

# Validierung einer Methode zur Bestimmung von Schweine-Muskelprotein (Myosin-7)

23.11.2023, Berlin

**M. Sc. Vincent Blaschke**

Nationales Referenzlabor für Tierisches Protein in Futtermitteln  
Abteilung Lebensmittelsicherheit (Fachgruppe 51)



# Kleiner Reminder – Warum Proteomics – Schwein-Methode

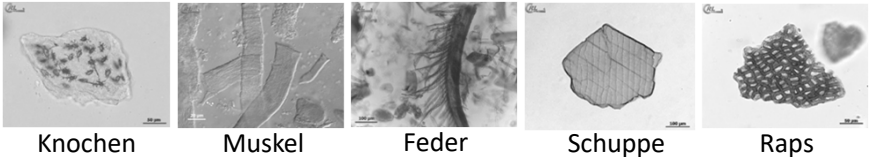
Rinderwahn-Epidemie → 2001 Verordnung (EG) Nr.999/2001

→ Verbot der Fütterung von tierischen Produkten an Nutztieren

→ Teilweise Lockerung der Verbote

## VO (EC) 152/2009

© EURL-AP am CRA-W (Gembloux, Belgien)

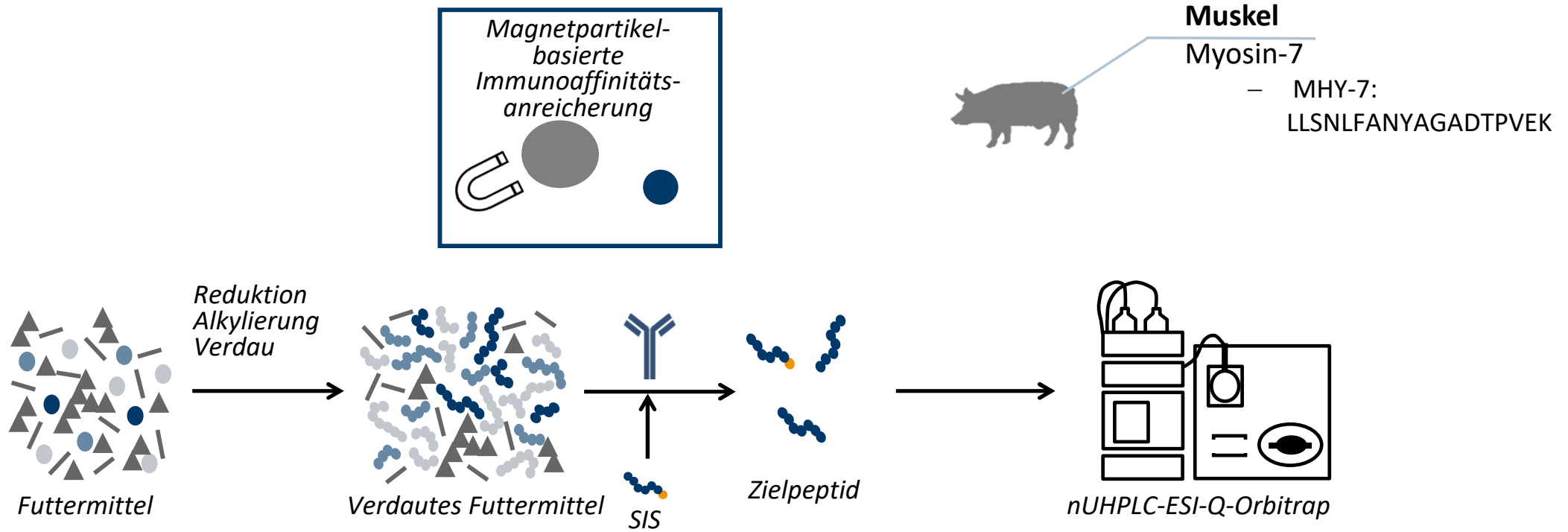


Spezifität: + Spezies  
± Gewebe

erlaubt   
verboten

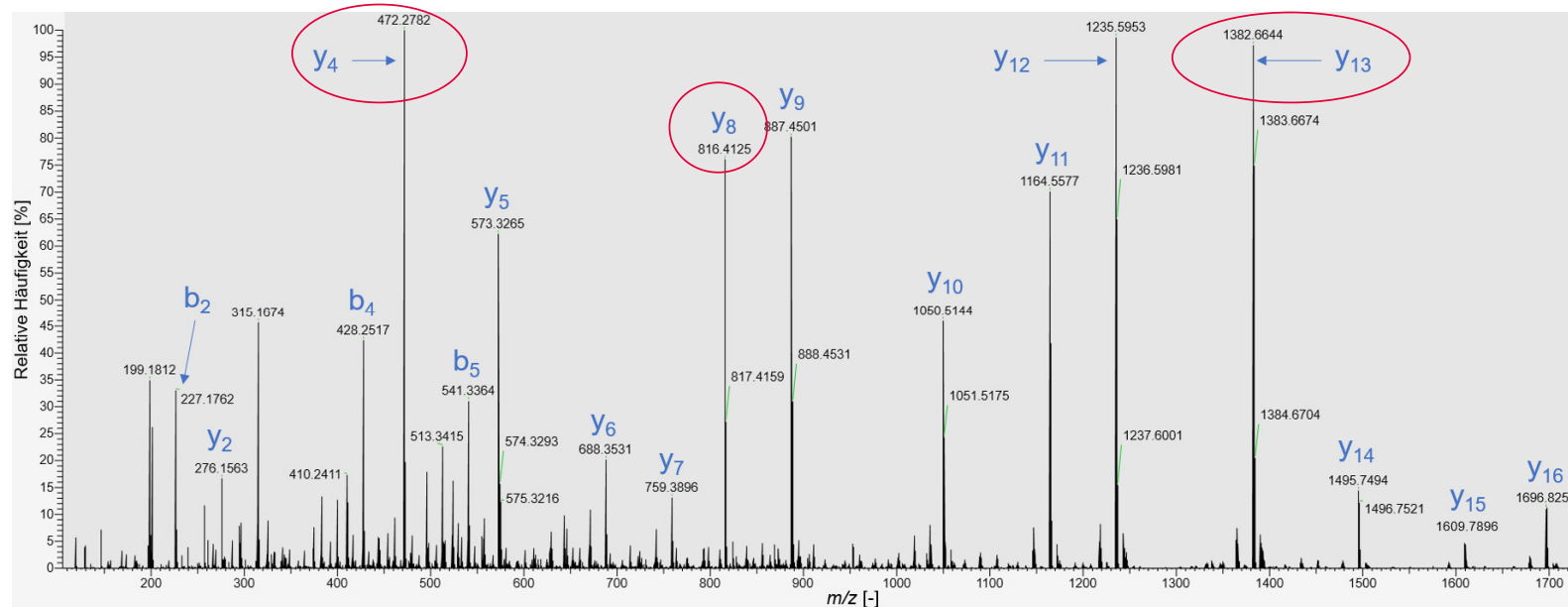
product <sup>a</sup>	fed to						
PAP, blood products collagen, gelatine bone $Ca_x(PO_4)_y$ hydrolysed protein (hides, skins, < 10 kDa)	milk (products)	erlaubt	erlaubt	erlaubt	erlaubt	erlaubt	erlaubt
	PAP	erlaubt	erlaubt	erlaubt	erlaubt	erlaubt	erlaubt
	blood products	erlaubt	erlaubt	erlaubt	erlaubt	erlaubt	erlaubt
	bone $Ca_x(PO_4)_y$ hydrolysed protein collagen, gelatine	erlaubt	erlaubt	erlaubt	erlaubt	erlaubt	erlaubt
	PAP	erlaubt	erlaubt	erlaubt	erlaubt	erlaubt	erlaubt
	blood products	erlaubt	erlaubt	erlaubt	erlaubt	erlaubt	erlaubt
	bone $Ca_x(PO_4)_y$	erlaubt	erlaubt	erlaubt	erlaubt	erlaubt	erlaubt
	egg (products) hydrolysed protein	erlaubt	erlaubt	erlaubt	erlaubt	erlaubt	erlaubt
	meal	erlaubt	erlaubt	erlaubt	erlaubt	erlaubt	erlaubt
	hydrolysed protein	erlaubt	erlaubt	erlaubt	erlaubt	erlaubt	erlaubt
	PAP	erlaubt	erlaubt	erlaubt	erlaubt	erlaubt	erlaubt

# Workflow – Schweine-Methode



# Peptide und Fragment-Ionen

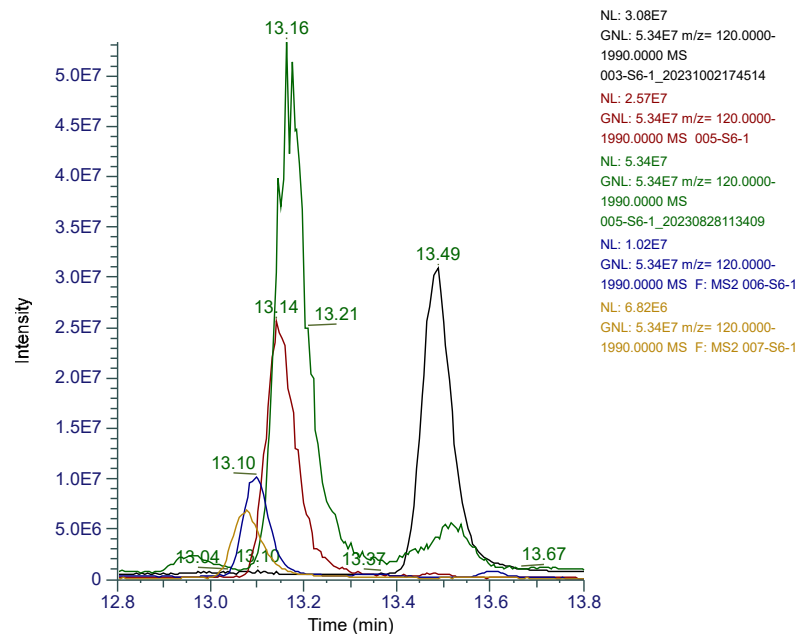
Peptide	Precursor		fragment ions			NCE	t <sub>R</sub> [min]
	m/z	charge	m/z <sub>calculated</sub>	ion type	use		
LLSNLFANYAGADTPVEK	961.9965	2	1382.6587	y13+	Quantifier	25	13.1
			816.4098	y8+	Qualifier		
			472.2766	y4+	Qualifier		
LLSNLFANYAGADTPVEK	966.0036	2	1390.6729	y13+	Quantifier	25	13.1
			824.4240	y8+	Qualifier		
			480.2766	y4+	Qualifier		



## Untere und obere Bestimmungsgrenze (LLOQ und ULOQ)

- LLOQ muss größer sein als mittlerer Blindwert + 6-mal die Blindwertstandardabweichung

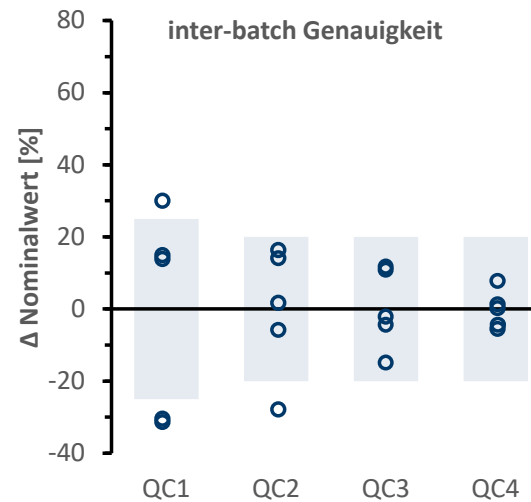
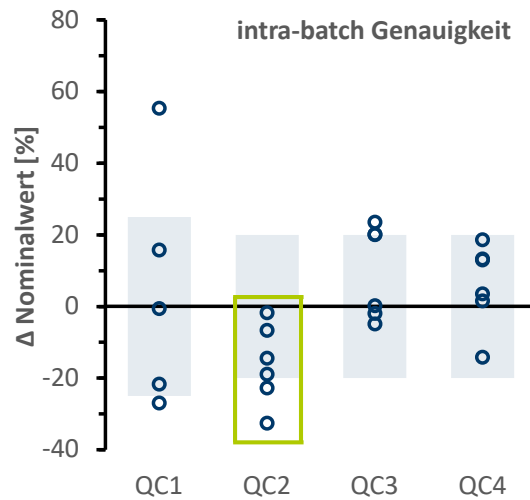
RT: 12.80-13.80 Chromatogramm LLOQ



Messung	LLOQ [ $\mu\text{g/g}$ ]	ULOQ [ $\mu\text{g/g}$ ]	Blindwert [ $\mu\text{g/g}$ ]
1	0,38	94	0,05
2	0,39	94	-
3	0,14	93	0,07
4	0,41	96	0,16
5	0,42	102	0,12
6	0,47	108	0,12
Mittelwert [ $\mu\text{g/g}$ ]	0,37	98	0,10
$\sigma$ [ $\mu\text{g/g}$ ]	0,12	6	0,04
Mittelwert + 6-mal $\sigma$ [ $\mu\text{g/g}$ ]			0,34

# Genauigkeit

- Intra-Assay = 6-mal QC-Proben auf einer Platte
- Inter-Assay = 1-mal QC-Proben auf 6 Platten



Genauigkeit = Richtigkeit + Präzision

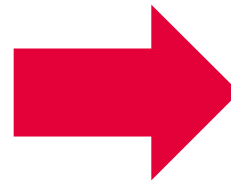
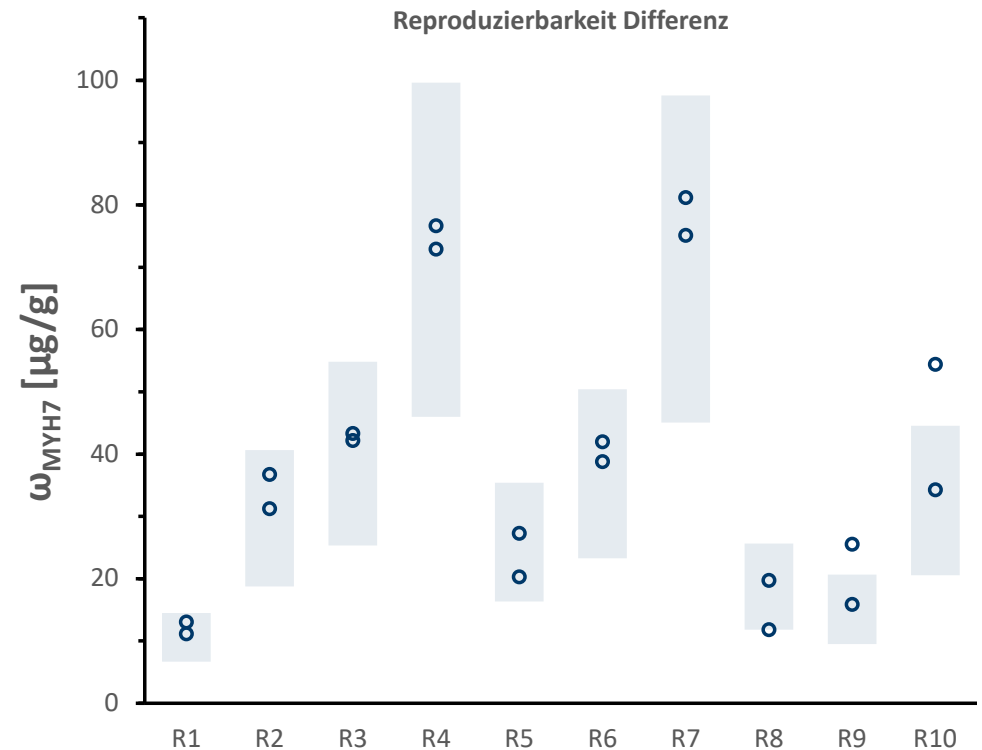


Genauigkeit kann für QC2-4 akzeptiert werden  
QC1 erfüllt nicht alle erforderlichen Kriterien

# Reproduzierbarkeit

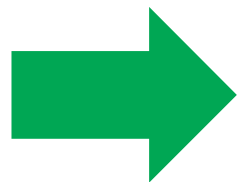
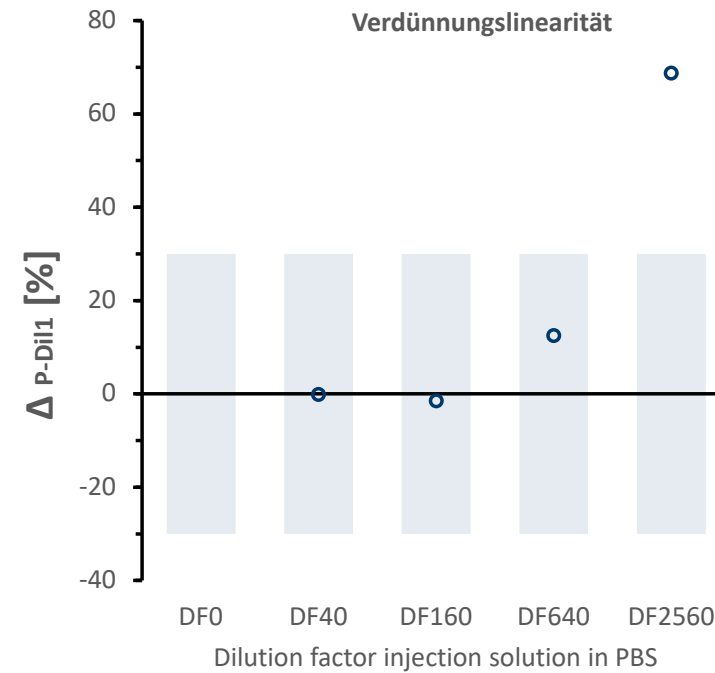
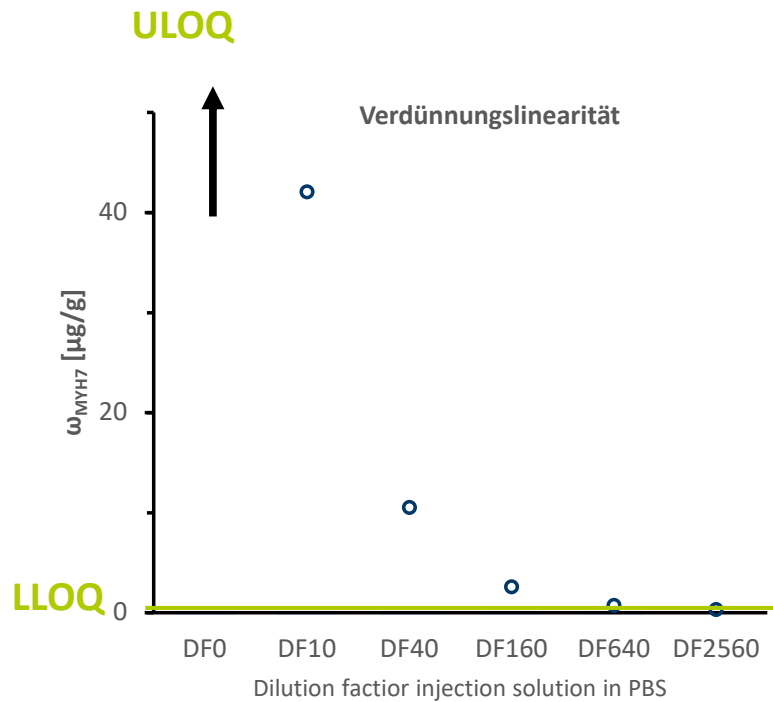
— Relative Abweichung nicht  $\leq 30\%$  bei mind. 8 Proben

Probe	MBM1	MBM2	MBM3	PiFx
R1				PiF1
R2				PiF2
R3				PiF3
R4				PiF4
R5				PiF5
R6				PiF6
R7				PiF7
R8				PiF8
R9				PiF9
R10				PiF5



- Homogenität??? → Fehlerhaft
- Wiederholung wird zeigen ob Methode reproduzierbar ist

# Verdünnungslinearität



- DF2560 liegt unter LLOQ (Ausschluss)
- Alle weiteren Proben erfüllen Kriterium  $\pm 30\%$



# Interferenzen

- Antikörper bindet ebenfalls analog MYH7 Peptide von Pferd und Rind
- Einfluss von MBM's mit Rind und Pferd??



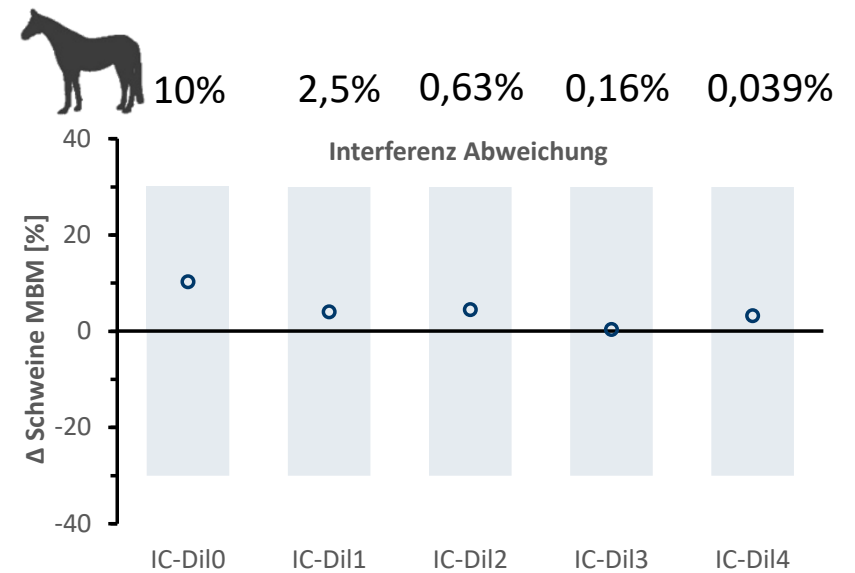
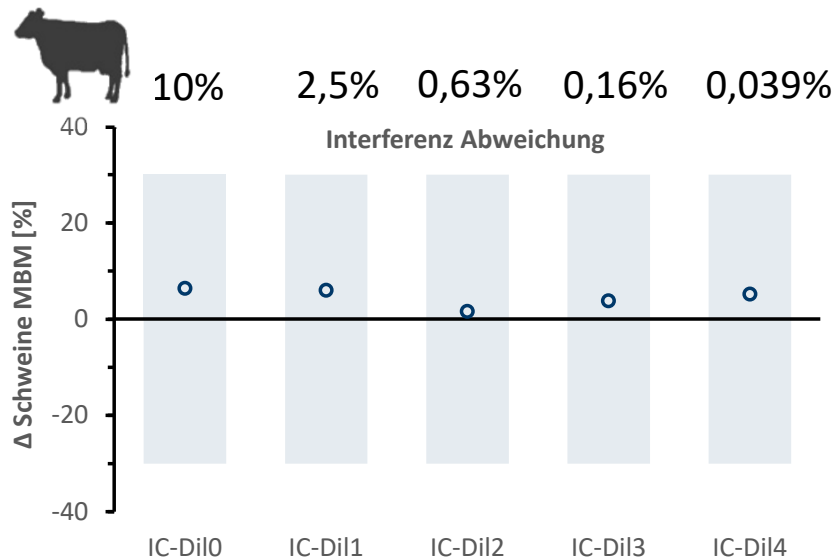
Verdünnung Rind	Anteil MBM von Rind (IC) [%]
IC-Dil0	10
IC-Dil1	2,5
IC-Dil2	0,63
IC-Dil3	0,16
IC-Dil4	0,039



Verdünnung Pfer	Anteil MBM von Pferd (IH) [%]
IH-Dil0	10
IH-Dil1	2,5
IH-Dil2	0,63
ICH-Dil3	0,16
IH-Dil4	0,039

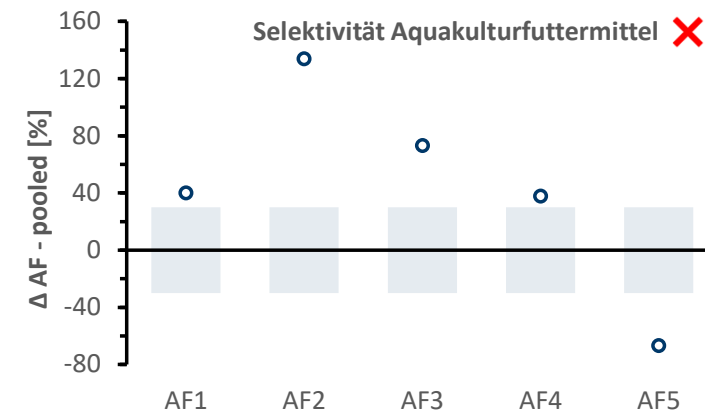
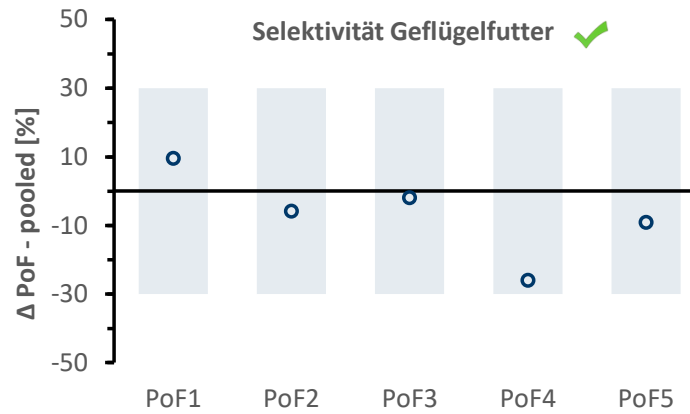
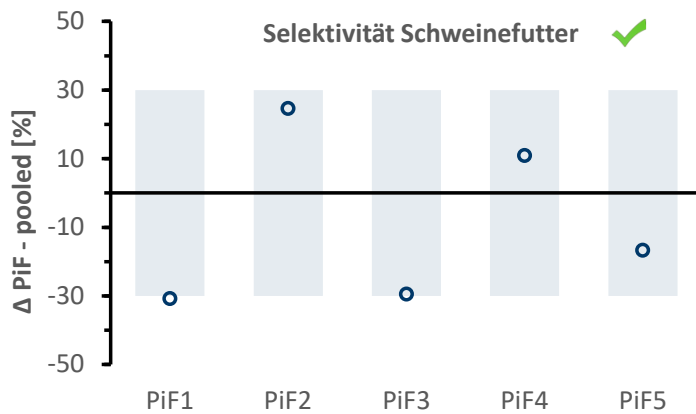
# Interferenzen

– Abweichung von Schwein MBM max.  $\pm 30\%$



**Zusätze von bis zu 10% MBM von Rind und Pferd haben keinen Einfluss auf die Performance des Assays**

# Selektivität: Matrixeffekte?



➤ Test auf Selektivität bei Schweine- und Geflügelfutter bestanden ✓

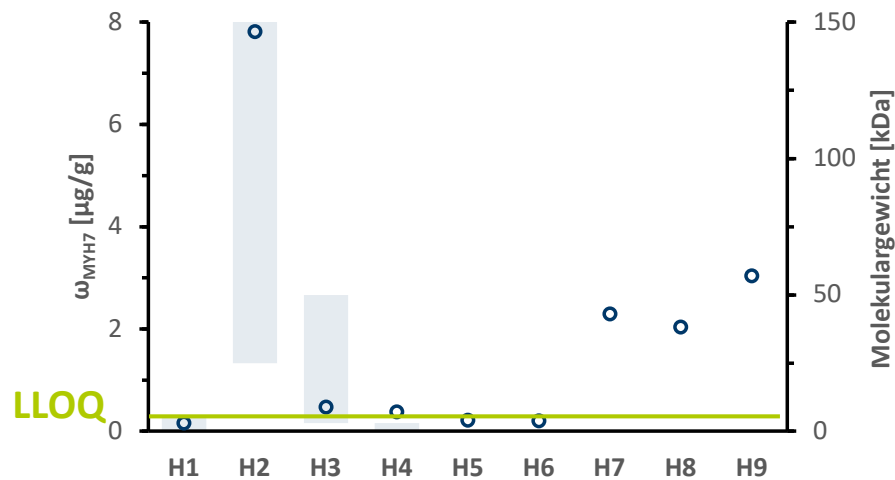
➤ Aquakulturfuttermittel zu fettig → Homogenität??? ✗



**Entfettung?**

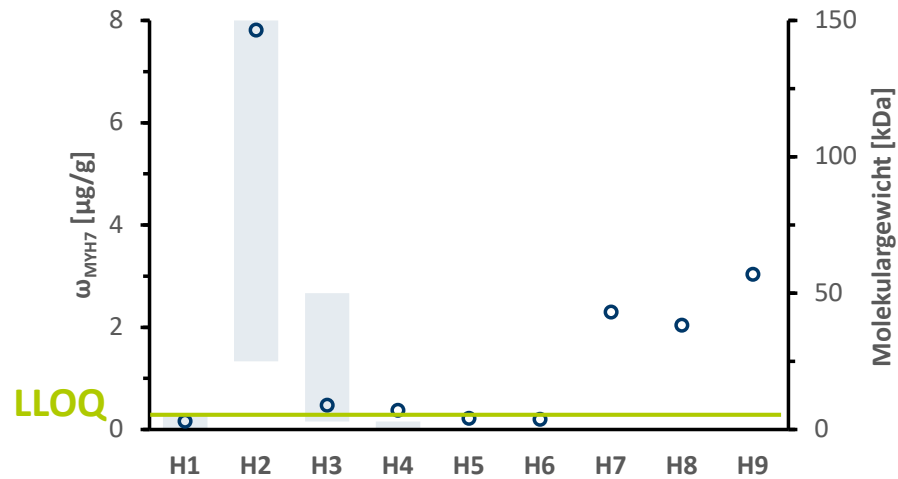
# Selektivität: Proteinhydrolysate

- Können Futtermittel legal zugesetzt werden
- Nachweis ob positive Ergebnisse von Schwein-Hydrolysaten stammen!



Probe	Gewebe
H1	Darmschleimhaut
H2	Fleisch, Knochen
H3	Fleisch, Knochen
H4	Fleisch, Knochen
H5	Unbekannt
H6	Unbekannt
H7	Gelatine, Haut
H8	Gelatine, Knochen
H9	Gelatine, Schwarte

# Proteinhydrolysate



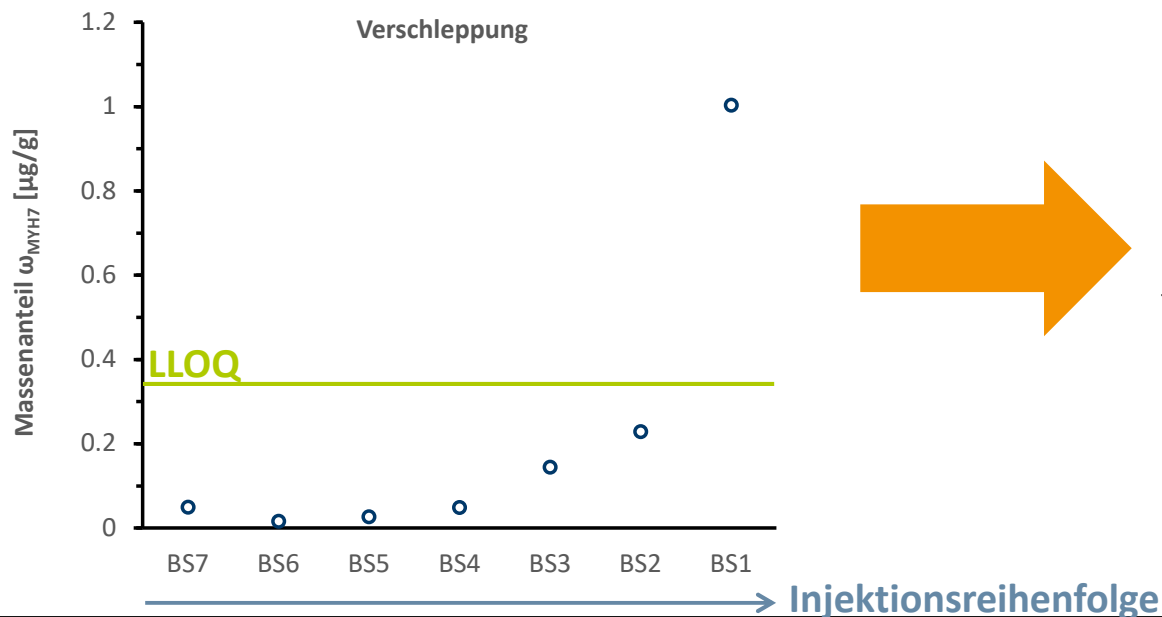
Probe	Gewebe
H1	Darmschleimhaut
H2	Fleisch, Knochen
H3	Fleisch, Knochen
H4	Fleisch, Knochen
H5	Unbekannt
H6	Unbekannt
H7	Gelatine, Hauts
H8	Gelatine, Knochen
H9	Gelatine, Schwarte



- Nur 3 von 9 Proben erzielen Ergebnisse unterhalb LLOQ (0.37  $\mu\text{g/g}$ )
- Hydrolysate können zu falsch-positivem Ergebnissen führen
- Probenzusammensetzung 10% (m/m) Hydrolysat in Schweinefuttermittel

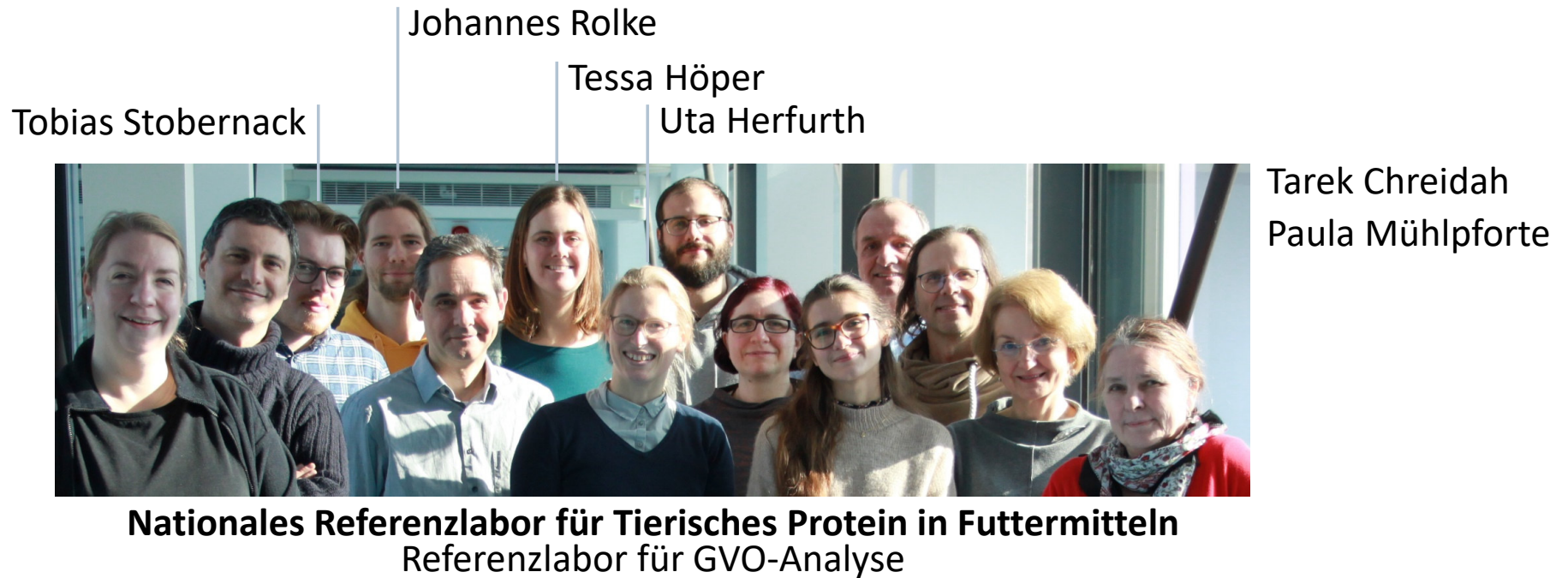
## Letzter Punkt – Validierung von Verschleppungen

- Verschleppungen können nachfolgende Messungen verfälschen
- Verschleppter Gehalt < LLOQ (0.37 µg/g)



- Bei Proben oberhalb des Massenanteils von S2 kann es zu Verschleppungen kommen

## Ein großes Dankeschön an ...



**Nationales Referenzlabor für Tierisches Protein in Futtermitteln**  
Referenzlabor für GVO-Analyse

**Danke für Ihre Aufmerksamkeit!**



Vincent Blaschke

T +49 30 18412-25111

vincent.blaschke@bfr.bund.de

Bundesinstitut für Risikobewertung

bfr.bund.de

**BfR** | Risiken erkennen –  
Gesundheit schützen

Verbraucherschutz zum Mitnehmen

**BfR2GO – das Wissenschaftsmagazin des BfR**


[bfr.bund.de/de/wissenschaftsmagazin\\_bfr2go.html](https://bfr.bund.de/de/wissenschaftsmagazin_bfr2go.html)

Folgen Sie uns

 @bfrde | @bfren | @Bf3R\_centre

 @bfrde

 [youtube.com/@bfr\\_bund](https://youtube.com/@bfr_bund)

 [social.bund.de/@bfr](https://social.bund.de/@bfr)

 [linkedin.com/company/bundesinstitut-f-r-risikobewertung](https://linkedin.com/company/bundesinstitut-f-r-risikobewertung)