



Nachweis und Herkunft von Abscisinsäure und Prolin in Honig

J Lipp

► To cite this version:

J Lipp. Nachweis und Herkunft von Abscisinsäure und Prolin in Honig. *Apidologie*, 1990, 21 (3), pp.249-259.
⟨hal-00890833⟩

HAL Id: hal-00890833

<https://hal.science/hal-00890833v1>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

Nachweis und Herkunft von Abscisinsäure und Prolin in Honig

J Lipp

*Institut für Hydrologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung,
Ingolstädter Landstrasse, 1, D-8042 Neuherberg, BRD*

(eingegangen 6 Februar 1990; angenommen 12 April 1990)

Zusammenfassung — Zur weiteren Klärung der Frage, aus welchen Quellen Abscisinsäure (ABA) und Prolin in den Honig gelangen, wurden Bienen, Nektar, Blattläuse (Aphoidea), Honigtau, Pollen, Zuckerfütterungshonig und natürlicher Honig auf diese Substanzen untersucht. Die Quantifizierung erfolgte im Falle der ABA mittels Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) und immunochemischem Test (ELISA), im Falle des Prolins mittels einer colorimetrischen Methode. ABA gelangt durch Nektar, Honigtau und Pollen in den Honig. Eine Beteiligung seitens der Biene ist bisher auszuschließen. Prolin kann im Falle prolinhaltiger Nektare, Honigtaue oder Pollen offensichtlich auch durch diese pflanzlichen Quellen in den Honig gelangen. Die bisher gültige Meinung, daß Prolin fast ausschließlich über den Bienenorganismus in den Honig eingetragen wird, kann in vorliegender Arbeit nicht unterstützt werden.

ABA / Honig / HPLC / Prolin / Zuckerfütterungshonig

EINLEITUNG

Abscisinsäure (Sesquiterpen, ABA) und Prolin (Aminosäure) werden in Pflanzen in verstärktem Ausmaß unter Streßsituationen (Wasser, Hitze, Salz, Kälte) gebildet (Palfi und Juhasz, 1970; Dörffling *et al.*, 1974; Palfi und Batyai, 1977; Syvertsen und Smith, 1983; Barros und Neill, 1987). Soweit bekannt, liegt ABA in pflanzlichem Gewebe vorwiegend als *cis/trans* (*ct*)- Isomeres vor, welches im Gegensatz zum *trans/trans* (*tt*)- Isomeren die physiologisch aktive Form des Hormons darstellen soll (Cummins und Sondheimer, 1973). Vermehrte *ct*-ABA-Ausschüttung bewirkt

über einen Schluß der Stomata die Reduzierung des Wasserverlustes und reguliert somit den Wasserhaushalt der Pflanze. Prolin wird im Zusammenhang mit "Streßsituationen" als Stabilisator von Membranen angesehen, hat aber darüber hinaus auch regulatorische Wirkungen. Diese beiden Substanzen findet man in relativ hohen Konzentrationen auch im Pollen, welcher als austrocknungsfähiger Teil des Cormophyten auf Streßsituationen hin konditioniert ist (Lipp, 1989).

Obwohl Pollen normalerweise in geringer Konzentration im Honig vorliegen, ist ein schwacher Eintrag von ABA und Prolin in den Honig denkbar. Dabei dürfte insbe-

sondere das Prolin als wasserlösliche Komponente in das Medium Honig "hineingelöst" werden.

In neuerer Zeit wurde allgemein der Zusammensetzung der Aminosäuren im Honig erhöhte Beachtung geschenkt, da sie eventuell zur Sortendiagnose und Bestimmung der geographischen Herkunft verwendet werden können (Gilbert *et al*, 1981; Davies und Harris, 1982; Speer und Montag, 1986). Der Prolingehalt des Honigs wird in der Lebensmittelanalytik dazu genutzt, das Ausmaß der Bespichelung des Sammelgutes durch Bienen, das heißt der "Reifung" zu erfassen.

Während andere Aminosäuren in sehr geringen Konzentrationen im Honig vorliegen, tritt Prolin als deren Hauptkomponente in relativ großer Menge auf (Lipp, 1988) und gehört auch zu den geschmacksgebenden Bestandteilen des Honigs (Maeda *et al*, 1962).

Nach bisheriger Auffassung stammt der überwiegende Teil des Honig-Prolins von der Biene, weil es im Zuckerfütterungshonig in gleichen Konzentrationen wie im natürlichen Honig vorliegen soll (Bergner und Hahn, 1972).

Die anderen Aminosäuren sind wahrscheinlich trachtbedingt. Über die ABA im Honig wurden, soweit bekannt, noch keine Untersuchungen angestellt. Um Menge und Herkunft von Prolin und ABA im Honig systematisch erfassen zu können, wurden sämtliche natürlichen Trachtquellen auf diese beiden Substanzen untersucht. Außerdem wurden mehrere Honige aus verschiedenen Ländern mit einem speziell angefertigten Zuckerfütterungshonig in ihren ABA- und Prolingehalten verglichen und statistisch ausgewertet.

MATERIAL UND METHODEN

Innerhalb unserer Untersuchungen wurden 22 Honige aus dem Handel gemäß der bekannten

Analysenmethoden (Schweizerisches Lebensmittelbuch, 1967; AOAC, 1984; Lipp *et al*, 1988) auf ihre Reinheit hin untersucht. Es handelte sich bei folgenden Proben um authentische Honige (Tabelle I).

Um den Ausschluß unkontrollierter Tracht zu gewährleisten, wurden Bienenvölker ausgehungert und im Flugzelt mit Zuckerwasser (1:1) gefüttert (Dr G Vorwohl, Landesanstalt für Bienenkunde, Hohenheim). Der ZFH wurde nach 14 Tagen ausgeschleudert, was dem Vorgehen von Bergner und Hahn (1972) entsprach.

Sechs Bienen aus der Winterfütterung (mit Flüssigzucker) wurden vor dem Laubaustrieb im Frühjahr gefangen. Nach Tötung in Chloroform wurden sie der Gefriertrocknung unterzogen, gewogen und einzeln homogenisiert. Ferner wurden zwei Bienen mit dicken Höschchen auf einem Rapsfeld (*Brassica napus napus* L) gefangen, sofort getötet und gefriergetrocknet. Nach Entfernung der Höschchen wurden sie gewogen und ebenfalls homogenisiert. Aus Bienen, Blattläusen und Pollen (je 100 mg) mußten ABA und Prolin durch Methanol-Extraktion gewonnen werden, die Honig-, Nektar- und Honigtauproben (je 100 mg) konnten als solche gelöst werden.

Die Fraktionierung von ABA und Prolin erfolgte im Vakuum über C_{18} -Einmaltrennsäulen (Baker, 3 ml) in der pH 4 sauren wässrigen Phase (Fraktion 1, Prolin) und in der Methanol-Phase (Fraktion 2, ABA). Die ABA wurde dünnstschichtchromatographisch über HPTLC-Alufolien (Merck, Kieselgel 60, Laufmittel: Toluol/Ethylacetat/Essigsäure: 75 + 22 + 3) gereinigt und HPLC-analytisch bei 254 und 280 nm quantifiziert. Hierbei wurde als Säule eine Lichrospher 100 RP 18, 5 μ m, 4 mm ID x 250 mm (Merck), als Vorsäule eine C_{18} -Vorsäulenkartusche 3 mm ID x 25 mm (Bischoff) verwendet. Die mobile Phase war ein Gemisch aus 66% Wasser mit 0,1% Essigsäure (Lösungsmittel A) und 44% Methanol (Lösungsmittel B), wobei die Durchflußrate 1 ml/min betrug. Die physiologisch aktive *ct*-ABA (Cummins und Sondheimer, 1973) wurde direkt aus dem chromatographischen Lauf fraktioniert, getrocknet und nochmals mittels des ELISA gemessen (Weiler *et al*, 1986).

Zur Prolinbestimmung wurde die Nachweismethode nach Bates *et al* (1973), abgeleitet von Troll und Lindsley (1955) gewählt, nachdem sie auf ihre Eignung überprüft worden war (Lipp, 1989).

Tabelle I. Auf ihre Reinheit hin untersuchte Honige.

Honig	Herkunft	Jahrgang	Mikroskopisches Bild
Wald 1	Neuseeland	1986	Pollen: Typisch, Honigtau
Wald 2	Spanien	1985	Pollen: Typisch, Honigtau
Wald 3	Türkei	1985	Sporen, Wachswolle
Wald 4	Türkei	1985	30% <i>Centaurea</i> , Wachswolle
Manuka	Neuseeland	1986	44% Manuka, 34% Klee-Arten
Leatherwood	Tasmanien	1986	94% <i>Eucryphia</i>
Linde 1	China	1985	27% <i>Tilia</i>
Linde 2	China	1986	22% <i>Tilia</i> . Sediment: Honigtau
Blütenhonig 1	Mexiko	1985	55% <i>Helianthus</i> , 21% Cruciferae
Blütenhonig 2	Argentinien	1985	83% Klee, 7% <i>Eucalyptus</i> , 4% <i>Echium</i>
Zentralzone	Chile	1986	Typisch Chile
Argentin T1	Argentinien	1986	Typisch
Argentin T2	Argentinien	1986	Typisch
Polyflora 1	CSSR	1986	Typisch, 15% Cruciferae
Polyflora 2	Ungarn	1985	21% Cruciferae (Raps), 10% <i>Helianthus</i>
Polyflora 3	Polen	1986	52% Cruciferae (Raps), Honigtau
Extra light amber	China	1986	40% Cruciferae + 3% <i>Tilia</i>
Light amber 1	China	1986	Typisch China
Light amber 2	Australien	1985	80% <i>Eucalyptus</i> , 3% <i>Echium</i>
Sonnenblume	China	1985	59% <i>Helianthus</i> -Arten
Hochland	Mexiko	1986	39% <i>Helianthus</i> -Arten, 35% Cruciferae
Zuckerfütterung	Deutschland	1985	—

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

ABA- und Prolingehalte in den Honigen

Das Verhältnis zwischen *ct*- und *tt*-ABA ist unter den verschiedenen Honigen ähnlich (Tabelle II). Die Isomerisierung der physiologisch aktiven *ct*-ABA könnte demnach während des Reifungsprozesses des Honigs stattfinden, was dadurch gestützt wird, daß im Nektar keine *tt*-ABA gefunden wird (Abb 3). Dagegen tritt sie im Honigtau, der durch die Blattlaus bearbeitet wurde, wieder auf (Abb 4). Man sollte demnach anhand des *ct/tt*-ABA-Verhältnisses beurteilen können, inwieweit Honige durch tierische Organismen bear-

beitet wurden. Waldhonige hätten demnach ein niedrigeres *ct/tt*-ABA-Verhältnis als Blütenhonige. Allerdings ist zu beachten, daß bei erhöhten Temperaturen (> 30°C) und unter UV-Licht-Einwirkung eine Isomerisierung von *ct* zu *tt*-ABA in Funktion der Zeit stattfindet (eigene Versuche). Es kommt folglich darauf an, wie lange der Nektar, bzw der Honigtau auf dem pflanzlichen Organismus verweilt, bis er von den Bienen gesammelt wurde. Entscheidend für das *ct/tt*-ABA-Verhältnis im Honig ist höchstwahrscheinlich jedoch die Intensität der Einspeichelung (je nach Trockenheitsgrad der Futterquelle) und die Dauer der Futterkette (je nach Masse der Tracht, Zustand des Volkes usw). Möglicher-weise lassen sich daraus die

Tabelle II. ABA- und Prolingehalte in Honigen. Q: Quotient ct/tt -ABA; FG: Frischgewicht.

Honig	tt-ABA ng/g FG	ct-ABA ng/g FG	Prolin µg/g FG	Q
Wald 1	90,9	468,6	230	5,2
Wald 2	491,6	3 668,2	512	7,5
Wald 3	1 054,6	1 910,5	493	1,8
Wald 4	1 115,4	1 396,4	615	3,4
Manuka	156,4	713,5	542	4,6
Leatherwood	1 012,4	6 504,4	233	6,4
Linde 1	315,9	1 813,4	153	5,7
Linde 2	279,1	1 462,3	212	5,2
Blütenhonig 1	467,7	1 179,4	362	2,5
Blütenhonig 2	56,1	292,2	265	5,2
Zentralzone	337,6	1 642,4	522	4,9
Argentin T ₁	50,7	283,3	254	5,6
Argentin T ₂	28,5	224,0	273	7,9
Polyflora 1	214,2	1 563,5	384	7,3
Polyflora 2	470,5	2 777,5	344	5,9
Polyflora 3	680,7	3 881,8	384	5,7
Extra light amber	106,9	562,6	239	5,3
Light amber 1	58,6	372,4	362	6,4
Light amber 2	71,9	288,3	563	4,0
Sonnenblume	18,8	70,0	325	3,7
Hochland	105,8	1 042,2	368	9,8
Zuckerfütterung	21,8	57,5	83	2,6

Abweichungen gewisser Honige (zB Blütenhonig aus Mexico, Spanien Wald) erklären. Die während des Versuchszeitraumes (2 Jahre) durchgeführte Kühle (10 °C) und dunkle Lagerung hatte keinen Einfluß auf das ct/tt -ABA-Verhältnis.

Unter den Honigen lassen sich im absoluten ABA-Gehalt extreme Schwankungen erkennen (Tabelle II, zB China Sonnenblume, Leatherwood). Dies liegt wahrscheinlich an den stark unterschiedlichen ABA-Gehalte in Nektaren und Honigtauen (Abb 3, 4). In Abb 1 werden die Honige mit Zuckerfütterungshonig verglichen. Zuckerfütterungshonig weist im Verhältnis zu den anderen Honi-

gen signifikant niedrigere Gehalte an ABA auf (t -Test). Nur China Sonnenblume hat einen mit Zuckerfütterungshonig vergleichbaren ABA-Gehalt (Tabelle II). Dies könnte daran liegen, daß die Sonnenblume als entwicklungsgeschichtlich relativ hoch stehende Pflanze (Compositae) die ABA des Phloemsaftes im Nektarium wieder rückresorbiert und der Nektar daher sehr wenig oder keine ABA enthält (Ziegler, 1968). Der äußerst geringe ABA-Gehalt im Zuckerfütterungshonig stammt wahrscheinlich von (ABA-haltigem) Restnektar, der sich noch im ausgehungerten Bienenstock befand. Dafür spricht der hoch signifikante Unterschied zwischen natürlichem Honig und Zuckerfütterungshonig, sowie der negative

Nachweis von endogener ABA in ausgehungerten Bienen nach der Winterfütterung (Abb 2, Tabelle III). Die unterschiedlichen Prolin-Konzentrationen in den Honigen sind auf eine Vielzahl von Variablen, eventuell auch auf verschiedenen starke Prolin-Konzentrationen in Nektaren und Honigtauen zurückzuführen (White und Rudyj, 1978; White, 1979). Diese Quellen würden somit zum Prolingehalt des Honigs beitragen (Abb 3, 4). Dies steht in Einklang mit der Beobachtung, daß Zuckerfütterungshonig im Vergleich mit den anderen Honigen einen signifikant niedrigeren Prolingehalt aufweist (Abb 1). Allerdings gelangt Prolin auch direkt von der Biene in den Honig, da sowohl Zuckerfütterungshonig selbst als auch ausgehungerte Bienen nach der Winterfütterung diese Substanz enthalten (Abb 1, 2). Es muß berücksichtigt werden, daß Zuckerfütterungshonig unter unnatürlichen Bedingungen gewonnen wird und der niedrigere Prolingehalt durch den schlechteren physiologischen Zustand (geringe Eiweißversorgung) der Bienen hervorgerufen sein könnte. Ähnliche Verhältnisse treffen für die Bienen nach der Winterfütterung zu (Abb 2); diese können jedoch eingelagerten Pollen als Nahrungs- und Eiweißquelle benutzen. Die Prolingehalte in einigen untersuchten Nektaren

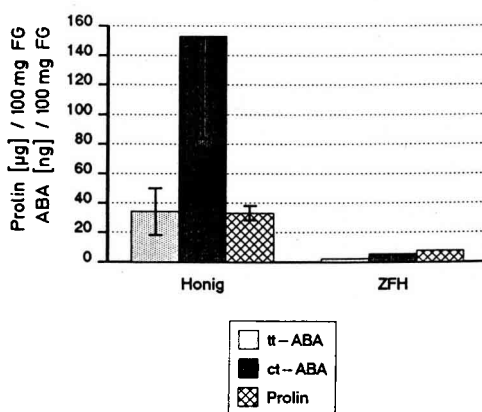


Abb 1. ABA- und Prolin-Gehalte in Honigen und Zuckerfütterungshonig (ZFH). Es ist jeweils der 5%-Vertrauensbereich angegeben.

(Abb 3), Honigtauen (Abb 4) und Pollen (Abb 5) sind ausreichend, um entscheidend zum Prolingehalt des Honigs beitragen zu können (Hahn, 1970; Bergner und Hahn, 1972).

ABA- und Prolingehalte in Bienen

Da signifikante Unterschiede bezüglich des ABA- und Prolingehaltes zwischen

Tabelle III. Vergleich von HPLC- und ELISA-Methoden anhand einiger ausgewählter Stichproben.

Probe	HPLC ct-ABA ng/100 mg	ELISA ct-ABA ng/100 mg
Blütenhonig 1	117,9 ± 3,6	213,2 ± 6,0
Extra light amber	56,3 ± 2,3	148,8 ± 2,1
<i>Sansevieria</i> Nektar	0,0	7,9 ± 0,1
<i>Cymbidium</i> Nektar	0,0	1,9 ± 0,0
Biene W ₂	0,0	0,0
<i>Cryptomyzus ribis</i>	1 886,4 ± 103,1	2 155,2 ± 604,9

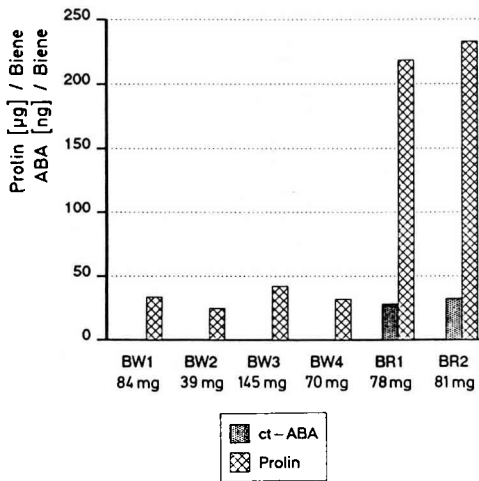


Abb 2. ABA- und Prolin-Gehalte der untersuchten Bienen. Das Trockengewicht [mg] der Tiere ist jeweils angegeben. BW1-BW4: Bienen nach Winterfütterung; BR 1, 2: Bienen vom Rapsfeld (*Brassica napus napus*).

den Bienen nach Winterfütterung und denjenigen vom Rapsfeld ermittelt werden, sind möglicherweise auch Trachteinflüsse für ABA- und Prolingehalt im Honig von Bedeutung (Abb 2). In ausgehungerten Bienen liegt endogen Prolin, aber nicht ABA vor (Siehe auch Tabelle III), was die potentielle Prolin-Zugabe zum Honig seitens der Biene erlaubt, die ABA-Zufuhr aber ausschließt.

ABA- und Prolingehalte in Nektaren

In Raps- und Taubnesselnektar liegen nachweisbare Mengen von ct-ABA vor. Alle untersuchten Nektare sind Prolin-positiv. Nektar als Haupt-Honigquelle kann damit zum ABA- und Prolingehalt des (Blüten)-Honigs beitragen.

ABA- und Prolingehalte in Blattläusen (Aphoidea) und Honigtau

Die ct-ABA-Gehalte in den Blattläusen (Aphoidea) sind sehr unterschiedlich. Honigtau weist geringe Mengen an tt-ABA auf (siehe oben). Sämtliche Proben enthalten Prolin (Abb 4). Die Blattläuse erhalten ABA und Prolin wahrscheinlich über den Phloemsaft der jeweiligen Wirtspflanzen, da dieser selbst diese Substanzen enthält (Becker, 1973; Weiler und Ziegler, 1981). Offenbar unterscheidet sich der Phloemsaft verschiedener Pflanzen oder der einer Pflanze zu verschiedenen Zeiten beträchtlich im ABA-Gehalt, weil auch in den Blattläusen stark unterschiedliche Mengen nachzuweisen sind. Da ABA und Prolin wieder ausgeschieden werden und damit in den Honigtau gelangen, ist zu erwarten, daß auch Honigtaue mehr oder weniger ABA und Prolin enthalten (Gray, 1952). Daraus läßt sich folgern, daß Honigtau-honige in ihren ABA- und Prolin-Gehalten Schwankungen unterliegen, was auch den hier vorliegenden Meßergebnissen entspricht.

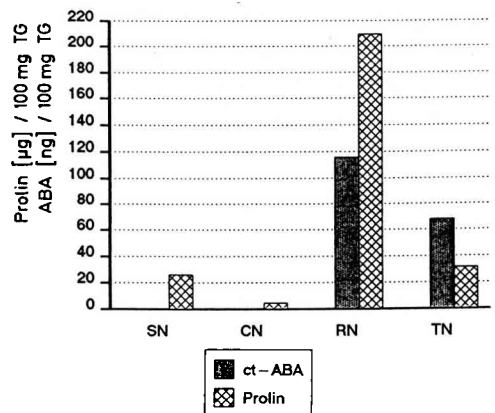


Abb 3. ABA- und Prolin-Gehalte untersuchter Nektare. SN = *Sanseveria*-Nektar (*S. trifasciata* Prain); CN = *Cymbidium*-Nektar (*C. spec*); RN = Rapsnektar (*Brassica napus napus* L); TN = Taubnesselnektar (*Lamium album* L).

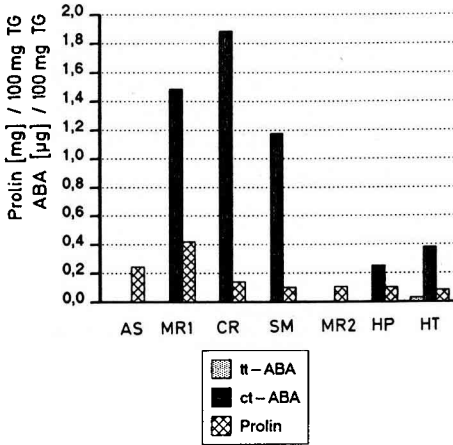


Abb 4. ABA- und Prolin-Gehalte in Blattläusen (Aphoidea) verschiedener Wirtspflanzen und im Honigtau. AS = *Aphis spec* (auf *Tilia vulgaris*); MR 1,2 = *Macrosiphum rosae* (auf *Rosa hybrida* weiß (1), rot (2)); CR = *Cryptomyzus ribis* (auf *Ribes rubrum* L); SM = *Sappaphis mali* (auf *Malus domestica* Borkh); HP = *Hyalopterus pruni* (auf *Prunus domestica* L); HT = Honigtau von *Myzus cerasi* (auf *Prunus cerasus* L).

ABA- und Prolingehalte in Pollen

Pollen weisen unterschiedliche ABA- und Prolingehalte auf, die unter botanischem Aspekt diskutiert werden (Lipp, 1989). Da der Pollenanteil im Honig normalerweise gering bleibt (max 0,05%), ist von dieser Seite nur ein geringer Eintrag zu erwarten, der jedoch bei einigen Pollenarten Berücksichtigung finden sollte (zB bei Löwenzahn, Goldregen, Trollblume, Hornklee, siehe Abb 5).

Vergleich der HPLC- mit der ELISA-Methode

In Tabelle III werden die mit HPLC ermittelten ct-ABA-Gehalte den mit ELISA

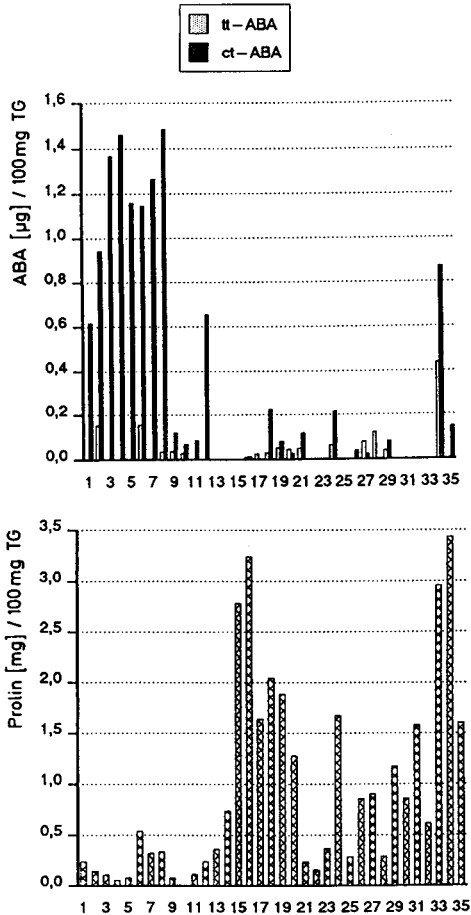


Abb 5. ABA- and Prolin-Gehalte in Pollen. 1-5: *Pinus mugo* (Karwendel); 6-8: *Pinus mugo* (München); 9: *Taxus baccata*; 10: *Chamaecyparis lawsoniana*; 11: *Equisetum sylvaticum*; 12: *Magnolia stellata*; 13: *Bellis perennis*; 14: *Ranunculus arvensis*; 15: *Laburnum anagyroides*; 16: *Taraxacum officinale*; 17: *Betula pendula* (München); 18: *Betula pendula* (Günzburg); 19: *Ranunculus repens*; 20: *Hemerocallis piquante*; 21: *Typha latifolia*; 22: *Althaea rosea*; 23: *Magnolia soulangeana*; 24: *Aesculus hippocastanum*; 25: *Cymbidium spec*; 26: *Brassica napus* (München); 27: *Brassica napus* (Günzburg); 28: *Rudbeckia grandiflora*; 29: *Zea mays*; 30: *Salix caprea*; 31: *Lilium candidum*; 32: *Ranunculus acris*; 33: *Trollius europaeus*; 34: *Lotus corniculatus*; 35: *Prunus sargentii*.

erhaltenen Ergebnissen anhand ausgewählter Proben gegenübergestellt. Die gute Übereinstimmung der verschiedenen Methoden ist ein Indiz für die Richtigkeit der ABA-Bestimmung.

Schlußfolgerungen

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit wird wahrscheinlich, daß ABA durch Nektar, Honigtau und Pollen in den Honig gelangt. Eine Beteiligung seitens der Bienen ist bisher auszuschließen. Dieser Befund ist keineswegs trivial, da ABA ubiquitär auftritt und sogar in Gehirnen von Säugetieren nachgewiesen wurde (Editorial, 1986).

Prolin kann in bestimmten Fällen, entsprechend der Nektar- Honigtau- und Pollenart, zu einem erheblichen Teil aus den Rohstoffen Nektar, Honigtau und Pollen stammen. Die Ergebnisse dieser Arbeit vertreten somit nicht die Ansicht von Bergner und Hahn, die die Hauptquelle des Prolins in der Biene selbst fanden. Zwar wurde in vorliegender Arbeit nur ein Zuckerfütterungshonig untersucht, der nicht unbedingt repräsentativ sein muß; die Ergebnisse werden jedoch auch durch die Untersuchung der Bienen und der ihnen zur Verfügung stehenden natürlichen Nahrungsquellen (Nektar, Honigtau, Pollen) gestützt. Die Anschauung, daß der Prolingehalt im Honig ein direktes Maß des Bearbeitungsgrades seitens der Biene darstellt, sollte im Falle prolinhaltiger Nektare und Honigtaue überdacht werden. Eventuell lassen sich diesbezüglich aus den *ct/tt*-ABA-Gehalten sicherere Aussagen ableiten.

Zur Überprüfung dieser Fragen und zur vertieften Kenntnis der Herkunft der ABA und des Prolins müssen jedoch Untersuchungen exakt definierter Zuckerfütterungshonige und Bienenproben unter

Einbeziehung von Bienenenzymen wie Saccharase, Amylase und Glucoseoxidase folgen. Der praktische Teil dieser Arbeit wurde am Institut für Botanik und Mikrobiologie der Technischen Universität München ausgeführt.

DANK

Der Autor dankt Herrn Prof Dr H Ziegler (TU München) für gewährte Hilfestellungen bei der Ausführung der Arbeit und für die Durchsicht des Manuskriptes. Herrn Dr G Vorwohl (Landesanstalt für Bienenkunde, Hohenheim) sei für die Überlassung des Zuckerfütterungshonigs herzlich gedankt! Für die Bereitstellung der Honige und die Ausführung der Kurz-Pollenanalysen möchte sich der Autor ganz herzlich bei Herrn W Henrich (Fa Langnese, Bargteheide) bedanken.

Summary — Detection and origin of abscissic acid and proline in honey. This paper attempts to establish the origin and amount of both abscissic acid (ABA) and proline in honey. Two isomers of the sesquiterpene phytohormone *cis trans* (*ct*)- and *trans trans* (*tt*)-ABA are found in nature, but only the *cis trans* isomer is physiologically active. It induces dormancy in plants or parts of plants and plays an important role in closing stomata, especially in water deficient conditions. Proline (an amino acid) has protective functions (*eg* in stabilizing membranes) if the plant is under stress (*eg* water deficiency). Both substances occur in relatively high amounts in pollen (fig 5). Honey contains ABA and proline originating from pollen. It is important to evaluate the origin of proline, since it has been suggested that this substance is added to honey solely by the bee. To identify the origin of ABA and proline systematically, their possible natural sources were analyzed: nectar, honeydew, pollen and bees. Further investigations were car-

ried out on aphids, honey from sugar fed bees and natural honeys. For separation of ABA and proline solid phase extraction by C₁₈-columns was used. Purification of ABA was effected by thin layer chromatography. ABA was quantified by HPLC and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), the proline was measured by a colorimetric test. The results obtained by HPLC and ELISA show good agreement (table III). Honey contains considerable amounts of ABA and proline (table II). Compared with natural honeys, the honey from sugar-fed bees (ZFH) has a significantly lower level of both ABA and proline (see fig 1). In contrast to bees which have visited nectar sources (rape field, BR 1,2 in fig 2), starved bees (BW 1-4, fig 2) contain less (endogenous) proline and no ABA at all (see fig 2). This corresponds to the observation that proline and ABA are present in nectar (see fig 3, SN = *Sanseveria*-nectar; CN : *Cymbidium*-nectar; RN : Rape-nectar; TN = Deadnettle-nectar). Aphids (honeydew) show very different amounts of these substances (see fig 4, AS = *Aphis* sp on *Tilia vulgaris*; MR 1,2 = *Macrosiphum rosae* on *Rosa hybrida* white (1), red (2); CR = *Cryptomyzus ribis* on *Ribes rubrum* L; SM = *Sappaphis mali* on *Malus domestica* Borkh; HP = *Hyalopectus pruni* on *Prunus domestica* L; HT = Honeydew of *Myzus cerasi* on *Prunus cerasus* L).

The results show that *ct*-ABA is added to the honey mainly from nectar, honeydew and pollen, and not by the bee itself. Possibly the bee might be responsible for conversion of *ct*- into *tt*-ABA, since honey contains rather more *tt*-ABA than does the nectar.

The proline content in honey originates in the nectar of some species investigated (*Lamium album* L, *Brassica napus napus* L, *Sanseveria trifasciata* Prain, *Cymbidium* sp), in honeydew (from *Myzus cerasi* on *Prunus cerasus* L), and in some pollen (fig 5) as well as in the honeybee itself. It is

proposed that the ratio of *ct*- to *tt*-ABA content (instead of the proline content) of honey depends on the extent of manipulation by the bees in converting nectar into honey, which in turn reflects upon nectar water content and environmental conditions.

abscissic acid / honey / HPLC / proline / honeydew

Résumé — Détection et origine de l'acide abscissique et de la proline dans le miel. Ce travail essaie de déterminer l'origine et les quantités d'acide abscissique (ABA) et de proline dans le miel. On trouve dans la nature 2 isomères de la phytohormone sesquiterpène ABA, *cis trans* (*ct*-) et *trans trans* (*tt*-), mais seul l'isomère *cis trans* est physiologiquement actif. Il induit la dormance des plantes ou de parties de plantes et joue un rôle important dans la fermeture des stomates, principalement lorsqu'il y a une déficience en eau. La proline (un acide aminé) possède des fonctions de protection (par exemple en stabilisant les membranes) lorsque la plante se trouve en conditions de stress (par exemple, déficience en eau). Les 2 substances sont présentes dans le miel en quantités relativement élevées (fig 5). L'ABA et la proline du miel proviennent du pollen. Il est important de déterminer l'origine de la proline, car il a été suggéré qu'elle n'était ajoutée au miel que par l'abeille.

Afin d'identifier systématiquement l'origine de l'ABA et de la proline, nous avons analysé leurs sources naturelles éventuelles : nectar, miellat, pollen et abeilles. D'autres recherches ont porté sur les pucerons, sur le miel élaboré par les abeilles à partir de sucre de nourrissage (miel de sucre) et sur des miels naturels. L'ABA et la proline ont été séparés sur colonnes C-18. L'ABA a été purifié par chromatographie sur couche mince, quan-

tifié par HPLC et ELISA. La proline a été mesurée par un test colorimétrique. Les résultats obtenus par HPLC et ELISA présentent une bonne concordance (tableau III). Le miel renferme des quantités considérables d'ABA et de proline (tableau II). Par rapport aux miels naturels, le miel de sucre (ZFH) a une teneur significativement plus faible, à la fois en ABA et en proline (fig 1). Contrairement aux abeilles qui ont visité des sources de nectar (champ de colza, fig 2 : BR₁, BR₂), les abeilles affamées (fig 2 : BW 1-4) renferment moins de proline (endogène) et pas du tout d'ABA (fig 2). Cela est conforme à l'observation selon laquelle la proline et l'ABA sont présents dans le nectar (fig 3 : SN = nectar de *Sanseveria*; CN : nectar de *Cymbidium*; RN = nectar de colza; TN = nectar de lamier blanc). Les pucerons (miellat) présentent des quantités très variables de ces substances (fig 4 : AS = *Aphis* sp sur *Tilia vulgaris*; MR₁ et MR₂ = *Macrosiphum rosae* sur *Rosa hybrida* blanche (1) et rouge (2); CR = *Cryptomyzus ribis* sur *Ribes rubrum* L; SM : *Sappaphis mali* sur *Malus domestica*; HP : *Hyalopterus pruni* sur *Prunus domestica*; HT = miellat de *Myzus cerasi* sur *Prunus cerasus*). Les résultats montrent que l'ABA-*ct* est principalement ajouté au miel à partir du nectar, du miellat et du pollen et non pas par l'abeille elle-même. Il se peut que l'abeille soit responsable de la conversion de l'ABA-*ct* en -*tt*, puisque le miel renferme plutôt plus d'ABA-*tt* que le nectar. La proline du miel provient du nectar de certaines espèces étudiées (*Lamium album* L, *Brassica napus napus* L, *Sanseveria trifasciata* Prain, *Cymbidium* sp), du miellat (de *Myzus cerasi* sur *Prunus cerasus* L) et de certains pollens (fig 5), aussi bien que de l'abeille elle-même. Le rapport teneur en ABA-*ct* / teneur en ABA-*tt* (au lieu de la teneur en proline) du miel dépend du degré de conversion par les abeilles du nectar en miel, qui reflète la teneur en eau du nectar et les conditions du milieu.

acide abscissique / miel / HPLC / proline / miel de sucre

LITERATUR

- AOAC (1984) *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, Inc* (Williams S, ed). 14th ed, section 31.115 – 31.167. Arlington, USA
- Barros RS, Neill SJ (1987) Shoot growth in willow in relation to abscisic acid, plant water status and photoperiod. *Physiol Plantarum* 70, 708-712
- Bates LS, Waldren RP, Teare ID (1973) Short communication: rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil* 39, 205
- Becker D (1973) Zur Kenntnis der biochemischen Leistung pflanzlicher Assimilatleitbahnen. Dissertation, Technische Universität München
- Bergner KG, Hahn H (1972) Zum Vorkommen und zur Herkunft der freien Aminosäuren in Honig. *Apidologie* 3, 5-34
- Cummins WR, Sondheimer E (1973) Activity of the asymmetric isomers of abscisic acid in a rapid bioassay. *Planta* 111, 365
- Davies AMC, Harris RG (1982) Free amino acid analysis of honeys from England and Wales: application to the determination of the geographical origin of honeys. *J Apic Res* 21, 168-173
- Dörffling K, Sonka B, Tietz D (1974) Variation and metabolism of abscisic acid in pea seedlings during and after water stress. *Planta* 121, 57
- Editorial (1986) Abscisinsäure in Säugetieren. *Naturwiss Rundsch* 39, 533
- Gilbert J, Shepherd MJ, Wallwork MA, Harris RG (1981) Determination of the geographical origin of honeys by multivariate analysis of gas chromatographic data on their free amino acid content. *J Apic Res* 20, 125-135
- Gray RA (1952) Composition of honeydew excreted by pineapple mealybugs. *Science* 115, 129-133
- Hahn H (1970) Zum Gehalt und zur Herkunft der freien Aminosäuren im Honig. Dissertation, Universität Stuttgart

- Lipp J (1988) Der Honig. Produktion, Entstehung und Inhaltsstoffe. *Naturwiss Rundsch* 41, 185-189
- Lipp J, Ziegler H, Conrady E (1988) Detection of high fructose and other syrups in honey using high-pressure liquid chromatography. *Z Lebensmittelunters Forsch* 187, 334-338
- Lipp J (1989) Zur Zusammensetzung des Honigs und Verfahren zum Nachweis von Honigverfälschungen. Dissertation, Technische Universität München
- Maeda S, Mukai A, Kosugi N, Okada Y (1962) On the tasting components of honey. *J Food Sci Technol* 9, 270-274
- Palfi G, Batyai J (1977) Effects of biologically active substances on the amino acid metabolism of isolated Lucerne shoots in the case of live wilting. *Acta Biol Szeged* 25, 49-61
- Palfi G, Juhasz J (1970) Increase of proline level in water deficient leaves as a reaction to saline or cold root media. *Acta Agron Acad Sci Hung* 19, 79-88
- Schweizerisches Lebensmittelbuch (1967) Kap. 23, 1-35 Eidg. Drucksachen- und Materialzentrale, Bern
- Speer K, Montag A (1986) Verteilung freier Aminosäuren in Honigen unter besonderer Berücksichtigung der deutschen und der französischen Heidehonige. *Deutsche Lebensmittel-Rundsch* 82, 248-253
- Syvertsen JP, Smith ML (1983) Environmental stress and seasonal changes in proline concentration of citrus tree, tissues and juice. *J Am Soc Hort Sci* 108, 861-866
- Troll W, Lindsley J (1955) A photometric method for the determination of proline. *J Biol Chem* 215, 655
- Weiler EW, Ziegler H (1981) Determination of phytohormones in phloem exudate from tree species by radioimmunoassay. *Planta* 152, 168
- Weiler EW, Eberle J, Mertens R, Atzorn R, Feyeraabend M, Jourdan PS, Arnscheidt A, Wieczorek U (1986) Antisera- and monoclonal antibody-based immunoassay of plant hormones. In: *Immunology in Plant Science* (Wang TL, ed) Cambridge University Press, Cambridge
- White JW Jr (1979) Methods for determining carbohydrates, hydroxymethylfurfural, and proline in honey: collaborative study. *J Assoc Off Anal Chem* 62, 515-526
- White JW Jr, Rudyj ON (1978) Proline content of United States honeys. *J Apic Res* 17, 89-93
- Ziegler H (1968) *La sécrétion du nectar*. Chauvin, *Traité de Biologie de l'Abeille* 3, 218-248