

طیف‌سنجی رامان و کاربرد آن در احراز هویت غذاهای حلال با استفاده از روش‌های کمومتریکس

سمیه ولی‌زاده*

۱- مرکز تحقیقات حلال، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران.

اطلاعات مقاله	چکیده
دریافت: ۱ بهمن ۱۴۰۱	سابقه و هدف: درک پایه‌ای اصول اولیه طیف‌سنجی رامان با تقویت نگرش به این روش قدرتمند می‌تواند به گسترش کاربردهای آن کمک کند. تلفیق روش‌های تحلیل چند متغیره کمومتریکس با طیف‌سنجی رامان در حل بسیاری از مسائل پژوهشی و کاربردی موثر است. در این مقاله، به مرور آنالیز داده‌های طیف‌سنجی رامان با روش‌های کمومتریکس پرداخته شده است. روش‌های آزمایشگاهی توسعه یافته بر پایه کمومتریکس به عنوان ابزاری مطمئن، با صحت بالا، و ارزان در صحنه‌گذاری غذاهای با منشأ حلال مطرح هستند.
داوری: ۱۰ بهمن ۱۴۰۱	یافته‌ها و نتیجه‌گیری: روش‌های الگوشناسی نظارت شده از تکنیک‌های چند متغیره کمومتریکس هستند که برای شناسایی کیفی، احراز هویت و تحلیل افتراقی دسته‌های مختلف از جمله مواد خوراکی استفاده می‌شوند. روش تحلیل مولفه اصلی با کاهش ابعاد داده امکان مشاهده و جستجوگری در فضای داده‌ها را فراهم می‌کند و مقدمه‌ای بر روش‌های دسته‌بندی می‌باشد. احراز هویت ژلاتین استخوان و پوست گاو با اندازه‌گیری‌های طیف‌سنجی رامان و استفاده از روش‌های الگوشناسی نظارت شده با موفقیت امکان‌پذیر است. اندازه‌گیری ساده و غیرتخریبی طیف‌های رامان و کاربرد روش‌های چند متغیره کمومتریکس برای تحلیل آنها منجر به ابداع راه حل‌هایی برای بسیاری از مسائل در حوزه شناسایی کیفی و تعیین کمی در سیستم‌های پیچیده می‌شود.
پذیرش: ۱۱ بهمن ۱۴۰۱	
کلمات کلیدی: طیف‌سنجی رامان احراز هویت مواد خوراکی تشخیص تقلب روش‌های کمومتریکس * نویسنده مسئول: سمیه ولی‌زاده مرکز تحقیقات حلال، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران. پست الکترونیکی: smy.valizade@gmail.com تلفن: ۰۲۱-۸۸۸۹۰۹۰۳۳-۹۸ فکس: ۰۲۱-۸۸۸۹۰۸۵۸-۹۸	

۱- مقدمه

پیشرفت علم و فناوری باعث سهولت دسترسی به داده‌های اندازه‌گیری شده توسط دستگاه‌های آزمایشگاهی شده است. افزایش حجم داده‌ها با افزایش محتوای اطلاعاتی آنها همراه است و می‌توان دانش بیشتری را از دستیابی به اطلاعات داده حاصل کرد. استخراج اطلاعات از داده‌هایی با ابعاد بزرگ نیاز به ابزارهای ویژه محاسباتی دارد. ریاضیات و آمار کلاسیک برای بررسی و تحلیل داده‌های بزرگ کافی نیستند. ریاضیات و آمار چند متغیره که متعاقب آن کاربرد کامپیوتر را ضروری می‌کند، می‌بایست در کنار هم قرار بگیرند تا توانایی محققین در پژوهش‌های بنیادی و کاربردی را ارتقا دهند. داده‌های طیف‌سنجی رامان از جمله داده‌های چند متغیره هستند که امروزه در اغلب آزمایشگاه‌ها به سهولت قابل دسترسی‌اند. طیف‌های رامان حاوی اطلاعات بنیادی از نمونه‌های مورد

بررسی هستند که نیاز به استفاده از روشهای چندمتغیره برای بررسی و تحلیل داده‌ها را ایجاد می‌کند. در این مقاله به طور خلاصه به اصول اولیه طیف‌سنجی رامان پرداخته می‌شود و اهمیت تلفیق این روش طیف‌سنجی با روش‌های تحلیل چندمتغیره کمومتریکس با ذکر مثال کاربردی به صورت اجمالی بیان خواهد شد.

۲- طیف‌سنجی رامان

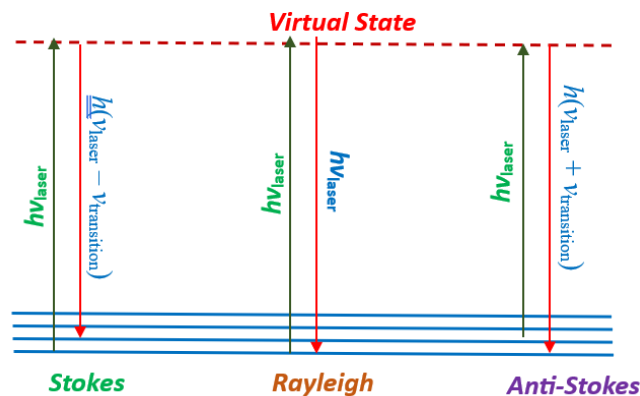
طیف‌های رامان از تحت تابش قرار گرفتن یک نمونه با یک منبع لیزر حاصل می‌شوند. یک طیف‌سنج مناسب می‌تواند طیف تابش پراکنده شده را در زاویه ۹۰ درجه اندازه‌گیری کند. برهمکنش تابش لیزر با مولکول سه نوع پراکندگی ایجاد می‌کند: پراکندگی استوکس، پراکندگی آنتی استوکس و پراکندگی رالی. پراکندگی حاصل برهم خوردن لحظه‌ای پخش الکترون‌هایی است که در اطراف پیوند در یک مولکول

به حالت برانگیخته واقعی) با مولکول را امکان‌پذیر می‌کند. پراکندگی رالی در نتیجه انتقال انرژی یک فوتون با انرژی ($h\nu_{\text{laser}}$) به مولکول و به دنبال آن نشر یک فوتون با همین اندازه انرژی و بازگشت مولکول به حالت پایه ایجاد می‌شود. در پراکندگی استوکس انرژی یک فوتون ($h\nu_{\text{laser}}$) به مولکول منتقل می‌شود و آن را به حالت مجازی و ناپایدار تحریک می‌کند که فوراً به حالت برانگیخته ارتعاشی آسایش می‌یابد $[h(\nu_{\text{laser}} - \nu_{\text{transition}})]$. پراکندگی آنتی استوکس هم مشابه استوکس است با این تفاوت که مولکول در هنگام برهمکنش با فوتون لیزر در حالت برانگیخته ارتعاشی است و پس از تحریک به حالت ارتعاشی با انرژی کمتر باز می‌گردد $[h(\nu_{\text{laser}} + \nu_{\text{transition}})]$ (۱).

توزیع شده‌اند و تحت تاثیر نور تابیده شده به مولکول قرار گرفته‌اند. پس از این تلاطم الکترونی، با بازگشت پیوند به حالت الکترونیکی اصلی خود تابش مجدداً منتشر می‌شود. انواع پراکندگی در شکل ۱ نشان داده شده است. در این دیگرام ν حالت‌های انرژی ارتعاشی مولکول را مشخص می‌کند، h ثابت پلانک، ν_{laser} فرکانس تابش منبع لیزر و $\nu_{\text{transition}}$ فرکانس تابش لیزر پس از برهمکنش با نمونه است. فرکانس تابش لیزر معکوس طول موج آن است:

$$\nu_{\text{laser}} = 1/\lambda_{\text{laser}}$$

یک حالت انرژی مجازی با طول عمر بسیار کوتاه، برهمکنش تابش‌های غیر رزونانسی (تابش با فرکانس کمتر از یک انتقال



شکل ۱- دیگرام انتقالات متناظر با پراکندگی‌های استوکس، رالی و آنتی استوکس

حالت ارتعاشی اولیه است که به همین دلیل شدت نشر آن به طور قابل توجهی بیشتر از دو نوع پراکندگی دیگر است. از آنجایی که شدت سیگنال پراکندگی استوکس تنها یک ده هزارم درصد شدت طول موج تحریک منبع لیزر است (۲)، تشخیص و اندازه‌گیری این پدیده به حساسیت آشکارساز، شدت لیزر، غلظت و قطبش‌پذیری مولکول‌های نمونه بستگی دارد. شدت تابش پراکندگی رامان معمولاً با غلظت گونه‌های فعال نسبت مستقیم دارد. بنابراین طیف‌سنجی رامان به طیف‌سنجی فلورسانس شباهت دارد که غلظت آنالیت مستقیماً با شدت نور متناسب است، در حالی که در طیف‌سنجی جذبی رابطه بین غلظت و شدت لگاریتمی است. طیف‌سنجی رامان به طور کلاسیک همراه با مادون قرمز (IR) برای استخراج اطلاعات ساختاری برای گونه‌های معدنی و آلی، همچنین برای اندازه‌گیری خواص فیزیکی مانند انواع خاصی از تعادل در محلول (به ویژه ثابت‌های تفکیک اسید)،

جمعیت نسبی مولکول‌ها در حالت‌های ارتعاشی بالاتر به اندازه‌ای کم است که پراکندگی استوکس به شدت نسبت به پراکندگی آنتی استوکس ترجیح داده می‌شود. از آنجایی که شدت خطوط رامان به طور مستقیم با توزیع بولتزمن متناسب است خطوط آنتی استوکس از جمعیت کمتری در حالت پایه منشأ می‌گیرد و بنابراین شدت این خطوط طیفی کم هستند. با این حال، با افزایش دما، نسبت شدت آنتی استوکس به استوکس افزایش می‌یابد زیرا بخش بزرگ‌تری از مولکول‌ها در اولین حالت برانگیخته ارتعاشی قرار می‌گیرند. در برخی موارد، انتشار استوکس ممکن است با یک نسبت ده به یک به آنتی استوکس ترجیح داده شود، در حالی که در موارد دیگر تنها تا سه برابر شدیدتر است. همچنین لازم به ذکر است که پراکندگی رالی نسبت به انواع دیگر احتمال بیشتری دارد زیرا محتمل‌ترین رویداد "جذب" تابش توسط یک مولکول و متعاقب آن آسایش این مولکول به

را می‌توان در طیف رامان تشخیص داد. ارتعاشات اسکلتی معمولاً در جابجایی رامان زیر 1500 cm^{-1} یافت می‌شوند و دارای الگوی مختص ماده هستند. این منطقه که اغلب به عنوان منطقه اثر انگشت یک ماده شناخته می‌شود، مهمترین بخش طیف برای اهداف شناسایی است (۳).

یک طیف‌سنج رامان فشرده و مدرن از چندین جزء اساسی تشکیل شده است، از جمله یک لیزر که به عنوان منبع تحریک برای القای پراکندگی رامان عمل می‌کند. به طور معمول لیزرهای حالت جامد در ابزار مدرن رامان با طول موج های متداول ۵۳۲، ۷۸۵، ۸۳۰ و ۱۰۶۴ نانومتر استفاده می‌شود. لیزرهای با طول موج کوتاه‌تر سطح مقطع پراکندگی رامان بالاتری دارند، بنابراین سیگنال حاصل قویتر است ولی بروز فلورسانس در طول موج کوتاه‌تر نیز افزایش می‌یابد. به همین دلیل بسیاری از سیستم‌های رامان از لیزر ۷۸۵ نانومتری بهره می‌برند. انرژی لیزر توسط کابل‌های فیبر نوری به نمونه منتقل شده و از آن جمع‌آوری می‌شود. یک فیلتر برای از بین بردن پراکندگی رالی و آنتی استوکس استفاده می‌شود و نور پراکنده باقی مانده استوکس به یک عنصر پراکندگی، معمولاً یک گریتنینگ هولوگرافیک منتقل می‌شود. یک آشکارساز Charge-coupled device (ابزار بار الکتریکی جفت شده) نور را می‌گیرد و در نتیجه طیف رامان ایجاد می‌شود. از آنجایی که پراکندگی رامان سیگنال ضعیفی تولید می‌کند، بسیار مهم است که از اجزای با کیفیت بالا و با همخوانی نوری در طیف‌سنج رامان استفاده شود.

دستگاه‌های مدرن طیف‌سنجی رامان طیف‌های ثبت شده را به صورت عددی در اختیار کاربر قرار می‌دهند. در واقع هر طیف یک رشته عدد از شدت تابش پراکنده شده در طول موج‌های متفاوت است. هر نمونه در دستگاه طیف‌سنج رامان به سهولت یک رشته عدد ایجاد می‌کند که برای استخراج اطلاعات از این داده نیاز به تحلیل‌های چند متغیره و روش‌های ویژه متناظر با آنها وجود دارد. چند متغیره یعنی بیش از یک متغیر در ایجاد نتیجه موثر هستند. هر اتفاقی که در جهان رخ می‌دهد به یک دلیل نیست، بلکه دلایل متعددی در پس هر نتیجه است که آن اتفاق را چند متغیره می‌کند. در واقع به راحتی می‌توان پذیرفت که به ندرت می‌توان پدیده‌ای را یافت که چند متغیره نباشد. این واقعیت اهمیت شناخت روش‌های چند متغیره را دو چندان می‌کند. نمی‌توان انتظار داشت که در دنیای مدرن و دیجیتال کنونی بدون

انتقال فاز، قدرت پیوند هیدروژنی و سایر کاربردهای کمی استفاده شده است (۳-۵). محدودیتی که کاربرد کمی طیف‌سنجی رامان را تهدید می‌کند، احتمال تداخل فلورسانس یا ناخالصی‌های درون نمونه است. بسیاری از گونه‌های مولکولی نوارهای فلورسنسی به نام جابجایی استوکس را نشان می‌دهند که در طول موج های بلندتر از خط رزونانس قرار می‌گیرند. همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است، یک مولکول ممکن است در طی فرآیند تحریک الکترونیکی به هر یک از چندین سطح ارتعاشی ارتقا یابد. با این حال، در محلول انرژی ارتعاشی اضافی در نتیجه برخورد بین مولکول‌های گونه برانگیخته و حلال از دست می‌رود. این فرآیند آسایش آنقدر کارآمد است که به طور متوسط یک حالت الکترونیکی برانگیخته به طور قابل توجهی طولانی‌تر از حالت برانگیخته ارتعاشی است که پراکندگی رامان را ایجاد می‌کند. بنابراین همپوشانی باندهای فلورسنت با باندهای رامان در ناحیه طیفی استوکس رخ می‌دهد. برای غلبه بر تداخل مولکول‌هایی که فلورسانس را نشان می‌دهند، می‌توان به باندهای آنتی استوکس توجه کرد. با این حال، شدت این باندها نسبتاً ضعیف است و اغلب قابل اندازه‌گیری نیستند. راه دیگر برای از بین بردن فلورسانس استفاده از لیزر مادون قرمز نزدیک (NIR) است. افزایش طول موج در یک لیزر NIR، فوتونی با انرژی کمتر از لیزرهای مرئی تولید می‌کند. از آنجایی که انرژی فوتون نسبتاً کم است، نمی‌تواند یک مولکول را به حالت برانگیخته الکترونی برانگیزد بلکه آن را به حالت مجازی ارتقا می‌دهد و فقط یک طیف رامان تولید می‌شود و بنابراین تداخل فلورسنت را حذف می‌کند.

ارتعاشات بخش‌های مشخصی از یک مولکول، به نام گروه‌های عاملی آن، در یک طیف رامان در شیف‌های مشخص رامان ظاهر می‌شود که برای همه مولکول‌های حاوی گروه عاملی تقریباً مشابه هستند. این سیگنال‌ها به ویژه هنگام نظارت بر واکنش‌هایی که شامل این گروه‌های عاملی (اکسیداسیون، پلیمریزاسیون و غیره) می‌باشند، مفید هستند زیرا آنها اندازه‌گیری مستقیمی از پیشرفت در طول واکنش را امکان‌پذیر می‌کنند. استفاده از این علامت‌های ویژه، ارتباط طیف یک ترکیب ناشناخته را با دسته‌ای از مواد برقرار کرده و شناسایی آن را ممکن می‌کند. به عنوان مثال ارتعاش کششی گروه کربونیل در یک آلدئید همیشه در محدوده 1700 تا 1730 cm^{-1} است. جدا از ارتعاشات مولکولی گروه‌های عاملی خاص، ارتعاشات داربست مولکولی (ارتعاشات اسکلتی)

به کار بردن روش‌های تحلیل چند متغیره، به شکل کارآمدی نتایج مفیدی از بررسی داده‌ها به دست آورد.

۳- کمومتریکس

کمومتریکس شاخه‌ای از علم شیمی است که از روش‌های ریاضی، آمار و کاربرد کامپیوتر، بر مبنای منطق برای طراحی یا انتخاب روش‌ها و آزمایش‌های اندازه‌گیری بهینه و ارائه حداکثر اطلاعات شیمیایی مرتبط با تجزیه و تحلیل داده‌های شیمیایی استفاده می‌کند. کمومتریکس در دهه اخیر گسترش روز افزونی یافته است و در حال رشد و تعالی است. پیشرفت علم الکترونیک و کامپیوتر باعث رشد مداوم کمومتریکس شده است و کاربردهای این رشته را در عمل در

تمام زیر حوزه‌های شیمی و علوم مرتبط گسترش داده است. کمومتریکس برای جمع‌آوری و تجزیه و تحلیل داده‌های چند متغیره در زمینه‌های کالبراسیون، مدل‌سازی فرآیند، تشخیص و طبقه‌بندی الگو، تصحیح و فشرده‌سازی سیگنال و کنترل آماری فرآیندها استفاده می‌شود. ماهیت کمومتریکس کاربرد آن را در تحقیقات بین رشته‌ای بسیار سازگار می‌کند. شکل ۲ ارتباط کمومتریکس با بسیاری از شاخه‌های علمی دیگر را نشان می‌دهد (۴). دامنه کاربرد روش‌های کمومتریکس بسیار گسترده است. صنایع داروسازی و مواد خوراکی نیز از حوزه‌های فعالیت کمومتریکس هستند که در حال رشد و گسترش می‌باشند (۸،۷).



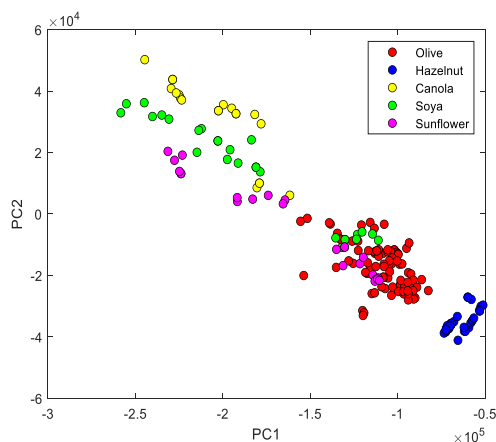
شکل ۲- ارتباط کمومتریکس با سایر علوم

۴- روش‌های الگوشناسی در کمومتریکس

تشخیص الگو در داده‌های اندازه‌گیری شده یکی از زمینه‌های فعال و پرکاربرد کمومتریکس است. در یک دسته‌بندی کلی این روش‌ها به دو بخش الگوشناسی نظارت شده و نظارت نشده تقسیم می‌شوند. روش‌های تشخیص الگو نظارت شده که به آنها روش‌های دسته‌بندی (classification methods) نیز اطلاق می‌شود، نیاز به اطلاعات اولیه در مورد نمونه‌هایی که عضویت آنها به هر گروه مشخص شده باشد دارند. در حالی که در روش‌های الگوشناسی نظارت نشده، خوشه‌بندی نمونه‌ها بدون در دست بودن چنین اطلاعاتی انجام می‌شود. روش تحلیل مولفه اصلی (Principal Component Analysis (PCA)) یکی از پرکاربردترین روش‌های الگوشناسی نظارت نشده است که به منظور کاهش ابعاد داده و همچنین نظارت بر ساختار داده استفاده می‌شود. روش‌های دسته‌بندی چند متغیره از تکنیک‌های کمومتریکسی هستند که بر اساس مجموعه‌ای از اندازه‌گیری‌ها

مدل‌های ریاضی را بنا می‌کنند و قادر به تشخیص عضویت هر نمونه در کلاس مناسب خود می‌باشند. در مرحله اول اطلاعات مربوط به عضویت نمونه‌ها به هر کلاس برای کالبره کردن مدل استفاده می‌شود و در مرحله بعد عضویت نمونه‌های مجهول به کلاس‌های تعریف شده پیش‌بینی می‌شود. مدل‌های دسته‌بندی در واقع مدل‌های ریاضی هستند که ارتباط بین متغیرهای توصیفی اندازه‌گیری شده مانند طیف‌های رامان را با یک متغیر کیفی یعنی عضویت در یک کلاس برقرار می‌کنند (۵). دسته‌بندی با دو هدف متفاوت می‌تواند انجام شود؛ اگر هدف تشخیص اصالت و احراز هویت در یک نمونه باشد از روش‌های مدلسازی کلاس (class modeling) استفاده می‌شود و اگر هدف تشخیص و تفکیک نمونه‌ها بین چند دسته باشد روش‌های تحلیل افتراقی (discriminant analysis) کاربرد دارند. مدلسازی نرم مستقل بر مبنای شباهت کلاس (Soft independent modeling of class analogy (SIMCA)) روش شناخته شده‌ای برای احراز

شکل ۳ الف طیف‌های رامان مربوط به ۵ گروه روغن خوراکی را نشان می‌دهد. کلاس‌های روغن زیتون، فرابکر، فندق، کانولا، سویا و آفتابگردان با رنگ‌های مختلف نشان داده شده‌اند. همانطور که مشاهده می‌شود، همپوشانی طیفی بین این پنج دسته روغن بقدری شدید است که تشخیص افتراقی آنها بر اساس مشاهده چشمی تفاوت‌های طیفی تقریباً غیرممکن است. این مسئله بخصوص در مواقعی که مسئله تقلب در نمونه‌ها مورد توجه باشد جدی‌تر می‌شود. به دلیل قیمت نسبی بالای روغن زیتون فرابکر، تقلب به صورت مخلوط کردن آن با روغن‌های خوراکی ارزانتر توسط سودجویان بسیار متداول است. در این صورت همپوشانی طیف‌های رامان مخلوط‌های روغن با روغن خالص بسیار جدی‌تر بوده و نیاز به ابزارهای قدرتمند تشخیص و شناسایی روغن‌های خالص بیشتر حائز اهمیت می‌شوند. شکل ۳ ب تصویر پنج دسته از روغن‌های خوراکی خالص که از اعمال تحلیل مولفه اصلی بر روی داده‌های طیف‌سنجی رامان (شکل ۳ الف) به دست آمده است را نشان می‌دهد (۷). نقاط هم‌رنگ متناظر با نمونه‌های متعلق به یک کلاس معین از روغن‌های خوراکی خالص هستند. فاصله بین دسته‌های نقاط مربوط به کلاس‌های متفاوت نشان‌دهنده میزان شباهت طیف‌های رامان آن روغن‌های خالص است. هر چه فاصله خوشه‌ها از هم بیشتر باشد، تشخیص افتراقی کلاس‌ها از یکدیگر امکان‌پذیرتر است. برای پیش‌بینی عضویت یک نمونه مجهول به هر یک از کلاس‌ها بر مبنای اندازه‌گیری طیف رامان آنها نیاز به اعمال روش‌های الگوشناسی نظارت شده وجود دارد.



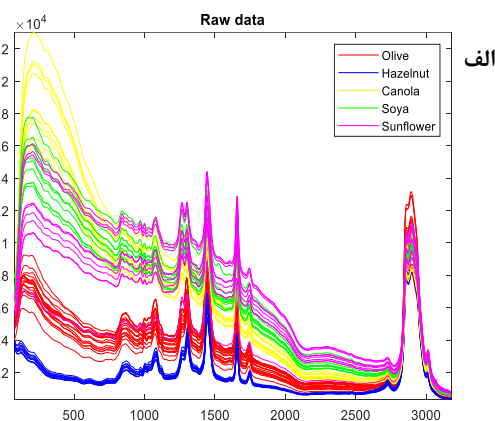
شکل ۳- الف) طیف‌های رامان پنج روغن خالص خوراکی شامل روغن زیتون، روغن فندق، روغن کانولا، روغن سویا، و روغن آفتابگردان؛ ب) تصویر پنج دسته از روغن‌های خوراکی در فضای دو مولفه اصلی اول از اعمال PCA بر روی داده‌های روغن (۷)

هویت (۹) و روش حداقل مربعات جزئی-تحلیل افتراقی (Partial Least Squares-Discriminant Analysis (PLS-DA)) متداول‌ترین روش تحلیل افتراقی دسته‌ها هستند (۶).

۵- تحلیل مولفه اصلی

تحلیل مولفه اصلی یک روش بسیار پرکاربرد در زمینه‌های مختلف علوم است. بسیاری از روش‌های کمومتریکس یا بر مبنای PCA بنا گذاشته شده‌اند و یا به نحوی از آن در تحلیل و تفسیر داده‌ها استفاده می‌کنند. در اغلب نرم‌افزارهای کمومتریکس PCA وجود دارد و به صورت کاملاً روزمره مورد استفاده قرار می‌گیرد. از PCA معمولاً یا به عنوان ابزار جستجوگر اولیه در داده‌ها استفاده می‌شود و یا برای کاهش ابعاد داده به کار می‌رود. هر دو کاربرد منجر به استخراج اطلاعات مفیدی از داده‌های چند متغیره می‌شوند. در زمینه الگوشناسی نیز PCA برای قابل مشاهده کردن اولیه داده‌ها و یا یک مرحله پیش پردازش برای انتقال داده‌ها به فضای PCA استفاده می‌شود. همچنین کاهش ابعاد داده‌ها با حفظ محتوای اطلاعاتی داده همواره یکی از کاربردهای PCA است (۸،۷).

تشخیص الگو و مشاهده خوشه‌های نمونه‌ها در یک مجموعه داده می‌تواند راهنما و تخمین اولیه خوبی برای تشخیص تفاوت‌ها و تشابهات کلاس‌های مختلف باشد. اعمال تحلیل مولفه اصلی بر روی داده‌های اندازه‌گیری شده از مجموعه نمونه‌ها تصویری از نحوه توزیع نمونه‌ها را در فضای مولفه‌های اصلی ایجاد می‌کند. طیف اندازه‌گیری شده برای هر نمونه در فضای مولفه‌های اصلی به صورت یک نقطه که به تعداد PC‌های معنی‌دار مختصه دارد نمایش داده می‌شود.



۶- مسئله احراز هویت و تشخیص ژلاتین حلال

ژلاتین عمدتاً از پوست خوک و پوست و استخوان گاو به دست می‌آید. با این حال، بحث‌هایی در مورد منشأ ژلاتین در مقیاس جهانی وجود دارد. به عنوان مثال، یک مسئله مشکل‌ساز برای جوامع مسلمان، مصرف ژلاتین خوک است که طبق قانون حلال ممنوع است. از سوی دیگر، هندوها به شدت نگران ژلاتین‌هایی هستند که با منشا گاوی تهیه می‌شوند. عواملی از این قبیل انگیزه ایجاد می‌کنند که ژلاتین‌ها بر اساس منبع آنها تفکیک و شناسایی شوند (۸). گذشته از این، نگرانی مصرف‌کنندگان در مورد تقلب و برچسب نادرست احتمالی افزایش یافته است. بنابراین، برای صحت‌گذاری منشأ ژلاتین به فرآیندهای دیگری نیاز است (۸، ۹). ژلاتینی که در اسلام حلال شمرده می‌شود از گاوهایی که طبق رسوم مسلمانان ذبح شده‌اند و یا از ماهی‌ها تهیه می‌شوند و به همین دلیل بسیاری از شرکت‌ها ژلاتین حلال را از استخوان دام‌هایی که طبق قوانین اسلامی ذبح شده‌اند تولید می‌کنند. اما به طور کلی ژلاتین از بافت‌های مشتق شده از حیواناتی که طبق قوانین مذهبی ذبح نشده‌اند نیز تهیه می‌شود. بنابراین، دانستن منبع ژلاتین در سطح بافت بسیار مهم است و برای تشخیص عملی و احراز هویت ژلاتین‌ها به یک روش قابل اعتماد و ویژه نیاز است.

روش‌های زیادی برای تشخیص منابع مختلف ژلاتین وجود دارد از جمله روش الکتروفورز (۹)، روش‌های ایمونولوژیکی (۱۰)، روش مبتنی بر اسید نوکلئیک (۱۱) و روش طیف‌سنجی جرمی (HPLC/MS) (۱۲). استفاده از بسیاری از تکنیک‌ها و دستورات ذکر شده دشوار هستند زیرا زمان‌بر، مخرب، پرهزینه و نیازمند تخصص قابل‌توجهی هستند (۱۳). روش‌های طیف‌سنجی ابزاری ساده و کم‌هزینه هستند که می‌توانند به شناسایی منابع بافتی ژلاتین و تقلب آن کمک کنند. نشان داده شده است که طیف‌سنجی رامان می‌تواند برای شناسایی و احراز هویت قابل اعتماد در بسیاری از موارد استفاده شود (۱۴). به طور خاص، در مقایسه با سایر تکنیک‌های تحلیلی، طیف‌سنجی رامان حساسیت و ویژگی شیمیایی بیشتری را ارائه می‌دهد (۱۵). اخیراً، طیف‌سنجی رامان پیشرفت‌های سریعی داشته و علاقه رو به رشد به این تکنیک‌ها استفاده از آن‌ها را افزایش داده است (۱۶). در شکل ۴ الف طیف رامان نمونه ژلاتین پوست و استخوان گاو نشان داده شده است (۱۷). همپوشانی شدید طیفی مبین این است

که تشخیص منبع ژلاتین با مشاهده چشمی و ابزارهای کلاسیک کار ساده‌ای نیست و کاربرد روش‌های چند متغیره و مدرن کمومتریکس جهت تشخیص و احراز هویت نوع ژلاتین الزامی است. اخیراً در یک کاربرد روش‌های دسته‌بندی نظارت شده کمومتریکس با استفاده از طیف‌سنجی رامان و به منظور احراز هویت ژلاتین گاوی مورد استفاده قرار گرفته است (۱۷).

۷- مقایسه روش‌های مدلسازی کلاس و تحلیل افتراقی

اگرچه روش‌های مدلسازی کلاس و تحلیل افتراقی هر دو متعلق به روش‌های دسته‌بندی هستند، اما اهداف آنها متفاوت است و به سؤالات متفاوتی پاسخ می‌دهند. بیشترین کاربرد رویکرد مدلسازی کلاس، مسئله احراز هویت است (۱۷، ۲۰). کلاس هدف شامل مجموعه‌ای شاخص از نمونه‌ها است که بر اساس شباهت بین اعضای مدل آن ساخته می‌شود و سپس از آن برای شناسایی یک نمونه ناشناخته جدید استفاده می‌شود. روش مدلسازی کلاس به این پرسش پاسخ می‌دهد که آیا نمونه ناشناخته متعلق به کلاس مدل شده هست یا خیر؟ روش‌های مدلسازی تحلیل افتراقی بر اساس تفاوت‌های بین کلاس‌ها بنا می‌شوند و برای تعیین اینکه آیا نمونه‌ها به یک کلاس خاص تعلق دارند یا خیر استفاده می‌شوند (۱۷، ۲۰). در مدلسازی تحلیل افتراقی، همیشه یک نمونه جدید به یکی از کلاس‌های مورد مطالعه اختصاص داده می‌شود، حتی اگر در واقعیت متعلق به هیچکدام از آنها نباشد. در نتیجه، روش‌های مدلسازی تفکیک افتراقی را نمی‌توان برای اهداف احراز هویت به کار برد زیرا نمونه تقلب‌های ناشناخته به یکی از کلاس‌های تعریف شده اختصاص داده می‌شوند. از سوی دیگر، مدل‌های افتراقی معمولاً نتایج دسته‌بندی بسیار بهتری نسبت به روش‌های مدلسازی کلاس، به ویژه زمانی که بین کلاس‌های مورد مطالعه همپوشانی وجود داشته باشد نشان می‌دهند. روش‌های مدلسازی کلاس بر اساس شباهت نمونه‌های منفرد بنا می‌شوند، بنابراین در صورت همپوشانی کلاس‌ها چندان موفق نخواهند بود، اما مدلسازی‌های افتراقی از تفاوت بین کلاس‌ها سود می‌برند و در مورد کلاس‌های مشابه بهتر عمل می‌کنند.

۸- مدلسازی نرم مستقل بر مبنای شباهت کلاس

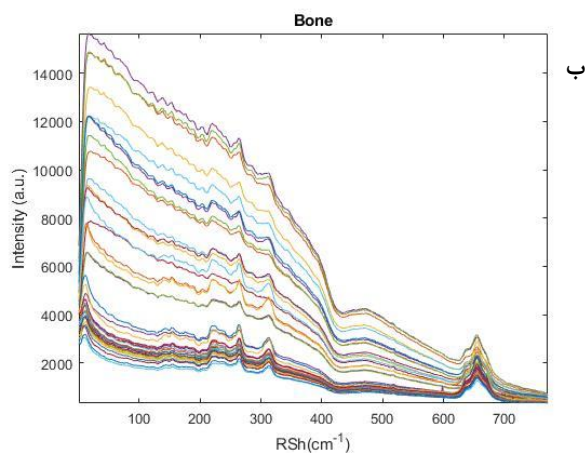
روش‌های مدلسازی کلاس، اعضای کلاس هدف را از همه اعضا و کلاس‌های دیگر متمایز می‌کند. روش DD-SIMCA

نشان می‌دهد. شکل ۴ الف طیف‌های خام رامان نمونه‌های خالص ژلاتین استخوان گاو را نشان می‌دهد. تغییرات حاصل از تفاوت‌های طبیعی در نمونه‌های مختلف یکی از عوامل تفاوت‌های مشاهده شده هستند. البته منابع فیزیکی غیر وابسته به ترکیب شیمیایی نمونه‌ها نیز یک عامل موثر در واریانس طیف‌هاست که معمولاً با روش‌های پیش پردازش طیفی تصحیح می‌شوند. شکل ۴ پ طیف همان نمونه‌ها را پس از پیش پردازش تصحیح سیگنال چندگانه (MSC) نشان می‌دهد. همانگونه که مشاهده می‌شود این پیش پردازش بخش عمده‌ای از تغییرات فیزیکی غیرمرتبط طیف‌های رامان را حذف کرده است.

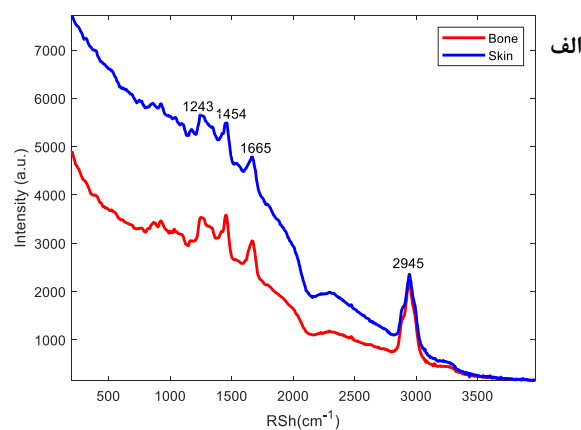
نتایج اعمال روش مدل‌سازی کلاس DD-SIMCA بر روی این دسته و پیش‌بینی نمونه‌های دیگر را در شکل ۴ ت می‌توان مشاهده کرد. این شکل که نمایش فواصل محاسبه شده توسط مدل است، ناحیه مجاز برای گروه هدف (ژلاتین استخوان گاو) را با مرزی به رنگ سبز مشخص کرده است. این مرز فاصله اطمینان ۹۵ درصد را بر مبنای مدل ساخته شده تعریف می‌کند. مرز اطمینان ۹۹ درصد نیز با منحنی قرمز نشان داده شده است. همان گونه که دیده می‌شود در این مدل‌سازی روش DD-SIMCA موفقیت بسیار خوبی در احراز هویت نمونه‌های ژلاتین استخوان گاو داشته است زیرا اکثر نمونه‌های متعلق به این گروه در دامنه مجاز (زیر منحنی سبز) قرار گرفته‌اند. در عین حال، اغلب نمونه‌های مربوط به گروه‌های غیر هدف (نمونه‌های ژلاتین خوک، ژلاتین پوست گاو، و مخلوط ژلاتین‌های پوست و استخوان گاو) در خارج از مرز ۹۹ درصد قرار گرفته‌اند.

یک رویکرد ویژه مبتنی بر استخراج اطلاعات از داده در روش مدل‌سازی نرم مستقل بر مبنای شباهت کلاس است (۱۸). الگوریتم DD-SIMCA را می‌توان در چهار مرحله خلاصه کرد؛ در مرحله اول یک ماتریس داده حاوی طیف‌های اندازه‌گیری شده از نمونه‌های معلوم متعلق به گروه هدف برای کالیبراسیون مدل تهیه می‌شود و بر روی این ماتریس تحلیل مولفه اصلی، PCA، اعمال می‌شود. در مرحله دوم بر اساس مختصات محاسبه شده با PCA دو فاصله برای هر نمونه محاسبه می‌شوند. فاصله امتیاز (score distance) در واقع فاصله مایلانوبیس هر نقطه در فضای PCA از مرکز ثقل گروه است. هر چه پخش نمونه‌ها کمتر باشند و نمونه‌ها به یکدیگر شبیه‌تر باشند فاصله‌های امتیاز کوچکتر هستند. فاصله دوم، فاصله عمودی (orthogonal distance) در واقع فاصله اقلیدسی هر نقطه در فضای PCA تا فضای داده است. هر چقدر تحلیل مولفه اصلی مدل بهتری از داده بسازد این فاصله برای هر نمونه کوچکتر است. در مرحله سوم یک معیار آماری برای تعریف مرز اطمینان کلاس هدف تعریف می‌شود. این آستانه بر مبنای توزیع آماره مربع خی و برای برآیند فاصله‌های امتیاز عمودی در سطح معینی از خطای نوع اول تعریف می‌شود. به این ترتیب مدل برای کلاس هدف ساخته می‌شود و محدوده مجاز حضور اعضا کلاس تعریف می‌شود. آخرین مرحله به کارگیری مدل به منظور تعیین هویت نمونه ناشناخته است. فواصل دوگانه بر اساس مدل ساخته شده محاسبه و بر اساس آن اعتبارسنجی نمونه مجهول ارزیابی می‌شود.

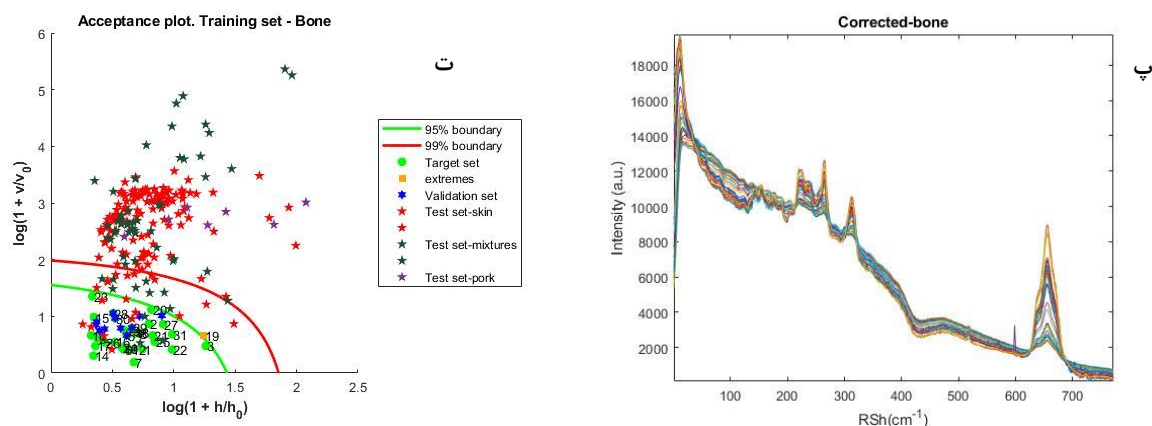
شکل ۴ داده‌های طیف‌سنجی رامان و نتایج اعمال روش DD-SIMCA را به منظور احراز هویت ژلاتین استخوان گاو



ب



الف

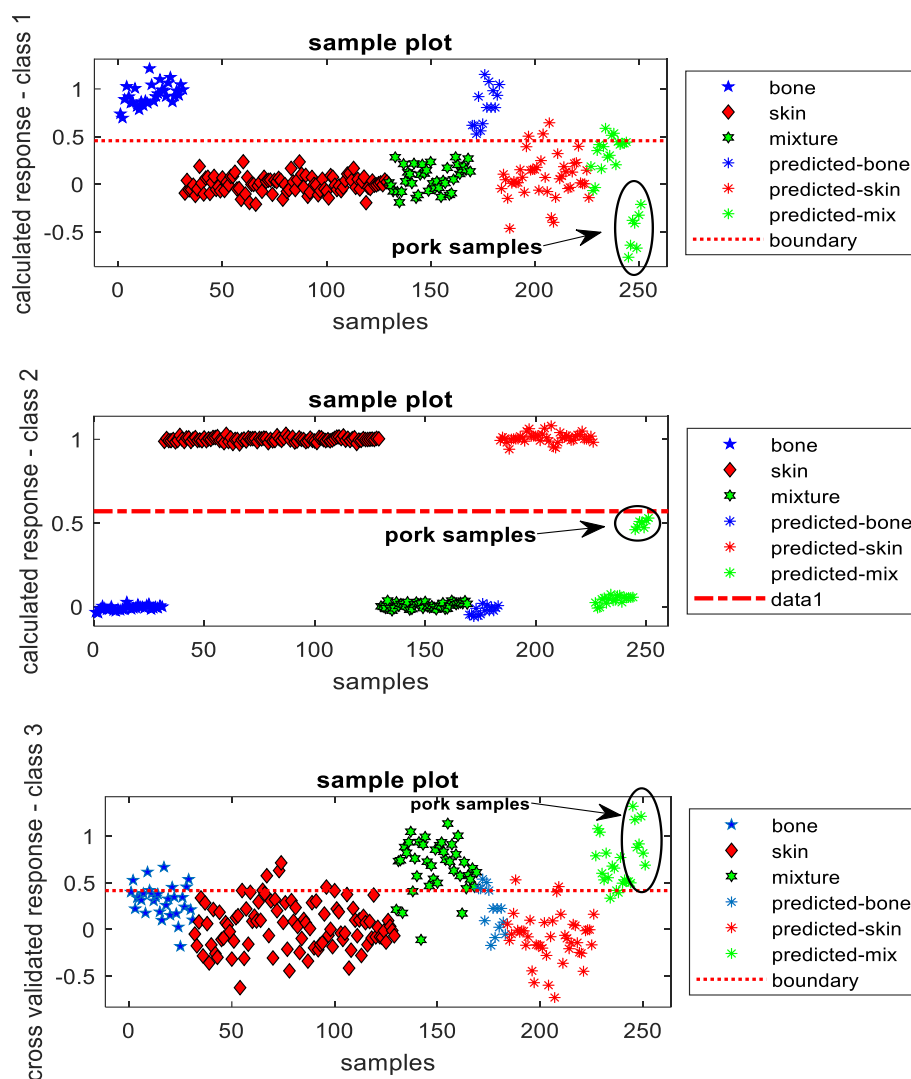


شکل ۴- الف) طیف‌های رامان ژلاتین استخراج شده از استخوان و پوست گاو؛ ب) احراز هویت ژلاتین استخوان گاو با روش DD-SIMCA، طیف‌های خام رامان مربوط به نمونه‌های خالص ژلاتین استخوان گاو؛ پ) طیف‌های رامان نمونه‌های خالص ژلاتین استخوان گاو پس از پیش پردازش با روش MSC؛ ت) نمودار فاصله حاصل از مدل‌سازی DD-SIMCA (۱۹)

تشخیص افتراقی نمونه‌های ژلاتین استخوان گاو، ژلاتین پوست گاو و مخلوط‌های دوتایی آنها بر مبنای اندازه‌گیری طیف‌سنجی رامان و کاربرد روش چند متغیره کمومتریکس PLS-DA می‌تواند مثال خوبی برای درک قدرت تشخیص یک روش چند متغیره هنگام ترکیب با طیف‌سنجی رامان باشد. شکل ۷ نتایج اعمال این روش را نشان می‌دهد. پروفایل‌های پیش‌بینی شده برای نمونه‌های مختلف متعلق به سه گروه (ژلاتین استخوان گاو، ژلاتین پوست گاو و مخلوط دو تایی آنها) در شکل‌های ۵ الف، ۵ ب و ۵ ج نشان داده شده است. شکل ۵ الف پیش‌بینی ضریب رگرسیون مدل برای کلاس ژلاتین استخوان گاو را نمایش می‌دهد. همانگونه که به وضوح می‌توان دید اغلب نمونه‌های متعلق به این گروه بالای خط آستانه ۰/۵ قرار گرفته‌اند که نشانه موفقیت مدل در پیش‌بینی است. وضعیت مشابهی برای پیش‌بینی کلاس ژلاتین پوست گاو در شکل ۵ ب و کلاس مخلوط دوتایی آنها در شکل ۵ ج وجود دارد. نکته جالب موقعیت نمونه‌های ژلاتین خوک است که در پروفایل‌های مربوط به ژلاتین‌های گاوی خالص زیر خط آستانه قرار گرفته‌اند، یعنی اینکه به درستی عضو گروه‌های مدل شده قرار نگرفته‌اند ولی عضو کلاس مخلوط دو نوع ژلاتین پیش-بینی شده‌اند.

۹- مدل‌سازی حداقل مربعات جزئی-تحلیل افتراقی

روش حداقل مربعات جزئی-تحلیل افتراقی (PLS-DA) یک روش دسته‌بندی خطی است که رگرسیون حداقل مربعات جزئی و قدرت دسته‌بندی را ترکیب می‌کند (۲۰). در PLS-DA فاکتورهایی با حداکثر همبستگی با متغیرهای وابسته با استفاده از الگوریتم رگرسیون PLS جستجو می‌شوند. PLS از رویکرد تصویرسازی برای مدل‌سازی ارتباط بین طیف‌های رامان و تعلق هر نمونه به یک دسته استفاده می‌کند. PLS-DA توسعه بسیار ساده‌ای از روش کالیبراسیون PLS2 برای مسائل دسته‌بندی است. پاسخ‌های اندازه‌گیری شده برای همه نمونه‌های متعلق به کلاس‌های مختلف مانند طیف‌های رامان اندازه‌گیری شده برای هر نمونه به عنوان متغیرهای مستقل و کدهای عضویت دوگانه صفر و یک برای هر کلاس، عناصر ماتریس متغیرهای وابسته می‌باشند. این دو ماتریس با مدل‌سازی رگرسیون PLS2 به هم مرتبط می‌شوند. بردارهای رگرسیون پس از مدل‌سازی، متغیرهای وابسته عضویت به هر کلاس را برای هر نمونه در مقایسه با یک آستانه از پیش تعریف شده ثابت (به عنوان مثال ۰/۵) پیش-بینی می‌کنند. بر این اساس، اگر مقدار پیش‌بینی شده برای نمونه ناشناخته بر اساس مدل PLS-DA بزرگتر از ۰/۵ باشد عضو گروه مورد نظر و در غیر اینصورت عضو آن گروه طبقه‌بندی نخواهد شد.



شکل ۵- نتایج اعمال روش PLS-DA به منظور تحلیل افتراقی طیف‌های رامان متناظر با دسته‌های ژلاتین استخوان گاو، ژلاتین پوست گاو و مخلوط دوتایی آنها؛ الف) پیش‌بینی مدل برای ژلاتین استخوان گاو؛ ب) پیش‌بینی مدل برای ژلاتین پوست گاو؛ پ) پیش‌بینی مدل برای مخلوط‌های دوتایی (۱۹)

۱۰- نتیجه‌گیری

مبنای طیف‌سنجی رامان و روش‌های دسته‌بندی کمومتریکس امکان‌پذیر است.

۱۱- تضاد منافع

نتایج حاصل از این مطالعه با منافع نویسنده در تعارض نیست.

منابع

1. Simons JW, Palmer BA, Hof DE, Oldenburg RC. Characterization of several ultraviolet-visible emission lines from a lead hollow-cathode lamp. Journal of the Optical Society of America B. 1989; 6(6): 1097-1102.

<https://doi.org/10.1364/JOSAB.6.001097>

روش طیف‌سنجی رامان ابزار بسیار قدرتمندی در دست محققین برای مطالعه و بررسی در سیستم‌های شیمیایی متفاوت است. طیف‌سنجی رامان گستره وسیعی از کاربردها را در علوم مختلف مانند صنایع غذایی، دارویی، شیمیایی، و محیط زیست دربرمی‌گیرد. تلفیق طیف‌سنجی رامان با روش‌های تحلیل چند متغیره کمومتریکس توانایی‌های جدیدی ایجاد می‌کند که منجر به کاربردهای بیشتر آن می‌شود. الگوشناسی نظارت شده بر مبنای اندازه‌گیری‌های طیف رامان در حل مسائل مختلف می‌تواند موفق باشد. احراز هویت، شناسایی و تشخیص افتراقی دسته‌های مختلف بر

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.06.039>

12. Malik A, Sutantyo ML, Hapsari I, Sinurat AV, Purwati EM, Jufri M, et al. Simultaneous identification and verification of gelatin type in capsule shells by electrophoresis and polymerase chain reaction. *Journal of Pharmaceutical Investigation*. 2016; 46: 475-485.

<https://doi.org/10.1007/s40005-016-0245-0>

13. Zhang G, Liu T, Wang Q, Chen L, Lei J, Luo J, et al. Mass spectrometric detection of marker peptides in tryptic digests of gelatin: A new method to differentiate between bovine and porcine gelatin. *Food Hydrocolloids*. 2009; 23(7): 2001-2007.

<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.03.010>

14. Sharma B. Instrumental methods of chemical analysis: Krishna Prakashan Media; 1981.

15. Yang D, Ying Y. Applications of Raman spectroscopy in agricultural products and food analysis: a review. *Applied Spectroscopy Reviews*. 2011; 46(7): 539-560.

<https://doi.org/10.1080/05704928.2011.593216>

16. Eliasson C, Matousek P. Noninvasive authentication of pharmaceutical products through packaging using spatially offset Raman spectroscopy. *Analytical Chemistry*. 2007; 79(4): 1696-1701.

<https://doi.org/10.1021/ac062223z>

17. Chao K, Dhakal S, Qin J, Peng Y, Schmidt WF, Kim MS, et al. A spatially offset Raman spectroscopy method for non-destructive detection of gelatin-encapsulated powders. *Sensors*. 2017; 17(3): 618.

<https://doi.org/10.3390/s17030618>

18. Ulberth F, Buchgraber M. Authenticity of fats and oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2000; 102(11): 687-694.

[https://doi.org/10.1002/1438-9312\(200011\)102:11%3C687::AID-EJLT687%3E3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/1438-9312(200011)102:11%3C687::AID-EJLT687%3E3.0.CO;2-F)

19. Forooghi E, Zade SV, Sahebi H, Abdollahi H, Sadeghi N, Jannat B. Authentication and discrimination of tissue origin of bovine gelatin using combined supervised pattern recognition strategies. *Microchemical Journal*. 2023; 187: 108417.

<https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.108417>

20. Rodionova OY, Oliveri P, Pomerantsev AL. Rigorous and compliant approaches to one-class classification. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 2016; 159: 89-96.

<https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2016.10.002>

2. Hexter R, Albrecht M-G. Metal surface Raman spectroscopy: theory. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy*. 1979; 35(3): 233-251.

[https://doi.org/10.1016/0584-8539\(79\)80143-9](https://doi.org/10.1016/0584-8539(79)80143-9)

3. Hesse M, Meier H, Zeeh B. *Spektroskopische methoden in der organischen Chemie*: Georg Thieme Verlag; 2005.

4. Brown SD, Tauler R, Walczak B. *Comprehensive chemometrics: chemical and biochemical data analysis*: Elsevier; 2020.

5. Aleixandre-Tudó JL, Castelló-Cogollos L, Aleixandre JL, Aleixandre-Benavent R. Chemometrics in food science and technology: a bibliometric study. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 2022; 222: 104514.

<https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2022.104514>

6. Ballabio D, Consonni V. Classification tools in chemistry. Part 1: linear models. PLS-DA. *Analytical methods*. 2013; 5(16): 3790-3798.

<https://doi.org/10.1039/C3AY40582F>

7. Zade SV, Forooghi E, Jannat B, Hashempour-baltork F, Abdollahi H. A combined classification modeling strategy for detection and identification of extra virgin olive oil adulteration using Raman spectroscopy. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 2023: 104903.

<https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2023.104903>

8. Bro R, Smilde AK. Principal component analysis. *Analytical methods*. 2014; 6(9): 2812-2831.

<https://doi.org/10.1039/C3AY41907J>

9. Lin L, Regenstein JM, Lv S, Lu J, Jiang S. An overview of gelatin derived from aquatic animals: Properties and modification. *Trends in Food Science and Technology*. 2017; 68: 102-112.

<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.012>

10. Hermanto S, Fatimah W. Differentiation of bovine and porcine gelatin based on spectroscopic and electrophoretic analysis. *Journal of Food and Pharmaceutical Sciences*. 2013: 68-73.

11. Tukiran NA, Ismail A, Mustafa S, Hamid M. Determination of porcine gelatin in edible bird's nest by competitive indirect ELISA based on anti-peptide polyclonal antibody. *Food Control*. 2016; 59: 561-566.

Raman spectroscopy and its application in authentication of halal foods by using chemometrics approaches

Somaye Vali Zade

Halal Research Center of IRI., Food and Drug Administration, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran.

Article history

Received: 21 January 2023

Revised: 30 January 2023

Accept: 31 January 2023

Keywords:

Raman spectroscopy

Halal food authentication

Adulteration

Chemometric methods

Correspondance to:

Somaye Vali Zade

Halal Research Center of IRI.,

Food and Drug

Administration, Ministry of

Health and Medical

Education, Tehran, Iran.

Email:

smy.valizade@gmail.com;

Tel.: +98-21-88909033

Fax: +98-21- 88890858

Abstract

Background and objective: Basic understanding of Raman spectroscopy by strengthening the attitude towards this powerful method can help to expand its applications. Combination of chemometrics multivariate analysis methods with other instrumental analysis is useful to find proper solutions for many research and practical problems. In this study, analysis of Raman spectroscopy data by chemometrics methods has been reviewed. The developed approach based on chemometrics methods is a valid, accurate, and cost-effective route in authentication of halal foods.

Results and conclusion: Supervised pattern recognition methods are the multivariate chemometrics techniques that are used for qualitative identification, authentication and discriminant analysis in different fields, including food researches. The principal component analysis method provides the possibility of visualizing and exploring in the data space by reducing the dimensions of the data and is an introduction to the classification methods. Authentication of bovine skin and bone gelatin is possible with Raman spectroscopy measurements and the use of supervised pattern recognition methods. The simple and non-invasive measurement of Raman spectra and the application of multivariate chemometrics methods for their analysis leads to the creation of solutions for many problems in the field of qualitative identification and quantitative analysis in complex systems.

