

DIN EN ISO 20418-3



ICS 59.060.01

**Textilien –
Qualitative und quantitative Proteomanalyse einiger Tierhaarfasern –
Teil 3: Peptiddetektion mit LC-MS ohne Proteinreduktion
(ISO 20418-3:2020);
Deutsche Fassung EN ISO 20418-3:2020**

Textiles –

Qualitative and quantitative proteomic analysis of some animal hair fibres –
Part 3: Peptide detection using LC-MS without protein reduction (ISO 20418-3:2020);
German version EN ISO 20418-3:2020

Textiles –

Analyse protéomique qualitative et quantitative de certaines fibres animales –
Partie 3: Détection des peptides par LC-MS sans réduction protéique (ISO 20418-3:2020);
Version allemande EN ISO 20418-3:2020

Gesamtumfang 32 Seiten

DIN-Normenausschuss Materialprüfung (NMP)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 20418-3:2020) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 38 „Textiles“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 248 „Textilien und textile Erzeugnisse“ erarbeitet, dessen Sekretariat von BSI (Vereinigtes Königreich) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 062-05-12 AA „Textilchemische Prüfverfahren und Fasertrennung“ im DIN-Normenausschuss Materialprüfung (NMP).

Für die in diesem Dokument zitierten Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 1833 (all parts)	siehe	DIN EN ISO 1833 (alle Teile)
ISO 3696	siehe	DIN ISO 3696
ISO 5725-2	siehe	DIN ISO 5725-2
ISO 13528	siehe	DIN ISO 13528
ISO 17751 (all parts)	siehe	DIN EN ISO 17751 (alle Teile)
ISO 20418-1	siehe	DIN EN ISO 20418-1
ISO/TR 11827	siehe	DIN CEN ISO/TR 11827 (DIN SPEC 4869)

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN CEN ISO/TR 11827 (DIN SPEC 4869), *Textilien — Prüfung der Zusammensetzung — Identifizierung der Fasern*

DIN EN ISO 1833 (alle Teile), *Textilien — Quantitative chemische Analysen*

DIN EN ISO 17751 (alle Teile), *Textilien — Quantitative Analyse von Kaschmir, Wolle, anderen speziellen tierischen Fasern und deren Mischungen*

DIN EN ISO 20418-1, *Textilien — Qualitative und quantitative Proteomanalyse einiger Tierhaarfasern — Teil 1: Peptiddetektion mittels LC-ESI-MS mit Proteinreduktion*

DIN ISO 3696, *Wasser für analytische Zwecke — Anforderungen und Prüfungen*

DIN ISO 5725-2, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 2: Grundlegende Methode für Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens*

DIN ISO 13528, *Statistische Verfahren für Eignungsprüfungen durch Ringversuche*

Deutsche Fassung

Textilien —
Qualitative und quantitative Proteomanalyse
einiger Tierhaarfasern —
Teil 3: Peptiddetektion mit LC-MS ohne Proteinreduktion
(ISO 20418-3:2020)

Textiles —
Qualitative and quantitative proteomic analysis of some
animal hair fibres —
Part 3: Peptide detection using LC-MS without protein
reduction (ISO 20418-3:2020)

Textiles —
Analyse protéomique qualitative et quantitative de
certaines fibres animales —
Partie 3: Détection des peptides par LC-MS sans
réduction protéique (ISO 20418-3:2020)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 7. Juni 2020 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim CEN-CENELEC-Management-Zentrum oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, der Republik Nordmazedonien, Rumänien, Schweden, der Schweiz, Serbien, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

CEN-CENELEC Management-Zentrum: Rue de la Science 23, B-1040 Brüssel

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Vorwort	5
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
5 Kurzbeschreibung	8
6 Reagenzien	9
7 Geräte	9
8 Prüfverfahren	10
8.1 Probenahme	10
8.2 Vorabidentifizierung	10
8.3 Waschen zur Entfettung	10
8.4 Pulverisierung von Fasern	10
8.5 Trypsin-Auflschluss	10
8.6 Markerpeptide	11
8.7 LC-MS-Analyse	11
8.8 Bewertung der Gültigkeit der ermittelten Daten	11
8.9 Berechnung des Korrekturfaktors	12
8.9.1 Korrekturfaktor	12
8.9.2 Korrekturfaktor für Cas1 gegenüber She1 und Yak1 (kc)	12
8.9.3 Korrekturfaktor für Yak2 gegenüber She2, She3 und Cas2 (ky)	12
8.9.4 Korrekturfaktor für Alpaka und Kamel (ka)	12
8.9.5 Korrekturfaktor für Angora (kr)	12
8.10 Berechnung des Mischungsverhältnisses	13
8.10.1 Berechnung des Mischungsverhältnisses von Kaschmir, Schafwolle und Yak	13
8.10.2 Berechnung mittels She1, Cas1, Yak1 und kc	13
8.10.3 Berechnung mittels She2, She3, Cas2, Yak2 und ky	13
8.10.4 Berechnung mittels She1, She2, She3, Cas2, Yak1	14
8.10.5 Berechnung des Mischungsverhältnisses von Kamel, Alpaka und Angora	14
9 Prüfbericht	15
Anhang A (informativ) Markerpeptide von Kaschmir-, Schafwolle- und Yakfasern	16

Anhang B (informativ) Beispiel für LC-MS-Analysebedingungen.....	19
Anhang C (informativ) Analyse von Kamel-, Alpaka- und Angorafasern.....	22
Anhang D (informativ) Beispiel für Massenchromatogramme von Markerpeptiden.....	25
Anhang E (informativ) Ergebnisse des Ringversuchs	29
Literaturhinweise.....	30

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 20418-3:2020) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 38 „Textiles“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 248 „Textilien und textile Erzeugnisse“ erarbeitet, dessen Sekretariat von BSI gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Januar 2021, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Januar 2021 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Entsprechend der CEN-CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, die Republik Nordmazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Serbien, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Türkei, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 20418-3:2020 wurde von CEN als EN ISO 20418-3:2020 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsinstitute (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird üblicherweise von Technischen Komitees von ISO durchgeführt. Jede Mitgliedsorganisation, die Interesse an einem Thema hat, für welches ein Technisches Komitee gegründet wurde, hat das Recht, in diesem Komitee vertreten zu sein. Internationale staatliche und nichtstaatliche Organisationen, die in engem Kontakt mit ISO stehen, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet bei allen elektrotechnischen Normungsthemen eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) zusammen.

Die Verfahren, die bei der Entwicklung dieses Dokuments angewendet wurden und die für die weitere Pflege vorgesehen sind, werden in den ISO/IEC-Direktiven, Teil 1 beschrieben. Es sollten insbesondere die unterschiedlichen Annahmekriterien für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC-Direktiven, Teil 2 erarbeitet (siehe www.iso.org/directives).

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren. Details zu allen während der Entwicklung des Dokuments identifizierten Patentrechten finden sich in der Einleitung und/oder in der ISO-Liste der erhaltenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname dient nur zur Unterrichtung der Anwender und bedeutet keine Anerkennung.

Für eine Erläuterung des freiwilligen Charakters von Normen, der Bedeutung ISO-spezifischer Begriffe und Ausdrücke in Bezug auf Konformitätsbewertungen sowie Informationen darüber, wie ISO die Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO, en: World Trade Organization) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT, en: Technical Barriers to Trade) berücksichtigt, siehe www.iso.org/iso/foreword.html.

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 38, *Textiles*, in Zusammenarbeit mit dem Europäischen Komitee für Normung (CEN) Technisches Komitee CEN/TC 248, *Textilien und textile Erzeugnisse*, in Übereinstimmung mit der Vereinbarung zur technischen Zusammenarbeit zwischen ISO und CEN (Wiener Vereinbarung) erarbeitet.

Eine Auflistung aller Teile der Normenreihe ISO 20418 ist auf der ISO-Internetseite abrufbar.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Auflistung dieser Institute ist unter www.iso.org/members.html zu finden.

Einleitung

Kaschmir ist eine lange, dünne Faser, die von Kaschmirziegen erhalten wird und aufgrund seiner hohen Qualität und Seltenheit kostspielig ist. Weltweit wurde wiederholt über Fälschungen oder Fälschungen von Kaschmirprodukten berichtet, die mit anderen, preiswerteren Tierfasern, z. B. Schafwolle und Yak, gemischt sind.

Derzeit offizielle Verfahren zur Identifizierung von speziellen Tierfasern stützen sich auf mikroskopische Beobachtungen. Allerdings wurde die mikroskopiegestützte Identifizierung aufgrund einer umfassenderen Anwendung chemischer oder physikalischer Behandlungen im Herstellungsprozess immer schwieriger. In Anbetracht dieser Probleme wurden mehrere andere Verfahren ebenfalls untersucht, entweder zur Unterscheidung von Faserstrukturen durch den Einsatz von Nahinfrarotspektroskopie oder Terahertzspektroskopie oder zur Unterscheidung von DNA-Sequenzen durch die Verwendung der Polymerasekettenreaktion. Dennoch hat jedes Verfahren bei der Anwendung einige Schwierigkeiten gezeigt. Deshalb ist es erforderlich, ein neuartiges Identifikationsverfahren zu entwickeln.

Tierfasern bestehen hauptsächlich aus Proteinen, die als Keratine bezeichnet werden, sowie einigen zugehörigen Proteinen. Daher stützen sich die vielversprechendsten Verfahren zur Identifizierung von Fasern auf die Analyse von in Textilien enthaltenen Proteinen. Üblicherweise werden Proteine analysiert, indem sie einem Aufschluss durch Trypsin unterzogen werden, der zu kleineren Molekülen, d. h. Peptiden, führt, die später durch Massenspektrometrie charakterisiert werden. Dementsprechend wurden Identifikationsverfahren untersucht, bei denen entweder matrixunterstützte Laserdesorptions-/Ionisations-Flugzeitmassenspektrometer oder ein Flüssigchromatographie-/Massenspektrometer (LC-MS, en: liquid chromatography/mass spectrometer) verwendet wurden. Bei einem Vergleich dieser Optionen ist der letztgenannte Gerätetyp kostengünstiger und als vielseitiges Analysengerät in Prüflaboren leichter verfügbar als der erstgenannte. Darüber hinaus weist das LC-MS eine hohe quantitative Fähigkeit auf und ist daher zur Berechnung des Mischungsverhältnisses von Tierfasern vorzuziehen.

Keratine sind aufgrund der Disulfidbindungen, die sie sowohl auf intramolekularer als auch auf intermolekularer Ebene zu bilden neigen, äußerst unlöslich. Daher werden Keratine im Allgemeinen in Gegenwart von Reduktionsmitteln extrahiert. Allerdings wird dieser Reduktionsschritt als zeitaufwendig und arbeitsintensiv angesehen. In diesem Dokument wird ein alternatives Verfahren verwendet, bei dem cysteinfreie Peptide als Identifizierungsmarker ausgewählt werden, wodurch die Notwendigkeit für den Reduktionsschritt entfällt und eine schnelle Herstellung von LC-MS-Proben ermöglicht wird.

Sowohl ISO 20418-1 als auch dieses Dokument beschreiben Verfahren, die LC-MS verwenden, allerdings unterscheiden sie sich hinsichtlich des zur Extraktion von Peptiden verwendeten Verfahrens. In ISO 20418-1 werden Proteine erst mit einer Thioharnstoff-/Harnstoff-/Dithiothreitol (DTT)-Lösung aus Fasern extrahiert und dann mit Trypsin aufgeschlossen, um Peptide zu erhalten. In dem hier beschriebenen Prozess werden Peptide direkt durch Trypsinaufschluss von zu Pulver gemahlenen Fasern extrahiert. Das Verfahren hat sich auch für stark verarbeitete Proben als nützlich erwiesen und ist für verschiedene Tierhaartypen wie (Kaschmir- oder Mohair-)Ziege, Wolle und Yak anwendbar.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein qualitatives und quantitatives Verfahren zur Bestimmung der Zusammensetzung von Tierhaarfaser-mischungen (aus Wolle, Kaschmir, Yak, Alpaka, Kamel oder Angora) mittels LC-MS ohne Proteinreduktion fest.

ANMERKUNG 1 Die Zusammensetzung von Haarfaser-nichttierischen Ursprungs kann mithilfe von ISO 1833 (alle Teile) bestimmt werden. Beide Ergebnisse werden kombiniert, um die Gesamtfaserzusammensetzung zu bestimmen.

Das Verfahren beruht auf einer Vorabidentifizierung, mittels Lichtmikroskopie, aller Fasern in der Mischung auf der Grundlage ihrer Morphologie nach ISO/TR 11827 [4]. Es ist nicht anzuwenden, wenn Fasern von der gleichen Tierart vorliegen (wie zum Beispiel Mischungen aus Kaschmir und Mohair).

ANMERKUNG 2 In diesem Fall wird die quantitative Analyse mittels mikroskopischer Analyse durchgeführt [zum Beispiel ISO 17751 (alle Teile)].

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

ISO 1833-1, *Textiles — Quantitative chemical analysis — Part 1: General principles of testing*

ISO 3696, *Water for analytical laboratory use — Specification and test methods*

ISO 17751 (alle Teile), *Textiles — Quantitative analysis of cashmere, wool, other specialty animal fibers and their blends*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

— ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <https://www.iso.org/obp>

— IEC Electropedia: verfügbar unter <http://www.electropedia.org/>

3.1

Tierhaarfaser

Art von Keratinfaser für die Verwendung in Textilien, wie zum Beispiel Wolle, Kaschmir, Yak, Alpaka, Kamel oder Angora

3.2

Hornträger

Bovidae

biologische Familie der paarhufigen Wiederkäuer, einschließlich Kaschmirziege, Schaf und Yak

3.3

Kamele

Camelidae

biologische Familie der Paarhufer, einschließlich Kamel und Alpaka

3.4

Protein

Polymer von Aminosäuren, das im Körper viele entscheidende Rollen spielt

3.5

Peptid

kleines *Protein* (3.4), das aus weniger als etwa 50 Aminosäuren besteht

3.6

Markerpeptid

Teil eines *Proteins* (3.4), der für dessen Identifizierung, Rückgewinnung und Reinigung verwendet wird

3.7

Massenchromatogramm

Chromatogramm für ein bestimmtes Masse-zu-Ladung-Verhältnis

3.8

Gesamtionenchromatogramm

TIC, en: total ion chromatogram

Chromatogramm, bei dem jeder Datenpunkt durch Addieren der Intensitäten aller zur gleichen Abtastung gehörenden Massenspektralpeaks erstellt wird

3.9

selektive Ionenüberwachung

SIM, en: selected ion monitoring

Massenspektrometrie-Abtastmodus, in dem nur ein begrenzter m/z -Bereich vom Gerät übertragen/detektiert wird

4 Symbole und Abkürzungen

A	Peakfläche
W	Mischungsverhältnis
Br	Anteil der Hornträger
Cr	Anteil der Kamele
ka	Korrekturfaktor für Alpaka und Kamel
kc	Korrekturfaktor für Kaschmir
kr	Korrekturfaktor für Angora
ky	Korrekturfaktor für Yak
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis, dabei ist m die Masse, ausgedrückt in atomarer Masseneinheit, und z die Ladungszahl der Ionen

5 Kurzbeschreibung

Die mechanisch zu Pulver gemahlenen Fasern sind ohne vorherige Reduktion unmittelbar einem Trypsin-Aufschluss zu unterziehen. Die Analyse der aufgeschlossenen Peptide ist mittels LC-MS durchzuführen. Die prozentuale Zusammensetzung ist aus den Peakflächen der artenspezifischen Markerpeptide zu berechnen.