

ÉTUDE COMPARATIVE
DES DOSAGES COLORIMÉTRIQUES DU PHOSPHORE.
II. — SPECTROPHOTOMÉTRIE DANS L'ULTRA-VIOLET,

par

JEAN-LOUIS DELSAL ET HAMID MANHOURI. (**)

Dans un mémoire précédent (9) nous avons montré que la méthode de dosage de phosphore la plus sensible, permettant de titrer 0,5 à 4 μg de P dans un volume de 4 ml de 1-butanol, était celle de Horecker, Ma et Haas (*) modifiée par une extraction de la coloration par le 1-butanol et sa mesure à 800 millimicrons.

Signalons qu'avant Horecker et al. la méthode de chauffage en présence de sulfite-acide amino naphthol sulfonique et de molybdate d'ammonium avait déjà été utilisée par Stewart et Hendry (41) dès 1935.

Depus notre premier mémoire, nous avons reçu l'équipement ultraviolet du spectrophotomètre Beckman. Nous avons donc pu étudier si, en effectuant les lectures dans l'ultra-violet, il ne serait pas possible d'augmenter encore la sensibilité du dosage du phosphore.

McCune et Weech (32) ont été les premiers à utiliser un filtre laissant passer une bande de 350 à 430 $\text{m}\mu$ pour le dosage de l'orthophosphate avec l'acide amino naphthol sulfonique. Sperry (40) a perfectionné la méthode en réduisant les teneurs du réducteur; mais la courbe d'talonnage obtenue de 2 à 20 μg de P dans 10 ml n'est pas une droite.

Stoloff (42) trace la courbe de transmission du bleu de molybdène en fonction de la longueur d'onde (400-700 $\text{m}\mu$). On se rend compte que pour une longueur d'onde inférieure à 400 $\text{m}\mu$ le pourcentage de transmission diminuera.

* Voir bibliographie du mémoire précédent (9) qui n'a pas été répétée.

** Bull. soc. Chim. Biol., 1958, 40 N^{os} 7-8.

Kitson et Mellon (24), dans la dernière phrase de leur mémoire, étudiant la méthode officielle A.O.A.C. (Association of Official Agricultural Chemists) avec l'hydroquinone, écrivent qu'ils observent un minimum d'absorption vers 340 m μ .

Dans les courbes du pourcentage de transmission du bleu de molybdène en fonction de la longueur d'onde tracées par Boltz et Mellon (2), on voit que vers 350 m μ il y a une très nette diminution de transmission et que le minimum sera voisin de celui observé à 820-830 m μ .

Conden et Stanier (8) utilisent la longueur d'onde 335 m μ pour le dosage du phosphore avec comme réducteur l'hydroquinone ou l'acid ascorbique (le maximum de densité optique étant d'ailleurs le même pour les deux réducteurs). Le dosage est effectué avec une acidité de 0,375 N sous un volume de 4 ml. La densité optique, déduite des figures de leur mémoire, est de 0,460 pour 1 gamma de P dans 1 ml de solution sous 1 cm. La densité optique à 335 m μ est proportionnelle à la concentration en phosphate.

Wadelin et Mellon (44) extraient l'acide molybdophosphorique par 20 p. 100 de 1-butanol dans le chloroforme; la solution ayant une acidité de 0,96 N. Ils indiquent un maximum à 310 m μ et un coefficient moléculaire d'absorption de 24.400 à cette longueur d'onde.

De Sesa et Rogers (10) extraient quantitativement l'acide molybdophosphorique par l'acétate d'isoamyle. La solution a une acidité de 0,12 N et les lectures sont faites à 330 m μ .

Robbins, Stulberg et Boyer (37) dosent le phosphore par une adaptation de la méthode de Sumner (réducteur sulfate ferreux) et utilisent la longueur d'onde de 355 m μ pour faire les lectures.

Michelsen (33) dose le phosphore sous forme d'acid molybdovanado-phosphorique à 315 m μ .

Dryer, Tammes et Routh (11) publient une méthode de dosage du phosphore utilisant comme réducteur le monochlorhydrate de N-phényl-p-phénylènediamine. Les densités optiques obtenues avec ce réducteur seraient plusieurs fois plus élevées que celles obtenues avec aucun autre réducteur. Ils ont constaté une densité optique plus élevée dans l'ultra-violet, comme les autres auteurs que nous venons de citer. Cependant, d'après leurs résultats pour 1 μ g de P par ml sous 1 cm la densité optique est de : 0,372 à 350 m μ (la coloration à 770 m μ étant environ deux fois moins intense). La méthode de ces auteurs est plus de deux fois moins sensible que celle effectuée après chauffage. Signalons que, pour enlever l'excès d'eau oxygénée, après une minéralisation acide sulfurique eau-oxygénée, les auteurs ajoutent

deux gouttes d'une solution d'urée à 5 p. 100. De plus, dans leur méthode, l'acidité finale est N, ce qui limite son emploi au dosage du phosphore organique après minéralisation ou du phosphore inorganique en absence d'esters phosphoriques.

Il est donc possible de doser le phosphore en spectrophotométrie ultra-violette, mais il est nécessaire de connaître si, réellement, on augmente la sensibilité du dosage d'une manière suffisamment importante pour justifier l'emploi de l'ultra-violet.

A) *Méthode de Fiske et Subbarow avec ou sans chauffage :*

Les proportions des réactifs, lorsque la réaction est faite à froid ou après 20 minutes de chauffage au bain marie bouillant, sont en ml pour un volume total de 10 ml :

	A froid	Avec chauffage
Acide sulfurique concentré . . .	0,3	0,5
Molybdate d'ammonium 5 p. 100 .	1	0,5
Acide amino naphthol sulfonique 0,2 p. 100	0,5	0,5

Les densités optiques obtenues, pour 10 μg de P dans un volume de 10 ml, avec cuves en quartz de 1 cm d'épaisseur, sont :

λ en $m\mu$	A froid		Avec chauffage	
	sans extraction	avec extraction	sans extraction	avec extraction
320		0,600		0,585
340	0,444		0,530	
750		0,167		
800				0,790
830	0,160		0,810	

Nous pouvons donc conclure qu'à *froid*, avec ou sans extraction, la réaction est plus sensible dans l'ultra-violet à 340 $m\mu$ (sans extraction) et à 320 $m\mu$ (après extraction par le 1-butanol).

Par contre, après 20 minutes de chauffage au bain marie bouillant, la méthode est plus sensible dans le visible à 830 $m\mu$ sans

extraction et à 800 m μ après extraction par le 1-butanol,

Ces conclusions sont d'ailleurs générales et indépendantes du réducteur employé : acide amino-naphtol-sulfonique, hydroquinone, chlorhydrate d'hydrazine, acide ascorbique ou métol.

Influence des ions cuivre dans la méthode de Fiske et Subbarow :

Lorsque la méthode est pratiquée à froid et à pH 1,0, les ions cuivre ont peu d'influence sur l'intensité de la coloration, mais agissent cependant sur la vitesse de la réaction. Nous avons étudié l'influence de concentrations en cuivre de 1×10^{-6} M à 0,5 M. Il faut atteindre une concentration de 1×10^{-2} M pour que la réaction soit accélérée ; les lectures peuvent être faites alors après 5 minutes à 830 m μ . Si on réalise une concentration 0,2 M en cuivre la réaction est stable entre 5 et 30 minutes et la densité optique est légèrement augmentée (5 p. 100). Avec 0,5 M de cuivre, il y a une nette diminution de la densité optique.

On peut conclure qu'à pH 1,0 l'addition de cuivre donne des blancs colorés, est souvent nuisible, n'augmente pratiquement pas l'intensité de la coloration et n'est pas à conseiller.

Nous verrons, dans une quatrième partie, que ces conclusions ne s'appliquent pas si la méthode de Fiske et Subbarow est effectuée à des pH moins acides.

Remarques :

I. — D'après les densités optiques données dans le tableau précédent, après extraction de 10 μ g de P par 10 ml de 1-butanol (1 μ g P par ml) nous obtenons une densité optique de 0,790 à 800 m μ sous 1 cm. Avec une telle quantité de 1-butanol par rapport aux 10 ml de la phase aqueuse, nous avons, à l'équilibre des deux phases, une augmentation de volume de la phase butanol. Dans notre mémoire précédent (page 1047) nous trouvons pour 4 μ g de P extrait par 4 ml de 1-butanol (également 1 μ g de P par ml) une densité optique de 1,000. Cette différence est due uniquement au changement de volume constaté. On doit donc faire, parallèlement au dosage, un témoin de phosphore de x μ g extrait par x ml de 1-butanol. Dans le cas de traces de phosphore à doser il est avantageux d'extraire par 4 ml seulement de 1-butanol pour avoir une sensibilité maximum.

II. — Dans la méthode de Fiske et Subbarow, qu'elle soit effectuée à froid ou après 20 minutes de chauffage, nous recommandons d'utiliser l'acide amino-naphtol-sulfonique recristallisé selon la méthode donnée par Fiske et Subbarow :

Dans 1 litre d'eau distillée à 90° C on dissout 150 g de métabi-sulfite de sodium, 10 g de sulfite de sodium cristallisé (plus pur que le sel anhydre) et 15 g d'acide amino-naphtol-sulfonique brut. Après dissolution, on élimine l'insoluble par filtration. Le filtrat est refroidi et on ajoute 10 ml d'acide chlorhydrique concentré pur. L'acide amino-naphtol-sulfonique précipité est recueilli sur Büchner, lavé avec environ 300 ml d'eau distillée, puis avec de l'alcool absolu et de l'éther anhydre. Le produit, très légèrement rosé, est conservé à l'obscurité dans un flacon coloré. Les solutions d'acide amino-naphtol-sulfonique faites avec ce produit recristallisé sont beaucoup plus stables et les dosages sont bien mieux reproductibles.

B) Méthode de Berenblum et Chain :

Nous avons vu dans notre mémoire précédent, que le maximum de sensibilité de la méthode était obtenu en effectuant les lectures à 735 m μ . Lueck et Boltz (30) indiquent un coefficient d'absorption moléculaire de 22.700 à 725 m μ et de 19.200 à 625 m μ . Cet écart de 15 p. 100 confirme nos résultats avec cependant un décalage de 10 m μ dans la longueur d'onde. D'après la courbe de transmission en fonction de la longueur d'onde tracée par Pons et Guthrie (*), on voit que la sensibilité est plus faible à 310 m μ (ou existe également un minimum d'absorption) qu'à 635 ou 735 m μ . Nous avons vérifié qu'il y a bien trois maxima à 635, 310 et 735 m μ dans l'ordre croissant des densités optiques. La mesure en ultra-violet ne permet donc pas d'augmenter la sensibilité de la méthode et c'est une exception dans les méthodes pratiquées à froid.

C) Méthode de Lowry, Roberts, Leiner Wu et Farr :

Cette méthode (29) permet de titrer le phosphore inorganique plus organique labile, le phosphore acido-soluble et le phosphore lipidique. Elle a été employée par Robins, Lowry, Eydt et McCaman (38) pour le microdosage des phospholipides et sphingolipides du cerveau. Chen, Toribara et Warner (7) l'utilisent avec une concentration en acide sulfurique de 0,6 N (limites 0,5 à 1 N).

Lowry et al. emploient un réactif contenant : 1 ml d'acide sulfurique 10 N, 6 ml d'eau, 1 ml de molybdate d'ammonium 2,5 p. 100 et 1 ml d'acide ascorbique 10 p. 100. Pour le dosage du phosphore inorganique plus organique labile, ils utilisent 40 μ l du réactif pour 5 μ l d'extrait trichloracétique 5 p. 100. Les quantités de réactifs nécessaires pour un volume de 10 ml sont environ : acide sulfurique concentré : 0,3 ml ; molybdate d'ammonium 5 p. 100 : 0,5 ml et acide ascorbique 10 p. 100 : 1 ml.

En vérifiant l'influence de la teneur en acide sulfurique, les

limites trouvées sont: 0,5 à 1 N, en accord avec les indications de Chen et al.

Après 2 heures à 38°, les courbes de pourcentage de transmission en fonction de la longueur d'onde sont tracées. On observe un minimum à 830 m μ .

Si on extrait la coloration par le 1-butanol, le minimum se trouve à 800 m μ comme pour toutes les réactions pratiquées avec chauffage quel que soit le réducteur employé.

Les mesures en ultra-violet avec ou sans extraction par le 1-butanol sont moins sensibles que dans le visible. Ces résultats sont généraux pour toutes les méthodes utilisant le chauffage.

Lowry et al. indiquent un coefficient moléculaire d'extinction de 25.000 à 820 m μ . En calculant ce coefficient pour la méthode de Fiske et Subbarow avec chauffage et extraction par 4 ml de 1-butanol, il est d'environ 30.000. La méthode de Lowry et al. à l'acide ascorbique et chauffage 2 heures à 38° n'est donc pas plus sensible que celle de Fiske et Subbarow après chauffage et les lectures en ultra-violet ne permettent pas d'en augmenter la sensibilité.

D) Choix du solvant extractif du bleu de molybdène pour effectuer les lectures en lumière ultra-violette : rôle du pH :

Nous avons vu que, lorsque le dosage du phosphore était effectué à froid, on augmentait la sensibilité de la méthode en faisant les lectures dans l'ultra-violet. En solution aqueuse, les lectures ne peuvent être faites qu'à partir de 340 m μ . En prenant l'exemple de la méthode de Fiske et Subbarow et étudiant les absorptions dues au molybdate d'ammonium et au réducteur, on se rend compte que le molybdate d'ammonium à une concentration de 20 μ g par ml, sous 1 cm. donne 97 p. 100 de transmission à 310 m μ tandis que le réducteur à la concentration de 40 μ g par ml donne 80 p. 100 de transmission à cette même longueur d'onde. La concentration du réducteur étant 5 fois plus grande dans le dosage, on voit qu'en solution aqueuse il n'est pas possible de faire les mesures au minimum de transmission du bleu de molybdène.

Par contre en faisant passer la coloration dans un solvant organique convenable, tout en purifiant l'extrait, on abaisse la limite possible des mesures. Cependant le choix du solvant est important. Il est nécessaire de choisir un solvant, ou un mélange de solvants, absorbant peu dans la région de la longueur d'onde utilisée. Nous avons choisi le 1-butanol pour les lectures dans le visible. En lumière ultra-violette un échantillon de 1-butanol, ayant subi deux purifications, donne 94 p. 100 de transmission à 310 m μ . L'étude faite

par Wadelin et Mellon (44) a conduit ces auteurs à adopter un mélange de 20 p. 100 de 1-butanol dans le chloroforme. Celui-ci n'absorbant pas à partir de 270 m μ son mélange avec le 1-butanol permet d'obtenir réellement le minimum de transmission à 310 m μ . En employant le 1-butanol seul nous observons seulement un palier pour 310-320 m μ . En tenant compte du minimum déterminé par Wadelin et Mellon, il est donc possible d'utiliser aussi le 1-butanol seul comme solvant extractif du bleu de molybdène et de faire les lectures à 310-320 m μ .

Le pH de la solution est très important pour obtenir une extraction quantitative du bleu de molybdène. Dans la méthode de Fiske et Subbarow, il est nécessaire d'avoir un pH de 1,0 à 1,6; pH d'ailleurs fonction de la concentration en molybdate d'ammonium: pH 1,0 pour une réaction effectuée avec 1 ml de molybdate d'ammonium 5 p. 100 et 1,6 avec 1 ml de molybdate d'ammonium 2 p. 100.

E) Méthode de Michelsen :

Nous devons maintenant examiner le dosage du phosphore sous forme d'acide molybdovanadophosphorique. Une microméthode très sensible a été décrite par Michelsen [33].

Les réactifs employés sont :

a) acide chlorhydrique 2,5 N ;

b) solution de métavanadate d'ammonium 0,234 p. 100 obtenue en dissolvant 2,34 g de métavanadate d'ammonium dans 500 ml d'eau distillée chaude. ajoutant 28 ml d'acide chlorhydrique concentré et, après refroidissement, complétant à 1 litre.

c) solution de molybdate d'ammonium 3,53 p. 100.

Le réactif concentré contient : 1 volume de solution de métavanadate d'ammonium ; 2 volumes d'acide chlorhydrique 2,5 N et 2 volumes de solution de molybdate d'ammonium.

Le réactif utilisé pour le dosage est le réactif concentré précédent dilué 25 fois avec de l'eau distillée.

A 1,5 ml d'une solution de phosphate dans l'acide chlorhydrique 0,1 N (contenant 0,2 à 3 μ g de P) on ajoute 1,5 ml du réactif dilué et on effectue les lectures à 315 m μ après 15 minutes. En étudiant la variation de la densité optique en fonction du temps, nous avons décidé de faire les lectures après 15 minutes et non après 2 minutes, comme l'indique l'auteur: la réaction étant stable après 15 minutes et s'intensifiant légèrement de 2 à 15 minutes.

En traçant la courbe de transmission, avec 1,5 et 3 μ g de P

dans un volume de 3 ml. nous obtenons bien un minimum pour 315 m μ en parfait accord avec l'auteur.

La densité optique, en fonction de la concentration suit la loi de Beer pour des concentrations de 1 à 4 μ g de P dans un volume total de 3 ml.

0,5 gamma	0,103	2,5 gamma	0,557
1 »	0,222	3 »	0,658
1,5 »	0,332	3,5 »	0,770
2 »	0,444	4 »	0,886

La densité optique est de 0,658 pour 1 μ g de P par ml de solution sous 1 cm, résultat identique à celui que l'on peut déduire de la courbe tracée par l'auteur. La précision du dosage est inférieure à ± 1 p. 100 comme l'indique l'auteur.

La méthode de Michelsen est effectuée avec une teneur faible en acide : 0,07 N ; pH 1,8 de sorte qu'elle est difficilement applicable au dosage du phosphore organique ou total après minéralisation. Cependant, elle peut être utilisée pour le dosage du phosphore inorganique plus organique labile après déprotéinisation du tissu par l'acide perchlorique 2 p. 100 ou l'acide trichloracétique 5 p. 100. Elle permet d'effectuer ce dosage sur 0,50 à 0,75 ml de la solution déprotéinisée à condition de maintenir l'acidité totale de la réaction à 0,07 N ; 0,021 N étant apporté par les 1,5 ml du réactif dilué.

F) *Dosage du phosphore sous forme d'acide molybdophosphorique :*

Avec 10 μ g de P dans un volume total de 10 ml en présence de 0,3 ml d'acide sulfurique N et de 1 ml de molybdate d'ammonium 0,2 p. 100, on peut titrer l'acide molybdophosphorique formé, après extraction par le 1-butanol à 310 m μ . La courbe des densités optiques en fonction de la longueur d'onde, de 250 à 350 m μ , passe par un maximum pour 310 m μ en accord avec Wadelin et Mellon.

La loi de Beer est vérifiée entre 0,25 et 1 μ g de P par ml et les densités optiques mesurées sous 1 cm (fente 0,3 mm) sont de :

0,25 μ g P/ml	0,125	0,75 μ g P/ml	0,456
0,50 »	0,305	1 »	0,610

Comme on le voit, cette méthode a une précision identique à celle de la méthode de Michelsen (inférieure à ± 1 p. 100) et a une sensibilité inférieure de 8 p. 100.

L'acidité totale dans cette méthode est de 0,03 N ce qui correspond au pH 2,0. Nous avons trouvé qu'en faisant varier initia-

lement le pH l'acide molybdophosphorique se forme bien pour des pH compris entre 2 et 4,5.

Cependant il n'est pas possible d'extraire l'acide molybdophosphorique dans tout cet intervalle de pH. Il est possible de modifier ce pH. avant l'addition de molybdate d'ammonium, et d'obtenir des pH finaux de : 2,5 ; 3,0 ; 3,5 et 4,0. Nous trouvons qu'à pH 4,0 l'extraction de l'acide molybdophosphorique par le 1-butanol est seulement de 43 p. 100. A pH 3,5 elle est de 90 p. 100 et à pH 3,0 de 100 p. 100. Il est donc nécessaire que le pH soit égal ou inférieur à 3,0 pour que l'extraction de l'acide Molybdophosphorique par le 1-butanol soit quantitative.

On peut réaliser une solution dont le pH soit 3,0 avec 0,3 ml d'acide sulfurique N/10 et 1 ml de molybdate d'ammonium 0,2 p. 100 pour un volume total de 10 ml. Il peut être avantageux, dans certains cas, de ne pas ajouter un réducteur. Le titrage du phosphore dans ces conditions à pH 3,0, après extraction de l'acide molybdophosphorique par le 1-butanol, est possible avec une grande précision en effectuant les lectures à 310 m μ .

RÉSUMÉ

Quel que soit le réducteur employé, nous pouvons dégager de cette étude les deux lois générales suivantes :

I) Dans les méthodes de dosage du phosphore pratiquées à froid (sauf exception de la méthode de Berenblum et Chain), avec ou sans extraction du bleu de molybdène par le 1-butanol, les lectures en lumière ultra-violette augmentent la sensibilité de ces méthodes.

II) Dans les méthodes de dosage du phosphore pratiquées après 20 minutes de *chauffage* au bain-marie bouillant ou 2 heures à 38° et extraction de la coloration par le 1-butanol. les lectures à 800 m μ permettent d'avoir le maximum de sensibilité. Dans ce cas, les lectures en lumière ultra-violette sont moins sensibles que dans le visible.

Le titrage du phosphore peut s'effectuer, sans réducteur, avec une grande précision, sous forme d'acide molybdovanadophosphorique à 315 m μ et sous forme d'acide molybdophosphorique à pH 3,0, après extraction par le 1-butanol, à 310 m μ .

SUMMARY

Whatever reducing agent be used, two general rules arise from this study. I. In methods of phosphorus estimation carried out *without heating* (except in the case of the Berenblum and Chain method), with or without I-butanol extraction of molybdene blue, readings in the ultra-violet increase the sensitivity of these methods.

II. In the methods of phosphorus estimation carried out after *heating* 20 minutes in a boiling water-bath or 2 hours at 38° and I-butanol extraction of the colour, 800 m μ readings give maximum sensitivity. In this case, ultra-violet readings are less sensitive than those in the visual light range.

The determination of phosphorus can be performed without a reducing agent with a high degree of accuracy in molybdovanadophosphoric acid form at 315 m μ and molybdophosphoric acid at pH 3.0 after I-butanol extraction at 310 m μ .

ZUSAMMENFASSUNG

Welches auch der verwendete Reduktor sein mag, man kann aus unsern Studien zwei allgemeine Gesetze entnehmen:

1. Beiden ohne Erwärmen gemachten Phosphorbestimmungen (mit Ausnahme der Methode von Berenblum und Chain) — mit und ohne Butanol extraktion des Molybdens — wird durch Lesung im UV. die Empfindlichkeit der Methode erhöht.

2. Bei Methoden in denen nach zweistündigem Erhitzen bei 38° oder nach zwanzig Minuten Erhitzen im kochenden Wärmebad die Butanol-extraktion des Farbanteils erfolgt, ergeben Lesungen bei 800 m μ maximale Empfindlichkeit. In diesem Falle sind die Lesungen im UV. weniger empfindlich.

Die Bestimmung des Phosphors kann ohne Reduktor mit grosser Genauigkeit im Zustand von Molybdo-vanadophosphorsäure bei 315 m μ und als Phosphormolybdensäure bei pH 3,0 nach Butanol-Extraktion, bei 310 m μ vorgenommen werden.

BIBLIOGRAPHIE

A la fin du 4^e mémoire.