

DOSAGE DE L'AZOTE TOTAL PAR MÉTHODE DE KJELDAHL

1. Principe

- L'échantillon est minéralisé en milieu acide sulfurique en présence de cuivre(II) et d'un catalyseur (oxyde de titane). Dans les conditions de minéralisation, l'azote organique est retrouvé sous forme ammonium.
- Les ions ammonium sont transformés en ammoniac par passage en milieu alcalin. On entraîne NH_3 à la vapeur d'eau et on dose le condensât recueilli par dosage volumétrique acide/base.

1.1 Minéralisation de type Kjeldahl classique (en milieu acide sulfurique)

La minéralisation est conduite à ébullition douce en milieu acide sulfurique chargé de sulfate de potassium et en présence de catalyseurs (les plus employés sont le sélénium ou le dioxyde de titane sous forme cristalline anatase mélangés à du sulfate de cuivre. Le sélénium est un métal lourd très toxique qu'il convient aujourd'hui de proscrire. Ces conditions de minéralisation conduisent à :

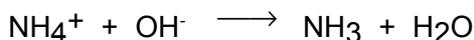
- l'azote organique et (évidemment) les formes NH_4^+ sont retrouvées sous forme NH_4^+ . NO_2^- et NO_3^- ne sont que partiellement réduits en NH_4^+ . Leur réduction totale implique un traitement préalable supplémentaire en milieu acide en présence des réducteurs acide salicylique et thiosulfate de sodium ;
- le carbone organique est retrouvé sous forme de carbone (noir) puis CO_2 ;
- l'hydrogène et l'oxygène sont combinés en H_2O .

Au cours de la minéralisation, l'acide sulfurique se décompose partiellement en dioxyde et trioxyde de soufre (SO_2 et SO_3 , gaz toxiques irritants). Il y a ainsi apparition de vapeurs blanchâtres très irritantes. La minéralisation est donc conduite avec un appareillage à aspiration puis traitement des vapeurs avant rejet.

Note technique : l'addition de certains sels comme le sulfate de potassium (K_2SO_4) permet en fait de favoriser la minéralisation en élevant la température d'ébullition du milieu de minéralisation. Pour information :

composition	température d'ébullition	commentaire
Acide sulfurique concentré	330°C	
Acide sulfurique concentré + K_2SO_4 50% (p/v)	344°C	
Acide sulfurique concentré + K_2SO_4 100% (p/v)	364°C	
Acide sulfurique concentré + K_2SO_4 150% (p/v)	383°C	
Acide sulfurique concentré + K_2SO_4 200% (p/v)	>400°C	pertes d'ammoniac !

1.2 Alcalinisation du milieu minéralisé et entraînement à la vapeur de l'ammoniac formé



L'ammoniac (volatil) ainsi formé est entraîné par de la vapeur d'eau (hydrodistillation), les vapeurs, condensées par réfrigération, sont recueillies dans un milieu suffisamment acide.

Remarque : le minéralisât est un milieu acide sulfurique concentré. Il est donc nécessaire d'introduire suffisamment de soude pour neutraliser puis alcaliniser et transformer NH_4^+ en NH_3 . On peut vérifier que le milieu est bien alcalin en ajoutant quelques gouttes de phénolphtaléine à la soude. Alcaliniser un milieu acide concentré présente des risques. Il convient de ne manipuler que si on a été correctement formé à cette action.

1.3 Dosage de l'ammoniac recueilli

1.3.1 Cas du dosage indirect (ou en retour)

L'ammoniac est recueilli dans une quantité connue (via la réalisation d'un témoin) et en excès d'une solution d'un acide fort. La fin de l'entraînement de NH_3 est estimée en considérant le volume de distillat recueilli ou la durée de l'opération.

Le reliquat de protons (du à l'excès d'acide fort) est dosé par une solution titrée d'une base forte.

L'indicateur coloré de fin de dosage est le rouge de méthyle qui vire à la goutte près à la fin du dosage du reliquat de protons.

Ce type de dosage évite de façon élégante tout risque de pertes en ammoniac distillé.

1.3.2 Cas du dosage direct

L'ammoniac est recueilli dans de l'acide borique en solution à 20 à 40 g/l. En général on utilise 10 mL de solution borique et on recueille le distillat sous un volume de 40 à 100 mL. Le pK de l'acide borique est de 9,23. Le pH de la solution d'acide borique, en absence d'ammoniac, est donc voisin de 5,0 à 5,4. Vers ces pH, le pouvoir tampon de la solution borique est très faible, elle permet ainsi d'observer le virage d'indicateurs colorés dont la teinte sensible se situe vers pH 5,0 à 5,4, à la goutte près, avec des solutions titrées d'acide fort aussi diluées que 0,02 mol/L en H⁺. Soit I_{stat} un tel indicateur.

Le pK de NH₄⁺/NH₃ est de 9,4. Si on introduit NH₃, en large défaut par rapport à l'acide borique, dans une telle solution, on peut donc admettre que la totalité de NH₃ se protone sous forme NH₄ avec augmentation du pH. On peut alors mesurer le volume de solution titrée d'acide fort nécessaire pour ramener le pH à la teinte de virage d'un indicateur coloré I_{stat}. On a lors n_{H⁺} ajouté à la burette pour revenir au virage = n_{NH₃}

distillé

Les indicateurs usuels utilisés sont :

mélange de Tashiro de rouge de méthyle () et de bleu de méthylène() en éthanol ()	mélange vert de bromocrésol (0,1g) et rouge de méthyle (0,02g) en éthanol (100 mL)
rouge de méthyle, rouge-jaune, pH 4,2 à 6,2 ; vert de bromocrésol, jaune-bleu, pH 3,8 à 5,4 ; bleu de méthylène : bleu aux pH du dosage.	
la solution borique pourra ainsi être ajustée à la teinte sensible « gris sale » : - passage du gris au violet, et ce à la goutte près, par ajout d'une solution d'un acide fort. - passage du gris au vert, et ce à la goutte près, par ajout d'une solution d'une base.	la solution borique pourra ainsi être ajustée à la teinte sensible « violet » : - passage du violet à l'orange, et ce à la goutte près, par ajout d'une solution d'un acide fort. - passage du violet au vert, et ce à la goutte près, par ajout d'une solution d'une base.

Remarque : On peut réaliser le dosage après la distillation ou au fur et à mesure de la distillation. Il est intéressant, surtout pour un dosage au fur et à mesure, d'avoir ajusté au préalable le milieu acide borique de recueil à la teinte sensible de l'indicateur coloré (donc le gris ou le violet selon celui choisi). Le dosage au fur et à mesure permet ainsi d'apprécier objectivement la fin de la distillation. Il est même possible de travailler en contrôle potentiométrique avec un point de titrage à pH = 5,0.

2. Application au dosage de l'azote total d'un foin

Le protocole différera selon l'origine de l'échantillon, sa teneur présumée en azote, et l'appareillage.

On propose ici un mode opératoire mettant en œuvre un dosage en retour de l'ammoniac distillé avec suivi potentiométrique et par indicateur coloré.

2.1 Minéralisation d'un échantillon de foin

La teneur en N des foins est de l'ordre de 1,5% (m/m).

Dans le matras à minéraliser, introduire :

- environ 0,3 g de foin (pesée exacte) ;
- 2,7 g de mélange catalytique (200 g de sulfate de potassium pour 6 g de sulfate de cuivre pentahydraté et 6 g de dioxyde de titane) ;
- 1 bille de verre (sauf si incompatible avec l'appareillage d'entraînement à la vapeur utilisé).
- 16 mL d'acide sulfurique concentré (**danger, il faut connaître les conditions de sécurité avant de manipuler**). Verser l'acide lentement et en agitant par rotation douce. Laisser reposer de 2 à quelques heures.

Placer le matras sur la rampe de minéralisation. Chauffer d'abord avec précaution jusqu'à disparition des mousses en veillant à ce qu'elles ne montent pas les parois du matras. Porter alors à ébullition douce en veillant à ce que l'acide sulfurique condense bien avant le col du matras. Attendre que le milieu devienne clair (4 heures au maximum).

2.2 Entraînement de NH_3 par la vapeur d'eau (distillation)

Lorsque la minéralisation est terminée, laisser refroidir le matras et évaluer son volume. Ceci permet de calculer le volume de lessive de NaOH qui sera nécessaire à l'alcalinisation. Ajouter approximativement 20 mL d'eau. Attention, on verse de l'eau dans une solution sulfurique concentrée ! ! **Ne manipuler qu'avec une connaissance parfaite des conditions de sécurité à observer impérativement ! !**

Certains appareillages permettent cette opération sur l'appareil de distillation et la rende ainsi moins dangereuse. Ce n'est malheureusement pas le cas avec l'appareillage disponible.

Installer alors sur l'appareillage de distillation. Mettre en place la fiole de recueil du distillat de façon à ce que l'extrémité du condenseur plonge dans la solution de recueil. Ajouter le volume de lessive de NaOH nécessaire à l'alcalinisation.

Opérer l'entraînement à la vapeur. Distiller environ 40 mL ou 3 minutes et rincer l'extrémité du condenseur puis procéder au dosage volumétrique.

2.3 Dosage volumétrique final

protocole dosage en retour (suivi indicateur coloré de pH)	Cas avec suivi pH-métrique
<ul style="list-style-type: none"> - Placer U = 20,00 mL de solution d'acide sulfurique étalonnée titrant environ 0,03 mol/L dans la fiole de recueil du distillat. - Après la distillation, ajouter quelques gouttes d'indicateur de Tashiroy ou tout simplement de rouge de méthyle - Titrer par une solution de NaOH environ 0,06 mol/L (chute de burette Ve) jusqu'au virage à la goutte près. - Réaliser un témoin sans azote (chute de burette vt). 	<ul style="list-style-type: none"> - Idem - Idem - Suivre le dosage au pH-mètre. Titrer avec la solution de NaOH jusqu'au volume maximum de la burette (25 mL). Noter le virage de l'indicateur. Tracer la courbe $\text{pH}=\text{f}(\text{NaOH})$. Déterminer le point de dosage intéressant. - Suivre le dosage au pH-mètre. Titrer avec la solution de NaOH jusqu'au volume maximum de la burette (25 mL). Noter le virage de l'indicateur. Tracer la courbe $\text{pH}=\text{f}(\text{NaOH})$. Déterminer le point de dosage intéressant.

3. Contrôle du dosage

Il est intéressant de contrôler le dosage :

Minéraliser un mélange d'environ 0,1 g de glucose et 0,8 mmol d'acide glutamique pur (pesée exacte au 1/10 mg, MM = 147,13 g/mol). Procéder au dosage. On doit retrouver la quantité d'N introduite avec un écart inférieur à 4%.

Si le temps nécessaire à la minéralisation fait défaut, on pourra se contenter de vérifier l'étape d'entraînement et le dosage acide/base : Dans le matras à distiller, introduire une pesée exacte (au 1/100 de mg si possible) de sulfate d'ammonium pur ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MM = 132,14 g/mol) équivalente à environ 0,3 à 0,4 mmol (soit 0,6 à 0,8 mmol d'N) (pesée exacte de produit pur et transfert quantitatif) puis compléter à environ 20 mL d'eau. Prévoir une alcalinisation par 2 mL de lessive de soude. Procéder au dosage de l'azote. On doit retrouver la quantité introduite avec un écart inférieur à 3 %.

4. Résultats et compte-rendu

- Schéma de principe de la manipulation comme établi avec l'ensemble du groupe d'étudiants ;
- Courbes pH métriques annotées et commentées. Formule littérale du dosage.
- Résultats expérimentaux pour le contrôle et conclusion ;
- Résultats expérimentaux pour le foin dosé ;
- En considérant que les protéines du foin contiennent 16 % d'azote en masse et que l'azote organique du foin est à 95 % de nature protéique, calculer la concentration des protéines du foin.
- Justifier le volume de lessive de soude utilisé pour l'alcalinisation présentée au paragraphe 2.2
- Déterminer les mesures de prévention et les équipements de protection adaptés au travail au poste d'hydrodistillation

5. Quelques données produits

Adresse internet = <http://www.inrs.fr/accueil/risques/chimiques/classification-produits/nouvelle-classification.html> pour téléchargement des mentions de danger et des conseils de prudence-prévention-intervention

H ₂ SO ₄ concentré	Dangers	Conseils de prudence-prévention-intervention
Masse moléculaire 98,08 g/mol titre > 95% (type purissime) densité = 1,83  corrosif	H314 Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves	P280 / P305 + P 351+ P338 / P310 Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage En cas de contact avec les yeux : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin

NaOH concentré	Phrases de risques	Phrases de sécurité
Masse moléculaire 39,997 g/mol titre > 30% (type purissime) densité = 1,33 corrosif 	H314	P280 / P305 + P 351+ P338 / P310

Ce paragraphe de données produits n'est pas exhaustif. La consultation internet des fiches produits chez le fabricant ou le fournisseur ainsi que des FDS (fiches de données de sécurité, MSDS material safety data sheet) est généralement nécessaire. Ainsi que la consultation du site de l'INRS notamment les pages depuis <http://www.inrs.fr/accueil/risques/chimiques.html>

6. Bibliographie

- Norme NF ISO 11261, juin 1995 (dosage de l'azote total du sol) ;
- Données aimablement fournies par D. Caquet.