

تشخیص و طبقه‌بندی عسل‌های طبیعی و تقلبی با تجزیه‌های آماری چند متغیره

صابر امیری^۱، محسن اسمعیلی^{۲*}، محمد عزیزاده خالد آباد^۱ و سمانه امیری^۱

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۱/۱۲

تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۰/۱۷

^۱ دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه

^۲ دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه ارومیه

*مسئول مکاتبات: esmailim@yahoo.ie

چکیده

عسل یک ماده غذایی طبیعی با ارزش تغذیه‌ای بالا و خواص مفید دارویی فراوان است. اجزای اصلی عسل کربوهیدرات‌های ساده و آب هست و به همین دلیل انجام تقلب در عسل با افزودن شربت‌های قندی ارزان قیمت به صورت تجاری متداول است. چنین عملی یک نگرانی مهم در کنترل کیفیت این محصول می‌باشد. در این مطالعه، تشخیص عسل‌های طبیعی خالص از عسل‌های تقلبی حاصل از غلظت‌های ۷، ۱۵ و ۳۰ درصد شربت قند اینورت و قند خرما به طور مجزا مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور از تجزیه‌های آماری چند متغیره‌ی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی عسل استفاده شد. با بکاربردن تجزیه مؤلفه‌های اصلی (Principal component analysis)، از میان ۱۲ پارامتر فیزیکی و شیمیایی اندازه‌گیری شده، نه پارامتر برای مؤلفه‌های اصلی بکار گرفته شد. سپس با تحلیل ممیزی خطی (Linear discriminant analysis) و بر اساس این نه پارامتر، نمونه‌های عسل خالص و تقلبی در سه گروه طبقه‌بندی شدند. بهترین طبقه‌بندی با ۹۱/۱۵ درصدی طبقه‌بندی صحیح با استفاده از سه ویژگی pH، اسیدیته آزاد و خاکستر به دست آمد. طبقه‌بندی صحیح ۸۵/۸۴ درصدی با سه پارامتر هدایت الکتریکی، قندهای احیاء کننده و رطوبت و ۸۲/۳۰ درصدی با سه پارامتر HMF، قند کل و نسبت فروکتوز به گلوکز حاصل گردید. نتایج حاکی از آن است که تجزیه‌های چند متغیره در ترکیب با تجزیه روتین می‌تواند در تشخیص سریع و آسان تقلب در عسل استفاده شود.

واژگان کلیدی: تجزیه آماری چند متغیره، شناسایی، عسل‌های طبیعی و تقلبی، طبقه‌بندی

مقدمه

وجود دارد. علاوه بر این، عسل حاوی مقادیر اندکی از سایر ترکیبات مانند پروتئین‌ها، آمینو اسیدها، آنزیم‌ها، اسیدهای آلی، لیپیدها، ویتامین‌ها، ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها، کاروتنوئیدها و مواد معدنی می‌باشد (پارادکار و ایرودایاراج ۲۰۰۱، قیصری و همکاران ۲۰۰۹). عسل طبیعی به دلیل ارزش تغذیه‌ای فوق‌العاده و

عسل محصولی ویسکوز و معطر است که توسط زنبور عسل و عمدتاً از شهد گل‌ها یا عسلک تهیه می‌شود (لازاریدوا و همکاران ۲۰۰۴). این محصول، به طور عمده یک محلول فوق اشباعی از فروکتوز و گلوکز بوده و مقدار کمی از سایر قندها مانند مالتوز و ساکارز در آن

برای مصرف‌کنندگان اهمیت روزافزونی پیدا کرده است. علاوه بر این، تقلب برای تولید کنندگان مواد غذایی به دو دلیل رقابت ناعادلانه با افراد سودجو که جهت به دست آوردن درآمد بیشتر مبادرت به این امر می‌کنند و تأثیر منفی در افزایش فروش به دلیل آسیب وارد کردن به اعتماد مصرف‌کننده، بسیار مهم می‌باشد (پارادکار و ایرودایاراج ۲۰۰۱، کابانرو و همکاران ۲۰۰۶).

تضمین ایمنی مواد غذایی و تشخیص محصولات تقلبی معمولاً با استفاده از روش‌های آزمایشگاهی پیچیده جهت اندازه‌گیری ترکیب‌های شیمیایی و یا خواص فیزیکی معین محصول انجام می‌گیرد. غذاهای طبیعی عمدتاً یا منحصرأ از مواد بیولوژیکی تشکیل شده است و ترکیب آن‌ها بسته به تنوع، گونه، منشأ جغرافیایی، سال تولید و فرآیند تولید استفاده شده متفاوت است. این پیچیدگی ماتریس مواد غذایی باعث می‌شود که وظیفه شناسایی محصولات تقلبی کاری سخت و دشوار باشد. از سوی دیگر باید ماده بکار برده شده برای تقلب را که از لحاظ ترکیب تقریباً مشابه ترکیب شیمیایی ماده غذایی می‌باشد شناسایی کرد. تعیین نسبت مابین برخی از ترکیبات شیمیایی و فرض این که این نسبت‌ها یک مؤلفه ثابت در یک ماده غذایی خاص است یکی از راه‌های تشخیص تقلبات است. بر اساس این فرض، افزودن هرگونه ماده یا مواد دیگر به مواد غذایی مقدار این نسبت‌ها را تغییر خواهد داد و یک تغییر غیرمعمول برجسته را در ترکیب شیمیایی آن ایجاد خواهد کرد. این رویکرد اغلب با مجموعه وسیعی از تجزیه داده‌ها و همچنین استفاده از تجزیه آماری چند متغیره همراه است که می‌تواند از روش‌های طبقه‌بندی صفات برای مقایسه شباهت‌ها و تفاوت‌های داده‌های نمونه و داده‌های اصلی استفاده کند (کوردلا و همکاران ۲۰۰۳، کوردلا و همکاران ۲۰۰۲). تجزیه آماری چند متغیره تمامی اثرات متقابل پیچیده مابین اجزاء حل شده و اثرات ترکیبی آن‌ها را در کل ماتریس در نظر گرفته و موجب می‌شود نمونه از تمام جنبه‌ها بررسی شود. کاربرد تشخیص الگوی

همچنین خواص سلامت بخشی فراوان یکی از محصولات اقتصادی بسیار با ارزش در تمام نقاط جهان محسوب می‌گردد (کابانرو و همکاران ۲۰۰۶، مانزانارس و همکاران ۲۰۱۱). این محصول بسیار مغذی و پُر انرژی بوده و دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی و پری‌بیوتیکی می‌باشد که علاوه بر مصرف مستقیم در برنامه غذایی روزانه، به عنوان شیرین کننده و نگهدارنده کاربرد وسیعی در صنایع غذایی دارد (کوردلا و کوزولینو ۲۰۰۶، گومز و همکاران ۲۰۱۰، گوا و همکاران ۲۰۱۱). عسل به سبب دارا بودن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، مورد علاقه‌ی مصرف‌کنندگانی است که توجه زیادی در استفاده از مواد غذایی طبیعی حاوی آنتی‌اکسیدان‌ها در رژیم غذایی خود دارند (ساکسنا و همکاران ۲۰۱۰).

از گذشته تقلب در تجارت مواد غذایی، بویژه در مواد غذایی با ارزش بالا و گران قیمت، معمولاً با انگیزه سود بیشتر رایج بوده است (کوردلا و همکاران ۲۰۰۳). از جمله روش‌های تقلب در مواد غذایی می‌توان به اختلاط مواد ارزان قیمت که از نظر ترکیب شیمیایی یا حتی ظاهری مشابه با ماده غذایی اصلی است اشاره کرد (پارادکار و ایرودایاراج ۲۰۰۱). بر اساس استانداردهای بین‌المللی عسل خالص طبیعی محصولی است که هیچ ماده دیگری مانند افزودنی‌های غذایی به آن اضافه نشود (کلی و همکاران ۲۰۰۶). ارزش اقتصادی و قیمت بالای عسل خالص در مقایسه با سایر شیرین کننده‌های مورد استفاده در صنایع غذایی (مانند شربت نرت با فروکتوز بالا، شربت اینولین با فروکتوز بالا، قند اینورت و شربت نرت) باعث شده این محصول هدف اختلاط با محلول‌های غلیظ قندی مشابه و ارزان قیمت قرار گیرد (پارادکار و ایرودایاراج ۲۰۰۱، سیواکساوا و همکاران ۲۰۰۲، گالاردو-ولازکوئز و همکاران ۲۰۰۹). تقلب در عسل با مواد قندی ارزان قیمت یک نگرانی بسیار مهم در تضمین کیفیت این محصول برای دستگاه‌های نظارتی می‌باشد زیرا با افزایش آگاهی عمومی در مورد ایمنی مواد غذایی، تهیه غذای سالم و عاری از مواد خارجی

کنترل شده در آزمایشگاه نگهداری شدند. آماده‌سازی نمونه‌ها براساس روش AOAC 920.180 انجام گرفت (AOAC, 1995).

اندازه گیری اسیدیته آزاد و pH

pH و درصد اسیدیته عسل با کمک دستگاه pH متر و روش تیتراسیون معکوس اندازه‌گیری شد (مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران ۱۳۸۶).

آزمون خاکستر

درصد خاکستر عسل با استفاده از کوره در دمای ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد تعیین شد (AOAC 920.181, 1995).

آزمون دیاستاز

۱۰ گرم نمونه عسل را بدون گرم کردن در یک بشر ۵۰ میلی‌لیتری وزن کرده و با حدود ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر کاملاً حل کرده و ۵ میلی‌لیتر بافر استات به آن اضافه شد. سپس محلول عسل حاصله به بالن ژوژه ۵۰ میلی‌لیتری محتوی ۳ میلی‌لیتر محلول کلور سدیم منتقل و به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسید. جهت انجام آزمون ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه آماده شده در بالن ژوژه ۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد، سپس در یک بالن دیگر ۱۰ میلی‌لیتر محلول نشاسته ریخته و هر دو در حمام آب ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از ۱۵ دقیقه ۵ میلی‌لیتر از محلول نشاسته به داخل محلول عسل اضافه شد و مخلوط گردید. پس از ۵ دقیقه، در فواصل زمانی معین (باتوجه به جدول شماره ۶ استاندارد شماره ۹۲، فواصل زمانی باید طوری تنظیم گردد که ۳ رقم جذب در محدوده ۰/۴۵۶ و ۰/۱۵۵ نانومتر بدست آید) ۰/۵ میلی‌لیتر از آن را به سرعت به ۵ میلی‌لیتر از محلول ید رقیق اضافه کرده و بعد از افزودن مقدار آب تعیین شده در استاندارد کردن محلول نشاسته، بلافاصله جذب محلول در ۶۶۰ نانومتر همراه با شاهد آب مقطر در سل یک سانتی‌متری اندازه‌گیری شد (مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران ۱۳۸۶). در نهایت فعالیت دیاستازی بر حسب عدد دیاستازی (DN)^۸ با استفاده از فرمول ذیل محاسبه شد:

نظارتی^۱ و تکنیک‌های آماری چند متغیره مانند تجزیه مؤلفه‌های اصلی و یا تحلیل ممیزی (تجزیه تابع تشخیص)^۲ احتمال تجزیه و تحلیل کل ماتریس نمونه غذایی را فراهم نموده و طبقه‌بندی را ممکن می‌سازد (کوربلا و کوزولینو ۲۰۰۶).

اغلب روش‌های دستگاهی نظیر روش ایزوتوپی، کروماتوگرافی، رزونانس مغناطیس هسته‌ای و طیف سنجی که در شناسایی تقلبات عسل استفاده شده‌اند اکثراً زمان‌بر و بسیار پرهزینه بوده و نیازمند تخصص هستند. بنابراین، نیاز به تعیین روش‌های آنالیزی سریع، کم هزینه و آسان برای شناسایی و تشخیص تقلبات عسل در آزمایشگاه‌های معمولی ضروری به نظر می‌رسد. در این پژوهش به منظور دستیابی به مناسب‌ترین روش تشخیص عسل طبیعی از تقلبی با اندازه‌گیری خواص فیزیکی شیمیایی متداول، تجزیه آماری چند متغیره با PCA^۳ و LDA^۴ استفاده شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های عسل طبیعی و تقلبی

در این پژوهش در مجموع ۱۱۳ نمونه عسل طبیعی و تقلبی مورد مطالعه قرار گرفت. ۱۱ نمونه عسل خالص طبیعی مایع دسته اول (PH)^۵، جداشده از شان، که از کارخانه فرآوری عسل، کارگاه‌های فرآوری عسل، بازار و زنبورداران شهرستان ارومیه خریداری شد. سپس ۵۱ نمونه عسل تقلبی با افزودن قند اینورت بعنوان دسته دوم (AHI)^۶ و نیز ۵۱ نمونه عسل تقلبی با افزودن قند خرما بعنوان دسته سوم (AHD)^۷، و هر دو دسته با تعداد یکسان در غلظت‌های ۷، ۱۵ و ۳۰ درصد، جهت مطالعه آماده شد. نمونه‌ها در ظروف شیشه‌ای و دمای

¹ Supervised pattern recognition

² Discriminant analysis

³ Principal component analysis

⁴ Linear discriminant analysis

⁵ Pure honey

⁶ Adulterated honey by invert sugar syrup

⁷ Adulterated honey by date sugar syrup

⁸ Diastase Number

ریخته شد. در دو لوله آزمایش ۵ میلی‌لیتر محلول عسل ریخته شد و به یکی از لوله‌ها ۵ میلی‌لیتر آب مقطر (نمونه) و به لوله دیگر ۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۲ درصد متابی‌سولفیت سدیم (شاهد) اضافه شد. جذب محلول‌ها با یک اسپکتروفتومتر UV-Visible در طول موج ۲۸۴ و ۲۳۶ نانومتر تعیین شد و مقدار HMF با استفاده از فرمول ذیل محاسبه گردید:

$$HMF \left(\frac{mg}{Kg} \right) = (A_{284} - A_{336}) \times 149.7 \times 5 \times \left(\frac{D}{W} \right)$$

که در آن D فاکتور رقیق سازی (در صورت نیاز به رقیق سازی محلول‌های نمونه و شاهد با استفاده از محلول ۰/۱ درصد متابی‌سولفیت سدیم) و W وزن نمونه عسل می‌باشد (AOAC 980.23, 1995).

اندازه‌گیری مواد جامد نامحلول

حدود ۱۰ گرم عسل در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به خوبی حل شده و توسط یک صافی شیشه‌ای که قبلاً در آن خشک شده و در دسیکاتور قرار داده شده تا به وزن ثابت برسد صاف گردید. صافی شیشه‌ای در آن ۱۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت حرارت داده شد و پس از سرد شدن در دسیکاتور توزین گردید. تفاوت وزن حاصله با وزن اولیه صافی را بر وزن نمونه تقسیم و در عدد ۱۰۰ ضرب شد تا درصد مواد جامد نامحلول بدست آید (بوگدانف ۲۰۰۰).

تجزیه آماری

در این پژوهش در مجموع ۱۱۳ نمونه مستقل شامل ۱۱ نمونه عسل طبیعی، ۵۱ نمونه عسل تقلبی شده با قند اینورت و ۵۱ نمونه عسل تقلبی شده با قند خرما در ۳ دسته به عنوان حجم نمونه^{۱۰} در نظر گرفته شد. برای هر یک از نمونه‌ها ۱۲ پارامتر فیزیکی-شیمیایی اندازه‌گیری شد و سپس از نظر متغیرهای مختلف کیفی با تجزیه آماری چند متغیره مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. با توجه به هدف پژوهش در تمایز گروه‌ها بر اساس طبیعی و تقلبی بودن و همچنین ماهیت چند متغیره بودن مطالعه، ابتدا به منظور کاهش ابعاد متغیرها و محاسبه

$$DN = \frac{300}{t_x}$$

که در آن t_x زمان واکنش بر حسب دقیقه بوده و با استفاده از معادله رگرسیونی برای جذب ۰/۲۳۵ نانومتر بدست می‌آید.

اندازه‌گیری رطوبت

برای این منظور از دستگاه رفاکتومتر در حرارت ۲۰ درجه سانتی‌گراد استفاده گردید. یک قطره عسل بر روی رفاکتومتر قرار داده شد. سپس با استفاده از جدول مرجع (مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران ۱۳۸۶) از روی اندیس رفاکسیون بدست آمده میزان درصد رطوبت عسل محاسبه شد. پس از بدست آمدن درصد رطوبت، عدد بدست آمده از ۱۰۰ کم گردید تا درصد مواد جامد محلول بدست آید (مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران ۱۳۸۶).

اندازه‌گیری قندها

قندکل و قندهای احیاء کننده با روش Lane-Eynon اندازه‌گیری شد (AOAC 920.183, 1995).

آزمون هدایت الکتریکی

دقیقاً مقدار ۲۰ گرم عسل بدون آب به بالن ژوژه ۱۰۰ میلی‌لیتری منتقل شده و با آب مقطر به حجم رسید. سپس ۴۰ میلی‌لیتر از محلول آماده شده به بشر ۵۰ میلی‌لیتری منتقل شده و با قرار دادن سل هدایت سنج در داخل بشر، هدایت الکتریکی آن در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد (بوگدانف ۲۰۰۰).

آزمون هیدروکسی متیل فورفورال

میزان HMF^۹ براساس روش اسپکتروفتومتری (1979 White) به شرح ذیل تعیین گردید. حدود ۵ گرم عسل در مقداری آب مقطر حل شده و به بالن ژوژه ۵۰ میلی‌لیتری منتقل شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول کاربازیک و ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول کاربازیک دو به آن اضافه شده و پس از همزدن به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسید. محلول با استفاده از کاغذ صافی صاف شده و ۱۰ میلی‌لیتر اول آن دور

¹⁰ Sample size

⁹ Hydroxymethylfurfural

آزاد و محتوای خاکستر می‌باشد در جدول ۱ (الف) نشان داده شده است. در شکل ۱ (الف)، درصد پوشش واریانس کل و همچنین بُردارهای ویژه سه فاکتور pH، اسیدیته آزاد و محتوای خاکستر برای مؤلفه‌های اصلی اول و دوم گروه اول نشان داده شده است.

مقدار ویژه گروه دوم مؤلفه‌های اصلی که براساس سه پارامتر رطوبت، هدایت الکتریکی و قندهای احیاء کننده تعیین شده در جدول ۱ (ب) مشاهده می‌شود. ۹۲/۹۸٪ از واریانس کل توسط دو مؤلفه اصلی اول (۶۱/۱۴٪) و دوم (۳۱/۸۴٪) توجیه می‌شود. بردار ویژه برای هر یک از این سه مؤلفه اصلی که جهت تفکیک براساس پارامترهای رطوبت، هدایت الکتریکی و قندهای احیاء کننده تعیین شده است در جدول ۱ (ب) نشان داده شده است. توانایی مؤلفه‌های اول و دوم گروه دوم در پوشش دادن واریانس کل و همچنین بردارهای ویژه سه پارامتر رطوبت، هدایت الکتریکی و قندهای احیاء کننده برای این دو مؤلفه در شکل ۱ (ب) نمایش داده شده است.

مؤلفه‌های اصلی گروه سوم براساس سه پارامتر HMF، قند کل و نسبت فروکتوز به گلوکز تعیین شده که مقدار ویژه سه مؤلفه اصلی این گروه در جدول ۱ (ج) ارائه شده است. همانطور که مشاهده می‌شود است مؤلفه اصلی اول و دوم در کل ۹۲/۳۲٪ واریانس کل (به ترتیب ۶۵/۳۷٪ و ۲۶/۹۵٪) را پوشش می‌دهند. جدول ۱ (ج) بردار ویژه برای هر یک از این سه مؤلفه اصلی گروه سوم را نشان می‌دهد. شکل ۱ (ج) نمودار دو بعدی است که بُردارهای ویژه پارامترهای HMF، قند کل و نسبت فروکتوز به گلوکز برای دو مؤلفه اول گروه سوم و همچنین توانایی این دو مؤلفه در پوشش دادن واریانس کل را نمایش می‌دهد.

ضرایب مدل‌های امتیاز مؤلفه‌های اصلی از مقدار ویژه^{۱۱} استفاده شد و سپس با روش تحلیل ممیزی خطی درصد دسته‌بندی نادرست (Misclassified) برای هر مدل جداسازی تعیین شد. در این روش ماتریس‌های مرکز، واریانس و کوواریانس هر کدام از گروه‌ها محاسبه شده و سپس با روش فاصله اقلیدوسی و فاصله‌ی ماهالانوبیس^{۱۲} فاصله تک تک نمونه‌ها از مرکز گروه‌ها محاسبه می‌گردد و با استفاده از یک رابطه نمایی احتمال قرار گرفتن هر داده در گروه‌های مربوطه محاسبه می‌شود. برای انجام تجزیه‌های آماری فوق الذکر نرم افزار JMP نسخه 10 مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج و بحث

تجزیه مؤلفه‌های اصلی

جهت فشرده سازی و کاهش ابعاد متغیرها از تجزیه مؤلفه‌های اصلی استفاده شد. از مجموع ۱۲ فاکتور (pH، رطوبت، محتوای هیدروکسی متیل فورفورال، قندهای احیاء کننده، قند کل، نسبت فروکتوز به گلوکز، هدایت الکتریکی، فعالیت دیاستاز، محتوای مواد جامد نامحلول، رطوبت اسیدیته آزاد و محتوای خاکستر) اندازه گیری شده ۹ فاکتور در سه گروه برای مؤلفه‌های اصلی تعیین شد.

گروه اول مؤلفه‌های اصلی بر اساس ۳ فاکتور pH، اسیدیته آزاد و محتوای خاکستر تعیین شد و مقدار ویژه که نشان دهنده واریانس توجیه شده توسط سه مؤلفه اصلی گروه اول می‌باشد در جدول ۱ (الف) نمایش داده شده است. ۶۸/۵۱٪ از کل واریانس توسط مؤلفه اول و ۲۹/۱۹٪ از کل واریانس توسط مؤلفه دوم توجیه می‌شود که در مجموع ۹۷/۷۰٪ کل واریانس را پوشش می‌دهند. همچنین بُردار ویژه^{۱۳} که نشان دهنده مدل محاسبه شده برای سه مؤلفه اصلی توسط ۳ پارامتر pH، اسیدیته

¹¹ Eigen value

¹² Mahalanobis

¹³ Eigen vector

جدول ۱- مقدار ویژه و بُردار ویژه مؤلفه‌های اصلی

(الف) گروه اول

| مؤلفه اصلی | مقدار ویژه | درصد | درصد تجمعی | بردار ویژه | | |
|------------|------------|-------|------------|------------|--------------|--------|
| | | | | pH | اسیدیته آزاد | خاکستر |
| ۱ | ۲/۰۶ | ۶۸/۵۱ | ۶۸/۵۱ | ۰/۶۸ | -۰/۶۵ | ۰/۳۵ |
| ۲ | ۰/۸۸ | ۲۹/۱۹ | ۹۷/۷۰ | -۰/۱۳ | ۰/۳۶ | ۰/۹۲ |
| ۳ | ۰/۰۷ | ۲/۳۰ | ۱۰۰/۰۰ | ۰/۷۲ | ۰/۶۷ | -۰/۱۶ |

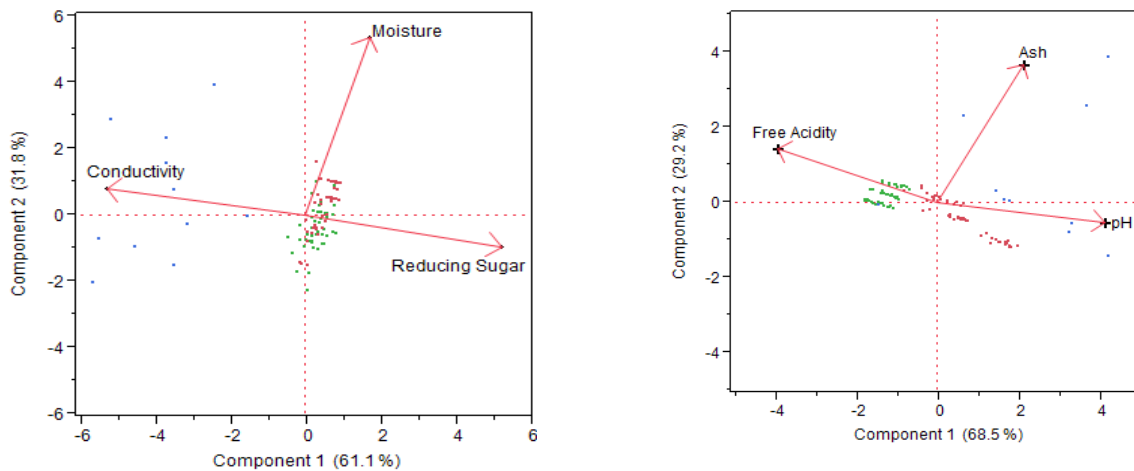
(ب) گروه دوم

| مؤلفه اصلی | مقدار ویژه | درصد | درصد تجمعی | بردار ویژه | | |
|------------|------------|-------|------------|------------|----------------|--------------------|
| | | | | رطوبت | هدایت الکتریکی | قندهای احیاء کننده |
| ۱ | ۱/۸۳ | ۶۱/۱۴ | ۶۱/۱۴ | ۰/۲۳ | -۰/۶۹ | ۰/۶۹ |
| ۲ | ۰/۹۶ | ۳۱/۸۴ | ۹۲/۹۸ | ۰/۹۷ | ۰/۱۵ | -۰/۱۸ |
| ۳ | ۰/۲۱ | ۷/۰۲ | ۱۰۰/۰۰ | ۰/۰۲ | ۰/۷۱ | ۰/۷۱ |

(ج) گروه سوم

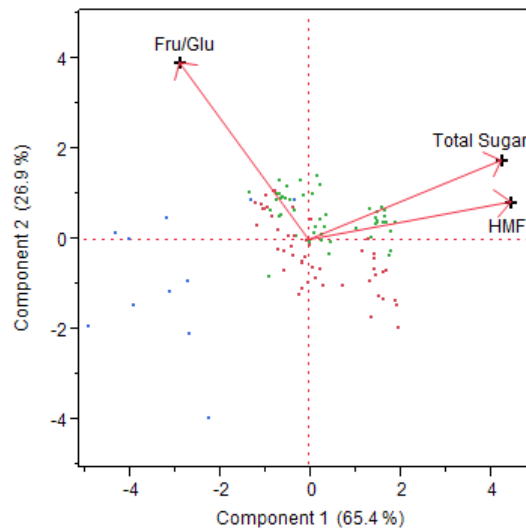
| مؤلفه اصلی | مقدار ویژه | درصد | درصد تجمعی | بردار ویژه | | |
|------------|------------|-------|------------|------------|--------|----------|
| | | | | HMF | قند کل | *Fru/Glu |
| ۱ | ۱/۹۶ | ۶۵/۳۷ | ۶۵/۳۷ | ۰/۶۶ | ۰/۶۳ | -۰/۴۲ |
| ۲ | ۰/۸۱ | ۲۶/۹۵ | ۹۲/۳۲ | ۰/۱۹ | ۰/۴۰ | ۰/۹۰ |
| ۳ | ۰/۲۳ | ۷/۶۹ | ۱۰۰/۰۰ | ۰/۷۳ | -۰/۶۷ | ۰/۱۴ |

*نسبت فروکتوز به گلوکز



(ب) گروه دوم

(الف) گروه اول



(ج) گروه سوم

شکل ۱- تعیین موقعیت عسل‌های تقلبی و خالص با استفاده از دو مولفه اول تجزیه به مؤلفه‌های اصلی

حاصل شد. شاخص طبقه‌بندی اشتباه^{۱۴} بر اساس سه فاکتور مذکور ۱۰ عدد می‌باشد. این مدل، یک نمونه از دسته عسل‌های طبیعی را عسل تقلبی شده با قند اینورت و همچنین ۳ نمونه از همین دسته را عسل تقلبی شده با قند خرما تشخیص داد. شایان ذکر است این مدل، ۶ نمونه از ۵۱ نمونه موجود در دسته عسل‌های تقلبی شده با خرما را به عنوان عسل‌های تقلبی شده با قند اینورت طبقه‌بندی کرد. شکل ۲ (الف)، نمودار

تحلیل ممیزی (تجزیه تابع تشخیص)

از ۳ پارامتر فیزیکی-شیمیایی pH، اسیدیته آزاد و محتوای خاکستر برای طبقه‌بندی عسل‌های طبیعی و تقلبی استفاده شد. همانطور که در جدول ۲ (الف) مشاهده می‌شود که ۷ نمونه از ۱۱ نمونه عسل طبیعی در مدل پیش بینی به درستی طبقه‌بندی شد. تمام ۵۱ نمونه عسل تقلبی شده با قند اینورت به درستی طبقه‌بندی شدند و ۴۵ نمونه از ۵۱ عسل تقلبی شده با قند خرما به درستی طبقه‌بندی شده است. در مجموع طبقه‌بندی صحیح ۹۱/۱۵ درصدی با استفاده از این سه پارامتر

¹⁴ Misclassified

در تحقیقی تقلب عسل با افزودن شربت‌های قندی ساده و مرکب در غلظت‌های ۷٪ و ۲۵٪ در سه نوع عسل تک گل با روش مادون قرمز میانی^{۱۶} (MIR) بررسی شده و با استفاده از تحلیل ممیزی خطی طبقه‌بندی بهینه صد در صدی عسل‌های تقلبی شده با گلوکز، ساکارز و فروکتوز ممکن گردید. همچنین تحلیل ممیزی خطی، با موفقیت قند اینورت چغندر و نیشکر را در عسل تشخیص داد (سیواکساوا و ایرودایاراج ۲۰۰۲).

همچنین در تحقیق دیگری برای تشخیص تقلب حاصل از افزودن شربت اینورت چغندر و شربت ذرت با فروکتوز بالا به عسل‌های ایرلندی از طیف سنجی مادون قرمز نزدیک^{۱۷} (NIR) و تجزیه آماری چند متغیره استفاده گردیده و ۸ نوع عسل خالص با شربت اینورت چغندر در غلظت‌های ۷، ۱۰، ۱۴، ۲۱، ۳۰، ۵۰ و ۷۰ درصد (وزنی / وزنی) تقلبی شدند. شربت ذرت با فروکتوز بالا نیز در غلظت‌های ۱۰، ۳۰، ۵۰ و ۷۰ درصد به ۱۰ نوع عسل خالص دیگر افزوده شد. در این مطالعه عسل‌های تقلبی شده با ۷ و ۱۰ درصد شربت اینورت در دسته عسل‌های خالص طبقه‌بندی شدند، در حالی که تمام عسل‌های تقلبی شده با درصد‌های مختلف شربت ذرت با فروکتوز بالا در دسته غیر خالص طبقه‌بندی گردیدند (کلی و همکاران ۲۰۰۶).

از طیف سنجی رامان^{۱۸} (FT-Raman) برای تفکیک و طبقه‌بندی تقلبات با قندهای اینورت چغندر و نیشکر در سه نوع عسل تک گل استفاده شده است. در این مطالعه یک مجموعه شامل ۴۷ نمونه عسل تقلبی در محدوده ۲٪ تا ۲۵٪ با افزایش ۵٪ برای هر مایه تقلب آماده گردید. ۲۰ نمونه از هر مجموعه برای اعتبار سنجی و بقیه نمونه‌ها برای کالیبراسیون به کار رفت. برای عسل شبدر درصد تمایز صحیح نمونه‌های کالیبراسیون برای هر دو قند اینورت چغندر و نیشکر ۹۸/۵۷٪ و درصد تمایز صحیح نمونه‌های اعتبار سنجی به ترتیب ۱۰۰٪ و

کانونیکال^{۱۵} جداسازی سه دسته عسل‌های طبیعی (PH)، عسل‌های تقلبی شده با افزودن قند اینورت (ADI) و همچنین عسل‌های تقلبی شده با افزودن قند خرما (AHD) را با استفاده از گروه اول مؤلفه‌های اصلی نشان می‌دهد.

از سه پارامتر فیزیکی شیمیایی رطوبت، هدایت الکتریکی و قندهای احیاء کننده برای طبقه‌بندی عسل‌های طبیعی و تقلبی شده با قند اینورت و قند خرما (بطور مجزا) استفاده شد. مطابق جدول ۲ (ب) مشاهده می‌شود که تمام ۱۱ نمونه عسل طبیعی در مدل پیش بینی کننده به طور صحیح طبقه‌بندی شده‌اند. ۱۰ نمونه از ۵۱ نمونه عسل تقلبی شده با قند اینورت در دسته عسل‌های تقلبی شده با قند خرما و همچنین عسل تقلبی شده با قند خرما در دسته عسل‌های تقلبی شده با قند اینورت تشخیص داده شده‌اند. طبقه‌بندی صحیح ۸۵/۸۴ درصدی با سه پارامتر هدایت الکتریکی، قندهای احیاء کننده و رطوبت به دست آمد و شاخص طبقه‌بندی اشتباه بر اساس سه فاکتور مذکور ۱۶ عدد می‌باشد.

در طبقه‌بندی عسل‌های طبیعی و تقلبی، بر اساس سه پارامتر فیزیکی شیمیایی HMF، قند کل و نسبت فروکتوز به گلوکز تقلبی ۲۰ نمونه از کل نمونه‌ها اشتباه پیش‌بینی گردید. ۹ نمونه از عسل‌های طبیعی توسط این مدل به درستی طبقه‌بندی شده و دو نمونه تقلبی تشخیص داده شدند. نمونه شماره یک به عنوان عسل تقلبی شده با قند خرما و عسل شماره چهار به عنوان عسل تقلبی شده با قند اینورت تشخیص داده شدند. همچنین ۱۰ نمونه از نمونه‌های تقلبی شده با قند اینورت در دسته عسل‌های تقلبی شده با قند خرما و ۷ نمونه از نمونه‌های تقلبی شده با قند خرما در دسته عسل‌های تقلبی شده با قند اینورت طبقه‌بندی شده است (جدول ۲ ج). طبقه‌بندی صحیح ۸۲/۳۰ درصدی با سه پارامتر HMF، قند کل و نسبت فروکتوز به گلوکز حاصل گردید.

¹⁶ Mid-infrared

¹⁷ Near-infrared

¹⁸ Fourier transform Raman

¹⁵ Canonical plot

HFCS و یا MS عسل با استفاده از PLS-LDA دارای دقت ۸۴/۴٪ بود. نتایج نشان داد که طیف سنجی رامان همراه با PLS-LDA یک روش بالقوه برای تشخیص تقلبات در عسل بود (لی و همکاران ۲۰۱۲). اثر افزودن غلظت‌های مختلف شربت‌های قندی تجاری به عسل با استفاده از رزونانس مغناطیسی هسته‌ای^{۲۳} (NMR) یک بُعدی (1D) و دو بُعدی (2D) همراه با تجزیه آماری چند متغیره مطالعه نمودند. در این پژوهش شصت و سه نمونه عسل تأیید شده و ۶۳ نمونه عسل تقلبی استفاده شد. برای تهیه عسل تقلبی، هفت شربت قند مختلف که به طور معمول برای تغذیه زنبور عسل استفاده می‌شود مورد استفاده قرار گرفت. بهترین مدل‌های تفکیک طیف یک بُعدی به دست آمده بود (قدرت پیش ۹۵/۲٪) و NMR دو بُعدی نیز نتایج قابل قبول (طبقه‌بندی صحیح ۹۰/۵٪) را داشت. (برتلی و همکاران ۲۰۱۰).

۹۵/۸۳٪ بود. در عسل گندم سیاه درصد تفکیک درست نمونه‌های کالیبراسیون ۹۵/۷۱٪ برای قند اینورت چغندر و ۹۸/۵۷٪ برای قند اینورت نیشکر شد و درصد تفکیک درست نمونه‌های اعتبار سنجی برای هر دو ۱۰۰٪ گردید. عسل پرتقال دارای درصد طبقه‌بندی درست نمونه‌های کالیبراسیون ۹۵/۶۵٪ برای قند اینورت چغندر و ۹۵/۷۱٪ برای قند اینورت نیشکر بود و همچنین دارای درصد طبقه‌بندی درست نمونه‌های اعتبار سنجی ۱۰۰٪ برای قند اینورت چغندر و ۹۵/۸۳٪ برای قند اینورت نیشکر بود. در کل نتیجه مطالعه طبقه‌بندی تقلبات عسل با استفاده از تحلیل متغیر متعارف (CVA)^{۱۹} دارای دقت طبقه‌بندی حداقل در حدود ۹۶٪ بود. (پارادکار و ایرودایاراج ۲۰۰۱).

در مطالعه‌ای که توسط لی و همکاران (۲۰۱۲) انجام شد، طیف سنجی رامان برای تشخیص تقلب ناشی از افزودن شربت ذرت با فروکتوز بالا (HFCS)^{۲۰} و شربت مالتوز (MS)^{۲۱} به عسل، مورد استفاده قرار گرفت. HFCS و MS با نمونه‌های تأیید شده عسل در نسبت های ۱:۱۰ (۱۰٪)، ۱:۵ (۲۰٪) و ۱:۲/۵ (۴۰٪)، (وزنی / وزنی) مخلوط گردید. تجزیه آماری چند متغیره (Adaptive iteratively reweighted penalized least squares (airPLS)) برای حذف پس زمینه از داده‌های طیفی انتخاب شد و سپس حداقل مربعات جزئی و تحلیل ممیزی خطی (PLS-LDA)^{۲۲} به منظور توسعه یک مدل طبقه‌بندی دوتایی مورد استفاده قرار گرفت. طبقه‌بندی نمونه‌های عسل تأیید شده با استفاده از PLS-LDA نشان داد که دقت در مجموع ۹۱/۱٪ برای عسل تأیید شده در مقابل عسل تقلبی با HFCS، ۹۷/۸٪ برای عسل تأیید شده در مقابل عسل تقلبی با MS و ۷۵/۶٪ عسل تأیید شده در مقابل عسل تقلبی با HFCS و MS بود. طبقه‌بندی افزودن شربت‌های قندی مانند

¹⁹ Canonical variate analysis

²⁰ High fructose corn syrup

²¹ Maltose syrup

²² Partial least squares-linear discriminant analysis

²³ Nuclear magnetic resonance

جدول ۲- ماتریس طبقه‌بندی حاصل از LDA بر اساس مؤلفه‌های اصلی برای سه دسته عسل طبیعی و تقلبی (ردیف‌های واقعی توسط ستون‌های پیش بینی شده)

(الف) گروه اول

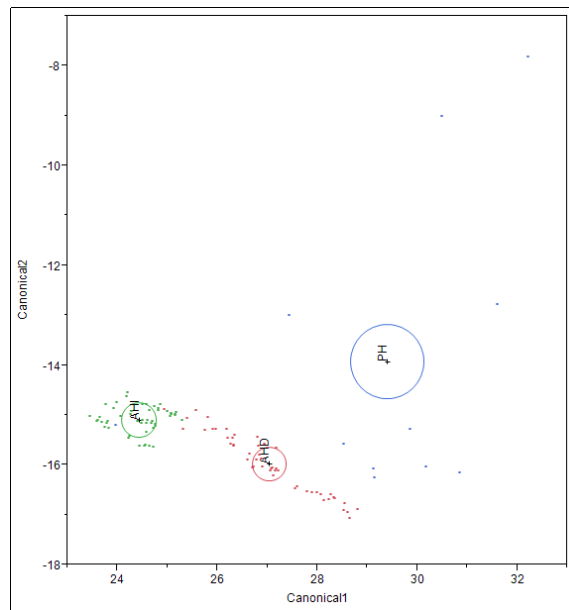
| عسل‌های طبیعی | عسل‌های تقلبی شده با قند اینورت | عسل‌های تقلبی شده با قند خرما |
|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| عسل‌های طبیعی | ۱ | ۳ |
| عسل‌های تقلبی شده با قند اینورت | ۵۱ | ۰ |
| عسل‌های تقلبی شده با قند خرما | ۶ | ۴۵ |

(ب) گروه دوم

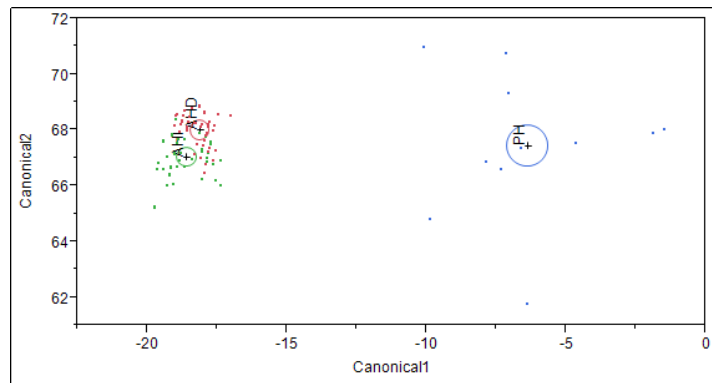
| عسل‌های طبیعی | عسل‌های تقلبی شده با قند اینورت | عسل‌های تقلبی شده با قند خرما |
|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| عسل‌های طبیعی | ۰ | ۰ |
| عسل‌های تقلبی شده با قند اینورت | ۴۱ | ۱۰ |
| عسل‌های تقلبی شده با قند خرما | ۶ | ۴۵ |

(ج) گروه سوم

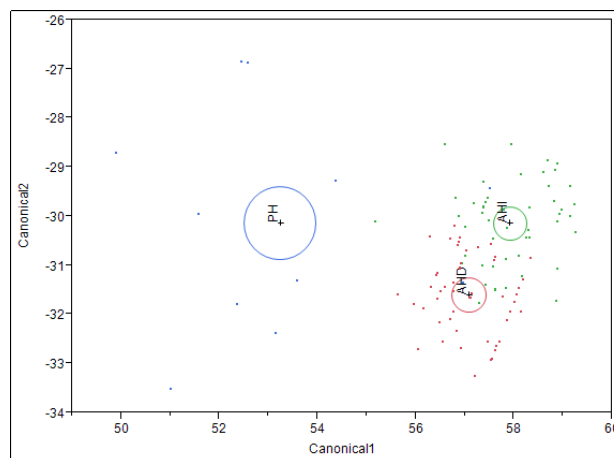
| عسل‌های طبیعی | عسل‌های تقلبی شده با قند اینورت | عسل‌های تقلبی شده با قند خرما |
|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| عسل‌های طبیعی | ۱ | ۱ |
| عسل‌های تقلبی شده با قند اینورت | ۴۰ | ۱۰ |
| عسل‌های تقلبی شده با قند خرما | ۷ | ۴۴ |



(الف) گروه اول



(ب) گروه دوم



(ج) گروه سوم

شکل ۲- نمودار کانونیکال براساس دو وکتور اول و دوم برای جداسازی سه دسته نمونه مورد مطالعه بر اساس مؤلفه‌های اصلی

نتیجه‌گیری

ممیزی خطی می‌توانند در تشخیص تقلبات صورت گرفته در عسل با روش‌های دستگاهی پیشرفته که پیر هزینه بوده و نیازمند تخصص هستند، رقابت کند. متغیرهایی HMF، خاکستر، اسیدیته آزاد، هدایت الکتریکی، pH، رطوبت، قندهای احیاء کننده، قند کل و نسبت فروکتوز به گلوکز به بهترین وجه در تمییز نمونه‌ها جواب دادند و در مدل طبقه‌بندی جهت ارزیابی بیشتر نمونه‌های عسل طبیعی و تقلبی از قدرت پیش‌بینی بالا برخوردار بودند.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که تلفیق اندازه‌گیری خواص فیزیکی-شیمیایی و تجزیه آماری چند متغیره می‌تواند در تشخیص سریع و آسان عسل‌های طبیعی از عسل‌های تقلبی حاوی قند اینورت و قند خرما مفید باشد. این مطالعه ثابت کرد روش‌های ساده و کلاسیک تجزیه عسل که با هزینه خیلی کم قابل انجام هستند در صورت استفاده از روش‌های تجزیه آماری چند متغیره مانند کاربرد تجزیه مؤلفه‌های اصلی و تحلیل

منابع مورد استفاده

- مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، عسل- ویژگی‌ها و روش‌های آزمون (تجدید نظر ششم)، شماره ۹۲، ۱۳۸۶.
- Alimentarius C. (2001). Revised codex standard for honey. Codex stan, 12, 1982.
- AOAC, 1995. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists International, Arlington, VA.
- Bertelli D, Lolli M, Papotti G, Bortolotti L, Serra G and Plessi M, 2010. Detection of honey adulteration by sugar syrups using one-dimensional and two-dimensional high-resolution nuclear magnetic resonance. *Journal of agricultural and food chemistry* 58(15): 8495-8501.
- Bogdanov S, Martin, P., & Lullmann, C. (2002). Harmonised methods of the international honey commission. Swiss Bee Research Centre, FAM, Liebefeld.
- Cabañero AI, Recio JL and Rupérez M, 2006. Liquid chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry: a new perspective on honey adulteration detection. *Journal of agricultural and food chemistry* 54(26): 9719-9727.
- Corbella E and Cozzolino D, 2006. Classification of the floral origin of Uruguayan honeys by chemical and physical characteristics combined with chemometrics. *LWT-Food Science and Technology* 39(5): 534-539.
- Cordella C, Moussa I, Martel AC, Sbirrazzuoli N and Lizzani-Cuvelier L, 2002. Recent developments in food characterization and adulteration detection: technique-oriented perspectives. *Journal of agricultural and food chemistry* 50(7): 1751-1764.
- Cordella C, Faucon JP, Cabrol-Bass D and Sbirrazzuoli N, 2003. Application of DSC as a tool for honey floral species characterization and adulteration detection. *Journal of thermal analysis and calorimetry* 71(1): 279-290.
- Cotte JF, Casabianca H, Chardon S, Lheritier J and Grenier-Loustalot MF, 2003. Application of carbohydrate analysis to verify honey authenticity. *Journal of Chromatography A*. 1021(1): 145-155.
- Gallardo-Velázquez T, Osorio-Revilla G, Loa MZD and Rivera-Espinoza Y, 2009. Application of FTIR-HATR spectroscopy and multivariate analysis to the quantification of adulterants in Mexican honeys. *Food Research International* 42(3): 313-318.
- Gheisari HR and Shirazi ARH, 2009. Comparison and evaluation of physicochemical properties and adulterations in produced honeys of Shiraz province in different seasons. *Iranian Food Science & Technology Research Journal* 4(2): 58-69.
- Gomes S, Dias LG, Moreira LL, Rodrigues P and Estevinho L, 2010. Physicochemical, microbiological and antimicrobial properties of commercial honeys from Portugal. *Food and Chemical Toxicology* 48(2): 544-548.

- Guo W, Liu Y, Zhu X and Wang S, 2011. Temperature-dependent dielectric properties of honey associated with dielectric heating. *Journal of Food Engineering* 102(3): 209-216.
- Kelly JD, Petisco C and Downey G, 2006. Potential of near infrared transmittance spectroscopy to detect adulteration of Irish honey by beet invert syrup and high fructose corn syrup. *Journal of near infrared spectroscopy* 14(2): 139-146.
- Kelly JD, Downey G and Fouratier V, 2004. Initial study of honey adulteration by sugar solutions using midinfrared (MIR) spectroscopy and chemometrics. *Journal of agricultural and food chemistry* 52(1): 33-39.
- Lazaridou A, Biliaderis CG, Bacandritsos N and Sabatini AG, 2004. Composition, thermal and rheological behaviour of selected Greek honeys. *Journal of Food Engineering* 64(1): 9-21.
- Li S, Shan Y, Zhu X, Zhang X and Ling G, 2012. Detection of honey adulteration by high fructose corn syrup and maltose syrup using Raman spectroscopy. *Journal of Food Composition and Analysis* 28: 69-74.
- Manzanares AB, García ZH, Galdón BR, Rodríguez ER and Romero CD, 2011. Differentiation of blossom and honeydew honeys using multivariate analysis on the physicochemical parameters and sugar composition. *Food Chemistry* 126: 664-672.
- Padovan GJ, De Jong D, Rodrigues LP and Marchini JS, 2003. Detection of adulteration of commercial honey samples by the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotopic ratio. *Food Chemistry* 82(4): 633-636.
- Paradkar MM and Irudayaraj J, 2001. Discrimination and classification of beet and cane inverts in honey by FT-Raman spectroscopy. *Food chemistry* 76(2): 231-239.
- Ruiz-Matute AI, Rodríguez-Sánchez S, Sanz ML and Martínez-Castro I, 2010. Detection of adulterations of honey with high fructose syrups from inulin by GC analysis. *Journal of Food Composition and Analysis* 23(3): 273-276.
- Saxena S, Gautam S and Sharma A, 2010. Physical, biochemical and antioxidant properties of some Indian honeys. *Food chemistry* 118(2): 391-397.
- Sivakesava S and Irudayaraj J, 2002. Classification of simple and complex sugar adulterants in honey by mid-infrared spectroscopy. *International journal of food science & technology* 37(4): 351-360.

Identification and classification of pure and adulterated honeys by multivariate analysis

S Amiry¹, M Esmaili^{2*}, M Alizadeh Khaledabad² and S Amiry¹

Received: February 01, 2014

Accepted: January 07, 2015

¹MSc Graduated Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Urmia, Iran

²Associate Professor, Department of Food Science and Technology, University of Urmia, Urmia, Iran

*Corresponding author: E-mail: esmailim@yahoo.ie

Abstract

Honey is a natural food with the high nutritional value and the most useful medicinal properties. The chief components of honey are simple carbohydrates and water, leading to the fraud in honey using cheaper commercially available sugar syrups. This is an important anxiety in quality control of honey. In this study, detection of pure natural honey from the honey adulterated by adding concentrations of 7, 15 and 30 percent of both beet invert sugar and date invert sugar was separately examined. For this purpose, multivariate analysis of physicochemical properties of honey samples were used. Applying principal component analysis (PCA), among 12 physicochemical properties measured, nine parameters were identified as principal components. Then the linear discriminant analysis (LDA) was utilized to discriminate the pure and adulterated honeys in three different batches according to these nine parameters. An optimum classification of 91.15% was reached using three physicochemical factors including pH, free acidity and ash. Correct classification of 85.84% were achieved by three others physicochemical properties, *i.e.* moisture content, electrical conductivity and reducing sugar, and of 82.30% by HMF, total sugar and Fructose/Glucose ratio. Results demonstrated that multivariate analysis in combination of the routine analysis of honey could be applied to rapid and easy detect of adulteration in honey.

Keywords: Classification, Identification, Multivariate statistical analysis, Pure and adulterated honey