

ISO/TC 34/SC 10

Secrétariat: ISIRI

Début de vote:
2015-10-29

Vote clos le:
2015-12-29

Aliments des animaux — Dosage du tryptophane

Animal feeding stuffs — Determination of tryptophan content

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
Full standard:
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/7dad79fe-fbb2-4293-8296-a53bfb742794/iso-13904-2016>

LES DESTINATAIRES DU PRÉSENT PROJET SONT INVITÉS À PRÉSENTER, AVEC LEURS OBSERVATIONS, NOTIFICATION DES DROITS DE PROPRIÉTÉ DONT ILS AURAIENT ÉVENTUELLEMENT CONNAISSANCE ET À FOURNIR UNE DOCUMENTATION EXPLICATIVE.

OUTRE LE FAIT D'ÊTRE EXAMINÉS POUR ÉTABLIR S'ILS SONT ACCEPTABLES À DES FINS INDUSTRIELLES, TECHNOLOGIQUES ET COMMERCIALES, AINSI QUE DU POINT DE VUE DES UTILISATEURS, LES PROJETS DE NORMES INTERNATIONALES DOIVENT PARFOIS ÊTRE CONSIDÉRÉS DU POINT DE VUE DE LEUR POSSIBILITÉ DE DEVENIR DES NORMES POUVANT SERVIR DE RÉFÉRENCE DANS LA RÉGLEMENTATION NATIONALE.

Veillez consulter les notes administratives en page iii



Numéro de référence
ISO/FDIS 13904:2015(F)

TRAITEMENT PARALLÈLE ISO/CEN

Le présent projet final a été élaboré dans le cadre de l'Organisation internationale de normalisation (ISO) et soumis selon le mode de collaboration **sous la direction de l'ISO**, tel que défini dans l'Accord de Vienne. Le projet final a été établi sur la base des observations reçues lors de l'enquête parallèle sur le projet.

Le projet final est par conséquent soumis aux comités membres de l'ISO et aux comités membres du CEN en parallèle à un vote d'approbation de deux mois au sein de l'ISO et à un vote formel au sein du CEN.

Les votes positifs ne doivent pas être accompagnés d'observations.

Les votes négatifs doivent être accompagnés des arguments techniques pertinents.

ITeH STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
Full standard:
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/7dad79fe-fbb2-4293-8296-a53bbf742794/iso-13904-2016>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2015, Publié en Suisse

Droits de reproduction réservés. Sauf indication contraire, 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, l'affichage sur l'internet ou sur un Intranet, sans autorisation écrite préalable. Les demandes d'autorisation peuvent être adressées à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Ch. de Blandonnet 8 • CP 401
CH-1214 Vernier, Geneva, Switzerland
Tel. +41 22 749 01 11
Fax +41 22 749 09 47
copyright@iso.org
www.iso.org

Sommaire

Page

Avant-propos.....	iv
1 Domaine d'application	1
2 Principe	1
3 Réactifs et matériaux	1
4 Appareillage	3
5 Mode opératoire	4
5.1 Préparation des échantillons.....	4
5.1.1 Aliments.....	4
5.1.2 Substances pures du commerce et prémélanges contenant plus de 2 % de tryptophane.....	4
5.2 Dosage du tryptophane libre (extrait).....	4
5.2.1 Aliments.....	4
5.2.2 Substances pures du commerce et prémélanges contenant plus de 2 % de tryptophane.....	4
5.3 Dosage du tryptophane total (hydrolysats).....	5
5.4 Dosage par CLHP.....	5
6 Calcul des résultats	6
6.1 Aliments.....	6
6.2 Produits purs du commerce et prémélanges contenant plus de 2 % de tryptophane.....	6
6.2.1 Contrôle de l'étalonnage.....	6
6.2.2 Calcul.....	7
7 Fidélité	7
7.1 Essai interlaboratoires.....	7
7.1.1 Aliments.....	7
7.1.2 Substances pures du commerce et prémélanges contenant plus de 2 % de tryptophane.....	7
7.2 Répétabilité.....	7
7.2.1 Aliments.....	7
7.2.2 Substances pures du commerce et prémélanges contenant plus de 2 % de tryptophane.....	7
7.3 Reproductibilité.....	8
7.3.1 Aliments.....	8
7.3.2 Substances pures et prémélanges contenant plus de 2 % de tryptophane.....	8
8 Rapport d'essai	8
Annexe A (informative) Résultats d'un essai interlaboratoires	9
Annexe B (informative) Observations sur la méthode	11
Annexe C (informative) Préparation des échantillons: Exemples portant sur des analyses dans des produits purs et des prémélanges	12
Annexe D (informative) Résultats d'un essai interlaboratoires portant sur le tryptophane dans les produits purs et les prémélanges contenant plus de 2 % de tryptophane	13
Bibliographie	15

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 (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier, de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir www.iso.org/directives).

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. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/brevets).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'OMC concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: [Avant-propos — Informations supplémentaires](#).

Le comité chargé de l'élaboration du présent document est l'ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 10, *Aliments des animaux*.

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 13904:2005), qui a fait l'objet d'une révision technique.

Aliments des animaux — Dosage du tryptophane

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale décrit une méthode de dosage du tryptophane total et libre (Trp) dans les aliments pour animaux (par exemple aliments complets et complémentaires, compléments alimentaires, matières premières, ingrédients et concentrés) et une méthode de dosage du tryptophane libre dans les substances pures du commerce et les prémélanges contenant plus de 2 % de tryptophane.

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 alcalin avec une solution d'hydroxyde de baryum saturé 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 légèrement acide en présence d'un étalon interne. Pour les substances pures du commerce et les prémélanges contenant plus de 2 % de tryptophane, il est possible d'ajouter l'étalon interne après l'extraction.

Le tryptophane et l'étalon interne dans l'hydrolysate ou l'extrait sont déterminés par CLHP avec une séparation en phase inverse sur colonne C₁₈ 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 et substance de contrôle: tryptophane (pureté/teneur w ≥ 99 %) séché sous vide sur du pentoxyde de phosphore. Le produit est considéré comme pur à 100 %.

Les deux produits sont considérés comme purs à 100 %. La substance de contrôle doit provenir d'un autre fabricant que celui de la substance étalon (voir [3.17.2](#)).

NOTE Le contrôle de pureté de la substance étalon peut être réalisé en mesurant l'absorbance d'une solution de tryptophane à 280 nm. Préparer une solution d'environ 5 mg/l dans de l'HCl à 10⁻³ N à partir d'une solution mère et mesurer l'absorbance OD à 280 nm par rapport à de l'HCl à 10⁻³ N. La concentration du tryptophane est alors:

$$C = OD/5\ 630 * 10^{+06}$$

où

5 630 est le coefficient d'extinction molaire du tryptophane dans l'eau à 280 nm;

C est exprimée en µmol/l.

La pureté de la substance étalon est alors (C/C₀)*100 où C₀ est la concentration théorique de la solution diluée, exprimée en µmol/l, égale à environ 25 µmol/l.

Le contrôle de pureté est réalisé tous les six mois; la pureté doit être ≥ 99 %.

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

3.4 Hydroxyde de baryum octahydraté.

Il convient de veiller à ne pas exposer excessivement le $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ à l'air afin d'éviter la formation de BaCO_3 , qui peut perturber le dosage (voir l'observation en [B.3](#)).

3.5 Hydroxyde de sodium.

3.6 Acide orthophosphorique, $w = 85 \%$.

3.7 Acide chlorhydrique concentré, $\rho_{20} = 1,19 \text{ g/ml}$.

3.8 Méthanol, qualité CLHP.

3.9 Éther de pétrole, plage d'ébullition entre $40 \text{ }^\circ\text{C}$ et $60 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.10 Solution d'hydroxyde de sodium, $c = 1 \text{ mol/l}$.

Dissoudre 40,0 g de NaOH ([3.5](#)) dans de l'eau ([3.1](#)) et ajuster à 1 l avec de l'eau ([3.1](#)).

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

Prélever 492 ml de HCl ([3.7](#)) et ajuster à 1 l avec de l'eau ([3.1](#)).

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

Prélever 82 ml de HCl ([3.7](#)) et ajuster à 1 l avec de l'eau ([3.1](#)).

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

Prélever 8,2 ml de HCl ([3.7](#)) et ajuster 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 ajuster à 1 l avec de l'eau ([3.1](#)).

3.15 Solution mère étalon de tryptophane et solution de contrôle ([3.2](#)), $c = 0,50 \text{ g/l}$.

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 compléter jusqu'au trait avec de l'acide chlorhydrique ([3.13](#)). Conserver à environ $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant quatre semaines maximum.

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

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

3.17 Solutions d'étalonnage de tryptophane et étalon interne

3.17.1 Solution d'étalonnage pour l'analyse du tryptophane dans les aliments pour animaux, ($c = 0,010 \text{ g/l}$).

Prélever 2,00 ml de solution mère de tryptophane ([3.15](#)) et 2,00 ml de solution mère d'étalon interne (α 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'hydrolysate final.

Cette solution doit être préparée avant chaque utilisation.

La protéger de l'exposition directe au soleil au cours de la préparation.

3.17.2 Solution d'étalonnage pour l'analyse du tryptophane dans les substances pures du commerce et les prémélanges contenant plus de 2 % de tryptophane, ($c = 0,010$ g/l).

Prélever 2,00 ml de solution mère de tryptophane (3.15) et 2,00 ml de solution mère d'étalon interne (α -méthyl-tryptophane) (3.16).

Diluer avec de l'acide chlorhydrique à 0,1 mol/l (3.13) dans une fiole jaugée de 100 ml. Compléter jusqu'au trait.

Cette solution doit être préparée avant chaque utilisation.

La protéger de l'exposition directe au soleil au cours de la préparation.

Pour la vérification de la solution d'étalonnage, il est possible d'utiliser une solution de contrôle de tryptophane. Cette solution de contrôle est préparée et analysée comme décrit pour la solution d'étalonnage, mais elle doit provenir d'un autre fabricant que celui de la substance étalon (3.2). La concentration en tryptophane dans l'échantillon de contrôle doit être comprise entre 99 % et 101 %.

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).

NOTE La solution de 1,1,1-trichloro-2-méthyl-2-propanol (3.19) pourrait être considérée dangereuse pour des raisons environnementales et peut nécessiter des dispositions particulières pour son élimination.

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 d'éthanolamine (3.18). Compléter à 1 000 ml avec de l'eau (3.1).

La durée de conservation de la phase mobile (en particulier la stabilité du mélange d'acide acétique et d'éthanolamine) doit être contrôlée par les temps de rétention.

Voir également l'Annexe B pour une phase mobile alternative: le mélange de tampon phosphate et de méthanol est moins onéreux et sans danger et il n'est pas nécessaire d'ajuster le pH. Le mélange est très stable.

4 Appareillage

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

4.1 Équipement pour CLHP avec détecteur spectrofluorimétrique.

4.2 Colonne de chromatographie en phase liquide, 125 mm × 4 mm, avec C₁₈, particules de 3 μ 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 en acétate de cellulose (de 0,45 μ m ou 0,22 μ m de porosité).

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

Un boîtier fermé étanche à la pression placé dans une étuve de séchage réglable à (110 ± 2) °C peut être utilisé.

4.7 Agitateur mécanique ou magnétique.

4.8 Mélangeur vortex.

4.9 Verrerie – filtres.

4.10 Erlenmeyers gradués: 200 ml, 250 ml, 600 ml.

4.11 Fioles jaugées: 100 ml, 500 ml, 1 000 ml (toutes de classe A).

5 Mode opératoire

5.1 Préparation des échantillons

5.1.1 Aliments

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

5.1.2 Substances pures du commerce et prémélanges contenant plus de 2 % de tryptophane

Broyer l'échantillon pour le réduire à une granulométrie de 0,25 mm et bien l'homogénéiser.

5.2 Dosage du tryptophane libre (extrait)

5.2.1 Aliments

Peser, à 1 mg près, une quantité appropriée (de 1 g à 5 g) de l'échantillon préparé (5.1.1) 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 le sédiment 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 de volume approprié et diluer avec de l'eau (3.1) jusqu'au volume nécessaire pour la chromatographie [à peu près le même volume que la solution d'étalonnage (3.17.1)].

Filtrer quelques millilitres de la solution au travers d'une membrane filtrante de $0,45 \mu\text{m}$ (4.5) avant injection sur la colonne CLHP. Passer à l'étape de chromatographie décrite en 5.4.

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

5.2.2 Substances pures du commerce et prémélanges contenant plus de 2 % de tryptophane

Peser, à 0,1 mg près, de 0,5 g à 5 g de l'échantillon bien homogénéisé (5.1.2), en fonction de la concentration de tryptophane attendue dans l'échantillon (voir, par exemple, l'Annexe C) dans une fiole jaugée de 1 000 ml.

Ajuster au volume avec de l'acide chlorhydrique à 0,1 mol/l (3.13).

Agiter le mélange pendant 30 min avec un agitateur mécanique ou magnétique (4.7). Laisser décanter les particules.

Transférer une aliquote de 2 ml de solution limpide dans une fiole jaugée de 100 ml. Ajouter 2 ml de la solution mère d'étalon interne (3.16).

Ajuster au trait avec de l'acide chlorhydrique à 0,1 mol/l (3.13).

Il convient que cette solution d'essai diluée ait une concentration de tryptophane aussi proche que possible de la concentration en tryptophane de la solution d'étalonnage (3.17.2). La concentration de l'étalon interne doit également être similaire ($c = 0,0108 \text{ g/l}$) à celle dans la solution d'étalonnage (3.17.2). Voir l'Annexe A pour un exemple de préparation des échantillons.

Filtrer quelques millilitres de la solution au travers d'une membrane filtrante de $0,45 \mu\text{m}$ (4.5) avant injection sur la colonne CLHP. Passer à l'étape de chromatographie décrite en 5.4.

Protéger la solution étalon et les extraits de la lumière directe du soleil. Si les analyses ne peuvent pas être effectuées le jour même, les extraits doivent être conservés à une température inférieure à 5°C pendant trois jours maximum.

5.3 Dosage du tryptophane total (hydrolysats)

Peser, à 0,2 mg près, de 0,1 g à 1 g de l'échantillon préparé (5.1.1) dans le flacon en polypropylène (4.4). Il convient que la prise d'essai pesée ait 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 Téflon 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 $(110 \pm 2)^\circ\text{C}$ 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 mère d'étalon interne (α -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). Maintenir le récipient dans le bain réfrigérant et le neutraliser avec de l'HCl 6 mol/l (3.11) tout en agitant et ajuster le pH à 3,0 avec de l'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 de volume approprié et diluer avec de l'eau (3.1) jusqu'au volume défini nécessaire pour la chromatographie (par exemple 100 ml). Il convient que l'ajout de méthanol ne provoque pas de précipitation.

Filtrer quelques millilitres de la solution au travers d'une membrane filtrante de $0,45 \mu\text{m}$ (4.5) avant injection sur la colonne CLHP. Passer à l'étape de 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 conservés 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.

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

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 d'éthanolamine (3.18). Compléter jusqu'à 1 000 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

6 Calcul des résultats

6.1 Aliments

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

$$w = \frac{A_{is,cal} \times A_{trp,sam} \times V_{trp} \times c_{trp} \times V_{is,sam} \times 100}{A_{is,sam} \times A_{trp,cal} \times V_{is,cal} \times m} \quad (1)$$

où

$A_{is,cal}$ est l'aire de pic de l'étalon interne dans la solution d'étalonnage (3.17.1);

$A_{trp,sam}$ est l'aire de pic du tryptophane dans l'extrait (5.2.1) ou dans l'hydrolysate (5.3);

V_{trp} est le volume, en millilitres (2 ml), de la solution mère de tryptophane (3.15) ajouté à la solution d'étalonnage (3.17.1);

c_{trp} est la concentration, en grammes par litre (=0,50), de solution mère de tryptophane (3.15) ajoutée à la solution d'étalonnage (3.17.1);

$V_{is,sam}$ est le volume, en millilitres, de solution mère d'étalon interne (3.16) ajouté à l'extraction (5.2.1) (=5,00 ml) ou à l'hydrolysate (5.3) (=2,00 ml);

$V_{is,cal}$ est le volume, en millilitres (=2,00 ml), de solution mère d'étalon interne (3.16) ajouté à la solution d'étalonnage (3.17.1);

$A_{is,sam}$ est l'aire de pic de l'étalon interne dans l'extrait (5.2.1) ou dans l'hydrolysate (5.3);

$A_{trp,cal}$ est l'aire de pic du tryptophane de la solution d'étalonnage (3.17.1);

m est la masse d'échantillon, en grammes (corrigée en masse initiale en cas de séchage et/ou de dégraissage).

6.2 Produits purs du commerce et prémélanges contenant plus de 2 % de tryptophane

6.2.1 Contrôle de l'étalonnage

Il est nécessaire de vérifier la qualité de cette solution. Si elle n'est pas conforme, une nouvelle solution doit être préparée (3.17.2).

Analyser une solution d'étalonnage toutes les quatre solutions d'essai.