

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

کبری حیدریگی^{۱*}، سیدسعید محتسبی^۲، شاهین رفیعی^۲، مهدی قاسمی و رنامخواستی^۳، کرامت‌الله رضایی^۴،
ماریا لوز رودریگوز - مندز^۵.

۱. استادیار گروه مکانیک ماشین‌های کشاورزی، دانشگاه ایلام

۲. استاد گروه مکانیک ماشین‌های کشاورزی، دانشگاه تهران

۳. استادیار گروه مکانیک ماشین‌های کشاورزی، دانشگاه شهرکرد

۴. استاد گروه صنایع غذایی، دانشگاه تهران

۵. استاد گروه مهندسی شیمی، دانشگاه والادولید، اسپانیا

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۷ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۲/۸)

چکیده

زعفران به دلیل عطر، رنگ، و خواص دارویی آن محصولی شناخته شده و به عنوان افزودنی مهم خوراکی، شایان توجه است. علاوه بر این، به دلیل قیمت بالای زعفران، تقلب در آن در بازارهای جهانی متداول است. در این پژوهش، سامانه قابل حمل زبان الکترونیک دارای آرایه‌ای از حسگرهای ولتامتری بر پایه الکترودهای صفحه چاپی (SPE) به منظور تشخیص تقلب در زعفران، شرح و بسط یافت. انواع زعفران تقلبی از مخلوط کردن زعفران اصلی با خامه زعفران، گلرنگ، کلاله رنگ شده ذرت، و رنگ‌های شیمیایی تارترازین و متیل اورنج، تهیه شده است. شکل و مکان پیک‌های هر ولتاموگرام حاصل از آرایه حسگری زبان الکترونیک در محلول‌های متفاوت و ویژه همان ماده و پیک‌های هر ولتاموگرام وابسته به اجزای ردوکس در محلول مورد نظر بود. ویژگی‌های استخراج شده از سیگنال‌های حاصل از سامانه زبان الکترونیک، با روش‌های تحلیل مؤلفه‌های 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 شود.

کلیدواژگان: تقلب، زبان الکترونیک، زعفران، PCA، LDA.

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 آب‌وهوایی منطقه خاورمیانه، مرکز آسیا، و قسمتی از اروپا است (Parmeh *et al.*, 2009). کلاله‌های خشک شده زعفران از گران‌ترین ادویه‌های جهان هستند و ارزش غذایی بالایی دارند که به عنوان افزودنی خوراکی و همچنین داروی گیاهی به کار می‌روند (Haghighi *et al.*, 2007). کیفیت، درجه بندی اقتصادی، و خواص حسی زعفران به محتوای ترکیباتی چون استرهای کروسستین (رنگ، حلال در آب)، پیکروکروسین (مزه تلخ، بی‌رنگ)، سافرانال (روغن فرار)، و فلاونوئیدهایی از قبیل

کامپفرول (نوعی آنتی‌اکسیدان) وابسته است (Pedroza *et al.*, 2007; Carmona *et al.*, 2012). قیمت زعفران به دلیل ترکیبات باارزش و خواص بالای آن و همچنین از نظر برداشت دشوار آن، بسیار بالاست. کلاله‌های خشک شده زعفران، گران‌ترین ماده گیاهی و ادویه در جهان است که قیمت بالا و افزایش روزافزون تقاضا برای خرید، منجر به افزایش تقلب در آن با استفاده از ترکیب مواد رنگی با ارزش کمتر و غالباً مضر برای سلامتی انسان، شده است. روش‌های متداول در ارزیابی کیفی زعفران شامل کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) (Campo *et al.*, 2005; Zalacain *et al.*, 2009; *al.*، 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) است. اخیراً تحقیقاتی به منظور تشخیص زعفران تقلبی با استفاده از روش‌های مرسوم مانند کروماتوگرافی صفحه‌ای (Maasheri *et al.*

* نویسنده مسئول: Kobra.heidarbeigi@gmail.com

برای الکتروود کاری می‌تواند شامل مواد گوناگون 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 پایه‌نقره به‌عنوان الکتروود مرجع باشد. این وسایل الکتروودهای کاری، مرجع و جریان را به‌صورت یک‌جا در یک سلول الکتروشیمیایی شامل می‌شود و ارزان، یک‌بار مصرف، و با قابلیت تولید مجدد، و استفاده آسان هستند و بنابراین به‌عنوان وسایل پرتابل کاربرد دارند (Wang and Tian, 1992; O'Halloran et al., 2001). الکتروودهای صفحه‌چاپی برای تحلیل مواد غذایی و نوشیدنی‌ها و همچنین تازگی مواد غذایی استفاده شدند. پاسخ الکتروود و رفتار الکتروشیمیایی حسگرهای زبان الکترونیک، بررسی و تحلیل شد. قابلیت آرایه حسگری به‌منظور تشخیص و طبقه‌بندی تقلب در زعفران، با استفاده از روش‌های تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) و تحلیل تفکیک خطی (LDA) ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه

نمونه‌های زعفران اصلی استفاده‌شده در این پژوهش در دو نوع، کلاله‌های قرمز زعفران (سرگل)، و زعفران همراه با خامه زردرنگ آن، از مزارع منطقه قائن (استان خراسان جنوبی، ایران) و شرکت نوین‌زعفران (مشهد، ایران) تهیه شد. گلرنگ، کلاله ذرت، و ریشه چغندر قرمز (بتا ولگاریس)^۴ به‌عنوان رنگ طبیعی برای رنگ کردن کلاله ذرت، از عطاری‌های استان البرز تهیه شد. همچنین رنگ‌های شیمیایی تارترازین و متیل اورانژ به‌عنوان رنگ‌های استفاده‌شده در رنگ‌آمیزی خامه زعفران و نیز اختلاط با پودر زعفران، به‌کار رفت. این دو ماده رنگی نیز از شرکت سیگما آلدردیج^۵ (اسپانیا) خریداری شد. نمونه‌ها در یخچال و در دمای ۴°C و تا زمان انجام آزمایش، دور از نور نگهداری شد. برای استخراج محلول رنگی از چغندر قرمز، از روش پرس کردن استفاده شد. در این روش ۲۰ گرم از خلال‌های چغندر قرمز را داخل سرنگ ریخته و با اعمال فشار به پیستون سرنگ، حدود ۱۰ mL محلول رنگی چغندر قرمز استخراج شد. یک میلی‌لیتر از محلول رنگی، با یک افشانک، به یک گرم کلاله ذرت که روی شیشه ساعت پهن شده بود، ۵ تا ۶ بار اسپری و سپس اجازه داده شد تا خشک شود. همچنین زعفران با خامه زردرنگ آن

(Parmeh et al., 2010) و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (al., 2010) انجام شده است. اما تاکنون ماشین یا سامانه ویژه‌ای برای تشخیص زعفران اصلی از زعفران تقلبی طراحی یا ساخته نشده است. فناوری زبان الکترونیک^۱ (تحلیل مایعات) از روش‌های جدیدی است که اخیراً در کشاورزی و به‌خصوص در زمینه بررسی کیفی مواد غذایی بسیار مورد توجه محققان قرار گرفته است و شامل آرایه‌ای از الکتروودهای انتخابی متصل به برنامه تشخیص الگو است (Baldwin et al., 2011). این سامانه‌های حسگری به‌طور گسترده در تحلیل مواد غذایی گوناگون از قبیل نوشیدنی‌ها و روغن‌ها استفاده شده‌اند (Gay et al., 2010; Ghasemi-Vamankhasti et al., 2011; Prieto et al., 2014; Medina-Plaza et al., 2014).

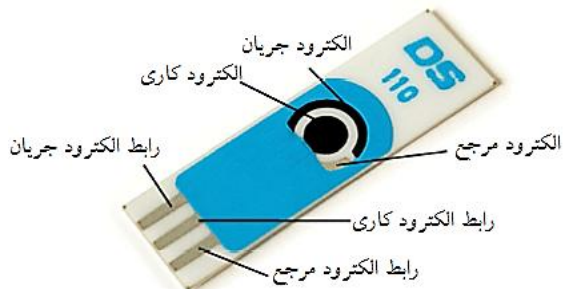
تاکنون فقط استفاده از یک سامانه بینی الکترونیک^۲ (ماشین بویایی) برای بررسی عطر نمونه‌های زعفران با منشأ جغرافیایی متفاوت، ساخته و استفاده شده است (Carmona et al., 2006). اما ماشین یا سامانه ویژه‌ای برای تشخیص زعفران اصلی از زعفران تقلبی مینی بر زبان الکترونیک طراحی یا ساخته نشده است. با توجه به قابلیت بالای این فناوری، در این تحقیق به سامانه مبتنی بر فناوری زبان الکترونیک برای تمیزدادن زعفران اصلی از زعفران تقلبی توجه شده است.

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

در این پژوهش آرایه‌ای از الکتروودهای صفحه‌چاپی^۳ در سامانه زبان الکترونیک استفاده شد. الکتروودهای صفحه‌چاپی با استفاده از قرارگیری و عملیات حرارتی لایه نازکی از یک ماده حساس روی ماده زمینه‌ای پلاستیکی یا سرامیکی ایجاد می‌شود (Wang et al., 1998; Fanjul-Bolado et al., 2008). مواد بسیاری به‌عنوان جوهر و مواد زمینه می‌توانند برای تولید حسگرهای ارزان و با حجم بالا استفاده شود. جوهر استفاده‌شده

4. Beetroot (Beta vulgaris L.)
5. Sigma Aldrich

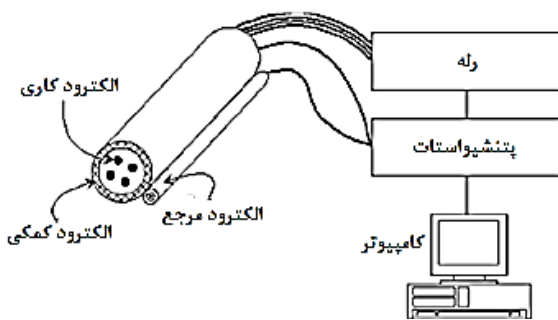
1. Electronic tongue
2. Olfaction machine
3. Screen-printed electrodes (SPE)



شکل ۱. الکتروود نمونه صفحه چاپی (الکتروود پایه کربنی)

الکتروودها به یک پتنتشیواستات (Stat 400 BioPotentiostat / Galvanostat) ویژهٔ این الکتروودها، ساخت شرکت دراپ سنس همراه با یک جعبهٔ کانکتور DSC متصل شدند. شکل ۲ طرح‌وارهٔ سامانهٔ زبان الکترونیکی طراحی شده را نشان می‌دهد.

در مرحلهٔ اول ۴ الکتروود کاری، آزمایش می‌شد و در مرحلهٔ دوم و پس از انتخاب بهترین الکتروودهای کاری از نظر پاسخ به ترکیبات آنالیت‌های مورد نظر، با تزریق تالوسیانین مس اصلاح و آرایهٔ اصلی الکتروودی آماده شد. آرایهٔ اولیه شامل ۴ الکتروود صفحهٔ چاپی مشتمل بر الکتروود کاری کربن، پلاتین، طلا، و پروسیان آبی/کربن بود. پس از مشاهدهٔ ولتاموگرام‌های حاصل از الکتروودها در محلول KCl با غلظت ۰/۱ مولار، محلول 10^{-3} مولار کروسیان و محلول زعفران و مقایسهٔ آن‌ها، تصمیم بر انتخاب دو الکتروود کاری کربن و طلا و اصلاح الکتروود کربن با سه نوع تالوسیانین مس گرفته شد.



شکل ۲. طرح‌وارهٔ زبان الکترونیک (Ivarsson et al., 2005)

سه الکتروود کربن با تالوسیانین مس II اصلاح شد که از تزریق $10 \mu\text{L}$ مشتقات تالوسیانین Pc مورد نظر (10 mM) در کلروفورم) با استفاده از سرنگ $50 \mu\text{L}$ بر سطح الکتروود کاری (کربن) انجام شد. پس از تزریق تالوسیانین روی سطح الکتروود کاری، الکتروودها به مدت چند ساعت به منظور خشک شدن تالوسیانین، در دمای محیط قرار گرفتند. سه الکتروود اصلاح شده به این صورت تهیه شد: الکتروودهای اصلاح شده با تالوسیانین - اکتا - بوتوکسی - مس (II) ($\text{CuPC}^{\text{o-but}}\text{-SPE}$)، تالوسیانین - تترا

به‌عنوان یکی از انواع تقلب نیز به کار رفت. برای تهیهٔ آنالیت لازم در آزمون‌های زبان الکترونیک، محلول آبی زعفران با غلظت 50 mg L^{-1} در آب مقطر با خلوص بالا تهیه شد. به این منظور، 50 mg زعفران با ترازوی با دقت $\pm 1 \text{ mg}$ وزن شد و سپس در هاون کوبیده و به حالت پودر آماده شد. به میزان 90 cc آب مقطر به نمونه اضافه شد. محلول با همزن مغناطیسی با سرعت 1000 rpm 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 100 cc رسانده شد. محلول به دست آمده از فیلتر با روزنه‌های با قطر $1 \mu\text{m}$ (PTFE) $0/45$ عبور داده و با نسبت ۱:۱۰ با آب مقطر رقیق شد (Campo et al., 2009). به منظور تهیهٔ نمونه‌های زعفران تقلبی، پودر زعفران نمونه‌های انتخابی به میزان ۵۰-۱۰ درصد و با نسبت‌های ۱۰ درصد (۹۰:۱۰، ۸۰:۲۰، ۷۰:۳۰، ۶۰:۴۰، و ۵۰:۵۰) (وزنی/وزنی) با پودر گلرنگ و کلالهٔ رنگ‌شدهٔ ذرت مخلوط شد. سپس محلول آبی این ترکیبات نیز مانند روش ذکر شده در بالا تهیه شد. به منظور تهیهٔ زعفران تقلبی با رنگ‌های شیمیایی متیل اورانژ و تارترازین از دو روش استفاده شد. به این منظور از روش رنگ کردن خامه‌های زعفران با این دو رنگ شیمیایی و تهیهٔ محلول آبی این نمونه‌ها و نیز اضافه کردن متیل اورانژ و تارترازین با غلظت 1 mg ml^{-1} به محلول استاندارد زعفران اصل، استفاده شد (Zougagh et al., 2005).

پیاده‌سازی سامانهٔ زبان الکترونیک

به منظور انجام آزمایش‌های زبان الکترونیک و قرارگیری الکتروودها در آنالیت (محلول) از محفظهٔ نمونه به حجم ۱۰ میلی‌لیتر استفاده شد. برای جلوگیری از تأثیر نور بر آزمایش‌ها این محفظه با فویل پوشانده شد.

به منظور اندازه‌گیری‌های مربوط به زبان الکترونیک، ابتدا محلول زعفران بر طبق آنچه که در بخش قبل گفته شد، آماده شد و ویژگی‌های اصلی آن با توجه به استاندارد ایزو ۳۶۳۲ (ISO 3632, 2011) تعیین شد. آزمایش‌های الکتروشیمی با استفاده از الکتروودهای صفحهٔ چاپی خریداری شده از شرکت دراپ سنس^۲ (اسپانیا) انجام شد. الکتروودها دربرگیرندهٔ یک پیکربندی سه‌الکتروودی سنتی است که روی نواری مشابه چاپ شده‌اند. الکتروودها شامل الکتروود کاری (قطر ۴mm)، الکتروود جریان و الکتروود مرجع هستند (شکل ۱).

1. Analyt
2. Dropsens (Spain)

– بوتیل – مس (II) ($\text{CuPc}^{\text{but}}\text{-SPE}$)، و تالوسیانین – اکتاکیس – اکتیل‌اکسی – مس (II) ($\text{CuPc}^{\text{O-ooxy}}\text{-SPE}$). بنابراین آرایه حسگر زبان الکترونیک متشکل از ۵ الکتروود کاری (کربن، طلا، و ۳ الکتروود کربن اصلاح‌شده) ساخته شد. برگشت‌پذیر بودن فرایند الکتروودی مورد توجه قرار گرفت و به‌وسیله پتنت‌شواستات این فرایند در مراحل رفت و برگشت، کنترل شد. ولتاموگرام‌های چرخه‌ای با سرعت روبش 50 mV.s^{-1} (Apetrei *et al.*, 2013; Fanjul-Bolado *et al.*, 2007) و از ۱- تا ۱ ولت، ثبت شد.

پردازش داده‌ها و استخراج ویژگی

ابتدا سیگنال‌های به‌دست‌آمده در رایانه به‌صورت داده‌های خام ثبت و ذخیره می‌شوند. این داده‌ها باید پیش‌پردازش شوند، به این معنی که با استفاده از روش‌های میانگین‌گیری، نرمال‌سازی، و مانند اینها. به شکل قابل استفاده توسط نرم‌افزارهای تحلیل درآیند. استخراج ویژگی‌ها از ولتاموگرام‌های حاصل صورت می‌پذیرد. تعداد ویژگی‌های استخراجی از ولتاموگرام‌ها وابسته به تقسیم‌بندی نواحی روی هر نمودار و تعداد حسگرهای موجود در آرایه است که در حین کار تعیین می‌شود. پیش‌پردازش ولتاموگرام‌های چرخه‌ای با استفاده از روش کاهش داده‌ها براساس نمودارهای از پیش تعریف‌شده "پنجره زنگوله‌ای شکل"^۲ پاسخ با نام کرنل^۳ به‌منظور استخراج اطلاعات مفید از سیگنال‌های ولتامتری انجام شد (Apetrei *et al.*, 2007). این اطلاعات به‌عنوان ماتریس ورودی در روش‌های تحلیل داده استفاده می‌شوند. 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 به‌دست آمد. پس از این مراحل داده‌های پیش‌پردازش‌شده، به روش‌های گوناگون تحلیل و ویژگی‌ها به‌عنوان ورودی روش‌های تحلیلی آماری برای طبقه‌بندی و تشخیص زعفران اصلی و تقلبی استفاده شد.

نتایج و بحث

در این پژوهش ابتدا رفتار الکتروشیمی حسگرهای استفاده‌شده ارزیابی شد. مطالعه رفتار الکتروشیمی با استفاده از ۴ الکتروود صفحه‌چاپی، کربن، طلا، پلاتین، و کربن/پروسیان آبی در محلول ۰/۱ مولار KCl (به‌عنوان آنالیت استاندارد) و نمونه‌های زعفران آزمایش و مقایسه و مشاهده شد. شکل و موقعیت

پیک‌ها در محلول KCl، وابسته به طبیعت شیمیایی الکتروود کاری است. پاسخ الکتروودها به آنالیت‌های استفاده‌شده، ولتاموگرام‌های یکسانی را در تکرارهای گوناگون نشان داد و از قابلیت تکرار^۴ و قابلیت تولید^۵ مشابه بسیار بالایی برخوردار بودند به گونه‌ای که در همه آزمایش‌ها انحراف معیار کمتر از ۵ درصد بود. الکتروودها همچنین در محلول زعفران با ویژگی‌های حسی^۶ متفاوت قرار گرفتند. ولتاموگرام‌های چرخه‌ای (CV) انتقال و تغییرات در شدت پیک‌های وابسته به مواد الکتروودها را نشان می‌دهند. این تغییرات به دلیل واکنش میان ترکیبات موجود در محلول زعفران و سطح الکتروود کاری اصلاح‌شده با دو لایه ماده حسی است. با توجه به نتایج ذکرشده حاصل از آزمایش‌های اولیه و بررسی ولتاموگرام‌های حاصل از عملکرد ۴ الکتروود کاری، الکتروودهای 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 آرایه‌های ۵ حسگر متشکل از الکتروودهای کربن، طلا، و الکتروودهای کربن اصلاح‌شده با مشتقات تالوسیانین مس، به‌منظور آنالیز نمونه‌های زعفران با ویژگی‌های متفاوت انجام شد. تالوسیانین مس ویژگی‌های الکتروکاتالیزوری دارد که می‌تواند به‌وسیله یون فلزی مرکزی و همچنین جانشین کردن آن با مواد الکتروفعال موجود در محلول، در واکنش‌های الکتروشیمی به‌عنوان کاتالیزور شرکت کند. ولتاموگرام‌های چرخه‌ای حاصل از آرایه حسگری در محلول زعفران با سرعت روبش 50 mV.s^{-1} در شکل ۳ برای زعفران اصلی به تصویر کشیده شده است. ویژگی‌های استخراج‌شده از ولتاموگرام‌ها نشانگر واکنش اجزای 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 الکتروودها به محلول هر نمونه زعفران، ویژه آن نمونه است. به علاوه، هر الکتروود در نمونه‌های گوناگون زعفران پاسخ‌های متفاوتی را نشان می‌دهد. چنین الگویی از پاسخ حسگرها می‌تواند به‌عنوان رد اثر ویژگی‌های^۷ زعفران مورد توجه قرار گیرد.

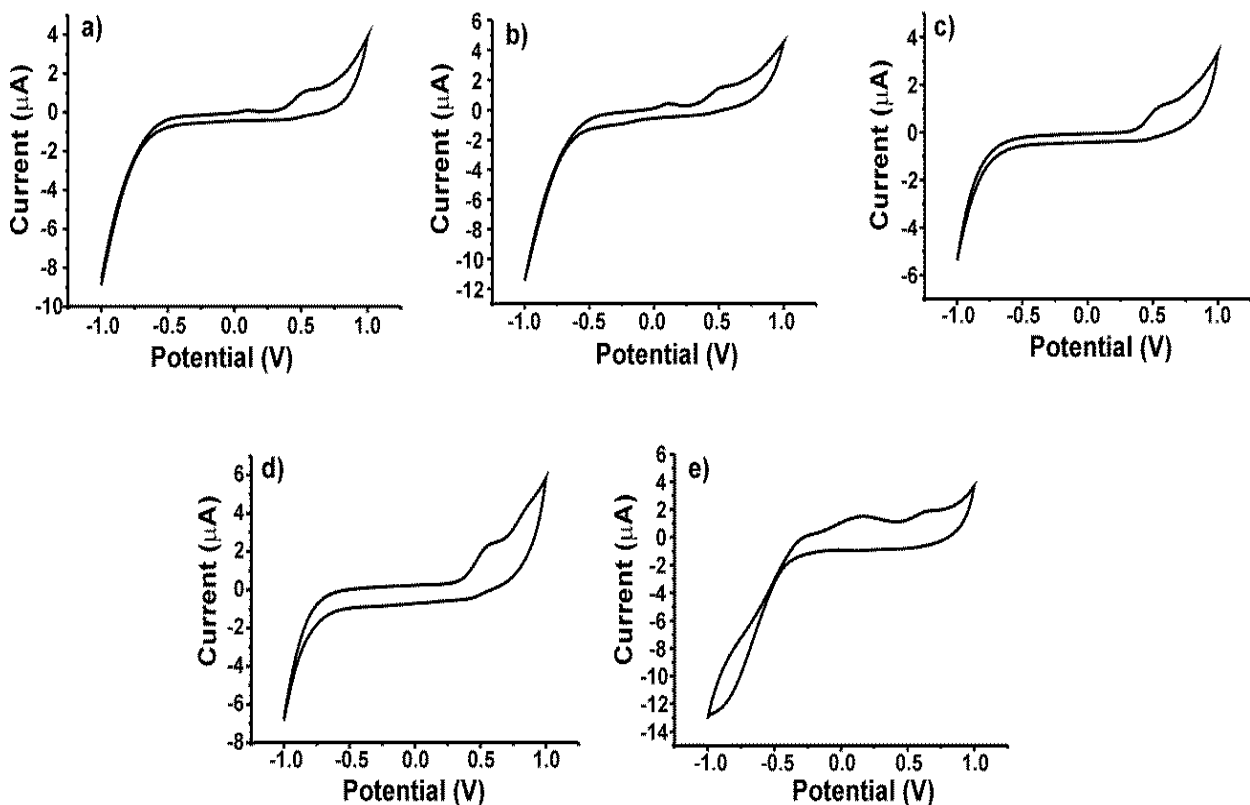
همچنین محلول‌هایی از ترکیب زعفران با گلرنگ، کلاله ذرت، خامه زعفران، و رنگ‌های مصنوعی تارتراژین و متیل اورانژ آماده شد و با آرایه ۵ حسگری آزمایش شد. تعدادی از

4. Repeatability Polyphenol
5. Reproducibility
6. Organoleptic properties
7. Characteristic fingerprint

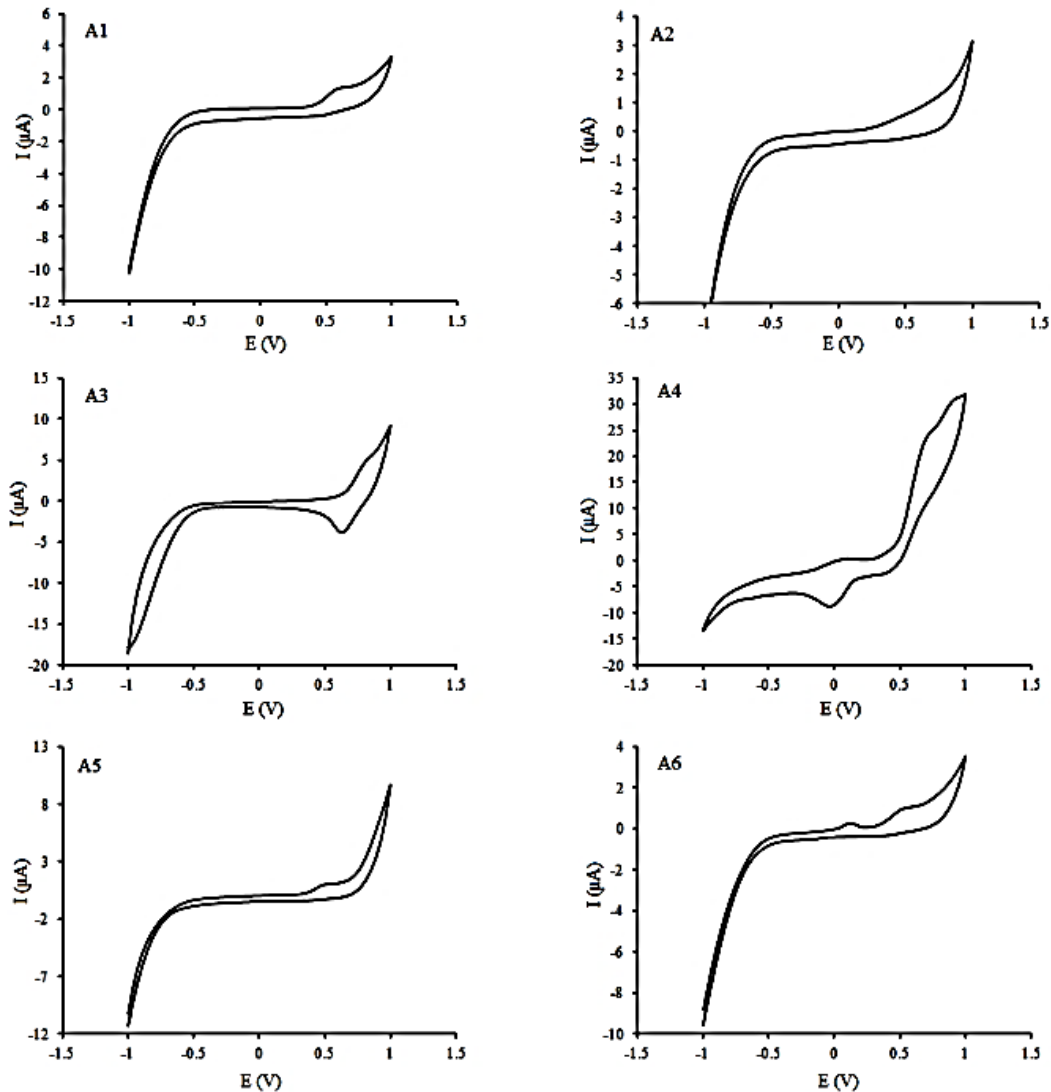
1. Scan rate
2. Bell-shaped windowing
3. Kernel

اصلی‌ترین واریانس در مجموعهٔ داده‌ها را نشان دادند و به‌منظور نمایش نمودار اسکور داده‌ها استفاده شد. نمودارهای اسکور در شکل ۵ نشان داده شده است که در آن گروه‌های زعفران و ترکیب آن با مواد دیگر متمایز شده‌اند. نمودار اسکور موقعیت پیش‌بینی‌شده اجزای مورد نظر را روی مؤلفه‌های اصلی نشان می‌دهد. براساس موقعیت هر گروه در نمودار اسکور (موقعیت با مقادیر مثبت یا منفی بر نمودار)، اختصاص‌دادن یک معنی خاص به هر یک از مؤلفه‌ها ممکن است. نتایج برای زعفران و گلرنگ به‌طور کامل از همدیگر جدا و در دو قسمت چپ و راست نمودار اسکور در شکل ۵(الف) توزیع شده‌اند که نشان‌دهندهٔ تفاوت در ترکیب شیمیایی این دو ماده است. همچنین در این شکل، نمونه‌های دیگر با توجه به نسبت‌های گلرنگ ترکیب‌شده با زعفران در نمودار اسکور توزیع شده‌اند. در شکل ۵(ب) نیز زعفران و کلالهٔ رنگ‌شدهٔ ذرت از هم جدا قرار گرفته‌اند. همان‌گونه که مشاهده می‌شود، توزیع نمونه‌های ۲۰ و ۳۰ درصد ترکیب زعفران و کلالهٔ ذرت با نمونه ۱۰۰ درصد کلالهٔ ذرت همپوشانی دارد که می‌توان دلیل آن را در وجود دو نمونهٔ زعفران و تمایز این دو نمونهٔ زعفران ذکر کرد.

ولتاموگرام‌های حاصل از آزمایش‌ها، به‌عنوان نمونه در شکل ۴ آورده شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود، شکل و مکان پیک‌های هر ولتاموگرام در محلول‌های گوناگون، ویژهٔ همان ماده است و پیک‌های هر ولتاموگرام، وابسته به اجزای ردوکس در محلول مورد نظر است. همچنین با توجه به نتایج حاصل از آرایهٔ حسگری زبان الکترونیک، ولتاموگرام‌های حاصل از ترکیب زعفران با مواد ذکرشده 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 می‌شود، نشان دهد. بنابراین حسگرهای زبان الکترونیک می‌تواند جایگزین روش‌های زمان‌بر و پیچیدهٔ متداول از قبیل HPLC در تشخیص و تعیین ترکیبات زعفران و تعیین درجهٔ خلوص زعفران شود. زعفران اصلی از نوع قلبی و ترکیب آن با دیگر مواد (گلرنگ، کلالهٔ ذرت، متیل اورانژ، و تارترازین) با نسبت‌هایی که قبلاً ذکر شد، با استفاده از فناوری زبان الکترونیک و روش تشخیص الگوی PCA براساس پاسخ حسگرهای استفاده‌شده، تشخیص داده شد. ماتریس داده‌ها از طریق اعمال روش کرنل به ولتاموگرام‌ها به‌دست آمد و با روش PCA به‌منظور بررسی ویژگی‌های نمونه‌ها تحلیل شد. دو مؤلفهٔ



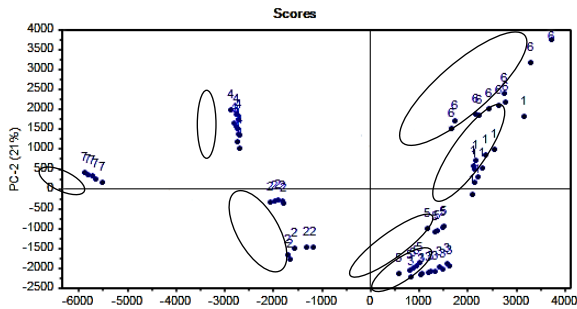
شکل ۳. ولتاموگرام‌های چرخه‌ای به‌دست‌آمده با استفاده از الکترودهای اصلاح‌شده با تالوسیانین در محلول زعفران. (a) $\text{CuPc}^{\text{thut}}\text{-SPE}$ ، (b) $\text{CuPc}^{\text{o-but}}\text{-SPE}$ ، (c) $\text{CuPc}^{\text{o-ooxy}}\text{-SPE}$ ، (d) C-SPE، (e) Au-SPE.



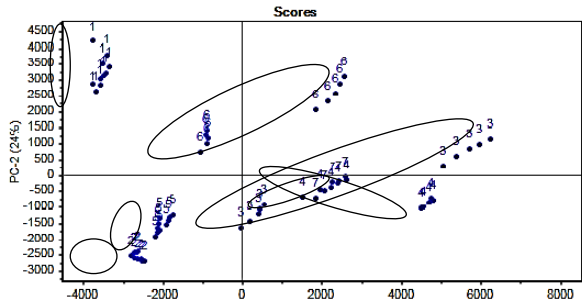
شکل ۴. ولتاموگرام حسگر کربن اصلاح شده با تالوسیانین (CuPc^{thut}-SPE) در محلول‌های: A1: زعفران، A2: گلرنگ، A3: کلاله رنگ شده ذرت، A4: ترکیب زعفران با تارترازین، A5: ترکیب زعفران با متیل اورانژ، A6: خامه زعفران

فضای با بعد بالاتر به بعد پایین تر، به حداقل می‌رساند. LDA توابع تفکیک را محاسبه و مشابه روش PCA نتیجه‌ای دوبعدی از داده‌های آموزش 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 بر مجموعه داده‌ها، درصد تشخیص ۸۷/۹۳ درصد، ۸۶/۲۱ درصد، ۹۶/۱۵ درصد، و ۱۰۰ درصد را به ترتیب برای نمونه‌های زعفران و ترکیب آن با گلرنگ، کلاله رنگ شده ذرت، رنگ‌های تارترازین و متیل اورانژ، و خامه رنگ شده 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.

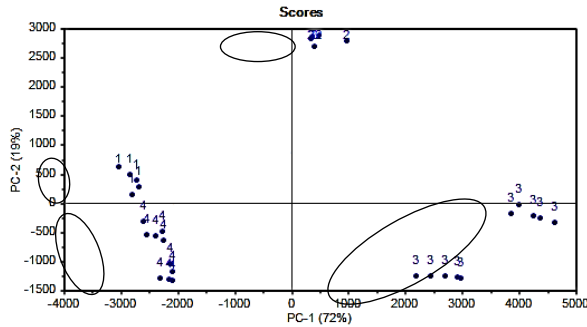
همچنین زبان الکترونیک قابلیت بالایی در تشخیص ترکیب زعفران و ترکیب پودر آن با پودر رنگ‌های شیمیایی نشان داد (شکل ۵ ج). در شکل ۵(د) نتایج نشان‌دهنده تمایز کامل نمونه زعفران از نمونه ترکیبی آن با خامه زعفران و خامه رنگ شده با رنگ‌های شیمیایی متیل اورانژ و تارترازین است. نمودارهای اسکور دو مؤلفه اصلی (PC1-PC2) واریانس ۷۵، ۷۹، ۹۱ و ۹۶ درصد را به ترتیب برای ترکیب زعفران با گلرنگ، کلاله رنگ شده ذرت، خامه رنگ شده، 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 پرکاربرد طبقه‌بندی و یک روش طبقه‌بندی پارامتری احتمالاتی است که واریانس بین گروه‌ها را بیشینه می‌کند و واریانس درون کلاس‌ها را با انتقال داده‌ها از



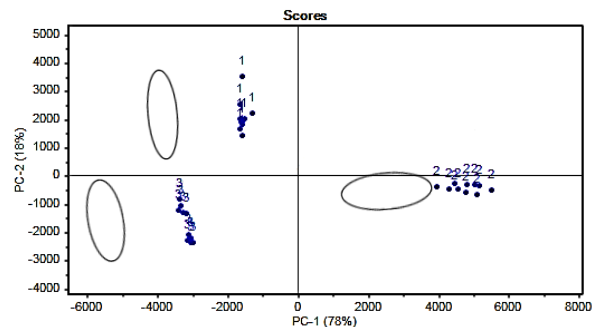
(ب)



(الف)

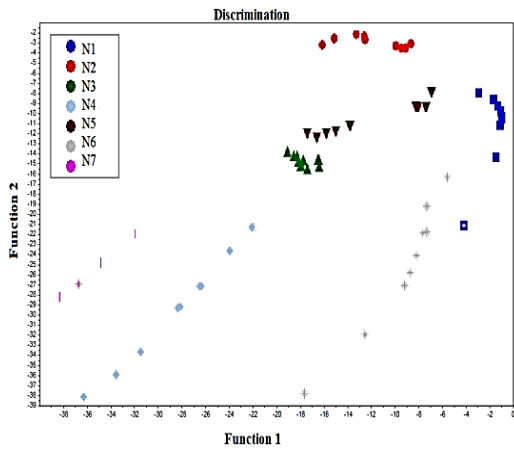


(د)

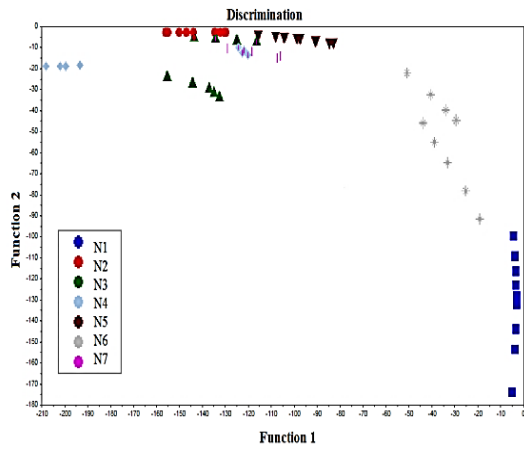


(ج)

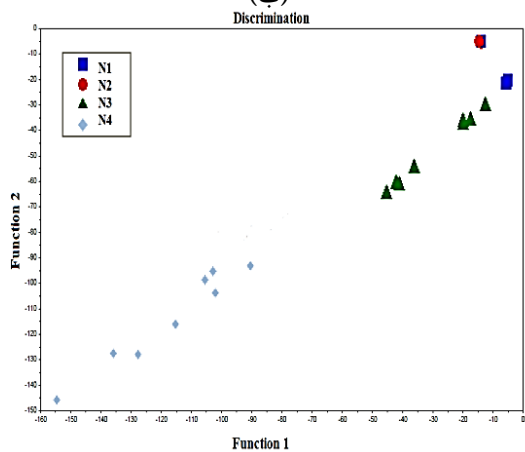
شکل ۵. نمودار اسکور PCA برای ترکیب زعفران و: الف) کلاله ذرت، ب) گلرنگ، ج) متیل اورانژ و تارترازین، د) خامه، خامهٔ رنگ‌شده با متیل اورانژ و تارترازین



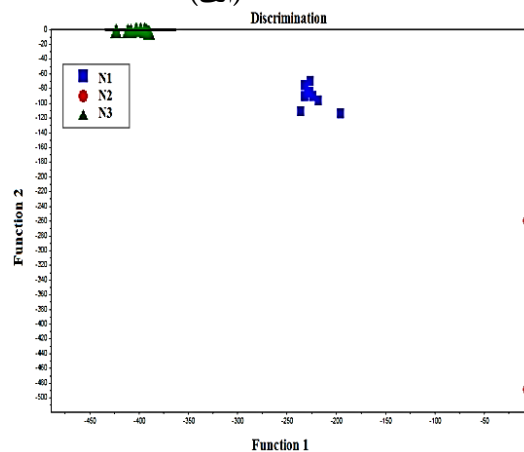
(ب)



(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) خامهٔ زعفران و خامهٔ رنگ‌شده با متیل اورانژ و تارترازین

نتیجه گیری

سامانه را برای تشخیص نمونه‌های گوناگون 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 گوناگون مواد حساس، انتخاب‌گری، و قابلیت تمایز نمونه‌ها توسط آرایه را بهبود می‌بخشد. این روش در مقایسه با روش‌های تحلیلی کلاسیک استفاده شده برای شناسایی تقلب در زعفران سریع‌تر، مقرون‌به‌صرفه، و ساده‌تر است و می‌تواند به‌عنوان جایگزینی برای آن‌ها به کار رود.

در این پژوهش سامانه چندحسگری زبان الکترونیک قابل حمل بر پایه الکترودهای صفحه چاپی، به‌منظور ایجاد روشی سریع، حساس، قابل اطمینان، و کم‌هزینه برای تحلیل ویژگی‌های متفاوت زعفران و نمونه‌های تقلبی آن، توسعه و اجرا شد. منحنی‌های به‌دست‌آمده با استفاده از زبان الکترونیک ولتامتری چرخه‌ای، اطلاعات شایان مقایسه‌ای را فراهم کرده است 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 حاصل توانایی این

REFERENCES

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- ISO 3632. 2011. International Organization for Standardization. Saffron (*Crocus sativus* L.). Part 1: Specification, Part 2: Test methods. Geneva: ISO.
- Ivarsson, P., Krantz-Rulcker, C., Winquist, F., Lundstrom, I. 2005. A Voltammetric Electronic Tongue. *Chemical Senses*. 30(1), 258-259.
- 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.
- Kadara, R.O., Jenkinson, N., Banks, C.E., 2009. Characterisation of commercially available electrochemical sensing platforms. *Sensors and Actuators (B)*. 138, 556-562.
- 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.
- Maasheri, S.M., Nazeri, S.M., Khezri, H., Ghorghlo, M., Gorgani, M., Tavasoli, A. 2010. Saffron adulteration- expanding the use of synthetic chemical colors in saffron. (In Persian)
- 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.
- O'Halloran, M.P., Pravda, M., Guilbault, G.G. 2001. Prussian Blue bulk modified screen-printed electrodes for H₂O₂ detection and for biosensors. *Talanta*. 55, 605-611.
- Parmeh, Z., Hosseini, M., Nabizadeh, A., Mohebi, H. 2009. Iranian saffron export capacity and target markets. *Journal of Trade*. 1, 59-95. (In Persian)
- 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.
- Pioggia, G., Francesco, F.D., Marchetti, A., Ferro, M., Ahluwalia, A. 2007. A composite sensor array impedimetric electronic tongue- Part I. Characterization. *Biosensors and Bioelectronics*. 22, 2618-2623.
- 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.
- 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, baicalein, kaempferol, luteolin and quercetin. *Phytother Research*. 18, 516-521.
- 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.
- Riul, J.A., Dantas, C.A.R., Miyazaki, C.M., Oliveira, J.O.N. 2010. Recent advances in electronic tongues. *Analyst*. 135, 2481-2495.
- 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.
- Scampicchio, M., Benedetti, S., Brunetti, B., Mannino, S. 2006. Amperometric Electronic Tongue for the Evaluation of the Tea Astringency. *Electroanalysis*. 18, 1643-1648.
- 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.
- Wang, J., Tian, B. 1992. Screen-Printed Stripping Voltammetric/Potentiometric Electrodes for Decentralized Testing of Trace Lead. *Analytical Chemistry*. 64, 1706-1709.
- 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.
- Winquist, F. 2008. Voltammetric electronic tongues- Basic principles and applications. *Microchimica Acta*. 163, 3-10.
- Winterhalter, P., Straubinger, R.M. 2000. Saffron. Renewed interest in an ancient spice. *Food Review International*. 16(1), 39-59.
- 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.
- Zalacain, A., Ordoudi, S.A., Diaz-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.