



QUALITY SERVICES INTERNATIONAL GMBH | DR. CORD LÜLLMANN | BREMEN | GERMANY





QUALITY SERVICES INTERNATIONAL GMBH | DR. CORD LÜLLMANN | BREMEN | GERMANY

Nachweis von Honigverfälschungen

*01. Dezember 2011, Stuttgart
Gudrun Beckh*

Fremdzucker in Honig

- Strecken mit Zuckersirup
 - Sirupe aus Rüben- oder Rohrzucker
 - Hydrolysierte Stärke, z.B. aus Mais oder Reis
 - Reste aus Zufütterung von Zuckern an die Bienen
 - Mischung mit gefiltertem Honig
- Vertrieb dieser Produkte nicht zulässig



Fremdzucker in Honig

- Das Strecken mit Zuckersirup, die Mischung mit gefiltertem Honig oder Reste aus Zufütterung von Zuckern an die Bienen setzt in der Regel aktives Verhalten voraus
- Hochwertiger Honig wird durch Beimischung qualitativ minderwertiger



Fremdzucker in Honig

- Zuckersirup, gefilterter Honig sowie Reste aus Zufütterung
 - nahezu neutrales Aroma
 - organoleptisch daher schwer zu identifizieren
 - Nachweismethoden erforderlich
 - qualitativ
 - quantitativ



Nachweismöglichkeiten

- direkt:
 - Zuckerprofil, Prolin
 - IRMS
 - LC-IRMS
 - Honigfremde Enzyme
 - Elektrophoretische Proteinuntersuchung
- indirekte Parameter
v.a. über Basiskennntnis der Honigsorte



Zuckerprofil

- HPLC-Messung der Honigzucker
- Detektion von Abweichungen hinsichtlich:
 - Fructose/Glucose-Verhältnis (→ Invertzucker-Sirup) verglichen zum Ergebnis der Pollenanalyse
 - auffällige Mengen bestimmter Di- und Trisaccharide (→ Maltose und Maltotriose aus Stärkehydrolysat)





IRMS – allgemeines

- **^{13}C isotope ratio mass spectrometry = ^{13}C Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie**
- AOAC Official Method 988.12 (1991-1996 entwickelt)
- Bienen nutzen C3-Pflanzen zur Honigproduktion. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotopenverhältnisse von C3- und C4-Zuckern sind unterschiedlich → Zumischungen von C4-Zuckern zu Honig können durch Vergleich der ^{13}C -Werte nachgewiesen werden.

Pflanzenart	Beispiele	Bereich der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte
C4	Zuckerrohr, Mais	-10 bis -12
C3	Zuckerrübe, Reis	-22 bis -27



IRMS – Prinzip der Methode

- Bestimmung der stabilen Kohlenstoff-Isotope in Honig und Protein (Protein = interner Standard)
- Unterschiede zwischen Protein- und Honigwerten zeigen die Art des Zuckerzusatzes sowie die ungefähre Menge an Fremdzucker an:
 - negative Differenz: Zusatz von Zucker aus C4-Pflanzen (Nachweisgrenze: 7 % C4-Zucker)
 - positive Differenz : Zusatz von Zucker aus C3-Pflanzen (Nachweisgrenze: 15-30 % C3-Zucker)

¹³C Werte von ausgewählten Sortenhonigen

Sorte	gesamt/unverfälschte Proben	unverfälschte Proben/ durchgeführte Pollenanalyse	Honey $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$			Protein $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$		
			max	min	Ø	max	min	Ø
Akazie	602/ 87 – 14,5%	515/ 257	-24,4	-22,3	-23,9	-24,3	-22,1	-23,9
Linde	254/ 27 – 10,6%	227/ 114	-25,9	-22,7	-24,1	-26,3	-23	-24,3
Wald	277/ 28 – 10,1%	250/ 94	-26,7	-22	-24,9	-26,2	-21,9	-24,7
Raps	63/ 6 – 9,5%	57/ 27	-25,1	-22,2	-24	-25,4	-22,3	-24,2
Sonnenblume	88/ 3 – 3,4%	85/ 22	-26	-23,6	-24,8	-25,9	-23,1	-24,5
Orange	38/ 4 – 10,5%	34/ 20	-27,2	-24,7	-26,3	-27,4	-23,7	-25,7
Klee	91/ 4 – 4,4%	87/ 18	-27,3	-25,1	-26,1	-26,6	-25,5	-25,9
Eukalyptus	43/ 0 – 0%	43/ 9	-26,8	-24,9	-26,3	-25,9	-25	-25,5

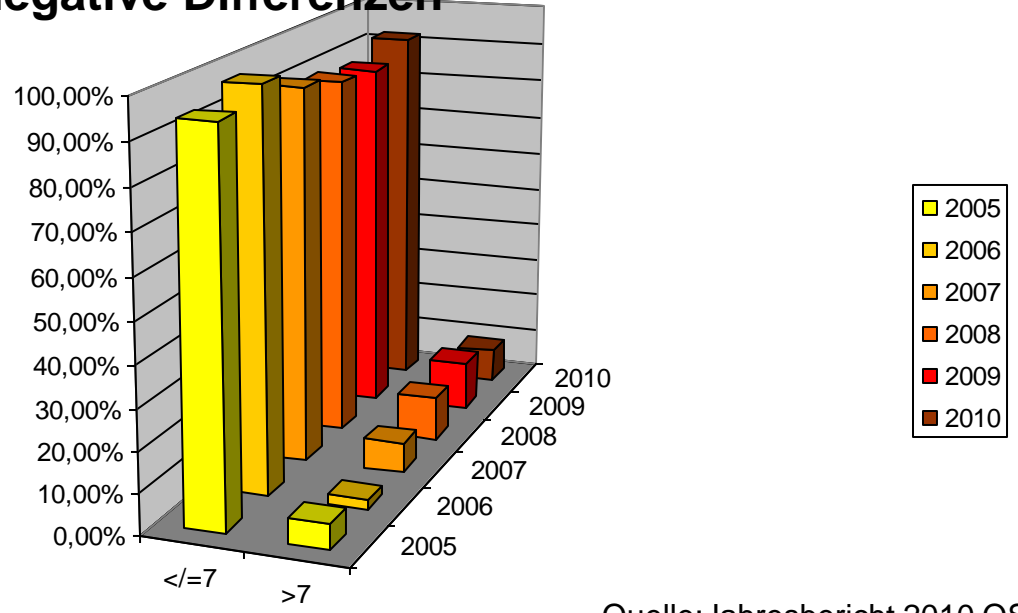
Anzahl der gesamten, verfälschten und unverfälschten (mit oder ohne Pollenanalyse) Proben mit Maximum, Minimum und Mittelwert $\delta^{13}\text{C}$ Honig und $\delta^{13}\text{C}$ Protein Werte für ausgewählte Honigsorten





Ergebnisse ¹³C negative Differenzen

¹³C-Isotopen-Massenspektrometrie Honig incl. Protein vom 01.01.2005 bis 31.12.2010 (max = maximaler Gehalt an C₄-Zuckern)



Quelle: Jahresbericht 2010 QSI



Positive Differenzen ^{13}C

- Bestimmung von C_3 -Zuckern (z.B. Reissirup, Rübenzucker) möglich
 - hohe positive Abweichungen zwischen Protein und Honig von mehr als +1 ‰
 - beruht auf Erkenntnissen, dass honigfremde C_3 -Zucker generell recht hohe ^{13}C -Werte haben (-26 bis -28 ‰)



Zumischungen von C3-Zuckersirupen

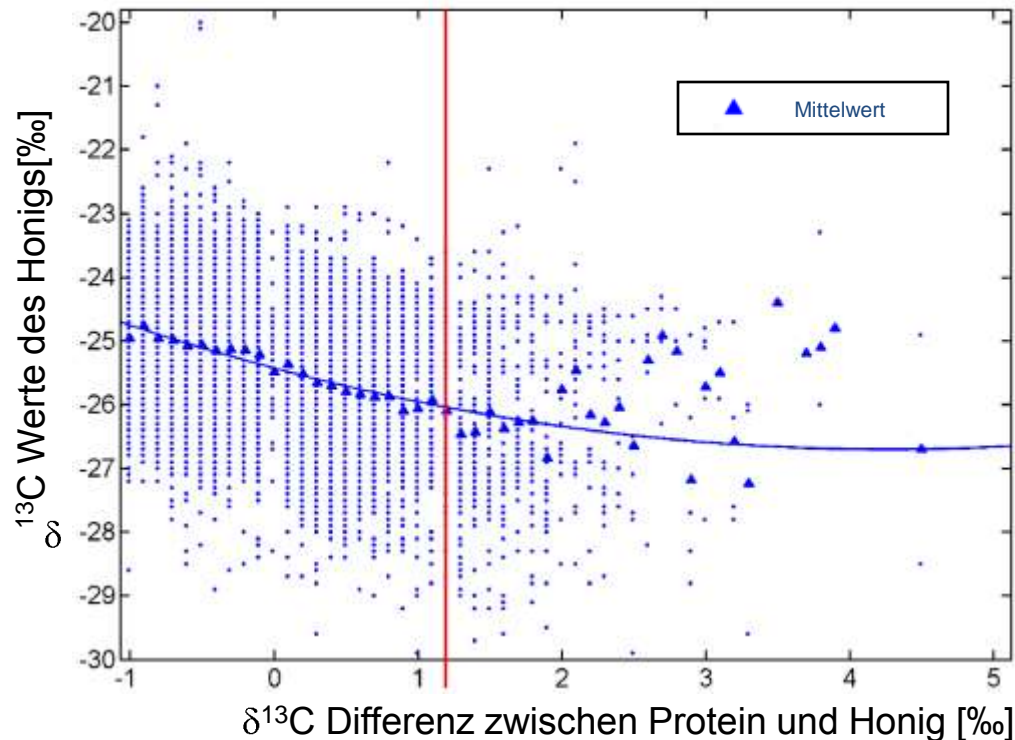
d ¹³ C-Ausgangswert des Honigs	Zumischung von Rübenzucker d ¹³ C = -26.4 ‰			Zumischung von Reissirup d ¹³ C = -27.1 ‰			Zumischung von Reissirup d ¹³ C = -27.8 ‰		
	50 %	25 %	10 %	50 %	25 %	10 %	50 %	25 %	10 %
-21.0	+2.70	+1.35	+0.54	+3.05	+1.53	+0.61	+3.40	+1.70	+0.68
-22.0	+2.20	+1.10	+0.44	+2.55	+1.28	+0.51	+2.90	+1.45	+0.58
-23.0	+1.70	+0.85	+0.34	+2.05	+1.03	+0.41	+2.40	+1.20	+0.48
-24.0	+1.20	+0.60	+0.24	+1.55	+0.78	+0.31	+1.90	+0.95	+0.38
-25.0	+0.70	+0.35	+0.14	+1.05	+0.53	+0.21	+1.40	+0.70	+0.28
-26.0	+0.20	+0.10	+0.04	+0.55	+0.28	+0.11	+0.90	+0.45	+0.18
-27.0	-0.30	-0.15	-0.06	+0.05	+0.03	+0.01	+0.40	+0.20	+0.08

→ Zumischung von Sirupen hat positive Differenzen zur Folge.

Quelle: Poster AOAC 2008

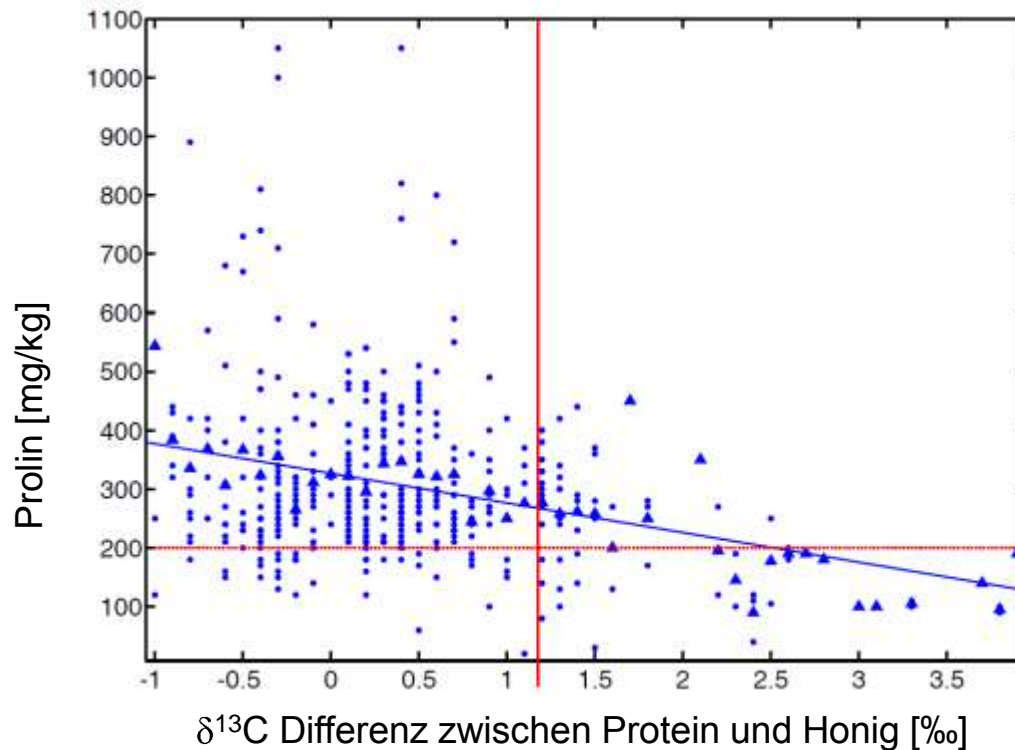


positive Differenzen: ^{13}C -Werte der Honige



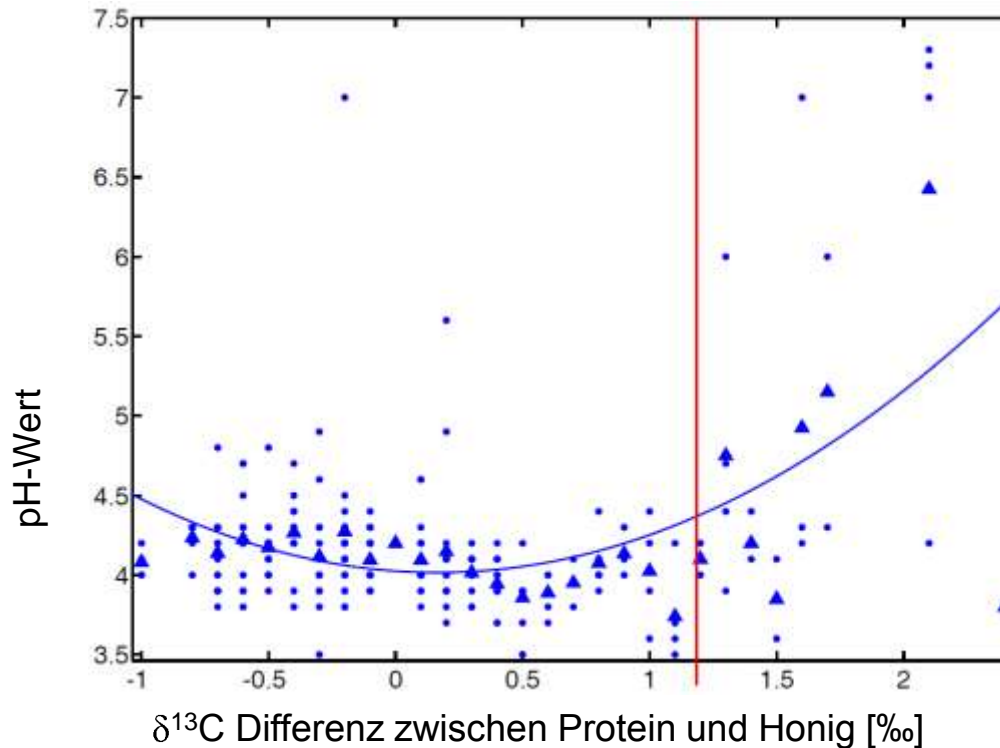
mit höheren positiven Differenzen werden die ^{13}C -Werte der Honige erwartungsgemäß negativer (durch höhere Zumischungsgrade der Sirupe)

positive Differenzen: Prolingehalte



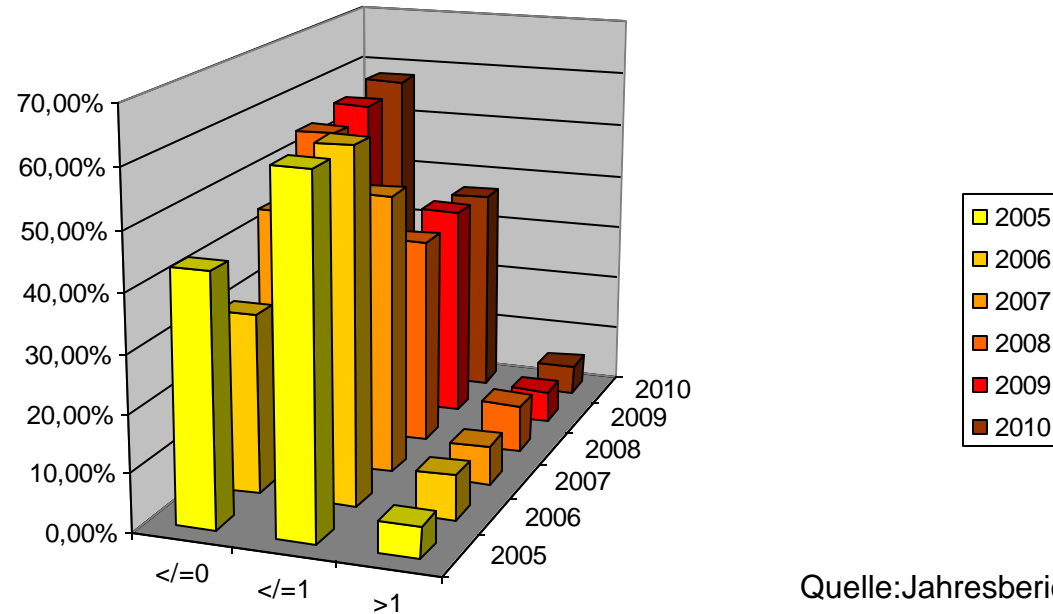
je höher die positive Differenz, desto geringer die Gehalte von Prolin

positive Differenzen: pH-Werte



je höher die positive Differenz, desto höher der pH-Wert

Ergebnisse ¹³C positive Differenzen



Quelle: Jahresbericht 2010 QSI



Zusammenfassung positive Differenzen ^{13}C

- Je höher die Gehalte an honigfremden C3-Zuckern, desto höher ist die via ^{13}C -IRMS ermittelte positive Differenz.
- Die Evaluation von über 1000 Handelshonigen zeigt, dass positive Differenzen mit weiteren Auffälligkeiten einhergehen.
- Ca. 5% aller Honigproben zeigten positive Differenzen von über +1.1 ‰

Quelle: Poster AOAC 2011



LC-IRMS

- IRMS der Honigzucker nach Trennung mittels HPLC
- Bestimmung der Kohlenstoff-Isotopen von Fructose, Glucose, Di- und Trisacchariden





Ergebnisse authentischer, unverfälschter Honige

	average values	range	standard deviation
d ¹³ C fructose [‰]	-25.2	-22.7 to -27.1	0.8
d ¹³ C glucose [‰]	-25.2	-22.3 to -27.2	0.8
d ¹³ C disaccharides [‰]	-25.1	-21.1 to -28.6	1.0
d ¹³ C trisaccharides [‰]	-24.7	-22.1 to -27.6	1.1
difference fru-glu (mono)	0	-0.9 to +0.9 max	0.2
difference mono-di	-0.7	-2.4 to +1.5 max	0.6
difference mono-tri	-0.5	-3.2 to +2.7 max	0.8
honey samples: n = 407			

natürliche Verteilung der $\delta^{13}\text{C}$ values der einzelnen Zuckerfraktionen unverfälschter Honige

LC-IRMS - Beurteilung

- + Zuckersirupe, die aus Mischungen von C3- und C4-Zuckern bestehen, können in einigen Fällen nachgewiesen werden.
- Zuckersirupe, die ausschließlich aus C3-Zuckern bestehen, können nicht nachgewiesen werden.
- Ebenso kann die Menge an zugesetztem Fremdzucker nicht ermittelt werden.



LC-IRMS - Beurteilung

- Untersuchung frisch eingetragener Nektare (gesammelt von Imkern direkt nach dem Eintrag)
→ Auftreten höherer Differenzen zwischen den $\delta^{13}\text{C}$ -Werten muss nicht unbedingt auf Verfälschung zurückzuführen sein
→ birgt die Gefahr falschpositiver Befunde



LC-IRMS - Beurteilung

	$\delta^{13}\text{C}$ - IRMS			$\delta^{13}\text{C}$ - LC-IRMS				Diff. Monos. - Dis.	F/G
	Honig	Protein	Diff.	Fru	Glu	Disacch.	Trisacch.		
Akaziennektar, Ungarn	-24,4	-23,6	0,8	-25	-25,2	-21,5	-23,4	3,5	1,73
Akaziennektar, Ungarn	-25,2	-25	0,2	-25,5	-25,6	-23,1	-24,2	2,4	1,62
Akaziennektar, Ungarn	-24,8	-24,2	0,6	-25	-25,1	-22,7	-24,3	2,3	1,64
Akaziennektar, Ungarn	-23,7	-23,7	0	-23,8	-24	-22,1	-23,2	1,7	1,61
Akaziennektar, Ungarn	-24,5	-24,3	0,2	-24,7	-24,9	-20,4	-23	4,3	1,25
Akaziennektar, Ungarn	-23,3	-22,8	0,5	-24	-23,8	-20	-22,7	4	1,72
Akaziennektar, Ungarn	-23,8	-23,5	0,3	-23,9	-23,3	-18,6	-21,6	5,3	1,61

$\delta^{13}\text{C}$ -Werte [‰] von IRMS- (nach AOAC) und LC-IRMS-Messungen sowie Fructose/Glucose-Verhältnisse (F/G) ausgewählter Robiniennektare



LC-IRMS - Beurteilung

Zusammenfassung:

→ LC-IRMS bietet ergänzende Methode zum Spektrum der Verfälschungsanalytik

→ Demgegenüber steht deutlich größerer analytischer Aufwand gegenüber etablierter AOAC-Methode

→ reine C3-Zuckersirupe können mit LC-IRMS nicht nachgewiesen werden



Nachweis von Reissirup mittels LC-MS

Ursprung zur Methodenentwicklung war eine aktuelle chinesische Publikation

Detektion mittels LC-MS über Markersubstanzmessung

→ Alle Reissirupe weisen diese spezifische Markersubstanz auf

→ Weder andere Zuckersirupe noch unverfälschte Honige weisen diese Markersubstanz auf

→ Bestimmungsgrenze: 10% Beimischung

→ Keine Quantifizierung möglich wegen schwankender Markervorkommen



Nachweis von Reissirup mittels PCR

Detektion mittels DNA-Nachweis durch PCR

- Bruchstücke von Reis-DNA können detektiert werden
- Diese kommen natürlicherweise nicht in Honig vor
- Ein hoher Aufreinigungsgrad des Sirups verursacht gegebenenfalls einen falsch negativen Befund
- Nachweis von Reissirup speziell für asiatische Honige interessant

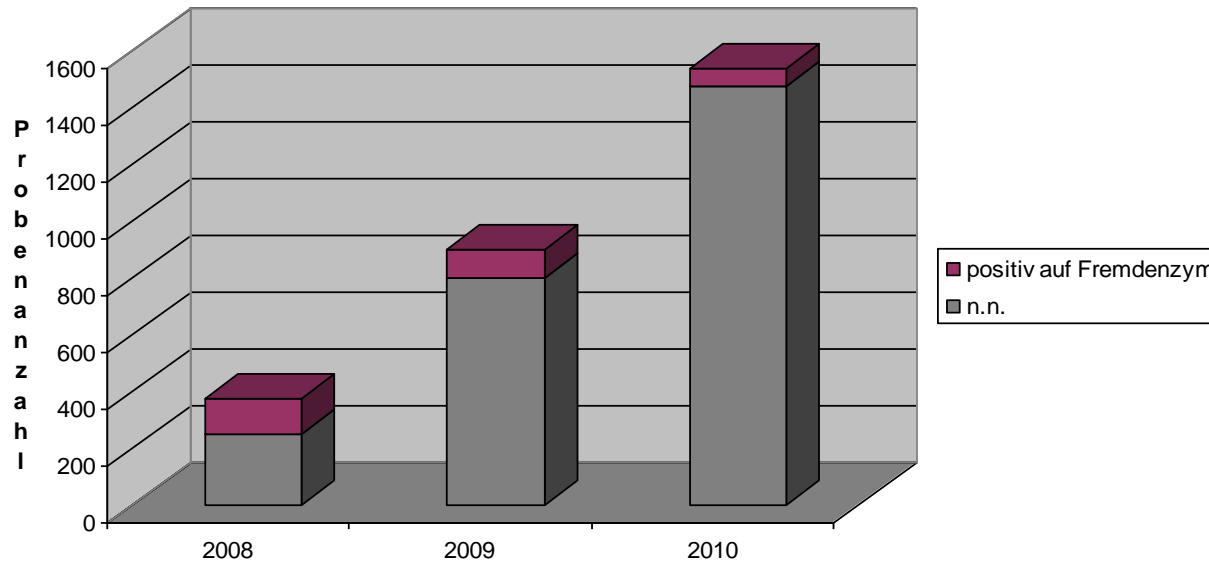




Honigfremde Invertase

- Das Enzym **β -Fructofuranosidase** hydrolisiert Saccharose zu Glucose und Fructose. Ein solcher Invertzucker aus Zuckerrübe kann im Honig mittels HPLC nicht detektiert werden.
- Methode zur Bestimmung der honigfremden Invertase:
 - Zusetzen eines spezifischen Substrates
 - HPLC-Messung des abgebauten Substrates bzw. des gebildeten Produkts

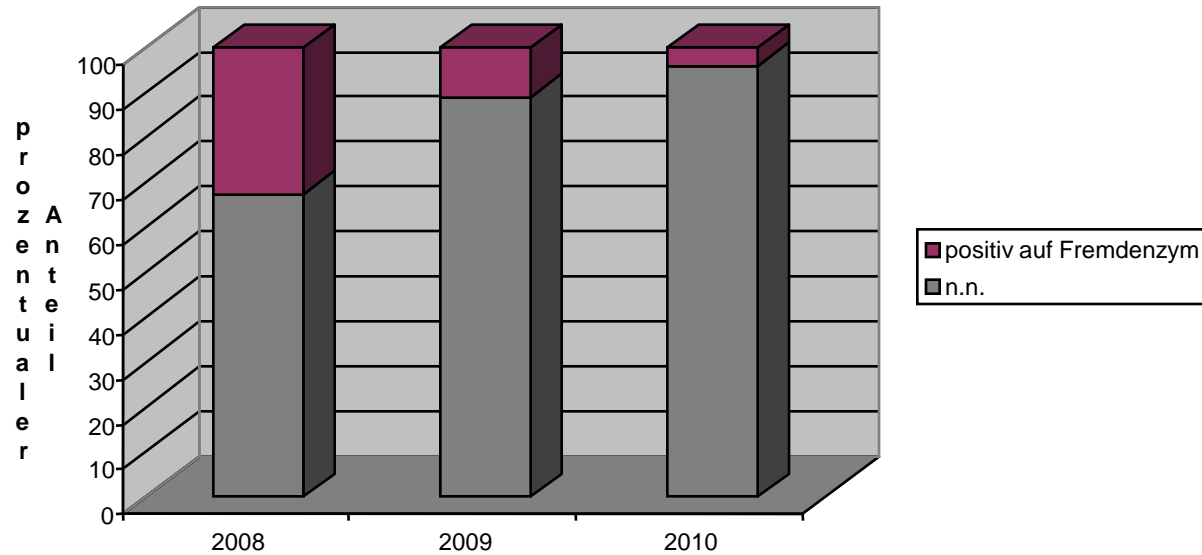
Ergebnisse Honigfremde Invertase



Entwicklung der untersuchten Probenanzahlen



Ergebnisse Honigfremde Invertase



Prozentualer Anteil der positiven Proben



Diastase-Methoden

- Natürlicherweise in Honig enthalten: α -Amylase (Diastase); β - oder γ -Amylase honigfremd (z.B. über hydrolysierte Stärke in den Honig gelangt)
 - Schade-Methode (DIN 10750) weist alle aktiven Amylasen nach (Substrat = Stärke), eingesetztes spezifisches Substrat wird nur von Diastase angegriffen
- Schade-Ergebnisse deutlich höher als Werte aus Alternativ-Substrat = Aktivität fremder Amylase resp. Zusatz hydrolysierter Stärke



Weitere Parameter

- verdächtiges/auffälliges Aroma
- niedriger Prolin-Gehalt
- niedrige Leitfähigkeit
- niedrige natürliche Enzymaktivitäten
- hoher pH-Wert



Honigfiltration

- Mit der Honigverordnung aus 2004 ist der Verkauf von gefiltertem Honig in der EU zugelassen
 - Problem: billige, gefilterte Honige können teuren, ungefilterten Honigen zugesetzt werden. In der mikroskopischen Analyse sind dann nur die Pollen des ungefilterten Honigs zu sehen.
- Entwicklung einer Nachweismethode von gefilterten in Mischungen mit ungefilterten Honigen (Forderung des Agrarausschusses des Bundesrates)

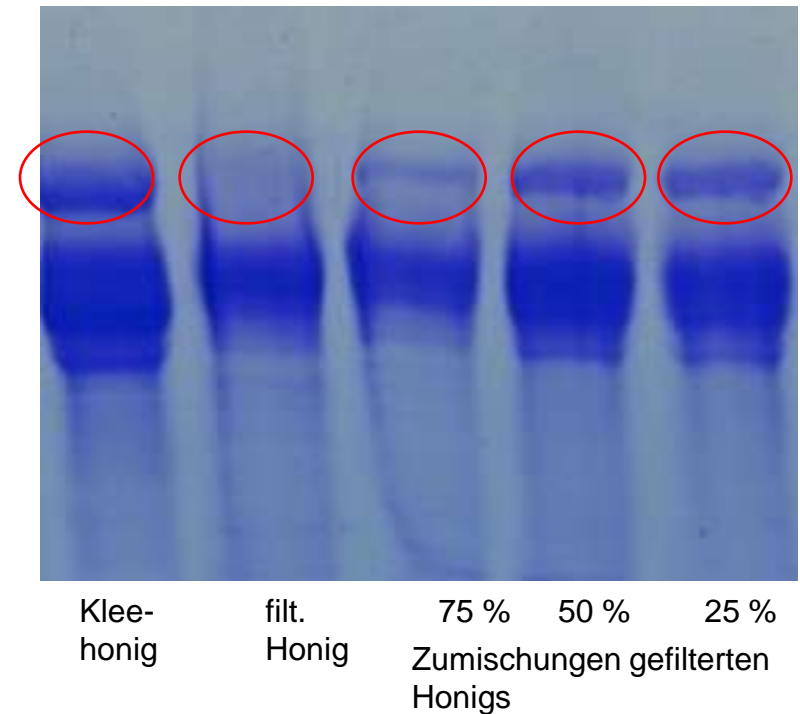


Nachweis einer Honigfiltration

Methode:

- gelchromatographische Abtrennung der Saccharase-Fraktion
- elektrophoretische Untersuchung und densitometrische Auswertung

→ die Farbdichte des Proteins mit der Masse 65 kD nimmt mit höherem Zumischungsgrad gefilterten Honigs ab





Nachweis einer Honigfiltration

- Bei ungefilterten Honigen beträgt der Quotient der Farbdichtewerte der Proteine 40 und 65 kD konstant 3 (Ergebnisse unabhängig von der Honigsorte)
- bei gefilterten Honigen liegt das Verhältnis bei > 30
→ Abnahme dieses Verhältnisses mit höherem Zumischungsgrad gefilterten Honigs
- Der Nachweis von gefilterten Honigen in Mischungen ist mit dieser Methode bis zu einem Anteil von 20 % möglich.

Kombination mehrerer Parameter

Grundsätzlich: Beurteilung von Honigen hinsichtlich Verfälschung sicherer und genauer durch

→ Kombination mehrerer unabhängiger Methoden





QUALITY SERVICES INTERNATIONAL GMBH | DR. CORD LÜLLMANN | BREMEN | GERMANY

Danke für Ihre Aufmerksamkeit!

Gudrun Beckh

Quality Services International GmbH

Am Flughafendamm 9a

D-28199 Bremen

Fon: +49 421 594770

beckh@qsi-q3.de

www.qsi-q3.de