

# UNE TECHNIQUE DE MINERALISATION RAPIDE DES VEGETAUX EN VUE DU DOSAGE EN SERIE DE N, P, K, Na, Ca, Mg, Fe, etc. Note analytique. \*

par J. LAMBERT

Laboratoire d'Agriculture - Institut National Agronomique - El Harrach - Alger.

## RESUME

La comparaison de différentes techniques de minéralisation des végétaux en vue de dosages en série des principaux anions et cations a montré l'intérêt d'une attaque par l'acide sulfurique et l'eau oxygénée. Cette méthode permet de doser l'azote, le sodium, le potassium, le calcium, le magnésium, le fer (la vérification restant à faire pour les différents oligoéléments, le chlore, etc.) par les méthodes classiques (Kjeldahl, spectrophotométrie, colorimétrie, etc.) à partir d'une seule prise d'essai de 200 mg de poudre végétale sèche. De plus cette méthode est beaucoup plus rapide et simple que toutes les autres et beaucoup plus fidèle que la calcination au four. Une fois le dosage du phosphore mis au point, cette méthode sera la seule permettant de doser la quasi-totalité des éléments sur le même minéralisat.

## I. INTRODUCTION.

La détermination de la teneur en éléments minéraux des végétaux est actuellement une technique appliquée dans de très nombreuses disciplines et en particulier dans l'agriculture pour améliorer la nutrition des plantes (diagnostic foliaire) et la fabrication de concentrés pour animaux. Ces dosages doivent donc répondre aux critères classiques de l'analyse (précision, sensibilité, fidélité, ...), mais également à celui de l'analyse en série: la rapidité.

Or, on utilise classiquement pour minéraliser des tissus végétaux la voie sèche (calcination au four) pour le dosage des cations, et la voie humide (acides à chaud) pour l'azote et le phosphore (MORARD et coll., 1970), l'azote pouvant aussi être dosé volumétriquement (autoanalyseur Coleman) et le phosphore après calcination au four. Nous avons donc cherché à n'utiliser qu'une seule minéralisation pour doser tous les éléments plus rapidement et, si possible, avec un gain de fiabilité.

En effet, la calcination au four et l'attaque par l'acide nitrique seul ou accompagné d'acide perchlorique, excluent le dosage de l'azote tandis que

---

\* Manuscrit déposé en Octobre 1975. Ann. de l'INA - Alger.

l'attaque selon la méthode Kjeldahl rend impossible celui du K dans le cas de l'emploi de  $K_2SO_4$  comme catalyseur. Même en présence de selenium, cette attaque reste une opération relativement longue, se prêtant mal aux analyses en série, et aléatoire pour les dosages de P, Ca et Na (MORARD et coll., 1970). L'attaque HCl-HF pose des problèmes de verrerie (l'acide fluorhydrique dissout la silice) et de sécurité; nous ne savons pas, de plus, si l'azote serait dosable. Il reste la spectrographie d'émission d'arc, plutôt employée pour l'analyse qualitative.

Seule l'attaque par l'acide sulfurique et l'eau oxygénée (mélange fortement exothermique au contact de la matière organique, ébullition possible de la solution d'attaque) pouvait a priori permettre l'analyse complète et rapide sur un seul échantillon, soufre excepté. Il s'avère que nous n'avons pas pu doser valablement le phosphore, mais une mise au point simple sera à même de résoudre cet unique handicap. Enfin, l'attaque étant rapide, les causes d'erreur dues à la libération d'éléments par le verre en particulier sous l'action des acides chauds, sont évitées.

Suite aux essais de MORARD et GULLO, nous n'avons travaillé que sur de très faibles quantités de poudre végétale (200 mg contre 1 à 2 g dans les méthodes classiques - JURION 1968), ce qui est un avantage incontestable lorsque la récolte de matière sèche est peu abondante (parties d'organes, etc.).

— Dans un premier essai, nous avons comparé les analyses de Na, K et P sur des feuilles de betteraves après trois types d'attaques par voie humide: acide nitrique à chaud, avec ou sans acide perchlorique, et acide sulfurique + eau oxygénée.

— Puis nous avons comparé les dosages en Na, K, Ca, Mg, et Fe sur des feuilles de luzerne après calcination au four à moufle ou attaque sulfurique + eau oxygénée. Enfin, après vérification de la validité de notre méthode pour le dosage de l'azote, nous avons testé sa précision quant à l'azote sur cette même luzerne. Néanmoins, un témoin par attaque à l'acide sulfurique à chaud en présence de Se n'a pas pu être réalisé.

## II. MATERIEL ET METHODES.

### 2.1) ORIGINE DES PLANTES:

*1er essai:* les trois attaques par voie humide sont réalisées sur environ 200 mg d'une poudre sèche de feuilles de betteraves (var. Cérès TR 4) cultivées en pots (73° jour). La fertilisation y était élevée en Na et P, mais normale pour tous les autres éléments.

2ème essai: prise d'essai de 200 mg d'une variété de luzerne à l'état spontané en Algérie.

## 2.2) PREPARATION DES ECHANTILLONS:

Les feuilles lavées sont séchées à l'étuve à 103 °C pendant 24 h, broyées, puis conservées en flacons fermés. L'humidité résiduelle est déterminée au moment des analyses. (Passage à l'étuve de 4 aliquotes de 5 g env.).

## 2.3) TECHNIQUES DE MINERALISATION:

*1er essai: attaque par HNO<sub>3</sub> à chaud:* dans un bécher, on verse 10 ml de HNO<sub>3</sub> concentré (d=1,40) sur 200 mg de poudre végétale. On évapore sur plaque chauffante, en recouvrant les béchers d'un verre de montre; le minéralisat est repris par 2 ml de HNO<sub>3</sub> conc. et transvasé avec les eaux de rinçage dans une fiole jaugée de 50 ml.

*attaque par HNO<sub>3</sub>+HClO<sub>4</sub>:* selon le même procédé, on minéralise par 10 ml d'une solution à 100 vol. d'acide nitrique pour 40 vol. d'acide perchlorique.

*attaque par H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:* pour une attaque complète, nous avons retenu après essais la technique suivante: dans un erlenmeyer de 100 ml, on verse 10 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pur et concentré (d=1,84) sur les 200 mg de poudre végétale. Après 5 à 10 min. d'attaque, on y ajoute sous hotte ventilée 10 ml d'eau oxygénée à 110 vol. (30%), en procédant lentement et en agitant pour éviter une ébullition brutale. Après refroidissement, le minéralisat est transvasé et amené à 50 ml en fiole jaugée.

*2ème essai: calcination au four à moufle:* les 200 mg sont placés dans une capsule en silice et mis au four. La température doit monter lentement (surtout entre 175 et 250 °C) et progressivement jusqu'à 400 °C en une heure, puis on la stabilise à 550 °C pendant 5 h. Les cendres sont reprises avec 1 ml de HNO<sub>3</sub> conc. (+ 1 ml pour rinçage) et versées dans une fiole jaugée de 100 ml.

*attaque par H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:* la méthode est ici la même: on laisse agir 10 ml d'acide sulfurique sur la poudre végétale pendant 10 min., puis on ajoute 5 ml seulement d'eau oxygénée à 110 vol. Le minéralisat est ajusté à 100 ml. La durée totale est d'environ 25 min. pour une série de 10 échantillons.

Dans chaque cas, un témoin sans poudre végétale est réalisé.

## 2.4) METHODES D'ANALYSE CHIMIQUE:

Les dilutions et les gammes d'étalonnage sont réalisées dans les mêmes solutions que les échantillons à analyser:

*dosage des cations*: on dose K et Na par spectrophotométrie d'émission de flamme (Eppendorf) et Ca, Mg, Fe, Cu, Mn, et Zn par spectrophotométrie d'absorption atomique (Perkin Elmer). De l'oxyde de Lanthane est ajouté à la concentration finale de 0,1% pour le dosage de Ca et Mg afin de limiter les interférences.

*dosage du phosphore*: la solution de reprise des minéralisats obtenus par la voie humide étant déjà acide (environ 0,6 N pour les attaques nitriques et 7,2 N pour l'attaque oxydante), on dose directement le phosphore par colorimétrie du complexe jaune formé après addition d'un réactif nitrovanadomolybdique (laboratoire d'analyses en séries).

Cependant, en milieu très oxydant ( $H_2SO_4 + H_2O_2$ ), la coloration est très instable. Nous avons vérifié que cette instabilité était due à un excès de pouvoir oxydant et non d'acidité par rapport aux normes préconisées par la méthode. Nous avons donc dosé le phosphore après apport de 1 ml d'acide ascorbique (réducteur) à 1% à 2 ml d'échantillon dilué au 1/5, puis deux ml de réactif.

*dosage de l'azote*: nous supposons que, à l'instar de l'attaque Kjeldahl à chaud, la quasi-totalité de l'azote organique sera passé à l'état de  $NH_4^+$  et le restera malgré la présence, d'eau oxygénée (potentiel redox normal: 1,776 V). Cette méthode est à rapprocher de celle préconisée par l'ORSTOM (CEPE, 1967) pour l'analyse de l'azote total du sol. La terre est attaquée par  $H_2SO_4$  conc. à chaud en présence d'une solution de  $K_2Cr_2O_7$  (potentiel redox normal: 1,33 V) et on considère que 89,4% de l'azote est ainsi minéralisé.

D'autre part, selon LUBOCHINSKY et coll. (1954), la minéralisation par  $H_2SO_4$  et  $H_2O_2$  donne des blancs très faibles pour l'ammonium, qu'ils dosent alors par une méthode colorimétrique.

Nous avons donc testé l'effet dépressif du milieu d'attaque sur une solution titrée de sulfate d'ammonium, par comparaison à un témoin non traité:

		Témoin *	Attaque $H_2SO_4 + H_2O_2$
$(NH_4)_2SO_4$ 0,1 M	ml:	5	5 (= 14 mg N)
$H_2SO_4$ concentré	ml:	—	10
$H_2O_2$ à 100 volumes	ml:	—	5
Attente 10 min.			
Eau distillée q.s.p.	ml:	100	100

\* 2 répétitions et 3 analyses d'azote sur chacune.

*Mode opératoire:* dans un distillateur d'azote (BUCHI), on neutralise une partie aliquote de 50 ml de minéralisat par 12 ml de lessive de soude à 60%; l'entraînement à la vapeur de l'ammoniac se fait en 3 min. après l'apparition de la première goutte d'ammoniac, mais nous avons distillé par sécurité pendant 6 min. L'ammoniaque récupérée dans 20 ml d'acide borique à 4% et 5 gouttes de réactif de Tashiro, est titrée par de l'acide sulfurique titrisol 0,05 N (env. 2,4 ml). Le virage se fait à pH 5,1–5,3, soit à l'obtention d'un rose persistant.

### III. RESULTATS ET DISCUSSIONS.

#### 3.1) PREMIER ESSAI:

Nous constatons (tableau) que pour le dosage de P, K, et Na, l'attaque par l'acide nitrique à chaud est la méthode la plus fidèle (coeff. de variation de 1,57 à 1,93). L'adjonction d'acide perchlorique semble donner des résultats qui ne diffèrent pas significativement des précédents, mais conduit à une perte de précision. La première méthode peut donc servir de témoin de référence.

L'attaque oxydante ( $H_2SO_4 + H_2O_2$ ) paraît donner d'excellents résultats pour le potassium (CV=2,08%) et le sodium malgré une fidélité moins bonne (CV=7,33%). Il n'y a pas de différence très significative avec la méthode considérée comme référence. Cependant, l'analyse du phosphate montre malgré l'homogénéité des résultats, une tendance de la méthode à majorer les teneurs. Ceci nous paraît dû à la difficulté d'obtenir une coloration phosphovanadomolybdique stable dans un milieu aussi oxydant. Une mise au point est encore nécessaire, visant notamment à dégrader l'eau oxygénée (ébullition) ou à doser le P par une autre méthode.

#### 3.2) DEUXIEME ESSAI:

3.2.1) *Cations:* Sur un échantillonnage plus grand de feuilles de luzerne, nous constatons la très grande imprécision de la méthode de calcination au four pourtant couramment pratiquée, comparativement à la méthode oxydante. En effet, au moins pour les cations dosés, les coefficients de variation obtenus par cette méthode sont très faibles et toujours inférieurs à ceux que l'on obtient par calcination. Seul le cas du Na peut paraître discordant (CV=15,9%) mais peut s'expliquer par la faiblesse des teneurs des feuilles de luzerne et cet élément; 500 à 600 ppm. Les effets signalés par MORARD et coll. pour les dosages de Ca et Na après attaque Kjeldahl ne sont pas tous retrouvés; seul l'effet dépressif de l'acide sulfurique sur le Ca est très significatif (P=1%), la libération de Na par le verre des erlenmeyers ne l'étant pas du tout (5%).

3.2.2) *Oligoéléments*: seul le fer a pu être dosé correctement; en effet, les feuilles de luzerne analysées étaient trop pauvres en Mn, Cu et Zn (de l'ordre de 50 ppm) pour un dosage direct en absorption atomique. Il suffirait donc de reprendre le résidu d'attaque dans un volume plus faible en augmentant, si besoin, la prise d'essai. Il y a également un effet dépressif significatif du milieu oxydant sur le dosage du fer — ou une attaque incomplète — car la teneur obtenue par cette méthode est faible; cependant les coefficients de variation sont de moitié inférieurs.

TABLEAU: Résultats des analyses chimiques.

Teneurs moyennes (% de la matière sèche). Coefficients de variation (CV)

Technique de minéralisation		N	P	K	Na	Ca	Mg	Fe
HNO <sub>3</sub> à chaud	n		5	5	5		Sur	
	moy. %		3,96*	5,77*	2,20*		b	
	CV %		1,57	1,85	1,93		e	
<hr/>								
HNO <sub>3</sub> + HClO <sub>4</sub>	n		4	4	4		t	
	moy. %		4,04*	5,85*	2,12*		e	
	CV %		2,27	2,09	3,19		r	
<hr/>								
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	n		7	10	10		a	
	moy. %		6,53	4,95*	2,00*		v	
	CV %		7,20	2,08	7,33		e	
<hr/>								
		N	P	K	Na	Ca	Mg	Fe
CALC. AU FOUR	n		Sur	11	10	11	11	10
	moy. %		u	2,52	0,05*	2,77	0,39	562 ppm
	CV %		z	15,36	17,95	6,33	3,32	16,48
<hr/>								
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	n	8	e	11	11	11	11	11
	moy. %	1,52	r	3,14	0,06*	2,67	0,43	486 ppm
	CV %	6,58	e	1,28	15,90	2,13	1,04	7,97

n: nombre de répétitions

\*: résultats ne différant pas de façon très significative (P = 1 %) au test de Fisher.

3.2.3) *Azote*: n'ayant pas pu confronter l'attaque oxydante à l'attaque Kjeldahl habituelle, nous avons testé l'effet de la solution d'attaque oxydante sur une solution titrée de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Dans les conditions de l'essai, soit 25 ml d'une solution d'attaque ou du témoin (3,5 mg de N dans les deux cas), il faut, après distillation, neutraliser en moyenne ( $n=6$ ) par:

3,70\* ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,05 N (CV=3,92) après attaque  
 3,82\* ml » » » (CV=0,74) pour le témoin  
 5,00 ml » » » pour la neutralisation théorique.

\* Résultats très significativement différents (F de Fisher à 1%).

On remarque donc que l'erreur due à la méthode (témoin) est importante puisqu'elle ne dose que 76,4% de l'azote placé, mais que celle-ci est très fidèle (CV=0,74% sur le dosage). D'autre part, l'attaque oxydante semble exercer un effet dépressif très significatif par rapport au témoin sur le dosage de l'azote: 74,0% de l'azote placé est ainsi dosé. Une correction systématique pourrait donc être faite sur toutes les analyses. En fait, l'essentiel serait de comparer la méthode à la méthode Kjeldahl classique en présence de Selenium seul. Ces deux attaques étant sulfuriques, un éventuel effet dépressif pourrait être attribué à une attaque incomplète ou à l'eau oxygénée. Dans ce dernier cas, la différence serait très mineure, l'attaque oxydante permettant de doser 97% de l'azote trouvé dans le témoin. Cette attaque pourrait donc convenir très bien, l'essentiel de l'erreur provenant de la méthode de dosage.

Nous pouvons donc dire que l'attaque oxydante est parfaitement adéquate pour le dosage des cations et au moins fidèle pour le dosage de l'azote.

#### IV. CONCLUSIONS.

Ces essais représentent une première mise au point d'une méthode rapide et fiable d'analyse. D'autres essais sont à réaliser en plus grand nombre sur différents végétaux et une méthode d'analyse plus juste du phosphore doit être mise au point. En l'état actuel, la méthode d'attaque par l'acide nitrique à chaud paraît être la plus fiable, mais exclut le dosage de l'azote. La calcination au four paraît largement imprécise et devrait être abandonnée. Quant à l'attaque en milieu oxydant (ac. sulfurique et eau oxygénée), elle s'est révélée être une méthode:

1 - *très rapide*: 30 minutes environ pour 10 échantillons. On peut donc multiplier les échantillons ou les prélèvements (meilleure précision), ou analyser rapidement un processus évolutif (tests de contrôles, etc.).

2 - *très économique*: ni matériel spécial (verrerie et produits courants), ni frais de chauffage; une seule minéralisation pour une analyse complète.

3 - *très fidèle*: pour Na, K, Ca, Mg, Fe, et N, et très certainement aussi pour les oligoéléments quand ils s'y trouvent en quantité suffisante. Pour le phosphore, une mise au point est nécessaire car les résultats, bien que fidèles, ne sont pas justes. A priori, d'autres éléments, comme les anions, pourraient être dosés par cette méthode.

4 - permettant l'*analyse complète* d'un échantillon sur un seul prélèvement d'un poids très faible (200 mg), pouvant même être ramené à 100 mg.

5 - permettant l'*analyse en série* dans les cas de diagnostic foliaire, de contrôles de fabrication (industries alimentaires et des aliments du bétail), de recherche (physiologie veg.).

Cette méthode pourrait être améliorée par l'emploi d'eau oxygénée à très haute teneur (200 vol.) et éventuellement d'un catalyseur. Elle pourrait alors être automatisée, étape nécessaire pour un laboratoire d'analyse ou de recherche.

## BIBLIOGRAPHIE

- Centre d'Etudes Phytosociologiques et Ecologiques (CEPE) - *Méthodes et techniques des analyses de terres* (polycopié). Montpellier, 1967.
- JURION R. - *Application de quelques méthodes récentes du dosage des éléments majeurs dans les végétaux*. Chim. Anal., 1968, 50 (6), 325-33.
- Laboratoire d'analyses en série - *Dosage de l'acide phosphorique par la méthode Joret-Hebert*. Méthodes d'analyses (polycopié), 1963.
- LUBOCHINSKY B. et ZALTA J. P. - *Microdosage colorimétrique de l'azote ammoniacal*. Bull. Soc. Chim. Biol., 1954, 36 (9), 1363.
- MORARD P. et GULLO - *Minéralisation des tissus végétaux en vue du dosage de P, K, Ca, Mg, Na*. Ann. Agro., 1970, 21 (2), 229-36.