

蜂蜜还原能力的电化学传感器检测

汤明杰¹, 蔡健荣^{1*}, 吴小娟¹, 吕强²

(1. 江苏大学食品与生物工程学院, 镇江 212013; 2. 河南工业大学信息科学与工程学院, 郑州 450001)

摘要: 为了实现蜂蜜抗氧化物还原能力的快速检测, 该文提出了一种用电化学传感器来检测 3 种不同蜜源蜂蜜的还原能力的新方法。试验采用循环伏安法采集蜂蜜样本的电化学响应信号, 提取 12 个特征值进行归一化预处理, 然后利用偏最小二乘法 (PLS) 建立模型进行检测。校正集的相关系数 r 和交互验证均方根误差 ($RMSECV$) 分别为 0.9425 和 0.0433; 预测集的相关系数 r 和预测均方根误差 ($RMSEP$) 分别为 0.9392 和 0.0417。研究结果表明, 电化学传感器结合偏最小二乘法检测蜂蜜的还原能力的思路是可行的。

关键词: 电化学传感器, 农产品, 模型, 蜂蜜, 还原能力, 偏最小二乘法

doi: 10.3969/j.issn.1002-6819.2011.02.062

中图分类号: TS207.3, TP212.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2011)-02-0366-04

汤明杰, 蔡健荣, 吴小娟, 等. 蜂蜜还原能力的电化学传感器检测[J]. 农业工程学报, 2011, 27(2): 366-369.

Tang Mingjie, Cai Jianrong, Wu Xiaojuan, et al. Determination of reducing power of honey by electrochemical sensor[J].

Transactions of the CSAE, 2011, 27(2): 366-369. (in Chinese with English abstract)

0 引言

蜂蜜具有多种生物学活性物质。蜂蜜的品质由蜜源种类及其化学组成决定。研究发现, 蜂蜜中含有源于蜜源植物的微量抗氧化成分, 有较好的抗菌、抗衰老作用。这些成分不仅是蜂蜜起保健作用的主要活性物质, 也可作为评价蜂蜜内在品质、鉴定蜂蜜真伪的重要指标。

蜂蜜中主要的抗氧化成分有黄酮类和酚酸类化合物等。由于蜂蜜的蜜源植物不同, 蜂蜜中抗氧化成分的种类和含量也有所不同, 其特征成分存在很大的差异^[1-4]。抗氧化剂是一种具有阻止或延缓氧化进程的活性物质, 在体内清除氧自由基的过程与在电极上发生的氧化还原过程类似, 通过电子转移来实现, 抗氧化活性实质上是一种电化学性质^[5]。

目前, 蜂蜜品质的测定方法有气相色谱/质谱 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) 联用法^[6]、核磁共振法^[7]、高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测法 (high-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection, HPAEC-PAD)^[8]和 ¹³C/¹²C 比率分析法^[9]、液相色谱技术^[10-11]等。然而, 这些方法涉及复杂、费时的样品前处理, 检测仪器昂贵, 萃取用的有机溶剂还会造成环境污染, 因而不便于日常分析。

近年来, 电化学技术由于其高效、快速、灵敏度高等特点, 得到了迅速的发展。采用电化学技术研究不同

蜜源蜂蜜中的微量抗氧化成分, 可以有效地评价不同蜜源植物来源的蜂蜜的抗氧化活性, 评价抗氧化活性的方法之一就是还原能力的测定。Yen 和 Siddhuraju P 认为抗氧化剂的还原能力与其抗氧化活性之间存在联系。还原能力越强, 抗氧化活性越强。因此, 可以通过测定还原能力来说明抗氧化活性的大小^[12-13]。目前关于采用电化学方法检测蜂蜜品质的研究尚无文献报道。

为了使建立的检测方法具有普遍适用性, 试验选用了 3 种蜜源的蜂蜜样本, 采用循环伏安法初步分析了蜂蜜在玻碳电极上的电化学响应信号, 提取特征变量, 利用偏最小二乘法建模, 快速检测不同蜜源蜂蜜的还原能力。为快速检测具有抗氧化活性物质的还原能力提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验选用 3 种蜜源的蜂蜜, 在 25 mL 电解杯中分别加入 1.5~6.5 g 的蜂蜜, 加入 15 mL 二次蒸馏水搅拌均匀, 移取 1 mL 溶液用于还原能力的测定, 其余用于电化学检测。共制得浓度不等的 156 个样本。样本构成如表 1 所示, 校正集 105 个, 其中枸杞蜜、荆条蜜、山楂蜜各 35 个, 预测集 51 个, 其中枸杞蜜、荆条蜜、山楂蜜各 17 个 (均购于江苏省镇江市胡老三蜜坊)。

表 1 试验样本的组成

Table 1 Compositions of test samples

品 种	校正集	预测集
枸杞蜜	35	17
荆条蜜	35	17
山楂蜜	35	17

1.2 电化学检测

试验使用电化学工作站 (CHI 660D, 上海辰华仪器公司), 电位范围: -0.1~0.8 V, 扫描速度: 0.1 V/s, 灵

收稿日期: 2010-09-06 修订日期: 2010-11-18

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30771243)

作者简介: 汤明杰 (1985—), 女, 河北唐山人, 主要从事农产品无损检测技术研究。镇江 江苏大学 (本部) 食品与生物工程学院, 212013。

Email: tangmingjie0917@gmail.com

*通信作者: 蔡健荣 (1966—), 男, 上海人, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事农产品无损检测技术、收获机器人技术研究。镇江 江苏大学 (本部) 食品与生物工程学院, 212013。Email: jrcai@ujs.edu.cn

灵敏度： $1e-6$ A/V，采样间隔： 0.001 V。玻碳电极(直径 3 mm)为工作电极，铂电极为对电极，饱和甘汞电极为参比电极。将玻碳电极在金相砂纸上打磨，依次在 1.0、0.3、 $0.05 \mu\text{m}$ 的 Al_2O_3 悬浊液上抛光成镜面；再依次在二次蒸馏水、1 mol/L 盐酸、无水乙醇、二次蒸馏水中分别超声洗涤 5 min。试验室环境温度控制 20°C 左右进行。测得 3 种蜂蜜样本的循环伏安图如图 1 所示，对每个样本先负向扫描得到还原信号(上面曲线)，再正向扫描得到氧化曲线(下面曲线)。

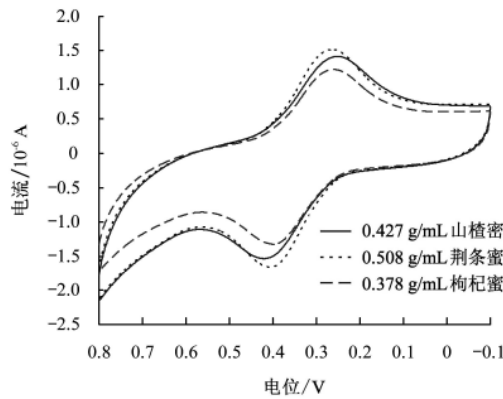


图 1 蜂蜜样本的循环伏安图

Fig.1 Cyclic voltammogram of honey samples

1.3 蜂蜜中抗氧化成分还原能力的测定

试验采用 Oyaizu 方法^[14]测定蜂蜜的还原能力。取 1 mL 溶液加入 10 mL 试管中，再依次加入磷酸盐缓冲溶

液 (0.2 mol/L , pH 值 6.6) 2.5 mL 和质量分数为 1% 铁氰化钾 2.5 mL，摇匀，置于 50°C 水浴中反应 20 min，然后加入质量分数为 10% 的三氯化乙酸 2.5 mL，摇匀。吸取上清液 2.5 mL，加入 2.5 mL 蒸馏水和 0.25 mL 质量分数为 0.1% 的三氯化铁溶液。样品在 700 nm 波长处使用紫外可见分光光度计 (UV1601, 北京瑞利公司) 测定吸光度。反应物的吸光度增加表明还原能力增强^[14]。通过测定蜂蜜对 Fe^{3+} 的还原能力来评价其抗氧化性的强弱。还原能力越强，抗氧化性越强^[14]。不同质量浓度蜂蜜的还原能力(吸光度)如图 2 所示。试验样本的还原能力统计分析见表 2。

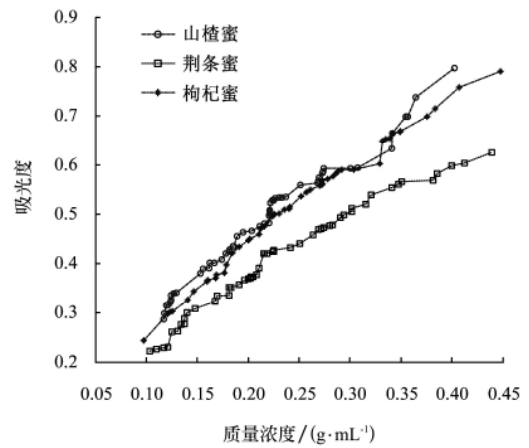


图 2 不同质量浓度蜂蜜的还原能力

Fig.2 Reducing power of honey of different concentrations

表 2 蜂蜜样本的还原能力实测值的统计表

Table 2 Statistic of honey reducing power

蜜源	样本数	还原能力 (吸光度 $A_{700 \text{ nm}}$)				变异系数/ %	
		平均值	最大值	最小值	标准偏差		
校正集	枸杞	35	0.4916	0.797	0.287	0.1230	25.0091
	荆条	35	0.4161	0.626	0.222	0.1122	26.9572
	山楂	35	0.5219	0.790	0.244	0.1342	25.7103
	枸杞+荆条+山楂	105	0.4765	0.797	0.222	0.1301	27.3096
预测集	枸杞	17	0.4816	0.699	0.299	0.1123	23.3214
	荆条	17	0.4093	0.598	0.226	0.1088	26.5768
	山楂	17	0.5131	0.758	0.298	0.1264	24.6533
	枸杞+荆条+山楂	51	0.4680	0.758	0.226	0.1219	26.0549

1.4 数据预处理

根据试验所得到的 3 种不同蜜源的蜂蜜样本循环伏安图的信息差异，并充分考虑各种参数之间的独立性，选取了 12 个参数作为模型建立的特征变量，特征变量的详细信息见表 3。

为了消除各特征值间幅值的差异，首先对建模输入变量的原始数据进行归一化处理，归一化后的数据具有零均值和单位方差。

1.5 偏最小二乘 (partial least square, PLS) 建模

PLS 是 1983 年由 S.Wold 和 C.Albano 等人首先提出，它是将因子分析和回归分析结合的多元数据处理方法^[15]。PLS 通过因子分析将数据压缩为较低维的空间数据。

表 3 特征变量的选取和表述

Table 3 Selection and expression of characteristic variables

变量序号	特征参数	变量序号	特征参数
X1	氧化峰电位值	X7	还原峰电位值
X2	氧化峰电流值	X8	还原峰电流值
X3	氧化峰半峰电位值	X9	还原峰半峰电位值
X4	氧化峰半峰电流值	X10	还原峰半峰电流值
X5	氧化峰电流差值	X11	还原峰电流差值
X6	氧化峰面积	X12	还原峰面积

它是在自变量 X 中提取主成分 t ，同时在因变量 Y 中提取主成分 u ，分别进行 X 对 t 的回归和 Y 对 u 的回归，并且考虑了 t 对 Y 的最大相关性。PLS 最大程度上提取了对因

变量解释的自变量成分，同时很好地解决了多重相关性的问题。

试验采用不同蜜源的校正集样本建模预测同种蜂蜜预测集样本的还原能力。再将 3 种蜜源样本混合在一起作为第 4 组样本（枸杞+荆条+山楂），建立模型。同时将 4 个模型对各组样本进行交叉预测，检验各模型对不同蜜源蜂蜜样本的鲁棒性。

2 结果与分析

2.1 3 种蜂蜜还原能力测定结果

由图 2 可知，随着蜂蜜浓度的增大，各不同蜜源蜂蜜的还原能力也依次增强，但不同蜜源蜂蜜的还原能力具有显著性差异 ($p < 0.05$)。3 种蜜源蜂蜜样本的还原能力的大小顺序依次为山楂蜜 > 枸杞蜜 > 荆条蜜。

2.2 偏最小二乘 (PLS) 建模

蜂蜜的电化学信号数据经归一化预处理后，用 12 个特征变量与蜂蜜的还原能力进行 PLS 建模。当 PLS 主因子数为 8 时，所有样本（枸杞+荆条+山楂）模型的交互验证均方根误差 (root mean square error of cross-validation, RMSECV) 达到最小 (见图 3)。校正集还原能力预测值与实测值的散点图如图 4a 所示，相关系数 r (correlation

coefficient) 和 $RMSECV$ 分别为 0.9425 和 0.0433。预测集还原能力预测值与实测值的散点图如图 4b 所示，相关系数 r 和预测均方根误差 $RMSEP$ (root mean square error of prediction) 分别为 0.9392 和 0.0417。模型具有很好的预测能力。

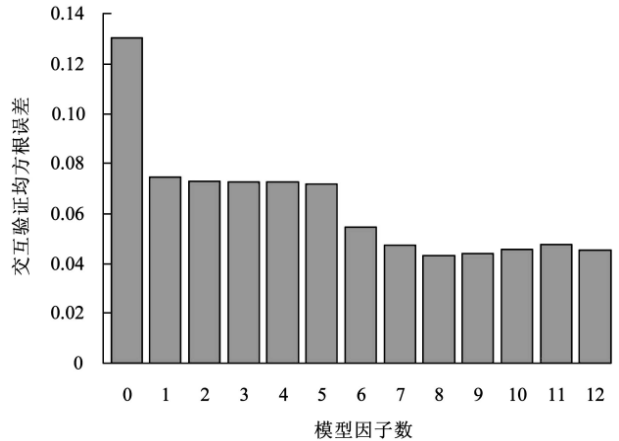
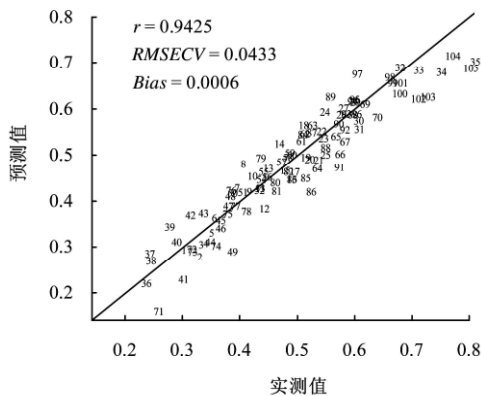
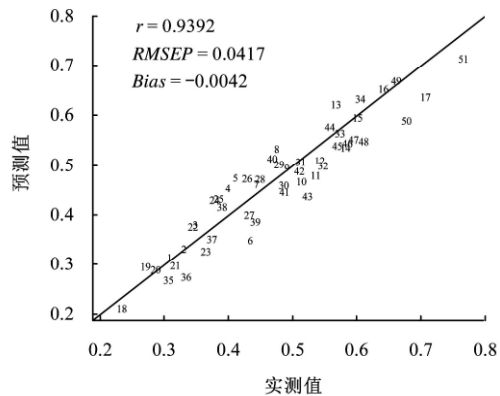


图 3 校正集均方根误差随偏最小二乘 PLS 主因子数变化情况
Fig.3 Root mean square error of cross-validation (RMSECV) vs. partial least square (PLS) components for calibration set



a. 校正集



b. 预测集

图 4 校正集和预测集 PLS 模型还原能力预测值与实测值的散点图
Fig.4 Predicted vs. actual in calibration model and prediction model

2.3 模型交叉验证

表 4 列出了不同蜜源蜂蜜的 PLS 模型交叉验证的结果，即采用 3 种蜜源蜂蜜和所有试验样本（枸杞+荆条+山楂）建立的 4 个 PLS 校正模型分别预测相应蜜源和其他蜜源蜂蜜的还原能力。从统计结果可以看出：不同蜜源蜂蜜的 PLS 模型能够很好的预测相应蜜源蜂蜜的还原

能力，说明利用电化学传感器技术检测蜂蜜的还原能力具有可行性；所有试验样本（枸杞+荆条+山楂）建立的 PLS 模型能够针对不同蜜源的蜂蜜有效地预测其还原能力，相关系数 r 分别为 0.9073, 0.9550 和 0.9575，说明所有试验样本建立的模型涵盖蜂蜜还原能力的信息；不同蜜源蜂蜜建立的 PLS 模型交叉验证其他蜜源蜂蜜还原能

表 4 不同蜜源蜂蜜的偏最小二乘 (PLS) 模型交叉验证

Table 4 Cross-validation of PLS calibration model of different nectariferous honey

模型	枸杞蜜		山楂蜜		荆条蜜		枸杞蜜+荆条蜜+山楂蜜	
	r	$RMSEP$	r	$RMSEP$	r	$RMSEP$	r	$RMSEP$
枸杞蜜	0.9283	0.0411	0.9356	0.0584	0.9515	0.0371	0.9279	0.0465
山楂蜜	0.8615	0.0690	0.9129	0.0548	0.9453	0.0495	0.8915	0.0584
荆条蜜	0.9459	0.0379	0.9573	0.1283	0.9726	0.0257	0.8333	0.0786
枸杞蜜+荆条蜜+山楂蜜	0.9073	0.0460	0.9550	0.0451	0.9575	0.0327	0.9392	0.0417

力时, 有些模型预测效果略差。例如, 山楂蜜建立的模型在预测枸杞蜜 ($r=0.8615$) 时, 荆条蜜建立的模型在预测 3 种蜜源蜂蜜样本 ($r=0.8333$) 时预测效果不理想 (见表 4), 可能是由于不同蜜源蜂蜜的抗氧化成分的种类和含量有所不同, 模型中反应蜂蜜还原能力的信息存在差异。

3 结 论

研究利用电化学传感器技术, 采集并分析枸杞、荆条和山楂 3 种蜜源蜂蜜的电化学响应信号, 在不同蜜源的蜂蜜循环伏安图上提取的 12 个特征, 归一化处理后进行 PLS 建模, 预测集相关系数 r 和预测均方根误差 $RMSEP$ 分别为 0.9392 和 0.0417。模型具有很好的鲁棒性。研究结果表明, 电化学传感器结合偏最小二乘法检测蜂蜜的还原能力的思路是可行的。

[参 考 文 献]

- [1] Yao L H, Datta N, Tomá S-Barberá F A, et al. Flavonoids, phenolic acids and abscisic acid in Australian and New Zealand *Leptospermum* honeys[J]. *Food Chemistry*, 2003, 81(2): 159—168.
- [2] Yao L H, Jiang Y M, Singanusong R, et al. Phenolic acids and abscisic acid in Australian *Eucalyptus* honeys and their potential for floral authentication[J]. *Food Chemistry*, 2004, 86(2): 169—177.
- [3] Kenjeric D, Mandić M L, Primorac L, et al. Flavonoid profile of *Robinia* honeys produced in Croatia[J]. *Food Chemistry*, 2007, 102(3): 683—690.
- [4] Ferreres F, Tomas-Barberan F A. An HPLC technique for flavonoid analysis in honey[J]. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 1991, 56(1): 49—56.
- [5] 何建波, 徐红梅, 朱燕舞, 等. 电化学方法研究天然抗氧化剂[J]. *化学与生物工程*, 2004(5): 10—12.
- [6] Montilla A, Ruiz-Matute A I, Sanz M L, et al. Diffructose anhydrides as quality markers of honey and coffee[J]. *Food Research International*, 2006, 39(7): 801—806.
- [7] Martin G J, Martin M L. Deuterium labeling at the natural abundance level as studied by high field quantitative ^2H NMR[J]. *Tetrahedron Letters*, 1981, 22(36): 3525—3528.
- [8] Cordella C, Militao J S L T, Clément M C, et al. Detection and quantification of honey adulteration via direct incorporation of sugar syrups or bee-feeding: preliminary study using high-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) and chemometrics[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 531(2): 239—248.
- [9] Padovana G J, De Jongh D, Rodrigues L P, et al. Detection of adulteration of commercial honey samples by the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotopic ratio[J]. *Food Chemistry*, 2003, 82(4): 633—636.
- [10] Swallow K W, Low N H. Analysis and quantitation of the carbohydrates in honey using high-performance liquid chromatography[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1990, 38(9): 1828—1832.
- [11] Cabanero A I, Recio J L, Rupérez M. Liquid chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry: A new perspective on honey adulteration detection[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(26): 9719—9727.
- [12] Yen G C, Duh P D, Tsai C L. Relationship between antioxidant activity and maturity of peanut hulls[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1993, 41(1): 67—70.
- [13] Siddhuraju P, Mohan P S, Becker K. Studies on the antioxidant activity of Indian Laburnum (*Cassia fistula* L.): a preliminary assessment of crude extracts from stem bark, leaves, flowers and fruit pulp[J]. *Food Chemistry*, 2002, 79(1): 61—67.
- [14] Oyaizu M. Studies on products of browning reactions: antioxidant activities of products of browning reaction prepared from glucose amine[J]. *Japanese Journal of Nutrition*, 1986, 44(6): 307—315.
- [15] 许禄, 邵学广. 化学计量学方法[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 2004: 163—176.

Determination of reducing power of honey by electrochemical sensor

Tang Mingjie¹, Cai Jianrong^{1*}, Wu Xiaojuan¹, Lü Qiang²

(1. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China;

2. School of Information Science and Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: In order to realize rapid detection of reducing power of the antioxidants in the honey, the new approach was proposed to predict reducing power of three kinds of different nectariferous honey by electrochemical sensor in this work. Twelve features were extracted from electrochemical signal using cyclic voltammetry and preprocessed by normalization. Partial least square (PLS) model was employed to discriminate reducing power of honey. Experimental results indicated that the optimal model was achieved with $r = 0.9425$ and $RMSECV = 0.0433$ in calibration set; and $r = 0.9392$ and $RMSEP = 0.0417$ in prediction set. This work shows that electrochemical sensor combined with PLS has a significant potential in detection of reducing power of honey.

Key words: electrochemical sensors, agricultural products, models, honey, reducing power, partial least square