HAL open science

Dosage du phosphore (méthode au vert de malachite)

Eric Lecloux

To cite this version:

Eric Lecloux. Dosage du phosphore (méthode au vert de malachite) : Mode opératoire de minéralisation pour des échantillons végétaux de 100 mg. INRAE. 2022, pp.31. hal-04243886

HAL Id: hal-04243886

https://hal.inrae.fr/hal-04243886

Submitted on 16 Oct 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

Dosage du phosphore (méthode au vert de malachite)

Mode opératoire de minéralisation pour des échantillons végétaux de 100 mg

Eric Lecloux, UMR AGIR, 2022

Organisation d’une journée type-Dosage du phosphore 38 échantillons

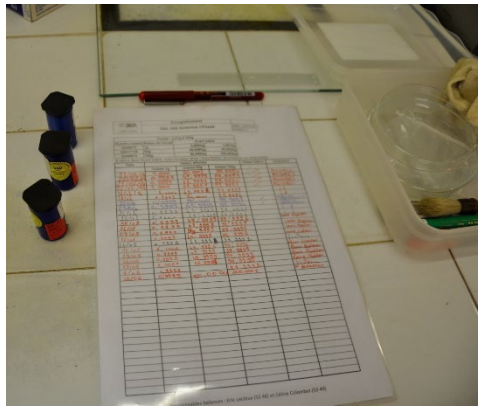
Journée type - Dosage du phosphore	
heures	tâches à accomplir
8h	dépôt de la plaque de creusets sur la plaque chauffante
8h-9h30	attaque acide + installation des fioles jaugées, entonnoirs, filtres
9h30-10h	transfert du contenu des creusets dans le filtre, début filtration
10h-11h	filtration + préparation du tableau de résultats + mettre 2,25 mL d’eau distillée dans les cuves + vaisselle des creusets
11h-12h	fin filtration, mise à niveau des fioles jaugées puis conditionnement
12h-13h	déjeuner
13h-14h	coloration
14h-16h00	pesée de la série suivante
16h-16h30	lecture au spectrophotomètre
16h30-17h	vaisselle des fioles jaugée et des entonnoirs
17h	Interprétation des résultats

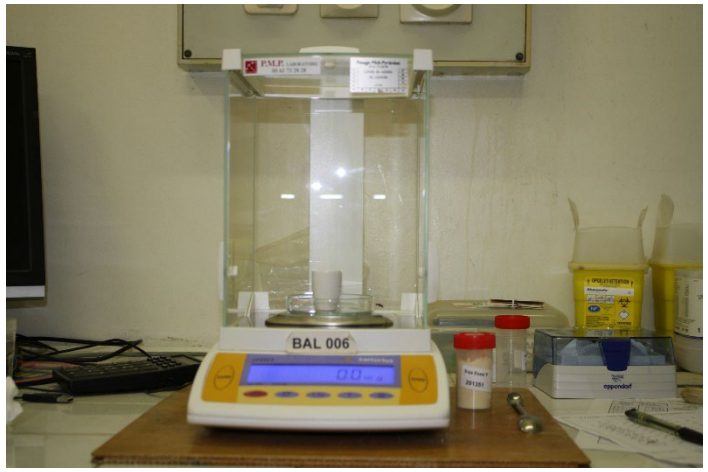
Etape 1 : Micro pesées

I) Matériel et/ou réactifs nécessaires pour la pesée :

Matériels	**Contrôles**
Balance de précision 0,0001g	Externe annuel Interne avant utilisation
Spatule plus papier essuie tout	
Couvercle de boîte de pétri	
Creusets	
plaque	
Plan de plaque	

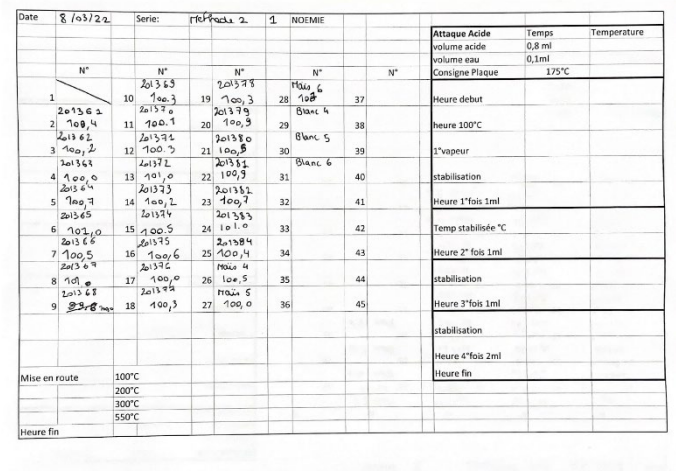
I) 1) Contrôle de la balance : enregistrer sur la fiche de suivi de la balance le poids des masses de contrôle avec la date et le nom de l'utilisateur





I) 2) Tarer avec le creuset

I) 3) Peser l'aliquote, introduire dans le creuset à l'aide d'une spatule



Date	8/03/22	Serie:	Plaque 2	1	NOEMIE

N°		N°		N°		N°		N°	
1		10	201368 100,3	19	201378 100,3	28	Maïs 6 100	37	
2	201362 100,4	11	201370 100,1	20	201379 100,3	29	Blanc 4	38	
3	201361 100,2	12	201371 100,3	21	201380 100,8	30	Blanc 5	39	
4	201369 100,0	13	201372 101,0	22	201381 100,3	31	Blanc 6	40	
5	201367 100,7	14	201373 100,2	23	201382 100,1	32		41	
6	201365 102,0	15	201374 100,5	24	201383 101,0	33		42	
7	201366 100,5	16	201375 100,6	25	201384 100,4	34		43	
8	201364 101,0	17	201376 100,0	26	Maïs 4 100,5	35		44	
9	201368 ~~99,8~~ Maïs	18	201377 100,3	27	Maïs 5 100,0	36		45	

Mise en route	100°C
	200°C
	300°C
	550°C
Heure fin	

Attaque Acide	Temps	Temperature
volume acide	0,8 ml	
volume eau	0,1ml	
Consigne Plaque	175°C	
Heure debut		
heure 100°C		
1°vapeur		
stabilisation		
Heure 1°fois 1ml		
Temp stabilisée °C		
Heure 2° fois 1ml		
stabilisation		
Heure 3°fois 1ml		
stabilisation		
Heure 4°fois 2ml		
Heure fin		

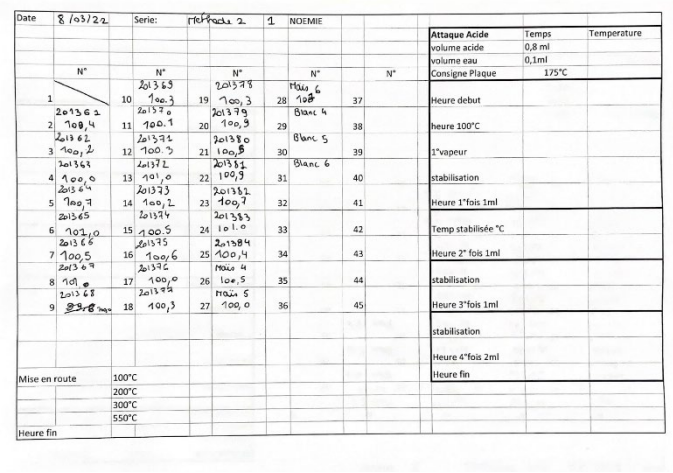
I) 4) Inscrire la masse de l'échantillon pesée sur la feuille du plan de plaque (retourner le premier creuset, sens de la plaque)

I) 5) Une plaque complète comprend 38 échantillons,
3 blancs, 3 standards de contrôle
standard: Maïs V463 USRAVE

Etape 2 : Calcination

II) Matériel et/ou réactifs nécessaires pour la calcination :

Matériels	**Contrôles**
Plaque en fonte	
Minuteur	
Four à moufle	Contrôle interne ponctuel
Creusets avec échantillons + fiche plan de plaque	



Date	8/03/22	Serie:	rtefPocks 2	1	NOEMIE

N°		N°		N°		N°		N°
1		10	201363 100,3	19	201378 100,3	28	Blanc 6 108	37
2	201362 108,4	11	201370 100,1	20	201379 100,3	29	Blanc 4	38
3	201361 100,2	12	201371 100,3	21	201380 100,8	30	Blanc 5	39
4	201364 100,0	13	201372 101,0	22	201381 100,9	31	Blanc 6	40
5	201364 100,7	14	201373 100,2	23	201382 100,7	32		41
6	201365 102,0	15	201374 100,5	24	201383 101,0	33		42
7	201366 100,5	16	201375 100,6	25	201384 100,4	34		43
8	201367 101,0	17	201376 100,0	26	Blanc 4 100,5	35		44
9	201368 [illegible]	18	201377 100,3	27	Blanc 5 100,0	36		45

Mise en route	100°C
	200°C
	300°C
	550°C
Heure fin	

Attaque Acide	Temps	Temperature
volume acide	0,8 ml	
volume eau	0,1ml	
Consigne Plaque	175°C	
Heure debut		
heure 100°C		
1°vapeur		
stabilisation		
Heure 1°fois 1ml		
Temp stabilisée °C		
Heure 2° fois 1ml		
stabilisation		
Heure 3°fois 1ml		
stabilisation		
Heure 4°fois 2ml		
Heure fin		

II) 1) Mettre la plaque dans le four, puis démarrer le chauffage à 100°C

II) 2) Attendre 30 min de chauffage

II) 3) Au bout des 30 min, monter la température à 200°C

II) 2) Attendre 30 min de chauffage

II) 3) Au bout des 30 min, monter la température à 300°C

II) 4) Attendre 30 min de chauffage

II) 3) Au bout des 30 min, monter la température à 550°C

II) 4) Attendre 5 heures de chauffage

Etape 3 : Minéralisation

III) Matériel et/ou réactifs nécessaires pour minéraliser :

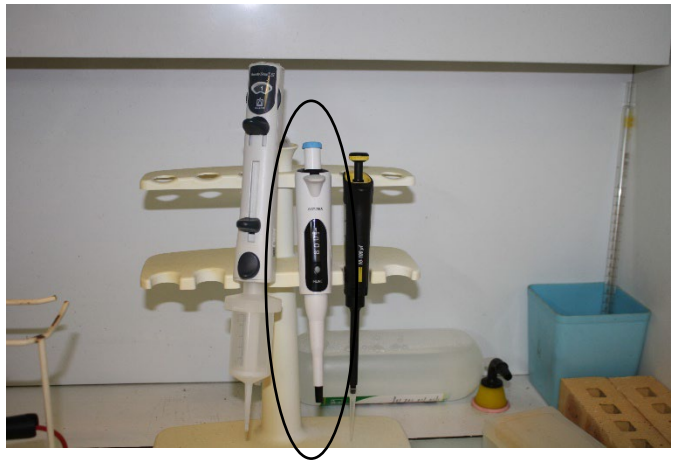
matériels	consommables	produits	EPI	Contrôles
Pipette automatique (5000 microL)	Cône P5000	Eau distillé	Gants nitrile	Externe annuel Interne ponctuel
Pipette automatique (100 microL)	Cône P100		Blouse	Externe annuel Interne ponctuel
Pipette automatique (1000 microL)	Cône P1000		visière	Externe annuel Interne ponctuel
Plaque chauffante				Interne systématique
Pipette distributrice 50mL				Interne ponctuel
Petit bécher (50ml)		Acide nitrique (65%)		
Grand bécher avec couvercle en verre				
Chronomètre				
Feuille d'enregistrement de température				
Plaque avec creuset calcinés				

III) 1) Poser la plaque en fonte et vérifier qu'elle soit bien a plat sur la plaque chauffante : tous les creusets doivent être chauffés de manière homogène puis poser le bécher d'eau distillée sur la plaque (maintenir la température des creusets lors des ajouts d'eau)

III) 2) Introduire 100 microlitres d'eau distillée dans chaque creuset avec la pipette automatique

III) 3) Mettre en route la hotte de sécurité à petite vitesse

III) 4) S'équiper de gants, blouse et lunettes de sécurité ou visière (E.P.I.)

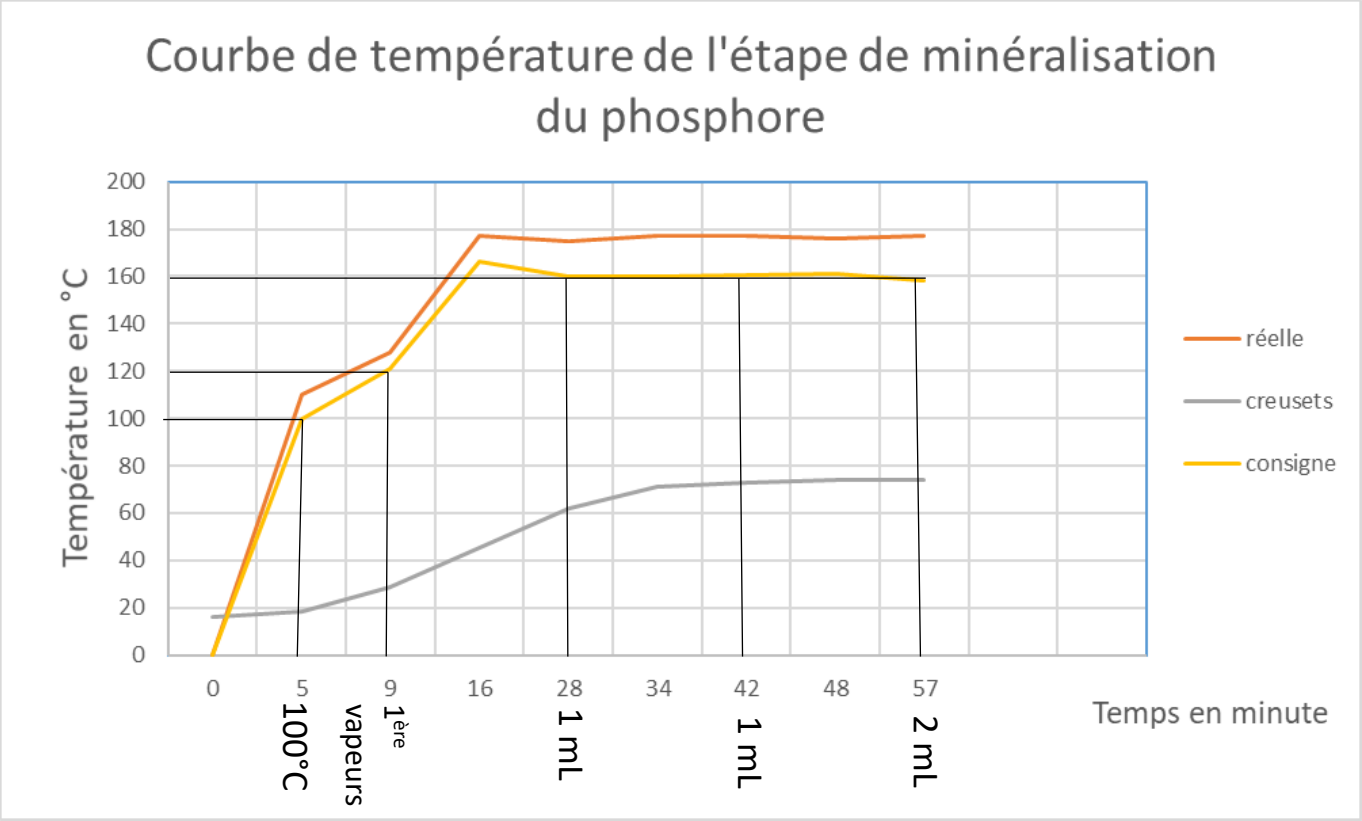


III) 5) Introduire 0,8 mL d'acide nitrique (95%) dans chaque creusets avec la pipette automatique

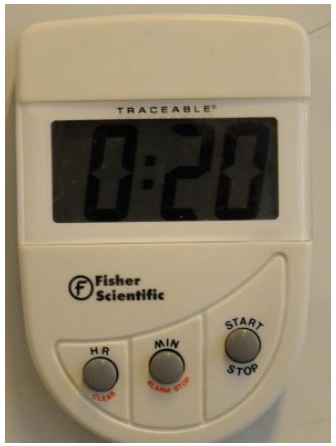
III) 6) Mettre en route la plaque chauffante affichage : 178°C enregistrer le départ de l'attaque acide (heure et températures) et poursuivre ces enregistrements à chaque ajout d'eau voir la courbe de température à la suite

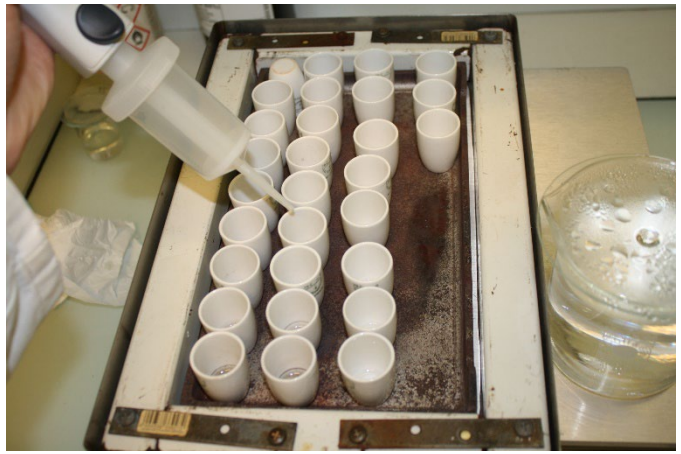
II) Suivi et enregistrement de la température dans les creusets pendant l'attaque acide en fonction du temps :

Contrôle permanent de la température et contrôle d'un niveau d'eau suffisant dans les creusets (ne doivent jamais être secs).



III) 7) Laisser chauffer pendant 28 min, évaporation principale, production de premières vapeurs : visibles au bout d'environ 10 min (à 110 - 120°C)

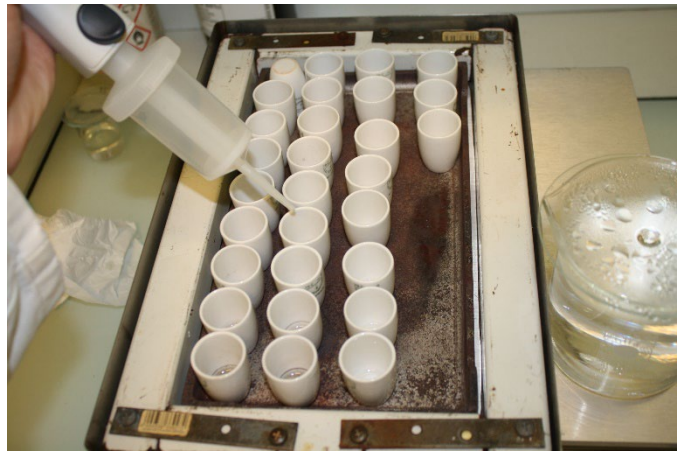




III) 8) Introduire 1 mL d'eau chaude dans chaque creusets et un peu plus pour les échantillons les plus évaporés.

III) 9) Laisser chauffer une nouvelle fois pendant 14 min la plaque (température de consigne 178°C).

II) 10) Introduire 1 mL d'eau chaque creusets et un peu plus pour les échantillons les plus évaporés.



II) 11) Laisser évaporer une troisième fois pendant 15 min.

II) 12) Introduire 2 mL d'eau chaque creusets et un peu plus pour les échantillons les plus évaporés.

II) 13) Éteindre la plaque chauffante, s'équiper de gants anti chaleur puis poser la plaque contenant les creusets sur la paillasse pour l'étape de filtration

Etape 4 : Filtration

IV) Matériel et/ou réactifs nécessaires pour Filtrer :

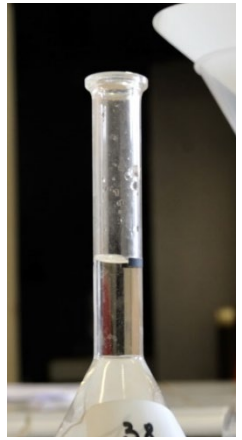
matériels	**consommables**	**produits**	**EPI**	**Contrôles**
Fioles jaugée de 50mL	Filtres Whatman Ashless 40 (110 mm de diamètre)	Eau distillée	Gants anti chaleur	
Entonnoirs	Cône P5000	Échantillons	Blouse	
Pissette d'eau distillée				
Piluliers étiquetés				
Pipette P5000				Externe annuel Interne ponctuel
Plaque avec creusets minéralisés				
Grand bécher rempli d'eau distillée chaude				

IV) 1) Disposer les fioles jaugées avec les piluliers dans l'ordre de la plaque avec entonnoirs + filtres (les imbiber d'eau distillée pour garder la forme de l'entonnoir)

IV) 2) Transférer les échantillons minéralisés dans les fioles correspondantes et rincer 2 fois les creusets à l'eau distillée tiède pour récupérer la totalité de l'échantillon

IV) 3) Remettre de l'eau dans les filtres au bout de 20 min
Le temps de filtration dure en tout 1h pour récupérer tout le filtrat de chaque échantillon

IV) 4) Au bout de 1h de filtration, retirer les filtres + entonnoirs



IV) 5) Ajuster chaque fiole à l'eau distillée (dilution au 1/50ème) au trait de jauge

IV) 6) Homogénéiser longuement chaque fiole et verser les solutions dans les piluliers correspondants (s'assurer du transfert de la totalité de la solution)

Fin de manip : Interprétation des résultats, vaisselle et nettoyage paillasse

La vaisselle est effectuée avec une éponge dédiée et sans savon ni autre détergent pour éviter de polluer le matériel au contact des solutions à doser

- Creusets
- Entonnoirs
- Fioles jaugées

Etape 5 : Coloration

A l'issu de la minéralisation du matin, les flacons de solutions sont conservés à température ambiante en attente de l'étape de coloration de l'après midi

> Les quantités nécessaires de réactifs sont sorties du réfrigérateur le matin pour une utilisation à température ambiante

> Après coloration, les flacons se conservent deux ans à 4°C

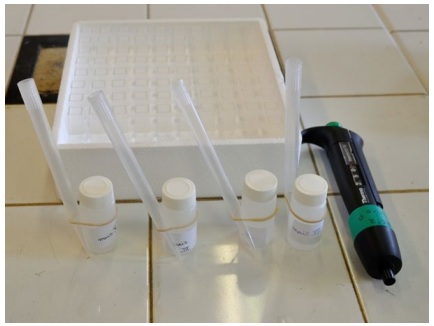
V) a) Matériel et/ou réactifs nécessaires pour colorer et lire :

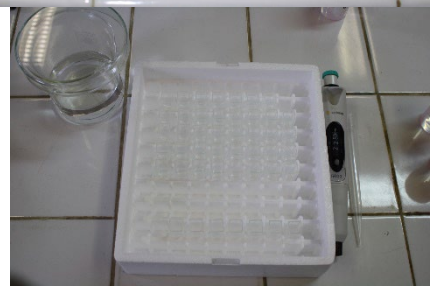
matériels	consommables	produits	EPI	Contrôles
Cuves spectrophotométriques : contenance 4,5 mL en PMMA 4 faces optiques	bouchons	Eau distillée	blouse	
Boîte cuves + couvercles		réactifs (R1, R2)	Gants nitrile	
Pipette P5000	Cône P5000	Gamme		Externe annuel Interne ponctuel
Pipette P1000	Cône P1000	Échantillons		Externe annuel Interne ponctuel
Spectrophotomètre Beckmann (longueur d'onde : 610nm)				Interne par comparaison avec un autre spectrophotomètre

V) b) Conseils d'organisation et méthodes de travail :

- Préparer le bon nombre de cuves + les 7 cuves de gamme
- Disposer les échantillons dans l'ordre de la fiche plan de plaque
- Bien homogénéiser le flacon avant de prélever
- Décaler la cuve d'un cran vers la gauche une fois le réactif ou l'échantillon versé
- Changer le cône de la pipette après avoir introduit chaque échantillon
- Vérifier régulièrement que le volume affiché par la pipette reste inchangé
- S'assurer que le pipetage/refoulement s'effectue correctement (afin d'éviter les erreurs de volume)
- Utiliser un seul bouchon par cuve, et ne pas les mélanger

V) 1) Préparer les cuves pour la gamme et les échantillons de manière a se repérer facilement (cuves non identifiables)

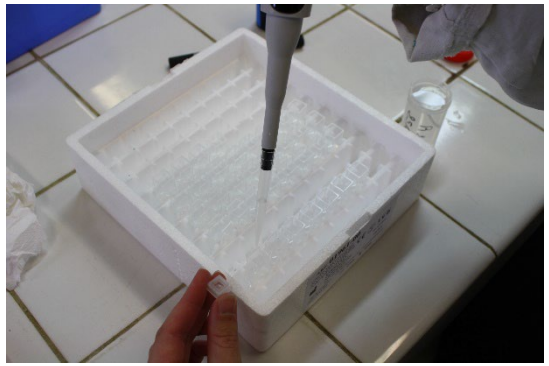




V) 2) **> Gamme :** prélever 2,5 mL de chaque solution étalon et verser dans les cuves correspondantes

> Echantillons/Essais : d'abord introduire 2,25 mL d'eau distillée dans chaque cuve puis prélever 0,25 mL de chaque échantillon (dilution au 1/10ème).

V) 3) Introduire dans chaque cuve (gamme + échantillons) 0,5 mL de réactif R1 et homogénéiser chaque cuve après avoir mis les bouchons de cuves. Enfin, laisser réagir pendant 10 min



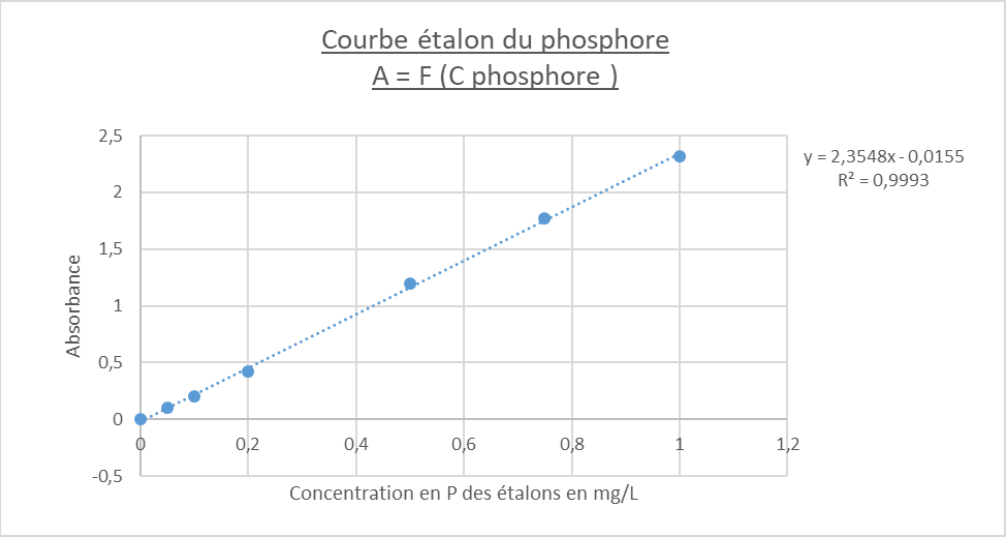
V) 4) Au bout des 10 min, retirer les bouchons de cuves pour ajouter 0,5 mL du réactif R2 (vert de malachite) dans chaque cuve (gamme + échantillons)

V) 5) Homogénéiser chaque cuve après avoir mis les bouchons de cuves. Puis, laisser réagir une nouvelle fois pendant à 2h maximum.

V) 6) Configurer le spectrophotomètre à 610 nm de longueur d'onde et mesurer tout d'abord les absorbances de la gamme (construction droite de régression), puis mesurer les absorbances des échantillons à doser.

V) 7) Construire la droite d'étalonnage donnée par la gamme de concentration linéaire du phosphore à l'aide d'un tableur puis relever l'équation de la droite de la forme ax + b (d'où $\mathrm{A(sol.\,étalon)} = f([phosphore])$).

gamme	Absorbances	Concentrations en P connues dans chaque étalon en mg P/L
T0	0	0
T1	0,102	0,05
T2	0,2068	0,1
T3	0,4248	0,2
T4	1,1935	0,5
T4,5	1,7713	0,75
T5	2,3154	1



Calcul de la concentration de l'échantillon: C(échantillon) = A(échantillon) + 0,0155)/ 2,3548

V) 8) calcul de la teneur en phosphore d'un échantillon

		Absorbance	Masses echantillon en g	Calcul regression (concentration en mg P/L)	Calcul teneur g P/Kg		
	Maïs	1,113	0,1005	0,47923391	2,38		
1	Masse echantillon	0,1005					
2	Regression donne mg P/L	0,47923391					
3	Fiolejaugée						
	Volume de dilution ml	50					
4	Quantité de mg de P	0,001198084		=(2,5*0,47923391)/1000			
	dans 2,5ml						
5	Volume d'echantillon	0,25					
	dans les 2,5 ml						
6	Quantité mg P pour volume	0,2396168		=(50*0,001198084)/0,25			
	echantillon						
7	Quantité de P pour 1Kg	2,38		=(1000*0,2396168)/0,1005			
	g par Kg						
	simplification	x*((2,5/1000)*50)/0,25		=x*0,5 ou divise/2	Ensuite divisé par masse échantillon		
		0,47923391		0,5	2,384		

Données du standard étudié :

référence	Absorbance	Masse en g
Maïs	1,113	0,1005

Calcul de la concentration en P par litre de l'échantillon 194895 :

- D'après la droite : $y = 2{,}3548\ x - 0{,}0155 \Leftrightarrow A_{(maîs)} = 2{,}3548 \times C_{(maîs)} - 0{,}0155$.
- D'où : $C_{(maîs)} = \dfrac{A(maîs)+0{,}0155}{2{,}3548} = 0{,}47923391$ mg P/L

référence	absorbance	Masse en g	Calcul régression C en mg P/L
Maïs	1,113	0,1005	0,47923391

Calcul de la teneur *Tm* (massique) en phosphore (g P/kg) de l'échantillon 194895 :

- $Tm = \left(\dfrac{C_{(maîs)}}{2*}\right) / m_{(maîs)} = 2{,}38$ g P/kg

2* : on divise la concentration obtenue par 2

référence	absorbance	Masse en g	Calcul régression C en mg P/L	Calcul teneur en g P/Kg
Maïs	1,113	0,1005	0,47923391	2,38