





# Was essen wir?

## Qualitätsanalytik von Lebensmitteln durch NMR

**Lucas Köberle<sup>1</sup>, Felix Brauer<sup>1,2</sup>, Prof. Dr. Paul Rösch<sup>1</sup> und  
Prof. Dr. Stephan Schwarzinger<sup>1,2</sup> in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Klaus Träger<sup>3</sup>,  
Dr. Karl-Heinz Schwind<sup>4</sup>, Prof. Dr. Fredi Schwägele<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> Nordbayerisches Zentrum für hochauflösende NMR-Spektroskopie im Forschungszentrum für Bio-Makromoleküle (BIOmac), Universität Bayreuth

<sup>2</sup> ALNuMed GmbH – Application Laboratory for Nutrition and Medical Products, Bayreuth

<sup>3</sup> Institut für Sicherheit und Qualität bei Fleisch und

<sup>4</sup> Arbeitsgruppe für Analytik, Max-Rubner-Institut, Kulmbach

**Was landet auf unseren Tellern? Dessen glaubten wir uns sicher zu sein, bis wir Anfang 2013 eines Besseren belehrt wurden. Anstelle von Rindfleisch wurde in großem Stil Pferdefleisch vor allem in Tiefkühlkost und Hackfleischprodukten verarbeitet. Obwohl keine Gesundheitsgefährdung bestand war der Schaden immens, denn zahlreiche Produkte mussten aus den Regalen entfernt werden. Als Kunden sind wir bereit für qualitativ hochwertige Waren mehr Geld auszugeben, als für minderwertige Produkte – aber wir verlassen uns darauf, dass hochwertige Qualität nicht nur versprochen, sondern tatsächlich auch geliefert wird. Mit aktuellen Möglichkeiten und Methoden der Lebensmittelanalytik lässt sich die Lebensmittelqualität sehr genau feststellen. Allerdings waren solche Qualitätsuntersuchungen bisher nur mit erheblichem finanziellen und zeitlichen Aufwand möglich und konnten nicht in großer Breite durchgeführt werden. Nun steht mit der NMR-Spektroskopie eine Methode zur Verfügung, mit der Qualitätsanalytik bei niedrigen Kosten und hohem Durchsatz durchgeführt werden kann und die damit bezahlbare, qualitativ hochwertige Lebensmittel garantiert.**

Bei Lebensmitteln hat der Qualitätsbegriff eine besondere Stellung – sowohl für Kunden als auch für Hersteller. Dabei bedeutet Qualität für Konsumenten und Produzenten von Lebensmitteln aber nicht immer das Gleiche. Während Hersteller viele gesetzliche Auflagen betreffend Inhaltsstoffen und Höchstmengen von Schadstoffen als wichtige Qualitätsparameter beachten müssen, treten für den Kunden heute Parameter wie die Authentizität der gekauften Lebensmittel in den Vordergrund, sei es Authentizität betreffend Sorte, biologische Verarbeitung oder geografische Herkunft. Insbesondere für ökologisch produzierte Lebensmittel regional genau definierten Ursprungs sind Kunden bereit einen höheren Preis zu bezahlen. Während der analytische Nachweis von Sorten beispielsweise mittels Genanalysen möglich ist, kann die geografische Herkunft durch Isotopenanalyse ermittelt werden. Allerdings sind diese Methoden sehr aufwändig und erlauben daher nur stichprobenartige Kontrollen. Wie der Pferdefleischskandal [1] dieses Jahr bereits gezeigt hat, reagieren die Kunden sehr sensibel auf Verfälschungen von Lebensmitteln selbst dann, wenn überhaupt keine gesundheitliche Gefährdung besteht. Den Schaden haben neben den Kunden und dem Handel vor allem auch jene Hersteller zu tragen, die unwissend verfälschte Rohwaren verarbeiteten.

## Was NMR-Spektroskopie kann

Abhilfe hierfür verspricht die magnetische Kernresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie; nuclear magnetic resonance), eine Technik, die ähnlich auch in der Medizin in Form der Kernspintomographie eingesetzt wird. Bei NMR-Spektroskopie wird die Reaktion einer magnetisch aktiven Atomsorte, z.B.  $^1\text{H}$  oder  $^{13}\text{C}$ , in einem starken äußeren Magnetfeld auf einen Radiofrequenzpuls gemessen. Aus den resultierenden Signalen lassen sich Schlüsse auf die chemische Umgebung dieser Atome und damit auf die Identität der untersuchten Substanz ziehen.

Da die NMR-Spektroskopie die einzige Methode ist, mit der sich sowohl Struktur als auch Dynamik von Molekülen charakterisieren lassen, wird sie unter anderem zur Erforschung medizinisch relevanter Fragen – etwa den molekularen Grundlagen von Lebensmittelallergien, den Grundlagen der bakteriellen Transkription für die Entwicklung neuer Antibiotika oder den Ursachen von Prionenerkrankungen – eingesetzt [2–5]. Letztendlich ist die NMR-Spektroskopie eine quantitative Methode, die aufgrund der heute verfügbaren Technik in der Lage ist, Dutzende von Molekülsorten parallel in derselben Messung zu identifizieren und ihre Menge zu quantifizieren. Aufgrund des technischen Fortschrittes der vergangenen Jahre sind die mittels NMR-Spektroskopie durchgeführten Untersuchungen so reproduzierbar, dass selbst Konzentrationsunterschiede im Bereich 1:1.000.000 absolut verlässlich wiedergegeben werden können.

NMR-Spektroskopie bietet damit die Voraussetzungen für eine schnelle und umfassende Qualitätsprüfung von Lebensmitteln [6] – in einer Messung von nur wenigen Minuten lassen sich mehrere Dutzend Inhaltsstoffe identifizieren und quantifizieren, ohne dass die Lebensmittel vorher einer chromatografischen Trennung unterzogen werden müssen. Mittels NMR-Spektroskopie können mehr Proben untersucht und mehr kritische Parameter gemessen werden, als dies mit den bisherigen Methoden der Lebensmittelanalytik möglich war. Hersteller und Verarbeiter von Lebensmitteln erhalten sehr schnell und kostengünstig ein Inhaltsprofil beispielsweise von Rohwaren, was zu einer entscheidenden Steigerung der Lebensmittelsicherheit und damit des Konsumentenvertrauens beiträgt.

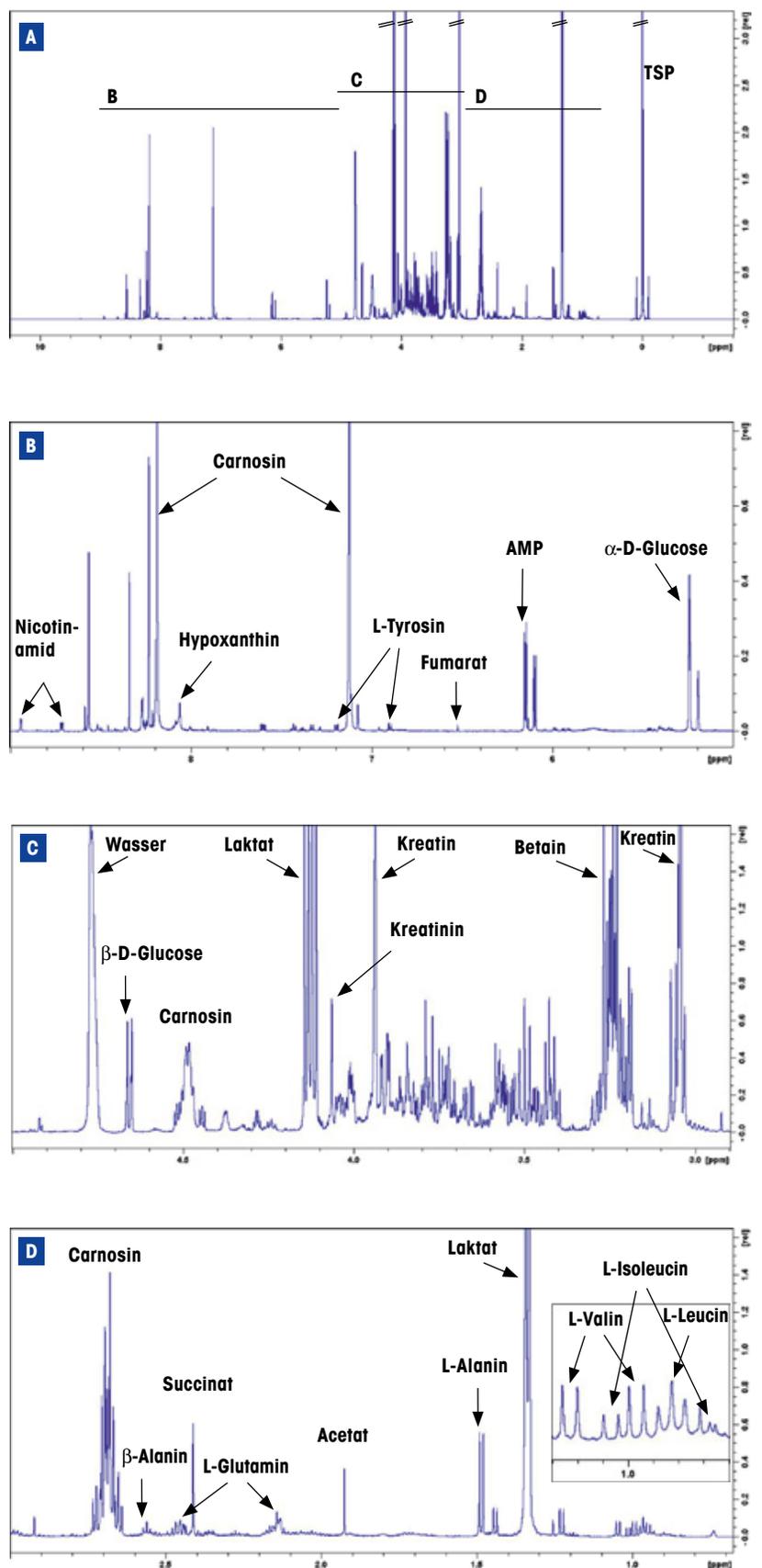
Ein Alleinstellungsmerkmal der NMR-Spektroskopie ist die Reproduzierbarkeit der Spektren bezüglich Lage und Intensität der Signale. In den vergangenen Jahren hat sich die NMR-Spektroskopie auch zur wichtigsten Methode

für die Gesamtanalyse von Stoffwechselprodukten – Metabonomik – und Abbauprodukten in Lebensmitteln entwickelt. Hierfür werden Gruppen von Proben mithilfe statistischer Methoden, etwa der Hauptkomponentenanalyse (principal component analysis, PCA), auf Unterschiede untersucht. Auf Basis der gefundenen Unterschiede (Hauptkomponenten; principal components, PC) können statistische Modelle aufgebaut und neue, unbekannte Proben durch Vergleich mit diesen Modellen beispielsweise einer Sorte, einer Herkunft oder einem Produktionsjahr zugeordnet werden, wie dies für Weine bereits möglich ist [7]. Sogar Verarbeitungsprozesse – etwa bei Fruchtsäften – lassen sich noch im Endprodukt identifizieren [8]. Während bei den meisten analytischen Methoden nur Parameter gefunden werden, nach denen gezielt gesucht wird, erlaubt die NMR-Spektroskopie durch den Vergleich mit den Referenzspektren auch die Detektion von unbekanntem Verfälschungen oder Qualitätsabweichungen.

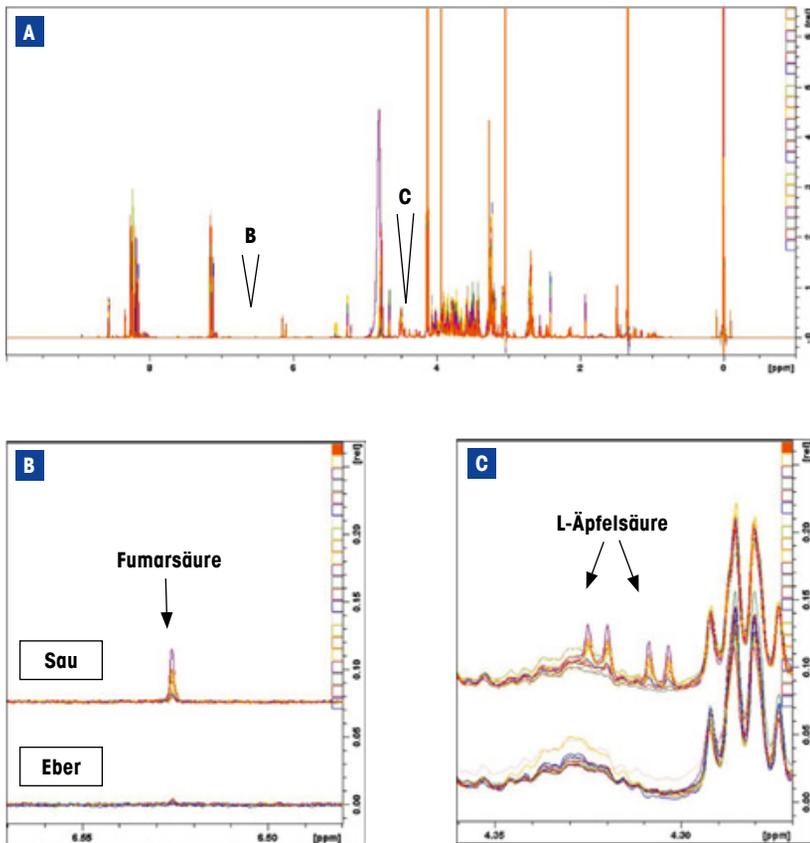
Vor kurzem gelang es uns, durch NMR-spektroskopische Analysen im Endprodukt Eber und Sau und die Verarbeitung durch verschiedene Grillverfahren zu unterscheiden.

## Eber oder Sau?

Für die Erstellung der statistischen Modelle wurde eine Datenbanken mit NMR-Spektren von authentischen Proben von Ebern und Sauen sowie von Schweinekoteletts, die unter kontrollierten Bedingungen entweder auf einem Holzkohlegrill, einem Gasgrill oder einem Elektrogrill zubereitet worden waren, erstellt. Alle Fleischstücke wurden nach der Schlachtung bzw. der Zubereitung tiefgefroren und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Für die NMR-Analyse wurde den Fleischstücken in gefrorenem Zustand ein fettfreies Stück von etwa 1 g entnommen und in flüssigem Stickstoff mit einer MM400 Schwingmühle (Retsch GmbH) gemahlen. Zur Vermeidung der Veränderung dieser Proben durch Enzyme wurde Perchlorsäure (70 %, C. Roth) zugegeben. Unlösliche Bestandteile des Fleischextraktes wurden durch Zentrifugation entfernt. Der pH-Wert der Probe wurde mit Natronlauge auf pH 7,0 eingestellt. Als interne Standards wurden 10 %  $\text{D}_2\text{O}$  (99,8 %, Sigma-Aldrich) und Spuren von Trimethylsilylpropionat ( $\text{d}_6$ -TSP, Eurisotop) zugegeben. Die Proben wurden in der Folge mit standardisierten Pulsprogrammen (noesygppr1d; Bruker Biospin GmbH) bei 298 K und einer Messfrequenz von 600 MHz mit einem Bruker Avance II+ Spektrometer (Bruker BioSpin GmbH) gemessen. Die Spektren wurden mit TopSpin 3.2 automatisch prozessiert und anschließend mit AMIX 3.9.14 (jeweils Bruker BioSpin GmbH) statistisch ausgewertet. Insgesamt wurde das Spektrum in



**Abb. 1** (A)  $^1\text{H}$ -600-MHz NMR Spektrum einer repräsentativen Schweinefleischprobe (Perchlorsäureextrakt Sau); die X-Achse zeigt die NMR-chemische Verschiebung in ppm, die Y-Achse die jeweilige Signalintensität in relativen Einheiten. Das Signal bei 0 ppm ist der interne Standard (TSP) zur Referenzierung der chemischen Verschiebung und der Signalintensität. Zur besseren Darstellung der zugeordneten Signale sind drei Vergrößerungen gezeigt: (B) 4-fach Vergrößerung der Intensität, Abschnitt 9 – 5 ppm; (C) und (D) jeweils 2-fache Vergrößerung, Abschnitte von 5 – 2,9 ppm bzw. 2,9 – 0,7 ppm.

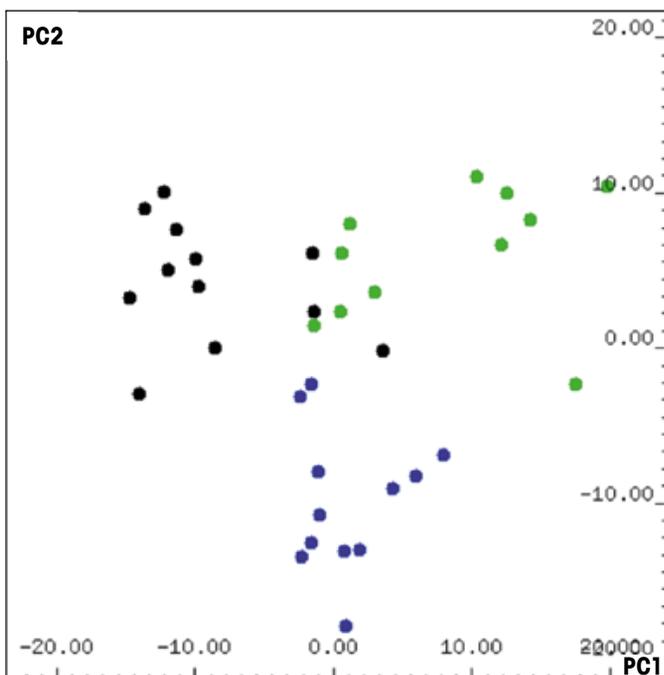


**Abb. 2 (A)** Überlagerung von 22 600-MHz NMR-Spektren von Schweinefleisch, je 11 Proben von Ebern und Sauen. Die Unterschiede zwischen Sau- und Eberproben sind nur in starker Vergrößerung sichtbar. Abbildungen B und C zeigen, dass die Spektren von Sauen zusätzliche Signale aufweisen, wie etwa das Singulett der Fumarsäure bei 6,526 ppm **(B)** und das Doppel-Duplett der Äpfelsäure bei 4,314 ppm **(C)**.

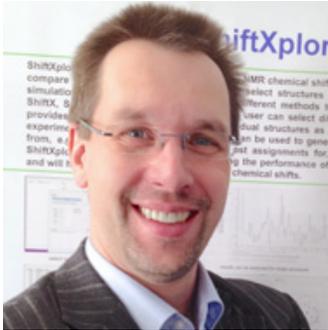
294 Bereiche unterteilt, die als Variablen in die Hauptkomponentenanalyse eingingen. Substanzen wurden durch Literaturvergleich [9] und mithilfe der HMDB- [10] und der BBioRefCode-Datenbank (pH 7.0, Bruker BioSpin GmbH) identifiziert. Da in der statistischen Analyse geringste Unterschiede interpretiert werden, ist ein exaktes und reproduzierbares Vorgehen bei der Probenvorbereitung essentiell.

## Möglichkeiten der Metabonomik

Die Unterscheidung von Sau und Eber wurde vor dem Hintergrund durchgeführt, einen Schnelltest zur Identifizierung von skatolbelastetem Eberfleisch zu entwickeln, das für den typischen Ebergeruch verantwortlich ist. Als erster Schritt ist hierzu eine automatische Unterscheidung von Sau- und Eberfleisch erforderlich. Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum einer repräsentativen Schweinefleischprobe kann in nur 2 m Messzeit aufgenommen werden (Abb. 1). Zahlreiche, in stark unterschiedlichen Konzentrationen vorliegende qualitätsrelevante Substanzen (% bis ppm) können sofort identifiziert werden. Obwohl in den NMR-Spektren von Sau und Eber zunächst keine Unterschiede feststellbar sind (Abb. 2A), zeigen die Vergrößerungen (2B, 2C), dass sich die Spektren von Sau und Eber unter anderem in den Konzentrationen der Metabolite Fumarsäure und L-Äpfelsäure unterscheiden. Diese und andere Unterschiede können für die Zuordnung von unbekanntem Proben verwendet werden. Prinzipiell müssen die Substanzen, welche zur Unterscheidung von Proben beitragen, nicht *a priori* bekannt sein. Bei der Analyse von Grillfleisch, das mit unterschiedlichen Grillverfahren (Holzkohle-, Gas-, Elektrogrill) zubereitet wurde, kann die Unterscheidung bereits ohne Kenntnis der chemischen Art der Unterscheidungsmerkmale erfolgen. Die NMR-Spektren der Grillfleischproben wurden mithilfe einer Hauptkomponentenanalyse untersucht. Der entsprechende Scores-Plot der Hauptkomponenten PC1 und PC2, die bereits 51 % der Varianz der Spektren ausmachen, zeigt deutlich, dass die drei unterschiedlichen Zubereitungsmethoden sich klar im Metabolitenspektrum abbilden und selbst mit der vergleichsweise einfachen Methode der Hauptkomponentenanalyse bereits gut unterschieden werden können (Abb. 3). Damit kann folglich die Zubereitungsform auch einer unbekanntem Probe sicher, schnell und kostengünstig nachgewiesen werden. Die zunächst unbekanntem Identität der Substanzen, welche für die statistische Unterscheidung der Zubereitungsarten verantwortlich sind, kann bei Interesse mittels weiterer Analysen, unter anderem mittels Kombination von Massenspektrometrie mit weiterführenden NMR-Methoden (iMetabonomics, integrierte Metabonomik), identifiziert werden.



**Abb. 3** Auftragung der Hauptkomponenten (principal components PC 1 vs. PC 2) für die <sup>1</sup>H-NMR Spektren der Perchlorsäureextrakte von 32 Grillfleischproben. Blau: Holzkohlg grill; schwarz: Elektrogrill; grün: Gasgrill. Die Hauptkomponenten PC1 und PC2 beschreiben zusammen 51,05 % der gesamten Varianz. Für die Erstellung der bucket-Tabelle wurde ein spektrales Fenster von 10 bis 0 ppm verwendet. Nach Ausschluss hochvariabler Bereiche ergaben sich bei der gewählten bucket-Größe von 0,03 ppm insgesamt 294 Statistikvariablen.



## Stephan Schwarzinger,

geb. 1970, studierte Wirtschaftswissenschaften an der Universität Linz, wo er 1999 promovierte. Es folgte ein Postdoc-Aufenthalt am The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, bis 2000. Anschließend forschte er am Lehrstuhl für Biopolymere an der Universität Bayreuth, wo er 2006 in biophysikalischer Chemie habilitierte und 2008 den Lehrstuhl Biochemie vertrat. Seit 2010 ist er Mitglied am Forschungszentrum für Bio-Makromoleküle (FZ BIOMac) der Universität Bayreuth, wo er seit 2013 außerplanmäßiger Professor ist. Weiterhin ist er Geschäftsführer der ALNuMed GmbH. Sein Forschungsinteresse gilt NMR-Methoden zur Charakterisierung von flexiblen Proteinen, NMR-basierter Lebensmittelanalytik, insbesondere von Getränken, Fleisch und pflanzlichen Lebensmitteln, sowie der Kombination von Analysemethoden.



## Paul Rösch,

geb. 1952, studierte Physik an den Universitäten Karlsruhe und Heidelberg und promovierte anschließend am MPI für Medizinische Forschung, Heidelberg. Anschließend war er Postdoc an der University of Pennsylvania, Medical School, USA, und wissenschaftlicher Mitarbeiter am MPI für Medizinische Forschung, Heidelberg. 1989 habilitierte er in Biophysik an der Universität Heidelberg. Seit 1990 ist er Leiter des Lehrstuhls Biopolymere und seit 2007 geschäftsführender Direktor des Forschungszentrums für Bio-Makromoleküle (FZ BIOMac) der Universität Bayreuth. Seine Forschungsschwerpunkte sind: NMR-basierte biomedizinische Strukturfor-



## Lucas Köberle,

geb. 1989, absolvierte ein Bachelorstudium in Biochemie an der Universität Bayreuth und fertigte 2013 seine Bachelorarbeit über NMR-basierte Metabonomik von Schweinefleisch und Grillgut am am FZ BIOMac der Universität Bayreuth an.



## Felix Brauer,

geb. 1989, absolvierte ein Bachelorstudium in Biochemie und ein Masterstudium in Biochemie und Molekulare Biochemie an der Universität Bayreuth. Seit 2013 ist er wissenschaftlicher Mitarbeiter bei der ALNuMed GmbH und Doktorand am FZ BIOMac. Seine Forschungsinteressen sind die NMR-basierte Lebensmittelanalytik und die Integration von Methoden für die Metabonomik (iMetabonomics).

Wir haben gezeigt, dass die NMR-Spektroskopie in der Lage ist, neben einer Fülle von qualitätsrelevanten Substanzen einer Fleischprobe auch das Geschlecht des Schlachttieres sowie die Art seiner Zubereitung zu bestimmen. An der Erstellung von Modellen für weiterführende Analysen von Fleischproben wird weiter intensiv gearbeitet.

NMR-Spektroskopie erlaubt Analysen von Lebensmitteln zur Bestimmung ihrer Authentizität, ihrer Reinheit und vieler anderer Qualitätsmerkmale. Mit unserer heutigen Kenntnis der Methode, mit den weiterführenden Untersuchungen, die gegenwärtig erprobt werden, hätten viele Lebensmittelskandale – vom Melamin-Milch Skandal bis zum Pferdefleischskandal – kostengünstig und effizient verhindert werden können. Zur Steigerung der Konsumentensicherheit ist die NMR-Spektroskopie eine unentbehr-

liche Methode geworden – damit der Kunde sich sicher sein kann, dass das, was auf der Verpackung steht, tatsächlich auch vor ihm auf dem Teller liegt.

Wir danken Dr. Petra Lehn, Universität Regensburg, Sigrid Schwarzinger, ALNuMed GmbH, und Sophie Vetter, BSc, Universität Bayreuth, für die kritische Durchsicht des Manuskriptes und viele Anregungen.

■ [s.schwarzinger@unibt.de](mailto:s.schwarzinger@unibt.de)

#### Literatur

- [1] Pferdefleischskandal in Europa 2013: [http://de.wikipedia.org/wiki/Pferdefleischskandal\\_in\\_Europa\\_2013](http://de.wikipedia.org/wiki/Pferdefleischskandal_in_Europa_2013)
- [2] Burmann, B.M et al. (2010) Science 328, 501-504
- [3] Burmann, B.M et al. (2012) Cell 150, 291-303
- [4] Berkner, H. & Rösch, P. (2009) Biospektrum 06.09, 618–620
- [5] Camilloni, C. et al. (2012) Biophys J 102, 158–167
- [6] Schwarzinger, S. & Rösch, P. (2012) GIT Labor-Fachzeitschrift 4/2012, 214–215
- [7] Godelmann, R. et al. (2013) J Agric Food Chem 61, 5610–5619
- [8] Spraul, M. et al. (2009) Nutrients 1(2), 148–155
- [9] Jung, Y. et al. (2010) J. Agric. Food Chem. 58 (19), 10458–10466
- [10] Wishart, D.S. et al. (2013) Nucleic Acids Res. 41(D1), D801–807

Foto: pantermedia.de | isseele, Life on White