

---

---

**Aliments des animaux – Détermination de  
la teneur en azote soluble après traitement  
avec de la pepsine dans l'acide  
chlorhydrique dilué**

*Animal feeding stuffs — Determination of soluble nitrogen content after  
treatment with pepsin in dilute hydrochloric acid*

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

ISO 6655:1997

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/999b4e9b-166a-4ced-aa8e-39ce9c693455/iso-6655-1997>



## Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

La Norme internationale 6655 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*, sous-comité SC 10, *Aliments des animaux*.

L'annexe A fait partie intégrante de la présente Norme internationale. Les annexes B et C sont données uniquement à titre d'information.

## iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 6655:1997](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/999b4e9b-166a-4ced-aa8e-39ce9c693455/iso-6655-1997)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/999b4e9b-166a-4ced-aa8e-39ce9c693455/iso-6655-1997>

© ISO 1997

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie et les microfilms, sans l'accord écrit de l'éditeur.

Organisation internationale de normalisation  
Case postale 56 • CH-1211 Genève 20 • Suisse  
Internet central@iso.ch  
X.400 c=ch; a=400net; p=iso; o=isocs; s=central

Imprimé en Suisse

# Aliments des animaux – Détermination de la teneur en azote soluble après traitement avec de la pepsine dans l'acide chlorhydrique dilué

## 1 Domaine d'application

La présente Norme internationale prescrit une méthode pour la détermination dans les aliments des animaux, de la teneur en azote soluble après traitement avec de la pepsine dans l'acide chlorhydrique dilué.

Cette méthode ne permet pas de différencier l'azote protéique de l'azote non protéique.

NOTE 1 Les valeurs obtenues en utilisant la présente méthode n'ont pas de rapport direct avec la digestibilité in vivo.

NOTE 2 En cas d'exclusion de l'azote non protéique dans le résultat de l'essai, il convient de déterminer sa teneur en utilisant une méthode appropriée.

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

## 2 Références normatives

Les normes suivantes contiennent des dispositions qui, par suite de la référence qui en est faite, constituent des dispositions valables pour la présente Norme internationale. Au moment de la publication, les éditions indiquées étaient en vigueur. Toute norme est sujette à révision et les parties prenantes des accords fondés sur la présente Norme internationale sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer les éditions les plus récentes des normes indiquées ci-après. Les membres de la CEI et de l'ISO possèdent le registre des Normes internationales en vigueur à un moment donné.

ISO 5983:1997<sup>1)</sup>, *Aliments des animaux — Détermination de la teneur en azote et calcul de la teneur en protéines brutes — Méthode Kjeldahl.*

ISO 6498:—<sup>2)</sup>, *Aliments des animaux — Préparation des échantillons pour essai.*

## 3 Principe

Incubation de l'échantillon pendant 48 h à 40 °C dans une solution de pepsine dans l'acide chlorhydrique dilué.

Filtration de la suspension et détermination de la teneur en azote, soit sur le filtrat, soit sur le résidu contenu dans le filtre, conformément à la méthode Kjeldahl prescrite dans l'ISO 5983. Dans ce dernier cas, détermination également de la teneur en azote de l'échantillon conformément à l'ISO 5983.

<sup>1)</sup> À publier. (Révision de l'ISO 5983:1979)

<sup>2)</sup> À publier. (Révision de l'ISO 6498:1983)

## 4 Réactifs

Utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue et de l'eau distillée ou déminéralisée ou de l'eau de pureté au moins équivalente.

Tous les réactifs (à l'exception des réactifs étalons) doivent être pratiquement exempts de composés azotés.

**4.1 Acide chlorhydrique dilué**,  $c(\text{HCl}) = 0,075 \text{ mol/l}$ .

**4.2 Pepsine**, ayant une activité de 2,0 unités par milligramme conformément à la définition donnée en annexe A. Contrôler l'activité de la pepsine conformément à la méthode prescrite en annexe A.

**4.3 Solution de pepsine dans l'acide chlorhydrique**, ayant une activité de pepsine d'environ 400 unités par litre.

Dissoudre  $0,2 \text{ g} \pm 0,001 \text{ g}$  de pepsine (4.2) dans 1 litre d'acide chlorhydrique dilué (4.1). Préparer cette solution extemporanément.

Si l'activité de la pepsine dévie de 2,0 unités par milligramme, ajuster la masse de pepsine pour obtenir une solution ayant une activité de pepsine de 400 unités par litre.

**4.4 Acide chlorhydrique**,  $c(\text{HCl}) = 7,5 \text{ mol/l}$  ( $\rho_{20} = 1,125 \text{ g/ml}$ ).

## 5 Appareillage

Matériel courant de laboratoire et, en particulier, ce qui suit.

**5.1 Bain d'eau ou étuve**, réglable à  $40 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ .

**5.2 Ballons à minéralisation de Kjeldahl**, de capacité appropriée.

**5.3 Papier filtre**, à filtration rapide, résistant aux acides.

**5.4 Matériel de distillation et de titrage.**

## 6 Échantillonnage

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode prescrite dans la présente Norme internationale. Une méthode d'échantillonnage recommandée est donnée dans l'ISO 6497 [3].

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport et de l'entreposage.

## 7 Préparation de l'échantillon pour essai

Préparer l'échantillon pour essai conformément à l'ISO 6498.

Si la teneur en matières grasses de l'échantillon pour essai dépasse 10 % ( $m/m$ ), extraire les matières grasses conformément à l'ISO 6498 et tenir compte de la teneur en huile extraite lors du calcul (article 9).

## 8 Mode opératoire

### 8.1 Prise d'essai

Peser, à 0,001 g près, environ 2 g de l'échantillon préparé pour essai.

### 8.2 Incubation

Introduire la prise d'essai dans une fiole jaugée de 500 ml et ajouter 450 ml de solution de pepsine (4.3) préalablement chauffée à 40 °C. Agiter de façon à éviter la formation d'agglomérats. Vérifier que le pH de la suspension est inférieur à 1,7. Placer la fiole dans le bain d'eau ou dans l'étuve (5.1) réglé(e) à 40 °C et l'y maintenir pendant 48 h. Agiter après 8 h, 24 h et 32 h.

Au bout de 48 h, ajouter 15 ml d'acide chlorhydrique (4.4) et refroidir jusqu'à 20 °C. Compléter au trait repère avec de l'eau, agiter et filtrer sur papier filtre (5.3), puis procéder conformément à 8.3 ou 8.4.

### 8.3 Détermination de la teneur en azote du filtrat

#### 8.3.1 Minéralisation de la matière organique

Prélever 250 ml du filtrat (8.2) et les introduire dans un ballon à minéralisation de Kjeldahl (5.2). Ajouter les réactifs nécessaires pour la minéralisation comme prescrit au paragraphe 8.2.1 de l'ISO 5983:1997. Mélanger et chauffer à ébullition.

NOTE — Il peut être utile d'ajouter un antimousse.

Maintenir la solution à vive ébullition jusqu'à évaporation presque complète de l'eau. Éliminer les dernières traces d'eau avec précaution, en réduisant l'intensité du chauffage. Lorsque la solution devient limpide, poursuivre l'ébullition pendant 1 h encore, puis laisser refroidir.

#### 8.3.2 Distillation et titrage

Procéder comme prescrit aux paragraphes 8.2.2 et 8.2.3 de l'ISO 5983:1997.

#### 8.3.3 Essai à blanc

Réaliser un essai à blanc en utilisant le même mode opératoire mais en omettant la prise d'essai. Procéder comme prescrit à l'article 9.

### 8.4 Détermination de la teneur en azote du résidu et de l'échantillon pour essai

#### 8.4.1 Minéralisation de la matière organique dans le résidu

Laver le papier filtre et le résidu (8.2) avec de l'eau chaude jusqu'à élimination de l'acidité. Transférer le filtre avec le résidu dans un ballon à minéralisation de Kjeldahl (5.2). Ajouter les réactifs nécessaires pour la minéralisation comme prescrit au paragraphe 8.2.1 de l'ISO 5983:1997. Mélanger et chauffer à ébullition.

NOTE — Il peut être utile d'ajouter un antimousse.

Éliminer l'eau en portant la solution à vive ébullition tout d'abord, puis en réduisant l'intensité du chauffage pour éliminer les dernières traces d'eau. Lorsque la solution devient limpide, poursuivre l'ébullition pendant 1 h encore, puis laisser refroidir.

#### 8.4.2 Distillation et titrage

Procéder comme prescrit aux paragraphes 8.2.2 et 8.2.3 de l'ISO 5983:1997.

#### 8.4.3 Détermination de la teneur en azote de l'échantillon pour essai

Déterminer la teneur en azote de l'échantillon pour essai préparé (voir l'article 7) conformément à l'ISO 5983.

#### 8.4.4 Essai à blanc

Effectuer un essai à blanc en utilisant le même mode opératoire, mais en omettant la prise d'essai.

## 9 Expression des résultats

### 9.1 Calcul de la teneur en azote soluble obtenu en utilisant le mode opératoire prescrit en 8.3

Si les quantités d'acide sulfurique utilisées pour récupérer l'ammoniac lors de la détermination et lors de l'essai à blanc sont égales (voir l'ISO 5983), calculer la teneur en azote soluble de l'échantillon pour essai à l'aide de l'équation suivante:

$$w_1 = \frac{2 (V_0 - V_1) \times c \times M}{m}$$

où

- $w_1$  est la teneur en azote soluble, en grammes par kilogramme, de l'échantillon pour essai, obtenu selon le mode opératoire prescrit en 8.3;
- $c$  est la concentration, en moles par litre, de la solution d'hydroxyde de sodium (voir le paragraphe 4.9.1 de l'ISO 5983:1997), utilisée pour les titrages;
- $m$  est la masse, en grammes, de la prise d'essai;
- $M$  est la masse molaire, en grammes par mole, de l'azote ( $M = 14$  g/mol);
- $V_0$  est le volume, en millilitres, de la solution d'hydroxyde de sodium (voir le paragraphe 4.9.1 de l'ISO 5983:1997), utilisé pour l'essai à blanc;
- $V_1$  est le volume, en millilitres, de la solution d'hydroxyde de sodium (voir le paragraphe 4.9.1 de l'ISO 5983:1997), utilisé pour la détermination (8.3.2).

Noter le résultat à 0,1 g/kg près.

### 9.2 Calcul de la teneur en azote soluble obtenu en utilisant le mode opératoire prescrit en 8.4

Si les quantités d'acide sulfurique utilisées pour récupérer l'ammoniac lors de la détermination et lors de l'essai à blanc sont égales (voir l'ISO 5983), calculer la teneur en azote soluble de l'échantillon pour essai à l'aide de l'équation suivante:

$$w_2 = w_N - \frac{(V_0 - V_1) \times c \times M}{m}$$

où

- $w_2$  est la teneur en azote soluble, en grammes par kilogramme, de l'échantillon pour essai, obtenu selon le mode opératoire prescrit en 8.4;
- $c$  est la concentration, en moles par litre, de la solution d'hydroxyde de sodium (voir le paragraphe 4.9.1 de l'ISO 5983:1997), utilisée pour les titrages;
- $m$  est la masse, en grammes, de la prise d'essai;
- $M$  est la masse molaire, en grammes par mole, de l'azote ( $M = 14$  g/mol);
- $V_0$  est le volume, en millilitres, de la solution d'hydroxyde de sodium (voir le paragraphe 4.9.1 de l'ISO 5983:1997), utilisé pour l'essai à blanc;
- $V_1$  est le volume, en millilitres, de la solution d'hydroxyde de sodium (voir le paragraphe 4.9.1 de l'ISO 5983:1997), utilisé pour la détermination (8.4.2);
- $w_N$  est la teneur en azote total, en grammes par kilogramme, de l'échantillon pour essai, déterminée en 8.4.3.

Noter le résultat à 0,1 g/kg près.

### 9.3 Calcul de la teneur en protéines brutes solubles

Si l'on désire exprimer le résultat en protéines brutes solubles, multiplier la teneur en azote déterminée par le facteur 6,25.

## 10 Fidélité

### 10.1 Essai interlaboratoire

Les détails d'un essai interlaboratoire relatif à la précision de la méthode sont donnés en annexe B. Les valeurs provenant de l'essai interlaboratoire ne peuvent être appliquées aux plages de concentrations et aux matrices autres que celles données.

### 10.2 Répétabilité

La différence absolue entre deux résultats d'essai individuels indépendants, obtenus à l'aide de la même méthode sur un matériau identique soumis à l'essai dans le même laboratoire par le même opérateur utilisant le même appareillage et dans un court intervalle de temps, ne sera pas supérieure à la valeur  $r$  figurant dans le tableau 1 dans plus de 5 % des cas.

### 10.3 Reproductibilité

La différence absolue entre deux résultats d'essai individuels, obtenus à l'aide de la même méthode sur un matériau identique soumis à l'essai dans des laboratoires différents par des opérateurs différents utilisant des appareillages différents, ne sera pas supérieure à la valeur  $R$  figurant dans le tableau 1 dans plus de 5 % des cas.

Tableau 1 — Limites de répétabilité ( $r$ ) et de reproductibilité ( $R$ )

Échantillon	Teneur moyenne en protéines brutes solubles	$r$	$R$
	g/kg <sup>1)</sup>	g/kg	g/kg
Farine de luzerne	136,6	7,2	26,5
Gluten de maïs	141,5	8,9	28,9
Farine de coprah	149,5	7,4	31,6
Ensilage d'herbe	192,9	7,9	36,3
Farine d'os	512,0	8,9	63,1
Farine de plume	574,3	22,1	166,3

1) Sur matière sèche.

## 11 Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit indiquer

- tous les renseignements nécessaires à l'identification complète de l'échantillon;
- la méthode selon laquelle l'échantillonnage a été effectué, si elle est connue;
- la méthode utilisée;

- le (les) résultat(s) d'essai obtenu(s), exprimé(s) en azote soluble ou en protéines brutes solubles et, dans ce cas, le facteur de conversion utilisé (c'est-à-dire 6,25);
- si la répétabilité a été vérifiée, le résultat final cité qui a été obtenu;
- tous les détails opératoires non prévus dans la présente Norme internationale, ou facultatifs, ainsi que les incidents éventuels susceptibles d'avoir agi sur le (les) résultat(s) d'essai.

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

[ISO 6655:1997](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/999b4e9b-166a-4ced-aa8e-39ce9c693455/iso-6655-1997)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/999b4e9b-166a-4ced-aa8e-39ce9c693455/iso-6655-1997>

## Annexe A (normative)

### Détermination de l'activité de la pepsine

#### A.1 Domaine d'application

La présente annexe prescrit une méthode pour la détermination de l'activité de la pepsine utilisée dans la détermination de la teneur en azote soluble après traitement avec de la pepsine dans l'acide chlorhydrique dilué.

#### A.2 Définition

Pour les besoins de la présente annexe, la définition suivante s'applique.

##### A.2.1 unité d'activité de pepsine

Quantité de pepsine qui libère par minute, dans les conditions prescrites, une quantité de groupements hydroxyaryle dont la coloration par le réactif de Folin-Ciocalteu a une absorbance correspondant à celle de 1  $\mu\text{mol}$  de tyrosine dans les mêmes conditions.

#### A.3 Principe

Traitement de l'hémoglobine avec de la pepsine dans l'acide chlorhydrique dilué. Précipitation de la fraction non hydrolysée des protéines par l'acide trichloroacétique.

Filtration et addition d'hydroxyde de sodium et de réactif de Folin-Ciocalteu. Mesurage de l'absorbance de cette solution à la longueur d'onde de 750 nm et détermination de la quantité correspondante de tyrosine à partir d'une courbe d'étalonnage.

#### A.4 Réactifs

Utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue et de l'eau distillée ou déminéralisée ou de l'eau purifiée au moins équivalente.

**A.4.1 Acide chlorhydrique**,  $c(\text{HCl}) = 0,2 \text{ mol/l}$ .

**A.4.2 Acide chlorhydrique**,  $c(\text{HCl}) = 0,06 \text{ mol/l}$ .

**A.4.3 Acide chlorhydrique**,  $c(\text{HCl}) = 0,025 \text{ mol/l}$ .

**A.4.4 Acide trichloroacétique**, solution,  $\rho(\text{CCl}_3\text{CO}_2\text{H}) = 50 \text{ g/l}$ .

**A.4.5 Hydroxyde de sodium**, solution,  $c(\text{NaOH}) = 0,025 \text{ mol/l}$ .

**A.4.6 Réactif de Folin-Ciocalteu.**

Introduire 100 g de tungstate de sodium dihydraté ( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 25 g de molybdate de sodium dihydraté ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) et 700 ml d'eau dans un ballon à fond rond de 2 litres à col rodé. Ajouter 50 ml d'acide orthophosphorique [ $\rho(\text{H}_3\text{PO}_4) = 1,71 \text{ g/ml}$ ] et 100 ml d'acide chlorhydrique concentré [ $\rho(\text{HCl}) = 1,19 \text{ g/ml}$ ]. Ajuster