solution de 50ml contenant des nitrites nous lui avons ajouté 2mL du réactif de Zambelli, on a agité et laissé reposer pendant 10min. Puis 2mL d'ammoniaque pur ont été ajoutés. Enfin on a mesuré l'absorbance de cette solution au spectrophotomètre visible à une longueur d'onde adéquate.

III.3 Principe de la méthode

L'acide sulfanilique, en milieu acide en présence d'ion ammonium et de phénol, forme avec les ions NO_2^- un complexe coloré jaune dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en nitrites susceptible d'un dosage spectrophotométrique.

L'ensemble des réactifs révélateurs de la coloration jaune de l'échantillon d'eau contenant des nitrites est appelé réactif de Zambelli [Hakmi].

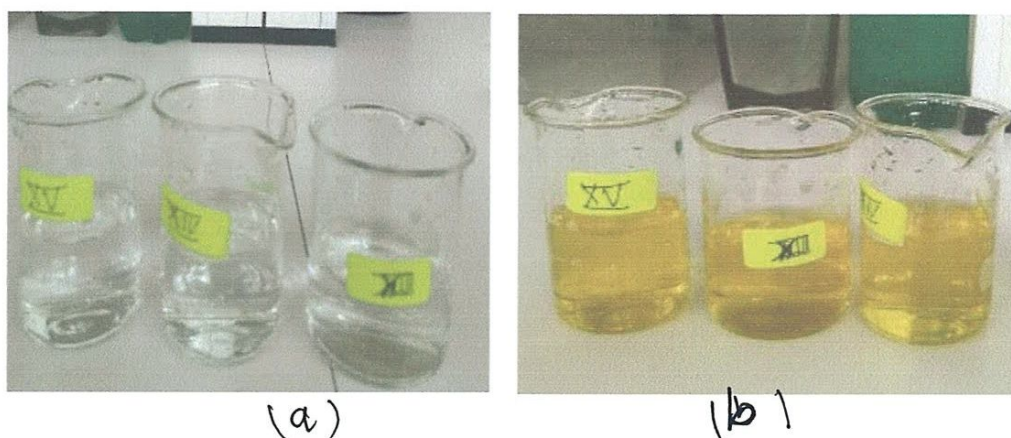


Figure III. 1: Coloration jaune indicatrice de la présence des nitrites dans l'eau.

III.4 Matériel utilisé

Le matériel de mesure utilisé est le spectrophotomètre de marque photolab spektral – WTW, figure III.2.

a) Fonctionnement de l'appareil

La longueur d'onde dans le domaine visible s'étend de 400 nm-800 nm. La source lumineuse émet une lumière polychromatique (lumière blanche) où le monochromateur permet de sélectionner une longueur d'onde et les autres longueurs d'onde sont dispersées par un jeu de fentes et miroirs. Le rayon lumineux devient monochromatique.

Le rayon monochromatique traverse la cuve en verre de lecture dans laquelle se trouve la solution contenant le composé à doser. Une partie du rayon est absorbée par la solution. Le reste continue son chemin jusqu'à un photodétecteur relié à un système électronique permettant de l'amplifier (photomultiplicateur) et de le quantifier. Ensuite s'affiche la valeur de l'absorbance correspondant à l'échantillon.



Figure III. 2: Photolab spektral-WTW.

III.5 Préparation du réactif de Zambelli

La composition du réactif de Zambelli est regroupée dans le tableau ci-dessous [Cherrah] :

Tableau III. 1: Les différents composants du réactif de Zambelli.

Composé chimique	Quantité correspondante
HCl pur (d = 1,19)	260 mL
Acide sulfanilique	5g
Phénol cristallisé	7,5g
Chlorure d'ammonium	135g
Eau distillée (exempte de NO ₂ ⁻)	625 mL

Dans une fiole jaugée de 1000 mL, nous avons introduit l'eau distillée et l'acide chlorhydrique. D'un autre côté, l'acide sulfanilique et le phénol ont été dissous en chauffant légèrement au bain- marie jusqu'à dissolution complète puis versé dans la fiole. Le chlorure d'ammonium a été ajouté en dernier. Après refroidissement, le volume a été ajusté à un litre avec de l'eau distillée.

III.6 Préparation des solutions mère et filles des nitrites

Tous les critères concernés par notre étude vont être déterminés en utilisant des solutions de nitrite de concentrations connues. Pour cela, nous avons préparé une solution mère à partir de laquelle nous avons préparé des solutions filles.

• Solution mère étalon à 0,23g/L de NO₂⁻

Nous avons pesé 0,345g de nitrite de sodium qui ont été ensuite versé dans la fiole jaugée de 1000mL et ajusté le volume à 1000mL avec l'eau distillée.

• Solution fille étalon (S₁) à 0,0023g/L de NO₂⁻

Nous avons amené 5 mL de la solution mère à 500mL avec de l'eau distillée.

• Solution fille étalon (S₂) à 0,023g/L de NO₂⁻

Nous avons amené 25 mL de la solution mère à 250 mL avec de l'eau distillée.

III.7 Détermination de la longueur d'onde maximale (λ_{\max})

Pour cette analyse nous avons choisi une solution de concentration 1,84mg/L en nitrite. Nous avons suivi le protocole décrit ci-haut pour la détermination de la longueur d'onde optimale et qui sera utilisé dans la suite de ce travail.

Nous avons varié la longueur d'onde appliquée par le spectrophotomètre dans le domaine du visible (400-750 nm) selon le tableau III.2. Nous avons resserré les points de mesure dans le domaine de longueur d'onde maximale attendue.

Tableau III. 2: Différentes longueurs d'onde utilisées pour la détermination de λ_{\max} .

Longueur d'onde (nm)	400	410	420	430	435	440	470	500	600	700	750
----------------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

III.8 Stabilité de la couleur

Nous avons utilisé pour cette analyse une solution aqueuse de concentration 0,046 mg/L de nitrite. Nous avons suivi le protocole décrit ci-haut pour la détermination de la stabilité de la couleur.

En effet, nous avons mesuré l'absorbance en fonction du temps qui s'étend de 2 minutes à 13 jours. La réponse du spectrophotomètre en fonction du temps permet de déterminer si oui ou non la solution à doser est stable et pour combien de temps. Une variation significative de l'absorbance de la solution par rapport aux premières minutes qui ont suivi le mélange du réactif de Zambelli permettrait de limiter le temps au bout duquel cette solution n'est plus stable.

III.9 Critères de validation

III.9.1 Construction de la courbe d'étalonnage (linéarité)

Afin de déterminer le domaine de linéarité, nous avons procédé à des dilutions à partir d'une solution mère de concentration 0,23g/L de nitrites pour obtenir des solutions filles de nitrites de concentrations croissantes auxquelles nous avons effectué les analyses au spectrophotomètre à la longueur d'onde 435 nm. La lecture des absorbances de ces solutions étalons permettra la construction de la courbe d'étalonnage.

La préparation des solutions étalons a été réalisée en utilisant les données des tableaux III.3 et III.4.

Tableau III. 3: Préparation des solutions étalons pour le dosage des nitrites à partir de la solution S1.

Numéro des béchers	Volume de S ₁ (mL)	Eau distillée (mL)	Réactif de Zambelli (mL)		Ammoniaque Pur NH ₃ (mL)	mg/L de NO ₂ ⁻
T	0	50	2	Attendre 10 min	2	0
I	0,1	49,9	2		2	0,0046
II	0,2	49,8	2		2	0,0092
III	0,4	49,6	2		2	0,0184
IV	0,6	49,4	2		2	0,0276
V	0,8	49,2	2		2	0,0368
VI	1	49	2		2	0,046
VII	3	47	2		2	0,138
VIII	5	45	2		2	0,23
IX	10	40	2		2	0,46
X	15	35	2		2	0,69
XI	20	30	2		2	0,92
XII	25	25	2		2	1,15
XIII	30	20	2		2	1,38
XIV	35	15	2		2	1,61
XV	40	10	2		2	1,84
XVI	45	5	2		2	2,07
XVII	50	0	2	2	2,3	

Tableau III. 4: Préparation des solutions étalons pour le dosage des nitrites à partir de la solution S₂.

Numéros des béchers	XVIII	XIX	XX	XXI	XXII	XXIII	XXIV	XXV	XXVI	XXVII
Solution étalon a 0,023g/L (mL)	0,5	1	7	9	10	15	20	30	40	50
Eau distillée (mL)	49,5	49	43	41	40	35	30	20	10	0
Réactif de Zambelli (mL)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Attendre 10 min										
Ammoniaque pur (mL)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
mg/L de NO ₂ ⁻	0,23	0,46	3,22	4,14	4,6	6,9	9,2	13,8	18,4	23

Il est à noter que pour une prise d'essai de 50 mL, la courbe donne directement la teneur en nitrite (NO₂⁻), exprimée en milligrammes par litre d'eau.

III.9.2 Justesse et répétabilité

Dans cette étude nous avons choisi trois concentrations dans le domaine de linéarité à savoir : 0,92 mg/L ; 1,15 mg/L et 2,07 mg/L, auxquelles nous avons effectué pour chaque concentration neuf à dix répétitions. Nous avons suivi le protocole décrit ci- haut pour les mesures de la justesse et de la répétabilité.

III.9.3 Reproductibilité

Dans cette étude nous avons choisi trois concentrations dans le domaine de linéarité à savoir : 0,92 mg/L ; 1,15 mg/L et 2,07 mg/L auxquelles nous avons effectué neuf répétitions pour chaque concentration pendant 3 jours. Le mode opératoire décrit dans la section III.2 a été également suivi ici pour la détermination de la reproductibilité.

III.9.4 Étude des interférences de quelques ions sur le dosage des nitrites

Cette étude a été réalisée en utilisant les concentrations 0,92 ; 1,84 et 4,14 mg de NO₂⁻/L. Les différentes substances chimiques susceptibles d'interférer dans le dosage des nitrites ~~Et nous avons étudié~~ sont : les ions phosphates, les ions nitrates et les chlorures.

III.10.2 Dosage des nitrites dans le pâté au fromage Bellat

Parmi les marques de pâtés disponibles dans le commerce ; nous avons choisi de mesurer la teneur en ion nitrite dans le pâté de marque Bellat sur lequel était affichée en clair la teneur de nitrite de sodium qui est de 0,6%.

a) Principe du dosage

On extrait les ions nitrite NO_2^- du pâté par l'eau bouillante à reflux. On ajoute ensuite une solution d'hexacyanoferrate de potassium ($\text{K}_4\text{FeCN}_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) et une solution d'éthanoate de zinc afin de faire précipiter toutes les substances qui peuvent troubler la solution (cette clarification s'appelle en langage technique une "défécation"). Les ions nitrite réagissent ensuite avec le réactif de Zambelli pour donner un produit coloré jaune qui peut être dosé par spectrophotométrie visible. Des solutions extractives ont été préparées afin de les utiliser selon un protocole préétabli [Discamps].

b) Préparation des solutions extractives

- **Solution de borax saturée**

5,1 g de borax ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) ont été pesé et dilués dans une fiole de 100 mL contenant de l'eau distillée.

- **Solution d'hexacyanoferrate de potassium**

5,3 g d'hexacyanoferrate de potassium ($\text{K}_4\text{FeCN}_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) ont été pesé puis dissout dans 100 mL d'eau distillée dans une fiole jaugée.

- **Solution d'éthanoate de zinc**

Dans une fiole de 50 mL, nous avons introduit un peu d'eau distillée et l'acide éthanoïque cristallisable (CH_3COOH). Puis nous avons pesé 11 g d'acétate de zinc déshydraté ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4\text{Zn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) que nous avons ajouté dans la fiole, le volume a été ajusté avec de l'eau distillée à 50 mL.

c) Manipulation

Pour le dosage des ions nitrites dans le pâté, nous avons procédé selon les étapes suivantes :

-On pèse avec précision environ 25 g du pâté que l'on introduit dans un ballon de 100 mL (figure III.3) ;

-On ajoute 5 mL de solution de borax saturée et 50 mL d'eau distillée à température $>70^\circ\text{C}$;

-On chauffe au bain marie bouillant, à reflux, sous agitation pendant 15 minutes ;

- On laisse refroidir ;
- On transvase le contenu du ballon dans la fiole jaugée de 250 mL ;
- On ajoute 2 mL de la solution d'hexacyanoferrate de potassium puis 2 mL de solution d'éthanoate de zinc puis 50 mL d'eau distillée ;
- On agite fortement ;
- On laisse reposer une demi-heure ;
- On complète au trait de jauge avec de l'eau distillée ;
- On filtre et la solution obtenue est appelée F.

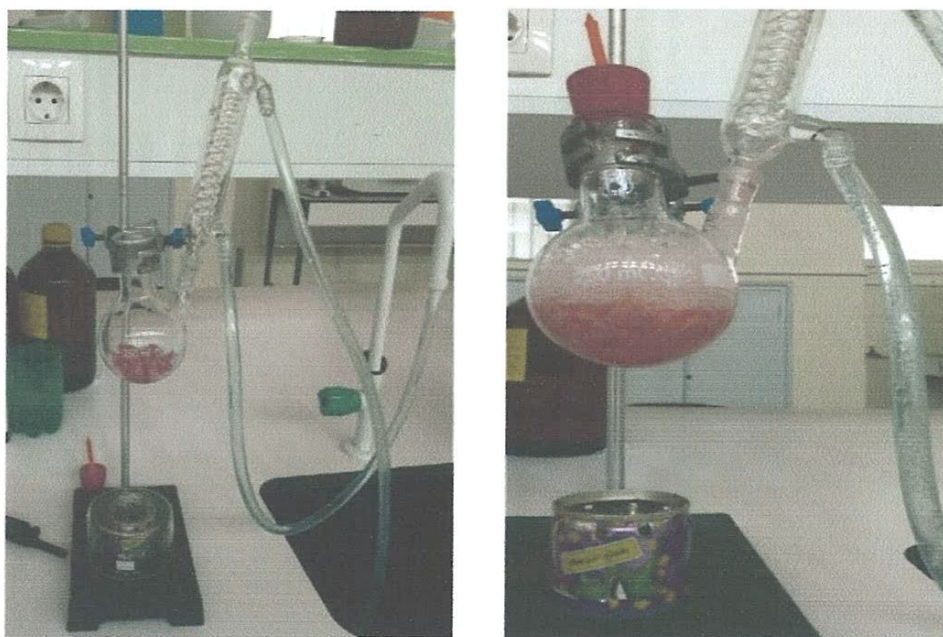


Figure III. 3: Extraction des ions nitrites dans le pâté.

• **Mode opératoire**

A partir de la solution F, on a élaboré une solution de concentration différente réalisée par dilution comme suit : 10 mL de solution F qu'on a amené à 50 mL avec de l'eau distillée. Ensuite on a ajouté 2 mL du réactif de Zambelli dans l'échantillon puis après agitation on a attendu 10 minutes pour

enfin verser dans l'échantillon 2 mL d'ammoniaque pur. La lecture a été effectuée au spectrophotomètre à la longueur d'onde $\lambda=435$ nm.

III.3 CONCLUSION

Dans ce chapitre, nous avons décrit en détails les différents protocoles et techniques expérimentales d'analyse des différents critères pour la validation de la méthode de Zambelli ainsi que l'application de la méthode pour le dosage des ions nitrites dans une eau minérale ainsi que dans un pâté du commerce.

IV.2.3 Critères de validation

Les critères de validation de la méthode de dosage des nitrites que nous avons étudié sont comme suit :

IV.2.3.1 Construction de la courbe d'étalonnage (linéarité)

Nous avons procédé à la détermination du domaine de linéarité. A partir d'une solution mère de concentration $C_2=0,23$ g/L, nous avons procédé à des dilutions pour obtenir des solutions filles de nitrites de concentrations croissantes auxquelles nous avons effectué les analyses au spectrophotomètre à la longueur d'onde 435 nm pour la détermination de la limite de linéarité. Par la suite, nous avons construit la courbe d'étalonnage à partir des concentrations se trouvant dans le domaine de linéarité ainsi trouvé.

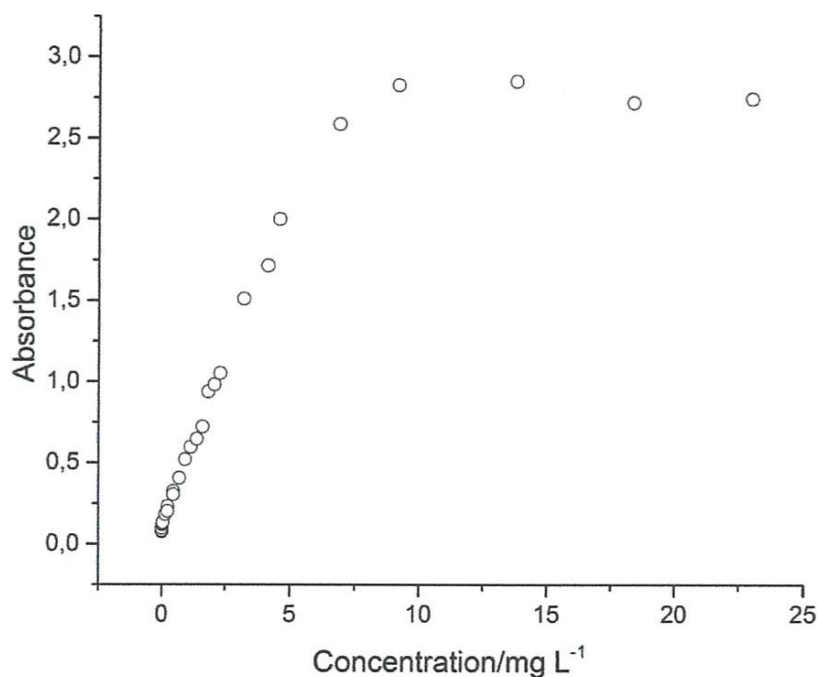


Figure IV. 3: Variation de l'absorbance des ions nitrites en fonction de la concentration.

On constate qu'à partir de la concentration $C=0$ mg/L jusqu'à $C=4,6$ mg/L que la droite reliant les absorbances aux concentrations est linéaire. Ensuite elle dévie de la courbe linéaire à partir de $6,9$ mg/L où elle ne demeure plus linéaire.

On déduit que la limite de linéarité est de $4,6$ mg/L, point à partir duquel la courbe commence à dévier de la linéarité.

Pour la partie linéaire, nous avons utilisé Microsoft Excel® pour déterminer l'équation de la droite ainsi que le coefficient de corrélation. Les résultats sont reportés dans la figure ci-dessous.

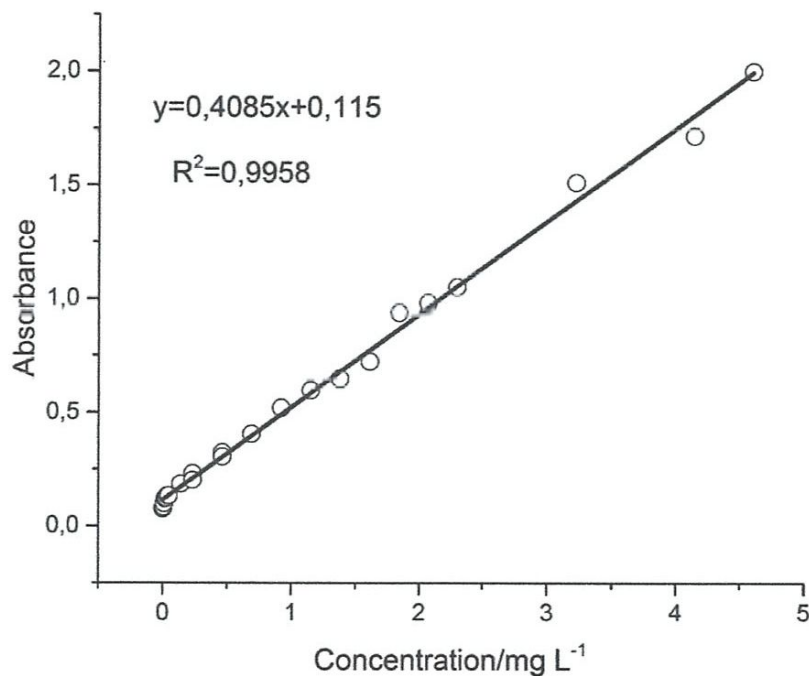


Figure IV. 4: Courbe d'étalonnage linéaire.

La figure IV.4 montre que les résultats du dosage sont proportionnels à la concentration. Le coefficient de corrélation obtenu (0,9958) est supérieur à celui attendu ($\geq 0,9950$) ce qui respecte le critère d'acceptation de la linéarité. La sensibilité est de $0,4085$ Abs/mg/L. Les autres critères : équation de la droite, coefficient de corrélation, sensibilité, zone quantifiable, zone semi-

quantifiable, zone non quantifiable, limite de linéarité extraits de cette droite en utilisant les calculs présentés dans le chapitre précédent sont regroupés dans le tableau ci-dessous (tableau IV.1).

On peut conclure que le domaine de linéarité débute à partir du blanc jusqu'à la concentration $C=4,6$ mg/L. Les autres critères de validation seront déterminés par la suite en utilisant les concentrations se trouvant dans ce domaine.

Tableau IV. 1: Fonction de linéarité.

Équation de la droite	$y = 0,4085 x + 0,115$
R²	0,9958
Sensibilité	0,4085
Zone quantifiable	[0,107 - 4,6]
Zone semi-quantifiable	[0,03 - 0,107]
Zone non quantifiable	<0,03
Limite de linéarité	4,6mg /L

IV.2.3.2 La justesse

La justesse a été étudiée pour trois concentrations en nitrites, à savoir ; 0,46 ; 1,15 et 2,07 mg de NO_2/L (tableau IV.2). Ces concentrations ont été choisies car elles sont incluses dans la droite de la courbe d'étalonnage et représentent la plupart des autres points de par leur dispersion. Nous avons utilisé dix répliquats ($n=10$) pour chaque concentration dans les mêmes conditions de répétabilité.

Tableau IV. 2: Récapitulatif des résultats relatifs à la mesure de la justesse.

Concentration (mg/L)	0,46	1,15	2,07
Moyenne	0,4438	1,1343	2
Écart type	0,0322	0,0492	0,0962
Vo	0,4438	1,1343	2
Vs	0,46	1,15	2,07
B%	-3,52%	-1,73%	-3,38%
Justesse %	96,48%	98,27%	96,62%

On note que toutes les erreurs relatives sont négatives ce qui signifie que la méthode surestime les concentrations. Les justesses obtenues sont de l'ordre de 96,48% ; 98,27% et 96,62% se trouvant dans l'intervalle [90-110]. On se fixe une limite d'acceptabilité ici, de 10 %, [Feinberg].

Ainsi, nous pouvons conclure que les justesses calculées sont bonnes.

IV.2.3.3 La répétabilité

Nous avons effectués les analyses pour la répétabilité en utilisant trois concentrations 0,46 ; 1,15 et 2,07 mg de NO₂/L (tableau IV.3). Nous avons utilisé de neuf à dix réplicats pour chaque concentration.

Tableau IV. 3: Récapitulatif des résultats relatifs à la mesure de la répétabilité.

Concentration	0,46	1,15	2,07
Moyenne	0,4438	1,1343	2
Écart type	0,0322	0,0492	0,0962
CV(%)	7,2759	4,3429	4,8110
n	10	10	9
Racine (n)	3,16	3,16	3
I.C	[0,42 ; 0,466]	[1,09 ; 1,17]	[1,926 ; 2,073]
r	0,0231	0,0352	0,0739

Toutes les valeurs des coefficients de variation sont inférieures à 5% sauf celle de la concentration 0,46mg/L. La limite de répétabilité (r) est de : 0,0231 (0,46 mg de NO_2/L), 0,0352 (1,15 mg de NO_2/L) et 0,0739 (2,07 mg de NO_2/L). La valeur admise dans notre protocole est de 10 % [Feinberg]. Comme nous l'avons mentionné dans le chapitre II, pour qu'une méthode ait une bonne répétabilité il faut que la limite de répétabilité soit inférieure à 5%.

Nous pouvons dire que la méthode a une bonne répétabilité notamment pour les concentrations 1,15 et 2,07 mg/L. Cependant, la répétabilité est moins bonne pour la concentration en nitrites $C = 0,46$ mg/L. En effet, $r > 5\%$. Un résultat similaire a été trouvé par les auteurs [El Ouchy] où leur méthode de dosage des nitrites n'a de bonne répétabilité que pour les grandes concentrations.

IV.2.3.4 La reproductibilité

Les concentrations utilisées pour l'étude de la reproductibilité sont 0,46 ; 1,15 et 2,07 mg de NO_2/L . Dans ce travail, nous n'avons pas eu l'opportunité de faire analyser nos échantillons dans d'autres laboratoires, c'est ainsi que nous n'avons effectué que les analyses en rapport avec la reproductibilité interne. Le tableau ci-dessous récapitule l'ensemble des résultats en rapport avec la reproductibilité.

Tableau IV. 4: Récapitulatif des résultats relatifs à la mesure de la reproductibilité interne.

Concentration (mg NO_2/l)	0,46	1,15	2,07
Moyenne	0,4580	1,1799	2,0892
Écart type	0,0379	0,0444	0,1449
CV%	8,2900	3,7660	6,9379
n	9	9	9
Racine (n)	3	3	3
t (student)	2,306	2,306	2,306
I.C	[0,421 ; 0,487]	[1,145 ; 1,213]	[1,978 ; 2,2]
R_I	0,0291	0,0341	0,1114

Les valeurs des coefficients de variation sont toutes inférieures à 10 %, seuil au-dessous duquel la reproductibilité des résultats est considérée comme bonne et leur limite de reproductibilité (R) est de : 0,0291 (0,46 mg de NO₂/L), 0,0341 (1,15 mg de NO₂/L) et 0,1114 (2,07 mg de NO₂/L).

Nous pouvons conclure que cette méthode est reproductible.

IV.2.3.5 Limite de détection (LDM) et de quantification (LQM)

→ La limite de détection est déterminée à partir de la courbe d'étalonnage linéaire à la longueur d'onde 435nm en utilisant l'écart-type du blanc Sa₀. L'Excel® permet tout aussi que Origine 8 permettent de fournir ces deux valeurs. Nous avons pris comme risque d'erreur de première et deuxième classe 5%.

Tableau IV. 5: LDM et LQM.

α, β	5%
U	1,6448
NC	0,0176
LDM	0,0352mg/L
LQM	0,1071mg/L
Pente	0,4085
Sa ₀	0,0043

Ainsi, la courbe d'étalonnage que nous avons construit a permis d'estimer la limite de détection à 0,0352 mg de NO₂/L et la limite de quantification à 0,1071 mg de NO₂ mg/L.

IV.2.3.6 Interférences

Les substances chimiques susceptibles d'inférer dans le dosage des nitrites [CEAEQ]_b sont : les chlorures (Cl), les nitrates (NO₃⁻) et les phosphates (PO₄⁻). En considérant les normes de chacune de ces substances dans l'eau potable, nous avons effectué le dosage de trois solutions de concentrations comprises dans le domaine de linéarité de nitrite 0,92 ; 1,84 et 4,14 mg de NO₂/L auxquelles nous avons ajouté trois différents teneurs en substances potentiellement interférentes. Les résultats sont regroupés dans les tableaux (IV.6)(IV.7)(IV.8.)

a) Cas des phosphates

La norme des phosphates dans les eaux potables est de 5 mg/L. Pour cela, nous avons ajouté des teneurs de 2,5 ; 5 et 10 mg/L dans trois échantillons contenant des concentrations en nitrites variant de 0,92 ; 1,84 ; 4,14. Les valeurs des teneurs en phosphates représentent une valeur correspondant à la moitié de la norme, la valeur correspondant à la norme et le double de la valeur admise par la norme de potabilité, respectivement. Le tableau ci-dessous et la figure IV.5 rassemblent les résultats relatifs à l'interférence des ions phosphates dans l'analyse des nitrites.

Tableau IV. 6: Interférences des phosphates.

Concentration réelle en NO ₂ ⁻ (mg/L)	Concentration ajoutée en PO ₄ ⁻ (mg/L)	Concentration retrouvée (mg/L)	Erreur relative (%)
0,92	2,5	1,05	+14,13
	5	0,936	+1,73
	10	1,002	+8,91
1,84	2,5	1,64	-10,86
	5	2,18	+18,47
	10	1,93	+4,89
4,14	2,5	4,07	-1,69
	5	4,43	+7
	10	4,37	+5,55

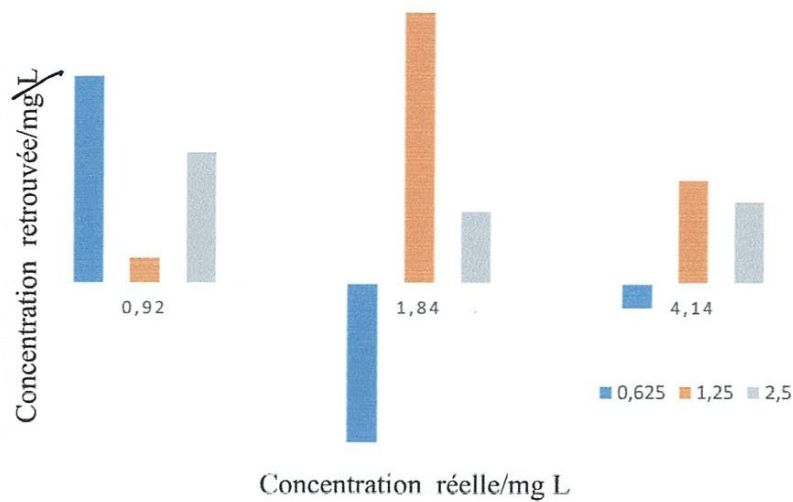


Figure IV. 5: Interférences des phosphates.

On remarque d'après les résultats obtenus qu'en général, l'influence des ions phosphates sur la mesure des teneurs en nitrites n'est pas énorme. D'un autre côté, on remarque que lorsque les teneurs de nitrites sont assez grandes, l'influence des ions phosphates devient négligeable. Les teneurs en nitrites dans les eaux potables étant, généralement, inférieures à 0,92 mg/L, on peut admettre que dans ce cas des teneurs au voisinage de la norme en phosphate n'influent quasiment pas sur la mesure des nitrites.

b) Cas des nitrates

La norme des nitrates dans les eaux potables est de 50 mg/L. Pour cela, nous avons ajouté des teneurs de 25 ; 50 et 100 mg/L dans trois échantillons contenant des concentrations en nitrites variant de 0,92 ; 1,84 ; 4,14. Les valeurs des teneurs en nitrates représentent une valeur correspondant à la moitié de la norme, la valeur correspondant à la norme et le double de la valeur admise par la norme de potabilité, respectivement. Le tableau ci-dessous et la figure IV.6 rassemblent les résultats relatifs à l'interférence des ions nitrates dans l'analyse des nitrites.

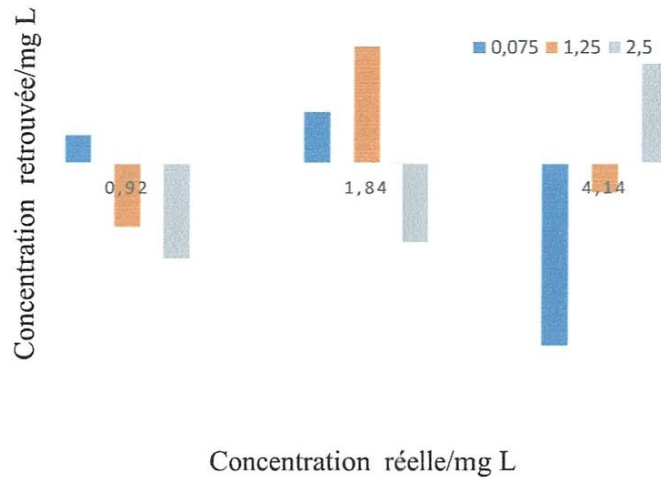


Figure IV. 7: Interférences des chlorures.

Comme dans le cas des deux autres ions, l'influence des chlorures est négligeable lorsque la teneur en nitrites est petite.

De manière générale, On peut dire que la présence des ions phosphates, nitrates et chlorures dans des proportions inférieures ou égales à celle de la norme de potabilité n'influe pas sur la mesure des nitrites par la méthode de Zambelli.

IV.2.4 Application de la méthode de Zambelli

Nous avons utilisé la méthode de Zambelli afin de déterminer la teneur en nitrite de deux échantillons dont la teneur est préalablement connue.

IV.2.4.1 Dosage des nitrites dans l'eau Ifri

Parmi les eaux embouteillées disponibles dans le commerce ; nous avons choisi de mesurer la concentration en ion nitrite dans l'eau minérale de marque Ifri car d'après l'étiquetage c'est celle qui contient la plus grande concentration en NO_2^- . Pour cela, nous avons analysé 50 mL d'eau Ifri en deux répliqués. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau IV.10.

Tableau IV. 9: Dosage des nitrites dans l'eau Ifri.

Absorbance	Concentration retrouvée (mg/L)
0,0935	-0,0526
0,087	-0,0685

Les concentrations calculées pour l'eau Ifri sont négatives, cela implique que la teneur en nitrites dans cette eau est en dessous de la valeur de la limite de détection de la méthode de Zambelli.

Effectivement, la limite de détection à laquelle nous sommes arrivés est 0,03 mg/L. La valeur affichée sur la bouteille est de <0,02 mg/L corrobore le résultat obtenu. On peut conclure que la valeur de l'étiquetage correspond bien à la teneur en nitrite dans cette eau.

IV.2.4.2 Dosage des nitrites dans le pâté au fromage Bellat

Parmi les marques de pâtés disponibles dans le commerce ; nous avons choisi de mesurer la teneur en ion nitrite dans le pâté de marque Bellat sur lequel était affiché en clair teneur de nitrite de sodium 0,6%. Nous avons suivi le protocole décrit dans la partie expérimentale.

En résumé, nous avons pesé 25 g de saucisson qu'on a mélangé à 50 ml de solution extractive. Le tout a été chauffé avec un dispositif à reflux puis filtrer. A partir du filtrat nous avons élaboré une solution de concentration différente réalisée par dilution comme suit : 10ml de filtrat qu'on a amené à 50 mL avec de l'eau distillée. Cette solution a été analysée au spectrophotomètre et les résultats sont regroupés dans le tableau ci-dessous.

Tableau IV. 10: Dosage des nitrites dans le pâté Bellat.

Concentration mesurée (g/L)	Concentration affichée (g/L)	Erreur relative (%)
0,170	0,12	41,66

IV.4 CONCLUSION

Dans ce chapitre nous avons présenté en détails les différents résultats obtenus. Les différents critères de validation par rapport aux limites d'acceptabilité nous permettent de valider la méthode de Zambelli. La teneur en nitrite dans le pâté commercial est supérieure à celle affichée. Un contrôle plus rigoureux permettrait de pallier à cette infraction car la santé publique est en jeu.



**CONCLUSION
GENERALE**

CONCLUSION GENERALE

Les nitrites sont classés parmi les composés chimiques les plus polluants de l'environnement. De plus, ils sont dangereux pour la santé humaine. Les eaux et les produits alimentaires destinés directement à la consommation des êtres humains doivent respecter les seuils rigoureux fixés par la législation du pays. Le contrôle de ces teneurs peut se faire à l'aide des méthodes de dosages des nitrites.

Le présent travail a été mené dans le but de valider la méthode de dosage des nitrites au réactif de Zambelli. Par application de la méthode, nous avons également procédé au dosage des nitrites dans une eau minérale et dans un pâté commercial.

Le calcul statistique effectué a permis de déterminer la limite de détection et de quantification de la méthode de Zambelli qui sont 0,0352 et, 0,1071 mg/L respectivement. La courbe d'étalonnage est linéaire sur un large intervalle qui s'étend de 0 à 4,6 mg/L. Les tests élaborés ont montré que la méthode de Zambelli est reproductible et a une bonne répétabilité.

De plus, l'étude de l'interférence des anions sur le dosage des nitrites a montré que ces derniers, en l'occurrence, phosphates, nitrates et chlorures, n'interfèrent que très peu. Cette interférence devient négligeable lorsque la teneur des nitrites est petite.

L'application de la méthode de Zambelli au dosage des nitrites a confirmé la teneur affichée sur la bouteille d'eau minérale mais a révélé une teneur plus grande que celle qui se trouve sur l'emballage du pâté commercial. Ce qui peut être nuisible pour la santé des consommateurs, notamment si cette préparation alimentaire est consommée de manière régulière.

L'acceptation de cette validation est vérifiée sur la base des calculs statistiques à savoir : l'étude de la fonction d'étalonnage, la linéarité de courbe d'étalonnage des nitrites, la limite de quantification et de détection, la justesse, la fidélité (répétabilité, reproductibilité interne).

Par la suite nous pouvons conclure que cette méthode utilisée a été validée.

[**Abdallah**] **Rawa Abdallah**, « Développement d'un procédé intégré pour la dégradation des nitrates –Couplage d'un procédé électrochimique et d'un procédé biologique » Thèse université de rennes 1 sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne.

[**Achour**] **Achour Terbouche, Siham Lameche, Chafia Ait-ramdane-Terbouche, DjamilGuerniche, DjahidaLerari, KhaldounBachari, DidierHauchard** « A new electrochemical sensor based on carbon paste electrode /Ru(III) complex for determination of nitrite : Electrochemical impedance and cyclic voltammetry measurements » Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-chimiques Université Européenne de Bretagne, 12 avenue Janvier, 35000 Rennes, France, 18 June 2016.

[**AFSSA**] **AFSSA – Saisie n° 2004-SA-0067** , « Fiche 19 : Évaluation des risques sanitaires liés au dépassement des limites de qualité des nitrates et des nitrites dans les eaux destinées à la consommation humaine » .

[**Blanchin**] **Marie-Dominique Blanchin**, « Validation des méthodes d'analyse » Laboratoire de Chimie Analytique. Istitut des bio-molecules Max Mousseron, université Mont Pellier1, Journées Qualité et Chimie 2010 .Une démarche qualité au service de la chimie Autrans - 14 octobre 2010.

[**C.Baillet**] **C.Baillet**, « TP spectrophotométrie ». site web : eduscol.education.fr/rnchimie/phys/baillet/06/tp_spectro.pdf.

[**CEAEQ**]^a **Centre D'expertise en analyse environnementale du Québec, (CEAEQ)** « Protocole pour la validation d'une méthode d'analyse en chimie », DR-12-VMC, Québec, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, 2015, 29 p.

[**CEAEQ**]^b **Centre D'expertise en analyse environnementale du Québec (CEAEQ)**, « Détermination des nitrates et des nitrites : méthode colorimétrique automatisée avec le sulfate d'hydrazine et le N.E.D. »2014-12-15 (révision 2).

[**Cherrah**] **Yahya Cherrah**, « travaux pratiques toxicologie II », Pharmacologie et Toxicologie, Médecine et de Pharmacie de Rabat ,2011-2012.

[**CMC**] **CMC** « Canadian meat Council conseil des viandes ducanada », Le nitrite dans les produits de salaison.

[Discamps] **B.Discamps, F.Rivoal**, « TP dosage des ions nitrite dans un jambon » concours régional des Olympiades de la Chimie à Bordeaux à des élèves de Terminale S et STL CLPI 2001.eduscol.education.fr/rnchimie/olymp/sujets/dosage_nitrite_jambon.pdf.

[El Ouchy] **M. El Ouchy, A. El Oualti, K. El Ouedghiri, F. OuazzaniChahdi, F. Zerrouq, A. El OualiLalami**, « Confirmation de validation de la méthode du dosage de nitrite, nitrate et orthophosphate dans l'eau par colorimètre ». J. Mater. Environ. Sci. 5 (S1) (2014) 2293-2302.

[Feinberg] **Max Feinberg**, « labo-stat Guide de validation des méthodes d'analyse ». Edition TEC & DOC, année 2009 pays Paris France.

[Fiche de Tp] **Fiche de Tp Olympiades de la chimie**, « dosage des ions nitrites dans l'eau ». Académie de Besançon, 2012.

besancon.udppc.asso.fr/.../olympiades_chimie/2012/.../1P_olympiades_dosage_nitrite.

[Hakmi] **Abdellatif Hakmi**, « traitement des eaux " traitement de l'eau de source bousfer ORAN », mémoire online sciences université des sciences et de la technologie Oran - Licence 2006.

[Hordé], **Docteur Pierrick Hordé**, « définition des nitrites ». Journal des femmes santé médecine <http://sante-medecine.journaldesfemmes.com/faq/35775-nitrite-definition>.

[Mayor] **Monique Mayor, Guilhem Bourrié**, « Validation d'une méthode de chimie analytique : Application au dosage des anions fluorure, chlorure, nitrite, bromure, nitrate, phosphate et sulfate par chromatographie ionique ». Validation des méthodes d'analyse quantitative par le profil d'exactitude.

[Mendham] **Mendham, Denney, Barnes, Thomas**, « analyse chimique quantitative de Vogel » traduction et révision scientifique de la 6^e édition anglaise par Jean Toullec et Monique Mottet, De boeck 2015 Paris France, pages 145 ; 664.

[Rodier] **Jean Rodier, Bernard Legube, Nicole Merlet et Coll.**, « l'analyse de l'eau » .9^e édition.

[Skoog] **Skoog, West, Holler, Crouch**, « chimie analytique ». Traduction et révision scientifique de C.Buess-Herman, J.Dauchot et T.Doneux 3^e édition, page 665. Éditions De boeck 2015 Paris France.

[Web] http://www.sciences-enligne.com/DIST/Data/Ressources/lic2/chimie/chi_gen/spectro/beer_lambert.htm 03/06/2017 à 14h.

[wikipedia]

https://fr.wikipedia.org/wiki/Validation_de_m%C3%A9thode_analytique#Les_interf.C3.A9rences
13/05/17 à 19h.

[Yilong] Zhao Yilong, Zhao Dean, Li Daoliang, « Electrochemical and Other Methods for Detection and Determination of Dissolved Nitrite: A Review ». International Journal of

Electrochemical science www.electrochemsci.org.