# 基于 HPLC-ELSD 和偏最小二乘判别分析法的蜂蜜掺假鉴别

许艳超[1,2]，陈尚卫[2]，朱 松[2]，季福标[3]，戴 军[*2]

（1. 江南大学 食品学院，江苏 无锡 214122；2. 食品科学与技术国家重点实验室，江南大学，江苏 无锡 214122；3. 江苏日高蜂产品有限公司，江苏 淮安 211799）

**摘要：**为了实现蜂蜜掺假的简便、快速识别，应用高效液相色谱技术和化学计量学手段建立了一种蜂蜜掺假检测的新方法。该研究收集了中国不同品种、不同地域的典型天然蜂蜜样品，根据目前市场上常见的蜂蜜掺假手段、掺假物质及相对含量情况模拟制备系列掺假蜂蜜样品，利用 HPLC-ELSD 对样品中糖类物质进行分离测定，并采用 PLS-DA 统计学方法进行蜂蜜掺假识别研究。研究结果表明：掺入质量分数 10% 以上果葡糖浆和麦芽糖浆的掺假蜂蜜样品均能利用本方法予以鉴别，其校正集的正确判别率达到 92.5%，验证集的正确判别率为 100%。

**关键词：**蜂蜜；掺假识别；HPLC-ELSD；PLS-DA

**中图分类号：**S 896.1　**文章编号：**1673-1689(2019)05-0147-06　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.05.021

# Identification of Adulterated Honey Based on HPLC-ELSD and Partial Least Squares-Discriminant Analysis

*XU Yanchao*[1,2]，*CHEN Shangwei*[2]，*ZHU Song*[2]，*JI Fubiao*[3]，*DAI Jun*[*2]

（1. School of Food Science and Technology，Jiangnan University，Wuxi 214122，China；2. State Key Laboratory of Food Science and Technology，Jiangnan University，Wuxi 214122，China；3. Jiangsu Rigao Bee-Products Company Limited，Huai'an 211799，China）

**Abstract：** In order to identify the honey adulteration，this paper present a new high performance liquid chromatography method，coupled with chemometric analysis，used to identification of adulterated honey. The sugar composibion of 33 honey samples obtained from different areas were separated and detected by HPLC-ELSD equipped with Amide column，The method relies on the use of chemometric methods to process chromatograms in order to achieve a better discrimination between authentic and adulterated honeys by partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA). This approach was investigated using honey samples adulterated from 10% to 30% with high fructose syrup and maltose syrup. Good result were obtained in the characterization of authentic and adulterated samples：92.5% of good classification in the training set and 100% in the test set.

**Keyword：** honey，adulteration identification，HPLC-ELSD，PLS-DA

**收稿日期：**2016-03-03

*** 通信作者：**戴 军(1957—)，男，博士，研究员，主要从事食品功能因子的分析鉴定及食品安全检测研究。E-mail：daihplc@163.com

**引用本文：**许艳超，陈尚卫，朱松，等. 基于 HPLC-ELSD 和偏最小二乘判别分析法的蜂蜜掺假鉴别[J]. 食品与生物技术学报，2019，38(05)：147-152.

蜂蜜是蜜蜂采集植物的花蜜分泌物或蜜露,与自身分泌物结合后,经过在巢脾内转化、脱水、贮存至成熟的过程而酿成的天然甜物质[1]。蜂蜜作为天然物质,具有独特的风味、口感和营养价值,并要求蜂蜜中不得添加或混入任何淀粉类、糖类、代糖类物质[2]。蜂蜜掺假不仅降低了蜂蜜的营养价值,还极大地损害了正规蜂农及企业的利益,破坏了市场秩序。蜂蜜掺假多使用价格低廉且外观特性与蜂蜜极为相似的果葡糖浆、蔗糖或者麦芽糖浆[3],目前报道了多种掺假检测技术。例如 A. I. Ruiz-Matute 等人用 GC(气相色谱)和 GC-MS(气相色谱质谱法)检测蜂蜜中是否含有二果糖酸酐(DFAs)来判定是否掺假[4-6],Megherb 等人首先将样品进行反相固相萃取,去除单糖和部分寡糖,同时对多糖进行浓缩,通过使用 HPAEC-PAD(高效阴离子交换色谱)检测样品中的聚合度为 11-17 的多糖构成指纹图谱来鉴别样品中是否掺有玉米糖浆,最低可检测到的掺假量为 1%[7],李水芳等利用拉曼光谱结合 PLS-LDA(偏最小二乘-线性判别分析) 对蜂蜜中果葡糖浆和麦芽糖浆掺假进行研究,结果对果葡糖浆和麦芽糖浆混合物、果葡糖浆、麦芽糖浆的准确识别率分别达到 75.6%、91.1%、97.8%[8],Davide Bertelli 等人利用 1D 和 2DNMR(核磁共振)测定蜂蜜中物质成分差异, 并结合统计学分析方法鉴定样品真假[9],Murat Tosund 等人通过 $^{13}C/^{12}C$ 同位素比率分析法可检测出掺有 5%以上麦芽糖浆的掺假蜂蜜[10,15]。

作者利用 HILIC(亲水作用色谱)柱分离低聚糖异构体的优势[11],通过检测灵敏度比示差折光高且与梯度洗脱兼容的蒸发光散射检测器(ELSD)[11-14]对蜂蜜中的糖类物质进行分离测定,并根据纯真蜂蜜和掺假所用糖浆的组成及其色谱峰差异,结合统计学分析方法[9,16-21]对真假样品进行分类来判定蜂蜜掺假,从而建立了一种较通用、易推广的新的蜂蜜掺假检测方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 原料** 分别采集了江苏、河北、山东、辽宁等地的蜂蜜,主要为洋槐、枣花、油菜、荆条、椴树等 9 种单植物源蜂蜜,共 33 个样品。样品采集后按 GB/T 23194-2008(蜂蜜中植物花粉的测定方法)确定蜂蜜的蜜源以及真实性;果葡糖浆、麦芽糖浆,均购自于市场。

**1.1.2 试剂** 葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽二糖、麦芽三糖、麦芽四糖、麦芽五糖、麦芽六糖标准品,Sigma 公司产品。

**1.1.3 仪器** Agilent 1100 系列高效液相色谱仪,Agilent 公司产品。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 样品前处理与掺假蜂蜜样品的制备** 采集常见的 33 个纯真的单一花种蜂蜜,分别为油菜蜜、洋槐蜜、荔枝蜜、龙眼蜜、枇杷蜜、枣花蜜、椴树蜜、苕子蜜,用这些真蜂蜜按质量分数 10%~30%(梯度 10%)加入果葡糖浆模拟配置一个掺假蜂蜜样品集,样品数为 99 个(33×3=99);选择 15 个上述真蜂蜜按质量分数 5%~10%(梯度 5%)加入麦芽糖浆配置一个掺假蜂蜜样品集,样品数为 30 个,真蜂蜜样品 33 个,样品集总数为 162 个。

称取 1.00 g 样品于 25 mL 容量瓶内,蒸馏水定容至刻度,充分混匀后,取 1 mL 过 0.45 μm 滤膜,滤液于液相进样瓶中备用。

**1.2.2 色谱条件** 色谱柱为 XBridge™D;流动相:A(体积分数 50%乙腈)-B(体积分数 75%乙腈)二元梯度洗脱。梯度程序:0~20 min,体积分数 0%~50% A;20~30 min,50% A;30~33 min,50%~0% A;33~35 min,0% A(100% B)。柱温:35 ℃;流量:1.0 mL/min;进样量:10 μL。检测器(ELSD)参数:漂移管温度,95 ℃;氮气流量,2.5 mL/min。

**1.2.3 数据处理及模型建立** 对色谱图中除单糖外的其他色谱峰进行积分, 求得每个峰面积百分比,为增加样品间的差异,以每个峰的峰面积百分比与共有峰的第 6 个峰的峰面积百分比的比值为新变量, 采用偏最小二乘-判别分析方法进行数据分析,该分析过程使用的是 SIMCA-P11 软件。为了验证分类的稳定性, 将样品集分为训练集和验证集。验证集是随机从各个梯度掺假量样品中选取的 16 个,训练集为其余 146 个样品。通过相关系数 $R^2$ 和交叉验证回归系数 $Q^2$ 对 PLS-DA 模型有效性进行评价[17]。

## 2 结果与讨论

### 2.1 真蜂蜜与模拟掺假蜂蜜的色谱峰特征及差异

图 1 为一个真洋槐蜜的色谱图。根据与标准样品色谱图对比(如图 2)可知,洋槐蜜在保留时间为

10.644 min 的色谱峰与蔗糖出峰时间接近（偏后），而洋槐蜜最后一个峰的保留时间为 16.195 min 的色谱峰与麦芽三糖出峰时间相近(偏前)，因此洋槐蜜在保留时间为 10.644、11.209、11.869、12.382、12.878、13.464、14.169 min 处的色谱峰可能均为二糖及其异构体，而保留时间为 16.195 min 的色谱峰则可能是三糖。将真洋槐蜜与掺有不同比例的果葡糖浆及麦芽糖浆的洋槐蜜色谱图分别进行对比(图 3 和图 4)可见，纯真洋槐蜜与掺假洋槐蜜的差异主要集中在 10~15 min 之间。图 3 显示，随着果葡糖浆掺入量的增加，10~13 min 的色谱峰高逐渐减小，说明该时间段，以蜂蜜成分峰为主；而 13~15 min 的色谱峰高随着果葡糖浆掺入量的增加而增加，这表明该时间段以果葡糖浆成分峰为主。同样，由图 4 可见，随着麦芽糖浆掺入量的增加，模拟掺假样的 10~12 min 和 13~15 min 的色谱峰的峰高逐渐减小，即这两时间段内，亦以蜂蜜成分峰为主；而 12~13 min 的色谱峰高则随着麦芽糖浆掺入量的增加而增加，也说明这些色谱峰以麦芽糖浆及其异构体为主。

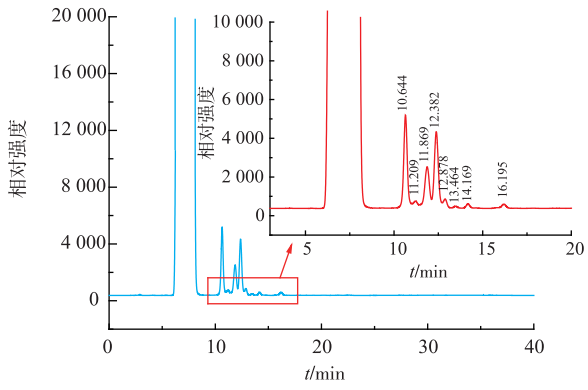



**图 1　真洋槐蜜色谱图**

**Fig. 1　Graph of acacia honey**

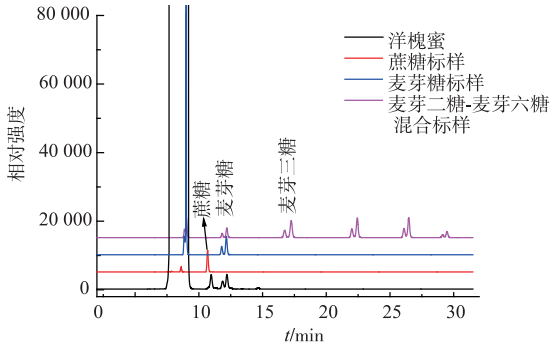



**图 2　真洋槐蜜与二糖标准品对比色谱图**

**Fig. 2　HPLC-ELSD analysis of acacia honey and Oligosaccharide standards**

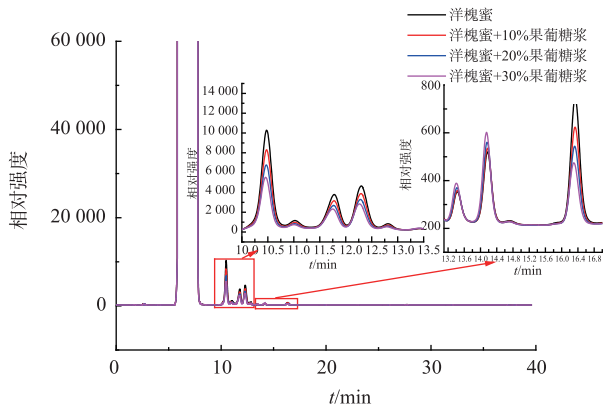



**图 3　真洋槐蜜与掺质量分数 10%、20%、30%果葡糖浆洋槐蜜对比图**

**Fig. 3　Graph of the sugar profile for 10%, 20% and 30% of added fructose corn syrup compared to**

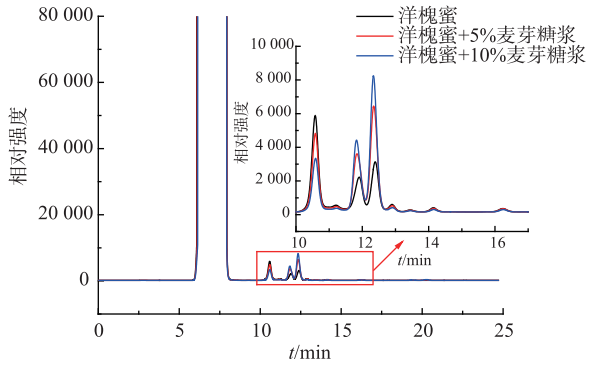



**图 4　真洋槐蜜与掺质量分数 5%、10%麦芽糖浆洋槐蜜对比图**

**Fig. 4　Graph of the sugar profile for 5%, 10% of added malt syrup compared to pure honey**

为了定量地表征上述纯真蜂蜜和掺假蜂蜜的色谱峰特征及其差异，从而有效地鉴别掺假蜂蜜，以下应用偏最小二乘法将样品的所有色谱峰的面积与保留时间为 14.169 min(图 1)的共有峰面积之比作为变量，进行统计学分析。

## 2.2　真蜂蜜与假蜂蜜的判别分析

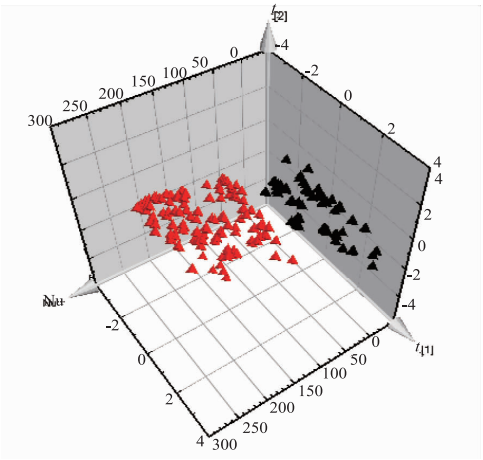
偏最小二乘法集主成分分析、多元回归分析和典型相关分析的基本功能为一体，是一种多元统计方法，分析过程中可以对自变量进行信息整合，消除众多信息中相互重叠的部分，使得分析数据更加准确可靠[18]。通过对比，当主成分数增加至 2 时，交叉有效性的值为 0. 0295 小于临界值 0.097，对提示模型的预测精度的贡献不显著，但为了能够绘制出二位成分图，所以依然选择 2 个主成分 $t_1$,$t_2$，不同主成分数建模的有关统计结果如表 1，图 5 为蜂蜜掺假分类的主成分得分 3D 图，其中黑色的代表所有

表 1　PLS–DA 模型的精度分析

Table 1　Precision analysis of PLS–DA model

| 主成分数 | 解释能力($R^2X$) | 累积解释能力($R^2X_{(cm)}$) | 交叉有效性($Q^2$) | 累积交叉有效性($Q^2_{(cm)}$) | 显著性 |
|---|---|---|---|---|---|
| $t_1$ | 0.253 | 0.253 | 0.319 | 0.308 | 显著 |
| $t_2$ | 0.236 | 0.489 | 0.029 5 | 0.319 | 不显著 |

真蜂蜜,红色的代表掺有果葡糖浆的蜂蜜。图中黑色标记和红色标记的样品没有交叉,因此,该模型能够对样品进行很好的分类。



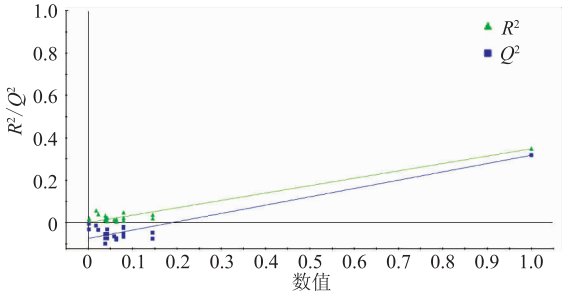
黑色的代表真蜂蜜,红色的代表果葡糖浆和麦芽糖浆掺假量高于 10%的蜂蜜

图 5　所有蜂蜜掺假分类的主成分得分 3D 图

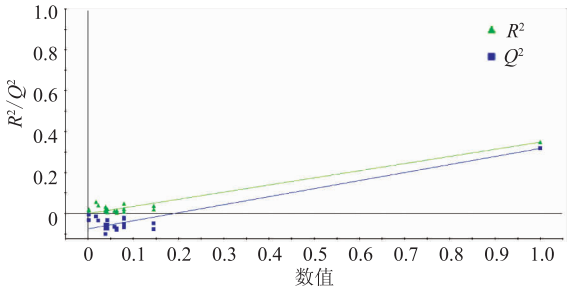
Fig. 5　PLS –DA 3D score plot of honey classification model

## 2.3　PLS–DA 模型的分析

对模型进行 20 次的置换检验实验，图 6 为 PLS–DA 模型置换检验图。在图中,$Q^2$ 为累积交叉有效性,$Q^2$ 值与模型的预测能力成正比关系,$R^2$ 累计方差值,表示用于建立新的 PLS–DA 判别模型原始数据量的多少,$R^2$ 值越大则表示模型的解释能力也越强[18]。通过检验图 6 可以看出,所有位于左边的 $R^2$ 和 $Q^2$ 值($Y$ 轴数据)均低于最右边的 $R^2$ 和 $Q^2$ 值,且 $Q^2$ 回归线的截距均为负值,说明 PLS–DA 判别模型没有出现过拟合的现象,且有较好的预测能力。




(a)真蜂蜜




(b)掺有果葡糖浆蜂蜜

图 6　PLS–DA 模型置换验证图

Fig. 6　Permutation Validation of the PLS–DA model

## 2.4　PLS–DA 模型对样品分类验证结果

通过分类列表来评估模型的分类能力。对每一个样品的判定标准为:①若 $Y$>0.5,且偏差<0.5 时,判定样本属于该类,②若 $Y$<0.5,偏差<0.5 时,判定不属于该类,③若 $Y\geqslant$0.5,判定不稳定[19],部分样品判定结果如表 2。训练集中的判别率为 94.02%,验证集的预测识别率为 100%,因此,可得出 PLS–DA 模型对蜂蜜掺假鉴别效果较好。

表 2　部分样品分类结果列表

Table 2　Classification List Reprojected onto the PLS–DA Model Performed by Considering partical Training Set Samples

| 样本序号 | 分类变量预测值 | | 类别 | |
|---|---|---|---|---|
| | $Y_A$ | $Y_B$ | 预测 | 实际 |
| 训练集 | | | | |
| 1 | 0.22 | 0.78 | B | A |
| 2 | 0.95 | 0.05 | A | A |
| 3 | 0.88 | 0.12 | A | A |
| 4 | 0.62 | 0.38 | A | A |
| 5 | 0.61 | 0.39 | A | A |
| 6 | 1.01 | –0.1 | A | A |
| 7 | 0.53 | 0.47 | A | A |
| 8 | 0.75 | 0.25 | A | A |
| 9 | 0.84 | 0.16 | A | A |
| 10 | 0.12 | 0.88 | B | B |
| 11 | –0.5 | 1.05 | B | B |
| 12 | 0.39 | 0.61 | B | B |
| 13 | 0.42 | 0.58 | B | B |
| 14 | 0.15 | 0.85 | B | B |
| 15 | 0.10 | 0.90 | B | B |

续表 2

| 样本序号 | 分类变量预测值 | | 类别 | |
|---|---|---|---|---|
| | $Y_A$ | $Y_B$ | 预测 | 实际 |
| 16 | 0.07 | 0.93 | B | B |
| 17 | 0.29 | 0.71 | B | B |
| 18 | 0.49 | 0.51 | B | B |
| 19 | 0.36 | 0.64 | B | B |
| 20 | 0.01 | 0.99 | B | B |
| 验证集 | | | | |
| 1 | 1.04 | −0.04 | A | A |
| 2 | 0.81 | 0.19 | A | A |
| 3 | 0.61 | 0.39 | A | A |
| 4 | 0.55 | 0.45 | A | A |
| 5 | −0.05 | 1.05 | B | B |
| 6 | 0.26 | 0.74 | B | B |
| 7 | 0.07 | 0.93 | B | B |
| 8 | 0.03 | 0.97 | B | B |
| 9 | −0.12 | 1.12 | B | B |
| 10 | 0.15 | 0.85 | B | B |

在建模过程中，可采用主成分分析得到的一个衡量样本到主成分空间原点距离的 Hotelling $T^2$ 统计量来评估被监测样品色谱的离散程度，可以判断出变量对模型的影响[19]。从图 7 中可以看出，验证集中的变量都在临界值以内（绿色线以下），说明所有的验证集变量符合训练集所构建的空间模型。

## 3 结 语

提出了一种应用高效液相色谱技术并结合偏最小二乘判别分析（PLS-DA）对蜂蜜掺假进行鉴别的方法，通过测定不同地区采集的不同种蜂蜜及其模拟掺假样品的液相色谱图，提取色谱峰型稳定的 8 个共有特征组分，以训练集样品进行建模，以 PLS-DA 模型对 16 个验证集样品预测，正确识别率为 100%。实验结果表明，HPLC-ELSD 与 PLS-DA 识别分析相结合，能成功的鉴别出果葡糖浆掺入量在质量分数 10%以上、麦芽糖浆掺入量为质量分数 5%以上的掺假蜂蜜样品。该方法简便准确，所需仪器较常见，对 C3 或 C4 植物源的果葡糖浆和麦芽糖浆的掺假鉴别均适用，具有较好的应用价值。

## 参考文献：

[1] 中华人民共和国卫生部. GB 14963-2011 食品安全国家标准蜂蜜[S]. 北京：中国标准出版社，2011.

[2] 中华全国供销总社. GH/T 18796-2012 蜂蜜[S]. 北京：国家标准出版社，2012.

[3] LEI Ming，HE Jinzhe，SUN Peilong. Review of detecting techniques of honey adulteration [J]. **Food Science and Technology**，2012，37(7)：283-287.(in Chinese)

[4] RUIZ-MATUTE A I，SORIA A C，MARTINEZ-CASTRO I，et al. A new methodology based on GC-MS to det-ect honey adulteration with commercial syrups[J]. **Journ-al of Agricultural and Food Chemistry**，2007，55：7264-7269.

[5] RUIZ-MATUTE A I，SANZ M L，MARTINEZ-CASTRO I. Use of gas chromatography-mass spectrometry for identification of a new disaccharide in honey[J]. **Journal of Chromatography A**，2007，1157：480-483.

[6] RUIZ-MATUTE A I，RODRIGUEZ-SANCHEZ S，SANZ M L，et al. Detection of adulterations of honey with high fructose syrups from inulin by GC analysis[J]. **Journal of Food Composition and Analysis**，2010，23：273-276.

[7] MEHDI M，BERNARD H，RENE F，et al. Polysaccharides as a marker for detection of corn sugar syrup addition in honey[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**，2009，57：2105-2111.

[8] LI Shuifang. Qualitive and quantitative detective of beet syrup adulteration of honey by Near-Infrared spectroscopy：a feasibility study[J]. **Spectroscopy and Spectral Analysis**，2013，33(10)：2637-2641.(in Chinese)

[9] DAVIDE B，MASSIMO L. Detection of honey adulteration by sugar syrups using one-dimensional and two-dimensional high-resolution nuclear magnetic resonance[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**，2010，58：8495-8501.

[10] MURAT T. Detection of adulteration in honey samples added various sugar syrups with 13c/12c isotope ratio analysis method[J]. **Food Chemistry**，2013，138：1629-1632.

[11] DAI Jun. Progress in application of liquid chromatography in the analysis of sugars [J]. **Chinese Journal of Chromatograp-hy**，2012，30(2)：113-115.(in Chinese)

[12] YU Juan. Detemination of sugars in honey by HPLC-ELSD method [J]. **Guangxi Journal of Light Industry**，2006，6：20-21.(in Chinese)

[13] WANG Zhen. Detemination of four sugars in honey by HPLC-ELSD method [J]. **Gansu Science and Technology**,2014,30(7).(in Chinese)

[14] YANG Z M,HU J,ZHAO M Y. Isolation and quantitative determination of in-ulin-type oligosaccharides in ro-ots of morinda officinalis[J]. **Carbohydrate Polymers**,2011,83:1997-2004.

[15] Serap B. Cinar,Aziz Eksi,Ilknur Coskun. Carbon isotope ratio (13C/12C) of pine honey and detection of HFCS adulteration[J]. **Food Chemistry**,2014,157:10-13.

[16] CHRISTOPHE C,JULIO S L T M. Detection and quantification of honey adulteration via direct incorpora-tion of sugar syrups or bee-feeding:preliminary study using High-Performance Anion Exchange Chromatography with pulsed Amperometric Detec-tion (HPAEC-PAD) and chem ometrics[J]. **Analytica Chimica Acta**,2005,531:239-248.

[17] ELISABETTA S,EVARISTO P. 1H nuclear magnetic resonance spectra of c-hloroform extracts of honey for c-hemometric determination of its botanical origin[J]. **Jo–urnal of Agricultural and Food Chemistry**,2010,58:57-65.

[18] TANG Jun,LIAO Xiang. GC-MS combined with PLS-DA to discriminate the varieties of XinJiang lavender essential oil[J]. **Computers and Applied Chemistry**,2014,31(6):701-704.(in Chinese)

[19] LI Libing,CHEN Kangning,WANG Jiajun,et al. Classification of tobacco flavors by PLS-DA combined with Multi-Bounce attenuated total reflectance IR fingerprint spectra[J]. **Tobacco Chemistry**,2014,7:37-39.(in Chinese)

[20] ERIKSSON L,JOHANSSON E,KETTANEH-WOLD N,et al. Multi-and Megavariate. Data analysis. part:basic principles and applications[M]. Sweden:Umetrics AB,2006.

[21] WANG Zhenbin,SHAO Shuping. Application of principal component analysis in comprehensive assessment of ultrasound treatment on vinegar[J]. **Journal of Food and Biotechnology**,2015,34(6):627-633.(in Chinese)

## 科　技　信　息

### 欧盟评估奇亚籽作为新型食品的安全性

2019 年 4 月 17 日,欧洲食品安全局(EFSA)发布了关于新型食品奇亚籽(Salvia hispanica)的安全性评估报告,允许使用奇亚籽的产品主要包括:烘焙产品、水果和蔬菜制品、乳制品、非酒精饮料、糖果等。根据欧盟委员会的要求,欧洲食品安全局新型食品和食物过敏原专家组(NDA)对奇亚籽的总体膳食暴露和安全性评估提出意见,评估结论如下:在上述食品中使用既定量整粒或磨碎的奇亚籽,如烘焙食品、糖果巧克力、非酒精饮料、乳制品等产品中使用含量不超过 10%的奇亚籽,水果制品中使用含量不超过 6%的奇亚籽,针对一般人群均是安全的。此次评估还涉及在没有特定限制和预防措施的情况下,在其他未经热处理(加工和烹饪过程)的食品中使用奇亚籽的安全性,除致敏性外,NDA 未发现任何安全危害。

[信息来源] 中华人民共和国海关总署. 欧盟评估奇亚籽作为新型食品的安全性 [EB/OL]. (2019–4–22) . http://www.customs.gov.cn/customs

### 欧盟修订芫荽籽油作为新食品原料的规格要求

2019 年 3 月 21 日, 欧盟官方公报消息,3 月 20 日欧盟委员会发布欧盟法规 (EU)2019/456, 对来自芫荽(Coriandrum sativum)的芫荽籽油(coriander seed oil)作为新食品原料的规格要求进行了修订。在欧盟委员会实施细则(EU)2017/2470 建立的授权新食品原料清单的相关条目中,修订了芫荽籽油规格中“皂化值”指标,新设定为 179~200 mg/g。该法规自官方公报发布之日起 20 日生效。

[信息来源]中华人民共和国海关总署. 欧盟修订芫荽籽油作为新食品原料的规格要求 [EB/OL]. (2019–3–25) . http://www.customs.gov.cn/customs