

DIN EN 17644

ICS 67.050

Einsprüche bis 2021-04-05

Entwurf

**Lebensmittel –
Nachweis von Lebensmittelallergenen mit
flüssigkeitschromatographisch-massenspektrometrischen (LC-MS)
Verfahren –
Allgemeine Betrachtungen;
Deutsche und Englische Fassung prEN 17644:2021**

Foodstuffs –

Detection of food allergens by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) methods –
General considerations;
German and English version prEN 17644:2021

Produits alimentaires –

Méthodes d'analyse de chromatographie en phase liquide et spectrométrie de masse pour la
détection des allergènes alimentaires –
Considérations générales;
Version allemande et anglaise prEN 17644:2021

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2021-02-05 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und
Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs
besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an nal@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL), 10772 Berlin oder Saatwinkler Damm 42/43, 13627 Berlin.

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten
Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 44 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17644:2021) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik - Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-01-05 AA „Lebensmittelallergene“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

<i>Titel de:</i>	Lebensmittel — Nachweis von Lebensmittelallergenen mit flüssigkeitschromatographisch-massenspektrometrischen (LC-MS) Verfahren — Allgemeine Betrachtungen
<i>Titel en:</i>	Foodstuffs — Detection of food allergens by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) methods — General considerations
<i>Titel fr:</i>	Produits alimentaires — Méthodes d'analyse de chromatographie en phase liquide et spectrométrie de masse pour la détection des allergènes alimentaires — Considérations générales

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort.....	3
Einleitung	4
1 Anwendungsbereich.....	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Allgemeine Anforderungen an Laboratorien	8
4.1 Kurzbeschreibung.....	8
4.2 Gerät und Ausrüstung.....	8
4.3 Material und Reagenzien	9
5 Verfahrensentwicklung.....	9
5.1 Allgemeines.....	9
5.2 Vorbereitung der Probe	10
5.2.1 Mahlen	10
5.2.2 Extraktion/Reinigung.....	10
5.2.3 Enzymatische Verdauung	10
5.3 Nachweis	11
5.3.1 Allgemeines.....	11
5.3.2 Auswahl der Zielproteine/-peptide	11
5.3.3 Auswahl der gemessenen MRM-Übergänge.....	12
5.3.4 Interner Standard (IS)	13
6 Validierung des Verfahrens	13
6.1 Allgemeines.....	13
6.2 Parameter für die Verfahrensvalidierung	14
6.2.1 Messgröße	14
6.2.2 Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze	14
6.2.3 Nachweisgrenze (LOD)	14
6.2.4 Bestimmungsgrenze (LOQ)	14
6.3 Selektivität	14
6.4 Kalibrierkurven.....	15
6.5 Richtigkeit	15
6.6 Präzision	15
6.7 Messunsicherheit	16
6.8 Robustheit	16
6.9 Gebrauchstauglichkeit/Anwendbarkeit.....	16
7 Routinemäßige Analyse von allergenen Lebensmittelinhaltsstoffen	16
7.1 Allgemeines.....	16
7.2 Validierung eines Analysedurchlaufs.....	17
7.3 Untersuchungsbericht.....	18
Literaturhinweise	20

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17644:2021) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik - Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Einleitung

Spezifische Peptide oder Peptidgruppen, die aus spezifischen Proteinen gewonnen werden, können als Marker für das Vorliegen von Lebensmitteln oder Lebensmittelinhaltsstoffen, die allergische Reaktionen hervorrufen, dienen. Dieses Dokument beschreibt ein Verfahren zur Entwicklung von qualitativen und/oder quantitativen, auf der Massenspektrometrie basierenden Verfahren für die Bestimmung von aus Proteinen gewonnenen Peptiden als Marker für mögliche allergene Lebensmittelinhaltsstoffe oder -bestandteile, bei dem das Protein/die Proteine, das/die aus einer Probe extrahiert wird/werden, analysiert wird/werden. Geeignete Verfahren für die Extraktion der Zielproteine sind wesentlicher Bestandteil jedes dieser Verfahren. Dieses Dokument führt allgemeine Gesichtspunkte für die Anwendung von auf der Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie basierenden Verfahren zur qualitativen oder quantitativen gezielten Analyse von spezifischen Peptiden (aus spezifischen Proteinen gewonnen) an, die für ein Lebensmittelallergen repräsentativ sind. Das Dokument enthält Empfehlungen für die Validierung der Verfahren sowie für die Umrechnung der Analyseergebnisse in Einheiten von Milligramm Proteine je Kilogramm Lebensmittel.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument erstellt einen Gesamtrahmen für die qualitativen und quantitativen Verfahren zur Bestimmung von Lebensmittelallergenen und allergenen Inhaltsstoffen unter Anwendung von auf der Massenspektrometrie basierenden Verfahren für die Bestimmung spezifischer Peptide/Proteine. Dieses Dokument bietet allgemeine Leitlinien und Leistungskriterien, die auf diese Verfahren anwendbar sind. Die in diesem Dokument angeführten Leitlinien, Mindestanforderungen und Leistungskriterien sind dafür vorgesehen, sicherzustellen, dass von verschiedenen Analytikern, Geräten und Laboratorien vergleichbare und reproduzierbare Ergebnisse erhalten werden.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

EN 15842, *Lebensmittel — Nachweis von Lebensmittelallergenen — Allgemeine Betrachtungen und Validierung von Verfahren*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach EN 15842 und die folgenden Begriffe.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

— IEC Electropedia: verfügbar unter <http://www.electropedia.org/>

— ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <https://www.iso.org/obp>

3.1

Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie

HPLC-MS, en: high-performance liquid chromatography–mass spectrometry

Verfahren der analytischen Chemie, bei dem die Möglichkeiten der Trennung der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie mit den Nachweismöglichkeiten der Massenspektrometrie (MS) kombiniert werden

Anmerkung 1 zum Begriff: Die englische Abkürzung LC-MS wird ebenfalls benutzt.

3.2

Tandem-Massenspektrometrie

MS/MS

MS²

sequentielle Kombination von zwei Massenanalysen

Anmerkung 1 zum Begriff: Es gibt unterschiedliche Gerätetypen eines Massenspektrometers, die verschiedene Grundsätze des Massennachweises kombinieren, z. B. Quadrupol-, Laufzeit-, Ionenfalle-, Fouriertransformation-Massenspektrometer.

3.3

mehrstufige Massenspektrometrie

MSⁿ

sequentielle Kombination von mehr als zwei Massenanalysen

3.4
gezielte Massenspektrometrie
Anwendung der Massenspektrometrie, bei der nur spezifische Ionen (m/z) zu bestimmten Zeiten (RT) analysiert werden

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Ziele sind in einer Auswahlliste festgelegt.

Anmerkung 2 zum Begriff: Das Gegenteil ist die ungezielte Massenspektrometrie, bei der jedes vorhandene Ion gemessen wird.

Anmerkung 3 zum Begriff: Im Allgemeinen erhöht sich bei der gezielten Massenspektrometrie die Empfindlichkeit des Verfahrens.

3.5
Peptid
aus zwei oder mehreren Aminosäuren bestehendes Amid

Anmerkung 1 zum Begriff: Peptide werden durch Amidbindung der Aminogruppe einer Aminosäure (AS) mit der Carboxylgruppe einer anderen AS gebildet.

Anmerkung 2 zum Begriff: In der Regel werden Peptide durch die enzymatische Hydrolyse von Proteinen während der Probenvorbereitung für auf der Massenspektrometrie basierende Verfahren erhalten.

3.6
Markerpeptid
für ein bestimmtes Protein spezifisches/einzigartiges und als Analyt in auf der Massenspektrometrie basierenden Verfahren verwendetes Peptid

Anmerkung 1 zum Begriff: Teil eines Proteins, der für dessen Identifizierung, Rückgewinnung und Reinigung verwendet wird.

[QUELLE: ISO 20418-1]

3.7
Analyt
Substanz oder chemischer Bestandteil, die/der einer Messung unterworfen wird

[QUELLE: CEN/TS 15968:2010, 3.1]

3.8
Messgröße
Größe, die gemessen werden soll

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Spezifikation einer Messgröße erfordert Kenntnis der Größenart, Beschreibung des Zustands des Phänomens, des Körpers oder der Substanz als Träger der Größe einschließlich aller relevanten Komponenten und beteiligten chemischen Betrachtungseinheiten.

Anmerkung 2 zum Begriff: In der zweiten Ausgabe des VIM und in IEC 60050-300:2001 wird die Messgröße als die „spezielle Größe, die Gegenstand der Messung ist“ definiert.

Anmerkung 3 zum Begriff: Die Messung, einschließlich des Messsystems und der Bedingungen, unter denen die Messung erfolgt, können das Phänomen, den Körper oder die Substanz derart verändern, dass die zu messende Größe möglicherweise von der Messgröße nach der Definition abweicht. In diesem Fall ist eine adäquate Korrektur notwendig.

[QUELLE: ISO/IEC Guide 99:2007, 2.3, modifiziert – Beispiele und Anmerkung 4 zum Begriff entfernt]

3.9

entstandene Proben, en: incurred samples

durch Zugabe einer bestimmten Menge einer allergenen Zutat zu einer relevanten Matrix hergestelltes Material, bevor es durch Lebensmittelherstellungstechniken verarbeitet wird

3.10

Masse-zu-Ladung-Verhältnis

m/z

dimensionslose Größe, die aus der Division des Verhältnisses der Masse (m) eines Ions zur einheitlichen atomaren Masseneinheit durch seine Ladungszahl (z) gebildet wird

[QUELLE: IUPAC Recommendations 2013: Definitions of terms relating to mass spectrometry, Pure Appl. Chem., Vol. 85, No. 7, S. 1515–1609]

3.11

Retentionszeit

RT, en: retention time

Zeit, die ein Analyt benötigt, um von Injektion bis Nachweis eine Chromatographiesäule zu durchlaufen

3.12

selektives Reaktionsmonitoring

SRM, en: selected reaction monitoring

Bestimmung eines Zielanalyts durch Messung des Übergangs von Vorläufer-Ion zu Produkt-Ion in MS/MS-Fragmentierung

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Massenfiter im Massenspektrometer werden auf die Ionmassen des Vorläufer-Ions bzw. des Produkt-Ions eingestellt („Massenfenster“), wodurch die Selektivität und die Empfindlichkeit der Messung erhöht werden.

Anmerkung 2 zum Begriff: Beim SRM wird ausschließlich ein einziges festgelegtes Massenfenster überwacht.

Anmerkung 3 zum Begriff: SRM wird im Englischen auch als „single reaction monitoring“ bezeichnet.

Anmerkung 4 zum Begriff: Eine andere Bezeichnung für Vorläufer-Ion ist Elterion.

Anmerkung 5 zum Begriff: Eine andere Bezeichnung für Produkt-Ion ist Fragmention.

3.13

multiples Reaktionsmonitoring

MRM, en: multiple reaction monitoring

Anwendung des SRM auf mehrere Produkt-Ionen von einem oder mehreren Vorläufer-Ionen

Anmerkung 1 zum Begriff: Das MRM scannt schnell über mehrere (schmale) Massenfenster und erfasst auf diese Weise Spuren von mehreren Produkt-/Fragment-Ionenmassen parallel.

3.14

Basic Local Alignment Search Tool

BLAST¹

bioinformatischer Algorithmus für den Vergleich von primären Sequenzinformationen wie Aminosäuresequenzen von Peptiden oder/und Proteinen oder Nukleotidsequenzen von DNS- und/oder RNS-Molekülen

¹ National Center for Biotechnology Information (NCBI), U.S. National Library of Medicine, Bethesda MD, USA

3.15

interner Standard

IS

ISTD

Substanz, die der zu bestimmenden Substanz im chemischen Verhalten (Struktur – Polarität) und analytischen Resonanz ähnlich ist

Anmerkung 1 zum Begriff: In auf der Massenspektrometrie basierenden Verfahren werden stabilisotopen-markierte interne Standards bevorzugt; diese Verfahren werden dann als absolute Quantifizierung (AQUA-Methoden) bezeichnet.

[QUELLE: IEC 62697-1:2012, 3.12]

3.16

Standardaddition

Verfahren, in dem eine bekannte Menge eines Analyts zur Untersuchungsprobe hinzugefügt wird

Anmerkung 1 zum Begriff: Zur Durchführung des Standardadditionsverfahrens wird die Untersuchungsprobe in zwei (oder mehr) Prüfmengen unterteilt. Eine Prüfmenge wird als solche analysiert, während zur anderen Prüfmenge vor der Analyse bekannte Mengen eines Analyts hinzugefügt werden.

3.17

Umrechnungsfaktor

Faktor zur Umrechnung von Messergebnissen in eine Berichtseinheit

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Messergebnisse werden z. B. in Milligramm Proteine je Kilogramm Lebensmittel umgerechnet.

4 Allgemeine Anforderungen an Laboratorien

4.1 Kurzbeschreibung

Die Proben für Proteine werden mittels eines hochergiebigen, reproduzierbaren und matrixspezifischen Verfahrens, einschließlich enzymatischer Verdauung zur Erzeugung von Peptiden, extrahiert. Darin enthalten darf ein Verfahrensschritt zur Reduktion und Alkylierung sein. Spezifische Markerpeptide werden durch HPLC-MS/MS unter Verwendung des gezielten MRM für eine qualitative oder quantitative Analyse gemessen. Das Signal (gewöhnlich die Peakfläche) eines bei einer bestimmten chromatographischen Retentionszeit gemessenen Markerpeptids wird für die Quantifizierung verwendet.

4.2 Gerät und Ausrüstung

Im Laboratorium muss ordnungsgemäß gewartete Ausrüstung verwendet werden, die für die angewendeten Verfahren geeignet ist, z. B. in Übereinstimmung mit den in EN ISO/IEC 17025 dargelegten Anforderungen. Außer der laborüblichen Grundausstattung werden zusätzliche Geräte in den spezifischen Verfahren beschrieben.

Geräte und Ausrüstungen sollten nach den Anweisungen des Herstellers gewartet werden. Kalibriersysteme müssen zur Verfügung stehen und eine Kalibrierung der Messgeräte muss routinemäßig nach Qualitätssicherungsprogrammen des Laboratoriums durchgeführt werden.

In einem Tandem-Massenspektrometer werden Ionen in der Ionenquelle gebildet und in der ersten Phase der Massenspektrometrie (MS1) durch Masse-zu-Ladung-Verhältnis getrennt. In der gezielten Massenspektrometrie werden Ionen eines bestimmten Masse-zu-Ladung-Verhältnisses (Vorläufer-Ionen) ausgewählt und Produkt-Ionen werden durch kollisionsinduzierte Dissoziation, Ion-Molekül-Reaktion, Photodissoziation oder andere Prozesse erzeugt. Die entstandenen Ionen werden anschließend getrennt und in einer zweiten Phase der Massenspektrometrie (MS2) nachgewiesen.

Im MRM-Modus wird das Massenspektrometer so eingestellt, dass es einen sehr kleinen Massenbereich in MS1, gewöhnlich eine Masseneinheit, an den erwarteten Massen der Ziel-Vorläufer-Ionen scannt. Nach der Fragmentierung werden die Produkt-Ionen in MS2 ermittelt, indem kleine Massenbereiche sukzessiv an ihren erwarteten Massen gescannt werden. Alternativ ermöglichen einige MS-Geräte (z. B. hochauflösende Geräte (HRMS) mit schnellem Schalten zwischen MS- und MS/MS-Leistung) den gleichzeitigen Nachweis aller Produkt-Ionen (paralleles Reaktionsmonitoring (PRM)).

Bei der auf MS basierenden Ionen-Fragmentierungsanalyse muss das für die Analyse ausgewählte Vorläufer-Ion eindeutig bestimmt werden; z. B. als das Molekül-Ion, ein charakteristisches Addukt des Molekül-Ions, ein charakteristisches Fragment-Ion oder ein typisches Isotopen-Ion. Die ausgewählten Produkt-Ionen sollten nicht ausschließlich aus demselben Teil im Molekül des zu analysierenden Markerpeptids stammen. Das Signal-Rausch-Verhältnis für jedes Produkt-Ion sollte $\geq 3 : 1$ sein.

4.3 Material und Reagenzien

Analyten müssen deutlich angegeben werden, einschließlich der Art des Standards (z. B. synthetische Peptide, gereinigte Proteine, Proteinextrakte) sowie Informationen zur Reinheit, Proteinprofilen usw.), Lagerbedingungen und Haltbarkeitsdauer.

Sofern in den Beschreibungen zum spezifischen Verfahren nichts anderes angegeben ist, sollten nur Reagenzien von MS-Qualität und nur deionisiertes, destilliertes oder gereinigtes Wasser für die HPLC-MS-Analyse verwendet werden. Sonstige Reagenzien, wie Enzyme, Reduktions- und Alkylierungsmittel, sollten von MS-Qualität sein. Pufferbestandteile, organische Lösemittelstandards, Analyt, Referenzmaterial, Kontrollen und Proben sind abhängig vom Verfahren. Die Lagerbedingungen und Haltbarkeitsdauer der Reagenzien und Proben sollten in der Validierung des Verfahrens (Robustheit des Verfahrens) bestimmt und in der Verfahrensvorschrift deutlich angegeben sein.

5 Verfahrensentwicklung

5.1 Allgemeines

Bei der Anwendung dieses Dokuments müssen die allgemeinen Qualitätssicherungsaufgaben für Laboratorien (z. B. hinsichtlich der Kalibrierung der Geräte, hinsichtlich der Probenextraktion und Wiederholungsmessungen, der Blindproben, der Verwendung von Referenzmaterialien, der Erstellung von Kalibrierkurven usw.) befolgt werden. Der Anwendungsbereich des Verfahrens, einschließlich der Anwendbarkeit auf bestimmte Lebensmittelmatrizes, muss eindeutig festgelegt sein.

Vor der Durchführung einer Lebensmittelallergenanalyse sollten besondere Überlegungen angestellt werden in Bezug auf:

- a) das Laborlayout (z. B. sollte der Arbeitsbereich für die Extraktion räumlich von dem Arbeitsbereich für den Nachweis getrennt sein);
- b) den aktuellen Arbeitsablauf (z. B. andere Tätigkeiten in den Laboratorien, die das Potenzial für Kreuzkontaminationen erhöhen können, sollten abgesondert werden);
- c) behandelte Probentypen (weil Kreuzkontaminationsprobleme die Fähigkeit, Analysen zuverlässig durchzuführen, beeinträchtigen können);
- d) Geräte in den Laboratorien (z. B. sollte bei gemeinsamer Benutzung von Geräten und Ausrüstungen das Risiko einer Kreuzkontamination berücksichtigt werden; soweit möglich sind fest zugeordnete Geräte und Ausrüstungen zu verwenden);
- e) Behälter (z. B. sind Einweg-Verbrauchsmaterialien mit geringer Proteinbindung vorzuziehen – Ausnahme: Polystyrol);

- f) allgemeine hauswirtschaftliche Aufgaben (z. B. ist die effektive Reinigung von Gegenständen und Oberflächen wichtig und sollte berücksichtigt werden). Besondere Reinigungsrouninen für Räume, in denen Massenspektrometrieeräte untergebracht sind, könnten erforderlich sein, da je nach MS-Gerätetyp Reinigungschemikalien die Analyse beeinträchtigen könnten.

5.2 Vorbereitung der Probe

5.2.1 Mahlen

Die Probenvorbereitung ist ein kritischer Schritt bei der Analyse von Lebensmittelallergenen, um zuverlässige Ergebnisse zu gewährleisten. Ziel muss sein, eine homogene und repräsentative Menge des ursprünglichen Probenmaterials bereitzustellen. Im Laboratorium sollten geeignete Geräte für die Homogenisierung der Probe, u. a. zum Walzen, Zerkleinern, Mahlen und/oder Mischen, zur Verfügung stehen; die genauen Hilfsmittel sind davon abhängig, welche Probentypen routinemäßig analysiert werden.

Eine größere Prüfmenge verbessert in der Regel das Detektionspotenzial, ebenso wie die Verringerung der Partikelgröße die Probenhomogenität verbessert.

5.2.2 Extraktion/Reinigung

Das Protein wird nach dem in der spezifischen Verfahrensvorschrift beschriebenen Verfahren extrahiert.

Folgendes sollte berücksichtigt werden:

- a) die Möglichkeit, die Mengen unter Beibehaltung des Verhältnisses zwischen der Prüfmenge und dem Extraktionsvolumen zu erhöhen, um die Extraktionsfähigkeit/Wiederfindungsrate des Zielallergens zu verbessern;
- b) die Zusammensetzung der Probenmatrix.

5.2.3 Enzymatische Verdauung

Um eine vollständige enzymatische Verdauung der Proteine im Extrakt der Prüfmenge zu erreichen, ist wichtig sicherzustellen, dass alle spezifischen Spaltungsstellen für die jeweiligen Enzyme zugänglich sind. Die folgenden Schritte werden in der Regel durchgeführt:

Denaturierung: Proteine werden entfaltet (z. B. durch Ultraschallbehandlung, Zugabe von Reinigungsmitteln oder chaotropen Reagenzien wie Harnstoff, Denaturierung mit hoher Temperatur usw.).

Reduktion: sämtliche im Protein vorhandene Disulfidbindungen werden gespalten, wodurch freie Thiolgruppen (hauptsächlich Cysteine) entstehen.

Alkylierung: die Neubildung von Disulfidbindungen wird durch irreversible Verkappung der freien während der Reduktion entstandenen Thiole verhindert. Üblicherweise wird die Alkylierung von Cystein unter Verwendung von Iodacetamid durchgeführt, wodurch S-Carboxyamidomethylcystein entsteht. Die Regeneration von Disulfidbindungen ist, bevor eine enzymatische Verdauung durchgeführt wird, bekanntermaßen problematisch, kann aber auch im entstandenen Peptidgemisch auftreten. Wird der Schritt der Alkylierung weggelassen, würde es zu einer zufälligen Dimerisierung der cysteinhaltigen Peptide kommen, was die massenspektrometrische Analyse erheblich erschweren würde.

Für die Verdauung von Proteinen in der MS-Probenvorbereitung wird häufig eine Anzahl von Enzymen verwendet. Pepsin spaltet die Kette der Aminosäuren (AS) unspezifisch, während Trypsin sehr spezifische Spaltungsstellen hat (Carboxylseite von Lysinen und Argininen). Proteine, die enzymatisch verdaut werden, können sich in ihrer AS-Zusammensetzung und ihrer Eignung für die MS-Analyse wesentlich unterscheiden. Daher muss die Verdauung während der Verfahrensentwicklung optimiert werden und ein

Verdauungsprotokoll, einschließlich der Wahl des Enzyms, ist Bestandteil des Probenvorbereitungsverfahrens.

Nach der enzymatischen Verdauung sollten die Proteinextrakte unmittelbar weiterverarbeitet werden; die Proteinextrakte könnten gelagert werden, wenn Daten zur Stabilität vorliegen.

5.3 Nachweis

5.3.1 Allgemeines

Allgemeine Angaben können EN 15842 entnommen werden.

5.3.2 Auswahl der Zielproteine/-peptide

Die vollständige Sequenz des Proteins sollte in einer Referenzdatenbank für Proteine zur Verfügung stehen. Die Variabilität der Proteinexpression sollte bestimmt werden und im besten Fall möglichst gering sein. Falls unterschiedliche Isoformen bekannt sind, sollten sie bestimmt werden und ihre Sequenzen zur Verfügung stehen.

Die Sequenzen der ausgewählten Markerpeptide sollten für die allergenen nachzuweisenden Inhaltsstoffe spezifisch sein.

Theoretisch darf jedes Protein, das allein für den allergenen Inhaltsstoff kennzeichnend ist, verwendet werden, um das Vorhandensein des Inhaltsstoffs selbst anzuzeigen. In der Praxis sind mehrere Überlegungen bei der Auswahl einzelner Proteine und Peptide als Zielmarker von Bedeutung, damit die Spezifität und Robustheit des Verfahrens sichergestellt wird.

Während der Auswahl der Peptide sollte besonders darauf geachtet werden, dass Markerpeptide gewählt werden, die in allen bekannten Isoformen eines Proteins vorhanden sind. Ist das nicht möglich, sollten verschiedene Markerpeptide ausgewählt werden, um beim Nachweis alle Isoformen abzudecken.

Aufmerksamkeit gilt der Analyse von gemeinsamen Allergenen, wie Fisch, Krustentieren, Weichtieren, Ei und Milch. Bei der Auswahl geeigneter Markerpeptide muss beachtet werden, ob alle zur Allergengruppe gehörenden Arten oder eine bestimmte Art nachgewiesen werden. Bei der Auswahl geeigneter Markerpeptide, z. B. Milch, muss beachtet werden, ob die gewählten Markerpeptide nur für Kuhmilch spezifisch sind oder auch in Büffel-, Ziegen-, Schaf-, Pferde- oder anderer Milch vorhanden sind. Bei Ei, beispielsweise, muss beachtet werden, ob die gewählten Markerpeptide nur für Hühnereier spezifisch sind oder auch in Gänse-, Enten-, Puten-, Wachtel- oder anderen Eiern vorhanden sind.

Vorzugsweise wird ein Peptid mit reproduzierbarer Ausbeute in der Probenvorbereitung und hoher Signalintensität als Markerpeptid ausgewählt. Ein Markerpeptid sollte bestenfalls mindestens zwei messbare Produkt-Ionen ergeben. Auf der Massenspektrometrie basierende Verfahren sollten je Zielprotein ein Peptid für die Quantifizierung („Quantifier“) und ein Peptid für die Qualitätslenkung („Qualifier“) enthalten. Die Auswahlkriterien für Proteine und Peptide sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1 — Auswahlkriterien bei Proteinen und Peptiden für die Allergenanalyse durch Massenspektrometrie [3,13]

Auswahlkriterien für Protein	Auswahlkriterien für Peptid
Vollständige Proteinsequenz, einschließlich Identifizierung der Isoformen, sollte zur Verfügung stehen	Für den allergenen Inhaltsstoff kennzeichnende Sequenz (Angaben zu BLAST werden zusammen mit den Angaben zur verwendeten Datenbank mit Abfragedatum/-uhrzeit bereitgestellt)
Protein sollte reichlich im Inhaltsstoff mit ausreichender Extraktionsausbeute vorhanden und relativ stabil sein	Geeignete Auswahl der Endoprotease — Peptidlänge: vorzugsweise 7 bis 20 Aminosäuren — vorzugsweise keine Cysteine (Oxidierung) — vorzugsweise kein Glutamin (Deamidierung) — vorzugsweise keine Fehlsplaltung
Variabilität der Proteinexpression sollte (Sorte, Umwelt-/Aufbereitungsbehandlung) gering sein.	Sequenz idealerweise unter bekannten Isoformen konserviert Falls nicht möglich, sollte 1 Peptid je Isoform gewählt werden
Protein sollte von der gewählten Endoprotease reproduzierbar verdaut werden	Peptidmodifizierung wird minimiert: Sequenz, die Methionin (M), Glutamin (Q) im N-Terminus des Peptids, und Asparagin (N)-Glycin (G)-Modifikation enthält, wird ausgeschlossen; Sequenzen, die Rückstände von Cystein (C), Asparagin und Glutamin enthalten, sollten möglichst ausgeschlossen werden

5.3.3 Auswahl der gemessenen MRM-Übergänge

Jedes Peptid erstellt, abhängig von z. B. seiner Primärsequenz, der Menge an interner Energie, dem Ladezustand des Peptids usw., ein typisches Fragmentmuster in einem MS/MS-Spektrum. Die anerkannte Nomenklatur für Produkt-Ionen von Peptiden wurde erstmals von Roepstorff und Fohlman [14] vorgeschlagen und von Bieman [15] modifiziert (Bild 1).

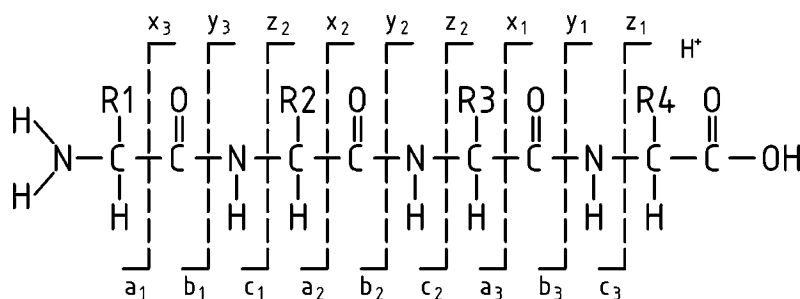


Bild 1 — Nomenklatur für Produkt-Ionen von Peptiden

Bei der kollisionsinduzierten Dissoziation mit geringer Energie (d. h. der kollisionsinduzierten Dissoziation in einer Quadrupol- oder einer Ionenfalle-MS) fragmentiert ein Peptid mit positiver Ladung hauptsächlich entlang seines Rückgrats, was zu einer Erzeugung von überwiegend *b*- und *y*-Ionen führt.