

---

---

**Aliments des animaux — Dosage du  
tryptophane**

*Animal feeding stuffs — Determination of tryptophan content*

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

[ISO 13904:2005](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4c024a53-0d36-4249-8db4-ea2c53708e1e/iso-13904-2005)

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4c024a53-0d36-4249-8db4-  
ea2c53708e1e/iso-13904-2005](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4c024a53-0d36-4249-8db4-ea2c53708e1e/iso-13904-2005)



**PDF – Exonération de responsabilité**

Le présent fichier PDF peut contenir des polices de caractères intégrées. Conformément aux conditions de licence d'Adobe, ce fichier peut être imprimé ou visualisé, mais ne doit pas être modifié à moins que l'ordinateur employé à cet effet ne bénéficie d'une licence autorisant l'utilisation de ces polices et que celles-ci y soient installées. Lors du téléchargement de ce fichier, les parties concernées acceptent de fait la responsabilité de ne pas enfreindre les conditions de licence d'Adobe. Le Secrétariat central de l'ISO décline toute responsabilité en la matière.

Adobe est une marque déposée d'Adobe Systems Incorporated.

Les détails relatifs aux produits logiciels utilisés pour la création du présent fichier PDF sont disponibles dans la rubrique General Info du fichier; les paramètres de création PDF ont été optimisés pour l'impression. Toutes les mesures ont été prises pour garantir l'exploitation de ce fichier par les comités membres de l'ISO. Dans le cas peu probable où surviendrait un problème d'utilisation, veuillez en informer le Secrétariat central à l'adresse donnée ci-dessous.

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

ISO 13904:2005

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4c024a53-0d36-4249-8db4-ea2c53708e1e/iso-13904-2005>



**DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT**

© ISO 2005

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'ISO à l'adresse ci-après ou du comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office  
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20  
Tel. + 41 22 749 01 11  
Fax + 41 22 749 09 47  
E-mail [copyright@iso.org](mailto:copyright@iso.org)  
Web [www.iso.org](http://www.iso.org)

Version française parue en 2008

Publié en Suisse

## Sommaire

Page

Avant-propos.....	iv
<b>1</b> <b>Domaine d'application</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b> <b>Principe</b> .....	<b>1</b>
<b>3</b> <b>Réactifs et matériaux</b> .....	<b>1</b>
<b>4</b> <b>Appareillage</b> .....	<b>2</b>
<b>5</b> <b>Mode opératoire</b> .....	<b>3</b>
<b>5.1</b> <b>Préparation des échantillons</b> .....	<b>3</b>
<b>5.2</b> <b>Dosage du tryptophane libre (extrait)</b> .....	<b>3</b>
<b>5.3</b> <b>Dosage du tryptophane total (hydrolysate)</b> .....	<b>3</b>
<b>5.4</b> <b>Dosage par CLHP</b> .....	<b>4</b>
<b>6</b> <b>Expression des résultats</b> .....	<b>4</b>
<b>7</b> <b>Fidélité</b> .....	<b>5</b>
<b>7.1</b> <b>Essai interlaboratoires</b> .....	<b>5</b>
<b>7.2</b> <b>Répétabilité</b> .....	<b>5</b>
<b>7.3</b> <b>Reproductibilité</b> .....	<b>5</b>
<b>8</b> <b>Rapport d'essai</b> .....	<b>5</b>
<b>Annexe A (informative) Résultats d'un essai interlaboratoires</b> .....	<b>6</b>
<b>Annexe B (informative) Observations sur la méthode</b> .....	<b>8</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>9</b>

## 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 Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 2.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. 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.

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

L'ISO 13904 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 10, *Aliments des animaux*.

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**  
ISO 13904:2005  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4c024a53-0d36-4249-8db4-ea2c53708e1e/iso-13904-2005>

# Aliments des animaux — Dosage du tryptophane

## 1 Domaine d'application

La présente Norme internationale décrit le dosage du tryptophane total et libre des aliments pour animaux (par exemple aliments complets et complémentaires, compléments alimentaires, matières premières, ingrédients, prémélanges et concentrés). Elle ne fait pas la distinction entre les formes D et L.

## 2 Principe

Pour le dosage du tryptophane total, l'échantillon est hydrolysé en milieu basique avec une solution d'hydroxyde de baryum et il est chauffé à 110 °C pendant 20 h. Après l'hydrolyse, un étalon interne est ajouté.

Pour le dosage du tryptophane libre, l'échantillon est extrait en milieu acide en présence d'un étalon interne.

Le tryptophane et l'étalon interne dans l'hydrolysate ou l'extrait sont déterminés par CLHP avec une séparation en phase inverse sur colonne C<sub>18</sub> et détection fluorimétrique.

## 3 Réactifs et matériaux

Sauf spécification contraire, n'utiliser que des réactifs de qualité analytique reconnue.

**3.1 Eau bidistillée**, ou de pureté équivalente (conductivité < 10 µS/cm).

**3.2 Substance étalon: tryptophane** (pureté/teneur ≥ 99 %) séché sous vide sur du pentoxyde de phosphore.

**3.3 Substance étalon interne: α-méthyl-tryptophane** (pureté/teneur ≥ 99 %) séché sous vide sur du pentoxyde de phosphore.

**3.4 Hydroxyde de baryum octahydraté.**

Prendre soin de ne pas exposer excessivement le Ba(OH)<sub>2</sub> · 8H<sub>2</sub>O à l'air afin d'éviter la formation de BaCO<sub>3</sub>, qui peut perturber le dosage (voir B.3).

**3.5 Hydroxyde de sodium.**

**3.6 Acide orthophosphorique**, w = 85 %.

**3.7 Acide chlorhydrique concentré**, ρ<sub>20</sub> = 1,19 g/ml.

**3.8 Méthanol**, qualité CLHP.

**3.9 Éther de pétrole**, plage d'ébullition entre 40 °C et 60 °C.

**3.10 Solution d'hydroxyde de sodium**, c = 1 mol/l.

Dissoudre 40,0 g de NaOH (3.5) dans de l'eau (3.1) et compléter 1 l avec de l'eau (3.1).

## ISO 13904:2005(F)

### 3.11 Acide chlorhydrique, $c = 6 \text{ mol/l}$ .

Prélever 492 ml d'HCl (3.7) et compléter à 1 l avec de l'eau (3.1).

### 3.12 Acide chlorhydrique, $c = 1 \text{ mol/l}$ .

Prélever 82 ml d'HCl (3.7) et compléter à 1 l avec de l'eau (3.1).

### 3.13 Acide chlorhydrique, $c = 0,1 \text{ mol/l}$ .

Prélever 8,2 ml d'HCl (3.7) et compléter à 1 l avec de l'eau (3.1).

### 3.14 Acide orthophosphorique, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ .

Prélever 34 ml d'acide orthophosphorique (3.6) et compléter à 1 l avec de l'eau (3.1).

### 3.15 Solution mère de tryptophane (3.2), $c = 0,000\ 5000 \text{ g/ml}$ .

Dans une fiole jaugée de 500 ml, dissoudre 0,25 g de tryptophane (3.2) (pesé à 0,1 mg près) dans de l'acide chlorhydrique (3.13) et porter au trait avec de l'acide chlorhydrique (3.13). Conserver à  $-18 \text{ °C}$  pendant quatre semaines maximum.

### 3.16 Solution mère d'étalon interne, $c = 0,000\ 54 \text{ g/ml}$ .

Dans une fiole jaugée de 500 ml, dissoudre 0,27 g de  $\alpha$ -méthyl-tryptophane (3.3) (pesé à 0,1 mg près) dans de l'acide chlorhydrique (3.13) et porter au trait avec de l'acide chlorhydrique (3.13). Conserver à  $-18 \text{ °C}$  pendant quatre semaines maximum.

### 3.17 Solution étalon de tryptophane de calibration et étalon interne.

Prélever 2,00 ml de solution mère de tryptophane (3.15) et 2,00 ml de solution mère d'étalon interne ( $\alpha$ -méthyl-tryptophane) (3.16). Diluer avec de l'eau (3.1) et du méthanol (3.8) approximativement au même volume et approximativement à la même concentration de méthanol (10 % à 30 %) que l'hydrolysats final.

Cette solution doit être préparée avant chaque utilisation.

Elle doit être protégée de l'exposition directe au soleil au cours de la préparation.

### 3.18 Éthanolamine > 98 %.

### 3.19 Solution de 1,1,1-trichloro-2-méthyl-2-propanol.

Ajouter 1 g de 1,1,1-trichloro-2-méthyl-2-propanol à 100 ml de méthanol (3.8).

### 3.20 Phase mobile pour CLHP.

Dissoudre 3,00 g d'acide acétique dans 900 ml d'eau (3.1) puis ajouter 50,0 ml de solution de 1,1,1-trichloro-2-méthyl-2-propanol (3.19). Ajuster le pH à 5,00 à l'aide de l'éthanolamine (3.18). Compléter à 1 000 ml avec de l'eau (3.1).

## 4 Appareillage

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

### 4.1 Équipement pour CLHP avec détecteur spectrofluorimétrique.

4.2 Colonne de chromatographie en phase liquide, 125 mm  $\times$  4 mm, avec  $C_{18}$ , particules de 3  $\mu\text{m}$ , ou équivalent.

**4.3 pH-mètre.**

**4.4 Flacon en polypropylène**, d'une capacité de 125 ml, à large col et bouchon à vis.

**4.5 Membrane filtrante**, 0,45 µm.

**4.6 Autoclave**, pouvant être maintenu à  $110\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ , [ $(140 \pm 10)\text{ kPa}$  ( $1,4 \pm 0,1$ ) bar].

Un boîtier fermé étanche à la pression placé dans une étuve de séchage réglable à  $(110 \pm 2)\text{ °C}$  peut être utilisé.

**4.7 Agitateur mécanique ou magnétique.**

**4.8 Mélangeur vortex.**

## 5 Mode opératoire

### 5.1 Préparation des échantillons

Broyer l'échantillon pour le réduire à une granulométrie de 0,5 mm. Avant broyage, les échantillons à fort taux d'humidité doivent être soit séchés à l'air à une température maximale de 50 °C ou par lyophilisation. Les échantillons à forte teneur en matières grasses doivent subir une extraction par de l'éther de pétrole (3.9) avant broyage.

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

### 5.2 Dosage du tryptophane libre (extrait)

Peser, à 1 mg près, une quantité appropriée (de 1 g à 5 g) de l'échantillon préparé (5.1) dans un erlenmeyer. Ajouter 100,0 ml d'acide chlorhydrique (3.13) et 5,00 ml de la solution mère d'étalon interne (3.16). Agiter ou mélanger pendant 60 min avec un agitateur mécanique ou magnétique (4.7). Laisser décanter et prélever à la pipette 10,0 ml de surnageant dans un bécher. Ajouter 5 ml d'acide orthophosphorique (3.14). Ajuster le pH à 3,0 avec l'hydroxyde de sodium (3.10). Ajouter assez de méthanol (3.8) pour obtenir une concentration comprise entre 10 % et 30 % de méthanol dans le volume final. Transférer dans une fiole jaugée d'un volume approprié et diluer avec de l'eau (3.1) jusqu'à un volume nécessaire pour la chromatographie [à peu près le même volume que la solution d'étalonnage (3.17)].

Filtrer quelques millilitres de la solution à travers une membrane filtrante de 0,45 µm (4.5) avant injection sur la colonne de CLHP. Passer à la chromatographie décrite en 5.4.

Protéger la solution étalon et les extraits de la lumière directe du soleil. Si les extraits ne peuvent pas être analysés le jour même, ils peuvent être stockés à 5 °C pendant trois jours au maximum.

### 5.3 Dosage du tryptophane total (hydrolysate)

Peser, à 0,2 mg près, de 0,1 g à 1 g de l'échantillon préparé (5.1) dans le flacon de polypropylène (4.4). La prise d'essai pesée doit avoir une teneur en azote d'environ 10 mg. Ajouter 8,4 g d'hydroxyde de baryum octahydraté (3.4) et 10 ml d'eau (3.1). Mélanger avec un mélangeur vortex (4.8) ou un agitateur magnétique (4.7). Laisser l'aimant revêtu de Teflon dans le mélange. Rincer les bords du récipient avec 4 ml d'eau (3.1). Poser le bouchon à vis sur le flacon sans le serrer. Transférer dans l'autoclave (4.6) contenant de l'eau bouillante, et de la vapeur pendant 30 min à 60 min. Fermer l'autoclave et autoclaver à  $(110 \pm 2)\text{ °C}$  pendant 20 h.

Avant d'ouvrir l'autoclave, réduire la température à un peu moins de 100 °C. Afin d'éviter la cristallisation du  $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ , ajouter 30 ml d'eau (3.1) à température ambiante au mélange chaud. Remuer ou agiter doucement. Ajouter 2,00 ml de solution étalon interne concentrée ( $\alpha$ -méthyl-tryptophane) (3.16). Refroidir le récipient dans un bain d'eau glacée pendant 15 min.

Ajouter alors 5 ml d'acide orthophosphorique (3.14). Garder le récipient dans le bain réfrigérant et le neutraliser avec l'HCl 6 mol/l (3.11) tout en agitant et ajuster le pH à 3,0 avec du HCl 1 mol/l (3.12). Ajouter assez de méthanol pour obtenir une concentration comprise entre 10 % et 30 % de méthanol dans le volume final. Transférer dans une fiole jaugée d'un volume approprié et diluer avec de l'eau (3.1) jusqu'au volume défini nécessaire à la chromatographie (par exemple 100 ml). Il convient que l'ajout de méthanol ne provoque pas de précipitation.

Filter quelques millilitres de la solution au travers d'une membrane filtrante de 0,45 µm (4.5) avant injection sur une colonne CLHP. Passer à la chromatographie décrite en 5.4.

Protéger la solution étalon et les hydrolysats de la lumière directe du soleil. Si les extraits ne peuvent pas être analysés le jour même, ils peuvent être entreposés à 5 °C pendant trois jours maximum.

#### 5.4 Dosage par CLHP

Les conditions suivantes de l'élution isocratique sont données à titre indicatif. D'autres conditions peuvent être utilisées si elles produisent des résultats équivalents (voir aussi B.1 et B.2):

Colonne de chromatographie en phase liquide (4.2):	125 mm × 4 mm, avec C <sub>18</sub> , particules de 3 µm ou équivalente
Température de colonne:	température ambiante
Phase mobile (3.20):	Dissoudre 3,00 g d'acide acétique dans 900 ml d'eau (3.1) puis ajouter 50,0 ml de solution de 1,1,1-trichloro-2-méthyl-2-propanol (3.19). Ajuster le pH à 5,00 à l'aide de l'éthanolamine (3.18). Compléter jusqu'à 1000 ml avec de l'eau.
Débit:	1 ml/min
Temps de rétention total:	environ 34 min
Longueur d'onde de détection:	excitation: 280 nm; émission: 356 nm
Volume d'injection:	20 µl

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

ISO 13904:2005  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4c024a53-0d36-4249-8db4-ea2c53708e1e/iso-13904-2005>

#### 6 Expression des résultats

La teneur en tryptophane, *w*, en grammes pour 100 g d'échantillon, est calculée comme suit:

$$w = \frac{A_{is,cal} \times A_{try,sam} \times V_{try} \times c_{try} \times V_{is,sam} \times 100}{A_{is,sam} \times A_{try,cal} \times V_{is,cal} \times m}$$

où

- A<sub>is,cal</sub>* est l'aire de pic de l'étalon interne dans la solution d'étalonnage (3.17);
- A<sub>try,sam</sub>* est l'aire du pic du tryptophane dans l'extrait (5.2) ou dans l'hydrolysate (5.3);
- V<sub>try</sub>* est le volume, en millilitres (2 ml), de la solution mère de tryptophane (3.15) ajouté à la solution d'étalonnage (3.17);
- c<sub>try</sub>* est la concentration, en grammes par millilitre (= 2,50), de la solution mère de tryptophane (3.15) ajoutée à la solution d'étalonnage (3.17);
- V<sub>is,sam</sub>* est le volume, en millilitres, de solution mère d'étalon interne (3.16) ajouté à l'extraction (5.2) (= 5,00 ml) ou à l'hydrolysate (5.3) (= 2,00 ml);



- $A_{is,sam}$  est l'aire du pic de l'étalon interne dans l'extrait (5.2) ou l'hydrolysate (5.3);
- $A_{try,cal}$  est l'aire de pic du tryptophane de la solution d'étalonnage (3.17);
- $V_{is,cal}$  est le volume, en millilitres (2,00 ml), de solution mère d'étalon interne (3.16) ajouté à la solution d'étalonnage (3.17);
- $m$  est la masse d'échantillon, en grammes (corrigée en masse initiale en cas de séchage et/ou dégraissage).

## 7 Fidélité

### 7.1 Essai interlaboratoires

Les détails d'essai interlaboratoires sur la fidélité de la méthode sont résumés dans l'Annexe A. Les valeurs obtenues à partir de cet essai interlaboratoires peuvent ne pas être applicables à des gammes de concentration et matrices autres que celles données.

### 7.2 Répétabilité

La différence absolue entre deux résultats d'essais individuels indépendants, obtenus avec la même méthode sur des matériaux d'essai identiques dans le même laboratoire par le même opérateur utilisant le même équipement sur une courte période, sera, dans moins de 5 % des cas, supérieure à la limite de répétabilité,  $r$ , donnée dans les Tableaux A.1 à A.3.

### 7.3 Reproductibilité

La différence absolue entre deux résultats d'essai individuels indépendants, obtenus avec la même méthode sur des matériaux d'essai identiques dans des laboratoires différents par des opérateurs différents utilisant des équipements différents, sera, dans moins de 5 % des cas, supérieure à la limite de reproductibilité,  $R$ , donnée dans les Tableaux A.1 à A.3.

## 8 Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit spécifier:

- toutes les informations nécessaires à l'identification complète de l'échantillon;
- la méthode d'échantillonnage utilisée, si elle est connue;
- la méthode d'essai utilisée, avec une référence à la présente Norme internationale;
- tous les détails d'opérations non spécifiées dans la présente Norme internationale ou considérés comme facultatifs, ainsi que les détails du moindre incident ayant influé sur les résultats de l'essai;
- les résultats d'essai obtenus ou, si la répétabilité a été vérifiée, les résultats finaux obtenus.