

بسمه تعالی

مروری بر مطالعات انجام شده در زمینه شناسایی ژلاتین حلال با استفاده از روش های نوین آزمایشگاهی

چکیده

در سال های اخیر با افزایش تمایل مصرف کنندگان مسلمان و غیرمسلمان به تهیه محصولات با برچسب «حلال»، بازار جهانی حلال گسترش یافته است. مواد اولیه و فرآورده های غذایی حلال عبارت است از آنچه به موجب شرع مقدس اسلام، خوردن و آشامیدن آن منع نگردیده است و ضمن رعایت قوانین شرعی تولید و عرضه میگردد. این مواد و فرآورده ها شامل خوردنی ها و آشامیدنی های پاک است که براساس احکام و قوانین اسلامی مصرف آنها مجاز شمرده میشود و باید عاری از هرگونه ترکیبات حرام باشد [۱]. اعتبار سنجی یک معیار بسیار مهم در ایمنی بهداشت غذا و کیفیت غذا میباشد. غذاهای با نشان حلال به معنی غذاهای مجاز برای خریداران مسلمان و یهودی است که از مصرف خوک و فرآورده های خوکی منع شده اند [۲]. مطابق مقررات ملی و سازمان غذا و داروی کشور برچسب گذاری مواد غذایی بایستی توصیفی از خصوصیات تغذیه ای یک محصول غذایی برای مطلع نمودن مصرف کننده باشد [۳]. بنابراین برچسب حلال باید نشان دهنده حلیت آن ماده غذایی و همچنین مواد تشکیل دهنده آن باشد. جهت اطمینان از حلیت مواد غذایی و مواد تشکیل دهنده آنها، شناسایی منشاء گونه های آن محصولات مانند ژلاتین و محصولات گوشتی و دارویی حائز اهمیت می باشد. اما گاهی بدلیل اعمال فرایندهای پیچیده در طی فراوری محصولات و یا تغییرات پس از پخت، شناسایی منشاء محصولات غذایی با روش های متداول امکان پذیر و قابل اطمینان نیست. در سالهای اخیر با استفاده از خصوصیات شیمیایی، مولکولی و ژنتیکی و با کمک روش های متعددی از جمله HPLC، PCR، ELISA، MASS و FTIR، منشاء محصولات غذایی مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته اند. مقاله زیر به بررسی مطالعات انجام یافته جهت شناسایی منشاء ژلاتین مورد استفاده در مواد غذایی حلال با استفاده از این روش ها پرداخته است.

کلمات کلیدی: غذای حلال، ژلاتین، FTIR، HPLC، PCR، ELISA، MASS

مقدمه

در حال حاضر، مسائل مربوط به محصولات حلال از جمله مواد غذایی، داروئی و بهداشتی، در تجارت و اولویت در میان کشورهای مسلمان و غیر مسلمان در حال ظهور هستند. اعتبار «حلال» به منظور تضمین کیفیت محصولات از جمله مواد غذایی، دارویی و آرایشی، به ویژه برای جوامع مسلمان ضروری است. با توجه به پیشرفت علم و فن آوری، برخی از مواد غذایی ممکن است تقلبی یا آلوده به اجزای غیر حلال باشند. در نتیجه، شناسایی و در برخی موارد تعیین اجزای غیر حلال برای مسلمانان الزامی است. چندین روش تحلیلی پیشنهاد شده و برای تحلیل اجزای غیر حلال در برخی از محصولات از جمله تکنیک های کروماتوگرافی، طیفسنجی و بیوتکنولوژی مولکولی توسعه یافته اند. اسپکتروسکوپی ارتعاشی (VS)^۱ به خاطر سادگی و سهولت در عملیات، جزو روش های رایج تجزیه و تحلیل اجزای غیر حلال هستند [۴].

^۱ Vibrational spectroscopy

فشار جامعه جهانی در برچسب گذاری دقیق منشاء گونه های مورد استفاده در مواد غذایی حلال و افزودنی های مورد استفاده در این محصولات مانند ژلاتین، رنگدانه های مواد غذایی و همچنین مسایل کشف شده در خصوص استفاده از گوشت های غیر مجاز در برخی محصولات گوشتی، باعث شده است که مدیریت زنجیره تامین غذا، چیزی فراتر از برچسب گذاری صرف و بدون پشتوانه اعتبارسنجی قابل اطمینان باشد. همچنین حساسیت پیروان برخی مذاهب از جمله اسلام و یهودیت بر عدم استفاده از محصولات خوکی مزید بر علت گردیده است. [۴-۶]

حلال یک واژه عربی است که به معنی « اجازه داده شده، مجاز و سالم میباشد» [۷]. مواد اولیه و فرآورده های غذایی حلال عبارت است از آنچه به موجب شرع مقدس اسلام، خوردن و آشامیدن آن منع نگردیده است و ضمن رعایت قوانین شرعی تولید و عرضه میگردد. این مواد و فرآورده ها شامل خوردنی ها و آشامیدنی های پاک است که بر اساس احکام و قوانین اسلامی مصرف آنها مجاز شمرده میشود و باید عاری از هر گونه ترکیبات حرام باشد [۱] در سال ۲۰۱۳ تجارت جهانی حلال در حدود ۵۸۰ تا ۶۶۰ میلیارد دلار برآورد گردید و پتانسیل فراوانی برای افزایش دارد [۸]. تخمین زده میشود که تا سال ۲۰۲۵ مسلمانان ۳۰٪ از جمعیت کل دنیا را تشکیل دهند. بازار مواد غذایی حلال در حال حاضر حدود ۱۲ درصد از تجارت جهانی محصولات کشاورزی را تشکیل می دهد [۲]. همچنین مصرف مواد غذایی و مکمل های غذایی مناسب جهت استفاده از مزایای تغذیه ای مناسب آنها و تامین سلامت مصرف کننده میباشد، ولی به علت تشابه ویژگی های مورفولوژیکی و عدم وجود ویژگی های قابل تشخیص برای تفکیک، سردرگمی ناشی از نام های معمول محلی مورد استفاده، مصرف جایگزین های محلی و یا جایگزینی عمدی مواد ارزانتر، گاهی باعث تقلب می شود و این امر ممکن است منجر به بروز عوارض جانبی شود [۹].

همه انواع محصولات خوکی (pig derivatives) مانند گوشت خوک، لارد، ژلاتین خوکی و سایر محصولات حاصل از خوک برای مسلمانان ممنوع شده است، از این رو توسعه روش های آنالیزی برای شناسایی این محصولات حائز اهمیت میباشد. در میان افزودنی های مواد غذایی، قابلیت تفکیک ژلاتین با منشاء خوکی و گاوی مورد توجه ویژه بسیاری از دانشمندان علم حلال قرار گرفته است. از آنجا که خصوصیات فیزیکی شیمیایی ژلاتین حاصل از منشاء خوکی و گاوی بسیار مشابه یکدیگر بوده و با روش های معمول قابل شناسایی نیستند، دانشمندان سعی بر شناسایی منشاء هویت ژلاتین از طریق روش های نوین آزمایشگاهی نمودند. از جمله این روش ها میتوان به آزمون های RT-PCR، ELISA، HPLC، Mass Spectrometry و FTIR اشاره کرد. هیداکا و لیو (۲۰۰۲) نشان داده اند که ژلاتین گاوی و خوکی ممکن است با استفاده از روش کاهش PH پس از رسوب فسفات کلسیم تشخیص داده شوند [۱۰] آنالیز آمینو اسید [۱۱] و ELISA [۱۲] نیز می توانند بین ژلاتین های خوک و گاو تفاوت قایل شوند، اما هر دوی این روش ها به نتایج و تجربیات مکرر نیاز دارند چون آماده سازی نمونه بسیار حساس و سخت است [۱۳]

از این رو برچسب گذاری دقیق مواد غذایی، باعث می شود که مصرف کنندگان با اتخاذ تصمیمات آگاهانه، مواد غذایی مورد نیاز خود را خریداری نمایند و از آنجا که در برچسب گذاری مواد غذایی باید دقت کافی صورت گیرد، توسعه روش های آزمایشی قابل اعتماد برای صنایع مصرفی؛ به مصرف کنندگان و نهادهای نظارتی و قانونی از لحاظ تعیین منشاء گونه های مواد غذایی کمک شایانی خواهد نمود. در این مقاله ما بصورت مختصر به بررسی مطالعاتی که در جهت شناسایی منشاء ژلاتین مورد استفاده در مواد غذایی با برند حلال انجام شده است میپردازیم.

واکنش زنجیره ای پلیمرز PCR

پیشینه:

PCR یک فناوری قدرتمند و توانمند است که به عنوان یک ابزار ضروری در طیف وسیعی از رشته های زیست شناختی کاربرد دارد. با این حال، با توجه به سهولت استفاده و اغلب عدم وجود استانداردهای سختگیرانه، بسیاری از برنامه های PCR می توانند به شدت متغیر، نادرست و در نهایت به نتایج بی معنی منجر شود. بنابراین، قبل از تثبیت (یا گسترش) هر روش در برنامه های جدید باید به دقت اعتبار سنجی گردد [۱۴].

واکنش زنجیره ای پلیمرز یا PCR در سال ۱۹۸۳ توسط Kary Banks Mullis ابداع شد. [۱۵] این تکنیک یک روش آنزیمی است که در یک منطقه خاصی از DNA برای بدست آوردن یک توالی خاصی بطور مکرر کپی برداری و تکثیر انجام میشود. این فرایند «تکثیر» مولکولی شامل گرمایش و سرمایش نمونه در یک سیکل حرارتی دقیق بوده که معمولاً بیش از حدود ۳۰ سیکل حرارتی می باشد. در هر سیکل حرارتی، یک کپی از منطقه مورد نظر از DNA تولید شده است. مرزهای محصول تکثیر شده با پرایمرهای الیگو نوکلئوتید که مکمل 3'-end منطقه مورد نظر هستند، تعریف شده است. در یک واکنش ایده آل با بازده ۱۰۰٪، تقریباً یک میلیارد کپی از محدوده مورد نظر DNA در طی ۳۲ سیکل حرارتی تشکیل شده است. با این حال، کاهش راندمان تکثیر از طریق مهار PCR و یا خنثی کردن پرایمر ضعیف منجر به تولید تعداد کمتری از محصول PCR می شود. [۱۶]

اصول PCR بر پایه این حقیقت استوار است که در دمای نزدیک ۹۵ درجه سلسیوس DNA دناتوره گشته، دو رشته مولکول هدف به علت شکستن پیوندهای A-T و C-G از هم جدا میشوند. در دمای آنیلینگ یا رسوبگذاری در دامنه ۶۵-۵۰ درجه سانتیگراد پرایمرهای مکمل جلو (forward) و معکوس (reverse) به انتهای 3' اتصال یافته و مولکول DNA هدف که حالا تک رشته ای است از دو طرف محصور میکنند. سپس پلیمرز Taq، رشته جدید DNA را با اضافه کردن dNTP ها توسعه داده و مولکول دو رشته ای خودش را در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد بازسازی میکند. این روند چند بار تکرار شده و چندین نسخه از مولکول هدف را بوجود می آورد [۱۵].

در مقایسه با روش هایی که بر پایه تشخیص پروتئین تکیه دارند، فن آوری های مبتنی بر DNA مزایای بسیاری دارند، از جمله میتوان به پایداری حرارتی بیشتر و توانایی تجزیه و تحلیل محصولات غذایی بسیار پردازش شده اشاره کرد. علاوه، این تکنیک ها ارزان تر، سریع تر و حساس تر هستند. در روش های مبتنی بر DNA، الیگونوکلئوتید های DNA برای جفت شدن با توالی مورد هدف مولکول های DNA مورد استفاده قرار می گیرند، در حالی که روش های تشخیص مبتنی بر پروتئین بسیار گران تر هستند. علاوه بر این، استفاده از

Real-time PCR امکان نظارت بر پیشروی واکنش را در طول آزمایش فراهم میسازد، همچنین در مقایسه با آزمون هایی که نیاز به تجسم مبتنی بر ژل و یا استفاده از آنتی بادی های ثانویه برای تجسم دارند صرفه جویی در زمان مزیت دیگر این روش است. کل زمان لازم برای استخراج DNA و شناسایی با روش Real-time PCR حدود ۳ ساعت بوده که بسیار سریعتر از تشخیص آنتی ژن با ELISA است. [۱۷] با این وجود، تخریب DNA و ورود بازدارنده ها ممکن است منجر به شکست و یا خطا در روش PCR شود [۹].

موضوع بسیار مهم برای تکثیر جایگاه های هدف در داخل یک ناحیه ای از ژنوم، طراحی پرایمر است. پرایمر موفق عمدتاً برای دستیابی به دو هدف یعنی ویژگی و کارایی طراحی میشود. در صورتیکه پرایمرها جهت پیشگیری از نتایج مثبت کاذب، با دقت کافی طراحی شوند هر دو این اهداف دست یافتنی می باشند. هنگام طراحی پرایمر باید ملاحظاتی در ذهن داشته باشیم که از جمله آنها میتوان به طول پرایمر (متناسب با ویژگی واکنش PCR و دمای واکنش)، محتوای GC (موثر در تعیین دمای ذوب T_m)، دمای ذوب T_m ، برآورد دمای مطلوب ذوب و دمای آنیلینگ پرایمر، وارد کردن جایگاه های محدود کننده، مکمل نبودن پرایمر ها، اجتناب از تکرار بازها، دقت در نوکلئوتید انتهایی پرایمر ها و نیز پیشگیری از ایجاد ساختار های ثانویه، اشاره کرد [۱۵].

مطالعات انجام شده

ژلاتین بعنوان یک ماده غذایی افزودنی در بسیاری از محصولات غذایی و دارویی از جمله محصولات قنادی، کیک ها و کلوچه ها، محصولات گوشتی (بعنوان جذب کننده آب جهت افزایش وزن) و همچنین بعنوان پوشش دهنده در داروها و کپسول های ژلاتینی کاربرد دارد [۱۸، ۶]. اشکال تجاری ژلاتین مانند ورق، گرانول یا پودر بطور عمده از استخوان گاو و پوست و استخوان خوک استخراج میگردد. البته طی سالهای اخیر ژلاتین از منابعی

مانند ماهی و مرغ و برخی گیاهان حاصل شده است که بسیار گران قیمت هستند. ژلاتین گاوی و خوکی دارای ساختارهای مشابه و ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی یکسانی هستند و بنابراین تمایز قائل شدن بین آنها، از طریق روش‌های معمول، کار مشکلی است. با توجه به فرایند بسیار پیچیده و تغییر ماهیت دهنده مورد استفاده در تولید ژلاتین، تعیین گونه‌های تجاری محدود شده است [۶]. طی سالیان متمادی تفکیک این دو نوع ژلاتین غیر ممکن مینمود. علی‌رغم تلاش‌های فراوان دانشمندان در سراسر جهان و انجام آزمایشات متعدد شیمیایی و فیزیکی تفکیک ژلاتین خوکی و گاوی بی نتیجه ماند. سرانجام در سال ۲۰۰۴ دکتر نعمتی با انجام آزمایشات کروماتوگرافی شیمیایی، موفق به تفکیک این دو نوع ژلاتین استخراج شده از پوسته کپسول‌های ژلاتینی گردید.

دکتر نعمتی و همکاران (۲۰۰۴) برای اولین بار در جهان به بررسی تفکیکی این دو نوع ژلاتین توسط روش chromatographic-chemometric در کپسول‌های ژلاتینی پرداختند. ایشان ۱۴ نمونه ژلاتین گاوی و ۵ نمونه ژلاتین خوکی را بررسی نمودند و از هیدرولیز اسیدی رایج جهت تجزیه اسیدهای آمینه استفاده کردند. جداسازی و تفکیک اسیدهای آمینه توسط جریان معکوس (RP) HPLC انجام شد. از ۲۰ منحنی بدست آمده توسط روش HPLC، یکی از منحنی‌ها بسیار شبیه به منحنی مربوط به ژلاتین گاوی بود. ارتفاع منحنی، مساحت آن، پهنای منحنی و درصد استفاده شده برای تولید ماتریکس (مخلوط دو ژلاتین) بسیار منطبق با منحنی حاصل شده بود. نتایج بدست آمده از مطالعات دکتر نعمتی و همکاران، تفکیک سازی بسیار خوبی را بین ژلاتین خوکی و گاوی توسط PCA یا آنالیز مولفه‌های اصلی نشان میداد [۱۱]. پس از دستاوردهای دکتر نعمتی و سایرین، دانشمندان سایر کشورها نیز در سراسر جهان به بررسی و تفکیک DNA خوکی و گاوی توسط روش‌های مختلف مبتنی بر اسیدهای آمینه و پروتئین‌ها پرداختند.

Yasemin Demirhan و سایرین، اقدام به انجام آزمون Real-time PCR بر روی ۳۶ نمونه از مواد غذایی حاوی ژلاتین، از جمله آبنبات ژله‌ای، شیرینی ژله‌ای ترکی و مارشمالو که در ترکیه و آلمان تولید شده بود نمودند. در این مطالعه استخراج و خالص سازی DNA از ژلاتین با استفاده از سیستم جانوری آماده سازی SureFood انجام گردید و Real-time PCR با استفاده از کیت SureFood® Animal ID Pork Sens انجام شد. از ۱۴ محصول غذایی تهیه شده از آلمان، دو نمونه شامل DNA خوکی بودند درحالی‌که ۲۱ نمونه محصول تولید شده در ترکیه فاقد این ماده بودند و یک نمونه تولید شده در کشور ترکیه DNA خوکی را نشان داد درحالی‌که در برچسب گذاری این محصول استفاده از این ماده ذکر نشده بود، که این امر بعنوان تقلب در ماده غذایی محسوب میگردد. این آزمایشات درحالی انجام شدند که ۶ نمونه کپی بطور مشخص نشان دادند که کیفیت مطلوب DNA با اطمینان میتواند از ژلاتین استخراج شود و زنجیره سیتوکروم b بطور مشخص تقویت و کشف گردد. از این رو آزمایشاتی با گرفتن ترکیبات گوناگون از DNA گاوی با اضافه کردن ۱۰، ۱، ۰.۱ درصد DNA خوکی انجام گردید. طبق نتایج آزمایشات Yasemin و همکارانش وجود مقدار ۱٪ DNA (w/w) خوکی در DNA گاوی بطور قابل اطمینانی کشف گردید. درحالی‌که مقدار ۰.۱٪ DNA (w/w) خوکی اضافه شده به DNA گاوی در هیچکدام از نمونه‌ها قابل تفکیک نبود. از این رو ایشان وجود ۱٪ DNA خوکی را بعنوان محدودیت موثر در آن مطالعه در نظر گرفتند [۱۹].

Cai Hui و همکاران (۲۰۱۲) با انجام یک آزمون real-time PCR بر روی ژلاتین‌های خوکی و گاوی خالص که با نسبت‌های مشخص در آزمایشگاه با یکدیگر مخلوط شده بودند و همچنین کپسول‌های ژلاتینی خریداری شده از Torpac، نشان دادند که این روش توانایی شناسایی دقیق DNA خوکی و گاوی را در غلظتهای پایین تا ۱ pg/mL دارد. علاوه بر این، فقدان تلاقی متقابل زمانی که این مجموعه‌ها برای تقویت DNA از گونه‌های دیگر استفاده می‌شود، ویژگی خاصی از آزمون qPCR را برای هر گونه از خود نشان می‌دهد. ایشان دریافتند هنگامی که ترکیب ژلاتین دوتایی حاوی مقادیر مختلف ژلاتین خوکی و گاوی تهیه شده و با استفاده از آزمون‌های qPCR (real-time PCR) مورد آزمون قرار گرفت، نسبت‌های

تعیین شده ماده خوکی به ماده گاوی بسیار نزدیک به مقادیر تئوری آنها بود و سطح آلودگی به میزان ۱٪ از حضور گونه های دیگر در مخلوط ژلاتین می تواند تعیین شود [۱۸].

طبق گزارش Cai Hui و همکاران زمانیکه کپسول های ژلاتینی تحت این آزمون قرار گرفتند، با وجود اینکه مقدار DNA بطور قابل توجهی کمتر از میزان تئوری آن تشخیص داده شد (که این امر میتواند بعلت استفاده از نمونه هایی باشد که بطور بالقوه در طول فرایند تولید ژلاتین و یا کپسول های ژلاتینی تحت فرایند شدید قرار گرفته اند باشد) تعیین هویت گونه های گاوی و خوکی و نیز برآورد فراوانی نسبی هر گونه از گونه دیگر امکان پذیر بود. با این حال، از آنجا که میزان تخریب DNA که در تولید ژلاتین و کپسول ژلاتینی رخ می دهد ممکن است متفاوت باشد و تعداد کپی عناصر تکراری بین افراد مختلف در یک گونه حیوانات ممکن است متفاوت باشد، مقدار DNA تعیین شده ممکن است همیشه نشان دهنده مقدار مواد خاصی از گونه های خوکی و گاوی در ژلاتین و کپسول های ژلاتینی نباشد. بنابراین داده های کمیته به دست آمده در تحقیق ایشان تنها یک تقریب است [۱۸].

دکتر حسام شعبانی و همکاران، با تهیه ۱۶ نمونه شامل: ۴ نمونه مخلوط ژلاتین های گاوی و خوکی، ۸ نمونه کپسول دارویی از گونه های ناشناخته از داروخانه های تهران و ۴ نمونه محصولات غذایی محتوی ژلاتین گاوی (ماشمالو و کیک که بعنوان ژلاتین گاوی نشانه گذاری شده بودند) و از فروشگاه های سطح شهر جمع آوری شده بودند، کارایی روش PCR را در شناسایی منشاء ژلاتین مورد بررسی قرار دادند [۶].

در محصولات غذایی بسیار پردازش شده مانند ژلاتین و غذاهای حاوی آن و محصولات دارویی، DNA به قطعات کوتاه تبدیل شده است که این امر باعث ایجاد برخی مشکلات در تقویت PCR میگردد. پیش نیاز ضروری برای تقویت PCR داشتن قالب مناسبی از DNA جهت تجزیه و تحلیل است. دکتر شعبانی و همکاران، برای این منظور از یک کیت تجاری تحت شرایط بهینه سازی اتصال ستون تنظیم شده برای بازیابی حداکثری قطعات کوتاه DNA استفاده نمودند و همچنین برای تشخیص وجود مقدار کافی از DNA در ژلاتین، آغازگرها را از مناطق حفاظت شده ژنهای میتوکندری انتخاب کردند. همچنین، سایتهای پیوند پرایمر از قطعات کوتاه DNA جهت تقویت انتخاب شده بودند، پرایمرهای استخراج شده مورد استفاده برای تقویت را از پودر ژلاتین با منشاء مشخص انتخاب کردند. نتایج الکتروفورز برای محصول تقویت شده PCR نشان داد که باندهای ۲۱۲ و ۲۷۱ به ترتیب برای ژلاتین خوکی و گاوی بودند [۶]. (شکل ۱)

طبق نظر دکتر شعبانی و همکاران تکنیک PCR مرسوم قابلیت شناسایی ژلاتین خوکی و گاوی در محصولات غذایی و دارویی را داشته و مقرون به صرفه، اختصاصی و حساس برای آنالیز ژلاتین در غذاها و داروها میباشد که میتواند جهت تایید حلال بودن محصولات غذایی و دارویی مورد استفاده قرار گیرد [۶].

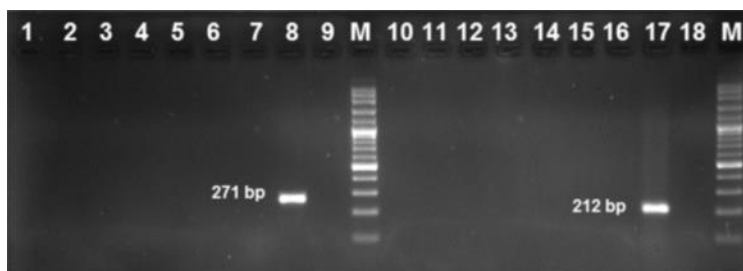
از سوی دیگر H.H Grundy و همکاران (۲۰۱۶) با تهیه ۱۰ نمونه از ژلاتین های گاوی و خوکی که با درصد های مشخص با ژلاتین مرغ که در آزمایشگاه تهیه شده و مخلوط شده بود، نشان دادند که روش PCR جهت تشخیص صحیح ژلاتین گاوی از خوکی قابل اطمینان نمی باشد. ایشان با اختلاط ۰٪ تا ۴.۶٪ ژلاتین گاوی و خوکی در آگزودای ژلاتین مرغ (بعنوان ژلاتین مرجع) نشان دادند که همه نمونه های استخراج شده از آگزوداهای شبیه سازی شده محتوی ژلاتین گاوی، توسط آنالیز PCR به نادرستی، بعنوان ژلاتین خوکی در نظر گرفته شدند. هیچکدام از DNA های گاوی یا خوکی، در آگزوداهای شبیه سازی شده محتوی فقط ژلاتین خوکی در سطح ۰.۲-۳.۵٪ (w / v) یافت نشدند. ماده شبیه سازی شده حاوی ژلاتین خوکی، تنها در سطح ۴.۶٪ (w / v) به طور اشتباه، به عنوان مادهی محتوی ژلاتین های گوشت گاو و گوشت خوک عنوان شد. در پودر ژلاتین تجاری مشکوک به داشتن ژلاتین خوکی (تزریق ۲) DNA خوکی آشکارسازی شد [۵].

Hassan Ibrahim Abdullah Amqizal و همکاران (۲۰۱۶) با آزمایش بر روی ۳۶ نمونه از غذاهای فراوری شده حاوی ژلاتین و یا وارداتی (شامل ژلاتین خوراکی خالص، ژله، مارشمالو، آبنبات، آدامس، پیتزای ژامبون، آبنبات مخلوط شده با شیر، سالسا، کیک هویج، و قرص دارویی) در ریاض عربستان به بررسی منشاء ژلاتین مورد استفاده در فرمولاسیون این محصولات نمودند. آنها از کنسرو گوشت خوک تهیه شده در کشور چین، یک نمونه ماهی تهیه شده از ریاض عربستان و یک نمونه فیله گوشت گاو تهیه شده از همام شهر، برای ایزوله کردن و جداسازی DNA مربوط به هرگونه بعنوان کنترل مثبت استفاده نمودند. در مطالعه ایشان ۳۳ نمونه از محصولات غذایی بعنوان ژلاتین استخوان گاو، یا ژلاتین خالص گاوی، یا ژلاتین ماهی و به تنها با عبارت ژلاتین اعلام شده بودند و در ۳ نمونه از جمله قرص دارویی هیچ اشاره ای به ژلاتین نشده بود. در آزمون PCR مستقیم (یا ساده) حضور DNA خوک را با " حساسیت بالا نسبت به خوک" در ۵ نمونه از ۱۲ نمونه ماده غذایی فرایند شده نشان داد که این میتواند بدلیل برچسبگذاری نادرست و یا جعلی ژلاتین حلال بجای ژلاتین خوکی باشد. طبق نظر Hassan Ibrahim و سایرین، این مطالعه تایید کرد که PCR یک ابزار تحلیلی امیدوار کننده و قابل اطمینان برای تشخیص منبع DNA و برای اجرای مقررات برچسب گذاری است و به راحتی می تواند برای تجزیه و تحلیل روزانه جهت شناسایی گونه ها و احراز هویت حلال بودن محصولات فراوری شده استفاده شود. با این حال، نتایج PCR معمولی باید توسط توالی و هم تراز با NCBI تایید شود. ایشان دریافتند که، Real Time-PCR بسیار حساس تر از PCR معمولی است، اما اعتبار آن برای تأیید برچسب «حلال» ژلاتین خالص یا محصولات غذایی فرآوری شده حاوی ژلاتین باید با یک پرایمر خوکی قوی (پرایمر اختصاصی DNA خوک) که واکنش متقابل با DNA سایر گونه های حیوانی نداشته باشد آزمایش شود [۲۰].

دکتر بهروز جنت و همکاران (۲۰۱۸) با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره پلیمرز (PCR) توسط پرایمرهای اختصاصی هر گونه و همچنین تجزیه و تحلیل شبیه سازی داده های آزمون طیف سنجی جرمی جهت تفکیک منبع ژلاتین گاوی، ژلاتین حاصل از خوک و ژلاتین با منبع ماهی، در ژلاتین خالص تجاری و مواد غذایی حاوی ژلاتین، مورد بررسی قرار دادند. همچنین مجموعه پرایمر اختصاصی PCR با استفاده از روش

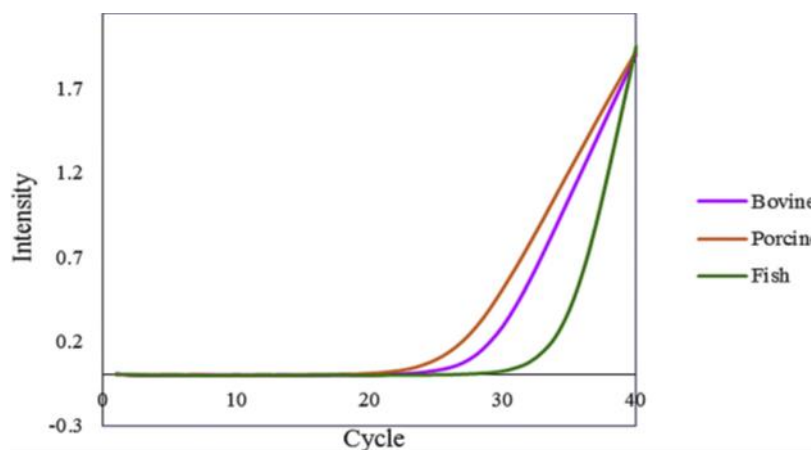
Real-time PCR به منظور شناسایی منبع ژلاتین به طور مرتب تعیین گردید. Real-time PCR حساس به شناسایی ژلاتین توسط DNA خاص هر گونه است. با این وجود، تعیین منبع هنگامیکه DNA در طول فرایند تولید دنا توره یا حذف می شود، غیرممکن است. تقویت DNA گاو با پرایمر گاو، DNA خوک با پرایمر خوک و DNA ماهی با پرایمر ماهی به ترتیب با خطوط بنفش، نارنجی و سبز در شکل (۲) نشان داده شده است [۲۱].

مجموعه های اعتبار سنجی شامل: ۱: دو ژله مصنوعی با استفاده از استانداردهای مرجع تهیه شده، ۲: آب نبات های جومینایی از یک فروشگاه خرده فروشی محلی و ۳: دو پودر ژلاتین (از اقلام آزمایشگاهی داخل آزمایشگاه) دریافت شده از مرکز حلال ایران بودند. دکتر جنت و سایرین مشاهده نمودند که Real-time PCR در حالی می تواند مفید باشد که، توسط روش های PCR معمولی امکان ردیابی DNA از منبع ژلاتین در محصول وجود ندارد و یا وقتیکه DNA از روی محصولات دنا توره و یا حذف شده باشد. در نهایت، آزمایش Real-time PCR برای شناسایی ژن های گاو، گوشت خوک و ماهی در چندین محصول تجاری مورد استفاده قرار گرفت. نمونه های ژلاتین تست شامل پودر های ژلاتین تجاری، تثبیت کننده ها، پودر کیک، پودر ژله، آب نبات میوه ای، آب نبات، مارشمالو و پوسته کپسول بودند، که همه آنها توسط مرکز حلال ایران تهیه شدند. نتایج آزمایش نشان داد که روش های پیشنهادی در تشخیص ژلاتین گوشتی، ماهی و خوکی در ژلاتین خالص تجاری و همچنین محصولات غذایی و دارویی موفق بوده اند، بنابراین تشخیص تقلب در مواد غذایی و دارویی امکان پذیر است [۲۱].

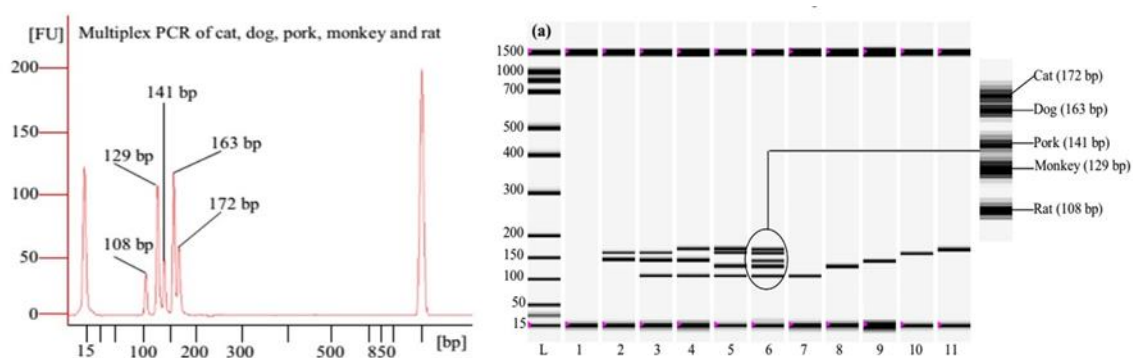


شکل ۱: آزمون اختصاصی PCR برای تشخیص گونه های پرایمر های خوکی و گاوی. خطوط ۱ تا ۸ مخصوص DNA های خر، بز، مرغ، اسب، خوک، بوقلمون، گوسفند و گاو است، که بترتیب با پرایمر های گاوی آزمایش شده اند؛ خطوط ۱۰ تا ۱۷ مخصوص به DNA خر، بز، مرغ، اسب، گاو، بوقلمون، گوسفند و خوک میباشد که با پرایمر های خوکی آزمایش شده اند؛ ستون های ۹ و ۱۸ کنترل های منفی هستند. M، DNA مارکر

است (۱۰۰ bp) [۶]



شکل ۲: منحنی تکثیر DNA استخراج شده از نمونه های مرجع با استفاده از پرایمر های طراحی شده برای گاو و خوک و ماهی [۲۱]



شکل ۳ و ۴: تصویر ژل و الکتروفورگرام بدست آمده از آزمون Multiplex PCR در مخلوط گوشت های گربه و سگ و خوک و میمون و موش. نقاط اوج منحنی بترتیب نشان دهنده DNA های موش (۱۰۸)، میمون (۱۲۹)، خوک (۱۴۱)، سگ (۱۶۳) و گربه

(۱۷۲) میباشد. [۲۲]

در طی دو دهه گذشته، علاقه به تحقیق و بررسی برای استفاده از روش های اسپکتروسکوپی مولکولی شامل UV-VIS ، فلورسنس ، Vibrational spectroscopy (شامل Raman و Infrared) و NMR^۲ در بین جوامع در حال افزایش است. اسپکتروسکوپی مولکولی یک طیف وسیعی از علم است که به واکنش^۳ بین امواج الکترومغناطیس (EMR)^۴ در مناطق خاص با نمونه ها در سطح مولکولی میپردازد [۲۳]. اسپکتروسکوپی ماوراء بنفش - visible^۵ واکنش بین EMR با نمونه را در مناطق ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر حساب می کند. در حالیکه اسپکتروسکوپی مادون قرمز (IR) منطقه ای بین ۲۵۰۰۰-۸۰۰ nm را مورد مطالعه قرار میدهد [۲۴، ۲۵]. از جمله مزایای اسپکتروسکوپی مولکولی میتوان به غیر مخرب بودن، حداقل نیاز و یا بدون نیاز به آماده سازی نمونه ، سهولت عملیات و سرعت در آنالیز کردن نمونه اشاره کرد [۲۶].

اسپکتروسکوپی IR بر اساس واکنش درونی بین نمونه ها با EMR در طیف امواج IR است که منجر به انتقال ارتجاعی^۶ باندهای شیمیایی می شود. بنابراین IR توأم با Raman بنام اسپکتروسکوپی لرزشی و یا Vibrational Spectroscopy نامیده می شود. طیفسنجی vibrational (VS) به تعامل بین تابش الکترومغناطیسی در منطقه مادون قرمز با مولکول می پردازد. به عبارت دیگر VS، آنالیز ویژگی های مولکولی بر اساس ارتعاشات سطح مولکولی است، که مرتبط با پیوندهای شیمیایی موجود در نمونه بوده و یک روش بسیار انتخابی است [۲۷، ۲۸]. روش های طیفسنجی IR و رامان به اندازه کافی سریع و حساس ، ساده و غیر مخرب و غیر تهاجمی هستند که اطلاعات مفیدی در مورد ترکیب مولکولی، ساختار و تعاملات درون یک نمونه را فراهم می کنند. یکی از مهم ترین ویژگی های VS ، امکان انجام همزمان مولفه های مختلف در یک نمونه از یک اندازه گیری ابزاری است. علاوه بر این، در مقایسه با باندهای متعدد مرتبط با ساختار مولکول هایی که نمونه ها را تشکیل می دهند، VS می تواند در گستره وسیعی از منطقه مورد استفاده قرار گیرد. داده های حاصل از دستگاه طیف سنجی IR در حوزه زمان هستند و باید جهت تفسیر اطلاعات بدست آمده، توسط تبدیل فوریه به حوزه فرکانس تبدیل شوند [۴، ۲۹].

موفقیت VS در اهداف تحلیلی، در استفاده از روش های کمومتریک است. کمومتریک شاخه ای از علوم است که از ابزارهای آماری و ریاضی برای استخراج اطلاعات مرتبط با داده های شیمیایی استفاده می کند که امکان استفاده حداکثری جمع آوری و استخراج اطلاعات مفید را فراهم میکند [۳۰]. جامعه بین المللی کمومتریک، علم کموتری را به عنوان "علم اندازه گیری مربوط به یک سیستم شیمیایی یا فرآیند به حالت سیستم از طریق استفاده از روش های ریاضی یا آماری" تعریف می کند [۴].

طیفسنجی فرسرخ با تبدیل فوریه Fourier transform infrared spectroscopic

طیفسنجی مادون قرمز تکنیکی است که از مادون قرمز برای آنالیز اجزاء تشکیل دهنده نمونه استفاده میشود و اجازه شناسایی کیفی اجزای نمونه را می دهد. در روش FTIR با استفاده از خصوصیات شیمیایی ماده غذایی و با کمک گروه های عاملی تشکیل دهنده آن نمونه مورد بررسی قرار گرفته و شناسایی میگردد. طیف مادون قرمز با یک فرکانس مشخص به نمونه تابانده میشود، هنگامی که پیوندهای اتم های تشکیل دهنده ماده، مرتعش می شوند، فرکانس ارتعاشات به شکل منحنی های جذب ، که به طیف فرسرخ نمونه تبدیل می شوند ، ثبت می شود. این طیف دقیقاً نشان دهنده " اثر انگشت " نمونه مورد نظر است زیرا با توجه به تفاوت در ترکیب اتم ها از یک ترکیب به یک ترکیب دیگر، هیچ دو ماده ای وجود ندارند که طیف آنها مشابه یکدیگر باشد [۳۱]. فناوری اسپکتروسکوپی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR) ، یک تکنیک ریاضی است که برای بدست آوردن قسمت اوج هر فرکانس منفرد به کار می رود. تبدیل فوریه توسط یک کامپیوتر برای آنالیز طیف مورد استفاده انجام می شود [۳۲].

^۲ Nuclear magnetic resonance

^۳ Interaction

^۴ Electromagnetic radiation

^۵ UV- vis spectroscopy

^۶ Vibrational transition

طیف‌سنجی FTIR همچنین می‌تواند با روش‌های کمومتریکس chemometrics به منظور شناسایی و متمایز کردن جانشین نمونه‌های غذایی ترکیب شود، این روش قابل‌اعتماد، سریع و اقتصادی است که به عنوان یک ابزار تشخیصی در صنعت غذا به کار می‌رود [۳۱]. در سال‌های اخیر و با پیشرفت فناوری‌های آنالیتیکی در جهت شناسایی منشاء مواد غذایی و اجزاء تشکیل دهنده آنها، دانشمندان از روش FTIR جهت مطالعات حلال استفاده نموده‌اند که در اینجا به برخی از این مطالعات اشاره نموده ایم.

Man و Erwanto، SisMindari، Rohman (۲۰۱۱) از طیف‌سنجی FTIR برای تشخیص و تعیین کمیت گوشت خوک مخلوط شده در گوشت گاو استفاده کردند. علاوه بر این، Yu و Ye، Cui، Cai، Xu (۲۰۱۲) از اسپکتروسکوپی FTIR برای بدست آوردن داده‌های طیفی گوشت حلال و غیر حلال در سوسیس‌های چینی استفاده کردند [۳۳]. تست تشخیصی خوک دیگری که میتوان به آن اشاره کرد، آنالیز چربی خوک در کوفته‌های آب گوشت بود [۳۴]. نمونه‌ها با استفاده از طیف‌سنجی FTIR بررسی شدند و قله‌های مختلف را می‌توان با چربی گوشت گاو و چربی خوک تشخیص داد. از آنجا که لارد، درجه غیراشباعی بالاتری دارد، پیک بالاتری نسبت به چربی گوشت گاو ایجاد میکند. با استفاده از روش تجزیه مولفه‌های اصلی، هیچ چربی لارد در نمونه‌های تجاری مورد آزمون مشاهده نشدند. [۳۱، ۳۵].

شناسایی و طبقه‌بندی انواع ژلاتین با استفاده از روش FTIR :

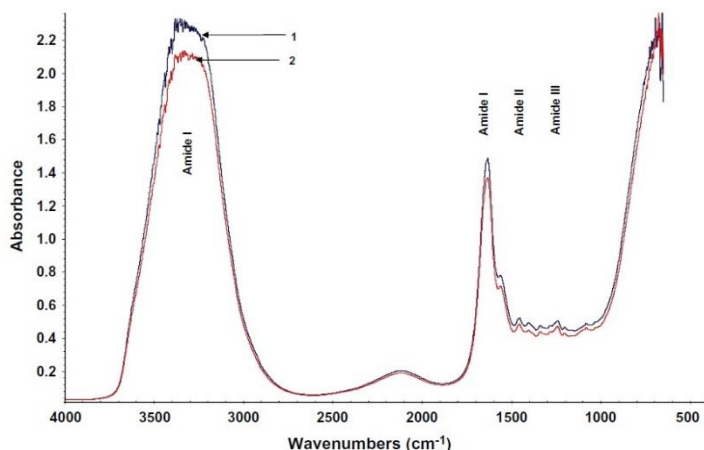
محصولات خوکی معمولاً ارزانتر از محصولات مشابه آنها با منشاء گوسفندی یا گاوی هستند. بعنوان مثال قیمت ژلاتین خوکی مورد استفاده در کپسول‌ها و محصولات غذایی از ژلاتین گاوی ارزانتر است. به همین علت تولیدکنندگان گاهی اوقات از محصولات خوکی (PDs)^۷ بجای محصولات مشابه گوسفندی و گاوی بعنوان تقلب استفاده میکنند. PD به تمام اجزاء بدست آمده از خوک گفته میشود و هر ژلاتینی که از استخوان و پوست خوک بدست می‌آید گفته میشود.

هاشم و همکاران (۲۰۱۰) طیف‌سنجی FTIR را با استفاده از بازتاب کلی تضعیف‌شده (ATR)^۸ به عنوان تکنیک نمونه برای شناسایی ژلاتین خوکی و ژلاتین گاوی توسعه دادند. روش کمومتری PCA همراه با استفاده از جذب در طیف شماره موج های $3280-3290$ و 1660 cm^{-1} به کار گرفته شد. نمودار «Cooman» تمایز آشکاری بین نمونه‌های ژلاتین با منشا گاوی و خوکی نشان داد [۱۳]

فرکانس‌هایی که در آن قله‌های اصلی رخ می‌دهند در شکل ۵ نشان داده شده‌است. ژلاتین‌هایی که از خوک مشتق شده‌اند، طیف‌های بسیار مشابهی را با ژلاتین‌های مشتق شده از گاوی دارند. چهار منطقه عبارتند از $3600-2300$ cm^{-1} (A amide)، $1644-1656$ cm^{-1} (I amide)، $1560-1335$ cm^{-1} (II amide) و $1240-670$ cm^{-1} (III amide). این قله‌ها با نتایج گزارش شده توسط MUYONGA و همکاران (۲۰۰۴) شناسایی شدند [۳۶، ۳۷].

^۷ PD : Pig Derivatives

^۸ Attenuated total reflectance



شکل ۵: طیف FTIR بدست آمده برای ژلاتین گاوی (۱) و ژلاتین خوکی (۲) [۱۳]

طیف معمول ژلاتین، شدت پایین باندهای آمید I و II را نشان داد، و باند آمید III تقریباً وجود نداشت. این امر با تغییرات مورد انتظار به دلیل دناتوره شدن کلاژن به ژلاتین سازگار است. شدت بسیار پایین برای ناحیه آمید III با از دست دادن حالت مارپیچ سه تایی در حین استخراج ژلاتین با دمای بالا نشان داده شده است [۳۶]

این ناحیه $3280-3290 \text{ cm}^{-1}$ با استفاده از حالت کشش پیوند N-H باند هیدروژنی گروه‌های آمیدی متصل شده است. جذب موازی با پیوند N-H است که موازی با محور مارپیچ آلفا در ساختارهای مارپیچی و عمود بر زنجیره پلی پپتیدی در ورق‌های بتا است. هنگامی که قدرت پیوند هیدروژنی افزایش یابد، ممکن است باند به فرکانس پایین منتقل شود. گروه کربونیل کربن C-O کشش دوگانه، با هم کاری خمش فاز N-H و کشش پیوند N-C، در محدوده فرکانسی $1620-1660 \text{ cm}^{-1}$ که اغلب به باند آمید I موسوم است، رخ می‌دهد. فرکانس بین $1650-1660 \text{ cm}^{-1}$ بعنوان مارپیچ آلفا و $1620-1640 \text{ cm}^{-1}$ بعنوان ساختار ورقه ای بتا نامید می‌شدند. طیف فرکانس بین $1520-1550 \text{ cm}^{-1}$ ناشی از آمید II با ساختار مارپیچ آلفا بین طیف $1540-1550 \text{ cm}^{-1}$ و ساختار ورقه ای بتا در $1520-1525 \text{ cm}^{-1}$ است. لرزش آمید II ناشی از تغییر شکل باند N-H است [۱۳]

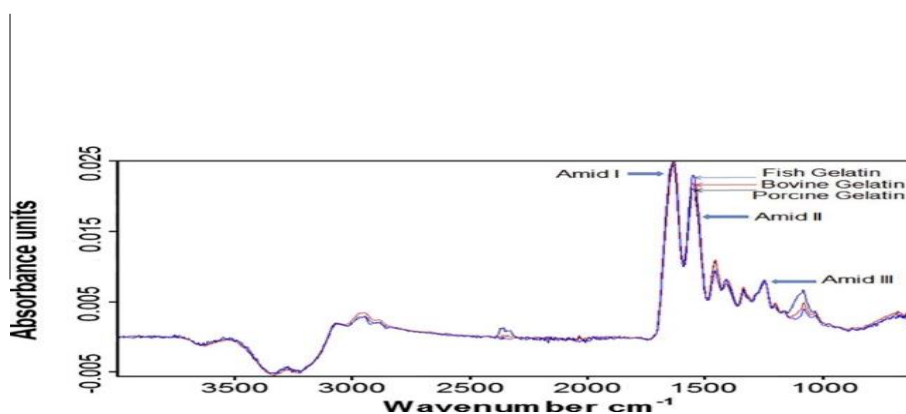
Nur Cebi و همکاران (۲۰۱۵) به بررسی کارایی روش FTIR در تشخیص و طبقه بندی ژلاتین های گاو، خوک و ماهی پرداختند. ژلاتین های استاندارد را از سیگما تهیه کردند، سپس ژلاتین های ماهی، خوک و گاو را بصورت جداگانه با غلظت های مختلف در آب دیونیزه حل کردند. غلظت محلول برای ژلاتین های گاوی، خوکی، ماهی بین $4\% (w/v)$ و $20\% (w/v)$ بود بطوریکه نهایتاً ۴۵ نمونه برای محلول های استاندارد ژلاتین تهیه شدند. همچنین مخلوطی از ژلاتین های گاوی و خوکی بطور مشابه تهیه شدند. برای نسبت های ژلاتین گاوی به خوکی به شکل ۱:۱، ۱:۳، ۱:۱ و ۱:۳ در این نمونه ها مخلوط با غلظت کل ۱۰٪ ژلاتین انتخاب شدند. طیف های ATR-FTIR محلول های ژلاتین با رزولوشن 4 cm^{-1} ثبت شدند و ۱۶ اسکن برای هر طیف دریافت کردند. طیف ها از $600-4000 \text{ cm}^{-1}$ ثبت شدند. برای بدست آوردن اسپکتروم صحیح، هر نمونه سه بار تکرار شد و طیف متوسط بدست آمد. ترکیبی از روش های طیف سنجی FTIR و روش های چند متغیری مانند آنالیز اجزای اصلی (PCA) و آنالیز خوشه ای^۹ امکان بررسی رابطه درونی نمونه ها با توجه به ناهمگونی طیفی آن ها را فراهم می آورد. تحلیل کمومتریکس که شامل تحلیل خوشه ای سلسله مراتبی است و تشخیص و طبقه بندی نمونه های ژلاتین گاوی، خوکی و ماهی و نیز نمونه های مخلوطی از ژلاتین های خوکی و گاوی انجام

^۹ Cluster analysis

شد. علاوه بر این، آنالیز PCA برای بررسی اینکه آیا نمونه‌های مختلف ژلاتین می‌توانند بر اساس منشا و گونه آن‌ها گروه‌بندی شوند انجام شد [۳۸]

شکل ۲ نشان می‌دهد که طیف FTIR نمونه‌ها که از منابع گاو، خوک و ماهی تشکیل شده‌بودند، ویژگی‌های طیفی مشابهی داشتند. همانطور که در شکل ۲ دیده می‌شود، طیف‌های FTIR نمونه‌های ژلاتین قله‌های اصلی در سه منطقه مختلف را نشان دادند. طیف FTIR از ژلاتین‌ها ۳ قله بزرگ را در $1600 - 1700 \text{ cm}^{-1}$ (amide-I)، $1520 - 1565 \text{ cm}^{-1}$ و $670 - 1240 \text{ cm}^{-1}$ به دست آورد. طیف‌های FTIR که از ژلاتین گاوی، خوکی، ماهی‌ها و مخلوطی از ژلاتین‌های گاو و خوک به دست می‌آیند، پیک‌های قوی و تیزی را نشان می‌دهند که شامل باندهای جذبی برجسته در ارتباط مستقیم با ساختار دوم پروتئین یافت‌شده در ژلاتین‌ها هستند. جذب Amide-I حاصل از ارتعاش کششی باند دوگانه $\text{C}=\text{O}$ گروه آمید و با کمک اندکی از ارتعاش کششی گروه C-N است در حالی که به نظر می‌رسد جذب Amide-II ناشی از خم شدن باند N-H و ارتعاش کششی حاصل از باند C-N باشد. در بسیاری از مطالعات نشان داده می‌شود که باند جذب Amide-I تقریباً به علت ارتعاشات کششی کامل پیوند $\text{C}=\text{O}$ در پیوند پپتیدی است که برای تعیین ساختار دوم پروتئین‌ها مفید است [۳۹].

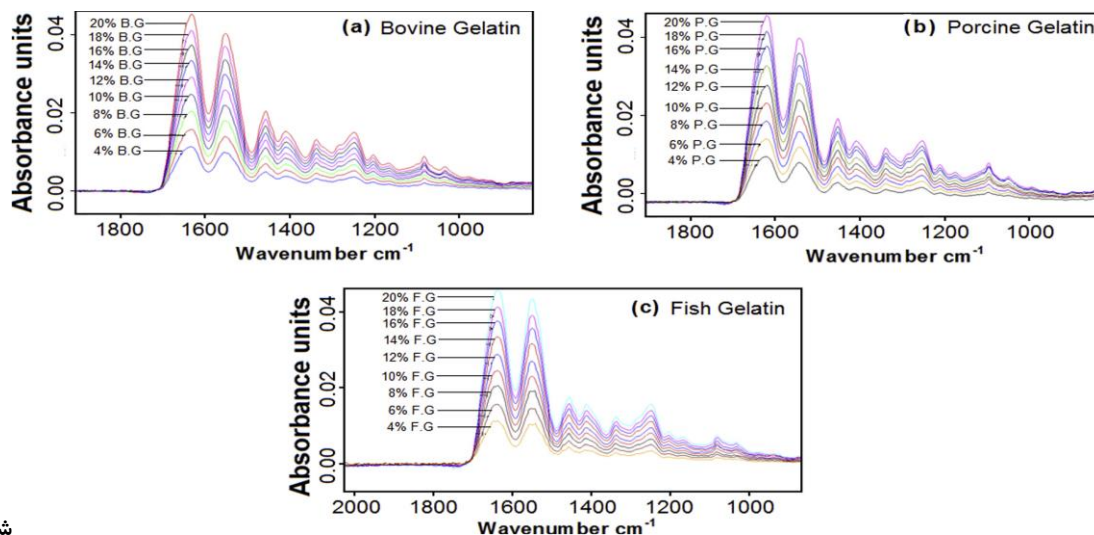
Amide-III بطور کلی نشان دهنده ارتعاش کششی باند C-N به همراه ارتعاش خمشی N-H و با سهم ضعیفی از کشش C-C و $\text{C}=\text{O}$ در خمش صفحه ای است [۳۹].



شکل ۶: طیف FTIR ژلاتین ماهی، گاو و خوکی [۳۸]

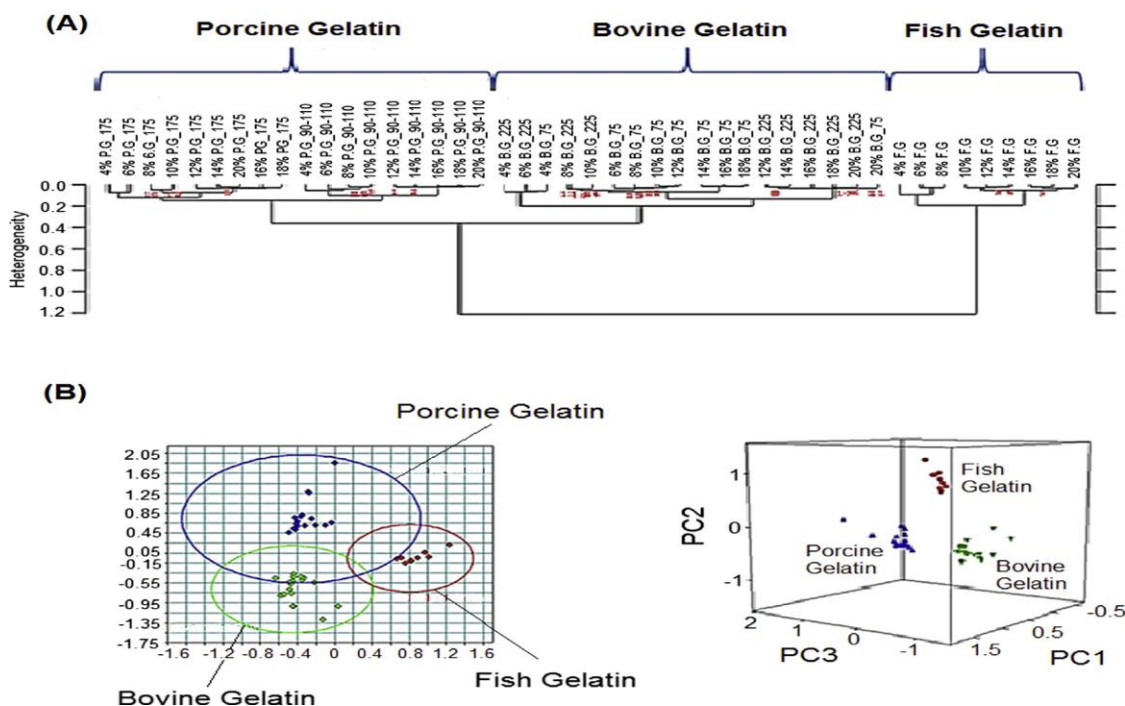
محدوده طیفی بین ۱۱۰۰ و 1000 cm^{-1} دارای لرزش ناشی از $\nu(\text{C}-\text{O})$ و $\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$ جذب ناشی از قسمت‌های کربوهیدراتی است، بعبارت دیگر باندها در محدوده $1031-1083 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاش کششی $\text{C}-\text{O}$ کربوهیدرات باقیمانده حاضر در کلاژن است و Amide I حاضر در پروتئوگلیکون‌ها (belbachir, Noreen,...). همانطور که از شکل ۶ دیده می‌شود تفاوت بین ژلاتین‌های ماهی، گاوی و خوکی مشاهده می‌شود. ویژگی‌های طیفی ژلاتین ماهی با دیگر گونه‌های ژلاتین در محدوده طیفی $1000-1100 \text{ cm}^{-1}$ متفاوت است.

شکل ۷، زمانیکه غلظت ژلاتین‌های گاو، ماهی و خوکی در محلول افزایش یافت، شدت جذب Amide-I و Amide-II با یک ضریب هبستگی ۰.۹۹ افزایش یافت. در این تحقیق طیف بدست آمده کارایی، حساسیت و کمال کار FTIR را نشان داد.



شکل ۷: طیف

های FTIR ژلاتین گاوی (B.G) (a)، ژلاتین خوک (P.G) (b) و ژلاتین ماهی (F.G) (c) وابسته به غلظت [۳۸]



شکل ۸: (A) دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای (الگوریتم ورد) از طیف FTIR بدست آمده از ۴۵ نمونه استاندارد مختلف ژلاتین گاوی، خوک و ماهی، (B) نمودار دو و سه بعدی آنالیز PCA حاصل از FTIR ۴۵ نمونه استاندارد مختلف گاوی و خوک و ماهی (B.G: ژلاتین گاوی، P.G: ژلاتین خوک) [۳۸]

Nur Cebi و همکاران دریافتند که ژلاتین گاوی، خوک و ماهی با استفاده از تجهیزات ATR-FTIR با موفقیت طبقه‌بندی شدند. علاوه بر این، مخلوطی از ژلاتین خوک و گاوی از ژلاتین های خالص خوک و گاوی تفکیک شدند. با توجه به مطالعه ایشان، تکنیک ATR-FTIR میتواند برای

تشخیص گونه ژلاتین استفاده شود، چراکه درمقایسه با سایر روشهای آنالیتیکی بسیار ساده و ارزان است و تمایز بین منابع ژلاتینی را بهبود میبخشد [۳۸].

Rohman و همکاران (۲۰۱۶) مروری بر استفاده از اسپکتروسکوپی لرزشی برای آنالیز کردن PD ها در ماتریکس های غذایی انجام دادند. طبق مطالعات ایشان VS میتواند یک اثرانگشت تابشی خاص هر نمونه را ایجاد کند، بنابراین، این تکنیک برای تحلیل هر گونه مواد برای شناسایی، توصیف، توضیح ساختار، نظارت بر واکنش، کنترل کیفیت، تضمین کیفیت و مطالعات تایید اعتبار حلال مناسب است [۴] و طیفسنجی FTIR روش ایده آل و سریع برای طبقه بندی منابع ژلاتین است [۴].

همچنین Nur Cebi و همکاران (۲۰۱۹) با آنالیز اسپکتروسکوپی ATR-FTIR بر روی آب نبات های ژله ای و مقایسه نتایج آن با روش PCR دریافتند که روش ATR-FTIR قابلیت تفکیک ژلاتین خوکی از گاوی بدون خطا را دارد. در این مطالعه، برای اولین بار، توانایی طیفسنجی ATR-FTIR به همراه روش های کمومتریک برای تعیین منبع ژلاتین در شکلات های ژله ای ارزیابی شد. بعنوان روش کمومتریک از PCA، HCA و PLS-DA با استفاده از داده های سه گانه انجام شدند. هر سه این روش ها توانستند نمونه های آب نبات را کاملاً متمایز کنند. محدوده طیفی ۱۷۳۴-۱۵۲۸ cm^{-1} برای تولید طریق الگوریتم Ward به کار رفت (HCA). همچنین آنالیز PLS-DA با استفاده از دامنه طیفی یکسان برای کالیبراسیون و اعتبارسنجی متقابل انجام شد (۱۷۳۴-۱۵۲۸ cm^{-1}). پیش بینی های طبقه بندی آب نبات ها ۱۰۰٪ با طبقه بندی مورد آزمون صحیح انجام شد. در این تحقیق، درحالی که HCA و PCA با نرم افزار OPUS تجزیه و تحلیل شدند، PLS-DA با نرم افزار Matlab بررسی شد. نتایج نسبتاً تأیید کننده و منسجم برای آب نبات ها در همه کاربردهای کموتری به دست آمد. علاوه بر این، منشاء ژلاتین ۲۰ آب نبات تجاری تهیه شده، توسط روش RT-PCR بررسی شد. در نهایت شناسایی تمامی نمونه های آزمایشی با توجه به منبع ژلاتین آن ها با روش ATR-FTIR با استفاده از تکنیک PCR با دقت ۱۰۰٪ و بدون پیش بینی غلط مورد تأیید قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان میدهند که تمایز و طبقه بندی آب نبات ها بر مبنای منشاء ژلاتین آنها از روش ATR-FTIR و بدون نیاز به هیچگونه آماده سازی نمونه، با موفقیت انجام شد. در نهایت، می توان نتیجه گرفت که تکنیک ATR-FTIR، مقرون به صرفه، سریع، آسان، غیر مخرب بوده و می تواند به عنوان "تکنیک تحلیلی سبز" ذکر شود، چرا که هیچ گونه حلال ها و معرف در طول این مطالعه مورد استفاده قرار نگرفته است [۴۰].

نتیجه گیری

با افزایش تجارت جهانی محصولات غذایی و مکمل های غذایی، احراز هویت دقیق و سریع برای برچسب زدن درست برای اطمینان از ایمنی مواد غذایی ضروری است. استفاده از احراز هویت مولکولی به یکی از مقررات بین المللی در آینده نزدیک تبدیل خواهد شد. با این حال، کیفیت DNA اغلب توسط گرما، آلودگی قارچی و یا باکتریایی، اشعه، و انواع مختلفی از متابولیت های ثانویه بدتر می شود. علاوه بر این، در اکثر مواقع DNA پس از فرایند تولید حذف می شود. بنابراین ضروری است تا توانایی استخراج DNA و حساسیت تشخیص را افزایش دهیم. با پیشرفت تکنیک های مولکولی و اطلاعات فراوان مولکولی موجود در پایگاه داده Gen Bank، توسعه پروتکل های سریع برای احراز هویت در کمترین زمان ممکن و کم کردن محصولات فرآوری شده، روند جدیدی خواهد بود.

طیفسنجی FTIR یک تکنیک چند منظوره است که می تواند برای شناسایی و تعیین ژلاتین خوکی مورد استفاده قرار گیرد. با انتخاب منطقه فرکانس بهینه قادر به ارائه بهترین مدل پیشگوی و توصیفی، به سرعت و بدون آماده سازی نمونه هستیم. بنابراین، طیفسنجی FTIR، تکنیکی ایده آل برای کنترل کیفیت و تایید اعتبار حلال محصولات مصرفی است. این تکنیک سریع، آسان و غیر مخرب بوده و میتوان از آن بعنوان یک روش آنالیزی «سبز» یاد کرد، چرا که در این روش برای آماده سازی نمونه ها هیچ گونه حلال و یا معرفی که برای محیط زیست مضر باشد استفاده

نشده است. با توجه به سهولت در استفاده از این روش و همچنین قابلیت تفکیک بالای آن، تکنیک FTIR ممکن است در آینده بتواند بعنوان جایگزین و یا مکمل روش های شناسایی پیشین، برای ارزیابی منشاء ژلاتین در غذاهای «حلال» توسعه یابد.

منابع:

۱. ایران، ا.م.، غذای حلال- راهنمای عمومی. ۱۳۸۸.
۲. Al-Kahtani, H.A., E.A. Ismail, and M. Asif Ahmed, *Pork detection in binary meat mixtures and some commercial food products using conventional and real-time PCR techniques*. Food Chemistry, ۲۰۱۷. ۲۱۹: p. ۵۴-۶۰.
۳. ایران، ا.م.، راهنمای برچسب گذاری تغذیه ای. ۱۳۹۳.
۴. Rohman, A., et al., *The use of vibrational spectroscopy and chemometrics in the analysis of pig derivatives for halal authentication*. ۲۰۱۶. ۲۳(۵).
۵. Grundy, H.H., et al., *A mass spectrometry method for the determination of the species of origin of gelatine in foods and pharmaceutical products*. Food Chemistry, ۲۰۱۶. ۱۹۰: p. ۲۷۶-۲۸۴.
۶. Shabani, H., et al., *Halal authenticity of gelatin using species-specific PCR*. Food Chem, ۲۰۱۵. ۱۸۴: p. ۲۰۲-۶.
۷. Abdul Rohman, N.S., *The employment of spectroscopic techniques coupled with chemometrics for authentication analysis of halal pharmaceuticals*. ۲۰۱۸.
۸. Jahangir, M., et al., *Halal status of ingredients after physicochemical alteration (Istihalah)*. Trends in Food Science & Technology, ۲۰۱۶. ۴۷: p. ۷۸-۸۱.
۹. Lo, Y.-T. and P.-C. Shaw, *DNA-based techniques for authentication of processed food and food supplements*. Food Chemistry, ۲۰۱۸. ۲۴۰: p. ۷۶۷-۷۷۴.
۱۰. Hidaka, S., S.J.J.o.F.C. Liu, and Analysis, *Effects of gelatins on calcium phosphate precipitation: a possible application for distinguishing bovine bone gelatin from porcine skin gelatin*. ۲۰۰۳. ۱۶(۴): p. ۴۷۷-۴۸۳.
۱۱. Nemat, M., et al., *Differentiation of bovine and porcine gelatins using principal component analysis*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, ۲۰۰۴. ۳۴(۳): p. ۴۸۵-۴۹۲.
۱۲. Venien, A., D.J.J.o.P. Leveux, and B. Analysis, *Differentiation of bovine from porcine gelatines using polyclonal anti-peptide antibodies in indirect and competitive indirect ELISA*. ۲۰۰۵. ۳۹(۳-۴): p. ۴۱۸-۴۲۴.

- Hashim, D.M., et al., *Potential use of Fourier transform infrared spectroscopy for differentiation of bovine and porcine gelatins*. Food Chemistry, ۲۰۱۰. ۱۱۸(۳): p. ۸۵۶-۸۶۰. .۱۳
- Kalle, E., M. Kubista, and C. Rensing, *Multi-template polymerase chain reaction*. Biomolecular Detection and Quantification, ۲۰۱۴. ۲: p. ۱۱-۲۹. .۱۴
- Reza Bohlolikhavi, T.A., Zahra Rakhshidan, Adel Nasiri, Negar Modaresadrani, Fateme Farajimazraekalafi, *مرور جامع و ضروری بر پی سی آر، انواع و کاربرد های آن. فصلنامه آزمایشگاه و تشخیص*, ۲۰۱۶. ۳۱. .۱۵
- Butler, J.M., *Introduction*, in *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*, J.M. Butler, Editor. ۲۰۱۲, ۰۰۰۰۰۰۰۰ ۰۰۰۰۰: ۰۰۰ ۰۰۰۰۰. ۰. ۰۰-۰۰۰. .۱۶
- Xiao, G., et al., *Development of a real-time quantitative PCR assay using a TaqMan minor groove binder probe for the detection of α -lactalbumin in food*. Journal of Dairy Science, ۲۰۱۶. ۹۹(۳): p. ۱۷۱۶-۱۷۲۴. .۱۷
- Cai, H., et al., *Real-time PCR assays for detection and quantitation of porcine and bovine DNA in gelatin mixtures and gelatin capsules*. Journal of Food Composition and Analysis, ۲۰۱۲. ۲۵(۱): p. ۸۳-۸۷. .۱۸
- Demirhan, Y., P. Ulca, and H.Z. Senyuva, *Detection of porcine DNA in gelatine and gelatine-containing processed food products—Halal/Kosher authentication*. Meat Science, ۲۰۱۲. ۹۰(۳): p. ۶۸۶-۶۸۹. .۱۹
- Abdullah Amqizal, H.I., et al., *Identification and verification of porcine DNA in commercial gelatin and gelatin containing processed foods*. Food Control, ۲۰۱۷. ۷۸: p. ۲۹۷-۳۰۳. .۲۰
- Jannat, B., et al., *Gelatin speciation using real-time PCR and analysis of mass spectrometry-based proteomics datasets*. Food Control, ۲۰۱۸. ۸۷: p. ۷۹-۸۷. .۲۱
- Ali, M.E., et al., *Multiplex PCR assay for the detection of five meat species forbidden in Islamic foods*. Food Chemistry, ۲۰۱۵. ۱۷۷: p. ۲۱۴-۲۲۴. .۲۲
- Davidson, A.J.P.p.c., *Ultraviolet-visible absorption spectrophotometry*. ۱۹۸۸. ۴: p. ۳۰۱-۳۰۲. .۲۳
- Pavia, D.L., et al., *Introduction to spectroscopy*. ۲۰۰۸: Cengage Learning. .۲۴
- S.R. Crouch, *Principles of instrumental analysis*. ۲۰۱۷: Cengage learning. Skoog, D.A., F.J. Holler, and Cozzolino, D.J.M., *The role of visible and infrared spectroscopy combined with chemometrics to measure phenolic compounds in grape and wine samples*. ۲۰۱۵. ۲۰(۱): p. ۷۲۶-۷۳۷. .۲۵
- Müller, U., *M. Diem: Introduction to modern vibrational spectroscopy*, J. Wiley, New York, Chichester, ۱۹۹۳, ISBN ۰-۴۷۱-۵۹۵۸۴-۵, ۲۸۵ Seiten, Preis: £ ۴۹.۵۰. ۱۹۹۴. ۹۸(۱۰): p. ۱۳۴۷-۱۳۴۸. .۲۶
- Lewis, I.R. and H. Edwards, *Handbook of Raman spectroscopy: from the research laboratory to the process line*. ۲۰۰۱: CRC Press. .۲۷
- Rohman, A., et al., *Application of Vibrational Spectroscopy in Combination with Chemometrics Techniques for Authentication of Herbal Medicine*. Applied Spectroscopy Reviews, ۲۰۱۴. ۴۹(۸): p. ۶۱۳-۶۰۳. .۲۸
- Gindy, A.E. and G.M.J.J.o.A.I. Hadad, *Chemometrics in pharmaceutical analysis: an introduction, review, and future perspectives*. ۲۰۱۲. ۹۵(۳): p. ۶۰۹-۶۲۳. .۲۹
- Lubis, H.N., et al., *From market to food plate: Current trusted technology and innovations in halal food analysis*. Trends in Food Science & Technology, ۲۰۱۶. ۵۸: p. ۵۵-۶۸. .۳۰
- Griffiths, P.R. and J.A. De Haseth, *Fourier transform infrared spectrometry*. Vol. ۱۷۱. ۲۰۰۷: John Wiley & Sons. .۳۱
- Xu, L., et al., *Rapid discrimination of pork in Halal and non-Halal Chinese ham sausages by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy and chemometrics*. Meat Science, ۲۰۱۲. ۹۲(۴): p. ۵۰۶-۵۱۰. .۳۲
- Kurniawati, E., A. Rohman, and K. Triyana, *Analysis of lard in meatball broth using Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics*. Meat Science, ۲۰۱۴. ۹۶(۱): p. ۹۴-۹۸. .۳۳

- Kuswandi, B., et al., *A simple visual ethanol biosensor based on alcohol oxidase immobilized onto poly(2-vinylpyridine) film for halal verification of fermented beverage samples*. *J. Food Sci.* 2014, 95(2): 2135-2149. .۳۵
- Muyonga, J., C. Cole, and K.J.F.C. Duodu, *Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (Lates niloticus)*. *J. Food Sci.* 2004, 79(3): 325-332. .۳۶
- Rohman, A., et al., *Analysis of pork adulteration in beef meatball using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy*. *Meat Science*, 2011, 88(1): p. 91-95. .۳۷
- Cebi, N., et al., *An evaluation of Fourier transforms infrared spectroscopy method for the classification and discrimination of bovine, porcine and fish gelatins*. *Food Chemistry*, 2016, 190: p. 1109-1115. .۳۸
- Bandekar, J., *Amide modes and protein conformation*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1999, 1476(2): 123-143. .۳۹
- Cebi, N., et al., *A rapid ATR-FTIR spectroscopic method for classification of gelatin gummy candies in relation to the gelatin source*. *Food Chemistry*, 2019, 277: p. 373-381. .۴۰

تهیه کننده

رقیه اکبرزادگان دانشجوی کارشناسی ارشد صنایع غذایی، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

آدرس پست الکترونی