

基于氢核磁共振技术和化学计量学方法 鉴别蜂蜜品种

宋晓莹¹, 陈兰珍^{1,2,3*}, 李熠^{1,2,3}, 周金慧^{1,2,3}, 陈雷^{4*}, 辛曼曼⁴

(1. 中国农业科学院 蜜蜂研究所, 北京 100093; 2. 农业农村部 蜂产品质量安全控制重点实验室, 北京 100093;
3. 农业农村部 蜂产品质量安全风险评估实验室, 北京 100093; 4. 中国科学院
武汉物理与数学研究所, 湖北 武汉 430071)

摘要: 利用氢核磁共振(¹H NMR)技术结合化学计量学方法对不同品种的蜂蜜进行鉴别。采集33个洋槐蜜、48个油菜蜜、63个荔枝蜜的核磁指纹图谱, 对数据进行不同方式的预处理后, 采用有监督的偏最小二乘判别分析(PLS-DA)和正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)建立判别模型。结果表明, 不同的数据预处理方式对模型解释能力和预测能力的影响较大, 自标度化(UV)模式更适于蜂蜜核磁数据的分析。建立的OPLS-DA模型可有效地分离判别3种蜂蜜, 所建模型对3种蜂蜜的判别解释能力达95.8%, 对未知样本的预测能力为90.5%。因此, 利用¹H NMR结合OPLS-DA方法可有效地实现不同品种蜂蜜的快速鉴别。

关键词: 氢核磁共振技术(¹H NMR); 化学计量学; 蜂蜜; 品种鉴别

中图分类号: O482.532; S896.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2019)03-0355-05

Classification of Chinese Honeys of Different Floral Origins by ¹H NMR Combined with Chemometrics

SONG Xiao-ying¹, CHEN Lan-zhen^{1,2,3*}, LI Yi^{1,2,3}, ZHOU Jin-hui^{1,2,3}, CHEN Lei^{4*}, XIN Man-man⁴

(1. Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China; 2. Key Laboratory of Bee Products for Quality and Safety Control, Ministry of Agriculture and Rural, Beijing 100093, China; 3. Laboratory of Risk Assessment for Quality and Safety of Bee Products, Ministry of Agriculture and Rural, Beijing 100093, China;
4. Wuhan Institute of Physics and Mathematics, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China)

Abstract: ¹H nuclear magnetic resonance (¹H NMR) spectroscopy combined with chemometrics was developed for the identification and classification of Chinese honey of different floral origins. 33 acacia honeys, 48 rape honeys and 63 lychee honeys were analyzed by NMR, and the NMR data were preprocessed in different modes. Supervised partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) were both used to set up discriminant models by extracting the useful information from NMR signals. Results showed that different data preprocessing methods have significant influences on the interpretation and prediction abilities of the models, and the unit variance (UV) scaling was more suitable for the analysis of honey NMR data than the others. The OPLS-DA model could effectively discriminate three kinds of honey of different floral origins. The explanation and prediction abilities based on the OPLS-DA model were 95.8% and 90.5%, respectively. Therefore, ¹H NMR spectroscopy combined with chemometric could effectively realize the rapid and accurate identification of Chinese honeys of different floral origins.

Key words: ¹H nuclear magnetic resonance technology (¹H NMR); chemometrics method; honey; floral origins identification

蜂蜜的物质组成复杂, 其主要成分是糖类, 占蜂蜜成分的65%~80%, 糖类中又以葡萄糖和果糖

收稿日期: 2018-09-11; 修回日期: 2018-10-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(31772070); 国家特色农产品风险评估专项(GJFP2018010); 中国农业科学院创新工程项目(CAAS-ASTIP-2018-IAR); 国家蜂产业技术体系(CARS-45-KXJ10)

* 通讯作者: 陈兰珍, 博士, 研究员, 研究方向: 蜂产品质量与安全, E-mail: chenlanzhen2005@126.com
陈雷, 博士, 高级工程师, 研究方向: 磁共振技术及应用, E-mail: chenlei@wipm.ac.cn

为主。此外,还有18%~22%的水,少量的蛋白质、酶、游离氨基酸、黄酮类物质、酚酸类物质、矿物质元素以及微量元素^[1]。常见的蜂蜜品种是按照蜜蜂所采集的蜜源植物不同进行划分。我国地域辽阔,蜜源植物种类较多,能得到的商品蜜种类多达几十种。因此,还衍生出其他划分蜂蜜品种的方式,如根据蜂蜜的颜色可划分为浅色蜜和深色蜜,市面上常见的洋槐蜜、油菜蜜、荔枝蜜、椴树蜜为浅色蜜,枣花蜜、荞麦蜜为深色蜜。

蜂蜜作为一种药食同源的食品,近年来的市场需求量不断增加。由于不同蜜源植物来源的蜂蜜品质及感官特征不同^[2],因此在市场中,不同品种蜂蜜的价格差异较大,且以浅色蜜更受欢迎^[3]。但不同种蜂蜜的主要成分含量差别很小,传统方法很难鉴别蜂蜜品种,因此出现了低价蜜掺入高价蜜中进行销售的现象,造成蜂蜜品种标识混淆,市场价格混乱^[4],并已成为蜂蜜市场中一个比较突出的问题。

蜂蜜品种的传统检测方法是感官鉴别和花粉分析,其结果判断带有一定的主观性,需要实验员具有丰富的经验和专业的知识背景^[5-6]。近年,一些检测技术也被应用于蜂蜜品种鉴别中,主要包括高效液相色谱^[7]、液相色谱-质谱联用技术^[8]、气相色谱-质谱联用技术^[9]、光谱技术(如近红外光谱、中红外光谱、拉曼光谱、荧光光谱)^[10-13]、电感耦合等离子体质谱^[14]等。这些方法均有各自的优缺点,尚未有一种检测技术能够有效地鉴别不同品种的蜂蜜。

氢核磁共振技术(¹H NMR)是依靠核磁共振现象测定分子结构的一种谱学技术,通过对样本施加外加磁场,使处在低能态的自旋核发生跃迁到高能态,当自旋核发生弛豫返回低能态时,产生核磁共振信号^[15]。该技术一次进样就可检出样品中所有含氢的化合物,检测物质的覆盖面广,样本预处理简单,上机分析所需时间较短。近年来,¹H NMR被广泛应用到食品领域,并在牛奶^[16]、橄榄油^[17]、酒类^[18]的品种鉴别以及咖啡^[19]、牛奶^[20]的产地识别中取得了很好的成果。现阶段,该方法在蜂蜜品种鉴别领域中的应用较少。本研究采用¹H NMR对洋槐蜜、油菜蜜、荔枝蜜进行全谱图分析,结合化学计量学的方法,以期从整体物质角度,建立最佳的判别分析模型,从而为解决蜂蜜品种的鉴别提供行之有效的方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

AVANCE 600MHz 液体 NMR 仪(瑞士 Bruker 公司); PL103 电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司); 移液枪(德国 Eppendorf 公司); 1-15PK 台式高速离心机(德国 Sigma 公司); 5 mm 核磁管(美国 Norell 公司); 涡旋混合器(美国 Scientific Industries 公司)。

三水合磷酸氢二钾(K₂HPO₄·3H₂O)、二水合磷酸二氢钠(NaH₂PO₄·2H₂O)购自上海国药集团试剂有限公司; 重水(D₂O, 99.9% 氘代, 含 0.05 g/100 mL 2, 2, 3, 3-氘代三甲基硅烷丙酸(TSP), 美国 Cambridge Isotope Laboratories 公司)。

1.2 样品信息

实验选择的蜂蜜品种为洋槐蜜、油菜蜜、荔枝蜜,均为较受市场欢迎的浅色蜜。所有的蜂蜜样品均直接取自蜂场中自然酿造的成熟蜜。共收集 144 个样品,在 4 °C 的冰箱中贮藏、备用。蜂蜜样本的具体信息如表 1 所示。

表 1 蜂蜜样本的信息
Table 1 The information of honey samples

蜂蜜品种	产地	结晶状态	个数
洋槐蜜	辽宁、山东、河南	未结晶	33
油菜蜜	湖北、四川、江苏	白色结晶	48
荔枝蜜	福建、广东、广西、海南、云南	结晶	63

1.3 NMR 样品的制备

将蜂蜜从冰箱中取出,放置至室温。对有结晶的样品,在 60 °C 水浴加热,待样品完全溶解后再称样。称取蜂蜜 100.00 mg 置于离心管中,加入 1.2 mL pH 7.4 的磷酸缓冲液(0.15 mol/L K₂HPO₄/NaH₂PO₄, 使用含 10% D₂O 的双蒸水配制而成)后,在涡旋振荡器上振荡 5 min,直至样品混合均匀。

在 8 000 r/min 下离心 10 min, 取 600 μ L 上清液转至 5 mm 核磁管中。

1.4 数据采集与处理

在 600 MHz 液体 NMR 仪上, 采用 NOESYPR1D 脉冲序列(Recycle delay - 90° - t_1 - 90° - t_m - 90° - acquisition)采集样品信息, 序列中 90° 脉冲的脉宽为 14.5 μ s, 固定间隔 t_1 为 4 μ s, 混合时间 t_m 为 2.27 s, 实验温度设置为 298 K。采用预饱和方法进行水峰抑制, 持续 2.0 s。¹H NMR 的谱宽设为 12 000 Hz, 采样点数为 32 768, 信号累加次数为 64 次。所有得到的自由感应衰减信号经过指数加权和傅里叶变化(指数线宽因子为 0.3 Hz)后得到核磁共振的一维图谱。

对得到的¹H NMR 谱图进行处理, 手动调节基线、相位, 对化学位移定标, 将内标 TSP 的共振峰设为 δ 0.00。将处理好的 NMR 谱图按照每段宽度为 δ 0.004 进行分段积分, 为消除残留水信号的影响, 剔除 δ 4.73 ~ 4.93 区间的信号。为减少不同组分和样品间的差异, 对信号峰的峰面积进行归一化处理, 所得到的积分数据导入 Excel 文件中保存。采用 SIMCA 13.0 软件(v13.0, Umetrics., Sweden)进行数据分析。

2 结果与讨论

2.1 谱图解析

选取洋槐蜜、油菜蜜、荔枝蜜的核磁谱图进行对比, 发现不同品种蜂蜜的谱图无明显差异。蜂蜜的¹H NMR 谱图可以分为 3 部分: 脂肪区(δ 0.0 ~ 3.0), 糖类化合物区(δ 3.0 ~ 6.0), 芳香区(δ 6.0 ~ 9.5)。通过局部放大 3 个区域的主要信号峰区间(图 1), 对其中的信号峰进行鉴别, 并结合化学位移、耦合常数、峰形等信息, 查阅相关参考文献对信号峰进行归属后, 共鉴定出 19 种化合物^[21-23]。

在脂肪区主要集中有机酸、氨基酸以及醇类物质的信号峰。在糖类化合物区域, 有效信号主要集中在 δ 5.0 ~ 5.5, 集中着单糖和二糖信号。在芳香区中, 可鉴别出苯丙氨酸、酪氨酸、甲酸 3 种物质中苯环上氢质子的共振信号。

2.2 数据分析

在蜂蜜中, 葡萄糖、果糖等单糖含量较高, 与丙氨酸等含量低的物质在含量上可以相差数个数量级, 因此在后续进行多变量统计分析时, 信号较弱的成分含量变化会被信号较强的成分含量

变化所掩盖, 进而影响差异成分的识别。为了避免上述情况出现, 在建模前需对数据进行优化。常见的数据预处理方法包括: 中心化(Mean center scaling, Ctr)、自标度化(Unit variance scaling, UV)、帕莱托标准化(Pareto scaling, Par)。Ctr 处理是将数据集中的各项数据减去其均值, 既不会改变样本点之间的相对位置, 也不会促使变量间相关性发生改变, 能够更好地分析数据集中波动的部分, 但可能导致低含量的变量信息受到高含量变量信息的抑制^[24]。UV 处理可使新得到的每个变量的均值或标准差在同一个等级上, 但噪声信号区域可能会影响最终结果^[25]。在 Par 处理中, 中心化和尺度变化同时进行, 通过对每个变量赋予相同的缩放系数, 可有效地减少较大信号数据的相对重要性, 保留原始数据集结构的完整性, 但变化相对较小的重要变量无法被选定为标记物^[26]。因此, 3 种方法各有优缺点, 在实际分析中需根据具体的数据进行筛选。

在 SIMCA 软件中, 常见的评价模型质量的参数有 R^2X 、 R^2Y 和 Q^2 , 其中 R^2X 、 R^2Y 分别代表模型对数据矩阵的解释能力, Q^2 代表模型整体的预测能力。通常情况下, R^2 和 Q^2 值越接近 1, 则说明模

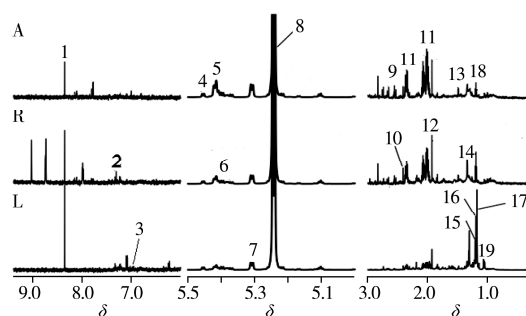


图 1 洋槐蜜(A)、油菜蜜(R)、荔枝蜜(L)的¹H NMR 谱图

Fig. 1 ¹H NMR spectra of acacia honey (A), rape honey (R) and lychee honey (L)

1. formic acid(甲酸), 2. phenylalanine(苯丙氨酸),
3. tyrosine(酪氨酸), 4. kojibiose(曲二糖),
5. sucrose(蔗糖), 6. nigerose(黑曲霉糖),
7. turanose(松二糖), 8. α -glucose(α -葡萄糖),
9. citric acid(柠檬酸), 10. succinic acid(琥珀酸),
11. proline(脯氨酸),
12. acetic acid(乙酸), 13. alanine(丙氨酸),
14. lactic acid(乳酸),
15. 3-hydroxy-butanone(3-羟基丁酮),
16. ethyl acetate(乙酸乙酯),
17. ethanol(乙醇), 18. 2, 3-butanediol(2, 3-丁二醇),
19. valine(缬氨酸)

越稳定可靠, 该值大于 0.5 就证明模型的判别效果较好。

2.2.1 偏最小二乘判别分析 偏最小二乘判别分析 (PLS-DA) 是一种常见的有监督的模式识别方法, 是在主成分分析的基础上增加了一个隐形变量 (Y), 使自变量向 Y 回归的程度达到最大, 以此弱化组内之间的差异, 突出组间的差异^[27]。

分别在 3 种预处理条件下建立 PLS-DA 模型, 3 个模型中的参数见表 2。通过参数对比, 发现在 UV 模式下模型的判别效果最好。在此条件下建立 PLS-DA 模型, 该模型中前 8 个主成分的累积贡献率 $R^2 Y$ 已近 95%, 超过一般要求的累积贡献率 (85%)。根据模型的得分散点图 (图 2) 可看出, 荔枝蜜样本主要集中在 PC1 得分值的负值区域, 而洋槐蜜、油菜蜜样本主要集中在 PC1 得分值的正值区域; 油菜蜜样本主要集中在 PC2 得分值的正值区域, 洋槐蜜样本主要集中在 PC2 得分值的负值区域。3 种蜂蜜之间有着明显的分离趋势, 但仍然存在过重重合的现象, 需选择更为合适的判别模型。

2.2.2 正交偏最小二乘判别分析 为了进一步去除不相关的差异, 更好地进行判别分离, 在 PLS-DA 基础上结合正交信号, 去除与 Y 矩阵无关的 X 矩阵的变化, 使得 X 矩阵和 Y 矩阵之间的关系最大化, 将分组差异最大化^[28]。因此, 采用正交偏最小二乘判别法 (OPLS-DA 法) 进一步分析、比较不同品种蜂蜜之间的差异。

分别在 3 种预处理条件下建立 OPLS-DA 模型, 通过对比同模型的特征参数值 (表 3), 发现在 UV 模式下, 模型的 $R^2 Y$ 和 Q^2 值均最高, 因此选择 UV 作为建模时的数据预处理方式。根据 OPLS-DA 模型得分图 (图 3), 发现在第二主成分下, 3 种蜂蜜可以得到很好的判别分离, 油菜蜜主要集中在 PC2 得分值的正值区域, 荔枝蜜处在坐标的中心区域, 而洋槐蜜主要分布在 PC2 得分值的负值区域。

利用 OPLS-DA 模型可以有效地区分洋槐蜜、油菜蜜和荔枝蜜, 所建模型对 3 种蜂蜜的判别解释能力达 95.8%, 对未知样本的预测能力为 90.5%。

3 结论

本文采用 ^1H NMR 结合化学计量学的方法进行蜂蜜品种的鉴别。通过对不同品种蜂蜜的主要核磁信号峰进行归属, 共鉴定出 19 种化合物的特征峰。为了更好地挖掘核磁数据中的信息, 讨论了在建立判别模型中数据预处理的方法, 通过比较发现自标度化为最适合核磁数据建模的数据预处理方式。通过不断筛选合适的数据分析模型, 发现在自标度化处理下, 利用 OPLS-DA 模型可以很好地区分洋槐蜜、油菜蜜、荔枝蜜。本文所采用的 ^1H NMR 是基于蜂蜜的全组分分析方法, 能够获得样品的全部有效信息, 有效弥补了其他检测技术对检出物质化学键、官能团的限制。将 ^1H NMR 与 OPLS-DA 相结合, 能够快速、准确地区分不同品种的蜂蜜, 从而为规范蜂蜜市场提供了一种新方法。

表 2 PLS-DA 模型在不同数据预处理下的模型参数
Table 2 Model parameters of PLS-DA model under different data scaling methods

Method	$R^2 X(\text{cum})$	$R^2 Y(\text{cum})$	$Q^2(\text{cum})$
Ctrl	0.894	0.650	0.557
UV	0.611	0.951	0.902
Par	0.843	0.799	0.639

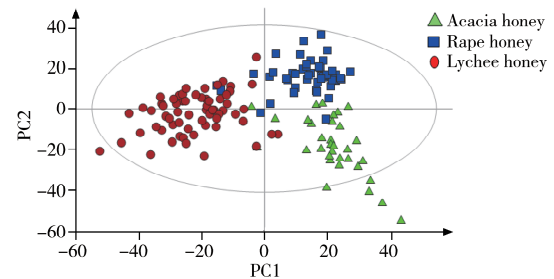


图 2 PLS-DA 在 UV 预处理下的得分散点图
Fig. 2 Score scatter plot of PLS-DA with UV scaling

表 3 OPLS-DA 模型在不同数据预处理下的模型参数

Method	$R^2 X(\text{cum})$	$R^2 Y(\text{cum})$	$Q^2(\text{cum})$
Ctrl	0.769	0.526	0.471
UV	0.632	0.958	0.905
Par	0.685	0.694	0.607

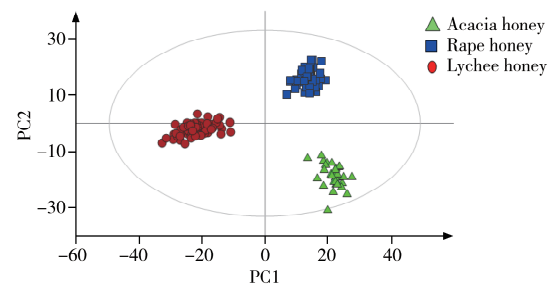


图 3 OPLS-DA 在 UV 预处理下的得分散点图
Fig. 3 Score scatter plot of OPLS-DA with UV scaling

参考文献:

- [1] Liu Y, Ding T, Wu B, Zhang R, Shen C Y, Fei X Q, Zhang K H, Liu J H, Deng X J, Guo D H. *J. Instrum. Anal.* (刘芸, 丁涛, 吴斌, 张睿, 沈崇钰, 费晓庆, 张阔海, 刘建红, 邓晓军, 郭德华. 分析测试学报), **2016**, 135(10): 1248 – 1254.
- [2] Nečemer M, Košir I J, Kump P, Kropf U, Jamnik M, Bertonec J, Ogrinc N, Golob T. *J. Agric. Food Chem.*, **2009**, 57(10): 4409 – 4414.
- [3] Chen L Z, Ye Z H, Zhao J. *Food Sci.* (陈兰珍, 叶志华, 赵静. 食品科学), **2008**, 29(3): 494 – 498.
- [4] Shen Y B, Tian H X, Chen C. *Food Ind.* (申永波, 田怀香, 陈臣. 食品工业), **2016**, 37(4): 251 – 254.
- [5] Yang Y, Battesti M J, Paolini J, Muselli A, Tomi P, Costa J. *Food Chem.*, **2013**, 134(1): 37 – 47.
- [6] Conte L S, Miorini M, Giomo A, Bertacco G, Zironi R. *J. Agric. Food Chem.*, **1998**, 46(5): 1844 – 1849.
- [7] Cavazza A, Corradini C, Musci M, Salvadeo P. *J. Sci. Food Agric.*, **2012**, 93(5): 1169 – 1175.
- [8] Kečkeš S, Gašić U, Veličković T C, Milojković – Ošpenica D, Natic M, Tešić Ž. *Food Chem.*, **2013**, 138(1): 32 – 40.
- [9] Seisonen S, Kivima E, Vene K. *Food Chem.*, **2015**, 169: 34 – 40.
- [10] Herrero L C, Peña – Crecente R M, García M S, Barciela G J. *Food Chem.*, **2013**, 141(4): 3559 – 3565.
- [11] Gok S, Severcan M, Goormaghtigh E, Kandemir I, Severcan F. *Food Chem.*, **2015**, 170: 234 – 240.
- [12] Corvucci F, Nobili L, Melucci D, Grillenzoni F V. *Food Chem.*, **2015**, 169: 297 – 304.
- [13] Lenhardt L, Zekovic I, Dramicanin T, Dramicanin M D, Bro R. *Appl. Spectrosc.*, **2014**, 68(5): 557 – 563.
- [14] Wu Z B, Chen L Z, Wu L M, Xue X F, Zhao J, Li Y, Ye Z H, Lin G H. *J. Agric. Food Chem.*, **2015**, 63(22): 5388 – 5394.
- [15] Gao H B, Zhang Z F. *Principles and Experimental Methods of Nuclear Magnetic Resonance*. Wuhan: Wuhan University Press(高汉宾, 张振芳. 核磁共振原理与实验方法. 武汉: 武汉大学出版社), **2008**.
- [16] Mannina L, Marini F, Gobbino M, Sobolev A P, Capitani D. *Talanta*, **2010**, 80(5): 2141 – 2148.
- [17] Brescia M A, Mazzilli V, Sgaramella A, Ghelli S, Fanizzi F P, Sacco A. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **2004**, 81(5): 431 – 436.
- [18] Fotakis C, Zervou M. *Food Chem.*, **2016**, 196: 760 – 768.
- [19] Arana V A, Medina J, Alarcon R, Moreno E, Heintz L, Schafer H, Wist J. *Food Chem.*, **2015**, 175: 500 – 506.
- [20] Jung Y, Lee J, Kwon J. *J. Agric. Food Chem.*, **2010**, 58(9): 10458 – 10466.
- [21] Boffo E F, Tavares L A, Tobias C A T, Ferreira M M C, Ferreira A G. *LWT – Food Sci. Technol.*, **2009**, 42(9): 1455 – 1460.
- [22] Zheng X, Zhao Y R, Wu H F, Dong J Y, Feng J H. *Food Anal. Methods*, **2016**, 9(6): 1470 – 1479.
- [23] Lolli M, Bertelli D, Plessi M, Sabatini A G, Restani C. *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, 56(4): 1298 – 1304.
- [24] Craig A, Cloareo O, Holmes E, Nicholson J K, Lindon J C. *Anal. Chem.*, **2006**, 78(7): 2262 – 2267.
- [25] Saccenti E, Smilde A K, Westerhuis J A, Hendriks M M. *J. Chemom.*, **2011**, 25(12): 644 – 652.
- [26] Deng L L, Cheng K K, Shen G P, Zhou L, Liu X Z, Dong J Y, Chen Z. *Spectrosc. Spectral Anal.* (邓伶俐, Cheng Kian – Kai, 沈桂平, 周玲, 刘新卓, 董继扬, 陈忠. 光谱学与光谱分析), **2014**, 34(10): 2868 – 2872.
- [27] Fang M L, Xing J, Li Z Y, Qin X M. *Chin. Tradit. Herbal Drugs*(范玛莉, 邢婕, 李震宇, 秦雪梅. 中草药), **2014**, 45(22): 3230 – 3237.
- [28] Bylesjö M, Rantalainen M, Cloarec O, Nicholson J K, Holmes E, Trygg J. *J. Chemom.*, **2006**, 20(8/10): 341 – 351.

(责任编辑: 龙秀芬)