

Setting up of a liquid chromatography-high resolution tandem mass spectrometry method for the detection of caseins in food. A comparison with ELISA method

Daniela Gastaldi,¹ Claudio Baiocchi,¹ Valeria Giancotti,² Elisabetta Genta,³ Lucia Decastelli⁴

¹Dipartimento di Chimica, Università di Torino; ²Marini Group, Moncalieri; ³Marini Group Laboratorio, Rivoli; ⁴Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Controllo Alimenti e Igiene delle Produzioni, Torino, Italy

Abstract

Determination of caseins in food matrices is usually performed by using the competitive-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) technique. However such a technique suffers from a number of limitations. Among these, the applicability to a narrow concentration range, a non linear (logarithmic) response, a non-negligible cross-reactivity and a high cost per kit. At the time of the completion of this study, in case of ELISA positive feedback, there was poor availability in the literature of finding reliable instrumental methods able to determine both qualitatively and quantitatively this class of substances. In the present study, a liquid chromatography-high resolution tandem mass spectrometry (HPLC-HRMS/MS) instrumental method was developed with a high resolution mass spectrometer (Orbitrap). Real samples of sausages in which caseins were detected by ELISA technique were analysed. A casein-free sample of ham was used as a blank. The analytical characteristics of the instrumental method were compared with those of a commercial ELISA test, declared specific for α - and β -casein.

Introduzione

L'allergia al latte è una delle allergie alimentari più comuni nei bambini a partire dalla nascita fino a 1 anno di età. Fortunatamente, l'85% dei bambini si desensibilizza entro i primi 3 anni di vita. Non esiste alcun trattamento per l'allergia, e l'unico modo per controllare i sintomi è evitare l'assunzione degli allergeni. Il latte intero contiene circa il 3% di

proteine, l'80% delle quali è rappresentato dalle caseine, le quali sono considerate i principali allergeni presenti nel latte (Natale, 2004), anche se è stato dimostrato che la maggior parte delle proteine del latte, ancorché presenti a basse concentrazioni, sono potenziali allergeni (Wal, 2004).

Per la determinazione della caseina in matrici alimentari, si utilizza attualmente la tecnica *competitive-enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), la quale però soffre di una serie di limitazioni. Tra queste l'applicabilità in un intervallo di concentrazioni piuttosto ristretto (1,5-4,5 ppm in soluzione), la risposta non lineare (logaritmica) caratterizzata quindi da maggiore incertezza, un costo *pro kit* elevato, e una non trascurabile *cross-reactivity* (Rozenfeld, 2002). Proprio per quest'ultimo motivo, in caso di riscontro ELISA positivo, sono necessarie analisi di conferma. Attualmente, in letteratura c'è scarsa disponibilità di metodi strumentali affidabili di determinazione qualitativa e quantitativa di questa classe di sostanze.

Nell'ultimo decennio, la spettrometria di massa è diventata il principale strumento per l'identificazione di peptidi e proteine. Il campione viene digerito con una proteasi, solitamente tripsina, e i peptidi prodotti vengono separati in *high-performance liquid chromatography* (HPLC) e analizzati in *tandem mass spectrometry* (MS/MS). L'identificazione della sequenza amminoacidica dei diversi frammenti proteolitici viene effettuata mediante un algoritmo di ricerca in un database, sulla base dei relativi spettri MS/MS. La sequenza amminoacidica di appropriati peptidi identifica in modo univoco la proteina di cui sono parte.

In questo lavoro è stato sviluppato un metodo strumentale *liquid chromatography-high resolution tandem mass spectrometry* (HPLC-HRMS/MS) con uno spettrometro di massa ad alta risoluzione (Orbitrap) per la determinazione di caseine in matrici carnee. La metodica è stata messa a punto su campioni di insaccati in cui la presenza di caseina era dichiarata in etichetta. Un campione di prosciutto dichiarato esente da caseina è stato utilizzato come *blank*, ovvero come matrice per la costruzione delle rette di calibrazione e per il calcolo della resa di estrazione. Le prestazioni analitiche del metodo strumentale sono state confrontate con quelle di un test ELISA commerciale, dichiarato specifico per α - and β -caseina.

Materiali e Metodi

Circa un grammo di campione di insaccato, finemente sminuzzato, è stato posto in una provetta con tappo a vite, e omogeneizzato con Ultra-Turrax in presenza di 10 mL di tampone

Correspondence: Valeria Giancotti, Marini Group, via Vittime del Vajont 18, 10024 Moncalieri, Italy. Tel. +39.0119592817 - Fax: +39.0119592818. E-mail: vgiancotti@marinigroup.it

Key words: Allergens, Caseins, Liquid chromatography, High resolution mass spectrometry, ELISA test.

Received for publication: 15 January 2013.

Revision received: 30 April 2013.

Accepted for publication: 1 May 2013.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 License (by-nc 3.0).

©Copyright D. Gastaldi et al., 2013
Licensee PAGEPress, Italy
Italian Journal of Food Safety 2013; 2:e27
doi:10.4081/ijfs.2013.e27

TRIS/glicina (0,1 M/0,4 M) a pH 8.7. Dopo riscaldamento sotto agitazione a 45°C per 2 h, i campioni sono stati raffreddati e ultracentrifugati a 20.000 rpm per 30 min. Aliquote del surnatante, dopo digestione con tripsina, sono state analizzate in HPLC-HRMS/MS.

Lo strumento utilizzato è un HPLC Ultimate 3000 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) accoppiato ad un analizzatore di massa ad alta risoluzione (LTQ Orbitrap) con sorgente ionica electrospray (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

Allo scopo di individuare i peptidi più adeguati per l'analisi quantitativa, 50 μ L di una soluzione a 10,0 ppm di caseinati di sodio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in tampone bicarbonato a pH 8.0 (40 mM) sono stati miscelati con 50 μ L di urea e digeriti con tripsina da pancreas bovino (Sigma-Aldrich). I diversi frammenti triptici ottenuti sono stati separati mediante HPLC e rivelati mediante HRMS-MS frammentando gli ioni più abbondanti in ogni spettro. I profili cromatografici degli estratti dei campioni sono stati acquisiti in HRMS/MS, isolando e frammentando soltanto gli ioni di interesse.

Le condizioni analitiche sono le seguenti: colonna RP C18 Phenomenex Synergi (150 mm \times 2,0 mm \times 3 μ m) (Phenomenex, Torrance, CA, USA) con precolonna Phenomenex Security Guard 5 μ m \times 30 mm (Phenomenex); flusso 200 μ L/min; volume di iniezione 20 μ L; temperatura di eluzione: 28°C; fasi mobili: soluzione acquosa di HCOOH 0,05% (A) e CH₃CN (B). Per l'eluizione è stato effettuato un gradiente lineare dal 95 al 45% di A in 45 min.

Le condizioni massa sono le seguenti:
Evento 1: *Fourier transform mass spectrometry* (FTMS) Res 30.000, range m/z: 450-2000;
Evento 2: FTMS, MS/MS dello ione a m/z 742.500 CID 35, Act Q 0,25, Act time 30,00 msec;

Evento 3: FTMS, MS/MS dello ione a m/z 692,900 CID 35, Act Q 0,25, Act time 30,00 msec.

La quantificazione delle caseine è stata eseguita sia mediante calibrazione esterna in matrice sia con il metodo delle aggiunte standard allo scopo di valutare l'esattezza. Prove di recupero sono state effettuate mediante aggiunte standard sul prosciutto dichiarato esente da caseina, dopo averne verificato l'effettiva assenza, alle concentrazioni di 6, 3 e 1,5 µg/g. Per la calibrazione sono state utilizzate 7 soluzioni standard di α-caseina (purezza ≥99%) e β-caseina (purezza ≤97%) (Sigma-Aldrich) nell'intervallo di concentrazione 0-45 µg/mL per l'α-caseina, e 0-75 µg/mL per la β-caseina.

Per i test ELISA è stato seguito il protocollo fornito dalla ditta produttrice (GenProbe casein kit; Hologic GenProbe Inc., San Diego, CA, USA) utilizzando il tampone estraente incluso nel kit.

Per l'identificazione degli amminoacidi è stata usata la notazione internazionale convenzionale con le lettere riportate in Tabella 1.

Risultati e Discussione

Dall'analisi del tracciato cromatografico dei frammenti triptici di caseinati di sodio (Figura 1) sono stati identificati due peptidi (uno proveniente dall'αs1-caseina e l'altro dalla β-caseina), specifici delle caseine bovine (Rif. banca dati *Swiss-Prot*), con peso molecolare 1383,730 uma (ione a doppia carica: 692,869 uma; sequenza: FFVAPFPEVFGK; dall'amminoacido 38 all'amminoacido 49 dell'αs1-caseina) (Figura 2) e peso molecolare 741,450 uma (ione monovalente; sequenza: GPFPIIV; dall'amminoacido 218 all'amminoacido 224 della β-caseina) (Figura 3). Le Tabelle 2 e 3 riportano lo schema di frammentazione dei peptidi di interesse.

Il limite di rivelabilità del metodo era di 49,0 ng/mL per l'α-casina e di 110 ng/mL per la β-caseina. La ripetibilità, calcolata sulla base di 8 determinazioni indipendenti sullo stesso campione (prosciutto esente, positizzato a 3,0 µg/g per entrambe le caseine), era del 3,93% nel caso dell'α-caseina e dell'8,00% nel caso della β-caseina. Il recupero era del 70±5% per

Tabella 1. Notazione internazionale convenzionale degli amminoacidi.

Amminoacido	Sigla	Peso monoisotopico (uma)
Glicina	G	57,0215
Alanina	A	71,0371
Serina	S	87,0320
Prolina	P	97,0528
Valina	V	99,0684
Treonina	T	101,0477
Cisteina	C	103,0092
Isoleucina	I	113,0841
Leucina	L	113,0841
Asparagina	N	114,0429
Acido aspartico	D	115,0269
Glutamina	Q	128,0586
Lisina	K	128,0950
Acido glutammico	E	129,0426
Metionina	M	131,0405
Istidina	H	137,0589
Fenilalanina	F	147,0684
Arginina	R	156,1011
Tirosina	Y	163,0633
Triptofano	W	186,0793

Tabella 2. Frammentazioni del peptide nello spettro di Figura 2 (ione precursore: 1374,7300) che consente di risalire agli amminoacidi costituenti.

Frammento b*	Ordine successivo di frammentazione°	Sigla	Ordine successivo di frammentazione°	Frammento y*
148,0764	1	F	12	1384,7300
295,1441	2	F	11	1237,6616
394,2125	3	V	10	1090,5932
465,2496	4	A	9	991,5247
562,3024	5	P	8	920,4876
709,3708	6	F	7	823,4349
806,4236	7	P	6	676,3665
935,4662	8	E	5	579,3137
1034,5346	9	V	4	450,2711
1181,6030	10	F	3	351,2027
1238,6245	11	G	2	204,1343
1366,7195	12	K	1	147,1128

*In riferimento allo schema tipico di frammentazione delle catene peptidiche; °calcolato a partire dai lati opposti della catena peptidica.

Tabella 3. Frammentazioni del peptide nello spettro di Figura 3 (ione precursore: 742,4498) che consente di risalire agli amminoacidi costituenti.

Frammento b*	Ordine successivo di frammentazione°	Sigla	Ordine successivo di frammentazione°	Frammento y*
58,0287	1	G	7	742,4498
155,0815	2	P	6	685,4283
302,1499	3	F	5	588,3756
399,2027	4	P	4	441,3071
512,2867	5	I	3	344,2544
625,3708	6	I	2	231,1703
724,4397	7	V	1	118,0863

*In riferimento allo schema tipico di frammentazione delle catene peptidiche; °calcolato a partire dai lati opposti della catena peptidica.

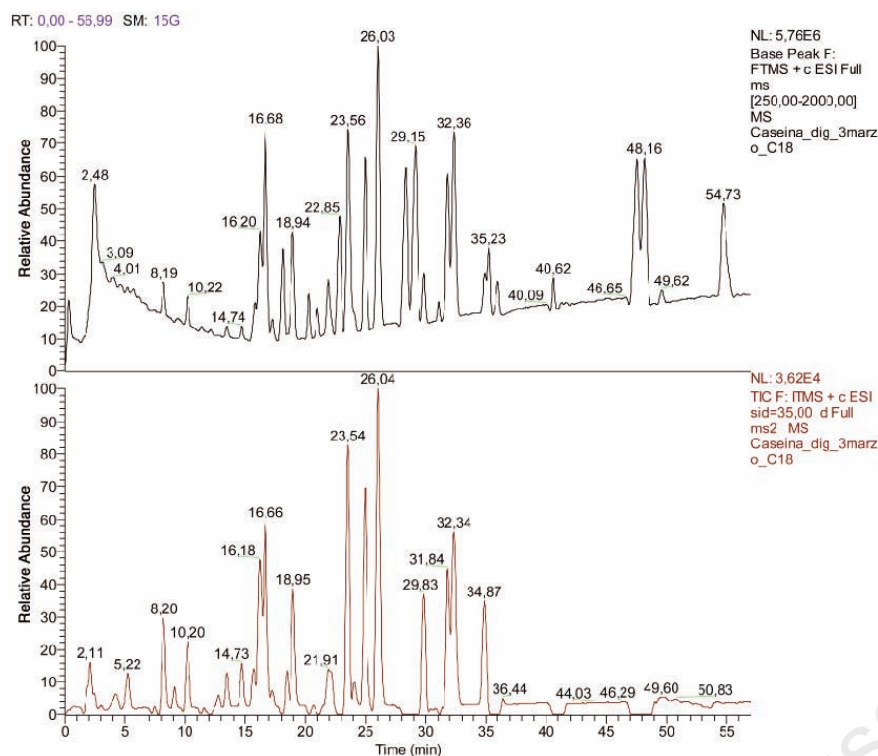


Figura 1. Cromatogramma *full mass spectrometry* (tracciato nero) e *tandem mass spectrometry* (tracciato rosso) di un digerito triptico di caseina.

Tabella 4. Concentrazioni di caseina nei campioni analizzati.

Campione	α 1-caseina (mg/kg)	β -caseina (mg/kg)
Hamburger bovino	nr	nr
Hamburger equino	0,73	1,03
Prosciutto C1	nr	nr
Salame C1	4,47	48,1
Salame C2	nr	nr
Prosciutto C2	7,45	25,5
Prosciutto C3	27,7	10,2

nr, non rinvenuto.

Tabella 5. Confronto dei risultati ottenuti con i diversi metodi.

Sigla campione	Concentrazione (HPLC-HRMS/MS) mediante calibrazione esterna (mg/kg)	Concentrazione (HPLC-HRMS/MS) mediante aggiunte standard (mg/kg)	Concentrazione (ELISA) (mg/kg)
C1 (0 ppm)	nr	nr	LOD
C2 (5,5-7,0 ppm)	6,50	6,13	6,55
SA1*	5,93	5,75	5,14
P2*	11,1	10,3	10,6
HE2*	1,66	1,02	0,54
SA2*	nr	nr	nr

HPLC-HRMS/MS, *liquid chromatography-high resolution tandem mass spectrometry*; ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*; C1, campione di controllo 1 fornito con il kit ELISA; nr, non rinvenuto; LOD, *limit of detection*; C2, campione di controllo 2 fornito con il kit ELISA; SA1, campione di salame 1; P2, campione di prosciutto 2; HE2, campione di hamburger 2; SA2, campione di salame 2. *Campioni di salami, prosciutto e hamburger equino diversi dai precedenti.

entrambe le caseine. Le concentrazioni di caseina nei campioni reali analizzati sono riportate in Tabella 4.

I risultati indicano una buona ripetibilità del metodo, un ampio intervallo dinamico lineare (oltre 40 ppm) e limiti di rivelabilità e quantificazione dello stesso ordine di quelli del metodo ELISA.

È interessante notare che, nei campioni testati, soprattutto in un campione di salame, la concentrazione di β -caseina è risultata molto maggiore della concentrazione di α -caseina.

Per il confronto dei parametri analitici del metodo strumentale con quelli del metodo ELISA l'estrazione delle caseine è stata effettuata seguendo il protocollo ELISA e utilizzando l'estrattore fornito dal kit commerciale; la misura della concentrazione è stata eseguita con entrambe le tecniche analitiche, utilizzando gli stessi calibratori del kit.

In generale, i valori forniti dall'ELISA concordavano molto bene con quelli ottenuti mediante il metodo strumentale per l' α 1-caseina. Il confronto tra i risultati ottenuti con i due metodi sono riportati in Tabella 5. Come si può evincere dalla tabella, i risultati ottenuti con il metodo della concentrazione esterna, non si discostano in modo significativo dai valori ottenuti con il metodo delle aggiunte standard, indicando una buona accuratezza del metodo utilizzato.

Conclusioni

I risultati ottenuti hanno messo in evidenza che l'anticorpo del test ELISA da noi utilizzato, sebbene dichiarato specifico per le α - e β -caseine, in realtà ha un'affinità maggiore per la α -caseina, dovuta a una più favorevole cinetica di reazione. A riprova di questo, diluizioni diverse dell'estratto di salame in cui era presente una maggiore concentrazione di β -caseina, analizzate con l'ELISA hanno fornito

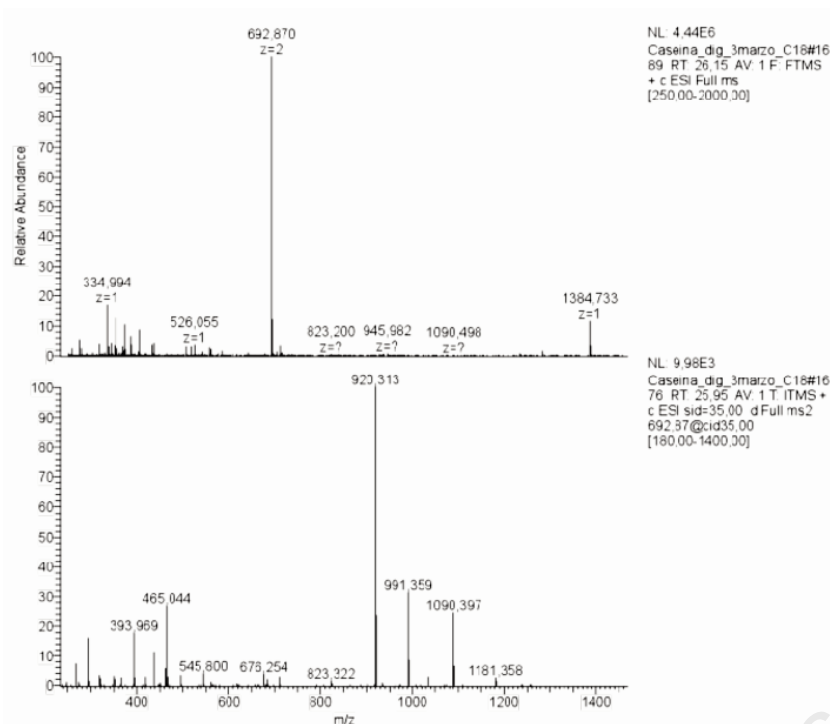


Figura 2. Spettro di massa del picco a 26.03 min e *tandem mass spectrometry* dello ione a range m/z 692.87⁺².

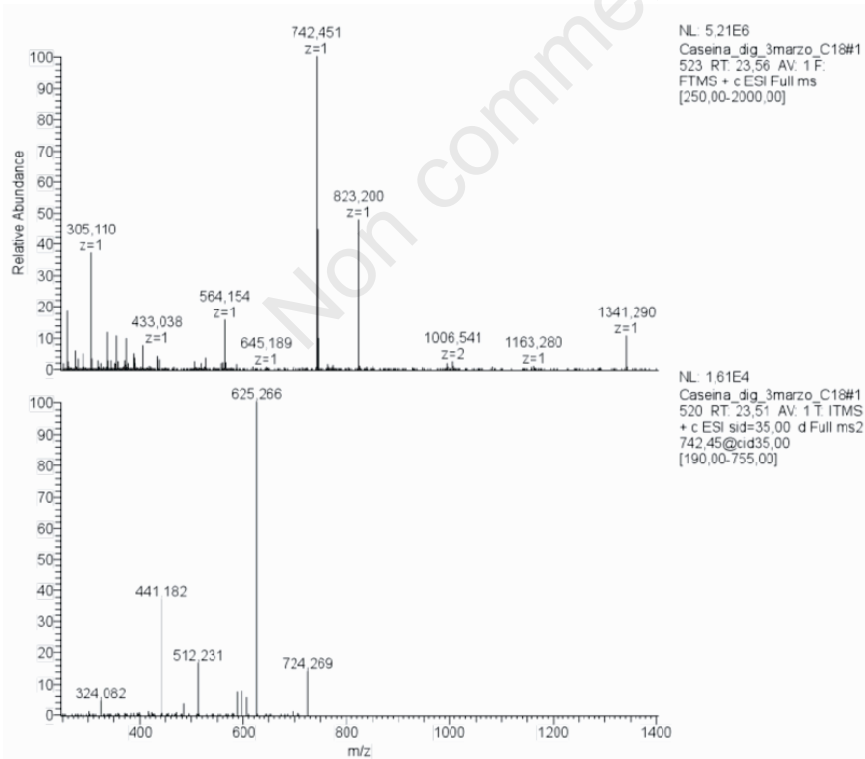


Figura 3. Spettro di massa del picco a 25.56 min e *tandem mass spectrometry* dello ione a range m/z 742.45⁺¹.

valori di concentrazione di caseina sul campione crescenti all'aumentare della diluizione in quanto al diminuire della α -caseina diventava cineticamente più competitiva la forma β .

Bibliografia

- Natale M, Bisson C, Monti G, Peltran A, Perono-Garoffo L, Valentini S, Fabris C, Bertino E, Coscia A, Conti A, 2004. Cow's milk allergens identification by two-dimensional immunoblotting and mass spectrometry. *Mol Nutr Food Res* 48:363-9.
- Rozenfeld P, Docena GH, Anon MC, Fossati CA, 2002. Detection and identification of a soy protein component that cross-reacts with caseins from cow's milk. *Clin Exp Immunol* 130:49-58.
- Wal JM, 2004. Bovine milk allergenicity. *Ann Allerg Asthma Im* 93(Suppl.3):s2-s11.