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

**Partie 3:
Détection des peptides par LC-MS sans
réduction protéique**

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

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

Part 3: Peptide detection using LC-MS without protein reduction

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3d0e9f5a-fc40-4b3c-9f7a-960128cef9d9/iso-20418-3-2020>



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 20418-3:2020

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3d0e9f5a-fc40-4b3c-9f7a-960128cef9d9/iso-20418-3-2020>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2020

Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en œuvre, 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, Genève
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	iv
Introduction	v
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Symboles et abréviations	2
5 Principe	3
6 Réactifs	3
7 Appareillage	3
8 Méthode d'essai	4
8.1 Échantillonnage.....	4
8.2 Identification préliminaire.....	4
8.3 Lavage pour dégraissage.....	4
8.4 Réduction en poudre des fibres.....	4
8.5 Digestion à la trypsine.....	4
8.6 Marqueurs peptidiques.....	5
8.7 Analyse LC-MS.....	5
8.8 Évaluation de la validité des données observées.....	6
8.9 Calcul du facteur de correction.....	6
8.9.1 Facteur de correction.....	6
8.9.2 Facteur de correction de Cac1 vis-à-vis de Mou1 et de Yac1 (kc).....	6
8.9.3 Facteur de correction de Yac2 vis-à-vis de Mou2, Mou3 et de Cac2 (ky).....	6
8.9.4 Facteur de correction de l'alpaga et du chameau (ka).....	6
8.9.5 Facteur de correction de l'angora (kr).....	7
8.10 Calcul des proportions de mélange.....	7
8.10.1 Calcul des proportions de mélange du cachemire, de la laine de mouton et du yack.....	7
8.10.2 Calcul avec Mou1, Cac1, Yac1 et kc.....	7
8.10.3 Calcul avec Mou2, Mou3, Cac2, Yac2 et ky.....	7
8.10.4 Calcul avec Mou1, Mou2, Mou3, Cac2, Yac1.....	8
8.10.5 Calcul des proportions de mélange de chameau, d'alpaga et d'angora.....	8
9 Rapport d'essai	9
Annexe A (informative) Marqueurs peptidiques de fibres de cachemire, de laine de mouton et de yack	11
Annexe B (informative) Exemple de conditions d'analyse LC-MS	14
Annexe C (informative) Analyse de fibres de chameau, d'alpaga et d'angora	17
Annexe D (informative) Exemple de chromatogrammes de masse de marqueurs peptidiques	20
Annexe E (informative) Résultats de l'étude interlaboratoires	24
Bibliographie	26

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.

Le présent document a été élaboré par le Comité technique ISO/TC 38, *Textiles*, en collaboration avec le Comité technique CEN/TC 248, *Textiles et produits textiles*, du Comité européen de normalisation (CEN) conformément à l'Accord de coopération technique entre l'ISO et le CEN (Accord de Vienne).

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

Le cachemire est une fibre fine et longue obtenue à partir des poils des chèvres cachemire, qui est coûteuse du fait de sa haute qualité et de sa rareté. Des cas de non-conformité de l'étiquetage ou d'adultération d'articles en cachemire qui intègrent d'autres fibres animales moins onéreuses telles que la laine de mouton et le yack ont été régulièrement signalés dans le monde entier.

Des méthodes officielles actuelles permettant d'identifier les différentes fibres animales s'appuient sur une observation au microscope. Toutefois, l'identification au microscope est devenue de plus en plus difficile du fait d'un emploi plus large de traitements chimiques ou physiques au cours du procédé de fabrication. Au vu de ces problèmes, plusieurs autres méthodes ont également été étudiées visant soit à différencier les structures des fibres par spectroscopie dans le proche infrarouge ou par spectroscopie térahertz, soit à différencier des séquences ADN par réaction en chaîne par polymérase. Néanmoins, chaque méthode présente des limitations sur le plan de l'application pratique. Par conséquent, il est nécessaire de mettre au point de nouvelles méthodes d'identification.

Les fibres animales se composent principalement de protéines appelées kératines ainsi que de certaines protéines associées. De ce fait, les méthodes d'identification les plus prometteuses reposent sur l'analyse des protéines contenues dans les textiles. Habituellement, les protéines sont analysées en étant soumises à une digestion par la trypsine afin de les transformer en molécules plus petites, c'est-à-dire en peptides, qui sont ensuite caractérisés par spectrométrie de masse. Par conséquent, les méthodes d'identification au moyen d'un spectromètre de masse à désorption/ionisation laser assistée par matrice avec analyseur à temps de vol ou d'un système de chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS, acronyme issu de l'anglais «liquid chromatography–mass spectrometry») ont été étudiées. Ce dernier type d'appareillage, par comparaison au premier type d'appareillage, est moins onéreux et les laboratoires d'essai en sont plus fréquemment équipés du fait de la polyvalence de cet instrument analytique. De plus, la LC-MS permet d'analyser de grandes quantités et est donc préférable pour calculer les proportions de mélange de fibres animales.

Les kératines sont hautement insolubles du fait des liaisons disulfure qu'elles tendent à former, tant sur le plan intramoléculaire que sur le plan intermoléculaire. C'est la raison pour laquelle les kératines sont généralement extraites en présence d'agents réducteurs. Toutefois, cette étape de réduction est chronophage et complexe. Le présent document spécifie une méthode alternative reposant sur la sélection de peptides exempts de cystéine à titre de marqueurs d'identification, éliminant de ce fait la nécessité d'avoir recours à l'étape de réduction et permettant une préparation rapide des échantillons de LC-MS.

L'ISO 20418-1 et le présent document traitent tous deux de l'analyse par LC-MS, mais diffèrent quant à la méthode d'extraction des peptides. Dans l'ISO 20418-1, les protéines sont dans un premier temps extraites des fibres à l'aide d'une solution de thiourée/urée/dithiothréitol (DTT), puis sont coupées par digestion à la trypsine afin d'obtenir des peptides. Dans le procédé décrit ici, les peptides sont directement extraits par digestion à la trypsine des fibres réduites en poudre de manière mécanique. Cette méthode s'est avérée très utile même pour analyser des échantillons hautement transformés et peut être appliquée à différents types de poils animaux, tels que les poils de chèvre (cachemire ou mohair), la laine ou le yack.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 20418-3:2020

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3d0e9f5a-fc40-4b3c-9f7a-960128cef9d9/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

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode qualitative et quantitative pour déterminer la composition des mélanges de fibres animales – poils - (composés de laine, de cachemire, de yack, d'alpaga, de chameau ou d'angora) par LC-MS sans réduction protéique.

NOTE 1 La composition des fibres autres que les poils animaux peut être mesurée conformément à l'ISO 1833 (toutes les parties). Les résultats de ces deux méthodes sont ensuite combinés pour déterminer la composition globale des fibres.

La méthode repose sur une identification préliminaire, par microscopie optique, de toutes les fibres présentes dans le mélange sur la base de leur morphologie, conformément à l'ISO/TR 11827^[4]. Elle n'est pas applicable si des fibres de la même espèce animale (telles que des mélanges de cachemire et de mohair) sont présentes.

NOTE 2 Dans ce cas, l'analyse quantitative est réalisée par microscopie [tel que décrit dans l'ISO 17751 (toutes les parties), par exemple].

2 Références normatives

ISO 20418-3:2020
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3d0e9f5a-fc40-4b3c-9f7a-960128cef9d9/iso-20418-3-2020>

Les documents suivants sont cités dans le texte de sorte qu'ils 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 1833-1, *Textiles — Analyse chimique quantitative — Partie 1: Principes généraux des essais*

ISO 3696, *Eau pour laboratoire à usage analytique — Spécification et méthodes d'essai*

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.

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

3.1

fibre animale (poil)

type de fibre de kératine destiné à un usage textile, tel que la laine, le cachemire, le yack, l'alpaga, le chameau ou l'angora

3.2

Bovidae

famille biologique regroupant les mammifères ruminants biongulés, incluant la chèvre cachemire, le mouton et le yack

3.3

Camelidae

famille biologique regroupant les mammifères ongulés à nombre de doigts pair, incluant le chameau et l'alpaga

3.4

protéine

polymère d'acides aminés qui joue de nombreux rôles essentiels dans le corps

3.5

peptide

petite *protéine* (3.4) composée de moins de 50 acides aminés environ

3.6

marqueur peptidique

partie d'une *protéine* (3.4) utilisée pour son identification, sa récupération et sa purification

3.7

chromatogramme de masse

chromatogramme pour un rapport masse sur charge donné

3.8

chromatogramme correspondant aux ions totaux

TIC

chromatogramme dont chaque point de donnée est créé en additionnant les intensités de tous les pics de spectres de masse appartenant au même balayage

3.9

détection d'ions sélectionnés

mode SIM

mode de balayage de spectrométrie de masse dans lequel le spectromètre ne reçoit/ne détecte qu'une plage limitée de rapport m/z

4 Symboles et abréviations

A	surface d'un pic
W	proportion de mélange
Br	proportion de Bovidae
Cr	proportion de Camelidae
ka	facteur de correction de l'alpaga et du chameau
kc	facteur de correction du cachemire
kr	facteur de correction de l'angora
ky	facteur de correction du yack
m/z	rapport masse sur charge, où m est la masse, exprimée en unité de masse atomique, et z est le nombre de charges des ions

5 Principe

Les fibres réduites en poudre de manière mécanique sont directement soumises à une digestion à la trypsine sans réduction préalable. L'analyse des peptides résultant de la digestion est réalisée par LC-MS. La composition en pourcentage est calculée à partir des surfaces des pics des marqueurs peptidiques propres aux espèces.

6 Réactifs

Les réactifs de qualité analytique suivants doivent être utilisés.

6.1 Acétone, d'une pureté supérieure ou égale à 99,5 %.

6.2 Eau, de qualité 3 tel que spécifié dans l'ISO 3696.

6.3 Solution de bicarbonate d'ammonium (NH₄HCO₃) (25 mmol/l)

— 197,5 mg de NH₄HCO₃, d'une pureté supérieure ou égale à 96,0 %.

— Compléter à 100 ml en ajoutant de l'eau (6.2).

6.4 Trypsine, trypsine porcine de qualité pour séquençage, modifiée par méthylation réductive.

6.5 Acétonitrile, d'une pureté supérieure ou égale à 99,8 %.

6.6 Acide formique, d'une pureté supérieure ou égale à 98 %.

6.7 Solution de trypsine

— 20 µg de trypsine (6.4).

— 200 µl d'acide formique à 0,1 % (6.6).

7 Appareillage

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

7.1 Chauffe-ballon, pouvant fonctionner dans une plage de température de 50 °C à 150 °C.

7.2 Broyeur, broyeur à billes, broyeur cryogénique ou dispositif équivalent, capable de broyer des matières en une poudre extrêmement fine.

7.3 Membrane filtrante, pour solutions aqueuses, présentant une taille de pores de 0,45 µm.

7.4 Bloc chauffant, permettant de chauffer des microtubes à 37 °C.

7.5 Agitateur de type vortex pour tube, permettant d'agiter au vortex le contenu de microtubes et de flacons pour LC pendant environ 30 min.

7.6 Évaporateur centrifuge, capable de fournir 5 000 g.

7.7 LC-MS, système de chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse, capable de détecter des m/z (u) compris entre 200 et 1 500.

ISO 20418-3:2020(F)

NOTE (u) désigne l'unité de masse atomique unifiée, unité SI.

7.8 Flaçon pour LC, qui doit être constitué de verre ou de polyméthylpentane.

7.9 Colonne de LC, colonne de chromatographie en phase inverse, composée de silice greffée par des chaînes octadécyle (C-18).

7.10 Balance, d'une résolution d'au moins 0,001 g.

7.11 Ballon de récupération (ballon poire ou ballon à fond rond).

8 Méthode d'essai

8.1 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 doivent être conformes à l'ISO 1833-1.

8.2 Identification préliminaire

L'analyse qualitative préliminaire de la fibre animale (poil) doit être réalisée d'après sa morphologie déterminée par microscopie optique, conformément à l'ISO 17751 (toutes les parties), après élimination de toute fibre non animale.

(standards.iteh.ai)

8.3 Lavage pour dégraissage

ISO 20418-3:2020

8.3.1 Chauffer à reflux 1 g des fibres dans 200 ml d'acétone (6.1) dans un ballon de récupération (7.11) placé dans un chauffe-ballon (7.1) pendant 30 min. Cette étape de lavage peut être omise pour des échantillons propres. La quantité des fibres peut être modifiée.

8.3.2 Extraire les fibres dégraissées du ballon de récupération et les laisser sécher à l'air. La méthode de préparation des échantillons de l'ISO 20418-1^[5] peut être utilisée à la place.

8.4 Réduction en poudre des fibres

Broyer l'échantillon de fibres séché (8.3.2) à l'aide d'un broyeur (7.2) jusqu'à obtention d'une poudre fine avec une longueur moyenne de fibre de 100 µm ou moins, la longueur étant vérifiée au microscope, et homogénéiser avec soin pour garantir un échantillonnage représentatif des fibres.

8.5 Digestion à la trypsine

8.5.1 Peser environ 10 mg de l'échantillon broyé et l'introduire dans un microtube. Pour une prise d'essai dépassant 10 mg, augmenter de manière proportionnelle les volumes de solution de NH₄HCO₃ en 8.5.2 et de solution de trypsine en 8.5.3.

8.5.2 Ajouter 300 µl de la solution de NH₄HCO₃ (6.3) et agiter au vortex de 10 min à 30 min.

8.5.3 Ajouter 10 µl de la solution de trypsine (6.7) à l'échantillon et incubé à 37 °C de 20 h à 24 h.

8.5.4 Centrifuger la solution tryptique pendant 3 min dans l'évaporateur centrifuge (7.6). Filtrer le surnageant sur une membrane filtrante (7.3) pour éliminer les fibres résiduelles.

NOTE Un filtre à centrifuger, un filtre seringue ou un autre dispositif de filtration peuvent être utilisés.

8.5.5 Transférer la solution dans un flacon pour LC, puis la sécher dans un évaporateur centrifuge (7.6). Si le flacon pour LC ne s'insère pas dans l'évaporateur, il est possible d'évaporer la solution dans d'autres types de contenants, par exemple dans un microtube. L'échantillon est transféré dans un flacon pour LC après dissolution. À titre d'alternative à l'évaporateur centrifuge, un lyophilisateur ou un flux d'azote peuvent être utilisés comme méthode de séchage.

8.5.6 Ajouter 40 µl d'eau contenant de l'acide formique à 0,1 % et de l'acétonitrile à 5 % et agiter au vortex pendant 30 min en vue des mesurages ultérieurs par LC-MS. L'agitation au vortex ne doit pas être remplacée par une sonication lorsque l'échantillon pour LC-MS est dissous.

8.6 Marqueurs peptidiques

8.6.1 Sélectionner les peptides à utiliser comme marqueurs pour une identification différentielle de fibres, comme spécifié à l'Annexe A et à l'Annexe C. Le résultat de l'identification préliminaire par microscopie (8.2) et le Tableau 1 peuvent servir de références pour cette sélection.

Tableau 1 — Corrélation entre marqueurs peptidiques et taxons d'animaux identifiables

Fibre	Espèce		Famille		Classe	
	Nom	Marqueur ^a	Nom	Marqueur	Nom	Marqueur
Laine de mouton	<i>Ovis aries</i>	Mou1, (Mou2, Mou3)	Bovidae	Fbv1	Mammalia	Cmm1
Cachemire/ mohair	<i>Capra hircus</i>	Cac1, (Cac2)				
Yack	<i>Bos grunniens</i>	Yac1, (Yac2)				
Alpaga	<i>Vicugna pacos</i>	Alp1, (Alp2)	Camelidae	Fcm1		
Chameau	<i>Camelus ferus</i>	Cha1, (Cha2)				
Lapin angora	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Ang1, (Ang2)	Leporidae	—		

^a Les marqueurs peptidiques portant le suffixe 1 sont préférables pour une analyse quantitative.

8.6.2 Optimiser les paramètres de LC-MS et confirmer les temps de rétention des pics cibles soit à l'aide de peptides synthétisés (présentant les séquences d'acides aminés spécifiées dans l'Annexe A et dans l'Annexe C), soit à l'aide de peptides extraits d'échantillons de fibres animales pures.

8.7 Analyse LC-MS

8.7.1 Injecter 5 µl d'échantillon dans une colonne de LC (7.9). Utiliser de l'eau contenant de l'acide formique à 0,1 % et de l'acétonitrile contenant de l'acide formique à 0,1 % de sorte à former un gradient de concentration croissante en acétonitrile pour la chromatographie. La concentration initiale d'acétonitrile est de 5 %. Un exemple de paramètres de LC est donné dans l'Annexe B.

8.7.2 Faire fonctionner le spectromètre de masse en mode SIM. Les marqueurs sélectionnés (de préférence ceux portant le suffixe 1) qui sont décrits dans l'Annexe A et dans l'Annexe C doivent être recherchés. Un exemple de paramètres de MS est donné dans l'Annexe B.

8.7.3 Intégrer la surface du pic de chaque marqueur peptidique. Les pics des marqueurs peptidiques complémentaires (ceux portant les suffixes 2 et 3), qui sont également décrits dans l'Annexe A et dans l'Annexe C, peuvent être utilisés lorsqu'il est difficile d'intégrer le pic cible.

8.8 Évaluation de la validité des données observées

Voir [Annexe C](#).

8.9 Calcul du facteur de correction

8.9.1 Facteur de correction

Il n'est pas escompté que les surfaces des pics des marqueurs peptidiques soient proportionnelles aux quantités de fibres animales correspondantes dans les combinaisons suivantes de marqueurs peptidiques, pour plusieurs raisons telles que la différence des espèces protéiques desquelles chaque marqueur peptidique est issu (voir [8.9.2](#)). En pareils cas, il convient de définir expérimentalement un facteur de correction pour un peptide vis-à-vis des autres peptides en vue de la quantification de leurs proportions de mélange. En outre, il convient de redéfinir le facteur de correction en cas de modification des conditions d'analyse.

8.9.2 Facteur de correction de Cac1 vis-à-vis de Mou1 et de Yac1 (kc)

8.9.2.1 Analyser des échantillons de mélange composés, en rapport massique, de 50 % de cachemire et de 50 % de laine de mouton au moins trois fois.

8.9.2.2 Calculer la valeur de $A_{\text{mou1}}/A_{\text{cac1}}$ à partir de la surface du pic de Mou1 (A_{mou1}) et de la surface du pic de Cac1 (A_{cac1}) pour chaque analyse.

8.9.2.3 Le facteur de correction du cachemire (kc) doit être établi en calculant la moyenne de tous les $A_{\text{mou1}}/A_{\text{cac1}}$.

8.9.3 Facteur de correction de Yac2 vis-à-vis de Mou2, Mou3 et de Cac2 (ky)

8.9.3.1 Analyser des échantillons de mélange composés, en rapport massique, de 50 % de cachemire et de 50 % de laine de mouton au moins trois fois.

8.9.3.2 Calculer la valeur de $A_{\text{cac2}}/A_{\text{yac2}}$ à partir de la surface du pic de Cac2 (A_{cac2}) et de la surface du pic de Yac2 (A_{yac2}) pour chaque analyse.

8.9.3.3 Le facteur de correction du yack (ky) doit être établi en calculant la moyenne de tous les $A_{\text{cac2}}/A_{\text{yac2}}$.

8.9.4 Facteur de correction de l'alpaga et du chameau (ka)

8.9.4.1 Analyser des échantillons de mélange composés, en rapport massique, de 50 % d'alpaga et de 50 % de laine de mouton au moins trois fois.

8.9.4.2 Calculer la valeur de $A_{\text{fbv1}}/A_{\text{fcm1}}$ à partir de la surface du pic de Fbv1 (A_{fbv1}) et de la surface du pic de F_{cm1} (A_{fcm1}) pour chaque analyse.

8.9.4.3 Le facteur de correction de l'alpaga et du chameau (ka) doit être établi en calculant la moyenne de tous les $A_{\text{fbv1}}/A_{\text{fcm1}}$.

EXEMPLE Voir [Annexe C](#).