

Comparaison de deux méthodes spectrophotométriques de dosage de l'acide phosphorique. Application à des sols et des végétaux

Sylvie Milin¹

Résumé. Deux méthodes de dosage colorimétrique de l'acide ortho-phosphorique sont généralement utilisées à des fins de recherche : la méthode conventionnelle au bleu céruléomolybdique (ou bleu de molybdène) (méthode Murphy et Riley) et une méthode alternative au vert de malachite (méthode Van Veldhoven). Nous avons automatisé la méthode au bleu sur une chaîne à flux continu segmenté puis nous l'avons comparée au dosage manuel au vert. Deux critères de performance mettent en valeur la méthode automatisée au bleu : sa grande dynamique de réponse (de 4 et 1200 µg P/L) et son haut degré d'autonomie. Deux critères discriminent favorablement le dosage au vert : sa simplicité de mise en œuvre et sa sensibilité de réponse environ cinq fois plus grande que la méthode au bleu en flux continu. Le dosage automatisé au bleu est plus précis ($cv \leq 1\%$ sur des solutions synthétiques) pour des teneurs inférieures ou égales à 20 µg P/L ; au-delà, les erreurs relatives des deux méthodes sont inférieures à 2%. Nous avons analysé le Phosphore soluble à l'eau dans des sols et le Phosphore total dans des ajoncs : la comparaison des valeurs obtenues par les deux méthodes colorimétriques donne des teneurs bien corrélées dans les sols ($r^2=0,9974$) et non significativement différentes ; elles sont parfaitement corrélées dans les ajoncs ($r^2=1$) et significativement supérieures de 3% par la méthode au vert comparativement à la méthode conventionnelle automatisée.

Mots clés : phosphore, orthophosphates inorganiques, analyse chimique, colorimétrie, bleu de molybdène, vert de malachite, flux continu segmenté

Introduction

Face à l'augmentation de la population mondiale et à la montée en puissance des problématiques écologiques, la mission de l'Unité mixte de recherches TCEM¹ de l'Inra de Bordeaux-Aquitaine est de gérer durablement la fertilité chimique des sols agricoles et forestiers, tout en préservant l'environnement ainsi que la qualité et la sécurité sanitaire des produits récoltés. Pour y répondre, les recherches de l'Unité portent sur la **biogéochimie des éléments minéraux nutritifs majeurs** (N, P, K, etc.) **et des métaux** (Fe, Cu, Zn, Mn, Pb, etc.).

Le phosphore est un facteur limitant majeur de la production agricole et une ressource non renouvelable ; sa fertilisation doit donc être raisonnée par l'élaboration d'un conseil agronomique.

La détermination de P total dans le sol présente peu d'intérêt agronomique mais la caractérisation de la **biodisponibilité du phosphore du sol pour la plante** revêt une importance capitale pour nos recherches.

¹ UMR 1220 TCEM Transfert sol-plante et Cycle des Eléments Minéraux dans les écosystèmes cultivés, INRA - Bordeaux Sciences Agro - F- 33883, Villenave d'Ornon BP81, France

☎ 05 57 12 25 18 ✉ milin@bordeaux.inra.fr

Le phosphore biodisponible ou « assimilable » désigne, au sein de la quantité totale d'un sol, la fraction de P susceptible d'être prélevée par la plante ; cette dernière absorbe le phosphore dans la solution du sol essentiellement par ses racines, sous forme d'ions orthophosphates dissous (H_2PO_4^- , HPO_4^{3-} ou PO_4^{3-}).

Les techniques d'extraction du P assimilable dans les sols sont nombreuses : l'extractant peut être de l'eau (extraction du P dissous) ou des acides et bases plus ou moins concentrés permettant d'extraire plus ou moins fortement les ions P retenus par les oxydes d'aluminium et de fer ou encore par le calcium. Au laboratoire, nous utilisons essentiellement deux méthodes d'extraction : la méthode Olsen (NaHCO_3 à pH8,5) car elle est communément utilisée dans le contexte des grandes cultures et en forêts, et la méthode d'extraction simple à l'eau car elle reflète le mieux la concentration en P de la solution du sol. Les teneurs en **P soluble à l'eau dans les sols** sont en général très faibles (de **0,01mg à 5mg de P par kg de sol sec**). Afin d'étudier les limites minimales de concentration en P, nous avons choisi d'une part la deuxième extraction (à l'eau) car elle extrait moins de P, et d'autre part des sols forestiers en raison de leur très faible teneur en P biodisponible due à une très faible réactivité des constituants solides de ces sols. Dans la quasi-totalité des méthodes d'extraction de P dans le sol, le dosage des extraits est basé sur la méthode conventionnelle au bleu céruléomolybdique.

Nous analysons aussi le **phosphore total** dans la solution du sol, les eaux de surface et les **végétaux** (ces derniers après minéralisation nitrique et reprise (avec de l'eau ultra-pure) du résidu évaporé). Les teneurs en P dans les végétaux varient de **10 à 3000mg de P par kg d'échantillon sec**. Dans cet article, nous avons quantifié P dans des poudres d'ajoncs du sous-bois des forêts des Landes.

Nous avons adapté la méthode au bleu en flux continu segmenté car elle permet une réduction chimique parfaitement répétitive. A l'inverse, nous n'avons pas tenté d'automatiser le dosage au vert de malachite car, selon certains auteurs (dont Muñoz et al., 1997), il serait difficile à adapter en flux continu à cause de l'accumulation progressive du colorant sur les parois internes des tubes du circuit analytique, créant une dérive importante de ligne de base.

L'objet de ce travail est de répondre à la question : « **parmi les deux méthodes, quelle est la plus adaptée aux besoins des chercheurs ?** ». Pour cela, nous avons comparé les performances de ces deux méthodes.

Quelques auteurs ont déjà comparé ces deux méthodes colorimétriques mais avec la même technique : soit manuelle (Irving et Mc Laughlin, 1990 - Ohno et Zibilske, 1991 - Subba Rao et al., 1997), soit en flux continu segmenté (Fernandez et al., 1985), soit par robotisation sur microplaques (Cogan et al., 1999). Tous reconnaissent les avantages de la méthode alternative au vert de malachite en terme de faisabilité (simplicité, utilisation de peu de réactifs, stabilité des réactifs) et de sensibilité par rapport à celle au bleu. Malgré cela, la méthode la plus ancienne, au bleu céruléomolybdique, reste la méthode normalisée de référence.

Cet article décrit d'abord les deux principaux critères favorables au dosage automatisé au bleu céruléomolybdique puis les deux principaux avantages du dosage manuel au vert ; enfin les critères de précision puis d'exactitude des deux méthodes, quoique non clairement discriminants, méritent d'être présentés.

1. Principes, matériel et méthodes

1.1. Dosage colorimétrique au bleu céruléomolybdique en flux continu segmenté

1.1.a. Principe du dosage colorimétrique (Murphy et Riley, 1962)

L'acide orthophosphorique résultant de l'acidification des ions phosphates forme avec l'acide molybdique et l'antimoine un complexe antimoine-phosphate-molybdate. Ce dernier est alors réduit par de l'acide ascorbique en un complexe coloré bleu appelé complexe céruléomolybdique, dont l'intensité de couleur ou densité optique est proportionnelle à la concentration en P et est mesurée à la longueur d'onde de 880 nm.

Le phosphore dosé est du phosphore minéral, sous forme d'orthophosphates ou de polyphosphates (P_xO_y).

Les réactions chimiques successives sont :

(i) acidification des phosphates :

(orthophosphates ou polyphosphates) + acide sulfurique \Rightarrow acide orthophosphorique H_3PO_4

(ii) complexation de l'acide phosphorique par l'acide molybdique :

acide orthophosphorique + acide molybdique \rightleftharpoons complexe phosphomolybdique
(1 molécule) (12 molécules) (1 molécule)

(iii) réduction du complexe phosphomolybdique par l'acide ascorbique :

complexe phosphomolybdique + acide ascorbique + antimoine \rightleftharpoons Complexe réduit de phosphomolybdate et d'antimoine
(incolore) (réducteur) (catalyseur) (1 molécule)(bleu)

Les réactions d'équilibre ii et iii sont déplacées vers la droite (dans le sens de la formation du complexe coloré) par un excès d'acide molybdique (molybdate d'ammonium acidifié) et d'acide ascorbique.

1.1.b. Principe général du flux continu segmenté

Cette technique automatisée consiste d'abord à pomper des réactifs **en continu**, à une vitesse constante mais à un débit qui dépend du diamètre interne des tubes de pompe choisis par l'opérateur. Les échantillons sont ensuite prélevés automatiquement à une cadence analytique constante prédéfinie ; ils sont séparés l'un de l'autre par **segmentation** par de l'air (comprimé ou non), et sont injectés dans le **flux** de réactifs pour y être mélangés et/ou dialysés et/ou chauffés, selon la réaction chimique désirée. Enfin, le flux est débullé avant sa lecture au détecteur spectrophotométrique (à filtre optique).

1.1.c. Matériel

Notre laboratoire dispose d'une chaîne multiparamétrique à flux continu (**Photo 1**) fabriquée et commercialisée par la société Skalar[®]. L'autoanalyseur appelé San²⁺ (**Photos 1 et 2**) est le « cœur » du système et permet de **doser indépendamment ou simultanément** les chlorures, les sulfates, les nitrates, les phosphates, l'ammonium.

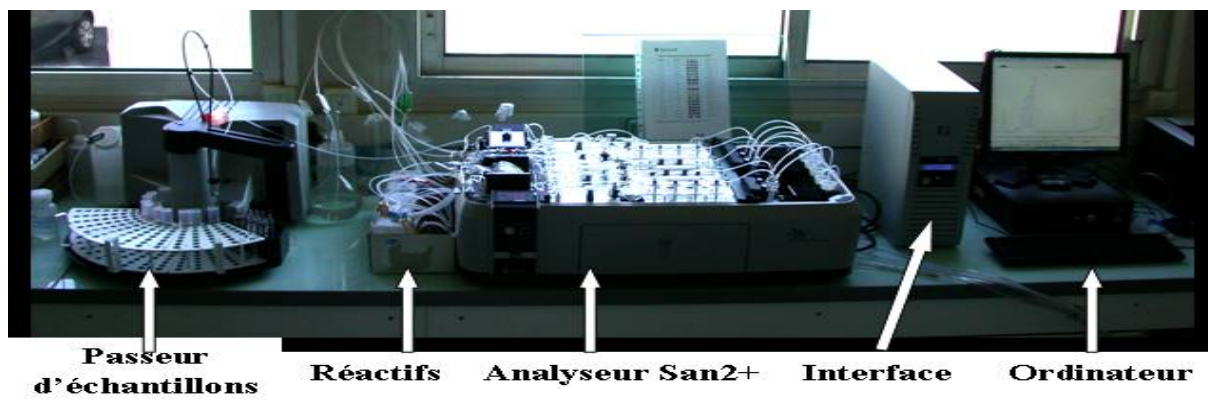


Photo 1. Vue générale de la chaîne multiparamétrique à flux continu segmenté (Skalar®)

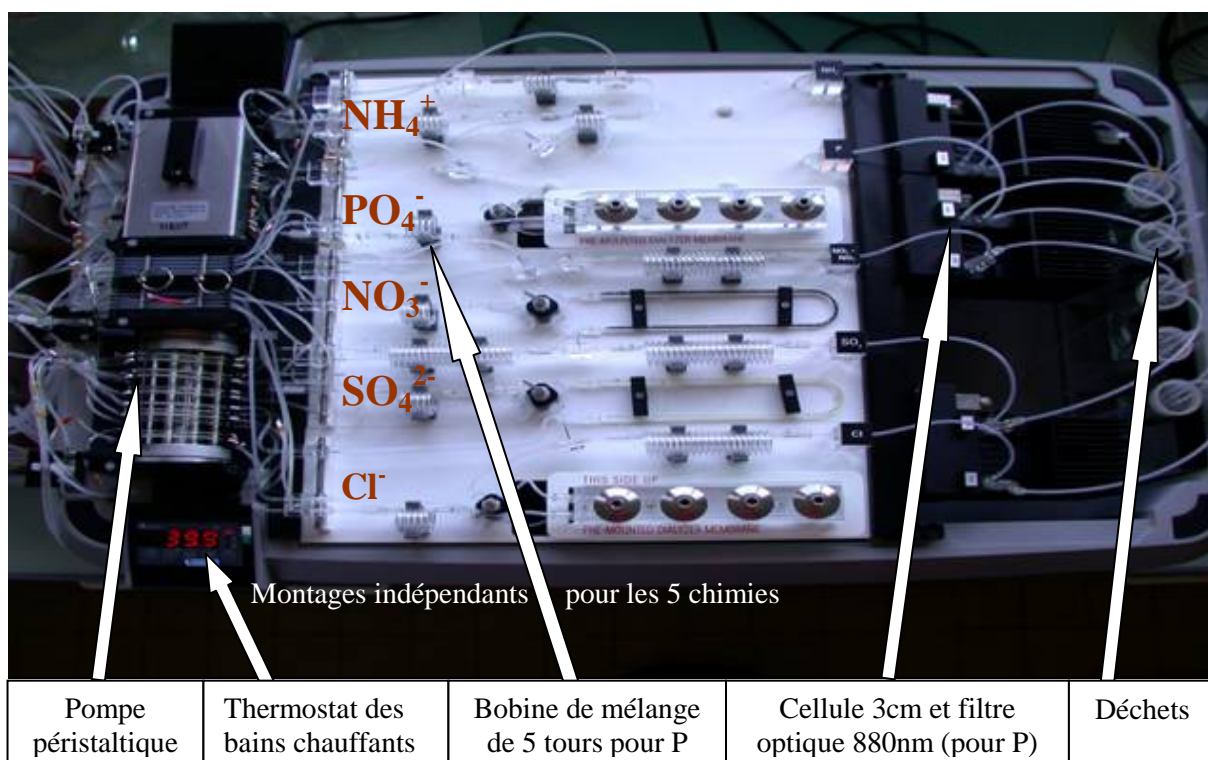


Photo 2. Vue de haut de l'analyseur San²⁺ (Skalar®)

1.1.d. Mode opératoire (norme ISO 15681-2)

Les solutions-réactifs et les solutions étalons sont préparées dans de l'eau ultra-pure (résistivité supérieure à 14MΩ cm⁻¹). Sauf mentions contraires, les produits chimiques sont de marque Merck. Trois solutions-réactifs sont préparées :

réactif 1 : 1 litre de solution d'H₂SO₄ à 6,8% (v/v) (Prolabo) + 2mL de « FFD6 » ; le FFD6 est un tensioactif anionique commercialisé uniquement par Skalar®, utilisé en flux continu pour abaisser la tension de surface entre la phase liquide et l'air dans le circuit analytique ; il permet donc de diminuer la contamination entre les échantillons ;

réactif 2 : 1 litre de solution acide d'heptamolybdate d'ammonium (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 4H₂O à 4,8g/L contenant 40mL d'H₂SO₄ pur (Prolabo 95% v/v) ;

réactif 3 : 1 litre de solution d'acide ascorbique à 18g/L et de tartrate de potassium et d'antimoine K(SbO)C₄H₄O₆, 1/2H₂O à 60mg/L.

Ces trois solutions se conservent une semaine : les solutions 1 et 2 sont gardées à température ambiante alors que la solution d'acide ascorbique non consommée dans la journée est stockée à +4°C jusqu'à analyse.

La solution mère étalon de phosphate à 326mg P/L est sous forme de dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4) et se conserve à +4°C. Les solutions filles sont préparées extemporanément et leur concentration varie de 0 à 1,4mg P /L.

La solution d'acide sulfurique est pompée en continu à un débit de 0,16mL/min, les solutions de molybdate d'ammonium et d'acide ascorbique sont pompées indépendamment à des débits de 0,23mL/min. La cadence analytique est de 36 dosages par heure (35s de prélèvement et 65s de rinçage). L'échantillon arrive dans le circuit analytique à un débit de 0,80mL/min, où il est acidifié avec l'acide sulfurique dans une bobine de mélange de 5 tours, puis réagit avec l'acide molybdique et enfin avec la solution d'acide ascorbique et d'antimoine avant d'être mélangé dans une bobine de 20 tours thermostatée à 40°C. Au bout d'environ 8 min, le flux est débullé juste avant son arrivée dans la cellule de mesure de trajet optique 3cm. La lecture informatisée du signal de densité optique se fait en hauteur de pic colorimétrique.

1.2. Dosage colorimétrique manuel au vert de malachite

1.2.a. Principe

L'acide orthophosphorique résultant de l'acidification des ions phosphates forme avec l'acide molybdique un complexe phosphate-molybdate qui s'associe avec le vert de malachite (légèrement jaune en milieu acide et en l'absence de P) pour donner un complexe coloré en vert ; on mesure l'intensité de la couleur (densité optique) en point final à 610 nm sur un spectrophotomètre UV-visible mono faisceau à réseau, de marque Hélios Epsilon (Thermo Scientific®).

Le phosphore dosé est du phosphore minéral, sous forme d'orthophosphates ou de polyphosphates (P_xO_y).

Les deux premières réactions chimiques sont identiques à celles par la méthode au bleu :

(i) acidification des phosphates :

(orthophosphates ou polyphosphates) + acide sulfurique \Rightarrow acide orthophosphorique H_3PO_4

(ii) complexation de l'acide phosphorique par l'acide molybdique :

acide orthophosphorique + acide molybdique \Rightarrow complexe
phosphomolybdique (1 molécule) (12 molécules) (1 molécule)

(iii) formation de paires d'ions entre le phosphomolybdate et le vert de malachite :

complexe phosphomolybdique + vert malachite acidifié \Rightarrow complexe vert de phosphomolybdate et de vert de malachite (1 molécule)
(1 molécule) (3 molécules) (jaune à pH<0)

Les réactions d'équilibre ii et iii sont déplacées vers la droite par un excès d'acide molybdique (molybdate d'ammonium acidifié) (ii) et de vert de malachite (iii).

1.2.b. Mode opératoire (Van Veldhoven et Mannaerts, 1987)

Les solutions-réactifs et les solutions étalons sont préparées dans de l'eau ultra-pure (de résistivité supérieure à $14\text{M}\Omega\text{ cm}^{-1}$). Deux solutions-réactifs sont préparées :

réactif 1 : 1 litre de solution acide d'heptamolybdate d'ammonium $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}, 4\text{H}_2\text{O}$ à 17,55g/L contenant 168mL d' H_2SO_4 pur (à 95% v/v) ;

réactif 2 : 1 litre d'une solution d'alcool polyvinylique ou PVA à 3,5g/L (obtenu après dissolution dans de l'eau à 80°C) contenant 0,35g d'oxalate de vert de malachite ; le PVA que nous utilisons est commercialisé chez VWR (référence 305735B) et sa masse molaire est de 22 000 g/mole (il est différent de celui de Van Veldhoven) : il sert à stabiliser le complexe coloré formé.

Plusieurs auteurs (notamment Carter et Karl, 1982, Ohno et Zibilske, 1991) et nous-mêmes soulignent l'importance de la qualité, du degré de polymérisation et du fournisseur du PVA sur la sensibilité de la méthode. Les deux solutions-réactifs sont très stables : elles se conservent un an au réfrigérateur.

La solution mère étalon à 326mg P/L est sous forme de dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4) et se conserve à $+4^\circ\text{C}$. On prépare quatre solutions étalons aqueuses de P : (i) 1,4mg P/L, (ii) 1,2mg P/L, (iii) 1,0mg P/L, (iv) 0,01mg P/L dans de l'eau ultra-pure.

Dans un tube de 3mL, on met entre 200 μL et 1mL maximum des étalons pour avoir 19 solutions contenant entre 0 et 1,4 μg de P que l'on complète à 1mL avec de l'eau ultra-pure ; on ajoute 200 μL de la solution acide de molybdate d'ammonium, que l'on agite vigoureusement. Après 10 min d'attente, on ajoute 200 μL de la solution de vert de malachite que l'on mélange. Après environ 2 h on lit manuellement la densité optique à 610 nm dans une cuve à usage unique de 1cm de trajet optique. Les données sont ensuite traitées sous Excel pour être transformées en concentration en P.

1.3. Traitement des échantillons avant dosage

L'étude est réalisée sur quatre échantillons : deux sols de forêts et deux poudres d'ajoncs.

Les deux sols forestiers des Landes de Gascogne, numérotés A et B (**Tableau 1**) sont séchés à l'air libre puis tamisés à 2 mm ; le P assimilable est extrait à l'eau, avec 1% (v/v) de toluène comme stabilisateur microbien : 10g de sol sec sont agités dans 15mL d'eau ultra-pure pendant 16h puis filtrés sur filtre-seringue à 0,2 μm .

Les deux échantillons d'ajoncs du sous-bois des Landes de Gascogne, numérotés C et D (**Tableau 1**) sont séchés à 55°C puis broyés au broyeur à couteaux (tamis 0,5mm) ; les poudres obtenues (300mg de prise d'essai) sont calcinées puis les cendres sont attaquées à chaud par de l'acide nitrique pur en milieu ouvert ; après évaporation de l'acide nitrique, le résidu est repris par de l'eau ultra-pure avant d'être filtré sur papier Whatman n°541, réceptionné dans une fiole de 50mL complétée au trait de jauge avec de l'eau ultra-pure.

Quatre ajouts dosés de P sont réalisés par échantillon ; P est ajouté **directement dans les extraits aqueux de sols** pour ne pas introduire de biais dû à l'adsorption de P à la surface du sol, **mais aussi directement dans les minéralisats d'ajoncs** pour homogénéiser le protocole. **Le même extrait est utilisé pour les deux dosages** qui sont faits le même jour sur trois répétitions successives de mesures. Avant analyse, le minéralisat D est dilué au 1/5 dans de l'eau ultra-pure pour cadrer sa concentration dans le domaine de linéarité des méthodes.

Tableau 1. Ajouts dosés de P réalisés dans les différents échantillons extraits

N°	Nature	Sol fertilisé en P ?	µgP/kg dans l'échant.	µgP/L initial approximatif dans l'extrait	Ajouts de P dans l'extrait (µgP/L)			
					2,50	5,00	10,00	31,25
A	Sol forestier landais (0-15cm)	Non	11	8	2,50	5,00	10,00	31,25
B		Oui	45	35	100,0	187,5	250,0	375,0
C	Ajonc de forêt landaise	Non	45 000	270	140	280	420	630
D		Oui	417 000	2500	1500	3000	4500	6000

1.4. Critère de linéarité

Nous avons estimé arbitrairement que la réponse donnant la densité optique en fonction de la concentration en phosphore initiale (avant ajout des réactifs) est linéaire si le coefficient de corrélation r^2 est supérieur à 0,999.

Nous avons quantifié les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ). La LOD est la plus petite valeur détectée mais non quantifiable ; la LOQ est la plus petite valeur quantifiée. Ces limites sont déterminées sur la base de 10 mesures successives d'un blanc d'eau ultra-pure (Afnor XPT 90-210, 1999) :

- ✓ densité optique de la LOD = densité optique moyenne des 10 blancs + 3*écart-type des 10 mesures de densité optique ;
- ✓ densité optique de la LOQ = densité optique moyenne des 10 blancs + 10*écart-type des 10 mesures de densité optique ;

Puis l'équation de la fonction d'étalonnage calculée précédemment permet de calculer respectivement la LOD et la LOQ (en mg/L).

1.5. Critère de sensibilité

La sensibilité d'une méthode caractérise sa capacité à répondre le plus fortement possible à une faible variation de concentration de l'analyte à doser. Elle s'exprime par le rapport du signal (DO) sur la concentration c en phosphore dans la cellule de mesure. Or, en colorimétrie et dans le domaine de linéarité de la méthode, la loi de Beer-Lambert s'applique :

$DO/c = \epsilon d$, où ϵ est le coefficient d'absorption moléculaire caractéristique de la substance absorbante à une longueur d'onde donnée et une température donnée et d est le trajet optique (ou épaisseur) de la cellule en cm.

ϵ caractérise donc la sensibilité de la méthode colorimétrique et s'exprime en $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

On le calcule à partir de la pente (DO/c) des droites de chaque méthode et de la valeur d .

1.6. Critère d'exactitude

Il s'agit de vérifier si les résultats obtenus par la méthode alternative au vert sont significativement différents de la méthode de référence au bleu céruléomolybdique automatisée. Pour chaque type d'échantillon (sol ou ajonc) traité à part, on compare l'ensemble des données expérimentales issues des ajouts dosés (sans et avec ajouts) ; on dispose de 10 valeurs moyennes de P par type d'échantillon et par méthode (**Tableau 2**).

Remarque : les ajouts dosés n'ayant pas permis de discriminer l'une des deux méthodes (aussi spécifiques l'une que l'autre), nous ne parlerons pas du critère de spécificité dans cet article.

Tableau 2. Nombre de valeurs n utilisées par méthode pour le test de justesse

Echant.	Nombre d'échant.	Nombre d'ajouts par échant.	Nombre de valeurs moyennes par échant. et par méthode (avec et sans ajout)	Nombre de répétitions de mesures par méthode	Nombre de valeurs n moyennes par méthode
Sols	2 (A et B)	4	4+1 = 5	3	$n = (4+1)*2 = 10$
Ajoncs	2 (C et D)	4	4+1 = 5	3	$n = (4+1)*2 = 10$

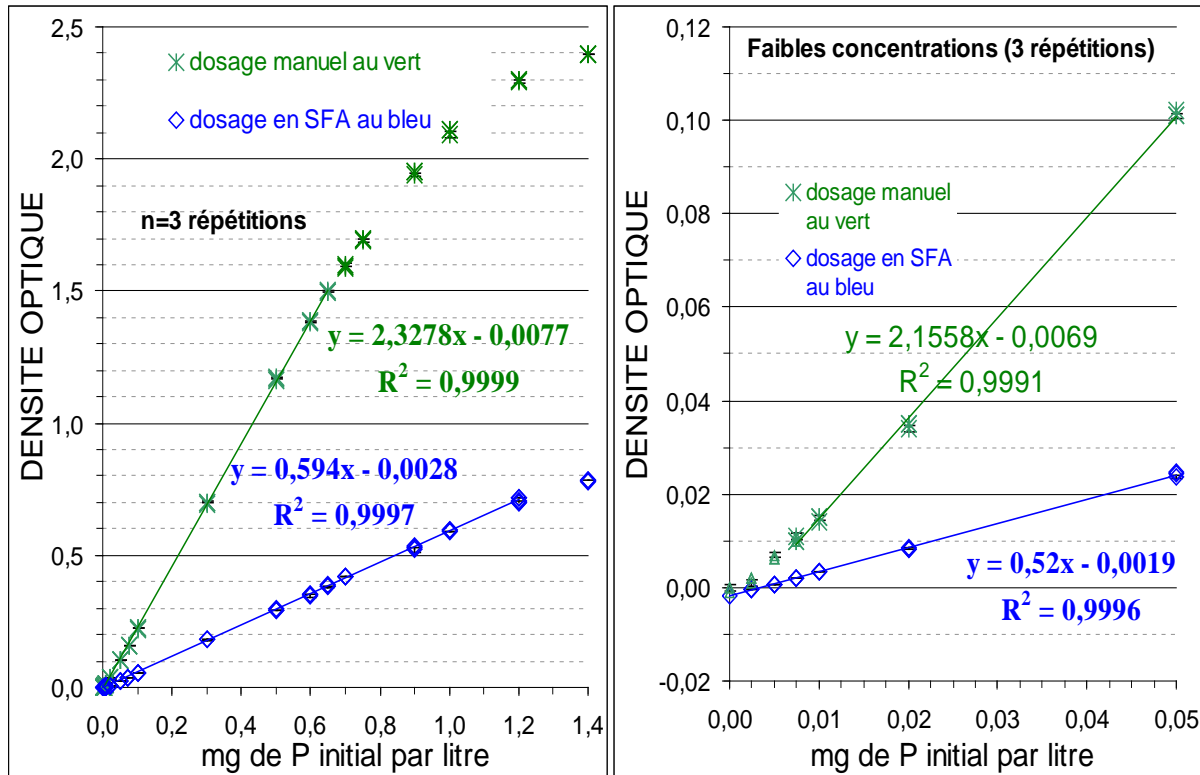
La relation reliant les teneurs obtenues par la méthode au bleu par rapport à celle au vert doit être la plus proche possible de la bissectrice d'équation $y=x$. On vérifie avec le test statistique de Student si l'ordonnée à l'origine n'est pas significativement différente de zéro et si la pente de la droite est significativement différente de 1 ; ce test bilatéral est réalisé sur $(10-2) = 8$ degrés de liberté, au risque 5% de se tromper.

2. Résultats et discussion

2.1. Critères favorables à la méthode au bleu céruléomolybdique

2.1.a. Linéarité de la fonction de réponse

✓ Détermination des limites supérieure et inférieure du domaine de linéarité



Figures 1 et 2. Moyenne \pm écart-type de densité optique (trois répétitions successives). Limites supérieures de linéarité (**Figure 1**) et limites inférieures de linéarité (**Figure 2**).

Les teneurs maximales initiales en P (**Figure 1**), au delà desquelles les réponses ne sont plus linéaires, sont 1,2mg P/L et 0,6mg P/L respectivement pour les dosages au bleu et au vert ; **la dynamique de réponse** pour la méthode au bleu est donc deux fois (=1,20/0,6) plus importante que la méthode alternative ; ceci s'explique par le facteur de dilution des phosphates engendré par l'ajout des réactifs : la méthode au bleu dilue environ deux fois plus que celle au vert (**Tableau 3**) : $(P_i/P_f)_{bleu}/(P_i/P_f)_{vert} = (1,20/0,395)/(0,6/0,429) = D_{bleu}/D_{vert} = 2,1$.

Dans les faibles valeurs (**Figure 2**), le dosage au bleu est plus linéaire que celui au vert.

Tableau 3. Effet de dilution des phosphates par les réactifs

	P _i = P initial maximum* (mgP/L)	Volume de d'échantillon (mL)	Volume total réactionnel (mL)	P _f = P final dans la cellule (mgP/L)	D= P _i /P _f <i>facteur de Dilution</i>	D _{bleu} /D _{vert} t
dosage au bleu (automatisé)	1,20	0,467**	1,42	0,395	3,04	~2,2
dosage au vert (manuel)	0,60	1,00	1,40	0,429	1,40	

* P initial maximum autorisé dans le domaine de linéarité de chaque méthode

** 0,467 mL est le volume d'échantillon prélevé en flux continu pendant 35 s avec un débit de pompage de 0,80mL/min (0,8mL/min x 35s/60s = 0,467mL) (voir §1.1.d)

Remarque : il ne faut pas confondre la concentration initiale en P (avant réaction) et la concentration finale dans la cellule de mesure.

✓ Détermination des limites de détection et de quantification du domaine de linéarité

Tableau 4. Détermination des LOD et LOQ

	DO moy. de 10 blancs (EUP)	Ecart-type de DO	cv (%)	Densité optique de la LOD	LOD (mg P/L)	Densité optique de la LOQ	LOQ (mg P/L)
dosage au bleu (automatisé)	-0,001808*	0,000157	9	-0,001338	0,002	-0,000243	0,004
dosage au vert (manuel)	0,000**	0,001	900	0,003	0,004	0,009	0,007

* 1 unité d'absorbance correspond à 1 000 000 unités digitales

** 1 unité d'absorbance correspond à 1 000 unités digitales

On peut donc en conclure (**Schéma 1**) que la méthode au bleu est la plus performante en terme de linéarité (grande dynamique de réponse, faibles LOD et LOQ).

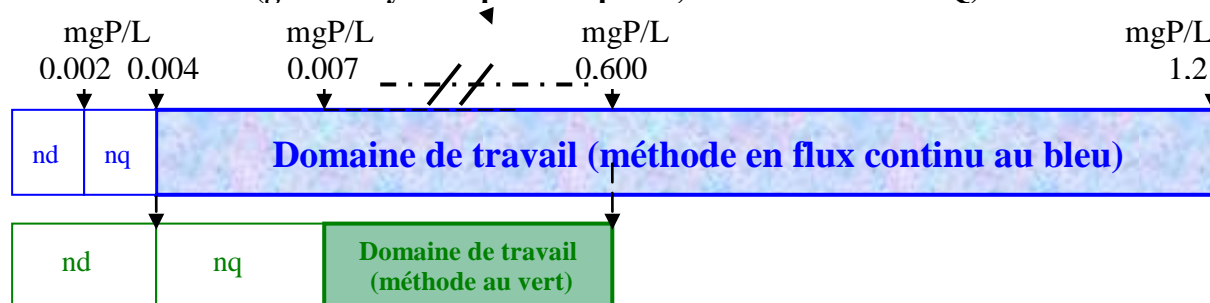


Schéma 1. Synthèse de l'étude de linéarité (nd = non détecté ; nq = non quantifié)

2.1.b. Degré d'automatisation

Pour le dosage au bleu en flux continu, la technique est automatisée sur 70 à 80% du temps total : une fois les réactifs et la gamme d'étalonnage préparés par le manipulateur, celui-ci programme puis lance sa séquence d'analyses sur la journée. Les données enregistrées donnent les densités optiques et aussi directement les concentrations en P.

Nous n'avons pas adapté en flux continu le dosage au vert de malachite (comme expliqué dans l'introduction). Le manipulateur intervient donc souvent manuellement : il n'intervient pas pendant environ 40% du temps correspondant aux deux heures d'attente du plateau de la réaction.

Ce critère est d'autant plus favorable à la méthode au bleu que le nombre d'échantillons à analyser est important.

2.2. Critères favorables à la méthode au vert de malachite

2.2 a. Simplicité et faisabilité

Le dosage manuel au vert est simple à mettre en œuvre ; il utilise seulement deux solutions-réactifs qui se conservent un an ; il ne nécessite pas de chauffage et convient parfaitement pour des dosages ponctuels de moins de 80 échantillons.

Le dosage automatisé au bleu est plus complexe par sa technicité. Les réactifs ne se conservent qu'une semaine. Ce dosage automatisé est adapté pour des analyses en série de 150 à 200 échantillons dosés quotidiennement, et/ou dans le cas d'analyses multi-élémentaires (NO_3^- et/ou NH_4^+ et/ou Cl^- et/ou SO_4^{2-}) pouvant être dosées simultanément.

2.2. b. Sensibilité

Dans le domaine de linéarité de chaque méthode, on obtient le graphe (**Figure 3**) représentant la densité optique en fonction de la **concentration finale en P dans la cellule** de mesure. Les pentes respectives (DO/c) des droites des méthodes au vert et au bleu (**Figure 3**) sont donc 3,2673 et 1,8062 L par mg de P.

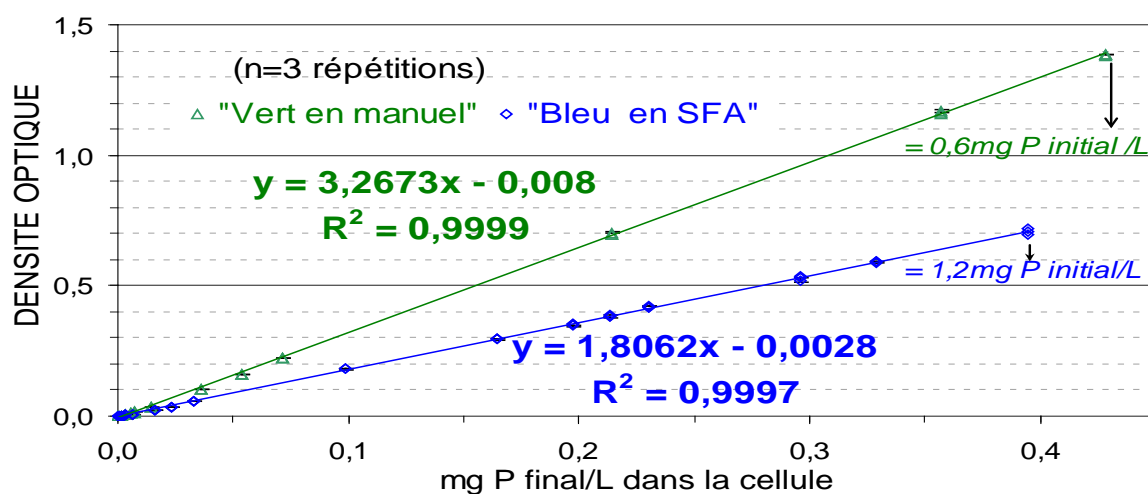


Figure 3. Etude de la sensibilité dans le domaine de linéarité des deux méthodes (n=3 répétitions, densité optique moyenne \pm écart-type).

Les trajets optiques respectifs pour les méthodes au vert et au bleu sont 1cm et 3cm.

Les coefficients d'extinction moléculaire (ϵ) sont calculés :

méthode au vert : $3,2673 \cdot 31 \cdot 1000 = 1,01 \cdot 10^5 \text{ Lmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$;

méthode au bleu : $1,8062 \cdot 31 \cdot 1000 / 3 = 0,19 \cdot 10^5 \text{ Lmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

La **méthode manuelle au vert** de malachite est donc environ **cinq fois plus sensible** (rapport $\epsilon_{\text{vert}}/\epsilon_{\text{bleu}} = 1,01 \cdot 10^5 / 0,19 \cdot 10^5 = 5,3$) que la méthode automatisée au bleu, à trajet optique équivalent et dans nos conditions opératoires.

Ce résultat paraît contradictoire avec une limite élevée de quantification obtenue par la méthode au vert (fin du §2.1.a). Deux hypothèses principales pourraient expliquer cette contradiction :

- ✓ **les performances propres de chaque détecteur** : le pouvoir de résolution du détecteur à réseaux utilisé dans la méthode au vert (1000 unités digitales) est plus faible (10^3 unités digitales) que celui à filtres utilisé dans la méthode au bleu (10^6 unités digitales), justifiant une plus faible précision dans les faibles densités optiques ;
- ✓ **la constante d'équilibre chimique réactionnel** de chaque méthode dans nos conditions opératoires : on pourrait penser que dans les faibles concentrations en P, le déplacement de l'équilibre chimique vers la droite (dans le sens de la formation du composé coloré) est plus difficile dans la méthode au vert que dans celle au bleu.

Par la méthode au vert, nous obtenons un coefficient d'extinction moléculaire quasiment équivalent (9% plus faible) à celui publié par Van Veldhoven (**Tableau 5**) dans les mêmes conditions opératoires et par la même technique.

Par la méthode au bleu, nos résultats concordent aussi avec ceux obtenus par Murphy et Riley : en flux continu nous obtenons un ϵ seulement 15% plus faible que celui publié par Murphy et Riley en dosage manuel (**Tableau 5**). Ceci s'explique par la **différence de temps réactionnel** : la mesure manuelle réalisée par Murphy et Riley (1962) en « point final » (signal stable et maximum) est faite au bout de 10 min alors que, par l'automatisation, le temps entre l'injection du dernier réactif et l'arrivée au colorimètre est d'environ 8 min ; le signal au bout de 8 min est donc environ 20% du signal maximum.

Tableau 5. Etude de la sensibilité des deux méthodes colorimétriques

<i>I^{er} auteur, année</i>	Technique	ϵ (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)
<i>Van Veldhoven, 1987</i>	<i>Manuelle</i>	<i>1,10*10⁵</i>
UMR TCEM	Manuelle	1,01*10 ⁵
<i>Murphy, 1962</i>	<i>Manuelle</i>	<i>0,22*10⁵</i>
UMR TCEM	Flux continu segmenté	0,19*10 ⁵

2.3. Précision des mesures sur trois répétitions successives d'étalons

Dans le domaine de linéarité de chaque méthode, le coefficient de variation (**Figure 4**) des trois mesures obtenues par le dosage manuel au vert augmente de façon inversement proportionnelle à la concentration en P, pour des teneurs inférieures ou égales à 50 µg P/L ; au contraire la précision relative de la méthode automatisée au bleu est indépendante de la concentration en P.

L'erreur relative principale par la méthode manuelle au vert est due à l'imprécision sur le volume prélevé (erreur relative d'autant plus grande que la concentration en P donc le volume est faible) ; au contraire la méthode automatisée qui utilise une pompe péristaltique prélève des volumes très répétables.

Par contre, à partir de 50 µg P/L, les erreurs principales affectant les mesures automatisées au bleu sont globalement deux fois plus grandes que celles au vert mais ne dépassent pas 2% (sauf pour 5 µg P/L où $cv = 9,5\%$) ; on peut l'expliquer par l'effet de contamination propre à la technique en flux continu (effet mémoire d'un échantillon sur l'échantillon qui le suit).

Les **erreurs principales** affectant la précision relative des mesures pour les deux méthodes sont donc **dues**, non à la méthode colorimétrique, mais à **la technique** utilisée (manuelle pour la méthode au vert et en flux continu pour la méthode conventionnelle) : elles **peuvent être atténuées mais pas supprimées**.

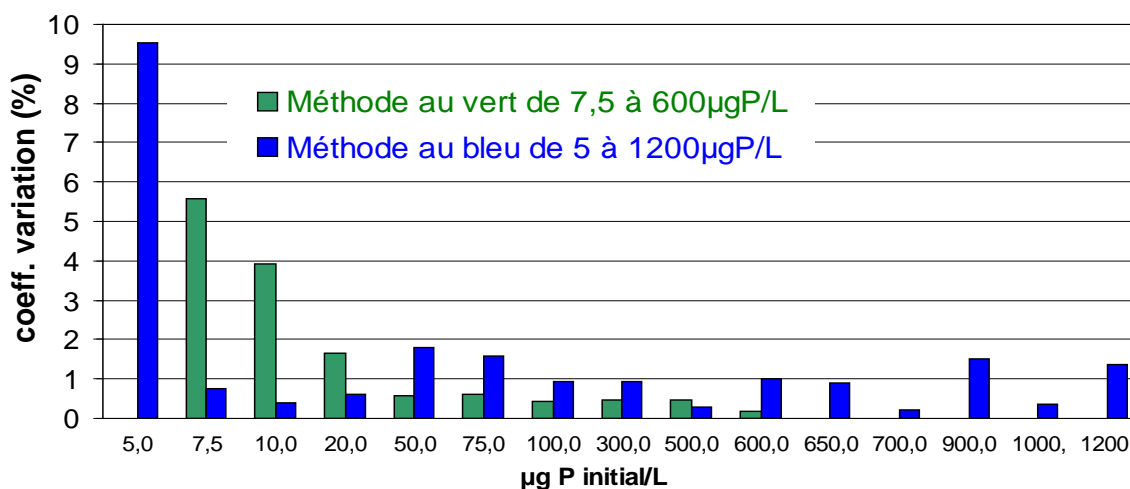


Figure 4. Mesures de la variation relative des mesures (coefficient de variation) sur trois répétitions successives et dans les zones de travail respectives des deux méthodes.

2.4. Exactitude de la méthode au vert par rapport à celle au bleu prise comme référence

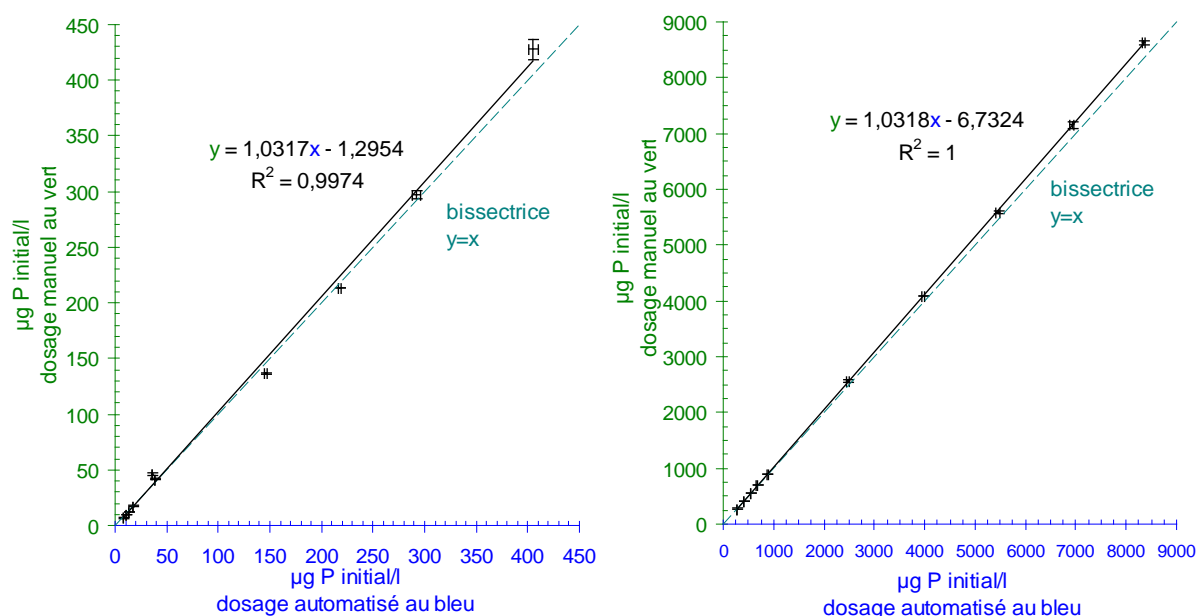
Les concentrations moyennes totales obtenues en P dans les extraits aqueux de sols et dans les minéralisats d'ajoncs sont rapportées dans le **Tableau 6**.

Les coefficients de corrélation des droites de régression reliant les deux dosages colorimétriques montrent que les résultats de P sont bien corrélés ($r^2=0,9974$ pour l'ensemble des 10 points constituant les extraits de sols (**Figure 5**) et fortement corrélés ($r^2=1,000$ pour les minéralisats d'ajoncs (**Figure 5bis**)). Pour les sols et les ajoncs, les pentes des droites sont équivalentes : 1,032.

Tableau 6. Comparaison des moyennes des résultats des ajouts dosés sur trois répétitions de mesures sur les extraits de sols et les minéralisats d'ajoncs (P_0 = teneur en P avant ajout)

	µgP/L	Méthode de référence au bleu		Méthode alternative au vert			µgP/L	Méthode de référence au bleu		Méthode alternative au vert	
		moy.	écart-type	Moy.	écart-type			moy.	écart-type	moy.	écart-type
SOL A	P_0	8,1	(0,1)	7,0	(0,5)	AJONC C	P_0	271	(5)	278	(11)
	P_0 +ajout1	10,6	(0,2)	9,8	(0,3)		P_0 +ajout1	410	(1)	412	(3)
	P_0 +ajout2	12,8	(0,1)	12,3	(0,02)		P_0 +ajout2	553	(4)	555	(1)
	P_0 +ajout3	17,5	(0,4)	17,4	(0,3)		P_0 +ajout3	675	(11)	696	(2)
	P_0 +ajout4	38,7	(0,3)	41,6	(0,3)		P_0 +ajout4	882	(10)	902	(3)
SOL B	P_0	35,8	(0,3)	46,1	(1,6)	AJONC D	P_0	2467	(23)	2562	(29)
	P_0 +ajout1	146,2	(1,4)	136,8	(0,3)		P_0 +ajout1	3972	(36)	4092	(4)
	P_0 +ajout2	217,7	(1,7)	213,6	(0,4)		P_0 +ajout2	5456	(49)	5583	(21)
	P_0 +ajout3	291,9	(3,5)	297,0	(4,0)		P_0 +ajout3	6925	(36)	7152	(55)
	P_0 +ajout4	405,5	(4,9)	427,7	(9,4)		P_0 +ajout4	8358	(26)	8626	(29)

Figures 5 (à gauche) et 5 bis (à droite). Comparaison des résultats de P dans les extraits de sols (**Figure 5**) et les minéralisats d'ajoncs (**Fig. 5bis**) : 10 valeurs moyennes par graphe ; trois répétitions successives ; barres d'erreurs x et y = écarts-types pour les deux méthodes.



Dans le cas des extraits de sols, les résultats du test statistique de Student (**Tableau 7**) montrent que l'ordonnée à l'origine n'est pas significativement différente de 0 (car $0,384 < 2,306$) et la pente de la droite n'est pas significativement différente de 1 (car $1,687 < 2,306$) ; les deux méthodes appliquées à des extraits aqueux de sols ne sont donc pas significativement différentes entre elles.

Dans le cas des ajoncs minéralisés (**Tableau 7**), l'ordonnée à l'origine n'est pas significativement différente de 0 (car $0,399 < 2,306$) mais la pente de la droite est significativement différente de 1,000 ; le dosage manuel au vert est donc significativement supérieur de 3% par rapport à la méthode au bleu prise comme référence.

Tableau 7. Test statistique de Student pour l'étude de l'exactitude des deux méthodes dans les extraits de sols et les minéralisats d'ajoncs au risque de 5 % de se tromper et pour n-2 degrés de liberté

Echantillon	Nombre de points n	Valeur critique pour l'ordonnée à l'origine	Ecart-type de l'ordonnée à l'origine	t obs (ordonnée origine)	Valeur critique pour la pente	Ecart-type de la pente	t obs (pente)	t Student
Sols	10	0,000	3,370	0,384	1,000	0,019	1,687	2,306
Ajoncs	10	0,000	16,874	0,399	1,000	0,004	7,798	2,306

Conclusions et perspectives

Cette étude comparative de deux méthodes de dosage colorimétrique de l'acide phosphorique a permis de montrer leur **complémentarité**. La méthode la plus adaptée aux besoins des chercheurs dépend **(1) du nombre d'échantillons** à analyser, **(2) du nombre de paramètres chimiques** supplémentaires (NO_3^- et/ou NH_4^+ et/ou Cl^- et/ou SO_4^{2-}) à analyser par échantillon, **(3) de la concentration attendue en P** dans l'extrait et **(4) du degré d'expérience** de l'analyste dans le domaine du flux continu. En effet, la méthode automatisée au bleu est très parfaitement adaptée dans le cas de grandes séries analytiques (au moins 200 échantillons) et/ou pour la détermination d'au moins un paramètre chimique supplémentaire sur l'autoanalyseur. Dans le cas de concentrations très faibles (inférieures à $20\mu\text{g P/L}$ dans l'extrait), le dosage automatisé au bleu est plus précis que la méthode manuelle au vert, mais celle-ci pourra être utilisée ponctuellement en augmentant la prise d'essai (1mL maximum d'extrait) et/ou en augmentant le rapport d'extraction (sol/eau).

Les résultats obtenus sur l'exactitude de la méthode au vert par rapport à celle au bleu prise comme référence doivent être validés par des échantillons de sols et de végétaux de nature plus variée que celle utilisée dans cet article.

A méthode colorimétrique équivalente, la technique en flux continu est qualitativement supérieure à la technique manuelle. L'automatisation du dosage colorimétrique au vert de malachite pourrait donc optimiser les performances du dosage du P (meilleure sensibilité par rapport à la méthode au bleu, et diminution de la limite de quantification) et permettre le dosage de traces de P dans les sols très peu réactifs ; mais les inconvénients majeurs sont l'encrassement progressif des tuyaux du circuit analytique par le colorant vert (Muñoz et al., 1997) et l'obtention d'un stabilisateur du complexe compatible avec le flux continu (Fernández et al., 1985). Nous pourrions réaliser ce test au laboratoire.

Références bibliographiques

Afnor XPT 90-210 (1999) Protocole d'évaluation d'une méthode alternative d'analyse physico-chimique quantitative par rapport à une méthode de référence.

Carter SG, Karl DW (1982) Inorganic phosphate assay with malachite green : an improvement and evaluation. *J Bioch Biophys Methods* **7**: 7-13.

Cogan EB, Birrell GB, Griffith OH (1999) A robotics-based automated assay for inorganic and organic phosphates. *Anal Biochem* **271** : 29-35.

Fernández JA, Niell FX, Lucena J (1985) A rapid and sensitive automated determination of phosphate in natural waters. *Limnol Oceanog* **30** : 227-230.

Irving G J, Mc Laughlin M J (1990) A rapid and simple field test for phosphorus in Olsen and Bray N°1 extracts of soil. *Commun Soil Sci Plant Anal* **21** (19&20) : 2245-2255.

ISO 15681-2. Determination of orthophosphate and total phosphorus contents by flow analysis, part 2 : Method by continuous flow analysis (CFA).

Muñoz A, Mas Torres F, Estela JM, Cerda V (1997) Evaluation of spectrophotometric methods for determination of orthophosphates by sequential injection analysis. *Anal Chim Acta* **350** : 21-29.

Murphy J, Riley JP (1962) A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal Chim Acta* **27** : 31-36.

Ohno T, Zibilske LM, 1991. Determination of low concentrations of phosphorus in soil extracts using malachite green. *Soil Sci Soc Am J*, **55** : 892-895.

Subba Rao A, Sammi Reddy K, Takkar PN (1997) Malachite green method compared to ascorbic acid for estimating small amounts of phosphorus in water, 0.01M calcium chloride, and Olsen soil extracts. *Commun Soil Sci Plant Anal* **28** : 589-601.

Van Veldhoven PP, Mannaerts G P (1987) Inorganic and organic phosphate measurements in the nanomolar range. *Anal Biochem* **161**, 45-48.

Remerciements

Je remercie sincèrement Christian Morel, Laurent Augusto et Monique Linères de l'UMR TCEM de l'Inra de Bordeaux pour les corrections apportées à cet article.