

Honey-Profiling™ von A bis Z

Der transparente Überblick

Jane Mißler, Bernd Kämpf, Stephan Schwarzinger und Birk Schütz

Honig steht nach Olivenöl und Milch weltweit an dritter Stelle der am häufigsten verfälschten Lebensmittel [1]. Die Verfälschung von Lebensmitteln ist meist wirtschaftlich motiviert (economically motivated adulteration, EMA). Durch Fütterung während der Tracht oder Zugabe von exogenen Zuckern und Sirupen sowie durch falsche Angaben bezüglich der geographischen oder botanischen Herkunft wird dem Konsumenten teilweise ein Produkt versprochen, welches er so nicht im Glas wiederfindet. Im Februar 2017 wurde über einen neuen Honigskandal in Europa, diesmal in Großbritannien, berichtet. Hierbei handelt es sich um Verfälschungen des, wegen seiner medizinischen Wirkung, beliebten Manukahonigs aus Neuseeland [2].



Dr. Jane Mißler

›› Zur Person

Chemikerin, seit 2015 für die Quality Services International GmbH in Bremen tätig, Leiterin der NMR-Abteilung in Hinblick auf Authentizität und Qualität von Lebensmitteln, insbesondere Honig ‹‹

Das Honey-Profiling™ ist das dritte Produkt aus der Foodscreening-Serie [3,4] von Bruker Biospin (Rheinstetten) und wurde zusammen im Konsortium mit führenden Laboren für Honiganalysen (Quality Services International GmbH und ALNuMed GmbH zusammen mit FoodQS GmbH) entwickelt. Seit September 2015 wird das Honey-Profiling™ von den Firmen ALNuMed, FoodQS und QSI [5] für die Untersuchung von Honig verwendet.

Diese Methode ermöglicht es, generelle Verfälschungen mit Sirupen aus diversen stärke liefernden Pflanzen (C_3 , C_4) aufzudecken, als auch Qualität und Herkunft des Produktes zu überprüfen. Unterschieden wird dabei zwischen der gezielten und nicht gezielten Analyse. Die Quantifizierung von 36 honigspezifischen Substanzen mittels Kernspinresonanzspektroskopie (NMR), beispielsweise wichtige Mono-, Di-, und Trisaccharide, organische Säuren und Aminosäuren sowie Marker-substanzen für Verfälschungen oder Fermentationsprodukte, erlaubt eine ge-

zielte Betrachtung des Honigs. Bei der ungezielten Analyse wird das gesamte 1H -NMR-Spektrum mit der Datenbank verglichen und auf Abweichungen untersucht.

Datenbank

Die aktuell verwendete erste Version der Datenbank besteht aus 3775 authentischen Honigproben aus mehr als 20 verschiedenen monofloralen Herkünften (Tab. 1) und über 50 Ländern (Abb. 1).

Die Authentizität der Datenbankproben wurde durch mehr als 40000 konventionelle Analysen, beispielsweise die Analyse des Pollenspektrums, der sensorischen Eigenschaften, des Zuckerprofils, der Oligosaccharide, der honigeigenen oder -fremden Enzyme sowie die ^{13}C -Isotopen-Bestimmung verifiziert.

Verschiedene Modelle ermöglichen die Überprüfung der Verfälschung und Authentizität. Derzeit können anhand des Linden-, Manuka- als auch des Akazienmodells die jeweiligen botanischen Herkünfte entweder bestätigt oder widerlegt

werden. Die geographischen Modelle ermöglichen die Unterscheidung der Kontinente Asien, Zentral- und Südamerika sowie Europa, differenzieren aber auch die Länder, China, Thailand, Vietnam, Mexiko, Kuba, Chile, Bulgarien/Rumänien, Ungarn und die Ukraine. Des Weiteren werden ausgewählte Bereiche des Spektrums oder auch bestimmte Zucker ins Verhältnis zueinander gesetzt, um Hinweise auf Sirupzusatz zu erhalten.

Klassifizierung und Verifikation

Die verwendeten statistischen Methoden zur Klassifizierung und Verifikation basieren hierbei auf etablierten Verfahren, wie der Hauptkomponentenanalyse (PCA), Linearen Diskriminanzanalyse (LDA), veröffentlichten Verfahren zur Verteilungsbestimmung und -transformation sowie bekannten Verfahren zur Auswertung multipler Tests und Gewinnung von p-Werten zur Einordnung von statistischen Ergebnissen.

Sämtliche Methoden zur Auswertung werden nach aktuellsten Standards validiert – beispielsweise durch intensive Monte-Carlo/Kreuzvalidierungen – und etablierte Kennzahlen wie Sensitivität und Spezifität ermittelt. Mögliche Konfundierungseffekte werden studiert und Ausreißer analysiert. Der kontinuierliche Vergleich mit konventioneller Analytik und Teilnahme an internationalen Ringtests ist Voraussetzung für eine ISO17025-Akkreditierung, die bereits für einige Labore erfolgreich stattgefunden hat – inklusive der statistischen Methoden des Honey-Profilings™. Ferner wird das NMR-basierte Profiling zu den derzeit durch die US Pharmacopeia entwickelten Standards für Non-targeted-Methoden im Lebensmittelbereich miteinbezogen.

In Abbildung 2 sind die ersten drei Dimensionen einer linearen Diskriminanzanalyse von NMR-Honigspektren dargestellt. Mit solchen Modellen werden signifikante

Tab. 1 Botanische Herkünfte der Datenbank 1. Version

Akazie/Robinie, Avocado, Buchweizen, Campanilla, Catay, Dandelion, Daidzilfe, Eucalyptus, Heide, Besenheide, Himbeere, Honigtau, Jujube, Kaffeeblüte, Kamahi, Kanuka, Kastanie, Klee, Koriander, Lavendel, Schopflavendel, Linde, Litschi, Löwenzahn, Mangrove, Manuka, Mesquite, Mimosa, Orangenblüte, Pinie, Polyfloral, Quillay, Raps, Rata, Rearewa, Rosmarin, Salbei, Seidenpflanze, Sonnenblume, Tahonal, Tanne, Thymian, Ulmo, Vitex

Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen ermittelt. Anhand detaillierter Verteilungsanalysen (auch der nicht dargestellten Dimensionen) werden p-Werte ermittelt, welche zu einer fundierten Beurteilung herangezogen werden – in diesem Beispiel für die Bestimmung der botanischen Herkunft (sortenreine Honige). Dabei repräsentieren die Ellipsoide 99 % der Modelldaten (eckige Marker) und die runden Marker unabhängige Testproben.

Honigbeurteilung

Abbildung 3 zeigt einen Quantilplotauschnitt eines authentischen Vitexhonigs aus China. Die schwarze Linie stellt das NMR-Spektrum der zu untersuchenden Probe im Vergleich zum Modell der Datenbank (Quantildarstellung als grau/roter Hintergrund) dar. Atypische Konzentrationen oder Signale können durch



Bernd Kämpf
Lebensmittelchemiker und Umweltanalytiker; seit 1999 Laborleiter und Leiter der Qualitätssicherung bei der Firma Breitsamer und Ulrich GmbH & Co.KG sowie Geschäftsführer der FoodQS GmbH

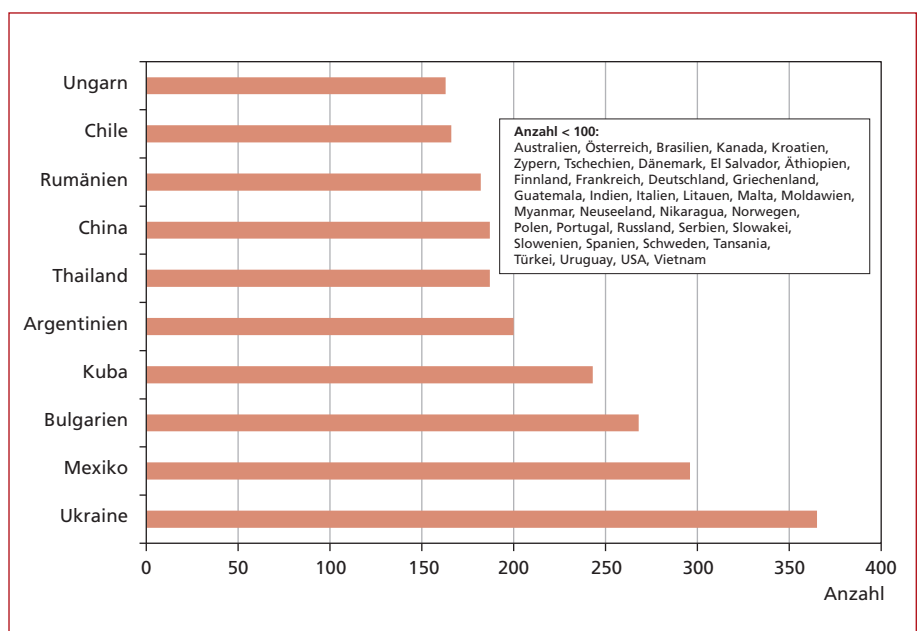


Abb. 1 Verteilung der geographischen Herkünfte in der Datenbank 1. Version

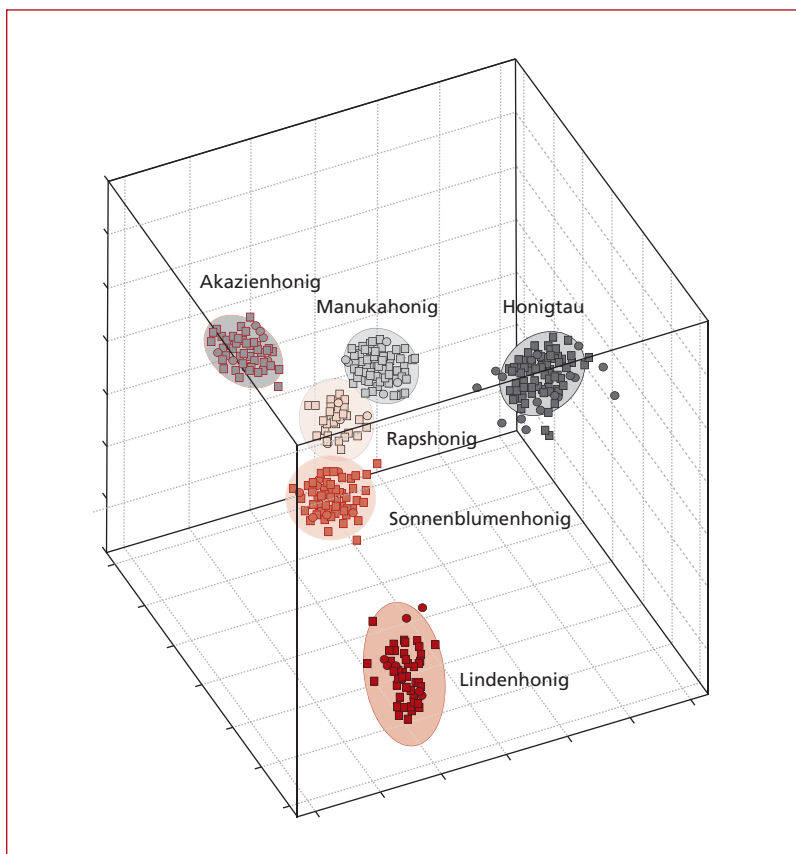


Abb. 2
Modell zur Unterscheidung von verschiedenen botanischen Herkünften

diese Darstellung einfach detektiert und interpretiert werden.

Das in Abbildung 4 dargestellte Spektrum gehört, gemäß Angabe des Lieferanten, zu einem thailändischen polyfloralen Honig. Im Allgemeinen ist zu beobachten, dass das Spektrum dieser Honigprobe (schwarze Linie) im Zucker-

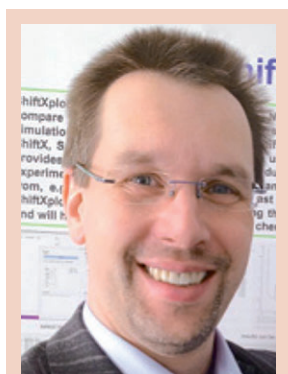
bereich des Quantilplots deutlich erhöht und teilweise außerhalb der Datenbankdaten verläuft. Anders gesagt, keine einzige authentische Probe in der Datenbank weist derart hohe Intensitäten in diesen Bereichen des Spektrums auf, was wiederum auf eine Verfälschung schließen lässt. Die Anwesenheit von Verfälschungsmarkern [6], beispielsweise vorhandene Oligosaccharide, ist ein weiterer Indikator für eine Verfälschung mit Sirup.

Aufgrund der Ergebnisse der Quantifizierung sowie der nicht gezielten Analyse (Chemometrie) wird dieser Honig als untypisch bewertet.

Fazit und Ausblick

Das Honey-Profiling™ eignet sich hervorragend als Screeningmethode, z. B. zur Kontrolle von Rohwaren und Wareneingangsprouben, da es aufgrund der Vielzahl an Parametern [7] zusammen mit der multivariaten Datenanalyse eine breite Basis zur Einschätzung der Qualität des Honigs liefert.

Jede Datenbank ist nur so gut wie ihre enthaltenen Honigproben. Authentische Honige müssen direkt vom Imker stammen und zusätzlich auf Verfälschungen jeglicher Art untersucht werden, um eventuelle Zusatzfütterungen während der Tracht oder nicht sachgemäße Behandlung der Bienenstöcke ausschließen zu können. Honige nicht direkt vom Imker



Prof. Dr. Stephan Schwarzinger
Geschäftsführer der ALNuMed GmbH; seit 2010 Mitglied am Forschungszentrum für Bio-Makromoleküle (FZ BIOmac) der Universität Bayreuth, seit 2013 außerplanmäßiger Professor

Benefits des Honey-Profiling™

- eine Vielzahl an Informationen mit nur einer Messung
- Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit
- einfache Aufarbeitung und kurze Messzeit
- umfangreiche statistische Analysen
- gezielte Analyse – ¹H-NMR ist eine primäre Quantifikationsmethode
- nicht gezielte Analyse (statistische Klassifizierung und Verifizierung des gesamten Spektrums)
- retrospektive Identifizierung und Quantifizierung
- Bestimmung von Verfälschungen
- Nachverfolgung von bestimmten Produktionsabläufen oder Lagerungen
- Bestimmung von geographischen und botanischen Herkünften

müssen die gesamten verfügbaren konventionellen Methoden durchlaufen, um als quasi-authentisch eingestuft werden zu können. Honiganalysen in solch einem Umfang sind zeitaufwendig und kostspielig. Daher ist ein internationales Konsortium zwingend notwendig, in welchem alle Partner in der Lage sind, repräsentative und authentische Muster zu beschaffen und nach aktuellstem Stand der Technik zu untersuchen.

Eine global harmonisierte und global validierte Methode auf breiter Datenbasis für alle Labore eröffnet eine neue Ära in der Charakterisierung und Beurteilung von Honigen. Externe und unabhängige Validierungen und der Austausch auf fachlicher Ebene, beispielsweise durch und mit staatlichen Einrichtungen, werden bereits beim NMR-Profiling von anderen Lebensmitteln kontinuierlich eingesetzt und sind auch beim Honey-Profiling™ geplant und ausdrücklich erwünscht.

Durch die Aufnahme von zusätzlichen Partnern und dem Fokus auf eine globale Vergleichbarkeit der Methode wurde die Datenbank seit der Veröffentlichung der ersten Version um zahlreiche Honigproben aus aller Welt der verschiedensten botanischen Herkünfte erweitert.

In der neuen Version Honey-Profiling™ 2.0, deren Markteinführung für 2017 geplant ist, werden mehr als 10000 authentische, aber auch verfälschte Proben enthalten sein. Proben, die auch mit konventionellen Methoden nachweislich verfälscht sind, werden ebenfalls für die Datenbank benötigt. Bereits bestehende Modelle werden entsprechend angepasst oder weiterentwickelt sowie weitere neue Modelle für die geographischen und botanischen Herkünfte generiert. Zudem werden die Verfälschungs-

modelle für die Zugabe von exogenen Zuckern oder Sirupen anhand der neuen Daten weiterentwickelt und ermöglichen somit eine noch präzisere Auswertung. Dennoch ist Expertenwissen für die korrekte Auswertung der Analysen sowie die Beurteilung der Proben hinsichtlich

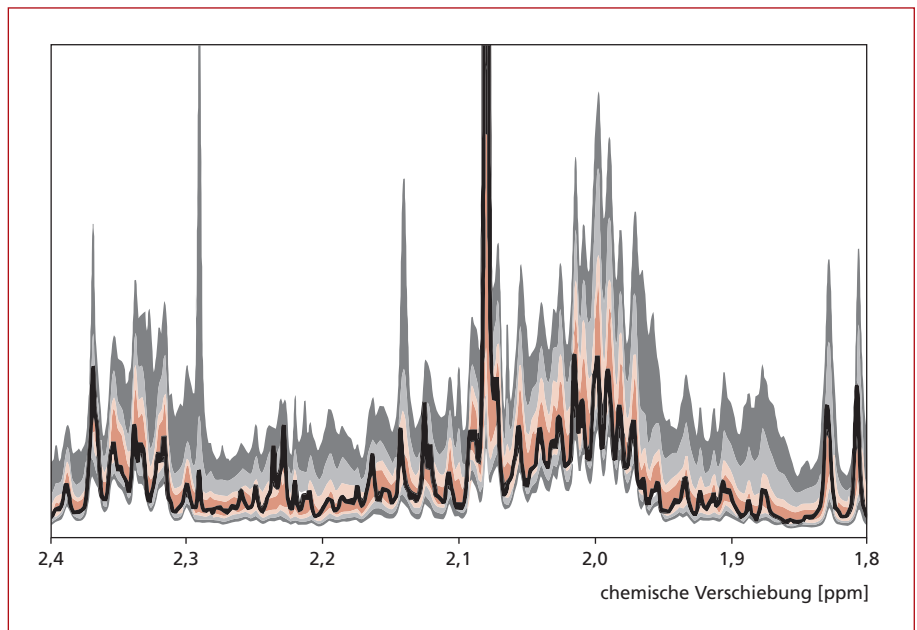


Abb. 3 Quantilplot eines authentischen chinesischen Vitexhonigs (Ausschnitt zeigt 6 % des gesamten NMR-Profiles)

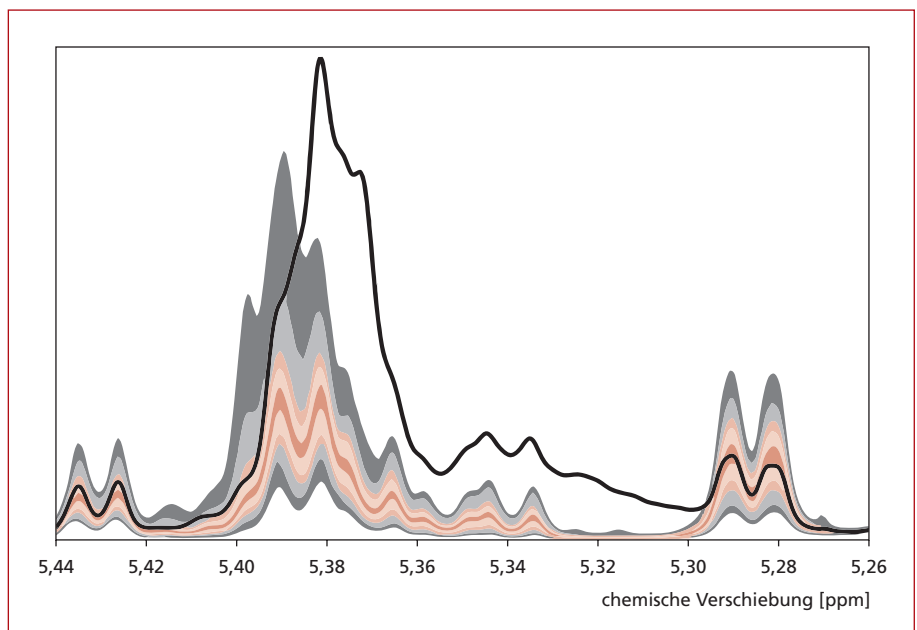


Abb. 4 Quantilplot eines verfälschten thailändischen polyfloralen Honigs (Ausschnitt zeigt ca. 2 % des gesamten NMR-Profiles, hier einen Teil des Zuckerspektrums)

Labor und mehr

■ Für die Spektrometrie

Die 3-in-1-Ganzquarz-Durchflussküvette von Hellma ermöglicht durch eine neue Technologie das Einbringen von Innengewinden in das Quarzglas, wodurch ein Aluminiumrahmen überflüssig wird. Schläuche können einfach und sicher angeschlossen werden und die Reinigungseffizienz und Temperaturbeständigkeit erhöhen sich. Die Küvette verfügt über 2 Schichtdicken. Bei jeder Schichtdicke kann zudem die Fluoreszenz gemessen werden. Das Wechseln von Küvetten wird überflüssig: Die Ganzquarz-Durchflussküvette wird einfach um 90° gedreht.

www.hellma-analytics.com

Verfälschung und Qualität unter Berücksichtigung der europäischen Richtlinien [8] unabdingbar – insbesondere für die Beurteilung von Honigproben aus selteneren geographischen oder botanischen Herkünften.

Literatur

- [1] *Moore JC*: Food Fraud: Public health threats and the need for new analytical detection approaches. Doi: nabc.cals.cornell.edu/Publications/Reports/nabc_23/23_5_3_Moore.pdf; letzter Zugriff am 16.5.2017.
- [2] *Leake J*: Bee careful: that £45 honey may be fake. The Sunday Times 5. Februar (2017); doi: www.thetimes.co.uk/article/bee-careful-that-honey-may-be-fake-3fc0zwd5x; letzter Zugriff am 17.2.2017.
- [3] *Spraul M* et al.: NMR-based multi parametric quality control of fruit juices: SGF profiling. *Nutrients* 1 (2), 148–155 (2009); doi: 10.3390/nu1020148.
- [4] *Godelmann R* et al.: Targeted and nontargeted wine analysis by ¹H NMR spectroscopy combined with multivariate statistical analysis. Differentiation of important parameters: grape variety, geographical origin, year of vintage. *J Agric Food Chem* 61 (23), 5610–5619 (2013); doi: 10.1021/jf400800d.
- [5] *Dübecke A*: NMR-Profilung of honey – the new approach in honey authenticity testing. *eFoodLab Int* 3, 14–16 (2015).
- [6] *Missler J* et al.: Mannose: a marker for adulteration with syrup or resin treat-

ment of blossom honey. *imp* 16, 17–20 (2016); doi: 10.1255/mrfs.4.

- [7] *Schwarzinger S* et al.: Authentic food: Why a single analysis parameter is not enough. *Q&More* 1, 37–43 (2016).
- [8] The Council of the European Union: Council Directive 2001/110/EC of 20 December 2001 relating to honey. *Off J Eur Comm L* 10, 47–52 (2001); doi: eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:010:0047:0052:EN:PDF; letzter Zugriff am 16.5.2017. ■

Anschrift der Autoren

Dr. Jane Mißler

Quality Services International GmbH
QSI
Flughafendamm 9a
28199 Bremen
info@qsi-q3.de
www.qsi-q3.de

Bernd Kämpf

FoodQS GmbH
Kontakt:
Mühlsteig 15
90579 Langenzenn
www.foodqs.de

Prof. Dr. Stephan Schwarzinger

ALNuMed GmbH
c/o Forschungszentrum für
Bio-Makromoleküle
Universitätsstraße 30
NW I – 1.2 U1
95447 Bayreuth
www.alnumed.com

Dr. Birk Schütz

Bruker Physik GmbH
Rudolf-Plank-Straße 23
76275 Ettlingen
www.bruker.com



Dr. Birk Schütz

Informatiker, seit 2001 für die Bruker BioSpin GmbH tätig, seit 2015 Leiter Entwicklungsteam für NMR-Lebensmittelanwendungen