**Université Ziane Achour- Djelfa-**

**Faculté des sciences de la nature et de la vie**

**Département des sciences biologiques**

**Module :** analyses biochimiques et physico-chimiques

**TP n° 0 3 : Méthode de détermination de la teneur en azote total de la viande et des produits de la viande**

**1. DEFINITION**

**Teneur en azote des viandes et des produits à base de viande :** Quantité d’azote correspondant à l’ammoniac produit et déterminée dans les conditions spécifiées ci-après.

**2. PRINCIPE**

Attaque d.une prise d’essai par l’acide sulfurique concentré qui transforme l’azote organique en ions ammonium, en présence de sulfate de cuivre (II) comme catalyseur; alcalinisation, distillation de l’ammoniac libéré dans un excès de solution d’acide borique, titrage de l’ammoniac combiné avec l’acide borique par l’acide chlorhydrique et calcul, à partir de l’ammoniac produit, de la teneur en azote de l’échantillon.

**3. REACTIFS**

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique reconnue. L’eau utilisée doit être de l’eau distillée ou de l’eau de pureté au moins équivalente.

**3.1 Sulfate de cuivre (II) pentahydrate** (CuSO4.5H2O)

**3.2 Sulfate de potassium** (K2SO4) anhydre.

**3.3 Acide sulfurique,** p20 1,84 g/ml.

**3.4 Hydroxyde de sodium,** solution exempte de carbonate, contenant environ 33 g d’hydroxyde de sodium (NaOH) pour 100 g de solution : dissoudre 500 g d’hydroxyde de sodium dans 1000 ml d’eau.

**3.5 Acide borique,** solution : dissoudre 40 g d’acide borique (H3BO3) dans de l’eau et compléter à 1000 ml.

**3.6 Acide chlorhydrique,** solution titrée 0, l N, la normalité étant connue avec quatre décimales.

**3.7 Indicateur, solution :** indicateur mixte (rouge de méthyle-bleu de méthylène), préparé par dissolution de 2g de rouge de méthyle et de 1g de bleu de méthylène dans 1000 ml d’éthanol à 95 % (V/V). Le changement de couleur de la solution d’indicateur a lieu pour un pH de 5,4.

Conserver la solution d’indicateur dans une bouteille foncée dans un endroit sombre et frais.

**3.8 Régularisateurs d’ébullition.**

**3.8.1 Pour l’attaque chimique**

Billes en verre, carbure de silicium ou éclats de porcelaine dure.

**3.8.2 Pour la distillation**

Carbure de silicium ou morceaux de pierre ponce récemment incinérés.

**4. APPAREILLAGE**

Matériel courant de laboratoire, et notamment :

**4.1.1 Hachoir à viande,** de type laboratoire, muni d’une plaque perforée dont les trous ont un diamètre ne dépassant pas 4 mm.

**4.1.2 Homogénéisateur.**

**4.2 Papier sulfurisé,** d’environ 9 cm x 6 cm.

**4.3 Burette,** de 50 ml de capacité.

**4.4 Matras de Kjeldahl,** de 800 ml de capacité maximale, muni, si nécessaire, d’un bouchon en verre piriforme s’adaptant librement au sommet du col.

**4.5 Appareil d’entraînement par la vapeur,** ou, en variante, appareil de distillation ordinaire.

**4.6 Dispositif de chauffage,** sur lequel le matras de Kjeldahl peut être chauffé en position inclinée de manière que la source de chaleur n’atteigne que la partie de la paroi du matras située au-dessous du niveau du liquide.

**4.7 Dispositif d’aspiration,** pour les vapeurs d’acide libérées pendant l’attaque chimique.

**4.8 Balance analytique.**

**5. ECHANTILLON**

**5.1** Opérer sur un échantillon représentatif d’au moins 200g.

**5.2** Conserver l’échantillon de façon à éviter toute détérioration et tout changement dans sa composition. Les agents de conservation, s’il y en a, ne doivent pas contenir de composants azotés en quantités mesurables.

**6. MODE OPERATOIRE**

**6.1 Préparation de l’échantillon pour essai**

Rendre l’échantillon homogène par au moins deux passages dans le hachoir à viande (4.1) et mélanger. Garder l’échantillon dans un flacon fermé, étanche et rempli complètement, et le conserver de façon à éviter toute détérioration et tout changement dans sa composition. Analyser l’échantillon dès que possible après l’homogénéisation, mais toujours dans les 24 h.

**6.2 Prise d’essai**

Placer quelques régularisateurs d’ébullition (3.8) dans le matras de Kjeldahl (4.4), puis ajouter environ 15g du sulfate de potassium anhydre (3.2) et 0,5 g du sulfate de cuivre(Il) (3.1).

Peser, à 0,001g près, environ 2 g (ou 1,5g dans le cas d’un échantillon très gras) de l’échantillon pour essai (6.1) sur un morceau de papier sulfurisé (4.2).

Introduire le papier sulfurisé et la prise d’essai dans le matras de Kjeldahl.

**6.3 Détermination**

Ajouter, dans le matras de Kjeldahl, 25 ml de l’acide sulfurique (3.3). Mélanger doucement la solution par rotation. Le cas échéant, un bouchon piriforme en verre peut être introduit dans le col du matras, l’extrémité effilée étant dirigée vers le bas.

Placer le matras en position inclinée (inclinaison d’environ 40° par rapport à la verticale) sur le dispositif de chauffage (4.6). Le chauffer d’abord doucement, jusqu’à ce que la formation de mousse cesse et que le contenu se soit complètement liquéfié. Puis attaquer en chauffant vigoureusement et en faisant tourner périodiquement le matras, jusqu’à ce que le liquide soit complètement limpide et de teinte claire bleu-vert. Maintenir le liquide à ébullition durant encore 90 min.

La totalité de l’attaque chimique doit s’effectuer en un minimum de 2 h. Prendre soin qu’aucun liquide condensé ne coule sur la paroi extérieure du matras. Eviter que trop d’acide sulfurique ne s’échappe par suite d’une surchauffe pendant l’attaque chimique, ce qui risquerait d’entraîner une perte d’azote.

* Refroidir à environ 40 °C et ajouter, avec précaution, environ 50 ml d’eau. Mélanger et laisser refroidir.
* Verser, au moyen d’une éprouvette graduée, 50 ml de la solution d’acide borique (3.5) dans une fiole conique d’environ 500 ml de capacité, ajouter 4 gouttes de la solution d’indicateur (3.7), mélanger et placer la fiole sous le réfrigérant de l’appareil de distillation (4.5) de façon que l’extrémité de l’allonge plonge dans le liquide.

Opérer sur le contenu du matras de Kjeldahl selon la technique de distillation ordinaire

Diluer, avec précaution, le contenu du matras de Kjeldahl avec 300 ml d’eau et agiter par rotation.

Transvaser, si nécessaire, dans une fiole de 1 litre. Après environ 15 mn, ajouter, au moyen d’une éprouvette graduée, 100 ml de la solution d’hydroxyde de sodium (3.4), en les versants avec soin le long du col incliné du matras, afin que les deux couches ne se mélangent pas dans le matras. Relier immédiatement le matras à la tête à distiller de l’appareil de distillation.

1. Distiller au moins 150 ml du liquide, même si le mélange présente des soubresauts irréguliers. Poursuivre la distillation jusqu’à ce que le mélange commence à présenter des soubresauts ou jusqu’à l’obtention de 250 ml de distillat. S’assurer que le distillat est effectivement refroidi et éviter que la solution d’acide borique ne s’échauffe.
2. Dans les deux cas, juste avant la fin de la distillation, abaisser la fiole conique afin que l’extrémité de l’allonge soit au-dessus du niveau du liquide. Rincer l’extrémité de l’allonge au-dessus du liquide (à l’intérieur et à l’extérieur) avec un peu d’eau. Vérifier que la distillation de l’ammoniac est achevée, au moyen d’un papier de tournesol rouge, humecté avec de l’eau distillée ; sa couleur ne doit pas être modifiée par le liquide provenant du réfrigérant. Arrêter le chauffage. Si la distillation se révèle être incomplète, effectuer une nouvelle détermination en se conformant soigneusement aux indications.
3. Titrer le contenu de la fiole conique avec la solution d’acide chlorhydrique (3.6). Noter le volume de solution d’acide chlorhydrique nécessaire, en l’estimant à 0,02 ml près.
4. Effectuer deux déterminations sur des prises d’essais provenant du même échantillon pour essai.

**6.4 Essai à blanc**

Effectuer toujours un essai à blanc (en double) lorsque de nouveaux lots de réactifs ou des solutions fraîchement préparées sont utilisés. Il est recommandé d’effectuer périodiquement un essai à blanc pour les réactifs et les solutions qui ont déjà été utilisés depuis quelques temps.

Effectuer cet essai à blanc selon (6.3) en prenant uniquement un morceau de papier sulfurisé (4.2).

**7. EXPRESSION DES RESULTATS**

**7.1 Mode de calcul et formule**

La teneur en azote, exprimée en pourcentage en masse, est égale à :

0,0014 x (V1. V0) x 100/M

Où

* V0 : est le volume, en millilitres, de solution d’acide chlorhydrique 0, l N, utilisé pour l’essai à blanc ;
* V1 : est le volume, en millilitres, de solution d’acide chlorhydrique 0, l N, utilisé pour la détermination ;
* M : est la masse, en grammes, de la prise d’essai.

**Note :**

Si la solution titrée d’acide chlorhydrique utilisée n’a pas exactement la concentration prévue en (3.6), un facteur de correction approprié doit être utilisé pour le calcul du résultat.

Prendre comme résultat la moyenne arithmétique des deux déterminations si les conditions de répétabilité (7.2) sont remplies.

Exprimer le résultat à 0,0lg près d’azote pour 100g d’échantillon.

**7.2 Répétabilité**

La différence entre les résultats de deux déterminations effectuées presque simultanément ou rapidement l’une après l’autre par le même analyste, ne doit pas dépasser 0,10g d’azote pour 100g d’échantillon.

**8. REMARQUES**

* La détermination doit être effectuée dans une pièce exempte de vapeur d’ammoniac.
* Il est également possible d’effectuer le dosage sur une partie aliquote du contenu du matras de Kjeldahl.

Dans ces conditions, des modifications appropriées doivent être apportées à l’appareillage et au mode opératoire (quantités et concentrations des réactifs utilisés, temps de distillation, volume de distillat.

8.3 L’azote provenant de composés organiques non protéiques sera inclus dans la détermination, et ainsi des résultats inexacts de teneur en protéines seront obtenus si la teneur en protéines est calculée à partir de la teneur en azote.

Si, outre le résultat en azote, on veut exprimer le résultat en protéines, il faut indiquer le coefficient utilisé.