نهمین کنگره ملی مهندسی ماشین‌های کشاورزی
(مکانیک بیوسیستم) و مکانیزاسیون
پردیس کشاورزی و منابع‌طبیعی دانشگاه تهران
۲ و ۳ اردیبهشت ۱۳۹۴ - کرج

پیاده‌سازی و ساخت سامانه زبان الکترونیک به منظور تشخیص تقلب در زعفران

کبری حیدربیگی[۱و۲*]، سید سعید محتسبی[۳]، شاهین رفیعی[۳]، مهدی قاسمی ورنامخواستی[۴]، کرامت‌اله رضایی[۵].

۱ و ۳- دانشجوی دکتری و استاد، گروه مکانیک ماشین‌های کشاورزی، دانشگاه تهران

۲- استادیار، گروه مکانیک ماشین‌های کشاورزی، دانشگاه ایلام

۴- استادیار، گروه مکانیک ماشین‌های کشاورزی، دانشگاه شهرکرد

۵- استاد، گروه صنایع غذایی، دانشگاه تهران

* **نویسنده مسئول:** Kobra.heidarbeigi@gmail.com

چکیده

زعفران به خاطر عطر، رنگ و خواص دارویی آن محصولی شناخته شده و به عنوان یک افزودنی مهم خوراکی، مورد توجه می‌باشد. علاوه بر این، به دلیل قیمت بالای زعفران، تقلب در آن در بازارهای جهانی متداول است. در این پژوهش، یک سامانه قابل حمل زبان الکترونیک دارای آرایه‌ای از حسگرهای ولتامتری بر پایه الکترودهای صفحه چاپی (SPE) به منظور تشخیص تقلب در زعفران، توسعه یافت. انواع زعفران تقلبی از مخلوط کردن زعفران اصلی با خامه زعفران، گلرنگ، کلاله رنگ‌شده ذرت و رنگ‌های شیمیایی تارترازین و متیل اورنج، تهیه گردید. شکل و مکان پیک‌های هر ولتاموگرام حاصل از آرایه حسگری زبان الکترونیک در محلول‌های مختلف متفاوت و ویژه همان ماده و پیک‌های هر ولتاموگرام وابسته به اجزاء ردوکس در محلول مورد نظر بود. ویژگی‌های استخراج شده از سیگنال‌های حاصل از سامانه زبان الکترونیک، با روش‌های تحلیل مولفه‌های اصلی (PCA) و تحلیل تفکیک خطی (LDA) پردازش و تمام نمونه‌ها به طور کامل از یکدیگر متمایز شدند. نتایج طبقه‌بندی نمونه‌ها، قابلیت بالای سامانه زبان الکترونیک را در تشخیص و تمایز تقلب در زعفران نشان داد. بنابر قابلیت حسگرهای زبان الکترونیک، این سامانه، می‌تواند جایگزین روش‌های زمان‌بر و پیچیده متداول در تشخیص و تعیین ترکیبات زعفران و تعیین درجه خلوص زعفران گردد.

واژه‌های کلیدی: زعفران، زبان الکترونیک، تقلب، PCA، LDA.

۱- مقدمه

زعفران با نام علمی *Crocus sativus* L.، متعلق به خانواده زنبقیان و دارای کلاله سه شاخه است (Winterhalter et al, 2000) که از محصولات کشاورزی سازگار با شرایط آب و هوایی منطقه خاورمیانه، مرکز آسیا و قسمتی از اروپا می‌باشد (پرمه و همکاران، ۱۳۸۸). کلاله‌های خشک شده زعفران گران‌ترین ادویه جهان و دارای ارزش غذایی بالا هستند که به عنوان افزودنی خوراکی و همچنین یک داروی گیاهی کاربرد دارند (Haghighi et al, 2007). کیفیت، درجه‌بندی اقتصادی و خواص حسی زعفران به محتوای ترکیباتی چون استرهای کروستین (رنگ، حلال در آب)، پیکروکروسین (مزه تلخ، بی‌رنگ)، سافرانال (روغن فرار) و فلاونوییدهایی از قبیل کامپفرول (نوعی آنتی اکسیدان) وابسته است (Pedroza et al, 2012; Carmona et al, 2007). قیمت زعفران به دلیل ترکیبات با ارزش و خواص بالای آن و همچنین به لحاظ برداشت دشوار آن، بسیار بالا می‌باشد. کلاله‌های خشک شده زعفران، گران‌ترین ماده گیاهی و ادویه در جهان است که قیمت بالا و افزایش روز افزون تقاضا برای خرید، منجر به افزایش تقلب در آن با استفاده از ترکیب مواد رنگی با ارزش کمتر و غالبا مضر برای سلامتی انسان، شده است. روش‌های متداول در ارزیابی کیفی زعفران شامل کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) (Campo et al, 2009; Zalacain et al, 2005)، طیف‌سنجی فروسرخ نزدیک (NIR) (Zalacain et al, 2005; Anastasaki et al, 2008)، فروسرخ متوسط (MIR) (Anastasaki et al, 2008) و طیف‌سنجی جرمی-کروماتوگرافی گازی (GC-MS) می‌باشد. اخیرا تحقیقاتی به منظور تشخیص زعفران تقلبی با استفاده از روش‌های مرسوم مانند کروماتوگرافی صفحه‌ای (معاشری و همکاران، ۱۳۸۹) و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (زوار پرمه و همکاران، ۱۳۸۸) انجام شده است. اما تاکنون یک ماشین یا سامانه ویژه برای تشخیص زعفران اصلی از زعفران تقلبی طراحی یا ساخته نشده است. فناوری زبان الکترونیک (تحلیل مایعات) از روش‌های جدیدی است که اخیرا در کشاورزی و به خصوص در زمینه بررسی کیفی مواد غذایی بسیار مورد توجه محققین قرار گرفته است و شامل آرایه‌ای از الکترودهای انتخابی متصل به یک برنامه تشخیص الگو است (Baldwin et al, 2011). این سامانه‌های حسگری به طور گسترده در تحلیل مواد غذایی مختلف از قبیل نوشیدنی‌ها، روغن‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Gay et al, 2010; Ghasemi-Vamankhasti et al, 2011; Prieto et al, 2011; Medina-Plaza et al, 2014).

تاکنون تنها استفاده از یک سامانه بینی الکترونیک (ماشین بویایی) جهت بررسی عطر نمونه‌های زعفران با منشا جغرافیایی مختلف، ساخته و استفاده شده است (Carmona et al, 2006) اما یک ماشین یا سامانه ویژه برای تشخیص زعفران اصلی از زعفران تقلبی مبنی بر زبان الکترونیک طراحی یا ساخته نشده است. با توجه به قابلیت بالای این فناوری، در این تحقیق سامانه مبتنی بر فناوری زبان الکترونیک جهت تمیز دادن زعفران اصلی از زعفران تقلبی مورد توجه قرار گرفته است.

روش‌های الکتروشیمیایی مورد استفاده در زبان الکترونیک شامل پتانسیومتری (Janczyk et al, 2011; Vlasov et al, 2010)، آمپرومتری (Scampicchio et al, 2006)، ولتامتری چرخه‌ای (Rodriguez-Mendez et al, 2008; Winquist, 2008; Labrador et al, 2010) یا اندازه‌گیری امپدانس (Pioggia et al, 2007; Riul et al, 2010) است. الکترودها در سامانه زبان الکترونیک، قابلیت ساخت و اصلاح با مواد مختلف را دارند. انتخاب مناسب مواد حساس به منظور ساخت آرایه حسگری با انتخاب‌گری مناسب برای کاربردهای مختلف، اهمیت بالایی دارد.

در این پژوهش آرایه‌ای از الکترودهای صفحه چاپی در سامانه زبان الکترونیک مورد استفاده قرار گرفت. الکترودهای صفحه چاپی با استفاده از قرارگیری و عملیات حرارتی یک لایه نازک از یک ماده حساس بر روی یک ماده زمینه‌ای پلاستیکی یا سرامیکی ایجاد می‌گردد (Wang et al, 1998; Fanjul-Bolado et al, 2008). مواد بسیاری به عنوان جوهر و مواد زمینه می‌توانند برای تولید حسگرهای ارزان و با حجم بالا استفاده گردد. جوهر استفاده شده برای الکترود کاری می‌تواند شامل مواد مختلف از قبیل ذرات گرافیت، کربن یا مواد فلزی (طلا، پلاتین، سرب و مس) (Kadara et al, 2009; Renedo et al, 2007) یا مخلوطی از کربن با مواد دیگر مانند پروسیان آبی و جوهر پایه نقره به عنوان الکترود مرجع باشد. این وسایل الکترودهای کاری، مرجع و جریان را به صورت یک‌جا در یک سلول الکتروشیمیایی شامل می‌شود و ارزان، یک‌بار مصرف، و با قابلیت تولید مجدد و استفاده آسان هستند و بنابراین به عنوان وسایل پرتابل کاربرد دارند (Wang and Tian, 1992; O'Halloran et al, 2001). الکترودهای صفحه چاپی برای تحلیل مواد غذایی و نوشیدنی‌ها و همچنین تازگی مواد غذایی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. پاسخ الکتریکی و رفتار الکتروشیمیایی حسگرهای زبان الکترونیک، بررسی و تحلیل گردید. قابلیت آرایه حسگری به منظور تشخیص و طبقه‌بندی تقلب در زعفران، با استفاده از روش‌های تحلیل مولفه‌های اصلی (PCA) و تحلیل تفکیک خطی (LDA) مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه نمونه

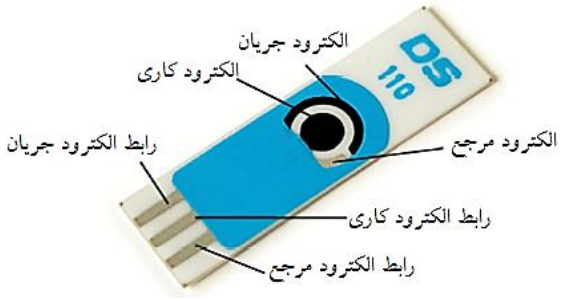
نمونه‌های زعفران اصلی استفاده شده در این پژوهش در دو نوع، کلاله‌های قرمز زعفران (سرگل) و زعفران همراه با خامه زرد رنگ آن، از مزارع منطقه قائن (استان خراسان جنوبی، ایران) و شرکت نوین زعفران (مشهد، ایران) تهیه شد. گلرنگ، کلاله ذرت و ریشه چغندرقرمز (بتا ولگاریس) به عنوان رنگ طبیعی جهت رنگ کردن کلاله ذرت، از عطاری‌های استان البرز تهیه شد. همچنین رنگ‌های شیمیایی تارترازین و متیل اورانژ به عنوان رنگ‌های مورد استفاده در رنگ‌آمیزی خامه زعفران و نیز اختلاط با پودر زعفران، به کار رفت. این دو ماده رنگی نیز از شرکت سیگما آلدریچ (اسپانیا) خریداری گردید. نمونه‌ها در یخچال و در دمای ۴°C و تا زمان انجام آزمایش، دور از نور نگه‌داری گردید. برای استخراج محلول رنگی از چغندرقرمز، از روش پرس کردن استفاده شد. در این روش ۲۰ گرم از خلال‌های چغندرقرمز را داخل سرنگ ریخته و با اعمال فشار به پیستون سرنگ، حدود ۱۰ mL محلول رنگی چغندرقرمز استخراج گردید.یک میلی‌لیتر از محلول رنگی، به وسیله یک افشانک، به یک گرم کلاله ذرت که روی شیشه ساعت پهن شده بود، ۵ تا ۶ بار اسپری شده و سپس اجازه داده شد تا خشک گردد. همچنین زعفران با خامه زرد رنگ آن به عنوان یکی از انواع تقلب نیز به کار رفت. برای تهیه آنالیت مورد نیاز در آزمون‌های زبان الکترونیک، محلول آبی زعفران با غلظت $0{,}5\ g\ L^{-1}$ در آب مقطر با خلوص بالا تهیه گردید. به این منظور، ۵۰mg زعفران با استفاده از ترازوی با دقت ±۱mg وزن شد و سپس در هاون کوبیده شد و به حالت پودر آماده گردید. سپس به میزان ۹۰cc آب مقطر به نمونه اضافه شد. محلول سپس با استفاده از همزن مغناطیسی با سرعت ۱۰۰۰rpm و به مدت ۱ ساعت، در غیاب نور و در دمای محیط هم‌زده شد. پس از این مرحله، مگنت از داخل محلول بیرون آورده شد و با اضافه کردن آب مقطر به حجم ۱۰۰cc رسانده شد. محلول به دست آمده سپس از فیلتر با روزنه‌های با قطر µm ۰,۴۵ (PTFE) عبور داده شد و با نسبت ۱:۱۰ با آب مقطر رقیق گردید (Campo et al, 2009). به منظور تهیه نمونه‌های زعفران تقلبی، پودر زعفران نمونه‌های انتخابی (نمونه ۱ و نمونه ۶) به میزان ۵۰-۱۰٪ و با نسبت‌های ۱۰٪ (۹۰:۱۰، ۸۰:۲۰، ۷۰:۳۰، ۶۰:۴۰ و ۵۰:۵۰) (وزنی/وزنی) با پودر گلرنگ و کلاله رنگ شده ذرت مخلوط گردید. سپس محلول آبی این ترکیبات نیز مانند روش ذکر شده در بالا تهیه گردید. به منظور تهیه زعفران تقلبی با رنگ‌های شیمیایی متیل اورانژ و تارترازین از دو روش استفاده گردید. به این منظور از رنگ کردن خامه‌های زعفران با این دو

رنگ شیمیایی و سپس تهیه محلول آبی این نمونه‌ها و نیز اضافه کردن متیل اورانژ و تارترازین با غلظت $1 mg\ ml^{-1}$ به محلول استاندارد زعفران اصل، استفاده گردید (Zougagh et al, 2005).

۲-۲- پیاده‌سازی سامانه زبان الکترونیک

به منظور انجام آزمایش‌های زبان الکترونیک و قرارگیری الکترودها در آنالیت (محلول) از محفظه نمونه به حجم ۱۰ میلی‌لیتر استفاده گردید. جهت جلوگیری از اثرات نور بر روی آزمایش‌ها، این محفظه با استفاده از فویل پوشانده شد.

به منظور اندازه‌گیری‌های مربوط به زبان الکترونیک، ابتدا محلول زعفران بر طبق آنچه که در بخش قبل گفته شد، آماده گردید و ویژگی‌های اصلی آن با توجه به استاندارد ایزو ۳۶۳۲ (ISO 3632. 2011) تعیین شد. آزمایش‌های الکتروشیمی با استفاده از الکترودهای صفحه چاپی خریداری شده از شرکت دراپ سنس (اسپانیا) انجام گردید. الکترودها در برگیرنده یک پیکربندی سه الکترودی سنتی است که روی یک نوار مشابه چاپ شده‌اند. الکترودها شامل الکترود کاری (قطر ۴ mm)، الکترود جریان و الکترود مرجع هستند (شکل ۱).

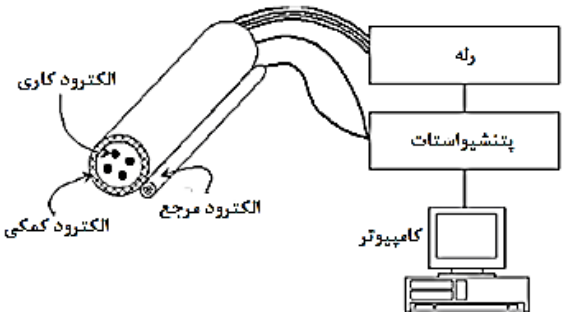


شکل ۱: الکترود نمونه صفحه چاپی (الکترود پایه کربنی).

الکترودها به یک پتنشیواستات (µStat 400 BioPotentiostat/Galvanostat) ویژه این الکترودها، ساخت شرکت دراپ سنس همراه با یک جعبه کانکتور DSC متصل شدند. شکل ۲ طرح‌واره سامانهٔ زبان الکترونیک طراحی شده را نشان می دهد.

در مرحله اول ۴ الکترودکاری، مورد آزمایش قرار گرفت و در مرحله دوم و پس از انتخاب بهترین الکترودهای کاری از نظر پاسخ به ترکیبات آنالیت‌های مورد نظر، با تزریق تالوسیانین مس اصلاح و آرایه اصلی الکترودی آماده گردید. آرایه اولیه شامل ۴ الکترود صفحه چاپی شامل الکترود کاری کربن، پلاتین، طلا و پروسیان آبی/ کربن بود.

پس از مشاهده ولتاموگرام‌های حاصل از الکترودها در محلول KCl با غلظت ۰٫۱ مولار، محلول 10^{-3} مولار کروسین و محلول زعفران و مقایسه آن‌ها، تصمیم بر انتخاب دو الکترود کاری کربن و طلا و اصلاح الکترود کربن با سه نوع تالوسیانین مس گرفته شد.



شکل ۲: طرح‌واره زبان الکترونیکی (Ivarsson et al, 2005).

سه الکترود کربن با تالوسیانین مس II اصلاح گردید که از تزریق ۱۰ µL مشتقات تالوسیانین Pc مورد نظر (۱۰mM در کلروفورم) با استفاده از سرنگ ۵۰µL بر روی سطح الکترود کاری (کربن) انجام شد. پس از تزریق تالوسیانین بر روی سطح الکترود کاری، الکترودها به مدت چند ساعت به منظور خشک شدن تالوسیانین، در دمای محیط قرار گرفتند. سه الکترود اصلاح شده به صورت زیر تهیه گردید: الکترودهای اصلاح‌شده با تالوسیانین-اکتا-بوتوکسی-مس (II)(CuPco-but-SPE)، تالوسیانین-تترا-بوتیل-مس(II)(CuPctbut-SPE) و تالوسیانین-اکتاکیس-اکتیل‌اکسی-مس(II) (CuPco-ooxy-SPE). بنابراین آرایه حسگر زبان الکترونیک متشکل از ۵ الکترود کاری (کربن، طلا و ۳ الکترود کربن اصلاح شده) ساخته شد. برگشت‌پذیر بودن فرایند الکترودی مورد توجه قرار گرفت و به وسیله پتنشیواستات این فرایند در مراحل رفت و برگشت، کنترل شد. ولتاموگرام‌های چرخه‌ای با سرعت روبش ۵۰mV.s-1 (Apetrei et al, 2013; Fanjul-Bolado et al, 2007) و از ۱- تا ۱ ولت، ثبت گردید.

۲-۳- پردازش داده‌ها و استخراج ویژگی

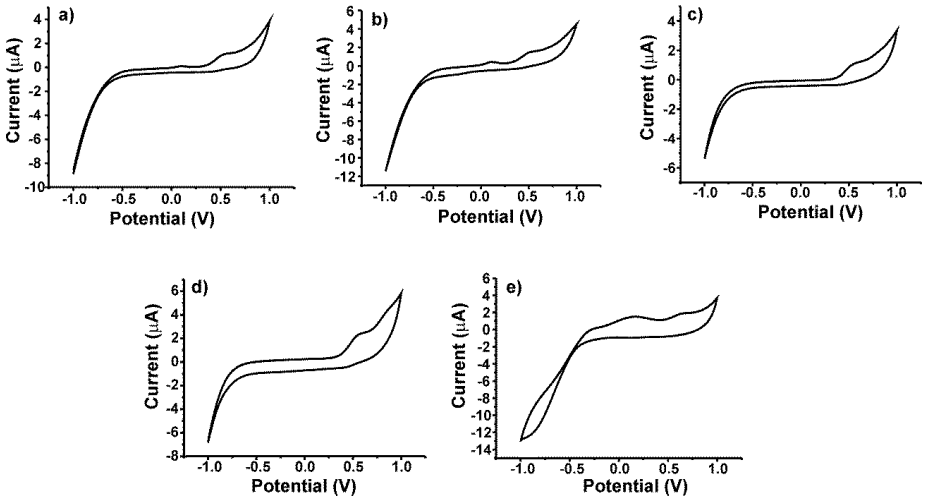
ابتدا سیگنال‌های به دست آمده در رایانه به صورت داده‌های خام ثبت و ذخیره می‌شوند. این داده‌ها باید پیش‌پردازش شوند، به این معنی که با استفاده از روش‌های میانگین‌گیری، نرمال‌سازی و... به شکل قابل استفاده توسط نرم‌افزارهای تحلیل در آیند. استخراج ویژگی‌ها از ولتاموگرام‌های حاصله صورت می‌گیرد. تعداد ویژگی‌های استخراجی از ولتاموگرام‌ها وابسته به تقسیم‌بندی نواحی روی هر نمودار و تعداد حسگرهای موجود در آرایه است که در حین کار

تعیین می‌گردد. پیش پردازش ولتاموگرام‌های چرخه‌ای با استفاده از روش کاهش داده‌ها براساس نمودارهای از پیش تعریف شده "پنجره زنگوله‌ای شکل" پاسخ با نام کرنل به منظور استخراج اطلاعات مفید از سیگنال‌های ولتامتری انجام شد (Apetrei et al, 2007). این اطلاعات به عنوان ماتریس ورودی در روش‌های تحلیل داده مورد استفاده قرار می‌گیرند. بنابراین با توجه به وجود تعداد ۵ حسگر در آرایه زبان الکترونیک و ده ناحیه در تقسیم‌بندی ولتاموگرام‌ها، از هر ولتاموگرام حاصل از هر نمونه زعفران ۵۰ ویژگی به دست آمد. پس از این مراحل، داده‌های پیش پردازش شده، به روش‌های مختلف تحلیل و ویژگی‌ها به عنوان ورودی روش‌های تحلیلی آماری به منظور طبقه‌بندی و تشخیص زعفران اصلی و تقلبی استفاده گردید.

۳- نتایج و بحث

در این پژوهش، ابتدا رفتار الکتروشیمی حسگرهای مورد استفاده مورد ارزیابی قرار گرفت. مطالعه رفتار الکتروشیمی با استفاده از ۴ الکترود صفحه چاپی، کربن، طلا، پلاتین و کربن/پروسیان آبی در محلول ۰,۱ مولار KCl (به عنوان آنالیت استاندارد) و نمونه‌های زعفران آزمایش و مقایسه گردید و مشاهده شد شکل و موقعیت پیک‌ها در محلول KCl، وابسته به طبیعت شیمیایی الکترود کاری است. پاسخ الکترودها به آنالیت‌های مورد استفاده، ولتاموگرام‌های یکسانی را در تکرارهای مختلف نشان داد و از قابلیت تکرار و قابلیت تولید مشابه بسیار بالایی برخوردار بودند به گونه‌ای که در همه آزمایش‌ها انحراف معیار کمتر از ۵٪ بود. الکترودها همچنین در محلول زعفران با ویژگی‌های حسی متفاوت قرار گرفتند. ولتاموگرام‌های چرخه‌ای (CV) انتقال و تغییرات در شدت پیک‌های وابسته به مواد الکترودها را نشان می‌دهد. این تغییرات به دلیل واکنش میان ترکیبات موجود در محلول زعفران و سطح الکترود کاری اصلاح شده با دو لایه ماده حسی است. با توجه به نتایج ذکر شده حاصل از آزمایش‌های اولیه و بررسی ولتاموگرام‌های حاصل از عملکرد ۴ الکترود کاری، الکترودهای پلاتین و کربن/پروسیان آبی به دلیل مشکل قابل تکرار نبودن ولتاموگرام‌های آن‌ها در زعفران، از آرایه زبان الکترونیک کنار گذاشته شدند. بنابراین آزمایش‌های بعد با استفاده از آرایه‌ای ۵ حسگر متشکل از الکترودهای کربن، طلا و الکترودهای کربن اصلاح شده با مشتقات تالوسیانین مس، به منظور آنالیز نمونه‌های زعفران با ویژگی‌های متفاوت انجام شد. تالوسیانین مس ویژگی‌های الکتروکاتالیزوری دارد که می‌تواند به وسیله یون فلزی مرکزی و همچنین جانشین کردن آن با مواد الکتروفعال موجود در محلول، در واکنش‌های الکتروشیمی به عنوان کاتالیزور شرکت کند. ولتاموگرام‌های چرخه‌ای حاصل از آرایه حسگری در محلول زعفران با سرعت روبش ۵۰mV.s-1 در شکل ۳ برای زعفران اصلی به تصویر کشیده شده است. ویژگی‌های استخراج شده از ولتاموگرام‌ها نشانگر واکنش اجزاء الکتروفعال موجود در زعفران از قبیل

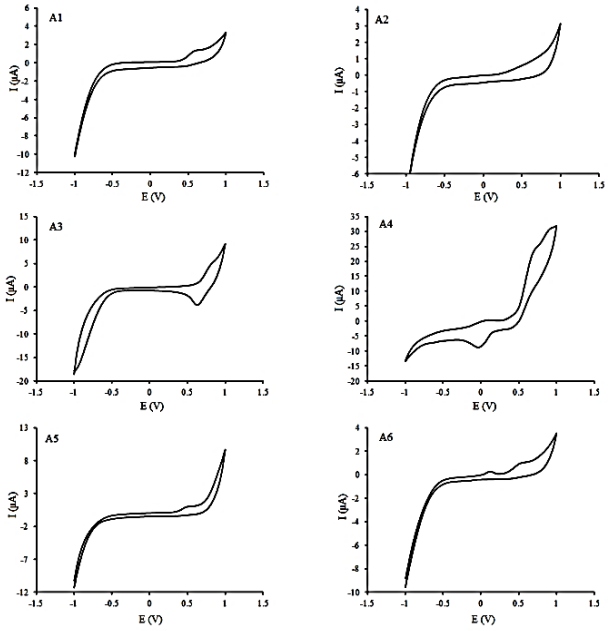
کروسین (ترکیب اصلی عامل رنگ در زعفران) و نیز پلی‌فنول‌ها مانند کامپفرول است (Psotova et al, 2004; Dar et al, 2013). این بدان معنی است که پاسخ ولتامتری الکترودها به محلول هر نمونه زعفران، ویژه آن نمونه است. به علاوه، هر الکترود در نمونه‌های مختلف زعفران پاسخ‌های متفاوتی را نشان می‌دهد. چنین الگویی از پاسخ حسگرها می‌تواند به عنوان رد اثر ویژگی‌های زعفران مورد توجه قرار گیرد.



شکل ۳: ولتاموگرام‌های چرخه‌ای به دست آمده با استفاده از الکترودهای اصلاح شده با تالوسیانین در محلول زعفران. (a) $CuPc^{tbut}$-SPE، (b) $CuPc^{o\text{-}but}$ -SPE، (c) $CuPc^{o\text{-}ooxy}$-SPE، (d) C-SPE، (e) Au-SPE.

همچنین محلول‌هایی از ترکیب زعفران با گلرنگ، کلاله ذرت، خامه زعفران و رنگهای مصنوعی تارترازین و متیل اورانژ آماده گردید و با آرایه ۵ حسگری مورد آزمایش قرار گرفت. تعدادی از ولتاموگرام‌های حاصل از آزمایش‌ها، به عنوان نمونه در شکل ۴ آورده شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌گردد، شکل و مکان پیک‌های هر ولتاموگرام در محلول‌های مختلف، ویژه همان ماده است و پیک‌های هر ولتاموگرام، وابسته به اجزاء ردوکس در محلول مورد نظر است. همچنین با توجه به نتایج حاصل از آرایه حسگری زبان الکترونیک، ولتاموگرام‌های حاصل از ترکیب زعفران با مواد ذکر شده نیز متفاوت از محلول خالص زعفران بود. تغییرات در شدت و مکان پیک‌ها می‌تواند قابلیت زبان الکترونیک را در تشخیص زعفران اصلی از ترکیبات مشابه که با عنوان زعفران عرضه می‌گردد نشان دهد. بنابراین حسگرهای زبان الکترونیک می‌تواند جایگزین روش‌های زمان‌بر و پیچیده متداول از قبیل HPLC در تشخیص و تعیین ترکیبات زعفران و تعیین درجه خلوص زعفران گردد. زعفران اصلی از نوع تقلبی و ترکیب آن با دیگر مواد (گلرنگ، کلاله ذرت، متیل اورانژ و تارترازین) با نسبت‌هایی که قبلا ذکر شد، با استفاده از فناوری زبان

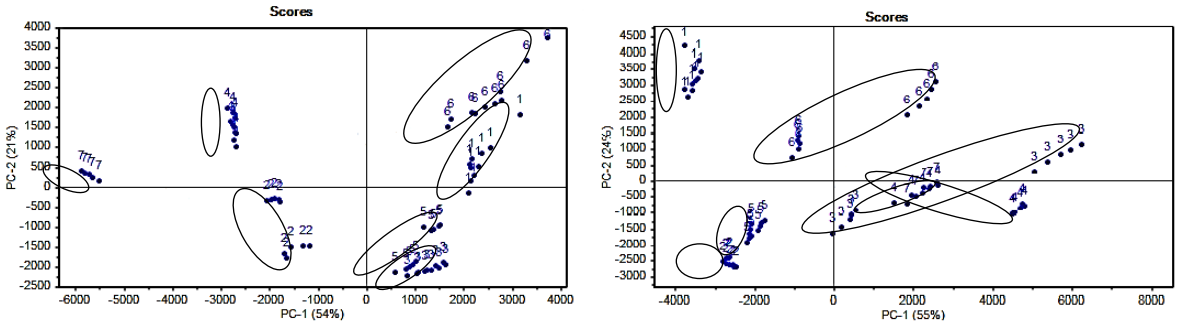
الکترونیک و روش تشخیص الگوی PCA بر اساس پاسخ حسگرهای مورد استفاده، تشخیص داده شد. ماتریس داده‌ها از طریق اعمال روش کرنل به ولتاموگرام‌ها به دست آمد و با استفاده از روش PCA به منظور بررسی ویژگی-های نمونه‌ها تحلیل گردید. دو مولفه اصلی بیشترین واریانس در مجموعه داده‌ها را نشان دادند و به منظور نمایش نمودار اسکور داده‌ها مورد استفاده قرار گرفت. نمودارهای اسکور در شکل ۵ نشان داده شده است که در آن گروه-های زعفران و ترکیب آن با مواد دیگر متمایز شده‌اند.



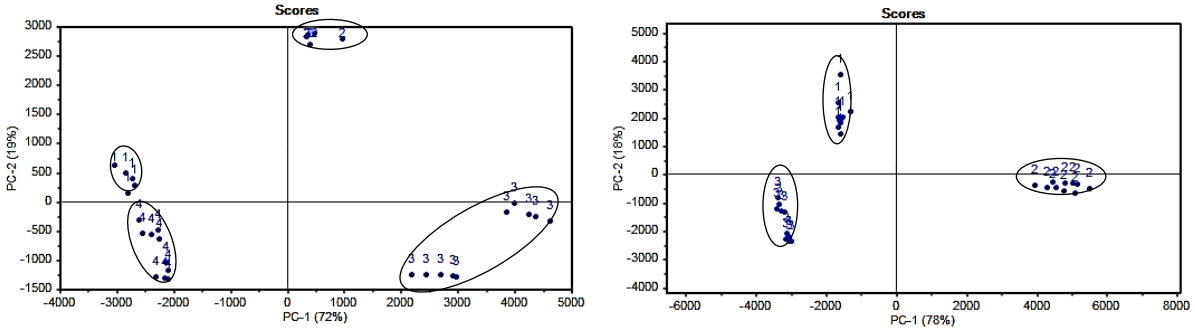
شکل ۴: ولتاموگرام حسگر کربن اصلاح شده با تالوسیانین ($CuPc^{tbut}$-SPE) در محلول‌های: A۱: زعفران، A۲: گلرنگ، A۳: کلاله رنگ‌شده ذرت، A۴: ترکیب زعفران با تارترازین، A۵: ترکیب زعفران با متیل اورانژ، A۶: خامه زعفران.

نمودار اسکور موقعیت پیش‌بینی شده اجزاء مورد نظر را بر روی مولفه‌های اصلی نشان می‌دهد. براساس موقعیت هر گروه در نمودار اسکور (موقعیت با مقادیر مثبت یا منفی بر روی نمودار)، اختصاص دادن یک معنی خاص به هر یک از مؤلفه‌ها ممکن است. نتایج برای زعفران و گلرنگ به طور کامل از همدیگر جدا و در دو قسمت چپ و راست نمودار اسکور در شکل ۵ (الف) توزیع شده‌اند که نشان دهنده تفاوت در ترکیب شیمیایی این دو ماده است. همچنین در این شکل، نمونه‌های دیگر با توجه به نسبت‌های گلرنگ ترکیب شده با زعفران در نمودار اسکور توزیع شده‌اند. در شکل ۵ (ب) نیز زعفران و کلاله رنگ شده ذرت از هم جدا قرار گرفته‌اند. همان‌گونه که مشاهده می-

گردد، توزیع نمونه‌های ۲۰ و ۳۰ درصد ترکیب زعفران و کلاله ذرت با نمونه ۱۰۰٪ کلاله ذرت همپوشانی دارد که می‌توان دلیل آن را در وجود دو نمونه زعفران و تمایز این دو نمونه زعفران ذکر کرد. همچنین زبان الکترونیک قابلیت بالایی در تشخیص ترکیب زعفران و ترکیب پودر آن با پودر رنگ‌های شیمیایی نشان داد (شکل ۵ ج). در شکل ۵ (د) نتایج نشان‌دهنده تمایز کامل نمونه زعفران از نمونه ترکیبی آن با خامه زعفران و خامه رنگ شده با رنگهای شیمیایی متیل اورانژ و تارترازین است. نمودارهای اسکور دو مولفه اصلی (PC1-PC2) واریانس ۷۵، ۷۹، ۹۱ و ۹۶ درصد را به ترتیب برای ترکیب زعفران با گلرنگ، کلاله رنگ‌شده ذرت، خامه رنگ‌شده و رنگ‌های شیمیایی تارترازین و متیل اورانژ نشان داد. همچنین پاسخ حسگرها به عنوان ورودی روش تحلیل تفکیک خطی در نظر گرفته شد. این روش از روش‌های پر کاربرد طبقه‌بندی و یک روش طبقه‌بندی پارامتری احتمالاتی است که واریانس بین گروه‌ها را بیشینه کرده و واریانس درون کلاس‌ها را با استفاده ازانتقال داده‌ها از فضای با بعد بالاتر به بعد پایین‌تر، به حداقل می‌رساند. LDA توابع تفکیک را محاسبه و مشابه روش PCA نتیجه‌ای دو بعدی از داده‌های آموزش را ایجاد می‌کند. تفاوت روش PCA با LDA در این است که PCA رابطه داده‌ها با کلاس‌های مورد نظر را نشان نمی‌دهد. به این منظور تحلیل تفکیک خطی برای ارائه مدل طبقه‌بندی مناسب اجرا شد. روش LDA اعمال شده به مجموعه داده‌ها، درصد تشخیص ۸۷,۹۳٪، ۸۶,۲۱٪، ۹۶,۱۵٪ و ۱۰۰٪ را به ترتیب برای نمونه‌های زعفران و ترکیب آن با گلرنگ، کلاله رنگ‌شده ذرت، رنگ‌های تارترازین و متیل اورانژ و خامه رنگ‌شده زعفران، نشان می‌دهد. نمودار اسکور تفکیک برای مدل طبقه‌بندی ویژگی‌های به دست آمده از داده‌های زبان الکترونیک (شکل ۶) میزان تفکیک نمونه‌ها را نشان می‌دهد.

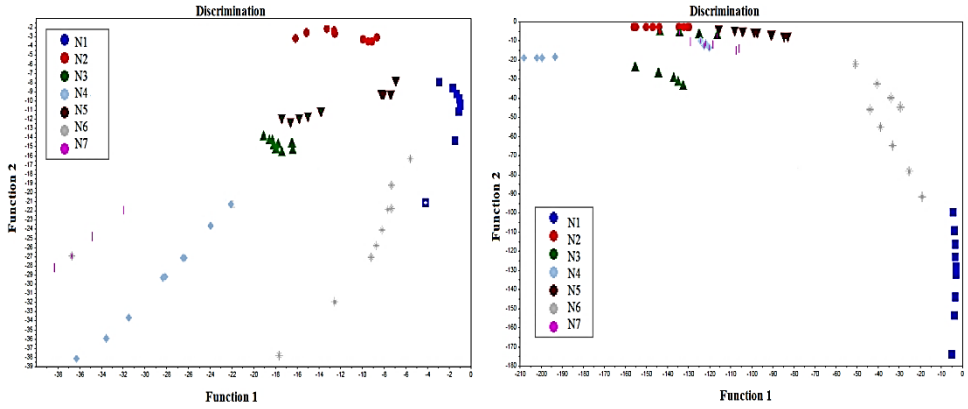


(الف)

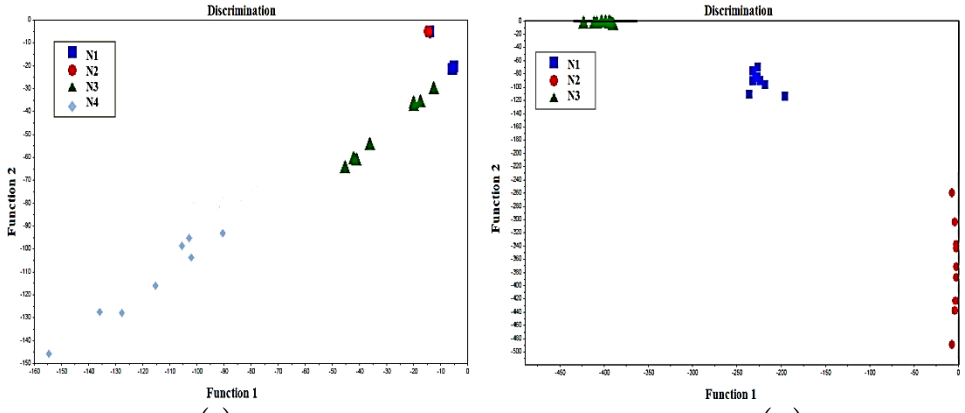


(ج)

شکل ۵. نمودار اسکور PCA برای ترکیب زعفران و: (الف) کلاله ذرت، (ب) گلرنگ، (ج) متیل اورانژ و تارترازین ، (د) خامه، خامه رنگ‌شده با متیل اورانژ و تارترازین.



(الف)



(د) (ج)

شکل ۶. نمودار اسکور LDA نمونه‌های زعفران و ترکیب آن با: (الف) کلاله ذرت، (ب) گلرنگ، (ج) متیل اورانژ و تارترازین، (د) خامه زعفران و خامه رنگ شده با متیل اورانژ و تارترازین.

۴- نتیجه‌گیری

در این پژوهش سامانه چند حسگری زبان الکترونیک قابل حمل برپایه الکترودهای صفحه چاپی، به منظور ایجاد روشی سریع، حساس، قابل اطمینان و کم هزینه جهت تحلیل ویژگی‌های متفاوت زعفران و نمونه‌های تقلبی آن، توسعه و اجرا گردید. منحنی‌های به دست آمده با استفاده از زبان الکترونیک ولتامتری چرخه‌ای، اطلاعات قابل مقایسه‌ای را فراهم کرده و با توجه به نتایج حاصل از روش PCA و روش طبقه‌بندی LDA، عملکرد مناسبی برای تمایز بین نمونه‌ها دارد. با توجه به اینکه اولین بار است که روش حسی شیمیایی (زبان الکترونیک) برای تحلیل زعفران استفاده شده است، نتایج حاصله توانایی این سامانه را برای تشخیص نمونه‌های مختلف زعفران و نوع تقلبی آن را در زمینه کنترل کیفیت زعفران آشکار می‌سازد. رفتار تشخیصی این سامانه بسیار مهم است چرا که تشخیص وجود مقدار کمی از ترکیبات اضافه شده توسط آن امکان‌پذیر است و می‌تواند برای تجزیه و تحلیل انواع دیگر تقلب استفاده شود. همچنین استفاده از انواع مختلف مواد حساس، انتخاب‌گری و قابلیت تمایز نمونه‌ها توسط آرایه را بهبود می‌بخشد. این روش نسبت به روش‌های تحلیلی کلاسیک مورد استفاده برای شناسایی تقلب در زعفران سریع‌تر، مقرون به صرفه و ساده‌تر هستند و می‌توانند به عنوان جایگزینی برای آن‌ها به کار روند.

منابع و مآخذ

۱. پرمه، ز. حسینی، م. نبی زاده، الف. محبی، ح. ۱۳۸۸. ظرفیت‌هاي صادراتي و بازارهاي هدف زعفران ايران. فصلنامه پژوهش‌نامه بازرگاني. شماره ۱، ۹۵-۵۹.
۲. معاشری، س.م. ناظري، س.م. خضري، ح. قرقلو، م. گرگاني، م. توسلي، ع. ۱۳۸۹. تقلبات زعفران- گسترش کاربرد رنگ هاي شيميايي مصنوعي در زعفران.
3. Anastasaki, E.G., Kanakis, C.D., Pappas, C.S., Tarantilis, P.A., Polissiou, M.G. 2008. Geographical origin of Saffron spice by Mid-Infrared Spectroscopy (MIR). 7th Joint meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF, Natural products with pharmaceutical, nutraceutical, cosmetic and agrochemical interest, Athens, GREECE.
4. Apetrei, C., Gutierrez, F., Rodriguez-Mendez, M.L., Saja, J.A. 2007. Novel method based on carbon paste electrodes for the evaluation of the bitterness of virgin olive oils. Sensors and Actuators (B). 121, 567- 575.
5. Apetrei, I.M., Apetrei, C. 2013. Voltammetric e-tongue for the quantification of total polyphenol content in olive oils. Food Research International. 54(2), 2075-2082.
6. Baldwin, E.A., Bai, J., Plotto, A., Dea, S. 2011. Electronic Noses and Tongues: Applications for the Food and Pharmaceutical Industries. Sensors. 11(5), 4744-4766.

7. Campo, C.P., Garde-Cerdan, T., Sanchez, A.M., Maggi, L., Carmona, M., Alonso, G.L. 2009. Determination of free amino acids and ammonium ion in saffron (Crocus sativus L.) from different geographical origins. Food Chemistry. 114, 1542–1548.
8. Carmona, M., Martinez, J., Zalacain, A., Rodriguez-Mendez, M.L., Saja, J.A., Alonso, G.L. 2006. Analysis of saffron volatile fraction by TD–GC–MS and e-nose. European Food Research Technology. 223, 96–101.
9. Dar, R.A., Brahman, P.K., Khurana, N., Wagay, J.A., Lone, Z.A., Ganaie, M.A., Pitre, K.S. 2013. Evaluation of antioxidant activity of crocin, podophyllotoxin and kaempferol by chemical, biochemical and electrochemical assays. Arabian Journal of Chemistry. In Press, Corrected Proof. Available online 20 February 2013.
10. Fanjul-Bolado, P., Queipo, P., Lamas-Ardisana, P.J., Costa-Garcia, A. 2007. Manufacture and evaluation of carbon nanotube modified screen-printed electrodes as electrochemical tools. Talanta. 74, 427-433.
11. Fanjul-Bolado, P., Hernandez-Santos, D., Lamas-Ardisana, P.J., Martin-Pernia, A., Costa-Garcia, A. 2008. Electrochemical characterization of screen-printed and conventional carbon paste electrodes. Electrochimica Acta. 53, 3635-3642.
12. Gay, M., Apetrei, C., Nevares, I., Alamo, M., Zurro, J., Prieto, N., Saja, J.A., Rodriguez-Mendez, M.L. 2010. Application of an electronic tongue to study the effect of the use of pieces of wood and micro-oxygenation in the aging of red wine. Electrochim Acta. 55, 6782-6788.
13. Ghasemi-Vamankhasti, M., Mohtasebi, S.S., Rodriguez-Mendez, M.L., Lozano, J., Razavi, S.H., Ahmadi, H. 2011. Potential application of electronic nose technology in brewery. Trends in food Science and Technology. 22, 165-174.
14. Haghighi, B., Feizy, J., Hemati-Kakhki, A. 2007. LC Determination of Adulterated Saffron Prepared by Adding Styles Colored with Some Natural Colorants. Chromatographia. 66 (5/6), 325-332.
15. ISO 3632. 2011. International Organization for Standarization. Saffron (*Crocus sativus* L.). Part 1: Specification, Part 2: Test methods. Geneva: ISO.
16 Ivarsson, P., Krantz-Rulcker, C., Winquist, F., Lundstrom, I. 2005. A Voltammetric Electronic Tongue. Chemical Senses. 30(1), 258-259.
17. Janczyk, M., Kutyla, A., Solohub, K., Wosicka, H., Cal, K., Ciosek, P. 2011. Potentiometric Electronic Tongues for Foodstuff and Biosample Recognition-An Overview. Sensors. 11, 4688-4701.
18. Kadara, R.O., Jenkinson, N., Banks, C.E., 2009. Characterisation of commercially available electrochemical sensing platforms. Sensors and Actuators (B). 138, 556-562.
19. Labrador, R.H., Masot, R., Alcaniz, M., Baigts, D., Soto, J., Martinez-Manez, R., Garcia-Breijo, E., Gil, L., Barat, J.M. 2010. Prediction of NaCl, nitrate and nitrite contents in minced meat by using a voltammetric electronic tongue and an impedimetric sensor. Food Chemistry. 122, 864-870.
20. Medina-Plaza, C., Revilla, G., Munoz, R., Fernandez-Escudero, J.A., Barajas, E., Medrano, G., Saja, J.A., Rodriguez-Mendez, M.L. 2014. Electronic tongue formed by sensors and biosensors containing phthalocyanines as electron mediators, Application to the analysis of red grapes. Journal of Porphyrins and Phthalocyanines. 18, 76-86.
21. O'Halloran, M.P., Pravda, M., Guilbault, G.G. 2001. Prussian Blue bulk modified screen-printed electrodes for H_2O_2 detection and for biosensors. Talanta. 55, 605-611.
22. Pedroza, M.A., Carmona, M., Pardo, F., Salinas, M.R., Zalacain, A. 2012. Waste grape skins thermal dehydration: potential release of colour, phenolic and aroma compounds into wine. CyTA- Journal of Food. 10(3), 225-234.

23. Pioggia, G., Francesco, F.D., Marchetti, A., Ferro, M., Ahluwalia, A. 2007. A composite sensor array impedentiometric electronic tongue- Part I. Characterization. Biosensors and Bioelectronics. 22, 2618-2623.
24. Prieto, N., Gay, M., Vidal, S., Aagaard, O., Saja, J.A., Rodriguez-Mendez, M.L. 2011. Analysis of the influence of the type of closure in the organoleptic characteristics of a red wine by using an electronic panel. Food Chemistry. 129, 589-594.
25. Psotova, J., Chlopcikova, S., Miketova, P., Hrbac, J., Simanek, V. 2004. Chemoprotective effect of plant phenolics against anthracycline-induced toxicity on rat cardiomyocytes. Part III. Apigenin, baicalelin, kaempherol, luteolin and quercetin. Phytother Research. 18, 516-521.
26. Renedo, O.D., Alonso-Lomillo, M.A., Arcos Martinez, M.J. 2007. Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications. Talanta. 73, 202-219.
27. Riul, J.A., Dantas, C.A.R., Miyazaki, C.M., Oliveira, J.O.N. 2010. Recent advances in electronic tongues. Analyst. 135, 2481-2495.
28. Rodriguez-Mendez, M.L., Parra, V., Apetrei, C., Villanueva, S., Gay, M., Prieto, N., Martinez, J., Saja, J.A. 2008. E-tongue based on voltammetric electrodes modified with electroactive materials.Applications. Microchimica Acta. 163, 23-31.
29. Scampicchio, M., Benedetti, S., Brunetti, B., Mannino, S. 2006. Amperometric Electronic Tongue for the Evaluation of the Tea Astringency. Electroanalysis. 18, 1643-1648.
30. Vlasov, Y.G., Ermolenko, Y.E., Legin, A.V., Rudnitskaya, A.M., Kolodnikov, V. 2010. Chemical sensors and their systems. Journal of Analytical Chemistry. 65, 890–898.
31. Wang, J., Tian, B. 1992. Screen-Printed Stripping Voltammetric/Potentiometric Electrodes for Decentralized Testing of Trace Lead. Analytical Chemistry. 64, 1706-1709.
32. Wang, J., Tian, B., Nascimento, V.B., Angnes, L. 1998. Performance of screen-printed carbon electrodes fabricated from different carbon inks. Electrochimica Acta. 43(23), 3459- 3465.
33. Winquist, F. 2008. Voltammetric electronic tongues-Basic principles and applications. Microchimica Acta. 163, 3-10.
34. Winterhalter, P., Straubinger, R.M. 2000. Saffron. Renewed interest in an ancient spice. Food Review International. 16(1), 39–59.
35. Zougagh, M., Rios, A., Valcarcel, M. 2005. An automated screening method for the fast, simple discrimination between natural and artificial colorants in commercial saffron products. Analytica Chimica Acta. 535, 133-138.
36. Zalacain, A., Ordoudi, S.A., Diaaz-Plaza, E.M., Carmona, M., M. Zquez, I.B., Tsimidou, Z., Alonso, G.L. 2005. Near-infrared spectroscopy in saffron quality control: determination of chemical composition and geographical origin. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 53, 9337-9341.

An electronic tongue design for the detection of adulteration in saffron samples

Abstract

Saffron is popular because of its delicate aroma, attractive color and medical properties and is used as a food additive. Moreover, due to the high cost of saffron, adulteration is rampant in the local market. In this research, a portable electronic tongue system consisted of an array of five voltammetric sensors based on screen-printed electrodes (SPE) was developed and successfully used to discriminate adulteration in saffron samples. Adulterated saffron samples were prepared by combining of original saffron with different proportions of yellow styles, safflower, dyed corn stigma, and chemical colors, tartrazine and methyl orange. The voltammetric responses obtained from the sensor array of the electronic tongue were specific for each type of saffron and there was observed that shape and place of the peaks in each voltammogram regard to different sample solutions were various and specific for, and were depend to the redox components of the corresponding samples. The extracted features from obtained signals and voltammograms, after preprocessing, by the sensory analysis were used for processing data by Principal Components Analysis (PCA) and linear discriminant analysis (LDA). As observed from PCA scores plot, all the samples could be clearly discriminated from each other by the first two components (PC1-PC2). Also, the result of classification of samples revealed that e-tongue system can discriminate and detect the adulteration in saffron samples. Taking into high ability of this system, these results indicate that these new array of sensors, can be valuable tools for classification of saffron samples in terms of quality and detecting the adulteration in saffron.

Keywords: Saffron, Electronic Tongue, Adulteration, PCA, LDA.