

# Frisch oder aufgetaut? Evaluation verschiedener NMR-Strategien zur Authentizitätsüberprüfung von Fisch

Kaltenbach, K.<sup>1,2,3</sup>, Kuballa, T.<sup>2</sup>, Schröder, U.<sup>4</sup>, Fritsche, J.<sup>4</sup>, Bunzel, M.<sup>3</sup>, Haase, I.<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Max Rubner-Institut, Nationales Referenzzentrum für authentische Lebensmittel, 76131, Karlsruhe, Deutschland

<sup>2</sup>Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Karlsruhe, 76187, Karlsruhe, Deutschland

<sup>3</sup>Karlsruher Institut für Technologie, Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung Lebensmittelchemie und Phytochemie, 76131, Karlsruhe, Deutschland

<sup>4</sup>Max Rubner-Institut, Institut für Sicherheit und Qualität bei Milch und Fisch, 24103, Kiel, Deutschland

<sup>5</sup>Max Rubner-Institut, Nationales Referenzzentrum für authentische Lebensmittel, 95326, Kulmbach, Deutschland

## Hintergrund

**Fisch** zählt zu den Top 10 der am häufigsten verfälschten Lebensmittel der EU. Eine Überprüfung der Authentizität von Fisch ist somit für die amtliche Lebensmittelüberwachung zum Schutz der Verbraucherinnen und Verbraucher vor Täuschung relevant. Gemäß Art. 35 (1) Buchst. d) der Verordnung (EU) 1379/2013 müssen Fischereierzeugnisse, wie bspw. Ganzfische oder Fischfilets, bei entsprechender Vorbehandlung mit der Angabe „aufgetaut“ gekennzeichnet werden. Eine fehlende Angabe würde ein frisches Fischereierzeugnis implizieren und somit Verbraucherinnen und Verbraucher irreführen. Eine standardisierte (z.B. nach § 64 LFGB, DIN ISO 17025) Überprüfungsmethode für diese Thematik ist demnach für die amtliche Lebensmittelüberwachung notwendig.

Die **Kernspinresonanz-Spektroskopie (NMR-Spektroskopie)** ist ein immer wichtiger werdendes analytisches Werkzeug zur Authentizitätsuntersuchung von Lebensmitteln. Sie zeichnet sich durch eine schnelle und v.a. eindeutige Analytik aus. Mittels NMR können unpolare als auch polare Metaboliten erfasst werden, welche wiederum zielgerichtet oder nicht-zielgerichtet ausgewertet werden können.

## Versuchsdesign und Methoden

Untersuchung der **Lipidfraktion** von Fischproben (bei 400 MHz)

- <sup>1</sup>H-NMR: Schnell, sensitiv (Abb. 1, A)
- <sup>1</sup>H-NMR + definierte Signalunterdrückung von Majorsignalen: Screening auf Minor-komponenten (Abb. 1, B)
- <sup>13</sup>C-NMR: Bessere Auflösung der Fettsäuren (Abb. 1, C)
- <sup>31</sup>P-NMR: Bessere Auflösung der Phospholipide inkl. Abbauprodukte (Abb. 1, D)

Untersuchung der **polaren Fraktion** von Fischproben (bei 400 MHz)

- **Presssaft**, <sup>1</sup>H-NMR: Abbildung der Metaboliten ohne größeren Einfluss (Abb. 1, E)
- **Wässriger Extrakt**, <sup>1</sup>H-NMR: Metaboliten nach Homogenisieren (Abb. 1, F)

Jeweils Protein-entfernung erforderlich, hier mittels Ultrafiltration.

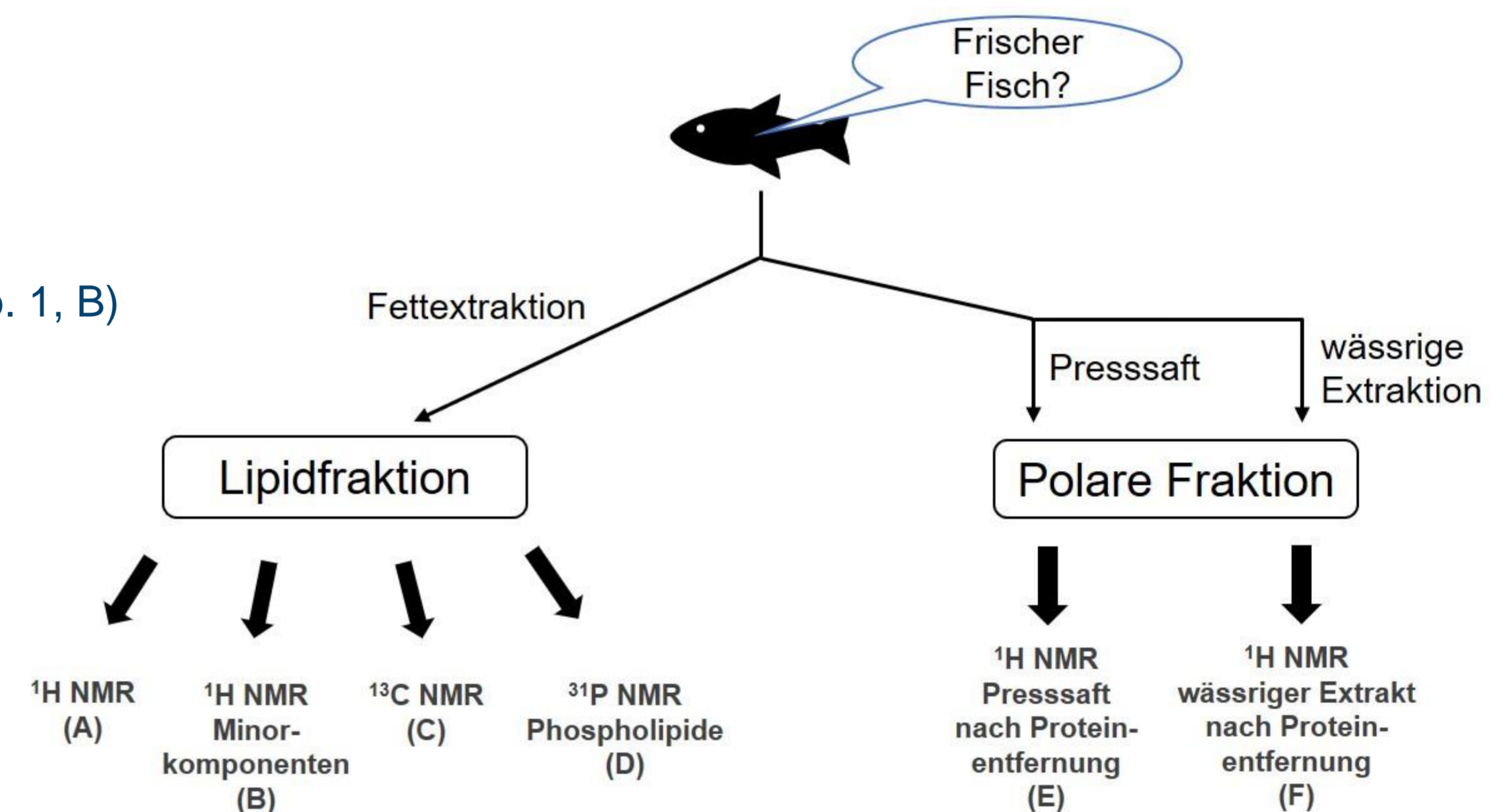
→ **Mehrere NMR-Methodenansätze sind möglich.**

→ Durch die Analyse von **96 Fischproben** (58 frisch, 38 aufgetaut; Kabeljau-, Forellen- und Makrelenproben) und **multivariate Datenauswertung** wurden diese hinsichtlich ihrer Leistung (Durchschnitt der korrekten Klassifizierung und Anwendbarkeit) beurteilt.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup> Kaltenbach et al. submitted

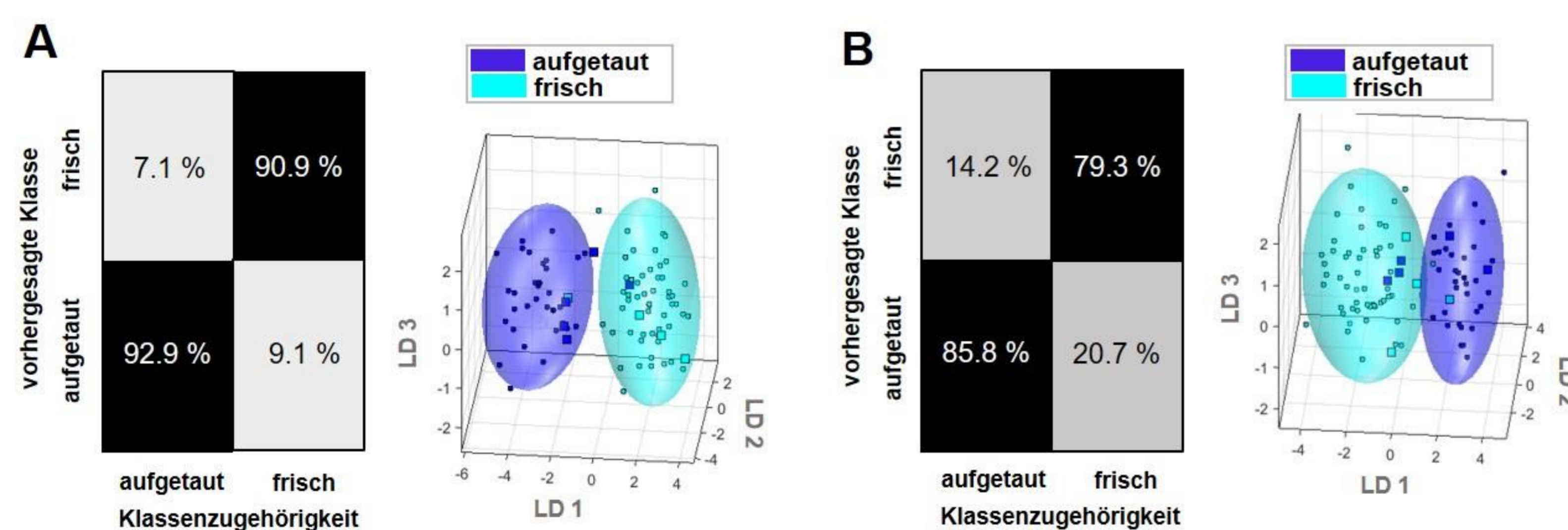
**Multivariate Datenauswertung** (nicht-zielgerichtet)

- Hier: Aufbau & interne Validierung von binären Klassifizierungsmodellen, Hauptkomponentenanalyse in Kombination mit linearer Diskriminanzanalyse (**PCA-LDA**, MATLAB)
- Datenvorbehandlungen: Referenzierung, Normalisierungen (ggf. Probeneinwaage, Standardsignal), Bucketierung, Selektion relevanter Buckets, log-Transformation (MATLAB)



**Abbildung 1:** Übersicht des Versuchsdesigns zur Identifizierung geeigneter NMR-Methoden zur Unterscheidung von frischem und aufgetautem Fisch.

## Ergebnisse



**Abbildung 2:** Ergebnisse der Monte Carlo Kreuzvalidierung zur Evaluation der Güte der Klassifikationsmodelle durch die PCA-LDA für die Vorhersage von **frischem (türkis)** oder **aufgetautem Fisch (blau)**.

**A:** Lipidfraktion, <sup>1</sup>H-NMR Minor-komponenten-Screening. **B:** Polare Fraktion, wässriger Extrakt. **Jeweils rechts:** Konfusionsmatrix mit der Häufigkeit der richtigen Zuordnung in Prozent; **jeweils links** Diskriminanzraum von einem Kreuzvalidierungsdurchlauf, mit 95%igem Prognoseellipsoid.

Aufgebaute Klassifizierungsmodelle zeigen **unterschiedliche Ergebnisse** (s. auch Abbildung 2).

**Lipidfraktion:**

- <sup>1</sup>H-NMR: Korrekte Klassifizierung von ca. 90,0 %
- <sup>1</sup>H-NMR Minor-komponenten-Screening: Korrekte Klassifizierung von ca. 91,9 %
- <sup>13</sup>C-NMR: Keine Klassentrennung
- <sup>31</sup>P-NMR Phospholipid-Screening: Tendenz zur Trennung, korrekte Klassifizierung von ca. 80,9 %

→ **Vielsprechende Ergebnisse durch <sup>1</sup>H-NMR-Messungen**

→ <sup>31</sup>C-NMR-Messungen und <sup>31</sup>P-NMR-Messungen sind vernachlässigbar

**Polare Fraktion:**

- Presssaft, <sup>1</sup>H-NMR: Korrekte Klassifizierung von ca. 84,3 %
- Wässriger Extrakt, <sup>1</sup>H-NMR: Korrekte Klassifizierung von ca. 82,6 %

→ Presssaft liefert besseres Ergebnis, jedoch ungeeigneter hinsichtlich Probenvorbereitung (Gewinnung des Presssaftes nur durch hohe Zentrifugalkraft, oftmals Verstopfung der Filter bei Protein-entfernung), **hier Vorzug des wässrigen Extraktes.**

## Fazit und Ausblick

**Unterschiedliche NMR-Methoden** zur Differenzierung von frischem und aufgetautem Fisch sind denkbar, diese unterscheiden sich jedoch in ihrer **Klassifikationsgüte und Anwendbarkeit**. Die vielversprechendsten Methoden sind **zwei <sup>1</sup>H-NMR-Methoden** zur Untersuchung der **unpolaren Metaboliten** (korrekte Klassifizierung von ≥ 90 %) und **eine <sup>1</sup>H-NMR-Methode** zur Untersuchung der **polaren Metaboliten** (korrekte Klassifizierung von 83 %).

**Ausblick:** Durch die **Analyse neuer Proben** sollen diese Modelle weiter ausgebaut werden. Zudem sollen die **spektralen Bereiche** (und im Idealfall Markersubstanzen), die für die Differenzierung relevant sind, identifiziert werden.