

Angewandte Wissenschaft » Originalarbeiten exklusiv für Sie vorgestellt

¹³C-Stabilisotopen-Messungen von Zuckerfraktionen des Honigs – Eine neue Möglichkeit zum Verfälschungsnachweis?

K. Beckmann, G. Beckh und C. Lüllmann

Quality Services International GmbH, Flughafendamm 9a,
D-28199 Bremen

Zusammenfassung

Die ¹³C/¹²C-Isotopen-Massenspektrometrie ist die etablierte Methode, um Verfälschungen von Honig mit C4-Fremdzuckern nachzuweisen. Dabei werden die δ¹³C-Werte von Honig und ausgefälltem Protein miteinander verglichen. C4-Zuckerprodukte lassen sich so sicher detektieren, C3-Zucker jedoch nur bei hohen Zumischungsgraden. Mittels vorheriger flüssigchromatographischer Trennung der Kohlenhydrate können auch die Kohlenstoff-Isotopenverhältnisse einzelner Zuckerfraktionen (Glucose, Fructose, Di- und Trisaccharide) bestimmt werden. Unterschiedliche δ¹³C-Werte dieser Fraktionen untereinander sollen weitergehende Hinweise auf Beimischungen von Fremdzuckern geben.

Messungen von Honigen, auch in verschiedenen Reifestadien, zeigen jedoch, dass auch natürlicherweise sehr hohe Differenzen in den einzelnen Zuckerfraktionen auftreten können. Daher ist eine Beurteilung aufgrund der Isotopen-Differenzen nur in Ausnahmefällen möglich.

Summary

¹³C/¹²C isotope ratio mass spectrometry is the established method to detect adulterations of honey with foreign sugars. δ¹³C values of honey and protein are compared. Admixtures of C4 sugars can be determined reliably while C3 sugars can only be detected in high amounts. Using liquid chromatography previously, isotope ratios of single sugar fractions (glucose, fructose, di- and trisaccharides) can be determined as well. Different δ¹³C values among each other should provide further indications of adulterations.

But measurements of honeys, also in various stages of ripeness, show large natural differences between sugar fractions. Therefore judgements due to isotope differences are only possible in exceptional cases.

Abb. 2 und 3 sowie Tab. 4 und 5 finden Sie unter www.dlr-online → Spezial/Passwort siehe S. 283

Einleitung

Honig besitzt den Stand eines naturbelassenen Lebensmittels. Der Zusatz fremder Stoffe zu Honig ist nach Anl. 2 in Verbindung mit § 2 der deutschen Honigverordnung [1]

nicht zulässig, daher müssen unerlaubte Zusätze von Fremdzuckern analytisch sicher nachgewiesen werden.

Derartige Verfälschungen sind leicht zu realisieren. Häufig werden dabei Stärkehydrolysate verwendet, bei denen der Wassergehalt so eingestellt ist, dass sie eine ähnliche Viskosität wie Honig besitzen.

Das Spektrum der im Honig enthaltenen Zucker kann bereits Aufschluss über eine Verfälschung geben. Hohe Gehalte von Maltose, Isomaltose oder Maltotriose können beispielsweise auf das Vorhandensein von Stärkeabbauprodukten hindeuten, während eine erhöhte Konzentration von Saccharose ein Hinweis auf eine Beimischung von Rüben- oder Rohrzucker sein kann [2]. Die Zuckerprofile werden analytisch mittels HPLC mit RI-Detektion nach DIN 10758 bestimmt.

Ein Zusatz von Invertzuckersirup (gleiche Anteile von Glucose und Fructose) lässt sich indes nur indirekt feststellen, wenn dieser mit Hilfe des Enzyms β-Fruktofuranosidase hergestellt wurde. Eine Zumischung zu Honigen ist dann über die Aktivität dieses Enzyms nachweisbar [3].

Als Standardmethode zur Detektion von Beimischungen mit C4-Zuckern (Rohrzucker, Maisstärke-Sirupe) wird die ¹³C/¹²C-Stabilisotopenanalytik nach *White* und *Winters* [4] angewendet, welche als AOAC-Methode etabliert ist [5].

Bienen nutzen fast ausschließlich Nektar für die Honigerzeugung, der von C3-Pflanzen bereitgestellt wird. Die photosynthetische Zuckerproduktion läuft bei diesen Pflanzen über einen anderen Weg als bei den C4-Pflanzen, was dazu führt, dass die Nektare der beiden Pflanzentypen unterschiedliche ¹³C/¹²C-Isotopenverhältnisse besitzen [6]. Diese Verhältnisse werden als δ¹³C-Werte ausgedrückt und in ‰ angegeben. *White* und *Winters* nutzten das ausgefällte Protein der Honige als inneren Standard und Bezugsgröße bei der Analytik. Das ¹³C/¹²C-Isotopenverhältnis des Gesamthonigs wird mit dem des Honigproteins verglichen. Bei unverfälschten Honigen sind die δ¹³C-Werte nahezu

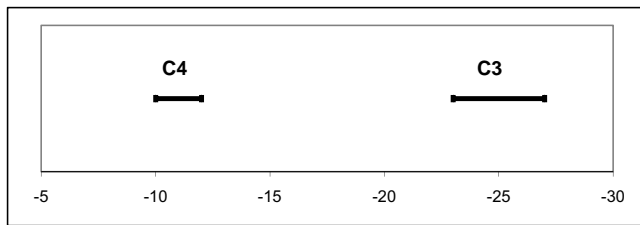


Abb. 1 Bereiche der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte [‰]_{V-PDB} von Zuckern aus C3- und C4-Pflanzen

identisch. Das Verhältnis verschiebt sich jedoch bei einem Zusatz von C4-Zuckern, da diese einen sehr viel weniger negativen $\delta^{13}\text{C}$ -Wert besitzen als die nektarliefernden Pflanzen (s. Abb. 1). Die Nachweisgrenze der AOAC-Methode liegt bei ca. 7 % C4-Zucker.

Werden Honigen jedoch Sirupe aus C3-Pflanzen, wie zum Beispiel Rübenzucker, beigemischt, gelingt der Nachweis mittels der AOAC-Methode nur bei hohen Zumischungsgraden, da die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte beider Produkte sehr ähnlich sind. Es treten dann positive Differenzen zwischen Protein und Honig auf, wobei ein Verhältnis von mehr als +1 % eine Verfälschung anzeigt [7].

Cabanero et al. [8] stellten 2006 eine Methode vor, bei der Glucose, Fructose und Saccharose chromatographisch getrennt wurden und anschließend die Kohlenstoff-Isotopenverhältnisse bestimmt wurden. Dieses Verfahren nutzte die neuentwickelte Methode der On-line-LC- ^{13}C -IRMS (Liquid Chromatography-Isotope Ratio Mass Spectrometry), bei der mittels LC getrennte Komponenten (Zucker) aus einem Gemisch (z. B. Honig) in einem Reaktionsgefäß unmittelbar nach der Trennung zu CO_2 umgesetzt und sofort bezüglich der Kohlenstoff-Isotopenverhältnisse untersucht werden. Ein Vergleich der Isotopenwerte der drei Einzelzucker erbrachte, dass sich die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Einzelzucker bei unverfälschten Honigen kaum unterschieden, bei einem Zusatz von Rübenzucker jedoch Differenzen auftraten, was eine Verfälschung anzeigen sollte. Die angegebene Nachweisgrenze von 5–10 % C3-Zucker basierte auf der Messung von 79 Honigen.

Elflein und Ræzke [9] berichteten 2008 umfassender von den Möglichkeiten der Verfälschungsanalytik mittels On-line-LC-IRMS nach Trennung der Honigzucker in Glucose-, Fructose-, Di-, Tri- und Oligosaccharidfraktion. Demnach sollte es mit dieser Methode in Kombination mit der AOAC-Methode gelingen, Sirupe aus C3-Zuckern in Honig generell und von C4-Zuckern mit noch geringeren Bestimmungsgrenzen nachzuweisen.

Aufgrund der übereinstimmenden Herkunft der Zucker in Honig und derer in entsprechenden Sirupen aus C3-Pflanzen erschien es allerdings nicht schlüssig, dass sich eine Unterscheidung aufgrund der Isotopenverhältnisse von Einzelzuckern vornehmen ließe. In dieser Arbeit sollte daher eine Interpretation der Daten vorgenommen wer-

den, ob und ab welchen Zumischungsgraden der Nachweis einer Verfälschung überhaupt möglich ist. Die Bestimmung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Zuckerfraktionen von natürlichen Honigen, von unreifen, das heißt frisch von den Bienen eingebrachten Nektaren, von Zuckerfütterungshonigen sowie von mit industriell hergestellten Zuckersirupen versetzten Honigen sollte Aufschluss darüber geben.

Material und Methoden

Probenmaterial und Analysenumfang

Im Rahmen dieser Arbeit wurden über 400 Honige unterschiedlicher geographischer und botanischer Herkünfte herangezogen. Weiterhin wurden ca. 60 frisch eingetragene Robinien- (Akazien-) Nektare aus Ungarn untersucht, welche selbst entnommen wurden. Ein großer Teil der Honigproben und sämtliche Nektare wurde unmittelbar von Imkern geliefert, um die Unverfälschtheit zu gewährleisten. Darüber hinaus dienten folgende Zuckersirupe, welche potenziell zur Streckung von Honig verwendet werden können, zur Simulation von Verfälschungen:

- „Meliose“ – konventioneller Zuckersirup für die Lebensmittelindustrie (Mischung aus C3- und C4-Zuckern)
- Sirup aus hydrolysiertes Reisstärke (C3-Pflanze) (Herkunft: China)
- Invertzucker, welcher aus einer wässrigen Haushaltszuckerlösung (Rübenzucker, C3) und Invertase (β -Fructofuranosidase, *Fluka*) hergestellt wurde
- Zuckersirup aus hydrolysiertes Weizenstärke (C3), versetzt mit Fructose aus einem C4-Zucker zur Erhöhung des Fructose/Glucose-Verhältnisses, also zur Anpassung an die Zusammensetzung der Honigzucker

Zuckerzusammensetzung der Sirupe nach HPLC siehe Tabelle 1.

Weiterhin wurden sogenannte Fütterungshonige analysiert, welche von Bienen produziert werden, indem sie den Zucker aus der Winterfütterung einlagern. Diese Erzeugnisse werden üblicherweise zu Beginn des Frühjahrs ausgeschleudert, da nur geringe Anteile an originärem Nektar enthalten sind.

Bei sämtlichen Proben wurden die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Honig und Protein nach der AOAC-Methode sowie die Zuckerprofile mittels HPLC nach DIN 10758 ermittelt, um die

Tab. 1 Prozentuale Anteile verschiedener Zucker der zur Simulation von Honigverfälschungen genutzten Sirupe, bezogen auf die Gesamtmasse

Sirup	Anteile der Zucker (bezogen auf gesamten Sirup)				
	Fructose [%]	Glucose [%]	Saccharose [%]	Maltose [%]	Maltotriose [%]
Meliose	29,2	35,1	–	1,3	–
Reissirup	0,3	21,5	–	22,1	8,7
Invertzuckersirup aus Rübenzucker	38,0	38,0	2,0	–	–
Sirup aus Weizenstärke mit C4-Fructose	22,3	19,6	–	16,5	9,7

Authentizität sicherzustellen. Die Bestätigung der botanischen und geographischen Herkunft wurde mittels Sensorik sowie mikroskopischer Pollenanalyse nach DIN 10760 durchgeführt.

Trennung der Honigzucker und Messung der Isotopenverhältnisse (LC-IRMS)

3 g der Honigprobe wurden in 3 ml bidestilliertem Wasser gelöst, und nach Membranfiltration wurden 50 µl der Lösung für die HPLC eingesetzt. Die Off-line-Trennung erfolgte auf einer *Aminex HPX 87C*-Säule (Firma *Bio-Rad*). Es wurde mit bidestilliertem Wasser eluiert (Fluss: 0,6 ml/min, Säulentemperatur 85 °C), und die Peak Erfassung wurde mittels RI-Detektion vorgenommen. Die einzelnen Zuckerfraktionen wurden mittels eines Fraktionssammlers isoliert (Beispielchromatogramm s. Abb. 2) und anschließend getrocknet. Die Anzahl der Fraktionierungen wurde dabei so gewählt, dass jeweils 1–2 mg Zucker resultierten, die zur Messung der Isotopen eingesetzt wurden. Von den Glucose- und Fructose-Fraktionen wurde daher jeweils nur ein Teil verwendet, bei den Di- und Trisacchariden wurden hingegen die Isolate mehrerer Trennungen zusammengeführt.

Die Messung der Kohlenstoffisotope erfolgte über den Elementaranalysator *Carlo Erba Instruments NC 2500* und das Isotopenverhältnis-Massenspektrometer *Finnigan MAT Delta plus* (Interface: *EA-MS Finnigan MAT ConFlo II*).

Die Kalibrierung erfolgte mit dem Standard IAEA-NBS-22 ($\delta^{13}\text{C} = -29,8\text{‰}$). Als Kontrollstandards wurden eingesetzt: Saccharose IAEA-CH-6 ($\delta^{13}\text{C} = -10,4\text{‰}$), Casein ($\delta^{13}\text{C} = -27,0\text{‰}$) und ein Kontrollhonig, welcher über einen längeren Zeitraum verfügbar war ($\delta^{13}\text{C} = -24,4\text{‰}$). Verschiedene Aufarbeitungen identischer Proben zeigten eine gute Reproduzierbarkeit der Methode. Die Abweichungen der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte lagen bei den Monosacchariden bei 0,15 ‰ und bei den Di- und Trisacchariden bei 0,3 ‰.

Um sicherzustellen, dass bei der Aufarbeitung des Probenmaterials keine Veränderungen der Kohlenstoff-Isotopenverhältnisse auftreten, wurde eine Testmischung aus verschiedenen Zuckern („Kunsthonig“) untersucht. Diese bestand aus den Zuckerstandards von Glucose, Fructose, Saccharose und Maltotriose. Es zeigte sich, dass die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Zucker nach Aufarbeitung denen der reinen Substanzen entsprachen. Die Präparation der Proben führte somit zu keiner An- oder Abreicherung von Kohlenstoff-Isotopen.

Ergebnisse und Diskussion

Authentizität des Probenmaterials

Die Ergebnisse der AOAC-Methode wiesen sämtliche Honigproben, auch die Fütterungshonige, als unverfälscht aus.

Bei den Zuckersirupen ließ sich kein Protein ausfällen. Die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Sirupe B und C lagen im Bereich von denen

der Honige (–22 ‰ bis –26 ‰), somit handelte es sich um Zucker aus C3-Pflanzenmaterial. Auch Produkt D ließ sich aufgrund der Ergebnisse der AOAC-Methode als C3-Sirup einordnen. Der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert der Meliose (A) war vergleichsweise positiv, was die Herkunft (Mischung aus C3- und C4-Zuckern) bestätigte.

Die Zuckerprofile der Honigproben zeigten keine Auffälligkeiten. Die frisch eingetragenen Robiniennektare enthielten grundsätzlich einen hohen Gehalt an Saccharose. Das Fructose/Glucose-Verhältnis war vergleichsweise hoch und entsprach dem von Robinienhonigen.

Die Sirupe hingegen konnten analytisch in reiner Form über die Zuckerprofile eindeutig von den Honigen abgegrenzt werden, da viele honigtypische Zucker nicht enthalten waren (vergl. Tab. 1 Zusammensetzung Sirupe).

Ergebnisse der LC-IRMS

Zunächst wurden bei sämtlichen Honigproben die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der einzelnen Zuckerfraktionen bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Werte der beiden Monosaccharide mit geringen Schwankungen denen der Gesamthonige entsprachen. Dies war auch theoretisch zu erwarten, da der Anteil der Monosaccharide am Gesamtzuckergehalt im Honig mehr als 90 ‰ beträgt. Die Abweichungen der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Di- und Trisaccharide voneinander und von den Monosacchariden waren indes deutlich höher (Schwankungsbreiten und Streuung der Werte s. Tab. 2 und Abb. 3). Das drückt sich auch in den Korrelationskoeffizienten der Einzelzuckerwerte zu den Honigwerten aus: $R^2(\text{Glucose})$: 0,96; $R^2(\text{Fructose})$: 0,98; $R^2(\text{Disaccharide})$: 0,85; $R^2(\text{Trisaccharide})$: 0,87.

Besonders auffällig waren die Befunde der Messungen der frisch eingetragenen Nektare. Dort zeigten die Werte der Disaccharide generell sehr hohe Differenzen und wichen bis zu +5 ‰ ab. Die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Trisaccharide waren dann zwar wieder deutlich negativer, aber immer noch positiver als die des Honigs bzw. der Monosaccharide (Beispiele s. Tab. 3). Diese Abweichungen könnten auf einen Kohlenstoff-Isotopeneffekt während der Honigreifung zurückzuführen sein. Bestimmte Enzyme, wie zum Beispiel die Invertase, setzen Di- und Trisaccharide um, wobei offensichtlich Zucker mit höheren Anteilen an ^{12}C bevorzugt werden. Das führt dann zu einer Anreicherung der ^{13}C -reichen Di- und Trisaccharide im nicht umgesetzten Anteil (und somit zu positiveren Werten dieser Di- und Trisaccharide im nicht ausgereiften Honig).

Die Fütterungshonige waren indes mittels LC-IRMS von den natürlichen Honigen nicht zu unterscheiden. Bei einigen dieser Proben konnte das Vorkommen honigfremder Zucker aber mittels der AOAC-Methode durch eine positive Abweichung zwischen Protein und Honig von mehr als +1 ‰ festgestellt werden (Beispiele s. Tab. 4).

Bei den reinen Sirupen war die Streuung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Einzelzucker geringer als bei den Honigen, es traten dort aber auch bei diesen Erzeugnissen Differenzen auf (s. Tab. 5).

Beim Sirup aus hydrolysierten Weizenstärke, welcher mit C4-Fructose versetzt wurde, war der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert der Fruc-



Tab. 2 Durchschnittliche $\delta^{13}\text{C}$ -Werte [‰]_{V-PDB} der Zuckerfraktionen und natürliche Schwankungsbreiten sowie die dazugehörigen Standardabweichungen nach Messung von > 400 Honigproben (Probenzahl: n = 407)

	$\delta^{13}\text{C}$ -Durchschnittswert [‰]	Bereich [‰]	Standardabweichung [‰]
Fructose	-25,2	-22,7 bis -27,1	0,8
Glucose	-25,2	-22,3 bis -27,2	0,8
Disaccharide	-25,1	-21,1 bis -28,6	1,0
Trisaccharide	-24,7	-22,1 bis -27,6	1,1
Differenz Fru-Glu (mono)	0	-0,9 bis +0,9 max	0,2
Differenz Mono-Di	-0,7	-3,4 bis +1,5 max	0,6
Differenz Mono-Tri	-0,5	-3,2 bis +2,7 max	0,8

tose positiver als der der anderen Fraktionen, wie zu erwarten war.

Im nächsten Schritt wurden Beimischungen der Sirupe zu Honigen in unterschiedlichen Anteilen hergestellt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass mittels LC-IRMS selbst bei hohen Zumischungsgraden von C3-Sirupen zu Honig keine Auffälligkeiten festzustellen sind. Nur bei dem Sirup mit dem Anteil an C4-Fructose konnte mit der LC-IRMS eine Verfälschung nachgewiesen werden und mit der AOAC-Methode nicht.

Interpretation der Daten

Nach Auswertung aller Daten ist abzuleiten, dass die LC-IRMS nur sehr bedingt geeignet ist, Honigverfälschungen nachzuweisen. Lediglich im Fall der Beimischung des Sirups mit einem Anteil an Fructose aus C4-Zuckern gelang es, diese Mischung ausschließlich mittels LC-IRMS, also über die ^{13}C -Analytik nach der AOAC-Methode hinaus, festzustellen.

Hohe Zumischungsgrade von Fremdzuckern ließen sich zum Teil mit der AOAC-Methode nachweisen, wenn positive Differenzen von Protein und Honig von mehr als +1 % auftraten, wie am Beispiel einiger Fütterungshonige gezeigt werden konnte.

Beim Reissirup, der eine große Menge an Sacchariden enthält, die natürlicherweise nicht in Honigen vorkommen, ließ sich bereits über das Zuckerprofil eine Aussage zu einer Verfälschung treffen. In diesem Fall waren hohe Gehalte an Maltose und Maltotriose als Abbauprodukte der

Stärkehydrolyse auffällig. Mittels LC-IRMS war aber keine Verfälschung nachweisbar.

Das gleiche galt für den Invertzucker aus Rübenzucker: Die LC-IRMS-Methode konnte auch hier keine Zumischung aufdecken. In diesem Fall gab der Nachweis der Aktivität der honigfremden Invertase Aufschluss.

Die Ergebnisse der frisch eingetragenen Nektare zeigen überdies, dass die Streuung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte bei den Di- und Trisacchariden

dieser Erzeugnisse noch höher ist als die der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der reifen Honige. Das bedeutet, dass allein das Auftreten auch höherer Differenzen zwischen den $\delta^{13}\text{C}$ -Werten einzelner Zuckerfraktionen der Honigproben nicht zwangsläufig auf eine Verfälschung zurückzuführen sein muss. Diesen Verdacht aufgrund von Werten, die außerhalb bestimmter Streuungsgrenzen liegen, zu äußern, ist riskant und birgt die Gefahr falsch positiver Befunde.

Es ist indes nicht möglich, mittels LC-IRMS Zumischungen von Sirupen zu detektieren, die ausschließlich aus C3-Zuckern zusammengesetzt sind. Diese besitzen bei den einzelnen Zuckerfraktionen ähnliche $\delta^{13}\text{C}$ -Werte wie unverfälschte Honige, sodass die Verschiebungen im Bereich der natürlichen Schwankungsbreiten liegen.

Weiterhin gelingt es mit dieser Methode nicht, quantitative Nachweise zu führen, da weder die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des Ursprungshonigs, noch die Zusammensetzung des Sirups bekannt ist, welcher zur Verfälschung genutzt worden ist. Die Kenntnis beider Parameter wäre jedoch notwendig, um die Menge an zugesetztem Fremdzucker zu berechnen.

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass die LC-IRMS zwar eine Ergänzung zum bisherigen Spektrum der Verfälschungsanalytik für Honig darstellt, jedoch steht dem deutlich größeren analytischen Aufwand, verglichen mit der ^{13}C -Analytik nach der AOAC-Methode, nach unseren oben beschriebenen Daten nur ein geringer Gewinn an zusätzlichen Erkenntnissen gegenüber.

Grundsätzlich zeigt sich weiterhin, dass eine zuverlässige Beurteilung von Honigen hinsichtlich einer möglichen Ver-

Tab. 3 $\delta^{13}\text{C}$ -Werte [‰]_{V-PDB} von IRMS- (nach AOAC) und LC-IRMS-Messungen sowie Fructose/Glucose-Verhältnisse (F/G) ausgewählter ungarischer Robiennenektare

$\delta^{13}\text{C}$ -IRMS			$\delta^{13}\text{C}$ -LC-IRMS				Differenz	
Honig	Protein	Differenz	Fructose	Glucose	Disaccharide	Trisaccharide	Disacch.-Monosacch.	F/G
-24,4	-23,6	+0,8	-25,0	-25,2	-21,5	-23,4	+3,5	1,73
-25,2	-25,0	+0,2	-25,5	-25,6	-23,1	-24,2	+2,4	1,62
-24,8	-24,2	+0,6	-25,0	-25,1	-22,7	-24,3	+2,3	1,64
-23,7	-23,7	0	-23,8	-24,0	-22,1	-23,2	+1,7	1,61
-24,5	-24,3	+0,2	-24,7	-24,9	-20,4	-23,0	+4,3	1,25
-23,3	-22,8	+0,5	-24,0	-23,8	-20,0	-22,7	+4,0	1,72
-23,8	-23,5	+0,3	-23,9	-23,3	-18,6	-21,6	+5,3	1,61

Tab. 6 Ergebnisse der Kohlenstoff-Isotopenanalyse an Honig, Protein aus Honig und den präparierten Zuckern aus Zumischungen von Sirupen zu Honigen (Simulation von Honigverfälschungen)

Honig, Sirupe und Zumischungen	$\delta^{13}\text{C}$ -IRMS			$\delta^{13}\text{C}$ -LC-IRMS				F/G
	Honig	Protein	Diffenz	Fructose	Glucose	Disaccharide	Trisaccharide	
Polyflora [%] + Meliose [%]								
100 + 0	-25,7	-25,5	+0,2	-25,5	-25,5	-26,4	-25,5	1,25
90 + 10	-25,3	-25,3	0	-25,1	-25,0	-26,1	-25,1	1,27
80 + 20	-24,8	-25,3	-0,5	-24,7	-24,4	-25,7	-24,3	1,27
50 + 50	-23,8	-25,3	-1,5	-23,8	-23,2	-25,2	-23,2	1,22
0 + 100	-21,0	-	-	-20,1	-21,3	-22,5	-21,3	1,12
Polyflora [%] + Invertzuckersirup aus Rübenzucker [%]								
90 + 10	-25,7	-25,2	+0,5	-25,5	-25,5	-26,4	-25,2	1,21
80 + 20	-25,8	-25,1	+0,7	-25,6	-25,6	-26,4	-26,1	1,18
50 + 50	-26,0	-25,0	+1,0	-25,8	-25,8	-26,5	-25,7	1,09
0 + 100	-26,1	-	-	-26,1	-26,1	-26,1	-	1,0
Akazie [%] + Sirup aus Weizenstärke mit C4-Fructose [%]								
100 + 0	-25,3	-24,9	+0,4	-25,3	-25,2	-25,3	-24,9	1,55
90 + 10	-24,9	-24,9	0	-24,4	-25,4	-25,6	-25,9	1,51
80 + 20	-24,5	-24,9	-0,4	-23,0	-25,4	-25,7	-25,6	1,47
50 + 50	-23,4	-24,9	-1,5	-19,5	-25,7	-25,8	-25,7	1,35
0 + 100	-21,5	-	-	-12,1	-26,0	-25,8	-26,4	1,14

fälschung durch Zuckerzusatz kaum auf der Grundlage nur eines Analysenverfahrens erreichbar ist. Es sollten daher mehrere unabhängige Methoden miteinander kombiniert werden.

Ausblick

In Zukunft könnte sich eine Änderung dieser Situation dadurch ergeben, dass an den einzelnen Zuckern aus Honig nicht nur die Kohlenstoff-Isotopenverhältnisse, sondern zusätzlich auch noch die Wasserstoff- und/oder Sauerstoff-Isotopenverhältnisse gemessen werden. Dies ist jedoch mit der Methode der On-line-LC-IRMS nicht möglich, dieses Verfahren ist nur für die Bestimmung der Kohlenstoff-Isotopendaten geeignet. Bei den Wasserstoff-Isotopenverhältnissen wäre zu berücksichtigen, dass ein erheblicher Anteil des Wasserstoffs in Zuckern austauschbar ist, das heißt keine Aussage über die zugrundeliegende botanische Herkunft liefert. Man muss daher Zuckerderivate untersuchen, bei denen nur der nichtaustauschbare Wasserstoff (an Kohlenstoff gebunden) erfasst wird, zum Beispiel nitrierte Zucker [10] oder aus Fructose hergestelltes Hexamethylenetetramin [11] bzw. Ethanol aus der Vergärung der Zucker [12]. Angesichts dieses Aufwandes stellt sich die Frage, ob so etwas als Routineverfahren zur Honiganalytik wirtschaftlich vertretbar ist, für spezielle Fragestellungen kann dies aber durchaus sinnvoll sein.

Wir danken Herrn *Dr. Andreas Roßmann* für die wertvolle Unterstützung bei der Erstellung dieser Publikation.

Literatur

- [1] Honigverordnung v. 16.1.2004 (BGBl. I S. 92) i. d. F. v. 22.2.2006 (BGBl. I S. 444).
- [2] *Lüllmann C, Horn H*: Das große Honigbuch, S. 134–143. Kosmos-Verlag, 3. Aufl. (2006).
- [3] *Beckmann K, Beckh G, Lüllmann C*: Nachweis von fremder Invertase in Honig. Deut Lebensm-Rundsch **104** (11/12), 55–57 (2008).
- [4] *White JW, Winters K*: Honey Protein as Internal Standard for Stable Carbon Isotope Ratio Detection of Adulteration of Honey. J Assoc Off Anal Chem **72** (6), 907–911 (1989).
- [5] AOAC Official Method 998.12: C-4 Plant Sugars in Honey.
- [6] *Schmidt HL, Rossmann A, Stöckigt D, Christoph N*: Stabilisotopenanalytik – Herkunft und Authentizität von Lebensmitteln. Chemie in unserer Zeit **39**, 90–99 (2005).
- [7] *Beckmann K, Beckh G, Lüllmann C*: Positive deviations of $\delta^{13}\text{C}$ IRMS-values between honey and protein – effects of adulterations. Postervortrag, 122nd AOAC Annual Meeting, Dallas (21.–24.9.2008).
- [8] *Cabanero AI, Recio JL, Rupérez M*: Liquid Chromatography Coupled to Isotope Ratio Mass Spectrometry: A New Perspective on Honey Adulteration Detection. J Agric Food Chem **54**, 9719–9727 (2006).
- [9] *Elflein L, Raetzke KP*: Improved detection of honey adulteration by measuring differences between $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ stable carbon isotope ratios of protein and sugar compounds with a combination of elemental analyzer – isotope ratio mass spectrometry and liquid chromatography – isotope ratio mass spectrometry ($\delta^{13}\text{C}$ -EA/LC-IRMS). Apidologie **39** (5), 574–587 (2008).
- [10] *Roßmann A, Lüllmann C, Schmidt H-L*: Massenspektrometrische Kohlenstoff- und Wasserstoff-Isotopen-Verhältnismessung zur Authentizitätsprüfung bei Honigen. Z Lebensm Unters Forsch **195**, 307–311 (1992).
- [11] *Kelly SD, Rhodes C, Lofthouse JH, Anderson D, Burwood CE, Dennis MJ, Brereton P*: Detection of Sugar Syrups in Apple Juice by $\delta^2\text{H}\text{‰}$ and $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ Analysis of Hexamethylenetetramine Prepared from Fructose. J Agric Food Chem **51**, 1801–1806 (2003).
- [12] *Lindner P, Bermann E, Gamarnik B*: Characterization of citrus honey by deuterium NMR. J Agric Food Chem **44**, 139–140 (1996).

¹³C-Stabilisotopen-Messungen von Zuckerfraktionen des Honigs – Eine neue Möglichkeit zum Verfälschungsnachweis?

K. Beckmann, G. Beckh und C. Lüllmann

Tab. 4 $\delta^{13}\text{C}$ -Werte [‰]_{V-PDB} von IRMS- (nach AOAC) und LC-IRMS-Messungen (an Mono-, Di- und Trisacchariden) sowie Fructose/Glucose-Verhältnisse (F/G) von Fütterungshonigen (Arg: Argentinien; D: Deutschland)

Fütterungshonig	Herkunft	$\delta^{13}\text{C}$ -IRMS			$\delta^{13}\text{C}$ -LC-IRMS				F/G
		Honig	Protein	Diffenz	Fructose	Glucose	Disaccharide	Trisaccharide	
A	Arg	-25,6	-24,4	1,2	-25,7	-26,0	-24,9	-25,2	1,21
A	Arg	-26,4	-25,3	1,1	-26,5	-27,0	-25,7	-25,9	1,13
A	Arg	-26,4	-25,2	1,2	-26,5	-26,7	-26,4	-25,6	1,25
A	Arg	-25,7	-24,6	1,1	-25,7	-26,0	-25,4	-25,1	1,17
B	Arg	-26,3	-25,7	0,6	-25,6	-26,2	-25,8	-25,2	1,48
C	D	-26,2	-26,4	-0,2	-26,3	-26,0	-25,7	-25,5	1,20
C	D	-26,3	-26,3	0	-26,2	-26,3	-26,7	-26,2	1,19

Fütterungshonige – A: Honig aus Herbst-, Winterfütterung mit Saccharose-Sirup ohne Protein; B: Honig aus Herbst-, Winterfütterung mit Saccharose-Sirup und Hefenprotein; C: Winterfütterungshonig, Bieneninstitut Hohen-Neuendorf

Tab. 5 $\delta^{13}\text{C}$ -Werte [‰]_{V-PDB} der Sirupe (Gesamtwerte sowie Werte der Einzelzucker nach Trennung mittels präparativer HPLC)

Sirup	$\delta^{13}\text{C}$ gesamt	$\delta^{13}\text{C}$ Einzelzucker			
		Fructose	Glucose	Disaccharide	Tri-, Oligosaccharide
Meliose	-21,0	-20,1	-21,3	-22,5	-21,3
Reissirup	-25,8	-26,3	-25,8	-25,2	-25,3
Invertzuckersirup aus Rübenzucker	-26,1	-26,1	-26,1	-26,1	–
Sirup aus Weizenstärke mit C4-Fructose	-21,5	-12,1	-26,0	-25,8	-26,4

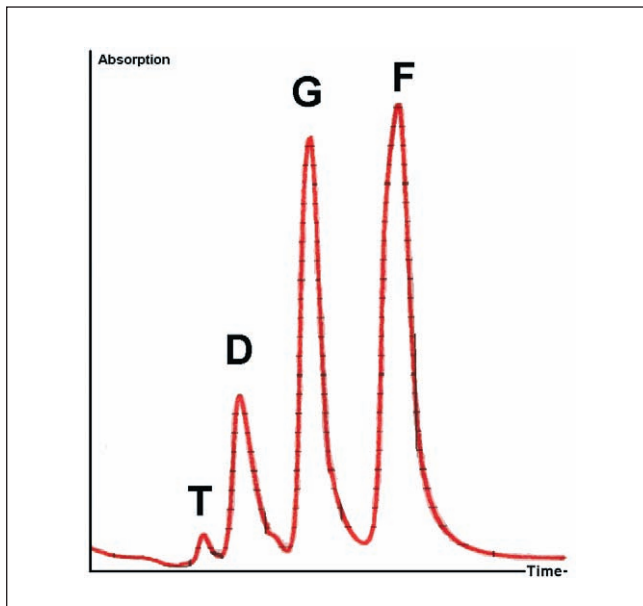


Abb. 2 Chromatogramm der präparativen HPLC-Trennung von Fructose (F), Glucose (G), Di- (D) und Trisacchariden (T) eines Blütenhonigs (Zeitachse läuft von links nach rechts)

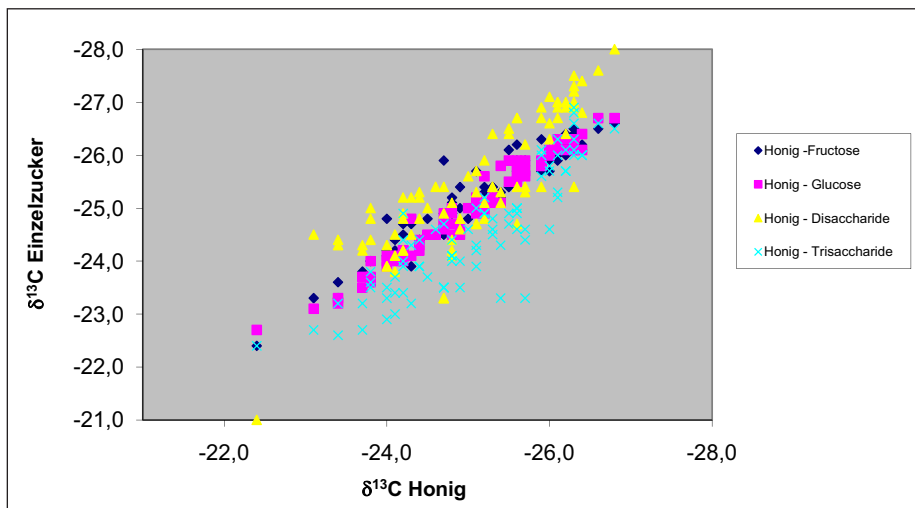


Abb. 3 Natürliche Korrelation der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte [‰]_{V-PDB} der einzelnen Zuckerfraktionen und des jeweiligen Wertes des Gesamthonigs