

MÉTHODES DE RÉFÉRENCE POUR LA DÉTERMINATION DES ÉLÉMENTS MINÉRAUX DANS LES VÉGÉTAUX

I. Azote, phosphore, potassium, sodium, calcium, magnesium.

par

les Laboratoires membres du Comité Inter-Instituts
d'Etude des Techniques Analytiques du Diagnostic Foliaire *

1) LES ENQUÊTES DU COMITÉ INTER-INSTITUTS

1) INTRODUCTION

Faisant suite au vœu émis au Colloque sur la Nutrition Minérale tenu à Abidjan en 1959, quelques laboratoires d'Instituts de Recherches spécialisés avaient décidé de confronter les techniques analytiques en analysant une série de plantes très diverses. En 1961, étaient publiés les premiers résultats de cette enquête préliminaire qui portaient sur l'analyse, par huit laboratoires, de neuf plantes : arachide, bananier, caféier, cotonnier, hévéa, maïs, olivier, palmier, riz, où étaient déterminés les éléments azote, phosphore, potassium, calcium, magnésium. On mettait ainsi en évidence pour chaque dosage des coefficients de variation entre laboratoires plus ou moins importants selon les éléments et qui pouvaient résulter soit du mode de minéralisation de la plante, soit du dosage. Les

laboratoires décidaient alors de constituer un Comité ayant pour but d'étudier les causes d'erreur responsables des divergences observées.

L'objectif final est, en résumé, l'amélioration de la précision, c'est-à-dire de la fidélité et de la justesse des résultats. Le Comité Inter-Instituts qui comprenait, en 1959, huit laboratoires en réunit aujourd'hui plus de vingt, certains répondant à des objectifs particuliers. Une telle équipe possédait ainsi de larges possibilités et constatait très vite l'utilité, sinon la nécessité d'élaborer des méthodes de références aboutissant à une unanimité dans les résultats. Ainsi, il était décidé de procéder à une étude méthodique de toutes les causes d'erreur et de rechercher les moyens d'y remédier ; en d'autres termes, il s'agissait de déterminer les conditions d'analyses suffisamment fidèles et qui, exécutées par l'ensemble des laboratoires, aboutissaient à des résultats aussi reproductibles que possible, c'est-à-dire présentant des écarts-types et des coefficients de variation minima, et en même temps une justesse maximale.

On en venait ainsi, décomposant les phases essentielles de chaque dosage, à étudier les conditions suivantes :

a) Préparation de l'échantillon.

b) Minéralisation.

c) Conditions particulières au dosage de chacun des éléments majeurs.

Cette collaboration a finalement conduit à une réduction souvent notable des coefficients de variation des résultats entre laboratoires, c'est-à-dire à une amélioration de la fidélité.

Les conclusions que l'on présente aujourd'hui n'ont pas de caractère absolu ; si elles ont, après plusieurs années de travail, la prétention d'être acceptables, elles n'en sont pas moins perfectibles.

* Ecole Nationale Supérieure Agronomique, Montpellier (ENSAM) ; Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer, Bondy (ORSTOM) ; Institut National de la Recherche Agronomique, Amiens, Avignon (INRA) ; Institut de Recherche Agronomique Tropicale et des Cultures Vivrières, Paris (IRAT) ; Institut Français du Caoutchouc, Paris (IFC) ; Institut de Recherche sur le Caoutchouc en Afrique, Paris (IRCA) ; Institut de Recherche des Huiles et Oléagineux, Paris (IRHO) ; Institut Français de Recherches Fruitières Outre-Mer, Paris (IFAC) Société pour la Mise en Valeur de la Corse, Bastia (SOMIVAC) ; Compagnie Nationale d'Aménagement du Bas-Rhône et du Languedoc, Nîmes (CNABRL) ; Société d'Etudes Chimiques pour l'Industrie et l'Agriculture, Argenteuil (SECPIA) ; Société Commerciale des Potasses et de l'Azote, Mulhouse (SCPA) ; Laboratoire Coopératif Agricole et Viticole, Montpellier (LCAV) ; Société des Produits Chimiques Péchiney-Saint-Gobain, Paris ; Faculté des Sciences Agronomiques, Gand ; Institut de Recherches Chimiques, Tervuren ; Comité National pour l'Etude de la Culture Fruitière, Gembloux (IRSIA) ; Centre Agricole National, Wageningen ; Centro da Edafologia de Sevilla ; Estacion Experimental del Zaidin, Granada.

En outre, elles n'intéressent aujourd'hui que les éléments majeurs principaux (N, P, K, Ca, Mg, Na); cependant, les efforts du Comité continuent de porter sur d'autres éléments d'importance dans la nutrition minérale : chlore, soufre, oligo-éléments (Fe, Mn, Cu, Zn, Mo...).

2) LES RESULTATS

Si les résultats sont rapportés élément par élément, il convient cependant de distinguer le cas de l'azote, qui fait appel à une méthode de minéralisation propre; en effet, les éléments P, K, Na, Ca, Mg sont déterminés sur la même solution.

Azote.

Les laboratoires retiennent le principe de Kjeldahl : en attaquant le milieu végétal par l'acide sulfurique en présence d'un catalyseur, l'azote est transformé en sulfate d'ammonium (NH_4), SO_4 . L'ammoniac est séparé par distillation et titré.

En fait, ce dosage ne présente pas de difficultés particulières. Les détails opératoires ne paraissant pas critiques, il ne semble pas que l'on doive s'orienter vers un mode opératoire rigoureux. Ainsi, dans l'enquête organisée en 1959 à laquelle huit laboratoires ont participé, l'azote a été dosé sur neuf échantillons foliaires. On relève, d'un laboratoire à l'autre, des différences sensibles, portant sur les proportions relatives de matériel végétal et d'acide sulfurique, celui-ci étant parfois additionné d'acide salicylique destiné à améliorer les résultats en présence de nitrates, la nature et la quantité du catalyseur, la durée et la conduite de la digestion, la distillation de l'ammoniac et son titrage.

Voici quelques-unes des principales différences opératoires :

Pour 100 mg d'échantillon, la quantité d'acide sulfurique variait de 3 à 10 cm³, celle de sulfate de potassium de 200 mg à 1 g, le catalyseur était constitué par du sélénium seul ou en mélange avec du sulfate de cuivre, ou par du sélénite de mercure; la durée de digestion variait de une à sept heures.

Les résultats ont cependant été satisfaisants puisque les coefficients de variation à l'intérieur des laboratoires (10 répétitions) sont inférieurs à 3% (tableau I). En outre, les coefficients de variation inter-laboratoire (déterminés à partir des moyennes de chacun, varient de 1, 4 à 5 sur les diverses plantes analysées; quelques-uns de ces résultats sont donnés tableau I. Il apparaît bien que l'un des laboratoires (n° 5) donne des résultats faibles (arachide, riz, maïs) perturbant le coefficient de variation du dosage dans ces trois plantes (à noter que le coefficient de variation est beaucoup plus faible sur hévéa [1,42] non analysé par le laboratoire n° 5).

On peut penser que la cause de cette dispersion provient du titrage final de l'ammoniac par l'acide sulfurique et particulièrement du titre de la solution d'acide sulfurique.

TABLEAU I

DOSAGE DE L'AZOTE
Résultats des laboratoires
Coefficients de variation intra-laboratoires
(valeurs entre parenthèses)
Moyennes générales
Coefficients de variation inter-laboratoires

Laboratoires	Arachide	Hévéa	Riz	Maïs
N° 1 N %..	4,14 (1,01)	2,67 (0,89)	1,48 (1,46)	2,38 (0,67)
2 N %..	4,13 —	2,74 —	1,57 —	2,44 —
3 N %..	4,14 (1,55)	2,71 (2,54)	1,50 (2,21)	2,41 (1,37)
4 N %..	4,21 (1,47)	2,76 (2,10)	1,57 (2,01)	2,46 (1,88)
5 N %..	3,89 (0,67)	—	1,42 (1,48)	2,22 (2,09)
6 N %..	4,14 (0,30)	2,73 (0,90)	1,50 (1,33)	2,41 (1,94)
7 N %..	4,19 (0,46)	2,78 —	1,55 (2,04)	2,43 (1,29)
8 N %..	4,12 —	—	1,50 —	2,48 —
Moyenne génér. N % ..	4,12 —	2,73 —	1,51 —	2,40 —
Ecart-type ..	0,0979	0,0387	0,0688	0,0805
Coefficient de variation	2,30	1,42	4,55	3,35

Phosphore, potassium, sodium, calcium, magnésium

RÉSULTATS OBTENUS EN 1960.

L'enquête de 1960 a fait apparaître une grande diversité dans les modes de minéralisation (calcination simple par élévation de température jusqu'à 450° C, calcination directe à 450, 500 ou 550° C, calcination double à 450° C, puis à 600° C, minéralisation par voie humide au mélange nitro-perchlorique, avec ou sans insolubilisation de la silice) et d'autre part dans les méthodes de dosage pour potassium, calcium, magnésium. Ainsi, pour déterminer le potassium, tous les laboratoires emploient la photométrie de flamme (pré-mélange ou injection directe; air-acétylène, oxygène-acétylène, oxygène-hydrogène). Pour le calcium, la photométrie de flamme (directe ou après séparation), la manéométrique, enfin pour le magnésium la photométrie de flamme, la complexométrie, la colorimétrie.

Quelques-uns des résultats obtenus en 1960 sont rapportés tableau II; ils ont été choisis de manière à faire apparaître la dispersion maximale inter-laboratoires; ainsi, on note des coefficients de variation allant de :

- 3,0 à 11,3 pour le phosphore,
- 6,6 à 10,5 pour le potassium,
- 4,4 à 13,2 pour le calcium,
- 10,3 à 22,3 pour le magnésium.

Il est difficile d'attribuer une cause précise à la diversité des coefficients de variation. La nature de la plante ne semble pas obligatoirement responsable des coefficients élevés; ainsi, pour le riz, il est 4,7 sur le phosphore et 22 sur le magnésium; il semble plutôt que l'on doive incriminer les modes de minéralisation et de dosage, souvent différents d'un laboratoire à l'autre. C'est dans cet esprit que l'on a cherché à uniformiser chacune des opérations de dosages; à cet effet, l'étude a porté d'une part sur les procédés de minéralisation, d'autre part sur le mode de dosage.

TABLEAU II
RÉSULTATS D'ANALYSE DE QUATRE PLANTES PAR HUIT LABORATOIRES
Moyennes inter-laboratoires, écarts-types, coefficients de variation
(Valeurs obtenues en 1960
pour les méthodes propres à chaque laboratoire)

	Phosphore				Potassium			
	Arachide	Hévéa	Riz	Maïs	Arachide	Hévéa	Riz	Maïs
%	0,232	0,289	0,232	0,136	2,49	0,81	1,79	1,71
Écart-type	0,0262	0,0262	0,0169	0,004	0,164	0,805	0,140	0,122
Coefficient de variation ..	11,3	5,8	7,3	3,0	6,6	10,5	7,8	7,1

	Calcium				Magnésium			
	Arachide	Hévéa	Riz	Maïs	Arachide	Hévéa	Riz	Maïs
%	1,54	0,63	0,28	1,03	0,402	0,310	0,133	0,306
Écart-type	0,093	0,040	0,037	0,045	0,055	0,069	0,029	0,032
Coefficient de variation ..	6,1	6,3	13,2	4,4	13,6	22,3	22,0	10,3

MINÉRALISATION.

Les qualités exigées d'un mode opératoire de référence sont les suivantes :

- application à tous les milieux végétaux, du moins à la plus grande variété possible ;
- destruction des matières organiques ;
- conservation et solubilisation des éléments minéraux P, K, Na, Ca, Mg et éventuellement des oligo-éléments ;
- élimination de la silice ;
- reproductibilité ;
- simplicité et sûreté d'exécution.

Les procédés par voie humide n'ont pas été retenus ; en effet, l'attaque nitro-perchlorique pourrait répondre aux exigences si elle n'était considérée par certains comme présentant quelques dangers : l'attaque sulfo-nitrique est longue et conduit souvent à des résultats par défaut, elle manque parfois de reproductibilité.

Le Comité a finalement retenu la calcination suivie d'une reprise chlorhydrique des cendres ; il s'agissait de déterminer les conditions de calcination (temps de chauffage, température), de séparation de la silice, de solubilisation ; ceci en vue d'obtenir la meilleure reproductibilité ainsi qu'une bonne précision.

Quelques types de plantes bien différentes quant à leur composition chimique ont été retenus pour cette mise au point. Ainsi, ont été retenus pour leurs caractéristiques chimiques particulières : le riz, pour sa richesse en silice ; les agrumes, pour leurs très fortes teneurs en calcium ; le maïs, pour sa pauvreté en matières minérales ; enfin, le pommier. Il va de soi que bien d'autres types de plantes ont également servi à tester les méthodes. Il en est ainsi apparu la nécessité d'éliminer totalement la silice, le procédé par volatilisation se révélant supérieur à l'insolubilisation. En effet, la silice peut former des silicates insolubles (Ca) ou retenir par adsorption des oligo-éléments.

La méthode est décrite paragraphe II-1.

On remarquera que la volatilisation de la silice n'est pas effectuée directement sur les cendres

mais après solubilisation de l'essentiel à l'acide chlorhydrique. Après volatilisation de la silice à l'acide fluorhydrique, il convient d'éliminer tout excès d'acide fluorhydrique.

Le procédé décrit permet le dosage des éléments P, K, Na, Ca, Mg, non seulement selon des méthodes de références décrites, mais également selon toutes autres méthodes (colorimétrie, spectrophotométrie d'émission de flamme, spectrophotométrie d'absorption atomique...).

PHOSPHORE.

Dans notre première enquête (1960) inter-laboratoires, la méthode de dosage était dans tous les cas la colorimétrie du phospho-vanado molybdate mais la minéralisation était réalisée selon des techniques propres à chaque laboratoire. L'uniformisation de la minéralisation devait amener un regroupement des résultats ; on constatait que l'erreur subsistante était due pour une part à l'étalonnage. C'est ainsi que l'emploi d'une solution d'étalonnage commune à tous les laboratoires entraînait une baisse très sensible des coefficients de variation ; c'est un fait important qui doit être souligné.

Il n'a pas paru nécessaire d'uniformiser le dosage proprement dit ; les précautions à prendre concernent essentiellement l'étalonnage qui doit être fait à partir de phosphate monopotassique ($K(H_2)PO_4$) pur « pour analyse », soigneusement séché avant d'être pesé et solubilisé. Il est à noter que l'origine de fabrication du phosphate n'est pas critique ; divers phosphates ont donné des résultats très semblables.

Le mode opératoire du dosage du phosphore donné au paragraphe II-3 peut être utilisé comme méthode de référence, bien que le détail des opérations ne soit pas essentiel.

Le tableau III donne des résultats obtenus sur quelques plantes analysées par treize laboratoires en 1957 ; les coefficients de variation, bien groupés et relativement faibles prouvent la validité de la méthode et des améliorations apportées depuis 1960.

TABLEAU III
DÉTERMINATION DU PHOSPHORE PAR TREIZE LABORATOIRES
SELON MÉTHODE DE RÉFÉRENCE
P %

Laboratoires	Agrume	Maïs	Pommier	Riz
1	0,120	0,320	0,180	0,115
2	0,122	0,311	—	0,103
3	0,125	0,317	0,172	0,116
4	0,134	0,306	0,175	0,122
5	0,121	0,312	0,161	0,117
6	0,122	0,313	0,174	0,117
7	0,123	0,312	0,168	0,112
8	0,127	0,328	0,176	0,119
9	0,127	—	0,172	—
10	0,123	0,311	0,168	0,112
11	0,127	0,307	0,174	—
12	0,129	0,308	0,173	—
13	0,123	0,313	0,172	0,111
Moyenne	0,125	0,316	0,170	0,113
Ecart-type ..	0,0039	0,0061	0,0048	0,0052
C.V.	3,1	1,95	2,8	4,6

POTASSIUM.

Les causes d'erreurs et de divergences des résultats de dosage du potassium sont essentiellement la minéralisation et l'étalonnage de la méthode de dosage ; le principe du dosage adopté par tous est la photométrie de flamme. Il ne semble pas nécessaire de rechercher des conditions particulières sur l'appareillage. Une flamme « froide » air-propane est recommandée.

En ce qui concerne la minéralisation, il a été montré que c'est la calcination qui convenait le mieux ; on ne doit pas dépasser 450° pour ne pas risquer des pertes de potassium. Les cendres sont reprises par un acide de concentration bien déterminée (HCl à 2 %) ; le même acide doit être utilisé pour la préparation des étalons. Ceux-ci doivent être préparés avec le plus grand soin. On utilise le chlorure de potassium, convenablement séché à 100° C pour préparer les solutions étalons. L'origine du chlorure de potassium ne paraît pas avoir d'importance.

Le mode opératoire décrit paragraphe II-4 a été essayé sur plusieurs plantes, quelques résultats sont donnés tableau IV : on constate une réduction des coefficients de variation par rapport à ce qui était obtenu en 1960 ; toutefois, on se gardera de formuler des conclusions trop absolues de ces résultats, en effet les plantes analysées en 1960 n'étaient pas les mêmes que celles analysées en 1967 et, de plus, la liste des laboratoires s'est modifiée (huit laboratoires en 1960 et treize à quinze en 1967).

Notons enfin que ces résultats peuvent et doivent encore être améliorés, en particulier le coefficient de variation sur le riz est relativement fort ; la raison est probablement la richesse en silice de cette plante.

TABLEAU IV
DÉTERMINATION DE POTASSIUM PAR QUINZE LABORATOIRES
SELON MÉTHODE DE RÉFÉRENCE
K %

Laboratoires	Agrume	Maïs	Pommier	Riz
1	0,98	2,01	1,28	1,98
2	1,09	2,11	1,38	2,31
3	1,01	2,24	1,32	2,26
4	0,98	1,91	1,25	—
5	1,12	2,13	1,35	2,52
6	1,08	2,19	1,36	2,37
7	1,08	2,08	1,36	2,26
8	1,07	2,26	1,41	2,53
9	0,98	2,08	1,22	2,15
10	1,05	2,08	1,32	2,12
11	1,07	1,90	1,26	1,95
12	1,12	2,17	1,38	—
13	1,06	2,22	1,34	2,30
14	1,06	2,14	1,36	2,33
15	0,95	1,97	1,26	2,37
Moyenne	1,046	2,099	1,323	2,265
Ecart-type ..	0,0541	0,1126	0,0566	0,1784
Coefficient de variation ..	5,16	5,36	4,28	7,88

CALCIUM.

Les causes de dispersion des résultats obtenus en 1960 (tableau II : les coefficients de variation s'échelonnent de 4 à 13) sont les suivantes : préparation de l'échantillon, minéralisation, méthode de dosage, étalonnage de la méthode. Tous ces facteurs ont été analysés. L'uniformisation de la préparation de l'échantillon a conduit à une réduction substantielle de la dispersion. Il restait alors la méthode de dosage.

Le choix paraissait difficile entre la photométrie de flamme, la complexométrie, la gravimétrie, la colorimétrie..., autant de méthodes utilisées dans les laboratoires ; il s'agissait, ainsi qu'il a été défini plus haut, de dégager une méthode aboutissant au groupement des résultats plutôt qu'à un rassemblement des partisans défenseurs de cette méthode.

Finalement, après diverses recherches, le Comité Inter-Instituts, repoussant les méthodes traditionnelles trop laborieuses, les méthodes par photométrie de flamme, trop dépendantes du type d'appareil et trop sensibles aux interactions, les méthodes colorimétriques parfois trop imprécises, s'est finalement rallié à une méthode complexométrique ; précisons que la méthode finalement adoptée n'était utilisée initialement que par un très petit nombre de laboratoires.

Décrite paragraphe II-5, cette méthode est simple et applicable à une grande variété de végétaux, quelques résultats sont donnés tableau V.

Les coefficients de dispersion se répartissent de 3 à 7 sans que l'on puisse en dégager une cause précise ; seule une bonne pratique de la méthode conduira à un meilleur groupement. Toute méthode, en particulier lorsqu'il s'agit d'une méthode de référence, doit être largement expérimentée avant d'être mise en application. De toute façon, les membres du Comité Inter-Instituts estiment que les coefficients de variation trouvés sont acceptables pour la détermination du calcium dans le milieu végétal et que la méthode utilisée peut constituer une bonne méthode de référence.

TABLEAU V
DÉTERMINATION DU CALCIUM PAR DIX-NEUF LABORATOIRES
PAR MÉTHODE DE RÉFÉRENCE
Ca %

Laboratoires	Agrume	Maïs	Pommier	Riz
1	6,00	—	1,31	—
2	6,02	—	1,41	—
3	5,99	1,03	1,15	0,63
4	5,55	1,01	1,33	0,63
5	6,07	0,97	1,31	0,64
6	5,96	0,96	1,41	0,63
7	—	1,04	1,27	0,67
8	6,28	0,99	1,42	0,61
9	6,37	1,11	1,48	0,76
10	6,16	0,95	1,45	0,60
11	6,21	1,03	1,44	0,60
12	6,07	0,95	1,32	0,58
13	6,04	—	1,35	—
14	6,38	1,05	1,34	0,68
15	5,98	0,85	1,35	0,66
16	6,10	1,00	1,36	0,63
17	5,90	0,81	1,30	0,65
18	—	0,96	—	0,62
19	—	0,99	—	0,65
Moyenne	6,067	0,981	1,353	0,640
Ecart-type ..	0,1988	0,0720	0,0793	0,0410
C.V.	3,28	7,34	5,86	6,41

MAGNÉSIUM.

C'est sur le dosage du magnésium que l'on obtient les coefficients de variation les plus importants (10,3 à 22,3 : tableau II) ; les méthodes utilisées sont variées ; on a vu ce qu'il en était de la minéralisation de l'échantillon ; mais c'est dans les méthodes de dosages proprement dites que

On trouve le plus de diversité : photométrie d'émission de flamme sous diverses formes, absorption atomique, complexométrie au versénate, colorimétrie au jaune titane..., colorimétrie à l'oxine... Après étude de divers modes de dosages, c'est une méthode colorimétrique au jaune titane qui a été retenue comme méthode de référence. Toutefois, la méthode classique est sujette à de nombreuses interférences (P, Al, Fe, Ca, Cu, Mn...). Dans la méthode retenue, on utilise pour éliminer les interférences dues au calcium, aux phosphates et aux métaux lourds, l'EGTA et la triéthanolamine dans une solution de compensation contenant en outre du manganèse ($Mn SO_4 \cdot 4 H_2O$), de l'aluminium ($Al Cl_3 \cdot 6 H_2O$) et du magnésium en quantités uniformes dans les solutions d'échantillons et d'étalons. En respectant ces conditions, le dosage du magnésium est suffisamment spécifique.

Il faut signaler le rôle des solutions d'étalonnage : en effet, il est essentiel de partir d'un sel de magnésium de composition sûre bien connue ; c'est le sulfate de magnésium anhydre qui offre le plus de garantie.

La méthode pratique est décrite au paragraphe II-6. Quelques-uns des résultats obtenus par dix-neuf laboratoires sont donnés tableau VI.

Les coefficients de variation paraissent encore assez importants (6,7 à 9,2) mais il ne faut pas oublier les difficultés de ce dosage et, par rapport à ceux obtenus en 1960, l'amélioration est certaine.

Il va de soi qu'une telle méthode de référence ne doit pas être considérée comme définitive. En effet, le développement ces dernières années de la spectrophotométrie d'absorption atomique, d'ailleurs utilisée par plusieurs laboratoires membres du Comité Inter-Instituts, devrait, dans les années qui viennent, permettre l'adoption d'une nouvelle méthode de référence. Le Comité Inter-Instituts a préféré, pour l'immédiat, retenir une méthode fondée sur des principes éprouvés et susceptible de la plus large diffusion.

TABLEAU VI

DÉTERMINATION DU MAGNÉSIUM PAR DIX-NEUF LABORATOIRES
PAR MÉTHODE DE RÉFÉRENCE *
Mg %

Laboratoires	Agrume	Maïs	Pommier	Riz
1	0,250	—	0,280	—
2	0,281	0,326	0,266	0,140
3	0,256	0,279	0,275	0,154
4	0,230	0,312	0,280	0,159
5	0,244	0,331	0,261	0,185
6	0,248	0,255	0,281	0,155
7	0,280	0,341	0,350	0,192
8	0,241	0,291	0,270	0,164
9	0,221	0,289	0,263	0,152
10	0,234	0,352	0,265	0,181
11	0,251	0,325	0,318	0,169
12	0,265	0,309	0,284	0,164
13	0,231	—	0,263	—
14	—	0,314	—	0,163
15	0,240	0,278	0,300	0,164
16	0,252	0,292	0,295	0,172
17	0,246	0,299	0,239	0,194
18	—	0,309	—	0,170
19	—	0,271	—	0,155
Moyenne	0,248	0,304	0,281	0,166
Ecart-type ..	0,0166	0,0261	0,0260	0,0149
C.V.	6,72	8,58	9,25	9,03

* La troisième décimale a été donnée pour respecter la forme habituelle de présentation des résultats, mais, d'après la reproductibilité obtenue, deux décimales seulement doivent être prises en considération.

II) MÉTHODES DE RÉFÉRENCE

1) TECHNIQUE DE MINÉRALISATION

Le mode de minéralisation décrit est utilisable pour les dosages de P, K, Na, Ca, Mg et de certains oligo-éléments.

RÉACTIFS :

Acide chlorhydrique concentré $d = 1,19$.
Acide fluorhydrique.
Eau distillée.

MODE OPÉRATOIRE :

Homogénéiser la poudre végétale finement broyée et la sécher seize heures à 70-80° C ; refroidir trente minutes au dessiccateur.

Peser 2 g d'échantillon en capsule de platine.

Disposer la capsule au four froid, élever la température à 450° C en deux heures et la maintenir deux heures, refroidir (remarque : les cendres obtenues sont généralement claires).

Humecter les cendres par 2 à 3 ml d'eau et 1 ml d'acide chlorhydrique concentré, lentement ajouté.

Chauffer sur plaque chauffante jusqu'à apparition des premières vapeurs, ajouter quelques ml d'eau.

Filtrer sur filtre sans cendre, dans une fiole jaugée de 100 ml, rincer trois ou quatre fois à l'eau tiède.

Incinérer le papier filtre et son contenu pendant une demi-heure à 550° au maximum.

Reprendre par 5 ml de FH.

Aller à sec sur plaque chauffante douce ou sur bain-marie, sans dépasser 250°.

Reprendre par 1 ml de HCl concentré. Laver à l'eau tiède. Filtrer. Amener à 100 ml, compléter au trait de jauge après refroidissement.

2) DOSAGE DE L'AZOTE

(Méthode de Kjeldahl)

En attaquant la matière végétale par H_2SO_4 concentré, à l'ébullition, en présence de catalyseur, l'azote est transformé en $(NH_4)_2 SO_4$. On distille avec un excès de soude et titre l'ammoniac entraîné par H_2SO_4 N/14.

RÉACTIFS :

H_2SO_4 pur « pour analyses », $d = 1,84$.

Lessive de soude 36° Bé.

H_2SO_4 N/14.

Catalyseur :

K_2SO_4 « pour analyses », 80 g.

$CuSO_4$ anhydre « pour analyses », 20 g (pulvérisé).

Sélénium pur, 2 g.

Indicateur coloré : mélange en volumes égaux de rouge de méthyle (0,66 %) et de vert de bromocrésol (0,33 %) dans l'alcool éthylique à 95°.

Acide borique en solution à 2 % dans l'eau.

MODE OPÉRATOIRE :

Introduire, dans un matras de 150 ml, de 150 à 200 mg d'échantillon végétal (humidité comprise entre 0 et 10 %) en évitant d'en déposer sur le col, puis 5 ml d'acide sulfurique concentré; laisser en contact une demi-heure.

Ajouter 200 mg environ de catalyseur et, après avoir mis deux ou trois petites billes de verre, chauffer d'abord doucement quelques instants, puis porter à ébullition. La décoloration complète est généralement obtenue en trente minutes. Durée totale du chauffage : une heure.

Laisser refroidir et ajouter en une seule fois 30 ml d'eau.

Au moment de distiller, ajouter d'un seul coup 25 ml de lessive de soude et fixer le matras à l'appareil à entraînement par la vapeur.

Recueillir le distillat dans un bécher de 250 ml contenant 0,5 ml d'indicateur et 10 ml d'acide borique, l'extrémité inférieure du réfrigérant touchant le fond du bécher. Durée de la distillation : 2,30 mn à 3 mn. Volume recueilli : 100 à 125 ml.

Titrer avec l'acide sulfurique N/14 (virage du vert au rouge).

CALCUL DES RÉSULTATS :

1 ml de solution N/14 correspond à 1 mg d'azote.

Soit p la prise d'essai en grammes, n le volume en ml de la solution de titrage, la teneur d'azote en % de matière sèche est donnée par :

$$N \% = \frac{n}{10 \times p}$$

3) DOSAGE DU PHOSPHORE

(Spectrophotométrie d'absorption)

PRINCIPE :

En solution acide, en présence d'ions V^{5+} et Mo^{6+} , l'acide phosphorique donne un complexe phosphovanadomolybdique jaune, dont la densité optique est mesurée spectrophotométriquement à 430 m μ .

RÉACTIFS :

Réactif nitrovanadomolybdique préparé en mélangeant :

- 100 ml de molybdate d'ammonium à 5 % ;
- 100 ml de vanadate d'ammonium à 2,5 % : dissoudre 25 g de vanadate d'ammonium dans 500 ml d'eau chaude, ajouter 20 ml NO_3H ($d = 1,33$). Après refroidissement, amener à 1 l ;
- 67 ml de NO_3H ($d = 1,33$) ;
- eau, quantité suffisante pour faire 500 ml.

Solution étalon de phosphore à 1 mg P/ml : peser 0,439 g de phosphate monopotassique pur « pour analyses » (PO_4H_2K) et le dissoudre dans 100 ml d'eau.

Solution à 20 μg P/ml : diluer cinquante fois la solution précédente.

MODE OPÉRATOIRE :

Introduire une prise d'essai de 5 à 10 ml suivant la concentration présumée en phosphore de la solution de cendres (paragraphe II-1) dans un ballon jaugé de 25 ml.

Ajouter 5 ml de réactif nitrovanadomolybdique.

Compléter le volume avec de l'eau déminéralisée.

Attendre une heure avant de passer au spectrophotomètre.

Mesurer la densité optique à 430 m μ .

La coloration reste stable pendant plusieurs heures.

Remarque : il est possible d'utiliser un photolorimètre avec filtre bleu (468 m μ).

ETALONNAGE :

Les lectures sont comparées à celles données par une gamme étalon de phosphore traitée dans les mêmes conditions et qui comprend généralement les teneurs suivantes :

0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 μg P/ml

CALCUL DES RÉSULTATS :

Soit p la prise d'essai en grammes, V le volume de solution minéralisée, n la concentration de P en $\mu g/ml$ dans la solution photométrée (10 $\mu g/ml$ de solution initiale étendue à 25 ml). La teneur de phosphore en % de matière sèche est donnée par

$$P \% = \frac{n \times 25 \times V}{10^6 \times p}$$

4) DOSAGE DU POTASSIUM ET DU SODIUM

(Spectrophotométrie de flamme)

PRINCIPE :

Les émissions spectrales du potassium et du sodium résultant de l'introduction de la solution des cendres végétales dans une flamme sont comparées à celles obtenues à partir de solutions synthétiques d'étalonnage.

RÉACTIFS :

Acide chlorhydrique, $d = 1,19$.

Acide chlorhydrique à 2 % (en volume).

Eau distillée.

Solution étalon de base de potassium à 1 mg K/ml ; dissoudre 1,907 g de KCl pur « pour analyses » et séché une heure à 400° C dans un litre d'acide chlorhydrique à 2 % ($K = 1.000 \mu g/ml$).

Solutions d'étalonnage de potassium : préparer à partir de la solution précédente une gamme contenant 0, 50, 75, 100, 125, 150, 175 et 200 μg K/ml en milieu HCl 2 %.

Remarque : il est souvent nécessaire d'utiliser des solutions complexes, c'est-à-dire contenant à côté du potassium, des concentrations moyennes des autres éléments (Ca, Mg, P). C'est en particulier le cas lorsque le potassium est faible par rapport aux autres éléments.

Solution de base de sodium à 1 mg/Na/ml : dissoudre 2,5413 g de NaCl chimiquement pur sec dans un litre d'acide chlorhydrique à 1 %.

Solution d'étalonnage de sodium : préparer à partir de la solution précédente une gamme contenant 0, 10, 25, 50, 75, 100 µg Na/ml en milieu HCl 1% et en présence de concentrations moyennes de K, Ca, Mg correspondant à la composition minérale du milieu analysé.

MODE OPÉRATOIRE :

MESURE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DU POTASSIUM.

Diluer la solution de l'échantillon (§ II-1) convenablement (deux à dix fois) pour avoir K entre 50 et 200 µg/ml en milieu HCl à 2%.

Utiliser de préférence un spectrophotomètre équipé d'une flamme air-propane (ou air-acétylène).

Régler la sensibilité du spectrophotomètre sur l'émission K 760 mµ pour avoir toute l'étendue de l'échelle avec la solution étalon à 200 µg K/ml et le zéro de l'échelle avec l'eau distillée ou l'étalon 50 µg K/ml.

Photométrer successivement les solutions étalons, les solutions d'analyses et à nouveau les solutions d'étalons.

CALCUL DES RÉSULTATS :

Tracer la courbe d'étalonnage et déterminer la concentration en potassium de solutions inconnues, soit : n µg/ml la valeur trouvée.

Soit p le poids de la prise d'essai en g, V le volume de la solution des cendres en ml, D la dilution de la solution à photométrer.

La teneur en potassium en % de matière sèche est donnée par :

$$K \% = \frac{n \times D \times V}{10^4 \times p}$$

MESURE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DU SODIUM :

Utiliser la solution préparée § II-1, sans dilution.

Régler la sensibilité du spectrophotomètre sur la raie Na 590 mµ pour avoir toute l'étendue de l'échelle avec la solution étalon Na 100 µg/ml et le zéro avec l'eau distillée.

Photométrer les solutions étalons et les solutions d'analyses comme pour le potassium.

5) DOSAGE DU CALCIUM

(Méthode complexométrique)

PRINCIPE :

Titration complexométrique du calcium à l'EDTA en présence d'hydroxy-2 (hydroxy-2 sulfo-4, naphthylazo-1)-1 naphthoïque-3 ou HHSNN, comme indicateur.

RÉACTIFS :

Solution EDTA 0,01 M : 3,72 g de sel disodique de l'acide éthylène-diamine tétracétique cristallisé avec 2 H₂O dans un litre d'eau.

Solution d'acide ascorbique à 5%.

Agent masquant : dissoudre à l'eau 3 g de KCN, ajouter 25 ml de triéthanolamine, étendre à 100 ml à l'eau.

Solution d'hydroxyde de sodium 2 N.

Indicateur HHSNN : mélanger et pulvériser intimement 0,500 g d'indicateur et 100 g NaCl R.P.

Solution de magnésium 0,05 M : soit 10,165 g MgCl₂ · 6 H₂O dans un litre.

Solution étalon de calcium 0,005 M. Dissoudre 0,500 g CaCO₃ pur « pour analyses » dans un litre HCl 2%.

MODE OPÉRATOIRE :

ÉTALONNAGE DE L'EDTA.

Dans un bécher de 100 ml, introduire successivement :

- 5 ml de solution étalon de Ca,
- 0,5 ml de solution de Mg,
- 50 ml d'eau,
- 3 gouttes d'acide ascorbique,
- 1 ml d'agent masquant,
- 5 ml d'hydroxyde de sodium,
- 50 à 100 mg d'indicateur.

Ajouter la quantité nécessaire d'EDTA pour obtenir le virage au bleu.

Dans deux autres béchers de 100 ml, introduire :

- 5 ml de solution étalon de Ca,
- 0,5 ml de solution de Mg,
- 50 ml d'eau,
- 3 gouttes d'acide ascorbique,
- 1 ml d'agent masquant,
- puis 95 % du volume d'EDTA précédemment déterminé,
- 5 ml d'hydroxyde de sodium.

Agiter exactement deux minutes sur agitateur magnétique.

Ajouter 50 à 100 mg d'indicateur et terminer le dosage en ajoutant la quantité utile complémentaire d'EDTA en s'arrêtant au premier virage au bleu.

DOSAGE DU CALCIUM DE L'ÉCHANTILLON.

Dans un premier bécher de 100 ml, introduire successivement :

- 5 ml de solution à analyser (solution préparée § II-1) ou plus si Ca < 0,004 % de matière sèche,
- 1 ml d'agent masquant,
- 50 ml d'eau,
- 3 gouttes d'acide ascorbique,
- 5 ml d'hydroxyde de sodium,
- 50 à 100 mg d'indicateur.

Titrer à l'EDTA jusqu'au premier virage au bleu.

Dans deux autres béchers de 100 ml, introduire successivement :

- 5 ml de la solution à doser (ou plus si nécessaire),
- 1 ml d'agent masquant,
- 50 ml d'eau,
- 3 gouttes d'acide ascorbique,
- 95 % du volume d'EDTA déterminé précédemment,
- 5 ml d'hydroxyde de sodium.

Agiter exactement deux minutes sur agitateur magnétique.

Ajouter 50 à 100 mg d'indicateur et terminer le dosage à l'EDTA au premier virage au bleu.

La teneur en calcium est calculée d'après la moyenne des deux derniers titrages, le premier étant généralement plus fort.

Soit n le nombre de ml d'EDTA utile (valeur moyenne des deux titrages).

CALCUL DES RÉSULTATS :

Soit t le titre de l'EDTA déterminé ci-dessus, valeur voisine de 0,01 M sachant que 1 ml EDTA 0,01 M correspond à 2 ml de calcium 0,005 M (0,0004008 g Ca).

Soit p la prise d'essai en grammes de matière sèche, V le volume en ml de solution de cendres, v la valeur en ml de la prise d'essai destinée au titrage.

La teneur de calcium en % de matière sèche est donnée par :

$$\text{Ca \%} = \frac{n \times V \times t \times 4,008}{v \times p}$$

6) DOSAGE DU MAGNESIUM

(Méthode spectrophotométrique au jaune titane)

PRINCIPE :

L'absorption spectrophotométrique du complexe magnésium-jaune titane permet un dosage spécifique du magnésium à partir des solutions végétales si les autres éléments présents et gênants (en particulier Ca) sont complexés à l'aide d'acide éthylène glycol bis - (B-amino-éthyléther)- N, N, N', N'-tétracétique (EGTA).

RÉACTIFS :

a) Solution de compensation :

Dissoudre 10 g de EGTA dans le volume minimum de KOH 6 N (environ 11 ml) et neutraliser à pH 7 avec HCl N.

Ajouter ensuite :

20 ml de triéthanolamine,
0,0813 g de $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$,
0,0894 g de $\text{AlCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$,

(ces sels étant dissous à l'avance dans une petite quantité d'eau distillée),

et 10 ml de solution standard de Mg.

Compléter à un volume de 400 ml.

Cette solution de compensation peut être conservée un mois.

b) Solutions étalon de magnésium à 100 et 10 $\mu\text{g/ml}$:

Dissoudre 0,495 g de sulfate de magnésium anhydre (MgSO_4) dans de l'eau distillée, amener à 1.000 ml.

Diluer dix fois cette solution pour faire Mg 10 $\mu\text{g/ml}$.

Remarque : le sulfate de magnésium anhydre est préparé en chauffant au four à 600° C pendant quatre heures le sulfate de magnésium hydraté $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; la montée en température doit être lente jusqu'à 250° C (100° par heure).

c) Ajouter à 10 ml d'une solution aqueuse 0,1 % de jaune titane 5 ml d'alcool polyvinylique à 1 % dans l'eau distillée, puis 25 ml d'une solution aqueuse à 1,75 % de H_2KPO_4 et 50 ml de glycérine. Compléter à 100 ml ; préparer une solution fraîche chaque jour.

d) Mélange de réactifs.

Mélanger le réactif c) avec un volume égal de la solution de compensation a).

e) Hydroxyde de potassium 6 N : 33,66 g de KOH dans 100 ml.

f) Hydroxyde de sodium 4 N : 16,00 g de NaOH dans 100 ml.

MODE OPÉRATOIRE :

La solution végétale préparée selon la méthode décrite § II-1 est diluée cinq fois à l'eau distillée (2 ml de solution et 8 ml d'eau) ; cette dilution convient pour les teneurs en magnésium entre 0 et 0,5 % de matière végétale.

La solution spectrophotométrée est préparée comme suit :

Effectuer une prise d'essai de 2 ml de la solution précédente.

Ajouter 2 ml du mélange des réactifs (d) et 1 ml de NaOH 4 N en agitant à chaque addition.

Maintenir la solution une heure à l'obscurité.

Spectrophotométrer à 550 $\text{m}\mu$ et comparer la densité optique à une gamme d'étalon.

ÉTALONNAGE :

A partir de la solution étalon Mg 10 $\mu\text{g/ml}$, effectuer des prélèvements de 0, 4, 8, 12, 20 $\mu\text{g/Mg}$, soit 0, 0,4, 0,8, 1,2, 1,6, 2 ml.

Compléter chaque prise à 2 ml à l'eau distillée.

Ajouter les réactifs comme pour les solutions d'analyse, spectrophotométrer et tracer la courbe d'étalonnage : densité optique à 550 $\text{m}\mu$ en fonction de la quantité de magnésium.

Remarques : en général, l'étalon zéro présente une absorbance de 0,250 à 0,280 par rapport à l'eau distillée.

Certaines fabrications d'EGTA sont contaminées en Mg. On doit adapter la quantité de Mg introduit dans la solution de compensation de telle façon que l'extinction de l'étalon zéro atteigne 0,25-0,28 par rapport à l'eau distillée.

CALCUL DES RÉSULTATS :

Soit n la prise d'essai de substance végétale en g, V le volume de solution minéralisée en ml, n la quantité de magnésium en μg dans le prélèvement photométré.

La teneur de magnésium en % de matière sèche est donnée par :

$$\text{Mg \%} = \frac{n \times V}{4.000 \times p}$$

III) CONCLUSIONS

L'application des méthodes présentées et l'examen des tableaux de résultats laissent prévoir qu'il reste encore à faire pour les perfectionner. C'est probablement la principale conclusion qu'il convient de tirer ; incontestablement, on peut espérer de larges améliorations qui résulteront simplement d'une meilleure expérience de la méthode, ou encore de l'exploitation de techniques nouvelles : absorption atomique, fluorescence atomique, fluorescence X, polarographie, radioactivation... Or, c'est essentiellement dans un but de contrôle de la nutrition minérale qu'ont été élaborées ces méthodes. Il appartient maintenant aux utilisateurs de donner leur avis. Les méthodes de références, en permettant des comparaisons inter-laboratoires,

faciliteront l'exploitation des résultats ; c'est dans un deuxième stade que pourront apparaître de nouvelles exigences. Les membres du Comité Inter-Instituts, conscients de leur responsabilité, poursuivent leurs travaux visant à une nouvelle réduction des coefficients de variation de leurs résultats d'analyses, notamment par l'adaptation de méthodes nouvelles.

Mais, dès à présent, les laboratoires du Comité travaillent à la préparation de méthodes de référence pour le soufre et le chlore, ainsi que pour les oligo-éléments fer, manganèse, cuivre et zinc.

Le Comité Inter-Instituts pour l'Etude des Techniques Analytiques du Diagnostic Foliaire reste prêt à accueillir toute collaboration nouvelle, aussi bien en ce qui concerne la variété des milieux analysés que les méthodes d'analyses.

Bio. J. Ann. 1.

L'AGRONOMIE TROPICALE

Extrait du Vol. XXIV, n° 9
SEPTEMBRE 1969

MÉTHODES DE RÉFÉRENCE POUR LA DÉTERMINATION DES ÉLÉMENTS MINÉRAUX DANS LES VÉGÉTAUX

I. Azote, phosphore, potassium, sodium, calcium, magnesium.

par
les Laboratoires membres du Comité Inter-Instituts
d'Etude des Techniques Analytiques du Diagnostic Foliaire

19 JUIN 1970

C. R. S. T. O. M.
Collection de Référence
n° B/4119