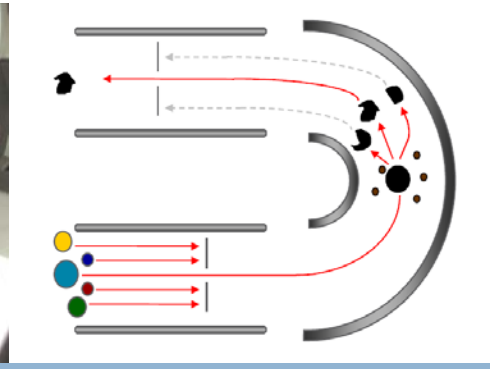
MRI
Max Rubner-Institut



HPLC-MS/MS-Methode zur simultanen Detektion von Lupine, Erbse und Soja in Fleischerzeugnissen

B. Hoffmann [a], S. Münch [a], F. Schwägele [a], C. Neusüß [b], W. Jira [a]

[a] Max Rubner-Institut (MRI), Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel
Institut für Sicherheit und Qualität bei Fleisch, Kulmbach

[b] Hochschule Aalen, Fakultät Chemie, Aalen

Mögliches Vorkommen von Leguminosen in Fleischerzeugnissen

- Hohe Proteingehalte
  Lupine (*Lupinus* spp.): 36-48 % in Trockenmasse
  Erbse (*Pisum sativum*): 26 % in Trockenmasse
  Soja (*Glycine maxima*): 41 % in Trockenmasse

- Beabsichtigte deklarierte und undeklarierte Zugabe („Meat adulteration“) als kostengünstige Fremdeiweiße (insbesondere bei Brühwürsten)

- Unbeabsichtigte Zugabe
  Kreuzkontamination (gemeinsame Produktionslinien)
  Kontaminationen von Gewürzmischungen oder anderen Zusatzstoffen

Lupine und Soja als Allergene

- Bereits geringe Mengen an Lupinen- und Sojaprotein im ppm-Bereich können für Allergiker gesundheitlich bedenklich sein (Erbsenprotein als Allergen weniger relevant)

- Referenzdosen des VITAL *(Voluntary Incidental Trace Allergen Labeling)* Expert Panel *(Taylor et al., Food and Chemical Toxicology, 63, 9-17 (2014))*:

  Lupine: 4 mg Protein
  Soja: 1 mg Protein

- Hohe Anforderung an das zu erarbeitende Nachweisverfahren: Nachweisgrenzen im unteren ppm-Bereich (mg Pflanzenprotein / kg Fleischerzeugnis)

Publikationen zum HPLC-MS/MS-Nachweis von Leguminosen in Lebensmitteln

- deutlicher Schwerpunkt auf Lebensmitteln mit geringem Proteingehalt (z.B. Brot, Nudeln)

- **Nachweisgrenzen:**

Soja: 24 mg/kg in Brot *(Heick et al., 2011)*
2 mg/kg in Keksen *(Monaci et al., 2014)*

Lupine: 1 mg/kg in Nudeln und Biscuit *(Mattarozzi et al., 2012)*

Erbse: bislang keine Untersuchungen

Herstellung von Brühwürsten mit Lupine, Erbse und Soja

Charge	Schweine-fleisch [%]	Lupinenmehl (Protein) [mg/kg]	Erbenproteinisolat (Protein) [mg/kg]	Sojaproteinisolat (Protein) [mg/kg]
0	49,1	0 (0)	0 (0)	0 (0)
1	49,1	1,28 (0,42)	1,28 (0,97)	1,28 (0,83)
2	49,1	6,4 (2,1)	6,4 (4,8)	6,4 (4,1)
3	49,1	32 (11)	32 (24)	32 (21)
4	49,1	160 (53)	160 (121)	160 (104)
5	48,9	800 (264)	800 (605)	800 (518)
6	47,9	4000 (1320)	4000 (3024)	4000 (2592)

Experimentelle Vorgehensweise bei der Auswahl der Markerpeptide und anschließende Optimierung in Fleischerzeugnissen

1. Schritt

Pflanzenmaterial
↓
Entfettung
↓
Proteinextraktion
↓
Trypsinverdau
↓
HPLC-MS/MS
maXis UHR-QToF
↓
Auswahl der Markerpeptide
1. MASCOT
2. BLAST
3. Peptideigenschaften

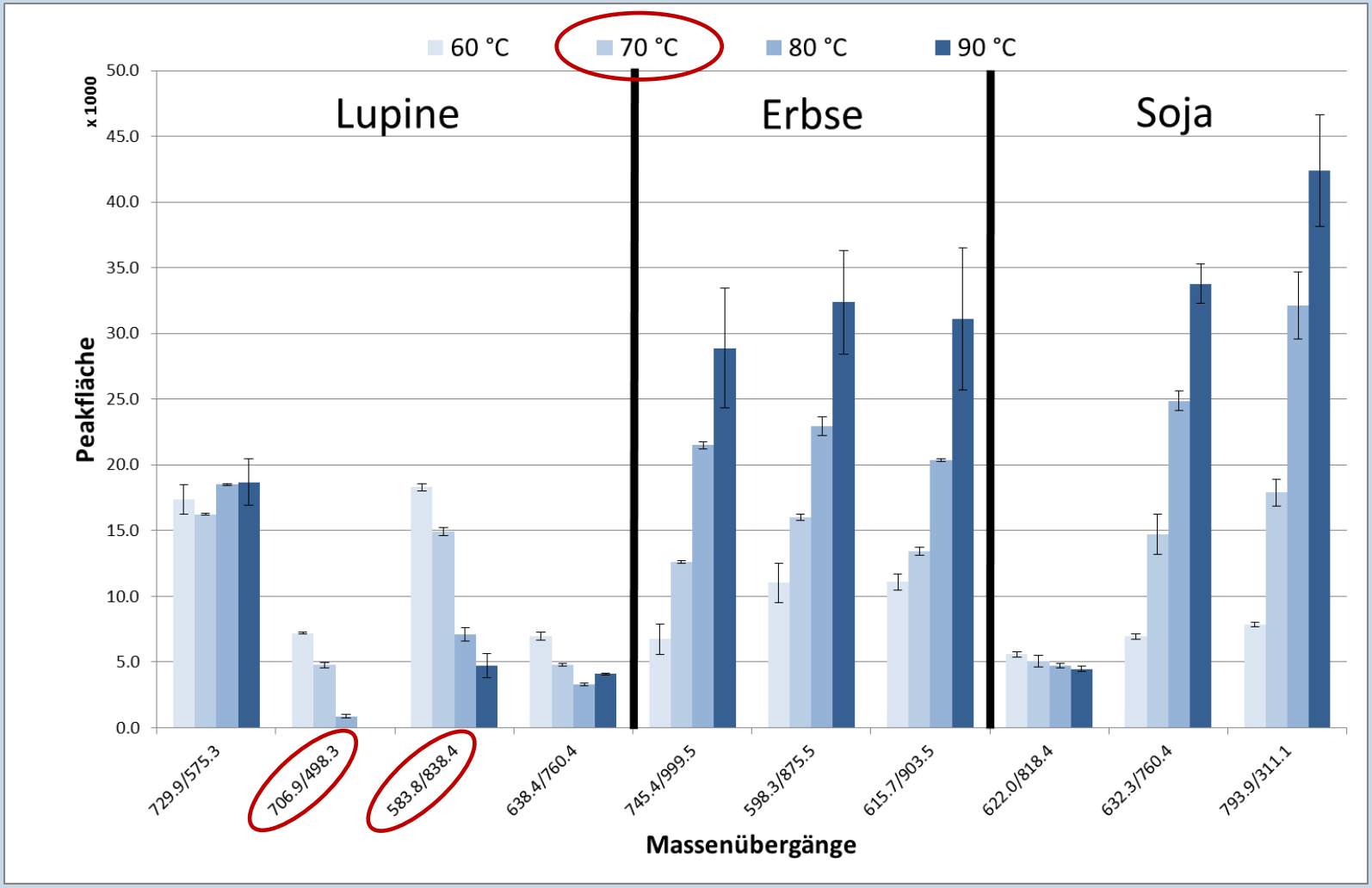
2. Schritt

Fleischerzeugnisse mit Pflanzenmaterial
↓
Entfettung
↓
Proteinextraktion ← *Optimierung: - Temperatur - Zeit*
↓
Trypsinverdau ← *Optimierung: - +/- DTT/IA - Zeit*
↓
SPE
↓
HPLC-MS/MS
QTrap 5500

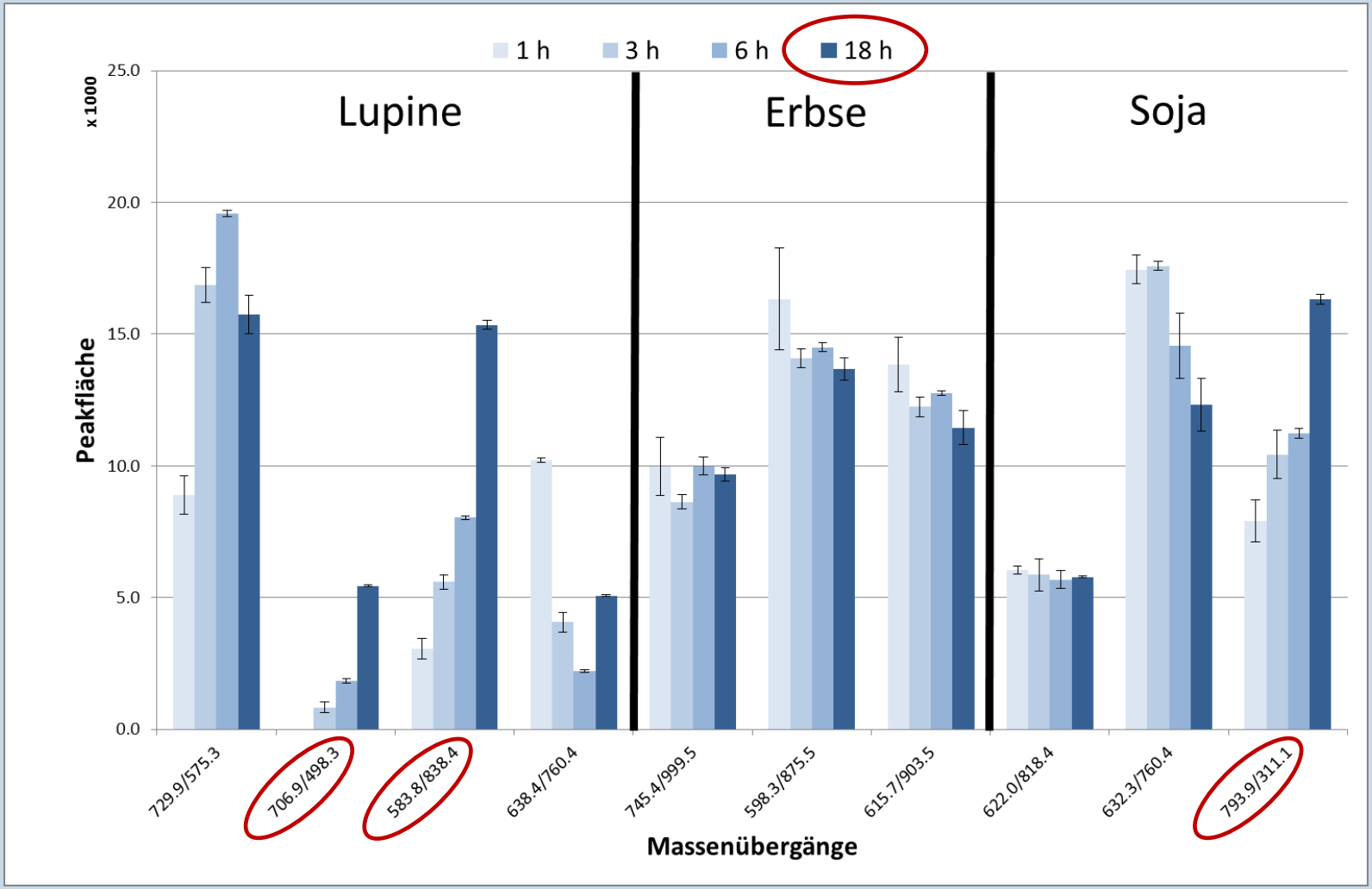
Ausgewählte Markerpeptide und zugehörige Targetproteine

Markerpeptid	Targetprotein	Spezies	Accession (NCBI)	Literatur
QQEQQLEGELEK	Conglutin delta	*L. angustifolius*	P09931	
ISSVNSLTLPILR	Conglutin alpha	*L. angustifolius*	AEB33710	
NTLEATFNTR	Conglutin beta Vicilin-like protein	*L. angustifolius* *L. albus*	ABR21772 CAI84850	Wait et al., 2005
TLTSLDFPILR	Conglutin alpha	*L. angustifolius*	AAC49787	
ELTFPGSVQEINR	Convicilin	*Pisum sativum*	CAB82855	
LSSGDVFVIPAGHPVAVK	Vicilin	*Pisum sativum*	P13918	
LTPGDVFVIPAGHPVAVR	Provicilin	*Pisum sativum*	P02855	
HFLAQSFNTNEDIAEK	Glycinin G4	*Glycine maxima*	CAB57802	Leitner et al., 2006
EAFGVNMQIVR	Glycinin G2	*Glycine maxima*	KHN10743	Heick et al., 2011
FYLAGNQEQEFLK	Glycinin G1/G2	*Glycine maxima*	KHN10744/KHN10743	

Optimierung der Temperatur der Proteinextraktion



Optimierung der Verdauzeit



Optimierte HPLC-MS/MS-Methode

Entfettung (PLE)
Aceton; 2 Zyklen (30°C, 50 bar)

↓

Proteinextraktion und Trypsinverdau
0,5 mL TRIS-HCl (1 M, pH 8,2) zu 50 mg entfettetem Material (2 h bei 70 °C); 2 µg Trypsin zu 100 µL Extrakt; 18 h bei 37 °C

↓

Festphasenextraktion
Strata-X; Elution mit 0,5 mL 80% ACN

↓

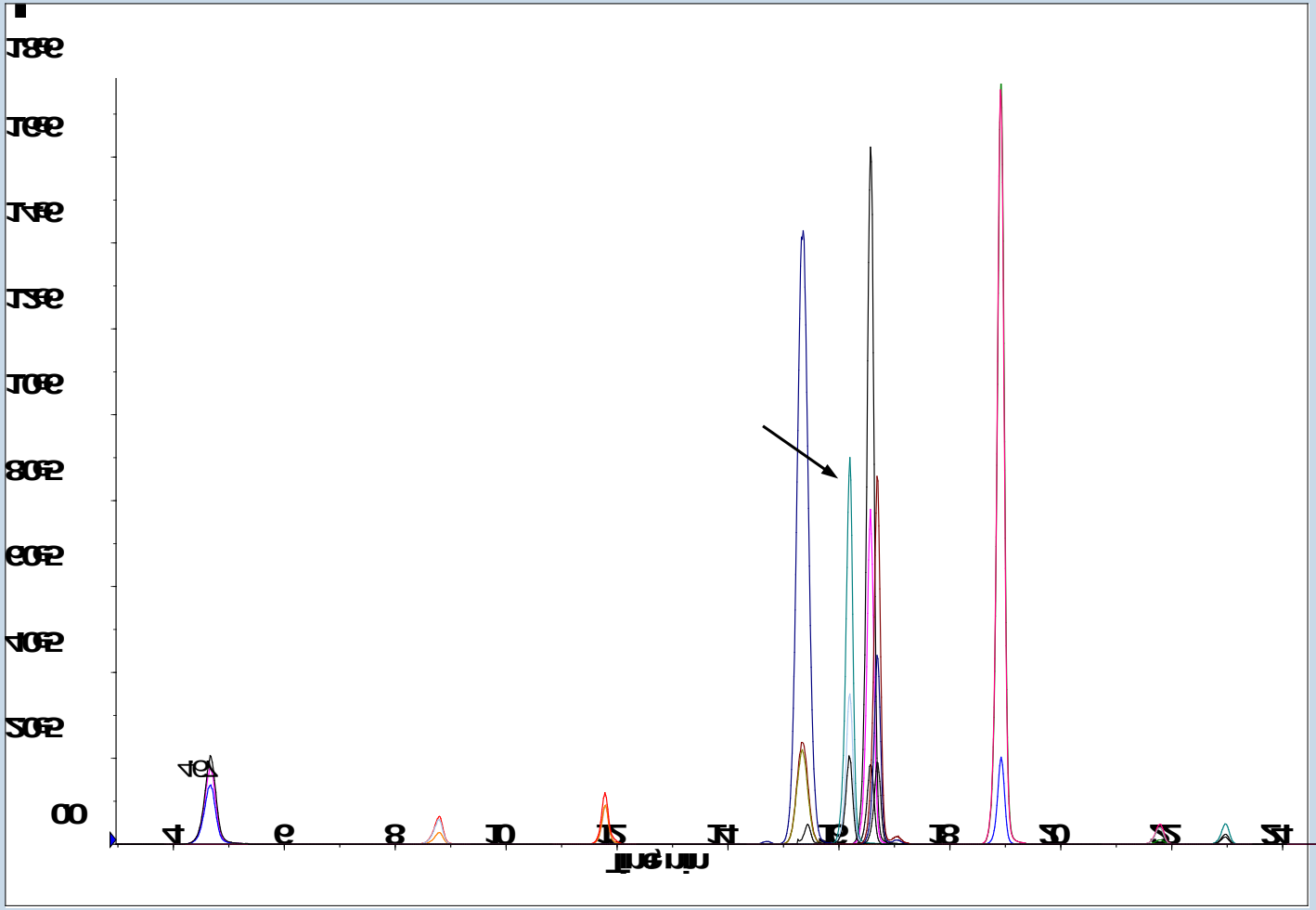
HPLC-MS/MS (QTrap 5500)
RP18-Säule; ACN/Wasser-Gradient; Flussrate 0,25 mL/min
Quelle: 430 °C; Ionensprayspannung: 5.5 kV; MRM-Modus

Optimierte HPLC-MS/MS-Methode

Parameter der MRM-Bedingungen

Markerpeptid (Targetprotein)	RT [min]	m/z (Ladung)	Fragmentionen	CE [V]
QQEQQLEGELEK (Lupine)	4.3	729.9 (+2)	575.3 (y5), 704.3 (y6), 817.4 (y7)	37/34/34
ISSVNSLTLPILR (Lupine)	22.2	706.9 (+2)	498.3 (y4), 712.5 (y6), 1026.6 (y9)	30/33/34
NTLEATFNTR (Lupine)	8.4	583.8 (+2)	838.4 (y7), 709.4 (y6), 951.6 (y8)	29/30/24
TLTSLDFPILR (Lupine)	23.4	638.4 (+2)	760.4 (y6), 1061.6 (y9), 960.6 (y8)	28/28/29
ELTFPGSVQEINR (Erbse)	15.6	745.4 (+2)	999.5 (y9), 500.3 ($y9^{2+}$), 573.8 ($y10^{2+}$)	35/35/35
LSSGDVFVIPAGHPVAVK (Erbse)	16.9	598.3 (+3)	875.5 (y9), 513.3 (y5), 988.6 (y10)	27/36/26
LTPGDVFVIPAGHPVAVR (Erbse)	19.4	615.7 (+3)	903.5 (y9), 541.3 (y5), 1016.6 (y10)	30/36/30
HFLAQSFNTNEDIAEK (Soja)	11.8	622.0 (+3)	818.4 (y7), 919.4 (y8), 1033.5 (y9)	27/27/24
EAFGVNMQIVR (Soja)	16.4	632.3 (+2)	760.4 (y6), 916.5 (y8), 859.9 (y7)	30/34/30
FYLAGNQEQEFLK (Soja)	16.9	793.9 (+2)	283.1 (a2), 424.2 (b3), 638.7 ($y11^{2+}$)	45/37/34

Chromatogramm der Markerpeptide in Fleischerzeugnissen (Zugabe von jeweils 2% Mehl bzw. Proteinisolat)



Ermittelte Nachweisgrenzen für Lupine, Erbse und Soja

Charge	Schweine-fleisch [%]	Lupinenmehl (Protein) [mg/kg]	Erbenproteinisolat (Protein) [mg/kg]	Sojaproteinisolat (Protein) [mg/kg]
0 --	49,1	0 (0)	0 (0)	0 (0)
1 --	49,1	1,28 (0,42)	1,28 (0,97)	1,28 (0,83)
2 ✓	49,1	6,4 (2,1)	6,4 (4,8)	6,4 (4,1)
3 ✓	49,1	32 (11)	32 (24)	32 (21)
4 ✓	49,1	160 (53)	160 (121)	160 (104)
5 ✓	48,9	800 (264)	800 (605)	800 (518)
6 ✓	47,9	4000 (1320)	4000 (3024)	4000 (2592)

⇨ Nachweisgrenzen vergleichbar mit PCR- und ELISA-Methoden

Vergleich der Nachweisgrenzen mit den Referenzdosen des VITAL Expert Panel *(Taylor et al., 2014)*

- Referenzdosen:
  Lupine: 4 mg Protein
  Soja: 1 mg Protein

- Nachweisgrenzen der HPLC-MS/MS-Methode:
  Lupine: 2 mg Protein/kg Fleischerzeugnis
  Soja: 4 mg Protein/kg Fleischerzeugnis

- Verzehr von 100 g Fleischerzeugnis:
  Lupine: 0,2 mg Protein/100 g Fleischerzeugnis
  Soja: 0,4 mg Protein/100 g Fleischerzeugnis

- Nachweisgrenzen liegen bei einer Portionsgröße von 100 g klar unter den Referenzdosen

Schlussfolgerungen I

- Anhand von charakteristischen Markerpeptiden (8 bis 18 Aminosäuren) ist ein simultaner Nachweis von Lupine, Erbse und Soja in Fleischerzeugnissen sicher möglich (LODs: Lupine: 2 mg Protein/kg, Erbse: 5 mg Protein/kg; Soja: 4 mg Protein/kg)

- Alle Markerpeptide stammen aus Speicherproteinen, die aufgrund ihres Vorkommens in großen Mengen und ihrer Spezifität als Targetproteine gut geeignet sind

- Die Verwendung von mindestens drei Markerpeptiden mit jeweils drei Massenübergängen pro Leguminose ermöglicht einen zuverlässigen Nachweis in Fleischerzeugnissen

Schlussfolgerungen II

- Anhand der vier Lupinen-Markerpeptide ist jedoch nur ein zuverlässiger Nachweis von blauer Lupine möglich. Nur ein Peptid ermöglicht die Detektion von weißer Lupine

- Methode besitzt großes Potenzial zur Aufnahme weiterer möglicher Fremdeiweiße

- Eine Weiterentwicklung der Methode zu einer Multi-Allergen-Screeningmethode in Fleischerzeugnissen ist denkbar

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!

Food Control 71 (2017) 200–209

Contents lists available at ScienceDirect

Food Control

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodcont

A sensitive HPLC-MS/MS screening method for the simultaneous detection of lupine, pea, and soy proteins in meat products

Björn Hoffmann [a], Siegfried Münch [a], Fredi Schwägele [a], Christian Neusüß [b], Wolfgang Jira [a, *]

[a] Max Rubner-Institut (MRI), Federal Research Institute of Nutrition and Food, Department of Safety and Quality of Meat, 95326 Kulmbach, Germany
[b] Aalen University, 73430 Aalen, Germany