

Multiallergenscreening mittels Massenspektrometrie

J. Heick

LChG Regionaltagung

Hannover 2012

IgE vermittelte Abwehrreaktion auf bestimmte Lebensmittelproteine

Prävalenz ~ 8 % Säuglinge und Kinder
~ 2 % Erwachsene

Auslösende Nahrungsmittel

> 160

Aber: 8 sind verantwortlich für > 90 % aller Allergien

Gesetzliche Regelungen

2007/68/EC regelt Kennzeichnung
14 allergenen Gruppen

28.11.2007

EN

Official Journal of the European Union

L 310/11

DIRECTIVES

COMMISSION DIRECTIVE 2007/68/EC
of 27 November 2007

amending Annex IIIa to Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council as regards certain food ingredients

(Text with EEA relevance)

IgE vermittelte Abwehrreaktion auf bestimmte Lebensmittelproteine

Prävalenz ~ 8 % Säuglinge und Kinder
~ 2 % Erwachsene

Auslösende Nahrungsmittel

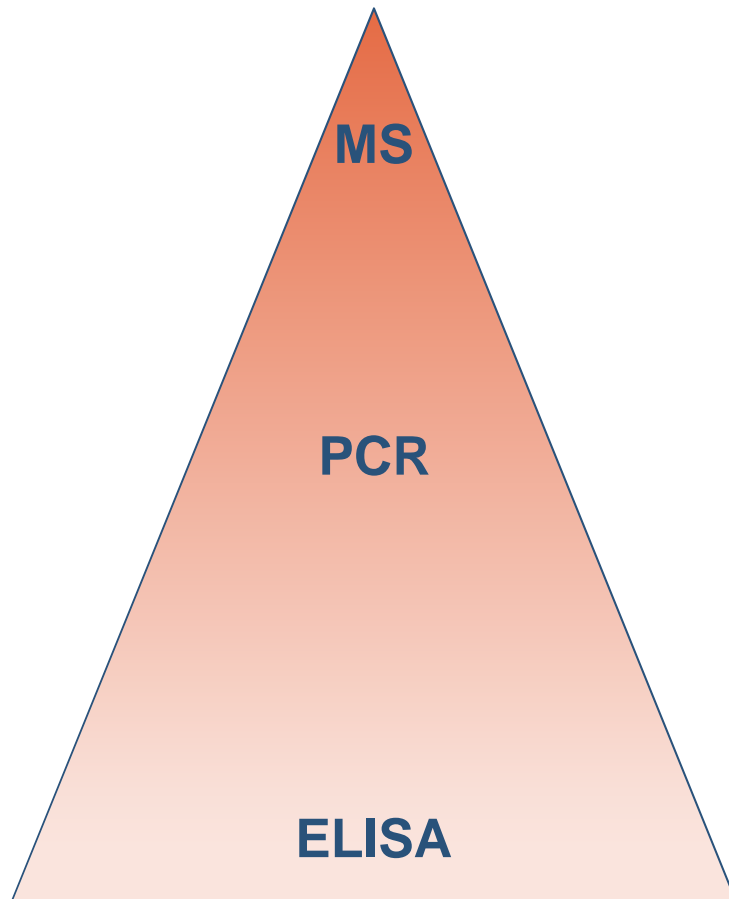
> 160

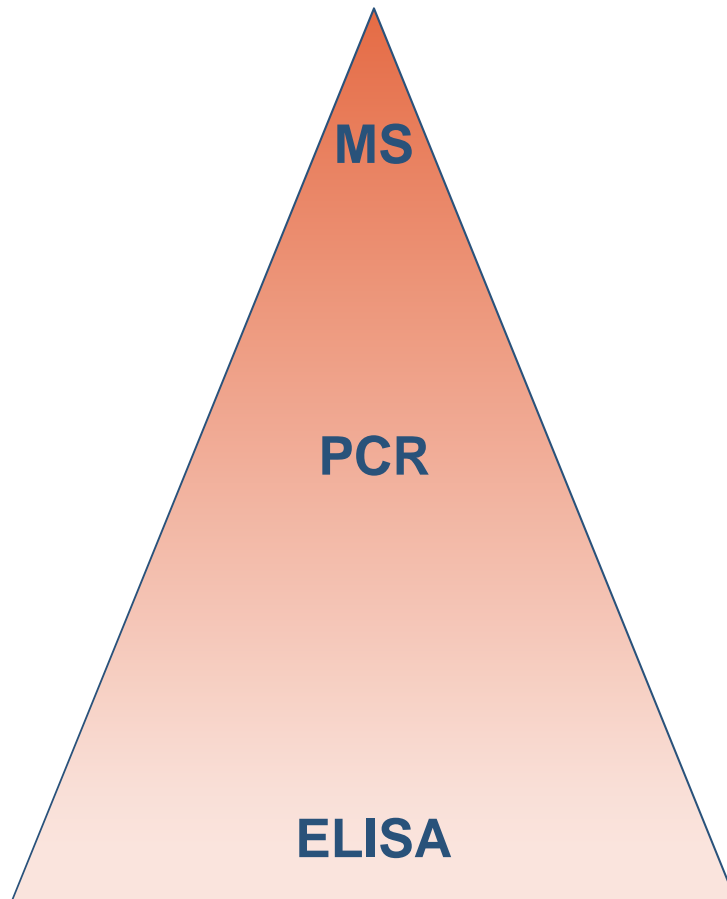
Aber: 8 sind verantwortlich für > 90 % aller Allergien

Gesetzliche Regelungen

2011/1169/EC Anhang II

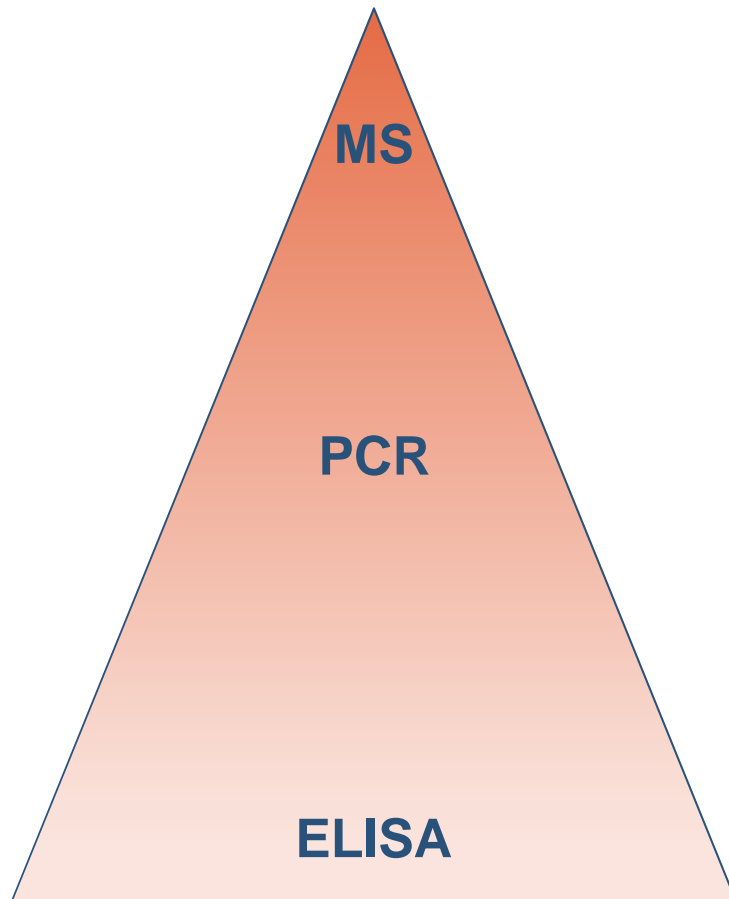
28.11.2007	EN	Official Journal	L 304/18	DE	Amtsblatt der Europäischen Union	22.11.2011
			VERORDNUNG (EU) Nr. 1169/2011 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 25. Oktober 2011 betreffend die Information der Verbraucher über Lebensmittel und zur Änderung der Verordnungen (EG) Nr. 1924/2006 und (EG) Nr. 1925/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates und zur Aufhebung der Richtlinie 87/250/EWG der Kommission, der Richtlinie 90/496/EWG des Rates, der Richtlinie 1999/10/EG der Kommission, der Richtlinie 2000/13/EG des Europäischen Parlaments und des Rates, der Richtlinien 2002/67/EG und 2008/5/EG der Kommission und der Verordnung (EG) Nr. 608/2004 der Kommission (Text von Bedeutung für den EWR)			
		COMMISSION of 27 amending Annex IIIa to Directive 2000/13/I regards cer (Text w				





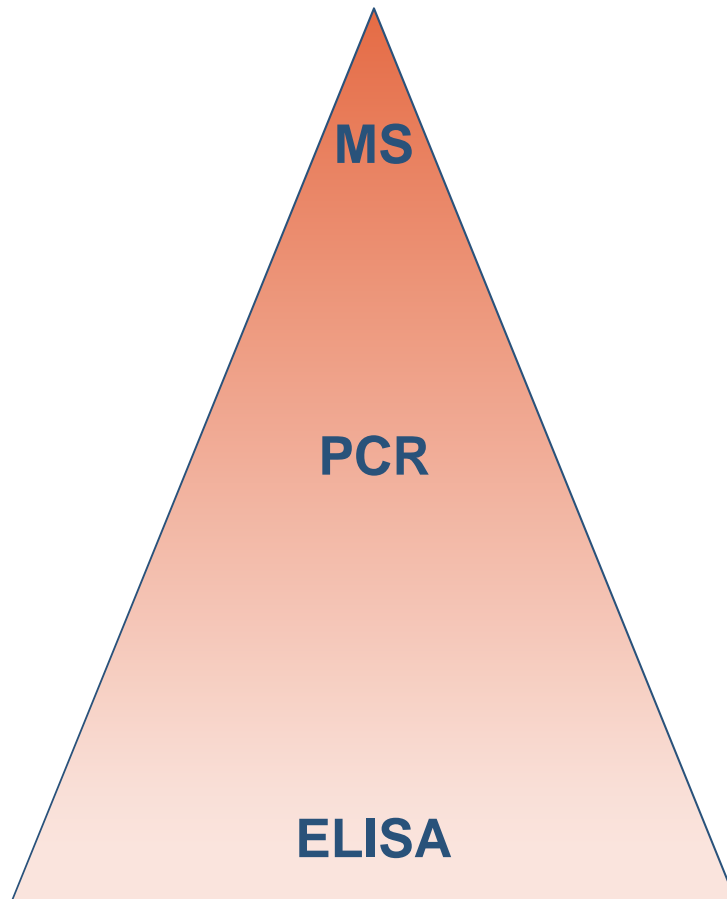
ELISA

- + schnell, einfach
- + kommerzielle Kits
- kein Multiscreening
- Kreuzreaktivität
- Zerstörung der Sekundär-/Tertiärstruktur durch Prozessierung



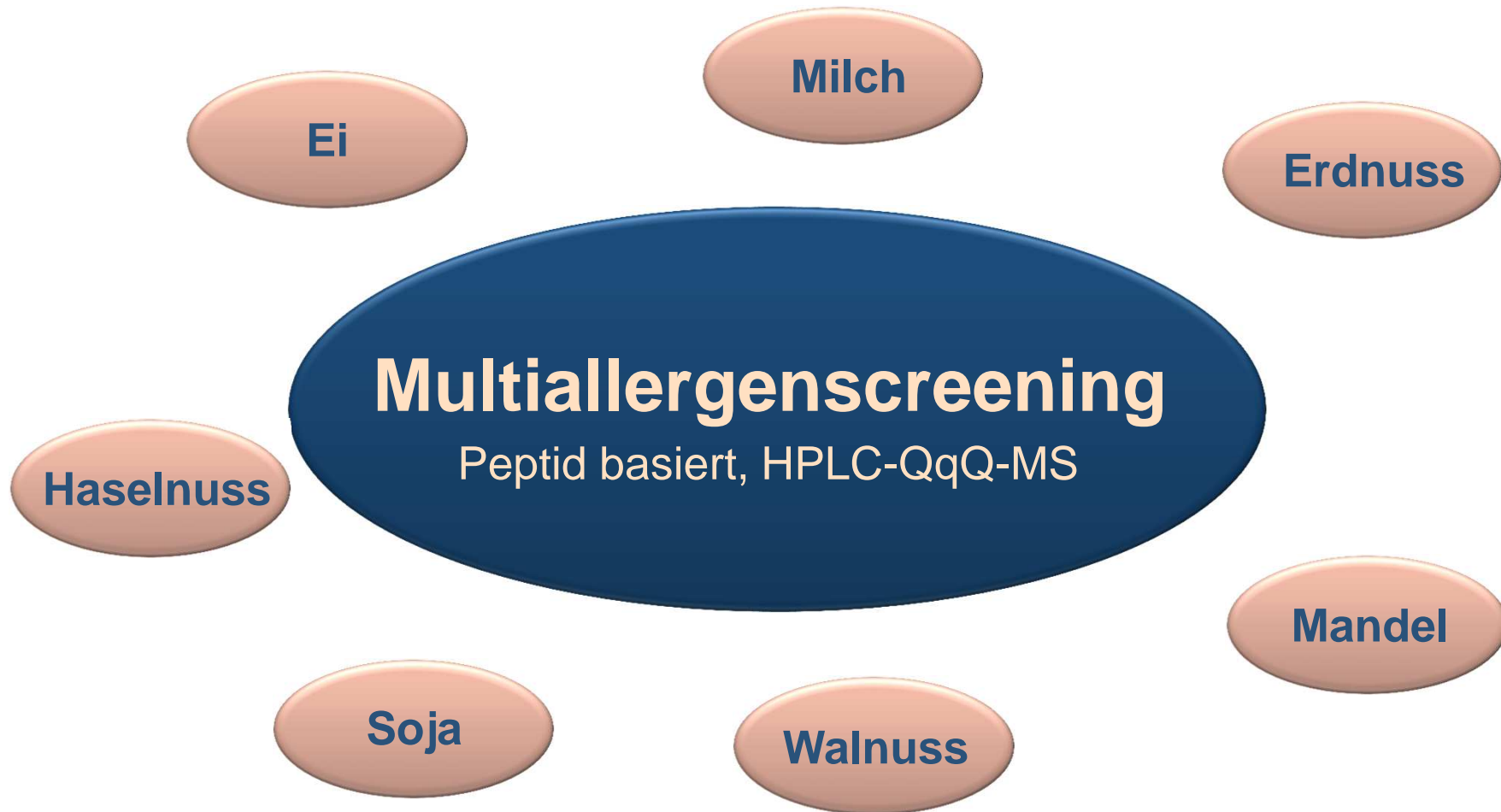
PCR

- + Multiscreening
- + Spezifisch
- Detektiert DNA nicht Protein
- Detektion von Milch/Ei schwierig



MS

- + Multiscreening
- + direkter Nachweis Protein
- + Spezifisch
- Technisch komplex
- Kosten



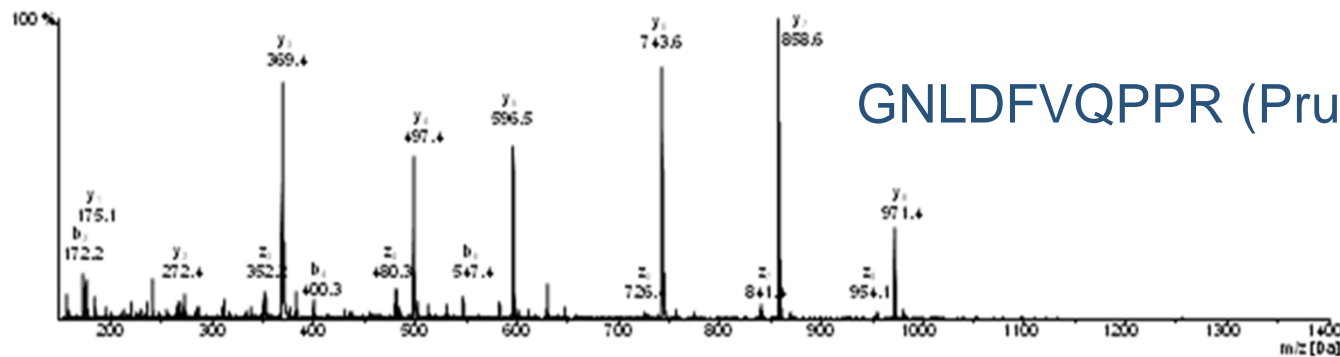
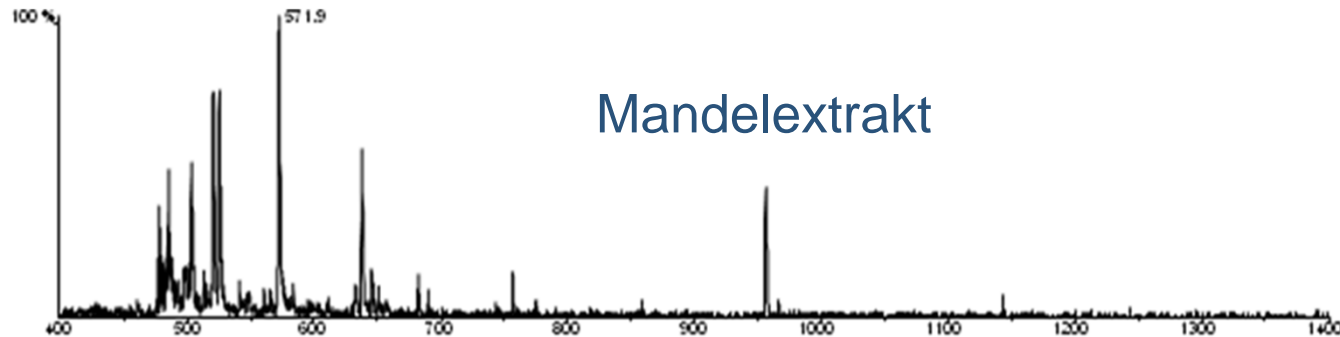
Multiallergenscreening

Ei, Erdnuss, Haselnuss, Mandel, Milch, Soja, Walnuss
Peptid basiert, HPLC-QqQ-MS

1. Welche Peptide entstehen reproduzierbar beim tryptischen Verdau von Casein?
2. Sind deren Aminosäuresequenzen eindeutig für Casein?
3. MRM Übergänge?

Kriterien für Peptidmarker

REPRODUZIERBAR



**IDA basierter Ansatz
für Peptididentifikation**

Multiallergenscreening

Ei, Erdnuss, Haselnuss, Mandel, Milch, Soja, Walnuss
Peptid basiert, HPLC-QqQ-MS

1. Welche Peptide entstehen reproduzierbar beim tryptischen Verdau von Casein?
2. Sind deren Aminosäuresequenzen eindeutig für Casein?
3. MRM Übergänge?

BLAST

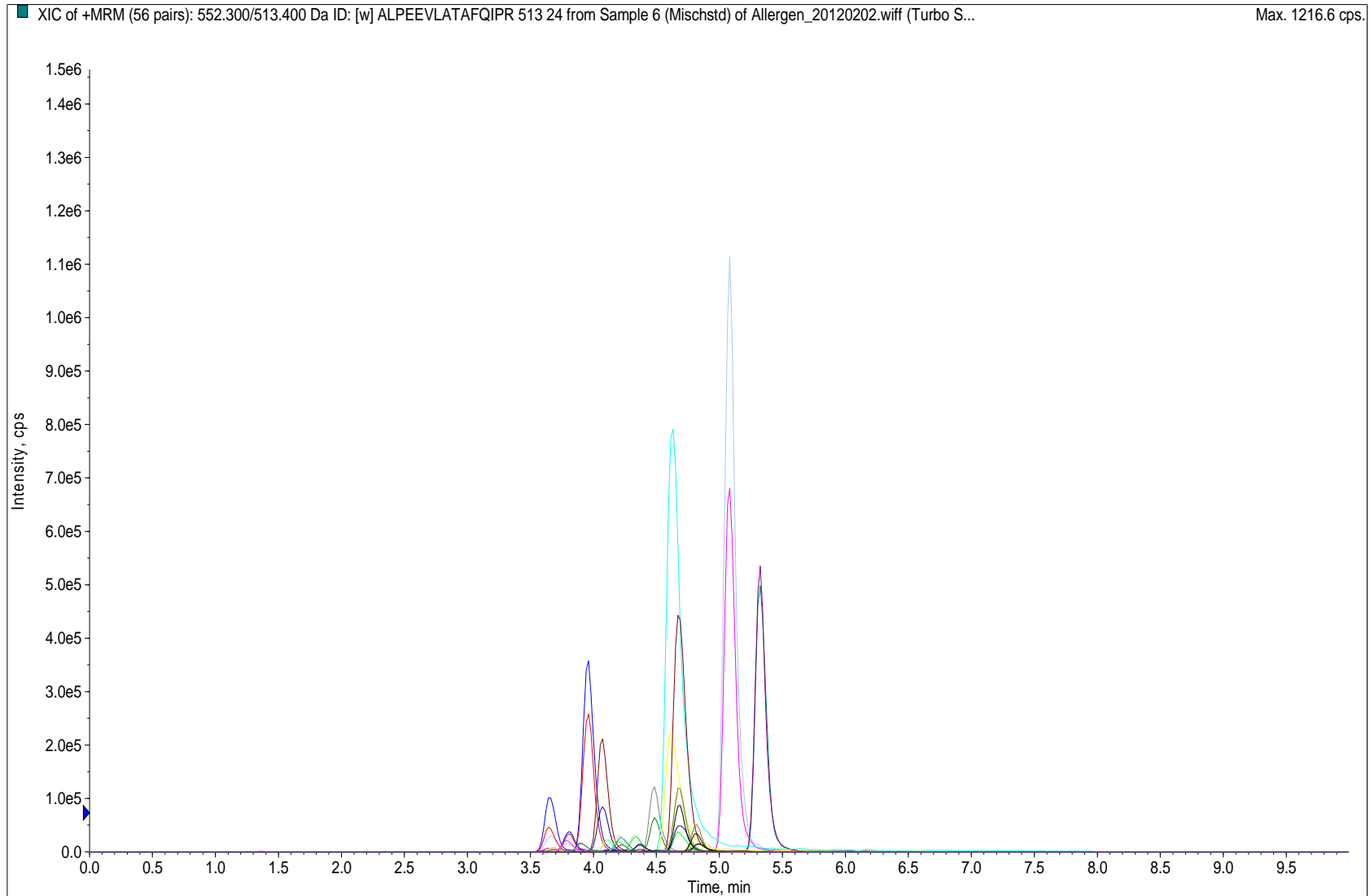
Sequences producing significant alignments:		Score (Bits)	E Value
gb ACJ14317.1 	alpha S1 casein [Bubalus bubalis]	36.3	0.41
gb ACG63494.1 	alpha S1 casein [Bos taurus]	36.3	0.41
gb ABW98966.1 	alpha S1 casein [Bos taurus]	36.3	0.41
gb ABW98955.1 	alpha S1 casein [Bos taurus]	36.3	0.41
gb ABW98954.1 	alpha S1 casein [Bos taurus]	36.3	0.41
gb ABW98953.1 	alpha S1 casein [Bos taurus]	36.3	0.41
gb ABW98952.1 	alpha S1 casein [Bos taurus]	36.3	0.41
gb ABW98951.1 	alpha S1 casein [Bos taurus]	36.3	0.41
gb ABW98950.1 	alpha S1 casein [Bos taurus]	36.3	0.41
gb ABW98949.1 	alpha S1 casein [Bos taurus]	36.3	0.41
gb ABW98948.1 	alpha S1 casein [Bos taurus]	36.3	0.41
gb ABW98945.1 	alpha S1 casein [Bos taurus]	36.3	0.41
gb ABW98943.1 	alpha S1 casein [Bos taurus]	36.3	0.41
gb ABW98942.1 	alpha S1 casein [Bos taurus]	36.3	0.41
gb ABW98941.1 	alpha S1 casein [Bos taurus]	36.3	0.41
gb ABW98940.1 	alpha S1 casein [Bos taurus]	36.3	0.41
gb ABW98939.1 	alpha S1 casein [Bos taurus]	36.3	0.41
gb ABW98938.1 	alpha S1 casein [Bos taurus]	36.3	0.41
gb ABW98937.1 	alpha S1 casein [Bos taurus]	36.3	0.41



Multiallergenscreening

Ei, Erdnuss, Haselnuss, Mandel, Milch, Soja, Walnuss
Peptid basiert, HPLC-QqQ-MS

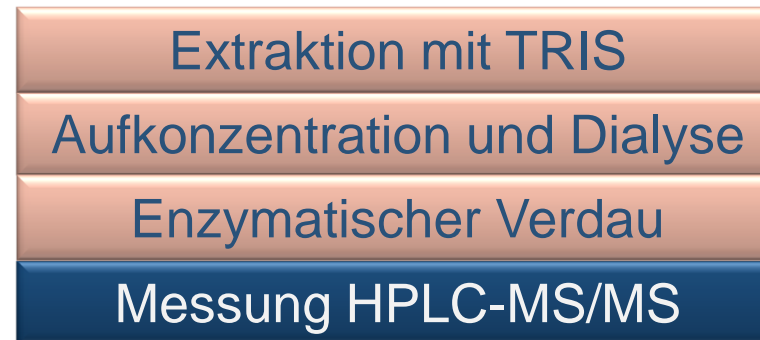
1. Welche Peptide entstehen reproduzierbar beim tryptischen Verdau von Casein?
2. Sind deren Aminosäuresequenzen eindeutig für Casein?
3. MRM Übergänge?



Finale Methode:

Nachweis von 7 Allergenen

- Ei, Erdnuss, Haselnuss, Mandel, Milch, Soja, Walnuss



Finale Methode:

Nachweis von 7 Allergenen

- Ei, Erdnuss, Haselnuss, Mandel, Milch, Soja, Walnuss

Messung HPLC-MS/MS

- HPLC:** Agilent 1200; Nucleodur Sphinx RP
Gradient: Wasser/ACN/Ameisensäure, 10 Minuten
- MS:** api5500, MRM Modus

VK, Linearität, Matrixeffekte

Allergenes Lebensmittel	Milch	Ei	Soja	Erdnuss	Haselnuss	Walnuss	Mandel
<i>VK [%]</i> (Standard/Dot. Extrakt)	8/3	14/6	5/3	7/1	17/4	6/17	5/3
<i>Korrelationskoeffizient</i> (Standard/Dot. Extrakt)	0.9983/ 0.9989	0.9966/ 0.9998	0.9999/ 0.9998	1.0000/ 0.9995	0.9994/ 1.0000	0.9995/ 0.9988	0.9993/ 0.9992
<i>Steigung [cps x mL/μg]</i> (Standard/Dot. Extrakt)	7890 ± 160/ 5100 ± 90	2900 ± 90/ 2270 ± 20	2580 ± 10/ 2050 ± 10	2910 ± 10/ 2550 ± 30	2830 ± 40/ 2300 ± 10	90 ± 1/ 100 ± 2	14920 ± 190/ 11590 ± 170
<i>Δ Steigung [%]</i>	35	22	21	12	19	-11	22
<i>LOD [μg/mL]</i> (Standard/Dot. Extrakt)	0.1/0.1	0.6/0.5	0.2/0.4	0.2/0.6	0.3/0.4	10/16	0.1/0.2

J AOAC Int. 2011, 94(4), 1060-1068

Bestimmung der Nachweisgrenzen mit prozessiertem Referenzmaterial



BROT

- Enthält alle 7 Allergene
- Prozessierung:
Backen bei 200 °C
- Dotierung:
allergene Pulver
in Mehl

Bestimmung der Nachweisgrenzen mit prozessiertem Referenzmaterial



LOD

- Milch, Erdnuss, Mandel
10 µg/g
- Ei, Soja, Haselnuss
50 µg/g
- Walnuss
100 µg/g

Vergleich mit ELISA

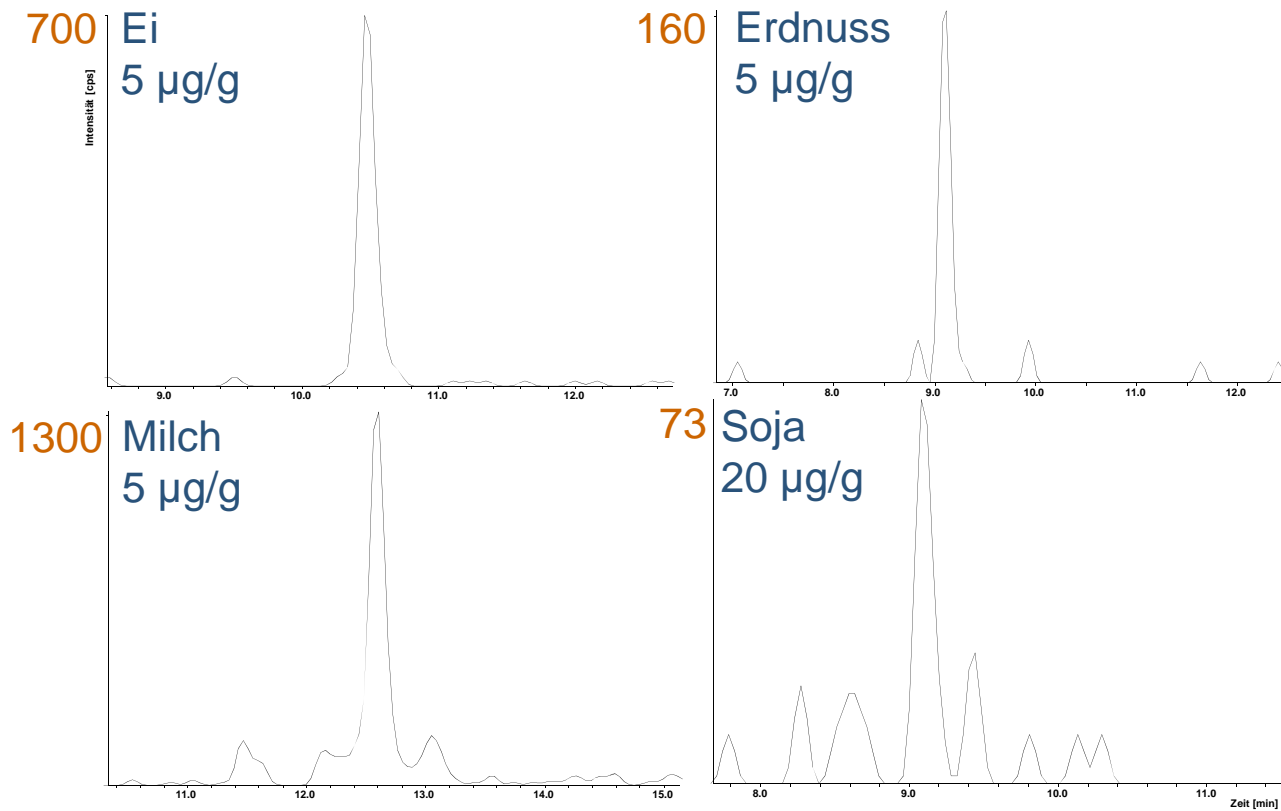


Ei

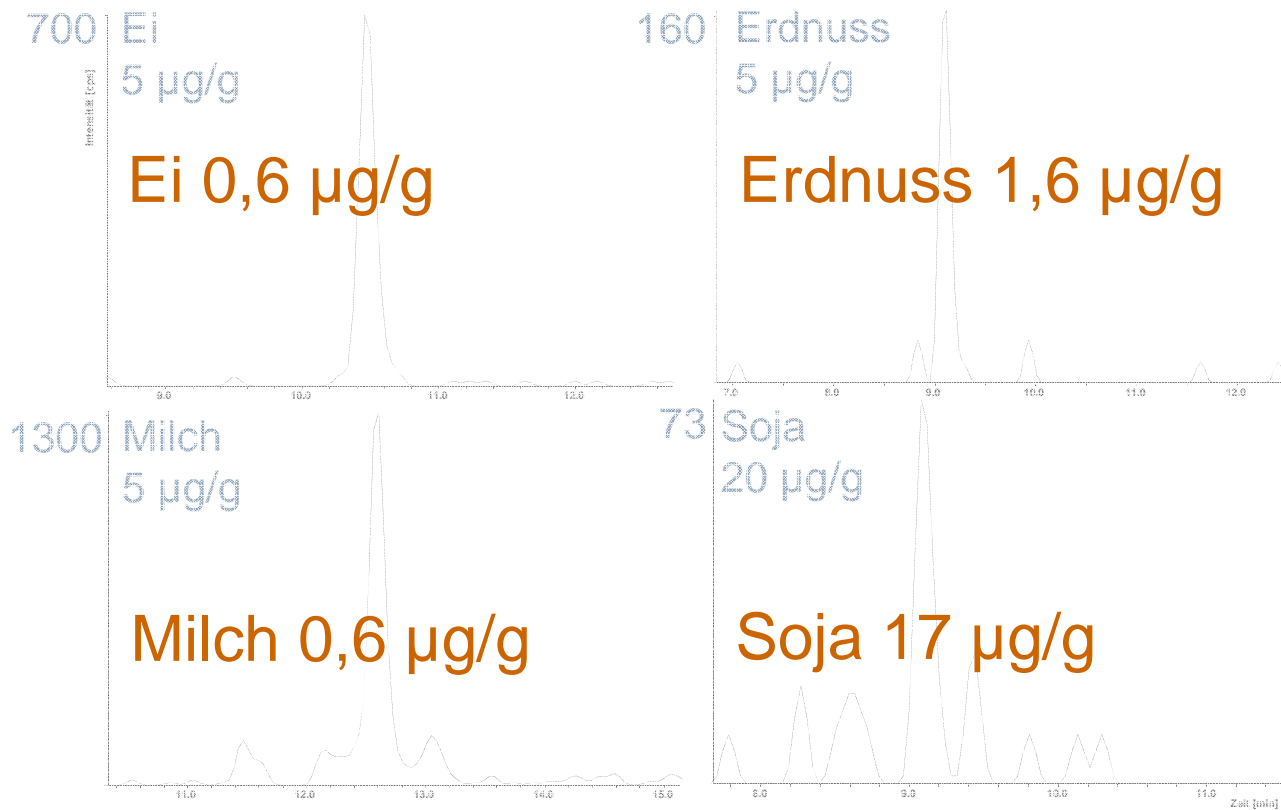
- Nachweis im Mehl (MS und ELISA)
- Brot: Nachweis MS; Nachweis durch ELISA nur mit einem von 4 Kits

J AOAC Int. **2011**, 94(4), 1060-1068

Nachweis in Gewürzmischungen



Nachweisgrenzen in Gewürzmischungen



Weitere Anwendung auf

- Spülwasser
- Tee
- Eis

Mit Modifizierung der Aufarbeitung

- Fleisch

Danke



Prof. Dr. Markus Fischer, Universität Hamburg
Dr. Bert Pöpping, Eurofins

