

اندازه‌گیری میزان هیدروکسی متیل فورفورال (HMF) به منظور تشخیص تازگی عسل به روش تحلیل کمی طیف فلورسانس القایی لیزری

علیرضا مشهدی، علی بوالی^{*}، محسن هاشمی، فرزاد مختاری خیرآبادی
دانشکده مهندسی انرژی و فیزیک، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران

^{*}نویسنده مسئول: alibavali@aut.ac.ir

چکیده-در این تحقیق، تأثیر افزایش هیدروکسی متیل فورفورال (Hydroxymethylfurfural -HMF) با گذشت زمان در عسل‌های تک‌گل تازه با منشأ گیاهی مختلف بر طیف فلورسانس القایی لیزری (LIF) عسل بررسی شده است. در روش پیشنهادی، فاکتوری کمی برای تمایز طیف‌های فلورسانس القایی لیزری دو نمونه عسل تک‌گل تازه و یک‌ساله از یک منشأ گیاهی تعریف شده است که تعیین میزان دقیق غلظت هیدروکسی متیل فورفورال را در عسل‌های تک‌گل امکان‌پذیر می‌کند. نتایج تجربی نشان می‌دهد که با این رویکرد سریع، دقیق، غیر مخرب و کم‌هزینه می‌توان عسل‌های تک‌گل تازه با منشأ گیاهی مختلف را از نمونه یک‌ساله آن تمییز داد.

کلید واژه- عسل تک‌گل، تازگی عسلی، فلورسانس القایی لیزری، هیدروکسی متیل فورفورال.

Measurement of hydroxymethyl furfural (HMF) by quantitative analysis of laser induced fluorescence spectra to detect freshness of honey

Alireza Mashhadi, Ali Bavali^{*}, Mohsen Hashemi, Farzad Mokhtari Kheyraadi

Department of Electrical Engineering and Physics, Amirkabir University of
Technology (AUT), Tehran

Abstract-In this research, the effect of increasing the amount of Hydroxymethylfurfural (HMF) over time in fresh unifloral honey on the laser induced fluorescence (LIF) spectra has been investigated. In the proposed method a quantitative factor is introduced to discriminate LIF spectra of fresh and one-year-old unifloral honey which accurately measures the concentration of hydroxymethyl furfural content. The experimental results reveal that with this fast, accurate, non-destructive and low-cost approach we can distinguish fresh unifloral honeys of different botanical origin from their one-year sample.

Keywords: Unifloral honey, Freshness of Honey, laser induced fluorescence, HMF.

۱-مقدمه

که بر این اساس یک روش سریع، دقیق، کم‌هزینه و غیرمخرب برای تشخیص تازگی عسل‌های تک‌گل خالص با منشأ گیاهی مختلف تدوین نموده ایم [۸].

۲-مبانی علمی

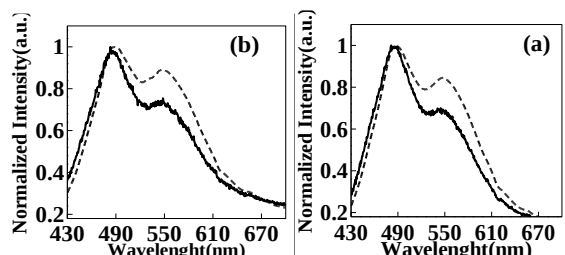
هدف اصلی این پژوهش، تشخیص عسل تک‌گل خالص و تازه از عسل‌های تک‌گل انباشت شده به روش مشخصه یابی نوری است. عسل ماتریس پیچیده‌ای شامل فلوروفورهای مختلف است که همپوشانی سیگنال‌های آن‌ها می‌تواند اندازه‌گیری غلظت یک ترکیب منحصر به فرد را غیرممکن سازد. با این وجود، شکل طیف فلورسانس همراه با تحلیل‌های آماری چندمتغیره می‌تواند امکان توصیف و شناسایی ترکیب‌های مختلف بر اساس ویژگی‌های فلورسانس آن‌ها (که به شدت تحت تاثیر محیط قرار دارند) را فراهم آورد [۸]. روش پیشنهادی در این پژوهش بر پایه فرآیند خودجذب طیف فلورسانس القایی لیزری تولیدشده در محیط انتشار و تأثیر آن بر مشخصه‌های طیف آشکارسازی شده استوار است. در این پژوهش، برای نخستین بار میزان HMF عسل تک-گل بر اساس تأثیر غلظت آن بر آهنگ خود-جذب طیف فلورسانس القایی لیزری تولیدشده توسط فلاونوئیدها اندازه‌گیری می‌شود.

۳-شرح آزمایش

شکل ۱ طرح کلی آرایه اندازه‌گیری را نشان می‌دهد. از نور تکفام لیزر دیودی 405 nm با توان 300 mW برای برانگیزش نمونه‌های عسل تک‌گل استفاده شده است. نمونه‌های عسل تک‌گل در ظروف ویال شیشه‌ای به وسیله بازوی نگهدارنده در فاصله 50 سانتی‌متری مقابل لیزر قرار گرفته‌اند. تابش فلورسانس نمونه‌ها توسط پروپ فیبر نوری با درجه عددی 0.22 ، که قابلیت چرخش زاویه‌ای دارد به طیف‌سنج هدایت شده‌اند. در آزمایشات طیف‌سنجی LIF، طیف‌سنج نوری مدل AvaSpec-2048 با قدرت تفکیک 0.4 نانومتر به کار رفته است. با استفاده از یک عدسی همگرا، پرتو لیزر بر نمونه متمرکز شد تا بتوان بیش‌ترین میزان فلوروفور غیربرانگیخته را در فاصله‌ی

عسل ماده‌ای است طبیعی که توسط زنبورعسل از شهد گل‌ها، ترشح بخش‌های زنده گیاهان و یا از مواد دفعی حشره‌های مکنده گیاهی تولید می‌شود [۲ و ۱]. بهای زیاد عسل خالص و تازه، در کنار زمان‌بری، دقیق کم، پرهزینه و تخصصی بودن روش‌های تشخیص خلوص و تازگی آن و همچنین استقبال مصرف‌کنندگان برای خرید عسل تک‌گل خالص سبب شده است تا فروش عسل نامرغوب سال‌خورده به جای عسل خالص و تازه همواره مورد توجه سودجویان قرار بگیرد [۳ و ۴]. عسل حاوی فلوروفورهای ذاتی بی‌شماری است که بررسی آن را با طیف-سنجی فلورسانس مناسب می‌سازد [۵]. اگرچه بسیاری از ترکیبات و ویژگی‌های شیمیایی منحصر به فرد عسل در نگهداری بلند مدت تغییر نمی‌کنند، اما برخی روندهای شیمیایی و بیوشیمیایی مانند تخمیر، اکسیداسیون یا کاهش آب‌قندها موجب تغییراتی در مقدار اسیدیته و تشکیل موادی چون هیدروکسی متیل فورفورال می‌شوند. این عوامل ویژگی‌های حسی عسل (رنگ، بو، مزه و ...) را تغییر داده و موجب کاهش کیفیت آن می‌شوند [۱]. مولکول فلوروفور هیدروکسی متیل فورفورال (HMF) ترکیبی است آلی، که در عسل تازه به مقادیر ناچیز وجود دارد و به طور طبیعی با گذشت زمان از طریق تجزیه فروکتوز بر مقدار آن افزوده شده و به PH عسل و درجه حرارت محل نگهداری آن نیز وابسته است [۶]. از اندازه‌گیری میزان HMF، اغلب جهت سنجش کیفیت عسل استفاده می‌شود، زیرا مقادیر بالای آن در عسل ممکن است از انباشت نامناسب و طولانی مدت، تقلب با شیرین‌کننده‌ها یا عملیات حرارتی شدید برای کاهش گرانروی عسل ناشی شود [۷]. از این رو، در این تحقیق به عنوان یک نشانگر، جهت تشخیص عسل تازه از یک‌ساله در نظر گرفته شده است. حداکثر میزان پذیرفته شده HMF حدود 40 میلی‌گرم در کیلوگرم است [۲]. طیف-سنجی فلورسانس القایی لیزری در مقایسه با روش‌های طیف-سنجی جذبی رایج، حساسیتی 100 تا 1000 برابر بیش‌تر دارد

را دارد. این ۵ طول موج عبارتند از طول موج‌های ۴۵۰، ۴۸۵، ۵۲۵، ۵۴۵ و ۵۷۵ نانومتر. تفاوت طیف‌های LIF بهنجار شده یک نمونه عسل مرکبات تازه با نمونه یکساله آن که در دو زاویه ۳۰ و ۶۰ درجه نسبت به خط تابش آشکارسازی شده اند، در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲: طیف LIF نرمال شده عسل مرکبات تازه (خط) و سالخورده (نقطه چین) با زاویه آشکارسازی (a) ۳۰ درجه (b) ۶۰ درجه.

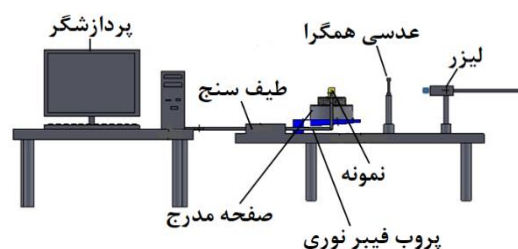
آهنگ بازجذب نمونه عسل یکساله در مقایسه با آهنگ بازجذب عسل تازه بیشتر است و علت این امر افزایش فلورفورهای HMF در نمونه‌های یکساله است. جهت تشخیص تازگی گونه‌های عسل با منشأ گیاهی مختلف مبتنی بر میزان آهنگ بازجذب، فاکتور Q به صورت زیر تعریف شد.

$$Q = \frac{I_{450} + I_{485} + I_{525} + I_{545} + I_{575}}{I_{545}} \quad (1)$$

در رابطه (۱)، I_i میانگین شدت طیف LIF نمونه‌ها در طول موج i ام است. نتایج حاصل از محاسبه Q برای گونه‌های عسل با منشأ گیاهی مختلف در دو وضعیت تازه و یکساله در جدول ۱ نشان داده شده است. بررسی جدول ۱ بیانگر آن است که برای هر گونه با منشأ گیاهی مختلف مقدار فاکتور Q متعلق به نمونه عسل تک‌گل یکساله از نمونه تازه آن در هر دو زاویه ۳۰ و ۶۰ درجه کمتر است که معیاری برای تشخیص تازگی عسل‌های تک‌گل با منشأ گیاهی مختلف می‌باشد. با داشتن اطلاعات جدول ۱ مقدار HMF را می‌توان با رابطه (۲) به دست آورد که ضریب تناسب ۱۰۰ بر اساس داده‌های تجربی انتخاب شده است.

$$HMF = \frac{(100 \times I_{545})}{Q} \quad (2)$$

تحریک نور لیزر در نمونه تا پروب فیبر نوری ایجاد نمود. بر این اساس با چرخش پروب فیبر نوری می‌توان تأثیر باز جذب فلورسانس توسط فلوروفورهای غیربرانگیخته را بررسی نمود. از آنجا که خودجذبی و نیز پراکندگی‌ها در محیط با کاهش شدت فلورسانس نیز همراه است، به منظور حفظ شدت لازم برای آشکارسازی، پروب می‌بایست در زاویه بهینه‌ای قرار داده شود. بررسی تجربی نمونه‌های مختلف عسل خالص نشان داد که زوایای آشکارسازی ۳۰ تا ۶۰ درجه بهترین ناحیه‌ی آشکارسازی و اجرای روش هستند.



شکل ۳: شماتیک چیدمان طیف‌سنجی LIF.

از هشت نمونه عسل خالص تازه تک‌گل با منشأ گیاهی گون، مرکبات، نمدار، کنار، بهاره، اکالیپتوس و آویشن و ایمن دیابتی در دو زاویه آشکارسازی ۳۰ و ۶۰ درجه نسبت به محل تابش لیزر، طیف فلورسانس القایی لیزری گرفته شد. نمونه‌های عسل به مدت یکسال در دمای اتاق $(25 \pm 5)^\circ C$ نگهداری شدند. پس از یکسال مجدداً طیف‌سنجی فلورسانس القایی لیزری انجام شد و نتایج حاصل با طیف‌سنجی نمونه‌های تازه مقایسه گردید. تکرار آزمایش‌های طیف‌سنجی فلورسانس القایی لیزری نتایج مشابهی را به همراه داشت که نشان دهنده تکرار پذیر بودن این روش است.

۴- بحث و تحلیل نتایج

تحلیل آماری شدت طیف‌های LIF حاصل از نمونه‌های تازه و سال‌خورده پس از بهنجارش در گستره طیفی ۴۳۰ تا ۷۰۰ نانومتر نشان داد که طیف LIF نمونه تازه هر عسل تک‌گل با منشأ گیاهی مختلف در مقایسه با طیف LIF همان عسل پس از یکسال در ۵ طول موج از این گستره، بیش‌ترین تفاوت شدت

فلورسانس القائی لیزری نمونه‌های عسل با منشأ گیاهی مختلف در دو وضعیت تازه و یک‌ساله نشان می‌دهد، افزایش غلظت HMF، افزایش آهنگ بازجذب یا به عبارتی کاهش فاکتور Q در گونه‌های مختلف را به دنبال دارد که با طیف-سنجی LIF به صورت سریع، دقیق و تکرار پذیر قابل اندازه-گیری است. از آن‌جا که مقدار HMF تولیدشده به طور طبیعی در عسل با گذشت یک‌سال حدوداً ۵-۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم عسل است، روش مذکور دارای قدرت تفکیک بسیار مناسب در تعیین مقدار HMF در نمونه‌های با HMF بیش از ۴۰ میلی‌گرم در کیلوگرم عسل است.

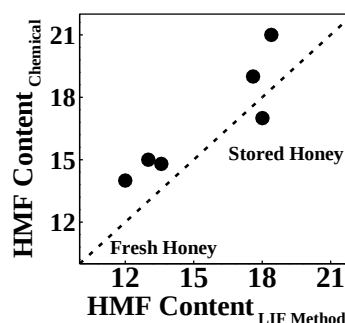
مرجع‌ها:

- [1] M. José Alvarez-Suarez Editor "Bee Products - Chemical and Biological Properties", 2017.
- [2] Codex Alimentarius, Revised codex standard for honey, Codex Stan 12-1981 Rev.2, 2001.
- [3] S. Sivakesava and J. Irudayaraj., "Detection of inverted beet sugar adulteration of honey by FTIR spectroscopy", Journal of the Science of Food and Agriculture., 81, P.P. 683-690, 2001.
- [4] L. Oddo, L. Piana., S. Anov., A. Bentabol., and P. Kerkliet. "Botanical species giving unifloral honey in Europe. Apidologie". 35, p.p 82-S93, 2004.
- [5] K. Ruoff., R.Karoui., E. Dufour., W.Luginbühl., J.O.Bosset., S. Bogdanov., and R. Amadó. "Authentication of the botanical origin of honey by front - face fluorescence spectroscopy. A preliminary study", J. Agric. Food Chem., 53, p.p 1343-1347, 2005.
- [6] K. Ruoff., and S. Bogdanov., "Authenticity of honey and other bee products", APIACTA. 38, p.p 317-327, 2004.
- [7] Bogdanov, S., 2010. Physical properties of honey. Book of honey. chapter 4.Bee Product Science, www.beehexagon.net. (Accessed: April 2008).
- [8] K. Ruoff, "Authentication of the Botanical Origin of Honey", ETH Zurich University, 2006.

جدول ۱: مقایسه مقادیر فاکتور Q برای عسل‌های با منشأ گیاهی مختلف در دو وضعیت تازه و سالخورده، به دست‌آمده از طیف LIF گونه‌ها در دو زاویه آشکارسازی ۳۰ و ۶۰ درجه نسبت به خط تابش.

گونه	زاویه ۳۰ درجه		زاویه ۶۰ درجه	
	Q_{Fresh}	Q_{Stored}	Q_{Fresh}	Q_{Stored}
گون	4.67 ± 0.02	4.28 ± 0.02	4.49 ± 0.02	4.26 ± 0.02
مرکبات	5.01 ± 0.02	4.52 ± 0.02	5.03 ± 0.02	4.52 ± 0.02
نمدار	4.40 ± 0.02	4.18 ± 0.02	4.45 ± 0.02	4.02 ± 0.02
کنار	4.35 ± 0.02	3.68 ± 0.02	4.15 ± 0.02	3.81 ± 0.02
بهاره	4.35 ± 0.02	4.03 ± 0.02	4.39 ± 0.02	4.24 ± 0.02
اکالیپتوس	4.37 ± 0.02	4.12 ± 0.02	4.47 ± 0.02	4.20 ± 0.02
آویشن	4.46 ± 0.02	4.20 ± 0.02	4.41 ± 0.02	3.95 ± 0.02
ایمن دیابتی	4.48 ± 0.02	4.06 ± 0.02	4.52 ± 0.02	4.10 ± 0.02

برای سه نمونه عسل با منشأ گیاهی مختلف، نتایج حاصل از اندازه‌گیری با روش مذکور، با نتایج آزمایش راستی سنجی شیمیایی مقایسه شد که در شکل ۳ مشاهده می‌شود.



شکل ۲ منحنی همبستگی نتایج آزمایش LIF با نتایج آزمایش شیمیایی تعیین HMF.

۵- نتیجه‌گیری

هیدروکسی متیل فورفورال (HMF) یک فلوروفور آلی است که عمدتاً در عسل‌های تازه وجود ندارد و با گذشت زمان به طور طبیعی در اثر تجزیه فروکتوز یا عوامل دیگر مانند حرارت دهی، تقلب با شیرین کننده‌ها و نگهداری نامناسب در عسل تولید می‌شود. به همین دلیل میزان HMF معیاری از کیفیت و عمر عسل است. بررسی کیفی و کمی طیف‌های