

Bienenprodukte

23A Honig

Bearbeitet von einer Expertengruppe „Bienenprodukte“

- S. BOGDANOV, (Präsident), Agroscope Liebefeld-Posieux,
Eidg. Forschungsanstalt für Milchwirtschaft und Nutztiere (ALP),
Zentrum für Bienenforschung, Liebefeld-Bern
- K. BIERI (Expertin), Biologisches Institut für Pollenanalyse, Kehrsatz
- G. GREMAUD, Bundesamt für Gesundheit, Liebefeld-Bern
- D. IFF, Narimpex AG, Biel
- A. KÄNZIG, Kantonales Laboratorium, Aargau
- K. SEILER, Laboratorium der Kantone AI, AR, GL, SH, Schaffhausen
- H. STÖCKLI, Verband Schweiz. Bienenzüchtervereine, Allschwil
- K. ZÜRCHER (EXPERTE), BASEL

Spezialvorschriften

(Probenahme und Probenvorbereitung)

Untersuchungsmethoden

- 1 Sinnenprüfung
- 2 Bestimmung des Wassergehaltes (refraktometrisch)
- 3 Bestimmung des *pH*-Wertes und des Gehaltes an freier Säure (potentiometrisch)
- 4 aufgehoben
- 5 Bestimmung der elektrischen Leitfähigkeit, elektrometrisch
- 6 Diastase (Amylase, α -Amylase)
- 6.1 Bestimmung der Diastaseaktivität (nach Phadebas)
- 6.2 Bestimmung der Diastaseaktivität (nach Schade)
- 7 Bestimmung der Invertase- (α -Glucosidase) aktivität, photometrisch
- 8 Zuckerarten
- 8.1 Bestimmung von Zuckerarten (HPLC)
- 8.2 Bestimmung der D-Glucose und D-Fructose, enzymatisch
- 9 Hydroxymethylfurfural (HMF)
- 9.1 aufgehoben
- 9.2 Bestimmung des Hydroxymethylfurfurals (HMF), photometrisch (nach White)
- 9.3 Bestimmung des Hydroxymethylfurfurals (HMF) mittels HPLC
- 10 Bestimmung des Prolins, photometrisch
- 11 Bestimmung von Zuckerarten mittels IC und PAD-Detektoren

Anhang

Bestimmung des Gehalts an wasserunlöslichen Stoffen, gravimetrisch
(international gültige Methode, in englisch)

Spezialvorschriften

PROBENAHRME

Aus Fässern und Eimern, deren Inhalt nicht gemischt werden kann, müssen an verschiedenen Stellen Probenaliquote mit einem geeigneten Probenstecher entnommen werden. Die so gezogenen Probenaliquote werden in einem Gefäss durch intensives Rühren homogen zu einer Probe vermischt.

PROBENVORBEREITUNG

Honige, die sich in einen flüssigen und einen festen Anteil getrennt haben, müssen vor der Entnahme für die Untersuchung gründlich homogenisiert werden.

Grobe Verunreinigungen müssen vor der Entnahme ohne Erwärmen für die weitere Untersuchung entfernt werden.

Wabenhonig: Falls die Wabenzellen noch verschlossen sind, werden sie zuerst abgedeckt. Danach wird der Honig, wenn immer möglich ohne Aufwärmen, mit Hilfe eines Siebes (Maschenweite $\geq 0,5$ mm) von den Waben getrennt. Ist der Honig in den Waben auskristallisiert, kann er kurzzeitig bei max. 40 °C erwärmt werden.

HINWEIS

Die Probenvorbereitung soll wenn möglich ohne Aufwärmen erfolgen, damit der Honig nicht geschädigt wird (siehe Abschnitt 2, "Lager- und Wärmeschädigungen").

Untersuchungsmethoden

1 **Sinnenprüfung**

Der Honig wird geprüft auf Aussehen (Farbe, Trübstoffe, Konsistenz), Geruch und Geschmack. Die Farbe des Honigs variiert von nahezu farblos über gelb, gelbbraun bis grau-, grün- oder braunschwarz.

Die Konsistenz kann dünnflüssig, zähflüssig, teilweise oder ganz kandierte sein, je nach Art des Honigs und der Lagerung.

Das Honigaroma kann stark verschieden sein. Gewisse Honige haben schwaches Aroma und schmecken rein süß (Alpenrosenhonig, KleeHonige). Andere Honige besitzen das mehr oder weniger typische Aroma der Trachtpflanzen (Lindenhonige, Edelkastanienhonige). Honige aus subtropischen Gebieten fallen oft durch ein aufdringliches, parfümartiges, betäubendes Aroma auf.

Artfremder Geruch oder Geschmack sind zu beanstanden.

Auffallende Farbe, mangelndes oder auffälliges Aroma sind allein kein Grund zur Beanstandung. Erst die chemische und mikroskopische Untersuchung ermöglichen es, einen Honig richtig zu beurteilen.

2 Bestimmung des Wassergehaltes

refraktometrisch

PRINZIP

Es wird der Brechungsindex des homogenen, gegebenenfalls verflüssigten Honigs bei 20 °C bestimmt und mit Hilfe einer Tabelle der zum jeweiligen Brechungsindex gehörende Wassergehalt in g/100 g ermittelt.

GERÄTE

- Stehkolben mit Stopfen (ca. 50 ml) oder Gläser mit Schraub- oder Schlifdeckel, bzw. Stopfen.
- Wärmeschrank, einstellbar auf 50 ± 2 °C.
- Abbé-Refraktometer, ausgestattet mit Thermostat oder mit Thermometer zum Messen bei $20 \pm 0,5$ °C, geeignet zum Ablesen des Refraktometerwertes auf die 4. Stelle nach dem Komma oder digitaler Refraktometer.

AUSFÜHRUNG

Verflüssigen des Honigs

Kandierte Honig vor der Bestimmung verflüssigen:

- Eine gut durchmischte Probe in einem dicht verschlossenen Glas im Trockenschrank bei 50 °C stehen lassen, bis sich der Honig verflüssigt hat
- vor dem Öffnen des Glases auf Raumtemperatur abkühlen lassen (je nach Grösse des Gefässes 1 - 2 Tage)
- vor der Bestimmung die Probe mit Hilfe eines Spatels oder Glasstabes nochmals gut durchmischen.

Messung des Brechungsindex

Mit einem Glasstab einen Tropfen des völlig verflüssigten oder durch intensives Rühren gut homogenisierten flüssigen Honigs rasch auf das Prisma des Refraktometers bringen.

BERECHNUNG UND ANGABE DER RESULTATE

Der zum erhaltenen Brechungsindex zugehörige Wassergehalt wird aus *Tabelle 23A.12* abgelesen und auf 0,1 g/100 g gerundet angegeben.

Liegt die Messtemperatur über 20 °C, sind pro °C je 0,00023 Indexeinheiten zum Brechungsindex hinzuzurechnen.

Liegt die Messtemperatur unter 20 °C, sind pro °C je 0,00023 Indexeinheiten vom Brechungsindex abzuziehen.

Liegt der ermittelte Brechungsindex zwischen den Werten der Tabelle, ist der Wassergehalt durch Interpolation zu ermitteln.

Genauigkeit der Resultate: Siehe DIN-Norm 10752.

Tabelle 23A.12

Ablesung des Wassergehaltes des Honigs aus dem Brechungsindex bei 20°C

Refrakto- Meterwert	Wasser- gehalt g/100 g	Refrakto- meterwert	Wasser- gehalt g/100 g	Refrakto- meterwert	Wasser- gehalt g/100 g
1,5044	13,0	1,4935	17,2	1,4830	21,4
1,5038	13,2	1,4930	17,4	1,4825	21,6
1,5033	13,4	1,4925	17,6	1,4820	21,8
1,5028	13,6	1,4920	17,8	1,4815	22,0
1,5023	13,8	1,4915	18,0	1,4810	22,2
1,5018	14,0	1,4910	18,2	1,4805	22,4
1,5012	14,2	1,4905	18,4	1,4800	22,6
1,5007	14,4	1,4900	18,6	1,4795	22,8
1,5002	14,6	1,4895	18,8	1,4790	23,0
1,4997	14,8	1,4890	19,0	1,4785	23,2
1,4992	15,0	1,4885	19,2	1,4780	23,4
1,4987	15,2	1,4880	19,4	1,4775	23,6
1,4982	15,4	1,4875	19,6	1,4770	23,8
1,4976	15,6	1,4870	19,8	1,4765	24,0
1,4971	15,8	1,4865	20,0	1,4760	24,2
1,4966	16,0	1,4860	20,2	1,4755	24,4
1,4961	16,2	1,4855	20,4	1,4750	24,6
1,4956	16,4	1,4850	20,6	1,4745	24,8
1,4951	16,6	1,4845	20,8	1,4740	25,0
1,4946	16,8	1,4840	21,0		
1,4940	17,0	1,4835	21,2		

Präzision. Ein unter der Leitung der Subkommission 7 nach Kapitel 60B "Ringversuche" des SLMB (Methodenprüfung) mit 19 schweizerischen Teilnehmerlaboratorien an 4 verschiedenen Honigproben mit je 3facher Bestimmung durchgeführter Ringversuch ergab folgende Werte:

Honigart	Mittelwerte (m) g/100 g	Wiederhol- barkeit (r)	Vergleich- barkeit (R)
Akazienhonig, Schweiz	16,4	0,13	0,48
Blütenhonig	17,3	0,15	0,52
Wildblütenhonig	18,1	0,15	0,68
Yucatanhonig, Mexiko	20,0	0,11	0,68

Die Einzelresultate sowie die Zusammenstellung der gesamten Auswertung sind in der Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Sektionen Bienen, einzusehen (unveröffentlichte Arbeit von *Bogdanov, S.*¹ und *Lischer, P.*²: Inter laboratory trials; Diastase activity; Phadebas and Schade methods; Saccharose activity by Siegenthaler and water content by refractometry 1993).

LITERATUR

Codex Alimentarius Commission: Revised Codex Standards for Sugars and Honey; CX 5/10.2; CL (1993)/14-SH; Via delle Terme di Caracalla, Rome (1993).

DIN Norm 10752 (Entwurf 1990): Bestimmung des Wassergehaltes von Honig.

Zürcher K. und Hadorn H.: Vergleichende Wasserbestimmungen in Honig nach Karl Fischer, aus Dichte, refraktometrisch und gravimetrisch. Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg. **71**, 396 - 403 (1980).

Grossfeld J.: Anleitung zur Untersuchung der Lebensmittel. Springer Verlag, Berlin (1927), S. 231 und 356.

Auerbach F. und Borries G.: Die Bestimmung der Trockenmasse echter Honige. Z. für Untersuchung der Nahrungs- und Genussmittel sowie der Gebrauchsgegenstände (ab 1943: Z. für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung). **48**, 272 - 277 (1924).

Bogdanov S., Martin P., Lüllmann C., Harmonised methods of the European honey commission, Apidologie, extra issue, 1-59 (1997)

¹ Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, 3097 Liebefeld

² Forschungsanstalt für Agrikulturchemie und Umwelthygiene, 3097 Liebefeld

3 **Bestimmung des *pH*-Wertes und des Gehaltes an freier Säure** potentiometrisch

PRINZIP

Die in Wasser gelöste Probe wird potentiometrisch mit Natronlauge auf den *pH*-Wert von 8,3 titriert, wobei aus der hierfür verbrauchten Menge Lauge die entsprechende Menge an freier Säure berechnet wird.

REAGENZIEN

- Natriumhydroxid-Lösung 0,1 mol/l.

GERÄTE

- *pH*-Messgerät.

AUSFÜHRUNG

- 10,0 g Honig in ein Becherglas einwiegen und in 75 ml Wasser unter Rühren mit dem Magnetrührer lösen.
- Nach Eintauchen der Elektrode den *pH*-Wert ablesen und anschliessend unter ständigem Rühren (Magnetrührer) mit der Natronlauge bis zum *pH*-Wert von 8,3 titrieren. Dafür sollen nicht mehr als 60 Sekunden gebraucht werden.

BERECHNUNG UND ANGABE DER RESULTATE

$$\text{Freie Säure, in meq/kg} = \frac{100 \cdot a}{E}$$

wobei

a = zur Titration verbrauchte Menge Natronlauge 0,1 mol/l, in ml

E = Einwaage, in g.

Angabe in meq/kg, mit 1 Dezimalen (1 meq/kg = 1 Milliäquivalent/kg = 1 mval/kg).

Präzision. Die Wiederholbarkeit (r) und die Vergleichbarkeit (R) wurden im Rahmen der DIN-Norm 10756 nach ISO 5725 berechnet und entsprechen den in folgender Tabelle dargelegten Werten:

Proben	M	R	S_r	R	S_R
Waldhonig	24,66	0,63	0,22	1,86	0,66
Akazienhonig	13,05	0,55	0,20	1,95	0,69
Yucatanhonig	26,41	0,51	0,18	2,54	0,90

Alle Angaben in meq/kg (mval/kg).

LITERATUR

Official Methods of Analysis AOAC: Free Acidity of Honey. 16. Ausgabe: 44.4.20 (1995).

DIN Norm 10756 (1995): Bestimmung des Gehaltes an freier Säure.

Codex Alimentarius Commission: Revised Codex Standards for Sugars and Honey; CX 5/10.2; CL (1993)/14-SH; Via delle Terme di Caracalla, Rome (1993).

4 Bestimmung des Aschegehaltes

aufgehoben

5 Bestimmung der elektrischen Leitfähigkeit

elektrometrisch

PRINZIP

Die elektrische Leitfähigkeit einer definierten wässrigen Honiglösung wird mit einem Leitfähigkeitsmessgerät gemessen.

GERÄTE

- Leitfähigkeitsmessgerät, Messbereich bis mindestens 10^{-7} Siemens (S)
- Leitfähigkeits- bzw. Durchlaufmesszelle mit Platindoppelelektroden, temperierbar.
- Thermometer, Skalenteilungswert 0,1 °C.
- Wasserbad mit Thermostat für 20 °C, regelbar auf $\pm 0,5$ °C.

AUSFÜHRUNG

Probenvorbehandlung

- Eine genau 20,0 g Honigtrockenmasse (Methode 23A/2) entsprechende Menge Honig in frisch destilliertem Wasser lösen
- quantitativ in einen 100-ml-Messkolben überführen und mit frisch destilliertem Wasser zur Marke auffüllen.

Messen

- 40 ml dieser Messlösung in ein Becherglas überführen und bei 20 °C thermostatisieren
- mit dem Rest der Lösung sorgfältig die Leitfähigkeitselektrode spülen
die Elektrode in die Lösung eintauchen und nach dem Temperatenausgleich die Leitfähigkeit der Messlösung in (S) ablesen.

Bemerkung

Die Mehrzahl der Messgeräte arbeitet mit Gleichspannung als Messspannung. Zur Vermeidung der Verfälschung der Messergebnisse durch Polarisationserscheinungen sollte der Messvorgang so kurz wie möglich sein.

BERECHNUNG UND ANGABE DER RESULTATE

$$L = K \cdot S$$

wobei

L = Elektrische Leitfähigkeit der Honiglösung in $\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$

K = Messzellenkonstante in cm^{-1}

S = gemessener Leitwert in Millisiemens (mS).

Angabe in $\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$, mit 2 Dezimalen.

PRÄZISION

Die Wiederholbarkeit (r) und die Vergleichbarkeit (R) wurden aus Ringversuchen erhalten. Diese wurden vom deutschen Institut für Normung nach DIN-Norm 10753 durchgeführt. Es wurden dabei folgende Werte (in $\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$) erhalten:

Probe	Mittelwerte (m)	Wiederholbarkeit (r)	Wiederholstandard- Abweichung (S _r)	Vergleichbarkeit (R)	Vergleichsstandard- Abweichung (S _R)
A	1,5203	0,0296	0,0105	0,1220	0,0431
B	0,4486	0,0048	0,0017	0,0453	0,0160
C	0,2329	0,0025	0,0009	0,0233	0,0082

LITERATUR

DIN-Norm 10753 (Entwurf 1994).

Arrêté du 15 février 1977 relatif aux méthodes officielles d'analyse du miel. Journal officiel de la République française (1977-04-22).

Vorwohl G.: Messung der elektrischen Leitfähigkeit des Honigs und der Verwendung der Messwerte zur Sortendiagnose und zum Nachweis von Verfälschungen mit Zuckerfütterungshonig. Zeitschr. Bienenforsch. **7**, 37 - 47 (1964).

Vorwohl G.: Die Beziehungen zwischen der elektrischen Leitfähigkeit der Honige und ihrer trachtmässigen Herkunft. Ann. Abeille **7** (4), 301 - 309 (1964).

Bogdanov S., Martin P., Lüllmann C., Harmonised methods of the European honey commission, Apidologie, extra issue, 1-59 (1997)

6 Diastase (α -Amylase)

6.1 Bestimmung der Diastaseaktivität

Phadebas-Methode, modifiziert

PRINZIP

Als Substrat für die Bestimmung der Diastasezahl im Honig wird ein blau gefärbtes, durch Quervernetzung wasserunlöslich gemachtes Stärkepolymer eingesetzt. Dieses wird durch das Enzym zu wasserlöslichen blauen Fragmenten hydrolysiert, deren Farbintensität bei 620 nm gemessen wird. Die Extinktion der blauen Lösung ist direkt von der Aktivität der Diastase in der Probe abhängig.

REAGENZIEN

- Phadebas-Tabletten: Pharmacia Biotech AG, Dübendorf.
- Essigsäure 100 % (Eisessig).
- Natriumhydroxid-Lösung. 0,5 mol/l.
- Natriumacetat-Trihydrat.
- Acetatpuffer-Lösung (0,1 mol/l; *pH* 5,2): 13,61 g $\text{Na}(\text{CH}_3\text{COO})\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ in Wasser lösen, mit Essigsäure 100 % (ca. 1 bis 2 ml) den *pH*-Wert auf 5,2 einstellen und mit Wasser zu 1000 ml auffüllen.

GERÄTE

- Photometer, Wellenlänge 620 nm.
- Vibrator, z. B. Vortex.
- Pipetten: Wird ohne mechanische Hilfsmittel pipettiert, müssen die Pipetten oben mit einem Wattepfropfen versehen werden, um zu verhindern, dass Spuren von Speichel in die Lösungen gelangen.
- Wasserbad mit Thermostat ($40,0 \pm 0,5$ °C).
- *pH*-Meter.

AUSFÜHRUNG

- 1,00 g Honig in ein kleines Becherglas einwiegen, mit Acetatpufferlösung lösen, quantitativ in einen 100-ml-Messkolben überspülen, mit Acetatpufferlösung zur Marke auffüllen und innerhalb 1 Stunde die im Folgenden beschriebene Reaktion durchführen

- 5 ml dieser Lösung in ein Reagenzglas überführen (nicht mit dem Mund pipettieren) und dieses darauf während 5 Minuten bei 40 °C halten (Probelösung)
- gleichzeitig 5 ml Acetatpufferlösung unter denselben Bedingungen als Blindprobe ansetzen (1 Blindprobe pro Serie)
- beiden Lösungen (Probe- und Blindlösung) mit Hilfe einer Pinzette je eine Phadebas-Tablette zugeben und gleichzeitig die Stoppuhr starten
- 10 Sekunden lang kräftig schütteln (Vibrator), bis die Tabletten zerfallen sind und weiter inkubieren lassen
- nach genau 15 Minuten (Stoppuhr) die Reaktion durch Zufügen von 1 ml Natriumhydroxidlösung 0,5 mol/l stoppen, erneut 5 Sekunden auf Vibrator schütteln
- die Reaktionsgemische sofort durch ein Faltenfilter filtrieren und anschliessend die Extinktionen der Filtrate in 1-cm-Küvetten bei 620 nm messen. Die Extinktion der Blindprobe von derjenigen der Probelösung abziehen (= ΔE_{620}).

BERECHNUNG UND ANGABE DER RESULTATE

Berechnung der Diastasezahl (DZ) in Schade Einheiten:

Die Diastasezahl gibt an, wieviele g Stärke von den in 100 g Honig enthaltenen Enzymen in 1 Stunde unter Versuchsbedingungen (siehe Schade [1958]) bis zum vorgeschriebenen Endpunkt abgebaut werden. Im Vergleich der Phadebas-Methode mit der Berechnung der DZ nach Schade (Methode 23A/6.2) ergibt sich folgende Beziehung:

$$DZ = 28,2 \cdot \Delta E_{620} + 2,64$$

Die Faktoren 28,2 und 2,64 sind die Steigung bzw. der Schnittpunkt auf der Ordinate (Achsenabschnitt) der linearen Regression zwischen der Amylasezahl als y und ΔE_{620} als x, bestimmt bei 57 Honigproben (Korrelationskoeffizient = 0,987).

Angabe, mit 1 Dezimalen.

Bei niedrigen Diastasezahlen (0 bis 6) gilt eine andere Beziehung (Persano, Pulcini, 1999)

$$DZ = 35,2 \cdot \Delta E_{620} - 0,46$$

Präzision. Ein unter der Leitung der SK 7 nach Kapitel 60B SLMB (Methodenprüfung) mit 35 Teilnehmerlaboratorien (11 aus EU-Ländern; 24 aus der Schweiz) an 9 verschiedenen Honigproben (je 3fache Bestimmung) durchgeführter Ringversuch ergab bei 620 nm in einem Extinktionsbereich von ca. 0,2 bis 1,3 folgende Werte:

$$\text{Wiederholbarkeit (r)} = 0,0325 \cdot E_{620} + 0,02$$

$$\text{Vergleichbarkeit (R)} = 0,316 \cdot E_{620} + 0,04$$

Die Einzelresultate sowie die Zusammenstellung der gesamten Auswertung sind in der Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Sektion Bienen, 3097 Liebefeld einzusehen (unveröffentlichte Arbeit von S. *Bogdanov*³ und P. *Lischer*⁴: Inter laboratory trials; Diastase acti vity; Phadebas and Schade methods; Invertase activity by Siegenthaler and water content by refractometry 1993).

LITERATUR

Bogdanov S.: Honigdiastase: Gegenüberstellung verschiedener Bestimmungsmethoden. Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg. **75**, 214 - 220 (1984).

Siegenthaler U.: Bestimmung der α -Amylase im Bienenhonig mit einem handelsüblichen, farbmarkierten Substrat. Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg. **66**, 393 - 399 (1975).

Bogdanov S., Martin P.; Lüllmann C., Harmonised methods of the European honey commission, Apidologie, extra issue, 1-59 (1997)

L. Persano Oddo, P. Pulcini; A scientific note on the Phadebas method for honeys with low enzyme content, Apidologie 30, 347-348 (1999)

³ Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, 3097 Liebefeld

⁴ Forschungsanstalt für Agrikulturchemie und Umwelthygiene, 3097 Liebefeld

6.2 Bestimmung der Diastaseaktivität

nach Schade

DEFINITION

Unter der Diastaseaktivität von Honig wird die nach dem hier beschriebenen Verfahren ermittelte Reaktionszeit verstanden, in der von einer definierten Menge Honig eine definierte Menge an Stärke bis zu einem vorgegebenen Endpunkt abgebaut wird. Die Diastaseaktivität wird als Diastasezahl (DZ) angegeben. Einer Diastasezahleinheit entspricht unter den Bedingungen dieses Verfahrens die Enzymaktivität in 1 g Honig, welche eine definierte Stärkemenge von 0,01 g mit einem bestimmten Blauwert in 1 Stunde bei 40 °C zu einem vorgegebenen Extinktions-Endwert abzubauen vermag.

PRINZIP

Definierte Volumina an Stärke- und Probenlösung werden in einem geeigneten Reaktionsgefäss mit seitlichem Schenkel voneinander getrennt auf 40 °C erwärmt und darauf im Hauptkolben des Reaktionsgefässes miteinander vermischt. Dem Reaktionsgemisch werden von Zeit zu Zeit Proben entnommen und mit Iodlösung versetzt. Der Stärkeabbau wird photometrisch verfolgt. Aus der mit Hilfe der Zeit-Messwert-Paare festgelegten Reaktionskurve wird die Zeit abgelesen, die bis zum Erreichen der vorgegebenen, dem Abbau von 1 g Stärke entsprechenden Extinktion vergangen ist.

REAGENZIEN

- Natriumacetat-Trihydrat.
- Natriumchlorid-Lösung: 2,9 g NaCl in Wasser lösen und auf 100 ml auffüllen.
- Essigsäure 100 % (Eisessig).
- Acetatpuffer-Lösung (pH 5,3): 43,5 g CH₃COONa·3H₂O in Wasser lösen, mit ca. 5 ml Essigsäure, 100 % auf pH 5,3 einstellen und mit Wasser auf 250 ml auffüllen.
- Stärke-Lösung

Bestimmung der Trockenmasse der Stärke:

- Ca. 2 g der lufttrockenen löslichen Stärke auf dem Boden eines vorgetrockneten und tarierten niedrigen Wägeglasses mit Deckel (ø ca. 5 cm; Höhe = 3 cm) gleichmässig in dünner Schicht verteilen
- auf 0,1 mg wägen und 90 Minuten bei 130 °C trocknen
- das mit dem Deckel verschlossene Wägeglas zum Abkühlen ca. 1 Stunde in den Exsikkator stellen und anschliessend auf 0,1 mg genau wägen.

Herstellung der Stärkelösung

- Die einer Trockenmasse von 2,000 g entsprechende Menge Stärke in einen 250-ml-Erlenmeyerkolben einwiegen
- mit 90 ml Wasser versetzen und unter Schwenken mischen
- die dabei erhaltene Suspension unter ständigem Schwenken des Kolbens schnell zum Sieden erhitzen und insgesamt 3 Minuten am Sieden erhalten
- anschliessend die heisse Lösung sofort in einen 100-ml-Messkolben überführen
- unter fließendem Wasser rasch auf Raumtemperatur abkühlen, mit Wasser zur Marke auffüllen und gründlich mischen.

Bemerkungen

Die Lösung ist am Tage der Verwendung frisch herzustellen.

Für die Stärkelösung sind nur lösliche Stärken zu verwenden, die bei dem unter "Ausführung", Abschnitt "Kalibrierung der Reaktionsmischung" beschriebenen Kalibrierungsverfahren eine klare, rein blaue Lösung der im Photometer festgelegten Extinktionen liefern.

- Iod, doppelt sublimiert, z. B. Merck Nr. 4761.
- Kaliumiodid.
- Iod-Stammlösung: 11,0 g doppelt sublimiertes Iod und 22,0 g Kaliumiodid in 30 bis 40 ml Wasser lösen und auf 500 ml auffüllen. Die Stammlösung ist bei Aufbewahrung in einer verschlossenen, dunklen Flasche ca. 1 Jahr haltbar.
- Iod-Lösung, verdünnt: 20,0 g Kaliumiodid in Wasser lösen und nach Zugabe von 2 ml Stammlösung mit Wasser auf 500 ml auffüllen. Diese verdünnte Iodlösung ist am Tage der Verwendung frisch herzustellen und vor übermäßigem Luftzutritt durch sofortiges Verschliessen des Vorratsbehältnisses nach Entnahme der benötigten Mengen zu schützen.

GERÄTE

Alle für diese Bestimmung verwendeten Geräte müssen frei von Detergentien sein!

- Wasserbad mit Thermostat ($40,0 \pm 0,5$ °C).
- Küvetten, Schichtdicke 1 cm.
- Spektro- oder Filterphotometer mit Schmalband-Interferenzfilter zur Messung bei 660 nm.
- Stoppuhr.
- pH-Meter.
- Reaktionsgefäß aus Glas, siehe Abb. 23A.1

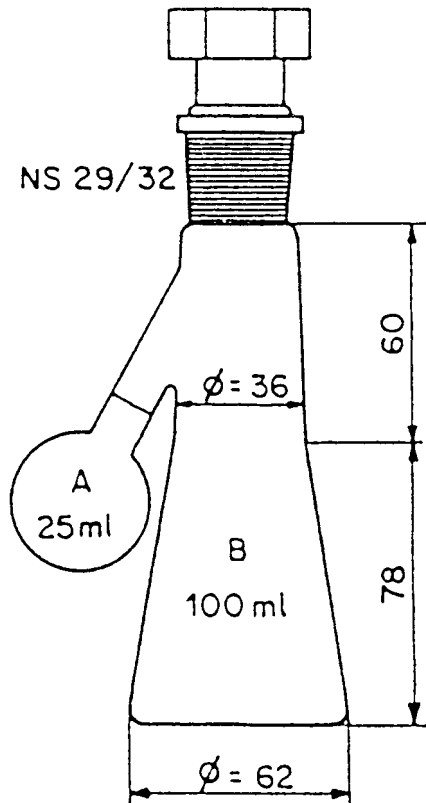


Abb.23A.1
Reaktionsgefäss mit Seitenarm (Masse in mm)

AUSFÜHRUNG

- 10,0 g Honig in ein Becherglas einwiegen und ohne Erwärmen in ca. 15 ml Wasser und 5 ml Acetatpufferlösung vollständig lösen
- diese Lösung anschliessend quantitativ in einen 3 ml Natriumchloridlösung enthaltenden 50-ml-Messkolben überführen und mit Wasser zur Marke auffüllen (Probenlösung).

Bemerkungen

Die Beigabe von Natriumchloridlösung darf erst nach Lösung des Honigs in Acetatpufferlösung erfolgen, weil die Diastaseaktivität in Gegenwart von Natriumchlorid bei *pH*-Werten unter 4,0 sehr schnell abnimmt. Die Probenlösung ist nur wenige Stunden unverändert haltbar. Es wird daher empfohlen, diese immer unmittelbar vor der Durchführung der Bestimmung anzusetzen.

Kalibrieren der Reaktionsmischung - Blauwert-Einstellung

(Dabei wird geprüft, welche Wassermenge der Reaktionsmischung beigefügt werden muss, damit von der Iod-Stärkelösung im Photometer eine Extinktion im Bereich von 0,745 bis 0,770 erhalten werden kann).

- In 6 geeignete Glasgefässe (Reagenzgläser) 20; 21; 22; 23; 24 und 25 ml Wasser und je 5 ml verdünnte Iodlösung geben
- beginnend mit dem ersten Gefäss 0,5 ml eines Gemisches aus 10 ml Wasser und 5 ml Stärkelösung hinzugeben, gut durchschütteln und sofort in einer 1-cm-Küvette die Extinktion bei 660 nm gegen Wasser messen
- mit den andern Gefässen nacheinander in gleicher Weise verfahren, bis damit im Photometer eine Extinktion von 0,770 bis 0,745 erhalten wird. Die so ermittelte Wassermenge ist die Standardverdünnung für alle mit der Stärkelösung durchgeführten Bestimmungen.

Bemerkungen

Die Zeit zwischen Zugabe der verdünnten Stärkelösung und der Bestimmung der Extinktion soll wegen der zeitlichen Abhängigkeit der Farbintensität sowohl bei der Kalibrierung als auch der Bestimmung der Diastaseaktivität möglichst einheitlich sein. Wird bei der ersten Verdünnungsstufe (20 ml) eine Extinktion von weniger als 0,745 oder der letzten Verdünnungsstufe (25 ml) eine höhere Extinktion als 0,770 erhalten, so ist die verwendete Stärke für die Bestimmung der Diastaseaktivität mit diesem Verfahren ungeeignet.

Bestimmung aus Probelösung

- 10 ml der Probenlösung in den Hauptarm B und 5 ml der Stärkelösung in den Seitenarm A des Reaktionsgefässes pipettieren
- das Reaktionsgefäss derart in das auf $40 \pm 0,2$ °C temperierte Wasserbad stellen, dass eine gleichmässige Erwärmung beider Lösungen sichergestellt, eine vorzeitige Vermischung jedoch ausgeschlossen ist
- nach 15 minütigem Erwärmen das Reaktionsgefäss kurzzeitig aus dem Wasserbad entnehmen und die im Seitenarm des Reaktionsgefässes befindliche Stärkelösung durch vier- bis fünfmaliges Kippen des Reaktionsgefässes und anschliessendes kräftiges Schütteln mit der Probenlösung vermischen bei gleichzeitiger Ingangsetzung der Stoppuhr (Reaktionszeit $t = 0$)
- anschliessend das Reaktionsgefäss sofort wieder ins Wasserbad zurückstellen
- in periodischen Zeitabständen (erstmal nach 5 Minuten) jeweils 0,5 ml der Reaktionsmischung entnehmen und zwecks Stoppen der Reaktion schnell zu jeweils 5 ml verdünnter Iodlösung geben

- nach Zugabe der wie unter Abschnitt "Kalibrieren der Reaktionsmischung" ermittelten Wassermenge und anschliessender guter Durchmischung die Extinktion der jeweiligen Lösung (Probenmesslösung) sofort in einer 1-cm-Küvette bei 660 nm gegen Wasser messen

Bemerkungen

Die Zeitabstände nach der ersten Entnahme aus dem Reaktionsgefäss sind so zu bemessen, dass 3 bis 4 Messwerte im Bereich zwischen den beiden Extinktionen 0,456 und 0,155 erhalten werden.

Als angenäherte Richtwerte für die Zeitabstände zwischen den Entnahmen aus dem Reaktionsgefäss gelten:

Extinktion bei t = 5 min	Zeitabstand
E > 0,658	10 min oder länger
0,658 > E > 0,523	5 bis 10 min
0,523 > E > 0,456	2 bis 5 min

Liegt die Extinktion bei t = 5 min unter ca. 0,350 ist es empfehlenswert, die Reaktionszeit für die erstmalige Messung entsprechend zu reduzieren.

Blindwertkontrolle

- 10 ml Probenlösung mit 5 ml Wasser versetzen und gründlich durchmischen
- anschliessend 0,5 ml davon abpipettieren und zu 5 ml verdünnter Iodlösung geben
- nach Zugabe der nach Abschnitt "Kalibrieren der Reaktionsmischung" ermittelten Wassermenge und anschliessender Durchmischung die Extinktion in einer 1-cm-Küvette bei 660 nm gegen Wasser messen. Ergibt sich hierbei eine messbare Extinktion, ist dieser Blindwert von den nach Abschnitt "Bestimmung aus Probenlösung" ermittelten Messwerten abzuziehen.

BERECHNUNG UND ANGABE DER RESULTATE

Die Diastaseaktivität berechnet sich als Diastasezahl (DZ) wie folgt:

$$DZ = \frac{300}{t_x}$$

wobei

t_x = die nach folgender Erklärung ermittelte Reaktionszeit, in Minuten.

Angabe, mit 1 Dezimalen.

Die Extinktionswerte der Probenmesslösungen werden, gegebenenfalls nach Abzug der Blindwertextinktion (siehe Abschnitt "Blindwertkontrolle"), auf Millimeterpapier gegen die entsprechenden Reaktionszeiten in Minuten aufgetragen. Für die im Bereich $E = 0,155$ bis $0,456$ liegenden Messpunkte wird die Ausgleichsgerade gezeichnet und mit Hilfe dieser der Zeitpunkt t_x für $E = 0,235$ ermittelt.

Bemerkungen

Der Massstab für die t- und E-Achse ist so zu wählen, dass die leichte Krümmung der Reaktionskurve im Bereich $E = 0,155$ bis $0,456$ weitgehend kompensiert wird und dass ferner eine ausreichend genaue Ablesung des Schnittpunktes der Ausgleichsgeraden mit der

$E = 0,235$ Linie möglich ist.

Anstelle der graphischen Auswertung kann die Ausgleichsgerade und der Zeitpunkt für $E = 0,235$ durch Regressionsrechnung (lineare Regression) ermittelt werden, wobei ebenfalls nur Messpunkte im Bereich $E = 0,155$ bis $0,456$ zu berücksichtigen sind.

Präzision. Ein unter der Leitung der Subkommission 7 nach Kapitel 60B "Ringversuche" des SLMB (Methodenprüfung) mit 11 Laboratorien aus dem EU-Bereich an 9 verschiedenen Honigproben (je 3fache Bestimmung) durchgeführter Ringversuch ergab für den Bereich zwischen 8,7 und 37,7 Diastasezahleinheiten folgende Werte:

Wiederholbarkeit (r) = $- 0,7 + 0,13 \cdot DZ$

Vergleichbarkeit (R) = $- 0,06 + 0,59 \cdot DZ$

Der relative hohe Wert von R ist sehr wahrscheinlich auf die Uneinheitlichkeit der käuflichen Stärkepräparate zurückzuführen.

Die Einzelresultate sowie die Zusammenstellung der gesamten Auswertung sind in der Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Sektion Bienen, einzusehen (unveröffentlichte Arbeit von *Bogdanov, S.*⁵ und *Lischer, P.*⁶: Inter laboratory trials; Diastase activity; Phadebas and Schade methods; Saccharase activity by Siegenthaler and water content by refractometry 1993).

⁵ Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, 3097 Liebefeld

⁶ Forschungsanstalt für Agrikulturchemie und Umwelthygiene, 3097 Liebefeld

LITERATUR

DIN Norm 10750 (Juli 1990): Bestimmung der Diastase-Aktivität.

Hadorn, H. und Zürcher, K.: Eine einfache kinetische Methode zur Bestimmung der Amylasezahl in Honig. *Dt. Lebensmittel Rdsch.* **68**, 209 (1972).

Hadorn, H.: Zur Problematik der quantitativen Amylasebestimmung in Honig. *Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg.* **52**, 67 - 103 (1961).

Schade, J.E., Marsh, G.L. and Eckert, J.E.: Amylase activity and hydroxymethylfurfural in honey and their usefulness in detecting heat adulteration. *Food Research* **23**, 446 - 463 (1958).

Bogdanov S., Martin P.; Lüllmann C., Harmonised methods of the European honey commission, *Apidologie*, extra issue, 1-59 (1997)

7 Bestimmung der Invertase- (α -Glucosidase) aktivität

photometrisch

PRINZIP

Als Substrat für die Bestimmung der Invertasezahl im Honig wird p-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid (pNPG) verwendet. Durch die im Honig vorhandene α -Glucosidase (Invertase) wird pNPG in Glucose und p-Nitrophenol aufgespalten. Durch Einstellen des *pH*-Wertes auf 9,5 wird einerseits die enzymatische Reaktion gestoppt und andererseits das Nitrophenol in das Nitrophenolat-Anion überführt, welches der umgesetzten Menge Substrat entspricht und photometrisch bei 400 nm bestimmt wird.

REAGENZIEN

- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan.
- Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4 .
- Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- p-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid (pNPG).
- Puffer-Lösung (0,1 mol/l; *pH* = 6,0): 11,66 g Kaliumdihydrogenphosphat und 2,56 g Dinatriumhydrogenphosphat mit Wasser lösen und zu 1 L auffüllen.
- Salzsäure, 3 mol/l.
- Substrat p-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid (pNPG)-Lösung, (0,02 mol/l): 6,0252 g pNPG (z. B. Fluka) in Pufferlösung lösen und zum Liter auffüllen. pNPG ist schlecht wasserlöslich; die zum Lösen verwendete Pufferlösung kann deshalb auf ca. 60 °C erwärmt werden. Die Substratlösung ist sofort wieder abzukühlen und ist in einer Braunglasflasche längere Zeit (2 Monate) im Kühlschrank haltbar.
- Sistir-Lösung (3 mol/l; *pH* = 9,5): 363,42 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan in Wasser lösen und auf 1 L auffüllen. Mit Salzsäure 3 mol/l auf einen *pH*-Wert von 9,5 einstellen.

GERÄTE

- Photometer, Wellenlänge 400 nm.
- Wasserbad mit Thermostat ($40 \pm 0,5$ °C).
- Vibrator, z.B. Vortex.
- *pH*-Meter.

AUSFÜHRUNG

- Honig-Lösung: 5,00 g Honig in ein kleines Becherglas einwiegen, mit Pufferlösung auflösen, quantitativ in einen 25-ml-Messkolben überführen und mit Pufferlösung zur Marke auffüllen. Diese Lösung ist im Kühlschrank 1 Tag haltbar
- 5,0 ml Substratlösung in einem Reagenzglas oder Plastikröhrchen im Wasserbad (40 °C) während 5 Minuten vorwärmen
- danach 0,50 ml Honiglösung zupipettieren (Startzeit)
- Inhalt mittels Vibrator kurz durchmischen und bei 40 °C inkubieren lassen
- nach genau 20 Minuten 0,50 ml SistirLösung zupipettieren und erneut mittels Vibrator durchmischen (Messlösung)
- für die *Blindprobe* 5,0 ml Substratlösung über die gleiche Zeitdauer bei 40 °C inkubieren; die Honiglösung wird jedoch hier erst *nach* der SistirLösung zupipettiert (je 0,50 ml)(für jeden Honig eine separate Blindprobe herstellen)
- nach Abkühlen der Lösungen auf Raumtemperatur innerhalb 1 Stunde die Extinktionen der Mess- und der Blindlösung in 1-cm-Küvetten bei 400 nm messen. Die Extinktion der Blindlösung von derjenigen der Messlösung abziehen (= ΔE_{400}).

BERECHNUNG UND ANGABE DER RESULTATE

Die im Versuch produzierte Menge p-Nitrophenol in μmol entspricht genau der Menge des umgesetzten Substrates in μmol . Die im Honig vorhandene Invertaseaktivität kann deshalb aus der bei 400 nm gemessenen Extinktion berechnet und in U/kg angegeben werden:

$$\begin{aligned} 1. \text{ Invertaseaktivität, in U/kg} &= 6 \cdot 0,05 \cdot 0,05298 \cdot 10^4 \cdot \Delta E_{400} \\ &= 158,94 \cdot \Delta E_{400} \end{aligned}$$

wobei

- U = 1 internationale Einheit, nach welcher definitionsgemäss 1 μmol pNPG pro Minute umgewandelt wird
- 6 = Faktor für die eingesetzte Anzahl ml Messlösung (Gesamtvolumen)
- 0,05 = Faktor für die Umrechnung der Reaktionszeit von 20 Minuten auf 1 Minute
- 10^4 = Faktor für die Umrechnung der eingesetzten Menge Honig (0,1 g in 0,5 ml) auf 1 kg
- 0,05298 = 7,37/139,11; Umrechnungsfaktor von μg in μmol pro ml, wobei 7,37 = Faktor für p-Nitrophenol aus der Bezugskurve ist
- 139,11 = Molare Masse von p-Nitrophenol.

$$1 \text{ U/kg} = \frac{1 \mu\text{mol pNPG}}{\text{Minute} \cdot \text{kg}_{\text{Honig}}}$$

Auf Grund von einer Publikation (von der Ohe et al. 1999) wurde vorgeschlagen auf die Angabe in Invertasezahlen zu verzichten und die Invertase-Aktivität in internationalen Einheiten anzugeben. In dieser Publikation wurde auch vorgeschlagen auf die Bezeichnung Sacchase zu verzichten, zugunsten der richtigen Bezeichnung „Invertase“. Diese Vorschläge wurden international akzeptiert.

Präzision: Ein unter der Leitung der Subkommission 7 nach Kapitel 60B "Ringversuche" des SLMB (Methodenprüfung) mit 19 schweizerischen Teilnehmerlaboratorien an 4 verschiedenen Honigproben (schweiz. Akazienhonig; Honigtau-honig; schweiz. Blütenhonig; mexikanischer Yucatanhonig) mit je 3facher Bestimmung durchgeführter Ringversuch ergab folgende Werte:

Honigart	Mittelwerte (m)	Wiederholbarkeit (r)	Vergleichbarkeit (R)
Akazienhonig, Schweiz	6,5	0,26	1,8
Honigtau-honig	9,4	0,33	1,2
Blütenhonig, Schweiz	7	0,48	1,8
Yucatanhonig, Mexiko	17,7	0,58	1,3

Die Einzelresultate sowie die Zusammenstellung der gesamten Auswertung sind in der Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Sektion Bienen, einzusehen (unveröffentlichte Arbeit von *Bogdanov, S.*⁷ und *Lischer, P.*⁸: Inter laboratory trials; Diastase activity; Phadebas and Schade methods; Saccharase activity by Siegenthaler and water content by refractometry 1993).

LITERATUR

Siegenthaler, U.: Eine einfache und rasche Methode zur Bestimmung der α -Glucosidase (Saccharase) im Honig. Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg. 68, 251 - 258 (1977).

Hadorn, H. und Zürcher, K.: Eine verbesserte polarimetrische Methode zur Saccharasezahlbestimmung im Honig. Dt. Lebensm. Rdsch. 62, 195 - 201 (1966).

von der Ohe, W., Raude-Roberg, R., Dustmann J. Comparison of methods for determination of saccharase activity in honey, Apidologie 30 (5): 412-413, 1999.

Bogdanov S., Martin P.; Lüllmann C., Harmonised methods of the European honey commission, Apidologie, extra issue, 1-59 (1997)

⁷ Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, 3097 Liebefeld

⁸ Forschungsanstalt für Agrikulturchemie und Umwelthygiene, 3097 Liebefeld.

8 Zuckerarten

8.1 Bestimmung von Zuckerarten

mittels HPLC (Refraktionsindexdetektion)

PRINZIP

Von einer klarfiltrierten Honiglösung werden die Zuckerarten mittels HPLC auf einer aminomodifizierten Kieselgelsäule getrennt. Die Bestimmung erfolgt mit einem Refraktionsindex-Detektor.

REAGENZIEN

- Standards: Glucose; Fructose; Saccharose; Turanose; Maltose; Trehalose; Melezitose; Isomaltose; Raffinose; (alle z. B. Merck; Fluka); Erlöse (Senn Chemicals; Dielsdorf).
- Standardlösung: Je 70 g/l Glucose und Fructose sowie je 5 g/l Saccharose, Turanose, Maltose, Trehalose, Erlöse, Melezitose, Isomaltose und Raffinose in einer Mischung von Methanol in Wasser (1+3 Volumenteile); (Haltbarkeit: Bei -20 °C mehrere Monate.)
- Methanol, HPLC-rein.
- Acetonitril, HPLC-rein.
- Elutionsmittel: Acetonitril/Wasser (4+1 Volumenteile).

GERÄTE

- HPLC-Gerät mit Refraktionsindex-Detektor und Integrator.
- Trennsäule: 250 · 4 mm, NH₂-modifiziertes Kieselgel (3 oder 5 µm), z. B. Spherisorb Amino (Phase Separation); Hypersil-APS (Shandon); Polygosyl (Macherey-Nagel) Vorsäule 20 · 4 mm mit gleicher Füllung wie Trennsäule.
- Membranfilter, 0,45 µm.

AUSFÜHRUNG

- 20,00 g Honig in ein Becherglas einwiegen, in einer Mischung von Methanol/Wasser (1 + 3 Volumenteile) lösen, quantitativ in einen 100-ml-Messkolben überführen und mit derselben Mischung zur Marke auffüllen
- ein Aliquot durch ein Membranfilter mit 0,45 µm Porenweite filtrieren und anschliessend chromatographieren.

Trennbedingungen (Beispiel, Abb. 23A. 2 - 4)

Einspritzmenge	10 μ l
Temperatur	Trennsäule und Refraktionsindex-Detektor thermostatisiert, 40 °C
Flussrate	1,0 ml/min

Bemerkungen

1. Vorgängig muss geprüft werden, ob der Response des Detektors im Messbereich linear ist. Ist er bis 70 g/l Fructose oder Glucose nicht linear, sollte für diese beiden Zuckerarten eine zweite Messung gemacht werden. Dabei werden die Standardlösung und die Honiglösung im Verhältnis 1 + 4 mit Methanol/Wasser (1 + 3 Volumenteile) verdünnt.
2. Zuckerarten, die in ihrer Retentionszeit nicht den Standardzuckerarten entsprechen, werden unter Verwendung des Responsefaktors für Maltose als Oligosaccharide zusammengefasst.
3. Vorliegende Methode beschränkt sich auf die Bestimmung der wichtigsten Zuckerarten. Für die Bestimmung weiterer Zuckerarten, unter Verwendung entsprechender Standards, siehe *Bogdanov, S. (1988)*.
4. Die Mischung von Methanol/Wasser (1 + 3 Volumenteile) hemmt die Honiginvertase vollständig.

BERECHNUNG UND ANGABE DER RESULTATE

Die Gehalte der einzelnen Zuckerarten werden aus der Peakfläche oder Peakhöhe mit Hilfe eines Bezugschromatogrammes berechnet (externer Standard). Die unbekanntes Zuckerarten werden mit dem Maltosestandard berechnet.

Angabe in g/100 g Honig, mit 1 Dezimalen.

Die Nachweisgrenze der einzelnen Zuckerarten liegt je nach Gerät und Zuckerart zwischen 0,1 und 0,5 g/100 g.

Präzision

Mittelwert (m), Wiederholbarkeit (r), Wiederholstandard-Abweichung (s), Vergleichbarkeit (R) und Vergleichsstandard-Abweichung (s_R) wurden aus Ringversuchen erhalten. Diese wurden vom deutschen Institut für Normung nach DIN-Norm 10758 durchgeführt. Es wurden dabei folgende Werte (in g/100 g Honig) erhalten:

Fructose

Proben	m	r	s _r	R	s _R
Waldhonig	31,20	0,82	0,29	1,60	0,57
Akazienhonig	42,39	0,88	0,31	2,34	0,83
Lavendelhonig	37,88	1,03	0,36	1,57	0,56

Glucose

Proben	m	r	s _r	R	s _R
Waldhonig	23,04	0,88	0,31	2,09	0,74
Akazienhonig	28,54	0,80	0,28	1,78	0,63
Lavendelhonig	32,03	1,07	0,38	1,42	0,50

Saccharose

Proben	m	R	s _r	R	s _R
Waldhonig	-	-	-	-	-
Akazienhonig	-	-	-	-	-
Lavendelhonig	2,83	0,43	0,15	0,93	0,33

Turanose

Proben	m	R	s _r	R	s _R
Waldhonig	2,12	0,42	0,15	0,84	0,30
Akazienhonig	1,66	0,27	0,10	0,51	0,18
Lavendelhonig	1,26	0,28	0,10	0,84	0,30

Maltose

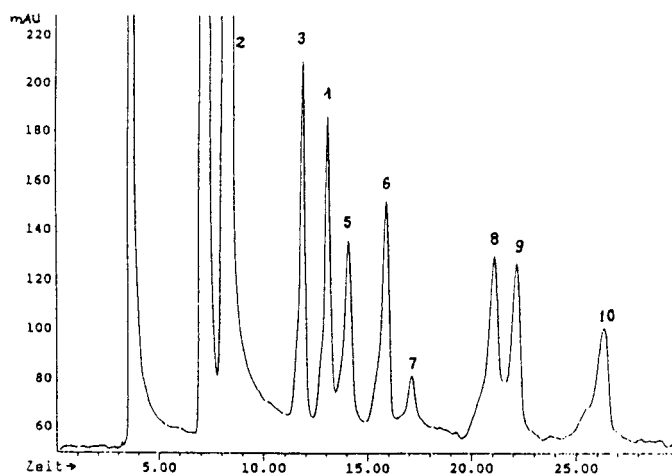
Proben	m	R	s _r	R	s _R
Waldhonig	4,77	0,55	0,19	2,54	0,90
Akazienhonig	2,02	0,62	0,22	1,31	0,46
Lavendelhonig	2,34	0,50	0,18	0,74	0,26

LITERATUR

DIN NORM 10758 (3. Vorlage): Bestimmung des Gehaltes an Sacchariden.
HPLC-Verfahren (April 1992).

Bogdanov, S. und E. Baumann, E.: Bestimmung von Honigzuckern mit HPLC. Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg. **79**, 198 - 206 (1988).

Bogdanov S., Martin P.; Lüllmann C., Harmonised methods of the European honey commission, Apidologie, extra issue, 1-59 (1997)

Legende

- 1 = Fructose
- 2 = Glucose
- 3 = Saccharose
- 4 = Turanose
- 5 = Maltose
- 6 = Trehalose
- 7 = Isomaltose
- 8 = Erlose
- 9 = Melezitose
- 10 = Raffinose

Abb. 23A.2
Chromatogramm:
Zuckerartenstandardgemisch

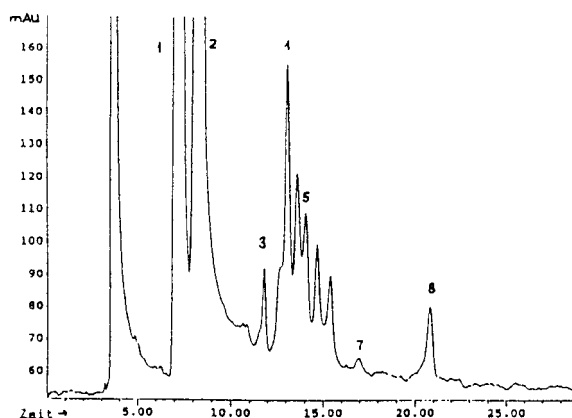


Abb. 23A.3
Chromatogramm:
Blütenhonig

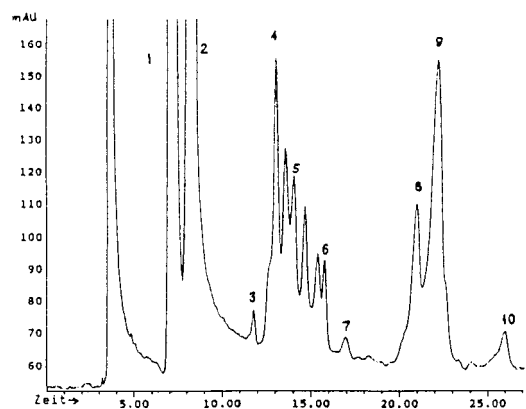


Abb. 23A.4
Chromatogramm:
Waldhonig

8.2 Bestimmung der D-Glucose und D-Fructose

enzymatisch

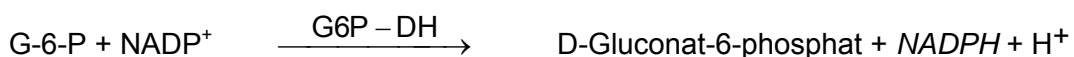
D-Fructose und D-Glucose können mit nachfolgenden Vorschriften quantitativ erfasst werden.

PRINZIP

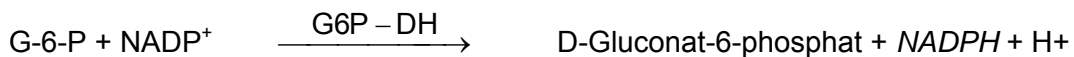
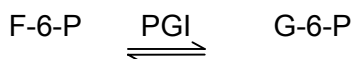
Die Bestimmung von D-Fructose erfolgt über die Umwandlung zu D-Glucose. D-Glucose und D-Fructose werden durch Hexokinase (HK) und Adenosin-5'-triphosphat (ATP) zu Glucose-6-phosphat (G-6-P) bzw. Fructose-6-phosphat (F-6-P) phosphoryliert. Mit Hilfe der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) wird das G-6-P durch Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat (NADP) zu Gluconat-6-phosphat oxidiert. Dabei wird NADPH (reduziertes NADP) gebildet, welches der Glucose-Menge äquivalent ist. Nach vollständiger Umsetzung des G-6-P wird das F-6-P durch die Phosphoglucose-Isomerase (PGI) in G-6-P überführt. Dieses reagiert wiederum mit NADP. Die nun gebildete Menge NADPH ist der Fructose-Menge äquivalent.



Glucosebestimmung:



Fructosebestimmung:



Der Fructosegehalt berechnet sich aus der Differenz von Gesamtglucose nach der Isomerisierung und ursprünglich vorhandener Glucose.

REAGENZIEN

- Enzym-Testkit zur Bestimmung verschiedener Zuckerarten wie Fructose, Glucose (z. B. Boehringer, Merck).

AUSFÜHRUNG

- Honig mit einem Spatel gut homogenisieren
- davon ca. 1 g genau in ein kleines Becherglas einwiegen
- mit zunächst wenig Wasser lösen, quantitativ in einen 100-ml-Messkolben überführen, mit Wasser bis zur Marke auffüllen und im Verhältnis 1 + 9 mit Wasser verdünnen (Messlösung)
- die Messlösung nach Vorschrift des angewandten Testkits weiterbehandeln (Pipettierschema, Messung).

BERECHNUNG UND ANGABE DER RESULTATE

Der aus der Messlösung erhaltene Gehalt an Glucose bzw. Fructose wird unter Einbezug der Verdünnungsfaktoren auf die Probe umgerechnet und in g/100 g, mit 1 Dezimalen angegeben.

Angaben zur "Wiederholbarkeit" siehe *Gonnet* (1979).

HINWEIS

Anstatt mit einem Enzymtestkit kann die Bestimmung auch mit Einzelreagenzien durchgeführt werden. Siehe dazu Kapitel "Enzymatische Bestimmungen", Methode 61B/1.2 .

LITERATUR

Boehringer Mannheim Biochemica, Methoden der enzymatischen BioAnalytik und Lebensmittelanalytik (1994).

Merck (SCHWEIZ) AG: Enzymatische Analytik in Lebensmitteln; Bioquant, Zürich.

Gonnet, M.: Application au miel d'une méthode de dosage par voie enzymatique des monosaccharides réducteurs. *Apidologie* **10**, 395 - 401 (1979).

Bergmeyer, H.U. (Hrsg.): Methoden der enzymatischen Analyse, Bd. II; *Bernt, E.* und *Bergmeyer, H.U.*: D-Fructose. Verlag Chemie, Weinheim (1974), S. 1349 - 1352.

9 Hydroxymethylfurfural

9.1 Bestimmung des Hydroxymethylfurfurals (HMF)

photometrisch, nach Winkler

aufgehoben

9.2 Bestimmung des Hydroxymethylfurfurals (HMF)

photometrisch, nach White

PRINZIP

Die Ermittlung des HMF-Gehaltes beruht auf der Messung der UV-Absorption des HMF bei 284 nm. Zur Ausschaltung anderer störender Komponenten bei dieser Wellenlänge wird die Differenz zwischen den Absorptionen einer geklärten wässrigen Honiglösung und derselben mit Zusatz von Bisulfit bestimmt. Nach Abzug der Untergrundabsorption bei 336 nm wird der Gehalt an HMF berechnet.

REAGENZIEN

- Carrez-Lösung I: 15 g Kaliumhexacyanoferrat (II), $K_4 \cdot [FeCN_6] \cdot 3H_2O$ in Wasser lösen und auf 100 ml auffüllen.
- Carrez-Lösung II: 30 g *Zinkacetat*, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ in Wasser lösen und auf 100 ml auffüllen.
- Natriumhydrogensulfit, $NaHSO_3$ (z. B. Baker Nr. 0266).
- Natriumhydrogensulfit-Lösung 2 g/l: 2,0 $NaHSO_3$ in Wasser lösen und auf 1000 ml auffüllen. Falls nötig wird diese Lösung für die Referenzlösung im Verhältnis 1 + 1 verdünnt. Frisch zubereiten!

GERÄTE

- Spektrophotometer, Wellenlänge 284 und 336 nm.
- Küvetten, 1 cm.
- Reagenzglas-Mischer.

AUSFÜHRUNG

- ca. 5 g Honig genau in ein 50-ml-Becherglas einwiegen
- Probe in ca. 25 ml Wasser lösen und quantitativ in einen 50-ml-Messkolben überführen
- 0,5 ml Carrezlösung I zufügen und mischen
- 0,5 ml Carrezlösung II zufügen, mischen und Messkolben mit Wasser bis zur Marke auffüllen (die Zugabe eines Tropfen Ethanol verhindert allfälliges Schäumen).
- Durch Filterpapier filtrieren; die ersten 10 ml Filtrat verwerfen
- je 5,0 ml Filtrat in 2 Reagenzgläser (18 · 150 mm) pipettieren

- ein Reagenzglas mit 5,0 ml Natriumhydrogensulfitlösung versetzen, gut mischen (= Referenzlösung)
- innerhalb einer Stunde die Extinktionen der Probelösung in 10-mm-Quarz-Küvetten bei 284 und 336 nm gegen die Referenzlösung messen
- falls die Extinktion bei 284 nm den Wert 1 überschreitet, Probelösung mit Wasser und Referenzlösung mit der verdünnten Natriumhydrogensulfitlösung je um den gleichen Faktor verdünnen.

Versuchsanordnung

	<i>Probelösung</i>	<i>Referenzlösung</i>
Honiglösung	5,0 ml	5,0 ml
Wasser	5,0 ml	-
Natriumhydrogensulfitlösung	-	5,0 ml

BERECHNUNG UND ANGABE DER RESULTATE

$$\text{HMF in mg/kg} = (\text{Ext.}_{284} - \text{Ext.}_{336}) \cdot 149,7 \cdot 5 \cdot F/E$$

wobei

Ext._{284} = Extinktion bei 284 nm

Ext._{336} = Extinktion bei 336 nm

149,7 = Faktor; Zusammensetzung

$$149,7 = \frac{126 \cdot 1000 \cdot 1000}{16830 \cdot 10 \cdot 5}$$

wobei

126 = Molare Masse von HMF

16830 = molarer Extinktionskoeffizient ϵ von HMF bei $\lambda = 284$ nm

1000 = Umrechnung von g in mg

10 = Umrechnung von 1 in 100 ml

1000 = Umrechnung von g Honig in kg

5 = theoretische Einwaage

F = Verdünnungsfaktor, falls verdünnt werden muss

E = Einwaage der Probe, in g.

Angabe in mg/kg, mit 1 Dezimalen.

Präzision. Ein unter der Leitung der Subkommission 7 nach Kapitel 60B "Ringversuche" des SLMB (Methodenprüfung) mit 19 Teilnehmerlaboratorien (12 aus der Schweiz, 7 aus der Europäischen Union) an 3 verschiedenen Honigproben (je 3fache Bestimmung) durchgeführter Ringversuch ergab folgende Werte:

Probe	Mittelwerte (m) mg/kg	Wiederholbarkeit (r) mg/kg	Vergleichbarkeit (R) mg/kg
A	3,8	0,9	2,3
B	22,3	1,2	3,9
C	42,1	2,9	4,4

Die Einzelresultate sowie die Zusammenstellung der gesamten Auswertung dieses Ringversuches können im Bundesamt für Gesundheitswesen, Sektion Lebensmittelbuch, Bern, eingesehen werden.

LITERATUR

Official Methods of Analysis AOAC: Hydroxymethylfurfural in honey. 16. Ausgabe: 44.4.15 (1995).

DIN Norm 10751, Teil 2 (1992): Bestimmung des Gehaltes an Hydroxymethylfurfural.

White, J.W.: Spectrophotometric Method for Hydroxymethylfurfural in Honey. *J. Ass. Off. Anal. Chem.* **62**, 509 - 514 (1979).

9.3 Bestimmung des Hydroxymethylfurfurals (HMF)

mittels HPLC

PRINZIP

In einer klarfiltrierten wässrigen Honiglösung wird HMF an einer Reversed-Phase-Säule mittels HPLC bestimmt. Die Bestimmung erfolgt durch einen UV-Detektor.

REAGENZIEN

- HMF: 5-(Hydroxymethyl)-furan-2-carbaldehyd (z. B. Merck Nr. 820 678 oder Fluka Nr. 55690).
- Methanol, HPLC-rein.
- Eluent: Wasser/Methanol (9 + 1 Volumenteile), beide HPLC-Qualität.
- Standard-Lösung: 25 mg HMF/l, als wässrige Lösung.

Gehaltsbestimmung des Standards: Es wird die Extinktion der zubereiteten Standardlösung in 1-cm-Quarz-Küvetten gegen Wasser bei 285 nm in einem UV-Spektrophotometer gemessen. Aus der gemessenen Extinktion und der Konzentration wird der molare Extinktionskoeffizient ϵ oder die spezifische Extinktion $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ berechnet. Anhand des Literaturwertes (*White* [1979]) von $\epsilon=16830$ kann der Gehalt des verwendeten Standards berechnet werden, wobei der errechnete Gehalt mindestens der durch den Lieferanten gegebenen Spezifikation entsprechen muss. Aufbewahrung des Standards bei 4 - 8 °C unter Stickstoff.

GERÄTE

- HPLC-Gerät (isokratisch) mit UV-Detektor und Integrator.
- Trennsäule: Hypersil ODS 5 μm , 125 · 4 mm oder 250 · 4 mm (z.B. Shandon).
- Membranfilter, 0,45 μm .

AUSFÜHRUNG

Probenvorbereitung

- Ca. 5 g Honig auf 10 mg in ein 50-ml-Becherglas einwiegen
- Probe in ca. 25 ml Wasser lösen, quantitativ in einen 50-ml-Messkolben überführen
- 0,5 ml Carrezlösung I zufügen und mischen

- 0,5 ml Carrezlösung II zufügen, mischen und Messkolben mit Wasser bis zur Marke auffüllen (die Zugabe eines Tropfen Ethanol verhindert allfälliges Schäumen).
- durch Filterpapier filtrieren; die ersten 10 ml Filtrat verwerfen
- je 5,0 ml Filtrat in 2 Reagenzgläser (18 . 150 mm) pipettieren
- ein Reagenzglas mit 5,0 ml Natriumhydrogensulfidlösung versetzen, gut mischen (=Referenzlösung)
- Grobfiltrieren (Papierfilter)
- durch einen 0,45- μ m-Membranfilter filtrieren (Probelösung).

Trennbedingungen (Beispiel, siehe Chromatogramme)

Flussrate	1,0 ml/Minute
Einspritzmenge	Probelösung: 20 μ l Standardlösung: 10; 20; 50 μ l
Detektion	UV-285 nm; Range: 0,2 AUFS.

BERECHNUNG UND ANGABE DER RESULTATE

Der Gehalt der Probe an HMF wird aus den entsprechenden Peakflächen und anhand des externen Standards berechnet, unter Einbezug der vorgenommenen Verdünnung.

Angabe in mg/kg, mit 1 Dezimalen.

Präzision. Ein unter der Leitung der Subkommission 7 nach Kapitel 60B "Ringversuche" des SLMB (Methodenprüfung) mit 14 Teilnehmerlaboratorien (10 aus der Schweiz, 4 aus der Europäischen Union) an 3 verschiedenen Honigproben (je 3fache Bestimmung) durchgeführter Ringversuch ergab folgende Werte:

Probe	Mittelwerte (m) mg/kg	Wiederholbarkeit (r) mg/kg	Vergleichbarkeit(R) mg/kg
A	5,2	0,4	1,6
B	22,8	1,2	4,9
C	42,3	2,1	7,3

Die Einzelresultate sowie die Zusammenstellung der gesamten Auswertung dieses Ringversuches können im Bundesamt für Gesundheitswesen, Sektion Lebensmittelbuch, Bern eingesehen werden.

HINWEIS

Mit der gleichen Methode kann auch Furfural bestimmt werden, das aber im Verhältnis zu HMF nur in sehr geringen Mengen im Honig vorkommt. Furfural eluiert bei der Verwendung einer 125 · 4-mm-Säule nach ca. 4,5 Minuten.

LITERATUR

Jeurings, H.J. and Koppers, F.: High Performance Liquid Chromatography of Furfural and Hydroxymethylfurfural in Spirits and Honey. *J. Ass. Off. Anal. Chem.* **63**, 1215 (1980).

White, J.W.: Spectrophotometric method for Hydroxymethylfurfural in Honey. *J. Ass. Off. Anal. Chem.* **62**, 509 (1979).

Bogdanov S., Martin P.; Lüllmann C., Harmonised methods of the European honey commission, *Apidologie*, extra issue, 1-59 (1997)

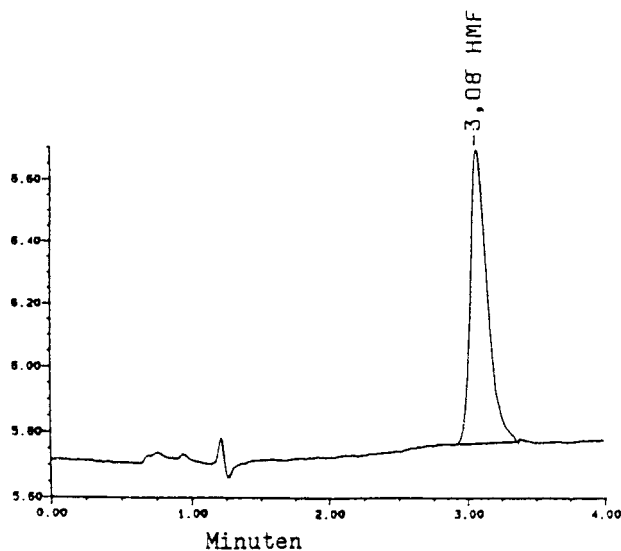


Abb. 23A.5
Chromatographie: HMF-Standard-Lösung

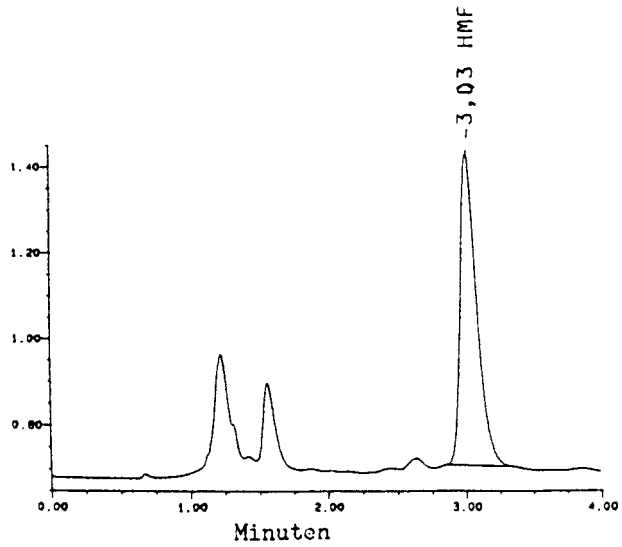


Abb. 23A.6
Chromatogramm: Honiglösung

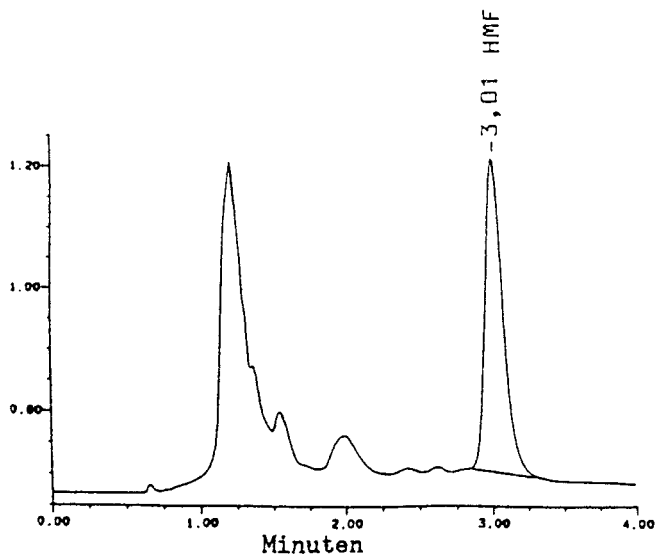


Abb. 23A.7
Chromatogramm: Honiglösung

10 Bestimmung des Prolins

photometrisch

PRINZIP

Prolin bildet mit Ninhydrin eine gefärbte Komplexverbindung, diese wird photometrisch bestimmt.

REAGENZIEN

- Ninhydrin.
- Prolin.
- Ameisensäure, konz. (98 - 100 %).
- Ethylenglycolmonomethylether bzw. 2-Methoxyethanol (Methylcellosolve).
- Ninhydrin-Lösung: 3,0 g Ninhydrin in 100 ml Ethylenglycolmonomethylether lösen. Vor Gebrauch frisch ansetzen.
- Prolin-Stammlösung: 40 mg L-Prolin/50 ml Wasser.
- Prolin-Standardlösung: 1 ml der Prolin-Stammlösung mit Wasser auf 25 ml auffüllen (25 ml enthalten genau 0,8 mg Prolin).
- 2-Propanol/Wasser (1+1 Volumenteile).

GERÄTE

- Spektrophotometer, Wellenlänge 500 bis 520 nm.
- Küvetten, Schichtdicke 1 cm.
- Reagenzgläser, 20 ml, mit Schraubverschluss oder Schliffstopfen.
- Wasserbad mit Thermometer (70 °C).

AUSFÜHRUNG

- Ca. 5 g Honig auf 10 mg genau in ein kleines Becherglas einwiegen und mit ca. 50 ml Wasser lösen
- quantitativ in einen 100-ml-Messkolben überführen, mit Wasser zur Marke auffüllen
- Kolben verschliessen und anschliessend kräftig schütteln (Probelösung).
- 0,5 ml der Probelösung in ein Reagenzglas geben, 0,5 ml Wasser in ein zweites Reagenzglas geben sowie in drei weitere Reagenzgläser je 0,5 ml der Prolinstandardlösung einpipettieren.

Bemerkung

Der Extinktionskoeffizient unterliegt Schwankungen. Seine Ermittlung muss deshalb für jede Messreihe mindestens durch eine Dreifachbestimmung aus der Prolin-Standardlösung erfolgen (Mittelwert berechnen).

- In jedes Reagenzglas zusätzlich 1,0 ml Ameisensäure und 1,0 ml Ninhydrinlösung pipettieren und die Reagenzgläser anschliessend dicht verschliessen
- Reagenzgläser kräftig schütteln und für 15 Minuten in ein siedendes Wasserbad stellen, wobei der Wasserspiegel des Bades über dem Flüssigkeitsspiegel des Inhaltes der Reagenzgläser stehen soll
- Reagenzgläser hernach entfernen und für 10 Minuten in ein Wasserbad von 70 °C stellen und dabei in jedes Glas 5,0 ml der Propanol/Wassermischung hinzugeben und die Reagenzgläser sofort wieder verschliessen
- zur vollen Farbentwicklung auf Raumtemperatur abkühlen lassen
- 45 Minuten nach der Entnahme aus dem zweiten Wasserbad die Extinktionskurven der Probe- und Standardlösungen gegen die Blindprobe in 1-cm-Küvetten im Bereich von 500 - 520 nm registrieren. Es ist das Maximum der Extinktionen zu ermitteln.

Bemerkung

Die vorgegebenen Zeiten sind genau einzuhalten. Die maximale Extinktion liegt bei ca. 510 nm.

BERECHNUNG UND ANGABE DER RESULTATE

$$\text{Prolin, in mg/kg} = \frac{\text{Ext}_p}{\text{Ext}_s} \cdot E_1 \cdot \frac{80}{E_2}$$

wobei

Ext_p = Extinktion der Probelösung

Ext_s = Extinktion der Prolinstandardlösung, ermittelt durch Mittelwertbildung

E_1 = Prolineinwaage für die Prolinstammlösung, in mg

E_2 = eingewogene Probemenge, in g

80 = Verdünnungsfaktor, bezogen auf 1 kg Honig.

Angabe in mg/kg, mit 1 Dezimalen.

Präzision. Die für die Wiederholbarkeit (r) bzw. die Wiederholstandardabweichung (s_r) sowie die Vergleichbarkeit (R) bzw. die Vergleichsstandardabweichung (s_R) dieser Methode höchstens zu erwartenden Werte wurden aus Ringversuchen gewonnen. Die Ringversuche wurden vom deutschen Institut für Normung DIN Norm 10754 durchgeführt. Die einzelnen Werte sind aus folgender Zusammenstellung ersichtlich (alle Angaben in mg/kg Honig):

Proben	m	r	s_r	R	s_R
Akazie	171	6,6	2,3	16,3	5,8
Yucatan	289	12,7	4,5	18,4	6,5
Eiche	762	24,4	8,6	58,4	20,7

m = Mittelwerte

r = Wiederholbarkeit

s_r = Wiederholstandard-Abweichung

R = Vergleichbarkeit

s_R = Vergleichsstandard-Abweichung

LITERATUR

Official Methods of Analysis AOAC: Proline in honey. 16. Ausgabe: 44.4.07 (1995).

DIN Norm 10754 (Entwurf 1991): Bestimmung des Prolingehaltes von Honig.

Speer, K. und Montag, A.: Verteilung freier Aminosäuren in Honig unter besonderer Berücksichtigung der deutschen und der französischen Heidehonige. Dt. Lebensm. Rdsch. 82 (8), 248 - 253 (1986).

Martin, P.G.: Manuals of Food Quality Control. 3. Commodities ROMSE: Food and Agriculture Organization of the United Nations; (FAO Food and Nutrition Paper; 14/3), (1979), S. 162.

Bogdanov S., Martin P.; Lüllmann C., Harmonised methods of the European honey commission, Apidologie, extra issue, 1-59 (1997)

11 Bestimmung von Zuckerarten mittels IC und PAD-Detektoren mittels IC und PAD-Detektoren

Hinweis

Die Anwender dieser Methoden/Angaben werden nachdrücklich ersucht, ihre Erfahrungen der Subkommission 7a oder der Sektion Lebensmittelbuch, Bundesamt für Gesundheit, Postfach 3003 Bern 14 mitzuteilen.

PRINZIP

Von einer klarfiltrierten wässrigen Honiglösung werden die Zuckerarten von einer Anionenaustauschersäule mittels Ionenchromatographie (IC) getrennt. Die Bestimmung erfolgt mittels gepulst-amprometrischer Detektion (PAD).

REAGENZIEN

- Standards: Glucose, Fructose, Saccharose, Maltose, Raffinose, Maltotriose, Trehalose, Melezitose, Arabinose, Melibiose und Nigerose (Merck); Isomaltose und Turanose (Sigma); Erlöse (Senn Chemicals; Dielsdorf) und Kojibiose (Koch & Light; Hartfield, Hertfordshire, England).
- Standardlösung: Glucose und Fructose je 150 mg/l, alle anderen Standards je 10 mg/l.
- Natronlauge, 50 %.
- Natriumacetat Trihydrat.
- Elutionsmittel (carbonatfrei, mit Helium begasen!):
 - A: 7,8 ml Natronlauge (50 %) zu 1 l mit Helium entgastem Wasser geben (150 mM NaOH).
 - B: 68 g Natriumacetat Trihydrat in 1 Liter Wasser lösen, mit Helium entgasen und 7,8 ml Natronlauge (A) zugeben (ca. 150 mM Natronlauge und 500 mM Natriumacetat).
 - C: 15,6 ml Natronlauge (50 %) zu 1 l mit Helium entgastem Wasser geben (300 mM NaOH).
- Nachsäulenaddition: 26 ml Natronlauge (50 %) zu 1 l mit Helium entgastem Wasser geben (500 mM NaOH).

GERÄTE

- IC-Gerät (z.B. Dionex) mit Gradientenpumpe und zusätzlicher isokratischer Pumpe.
- OAD-Detektor mit Goldelektrode.
- Trennsäule: Dionex Carbopac PA1 (250 x 4 mm) Art. Nr. 39686 mit PA1-guard-column (3 x 25 mm) Art. Nr. 37141.

- Membranfilter, 0,45 μm .

AUSFÜHRUNG

- Ca. 5 g Honig auf 10 mg genau in ein kleines Becherglas einwiegen, mit ca.20 ml Wasser lösen, quantitativ in einen 100-ml-Messkolben transferieren und mit Wasser zur Marke auffüllen
- mit Wasser 1:100 verdünnen
- ein Aliquot durch ein Membranfilter 0,45 μm filtrieren und für die Analyse einsetzen.

Trennbedingungen (Beispiel siehe Abbildungen)

Flussrate. Bis 17 Minuten 0,5 ml/Minute, dann innerhalb von 5 Minuten den Flussrate auf 1 ml/Minute erhöhen.

Bemerkung

Je nach Säule muss der Startpunkt des Flussgradienten so gewählt werden, dass die Peaks von Saccharose, Kojibiose und des unbekanntes Zuckers vor der Kojibiose befriedigend getrennt werden.

Nachsäulenaddition: 500 mM NaOH; Flussrate 0,5 ml/Minute.

Detektor: $E_1 = 50 \text{ mV}$ $t_1 = 480 \text{ msec.}$
 $E_2 = 600 \text{ mV}$ $t_2 = 120 \text{ msec.}$
 $E_3 = -600 \text{ mV}$ $t_3 = 60 \text{ msec.}$

Empfindlichkeit: 30 μA

Injektionsvolumen: 50 μl

Gradient: (min)	Time	% A	% B	% C
	0	100		
	20	100		
	30	80	20	
	35			100
	45			100
	46	100		
	56	100		

BERECHNUNG UND ANGABE DER RESULTATE

Die Gehalte der einzelnen Zuckerarten werden aus den entsprechenden Peakflächen und anhand des externen Standards unter Berücksichtigung der vorgenommenen Verdünnung berechnet.

Angabe in g/100 g Honig, mit 1 Dezimalen.

HINWEIS

Unter den angegebenen Trennbedingungen gibt es verschiedene Zuckerarten die koeluiiren, z.B. Maltulose und Isomaltose sowie Raffinose und Nigerose. Bei der Saccharose ist keine Interferenz zu erwarten.

LITERATUR

Pourtallier J., Rognone C. und Davico R.: Une nouvelle technique d'analyse des sucres des miels par chromatographie liquide a haute performance. L'abeille de France, Nr. 754, 448 - 451 (1990).

Swallow K.W. und Low N.H.: Analysis and Quantitation of the Carbohydrates in Hones Using High-Performance Liquid Chromatography. J. Agric. Food Chem. **38**, 1828 - 1832 (1990).

Bogdanov S., Martin P.; Lüllmann C., Harmonised methods of the European honey commission, Apidologie, extra issue, 1-59 (1997)

Anhang

Determination of insoluble matter

SCOPE

The method can be applied to all honey samples.

DEFINITION

Insoluble matter is defined as that material found by the procedure to be insoluble in water. The result is expressed as a percentage by weight.

PRINCIPLE

The insoluble matter is collected on a crucible of specified pore size and the dried residue is weighed after being washed free of soluble material.

EQUIPMENT

Analytical balance, to 0.1mg.
Sintered glass crucible, pore size 15 to 40 microns.
Drying oven at $135 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

PROCEDURE

Accurately weigh approximately 20 grams of honey and dissolve in about 200ml of water at about 80°C . Mix well.
Dry a crucible in the oven and leave to obtain ambient temperature in a desiccator containing an efficient desiccant such as silica gel. Weigh the crucible.
Filter the sample solution through the crucible. Wash carefully and extensively with warm water until free from sugars. Check by adding to some filtrate in a test tube some 1% phloroglucinol in ethanol. Mix and run a few drops of concentrated sulphuric acid down the sides of the tube. Sugars produce a colour at the interface.
Dry the crucible at 135°C for an hour, cool in the desiccator and weigh. Return to the oven for 30 minute intervals until constant weight is obtained.

CALCULATION AND EXPRESSION OF RESULTS

% Insoluble Matter in g/100 g = $\frac{m}{m_1} \times 100$
 where m = mass of dried insoluble matter and
 m₁ = mass of honey taken

PRECISION

The precision of the method was determined in the UK collaborative study. The values are in g/100 g.

Mean, \bar{x}	0.021	0.009	0.031	0.011
Repeatability (r)	0.016	0.016	0.023	0.010
Reproducibility (R)	0.021	0.016	0.023	0.026

REFERENCES

1. Codex Alimentarius Commission: Recommended European regional standard for honey (CAC/RS 12-1969).
2. D.W. Lord, M. J.Scotter, A.D.Whittaker and R.Wood, The determination of acidity, apparent reducing sugar and sucrose, hydroxymethylfurfural, mineral, moisture, water-insoluble solids contents in honey; collaborative study, J.Assoc. Publ.Anal.(UK), 26, 51-76 (1988).
3. *Bogdanov S., Martin P., Lüllmann C.* (1997) Harmonised methods of the European honey commission, Apidologie 1-59, pp. 51-52