

## 基于高分辨质谱的非靶向筛查技术在鉴别蜂蜜掺假中的应用研究

严大银, 王 娟

恩施州公共检验检测中心 湖北恩施

**【摘要】目的** 蜂蜜掺假是当前食品欺诈的突出问题, 严重损害消费者权益与市场公平。本研究旨在建立一种基于液相色谱-四极杆飞行时间质谱 (LC-Q-TOF-MS) 的非靶向代谢组学方法, 用于高效、准确地鉴别纯正蜂蜜与掺假蜂蜜。**方法** 收集来自不同蜜源 (槐花、荆条、枣花) 的纯正蜂蜜样本, 并以常见掺假物 (大米糖浆、甜菜糖浆) 制备不同掺假比例 (10%, 20%, 30%, 50%, w/w) 的模拟样本。采用 LC-Q-TOF-MS 技术获取所有样本的代谢谱图, 通过主成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘-判别分析 (OPLS-DA) 进行模式识别, 筛选差异性标志物, 并构建鉴定模型。**结果** PCA 和 OPLS-DA 模型能清晰区分纯正蜂蜜与掺假蜂蜜。通过变量重要性投影 (VIP>1.5) 和 t 检验 ( $p<0.05$ ), 共筛选出 15 个显著差异性化合物作为潜在化学标志物, 包括寡糖、氨基酸、酚酸和黄酮类化合物。其中, 大米糖浆标志物 (如麦芽糖寡糖特定异构体) 和甜菜糖浆标志物 (如海藻糖、棉子糖) 在掺假样本中显著上调, 而某些蜂蜜特征性花粉源植物化合物在掺假样本中显著下调。基于这些标志物建立的判别模型对验证集的鉴别准确率达到 98.5%。**结论** 本研究建立的非靶向筛查方法能够克服传统靶向方法的局限性, 无需预先设定目标物即可有效鉴别蜂蜜中是否存在外源糖浆掺假, 并提示可能的掺假源, 为蜂蜜真实性鉴别提供了强有力的技术支撑。

**【关键词】** 蜂蜜掺假; 非靶向筛查; 高分辨质谱; 化学标志物; 正交偏最小二乘-判别分析 (OPLS-DA)

**【收稿日期】** 2025 年 10 月 16 日 **【出刊日期】** 2025 年 11 月 26 日 **【DOI】** 10.12208/j.jafs.20250012

### Application of untargeted screening technology based on high-resolution mass spectrometry for the authentication of honey adulteration

Dayin Yan, Juan Wang

Enshi Prefecture Public Inspection and Testing Center, Enshi, Hubei

**【Abstract】Objective** Honey adulteration is a prominent issue of food fraud, severely undermining consumer rights and market fairness. This study aimed to establish an untargeted metabolomics approach based on liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-Q-TOF-MS) for the efficient and accurate discrimination of pure and adulterated honey. **Methods** Pure honey samples from different botanical origins (acacia, vitex, jujube) were collected, and simulated adulterated samples were prepared by adding common adulterants (rice syrup, beet syrup) at different ratios (10%, 20%, 30%, 50%, w/w). The metabolic profiles of all samples were acquired using LC-Q-TOF-MS. Pattern recognition was performed using principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) to screen for differential markers and construct identification models. **Results** PCA and OPLS-DA models effectively distinguished pure honey from adulterated honey. Fifteen significant differential compounds were screened out as potential chemical markers through variable importance in projection (VIP > 1.5) and t-test ( $p < 0.05$ ), including oligosaccharides, amino acids, phenolic acids, and flavonoids. Among them, markers for rice syrup (e.g., specific isomers of maltooligosaccharides) and beet syrup (e.g., trehalose, raffinose) were significantly up-regulated in adulterated samples, while some characteristic plant-derived compounds

作者简介: 严大银 (1986-) 女, 湖北恩施, 土家族, 本科, 助理工程师, 检验员, 聚焦食品添加剂、重金属等有害物质的检测技术, 食品检测; 王娟 (1987-) 女, 河南信阳, 汉, 研究生, 助理工程师, 检验员, 食品微生物, 食品检测。

of honey were significantly down-regulated. The discriminant model established based on these markers achieved an accuracy of 98.5% for the validation set. **Conclusion** The untargeted screening method established in this study can overcome the limitations of traditional targeted methods, effectively identifying the presence of exogenous syrup adulteration in honey without pre-defined targets, and suggesting possible adulteration sources. It provides a powerful technical support for honey authenticity identification.

【**Keywords**】Honey adulteration; Untargeted screening; High-resolution mass spectrometry; Chemical markers; OPLS-DA

## 1 引言

蜂蜜是一种由蜜蜂采集植物花蜜、分泌物或蜜露,与自身分泌物结合后,经充分酿造而成的天然甜物质<sup>[1]</sup>。它富含糖类、氨基酸、维生素、矿物质及多种生物活性物质(如酚酸、黄酮类),深受消费者喜爱。然而,由于其产量相对较低且价格较高,蜂蜜成为食品掺假的重灾区。不法商家常使用价格低廉的外源糖浆(如大米糖浆、玉米糖浆、甜菜糖浆)进行掺假,以牟取非法利润<sup>[2]</sup>。这种掺假行为不仅欺骗消费者,破坏了市场公平竞争环境,更可能因劣质糖浆的引入而带来食品安全风险。

传统的蜂蜜掺假检测方法包括稳定同位素比率分析(SCIRA)、色谱技术、光谱技术等<sup>[3]</sup>。其中,碳同位素比值法(C4植物糖检测)是国际公认的标准方法,可有效检测出来源于C4植物(如玉米、甘蔗)的糖浆掺假<sup>[4]</sup>。然而,该方法无法检测出来源于C3植物(如大米、甜菜、小麦)的糖浆,而后者正成为当前主流的掺假物。虽然靶向液相色谱-质谱联用(LC-MS)方法可以通过检测特定标志物(如大米糖浆中的寡糖特征谱)来鉴别C3植物糖浆掺假<sup>[5]</sup>,但其需要预先知道目标化合物的信息,对于不断更新的新型掺假物显得无能为力。

近年来,基于高分辨质谱(HRMS)的非靶向筛查技术为解决这一难题提供了新思路。该技术无需预先设定目标物,即可对样本中成千上万种化合物进行全景式扫描和分析<sup>[6]</sup>。通过化学计量学方法,可以从海量数据中挖掘出能够区分纯正与掺假蜂蜜的潜在化学标志物,从而实现准确鉴别<sup>[7]</sup>。本研究拟采用LC-Q-TOF-MS技术,结合多元统计分析,建立一种非靶向筛查方法,旨在高效、精准地鉴别蜂蜜中是否存在C3植物糖浆掺假,并筛选关键差异性标志物,为蜂蜜质量控制和市场监管提供新的技术手段。

## 2 材料与方法

### 2.1 材料与试剂

本研究共收集45批次经碳同位素及其他理化指标验证的纯正单花蜜样本(槐花蜜、荆条蜜、枣花蜜各15批次),均来自合作蜂场或信誉良好的供应商。掺假物为市售高纯度大米糖浆和甜菜糖浆。

乙腈、甲醇(质谱纯)购自美国Fisher Chemical公司;甲酸(质谱纯)购自德国CNW Technologies公司;超纯水由Milli-Q系统制备。

### 2.2 样本制备

将纯正蜂蜜样本于40℃水浴中温热融化,混匀。分别称取一定量的纯正蜂蜜,加入大米糖浆或甜菜糖浆,制备成掺假比例为10%、20%、30%、50%(w/w)的模拟掺假样本,每个比例制备3个平行。所有样本于4℃保存待测。

### 2.3 LC-Q-TOF-MS 分析

色谱分离采用Agilent 1290 Infinity II液相系统。色谱柱:Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18柱(2.1×100mm, 1.8 μm)。流动相:A相为0.1%甲酸水溶液,B相为0.1%甲酸乙腈溶液。梯度洗脱程序:0-2min, 5%B; 2-15min, 5%-95%B; 15-17min, 95%B; 17-17.1min, 95%-5%B; 17.1-20min, 5%B。流速:0.3mL/min;柱温:35℃;进样量:2 μL。

质谱检测采用Agilent 6545 Q-TOF质谱仪,在正离子模式下采集数据。离子源参数:干燥气温度:320℃;干燥气流速:8 L/min;雾化器压力:35 psi;鞘气温度:350℃;鞘气流速:11 L/min;毛细管电压:3500 V;喷嘴电压:1000 V。质量扫描范围:m/z 50-1700。采用二级质谱自动触发模式(Auto MS/MS)进行数据采集,以用于化合物结构鉴定。

### 2.4 数据处理与统计分析

原始数据经Agilent MassHunter Qualitative Analysis软件转换为.mzData格式后,导入XCMS Online平台进行峰识别、峰对齐、峰面积提取等预

处理<sup>[8]</sup>。将生成的数据矩阵导入 SIMCA-P 14.1 软件 (Umetrics, Sweden) 进行多元统计分析。首先采用无监督的主成分分析 (PCA) 观察样本的自然聚集情况和离群值。然后采用有监督的正交偏最小二乘-判别分析 (OPLS-DA) 来最大化组间差异, 并通过 7 次循环交互验证和 200 次响应置换检验来评估模型的有效性和防止过拟合。根据 OPLS-DA 模型的变量重要性投影 (VIP) 值 ( $VIP > 1.5$ ) 并结合 Student's t 检验 ( $p < 0.05$ ) 来筛选显著性差异化合物。利用在线数据库 (如 HMDB, MetLin) 和二级质谱碎片信息对潜在标志物进行鉴定。

### 3 结果与分析

#### 3.1 非靶向代谢谱数据的多元统计分析

对所有纯正蜂蜜和掺假蜂蜜样本的 LC-Q-TOF-MS 数据进行多元统计分析。首先采用无监督的主成分分析 (PCA), 结果显示, PC1 和 PC2 的累计贡献率为 62.3%。分析结果表明, 纯正蜂蜜与掺假蜂蜜样本呈现出明显的分离趋势, 且不同掺假比例的样本沿 PC1 方向呈梯度分布, 这一现象表明掺假行为显著改变了蜂蜜的整体化学组成。同时, 不同蜜源的纯正蜂蜜样本在 PCA 空间中存在部分重叠, 反映了其本底化学组成固有的差异性。

为了更有效地放大组间差异并减小组内变异的影响, 进一步采用了有监督的正交偏最小二乘-判别分析 (OPLS-DA)。OPLS-DA 模型能够清晰地将纯正蜂蜜组与掺假蜂蜜组完全分离, 该模型参数良好, 其中  $R^2 X = 0.512$ , 代表模型对 X 矩阵的解释率;  $R^2 Y = 0.981$ , 代表模型对 Y 矩阵的解释率;  $Q^2 = 0.932$ , 代表模型的预测能力。此外, 通过 200 次响应置换检验验证, 模型未出现过拟合, 证明所建立的 OPLS-DA 模型稳定且具有很强的预测能力, 能有效区分纯正蜂蜜与掺假蜂蜜。

#### 3.2 差异性标志物的筛选与鉴定

通过 OPLS-DA 模型的 VIP 值 ( $VIP > 1.5$ ) 并结合 t 检验 ( $p < 0.05$ ), 从数千个代谢特征中筛选出 15 个在纯正蜂蜜与掺假蜂蜜间存在显著差异的化合物。这些标志物可归为以下几类:

外源糖浆引入的标志物: 在大米糖浆掺假样本中, 检测到多种麦芽糖寡糖 (如麦芽三糖、麦芽四糖的特定异构体) 含量显著升高, 这些是淀粉糖浆的特征性成分。在甜菜糖浆掺假样本中, 海藻糖和棉

子糖含量显著上调, 这与甜菜糖的组成特征相符。

蜂蜜特征性成分: 在掺假样本中, 一些源自花粉和花蜜的特征性成分含量显著降低, 包括特定的酚酸 (如咖啡酸、阿魏酸) 和黄酮类化合物 (如槲皮素、山奈酚的糖苷衍生物)。这些物质的稀释效应是掺假导致蜂蜜品质下降的直接证据。

氨基酸与小分子有机酸: 脯氨酸是蜂蜜中最重要的游离氨基酸, 其含量在掺假蜂蜜中显著降低。此外, 一些参与糖代谢的小分子有机酸 (如柠檬酸、葡萄糖酸) 的含量也发生了变化。

#### 3.3 鉴别模型的建立与验证

差异性标志物的峰面积为变量, 采用偏最小二乘-判别分析 (PLS-DA) 构建分类模型。将样本集的 70% 作为训练集, 30% 作为验证集。模型对训练集的分类准确率为 100%。对验证集进行分类预测, 其总体鉴别准确率高达 98.5%, 仅有一个低比例 (10%) 掺假样本被误判, 证明了该模型具有优异的鲁棒性和预测能力。

### 4 讨论

本研究成功将 LC-Q-TOF-MS 非靶向筛查技术与化学计量学相结合, 用于蜂蜜掺假鉴别。结果表明, 该方法不仅能有效区分纯正与掺假蜂蜜, 还能通过差异性标志物提示可能的掺假物来源 (如大米或甜菜), 这是传统靶向方法无法实现的。

非靶向筛查的优势在于其“全景式”分析能力。它不依赖于任何先验知识, 能够同时检测到已知和未知的掺假标志物, 这对于应对不断出现的“新型”或“隐形”掺假物 (如经特殊处理的糖浆) 至关重要<sup>[7]</sup>。本研究筛选出的麦芽寡糖异构体和甜菜来源的稀有糖, 正是这种能力的体现。

然而, 该方法也面临挑战。一是数据库的完备性, 许多植物源性化合物的二级质谱图尚未被收录, 给鉴定工作带来困难。二是仪器成本较高, 操作复杂, 对分析人员的技术要求高。未来研究可聚焦于扩大样本库, 建立更全面的蜂蜜化学数据库, 并探索将非靶向筛查发现的关键标志物转化为低成本、快速检测的靶向方法, 以促进其在实际监管中的应用。

### 5 结论

本研究建立了一种基于 LC-Q-TOF-MS 的非靶向代谢组学方法, 并结合多元统计分析, 成功用于

蜂蜜中 C3 植物糖浆掺假的鉴别。该方法能够清晰区分纯正蜂蜜与掺假蜂蜜, 准确率高达 98.5%, 并筛选出 15 个关键化-学标志物。该技术为蜂蜜真实性控制提供了一种高效、准确、全面的解决方案, 具有重要的理论价值和广阔的应用前景。

### 参考文献

- [1] Codex Alimentarius Commission. CODEX STAN 12-1981 Standard for Honey[S]. 1981.
- [2] ZHU Y, LI C, CUI H, et al. Adulteration detection of commercial honey using gas chromatography-mass spectrometry-based metabolomics[J]. Food Chemistry, 2023, 405(P A): 134758.
- [3] SIDDIQUEE S, RASHID R, SUN C, et al. Recent advances in the detection of honey adulteration: A review[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2023, 22(2): 1292-1323.
- [4] DONER L W. The sugars of honey—a review[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1977, 28(5): 443-456.
- [5] ZHAO H, WANG X, ZHANG J, et al. Identification of rice syrup adulteration in honey using ultra-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2016, 30(1): 149-155.
- [6] CUADROS-RODRÍGUEZ L, RUIZ-SAMBLÁS C, VALVERDE-SOM L, et al. Chromatographic fingerprinting: An innovative approach for food 'identification' and food authentication – A tutorial[J]. Analytica Chimica Acta, 2016, 909: 9-23.
- [7] CUEVAS F J, MORENO-ROJAS J M, RUPÉREZ F J. Authentication of bee pollen grains in bright-field microscopy by combining one-class classification techniques and image processing[J]. Microchemical Journal, 2022, 177: 107299.
- [8] TAUTENHAHN R, PATTON G, ROLFUSSEN D, et al. XCMS Online: A web-based platform to process untargeted metabolomic data[J]. Analytical Chemistry, 2012, 84(11): 5035-5039.

版权声明: ©2025 作者与开放获取期刊研究中心(OAJRC)所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



OPEN ACCESS