



TOF-Massenspektrometer in einem Labor der Hochschule Bremerhaven. Bild: Stefan Wittke / HS Bremerhaven

LC-MS/MS von Proteinen zum Erkennen von Lebensmittelbetrug:

Zukunft oder Gegenwart?

Lebensmittelbetrug? Was bedeutet das? Eine Definition liefert die EU [1]: Es handle sich um „jede mutmaßliche vorsätzliche

Handlung von Unternehmen oder Einzelpersonen mit dem Ziel, Käufer zu täuschen und sich daraus einen ungerechtfertigten Vorteil zu verschaffen,



sale by replacing more valuable with less valuable or inert ingredients“.

Einfache Analysetechniken erzielen oft nur unzureichende Ergebnisse. Ein Beispiel ist der Melamin-Skandal, wo durch Zugabe des stickstoffreichen Melamins ein hoher Proteingehalt vorgetäuscht wurde, wobei die Analytik nach Kjeldahl das Problem nicht erkannte [3].

Das zeigt den Bedarf an Techniken zum Nachweis von Inhaltsstoffen (Bereich: Food Fraud) oder zur Bestimmung der Herkunft von Lebensmitteln. Die Anforderungen an die Analytik können aufgrund der komplexen Matrix, der Herkunft aus verschiedenen Quellen, der Zusammensetzung (Proteine, Lipide, Kohlenhydrate, Salze ...) oder dem Grad der Prozessierung sehr hoch sein. Zugleich muss gewährleistet sein, dass die Lebensmittelüberwachung die Methoden auch einsetzen kann (techn. Voraussetzungen) bzw. darf (regulative Vorgaben).

Letzteres regelt die EU-Kontrollverordnung VO (EU) 2017/625, nach der es sich idealerweise um amtliche Untersuchungsmethoden (Art. 34, Abs. 2a VO (EU) 2017/625) handelt, welche möglichst entsprechend Anhang III validiert wurden [4]: „Die Analysemethoden und Messergebnisse sollten durch folgende Merkmale gekennzeichnet sein: Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision), Zweckmäßigkeit (Matrix und Konzentrationsbereich), Nachweisgrenze, Bestimmungsgrenze, Präzision (idealerweise in Ringversuchen nach ISO 5725 bestimmt), Wiederholbarkeit, Reproduzierbarkeit, Wiederfindung, Selektivität, Empfindlichkeit, Linearität, Messunsicherheit, sonstige nach Bedarf ausgewählte Kriterien.“ Gemäß Art. 34, Abs. 2b VO (EU) 2017/625 dürfen alternative Methoden eingesetzt werden: „... einschlägige Methoden, die im Rahmen von laborintern oder zwischen Laboratorien durchgeführten Studien zur Validierung der Methoden im Einklang mit international anerkannten wissenschaftlichen Protokollen entwickelt und validiert wurden.“

Stellt sich die Frage, inwieweit die Validierungsparameter bei Techniken wie der massenspektrometrischen Proteinanalytik definiert bzw. anwendbar sind. Denn die Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) wäre auf Grund der spezifischen Ergebnisse eine nützliche Technik für die Lebensmittelanalyse [5].

Xiong et al. identifizierten spezifische Peptide zum Nachweis und der Differenzierung der engl. Walnuss und verwandter Spezies [6]. Ähnliches machten Perner et al. für die Haselnuss [7]. Ruhland et al. beschreiben eine LC-MS/MS-Methode, welche spezifische Proteine / Peptide für verschiedene Nusspezies detektiert und für die Bereiche Allergenanalytik sowie Lebensmittelbetrug (z. B. von Nussnougatcremes) interessant ist [8].

Stader et al. untersuchten Beimengungen von Plasmaproteinen in Wurstwaren [9]. Der Ansatz

unter Verstoß gegen die in Artikel 1 Absatz 2 der Verordnung (EU) 2017/625 (Rechtsvorschriften zur Lebensmittelkette) genannten Vorschriften“. Vier Kriterien müssen erfüllt sein, um von Lebensmittelbetrug (Food Fraud) zu sprechen:

- Verstoß gegen EU-Regularien,
- Täuschen des Verbrauchers,
- Erreichen von unzulässigen (z. B. pekuniären) Vorteilen,
- Intention (insbes. die Substitution).

Das FoodIntegrity Handbook [2] definiert Substitution als „a type of food fraud which includes the intentional addition of a foreign or inferior substance or element; especially to prepare for

von Fiorino et al. ermöglicht die Unterscheidung von Zucht- und Wildlachs [10], während Lasch et al. die Unterscheidung von Fischspezies zum Ziel haben [11]. Brümmer et al. entwickelten eine LC-MS/MS-Nachweismethode für verschiedene Thunfischspezies [12].

Um diese Entwicklungen zu fördern, wurde 2019 eine Arbeitsgruppe nach §64 LFGB am Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit gegründet. Sie hat zum Ziel, die massenspektrometrische Proteinanalyse in der amtlichen Lebensmittelüberwachung für Lebensmittelallergene und -betrug zu etablieren [13]. Die Methode zum Nachweis von Transglutaminase in restrukturiertem Fleisch wurde kürzlich in einem Ringversuch mit Laboren aus staatlichen, akademischen und privaten Einrichtungen validiert [14].

LC-MS/MS zielgerichtet (multiple reaction monitoring, MRM) nachgewiesen [16].

Zurück zur Frage, ob die Validierungsparameter gemäß EU-Kontrollverordnung VO (EU) 2017/625 bei der LC-MS/MS adressiert werden können, hierzu die Tabelle: Genauigkeit ist der Nachweis spezifischer Fragmentationen mit hoher Massengenauigkeit (Präzision) und deren Zuordnung zu einem bestimmten Vorläuferion (Richtigkeit). Dies wird durch einen MRM-Ansatz ermöglicht, d.h. bei der Messung wird ausschließlich nach TG-1 und TG-2 selektiert (Selektivität) und deren Fragmentierungsmuster aufgenommen. Die Zweckmäßigkeit ist gesichert, da künstlich hergestellte Fleischwaren mit unterschiedlichen Mengen an TG (0,2 – 2 %) versetzt wurden. Die Nachweisgrenze ist mit 0,0013 % TG angegeben, wobei ein Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) ≥ 3 der

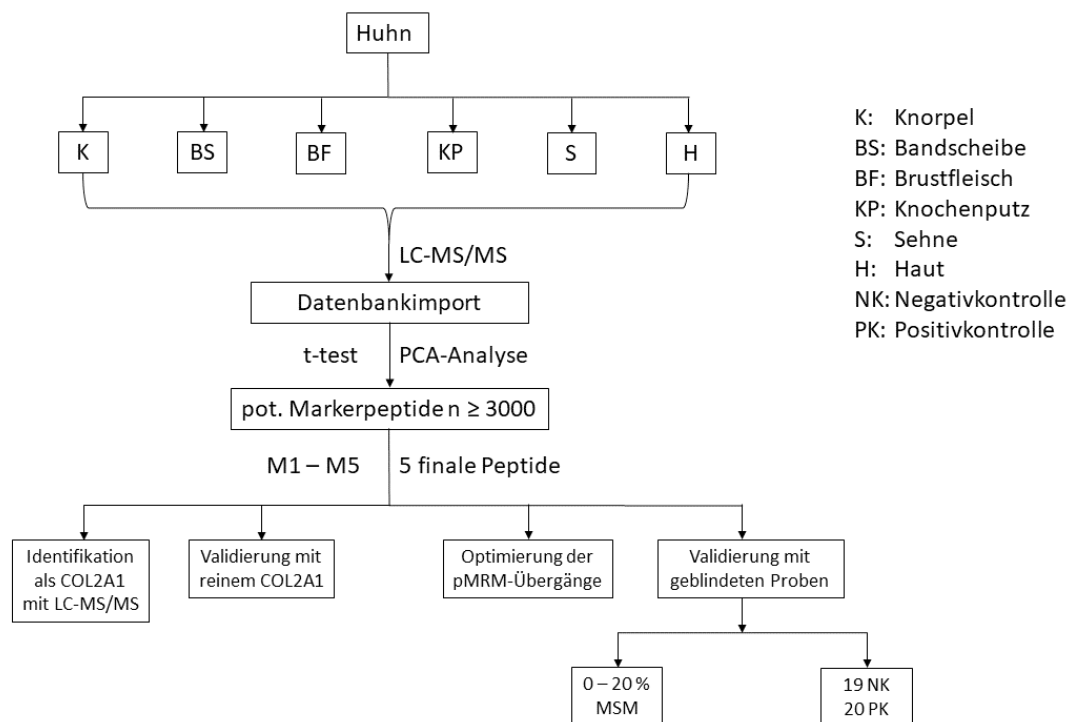


Bild 1: Studie zu Separatorenfleisch (MSM) mit Markerauswahl und Validierung gemäß Anhang III der EU-Kontrollverordnung VO (EU) 2017/625. Bild: Stefan Wittke / HS Bremerhaven

Transglutaminase

Für die Herstellung von restrukturiertem Fleisch und Fleischerzeugnissen wird z.B. mikrobielle Transglutaminase (TG) eingesetzt. Die Verwendung der TG ist gemäß Lebensmittelinhaltsstoffverordnung (LMIV Artikel 7, Anhang VI) kennzeichnungspflichtig [15].

2017 entwickelten Jira et al. eine Methode zum qualitativen Nachweis von TG. Über spezifische Peptide (TG-1, TG-2) und deren Fragmentationen wird die TG in restrukturiertem Fleisch mit der

analytischen Nachweisgrenze (Empfindlichkeit) entspricht. Die Reproduzierbarkeit wurde durch die Anwendung in 13 Laboren abgesichert und der Parameter Messunsicherheit durch strikte Auswahlregeln bezüglich der Massengenauigkeit und der erlaubten Zeitabweichung adressiert. Die Präzision wurde mit 99 % angegeben. Damit erfüllt die Methode die Vorgaben der EU-Kontrollverordnung VO (EU) 2017/625 und ist Teil der amtlichen Sammlung von Analysemethoden nach dem Deutschen Lebens- und Futtermittelgesetzbuch (§ 64 LFGB).

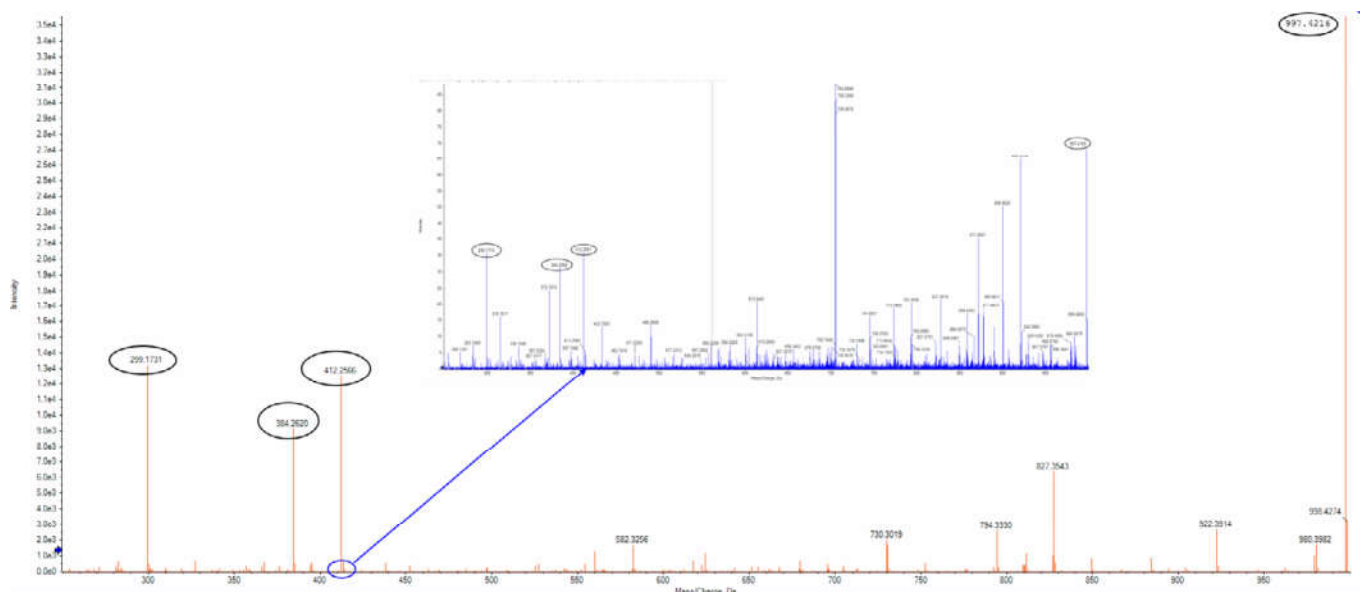


Bild 2: Vergleich der Signalintensitäten für M5 ($m/z = 704.835$; $z=2$) für COL2a1 in Knorpel und Sehne vom Huhn; markiert (Kreis) sind die signalintensivsten Fragmentationen von M5. Die Signalintensität beim Knorpel ist um den Faktor 3000–5000 höher als in Sehne. Bild: Stefan Wittke/ HS Bremerhaven

Separatorenfleisch

Nach der Verordnung (EG) Nr. 853/2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs ist Separatorfleisch (MSM; engl. mechanically separated meat) ein Produkt, das durch Ablösung des an fleischtragenden Knochen nach dem Entbeinen bzw. an den Geflügelschlachtkörpern haftenden Fleisches auf maschinelle Weise gewonnen wird. Entscheidend ist, dass die Struktur der Muskelfasern aufgelöst oder verändert wird. Unter Berücksichtigung von Art. 7 in Verbindung mit Anhang VI der Lebensmittelinformations-VO (EU) 1169/2011 ist MSM von Geflügel oder Schwein erlaubt, die Verwendung in Lebensmittelzubereitungen aber kennzeichnungspflichtig.

Der Nachweis von MSM erfolgt mikroskopisch (Knochenfragmente) oder über die erhöhten Kalziumgehalte, die durch Knochensplinter entstehen [17–19]. Wie von Branchenexperten betont wird, sind die Methoden allerdings nicht zuverlässig [20].

Nachweis von MSM mittels LS-MS/MS

Im Gegensatz zur TG-Analytik war keine Zielsubstanz bekannt, und es wurde zunächst ein nicht-zielgerichteter Ansatz verfolgt (Bild 1). MSM vom Huhn enthält produktionsbedingt neben Fleisch und Fett auch Sehnen, Knochenmark, Knochensplinter, Knorpel und Bandscheiben. Das Proteom der verschiedenen Gewebetypen vom Huhn ist unterschiedlich zusammengesetzt, z. B. enthalten Knorpel und Bandscheiben Kollagen II [21], Sehne und Hühnerhaut vor allem Kollagen I [22].

Typenreine Gewebe (Gewebearten s. Bild 1) wurden enzymatisch verdaut und mittels LC-MS/MS analysiert. Durch Vergleich der Peptidverteilung in den verschiedenen Gewebetypen [23] ergaben sich mehr als 3000 Peptide, die für eine Differenzierung in Frage kommen [24]. Die am stärksten diskriminierenden Peptide (M1–M5) wurden mittels LC-MS/MS identifiziert und dem Kollagen 2 alpha1 (COL2a1) zugeordnet.

Mit COL2a1 als Zielsubstanz wurde die Methodik validiert (Tabelle). Die Genauigkeit (Präzision) wurde über die Massengenauigkeit ($\Delta m/z = \pm 0,002$ Da) und die Abweichung der Retentionszeit ($\Delta t = \pm 0,1$ min) der Fragmentationen validiert (Richtigkeit). Damit wurden strikte Parameter für die Messunsicherheit etabliert. Duplikate (oder höhere Replikanzahl) sichern die Wiederholbarkeit der Experimente ab. Die Selektivität der Fragmentationen wurde durch den Vergleich mit reinem COL2a1 bestätigt. Geprüft wurde auch, ob COL2a1 in anderen Kollagen-haltigen Gewebetypen (z. B. Sehne, Haut) eine Rolle spielt. Bild 2 zeigt beispielhaft für M5, dass COL2a1 in Sehnenmaterial (Signalhöhe MSMS 30–70 cts) im Gegensatz zu Knorpelmaterial (9000–35000 cts) keine Rolle spielt. Markiert (Kreis) sind die signalintensivsten Fragmentationen von M5 in reinem Knorpel und das Insert ist die Intensitätsverteilung für reine Sehne. Ergo ist das Signal für COL2a1 in Knorpel 3000- bis 5000-fach höher.

Als Nachweisgrenze wurde definiert, dass COL2a1 nachgewiesen ist, wenn je mindestens drei von vier Fragmentationen für M1–5 detektiert werden ($SNR \geq 3$). Für die Bestimmungsgrenze gilt ein $SNR \geq 10$. Die Zweckmäßigkeit wurde mit reinem MSM und zusätzlich verblindet durch mit

steigenden Mengen an MSM versetzte Proben (0 – 20 %) untersucht. Es wurden Mengen an MSM gewählt, die am unteren Bereich typischer MSM-Zugaben (10 – 90 %) liegen. Die Matrix beeinträchtigte die Detektion der Markerpeptide nicht und der gewählte Konzentrationsbereich war adäquat.

Die finalen Bewertungskriterien wurden vom MSM-Gehalt von 10 % abgeleitet, d.h. es wurde akzeptiert, dass ein MSM-Gehalt von 5 % negativ evaluiert wird. Damit muss das Signal eines Fragmentions eine Signalintensität ≥ 50 erreichen ($\text{SNR} \geq 10$), um als bestimmt zu gelten. Erst wenn mindestens drei von vier Fragmentionen das Kriterium erfüllen, gilt das Vorläuferion als detektiert. Auf Basis der strikten Vorgaben wurde die Präzision evaluiert und 39 weitere Realproben verblindet untersucht. Die Negativkontrollproben (NK) stammten von Metzgern aus verschiedenen Regionen in Deutschland und erfüllen Anforderungen der EU-Kontrollverordnung VO (EU) 2017/625 [4]: „... Proben sind so zu entnehmen, zu handhaben und zu kennzeichnen, dass ihre rechtliche, wissenschaftliche und analytische Validität gewährleistet ist.“

D.h., es müssen NK verwendet werden, die nachweislich MSM-negativ sind. Die verfügbaren Methoden (Kalzium, Mikroskopie) sind aber ungeeignet, um derartige NK zu identifizieren [20]. D.h., ohne den Produktionsprozess zu begleiten und sämtliche Lieferunterlagen und Beimengungen zu beurteilen, können MSM-freie industriell gefertigte NK nicht sicher identifiziert werden und sind auszuschließen.

Zwei NK wurden mit erwerbbaarem Collagenhydrolysat versetzt, um den Einfluss auf die Klassifikation zu testen. NK vom Schwein wurden untersucht, um sicherzustellen, dass dessen Kollagene die Selektivität nicht beeinträchtigen. Die Positivkontrollen sind aus industrieller Produktion und als MSM-positiv gekennzeichnet (EU-Kontrollverordnung VO (EU) 2017/625 erfüllt).

Die 39 Realproben wurden korrekt klassifiziert, so dass inkl. der Proben mit steigendem MSM-Gehalt die Präzision der Methodik 98 % beträgt. Validierungsparameter wie Linearität, Wiederfindung und Bestimmungsgrenze wurden nicht adressiert, weil die Methoden keine Absolutgehalte detektieren. Der quantitative Nachweis von MSM und die Methodvalidierung in einem Zweitlabor (TripleQuad; Reproduzierbarkeit) werden aktuell bearbeitet.

Schlussfolgerung

Es wurden zwei unterschiedliche Methoden vorgestellt, welche sich mit der Thematik des Lebensmittelbetruges intensiv auseinandersetzen. Während eine der Methoden zum Nachweis von TG bereits als amtliche Methode in der Lebensmittelüberwachung eingesetzt wird, ist die Methode zum Nachweis von MSM bislang eine „In-house“-

Lösung. Da die Methodik aber gemäß EU-Kontrollverordnung VO (EU) 2017/625 validiert wurde, kann sie in der Lebensmittelüberwachung eingesetzt werden, da derzeit keine sichere Methodik zur Verfügung steht.

Abschließend ist festzustellen, dass die massenspektrometrische Proteinanalytik einen zunehmenden Beitrag beim Aufdecken von Lebensmittelbetrug leistet und nun Teil der Gegenwart ist.

Danksagung

Die Forschung zum MSM wurde gefördert vom BMWi, Zentrales Innovationsprogramm für kleine und mittlere Unternehmen (ZIM), KK5125601BMO.

AUTOREN

Prof. Dr. Stefan Wittke

Hochschule Bremerhaven
Tel.: 0471/4823-0
info@hs-bremerhaven.de
www.hs-bremerhaven.de

Mikko Hofsommer

GfL Gesellschaft für Lebensmittel-
Forschung mbH, Berlin
Tel.: 030/2639200
info@gfl-berlin.com
www.gfl-berlin.com

Literatur:

- [1] https://food.ec.europa.eu/safety/agri-food-fraud/food-fraud-what-does-it-mean_en; letzter Zugriff 18.07.2022
- [2] <https://foodintegrity.fera.co.uk/index.cfm?sectionid=83>; letzter Zugriff 26.07.2022
- [3] World Health Organization. *Environ Health Perspect* 117:1803–1808 (2009). doi:10.1289/ehp.0900949
- [4] <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:02017R0625-20170407&from=DE>; letzter Zugriff 26.07.2022
- [5] *Proteomics for Food Authentication*. Edited By Leo M.L. Nollet, Semih Ötleş. SBN 9780367205058, May 26, 2020, CRC Press
- [6] Xiong et al.: Selection of Tree Nut Allergen Peptide Markers: A Need for Improved Protein Sequence Databases. *Journal of AOAC international* Vol. 102, no. 5, 2019.
- [7] Perner et al.: Investigation of Reduced ELISA Recovery of Almond and Hazelnut Traces from Roasted Nut Samples by SDS-PAGE and Mass Spectrometry. *Journal of AOAC International* Vol. 102, no. 5, 2019
- [8] M. Ruhland, R. Klinger. *Food Fraud: A Simple and Efficient LC-MS/MS Approach for Peptide-Based*

Parameter / Studie	Transglutaminase	Separatorenfleisch
Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision)	X	X
Zweckmäßigkeit (Matrix, Konzentrationsbereich)	X	X
Nachweisgrenze	X	X
Bestimmungsgrenze	n. a.	X
Präzision	X	X
Wiederholbarkeit	X	X
Reproduzierbarkeit	X	-
Wiederfindung	n. a.	n. a.
Selektivität	X	X
Empfindlichkeit	X	X
Linearität	n. a.	n. a.
Messunsicherheit	X	X
weitere Kriterien	-	X

Tabelle: Validierungsparameter nach EU-Kontrollverordnung VO (EU) 2017/625 mit Angaben, inwieweit sie erfüllt sind; n. a.: nicht adressiert.

- Food Authentication Journal of AOAC International* Vol. 102, no. 5, 2019.
- [9] C. Stader, M. Judas, W. Jira. A rapid UHPLC-MS/MS screening method for the detection of the addition of porcine blood plasma to emulsion-type pork sausages. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2019) 411:6697 – 6709.
- [10] Fiorino et al.: Mass Spectrometry-Based Untargeted Proteomics for the Assessment of Food Authenticity: The Case of Farmed Versus Wild-Type Salmon *Journal of AOAC International* Vol. 102 (5), 2019
- [11] Lasch P, Uhlig S, Uhlig C, Wilhelm C, Bergmann N, Wittke S. Development and in-house validation of an LC-MS and LC-MS/MS assay for the determination of food fraud for different fish species. 2019. *Journal of AOAC International*. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.19-0061>
- [12] Brümmer I. et al.: Authentizität von Lebensmitteln – „Echter“ Thunfisch Isobares Labeling als Methode zur Identifizierung von Markerpeptiden zum Authentizitätsnachweis. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 114 (4): 156-163 (2018)
- [13] Stoyke M. et al.: German Government Official Methods Board Points the Way Forward: Launch of a New Working Group for Mass Spectrometry for Protein Analysis to Detect Food Fraud and Food Allergens *Journal of AOAC International* Vol. 102, no. 5, 2019
- [14] Jira W. et al.: Inter-laboratory Validation of an HPLC-MS/MS Method for the Detection of Microbial Transglutaminase in Meat and Meat Products *Food Analytical Methods*. <https://doi.org/10.1007/s12161-022-02289-0>
- [15] <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:304:0018:0063:de:PDF>; letzter Zugriff 26.07.2022.
- [16] Jira W, Schwägele F (2017) A sensitive high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the detection of microbial transglutaminase in different types of restructured meat. *Food Chem* 221:1970–1978. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.030>
- [17] Tremlova B, Sarha P, Pospiech M, Buchtova H, Randulova Z (2006) Histologische Untersuchung verschiedener Arten von Separatorenfleisch. *Arch Lebensmittelhyg* 57:85–91
- [18] Mohamed MA, Zahran DA, Kasem GMA, Emara MMT, Mansour NM (2016) Detection of mechanically recovered poultry meat (MRPM) in traditional Egyptian luncheon (emulsion type sausage). *Pol J Food Nutr Sci* 66(1):17–23. <https://doi.org/10.1515/pjfn-2015-0013>
- [19] Langen M, Horn D (2020) *Bildatlas Histologie Fleisch und Fleischerzeugnisse: Befunde beurteilen – Ergebnisse sicher bewerten*, 1st edn. Behrs Verlag, Hamburg
- [20] Stanislawski, *Fleischwirtschaft*, Juli 2022
- [21] <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=COL2A1&keywords=col2a1>; letzter Zugriff 23.07.2022
- [22] <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=COL1A2>; letzter Zugriff 23.07.2022.
- [23] Uhlig s. et al. Valid machine learning algorithms for multiparameter methods. *Accred Qual Assur DOI* 10.1007/s00769-019-01384-w
- [24] Wilhelm et al.: Detection of Mechanically Separated Meat from Chicken in Sausages and Cold Meat by Targeted LC-MS/MS Analysis. *Food Analytical Methods*, <https://doi.org/10.1007/s12161-022-02231-4>

