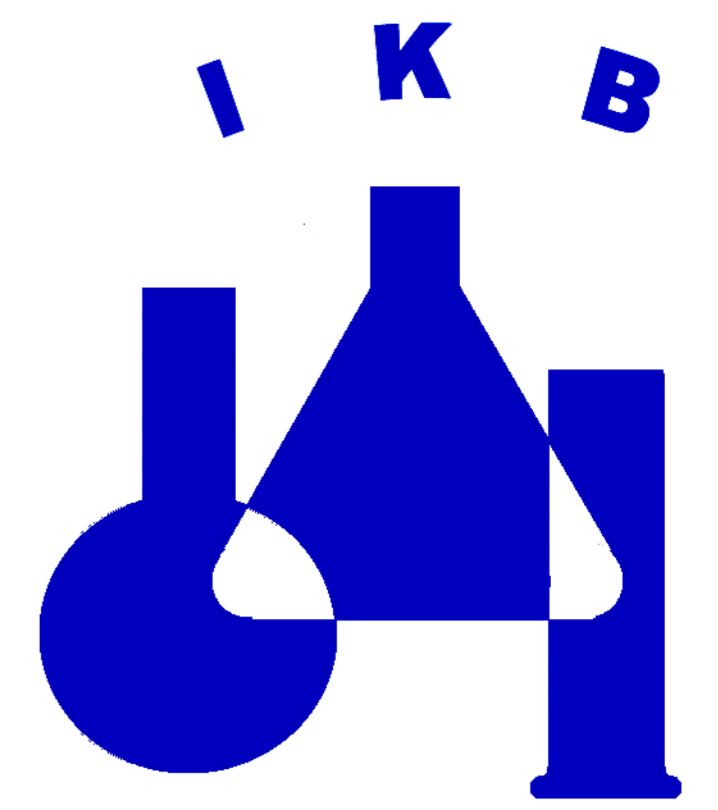


Fortschritte in der Analytik von Lebensmittelallergenen



Köhler, H.^{1,2}, Konetzki, J.², von Barga, C.¹, Brockmeyer, J.¹, Becker, E.², Kirchhoff, E.²

¹Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Institut für Lebensmittelchemie, Corrensstr. 45, 48149 Münster

²Institut Kirchhoff Berlin GmbH, Albestraße 3-4, 12159 Berlin, email: IKB@institut-kirchhoff.de



Institut für Lebensmittelchemie

Nahrungsmittelallergie

= Überempfindlichkeitsreaktion auf Lebensmittelproteine

Reaktion

Immunglobulin E vermittelte Antigen-Antikörper-Komplexreaktion mit folgender Immunreaktion

Symptome

Hautrötungen, Jucken, Atemwegsbeschwerden, Störungen im Magen-Darm-Trakt, anaphylaktischer Schock mit Todesfolge

Rechtliche Grundlage

- Verpflichtende Deklaration von Zutaten
- Keine Regelungen für Kontaminationen^[1]

→ **Verlässliche Nachweismethoden** unerlässlich

Nachweismethoden

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

- Immunochemischer Nachweis über Antikörper-Antigen-Komplexbildung

PCR (Polymerase Chain Reaction)

- Indirekter Nachweis über DNA mittels **Multiplex** oder **Real-time PCR**

LC-MS/MS

- Nachweis allergenspezifischer tryptischer Peptide
- Direkte Detektion des allergenen Stoffes
- Auswahl spezifischer Peptide zur Vermeidung von Kreuzreaktivitäten verwandter Spezies
- **Bisheriger Stand:**

→ Methode zum **gleichzeitigen** Nachweis von **sieben verschiedenen Allergenen**^[2]

Kreuzreaktivität

Überprüfung von **Kreuzreaktivitäten** innerhalb der Kerne aus der Unterfamilie der **Prunoideae in silico** über die Datenbank **BLAST** nicht möglich, da keine ausreichenden Informationen zur Aminosäuresequenz von Aprikosen und Pfirsichkernen vorhanden.

Experimentelle Überprüfung:

- Mandel *Prunus dulcis*
- Aprikose *Prunus armeniaca*
- Pfirsich *Prunus persica*

→ Entwicklung einer neuen **MRM-Methode** für den **spezifischen Nachweis** von Mandelkernpeptiden

Fragmentierung nach Roepstorff

- Peptide werden in der LC-MS/MS Methode anhand ihres spezifischen Fragmentierungsmusters identifiziert.^[3]

- Für die Analytik ergeben meist die in Abbildung 1 dargestellten b- und y-Ionen die stabilsten Fragmentationen. Es sind aber auch andere Fragmentierungsstellen möglich.

- Die Zuordnung erfolgt anhand des spezifischen m/z Verhältnisses der einzelnen Fragmente im dritten Quadrupol der LC-MS/MS.

Übereinstimmung der MRM-Übergänge

- Zur Charakterisierung des Mandelproteins werden 4 verschiedene Peptide mit jeweils 2 verschiedenen Massenübergängen in einer **MRM-Methode** gemessen.

- Der Vergleich der Massenübergänge dieser MRM-Methode zeigt eine komplette Übereinstimmung von Mandel- mit Aprikosenkernen.

→ **Keine Differenzierung** von Mandel- zu Aprikosenkernen mit Hilfe dieser Methode **möglich**

Übereinstimmung des Fragmentierungsspektrums

- Die Überlegung, andere Fragmentationen für die MRM-Methode zu verwenden, die nur beim Mandelpeptid vorkommen, war nicht umsetzbar.

- Grund: Übereinstimmung des kompletten Fragmentierungsmusters der einzelnen Peptide mit Variationen allein in den Intensitäten der Fragmente

- Abbildung 3 zeigt beispielhaft diese Übereinstimmungen anhand eines Peptides. Die Fragmentierungsmuster für die restlichen Peptide ergaben analoge Ergebnisse.

→ **Keine Differenzierung** mit diesen Peptiden unter Einsatz **anderer Fragmentationen** zur Differenzierung von Mandel- und Aprikosenkernen **möglich**

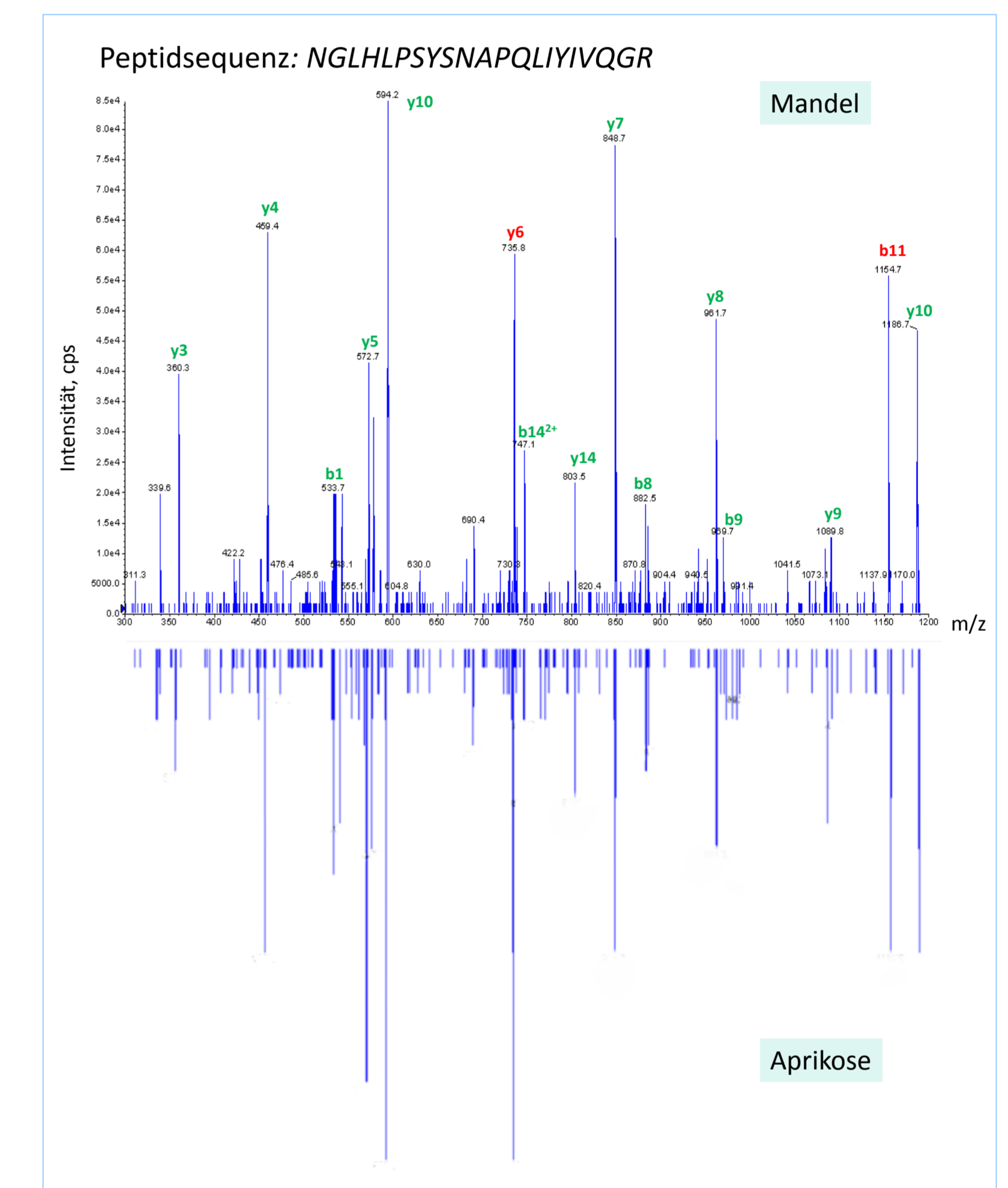


Abb. 3: Fragmentierungsmuster eines Produktionsenscans der Precursormasse von 780,8 im Vergleich von Mandelkernen (oben) und Aprikosenkernen (unten) gemessen mittels LC-MS/MS AB Sciex API 4000 zum Abgleich von Kreuzreaktivitäten; rote Markierung der Massenübergänge aus [2]

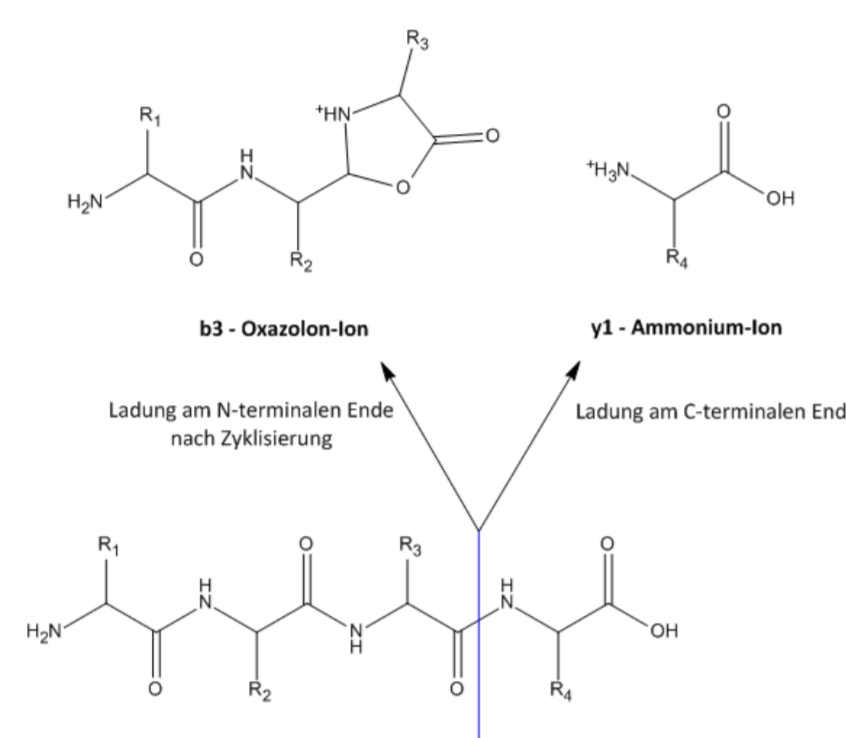


Abb. 1: Fragmentierung der Aminosäurekette in b- und y-Fragmentionen nach Roepstorff^[3]

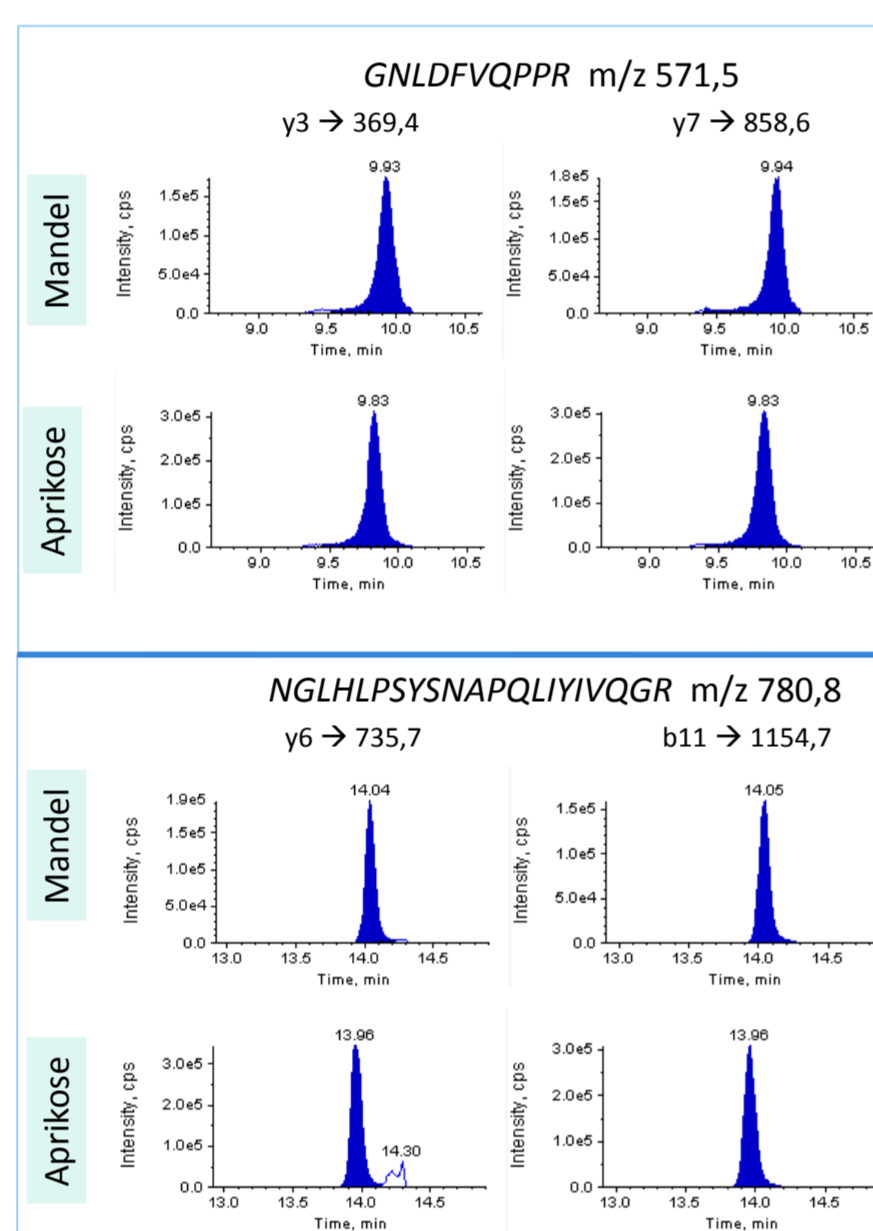


Abb. 2: MRM-Übergänge von zwei Mandelpeptiden mit jeweils zwei Übergängen entsprechend [2] im Vergleich von Mandelkernen (oben) und Aprikosenkernen (unten) gemessen mittels LC-MS/MS AB Sciex API 4000 zum Abgleich von Kreuzreaktivitäten; Ergebnisse weiterer Peptide erzeugen analoge Ergebnisse → **Kreuzreaktivitäten feststellbar**

Suche neuer Peptide

- Mit Hilfe eines kompletten Peptidscreenings von Mandel- sowie Aprikosenkernen sollen mandelspezifische Peptide mittels hochauflösender LTQ Orbitrap XL identifiziert werden.

- Abgleich der detektierten Peptide, so dass für die Auswahl nur mandelspezifische Peptide verwendet werden, die nicht im Aprikosenkernextrakt detektiert wurden.

- Überprüfung der spezifischen Mandelpeptide auf ihre Eignung (Aussortieren von Mischleavages, Peptide mit hohem Cystein- oder Methioninanteil)

- Identifizierung der Retentionszeit der Peptide an der LC-MS/MS über die spezifischen Fragmentierungsmuster aus der Orbitrap-Messung und Abgleich mit der Software **MRM-Pilot**

- Entwicklung einer MRM-Methode für die neuen Peptide für die LC-MS/MS

→ Auswahl empfindlicher Massenübergänge

→ Optimierung der LC-MS/MS Einstellungen (z.B. DP/CE)

- Experimenteller Abgleich von Kreuzreaktivitäten mit Aprikosen- und Pfirsichkernen ergeben keine Übereinstimmungen.

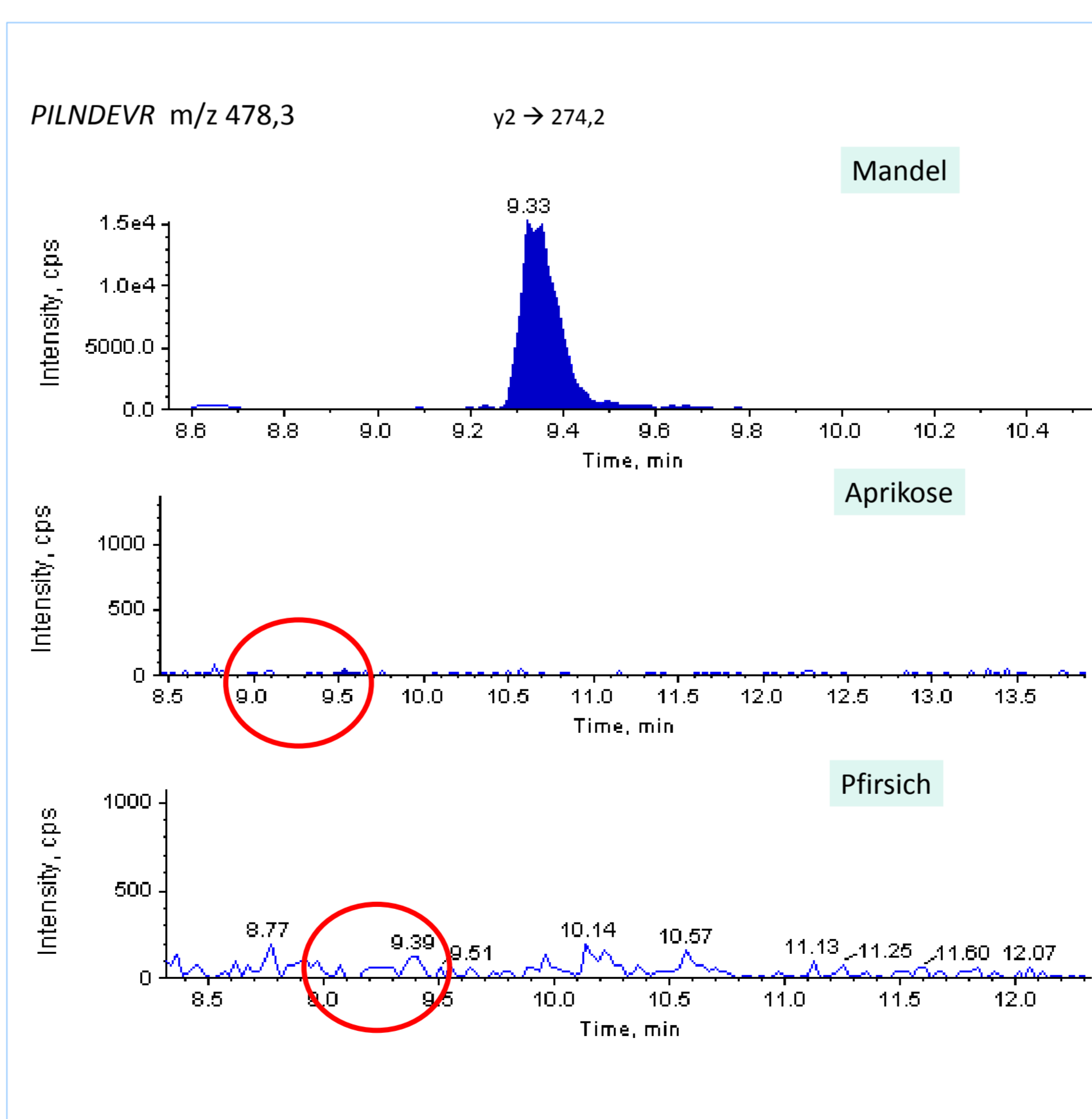


Abb. 5: Beispielhafter MRM-Übergang eines Mandelpeptids mit der Precursormasse von 478,3 zum Abgleich von Kreuzreaktivitäten von Mandelkernen (oben) zu Aprikosenkernen (mitte) und Pfirsichkernen (unten) gemessen mittels LC-MS/MS AB Sciex API 4000; rote Markierung zeigt eigentliche Retentionszeit an. → **Keine Kreuzreaktivitäten feststellbar**

Fazit

Für die Entwicklung der neuen MRM-Methode ergeben sich folgende Vorteile:

Speziesnachweis

Mit der Entwicklung der **neuen MRM-Methode** für vier mandelspezifische Peptide kann nun ein **verlässlicher Speziesnachweis** des Allergens mittels LC-MS/MS gesichert werden, ohne dass die Messung durch **Kreuzreaktivitäten** mit zwei Vertretern der Unterfamilie der **Prunoideae** gestört wird.

Proteinhomologien

Bisher existieren **kaum Daten zu den allergenen Proteinen** von Aprikosenkernen. Durch die Bestimmung der **Kreuzreaktivität** der Peptide des Mandelproteins *Pru du 6* können erste Aussagen auf das **homologe Vorkommen** dieses Proteins anhand von einzelnen Peptidsequenzen im Aprikosenkern gemacht werden.

Authentizitätsnachweis

Der differenzierte Nachweis von Mandel- und Aprikosenkernen bietet die Möglichkeit auf eine **Erweiterung der LC-MS/MS-Analytik** für den **Authentizitätsnachweis** von Mandel in Marzipan, als **Alternativmethode zur PCR**, um Verfälschungen mit kostengünstigeren Aprikosenkernen zu identifizieren.

Peptid	Precursormasse mit Ladungszustand [m/z]	MRM-Übergänge (Fragmention) [m/z]
FYNPQGGR	469,7 (+2)	311,1 (b2) / 514,5 (y5) / 628,3 (y6) / 791,5 (y7)
PILNDEVR	478,3 (+2)	274,2 (y2) / 403,5 (y3) / 632,6 (y5) / 745,7 (y6)
NLKYNRQESRLLSATSPPR	558,3 (+4)	175,0 (y1) / 228,1 (b2) / 520,1 (b4) / 722,7 (y2+)
TNANALVVAIR	603,3 (+2)	522,3 (y4) / 621,3 (y5) / 734,9 (y6) / 805,5 (y7)

Tab. 1: Übersicht über die Peptide der neu entwickelten MRM-Methoden mit ihrem m/z und den spezifischen MRM-Übergängen mit dem jeweiligen Fragmention

Literatur: [1] U. Busch, A. H. Meyer, H.-U. Waiblinger, M. Worm, „Allergene in Lebensmitteln“, B. Behr's Verlag GmbH & Co. KG, Hamburg, 4. Aktualisierungs-Lieferung 03/2012.
 [2] J. Heick *et al.*, „First screening method for the simultaneous detection of seven allergens by liquid chromatography mass spectrometry, J Chrom A, 2011, pp. 938-943
 [3] P. Roepstorff *et al.*, „Evaluation of Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry for Sequence Determination of Peptides“, Biomed Mass Spec, 1985, pp. 181-189