
**Textiles — Analyse protéomique
qualitative et quantitative de certaines
fibres animales —**

**Partie 1:
Détection des peptides par LC-ESI-MS
avec réduction protéique**

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

*Textiles — Qualitative and quantitative proteomic analysis of some
animal hair fibres —*

Part 1: Peptide detection using LC-ESI-MS with protein reduction

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ea41292-4b37-4fb8-af71-62d932608bd5/iso-20418-1-2018>



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 20418-1:2018

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ea41292-4b37-4fb8-af71-62d932608bd5/iso-20418-1-2018>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2018

Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en oeuvre, 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, ou la diffusion sur l'internet ou sur un intranet, sans autorisation écrite préalable. Une autorisation peut être demandée à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 401 • Ch. de Blandonnet 8
CH-1214 Vernier, Geneva
Tél.: +41 22 749 01 11
Fax: +41 22 749 09 47
E-mail: copyright@iso.org
Web: www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

| | |
|---|-----------|
| Avant-propos | v |
| Introduction | vi |
| 1 Domaine d'application | 1 |
| 2 Références normatives | 1 |
| 3 Termes et définitions | 1 |
| 4 Abréviations | 2 |
| 5 Réactifs | 2 |
| 6 Appareillage | 3 |
| 7 Méthode d'essai | 3 |
| 7.1 Échantillonnage..... | 3 |
| 7.2 Identification préliminaire | 4 |
| 7.3 Préparation de l'échantillon..... | 4 |
| 7.4 Extraction des protéines..... | 4 |
| 7.5 Digestion à la trypsine des protéines extraites..... | 4 |
| 7.6 Analyse des peptides tryptiques par LC-ESI-MS | 4 |
| 7.7 Calcul et expression des résultats | 5 |
| 7.8 Rapport d'essai..... | 5 |
| Annexe A (informative) Paramètres | 7 |
| Annexe B (informative) Marqueurs | 9 |
| Annexe C (informative) Exemples de résultats d'essais interlaboratoires | 10 |
| Bibliographie | 12 |

ISO 20418-1:2018
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ea41292-4b37-4fb8-af71-62d932608bd5/iso-20418-1-2018>

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 attirée 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 nature volontaire des normes, 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'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: www.iso.org/iso/fr/avant-propos.html.

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 38, *Textiles*.

Une liste de toutes les parties de la série ISO 20418 se trouve sur le site Web de l'ISO.

Il convient que l'utilisateur adresse tout retour d'information ou toute question concernant le présent document à l'organisme national de normalisation de son pays. Une liste exhaustive desdits organismes se trouve à l'adresse www.iso.org/fr/members.html.

Introduction

Les producteurs internationaux de textiles en cachemire et autres fibres spéciales doivent connaître et être capables de garantir la composition en fibres, afin de protéger les consommateurs et de se défendre contre les fraudes courantes. Par conséquent, il est important de disposer d'une méthode d'analyse harmonisée au niveau international, afin d'éviter des interprétations différentes des résultats et les conflits qui pourraient en découler entre les parties prenantes.

Les innovations de la méthode décrite dans le présent document sont:

- la détermination qualitative objective de la présence de fibres dérivées d'espèces animales; et
- l'évaluation quantitative des pourcentages relatifs présents dans les mélanges.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 20418-1:2018](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/62d932608bd5/iso-20418-1-2018)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/62d932608bd5/iso-20418-1-2018>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 20418-1:2018

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ea41292-4b37-4fb8-af71-62d932608bd5/iso-20418-1-2018>

Textiles — Analyse protéomique qualitative et quantitative de certaines fibres animales —

Partie 1: Détection des peptides par LC-ESI-MS avec réduction protéique

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode d'essai qualitative et quantitative pour la détermination de la composition des fibres de laine, de cachemire, de yack et leurs mélanges dans les textiles par contrôle préliminaire au microscope, extraction protéique, digestion enzymatique et détection de peptides spécifiques au moyen d'un système de chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse équipé d'une source d'ionisation par électropulvérisation (LC-ESI-MS).

Cette méthode peut être appliquée aux produits textiles pertinents à chaque étape de fabrication (c'est-à-dire, de la matière première au vêtement) avec une distribution homogène des composants. Elle peut être appliquée à différents types de matières textiles (par exemple, fibres à filer, rubans de peigné, fils et étoffes) qui contiennent des fibres de laine, de cachemire ou de yack et leurs mélanges. La méthode repose sur une identification préliminaire de toutes les fibres présentes dans le mélange sur la base de leur morphologie, par microscopie optique. Les protéines sont ensuite extraites par une solution de thiourée/urée/dithiothréitol (DTT). Une digestion enzymatique par la trypsine de la protéine extraite des fibres est réalisée. Une analyse des marqueurs spécifiques est réalisée par LC-MS et la composition en pourcentage est calculée.

La présente méthode est applicable aux échantillons contenant d'autres types de fibres que la laine, le cachemire et le yack, en combinant ses résultats avec les résultats obtenus en utilisant la série ISO 1833 et/ou la série ISO 17751.

Le présent document ne s'applique pas si des fibres de la même espèce animale sont présentes (par exemple, mélanges de cachemire et de mohair); dans ce cas, l'analyse quantitative peut être réalisée par microscopie (par exemple, série ISO 17751).

2 Références normatives

Les documents suivants cités dans le texte constituent, pour tout ou partie de leur contenu, des exigences du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

ISO 137:2015, *Laine — Détermination du diamètre des fibres — Méthode du microscope à projection*

ISO 1833 (toutes les parties), *Textiles — Analyse chimique quantitative*

ISO 17751 (toutes les parties), *Textiles — Analyse quantitative du cachemire, de la laine, d'autres fibres animales spéciales et leurs mélanges*

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

ISO 20418-1:2018(F)

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes:

- ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse <http://www.iso.org/obp>;
- IEC Electropedia: disponible à l'adresse <http://www.electropedia.org/>.

3.1 fibre animale

type de fibre de kératine pour usage textile: laine, cachemire et yack

3.2 chromatographie en phase liquide – spectrométrie de masse LC-ESI-MS

technique de chimie analytique qui combine les capacités de séparation physique de la chromatographie en phase liquide avec les capacités d'analyse de masse de la spectrométrie de masse

3.3 prise d'essai de fibre

portion extraite à partir de tronçons de fibre coupés de manière aléatoire à partir d'un échantillon de laboratoire à des fins de mesurage

3.4 digestion à la trypsine

partie de la préparation d'un échantillon pour identification par spectrométrie de masse, consistant à couper la protéine par une méthode enzymatique à l'aide de trypsine en un nombre limité de fragments plus courts

3.5 peptide

fragment court dérivé d'une protéine après digestion enzymatique

3.6 marqueur peptidique

portion d'une protéine utilisée pour son identification, sa récupération et sa purification

3.7 analyse protéomique

identification et quantification systématiques du complément complet de protéines d'un système biologique en utilisant différentes techniques de séparation et d'analyse, telles que la spectrométrie de masse

4 Abréviations

| | |
|----|-----------|
| WS | cachemire |
| WO | laine |
| WY | yack |

5 Réactifs

Durant l'analyse, sauf indication contraire, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue et de l'eau distillée ou déminéralisée ou de l'eau de pureté équivalente.

5.1 Thiourée, 99 %.

5.2 Urée, 99,5 % (réactif plus).

- 5.3 DL-dithiothréitol (DTT)** >98 % (TLC), >99 % (titration).
- 5.4 Tris, (hydroxyméthyl) aminométhane (Tris)**, >99,9 %.
- 5.5 Bicarbonate d'ammonium**, (NH₄HCO₃) additif éluant pour LC-MS.
- 5.6 Iodoacétamide, (IAM)**, > 99 % (RMN).
- 5.7 Trypsine de type II**, de pancréas porcin (1 000 à 2 000) unités/mg solide sec ou avec taux équivalent.
- 5.8 Eau**, LC-MS pour LC-MS.
- 5.9 Acide chlorhydrique**, 37 % (HCl) >97 %.
- 5.10 Acétonitrile**, LC-MS pour LC-MS.
- 5.11 Acide formique**, (HCOOH) qualité réactif >95 %.

6 Appareillage

Appareillage de laboratoire habituel et, en particulier, ce qui suit.

- 6.1 Microscope optique (MO)**, conformément à l'ISO 17751-1.
- 6.2 Appareil Soxhlet** composé d'un condenseur, d'un extracteur, d'un ballon et d'une cartouche (généralement en papier filtre épais) qui retient l'échantillon.
- 6.3 Microtome** conformément à l'ISO 137.
- 6.4 Bain thermostatique** à chauffage réglable avec une vitesse d'agitation comprise entre 20 tr/min et 200 tr/min.
- 6.5 Centrifugeuse** de vitesse comprise entre 200 tr/min et 20 000 tr/min.
- 6.6 Mélangeur Vortex**, avec des réglages de vitesse compris entre 100 tr/min et 3 200 tr/min.
- 6.7 Concentrateur d'échantillon sous flux d'azote**, avec une pression de gaz maximale de 2 psi, équipé d'aiguilles en acier.
- 6.8 Système de chromatographie en phase liquide – spectromètre de masse**, équipé d'une source d'ionisation par électropulvérisation (LC-ESI-MS).

7 Méthode d'essai

7.1 Échantillonnage

L'exigence générale est que la prise d'essai doit être représentative du lot de matière dont elle est issue. La méthode d'obtention d'une prise d'essai de fibres dépend de la forme de l'échantillon. Les termes relatifs à l'échantillonnage pour les divers types d'échantillons sont fournis dans l'ISO 1833-1.

7.2 Identification préliminaire

L'analyse qualitative préliminaire de la composition des fibres doit être réalisée d'après la morphologie des fibres par microscopie optique, conformément à l'ISO 17751-1.

7.3 Préparation de l'échantillon

Dégraissier les échantillons et les débarrasser des poils. Les nettoyer à l'éther de pétrole pendant 2 h dans un extracteur Soxhlet ou par immersion. Les rincer pendant 1 h dans de l'eau à température ambiante. Puis les rincer pendant 1 h dans de l'eau à 50 °C. Sécher les fibres dans une étuve à 50 °C. Les conditionner pendant 24 h sous atmosphère normalisée à 20 °C et 65 % d'HR.

Couper des tronçons de fibre en utilisant un microtome (6.3) conformément à l'ISO 137:2015, 6.3. Il est recommandé qu'un échantillon représentatif ait une masse totale d'environ 150 mg de tronçons de fibre. Pour la fragmentation des fibres, il est possible d'utiliser n'importe quel instrument qui garantisse la fragmentation homogène des échantillons (ciseaux, microtome ou broyeur).

7.4 Extraction des protéines

Ajouter un tampon d'extraction [25 mmol/l de tris, 2,4 mol/l de thiourée (5.1), 5 M d'urée (5.2), 5 % de dithiothréitol (DTT) pH 8,5 (5.3)] selon un rapport de 9,5 ml pour 150 mg de fibres.

Laisser le tampon en contact avec les fibres pendant deux jours à 50 °C sous agitation lente.

Filter la solution sur des filtres de taille de pores 5 µm et centrifuger (6.5) à 12 000 g pendant 20 min à température ambiante.

Recueillir le surnageant et le conserver à 4 °C.

7.5 Digestion à la trypsine des protéines extraites

Soumettre la solution brièvement aux ultrasons afin de dissoudre les cristaux de thiourée potentiellement présents.

Ensuite, ajouter 67 µl de la solution à un volume égal de bicarbonate d'ammonium NH₄HCO₃ à 100 mmol/l et mélanger au vortex (6.6). Puis, ajouter 5 µl d'une solution de DTT à 200 mmol/l (5.3) dans le NH₄HCO₃ à 100 mmol/l (5.5), avant un nouveau traitement au vortex.

Incuber la solution pendant 1 h à température ambiante, puis ajouter 4 µl d'iodoacétamide à 1 mol/l (5.6) dans le NH₄HCO₃ à 100 mmol/l (5.5), avant un nouveau traitement au vortex.

Incuber de nouveau la solution pendant 1 h à température ambiante, puis éliminer l'iodoacétamide en excès en ajoutant 20 µl d'une solution de DTT à 200 mmol/l, avant un nouveau traitement au vortex et une incubation pendant 1 h à température ambiante.

Ajouter 818 µl d'eau désionisée et 20 µl de solution de trypsine (100 ng/µl dans le CH₃COOH à 1 %, si nécessaire), avant un nouveau traitement au vortex.

Laisser la solution à 37 °C pendant 4 h, puis ajouter 20 µl d'acide chlorhydrique à 37 % (5.9) pour arrêter la digestion et réduire le volume sous azote.

7.6 Analyse des peptides tryptiques par LC-ESI-MS

Dissoudre les échantillons séchés dans 100 µl d'éluant A [solution d'eau, acétonitrile à 0,2 % (5.10) et acide formique à 0,1 % (5.11)], les traiter au vortex et les transférer dans des flacons pour l'analyse par LC-ESI-MS.

Quelques paramètres analytiques sont indiqués dans l'Annexe A à titre d'exemple.

7.7 Calcul et expression des résultats

Pour les analyses quantitatives, tous les marqueurs sont déterminés dans des échantillons mélangés par détection information source SIR surveillant spécifiquement les ions caractéristiques uniquement. Les régions chromatographiques associées aux marqueurs sont intégrées, afin d'estimer le pourcentage des échantillons mélangés.

La masse moléculaire, le temps de rétention et les ions caractéristiques de chaque marqueur sont fournis dans l'[Annexe B](#). Des exemples tirés d'un essai interlaboratoires réalisé pour valider la méthode d'essai sont fournis dans l'[Annexe C](#).

Les indices quantitatifs, fournis en pourcentage, sont calculés comme suit:

$$w_{\text{yack}} = \frac{A_{\text{yack}}}{A_{\text{yack}} + A_{\text{mouton-chèvre}}} \times 100$$

$$w_{\text{laine1}} = \frac{A_{\text{mouton1}}}{A_{\text{mouton1}} + A_{\text{cachemire1}}} \times 100$$

$$w_{\text{laine2}} = \frac{A_{\text{mouton2}}}{A_{\text{mouton2}} + A_{\text{cachemire2}}} \times 100$$

$$w_{\text{laine}} = \frac{w_{\text{laine1}} + w_{\text{laine2}}}{2} \times \frac{100 - w_{\text{yack}}}{100}$$

$$w_{\text{cachemire}} = 100 - w_{\text{yack}} - w_{\text{laine}}$$

iTech STANDARD PREVIEW
(standards.itech.ai)

où

A_{yack} est le marqueur spécifique des fibres de yack;
ISO 20418-1:2018
<https://standards.itech.ai/catalog/standards/sist/ea41292-4b37-4fb8-af71-62d9520086d9/iso-20418-1-2018>

A_{mouton1} et A_{mouton2} sont les marqueurs spécifiques des fibres de laine;

$A_{\text{cachemire1}}$ et $A_{\text{cachemire2}}$ sont les marqueurs spécifiques des fibres de cachemire;

$A_{\text{mouton-chèvre}}$ est le marqueur spécifique des fibres de laine et de cachemire.

Selon l'équipement utilisé par le laboratoire, la quantification des fibres de yack peut être surestimée. Si c'est le cas, un facteur correctif doit être déterminé.

NOTE Le facteur correctif peut être déterminé sur la base des matériaux de référence interne utilisés comme contrôle qualité.

Si des fibres autres que la laine, le cachemire et le yack sont présentes, la composition totale de l'étoffe doit être calculée en combinant les résultats de l'ISO 20418-1 avec les résultats obtenus en utilisant la série ISO 1833 et/ou la série ISO 17751.

7.8 Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit inclure au moins les informations suivantes:

- référence au présent document, c'est-à-dire ISO 20418-1;
- nature de l'échantillon (par exemple, fibre, fil, pièce d'étoffe, produit de prêt-à-porter);
- identification de l'échantillon (par exemple, numéro de lot, numéro d'article);
- équipement utilisé;