

# Den Allergenen auf der Spur

## LC-MS/MS als Routinemethode für den Allergennachweis

### Kennzeichnung von allergenen Lebensmitteln

Behandelt werden können bislang nur die Symptome der allergischen Reaktion, nicht jedoch die eigentliche Allergie. Nur durch Verzicht auf das entsprechende Lebensmittel kann demnach eine allergische Reaktion vermieden werden. Die europäische Kommission hat in ihren Richtlinien 2003/89/EC und 2006/142/EC sowie 2005/26/EC die Kennzeichnung von allergenen Lebensmitteln festgelegt. Sie müssen entweder als Zutat enthalten sein oder das Lebensmittel, das während seiner Herstellung mit dem allergenen Lebensmittel in Kontakt getreten ist, enthält dieses in seiner technologisch unvermeidbaren Restkonzentrationen als potenziell allergieauslösenden Inhaltsstoff. Um Allergiker zu schützen und eine mögliche Auswahl bei fertigen Produkten zu erleichtern, ist eine eindeutige Allergenkennzeichnung unumgänglich. Kreuzkontamination (Cross Contact) der Zutaten und verschiedener Produkte während der Herstellungsprozesse in einem Unternehmen wird durch die Kennzeichnungsvorschriften bisher nicht erfasst. Hier unterliegt die Kennzeichnung der Produktions- und Sorgfaltspflicht des Herstellers. Zu den zu kennzeichnenden Lebensmitteln gehören die folgenden Gruppen:

- glutenhaltiges Getreide (Weizen, Roggen, Gerste, Hafer, Dinkel, Kamut oder Hybridstämme davon) sowie daraus hergestellte Erzeugnisse
- Krebstiere und Krebstiererzeugnisse
- Eier und Eierzeugnisse
- Fisch und Fischerzeugnisse
- Erdnüsse und Erdnusserzeugnisse
- Soja und Sojaerzeugnisse
- Milch und Milcherzeugnisse (einschließlich Laktose)
- Schalenfrüchte (Mandel, Haselnuss, Walnuss, Kaschunuss, Pecannuss, Paranuss, Pistazie, Macadamianuss, Queenslandnuss) sowie daraus hergestellte Erzeugnisse
- Sellerie und Sellerieerzeugnisse
- Senf und Senferzeugnisse
- Sesamsamen und Sesamsamenerzeugnisse
- Schwefeldioxid und Sulfite von mehr als 10 mg/kg
- Lupine und Lupinenerzeugnisse

**Lebensmittelallergien sind immunologische Reaktionen auf bestimmte Proteine in Lebensmitteln. Betroffen sind bis zu 8 % der Säuglinge und Kleinkinder und bis zu 2 % der Erwachsenen. Die häufigsten Auslöser bei Säuglingen sind Milch und Ei, bei Erwachsenen finden sich zumeist Allergien gegen Erdnuss, Baumnüsse, Krustentiere und Fisch. Die Schwere der Reaktion und die klinischen Symptome hängen dabei sowohl von den Betroffenen als auch von dem jeweiligen Allergen ab. Vor allem Erdnuss, Baumnuss, Krustentiere und Fisch können schon in geringen Mengen schwere allergische Reaktionen, bis hin zum anaphylaktischen Schock, auslösen [1,2].**



- Weichtiere und Weichtiererzeugnisse  
Reaktionen auf Schwefeldioxid bzw. Laktose fallen nicht unter Lebensmittelallergien, sondern stellen eine pseudoallergische Reaktion oder eine enzymopathische Reaktion dar. Sie wurden jedoch von der europäischen Kommission in dieser Liste berücksichtigt.

Mit Ausnahme der Gruppe Schwefeldioxid und Sulfite gilt die Kennzeichnungspflicht unabhängig von ihrer Konzentration im Lebensmittel [3]. Eine ausführliche Risikobewertung hinsichtlich der Allergenbelastung ist demnach unabdingbar. Zu dieser gehört unter anderem die Verifizierung von Reinigungsprotokollen mittels analytischer Methoden. In Frage kommende analytische Verfahren müssen dazu mehrere Anforderungen erfüllen, beispielsweise hinsichtlich ihrer Sensitivität und ihrer Fähigkeit, das Allergen auch in prozessierten Lebensmitteln nachweisen zu können.

## Anforderungen an die Analyseverfahren

Um in der Risikokontrolle zum Schutz von allergischen Verbrauchern eingesetzt werden zu können, muss ein Analyseverfahren empfindlich genug sein, um die Konzentrationen zu detektieren, die bei einem sensitiven Allergiker ausreicht, eine Reaktion auszulösen. Die Deutsche Gesellschaft für Allergologie und Immunologie, Arbeitsgruppe Nahrungsmittelallergie (DGAI) hat in ihrer Stellungnahme geäußert, dass nachgewiesene 0.001 % des allergenen Lebensmittels bzw. 1 mg Protein pro Kilogramm des jeweiligen Lebensmittels ein Schwellenwert sein sollte. Aus diesen Zahlen ergeben sich die notwendigen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die chemisch analytischen Verfahren, die eingesetzt werden müssen, um den Allergengehalt in Lebensmitteln zu ermitteln.

Des Weiteren sollte das analytische Verfahren in der Lage sein, das Zielallergen spezifisch in verschiedenen Lebensmitteln sowie nach diversen technologischen Verarbeitungsschritten zu detektieren. Auch ein simultaner Nachweis mehrerer Allergene gleichzeitig wäre wünschenswert.

In der Routineanalytik von Lebensmittelallergenen werden zum jetzigen Zeitpunkt drei Verfahren eingesetzt: (i) Immunologische Antikörper-basierte ELISA (ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay), (ii) PCR-Verfahren (PCR: Polymerase Kettenreaktion), die auf der Amplifikation und dem Nachweis der DNA beruhen, sowie (iii) Verfahren basierend auf MS Technologien (MS: Massenspektrometrie). Während ELISA und PCR schon viele Jahre in der Routineanalytik für Lebensmittelallergene eingesetzt werden, ist der Einsatz der Massenspektrometrie in diesem Bereich noch relativ neu.

## ELISA

Der Nachweis eines Allergens mittels ELISA beruht dabei generell auf der Bindung eines spezifischen Antikörpers an ein Antigen, das ein Protein oder eine Proteinfraction eines allergenen Lebensmittels sein kann. Die Vorteile der ELISA-

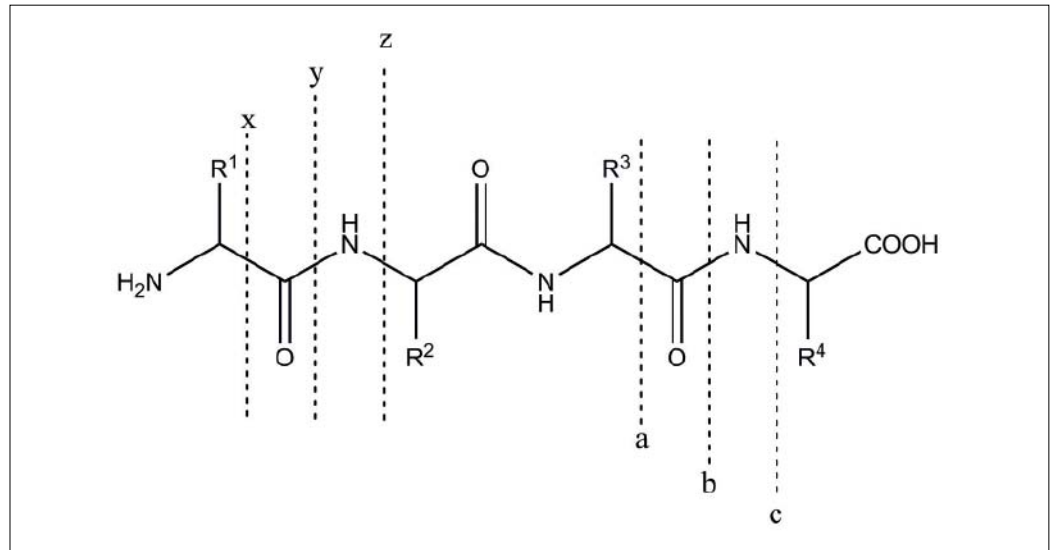


Abb. 1: Peptidfragmentierung im Massenspektrometer. x, y, z und a, b, c, Bruchstellen in einer Aminosäuresequenz; R, beliebige Aminosäureseitenketten.

Verfahren sind dabei zum einen ihre einfache Handhabung und zum anderen die gute Verfügbarkeit kommerzieller Kits. Es ergeben sich jedoch einige Einschränkungen und Schwierigkeiten bei der Anwendung: (i) Aufgrund von strukturellen Ähnlichkeiten nachzuweisender Allergene kann es zu Kreuzreaktivitäten kommen, was letztlich in falsch-positiven Ergebnissen resultiert. Um dies auszuschließen sind generell umfangreiche Validierungen mit geeigneten Referenzmaterialien erforderlich [4]. (ii) Die Antigen-Antikörper-Reaktion ist häufig von der dreidimensionalen Struktur des Allergens abhängig, die bei einer technologischen Verarbeitung des Lebensmittels verändert werden kann. Ist die Ausbildung eines Antikörper-Antigen-Komplexes nicht mehr möglich, führt dies möglicherweise zu falsch-negativen Ergebnissen [5]. (iii) Ein weiterer Nachteil des ELISA-Verfahrens ist die eigentlich erwünschte Spezifität der Antikörper-Antigen-Wechselwirkung. In nuce bedeutet dies, dass für jedes Allergen ein eigener Antikörper bereitgestellt und validiert werden muss. Kommerziell werden für einige Lebensmittel ELISA-Testkombinationen angeboten. Die Nachweise von Haselnuss, Mandel, Erdnuss, Soja, Weizen, Sesam, Ei, Milch und Krebstiere stehen dabei im Vordergrund. Die Testverfahren enthalten polyclonale oder monoclonale Antikörper auf einzelnen oder Kombinationen

aus Allergenen. Die angegebenen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (in der Regel zwischen 1 und 10 ppm) sind dabei für die jeweilige Lebensmittelmatrix genau zu betrachten.

## PCR

Nicht auf der Detektion des allergenen Proteins, sondern auf der Detektion der DNA des allergenen Lebensmittels beruht das zweite

wichtige Verfahren in der Allergenanalytik, die PCR. Die größten Vorteile der PCR sind ihre Selektivität und Sensitivität sowie die Möglichkeit, mehrere Allergene simultan zu detektieren. Nachteilig ist jedoch, dass der Nachweis der DNA keine direkte Korrelation auf die Menge des tatsächlich vorhandenen allergenen Proteins zulässt [6]. Kommerziell angeboten werden quantitative und nicht-quantitative PCR-Kits für diverse allergene Lebensmittel, wie Soja-, Lupine-, Sellerie-, Sesam-, Senf, Erdnuss-, Keschunuss-, Haselnuss-, Macadamianuss-, Mandel-, Paranuss-, Pecannuss-, Pistazie-, Walnuss-, Weizen-, Hafer-, Krebstier-, Fisch-, Weichtier-, Milch- und Ei-Tests. Die Milch- und Ei-Tests weisen letztendlich Kuh und Huhn nach und sind dementsprechend nicht spezifisch für Milch und Ei, sondern sprechen auf ein Gen für ein Muskelprotein dieser Tiere an. Die Einschränkungen der Verfahren sind bereits oben genannt. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen liegen im Bereich der ELISA-Verfahren, häufig darüber.

## LC-MS

Instrumentell von den ELISA- und den PCR-Methoden unterscheidet sich der Nachweis mittels MS. Letztere bietet den Vorteil, dass sie einen direkten Nachweis der allergenen Proteine ermöglicht und nicht die DNA detektiert, sie eine hohe Spezifität aufweist und dass sie den simultanen Nachweis mehrerer Allergene erlaubt. Eine kürzlich veröffentlichte Methode beruht beispielsweise auf der Extraktion der Allergene aus der Matrix und anschließender Aufreinigung der Extrakte mittels Ultrafiltration [7]. Nach tryptischer Spaltung der Proteine werden die resultierenden Peptide dabei mittels HPLC getrennt und massenspektrometrisch detektiert. Dieser Ansatz beruht auf bereits etablierten Methoden aus der Proteomforschung. Mit dieser Methode ist der simultane Nachweis von Ei, Erdnuss, Haselnuss, Mandel, Milch, Soja und Walnuss möglich [7].

Aufgrund der hohen Selektivität und Sensitivität erfolgt die Detektion im Triple-Quadrupol-Massenspektrometer im sogenannten MRM-Modus. MRM steht für „Multiple Reaction Monitoring“. Bei diesem Messprinzip wird die Tatsache ausgenutzt, dass Peptide im Massenspektrometer spezifisch an ihrem Aminosäurerückgrat gespalten werden können (Abbildung 1 zeigt diese Spaltungsstellen und ihre Nomenklatur in einer Aminosäurekette). Nur das ausgewählte Massenpaar Peptid/Fragment wird dabei beobachtet, was zu einer erhöhten Selektivität und Sensitivität führt. Während der Methodenentwicklung muss dazu für jedes Allergen mindestens ein spezifisches Peptid als Marker selektiert werden. Die Massenspektrometrie bietet grundsätzlich die Möglichkeit, mehrere Peptide pro Allergen zu beobachten. Dies erhöht die Sicherheit des Nachweises. In der beschriebenen Methode werden pro Aller-

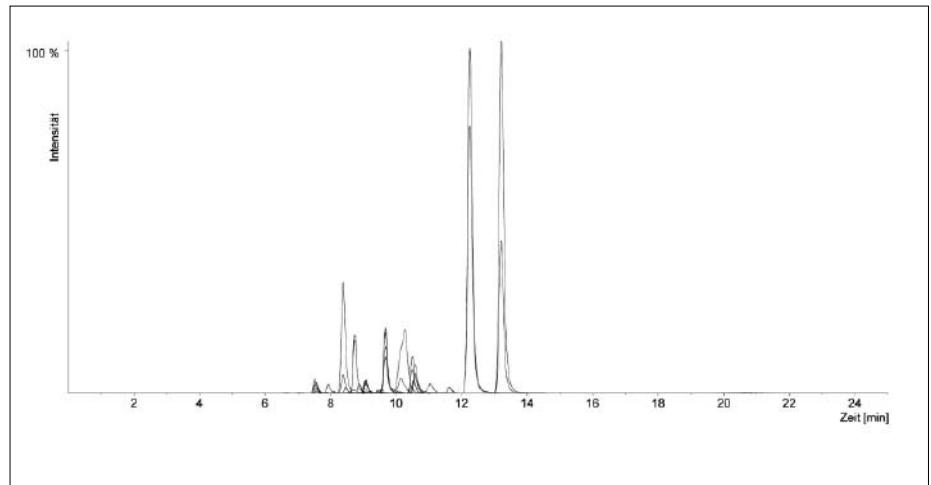


Abb. 2: Chromatogramm für einen Mischstandard aus Extrakten der sieben untersuchten allergenen Lebensmittel.

gen sogar vier Peptide detektiert. Abbildung 2 zeigt ein typisches Chromatogramm für einen Mischstandard aus Extrakten der sieben allergenen Lebensmittel.

Während der Produktion eines Lebensmittels können Verarbeitungsschritte, wie z. B. Erhitzen, dazu führen, dass die allergenen Proteine denaturieren und/oder Reaktionen mit Matrixkomponenten eingehen. Um die Anwendbarkeit der entwickelten MS Multimethode auch auf prozessierte Matrices zu demonstrieren, wurden als Modelllebensmittel allergen-freie und allergenhaltige Brote sowie die zum Backen verwendeten Mehle untersucht. Die verwendeten Mehle wurden vor dem Backen mit entfetteten Pulvern der allergenen Lebensmittel dotiert. Zusätzlich zur MS wurden sämtliche Proben auch mittels kommerziell erhältlichen ELISA-Kits analysiert. Zusammenfassend konnten mittels Massenspektrometrie sämtliche Allergene nachgewiesen werden, wohingegen drei von vier verwendeten ELISA-Tests, selbst bei einer Eikonzentration von 1.000 mg Ei/kg Brot, kein Ei in der prozessierten Matrix nachweisen konnten. Ein ähnliches Bild ergab sich bei der Detektion von Milch und Soja [8].

## Zusammenfassung

ELISA- und PCR-Verfahren sind für die Analytik von geringen Konzentrationen an Allergenen bzw. allergenem Lebensmittel im ppm-Bereich geeignet. Beide Methoden sind mit mehr oder weniger großen analytischen Schwierigkeiten in verarbeiteten komplexen Lebensmitteln verbunden.

Die MS-basierte Methode eignet sich grundsätzlich für die Routineanalytik von Allergenen auch aus prozessierten Lebensmitteln und bietet gleichzeitig den Vorteil, sieben Allergene „auf einen Streich“ zu detektieren. Im Verlauf der letzten Monate wurde diese Methode nicht nur auf Brot, sondern auch auf Kekse, Gewürze, Spülwässer und Eiscreme erfolgreich angewandt.

Grundsätzlich sind aufgrund der besonderen Problematik von Lebensmittelproben, Referenzmaterialien und die Durchführungen von umfassenden Validierungen und Ringversuchen erforderlich.

## Literatur

- [1] Bannon G. A.: *Curr. Allergy Asthma Report* 4, 43–46 (2004)
- [2] Sicherer S. H.: *Symposium: Pediatric food allergy Pediatrics* 111, 1591–1595 (2003)
- [3] Pöpping B. *et al.*: *Molecular biological and immunological techniques and applications for food chemists*, 1. Auflage, Wiley, Hoboken, 2010 267–292
- [4] Abbott M. *et al.*: *J. AOAC Int.* 93, 442–450 (2010)
- [5] Diaz-Amigo C.: *Food Anal. Methods* 3, 351–356 (2009)
- [6] Poms R. E. *et al.*: *Food Add. Contam.* 21, 1–31 (2004)
- [7] Heick J. *et al.*: *J. Chromatogr. A* 1218, 938–394 (2011)
- [8] Heick J. *et al.*: *J AOAC Int.* 94, 1060–1068 (2011)

## ► KONTAKT

**Prof. Dr. Markus Fischer**  
Universität Hamburg  
Hamburg School of Food Science  
Institute of Food Chemistry  
markus.fischer@chemie.uni-hamburg.de,  
www.hsfs.org

**Dr. Bert Pöpping**  
Eurofins CTC  
Am Neuländer Gewerbepark 1  
Hamburg  
www.eurofins.de/conferences

**Julia Heick**  
Eurofins Analytik GmbH  
Hamburg