

**DIN EN ISO 20418-1**

ICS 59.060.01

Einsprüche bis 2017-08-16

**Entwurf****Textilien –**
**Qualitative und quantitative Proteomanalyse einiger Tierhaarfasern –  
Teil 1: Peptiddetektion mittels LC-ESI-MS mit Proteinreduktion  
(ISO/DIS 20418-1:2017);**
**Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 20418-1:2017**
**Textiles –**

Qualitative and quantitative proteomic analysis of some animal hair fibres –  
Part 1: Peptide detection using LC-ESI-MS with protein reduction (ISO/DIS 20418-1:2017);  
German and English version prEN ISO 20418-1:2017

**Anwendungswarnvermerk**

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2017-06-16 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und  
Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs  
besonders zu vereinbaren.

**Stellungnahmen werden erbeten**

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter [www.din.de/go/entwuerfe](http://www.din.de/go/entwuerfe) bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter [www.entwuerfe.normenbibliothek.de](http://www.entwuerfe.normenbibliothek.de), sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an [nmp@din.de](mailto:nmp@din.de) möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter [www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe](http://www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe) oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter [www.dke.de/stellungnahme](http://www.dke.de/stellungnahme) abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Materialprüfung (NMP), 10772 Berlin, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin.

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten  
Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 32 Seiten

DIN-Normenausschuss Materialprüfung (NMP)

## Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 20418-1:2017) 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 deutsche Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 062-05-12 AA „Textilchemische Prüfverfahren und Fasertrennung“ im DIN-Normenausschuss Materialprüfung (NMP).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

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

ISO 137                    siehe DIN EN ISO 137

## Nationaler Anhang NA (informativ)

### Literaturhinweise

DIN EN ISO 137, *Wolle — Bestimmung des Faserdurchmessers — Mikroskop-Projektionsverfahren*

**Textilien — Qualitative und quantitative Proteomanalyse einiger  
Tierhaarfasern — Teil 1: Peptiddetektion mittels LC-ESI-MS mit  
Proteinreduktion (ISO/DIS 20418-1:2017)**

*Textiles — Qualitative and quantitative proteomic analysis of some animal hair fibres — Part 1: Peptide detection  
using LC-ESI-MS with protein reduction (ISO/DIS 20418-1:2017)*

ICS:

Deskriptoren:

Dokument-Typ: Europäische Norm  
Dokument-Untertyp:  
Dokumentstufe: parallele Umfrage  
Dokumentsprache: D

STD Version 2.8l

## Inhalt

|                                                                          | Seite |
|--------------------------------------------------------------------------|-------|
| Europäisches Vorwort .....                                               | 3     |
| Vorwort .....                                                            | 4     |
| Einleitung .....                                                         | 5     |
| 1 Anwendungsbereich .....                                                | 6     |
| 2 Normative Verweisungen .....                                           | 6     |
| 3 Begriffe .....                                                         | 6     |
| 4 Symbole und Abkürzungen .....                                          | 7     |
| 5 Reagenzien .....                                                       | 7     |
| 6 Prüfeinrichtung .....                                                  | 8     |
| 7 Prüfverfahren .....                                                    | 8     |
| 7.1 Probenahme .....                                                     | 8     |
| 7.2 Vorabidentifizierung .....                                           | 8     |
| 7.3 Probenvorbereitung .....                                             | 8     |
| 7.4 Proteinextraktion .....                                              | 8     |
| 7.5 Trypsin-Auflschluss der extrahierten Proteine .....                  | 9     |
| 7.6 Analyse tryptischer Peptide mittels LC/ESI-MS .....                  | 9     |
| 7.7 Berechnung und Angabe der Ergebnisse .....                           | 9     |
| Anhang A (informativ) Parameter .....                                    | 10    |
| Anhang B (informativ) Marker .....                                       | 12    |
| Anhang C (informativ) Beispiele für Ergebnisse eines Ringversuches ..... | 13    |
| Literaturhinweise .....                                                  | 15    |

## Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 20418-1:2017) 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.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

### Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/DIS 20418-1:2017 wurde von CEN als prEN ISO 20418-1:2017 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

## Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung von Nationalen Normungsorganisationen (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird normalerweise von ISO Technischen Komitees 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 Organisationen, staatlich und nicht-staatlich, in Liaison mit ISO, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) bei allen elektrotechnischen Themen 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. Im Besonderen sollten die für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten notwendigen Annahmekriterien beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC-Direktiven, Teil 2 erarbeitet (siehe [www.iso.org/directives](http://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 empfangenen Patenterklärungen (siehe [www.iso.org/patents](http://www.iso.org/patents)).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname wird als Information zum Nutzen der Anwender angegeben und stellt keine Anerkennung dar.

Eine Erläuterung der Bedeutung ISO-spezifischer Benennungen und Ausdrücke, die sich auf Konformitätsbewertung beziehen, sowie Informationen über die Beachtung der Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO) zu technischen Handelshemmnissen (TBT, en: Technical Barriers to Trade) durch ISO enthält der folgende Link: [www.iso.org/iso/foreword.html](http://www.iso.org/iso/foreword.html).

Das für dieses Dokument verantwortliche Komitee ist ISO/TC 38.

## Einleitung

Internationale Hersteller von Textilien aus Kaschmir und anderen Spezialfasern müssen sich bewusst und in der Lage sein, den Fasergehalt sicherzustellen, um Verbraucher und sich selbst vor gemeinrechtlichen Betrugsfällen zu schützen. Daher ist es wichtig, dass auf internationaler Ebene ein harmonisiertes Analyseverfahren zur Verfügung steht, damit unterschiedliche Auslegungen der Ergebnisse und damit einhergehende Streitigkeiten zwischen den Beteiligten vermieden werden. Neuerungen bei diesem Verfahren sind die objektive qualitative Ermittlung des Vorliegens von Fasern tierischen Ursprungs sowie auch die quantitative Beurteilung der jeweiligen in Mischungen vorhandenen prozentualen Anteile.

## 1 Anwendungsbereich

Diese Internationale Norm legt ein qualitatives und quantitatives Prüfverfahren zur Bestimmung des Fasergehalts von Wolle, Kaschmir und Yak sowie deren Mischungen in Textilien fest durch: eine Vorabuntersuchung mittels Mikroskop, eine Proteinextraktion, den enzymatischen Aufschluss sowie die Erkennung spezieller Peptide mittels einer Kombination aus Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie.

Dieses Verfahren kann bei entsprechenden Textilprodukten in jeder Prozessphase (d. h. vom Rohstoff bis zum Kleidungsstück) angewendet werden. Es kann bei verschiedenen Arten textiler Stoffe angewendet werden (z. B. Stapelfasern, Kammzüge, Garne und Gewebe), die Woll-, Kaschmir- oder Yakfasern enthalten. Eine gleichmäßige Verteilung der Bestandteile in der Probe ist erforderlich.

Das Verfahren beruht auf einer Vorabidentifizierung aller Fasern in der Mischung auf der Grundlage ihrer Morphologie, die mittels Lichtmikroskopie erfolgt. Anschließend werden die Proteine durch eine Thioharnstoff-/Harnstoff-/DTT-Lösung extrahiert. Dann erfolgt der enzymatische Aufschluss des aus den Fasern extrahierten Proteins durch Trypsin. Danach wird mittels einer Kombination aus Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie (LC-MS) die Analyse des Oligopeptid-Verhältnisses durchgeführt und die prozentuale Zusammensetzung berechnet [1] [2].

## 2 Normative Verweisungen

Die folgenden zitierten Dokumente sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. 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, *Textiles — Binary fibre mixtures — Quantitative chemical analysis*

ISO 17751:2007, *Textiles — Quantitative analysis of animal fibres by microscopy — Cashmere, wool, speciality fibres and their blends*

ISO 137, *Wool — Determination of fibre diameter — Projection microscope method*

ISO 2647, *Wool — Determination of percentage of medullated fibres by the projection microscope*

## 3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

### 3.1

#### **Tierhaarfaser**

Arten von Keratinfasern für die Verwendung in Textilien: Wollfasern, Kaschmirfasern und Yak-Fasern

### 3.2

#### **Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (LC-ESI-MS)**

Verfahren der analytischen Chemie, bei dem die Möglichkeiten der physikalischen Trennung der Flüssigkeitschromatographie mit den Möglichkeiten der Massenanalyse der Massenspektrometrie kombiniert werden

### 3.3

#### **Faserprüfstück**

Teilstück, das für Messzwecke aus nach dem Zufallsprinzip aus einer Laborprobe geschnittenen Faserstückchen entnommen wurde

### 3.4

#### **Trypsin-Aufschluss**

Teil der Probenvorbereitung für die massenspektrometrische Identifizierung, welcher die enzymatische Spaltung von Proteinen durch Trypsin in eine begrenzte Anzahl kürzerer Fragmente umfasst

### 3.5

#### **Peptid**

kürzere Fragmente, die von einem Protein nach einem enzymatischen Aufschluss stammen

### 3.6

#### **Proteomanalyse**

systematische Identifizierung und Quantifizierung des vollständigen Komplements von Proteinen eines biologischen Systems unter Anwendung verschiedener Verfahren der Trennung und Analyse wie z. B. Massenspektrometrie

### 3.7

#### **Markerpeptid**

Teil eines Proteins, der für dessen Identifizierung, Rückgewinnung und Reinigung verwendet wird

## 4 Symbole und Abkürzungen

WS Kaschmirfasern

WO Wollfasern

WY Yak-Fasern

## 5 Reagenzien

Die folgenden analysenreinen Reagenzien sollten verwendet werden:

- 1) Thioharnstoff 99 %;
- 2) Harnstoff > 99,5 % (für Reagenzien geeigneter Reinheitsgrad plus);
- 3) DL-Dithiothreitol (DTT) > 98 % (Dünnschichtchromatographie) (en: thin layer chromatography, TLC), > 99 % (Titrierung);
- 4) Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) > 99,9 %;
- 5) Ammoniumbicarbonat( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ )-Eluentenzusatz für LC-MS;
- 6) Iodacetamid (IAM) > 99 % (Kernspinresonanzspektroskopie) (en: nuclear magnetic resonance, NMR);
- 7) Trypsin Typ II aus dem Schweinepankreas 1 000 bis 2 000 Einheiten/mg Trockensubstanz oder gleichwertiges Niveau;
- 8) Wasser, LC-MS-Grad, für LC-MS;
- 9) Chlorwasserstoffsäure 37 % (HCl) > 97 %;
- 10) Acetonitril, LC-MS-Grad, für LC-MS;
- 11) Methansäure ( $\text{HCOOH}$ ), für Reagenzien geeigneter Reinheitsgrad > 95 %.

## 6 Prüfeinrichtung

Die folgende Prüfeinrichtung sollte verwendet werden:

- 1) Lichtmikroskop (LM);
- 2) Thermostatenbad;
- 3) Vortexmischer;
- 4) Trockner unter Stickstoffstrom mit Stahlnadeln;
- 5) Flüssigchromatographie-Massenspektrometer, ausgestattet mit einer Elektrosprayionisationsquelle (LC-ESI-MS).

## 7 Prüfverfahren

### 7.1 Probenahme

Die allgemeine Anforderung besteht darin, dass das Prüfstück für die Werkstoffcharge, aus der es entnommen wurde, repräsentativ sein muss. Das Verfahren zur Gewinnung eines Faserprüfstücks ist je nach Probenform verschieden. Die Begriffe in Bezug auf die Probenahme für die verschiedenen Arten von Proben sind in der Verordnung (EU) Nr. 1007/2011 und in ISO 1833 genau angegeben.

### 7.2 Vorabidentifizierung

Die qualitative Vorabanalyse der Faserzusammensetzung erfolgt auf der Grundlage der Morphologie der Fasern mittels Lichtmikroskopie nach ISO 17751:2007, *Textiles — Quantitative analysis of animal fibres by microscopy*.

### 7.3 Probenvorbereitung

Die Proben werden entschweißt, enthaart und mit Petrolether für 2 h in einem Soxhlet-Extraktor gereinigt, oder durch Eintauchen, indem sie für 1 h in Wasser bei Raumtemperatur gespült und abschließend für 1 h mit Wasser bei 50 °C abgespült werden. Die Fasern werden in einem Ofen bei 50 °C getrocknet und anschließend für 24 h bei Normalklima bei 20 °C und einer relativen Luftfeuchte von 65 % konditioniert.

Durch Verwendung eines Mikrotoms und Anwendung des in IWTO-8, ISO 137 und ISO 2647 beschriebenen Verfahrens werden aus der Probe Faserstückchen mit einer Länge von 0,4 mm unabhängig vom Faserdurchmesser erhalten. Für eine repräsentative Probe wird eine Gesamtmasse von etwa 150 mg Faserstückchen empfohlen. Zur Fragmentierung der Fasern ist es möglich, jedes beliebige Gerät zu verwenden, das eine einheitliche Fragmentierung der Proben sicherstellt (Schere, Mikrotom oder Fräse).

### 7.4 Proteinextraktion

Ein Extraktionspuffer (25 mmol/l Tris, 2,4 mol/l Thioharnstoff, 5 M Harnstoff, 5 % Dithiothreitol (DTT), pH 8,5) wird im Verhältnis von 9,5 ml für 150 mg Fasern zugegeben. Der Puffer bleibt für zwei Tage mit den Fasern bei 50 °C unter langsamem Rühren in Berührung. Die Lösung wird anschließend durch Filter der Porengröße 5 µm filtriert und bei 12 000 g für 20 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wird aufgefangen und bei 4 °C gelagert.