

DIN EN ISO 20418-3



ICS 59.060.01

Einsprüche bis 2019-09-12

Entwurf**Textilien –****Qualitative und quantitative Proteomanalyse einiger Tierhaarfasern –****Teil 3: Peptiddetektion mit LC-MS ohne Proteinreduktion****(ISO/DIS 20418-3:2019);****Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 20418-3:2019**

Textiles –

Qualitative and quantitative proteomic analysis of some animal hair fibres –

Part 3: Peptide detection using LC-MS without protein reduction (ISO/DIS 20418-3:2019);

German and English version prEN ISO 20418-3:2019

Textiles –

Analyse protéomique qualitative et quantitative de certaines fibres animales –

Partie 3: Détection peptidique par LC-MS sans réduction de protéines

(ISO/DIS 20418-3:2019);

Version allemande et anglaise prEN ISO 20418-3:2019

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2019-07-12 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 bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an nmp@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Materialprüfung (NMP), 10772 Berlin, Saatwinkler Damm 42/43, 13627 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 65 Seiten

DIN-Normenausschuss Materialprüfung (NMP)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 20418-3:2019) 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).

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 1833-1	siehe	DIN EN ISO 1833-1
ISO 3696	siehe	DIN ISO 3696
ISO 5725-2	siehe	DIN ISO 5725-2
ISO 13528	siehe	DIN ISO 13528
ISO 17751-1	siehe	DIN EN ISO 17751-1
ISO 17751-2	siehe	DIN EN ISO 17751-2
ISO 20418-1	siehe	DIN EN ISO 20418-1

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 1833-1, *Textilien — Quantitative chemische Analysen — Teil 1: Allgemeine Grundlagen der Prüfung*

DIN EN ISO 17751-1, *Textilien — Quantitative Analyse von Kaschmir, Wolle, anderen speziellen tierischen Fasern und deren Mischungen — Teil 1: Lichtmikroskopie-Verfahren*

DIN EN ISO 17751-2, *Textilien — Quantitative Analyse von Kaschmir, Wolle, anderen speziellen tierischen Fasern und deren Mischungen — Teil 2: Rasterelektronenmikroskopie-Verfahren*

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*

— Leerseite —

Textilien — Qualitative und quantitative Proteomanalyse einiger Tierhaarfasern — Teil 3: Peptiddetektion mit LC-MS ohne Proteinreduktion (ISO/DIS 20418-3:2019)

Textiles — Analyse protéomique qualitative et quantitative de certaines fibres animales — Partie 3 : Détection peptidique par LC-MS sans réduction de protéines (ISO/DIS 20418-3:2019)

Textiles — Qualitative and quantitative proteomic analysis of some animal hair fibres — Part 3: Peptide detection using LC-MS without protein reduction (ISO/DIS 20418-3:2019)

ICS:

Deskriptoren:

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

STD Version 2.9p

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Vorwort	5
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Symbole und Abkürzungen	8
5 Kurzbeschreibung	9
6 Reagenzien	9
7 Prüfeinrichtung	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 beobachteten Daten	12
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 Angorakaninchen (kr)	13
8.10 Berechnung des Mischungsverhältnisses	13
8.10.1 Berechnung des Mischungsverhältnisses von Kaschmir-, Schafwolle- und Yakfasern	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 Angorakaninchenfasern	14
9 Prüfbericht	15
Anhang A (informativ) Markerpeptide von Kaschmir-, Schafwolle- und Yakfasern	16
A.1 Angaben zu Markerpeptiden	16
A.1.1 Cmm1	16
A.1.2 Fbv1	16
A.1.3 Cas1	16
A.1.4 She1	16
A.1.5 Yak1	17
A.1.6 Cas2	17
A.1.7 She2	17

A.1.8	She3	17
A.1.9	Yak2	17
A.2	Eigenschaften von Markerpeptiden für die LC-MS-Analyse	18
A.3	Beispiel eines TIC von Markerpeptiden	18
Anhang B (informativ) Beispiel für LC-MS-Analysebedingungen		20
B.1	Allgemeines	20
B.2	LC-Analysebedingungen	20
B.3	MS-Analysebedingungen	20
B.4	Gültigkeit der erhaltenen Daten	21
B.5	Kalibrierkurve	21
B.5.1	Kaschmir – Schafwolle	21
B.6	Berechneter kc-Wert	22
Anhang C (informativ) Analyse von Kamel-, Alpaka und Angorakaninchenfasern		23
C.1	Allgemeines	23
C.2	Angaben zu Markerpeptiden	23
C.2.1	Fcm1	23
C.2.2	Cam1	23
C.2.3	Alp1	23
C.2.4	Ang1	23
C.2.5	Cam2	24
C.2.6	Alp2	24
C.2.7	Ang2	24
C.3	Eigenschaften von Markerpeptiden für die LC-MS-Analyse	24
C.4	Beispiel eines TIC von Markerpeptiden	25
Anhang D (informativ) Beispiel für Massenchromatogramme von Markerpeptiden		26
D.1	Beispiel für Massenchromatogramme	26
Anhang E (informativ) Ergebnisse des internationalen Ringversuchs		31
E.1	Teilnehmer	31
E.2	Prüfergebnisse	31
Literaturhinweise		32

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 20418-3:2019) 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 20418-3:2019 wurde von CEN als prEN ISO 20418-3:2019 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsorganisationen (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 Themen 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*, erarbeitet.

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

Einleitung

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

Die derzeit gültigen offiziellen Verfahren zur Identifizierung von speziellen Tierfasern stützen sich auf die mikroskopische Beobachtung. In den letzten Jahren wurde die mikroskopiegestützte Identifizierung jedoch immer schwieriger, da die chemische oder physikalische Behandlung im Herstellungsprozess weit verbreitet ist, was die mikroskopische Identifizierung von Tierfasern oft erschwert.

Deshalb war die Entwicklung neuartiger Identifikationsverfahren erwünscht. Obwohl verschiedene Verfahren wie die Nahinfrarotspektroskopie und Terahertzspektroskopie zur Unterscheidung der Faserstrukturen und die Verwendung der Polymerasekettenreaktion zur Unterscheidung der DNA-Sequenzen untersucht wurden, gibt es bei jedem Verfahren einige Schwierigkeiten bei dessen praktischen Anwendung.

Die Tierfasern bestehen hauptsächlich aus als Keratine bezeichneten Proteinen und einigen zugehörigen Proteinen. Daher wird die Analyse von in Textilien enthaltenen Proteinen allgemein als eine der vielversprechendsten Identifizierungsverfahren angesehen. Das allgemeine Verfahren zur Analyse von Proteinen umfasst den Aufschluss von Proteinen durch Trypsin zur Umwandlung in kleinere Moleküle, d. h. Peptide, gefolgt vom Nachweis der entstandenen Peptide in Massenspektrometern. Dementsprechend wurde ein Identifikationsverfahren untersucht, bei dem entweder ein matrixunterstütztes Laserdesorptions-/Ionisations-Flugzeitmassenspektrometer oder ein Flüssigchromatographie-/Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometer (LC-MS) verwendet wurde. Der letztgenannte Gerätetyp ist kostengünstiger und als vielseitiges Analysengerät in Prüflaboren leichter verfügbar. Darüber hinaus weist das LC-MS eine hohe quantitative Fähigkeit auf und ist daher zur Berechnung des Mischungsverhältnisses von Tierfasern vorzuziehen.

Keratine haben viele intermolekulare und intramolekulare Disulfidbindungen, die die Proteine schwerlöslich machen. Daher werden Keratine im Allgemeinen in Gegenwart von Reduktionsmitteln extrahiert. Dieser Reduktionsschritt erfordert jedoch viel Zeit und Aufwand. In diesem Teil der Norm wird ein alternatives Verfahren vorgestellt, bei dem cysteinfreie Peptide als Identifizierungsmarker ausgewählt werden, wodurch die Notwendigkeit eines Reduktionsschritts entfällt und eine schnelle Herstellung von LC-MS-Proben ermöglicht wird.

Sowohl in ISO 20418-1 als auch in diesem Dokument wird das LC-MS verwendet, unterscheidet sich jedoch hinsichtlich des Extraktionsverfahrens von Peptiden. 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 diesem Dokument 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 auf 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 Tierhaarfasermischungen mittels LC-MS ohne Proteinreduktion fest.

Die Zusammensetzung von Haarfasern nichttierischen Ursprungs kann mithilfe der Normenreihe ISO 1833 bestimmt werden; dann werden beide Ergebnisse kombiniert, um die gesamte Zusammensetzung der Fasern zu bestimmen.

Das Verfahren beruht auf einer Vorabidentifizierung aller Fasern in der Mischung auf der Grundlage ihrer Morphologie, die mittels Lichtmikroskopie erfolgt. Wenn Fasern von der gleichen Tierart vorliegen (z. B. Mischungen aus Kaschmir und Mohair), ist das Verfahren nicht anwendbar und die quantitative Analyse kann mittels mikroskopischer Analyse (z. B. Normenreihe ISO 17751) durchgeführt werden.

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 17751-1, *Textiles — Quantitative analysis of cashmere, wool, other specialty animal fibers and their blends — Part 1: Light microscopy method*

ISO 17751-2, *Textiles — Quantitative analysis of cashmere, wool, other specialty animal fibers and their blends — Part 2: Scanning electron microscopy method*

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:

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

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

3.1

Tierhaarfasern

Kaschmir-, Schafwolle-, Yak- und einige andere Tierhaarfasern, z. B. von Kamel, Alpaka und Angorakaninchen

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

Proteine

Polymere von Aminosäuren, die im Körper viele entscheidende Rollen spielen

3.5

Peptide

kleine Proteine, die aus etwa weniger als 50 Aminosäuren bestehen

3.6

Markerpeptide

bestimmte Peptide zur Identifizierung von Tierhaarfasern

3.7

LC-MS

Hochleistungs-Flüssigchromatographie-Massenspektrometer, ausgestattet mit einer Elektrospray-Ionisations-Ionenquelle

3.8

Massenchromatogramm

Chromatogramm für ein bestimmtes Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z)

3.9

Gesamtionenchromatogramm

TIC

(en: total ion chromatogram)

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

3.10

selektive Ionenüberwachung

SIM

(en: selected ion monitoring)

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

4 Symbole und Abkürzungen

A	Peakfläche
Br	Anteil der Hornträger
Cr	Anteil der Kamele
ka	Korrekturfaktor für Alpaka und Kamel
kc	Korrekturfaktor für Kaschmirziege
kr	Korrekturfaktor für Angorakaninchen
ky	Korrekturfaktor für Yak

5 Kurzbeschreibung

Die zu Pulver gemahlenen Fasern werden ohne vorherige Reduktion unmittelbar einem Trypsin-Aufschluss unterzogen. Die Analyse der aufgeschlossenen Peptide wird mittels LC-MS durchgeführt. Die prozentuale Zusammensetzung wird aus den Peakflächen der artenspezifischen Markerpeptide berechnet.

6 Reagenzien

Die folgenden analysenreinen Reagenzien sollten verwendet werden:

6.1 Aceton, 99,5 % (GC)

6.2 Wasser der Qualität 3, wie in ISO 3696 festgelegt

6.3 Ammoniumhydrogencarbonat (NH_4HCO_3)-Lösung (25 mmol/l)

— NH_4HCO_3 , 96,0 % (T) 197,5 mg

— durch Hinzufügen von Wasser (6.2) wird auf 100 ml aufgefüllt

6.4 Trypsin, Schweine-Trypsin mit einer für die Sequenzanalyse geeigneten Reinheit, modifiziert durch reduktive Methylierung

6.5 Acetonitril, 99,9 % (GC)

6.6 Methansäure (Ameisensäure), 98 % (T)

6.7 Trypsin-Lösung

— Trypsin (6.4), 20 µg

— 0,1 % Methansäure (6.6), 200 µl

7 Prüfeinrichtung

Die übliche Laborausrüstung und insbesondere Folgendes.

7.1 Heizmantel, geeignet für den Betrieb in einem Temperaturbereich von 50 °C bis 150 °C

7.2 Mühle, Perlmühle, Kryomühle oder gleichwertiges Gerät, das in der Lage ist, Materialien zu einem extrem feinen Pulver zu zerkleinern

7.3 Membranfilter, für wässrige Lösungen, mit einer Porengröße von 0,45 µm

7.4 Heizblock, zum Erwärmen von Mikroröhrchen auf 37 °C

7.5 Reagenzglasschüttler, für Vortex-Mikroröhrchen und LC-Fläschchen für etwa 30 min

7.6 Rotationsverdampfer

7.7 LC-MS, für den Nachweis des m/z -Bereichs von 200 bis 1 500 geeignet

7.8 LC-Fläschchen, muss aus Glas oder Polymethylpentan hergestellt sein

7.9 LC-Säule, Octadecyl (C-18)-Silica-Umkehrphasensäule

7.10 Waage, auf 1 mg ablesbar

7.11 Rückgewinnungskolben (auberginenförmiger Kolben oder Rundkolben)

8 Prüfverfahren

8.1 Probenahme

Die allgemeine Anforderung besteht darin, dass die Messprobe für die Werkstoffcharge, der sie entnommen wird, repräsentativ sein muss. Das Verfahren zur Gewinnung einer Fasermessprobe ist je nach Probenform verschieden. Die Begriffe in Bezug auf die Probenahme für die verschiedenen Arten von Proben sind namentlich in ISO 1833-1 angegeben.

8.2 Vorabidentifizierung

Die qualitative Vorabanalyse der Faserzusammensetzung erfolgt auf der Grundlage ihrer Morphologie mittels Lichtmikroskopie nach Normenreihe ISO 17751.

8.3 Waschen zur Entfettung

8.3.1 1 g der Fasern wird in einem Rückgewinnungskolben (7.11) auf einem Heizmantel mit 200 ml Aceton 30 min unter Rückfluss erwärmt.

ANMERKUNG 1 Die Menge der Fasern kann geändert werden.

ANMERKUNG 2 Dieser Waschschrift darf bei sauberen Proben entfallen.

8.3.2 Die entfetteten Fasern werden dem Rückgewinnungskolben entnommen und an der Luft getrocknet.

ANMERKUNG Alternativ kann das Probenvorbereitungsverfahren nach ISO 20418-1 angewendet werden.

8.4 Pulverisierung von Fasern

Etwa 1 g der getrockneten Faserprobe wird mithilfe einer Mühle (7.2) zu einem feinen Pulver mit einer durchschnittlichen Länge von höchstens 100 µm zerkleinert und gründlich gemischt, um eine repräsentative Probenahme der Fasern sicherzustellen.

8.5 Trypsin-Aufschluss

8.5.1 10 mg der zerkleinerten Proben werden eingewogen und die Messprobe in ein Mikroröhrchen gegeben. Die Volumina der NH_4HCO_3 -Lösung in 8.5.2 und der Trypsin-Lösung in 8.5.3 entsprechend erhöht, wenn mehr als 10 mg der Probe verwendet werden.

8.5.2 300 µl NH_4HCO_3 -Lösung (6.3) werden zugegeben und 10 min bis 30 min mithilfe eines Vortexmischers gemischt.

8.5.3 10 µl Trypsin-Lösung (6.7) werden zur Probe gegeben und 20 h bis 24 h bei 37 °C inkubiert.

8.5.4 Die tryptische Lösung wird 3 min bei 5 000 g zentrifugiert. Der Überstand wird durch ein Membranfilter (7.3) filtriert, um restliche Fasern zu entfernen.

ANMERKUNG Rotationsfilter, Spritzenfilter oder andere Filtrationsmittel können verwendet werden.

8.5.5 Die Menge der Lösung, die 2 mg Faser entspricht, wird in ein LC-Fläschchen überführt. Die Probe wird in einem Rotationsverdampfer getrocknet.

ANMERKUNG 1 Wenn das LC-Fläschchen nicht in einen Trockner passt, kann die Lösung in anderen Behältertypen getrocknet werden, z. B. in einem Mikroröhrchen, und die Probe kann nach dem Auflösen in ein LC-Fläschchen überführt werden.

ANMERKUNG 2 Alternativ kann anstelle des Rotationsverdampfers ein Gefriertrockner oder ein Stickstoffstrom als Trocknungsverfahren angewendet werden.

8.5.6 Für die anschließend durchgeführten LC-MS-Messungen werden 40 µl Wasser mit 0,1 % Methansäure und 5 % Acetonitril zugegeben und 30 min mithilfe eines Vortexmischers gemischt. Die Ultraschallbehandlung darf nicht durch den Mischvorgang mithilfe des Vortexmischers ersetzt werden, wenn die LC-MS-Probe aufgelöst wird.

8.6 Markerpeptide

8.6.1 Die Peptide, die als Marker für die differentielle Identifizierung von Fasern aus Anhang A und Anhang C verwendet werden, werden ausgewählt. Für die Auswahl kann das Ergebnis der Vorabidentifizierung durch Mikroskopie (8.2) und Tabelle 1 herangezogen werden.

Tabelle 1 — Korrelation von Markerpeptiden und identifizierbaren Tiertaxa

Faser	Art		Familie		Klasse	
	Name	Marker ^a	Name	Marker	Name	Marker
Schafwolle	<i>Ovis aries</i>	She1, (She2, She3)	Hornträger	Fbv1	Säugetiere	Cmm1
Kaschmir/Mohair	<i>Capra hircus</i>	Cas1, (Cas2)				
Yak	<i>Bos grunniens</i>	Yak1, (Yak2)				
Alpaka	<i>Vicugna pacos</i>	Alp1, (Alp2)	Kamele	Fcm1		
Kamel	<i>Camelus ferus</i>	Cam1, (Cam2)				
Angorakaninchen	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Ang1, (Ang2)	Hasenartige	—		

^a Wenn die quantitative Analyse durchgeführt wird, werden Markerpeptide mit dem Suffix 1 bevorzugt.

8.6.2 Die LC-MS-Parameter werden optimiert und die Retentionszeiten der Zielpeaks werden bestätigt, indem entweder synthetisierte Peptide (mit den in Anhang A und Anhang C dargestellten Aminosäuresequenzen) oder aus reinen Tierhaarfaserproben extrahierte Peptide verwendet werden.

8.7 LC-MS-Analyse

8.7.1 5 µl der Probe werden in eine LC-Säule (7.9) injiziert. Wasser mit 0,1 % Methansäure und Acetonitril mit 0,1 % Methansäure werden verwendet, um mit zunehmender Konzentration von Acetonitril einen Gradienten für die Chromatographie zu bilden. Die Anfangskonzentration von Acetonitril beträgt 5 %. Ein Beispiel für LC-Parameter ist in Anhang B angegeben.

8.7.2 Das Massenspektrometer wird im SIM-Modus betrieben. Die in Anhang A und Anhang C beschriebenen (vorzugsweise mit dem Suffix 1) ausgewählten Marker sind zu überwachen. Ein Beispiel für MS-Parameter ist in Anhang B angegeben.

8.7.3 Die Peakfläche jedes Markerpeptids wird integriert. Wenn es schwierig ist, den Zielpeak zu erhalten, kann der Peak der zusätzlichen Markerpeptide (mit den Suffixen 2 und 3), die ebenfalls in Anhang A und Anhang C beschrieben sind, verwendet werden.

8.8 Bewertung der Gültigkeit der beobachteten Daten

Siehe Anhang C.

8.9 Berechnung des Korrekturfaktors

8.9.1 Korrekturfaktor

Es wird nicht erwartet, dass die Peakflächen von Markerpeptiden proportional zu den Mengen der entsprechenden tierischen Fasern in den folgenden Kombinationen von Markerpeptiden sind, beispielsweise aufgrund des Unterschieds in der Proteinspezies, von der jedes Markerpeptid abgeleitet ist (8.9.2). In diesen Fällen sollte ein Korrekturfaktor für ein Peptid gegenüber anderen Peptiden zur Quantifizierung ihres Mischungsverhältnisses experimentell erhalten werden. Darüber hinaus sollte der Korrekturfaktor aktualisiert werden, wenn die Analysebedingungen modifiziert werden.

8.9.2 Korrekturfaktor für Cas1 gegenüber She1 und Yak1 (kc)

8.9.2.1 Mischproben mit 50 % Kaschmir- und 50 % Schafwolle werden mindestens dreimal analysiert.

8.9.2.2 Für jede Analyse wird der Wert von $A_{\text{she1}}/A_{\text{cas1}}$ aus der Peakfläche von She1 (A_{she1}) und der Peakfläche von Cas1 (A_{cas1}) berechnet.

8.9.2.3 Der Korrekturfaktor für Kaschmir (kc) muss mithilfe des aus allen $A_{\text{she1}}/A_{\text{cas1}}$ -Werten gebildeten Mittelwerts berechnet werden.

8.9.3 Korrekturfaktor für Yak2 gegenüber She2, She3 und Cas2 (ky)

8.9.3.1 Mischproben mit 50 % Kaschmir und 50 % Yak werden mindestens dreimal analysiert.

8.9.3.2 Für jede Analyse wird der Wert von $A_{\text{cas2}}/A_{\text{yak2}}$ aus der Peakfläche von Cas2 (A_{cas2}) und der Peakfläche von Yak2 (A_{yak2}) berechnet.

8.9.3.3 Der Korrekturfaktor für Yak (ky) muss mithilfe des aus allen $A_{\text{cas2}}/A_{\text{yak2}}$ -Werten gebildeten Mittelwerts berechnet werden.

8.9.4 Korrekturfaktor für Alpaka und Kamel (ka)

8.9.4.1 Mischproben mit 50 % Alpaka- und 50 % Schafwolle werden mindestens dreimal analysiert.

8.9.4.2 Für jede Analyse wird der Wert von $A_{\text{fbv1}}/A_{\text{fcm1}}$ aus der Peakfläche von Fbv1 (A_{fbv1}) und der Peakfläche von F_{cm1} (A_{fcm1}) berechnet.

8.9.4.3 Der Korrekturfaktor für Alpaka und Kamel (ka) muss mithilfe des aus allen $A_{\text{fbv1}}/A_{\text{fcm1}}$ -Werten gebildeten Mittelwerts berechnet werden.

ANMERKUNG Siehe Anhang C.

8.9.5 Korrekturfaktor für Angorakaninchen (kr)

8.9.5.1 Mischproben mit 50 % Angorakaninchen- und 50 % Schafwolle werden mindestens dreimal analysiert.

8.9.5.2 Für jede Analyse wird der Wert von A_{fbv1}/A_{ang1} aus der Peakfläche von Fbv1 (A_{fbv1}) und der Peakfläche von Ang1 (A_{ang1}) berechnet.

8.9.5.3 Der Korrekturfaktor für Angorakaninchen (kr) muss mithilfe des aus allen A_{fbv1}/A_{ang1} --Werten gebildeten Mittelwerts berechnet werden.

ANMERKUNG Siehe Anhang C.

8.10 Berechnung des Mischungsverhältnisses

8.10.1 Berechnung des Mischungsverhältnisses von Kaschmir-, Schafwolle- und Yakfasern

Die Mischungsverhältnisse werden mithilfe einer der folgenden drei Unterabschnitte berechnet.

8.10.2 Berechnung mittels She1, Cas1, Yak1 und kc

Die Mischungsverhältnisse werden mithilfe der folgenden Gleichung berechnet.

$$\text{Schafwolle (\%)} = A_{she1} / (A_{she1} + kc \times A_{cas1} + A_{yak1}) \times 100$$

$$\text{Kaschmir (\%)} = kc \times A_{cas1} / (A_{she1} + kc \times A_{cas1} + A_{yak1}) \times 100$$

$$\text{Yak (\%)} = A_{yak1} / (A_{she1} + kc \times A_{cas1} + A_{yak1}) \times 100$$

Dabei ist

A_{she1} die Peakfläche von She1

A_{cas1} die Peakfläche von Cas1

A_{yak1} die Peakfläche von Yak1

8.10.3 Berechnung mittels She2, She3, Cas2, Yak2 und ky

Die Mischungsverhältnisse werden mithilfe der folgenden Gleichung berechnet.

$$\text{Schafwolle (\%)} = (A_{she2} + A_{she3}) / (A_{she2} + A_{she3} + A_{cas2} + ky \times A_{yak2}) \times 100$$

$$\text{Kaschmir (\%)} = A_{cas2} / (A_{she2} + A_{she3} + A_{cas2} + ky \times A_{yak2}) \times 100$$

$$\text{Yak (\%)} = ky \times A_{yak2} / (A_{she2} + A_{she3} + A_{cas2} + ky \times A_{yak2}) \times 100$$

Dabei ist

A_{she2} die Peakfläche von She2

A_{she3} die Peakfläche von She3

A_{cas2} die Peakfläche von Cas2

A_{yak2} die Peakfläche von Yak2

8.10.4 Berechnung mittels She1, She2, She3, Cas2, Yak1

Wenn A_{she1} ungleich 0 ist, werden die Mischungsverhältnisse mithilfe der folgenden Gleichung berechnet.

$$A_{she2+3} = A_{she2} + A_{she3}$$

$$\text{Schafwolle (\%)} = 1 / (1 + A_{cas2}/A_{she2+3} + A_{yak1}/A_{she1}) \times 100$$

$$\text{Kaschmir (\%)} = (A_{cas2}/A_{she2+3}) / (1 + A_{cas2}/A_{she2+3} + A_{yak1}/A_{she1}) \times 100$$

$$\text{Yak (\%)} = (A_{yak1}/A_{she1}) / (1 + A_{cas2}/A_{she2+3} + A_{yak1}/A_{she1}) \times 100$$

Dabei ist

A_{she1} die Peakfläche von She1

A_{she2} die Peakfläche von She2

A_{she3} die Peakfläche von She3

A_{cas2} die Peakfläche von Cas2

A_{yak1} die Peakfläche von Yak1

8.10.5 Berechnung des Mischungsverhältnisses von Kamel-, Alpaka- und Angorakaninchenfasern

Das Mischungsverhältnis wird mithilfe der folgenden Gleichung berechnet. Markerpeptide von Kamel-, Alpaka- und Angorakaninchen mit dem Suffix 1 können durch Markerpeptide mit dem Suffix 2 ersetzt werden. A_{alp1} wird in Kombination mit A_{cam1} und A_{alp2} in Kombination mit A_{cam2} verwendet.

$$\text{Anteil der Hornträger (Br)} = A_{fbv1} / (A_{fbv1} + ka \times A_{fcm1} + kr \times A_{ang1})$$

$$\text{Anteil der Kamele (Cr)} = (ka \times A_{fcm1}) / (A_{fbv1} + ka \times A_{fcm1} + kr \times A_{ang1})$$

$$\text{Angorakaninchen (\%)} = (kr \times A_{ang1}) / (A_{fbv1} + ka \times A_{fcm1} + kr \times A_{ang1}) \times 100$$

$$\text{Schafwolle (\%)} = Br \times \text{Schafwolle (\%)} \text{ (siehe 8.10.1)}$$

$$\text{Kaschmir (\%)} = Br \times \text{Kaschmir (\%)} \text{ (siehe 8.10.1)}$$

$$\text{Yak (\%)} = Br \times \text{Yak (\%)} \text{ (siehe 8.10.1)}$$

$$\text{Alpaka (\%)} = Cr \times A_{alp1} / (A_{alp1} + A_{cam1}) \times 100$$

$$\text{Kamel (\%)} = Cr \times A_{cam1} / (A_{alp1} + A_{cam1}) \times 100$$

Dabei ist

A_{fbv1} die Peakfläche von Fbv1

A_{fcm1} die Peakfläche von Fcm1

A_{ang1}	die Peakfläche von Ang1
A_{she1}	die Peakfläche von She1
A_{cas1}	die Peakfläche von Cas1
A_{yak1}	die Peakfläche von Yak1
A_{alp1}	die Peakfläche von Alp1
A_{cam1}	die Peakfläche von Cam1

Anhang C enthält ein Beispiel.

9 Prüfbericht

Der Prüfbericht enthält die folgenden Angaben:

- a) eine Verweisung auf dieses Dokument, d. h. ISO 20418-3;
- b) Einzelheiten zu den zu prüfenden Probenfasern;
- c) Einzelzeiten zu den Prüfergebnissen;
- d) Einzelheiten zu allen vom festgelegten Verfahren festgelegten Prüfergebnissen;
- e) Einzelheiten zu allen beobachteten Besonderheiten;
- f) das Prüfdatum.

Anhang A (informativ)

Markerpeptide von Kaschmir-, Schafwolle- und Yakfasern

A.1 Angaben zu Markerpeptiden

A.1.1 Cmm1

- Identifizierbare Tierklasse, Säugetiere
- Protein, Keratin, Typ II
- Aminosäuresequenz, FAAFIDK
- Relative Molekülmasse, 810,43
- Beispiel für Massenchromatogramm siehe Anhang D, Bild D.1.

A.1.2 Fbv1

- Identifizierbare Tierfamilie, Hornträger
- Protein, Keratin, Typ II
- Aminosäuresequenz, AQYDDIASR
- Relative Molekülmasse, 1 037,48
- Beispiel für Massenchromatogramm siehe Anhang D, Bild D.1.

A.1.3 Cas1

- Identifizierbare Tierart, Kaschmir(ziege)
- Protein, Keratin 34, Typ I
- Aminosäuresequenz, SDLEAQVESLKEELLFLK
- Relative Molekülmasse, 2 090,12
- Beispiel für Massenchromatogramm siehe Anhang D, Bild D.1.

A.1.4 She1

- Identifizierbare Tierart, Schaf
- Protein, Protein S100A3
- Aminosäuresequenz, Acetyl- ASLLEQALATLVK
- Relative Molekülmasse, 1 397,97