Journal of Saffron Research

Vol. 14, No. 1, p. 156- 173

10.22077/jsr.2026.12072.1314

University of Birjand

Original Article

Feasibility Study of Detecting Synthetic Dyes Adulteration in Saffron using Digital Image Processing and Principal Component Analysis (PCA)

Leila Choopani[1], Vahid Hakimzadeh[*2], Mahsa Akbari[3], Sina Irvani Kazar[4]

1- MSc, Department of Food Science and Technology, Qu. C., Islamic Azad University, Quchan, Iran.
2- Associate Professor of Department of Food Science and Technology, Qu. C., Islamic Azad University, Quchan, Iran.
3- PhD Student, Department of Food Science and Technology, Qu. C., Islamic Azad University, Quchan, Iran.
4- PhD, Department of Food Science and Technology, Qu. C., Islamic Azad University, Quchan, Iran.

*Corresponding author: *v.hakimzadeh@iau.ac.ir*

Received: 10 September 2026; **Revised:** 07 October 2026, **Accepted:** 16 October 2026

Extended Abstract

Introduction: Saffron (*Crocus sativus* L.) is one of the most valuable spices worldwide because of its distinctive color, aroma, and flavor. Its high economic value and limited production have made it particularly susceptible to adulteration. The addition of synthetic dyes is among the common fraudulent practices used to intensify the apparent color of saffron and increase its commercial value. Therefore, the development of rapid, reliable, and accessible methods for detecting artificial colorants is important for saffron quality control and food authenticity assessment. Conventional analytical methods such as chromatography and spectrophotometry can provide valuable information for identifying adulterants; however, some of these techniques require specialized equipment, considerable analysis time, or complex sample preparation. Digital image processing combined with chemometric techniques has emerged as a promising alternative for rapid and non-destructive evaluation of food quality. Principal component analysis (PCA), in particular, can reduce the dimensionality of multivariate color data and reveal differences among samples. Therefore, the present study aims to investigate the applicability of thin-layer chromatography (TLC), spectrophotometry, digital image processing, and PCA for the detection and discrimination of saffron samples adulterated with synthetic dyes.

Materials and Methods: Four synthetic food dyes, including tartrazine, Erythrosine, quinoline yellow, and sunset yellow, were investigated. Stock solutions of the dyes were prepared at a concentration of 1 g/L, followed by preparation of working solutions at 0.001 and 0.0005 g/L. Saffron samples were artificially adulterated using individual dyes, binary combinations, and a mixture containing all four dyes, while untreated saffron was used as the control. For this purpose, 5 g portions of saffron were treated with the corresponding dye solutions, dried, homogenized, and stored at 4°C until analysis. For extraction, 0.5 g of each sample was mixed with 25 mL of distilled water at 60°C, shaken for 1 min, and centrifuged at 4000 rpm for 10 min. The resulting-colored aqueous phase was collected for further analysis. TLC was employed for preliminary identification of synthetic dyes based on their retention factor (RF) values. Spectrophotometric measurements were performed at the maximum absorption wavelength (λmax) of each dye. For digital image analysis, saffron samples were photographed under controlled illumination using a fixed camera position and identical imaging conditions. The obtained images were analyzed using ImageJ software, and color parameters were extracted from

Copyright © 2026 by the authors
Published by University of Birjand. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0).

the CIELAB, HSV, and RGB color spaces. The resulting variables included L*, a*, b*, B1, S, G, and B2. Variables H and R were excluded from subsequent analysis because of their very low contribution to the explained variance. PCA was performed using Minitab 16 to investigate the multivariate relationships among color parameters and to visualize the discrimination of control and adulterated samples.

Results and Discussion: Comparison of the Rf values obtained by thin-layer chromatography (TLC) with those of the reference dyes provided useful qualitative information for identifying artificial colorants in saffron samples. Spectrophotometric analysis also revealed distinct absorption characteristics for the investigated dyes. In particular, the sample containing the mixture of all four dyes exhibited a considerably different spectral response compared with the other treatments, whereas some individual and binary adulterations showed relatively similar responses to the control sample. Digital image analysis provided additional information regarding changes in the visual color characteristics of adulterated saffron. PCA demonstrated that the extracted color parameters contained sufficient information to distinguish several adulterated samples from the control sample. At a dye concentration of 0.001 g/L, the first and second principal components had eigenvalues of 5.2665 and 0.9637 and explained 75.2% and 13.8% of the total variance, respectively, accounting for approximately 89.0% of the cumulative variance. At 0.0005 g/L, PC1 and PC2 explained 91.6% and 5.1% of the total variance, respectively, with a cumulative variance of approximately 96.7%. These results indicate that most of the variability in the image-derived color data could be represented by only two principal components. The score plots generally showed separation between the authentic saffron and several adulterated groups, although some overlap was observed among particular dye treatments and combinations. These findings indicate that PCA based on color parameters can be useful for exploratory discrimination and rapid screening, but it may not be sufficient for the unequivocal identification of every adulterant. Similar studies have demonstrated the potential of chemometric methods, including PCA and supervised classification techniques, for detecting synthetic colorants and other forms of saffron adulteration.

Conclusion: The proposed method is a simple and potentially low-cost approach for the preliminary screening of saffron adulterated with synthetic dyes. The high proportion of explained variance by the first two principal components confirms the effectiveness of the extracted color parameters for describing differences among samples. Nevertheless, because some adulterated groups exhibited partial overlap, image-based PCA should preferably be considered a screening tool rather than a definitive identification method. Combining digital image analysis with complementary techniques such as TLC and spectrophotometry can improve the reliability of saffron authenticity assessment and provide a practical strategy for quality control.

Conflict of Interest: The authors declare no potential conflict of interest related to the work.

Keywords: Artificial colorants, Image processing, Principal component analysis, Saffron adulteration, Thin-layer chromatography.

نشریه پژوهش‌های زعفران (دو فصلنامه)
جلد چهاردهم، شماره اول، بهار و تابستان ۱۴۰۵
شماره صفحه: ۱۷۳ – ۱۵۶
10.22077/jsr.2026.12072.1314

مقاله پژوهشی

بررسی امکان شناسایی تقلب زعفران با رنگ‌های مصنوعی با استفاده از پردازش تصویر دیجیتال و تحلیل مؤلفه‌های اصلی

لیلا چوپانی[۱]، وحید حکیم زاده[۲*]، مهسا اکبری[۳]، سینا ایروانی کازار[۴]

۱- کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران.
۲- دانشیار تمام وقت، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران.
۳- دانشجوی مقطع دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران.
۴- دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران.

* نویسنده مسئول: *v.hakimzadeh@iau.ac.ir*

تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۶/۱۹؛ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۵/۰۷/۱۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۷/۲۴

چکیده

استفاده از رنگ‌های شیمیایی مصنوعی در زعفران شایع‌ترین انواع تقلب بوده که سلامت مصرف‌کنندگان و تجارت این محصول استراتژیک را تهدید می‌کند. شناسایی اینگونه تقلبات، معمولاً با استفاده از روش کروماتوگرافی‌لایه نازک انجام می‌شود که با وجود کارایی مناسب، روشی زمان‌بر و نسبتاً پرهزینه است. ازاین‌رو، هدف پژوهش حاضر بررسی کارایی روش تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) مبتنی بر شاخص‌های رنگی در تشخیص تقلبات رنگی زعفران بود. بدین‌منظور، نمونه‌های زعفران با چهار رنگ مصنوعی شامل تارترازین، اریتروزین، کینولین‌یلو و سانست‌یلو به‌صورت منفرد، ترکیبات دوتایی و مخلوط چهارگانه، در دو غلظت ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۰۵ درصد تیمار شدند و با زعفران خالص به‌عنوان نمونه شاهد مقایسه گردیدند. شاخص‌های رنگی نمونه‌ها در فضاهای رنگی Lab، HSB و RGB با استفاده از نرم‌افزار ImageJ استخراج و با روش PCA مورد تحلیل قرار گرفتند. بر اساس میزان واریانس و مقادیر ویژه، مؤلفه‌های L، a، b، B1، S، G و B2 به ترتیب به‌عنوان مؤلفه‌های اصلی رنگی انتخاب شدند. نتایج نشان داد که مؤلفه‌های L و a (به‌عنوان PC1 و PC2) بیشترین سهم را در تبیین تغییرات داده‌ها داشتند و توانایی مناسبی برای تفکیک نمونه‌های زعفران خالص فراهم کردند. پراکنش نمونه‌ها در فضای دو مؤلفه اصلی نشان داد که نمونه‌های حاوی رنگ مصنوعی در غلظت ۰/۰۰۱ درصد به‌طور مطلوبی از نمونه شاهد قابل تفکیک بودند. اگرچه، در غلظت ۰/۰۰۰۵ درصد، میان نمونه‌های حاوی تارترازین و کینولین‌یلو و برخی نمونه‌ها هم‌پوشانی مشاهده شد. در مجموع، نتایج نشان داد که رنگ‌سنجی و تحلیل مؤلفه‌های اصلی می‌تواند به‌عنوان روشی سریع و کم‌هزینه برای غربالگری تقلبات رنگی زعفران مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: پردازش تصویر، تقلب در زعفران، تحلیل مولفه های اصلی،رنگ مصنوعی، کروماتوگرافی لایه نازک.

Copyright © 2026 by the authors
Published by University of Birjand. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0).

مقدمه

زعفران با نام عمومی Saffron و نام علمی گیاه کرکوس ساتیوس(*Crocus sativus L.*)، از تیره زنبقیان است (Ghodsnia, 2023) .زعفران ادویه ای است که به خاطر ایجاد عطر و رنگ مناسب در انواع غذا ها مصرف جهانی داشته و گرانترین ادویه دنیا است (Koocheki & Milani, 2020; Moghiminia et al., 2025). با توجه به رنگ مطلوب زعفران و دارا بودن عطر و بوی بی نظیرش و همچنین گران بودن آن (طلای سرخ)، از دیرباز استفاده از رنگ های تقلبی در زعفران صورت می گرفت. استفاده از انواع رنگ های شیمیایی مصنوعی در زعفران یکی از شایعترین تقلباتی است که تجارت این محصول کشاورزی استراتژیک و همچنین سلامتی مصرف کننده را تهدید می کند (Bhoomat et al., 2020; Haghighi et al., 2006). از بین رنگ‌های شیمیایی کارمویزین[1] مقدار زیادی از تقلبات را به تنهایی شامل می‌شود. تارترازین[2] رنگ دیگری است که به طور رایج در تقلبات زعفران به کار می‌رود(Mikkelsen et al., 1987). تاثیر متقابل رنگ‌های افزودنی با بعضی از فاکتورهای ژنتیکی می‌تواند منجر به بعضی اختلالات رفتاری مثل بیش فعالی در کودکان شود (Donna , 2007). در این رابطه اثر نامطلوب ژنتیکی رنگ کینولین یلو[3] بر روی سلول‌های لنفوسیت انسانی تایید گردیده است (Kuno & Mizutani, 2005). در مطالعه‌ی دیگری مشخص شد که مواجهه حیوانات آزمایشگاهی با دوز نیمه سمی رنگ سان ست یلو[4] موجب تغییرات قابل توجهی در ذخیره کل لیپید بدن گردیده که چنین تغییراتی خود باعث اختلال در متابولیسم لیپید ها و در نتیجه آسیب های کبدی خطرناک می شود (Tripathi et al., 2007). در حال حاضر از روش‌های کروماتوگرافی لایه نازک برای شناسایی رنگ‌های شیمیایی افزودنی به زعفران استفاده می شود که متاسفانه بسیار وقت‌گیر و گران قیمت است. از طرفی شناسایی رنگ می‌تواند هم توسط خواص حسی انسان و هم بوسیله ابزارهای فیزیکی صورت گیرد. اگرچه پردازش تصاویر توسط انسان بسیار قدرتمند است اما وابسته به شخص است و از نظر قدرت تشخیصی از فردی به فرد دیگر در تمام پارامترهای خود متغیر است. همچنین استفاده از عامل انسانی بسیار زمان بر بوده و نیاز به تعلیمات یکسان به تمام افراد آموزش دیده دارد. بنابراین استفاده از ابزارهایی جهت شناسایی سریع تر و آسان‌تر کیفیت رنگی مواد خوراکی لازم است. در حال حاضر از فضاهای رنگی و ارزشهای وابسته عددی برای ایجاد و ارائه و تصویرسازی رنگ‌ها در فضاهای دو بعدی و سه بعدی استفاده می شود (Yama & Papadakis, 2004; Akbari et al., 2021). پردازش تصویر به‌عنوان روشی سریع، غیرمخرب و کم‌هزینه، در ارزیابی کیفیت و اصالت مواد غذایی مورد توجه قرار گرفته است. در تصاویر دیجیتال، اطلاعات رنگی هر پیکسل به‌صورت مقادیر عددی در کانال‌های رنگی مختلف ثبت می‌شود و با تبدیل تصاویر به فضاهای رنگی مختلف نظیر RGB، HSV و CIELAB می‌توان ویژگی‌های رنگی را استخراج و به‌صورت کمی تحلیل کرد. همچنین، شاخص‌های آماری نظیر میانگین و واریانس یا انحراف معیار مقادیر پیکسل‌ها می‌توانند برای توصیف ویژگی‌های رنگی نواحی موردنظر تصویر مورد استفاده قرار گیرند (Wu & Sun, 2013; Meenu et al., 2021; Gomes et al., 2025). از بین فضاهای رنگی می‌توان به فضای رنگی RGB اشاره کرد که این فضا از مولفه‌های قرمز، آبی و سبز که به اختصار R، B و G نامیده می شود تشکیل شده است. دامنه تغییرات این مولفه‌های رنگی بین صفر تا ۲۵۵ می باشد مقادیر صفر و ۲۵۵ به ترتیب معادل رنگ سیاه و سفید است (Jafari et al., 2014). فضای رنگی رایج دیگر، فضای CIELAB (L*a*b*) است که به دلیل یکنواختی ادراکی و نزدیکی نسبی به نحوه‌ی درک رنگ توسط چشم انسان، کاربرد گسترده‌ای در اندازه‌گیری و ارزیابی رنگ مواد غذایی دارد. این فضا از سه مؤلفه L*، a* و b* تشکیل شده است؛ به‌طوری‌که L* بیانگر روشنایی و در محدوده ۰ (سیاه) تا ۱۰۰ (سفید) قرار دارد، در حالی که a* محور رنگی سبز–قرمز و b* محور رنگی آبی–زرد را نشان می‌دهند. در سیستم مورد استفاده برای تصاویر دیجیتال، مقادیر a* و b* معمولاً در محدوده تقریبی ۱۲۰- تا ۱۲۰+ بیان می‌شوند (León et al., 2006; Wu & Sun, 2013; Fallahi et al., 2023). فضای رنگی HSB نیز بر اساس اشباعیت رنگ‌ها یعنی Hue، Saturation و Brightness بوده و

[1] Carmoisine
[2] Tartrazine
[3] Quinoline yellow
[4] Sunset Yellow

به عنوان یک فضای رنگی نزدیک به دید انسان، رابطه‌ی بهتری با اهمیت بصری سطوح مواد غذایی دارد (Dehbashi, 2022). تحلیل مؤلفه‌های اصلی (Principal Component Analysis; PCA) یکی از روش‌های پرکاربرد در آمار چندمتغیره و رنگ سنجیس است که با تبدیل مجموعه‌ای از متغیرهای هم‌بسته به تعداد محدودی مؤلفه اصلی، امکان کاهش ابعاد داده‌ها و استخراج مهم‌ترین الگوهای موجود در آنها را فراهم می‌کند. در این روش، مؤلفه‌های اصلی به‌گونه‌ای ایجاد می‌شوند که به‌ترتیب بیشترین میزان واریانس موجود در داده‌ها را توضیح دهند و از این طریق، ساختار و تفاوت‌های میان نمونه‌ها در یک فضای با ابعاد کمتر قابل مشاهده و تفسیر شود. PCA به‌ویژه در مطالعات مرتبط با کیفیت، اصالت و شناسایی تقلبات مواد غذایی کاربرد گسترده‌ای دارد و می‌تواند برای بررسی الگوهای حاصل از داده‌های رنگ‌سنجی، طیف‌سنجی و سایر روش‌های تحلیلی چندمتغیره مورد استفاده قرار گیرد. مطالعات اخیر نیز PCA را یکی از روش‌های مهم تحلیل اکتشافی داده‌ها در رنگ سنجیس غذایی و شناسایی الگوهای مرتبط با اصالت و تقلب مواد غذایی معرفی کرده‌اند (Souza et al., 2024; Zhang et al., 2024).

بنابراین در این تحقیق با توجه به سرعت عمل تشخیصی توسط روش پردازش تصویر، کاهش ضایعات طی نمونه‌گیری و در راستای حفظ محیط زیست به دلیل عدم استفاده از ترکیبات شیمیایی مضر، از روش تحلیل مولفه های اصلی برای تشخیص حضور ترکیبات رنگی تقلبی در زعفران بر اساس سه فضای رنگی مذکور استفاده شد.

مواد و روش ها

مواد

زعفران رشته ای و خامه ی زعفران (پایه سفید رنگ زعفران) از شهرستان چرمه در خراسان جنوبی تهیه شد و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و دور از نور نگهداری شد. همچنین رنگ های سنتزی کینولین یلو، سان ست یلو، تارترازین و اریتروزین B[1] از شرکت سیگما آلدریچ[2] تهیه گردید. پودر پلی آمید نیز برای ستون کروماتوگرافی و سایر ترکیبات شیمیایی مانند استن، اسید فرمیک و آمونیاک نیز از شرکت مرک آلمان تهیه شد.

آماده سازی اولیه نمونه ها

برای تهیه نمونه‌های اولیه و شاهد ابتدا ۵۰ گرم خامه ی زعفران با ۵۰ گرم سرگل رشته ای مخلوط شد تا نمونه همگنی بدست آید.

تهیه‌ی محلول‌های رنگی استاندارد

به‌منظور تهیه محلول‌های رنگی استاندارد، ابتدا محلول مادر هر یک از رنگ‌های مصنوعی با غلظت ۱ گرم در لیتر تهیه شد. تهیه محلول‌های مادر با این غلظت بر اساس روش استاندارد ISO 3632-2 انجام گرفت. سپس، با استفاده از محلول‌های مادر و انجام رقیق‌سازی‌های حجمی مناسب، محلول‌های رنگی با غلظت‌های ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۰۵ گرم در لیتر تهیه و در آزمون‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفتند (ISO 3632-2:2010).

آماده سازی نمونه های آغشته به رنگ مصنوعی

به‌منظور تهیه نمونه‌های زعفران آغشته به رنگ‌های مصنوعی، ۵ گرم از نمونه زعفران درون پلیت شیشه‌ای به‌صورت یکنواخت پهن شد. برای تهیه نمونه‌های حاوی یک رنگ، ترکیب‌های دوتایی رنگ‌ها و مخلوط حاوی تمامی رنگ‌های مورد مطالعه، به‌ترتیب چهار، چهار و یک پلیت در نظر گرفته شد. سپس، ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگی با غلظت مشخص (۰.۰۰۱ و ۰.۰۰۰۵ گرم در لیتر) به‌صورت جداگانه، ترکیب‌های دوتایی و مخلوط تمامی رنگ‌ها، به‌طور یکنواخت بر سطح نمونه‌های زعفران اسپری شد. یک نمونه شامل ۵ گرم زعفران بدون افزودن رنگ مصنوعی نیز به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. پس از جذب محلول رنگی توسط زعفران، نمونه‌ها در شرایط محیطی تا خشک‌شدن کامل نگهداری، سپس به‌طور یکنواخت همگن شده و تا زمان انجام آزمون‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. روش تهیه نمونه‌های زعفران آغشته به رنگ‌های مصنوعی با مطالعات پیشین در زمینه شناسایی تقلبات رنگی زعفران مطابقت داشت (Sereshti et al., 2018; Fattahi et al., 2023; Akbari et al., 2021).

[1] Erythrosine
[2] Sigma-Aldrich

عصاره‌گیری از نمونه ها

پس از آماده‌سازی نمونه‌ها، مقدار ۰/۵گرم از هر نمونه به یک لوله آزمایش منتقل و ۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به آن افزوده شد. مخلوط به‌مدت ۱ دقیقه روی شیکر قرار گرفت تا ترکیبات رنگی محلول در آب از ماتریس زعفران استخراج شوند. سپس، نمونه‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند تا ترکیبات استخراج‌شده در فاز مایع از بخش جامد نمونه جدا شوند. در نهایت، فاز مایع حاصل به‌عنوان عصاره‌ی رنگی نمونه برای انجام آزمون‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت. استفاده از استخراج آبی و روش‌های اسپکتروفتومتری برای بررسی رنگ‌های مصنوعی افزوده‌شده به زعفران در مطالعات پیشین نیز گزارش شده است (Masoum et al., 2015).

شناسایی به روش کروماتو گرافی لایه نازک

به منظور شناسایی رنگ‌های مصنوعی، به عصاره آماده‌شده مقدار ۵۰۰ میکرولیتر اسید فرمیک ۹۵ درصد اضافه شد و عصاره اسیدی‌شده به‌آرامی روی ستون پلی‌آمید قرار گرفت. پس از عبور کامل عصاره، ستون پلی‌آمید به‌ترتیب با ۴۵ میلی‌لیتر متانول، ۴۵ میلی‌لیتر استون و ۴۵ میلی‌لیتر متانول حاوی ۵۰۰ میکرولیتر اسید فرمیک شست‌وشو داده شد. سپس رنگ‌های جذب‌شده بر روی ستون با استفاده از ۱۰ میلی‌لیتر متانول آمونیاکی ۵ درصد استخراج شدند. عصاره حاصل از ستون پلی‌آمید در دمای محیط خشک و سپس در ۳۰۰ میکرولیتر متانول حل شد و ۱۰ میکرولیتر از آن با استفاده از سرنگ هامیلتون بر روی صفحه TLC نوع ۳۵۵۳ لکه‌گذاری گردید. برای توسعه کروماتوگرافی، مطابق روش شناسایی رنگ‌های مصنوعی در استاندارد ISO 3632-2:2010، از دو سیستم فاز متحرک به‌صورت جداگانه استفاده شد. فاز متحرک اول از حل کردن ۲ گرم تری‌سدیم سیترات در مخلوط ۸۰ میلی‌لیتر آب و ۲۰ میلی‌لیتر محلول آمونیاک ۲۵ درصد تهیه شد. فاز متحرک دوم نیز از حل کردن ۰/۴ گرم پتاسیم کلرید در مخلوط ۵۰ میلی‌لیتر ترت-بوتانول، ۱۲ میلی‌لیتر اسید پروپیونیک و ۳۸ میلی‌لیتر آب تهیه گردید. برای هر یک از دو سیستم، صفحه TLC در تانک کروماتوگرافی مربوطه قرار گرفت؛ در هر تانک، فاز متحرک تا ارتفاع تقریبی ۱ سانتی‌متر ریخته شد و تانک به مدت ۱ تا ۲ ساعت بسته نگه داشته شد تا فضای داخلی آن از بخارات حلال اشباع شود. سپس صفحه در تانک قرار گرفت و تا پیشروی مناسب جبهه حلال و جدایش لکه‌های رنگی توسعه داده شد. پس از اتمام توسعه، صفحه خارج و در دمای محیط خشک شد و لکه‌های حاصل بر اساس رنگ و موقعیت آن‌ها بررسی گردید. شناسایی رنگ‌های مصنوعی بر اساس مقایسه مقادیر ضریب بازداری (RF)[1] لکه‌های نمونه با مقادیر آن ها در رنگ‌های استاندارد انجام شد. مقدار ضریب بازداری از نسبت فاصله طی‌شده توسط لکه رنگی به فاصله طی‌شده توسط جبهه حلال با رابطه ۱ محاسبه شد (Moghadasi et al., 2019; ISO 3632-2:2010).

$$RF = \frac{d_{sample}}{d_{solvent}} \qquad \text{(رابطه ۱)}$$

که در آن d_{sample} فاصله طی شده توسط لکه ی نمونه و $d_{solvent}$ فاصله ی طی شده توسط حلال می باشد.

روش اسپکتروفتو متری

دراین آزمون از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل RAYLIGHT –UV9200) استفاده شد. برای بررسی میزان رنگ نمونه ها از طول موج ماکزیمم جذب هر یک از آن ها که در جدول ۱ مشخص شده است استفاده گردید و میزان جذب عصاره ی نمونه ها در هر یک از این طول موج ها قرائت شد (Hashemi et al., 2019).

جدول ۱. طول موج های مربوط به شناسایی رنگ ها به روش اسپکتروفتومتری

Table 1. Wavelengths used for the identification of dyes by spectrophotometry

کروسین(زعفران)	تارترازین	اریتروزینB	سانست یلو	کینولین یلو
Crossin	**tartrazine**	**Erythrosine B**	**Sunset yellow**	**Quinoline Yellow**
440 nm	425 nm	530 nm	500 nm	416 nm

[1] Retention Factor

تصویربرداری و استخراج شاخص‌های رنگی

به‌منظور تصویربرداری از نمونه‌ها در شرایط نوری کنترل‌شده، یک محفظه نوردهی چوبی با ابعاد ۹۰×۹۰×۱۲۰ سانتی‌متر ساخته شد که در آن از شش منبع نوری استفاده گردید. به‌منظور کاهش اثر تابش مستقیم منابع نوری بر لنز دوربین و ایجاد شرایط تصویربرداری یکنواخت، دوربین عکاسی در مرکز محفظه و در فاصله ۳۰ سانتی‌متری از نمونه‌ها نصب شد. تصاویر با دوربین Canon D1000 با وضوح ۱۰ مگاپیکسل و حداکثر اندازه ۲۸۱۶×۱۸۸۰ پیکسل و با استفاده از نرم‌افزار EOS Utility ، نسخه ۲، ثبت شدند. تصاویر از طریق کابل USB به رایانه منتقل و برای پردازش و استخراج ویژگی‌های رنگی ذخیره شدند. استفاده از محفظه تصویربرداری با شرایط نوری ثابت و کنترل‌شده، به‌منظور کاهش تغییرپذیری ناشی از شرایط روشنایی، در مطالعات بینایی ماشین و ارزیابی رنگ مواد غذایی توصیه شده است (Wu & Sun, 2013; Meenu et al., 2021).

تنظیمات دوربین مورد استفاده در تصویربرداری نمونه‌ها در جدول ۲ ارائه شده است. پس از تصویربرداری از تمامی نمونه‌ها تحت شرایط یکسان، تصاویر دیجیتال با استفاده از نرم‌افزار ImageJ پردازش شدند و مؤلفه‌های رنگی در فضاهای CIELAB، HSB (اشباعیت و روشنایی رنگی) و RGB (قرمز، سبز، آبی) استخراج گردیدند و برای تحلیل‌های آماری و چندمتغیره مورد استفاده قرار گرفتند (León et al., 2006; Wu & Sun, 2013; Meenu et al., 2021).

آنالیز آماری

به‌منظور بررسی الگوی تغییرات شاخص‌های رنگی و تفکیک نمونه‌های زعفران بر اساس ویژگی‌های رنگی، داده‌های حاصل از تصویربرداری دیجیتال در سه نوبت از سطح هر نمونه، با استفاده از روش تحلیل مؤلفه‌های اصلی (Principal Component Analysis; PCA) در نرم‌افزار Minitab 16 مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفتند. در هر نوبت تصویربرداری، شاخص‌های رنگی L*، a* و b* از کل سطح نمونه استخراج شدند. در این روش، متغیرهای رنگی اولیه به مجموعه‌ای از مؤلفه‌های اصلی تبدیل شدند که به‌ترتیب بیشترین میزان واریانس موجود در مجموعه داده‌ها را تبیین می‌کنند. تعداد مؤلفه‌های اصلی بر اساس مقادیر ویژه (Eigenvalues) و سهم هر مؤلفه در تبیین واریانس کل داده‌ها تعیین شد. همچنین، با استفاده از نمودار پراکنش نمونه‌ها بر اساس مؤلفه‌های اصلی منتخب، الگوی قرارگیری و میزان تفکیک نمونه‌های زعفران خالص و نمونه‌های حاوی رنگ‌های مصنوعی بررسی شد.

جدول ۲. تنظیمات دوربین در فرایند تصویربرداری

Table 2. Camera settings used for sample imaging

ویژگی properties	مقدار value
فاصله کانونی Focal Length	34 ML
حساسیت ISO Speed	ISO-100
مدت زمان قرار گرفتن Exposure Time	20 second
فلاش Flash	off
تعادل سفیدی White Balance	Manual
ورژن EXIF	0221

نتایج و بحث

شناسایی رنگ به روش کروماتو گرافی لایه نازک

شناسایی رنگ در این روش بر اساس میزان RF (ضریب نگهداری) رنگ صورت گرفت که با توجه به ضریب نگهداری مشخص برای هر رنگ، براساس جدول ۳ میزان رنگ نمونه ها به روش کروماتوگرافی لایه نازک بدست آمد. همانطور که دیده می شود در این روش نمونه ی مخلوط شده با ترکیب رنگ‌های تارترازین و اریتروزین به نمونه شاهد بسیار نزدیک تر از سایر نمونه ها می‌باشد.

شناسایی رنگ به روش اسپکتروفتو متری

شکل ۱ شناسایی رنگ‌های تقلبی به روش اسپکتروفتومتری و مقایسه آن با نمونه شاهد را نشان می دهد. همانطور که در شکل نیز دیده می شود نمونه‌هایی که با مخلوط کلی رنگ‌ها آلوده شده بودند تفاوت زیادی با سایر نمونه‌ها داشتند، در حالی که تفاوت نمونه شاهد با نمونه‌های ترکیبی دوتایی و رنگ های منفرد معنی‌دار نبود.

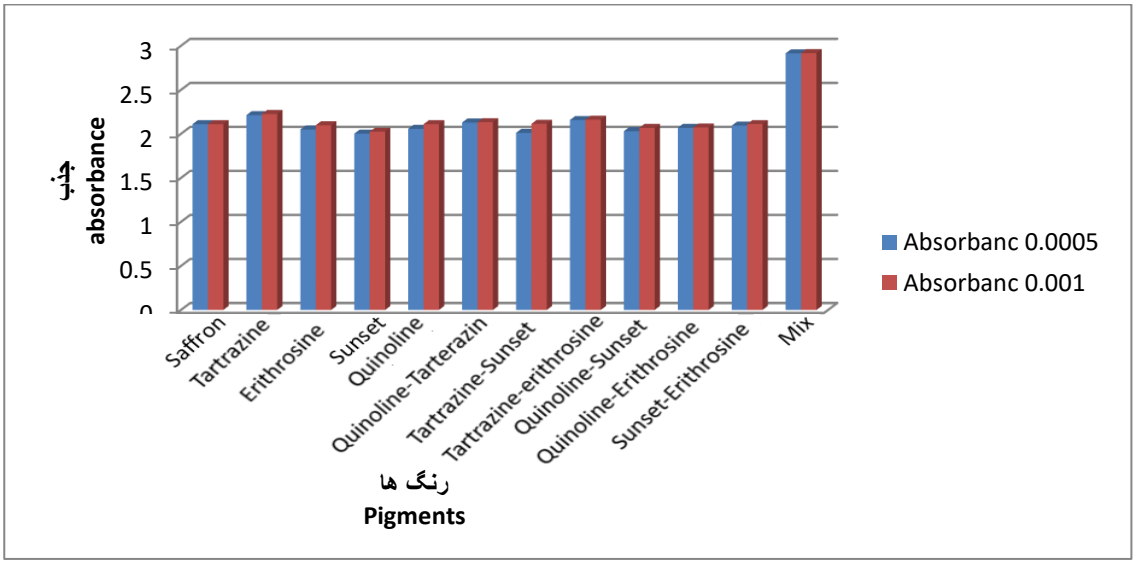
شناسایی رنگ به روش تجزیه و تحلیل مولفه های اصلی (PCA)

به منظور توصیف داده‌های تجربی حاصل از آزمایش‌ها و برای بررسی ارتباط میان پارامترهای رنگی و آنالیز رنگ نمونه شاهد با نمونه‌های آلوده به رنگ‌های سنتزی از این روش استفاده شد. برای دستیابی به نتایج رضایت‌بخش در تجزیه و تحلیل آماری چند متغیره، انتخاب متغیرها باید به‌دقت انجام شود. از اینرو در این مطالعه با توجه به سهم بسیار پایین این مؤلفه‌ها در تبیین واریانس کل داده‌ها، ، مولفه های H از سیستم رنگ سنجی HSB1 و R از سیستم رنگ سنجی RB2G ، از محاسبات حذف شدند و به ترتیب مؤلفه‌های L، a ، b، B1، S، G و B2 تحت عناوین PC1 تا PC7 به عنوان مولفه های رنگی مورد آنالیز قرار گرفتند. در ادامه‌ی آنالیز داده ها، طبق جداول ۴ تا ۶، اولین و دومین مولفه یعنی L و a با دارا بودن بیشترین مقادیر ویژه و بیشترین درصد واریانس داده ها توسط نرم افزارMinitab16 به عنوان مؤلفه‌های اصلی انتخاب شدند (Shayegan & Sarirchi.,2021).

جدول ۳. مقایسه و شناسایی رنگ‌های موجود در نمونه‌های مختلف بر اساس مقادیر Rf به روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)

Table 3. Comparison and identification of dyes in different samples based on Rf values using thin-layer chromatography (TLC)

نمونه Sample	شاهد Control	تارترازین Tartrazine	اریتروزین Erythrosine	سانست یلو Sunset yellow	کینولین یلو Quinoline Yellow	کینولین یلو/ تارترازین Quinoline Yellow / tartrazine	تارترازین/ سانست یلو Tartrazine/ sunset yellow	تارترازین/ اریتروزین Tartrazine/Erythrosine	کینولین یلو/ سانست یلو Quinoline Yellow/sunset yellow	کینولین یلو/ اریتروزین cinnoline yellow/Erythrosine	سانست یلو/ اریتروزین Sunset yellow/Erythrosine
RF	0.68	0.41	0.92	0.61	0.63	0.52	0.51	0.66	0.62	0.77	0.76



شکل ۱. میزان جذب نوری رنگ‌های مختلف در بیشینه طول موج جذب، در دو غلظت ۰.۰۰۱ و ۰.۰۰۰۵ گرم در لیتر

Fig 1. Comparison of the absorbance of different dyes at their maximum absorption wavelengths (λmax) at two concentrations of 0.001 and 0.0005 g/L

بر این اساس در جدول۴ درصد تغییرپذیری، درصد واریانس تجمعی و مقادیر ویژه‌ی پارامترهای رنگی با غلظت ۰/۰۰۱ گرم در لیتر رنگ ها نشان داده شده که اولین و دومین مولفه اصلی با واریانس ۰/۷۵۲ و ۰/۱۳۸ و مقادیر ویژه ی ۵/۲۶۶۵ و ۰/۹۶۳۷ دارای بیشترین تغییرپذیری و مقدار ویژه در میان ۷ مولفه ی رنگی بودند.

در جدول ۵ نیز مشخصات مربوط به غلظت آغشتگی رنگ ۰/۰۰۰۵ گرم در لیتر برای مولفه های رنگی آورده شده است که در این غلظت نیز اولین و دومین مولفه اصلی با تغییرپذیری ۰/۹۱۶ و ۰/۰۵۱ و مقدار ویژه ی ۶/۴۱۴۱ و ۰/۳۵۸۸ بیشترین مقدار را در میان ۷ مولفه ی رنگی دارا بودند.

جدول ۴. مقادیر ویژه، واریانس تجمعی و تغییر پذیری مولفه های رنگی در غلظت ۰/۰۰۱ g/lit

Table 4. Eigenvalues, cumulative variance, and variability of color components at a concentration of 0.001 g/L

PC7(B2) شفافیت	PC6(S) اشباعیت	PC5(B1) رنگ آبی	PC4(G) رنگ سبز	PC3(b) زردی	PC2(a) قرمزی	PC1(L) روشنایی	Concentration 0.001 غلظت ۰/۰۰۱
0.0000	0.0077	0.0120	0.0180	0.7320	0.9637*	5.2665*	**مقادیر ویژه** Eigenvalues
0.000	0.001	0.002	0.003	0.105	0.138*	0.752*	**تغییرپذیری** variance
1.000	1.000	0.999	0.997	0.995	0.890*	0.752*	**واریانس تجمعی** Cumulative Variance

*مولفه های با بیشترین مقادیر ویژه، تغییرپذیری و واریانس تجمعی که به عنوان مولفه های اصلی انتخاب شدند.

*The principal components selected based on highest eigenvalues, variability, and cumulative variance.

جدول ۵. مقادیر ویژه، واریانس تجمعی و تغییر پذیری مولفه های رنگی در غلظت ۰/۰۰۰۵ g/lit

Table 5. Eigenvalues, cumulative variance, and variability of color components at a concentration of 0.0005 g/L

PC7(B2) شفافیت	PC6(S) اشباعیت	PC5(B1) آبی	PC4(G) رنگ سبز	PC3(b) زردی	PC2(a) قرمزی	PC1(L) روشنایی	Concentration 0.0005 غلظت ۰/۰۰۰۵
0.0000	0.0059	0.0170	0.0716	0.1326	0.3588*	6.4141*	**مقادیر ویژه** Eigenvalues
0.000	0.001	0.002	0.010	0.019	0.051*	0.916*	**تغییرپذیری** variance
1.000	1.000	0.999	0.997	0.987	0.968*	0.916*	**واریانس تجمعی** Cumulative Variance

*مولفه های با بیشترین مقادیر ویژه، تغییرپذیری و واریانس تجمعی که به عنوان مولفه های اصلی انتخاب شدند.

*The principal components selected based on highest eigenvalues, variability, and cumulative variance.

جدول ۶. مقادیر ویژه، واریانس تجمعی و تغییر پذیری مولفه های رنگی درمیانگین دو غلظت

Table 6. Eigenvalues, cumulative variance, and variability of color components across the mean of the two concentrations.

PC7(B2) شفافیت	PC6(S) اشباعیت	PC5(B1) آبی	PC4(G) رنگ سبز	PC3(b) زردی	PC2(a) قرمزی	PC1(L) روشنایی	mean of the two concentrations میانگین دو غلظت
0.0001	0.0116	0.0313	0.2741	0.4235	1.0123*	5.2471*	**مقادیر ویژه** Eigenvalues
0.000	0.002	0.004	0.039	0.061	0.145*	0.750*	**تغییرپذیری** variance
1.000	1.000	0.998	0.994	0.955	0.894*	0.750*	**واریانس تجمعی** Cumulative Variance

*مولفه های با بیشترین مقادیر ویژه، تغییرپذیری و واریانس تجمعی که به عنوان مولفه های اصلی انتخاب شدند.

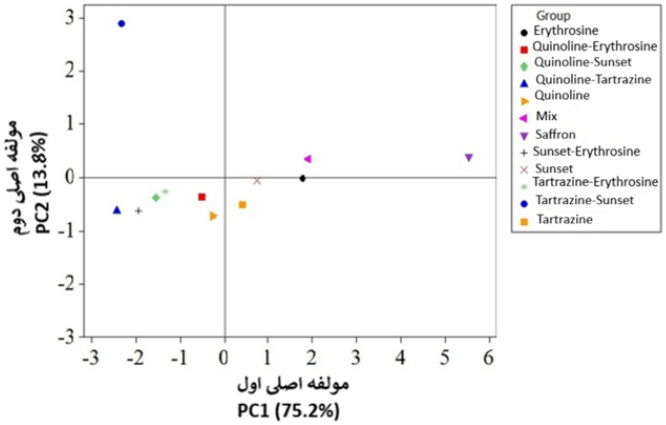
*The principal components selected based on highest eigenvalues, variability, and cumulative variance

همچنین بر اساس داده های بدست آمده در جدول۶، اولین و دومین مولفه اصلی با تغییرپذیری ۰/۷۵ و ۰/۱۴۵ و مقادیر ویژه ی ۵/۲۴۷۱ و ۱/۰۱۲۳ دارای بیشترین اختلاف با سایر مولفه ها در مقدار میانگین دو غلظت رنگی بودند.

بدین ترتیب و پس از مشخص شدن بیشترین اختلاف در بین مولفه‌های رنگی یعنی مولفه L و a، نمودار حاصل از پراکندگی نمونه‌های آغشته به رنگ زعفران با توجه به غلظت مورد استفاده در آنها به روش تحلیل مؤلفه اصلی رسم گردید. محورهای افقی و عمودی نمودار به‌ترتیب بیانگر نمرات مؤلفه‌های اصلی اول و دوم (PC1 و PC2) بوده و موقعیت هر نمونه در این فضا بر اساس نمره آن در مؤلفه‌های مربوطه تعیین شده است.

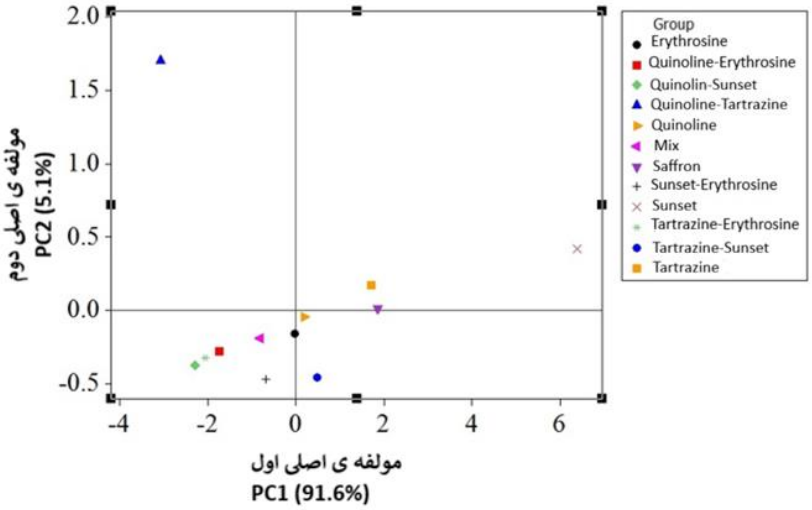
با توجه به نمودار در شکل ۲، امتیازات PCA نشان داد که نمونه‌ها بر اساس دو مؤلفه اصلی PC1 و PC2 الگوی پراکنش متفاوتی از خود نشان دادند. مؤلفه اصلی اول (PC1) با تبیین ۷۵/۲درصد از واریانس کل داده‌ها، بیشترین سهم را در تفکیک نمونه‌ها داشت و بر اساس این مؤلفه، نمونه شاهد (زعفران خالص) از بخش عمده‌ای از نمونه‌های حاوی رنگ‌های مصنوعی تفکیک شد و کمترین میزان همپوشانی را با سایر گروه‌ها نشان داد. در مقابل، مؤلفه اصلی دوم (PC2) که ۱۳/۸درصد از واریانس کل را تبیین می‌کرد، قدرت تفکیک کمتری داشت؛ به‌طوری‌که بر اساس این مؤلفه، نمونه زعفران خالص با نمونه حاوی مخلوط تمامی رنگ‌های مصنوعی تا حدودی همپوشانی نشان داد. در مجموع، پراکنش نمونه‌ها در فضای PC1–PC2 نشان داد که مؤلفه اول نقش غالب‌تری در تفکیک زعفران خالص از نمونه‌های رنگ‌شده داشته است، در حالی که PC2 اگرچه بخش دیگری از تغییرات رنگی را توضیح می‌دهد، در تفکیک برخی از تیمارها با محدودیت همراه بود.

در بررسی نمودار شکل ۳، امتیازات تحلیل مؤلفه‌های اصلی نشان داد که مؤلفه اصلی اول (PC1) با تبیین ۹۱/۶٪ درصد از واریانس کل داده‌ها، بیشترین سهم را در ایجاد تغییرپذیری و تفکیک نمونه‌ها داشته است، در حالی که مؤلفه اصلی دوم (PC2) ۵/۱ درصد از واریانس کل را تبیین کرد. در مجموع، دو مؤلفه اصلی اول و دوم قادر به توضیح ۹۶/۷ درصد از تغییرات موجود در داده‌های رنگی بودند. همان‌طور که مشاهده می‌شود، نمونه شاهد (زعفران خالص) در ناحیه مثبت PC1 و در نزدیکی محور افقی قرار گرفت و از بخش قابل توجهی از نمونه‌های حاوی رنگ‌های مصنوعی که در ناحیه منفی PC1 پراکنده شده بودند، تفکیک شد. با این حال، نمونه شاهد در امتداد PC1 به نمونه‌های حاوی تارترازین و مخلوط‌های رنگی نزدیک‌تر بود که نشان‌دهنده وجود همپوشانی نسبی میان این تیمارها است. از سوی دیگر، در امتداد PC2 نیز برخی از نمونه‌ها، از جمله نمونه حاوی کینولین–تارترازین، در مقادیر مثبت بالاتری قرار گرفتند و از سایر گروه‌ها فاصله گرفتند، در حالی که بخش عمده نمونه‌ها در محدوده نزدیک به صفر یا مقادیر منفی PC2 تجمع داشتند. بنابراین، پراکنش نمونه‌ها در فضای دو مؤلفه اصلی نشان داد که PC1 نقش غالبی در تفکیک نمونه‌های زعفران خالص و آلوده به رنگ‌های مصنوعی داشته و با وجود همپوشانی نسبی برخی تیمارها، بخش عمده‌ای از گروه‌های مورد بررسی بر اساس ویژگی‌های رنگی از یکدیگر قابل تفکیک بودند.



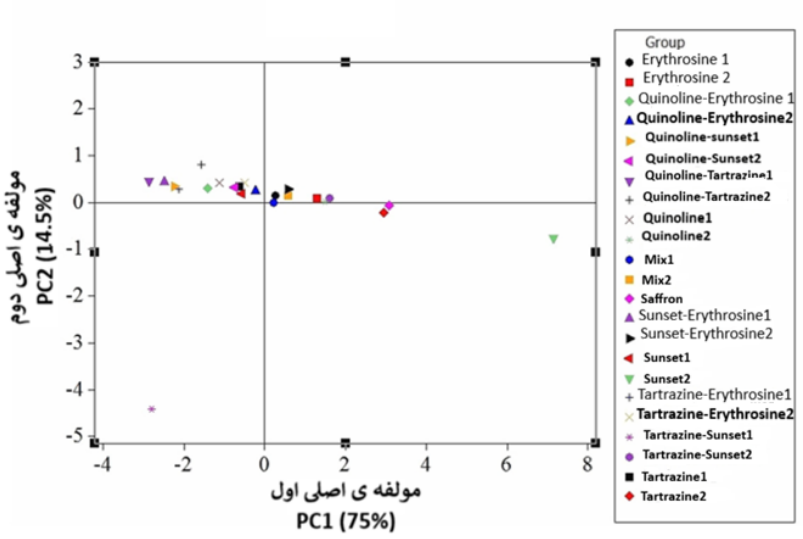
شکل ۲. نمودار امتیازات تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) برای تفکیک نمونه‌های زعفران خالص و نمونه‌های حاوی رنگ‌های مصنوعی در غلظت ۰/۰۰۱ بر اساس شاخص‌های رنگی

Fig 2. Principal component analysis (PCA) score plot for discrimination of pure saffron samples and samples containing synthetic dyes at a concentration of 0.001 g/L based on color indices



شکل ۳. نمودار امتیازات تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) برای تفکیک نمونه‌های زعفران خالص و نمونه‌های حاوی رنگ‌های مصنوعی در غلظت ۰/۰۰۰۵ بر اساس شاخص‌های رنگی

Fig 3. Principal component analysis (PCA) score plot for discrimination of pure saffron samples and samples containing synthetic dyes at a concentration of 0.0005 g/L based on color indices.



شکل ۴. نمودار امتیازات تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) برای تفکیک نمونه‌های زعفران خالص و نمونه‌های حاوی رنگ‌های مصنوعی در میانگین غلظت ۰/۰۰۱ (کد۱) و ۰/۰۰۰۵ (کد۲) بر اساس شاخص‌های رنگی

Fig 4. Principal component analysis (PCA) score plot for discrimination of pure saffron samples and samples containing synthetic dyes at a concentration of 0.001 (Code1) and 0.0005 (Code2) g/L based on color indices

بررسی نمودار امتیازات تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) نشان داد که مؤلفه اصلی اول (PC1) با تبیین ۷۵ درصد از واریانس کل داده‌ها، بیشترین سهم را در توضیح تغییرات موجود در شاخص‌های رنگی داشت، در حالی که مؤلفه اصلی دوم (PC2) ۱۴/۵ درصد از واریانس کل را تبیین کرد. بنابراین، دو مؤلفه اصلی اول و دوم در مجموع قادر به توضیح ۸۹/۵ درصد از تغییرات موجود در داده‌های رنگی بودند. همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، پراکنش نمونه‌ها در امتداد PC1 الگوی متمایزی را در میان گروه‌های مختلف نشان داد. نمونه شاهد (زعفران خالص) در ناحیه مثبت PC1 و نزدیک به محور PC2 قرار گرفت و از بخش عمده‌ای از نمونه‌های حاوی رنگ‌های مصنوعی که عمدتاً در ناحیه منفی PC1 یا نزدیک مبدأ پراکنده شده بودند، فاصله گرفت. با این حال، نزدیکی برخی از تیمارهای رنگی به نمونه شاهد نشان‌دهنده وجود همپوشانی نسبی میان این گروه‌ها

است. از سوی دیگر، PC2 توانست برخی از نمونه‌ها را بر اساس تفاوت در ویژگی‌های رنگی از سایر گروه‌ها متمایز کند؛ به‌طوری‌که تعدادی از نمونه‌ها در مقادیر منفی‌تر PC2 و فاصله قابل توجه از تجمع اصلی نمونه‌ها قرار گرفتند. همچنین، یک نمونه در ناحیه مثبت بالای PC2 از سایر گروه‌ها فاصله محسوسی نشان داد که بیانگر رفتار رنگی متفاوت آن تیمار نسبت به سایر نمونه‌ها است. در مجموع، پراکنش نمونه‌ها در فضای PC1–PC2 نشان داد که بخش عمده تغییرات داده‌های رنگی توسط PC1 توضیح داده می‌شود و این مؤلفه نقش مهم‌تری در تفکیک زعفران خالص از نمونه‌های حاوی رنگ‌های مصنوعی دارد. با وجود این، همپوشانی مشاهده‌شده میان برخی تیمارها نشان می‌دهد که قدرت تفکیک PCA برای تمامی رنگ‌های مورد بررسی یکسان نبوده و شناسایی برخی نمونه‌ها نیازمند استفاده همزمان از سایر روش‌های تحلیلی است.

تقلب در زعفران از مهم‌ترین چالش‌های مرتبط با اصالت و کیفیت این محصول ارزشمند به شمار می‌رود و استفاده از رنگ‌های مصنوعی یکی از روش‌هایی است که می‌تواند با تغییر ظاهر محصول، تشخیص نمونه تقلبی را برای مصرف‌کننده دشوار کند. به همین دلیل، توسعه روش‌های سریع، ساده و کم‌هزینه برای غربالگری نمونه‌های مشکوک اهمیت زیادی دارد. در پژوهش حاضر، قابلیت سه رویکرد کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)، اسپکتروفتومتری و تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) مبتنی بر شاخص‌های رنگی برای شناسایی زعفران آغشته به رنگ‌های مصنوعی تارترازین، اریتروزین، کینولین یلو و سان‌ست یلو بررسی شد. نتایج حاصل از این سه روش نشان داد که افزودن رنگ‌های مصنوعی موجب ایجاد تغییراتی در ویژگی‌های ظاهری و پاسخ‌های دستگاهی زعفران می‌شود، اگرچه میزان قابلیت تفکیک نمونه‌ها به نوع رنگ، غلظت رنگ و روش تحلیلی مورد استفاده وابسته بود.

نتایج TLC نشان داد که نمونه‌های حاوی رنگ‌های مصنوعی بر اساس موقعیت لکه‌ها و مقادیر Rf قابل بررسی و شناسایی هستند. استفاده از RF به‌عنوان شاخصی برای مقایسه مهاجرت ترکیبات درTLC ، امکان مقایسه الگوی نمونه‌های آلوده با رنگ‌های مورد استفاده را فراهم می‌کند. در مطالعات مربوط به اصالت زعفران نیز TLC به‌عنوان یکی از روش‌های کروماتوگرافی مورد استفاده قرار گرفته است و توانایی آن در شناسایی رنگ‌های مصنوعی و سایر ترکیبات غیرطبیعی گزارش شده است. بوما و همکاران (Bhooma et al., 2020) با بررسی نمونه‌های تجاری زعفران نشان دادند که TLC می‌تواند در غربالگری رنگ‌های مصنوعی موجود در نمونه‌های تجاری مؤثر باشد؛ در آن مطالعه، پس از مشاهده الگوهای غیرطبیعیTLC ، رنگ‌های موجود با روش طیف‌سنجی جرمی شناسایی شدند. همچنین، مطالعه اوردودی و همکاران (Ordoudi et al., 2017) نشان داد که آزمون‌های رنگ‌سنجی و طیف‌سنجی می‌توانند غیرخالص بودن نمونه زعفران را آشکار کنند، هرچند برای شناسایی دقیق ماهیت تقلب، استفاده از روش‌های تحلیلی تکمیلی ضروری است.

در مطالعه حاضر، اهمیت TLC بیشتر از منظر تأیید حضور رنگ‌های افزوده‌شده و ایجاد یک مبنای مقایسه‌ای برای ارزیابی روش‌های سریع‌تر است. با این حال، TLC به دلیل نیاز به آماده‌سازی نمونه، انجام مراحل جداسازی و تفسیر لکه‌ها، برای استفاده گسترده و غربالگری تعداد زیادی نمونه ممکن است محدودیت‌هایی داشته باشد. بنابراین، استفاده از روش‌هایی که بتوانند بدون جداسازی کامل اجزای رنگی، الگوی کلی تغییرات نمونه را بررسی کنند، می‌تواند مکمل مناسبی برای روش‌های کروماتوگرافی باشد.

نتایج اسپکتروفتومتری نیز نشان داد که نمونه‌های حاوی مخلوط کلی رنگ‌ها نسبت به نمونه شاهد و نمونه‌های حاوی رنگ‌های منفرد یا ترکیبات دوتایی، تفاوت بیشتری در پاسخ طیفی نشان می‌دهند. این یافته نشان می‌دهد که ترکیب چند رنگ مصنوعی می‌تواند تغییر محسوسی در ویژگی‌های نوری نمونه ایجاد کند. بااین‌حال، شباهت بیشتر پاسخ نمونه‌های حاوی رنگ‌های منفرد و ترکیبات دوتایی با نمونه شاهد نشان می‌دهد که تشخیص تقلب بر اساس یک ویژگی منفرد طیفی ممکن است در برخی شرایط دشوار باشد. این موضوع با نتایج مطالعاتی که از روش‌های رنگ سنجی برای تفسیر داده‌های طیفی زعفران استفاده کرده‌اند، همخوانی دارد؛ زیرا در نمونه‌های پیچیده غذایی، تغییرات حاصل از تقلب ممکن است در تعداد زیادی از متغیرها توزیع شده باشد و تفسیر همزمان آنها به روش‌های چندمتغیره نیاز داشته باشد . کریمی و همکاران (karimi et al., 2016) نیز در بررسی زعفران تقلبی با استفاده از FTIR نشان دادند که PCA

می‌تواند برای ارائه نمای کلی از یک مجموعه داده پیچیده طیفی مفید باشد، اگرچه در آن مطالعه PCA به‌تنهایی برای تفکیک همه گروه‌ها کافی نبود.

یکی از مهم‌ترین یافته‌های پژوهش حاضر، قابلیت PCA در خلاصه‌سازی اطلاعات حاصل از شاخص‌های رنگی و نمایش الگوی پراکنش نمونه‌های زعفران خالص و آلوده به رنگ‌های مصنوعی بود. در این مطالعه، پس از بررسی متغیرهای رنگی، مؤلفه‌های H و R به دلیل سهم پایین‌تر آنها در توضیح تغییرات داده‌ها کنار گذاشته شدند و هفت متغیر L ، a، b، B1، S، Gو B2 در تحلیل نهایی مورد استفاده قرار گرفتند. این رویکرد باعث شد ساختار چندبعدی داده‌های رنگی به تعداد محدودی مؤلفه اصلی کاهش یابد و امکان مشاهده روابط میان نمونه‌ها در یک فضای دوبعدی فراهم شود. اهمیت این موضوع در داده‌های رنگی بیشتر آشکار می‌شود، زیرا تغییرات ظاهری نمونه‌ها معمولاً همزمان در چندین شاخص رنگی رخ می‌دهد و بررسی جداگانه هر شاخص الزاماً قادر به توصیف کامل تفاوت میان نمونه‌ها نیست.

نتایج PCA نشان داد که PC1 و PC2 بیشترین سهم را در توضیح واریانس داده‌ها داشتند. در غلظت ۰/۰۰۱ گرم بر لیتر، PC1دارای مقدار ویژه ۵/۲۶۶۵ و PC2 دارای مقدار ویژه ۰/۹۶۳۷ بود که به‌ترتیب ۷۵/۲ و ۱۳/۸ درصد از واریانس کل داده‌ها را توضیح دادند. بنابراین، دو مؤلفه نخست در مجموع حدود ۸۹ درصد از تغییرات موجود در هفت متغیر رنگی را پوشش دادند. در غلظت ۰/۰۰۰۵ گرم بر لیتر نیز PC1 با مقدار ویژه ۶/۴۱۴۱ توانست ۹۱/۶ درصد از واریانس کل را توضیح دهد، در حالی که PC2 با مقدار ویژه ۰/۳۵۸۸ حدود ۵/۱ درصد از واریانس را تبیین کرد. در نتیجه، در این غلظت نیز دو مؤلفه نخست مجموعاً بیش از ۹۶ درصد از تغییرات داده‌ها را توضیح دادند. چنین سهم بالایی از واریانس نشان می‌دهد که ساختار اصلی تغییرات شاخص‌های رنگی در تعداد بسیار محدودی از مؤلفه‌ها قابل توصیف بوده است.

این یافته با گزارش‌های پیشین درباره کاربرد PCA در بررسی ویژگی‌های رنگی محصولات غذایی همخوانی دارد. برای نمونه، در یک مطالعه روی ویژگی‌های رنگی گاری، PC1و PC2 در مجموع ۸۶/۵ درصد از تغییرات شاخص‌های*L ، *a و *b را توضیح دادند و PCA توانست نمونه‌ها را بر اساس ویژگی‌های رنگی از یکدیگر تفکیک کند. در آن مطالعه نیز *L و *a نقش مهمی در جهت‌گیری و پراکنش برخی گروه‌های نمونه داشتند (Emmanuel Alamu et al., 2024). همچنین در مطالعه‌ای جدیدتر روی ویژگی‌های رنگی محصولات غذایی، ساختار PCA نشان داد که *L و *a می‌توانند بخش عمده‌ای از تغییرپذیری رنگی را در مؤلفه نخست توضیح دهند؛ این یافته از نظر نقش این دو متغیر در توصیف تغییرات رنگی با نتایج پژوهش حاضر هم‌راستا است.

در پژوهش حاضر نیز *L و *a بیشترین نقش را در ساختار دو مؤلفه نخست نشان دادند. از نظر مفهومی، این نتیجه قابل انتظار است؛ زیرا *L بیانگر روشنایی نمونه و *aبیانگر موقعیت رنگ در محور سبز–قرمز است و تغییر در رنگ ظاهری ناشی از افزودن رنگ‌های مصنوعی می‌تواند هم روشنایی و هم مؤلفه قرمز–سبز نمونه را تغییر دهد. بنابراین، قرار گرفتن این متغیرها در میان مهم‌ترین متغیرهای مرتبط با مؤلفه‌های اصلی می‌تواند نشان‌دهنده آن باشد که بخش مهمی از تفاوت ظاهری میان زعفران خالص و نمونه‌های رنگ‌شده از طریق تغییر در روشنایی و مؤلفه قرمز–سبز قابل توصیف است.

پراکنش نمونه‌ها در فضای PC1–PC2 نیز اطلاعات مهمی درباره توانایی روش رنگ‌سنجی در تشخیص تقلب فراهم کرد. در غلظت ۰/۰۰۱ گرم بر لیتر، نمونه شاهد در امتداد PC1 کمترین همپوشانی را با بسیاری از گروه‌های رنگی نشان داد و در نتیجه تفکیک مناسب‌تری میان زعفران خالص و نمونه‌های آلوده مشاهده شد. این نتیجه نشان می‌دهد که حتی در شرایطی که بررسی جداگانه شاخص‌های رنگی ممکن است تفاوت میان نمونه‌ها را به‌صورت کامل آشکار نکند، ترکیب همزمان اطلاعات چندین شاخص رنگی در قالب PCA می‌تواند الگوی متفاوت نمونه‌ها را بهتر آشکار کند.

در مقابل، مشاهده همپوشانی میان نمونه شاهد و برخی نمونه‌های حاوی رنگ مصنوعی، به‌ویژه تارترازین و کینولین یلو، نشان می‌دهد که PCA مبتنی بر رنگ‌سنجی را نباید به‌عنوان روشی مطلق برای شناسایی تمام انواع تقلب در نظر گرفت. این همپوشانی احتمالاً بیانگر شباهت نسبی پاسخ رنگی برخی نمونه‌های آلوده به رنگ‌های خاص با رنگ طبیعی زعفران است. در واقع، هنگامی که یک رنگ مصنوعی تغییرات رنگی مشابهی با نمونه شاهد ایجاد کند، تنها استفاده از پارامترهای رنگی ممکن است برای تفکیک کامل کافی نباشد. این موضوع

با مطالعات مبتنی بر روش‌های طیف‌سنجی و رنگ سنجی نیز سازگار است؛ به‌عنوان مثال، کریمی و همکاران (Karimi et al., 2016) گزارش کردند که اگرچه PCA برای خلاصه‌سازی ساختار داده‌های FT-IR زعفران مفید بود، اما شباهت زیاد برخی طیف‌ها می‌توانست تفکیک کامل گروه‌ها را بر اساس دو مؤلفه نخست محدود کند.

از سوی دیگر، نتایج پژوهش حاضر با مطالعاتی که مستقیماً از رنگ سنجی برای تشخیص تقلب زعفران استفاده کرده‌اند، در یک جهت کلی قرار دارد. فتاحی و همکاران (Fattahi et al., 2022) با استفاده از طیف‌سنجی تحرک یونی و روش‌های چندمتغیره، از جمله PCA ، توانستند زعفران خالص و نمونه‌های حاوی چهار رنگ مصنوعی شامل تارترازین، سان‌ست یلو، پونسو و اریتروزین را از یکدیگر تفکیک کنند. در آن مطالعه، PCA حدود ۹۲/۲۸ درصد از واریانس داده‌ها را توضیح داد و تفکیک قابل قبولی میان نمونه‌های زعفران و رنگ‌های مصنوعی مشاهده شد. این یافته با نتایج پژوهش حاضر از نظر قابلیت PCA برای استخراج اطلاعات مرتبط با تقلب از یک مجموعه داده چندمتغیره همخوانی دارد، هرچند نوع داده ورودی در دو پژوهش متفاوت است. در مطالعه فتاحی و همکاران، داده‌های طیف‌سنجی تحرک یونی مبنای PCA قرار گرفت، در حالی که در پژوهش حاضر، اطلاعات بسیار ساده‌تر و کم‌هزینه‌تر حاصل از رنگ‌سنجی دیجیتال در فضاهای Lab ، HSB و RGB مورد استفاده قرار گرفته است.

اهمیت این تفاوت از نظر کاربرد عملی قابل توجه است. روش‌های طیف‌سنجی پیشرفته و رنگ سنجی می‌توانند قدرت تشخیص بالایی داشته باشند، اما معمولاً به تجهیزات تخصصی، آماده‌سازی نمونه و پردازش پیچیده‌تر نیاز دارند. در مقابل، استفاده از شاخص‌های رنگی استخراج‌شده از تصاویر می‌تواند رویکردی ساده‌تر برای غربالگری اولیه نمونه‌های مشکوک فراهم کند. در مطالعه‌ای درباره تشخیص تقلب زعفران با استفاده از سیستم بینایی ماشین و بینی الکترونیکی نیز مشخص شد که ویژگی‌های استخراج‌شده از داده‌های رنگی و عطری پس از پردازش با PCA و سایر روش‌های چندمتغیره قادر به تفکیک زعفران اصیل و نمونه‌های تقلبی بودند (Kiani et al., 2017). همچنین، استفاده از تصاویر HPTLC و تحلیل چندمتغیره نشان داده است که اطلاعات رنگی موجود در تصاویر کروماتوگرافی نیز می‌تواند با PCA و سایر روش‌های رنگ سنجی برای بررسی اصالت زعفران مورد استفاده قرار گیرد (Parastar et al., 2020).

از جنبه دیگری، یافته‌های مربوط به سه غلظت مورد بررسی در پژوهش حاضر نشان می‌دهد که قدرت تفکیک PCAبا غلظت رنگ مصنوعی یکسان نیست. در غلظت ۰/۰۰۱ گرم بر لیتر، جداسازی نمونه شاهد از بخش عمده‌ای از نمونه‌های آلوده مطلوب‌تر بود، در حالی که در غلظت ۰/۰۰۰۵ گرم بر لیتر همپوشانی بیشتری با برخی رنگ‌ها مشاهده شد. این رفتار از نظر تحلیلی منطقی است، زیرا کاهش غلظت رنگ افزوده‌شده می‌تواند باعث کاهش شدت تغییرات رنگی و نزدیک‌تر شدن ویژگی‌های ظاهری نمونه آلوده به نمونه شاهد شود. در چنین شرایطی، کاهش فاصله نمونه‌ها در فضای PCA الزاماً به معنای ناکارآمد بودن روش نیست، بلکه می‌تواند بیانگر نزدیک شدن پاسخ رنگی نمونه آلوده به محدوده تغییرات طبیعی نمونه شاهد باشد.

نتایج مربوط به میانگین دو غلظت نیز این موضوع را تأیید کرد. در این حالت، نمونه زعفران در امتداد PC1 از بیشتر گروه‌های رنگی، به استثنای تارترازین، تفکیک مناسبی نشان داد، اما این تفکیک در PC2 به همان وضوح مشاهده نشد. این نتیجه اهمیت بررسی همزمان چند مؤلفه اصلی را نشان می‌دهد؛ زیرا یک گروه ممکن است در یک مؤلفه به‌خوبی از سایر گروه‌ها جدا شود، اما در مؤلفه دوم همپوشانی داشته باشد. بنابراین، تفسیر PCA باید بر اساس الگوی کلی پراکنش نمونه‌ها در فضای مؤلفه‌های اصلی انجام شود و نباید تنها به یک محور محدود شود.

در مجموع، مقایسه سه روش مورد استفاده در این پژوهش نشان می‌دهد که TLC از نظر جداسازی و شناسایی مستقیم رنگ‌ها مزیت دارد، اسپکتروفتومتری اطلاعاتی درباره تغییرات پاسخ نوری نمونه فراهم می‌کند و PCA امکان ترکیب همزمان اطلاعات چندین شاخص رنگی و نمایش الگوی تفاوت نمونه‌ها را فراهم می‌سازد. بنابراین، PCA را می‌توان در این مطالعه بیشتر به‌عنوان یک ابزار غربالگری و تفکیک اکتشافی در نظر گرفت و نه جایگزینی کامل برای روش‌های تأییدی مانند TLC یا روش‌های دستگاهی پیشرفته. این تمایز اهمیت زیادی دارد، زیرا PCA ذاتاً یک روش اکتشافی برای کاهش ابعاد و نمایش ساختار داده‌هاست و مشاهده خوشه‌های جدا از

هم به‌تنهایی معادل اثبات قطعی هویت یک رنگ خاص نیست.

این موضوع با روند کلی تحقیقات جدید در زمینه اصالت‌سنجی زعفران نیز مطابقت دارد. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که ترکیب روش‌های تحلیلی با رنگ سنجی می‌تواند توانایی تشخیص نمونه‌های تقلبی را افزایش دهد. برای نمونه، استفاده از NIR و MIR همراه با روش‌های رنگ سنجی برای اصالت‌سنجی و تشخیص تقلب زعفران، و همچنین استفاده از روش‌های فلورسانس چندبعدی و الگوریتم‌های رنگ سنجی برای طبقه‌بندی نمونه‌های اصیل و تقلبی، نشان‌دهنده حرکت پژوهش‌های این حوزه به سمت تحلیل چندمتغیره داده‌هاست (Parastar et al., 2021; Chen et al., 2024).

در مورد نتایج تحقیقات مربوط به تحلیل مولفه های اصلی در ارتباط با سایر محصولات غیر از زعفران می توان به موارد زیر اشاره کرد. در سال ۲۰۱۶ در تحقیقی از روش تحلیل مولفه های اصلی، اثر میزان ایزوله پروتئینی ماهی تون و ماهی هداک را بر خصوصیات حسی بخصوص رنگ نوعی ناگت ماهی و مقایسه آن با نمونه حاوی گوشت ۱۰۰درصد ماهی بررسی شد. در تحقیق مذکور مشابه با نتایج این تحقیق قرابت و همپوشانی مقادیر عددی دو مولفه ی انتخاب شده به عنوان ملاکی برای تعیین مقدار بهینه ی ایزوله ی پروتئین مد نظر قرار گرفت (Shaviklo et al., 2016). همچنین طی تحقیق دیگری روش PCA برای بررسی صفات کیفی تخم نژادهای اردک بومی چین انجام شد و در این تحقیق بیان شد دو مولفه اصلی وزن و شاخص شکل تخم مرغ بیشترین درصد از کل پراکندگی را به خود اختصاص داده است (Xue et al., 2013). همچنین از روش تحلیل مولفه های اصلی به عنوان معیاری برای انتخاب مرغ های تخم گذار قهوه ای و سفید بر اساس تعیین متغیرهای توصیفی مانند استحکام، ضخامت پوسته و شاخص آلبومین به عنوان موثرترین پارامترها در ژنوتیپهای مختلف استفاده شده است (Sarica et al., 2011). ذولفقاری و همکاران (Zolfaghari et al., 2022) رنگ مافین کم ساکارز حاوی مالتودکسترین و قاووت بر اساس فضای Lab را بر اساس تحلیل مولفه های اصلی بدست آمده از تغییر مقدار مالتودکسترین و قاووت بررسی کردند. در این تحقیق مقدار بهینه مالتودکسترین و قاووت بر اسا دو مولفه ی اصلی با بیشترین سهم از واریانس کل بدست آمد. حیدری و همکاران (Heydari et al., 2018) مقادیر مختلف گوشت شتر در برگر آن را به عنوان مولفه‌های اصلی در تعیین بهترین خصوصیات بافتی و حسی بررسی کردند که در آن تحقیق از دو مولفه اصلی برای تعیین بهترین فرمول از نظر قرابت و همپوشانی با نمونه‌ی شاهد استفاده گردید. محمدی و همکاران (Mohammadi et al., 2021) بیشترین شفافیت (L*) و زردی (a*) را با روش تحلیل مولفه‌های اصلی بر اساس تغییرات در مقدار چربی و صمغ کنجاک مورد بررسی قرار دادند که از بین ۱۳ حالت متغیرها دو حالت آن به عنوان مولفه‌های اصلی تحت یک رگرسیون خطی مورد استفاده قرار گرفت.

در نهایت، مهم‌ترین دستاورد پژوهش حاضر را می‌توان در نشان دادن ظرفیت رنگ‌سنجی ساده همراه با PCA برای ایجاد تمایز میان زعفران خالص و نمونه‌های حاوی رنگ‌های مصنوعی دانست. برخلاف روش‌های پیشرفته طیف‌سنجی که نیازمند تجهیزات تخصصی هستند، استفاده از شاخص‌های رنگی می‌تواند روشی کم‌هزینه‌تر و سریع‌تر برای غربالگری اولیه باشد. با این حال، وجود همپوشانی میان برخی گروه‌ها، به‌ویژه تارترازین و کینولین، نشان می‌دهد که برای شناسایی قطعی نوع رنگ و تأیید تقلب، استفاده از روش‌های تأییدی مانند TLC یا روش‌های طیف‌سنجی و کروماتوگرافی پیشرفته همچنان ضروری است. بنابراین، پیشنهاد می‌شود کاربرد PCA مبتنی بر رنگ‌سنجی در آینده با تعداد بیشتری از نمونه‌های واقعی بازار، تکرارهای مستقل، دامنه وسیع‌تری از غلظت‌های رنگی و مجموعه بزرگ‌تری از رنگ‌های مصنوعی ارزیابی شود تا حد تشخیص و قابلیت تعمیم این روش با دقت بیشتری مشخص گردد.

نتیجه گیری

در مجموع، نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از شاخص‌های رنگی همراه با تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) می‌تواند به‌عنوان روشی ساده و سریع برای غربالگری تقلبات رنگی زعفران مورد استفاده قرار گیرد. نتایج PCA نشان داد که مؤلفه‌های L* و a* بیشترین سهم را در تغییرپذیری داده‌های رنگی داشتند و در غلظت ۰/۰۰۱ گرم در لیتر، نمونه زعفران خالص تفکیک

مناسب‌تری از نمونه‌های حاوی رنگ‌های مصنوعی نشان داد، در حالی که در غلظت ۰/۰۰۰۵ گرم در لیتر و میانگین دو غلظت، در برخی نمونه‌ها به‌ویژه تارترازین و کینولین یلو همپوشانی مشاهده شد. همچنین، نتایج اسپکتروفتومتری و کروماتوگرافی لایه نازک نشان دادند که نمونه‌های حاوی مخلوط رنگ‌ها الگوهای متمایزی نسبت به زعفران خالص ایجاد می‌کنند. یافته‌های حاضر با مطالعات پیشین درباره کاربرد روش‌های رنگ سنجی در شناسایی و اصالت‌سنجی زعفران همخوانی دارد و نشان می‌دهد که ترکیب داده‌های رنگ‌سنجی با PCA می‌تواند ظرفیت مناسبی برای تشخیص اولیه نمونه‌های مشکوک به تقلب داشته باشد.

منابع

Akbari-Adergani, B., Mohammadzade Moghadam, M., Karimi Noghabi, M., Mohammadpour, M., & Khalilian-Movahhed, M. (2021). Application of computer vision on non-destructive detection of the authentic and adulterated saffron. *Saffron Agronomy and Technology*, *9*(4), 409–429. https://doi.org/10.22048/jsat.2021.299151.1433

Bhooma, V., Nagasathiya, K., Vairamani, M., & Parani, M. (2020). Identification of synthetic dyes magenta III (new fuchsin) and rhodamine B as common adulterants in commercial saffron. *Food Chemistry*, 309, 125793. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125793

Chen, et al. (2024). Rapid detection and quantification of adulteration in saffron by excitation–emission matrix fluorescence combined with multi-way chemometrics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. https://doi.org/10.1002/jsfa.13028

Dehbashi, M. R., Amir, & Kardan Moghadam, H. (2022). Locating and detecting saffron flower using image processing techniques. *Saffron Agronomy and Technology*, *10*(3), 227–260. [in Persian] https://doi.org/10.22048/jsat.2022.290185.1427

Donna Mc., (2007). Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year- old children in the community; a randomised double-blinded, placebo-controlled trial. *The Lancet*;Volume 370, Issue 9598, pages 1560-1567 https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61306-3

Emmanuel Alamu, O., Teeken, B., Ayetigbo, O., Adesokan, M., Kayondo, I., Chijioke, U., ... & Maziya-Dixon, B. (2024). Establishing the linkage between eba's instrumental and sensory descriptive profiles and their correlation with consumer preferences: implications for cassava breeding. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *104*(8), 4573-4585. https://doi.org/10.1002/jsfa.12518

Fallahi, H. R., Aghhavani-Shajari, M., Sabahi-Bajestani, M., Meysamizadeh, M., Ziba, N., Abgarmi, M., ... & Hosseini, S. A. H. (2023). Comparison of Flowering and Color Parameters of Saffron Stigma Obtained from Hydroponic and Open-Field Production Systems. *Journal of Saffron Research*, *11*(1), 94-107. [in Persian] http://dx.doi.org/10.22077/jsr.2023.6170.1209

Fattahi, R., Mani-Varnosfaderani, A., Barzegar, M., & Sahari, M. A. (2023). An ion mobility spectrometry-chemometrics combination approach for assessing adulteration in saffron (Crocus sativus L.) with synthetic colorants. *Industrial Crops and Products*, *193*, 116161. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.116161

Ghodsinya, M., & Reza, S. (2023). Machine vision applications in saffron plant field. *Journal of Saffron Research*, *11*(1), 177–200. [in Persian] http://dx.doi.org/10.22077/jsr.2023.6225.1211

Gomes, A. A., Diniz, P. H. G. D., Fernandes, D. D. S., Ríos-Reina, R., Azcarate, S. M., & Špánik, I. (2025). Digital image-based chemometrics for food analysis: A practical tutorial and roadmap. *Food Chemistry*, 486, 144531. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.144531

Haghighi, B., Feizi, J., & Kakhki, A. H. (2006). Identification of colored styles as one of the saffron adulterations with HPLC. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, *2*(2), 33–44. [in Persian] https://doi.org/10.22067/ifstrj.v2i2.340

Hashemi, S., & Allahverdi, G. (2019). The study of the frequency of dyes used in food products delivered at Fasa restaurants using thin layer chromatography and spectrophotometric methods in 1397. *Journal of Advanced Biomedical Sciences*, *9*(1), 1306–1313.

Heydari, F., Varidi, M. J., Varidi, M., & Mohebbi, M. (2019). Using principal component analysis for evaluation of the camel burger quality. *Iranian Food Science and*

Technology Research Journal, Vol. *14*, No.6, Feb. Mrch. 2019, p. 139-146. [in Persian] https://doi.org/10.22067/ifstrj.v0i0.65293

International Organization for Standardization. (2010). ISO 3632-2:2010: Spices—Saffron (Crocus sativus L.)—Part 2: Test methods. Geneva, Switzerland: ISO.

Jafari, A., Bakhshipour, A., & Hemmatian, R. (2014). Integration of Color Features and Artificial Neural Networks for In-field Recognition of Saffron Flower. *Iran Agricultural Research*, *33*(1), 1-14. [in persian] https://doi.org/10.22099/IAR.2014.2376

Karimi, S., Feizy, J., Mehrjo, F., & Farrokhnia, M. (2016). Detection and quantification of food colorant adulteration in saffron sample using chemometric analysis of FT-IR spectra. *RSC Advances*, *6*, 23085–23093. https://doi.org/10.1039/C5RA25983E

Kiani, S., Minaei, S., & Ghasemi-Varnamkhasti, M. (2017). Integration of computer vision and electronic nose as non-destructive systems for saffron adulteration detection. Computers and Electronics in Agriculture, 141, 46-53. https://doi.org/10.1016/j.compag.2017.06.018

Koocheki, A., & Milani, E. (2020). Saffron adulteration. In Saffron (pp. 321–334). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818638-1.00020-4

Kuno, N., & Mizutani, T. (2005). Influence of synthetic and natural food dyes on activities of CYP2A6, UGT1A6, and UGT2B7. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, Part A, *68*(16), 1431–1444. https://doi.org/10.1080/15287390590956588

León, K., Mery, D., Pedreschi, F., & León, J. (2006). Color measurement in Lab* units from RGB digital images. *Food Research International*, *39*(10), 1084–1091. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.03.006

Masoum, S., Gholami, A., Hemmesi, K., & Abbasi, S. (2015). Quality assessment of the saffron samples using second-order spectrophotometric data assisted by three-way chemometric methods via quantitative analysis of synthetic colorants in adulterated saffron. Spectrochimica Acta Part A: *Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *148*, 389–395. https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.03.135

Meenu, M., Kurade, C., Neelapu, B. C., Kalra, S., Ramaswamy, H. S., & Yu, Y. (2021). A concise review on food quality assessment using digital image processing. *Trends in Food Science & Technology*, *118*, 106–124. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.09.014

Mikkelsen, H., Larsen, J. C., & Tarding, F. (1978). Hypersensitivity reactions to food colours with special reference to the natural colour annatto extract (butter colour). *Archives of Toxicology, Supplement*, *1*, 3–14. https://doi.org/10.1007/978-3-642-66896-8_16

Moghadasi, M., Rahimi, A., & Heshmati, A. (2019). The prevalence of synthetic color in saffron and sweet products (yellow halvah, candy and crystallized sugar) supplied in store of Hamadan City using thin layer chromatography (TLC). *Pajouhan Scientific Journal*, *17*(2), 31–36. [in Persian] https://doi.org/10.29252/psj.17.2.31

Moghiminia, S., Farsi, H., Raissi, H., & Nasseri, M. (2025). The synergetic effect between extracted dyes from stigma and petals of Saffron for sensitizing TiO2 nanoparticles for harvesting the light. *Journal of Saffron Research*, *13*(2), 253-267. [in Persian] https://doi.org/10.22077/jsr.2025.8035.1285

Mohammadi, S. A., Ghods, R. M., Najafi, M. N., & Kashaninejad, M. (2021). Evaluation and comparison of sensory, color, and rheological properties of low-fat cream containing Konjac gum by principal component analysis (PCA) and partial least squares (PLS) regression. [in Persian] https://doi.org/10.22067/ifstrj.v17i1.81470

Ordoudi, S. A., Cagliani, L. R., Melidou, D., Tsimidou, M. Z., & Consonni, R. (2017). Uncovering a challenging case of adulterated commercial saffron. *Food Control*, *81*, 147–155. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.05.046

Parastar, H., Amirvaresi, A., Nikounezhad, N., Amirahmadi, M. & Daraei, B., (2021). Comparison of near-infrared (NIR) and mid-infrared (MIR) spectroscopy based on chemometrics for saffron authentication and adulteration detection. *Food Chemistry*, *344*, 128647. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461461

Sarica, M., Onder, H., & Yamak, U. S. (2012). Determining the most effective variables for egg quality traits of five hen genotypes. *International Journal of Agriculture and Biology*, *14*, 235–240.

Sereshti, H., Poursorkh, Z., Aliakbarzadeh, G., & Zarré, S. (2018). Quality control of saffron and evaluation of potential adulteration by means of thin layer chromatography-image analysis and chemometrics methods. *Food Control*, *90*, 48–57.

https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.02.026

Shaviklo, A. R., Moradinezhad, N., Abolghasemi, S. J., Motamedzadegan, A., Kamali-Damavandi, N., & Rafipour, F. (2016). Product optimization of fish burger containing tuna protein isolates for better sensory quality and frozen storage stability. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, *16*, 923–933. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v16_4_20

Shayegan, M. A., & Saririchi Aboodzadeh, N. (2021). Fish object segmentation in under-water images by using CIE Lab color space. *Machine Vision and Image Processing*, *8*(1), 59–79. [in persian]. https://doi.org/115250

Souza, A. S., Bezerra, M. A., Cerqueira, U. M. F. M., Rodrigues, C. J. O., Santos, B. C., Novaes, C. G., & Almeida, E. R. V. (2024). An introductory review on the application of principal component analysis in the data exploration of the chemical analysis of food samples. *Food Science and Biotechnology*, *33*(6), 1323–1336. https://doi.org/10.1007/s10068-023-01509-5

Tripathi, M., Khanna, S. K., & Das, M. (2007). Surveillance on use of synthetic colours in eatables vis-à-vis Prevention of Food Adulteration Act of India. Food Control, *18*(3), 211–219. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.09.016

Wu, D., & Sun, D.-W. (2013). Colour measurements by computer vision for food quality control – A review. *Trends in Food Science & Technology*, *29*(1), 5–20. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.08.004

Xue, D. B., Zhou, S. J., Bing, Z. J., Li, G. W., Yun, W., & Ying, C. X. (2013). Principal components analysis on egg quality characteristics of native duck breed in China. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, *12*, 1286–1288. https://doi.org/10.3923/javaa.2013.1286.1288

Yama, K. L., & Papadakis, S. E. (2004). A simple digital imaging method for measuring and analyzing color of food surfaces. *Journal of Food Engineering*, *61*, 137–142. https://doi.org/10.1016/S0260-8774(03)00195-X

Zhang, Z., Li, Y., Zhao, S., Qie, M., Bai, L., Gao, Z., Liang, K., & Zhao, Y. (2024). Rapid analysis technologies with chemometrics for food authenticity field: A review. *Current Research in Food Science*, *8*, 100676. https://doi.org/10.1016/j.crfs.2024.100676

Zolfaghari, N., Ataye Salehi, E., & Sheikholeslami, Z. (2023). Application of principal component analysis (PCA) method to study the qualitative and quantitative parameters of muffin with reduced sugar containing maltodextrin and traditional ghavoot. Journal of Food science and technology, *19*(132). [in persian]. https://doi.org/10.22034/FSCT.19.132.211