

# توانایی روش‌های کالبراسیون چندمتغیره در تشخیص ترکیبات موثر در فعالیت ضداکسیدانی گیاهان دارویی با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی - طیف‌سنجی جرمی

سعید معصوم\* و نرجس قاسمی  
دانشکده شیمی، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۹/۳۰

تاریخ تصحیح: ۹۴/۰۹/۱۱

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۸/۲۰

## چکیده

آویشن و زنیان از جمله گیاهان دارویی معروف در دنیا هستند که به‌عنوان ضداکسیدان، ضد میکروب، ضد عفونی‌کننده و ضد سرطان استفاده می‌شوند. هدف از این پژوهش تعیین پتانسیل ضداکسیدانی ترکیبات در اسانس‌های آویشن و زنیان می‌باشد. برای این منظور کروماتوگرام‌های به‌دست آمده و فعالیت ضداکسیدانی اسانس‌ها مورد استفاده قرار گرفت. فعالیت ضداکسیدانی اسانس‌ها با استفاده از روش به‌دام‌اندازی رادیکال‌های ۲، ۲- دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH) اندازه‌گیری شد. از تلفیق کروماتوگرام‌های حاصل از کروماتوگرافی گازی و داده‌های به‌دست آمده از خواص ضداکسیدانی با روش‌های کمومتریک می‌توان پیک‌های ایجادکننده خاصیت ضداکسیدانی را شناسایی کرد. برای این منظور روش‌های رگرسیون جزء اصلی و رگرسیون جزء مستقل با پیش‌پردازش‌های متفاوت روی کروماتوگرام‌های آویشن و زنیان اجرا شد. نتایج حاصل از این روش‌ها به‌صورت نمودارهای رگرسیون نمایش داده شدند که در آن‌ها پیک‌های ایجادکننده خاصیت ضداکسیدانی دارای ضریب رگرسیون منفی هستند. در نهایت برای مشخص کردن ساختار شیمیایی ترکیبات شناخته شده در فعالیت ضداکسیدانی، از روش کروماتوگرافی گازی - طیف‌سنج جرمی استفاده شد.

**واژگان کلیدی:** آویشن، زنیان، خاصیت ضداکسیدانی، کروماتوگرافی گازی - طیف‌سنجی جرمی، روش‌های کالبراسیون چندمتغیره

## ۱- مقدمه

گیاهان دارویی از ارزش و اهمیت خاصی در تامین بهداشت و سلامتی جوامع برخوردار هستند. کشف ویژگی‌های درمانی گیاهان می‌تواند ناشی از نوعی غریزه انسانی باشد، زیرا انسان‌های اولیه از گیاهان به‌عنوان غذا و دارو استفاده می‌کردند و در این راستا به مرور زمان و در اثر آزمایش و خطا موفق به کشف برخی ویژگی‌ها در بعضی از گیاهان شدند و براساس این گونه ویژگی‌ها، گیاهان را شناسایی و طبقه‌بندی کردند. با ظهور داروهای شیمیایی و بیولوژیک، نقش و اهمیت گیاهان دارویی در تأمین سلامت بشر، در معرض فراموشی قرار گرفت و باعث شد بسیاری از مردم به‌هنگام بیماری به داروهای شیمیایی روی آورند. این در حالی است که گیاهان دارویی به دلیل ماهیت طبیعی و وجود ترکیبات همولوگ دارویی در کنار هم، با بدن سازگاری بهتری دارند و معمولاً فاقد عوارض ناخواسته هستند. خوش‌بختانه گرایش عمومی جامعه به استفاده از داروها و

درمان‌های گیاهی و به‌طور کلی فرآورده‌های طبیعی به ویژه در طی سال‌های اخیر روبه افزایش بوده و از مهم‌ترین علت‌های آن می‌توان به اثبات اثرات مخرب و جانبی داروهای شیمیایی از یک طرف و ایجاد آلودگی‌های زیست محیطی که کره زمین را تهدید می‌کند از سوی دیگر اشاره کرد.

گیاهان دارویی حاوی محدوده وسیع و متنوعی از انواع ترکیبات مختلف با اثرات متفاوت می‌باشند که برخی از این ترکیبات اثرات مورد نظر درمانی را ایجاد می‌نمایند و برخی هم سبب بروز عوارض جانبی نامطلوب می‌گردند. بنابراین آن‌چه که در ابتدا بسیار حائز اهمیت است شناسایی ماده موثره‌ای است که اثر درمانی مورد نظر را ایجاد می‌نماید. این ماده موثره که در اسانس و یا عصاره گیاه وجود دارد باید از سایر ترکیبات موجود در گیاه و از اندام مورد نظر جداسازی و استخراج شود [۱].

پس از استخراج، ترکیبات موجود در گیاه با کمک روش‌های شیمیایی از یکدیگر جدا و شناسایی می‌شوند. به‌دلیل این‌که ترکیبات شیمیایی موجود در گیاهان در ارتباط با هم هستند، بررسی یک جزء از گیاه به تنهایی نتایج قابل قبولی را ایجاد نمی‌کند و باید تمام اجزاء، به جهت پی بردن به فعالیت دارویی و عوارض جانبی احتمالی، بررسی شوند.

از روش‌های کنترل کیفیت گیاهان می‌توان به کروماتوگرافی لایه نازک<sup>۱</sup>، کروماتوگرافی گازی<sup>۲</sup>، کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا<sup>۳</sup>، الکتروفورز لوله موئین<sup>۴</sup> و غیره اشاره کرد [۲]. الگوی کروماتوگرافی حاصل از ترکیبات استخراج شده از هر گیاه، همانند اثرانگشت منحصر به فرد بوده و از این رو به آن اثرانگشت کروماتوگرافی<sup>۵</sup> گفته می‌شود [۳].

امروزه برای دستیابی به اطلاعات بیشتر از تلفیق روش‌های کروماتوگرافی و طیف‌سنجی استفاده می‌شود، مانند کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا- آشکارساز آرایه دیودی<sup>۶</sup> (HPLC-DAD) کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنج جرمی (GC-MS)، الکتروفورز لوله موئین- آشکارساز آرایه دیودی (CE-DAD) و غیره. داده‌های حاصل از این روش‌ها داده‌هایی دو بعدی<sup>۷</sup> هستند که یک بعد آن مربوط به کروماتوگرام و یک بعد مربوط به طیف است. با کمک داده‌های طیفی حاصل می‌توان به‌صورت هم‌زمان ترکیب جداسازی شده را شناسایی کرد [۴].

کروماتوگرافی گازی تلفیق شده با طیف‌سنج جرمی یکی از رایج‌ترین روش‌ها جهت تجزیه ترکیبات فرار به‌خصوص روغن‌های فرار می‌باشد.

اثرانگشت کروماتوگرافی به‌دست آمده از نمونه‌ی استخراج شده حاوی پیک‌های متعددی است و متغیرهای زیادی را شامل می‌شود. بررسی محتوای اطلاعاتی اثر انگشت‌ها با اندازه‌گیری زمان بازداری، سطح زیر پیک و ارتفاع پیک هر یک از پیک‌های

<sup>1</sup>Thin layer chromatography

<sup>2</sup>Gas chromatography

<sup>3</sup>High performance liquid chromatography

<sup>4</sup>Capillary electrophoresis

<sup>5</sup>Chromatographic fingerprint

<sup>6</sup>Diode array detector

<sup>7</sup>Two-way data

مستقل امکان پذیر است، البته حجم محاسبات بسیار سنگین می باشد. در صورتی که کروماتوگرام حاصل حاوی پیک های همپوشانی شده باشد، بخشی از اطلاعات در نظر گرفته نمی شوند و در نتیجه تصویر واضحی از ساختار گیاه به دست نمی آید [۵]. این امر سبب می شود تعیین ساختار شیمیایی گیاه، تجزیه کمی مخلوط های پیچیده، تعیین خواص و تشخیص منشا گیاه به راحتی امکان پذیر نباشد و تفسیر کاملی از اطلاعات شیمیایی به دست آمده از اثرانگشت های کروماتوگرافی انجام نگیرد. تنها راه حل در این گونه موارد ایجاد یک مدل برای اطلاعات شیمیایی است تا بتوان به کمک آن دید مناسبی نسبت به گیاه پیدا کرد. این کار توسط روش های آماری و به عبارتی توسط روش های کمومتریک<sup>۱</sup> انجام می گیرد.

در بسیاری از پژوهش های انجام شده بر روی اسانس گیاهان، از روش های کمومتریک به منظور بررسی دقیق تر اجزا و تعیین خصوصیات آن ها استفاده می شود. در گروه تحقیقاتی هیدن<sup>۲</sup>، ترکیبات موثر در خواص ضد اکسیدانی گیاه مالتوس که بومی ویتنام و چین است مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق ۳۹ نمونه گیاه مالتوس از ۱۷ گونه مختلف جمع آوری و پس از عصاره گیری و انجام کروماتوگرافی مایع با روش های کمومتریک طبقه بندی شدند، سپس با روش های حداقل مربعات جزئی<sup>۳</sup> و تصویرسازی متعامد ساختارهای نهفته<sup>۴</sup> اجزای موثر در خاصیت ضد اکسیدانی آن ها شناسایی شدند [۶].

هدف در این پژوهش تعیین اجزای موثر در خاصیت ضد اکسیدانی گیاهان آویشن و زنیان با به کارگیری روش های رگرسیون جزء اصلی<sup>۵</sup> و رگرسیون جزء مستقل<sup>۶</sup> می باشد.

## ۲- تئوری

### ۲-۱- روش های تجزیه تک متغیره و چندمتغیره

ارتباط بین یک کمیت اندازه گیری شده و مقدار جسم به واسطه یک رابطه تجربی یا یک رابطه ریاضی به دست می آید. رایج ترین نوع ارتباط بین پاسخ فیزیکی و مقدار جسم، رابطه خطی  $y = ax$  می باشد که در این رابطه به ازای هر نمونه یک متغیر وجود دارد و یک روش تجزیه تک متغیره می باشد و زمانی که تعداد متغیرها افزایش یابد از روش های تجزیه چندمتغیره استفاده می شود.

<sup>1</sup> Chemometric methods

<sup>2</sup> Heyden

<sup>3</sup> Partial least squares (PLS)

<sup>4</sup> Orthogonal projection to latent structure (OPLS)

<sup>5</sup> Principal component regression (PCR)

<sup>6</sup> Independent component regression (ICR)

۲-۲- روش تجزیه اجزای اصلی<sup>۱</sup>.

روش تجزیه اجزای اصلی یک روش چندمتغیره است که در این روش داده‌ها به گونه‌ای در فضا چرخانده می‌شوند که بیشترین تغییرات روی بردارهای جدید تصویر گردد. تجزیه اجزای اصلی زمانی مورد استفاده قرار می‌گیرد که ابعاد داده‌ها بزرگ و کار کردن با آن‌ها دشوار باشد. با اعمال تجزیه اجزای اصلی روی ماتریس داده‌ها، ابعاد جدیدی ایجاد می‌شود که بین متغیرهای آن حداکثر واریانس وجود دارد. در روش تجزیه اجزای اصلی به تعداد متغیرهای اولیه بعد جدید تشکیل می‌شود که ترکیب خطی از ابعاد قبلی هستند با این تفاوت که ضرایب ابعاد مختلف، متفاوت می‌باشد و این باعث می‌شود واریانس بعدها با هم تفاوت داشته باشد. از میان بعدها جدید تنها آن دسته از بعدها قابل قبول هستند که واریانس شاخصی دارند و مابقی حذف می‌شوند، به این ترتیب یک کاهش ابعاد رخ می‌دهد. بعدها انتخابی به گونه‌ای شامل بعدها حذف شده می‌باشند و هیچ نقصی در اطلاعات اولیه رخ نمی‌دهد [۷].

۲-۳- روش تجزیه اجزای مستقل<sup>۲</sup>

روش تجزیه اجزای مستقل در دهه ۱۹۹۰ با هدف پردازش سیگنال‌ها توسعه پیدا کرد. این روش نخستین بار در پردازش سیگنال‌های مخابراتی به کار گرفته شد و پس از آن در تمامی حوزه‌هایی که سیگنال‌ها مورد بررسی قرار می‌گیرند مانند شیمی تجزیه (جهت تجزیه نمونه‌ها با روش‌های طیف‌سنجی)، دارو و پزشکی (جهت تشخیص تومورهای مغزی و تجزیه‌های تصویری) مورد استفاده قرار گرفت [۸]. با کمک روش آماری تجزیه اجزای مستقل می‌توان سیگنال‌های مستقل را از مجموعه سیگنال‌های مشاهده شده شناسایی کرد.

زمانی که  $n$  متغیر تصادفی که عبارتند از سیگنال‌های مشاهده شده  $(X_1, X_2, \dots, X_n)$ ، ترکیب خطی از  $n$  متغیر تصادفی دیگر  $(S_1, S_2, \dots, S_n)$  باشند مدل ICA به صورت زیر نمایش داده می‌شود.

$$x_i = a_{i1}s_1 + a_{i2}s_2 + \dots + a_{in}s_n \quad (i=1, 2, \dots, n) \quad (1)$$

در واقع مدل ICA حاصل ضرب دو ماتریس  $\mathbf{A}$  و  $\mathbf{S}$  می‌باشد و می‌توان آن را به صورت  $\mathbf{X}=\mathbf{AS}$  نمایش داد. هدف روش ICA تعیین ماتریس مخلوط کننده  $\mathbf{A}$  و ماتریس اجزای مستقل  $\mathbf{S}$  می‌باشد. در حالی که تنها ماتریس سیگنال‌های مخلوط  $\mathbf{X}$  معلوم است بنابراین روش ICA یک روش جداسازی منبع کور<sup>۳</sup> می‌باشد [۹]. در اکثر مواقع برای اطمینان از این که مدل ICA می‌تواند تخمین زده شود فرضیات و محدودیت‌هایی اعمال می‌شود. یکی از مهم‌ترین فرضیات در ICA این است که اجزای بردار  $\mathbf{s}$  از همدیگر مستقل آماری باشند، از طرفی اجرای روش ICA برای منابع با حداقل حالت گوسی صورت می‌گیرد.

<sup>1</sup>Principal components analysis (PCA)

<sup>2</sup>Independent components analysis (ICA)

<sup>3</sup>Blind source separation (BSS)

بنابراین روش‌های مرتبط با ICA برای متغیرهای تصادفی که توزیع گوسی دارند استفاده نمی‌شود. همچنین باید تعداد مشاهدات از تعداد اجزای مستقل بیشتر باشد، به عبارتی در رابطه  $X=AS$  تعداد اجزای بردار  $S$  کمتر از تعداد اجزای بردار  $X$  باشد.

### ۲-۳-۱- الگوریتم‌های تجزیه اجزای مستقل

روش‌های مختلفی در تخمین استقلال آماری وجود دارد، بنابراین الگوریتم‌های متفاوتی جهت اجرای ICA استفاده می‌شود. از جمله این روش‌ها می‌توان به روش FastICA، اتصال تقریبی قطری ماتریس ویژه (JADE)<sup>۱</sup>، InfomaxICA و KernelICA اشاره کرد که انتخاب نوع الگوریتم به شرایط موجود در تعیین استقلال آماری و روش استفاده شده در حداکثر کردن استقلال بستگی دارد [۱۰]. در اکثر الگوریتم‌های ICA یک مرحله پیش پردازش جهت ساده‌تر شدن الگوریتم وجود دارد. رایج‌ترین پیش پردازش استفاده شده در الگوریتم‌ها روش تجزیه اجزای اصلی می‌باشد. این روش در حالتی که تعداد سیگنال‌های مشاهده شده بیشتر از تعداد اجزای مستقل باشد به منظور کاهش بعد اعمال می‌شود. به عبارتی می‌توان گفت روش تجزیه اجزای اصلی یک حالت خاصی از ICA است که در آن فرض می‌شود که اجزای مستقل توزیع گوسی داشته باشند. در این روش عمل تخمین اجزا به وسیله تصویر کردن داده‌های مشاهده شده روی بردارهای ویژه صورت می‌گیرد.

در این الگوریتم‌ها اگر  $W$  تخمینی از معکوس ماتریس مخلوط کننده  $A$  باشد در این صورت ماتریس  $S$  تخمینی از اجزای مستقل خواهد بود. در واقع زمانی که  $W$  تخمین زده می‌شود سیگنال‌های ترکیبات خالص در ردیف‌های ماتریس  $S$  با کمک رابطه  $S=WX$  بازیابی می‌شوند [۱۱].

### ۲-۳-۲- تعیین تعداد اجزای مستقل

یک مرحله‌ی مهم و اساسی در زمان استفاده از یک مدل بر اساس متغیرهای پنهان (LVS)، تعیین تعداد متغیرهای پنهان یا به عبارتی اجزای مستقل می‌باشد.

تعیین متغیرهای پنهان در روش PCA به وسیله سهم کاهنده واریانس استخراج شده انجام می‌گیرد. در روش ICA نیز از آنجایی که محاسبه بیش از حد ICها می‌تواند سیگنال‌های خالص را تجزیه کند و نتایج نادرستی را ارائه دهد، تعیین اجزای مستقل از اهمیت زیادی برخوردار است.

روش‌های مختلفی جهت تعیین تعداد بهینه ICهای استخراجی از یک مجموعه داده به دست آمده وجود دارد، اما بسیاری از آن‌ها به دانش اولیه از داده‌ها مانند ماتریس مخلوط کننده  $A$  بستگی دارد. در سال‌های اخیر دو روش سریع به نام‌های

<sup>1</sup>Joint approximate diagonalization of eigenmatrices (JADE)

تجزیه اجزای مستقل به وسیله قطعه‌ها<sup>۱</sup> و معیار Durbin-Watson که تنها به داده‌های آزمایشگاهی وابسته هستند ارائه شده است [۱۲]. در روش تجزیه اجزای مستقل به وسیله قطعه‌ها، داده‌ها به دو قطعه یا در صورت لزوم به قطعه‌های بیشتری تقسیم می‌شوند. مدل‌های مختلفی از ICA با تعداد ۱ تا A جزء مستقل برای هر یک از این قطعه‌ها محاسبه می‌شود. پس از آن ICهای به دست آمده در هر قطعه از طریق محاسبه همبستگی بین هر دو جفت سیگنال استخراج شده مقایسه می‌شوند. مدل با بالاترین بعد برای هر یک از ICهای به دست آمده در یک قطعه مشابه ICهای به دست آمده در قطعه‌های دیگر است و تعداد بهینه ICهای استخراجی از داده‌های مورد بررسی را نشان می‌دهد.

#### ۲-۴- رگرسیون جزء اصلی

در روش رگرسیون جزء اصلی، با استفاده از اجزای اصلی تعیین شده به روش PCA ارتباط بین ماتریس پیش بینی کننده (T) که همان ماتریس اسکور می‌باشد و ماتریس پاسخ (Y) مورد بررسی قرار می‌گیرد. مدل ایجاد شده به روش رگرسیون جزء اصلی به صورت  $Y=TB$  است که در آن B ماتریس ضرایب می‌باشد [۱۳].

#### ۲-۵- رگرسیون جزء مستقل

بر اساس روش تجزیه اجزای مستقل، یک روش رگرسیون با نام رگرسیون جزء مستقل (ICR) توسط چن<sup>۲</sup> و وانگ<sup>۳</sup> ابداع شد. در روش رگرسیون جزء مستقل، ابتدا ماتریس مخلوط کننده (A) بر اساس روش ICA تعیین می‌شود، سپس از طریق رابطه  $y=AB$  ماتریس ضرایب (B) محاسبه می‌شود. در این رابطه y بیانگر کمیت اندازه‌گیری شده مانند خاصیت ضداکسیدانی گیاهان می‌باشد [۱۴].

#### ۲-۶- خواص ضداکسیدانی

رادیکال‌های آزاد ترکیباتی هستند که دارای تک الکترون می‌باشند، این ترکیبات در حین واکنش اکسایش با برخی مولکول‌ها تولید می‌شوند. وجود این رادیکال‌های آزاد در بدن و واکنش آن‌ها با قسمت‌های سلولی مانند DNA بسیار خطرناک است و منجر به بروز پیری زودرس و بیماری‌هایی مانند سرطان و سکتة مغزی می‌شود.

ضداکسیدان‌ها موادی هستند که از تشکیل رادیکال‌های آزاد در سلول‌ها جلوگیری می‌کنند. علیرغم وجود ضداکسیدان‌های مختلف در پلاسما، سیستم دفاعی بدن به تنهایی قادر به از بین بردن رادیکال‌های آزاد ایجاد شده در بدن نیست، به همین جهت نیاز به تامین ضداکسیدان از منابع خارجی دارد [۱۵]. گیاهان یکی از مهم‌ترین منابع

<sup>1</sup>ICA-by-Blocks

<sup>2</sup>Chen

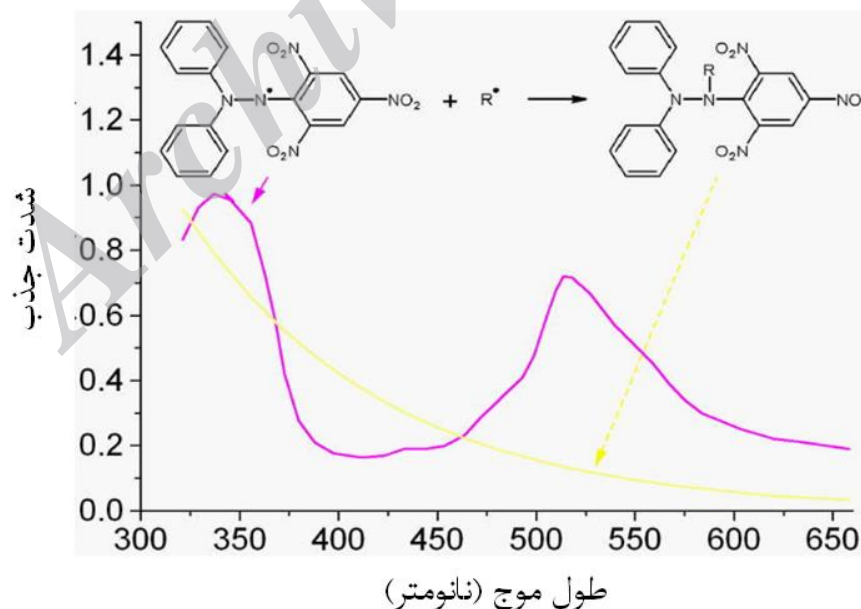
<sup>3</sup>Wang

ضداکسیدان می‌باشند. فعالیت ضداکسیدانی گیاهان به دلیل حضور ترکیبات متفاوتی مانند پلی‌فنول‌ها، فلاونوئیدها، ترپنوئیدها و غیره می‌باشد [۱۶].

از جمله گیاهانی که دارای خاصیت ضداکسیدانی می‌باشند می‌توان به چای سبز، زنیان، نعنای، زیره، گشنیز، برگ درخت گردو، آویشن و غیره اشاره کرد. ضداکسیدان‌ها در محیط، اتم‌های هیدروژن آزاد می‌کنند که این اتم‌ها توسط رادیکال‌های آزاد جذب شده و مانع از گسترش زنجیره‌ای آن‌ها می‌شود.

## ۲-۶-۱- روش اندازه‌گیری فعالیت ضداکسیدانی

اثر ضداکسیدانی اسانس‌ها با استفاده از روش اندازه‌گیری کاهش ظرفیت رادیکالی به کمک ترکیب ۲،۲-دی‌فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. DPPH ترکیبی بنفش رنگ است که به دلیل حضور گروه‌های فنیل در ساختار آن، به راحتی به صورت رادیکال درآمده و در واقع منبع رادیکال آزاد می‌باشد. این ترکیب با گرفتن یک الکترون از ترکیب ضداکسیدان، از بنفش به زرد، تغییر رنگ می‌دهد. رادیکال‌های آزاد موجود در DPPH در ۵۱۷ نانومتر جذب دارند که از قانون بیر لامبرت پیروی می‌کنند. کاهش جذب این ترکیب با میزان ماده ضداکسیدان رابطه خطی دارد. هرچه مقدار ماده ضداکسیدان بیشتر باشد، DPPH بیشتری مصرف شده و رنگ بنفش بیشتر به سمت زرد میل می‌کند. شکل ۱ نمودار جذبی این ترکیب را نشان می‌دهد.



شکل ۱- نمودار جذبی ترکیب DPPH

اگر فعالیت بر اساس DPPH مصرف شده گزارش شود از معادله ۲ استفاده می‌شود.

$$\%SA = \left( \frac{A_{\text{نمونه}} - A_{\text{شاهد}}}{A_{\text{شاهد}}} \right) \times 100 \quad (2)$$

در این رابطه جذب نمونه و جذب شاهد پس از هفتاد دقیقه از شروع واکنش در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده می‌شود و میزان DPPH از دست رفته محاسبه می‌گردد، هر چه میزان به دام اندازی رادیکال‌های DPPH بیشتر باشد فعالیت ضداکسیدانی نمونه بیشتر است.

با محاسبه‌ی %SA<sup>۱</sup> برای غلظت‌های مختلفی از اسانس و رسم منحنی %SA نسبت به غلظت می‌توان غلظتی از اسانس را که قادر است ۵۰ درصد از رادیکال‌های آزاد را تخریب کند (IC<sub>50</sub>) محاسبه کرد.

### ۳- بخش تجربی

#### ۳-۱- مواد شیمیایی مورد نیاز

مواد شیمیایی مورد نیاز در این پژوهش شامل اتانول، متانول، سدیم سولفات و ۲،۲-دی‌فنیل ۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) خریداری شده از شرکت مرک آلمان می‌باشد.

#### ۳-۲- دستگاه‌های مورد استفاده

در این پژوهش از دستگاه‌های کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنج جرمی مدل HP-5973 شرکت Agilent آمریکا و طیف‌سنج مرئی-ماورای بنفش مدل Optizen 3220UV شرکت Mecasys کره جنوبی استفاده شد.

#### ۳-۳- شرح آزمایش

در این پژوهش ۵ نمونه گیاه زنیان و ۳۰ نمونه گیاه آویشن توسط دستگاه کلونجر<sup>۲</sup> بر اساس روش تقطیر با آب اسانس‌گیری و به‌منظور جداسازی و شناسایی اجزای موجود در اسانس به دستگاه GC-MS تزریق شدند و اثرانگشت‌های کروماتوگرافی آن‌ها حاصل گردید.

برای اندازه‌گیری خاصیت ضداکسیدانی نمونه‌ها از محلول DPPH استفاده شد. برای این کار ابتدا مقدار ۳ میلی‌گرم از پودر DPPH درون یک بالن حجمی ۵۰ میلی‌لیتری با متانول به حجم رسانده شد. برای تهیه محلول‌های نمونه مقدار ۲۰ تا ۴۰ میلی‌گرم از اسانس با متانول به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد (با توجه به میزان خاصیت ضداکسیدانی نمونه‌ها، مقدار متفاوتی از اسانس‌ها استفاده می‌شود)، سپس سه غلظت متفاوت از آن‌ها تهیه گردید.

<sup>1</sup>Scavenging activity

<sup>2</sup>Clevenger



به جهت اطمینان از تکرارپذیری واکنش برای هر سه غلظت ساخته شده از نمونه‌ها، دو نمونه تهیه شد به این ترتیب که از هر غلظت مقدار ۲ میلی‌لیتر در دو لوله آزمایش متفاوت ریخته و میزان ۲ میلی‌لیتر از محلول DPPH به آن‌ها اضافه شد، این لوله آزمایش‌ها به همراه نمونه شاهد به مدت ۷۰ دقیقه در محیطی تاریک قرار داده شدند تا واکنش کامل شد. نمونه شاهد با مخلوط کردن ۲ میلی‌لیتر از محلول DPPH با ۲ میلی‌لیتر از متانول تهیه شد. پس از گذشت ۷۰ دقیقه، جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه طیف‌سنج جذبی دو پرتویی در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد، به این ترتیب که ابتدا برای صفر شدن دستگاه، هر دو سل با متانول پر و یک خط زمینه<sup>۱</sup> گرفته شد. پس از آن جذب محلول شاهد و جذب غلظت‌های ساخته شده به ترتیب از رقیق به غلیظ در مقابل شاهد متانول اندازه‌گیری شد. میانگین جذب برای هر غلظت محاسبه و مطابق با معادله ۲ درصد بازداری به دست آمد.

پس از محاسبه درصد بازداری، نمودار درصد بازداری در مقابل غلظت‌های مختلف از هر نمونه اسانس رسم شد و با قرار دادن ۵۰ به جای  $y$  در معادله به دست آمده میزان  $IC_{50}$  محاسبه گردید.

$IC_{50}$  غلظتی از اسانس بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر است که قادر می‌باشد ۵۰ درصد از رادیکال‌های آزاد را مهار کند. طیف GC ماتریس  $X$  و  $IC_{50}$  بردار  $y$  را تشکیل می‌دهد و می‌توان با استفاده روش‌های کمومتریک ارتباط بین ماتریس  $X$  و بردار  $y$  را تعیین کرد. در جدول ۱ و ۲ به ترتیب  $IC_{50}$  گیاه آویشن و زنیان گزارش شده است.

برای نمونه‌های گیاه زنیان ماتریسی با ابعاد  $5 \times 4626$  و برای نمونه‌های گیاه آویشن ماتریسی با ابعاد  $30 \times 4190$  حاصل خواهد شد که همان ماتریس  $X$  خواهد بود که ۵ و ۳۰ بیانگر تعداد نمونه‌ها و ۴۶۲۶ و ۴۱۹۰ مبین شدت در زمان‌های بازداری مختلف می‌باشد.

البته قبل از انجام هرگونه عملیاتی روی داده‌ها، پیک‌ها هم‌تراز می‌شوند که برای این کار از روش همبستگی بین همساز شده بهینه<sup>۲</sup> استفاده می‌شود.

جدول ۱-  $IC_{50}$  نمونه‌های مختلف آویشن

نماد	نوع گونه آویشن	نام علمی	$IC_{50}(\mu g/ml)$
A	آویشن شیرازی	Zataria multiflora	۸۵/۱
B	آویشن باغی	Thumus vulgaris	۲۰۳/۰
C	آویشن شیرازی	Zataria multiflora	۲۴۵/۲

<sup>1</sup>Baseline

<sup>2</sup>Correlation optimized warping (COW)

۲۵۰/۸	<i>Thymus daenensis</i>	آویشن دنایی	D
۱۶۹/۱	<i>Zataria multiflora</i>	آویشن شیرازی	E
۲۳۱/۰	<i>Thymus vulgaris</i>	آویشن باغی	F
۱۳۲/۸	<i>Zataria multiflora</i>	آویشن شیرازی	G
۱۱۸/۱	Unknown	ناشناخته	H
۲۶۰/۰	<i>Thymus vulgaris</i>	آویشن باغی	I
۶۶/۶	<i>Thymus vulgaris</i>	آویشن باغی	J
۸۱/۳	<i>Thymus daenensis</i>	آویشن دنایی	K
۱۰۱/۸	Unknown	ناشناخته	L
۶۶۰/۰	<i>Thymus serpyllum</i>	آویشن واقعی	M
۱۸۶۱/۰	<i>Thymus migricus</i>	آویشن کرک آلود	N
۶۰/۰	<i>Thymus vulgaris</i>	آویشن باغی	O
۳۷۶/۲	<i>Thymus kotschyanus</i>	آویشن کوچیانوس	P
۱۳۶۰/۰	<i>Thymus eriocalyx</i>	آویشن آذربایجانی	Q
۱۱۱/۵	<i>Thymus vulgaris</i>	آویشن باغی	R
۲۴۹۱/۰	<i>Thymus kotschyanus</i>	آویشن کوچیانوس	S
۲۲۰/۰	<i>Thymus vulgaris</i>	آویشن باغی	T
۲۰۷/۸	<i>Zataria multiflora</i>	آویشن شیرازی	U
۱۷۶/۰	<i>Zataria multiflora</i>	آویشن شیرازی	V
۲۱۹/۰	<i>Zataria multiflora</i>	آویشن شیرازی	W
۹۶/۱	<i>Thymus vulgaris</i>	آویشن باغی	X
۱۵۵/۴	Unknown	ناشناخته	Y
۱۰۶/۰	<i>Thymus vulgaris</i>	آویشن باغی	Z
۲۳۳/۰	<i>Thymus vulgaris</i>	آویشن باغی	AA
۲۸۸/۲	<i>Thymus vulgaris</i>	آویشن باغی	AB

۱۱۲/۰	Thymus daenensis	آویشن دنایی	AC
۱۴۰/۰	Thymus caramanicus	آویشن کارامانیکوس	AD

جدول ۲- IC<sub>50</sub> گونه‌های مختلف زنیان

IC <sub>50</sub> (μg/ml)	نوع گونه زنیان
۲۹۴	زاهدان
۱۳۵	یزد
۶۱۴	اردبیل
۱۲۷	شیراز
۱۹۷	تبریز

با اجرا کردن روش‌های کمومتریک مانند PCR و ICR با پیش‌پردازش‌های مختلف روی ماتریس  $X$  و بردار  $y$  می‌توان ضریب رگرسیون را بر حسب متغیرها رسم کرد و به کمک آن تشخیص داد که چه اجزایی در تبیین خاصیت ضداکسیدانی نمونه نقش بیشتری را ایفا کرده‌اند.

این محاسبات با استفاده از جعبه ابزار نصب شده روی برنامه MATLAB به نام PLStoolbox و نیز m-file‌های نوشته شده در این محیط انجام می‌گیرد.

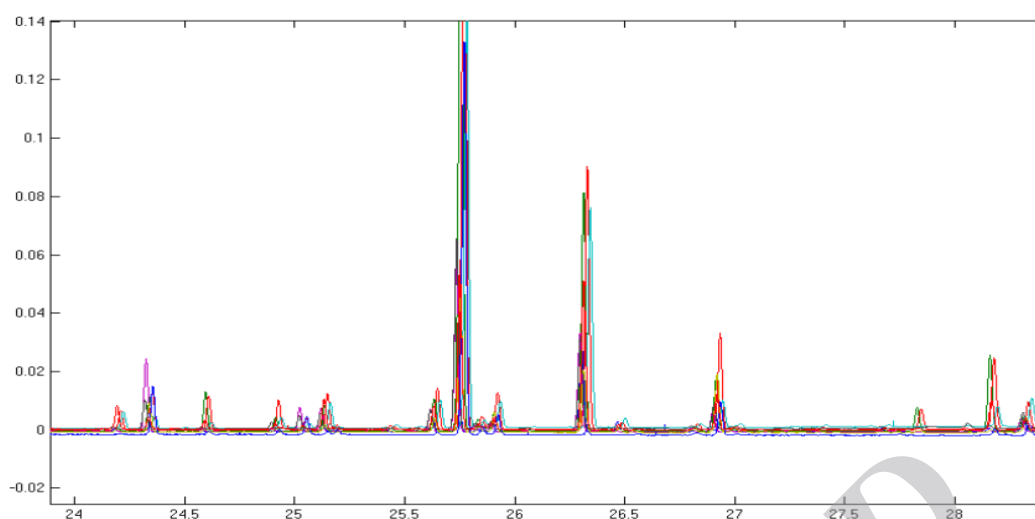
#### ۴- نتایج و بحث

##### ۴-۱- هم‌ترازسازی کروماتوگرام‌ها

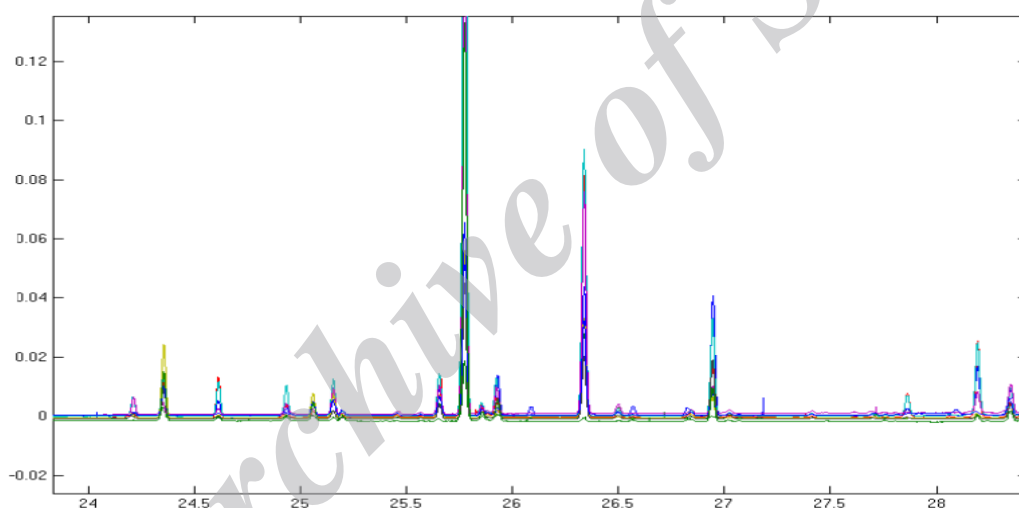
پیش‌پردازش COW با استفاده از m-file مربوطه در محیط MATLAB روی ماتریس کروماتوگرام‌ها اعمال می‌شود. در شکل‌های ۲ و ۳ تفاوت در قبل و بعد از هم‌ترازسازی مربوط به گیاه آویشن با استفاده از روش COW نشان داده شده است.

##### ۴-۲- طبقه‌بندی نمونه‌ها

به دلیل کم بودن نمونه‌های گیاه زنیان طبقه‌بندی تنها روی نمونه‌های آویشن انجام می‌شود. در طبقه‌بندی نمونه‌های آویشن به روش ICA از دو الگوریتم FastICA و JADEICA استفاده می‌شود. در هر دو روش ابتدا روش تجزیه اجزای اصلی به‌عنوان پیش‌پردازش جهت کاهش ابعاد ماتریس داده‌های  $X$  به کار گرفته می‌شود، سپس روش ICA بر روی داده‌های پیش‌پردازش شده اجرا می‌شود.



شکل ۲- کروماتوگرام نمونه‌های آویشن قبل از هم‌ترازسازی با COW

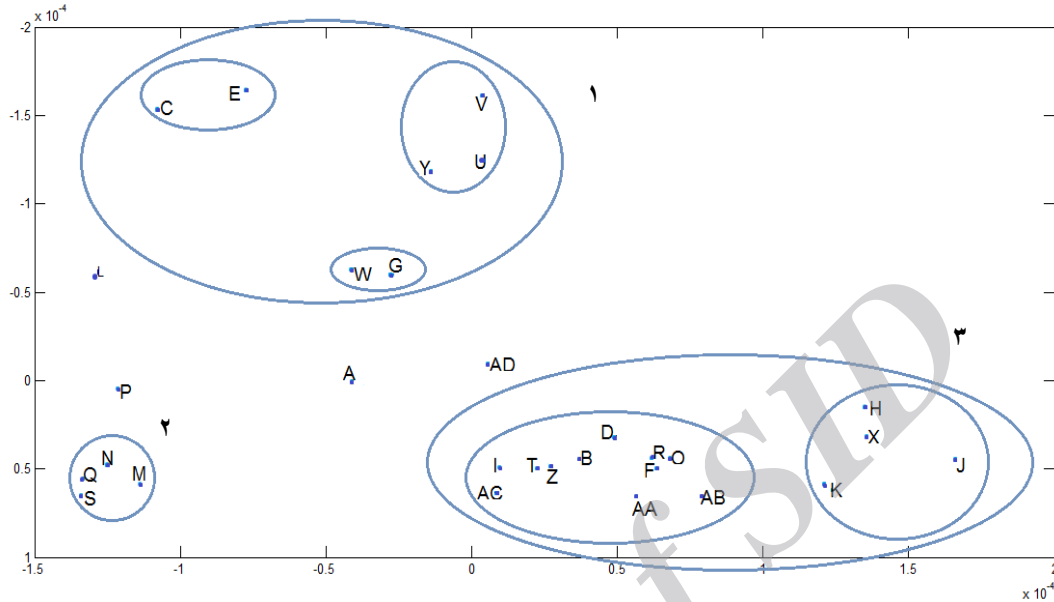


شکل ۳- کروماتوگرام نمونه‌های آویشن بعد از هم‌ترازسازی با COW

شکل ۴ نمودار طبقه‌بندی نمونه‌های آویشن به روش تجزیه اجزای مستقل با الگوریتم FastICA را نشان می‌دهد. نتایج طبقه‌بندی نمونه‌های آویشن به روش تجزیه اجزای مستقل با الگوریتم JADEICA مشابه با نتایج الگوریتم FastICA می‌باشد.

با توجه به شکل ۴ نمونه‌ها به سه دسته طبقه‌بندی می‌شوند. دسته اول گونه آویشن‌های شیرازی است. دسته دوم شامل گونه‌های کوچیانوس، کرک‌آلود، آذربایجانی و واقعی است که در طبیعت دارای فراوانی کمتری نسبت به سایر گونه‌های آویشن هستند. دسته سوم شامل گونه‌های آویشن باغی و دناپی می‌باشد به این مفهوم که گونه آویشن دناپی با آویشن باغی اختلاف

زیادی ندارد. به کمک این نمودار می‌توان تشخیص داد که نمونه ناشناخته منطقه کاشان (H) گونه‌ای از آویشن دناپی یا باغی است و نمونه ناشناخته منطقه اراک (Y) می‌تواند متعلق به گونه آویشن شیرازی باشد..



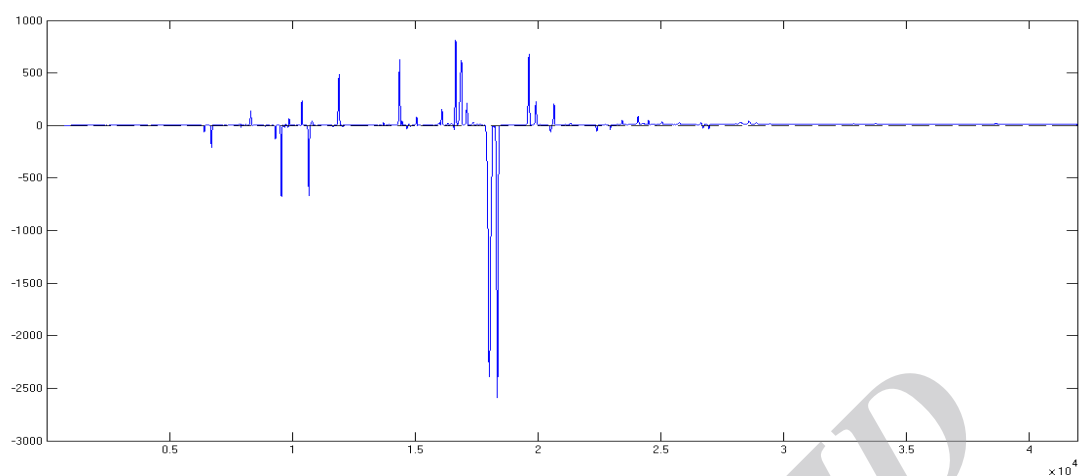
شکل ۴- نمودار ICA با استفاده از الگوریتم Fast ICA

#### ۴-۳- تعیین ضرایب رگرسیون

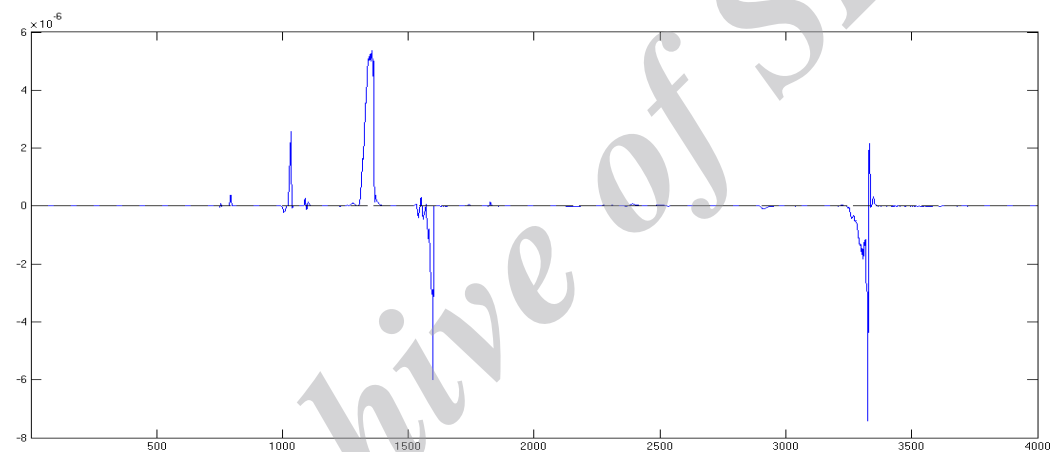
برای تعیین ضرایب رگرسیون ارتباط بین ماتریس پیش‌بینی کننده  $X$  و بردار پاسخ  $y$  را بررسی می‌شود که در آن ماتریس  $X$  زمان بازداری کروماتوگرام‌ها و شدت پیک‌ها می‌باشد و بردار پاسخ خاصیت ضداکسیدانی نمونه‌ها است. پس از مدل‌سازی با پیش‌پردازش‌های مناسب، ضرایب رگرسیون بر حسب زمان بازداری رسم و خاصیت ضداکسیدانی با توجه به نمودارها تفسیر می‌شود.

#### ۴-۳-۱- اجرای مدل رگرسیون جزء اصلی

شکل‌های ۵ و ۶ به ترتیب نمودارهای ضرایب رگرسیون مربوط به اجرای مدل PCR با پیش‌پردازش COW و تمرکز بر میانگین بر روی گیاه آویشن و زنیان می‌باشد.



شکل ۵- نمودار ضرایب رگرسیون بر حسب متغیرها با پیش پردازش COW و تمرکز بر میانگین در مدل PCR برای گیاه آویشن

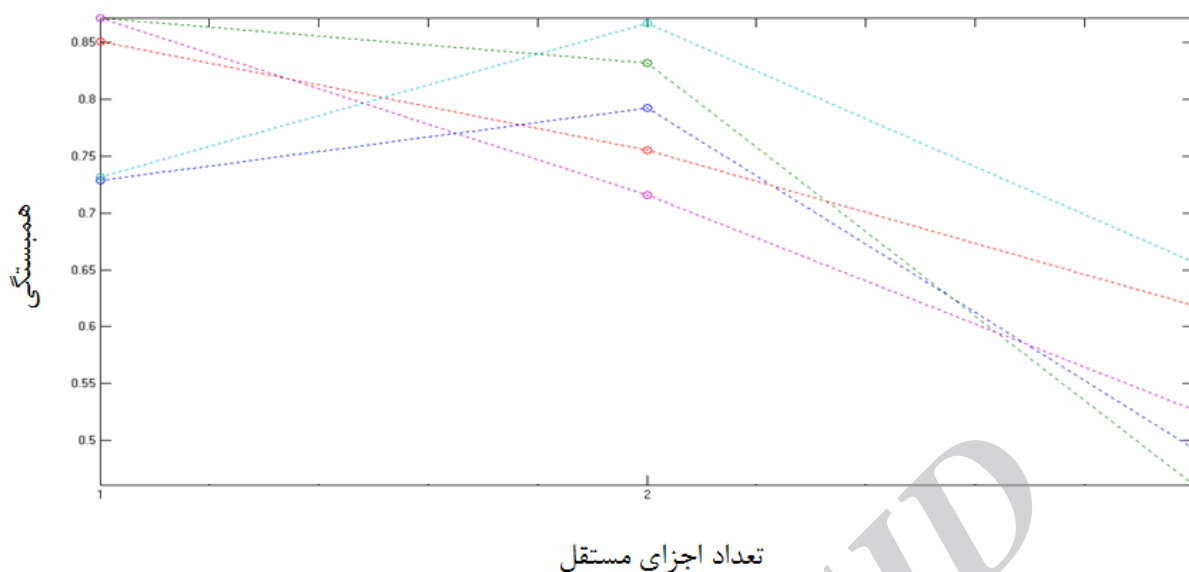


شکل ۶- نمودار ضرایب رگرسیون بر حسب متغیرها با پیش پردازش COW و تمرکز بر میانگین در مدل PCR برای گیاه زنبان

#### ۴-۳-۲- اجرای مدل رگرسیون جزء مستقل

در شکل ۷ نمودار تعیین تعداد اجزای مستقل بهینه برای نمونه‌های آویشن نشان با روش ICA-by-Blocks داده شده

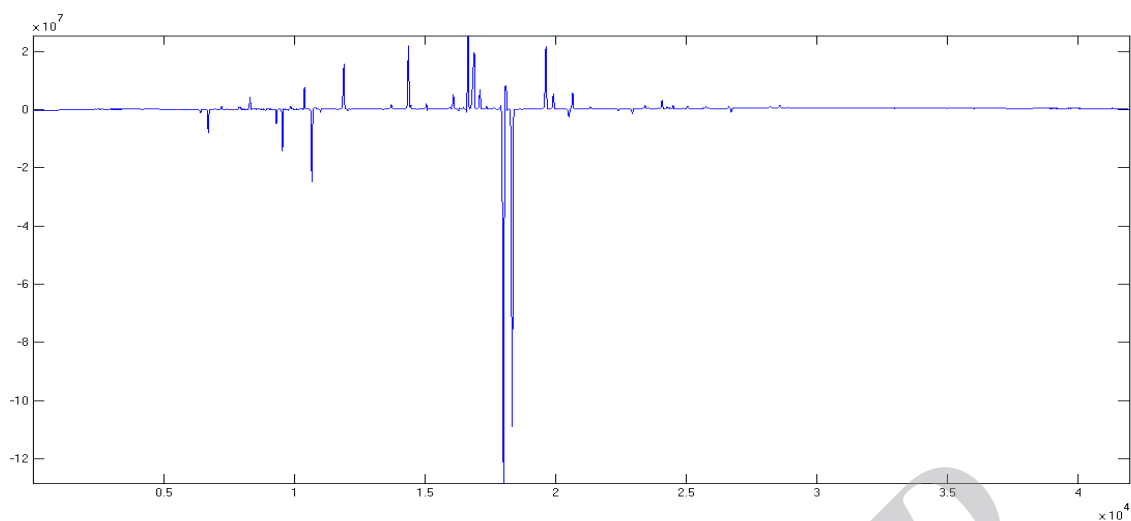
است. مطابق با این نمودار تعداد اجزای مستقل بهینه برای نمونه‌های آویشن برابر با ۲ انتخاب می‌شود.



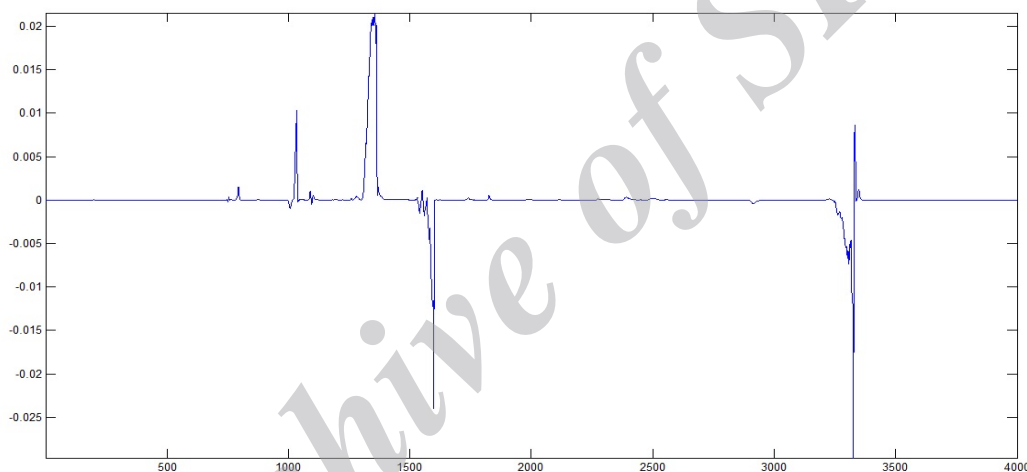
شکل ۷- نمودار ICA-by-Blocks جهت تعیین تعداد اجزای مستقل

شکل‌های ۸ و ۹ به ترتیب نمودارهای ضریب رگرسیون مربوط به گیاه آویشن و زنیان را بر اساس روش ICR نشان می‌دهد. در این نمودارها که مشابه نمودارهای حاصل از روش PCR است دو پیک با ضریب رگرسیون منفی ظاهر شده است. به عبارتی می‌توان گفت نتایج حاصل از روش ICR کاملاً مشابه با نتایج حاصل از روش PCR است و این دو روش در پیش‌بینی‌های کمی نتایج یکسانی خواهند داشت. تنها تفاوت این دو روش در ماتریس وارد شده در مدل‌سازی می‌باشد که در روش ICR، ماتریس مخلوط‌کننده (A) محاسبه شده با روش ICA است و در روش PCR ماتریس اسکور (X) است که با روش PCA محاسبه شده است.

با توجه به توضیحاتی که در قسمت تئوری داده شد هرچه میزان  $IC_{50}$  کمتر باشد مقدار کمتری از اسانس گیاه برای تخریب رادیکال‌های آزاد نیاز می‌باشد، یعنی خاصیت ضداکسیدانی بیشتری دارد. مقادیر  $IC_{50}$  تشکیل بردار  $y$  را می‌دهد و در نتیجه ترکیباتی که بتوانند نقش موثرتری در بیان مقادیر کمتر  $y$  ایفا کنند، مهمتر می‌باشد. هر چه ضرایب رگرسیون مربوط به ترکیبات منفی تر باشد این ترکیبات نقش موثرتری در تعیین خاصیت ضداکسیدانی گیاه دارند.



شکل ۸- نمودار ضریب رگرسیون بر حسب متغیرها در مدل ICR برای گیاه آویشن



شکل ۹- نمودار ضریب رگرسیون بر حسب متغیرها در مدل ICR برای گیاه زنیان

#### ۴-۴- تعیین اجزای موثر در خاصیت ضداکسیدانی اسانس

در این نمودارها پیک‌های دارای ضریب رگرسیون منفی نشان دهنده جزء موثر در خاصیت ضداکسیدانی هستند. از مقایسه این نمودارها با کروماتوگرام نمونه‌ها می‌توان پیک موثر در خاصیت ضداکسیدانی را تعیین کرد. شناسایی این پیک‌ها از طریق مقایسه طیف جرمی آن‌ها با طیف‌های مرجع موجود در کتابخانه دستگاه GC-MS انجام می‌گیرد.

از نمودارهای حاصل از روش‌های ICR و PCR گیاه آویشن مشاهده می‌شود که ترکیبات تیمول، پاراسیمن، گاما تریپین، کارواکرول، کاربوفیلین و بتامیرسن و آلفاپینن دارای ضریب رگرسیون منفی هستند و در خاصیت ضد اکسیدانی گیاه آویشن نقش دارد. در این نمودارها پیک مربوط به تیمول دارای ضریب رگرسیون منفی‌تر می‌باشد و بیانگر این است که تیمول نسبت به سایر ترکیبات ذکر شده نقش بیشتری در خاصیت ضداکسیدانی آویشن ایفا می‌کند.

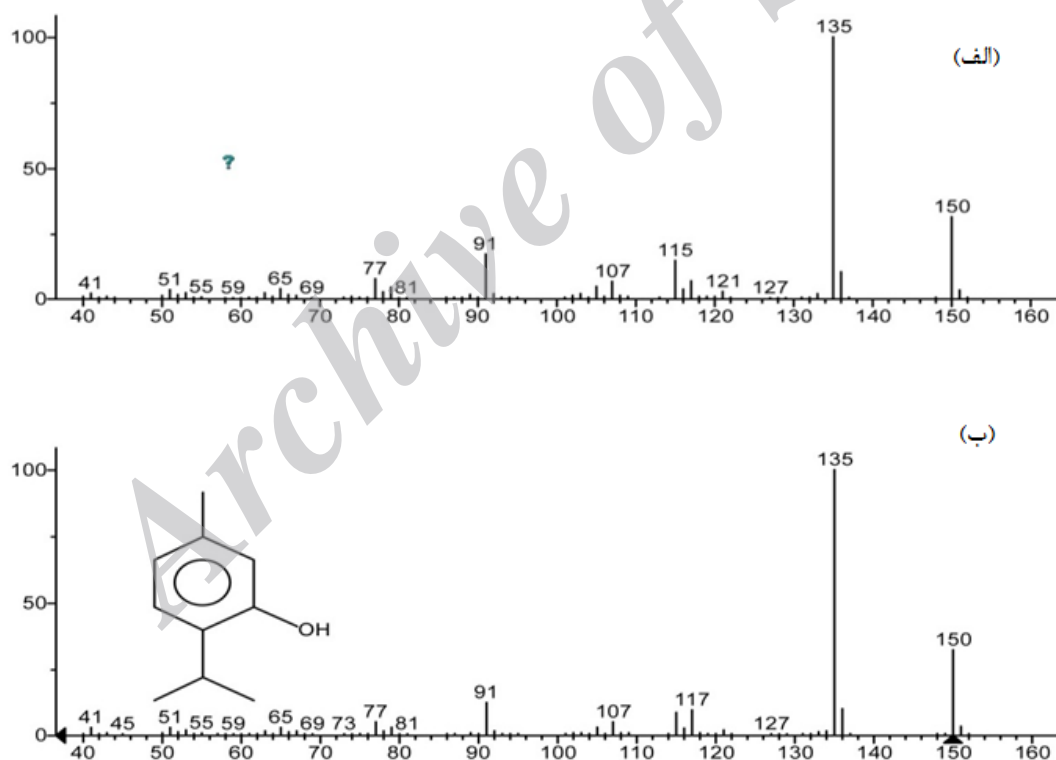


پیک‌های دارای ضریب رگرسیون منفی نمایان شده در نمودارهای PCR و ICR گیاه زنیان مربوط به ترکیبات تیمول و گاماترپین می‌باشد که خاصیت ضداکسیدانی دارند.

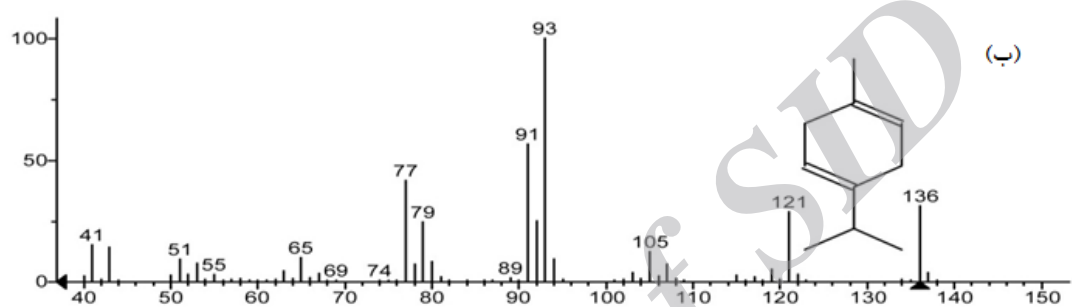
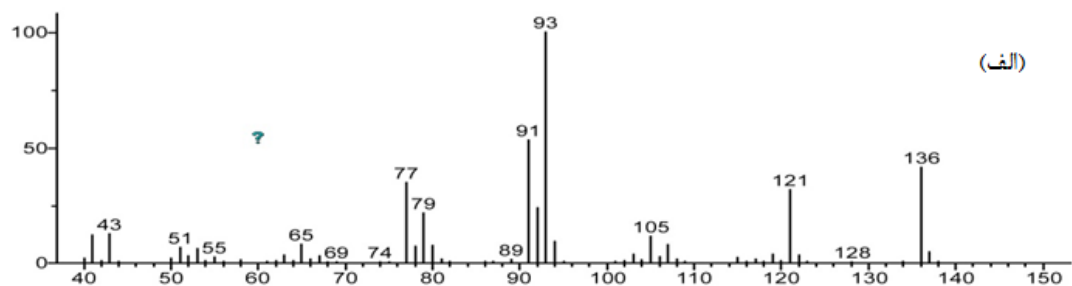
#### ۴-۵- شناسایی ترکیبات موجود در اسانس

برای شناسایی دقیق ترکیبات موجود در اسانس‌های استخراج شده از گیاهان زنیان و آویشن، نمونه‌های جمع‌آوری شده به دستگاه GC-MS تزریق شدند.

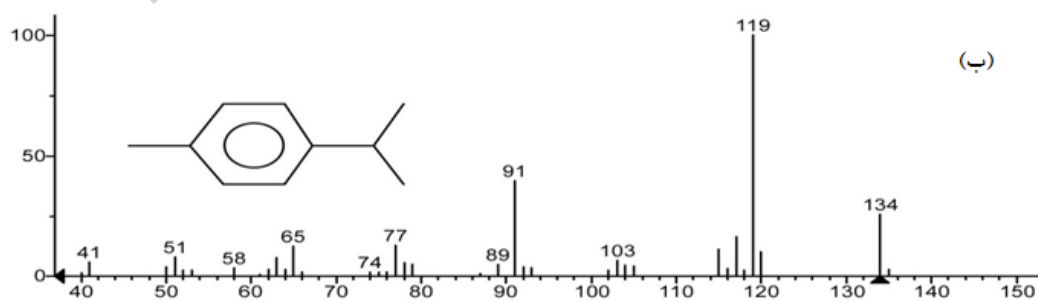
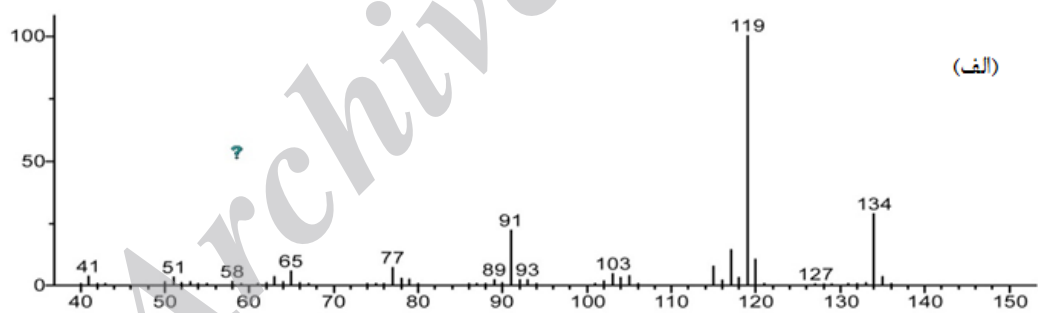
پیک‌های کروماتوگرام‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم افزارهای CHEMESTATION و NIST(05) بر اساس کتابخانه Wiley7n به الگوهای طیفی تبدیل و از نظر شاخص تشابه با طیف جرمی استانداردشان مقایسه و شناسایی می‌شوند. شکل‌های ۱۰ تا ۱۶ طیف جرمی استاندارد و استخراج شده مهم‌ترین ترکیبات شناسایی شده در گیاهان آویشن و زنیان را نشان می‌دهند.



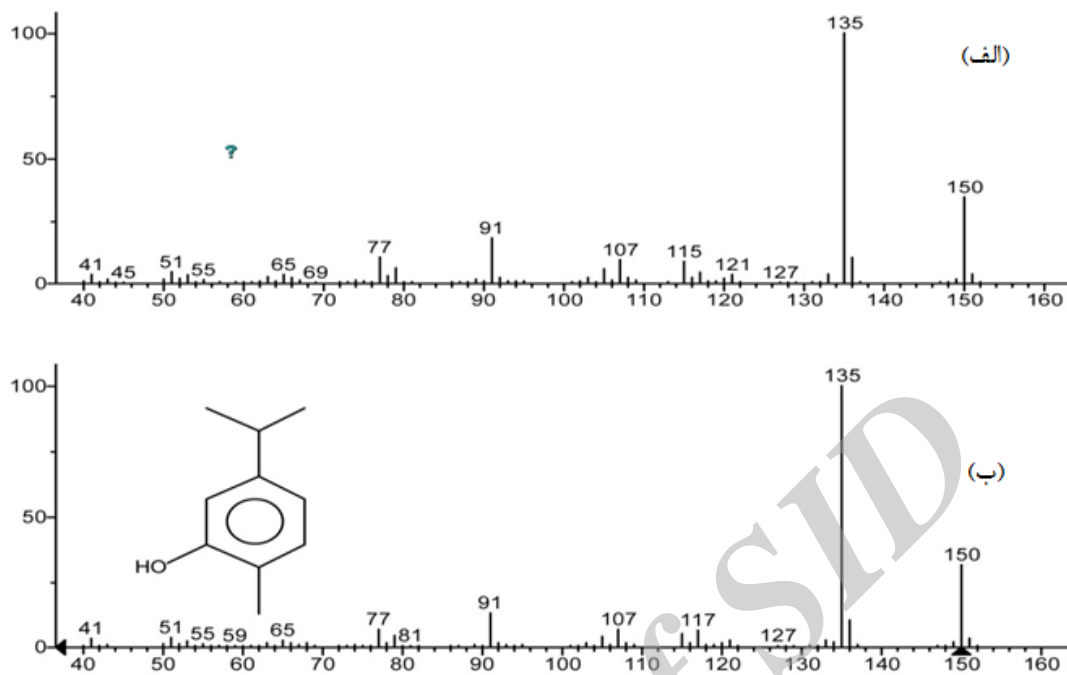
شکل ۱۰- طیف جرمی استخراج شده (الف) و طیف جرمی استاندارد (ب) تیمول



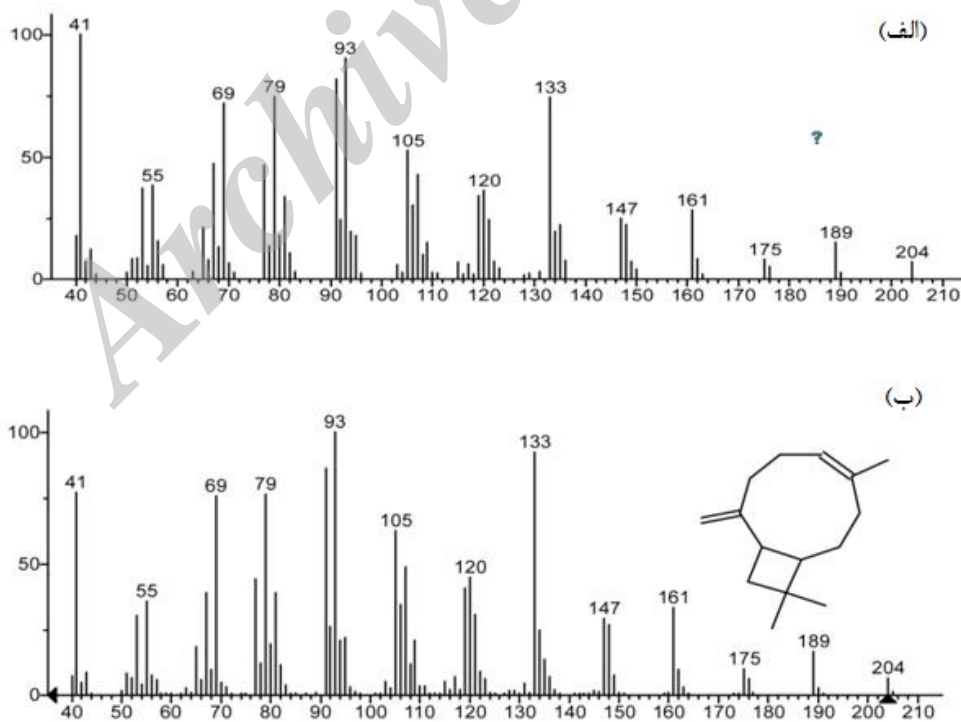
شکل ۱۱- طیف جرمی استخراج شده (الف) و طیف جرمی استاندارد (ب) گاماترینین



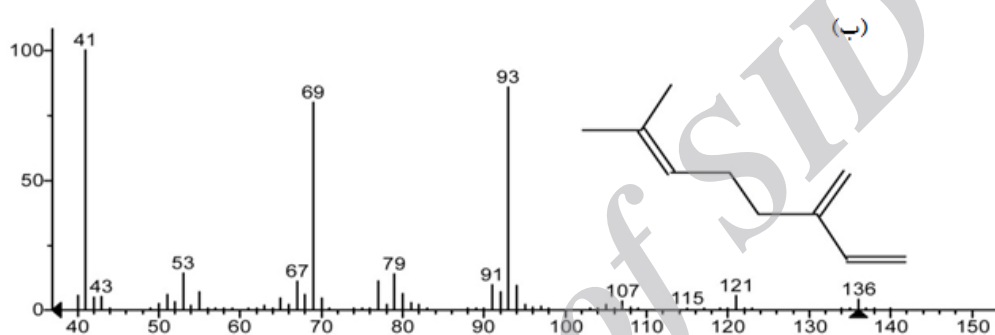
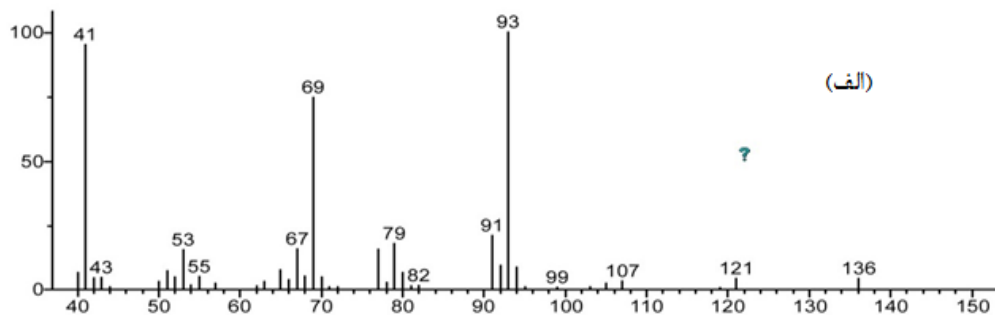
شکل ۱۲- طیف جرمی استخراج شده (الف) و طیف جرمی استاندارد (ب) پاراسیمن



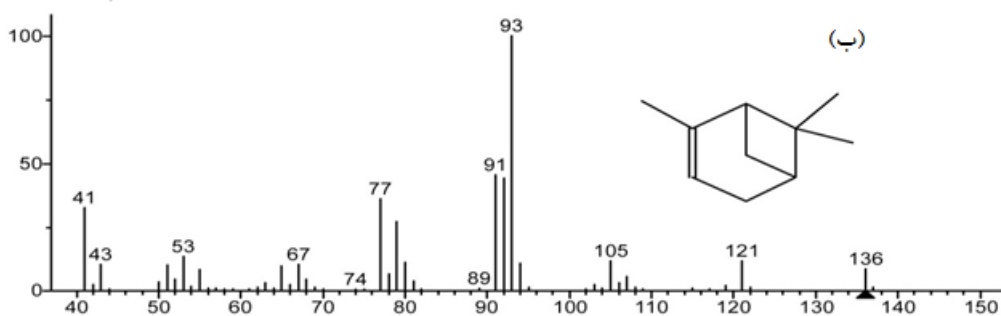
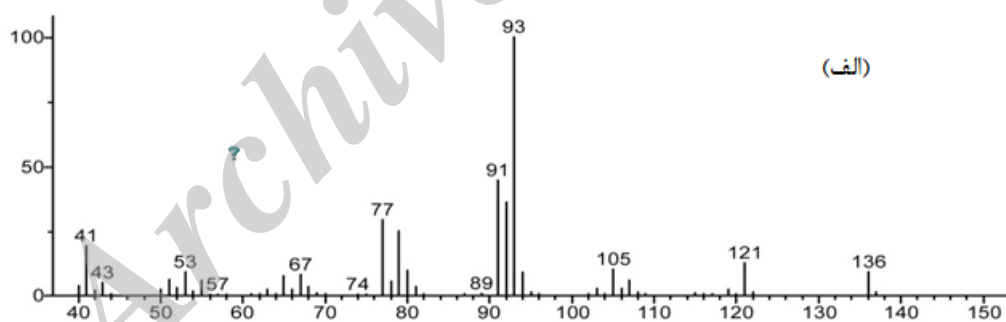
شکل ۱۳- طیف جرمی استخراج شده (الف) و طیف جرمی استاندارد (ب) کارواکول



شکل ۱۴- طیف جرمی استخراج شده (الف) و طیف جرمی استاندارد (ب) کاریوفیلین



شکل ۱۵- طیف جرمی استخراج شده (الف) و طیف جرمی استاندارد (ب) بتامیرسن



شکل ۱۶- طیف جرمی استخراج شده (الف) و طیف جرمی استاندارد (ب) آلفاینن

## ۵- نتیجه گیری

نتایج ترکیبات موثر در خاصیت ضداکسیدانی گیاه زنیان در هر دو روش PCR و ICR یکسان بود و پیک‌های دارای ضریب رگرسیون منفی تیمول و گاماترپینن شناسایی شدند.

برای گیاه آویشن ترکیبات تیمول، پاراسیمین، گاماترپینن، کارواکرول، کاریوفیلین، بتامیرسن و آلفاپینن با روش‌های PCR و ICR شناسایی شدند، که روش ICR از تعداد فاکتور کمتری استفاده شد و به‌علاوه پیک‌ها با ضریب رگرسیون منفی‌تری به‌دست آمدند.

در نهایت این‌گونه نتیجه گرفته می‌شود که شناسایی تمام اجزای موثر در خاصیت ضداکسیدانی نمونه‌ها با روش‌های دستگامی امکان‌پذیر نیست و تلفیق این روش‌ها با روش‌های کمومتریک، یک روش قابل اعتماد برای تجزیه نمونه‌های واقعی فراهم می‌کند.

## ۶- مراجع

- [1] M. Azimzadeh, MSc thesis, Abourayhan campus, University of Tehran, Tehran, (2009).
- [2] X.J. Yan, J. J. Zhou, G.R. Xie, G. W. A. Milne, *Traditional Chinese Medicines*, Aldershot, Ashgate, (1999).
- [3] V. E. Tyler, *Journal of Natural Products*, **62** (1999) 1589.
- [4] F. Gong, Y. Z. Liang, H. Cui, F. T. Chau, B. T. P. Chau, *Journal of Chromatography A*, **909** (2001) 237.
- [5] F. Gong, Y. Z. Liang, P. S. Xie, A. J. Sung, *Journal of Chromatography A*, **1002** (2003) 25.
- [6] C. Tistaert, B. Dejaegher, G. Chataigné, C. Rivière, N. Nguyen Hoai, M. ChauVan, J. Quetin-Leclercq, Y. Vander Heyden, *Analytica Chimica Acta*, **721** (2012) 35.
- [7] S. Matero, F. van Den Berg, S. Poutiainen, J. Rantanen, J. Pajander, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **102** (2013) 1385.
- [8] P. Comon, *Independent Component Analysis*, Elsevier, (1994).
- [9] D. N. Rutledge, D. Jouan-Rimbaud Bouveresse, *TrAC. Trends in Analytical Chemistry*, **50** (2013) 22.
- [10] A. Hyvärinen, E. Oja, *Neural Computation*, **9** (1997) 1483.
- [11] J. F. Cardoso, A. Souloumiac, *Radar and Signal Processing*, **140** (1993) 362.
- [12] D. Jouan-Rimbaud Bouveresse, A. Moya-González, F. D. N. Ammari, Rutledge, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **112** (2012) 24.
- [13] J. Sun, *Journal of Chemometrics*, **9** (1995) 21.
- [14] J. Chen, X. Z. Wang, *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, **41** (2001) 992.
- [15] D. Oldroyd, *The Arch of Knowledge*, New York, (1986).
- [16] K. S. Booksh, B. R. Kowalski, *Analytical Chemistry*, **66** (1994) 782.

Archive of SID