



بررسی رفتار هالوکرومیک فیلم استات سلولز حاوی شناساگر رنگی بروموتیمول بلو

زهرا آقائی^۱، بهاره عمادزاده^{۲*}، بهروز قرآنی^۲، رسول کدخدایی^۳

۱. دانشجوی دکتری، مهندسی علوم و صنایع غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، مشهد

۲. استادیار، گروه نانوفناوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، مشهد

۳. دانشیار، گروه نانوفناوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، مشهد

(تاریخ دریافت: ۹۵/۶/۱۴، تاریخ پذیرش: ۹۵/۸/۲۲)

چکیده

رشد میکروبی در محصولات غذایی سبب کاهش ماندگاری مواد غذایی و افزایش خطر ابتلا به بیماری‌هایی با منشأ غذایی می‌شود. روش‌های مختلفی برای پایش رشد میکروبی و به تبع آن بروز فساد در محصولات غذایی وجود دارد که از آن جمله می‌توان به طراحی حسگرهای شناساگر فساد اشاره کرد. لذا در تحقیق حاضر به بررسی امکان تولید فیلم استات سلولز دارای معرف رنگی بروموتیمول بلو، به‌عنوان یک حسگر هالوکرومیک پرداخته شده است. از محلول ۴٪ استات سلولز حاوی غلظت‌های رنگ ۰/۵، ۱ و ۱/۵٪ جهت تهیه فیلم‌های شناساگر حساس به pH استفاده شد و رفتار هالوکرومیک فیلم‌های تولید شده با استفاده از بافرهای ۵ تا ۹، طی اندازه‌گیری فاکتورهای رنگ سنجی (a^* ، L^* و b^*) و اختلاف رنگ کلی (ΔE)، بررسی شد. سرعت عکس‌العمل فیلم‌های تولید شده و همچنین میزان تراوش ماده رنگی در pHهای مختلف نیز مطالعه گردید. نتایج این بررسی نشان دهنده تأثیر معنی‌دار غلظت رنگ بر فاکتورهای رنگ سنجی ($P < 0/05$) است. افزایش pH به ترتیب، باعث افزایش ΔE و کاهش فاکتورهای a^* ، L^* و b^* گردید. همچنین مشخص شد که فیلم‌های با غلظت ۱/۵٪ رنگ دارای سرعت پاسخگویی بالاتر و شدت تغییرات رنگی بیش‌تری هستند. از نظر تراوش رنگ نیز اندازه‌گیری‌هایی که توسط دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد، نشان داد که فیلم‌های هالوکرومیک تهیه شده، در آب مقطر و بافرها تراوش نداشتند و پیک جذبی قابل قبولی مشاهده نشد؛ که این ویژگی حسگرها را برای کاربرد در بسته‌بندی مواد غذایی با رطوبت بالا مناسب می‌کند.

واژه‌های کلیدی: بسته‌بندی هوشمند، بروموتیمول بلو، استات سلولز، شناساگر هالوکرومیک، فساد مواد غذایی.

1- مقدمه

ساختار درونی و در نتیجه ایجاد تغییرات رنگی می‌شود. اگر مواد غذایی توسط باکتری‌های تولیدکننده گاز آلوده شوند، بسته‌بندی باد کرده و باعث ایجاد فشار می‌شود؛ این امر سبب کشش فیلم و در نتیجه تغییر در رنگ آن می‌شود [2]. گروه دیگر حسگرهایی هستند که از ترکیب چند رنگ¹ تشکیل شده‌اند. این حسگرها می‌توانند برای محصولات تخمیری مانند کیمچی جهت کنترل درجه تخمیر استفاده شوند [4]. هونگ و پارک امکان کاربرد شناساگرهای رنگی ترکیبی (برموزول پرپل و متیل رد) را در تولید حسگرهای رنگی با استفاده از پلیمر پلی پروپیلن و هیدروکسید کلسیم به‌عنوان جاذب CO₂ ارزیابی کردند. این حسگرها درون بسته‌بندی کیمچی قرار داده شدند. نتایج به‌دست آمده به محققان اجازه داد تا درجه رسیدگی کیمچی را بدون نیاز به باز کردن بسته‌بندی متوجه شوند [5]. در طی فرایند رسیدن کیمچی، اسیدهای آلی تولید می‌شوند و در نتیجه pH کاهش می‌یابد؛ در اثر تغییرات pH، شناساگرهای رنگی به‌کار رفته تغییر رنگ داده و این تغییرات رنگ در واقع سیگنالی هستند که در مورد رسیدگی بیش از حد و کاهش کیفیت کیمچی به مصرف کننده هشدار می‌دهند.

گروه دیگر، حسگرهای فساد-تازگی² محصولات غذایی هستند. این حسگرها درون بسته‌بندی ماده غذایی تعبیه شده و جهت هشدار به مصرف کننده در مورد تغییرات شیمیایی که درون فرآورده رخ داده است طراحی شده‌اند. این حسگرها نسبت به متابولیت‌های خاصی که در اثر فساد فرآورده‌های غذایی تولید می‌شوند حساس هستند [6]. پاکوئیت و همکاران در دو پروژه در سال‌های 2006 و 2007 با استفاده از پلیمر پلی اتیلن ترفتالات و شناساگر برموزول گرین حسگرهایی را جهت کاربرد در بسته بندی‌های هوشمند در نگره‌داری ماهی تولید کردند. این حسگرها در اثر تولید گازهای تری متیل آمین، آمونیاک و دی متیل آمین ناشی از فساد ماهی، تغییر رنگ می‌دهند. آزمون‌هایی که روی ماهی کاد صورت گرفت مشخص کرد که پاسخ حسگر با الگوی رشد میکروبی در نمونه‌های ماهی همبستگی دارد؛ بنابراین می‌توان فساد محصول را در زمان واقعی کنترل نمود [7، 8].

تغییرات دما یکی از فاکتورهای مهم در کیفیت فرآورده‌های

کیفیت مواد غذایی، به لحاظ فسادپذیری، در چرخه بسته‌بندی و توزیع بسیار تغییرپذیر بوده و اغلب با افت همراه است. حفظ کیفیت محصولات غذایی در چرخه تولید تا عرضه الزامی بوده و صرفاً تاریخ انقضای روی بسته‌بندی محصولات نمی‌تواند متضمن حفظ کیفیت و سلامت محصول عرضه شده باشد. در نتیجه، پایش کیفیت در حین بسته‌بندی، حمل و نقل، انبارداری و توزیع امری ضروری است که می‌تواند اطلاعات کافی و مهمی را برای تعیین بهتر کیفیت برای همه از جمله مصرف کننده فراهم نماید. یکی از فناوری‌های در حال ظهور که پتانسیل ایجاد انقلاب در صنعت بسته‌بندی را دارد، استفاده از حسگرها و شناساگرهایی است که رنگ آن‌ها در اثر تغییر ویژگی‌های فرآورده بسته‌بندی شده تغییر می‌کند. یکی از این شناساگرها، مواد هالوکرومیک¹ هستند. ترکیب هالوکرومیک ترکیبی است که با تغییر pH، در آن تغییر رنگ رخ می‌دهد. در واقع کلمه کرومیک به‌عنوان ماده‌ای که می‌تواند رنگ را به صورت برگشت‌پذیر تحت تأثیر عاملی تغییر دهد، تعریف می‌شود و در مورد حسگرهای هالوکرومیک، عامل تغییر رنگ، تغییرات pH است [1].

از دیگر مواد کرومیک می‌توان به مواد ترموکرومیک²، فتوکرومیک³ و الکتروکرومیک⁴ اشاره کرد که به ترتیب در اثر تغییرات دما، تابش نور و کاربرد پتانسیل الکتریکی خواص نوری آن‌ها تغییر می‌کند [2]. از جمله شناساگرهایی که دارای رنگ تغییرپذیر هستند و می‌توانند در بسته‌بندی مواد غذایی به‌کار روند می‌توان به فیلم‌های پلیمری شیری رنگ⁵ ساخته شده توسط دانشمندان دانشگاه ساوث امپتون انگلستان اشاره کرد. این پلیمرها حاوی کریستال‌هایی هستند که از واحدهای تکرارشونده تشکیل شده‌اند، اما اختلاف شدیدی در خواص نوری آن‌ها وجود دارد. این امر سبب می‌شود تا طیف وسیعی از فرکانس‌ها ایجاد شده و باعث تغییرات در نور منعکس شده از این مناطق می‌شود [3]. اگر فیلم‌های انعطاف‌پذیر با استفاده از این پلیمرها ساخته شوند، کشش آن‌ها سبب جهت‌گیری

1. Halochromic
2. Thermochromic
3. Photochromic
4. Electrochromic
5. Polymer opal films

1. Direct Incorporation of Color Indicators
2. Spoilage detectors/freshness indicators

در این مطالعه پاسخ حسگر در دمای یخچال نیز ارزیابی شد، زیرا جمعیت میکروبی و فعالیت میکروبی هر دو به دما بستگی دارند [10].

آگاروال و همکاران با استفاده از پلیمر نایلون 6 و تلفیق پنج رنگ مختلف (فنول رد، متیل رد، بروموتیمول بلو، فنول فتالین و بروموکرزول گرین) با هدف پوشش دامنه وسیع تری از pH موفق به نمایش تغییرات رنگی در دامنه pH از 1 تا 10 شدند (شکل 1). آن‌ها در تولید حسگر خود از روش الکترورسی استفاده نمودند. هم‌چنین نانوحسگرهای تولیدی توسط این محققین برای دوره زمانی طولانی (6 ماه) و در گستره وسیعی از دما، رطوبت و pH مقاوم بودند. تصاویر میکروسکوپ الکترونی از الیاف نانوکامپوزیتی الکترورسی شده به همراه ترکیب رنگی، موفقیت آمیز بودن تشکیل نانو الیاف با قطر 40-50 نانومتر را نشان دادند. مدت زمان ایجاد تغییرات رنگی نیز 3 ثانیه گزارش شد که بسیار سریع می‌باشد [11].

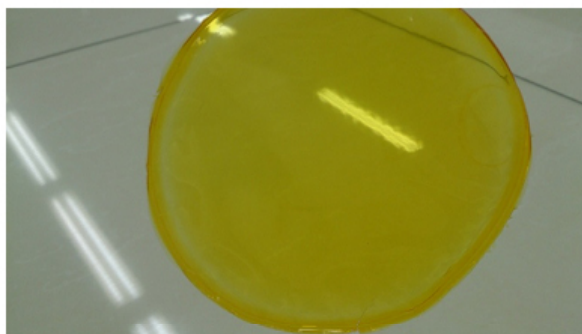
راکچون و همکاران، حسگری را جهت کنترل تازگی گوشت سینه مرغ طراحی کردند. در این تحقیق CO₂ به‌عنوان متابولیت فساد استفاده شد، زیرا در این فراورده درجه فساد با مقدار CO₂ افزایش یافته، ارتباط دارد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که پاسخ حسگر با الگوهای رشد میکروبی همبستگی داشته و بنابراین می‌تواند فساد را در زمان واقعی نشان دهد [12]. زیائو و همکاران، با اضافه کردن نانوذرات اکسید تیتانیوم به پلیمرهای مختلف، فیلم‌های شلاته‌کننده اکسیژن تولید کردند تا در بسته‌بندی مواد غذایی حساس به اکسیداسیون، سطح اکسیژن را در حد پایین حفظ کنند [13]. البته از آنجایی که اکسید تیتانیوم با یک مکانیسم فتوکاتالیک عمل می‌کند، بنابراین مشکل اصلی آن نیاز به نور

فراورده‌های غذایی می‌باشد. اگرچه ماده غذایی در دمای بهینه، جهت ماندگاری طولانی، فراوری، بسته‌بندی و حمل می‌شود، ممکن است کیفیت آن در حین حمل و نقل و انبارداری و قبل از رسیدن به دست مشتری در اثر نوسانات دمایی تغییر کند. جهت اطمینان از این‌که ماده غذایی در شرایط مناسب دمایی نگهداری شده است یا خیر، می‌توان از شناساگرهای زمان-دما¹ در بسته‌بندی ماده غذایی استفاده کرد. در واقع این شناساگرها ابزار کوچکی هستند که از طریق ایجاد تغییر رنگ، توانایی نمایش تغییرات کیفیت محصول را در اثر نوسانات دمایی دارند [6].

گروه دیگر افزودنی‌هایی هستند که جهت ایجاد تغییر رنگ²، به مواد کاربردی در تولید بسته‌بندی اضافه می‌شوند. این تکنولوژی توسط دانشمندان استرالیایی ارائه شده است و در واقع کلاهک‌های هوشمندی هستند که به‌عنوان درپوش قهوه استفاده می‌شوند. درون این کلاهک یک افزودنی وجود دارد که قابلیت تغییر رنگ از قهوه‌ای (هنگامی که قهوه سرد است) به قرمز روشن (هنگامی که قهوه داغ است) را دارد. این افزودنی‌ها ایمن بوده و تأییدیه FDA آمریکا را نیز دارا هستند [9].

در پژوهشی که توسط ناپوینیوانگ و همکاران انجام شد، با استفاده از پلی اتیلن با دانسیته پایین و ترکیب رنگی بروموتیمول بلو و متیل رد، حسگر رنگی حساس به pH، جهت بررسی فساد نوعی دسر نیمه مرطوب تهیه شد. این حسگر به گاز CO₂ حاصل از فعالیت میکروبی حساس بوده و دچار تغییر رنگ شد. طبق نتایج حاصل از این تحقیق، مشخص شد که پاسخ حسگر با رشد میکروبی در نمونه‌ها همبستگی داشته و توانست به سرعت فساد دسر را نشان دهد. علاوه بر این، در این

1. Time - temperature indicators
2. Color Changing Additives



شکل (1) تصویر فیلم استات سلولز دارای 0/5٪ بروموتیمول بلو، تهیه شده به روش قالب ریزی

UVA می‌باشد [14، 15].

پرهیز از مصرف آن‌ها هشدار می‌دهد. نحوه کاربرد این حسگرها به این گونه است که در فضای بالای بسته‌بندی، چسبیده به فیلم بسته‌بندی قرار می‌گیرند و نسبت به وجود گازهایی که در اثر فساد محصولات غذایی تولید می‌شوند، حساس بوده و در اثر واکنش با آن‌ها تغییر رنگ نشان می‌دهند.

2- مواد و روش‌ها

2-1- مواد اولیه

استات سلولز (با وزن مولکولی 30 کیلودالتون و درصد استیل 39/8٪ وزنی-وزنی) و پلی وینیل الکل از شرکت سیگما-آلدریچ (آمریکا)، استون و ان، ان-دی متیل استامید و شناساگرهای فنول رد، فنول فتالئین و بروموتیمول بلو از شرکت مرک (آلمان) خریداری شدند.

2-2- تعیین رنگ هالوکرومیک

جهت انتخاب بهترین رنگ هالوکرومیک که بتواند تغییرات رنگی مطلوبی را ایجاد کند، در آزمایشی به محلول استات سلولز مقدار 0/5٪ وزنی-وزنی از رنگ‌های فنول رد، فنول فتالئین و بروموتیمول بلو (هر کدام جداگانه)، اضافه شد. با توجه به دامنه تغییرات رنگی مشهودتر میان pHهای مختلف در معرف بروموتیمول بلو، این ماده رنگی به‌عنوان شناساگر مورد استفاده در تهیه حسگرها انتخاب شد (جدول 1)؛ زیرا در صورت کاربرد نتایج حاصل از این تحقیق در مبحث بسته‌بندی هوشمند مواد غذایی همچون گوشت، مرغ و ماهی، حسگر هالوکرومیک کاربردی اختلاف رنگ بیش‌تری با محصول خواهد داشت. فنول فتالئین نیز به علت فعالیت در pHهای بالاتر از pH مورد نظر این تحقیق، مناسب نبود.

















بروموتیمول بلو یا بروموتیمول سولفون فتالئین، شناساگر pH برای اسیدها و بازهای ضعیف می‌باشد و اغلب در استخرها و مخازن ماهی برای کنترل pH به کار می‌رود. این شناساگر رنگی در pH زیر 6 به رنگ زرد و در pH بالای 7/6 به رنگ آبی دیده می‌شود. لذا قابلیت پایش فساد در محصولاتی که فساد آن‌ها در این بازه pH و حتی بالاتر رخ می‌دهد را دارا می‌باشد. فرم پروتون‌دار شده بروموتیمول بلو دارای پیک جذبی در 427 نانومتر است. بنابراین نور زرد را در محلول‌های اسیدی منعکس

پیرا و همکاران، یک حسگر زمان-دما بر پایه پلیمرهای PVA/کیتوزان دارای آنتوسیانین طراحی کردند تا به‌طور غیرمستقیم تغییرات کیفیت ماده غذایی را از طریق تغییرات pH محصولات غذایی بسته‌بندی‌شده، در زمانی که در معرض دمای نامناسب انبارداری قرار گرفته‌اند، نشان دهد. در این پژوهش آزمون فعال‌سازی حسگر در شیر انجام شد که این حسگر توانست به‌خوبی تغییرات رنگ را در pHهای مختلف شیر نشان دهد [16].

یوشیدا و همکاران نیز فیلم‌های زیستی هوشمندی را بر پایه کیتوزان و آنتوسیانین جهت کنترل تغییرات pH تهیه کردند. از جمله مزایای فیلم تولیدی آن‌ها، سهولت فرایند تولید، تجزیه پذیر بودن زیستی فیلم و کاربرد ترکیبات طبیعی و سالم بود [17]. در پژوهشی دیگر، سیلوا-پیرا و همکاران، از فیلم ترکیبی کیتوزان/نشاسته ذرت به همراه عصاره استخراج شده از کلم قرمز به‌عنوان شناساگر فساد ماهی استفاده کردند. نتایج حاصل از این تحقیق روی فیلم‌های ماهی نشان داد که سیستم از نظر بصری و ویژگی‌های مورفولوژیکی خوب بوده و نسبت به تغییرات pH بسیار حساس می‌باشد [18].

با وجود تحقیقاتی که توسط محققان بسیاری در زمینه تولید حسگرهای هالوکرومیک صورت گرفته است، تا کنون از استات سلولز¹ به‌عنوان پلیمر در ساخت این حسگرها استفاده نشده است. در این پروژه تحقیقاتی، حسگرهایی به روش قالب‌ریزی، با استفاده از استات سلولز به همراه بروموتیمول بلو، تهیه شد. استات سلولز به علت استحکام و مقاومت به اسید، باز و حرارت و همچنین آب‌گریز بودن و بروموتیمول بلو به این علت که طیف رنگی مناسبی را در محدوده اسیدی ضعیف تا قلیایی ضعیف از خود نشان می‌دهد، برای کاربرد در تحقیق حاضر انتخاب شدند. از آنجایی که محصولاتی مانند ماهی و فراورده‌های آن دارای pH اسیدی ضعیف بوده و در هنگام شروع فساد، شروع به آزاد کردن گازهای آمینه کرده و سبب افزایش pH این مواد غذایی و محیط بسته‌بندی آن‌ها می‌شوند؛ بنابراین اگر چنین حسگرهایی در بسته‌بندی این فراورده‌ها استفاده شود، می‌توان به آسانی تشخیص داد که چه موقع تاریخ مصرف مواد غذایی گذشته است و به مشتریان نسبت به

جدول (1) رفتار هالوکرومیک حسگرهای رنگی در بافرهای 6/5 تا 10

رنگ	6/5	7	7/5	8	9/5	10	گستره pH فعالیت
فنول رد					-	-	1/2-3 و 6/5-8
فنول فتالین							8/3-10
بروموتیمول بلو							6-7/6

این منظور ابتدا محلول 4٪ وزنی-حجمی استات سلولز با حل کردن استات سلولز در حلال تهیه شد که حلال مورد استفاده استون و آن، ان-دی متیل استامید (با نسبت 2:1) بود. سپس به محلول پلیمری تهیه شده، میزان 0/5، 1 و 1/5٪ وزن پلیمر، شناساگر رنگی بروموتیمول بلو و 0/5٪ حجم حلال (وزنی-حجمی) گلیسرول به عنوان پلاستیسیزور اضافه شد و به مدت 24 ساعت در دمای °C 25 روی همزن مغناطیسی قرار گرفت. در مرحله بعد، محلول پلیمری تهیه شده در قالب‌های شیشه‌ای با قطر 9 سانتی‌متر ریخته، قالب‌ها در آن با دمای °C 45 به مدت 24 ساعت قرار داده شده و در نهایت فیلم‌هایی با ضخامت 0/07 mm و وزن 0/04 gr به دست آمد (شکل 2).

جهت انجام آزمون‌ها، فیلم‌های تهیه شده به قطعاتی با اندازه 2x2 cm برش داده شدند. شایان ذکر است که طی آزمون‌های مقدماتی، فیلم‌های با غلظت رنگی 0/1، 0/25، 0/5، 1 و 1/5٪ مورد آزمایش قرار گرفتند ولی به علت عدم پاسخگویی فیلم‌های دارای غلظت رنگی کم‌تر از 0/5٪، غلظت‌های 0/5٪ و بالاتر از آن برای آزمون‌ها انتخاب شدند.

2-5- تهیه محلول‌های بافری

در این تحقیق از بافرهای 5، 6، 7، 8 و 9 (اسیدی ضعیف تا قلیایی ضعیف) استفاده شد (جدول 2). دامنه pH مورد بررسی به گونه‌ای انتخاب شد که حسگر طراحی شده قابلیت پایش فساد در محصولات غذایی دارای pH اسیدی ضعیف را داشته باشد.

2-6- بررسی رفتار هالوکرومیک و کنترل رنگ حسگرها

براساس مدل‌های رنگی

فضای رنگی L^* ، a^* و b^* مدلی است که در سال 1976 توسط کمیسیون بین‌المللی روشنایی نور (CIE) جهت توصیف

می‌کند. فرم دپروتونه آن دارای پیک جذبی در 602 نانومتر است، بنابراین رنگ آبی را در بیش‌تر محلول‌های بازی منعکس می‌کند [19].

2-3- تعیین پلیمر مناسب

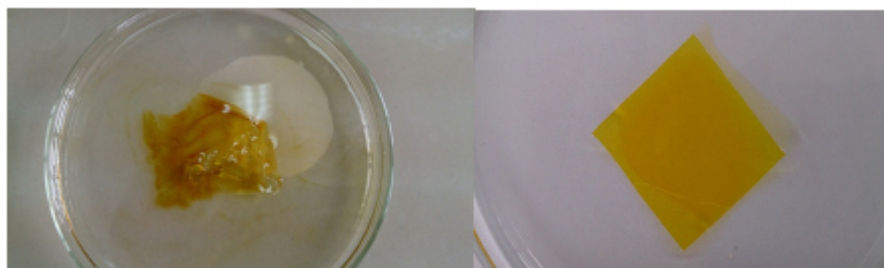
پلیمرهای پیشنهادی جهت استفاده در این تحقیق استات سلولز و پلی وینیل الکل بودند که طبق آزمون‌های مقدماتی مشخص شد فیلم‌های پلی وینیل الکل تهیه شده، برخلاف انتظار در آب (در دمای محیط) حل می‌شوند، به این دلیل نامناسب بودند (شکل 2) ولی استات سلولز بسیار مناسب بوده و در واقع آب‌گریزی، مقاومت به اسید و باز، مقاومت در برابر حرارت، استحکام مناسب و مقرون به صرفه بودن آن، موجب استفاده از این پلیمر شد. استات سلولز دارای کاربردهای پزشکی و صنایع غذایی می‌باشد. از جمله کاربردهای آن در صنایع غذایی می‌توان به تولید حسگرهای زیستی، غشاهای اولترافیلتراسیون و اسمز معکوس و همچنین ترکیب با باکتریوفاژها جهت تولید بسته‌بندی‌های ضد میکروبی و ترکیب با آلبومین تخم مرغ جهت تولید الیاف خوراکی اشاره کرد. در این تحقیق از غلظت 4٪ وزنی-حجمی استات سلولز جهت تولید فیلم استفاده شد که دلیل انتخاب این غلظت، گرانروی مناسب نمونه‌ها جهت ریختن درون قالب و در نهایت، تولید فیلم‌های یکنواخت‌تر بود. بر اساس آزمون‌های مقدماتی مشاهده شد که در غلظت‌های کم‌تر از 4٪، به علت رقیق شدن زیاد، فیلم‌های بسیار نازکی به دست می‌آید و در غلظت‌های بالاتر از 4٪ به علت گرانروی زیاد، قابلیت ریخته شدن در قالب‌ها کم شده و همچنین فیلم‌های ضخیم و غیریکنواختی به دست می‌آید.

2-4- تهیه فیلم‌های استات سلولز رنگی

فیلم‌های هالوکرومیک به روش قالب‌ریزی تهیه شدند. برای

جدول (2) ترکیبات سیستم بافری استفاده شده برای هر pH

ترکیبات	pH بافر
پتاسیم هیدروژن فتالات + بی‌کربنات سدیم	5
سدیم فسفات مونوبازیک + سدیم فسفات دی‌بازیک	6
سدیم فسفات مونوبازیک + سدیم فسفات دی‌بازیک	7
تریس + اسید کلریدریک	8
تریس + اسید کلریدریک	9



شکل (2) تصویر حل شدن فیلم پلی‌وینیل الکل در آب مقطر، تصویر اولیه فیلم (سمت راست)، تصویر فیلم پس از چند ثانیه (سمت چپ)

روابط بین رنگ‌های قابل مشاهده توسط چشم تأیید شد، که در آن L^* بیانگر روشنایی رنگ (بین 0 تا 100)، a^* (+ قرمز، - سبزی) و b^* (+ زرد، - آبی رنگ) بین -120 تا +120 می‌باشند و در تحقیقات علمی از آن‌ها استفاده می‌شود [20].

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}} \quad (1)$$

$$\Delta L^* = L_{sa}^* - L_{st}^*$$

$$\Delta a^* = a_{sa}^* - a_{st}^*$$

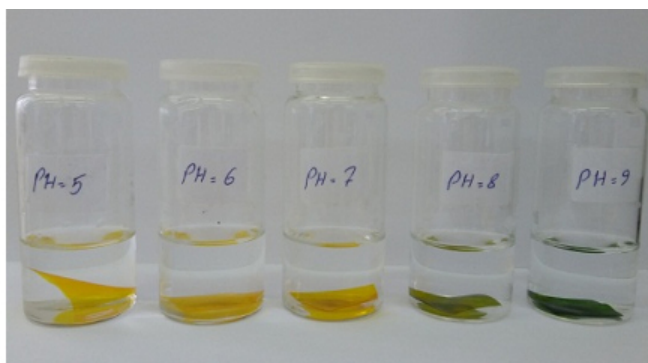
$$\Delta b^* = b_{sa}^* - b_{st}^*$$

که ΔE اختلاف رنگ کلی، ΔL^* تغییرات روشنایی، Δa^* تغییرات قرمزی (قرمز-سبز)، Δb^* تغییرات زردی (زرد-آبی)، L_{sa}^* روشنایی نمونه تیمار شده، L_{st}^* روشنایی نمونه شاهد، a_{sa}^* قرمزی نمونه تیمار شده، a_{st}^* قرمزی نمونه شاهد، b_{sa}^* زردی نمونه تیمار شده و b_{st}^* زردی نمونه شاهد است.

2-7- مدت زمان بروز حساسیت به محیط

مدت زمان بروز حساسیت به محیط یا به عبارت دیگر زمان پاسخگویی حسگرهای هالوکرومیک به تغییرات pH بررسی شد. برای این منظور، قطعات مساوی از فیلم‌های تولیدی، در میزان 10 میلی‌لیتر از هر یک از بافرهای 5 تا 9 قرار گرفتند و بلافاصله پس از قرارگیری نمونه در بافر، زمان مشاهده اولین

عکس گرفته شد. عکسبرداری توسط اسکنر از جمله روش‌هایی است که به دلیل کنترل بهتر و بیش‌تر شرایط نورپردازی در مقایسه با دوربین، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در کلیه آزمون‌ها یک قطعه فیلم هالوکرومیک بدون انجام تیمار pH روی آن، به‌عنوان نمونه شاهد به‌کار رفت. تصاویر تهیه شده با فرمت JPG ذخیره شدند. جهت مقایسه و کنترل تغییرات رنگی حسگرها بر اساس تغییرات pH، مؤلفه‌های تغییرات رنگی حسگرها در محلول‌های بافر، با استفاده از نرم افزار Image J 1.42 در سیستم رنگی CIE محاسبه و تغییرات ΔE^* و همچنین مقادیر فاکتورهای رنگ‌سنجی L^* ، a^* و b^* به‌صورت نمودارهایی نسبت به تغییرات pH برای هر یک از



شکل (3) تغییرات رنگ در فیلم‌های هالوکرومیک استات سلولز دارای 1/5٪ بروموتیمول بلو در محلول‌های بافری

تغییر رنگ بصری (بر اساس دقیقه) ثبت گردید.

pHهای مختلف در جدول‌های 4-الف، 4-ب و 4-ج آورده شده است. نتایج نشان داد که در صورت افزایش pH، اختلاف رنگ کلی نیز افزایش و فاکتورهای a^* ، L^* و b^* کاهش می‌یابند. در واقع کاهش فاکتور L^* نشان دهنده تمایل حسگر به سمت تیرگی، کاهش a^* نشان از تمایل به رنگ سبز و کاهش b^* نشان از تمایل به رنگ آبی دارد که این موضوع نیز با کاربرد بروموتیمول بلو به عنوان شناساگر انتظار می‌رفت (شکل 4).

فیلم تولیدی استات سلولز به عنوان یک حسگر هالوکرومیک، خود دارای pH اسیدی ضعیف 6/4 و در نتیجه به رنگ زرد می‌باشد. با غوطه‌وری فیلم در pH برابر 5 و 6 به همان رنگ زرد باقی ماند؛ در pH خنثی به رنگ سبز روشن، در pH برابر 8 به رنگ سبز زیتونی و در pH برابر 9 به رنگ سبز بسیار تیره درآمدند. روشنایی (L^*) فیلم‌های استات سلولز- بروموتیمول بلو به صورت تابعی از pH تغییر کرد (شکل 4). در هر غلظت رنگ (0/5، 1 و 1/5٪) کم‌ترین مقدار L^* برای pH برابر 9 ثبت شد که نشان می‌دهد فیلم در این pH نسبت به بقیه، تمایل به تیرگی دارد. هم‌چنین کم‌ترین مقدار L^* در pH برابر 9 برای فیلم‌های با غلظت 1/5٪ بروموتیمول بلو است که نشان دهنده کاهش روشنایی فیلم‌ها در اثر افزایش غلظت رنگ می‌باشد.

تغییرات مقادیر a^* و b^* نشان می‌دهد که رنگ فیلم‌ها به صورت معنی‌داری به عنوان تابعی از pH تغییر کرده‌اند (جدول‌های 4-الف، 4-ب و 4-ج). در غلظت‌های 1 و 1/5٪ بروموتیمول بلو در pH= 5-7 فاکتور a^* مثبت می‌باشد و با افزایش pH به 8 و 9 و ورود به pH بازی، این فاکتور منفی شده است که نشان‌دهنده تمایل شدن رنگ فیلم به سبز است. در غلظت 0/5٪ بروموتیمول بلو، فاکتور a^* در نمونه شاهد و

2-8- تراوش رنگ در آب مقطر و بافرهای 5 تا 9

0/012 گرم از نمونه فیلم در 10 میلی‌لیتر آب دیونیزه به مدت 24 ساعت قرار داده شد. سپس جذب محلول آبی با رنگ منتشر شده در طول موج 400-700 nm توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل UV-160A SHIMADZU، با استفاده از سل کوارتز 1 سانتی‌متر قرائت شد [1]. هم‌چنین، 0/012 گرم نمونه در 10 ml از هر بافر قرار داده شد [11] و سپس جذب محلول پس از 30 دقیقه توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج‌های 427 و 602 nm قرائت گردید.

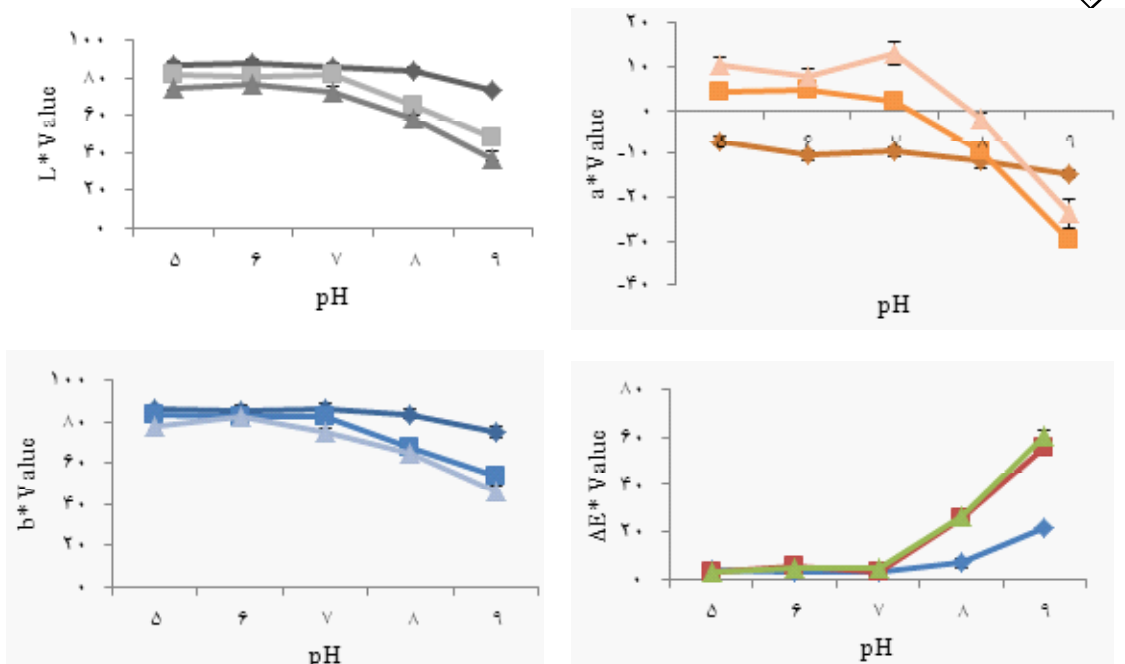
2-9- تجزیه و تحلیل آماری

آزمون‌ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شدند و با استفاده از نرم‌افزار SAS 9، تأثیر غلظت رنگ و pH بر فاکتورهای رنگ سنجی L^* ، a^* و b^* و ΔE بررسی و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن با سطح احتمال 0/05 انجام شد.

3-نتایج و بحث

3-1- رفتار هالوکرومیک حسگرهای رنگی

طبق نتایج حاصل از این تحقیق، مشخص شد که غلظت رنگ و pH و هم‌چنین اثر متقابل این دو تیمار بر فاکتورهای رنگ سنجی اثر معنی‌دار ($p < 0/05$) دارند (جدول 3). نتایج مقایسه میانگین فاکتورهای رنگ سنجی (L^* ، a^* و b^*) و ΔE برای حسگرهای هالوکرومیک در غلظت‌های مختلف بروموتیمول بلو و



شکل (4) تأثیر pH و غلظت رنگ بر فاکتورهای رنگ سنجی L^* ، a^* و b^* و ΔE برای فیلم‌های استات سلولز دارای غلظت‌های 0/5 (◆)، 1 (■) و 1/5 (▲) بروموتیمول بلو.

جدول (3) تحلیل واریانس تأثیر غلظت بروموتیمول بلو و pH بر فاکتورهای رنگ‌سنجی L^* ، a^* ، b^* و ΔE حسگرهای هالوکرومیک

میانگین مربعات				درجه آزادی	منابع تغییر
ΔE^*	b^*	a^*	L^*		
682/75**	757/35**	527/46**	1510/07**	2	غلظت بروموتیمول بلو
3073/84**	1023/53**	1026/92**	1356/25**	4	pH
268/63**	100/65**	155/36**	110/23**	8	غلظت بروموتیمول بلو × pH
1/86	6/54	2/73	5/56	30	اشتباه آزمایش
8/88	3/39	-32/23	3/23		ضریب تغییرات (درصد)

* و ** به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد

آنالیز مشابهی نیز برای فاکتور b^* انجام شد که نشان می‌دهد زمانی که مقادیر آن مثبت باشد رنگ متمایل به زرد و در مقادیر منفی، رنگ متمایل به آبی خواهد شد. همان‌طور که مشاهده می‌شود در کلیه غلظت‌های رنگی، با افزایش pH میزان فاکتور b^* با این‌که مثبت باقی مانده است ولی روند کاهشی داشته و این نشان می‌دهد که با افزایش pH از شدت رنگ زرد کاسته شده و رنگ فیلم اندکی به آبی متمایل شده است. جهت مقایسه رنگ‌سنجی نمونه‌ها از فاکتور اختلاف رنگ

نمونه‌های تیمار شده در کلیه pHها منفی است و در pH برابر 8 و 9 کم‌ترین مقدار خود را نشان می‌دهد. علت منفی بودن a^* در تمام pHها در غلظت 0/5 بروموتیمول بلو، کم بودن غلظت رنگ می‌باشد، به طوری که مقدار این فاکتور برای نمونه شاهد این غلظت رنگ -11/9 بود و با افزایش غلظت رنگ به 1 و 1/5 میزان این فاکتور به ترتیب به 0/77 و 12/95 افزایش یافت که نشان می‌دهد با افزایش غلظت رنگ میزان قرمزی فیلم‌های شاهد افزایش یافته است.

جدول (4-الف) مقایسه میانگین تأثیر pH (در پنج سطح) بر فاکتورهای رنگ سنجی ΔE^* ، a^* ، b^* و L^* حسگرهای هالوکرومیک با غلظت 0/5٪ پروموتیمول بلو

تیمار	میانگین			
pH	L^*	a^*	b^*	ΔE^*
5	86/65 ^{ab}	-7/23 ^a	85/77 ^a	4/15 ^c
6	88/38 ^a	-10/45 ^b	85/63 ^a	2/56 ^c
7	86/25 ^{ab}	-9/58 ^b	85/78 ^a	3/12 ^c
8	83/41 ^b	-11/77 ^b	83/70 ^a	6/70 ^b
9	73/53 ^c	-14/86 ^c	75/21 ^b	21/53 ^a

* در هر ستون، اعدادی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی داری با همدیگر ندارند.

جدول (4-ب) مقایسه میانگین تأثیر pH (در پنج سطح) بر فاکتورهای رنگ سنجی ΔE^* ، a^* ، b^* و L^* حسگرهای هالوکرومیک با غلظت 1٪ پروموتیمول بلو

تیمار	میانگین			
pH	L^*	a^*	b^*	ΔE^*
5	81/84 ^a	4/33 ^a	83/82 ^a	3/33 ^{cd}
6	80/99 ^a	4/56 ^a	82/18 ^a	5/13 ^c
7	81/35 ^a	2 ^b	82/56 ^a	3/01 ^d
8	64/88 ^b	-9/40 ^c	67/37 ^b	25/95 ^b
9	47/96 ^c	-29/72 ^d	53/51 ^c	55/66 ^a

* در هر ستون، اعدادی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی داری با همدیگر ندارند.

جدول (4-ج) مقایسه میانگین تأثیر pH (در پنج سطح) بر فاکتورهای رنگ سنجی ΔE^* ، a^* ، b^* و L^* حسگرهای هالوکرومیک با غلظت 1/5٪ پروموتیمول بلو

تیمار	میانگین			
pH	L^*	a^*	b^*	ΔE^*
5	74/38 ^a	10/29 ^{ab}	77/98 ^{ab}	3/09 ^c
6	77/09 ^a	7/54 ^b	82/61 ^a	4/71 ^c
7	73 ^a	13/06 ^a	74/78 ^b	4/35 ^c
8	57/77 ^b	-1/90 ^c	65/11 ^c	26/32 ^b
9	36/51 ^c	-23/75 ^d	45/86 ^d	60/90 ^a

* در هر ستون، اعدادی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی داری با همدیگر ندارند.

(ΔE^*) استفاده شد. جهت توصیف اختلاف رنگ در معنی است که رنگ قابل تشخیص است ولی اگر بیش از 12 فضای رنگی CIELAB استفاده می شود و در واقع عددی است که فاصله بین دو رنگ را نشان می دهد. با توجه به معادله 1 مشخص می شود که ΔE^* ، اختلاف رنگ کلی (از نظر هر سه فاکتور L^* ، a^* و b^*) را بین نمونه شاهد و نمونه تیمار شده بیان می کند. در صورتی که مقدار ΔE^* بیش تر از 5 باشد، بدین

معنی است که رنگ قابل تشخیص است ولی اگر بیش از 12 باشد یعنی رنگ کاملاً به فضای دیگری تعلق دارد [22]. طبق نتایجی که در شکل (2) و جدول (1) نشان داده شده است، مشاهده می شود که با افزایش pH و غلظت رنگ، اختلاف رنگ (ΔE^*) نیز افزایش می یابد؛ یعنی هر چه فیلم در بافر با pH بالاتری قرار گیرد رنگ آن با نمونه شاهد اختلاف بیش تری

کنیم، هم شدت رنگ‌ها و هم سرعت پاسخگویی حسگر به تغییرات pH افزایش می‌یابد. در pHهای 5 و 6 به این علت که تغییر رنگ بصری نداشته‌ایم، زمانی گزارش نشده است. همچنین در بافر 7، مدت زمان بروز حساسیت در کلیه غلظت‌های رنگ بسیار بالا بوده است که این مسئله در مورد مواد غذایی که فساد آن‌ها در این pH رخ می‌دهد، به این دلیل که حسگر به تغییر pH حاصل از فساد دیر پاسخ می‌دهد، مناسب نیست و لذا درصد بالاتری از رنگ پیشنهاد می‌شود.

3-3- نتایج تراوش رنگ در آب مقطر و بافرها

طبق اندازه‌گیری‌هایی که توسط دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد، فیلم‌های هالوکرومیک تهیه شده، در آب مقطر و بافرها تراوش نداشتند و پیک جذبی قابل قبولی مشاهده نشد. از آنجایی که این حسگرها جهت کاربرد در بسته‌بندی مواد غذایی در حال بررسی هستند، لذا باید به بحث آگریز بودن و کاهش هرچه بیشتر تراوش آن‌ها در محیط آبی و مرطوب نیز توجه شود تا در صورت قرار گرفتن بسته‌بندی دارای این حسگرها در معرض آب، حسگر تولید شده ویژگی هالوکرومیک خود را از دست ندهد.

4- نتیجه‌گیری

سیستم بسته‌بندی دارای حسگرهای هوشمند هالوکرومیک، اساساً جهت فرآورده‌هایی که طی فساد pH آن‌ها تغییر می‌کند، کاربرد دارد. نتایج این بررسی نشان دهنده تأثیر معنی‌دار غلظت رنگ بر فاکتورهای رنگ سنجی ($P < 0/05$) است. افزایش pH باعث افزایش ΔE و کاهش فاکتورهای

دارد که این موضوع نیز در فیلم‌های غوطه‌وری در بافرها به وضوح مشاهده گردید. با افزایش غلظت رنگ، از آنجایی که میزان رنگ بیش‌تری در معرض محلول بافری قرار می‌گیرد، لذا شدت رنگ افزایش و ΔE^* نیز افزایش می‌یابد.

نتایج رنگ سنجی این تحقیق، با نتایج پیرا و همکاران مبنی بر امکان استفاده از یک شناساگر مناسب pH، برای پایش تغییرات pH بر مبنای تغییرات رنگی، مطابقت داشت. در این بررسی، از عصاره کلم قرمز (حاوی آنتوسیانین) به‌عنوان رنگ هالوکرومیک استفاده شد و با افزایش pH هر سه فاکتور a^* ، L^* و b^* کاهش یافتند. همچنین نتایج حاصله با نتایج یوشیدا و همکاران که حسگری بر پایه‌ی کیتوزان-آنتوسیانین جهت کنترل تغییرات pH ساخته بودند، مطابقت داشت. در پژوهش این محققان در گستره pH برابر 5/6 تا 8 که مشابه گستره pH کاربردی در تحقیق حاضر است، با افزایش pH اختلاف رنگ کلی (ΔE^*) نیز افزایش و سایر فاکتورهای رنگی کاهش یافتند.

3-2- مدت زمان بروز حساسیت به محیط

یکی از فاکتورهای مهم در طراحی حسگرها، سرعت پاسخ آن‌ها به تغییرات محیطی است، زیرا هرچه سرعت تغییر رنگ حسگر بیش‌تر باشد، فساد احتمالی روی داده در محصول غذایی سریع‌تر پایش شده و از مصرف آن ممانعت به عمل می‌آید. طبق نتایجی که در جدول (5) آورده شده است، با افزایش غلظت رنگ، مدت زمان بروز حساسیت کاهش یافته است؛ به‌طوری که کم‌ترین زمان برای فیلم‌های با غلظت 1/5٪ ثبت گردیده است و در واقع هرچه از غلظت رنگ بیش‌تری استفاده

جدول (5) مدت زمان بروز حساسیت (برحسب دقیقه) فیلم‌های هالوکرومیک استات سلولزدارای 0/5، 1 و 1/5٪ رنگ بروموتیمول بلو به تغییرات pH

غلظت رنگ		pH
1/5	1	
-	-	5
-	-	6
245	435	7
8/8	14/3	65/7
2/3	3/7	22/7

گسترده‌تر در زمینه بسته‌بندی هوشمند در کشور تا بتوانیم کیفیت مواد غذایی را به صورت مناسب‌تری کنترل نماییم. در واقع این حسگرها را می‌توان به عنوان نوعی بارکد در بسته‌بندی فرآورده‌های مختلف غذایی که فساد آن‌ها همراه با تولید گاز و تغییر pH فضای بسته‌بندی است به کار برد. در پایان، شایان ذکر است که انجام تحقیقات بیشتر در این حوزه، امکان ارائه دانش فنی تولید بسته‌بندی‌های هوشمند به صنایع داخلی را فراهم خواهد کرد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان لازم می‌دانند از راهنمایی‌ها و همکاری صمیمانه جناب آقای دکتر عادل بیک بابایی کمال سپاس و تشکر را داشته باشند.

L، a و b* گردید. همچنین مشخص شد که فیلم‌های با غلظت 1/5٪ رنگ با سرعت پاسخگویی 245، 8/8 و 2/3 دقیقه، به ترتیب برای بافرهای با pH برابر 7، 8 و 9، دارای سرعت پاسخگویی بالاتر و شدت تغییرات رنگی بیش‌تری هستند و قابلیت استفاده به عنوان حسگر رنگی جهت پایش فساد ماده غذایی را دارند؛ اما از آن جایی که در بافر 7، درکل سرعت پاسخگویی ضعیف بوده است، لذا استفاده از غلظت‌های بالاتر ترکیب رنگی پیشنهاد می‌شود. از نظر تراوش رنگ نیز بررسی‌ها نشان داد که فیلم‌های هالوکرومیک تهیه شده، در آب مقطر و بافرها تراوش نداشته و پیک جذبی قابل قبولی نشان ندادند. این ویژگی، حسگرهای تولید شده را برای کاربرد در بسته‌بندی مواد غذایی با رطوبت بالا مناسب می‌کند. پژوهش حاضر مقدمه‌ای بود جهت تحقیقات بیش‌تر و

منابع

- 255-257.
- [6] De Johng, A.R., Boumans, H., Slaghek, J., Van Veen, J., Rijk, R., Van Zandvoort, M. (2005). Active and intelligent packaging for food: Is it the future. *Food Addit. Contam.*, 22, 975 – 979.
- [7] Pacquit, A., Lau, K.T., McLaughlin, H., Frisby, J., Quilty, B., Diamond, D. (2006). Development of a volatile amine sensor for the monitoring of fish spoilage. *Talanta*, 69, 515–520.
- [8] Pacquit, A., Frisby, J., Diamond, D., Tong Lau, K., Farrell, A., Quilty, B., Diamond D. (2007). Development of a smart packaging for the monitoring of fish spoilage. *Food Chem.*, 102, 466-470.
- [9] Smart Lid Systems. (2008). Color Changing Disposable Beverage Lids. www.smartlidsystems.com
- [10] Nopwinyuwong, A., Trevanich, S., Suppakul, P. (2010). Development of a novel colorimetric indicator label for monitoring freshness of intermediate-moisture
- [1] Van der Schueren, L., De Meyer, T., Steyaert, I., Ceylan, Ö., Hemelsoet, K., Van Speybroeck, V., De Clerck, K. (2013). Polycaprolactone and polycaprolactone/chitosan nanofibres functionalised with the pH-sensitive dye Nitrazine Yellow. *Carbohydr. Polym.*, 91 (1), 284-293.
- [2] Feliciano, L. (2009). Color Changing Plastics for Food Packaging. Ohio State University, Columbus, Ohio. pp: 1-13.
- [3] Science Daily. (2007). New color-changing technology has potential packaging, Military, Aerospace Applications. <http://www.sciencedaily.com/releases/2007/07/070723163522.htm>
- [4] Hong, S.I. (2002). Gravure-printed color indicators for monitoring kimchi fermentation as a novel intelligent packaging. *Packag. Technol. Sci*, 15, 155-160.
- [5] Hong, S.I., Park, W.S. (1999). Development of color indicators for kimchi packaging. *J. Food Sci.*, 64,

- International Nano Letters, 2 (16), 3.
- [20] Hunter Lab. (2001). The basic of color perception and measurement. Hunter Associates Laboratory. <http://www.hunterlab.com/pdf/color>.
- [21] Hunter Lab. (2008). CIELAB color space, Application Notes, 8 (7): 1-4.
- [22] Tassanawat, S., Phandee, A., Magaraphan, R., Nithitanakul, M., Manuspiya, H. (2007). pH-sensitive PP/clay nanocomposites for beverage smart packaging, in: Proceedings of the 2nd IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems. 1-10 .
- dessert spoilage. *Talanta*, 81, 1126–1132.
- [11] Agarwal, A., Raheja, A., Natarajanb, T.S., Chandra, T. S. (2012). Development of universal pH sensing electrospun nanofibers. *Sensors Actuat. B-Chem.*, 161, 1097– 1101.
- [12] Rukchon, C., Nopwinyuwong, A., Trevanich, S., Jinkarn, T., Suppakul, P. (2014). Development of a food spoilage indicator for monitoring freshness of skinless chicken breast. *Talanta*, 130, 547-554.
- [13] Xiao-e, L., Green, A.N.M., Haque, S.A., Mills, A., Durrant, J.R. (2004). Light-driven oxygen scavenging by titania/polymer nanocomposite films. *Photochem. Photobiol.*, 162, 253–259.
- [14] Mills, A., Doyle, G., Peiro, A. M., Durrant, J. (2006). Demonstration of a novel, flexible, photocatalytic oxygen-scavenging polymer film. *Photochem. Photobiol.*, 177, 328–331.
- [15] Azeredo, H. M.C. (2009). Nanocomposites for food packaging applications, review. *Food Res. Int.*, 42, 1240–1253.
- [16] Pereira , V.A., Arruda , I.N.Q., Stefani, R. (2015). Active chitosan/PVAfilms with anthocyanins from Brassica oleraceae (Red Cabbage) as Time-Temperature Indicators for application in intelligent food packaging. *Food Hydrocolloid.*, 43, 180-188.
- [17] Yoshida, C.M.P., Maciel, V.B.V., Mendonça, M.E.D., Franco, T.T. (2014). Chitosan biobased and intelligent films: monitoring pH variations. *Food Sci Technol-LWT*, 55(1), 83-89.
- [18] Silva-Pereira, M.C., Teixeira, J.A., Pereira-Júnior, V.A., Stefani, R. (2015). Chitosan/corn starch blend films with extract from Brassica oleraceae (red cabbage) as a visual indicator of fish deterioration. *Food Sci. Technol-LWT*, 61, 258-262.
- [19] Nahhal, I.E. (2012). Thin film optical BTB pH sensors using sol–gel method in presence of surfactants.