

## شناسایی ترکیبات با خواص ضداکسیدانی موثر در عصاره‌ی برگ گیاه گردو با استفاده از کروماتوگرافی مایع - طیف‌سنجی جرمی و روش‌های کالبراسیون چندمتغیره خطی

سعید معصوم<sup>۱\*</sup>، ناصر صمدی<sup>۲</sup>، بهاره مهرآرا<sup>۲</sup>، مهرداد اخگری<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup>دانشکده شیمی، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران

<sup>۲</sup>دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۲۷

تاریخ تصحیح: ۹۷/۰۴/۲۲

تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۴/۲۸

### چکیده

برگ گیاه گردو به دلیل اثرات گوناگون در دارو درمانی و طب سنتی شناخته شده است. این گیاه دارای خواص ضداکسیدانی و ضد میکروبی خوبی می‌باشد. در این مطالعه، عصاره‌ی برگ گیاه گردو از مناطق مختلف ایران به‌وسیله‌ی دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا-طیف‌سنجی جرمی مورد تجزیه قرار گرفت. نمونه‌ها از نظر فعالیت بازدارنده رادیکال آزاد، به‌وسیله‌ی سنجش ۲،۲-دی فنیل ۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) مورد آزمایش قرار گرفته و با استفاده از چندین روش کالبراسیون چندمتغیره خطی، شناسایی پیک‌های مسئول خاصیت ضداکسیدانی از پیک‌های کروماتوگرافی صورت پذیرفت. از بین روش‌های مورد مطالعه روش رگرسیون اجزای مستقل به‌دلیل سادگی و تفسیرپذیری ضرایب رگرسیون، برای نشان دادن ترکیبات مسئول فعالیت ضداکسیدانی در نمونه‌ها ترجیح داده می‌شود.

**کلمات کلیدی:** برگ گیاه گردو، کالبراسیون چندمتغیره خطی، ترکیبات مسئول خاصیت ضداکسیدانی، رگرسیون اجزای مستقل.

### ۱- مقدمه

از دیرباز تاکنون، گیاهان دارویی از ارزش و اهمیت خاصی در تامین بهداشت و سلامتی جوامع هم به لحاظ درمان و هم پیشگیری از بیماری‌ها برخوردار هستند. پس از ظهور پزشکی نوین و استفاده گسترده از داروهای شیمیایی، گرایش مردم برخی کشورها به گیاهان دارویی کاهش یافت. اما اکنون پس از حدود یک قرن از حاکمیت مطلق پزشکی نوین، مجدداً طب گیاهی قد برافراشته و استقبال بشر به آن رو به افزایش است [۱].

گیاه گردو با نام علمی *Juglans regia* میوه‌ی مغزدار بارزنی است که منبع عالی پروتئین، فیبر، ویتامین‌ها، ضداکسیدان‌ها و مواد معدنی می‌باشد. برگ درخت گردو دارای ۳ درصد اینوزیت، اسید الاژیک، اسید گالیک و اسانس با بوی مخصوص و مقداری پارافین، تانن، مواد چرب و املاح معدنی مانند کلسیم، پتاسیم، منیزیم، باریوم و هم‌چنین کاروتن است. عصاره برگ درخت گردو سرشار از ضداکسیدان‌های طبیعی می‌باشد و خواص میکروب‌کشی و باکتری‌کشی دارد [۲].

ضداکسیدان‌ها بهترین راه مقابله با رادیکال‌های آزاد می‌باشند. آن‌ها با دادن الکترون به رادیکال‌های آزاد اثر اکسیدکنندگی آن‌ها را خنثی کرده و خود نیز به مواد زایدی تبدیل نمی‌شوند. در این پژوهش، فعالیت پالایشی رادیکال‌های آزاد موجود در عصاره‌ی برگ گیاه گردو با استفاده از ترکیب ۲، ۲-دی فنیل ۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) سنجش می‌شود که ولیوگلو و همکاران گزارش کردند که با ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در گیاه ارتباط خطی دارد [۳]. DPPH ترکیبی است بنفش‌رنگ که به دلیل حضور گروه فنیل در ساختارش به راحتی به صورت رادیکال درآمده و در واقع منبع رادیکال آزاد می‌باشد. این ترکیب با گرفتن یک الکترون از ترکیب ضداکسیدان، از رنگ بنفش به زرد، تغییر رنگ می‌دهد.

اثرانگشت کروماتوگرافی به دست آمده از عصاره استخراج شده از یک نمونه گیاهی حاوی پیک‌های فراوان و متعددی است که حاوی متغیرهای زیادی می‌باشد. اگرچه بررسی محتوای اطلاعاتی اثر انگشت‌ها با اندازه‌گیری سطح زیر پیک، ارتفاع پیک و یا زمان بازداری هر یک از پیک‌های مستقل امکان‌پذیر می‌باشد ولی حجم محاسبات بسیار سنگین خواهد شد. در صورتی که پیک‌های همپوشانی شده در کروماتوگرام حاصل وجود داشته باشد، بخشی از اطلاعات در نظر گرفته نمی‌شوند و در نتیجه تصویر واضحی از ساختار گیاه حاصل نخواهد شد که این امر موجب می‌گردد تا تجزیه کمی مخلوط‌های پیچیده، تعیین خواص، ساختار و تشخیص منشا شیمیایی گیاه به راحتی امکان‌پذیر نباشد و تفسیر جامعی از اطلاعات شیمیایی به دست آمده از اثرانگشت‌های کروماتوگرافی حاصل نشود. تنها راه حل ممکن در این زمینه ایجاد یک مدل برای اطلاعات شیمیایی است تا بتوان به کمک آن دید مناسبی نسبت به گیاه پیدا کرد که این کار از طریق روش‌های آماری و به عبارتی توسط روش‌های کمومتریک محقق می‌گردد. ترکیب داده‌های حاصل از کروماتوگرام‌های حاصل از کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا و داده‌های به دست آمده از خواص ضداکسیدانی با روش‌های کمومتریک به ما اجازه می‌دهد تا پیک‌های مسئول خاصیت ضداکسیدانی را مشخص کنیم. در این پژوهش داده‌های کروماتوگرافی (شامل داده‌های HPLC-DAD) به صورت ماتریس  $X$  استخراج شده و پس از اعمال روش‌های پیش‌پردازش مناسب شامل تمرکز بر میانگین<sup>۱</sup>، بهنجارسازی<sup>۲</sup> و همبستگی بین همسازشده‌ی بهینه<sup>۳</sup> [۴]، همراه با داده‌های به دست آمده از خاصیت ضداکسیدانی به عنوان بردار  $y$ ، جهت تجزیه و تحلیل آماری مورد بررسی قرار می‌گیرند.

<sup>1</sup> Mean centering

<sup>2</sup> Normalization

<sup>3</sup> Correlation optimized warping (COW)

با استفاده از روش‌های کالیبراسیون چندمتغیره شامل رگرسیون جزء اصلی<sup>۱</sup> [۵ و ۶]، رگرسیون حداقل مربعات جزئی<sup>۲</sup> [۷ و ۸]، تصحیح علامت متعامد<sup>۳</sup> [۹ و ۱۰]، تصویرسازی متعامد ساختارهای نهفته<sup>۴</sup> [۱۱ و ۱۲]، رگرسیون جزء مستقل<sup>۵</sup> [۱۳-۱۵] و با رسم نمودارهای متغیرها بر حسب ضریب رگرسیون، پیک‌های مسئول خاصیت ضداکسیدانی، خود را به صورت منفی نشان می‌دهند. از آنجایی که استقلال از مرتبه‌ی آماری بالاتر از تعامد برخوردار است اطلاعات حاصل از روش ICR نسبت به سایر روش‌های بحث شده در این پژوهش از اهمیت و جامعیت بیشتری برخوردار است. روش ICR قدرت بیشتری در تجزیه مجموعه داده‌های چندمتغیره دارد زیرا آمار درجه بالاتر ICها می‌تواند خواص ذاتی سیگنال‌های مخلوط را بهتر نشان بدهد و این روش، بهبود تفسیر ضریب رگرسیون را به همراه دارد [۱۳-۱۵]. در مرحله‌ی نهایی با استفاده از دستگاه طیف‌سنجی جرمی، پیک‌های مسئول شناسایی شده و به این طریق، نام ترکیب مورد نظر که عامل ایجادکننده خاصیت ضداکسیدانی می‌باشد مشخص می‌گردد.

نومی و همکاران در تحقیقی در سال ۲۰۱۲ به بررسی خواص ضداکسیدانی و شناسایی اجزای فنولی تشکیل‌دهنده‌ی عصاره‌ی اتیل استاتی گیاه گردوی تونس با استفاده از کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا پرداخته‌اند [۱۶]. در تحقیقی دیگر جلیلی و همکاران در سال ۲۰۱۲ محتوای فنولی برگ گردوی ایرانی را در نمونه خاک‌های متفاوت بررسی و این اجزا را با استفاده از کروماتوگرافی مایع - طیف‌سنجی جرمی شناسایی نموده‌اند [۱۷]. هم‌چنین رگوییرو و همکاران در پژوهشی دیگر در سال ۲۰۱۴، اجزای پلی‌فنول در گردو را با به‌کارگیری کروماتوگرافی مایع تلفیقی با طیف‌سنجی شناسایی نمودند [۱۸]. در مورد شناسایی ترکیبات موثر در خواص ضداکسیدانی، تحقیقی در مورد گیاه مالتوس بومی ویتنام و چین توسط تیسارت و همکاران در دانشگاه بلژیک در سال ۲۰۰۹ و ۲۰۱۲ صورت گرفته است [۱۹ و ۲۰]. در تحقیقاتی دیگری، معصوم و همکاران علاوه بر تعیین اجزای اسانس گونه‌های مختلف آویشن و زنیان و تعیین خاصیت ضداکسیدانی هر یک از آن‌ها، ارتباط بین خاصیت ضداکسیدانی و اجزای تشکیل‌دهنده اسانس را توسط روش‌های مختلف کالیبراسیون چندمتغیره بررسی و اجزای موثر در خاصیت ضداکسیدانی در ترکیب اسانس را شناسایی نموده‌اند [۲۱ و ۲۲].

## ۲- بخش تئوری

### ۲-۱- هم‌بستگی بین هم‌سازشده‌ی بهینه

<sup>1</sup> Principal components regression (PCR)

<sup>2</sup> Partial least squares (PLS)

<sup>3</sup> Orthogonal signal correction (OSC)

<sup>4</sup> Orthogonal projections to latent structures (OPLS)

<sup>5</sup> Independent component regression (ICR)

به علت تغییرات ظریف پارامترهای دستگاهی، جابه‌جایی پیک‌ها در یک نمونه‌ی مشابه امری طبیعی می‌باشد لذا در بعضی موارد برای دستیابی به نتایج بهتر، نیاز به هم‌ترازسازی طیف‌ها احساس می‌گردد. در روش هم‌بستگی بین هم‌سازشده‌ی بهینه یا COW که در بین سایر روش‌هایی که به این منظور ابداع شده‌اند پرکاربردتر است، با استفاده از یک عملیات ریاضی طیف‌ها جابه‌جا شده و با حفظ اطلاعات موجود در داده‌ها شامل شکل و سطح زیر پیک، موقعیت‌های مشابه در یک مکان قرار می‌گیرند. در این روش کروماتوگرام‌های نمونه نسبت به کروماتوگرام مرجع به کمک کشیده شدن یا جمع کردن تکه‌ای از طیف نمونه با استفاده از درون یابی خطی هم‌تراز می‌شوند.

در این روش دو پارامتر اندازه‌ی قطاع و اندازه‌ی قطعه از طریق یک فرآیند بهینه‌سازی انتخاب می‌شوند. در روش COW باید نمونه‌ای به‌عنوان مرجع انتخاب شود که بیشترین شباهت را با نمونه‌ی واقعی داشته باشد. تعداد کشیده شدن و فشرده شدن مشخصی برای هر قطعه مورد نیاز است که با پارامتر اندازه‌ی قطاع کنترل می‌شود. به‌عنوان مزیت این روش می‌توان ذکر کرد که برای استفاده از این روش هیچ اطلاعاتی در مورد شناخت نمونه مورد نیاز نیست ولی به هر حال عیب این روش این است که در صورتی که تعداد داده‌ها زیاد باشد روش وقت‌گیری است [۴].

## ۲-۲- تجزیه اجزای اصلی<sup>۱</sup>

تجزیه اجزای اصلی، روشی قدیمی و رایج در تجزیه چندمتغیره می‌باشد. این روش می‌تواند برای فشرده‌کردن مجموعه‌ای از داده‌ها با ابعاد زیاد به ابعاد کمتر برای ماتریس  $X$  با ابعاد  $n \times m$  مورد استفاده قرار بگیرد، جایی که  $n$  نشان‌دهنده‌ی تعداد سطرها (نمونه‌ها) و  $m$  نشان‌دهنده‌ی تعداد ستون‌ها (در این پژوهش زمان‌های بازداری) می‌باشد. در روش تجزیه اجزای اصلی کاهش ابعاد داده‌ها در حد امکان، با حفظ بیشترین اطلاعات صورت می‌گیرد. در این روش، اولین جزء اصلی ( $PC_1$ ) همیشه دارای بالاترین واریانس می‌باشد و دومین جزء اصلی ( $PC_2$ ) که مستقل از جزء اول می‌باشد شامل بیشترین تغییرات بعدی است که توسط جزء اول توصیف نگردیده و عمود بر جزء اصلی اول می‌باشد [۲۳].

## ۲-۳- رگرسیون جزء اصلی

در روش رگرسیون جزء اصلی، از طریق اجرای یک PCA روی داده‌های اولیه، تعداد متغیرهای پیش‌بینی کننده کاهش می‌یابد. مهمترین مزیت رگرسیون جزء اصلی این است که در مرحله‌ی مدل‌سازی، تعداد کمتری از متغیرها در مقایسه با تعداد زیاد متغیرهای اصلی استفاده می‌گردد. مدل رگرسیون جزء اصلی با معادله‌ی زیر معرفی می‌گردد.

$$Y = TB + E \quad (1-1)$$

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

که در آن  $Y$  متغیر وابسته،  $T$  اسکور حاصل از مرحله‌ی PCA و  $B$  ضریب رگرسیون است که محاسبه می‌گردد. در این معادله  $E$  نماینده‌ی خطای باقیمانده می‌باشد. در روش حداقل مربعات معمولی ضریب رگرسیون از فرمول زیر به دست می‌آید:

$$B = (T^T T)^{-1} (T^T Y) \quad (2-1)$$

نماد  $T^T$  وقتی به کار می‌رود که ماتریس  $T$  را ترانزپوز می‌کنیم [۶ و ۵].

#### ۲-۴- رگرسیون حداقل مربعات جزئی

روش رگرسیون حداقل مربعات جزئی روشی رایج و قدرتمند برای ساختن مدل‌های پیشگویی می‌باشد و به‌ویژه هنگامی مفید است که ما نیاز به پیشگویی مجموعه‌ای از متغیرهای وابسته از مجموعه‌ی بزرگی از متغیرهای مستقل داشته باشیم. به عبارتی دیگر، PLS یک روش رگرسیون متغیر پنهان برای به دست آوردن بردار وابسته‌ی  $Y$  به وسیله‌ی ماتریس پیش‌گویی  $X$  می‌باشد. در روش PLS متغیرهایی که همبستگی بالایی با متغیرهای پاسخ نشان می‌دهند در پیش‌بینی موثرتر خواهند بود و وزن بیشتری می‌گیرند. برخلاف روش رگرسیون جزء اصلی که فقط از ماتریس  $X$  جهت تعیین جزء اصلی استفاده می‌شود در روش PLS علاوه بر ماتریس  $X$  از بردار  $Y$  هم بهره گرفته می‌شود، لذا این روش نقش موثرتری در مدل‌سازی ایفا می‌کند.

#### ۲-۵- تصحیح علامت متعامد

از روش تصحیح علامت برای جدا کردن تغییرات سیستماتیک ناخواسته از ماتریس پاسخ  $X$  که ناهمبسته و متعامد نسبت به بردار خواص  $Y$  هستند و باعث پیچیدگی و نوفه‌دار شدن مدل می‌گردند استفاده می‌شود. در روش تصحیح علامت متعامد یا OSC امکان حذف اجزای دوسویه از  $X$  که عمود بر  $Y$  هستند بررسی می‌شود و از حذف اطلاعات مهم و ضروری برای توصیف آنالیت جلوگیری می‌کند. فیلتر OSC می‌تواند به‌عنوان یک مرحله‌ی پیش‌پردازش متقدم برای جداسازی نوفه از  $X$  استفاده شود. مدل OSC می‌تواند به‌وسیله‌ی معادله زیر توصیف شود:

$$X' = X - t_{osc} p_{osc}^T \quad (3-1)$$

که در آن  $X' = X w_{osc}$  و  $t_{osc} = 0$  و  $y^T t_{osc} = 0$  می‌باشد.  $w_{osc}$  و  $p_{osc}$  به ترتیب بردارهای اسکور، لودینگ و وزن عمود بر  $Y$  می‌باشند.  $X'$  ماتریس فیلتر OSC است که متعاقباً در مدل رگرسیون متغیر پنهان استفاده می‌شود.

#### ۲-۶- تصویرسازی متعامد ساختارهای نهفته

در روش رگرسیون خطی تصویرسازی متعامد ساختارهای نهفته که اولین بار توسط تیگ و ولد معرفی گردید متغیرهای موجود در  $X$  که با  $Y$  همبستگی ندارد و بر  $Y$  عمود می‌باشند از داده‌های اولیه حذف گردیده و بدین طریق پیچیدگی مدل را کاهش یافته و به تفسیر آن بهبود می‌بخشند. سادگی مدل OPLS که شکل اصلاح شده‌ی مدل PLS معمولی می‌باشد باعث شده که

این روش به روشی پرکاربرد تبدیل گردد. در روش OPLS متغیرهای هم‌بسته و غیرهم‌بسته از هم جدا شده و حد تشخیص اسکور بهبود پیدا می‌کند [۱۱ و ۱۲].

## ۲-۷- تجزیه اجزای مستقل<sup>۱</sup>

روش تجزیه‌ی اجزای مستقل، یک روش جداسازی منبع کور است که هدف آن به‌دست آوردن سیگنال‌های منبع اصلی و نسبت آن‌ها در مخلوط‌های تجزیه‌ای ناشناخته است. با کمک این روش می‌توان سیگنال‌های مستقل را از مجموعه‌ی سیگنال‌های مشاهده شده شناسایی کرد.

در واقع مدل ICA حاصل ضرب دو ماتریس  $A$  و  $S$  می‌باشد که معادله‌ی آن به‌صورت زیر نشان داده می‌شود:

$$X = AS \quad (۴-۱)$$

که پارامتر  $A$  ماتریس مخلوط‌کننده و پارامتر  $S$  ماتریس اجزای مستقل می‌باشد.

هدف ICA پیدا کردن یک ارائه‌ی خطی مناسب از بردارهای غیرگوسینی است که در آن بردارهای تخمین‌زده شده مستقل هستند و مخلوط سیگنال‌ها می‌تواند به‌وسیله‌ی ترکیب خطی این اجزای مستقل مشخص شوند. مدل ICA بدون نوفه بسیار شبیه روش PCA می‌باشد که در آن سیگنال‌های مخلوط به‌وسیله‌ی ترکیب خطی بعضی از اجزای اصلی عمود مشخص می‌شوند. مهمترین تفاوت ICA و PCA معیارهای متفاوتی است که در ارائه‌ی خطی دارند که در اولی پیدا کردن ICهای مستقل و در دومی پیدا کردن PCهای عمود است [۱۳].

در سال‌های اخیر دو روش مبتنی بر داده‌های آزمایشگاهی برای تعیین تعداد بهینه‌ی اجزای مستقل یا ICs معرفی شده‌اند. روش اول به‌وسیله‌ی شکافتن ماتریس داده‌ها به دو یا چند قطعه با اندازه‌ی تقریباً معادل آغاز می‌گردد. نمونه‌ها در هر یک از این قطعه‌ها نماینده‌ی تمام ماتریس داده هستند. سپس مدل‌های مختلفی از ICA با ۱ تا  $A$  جزء مستقل برای هر یک از این قطعه‌ها محاسبه می‌شود (روش ICA-by-Blocks). روش دوم روش معیار Durbin – Watson می‌باشد که به‌عنوان ابزاری برای تعیین نسبت سیگنال به نوفه در سیگنال‌ها تعریف گردیده است. در این روش ابتدا مدل‌های مختلفی از ICA با ۱ تا  $A$  جزء مستقل ایجاد می‌شود ولی این تفاوت وجود دارد که ساخت این مدل‌ها با استفاده از تمام داده‌های موجود صورت می‌پذیرد. پس از استخراج اجزای مستقل از ماتریس اصلی، معیار Durbin – Watson روی نمونه‌ها در ماتریس باقی‌مانده اعمال می‌شود. از طریق رابطه‌ی ۵-۱ می‌توان این معیار را محاسبه نمود.

$$DW = \frac{\sum_{i=2}^n (s(i) - s(i-1))^2}{\sum_{i=1}^n s(i)^2} \quad (۵-۱)$$

<sup>۱</sup> Independent component analysis (ICA)

در این رابطه  $S(i)$  داده‌ی  $i$ ام در ماتریس  $S$  می‌باشد. هنگامی که مقدار معیار دوربین - واتسون به صفر میل کند در سیگنال هیچ نوفه‌ای وجود ندارد و فاکتور مورد نظر، معنی‌دار می‌باشد اما هنگامی که این معیار به ۲ میل کند سیگنال فقط شامل نوفه می‌باشد و می‌تواند کنار گذاشته شود. هر دو روش تعیین اجزای مستقل، نتایج رضایت‌بخش و مشابهی می‌دهند [۱۴].

### ۲-۸- رگرسیون جزء مستقل

روش رگرسیون جزء مستقل بر اساس روش تجزیه اجزای مستقل توسط چن و وانگ معرفی شد. الگوریتم کامل این روش بسیار شبیه با روش رگرسیون جزء اصلی (PCR) می‌باشد تنها تفاوت در استفاده از ICها و ماتریس ضربیشان در روش ICR به جای استفاده از PCها و ماتریس اسکور در روش PCR می‌باشد. از آنجایی که استقلال از مرتبه‌ی آماری بالاتر از تعامد برخوردار است اطلاعات حاصل از روش ICR از روش PCR از اهمیت و جامعیت بیشتری برخوردار است و روش ICR قدرت بیشتری در تجزیه مجموعه داده‌های چندمتغیره دارد، زیرا آمار درجه بالاتر ICها می‌تواند خواص ذاتی سیگنال‌های مخلوط را بهتر نشان بدهد. در روش ICR ابتدا بر اساس روش ICA ماتریس مخلوط‌کننده (A) به دست می‌آید و سپس با استفاده از فرمول  $y = AB$  که در آن  $y$  بیانگر کمیت اندازه‌گیری شده مانند خاصیت ضداکسیدانی گیاهان است، ماتریس ضرایب (B) تعیین می‌شود [۱۵].

### ۳- بخش تجربی

#### ۳-۱- مواد شیمیایی مورد نیاز

مواد شیمیایی مورد استفاده در این مطالعه عبارتند از: متانول HPLC grade تهیه شده از شرکت سیگماآلدریج با درجه خلوص  $< 99/9$  درصد، آب HPLC grade تهیه شده از شرکت Chem Lab با درجه خلوص  $< 99/9$  درصد، استونیتریل HPLC grade تهیه شده از شرکت سیگماآلدریج با درجه خلوص  $< 99/9$  درصد، فرمیک اسید تهیه شده از شرکت پانریک با درجه خلوص  $< 99/9$  درصد و ۲، ۲-دی فنیل ۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) تهیه شده از شرکت جنا با درجه خلوص ۹۹ درصد.

#### ۳-۲- وسایل مورد نیاز

و وسایل مورد استفاده در این مطالعه عبارتند از: کیف شیشه‌ای، کاغذ صافی واتمن، ارلن مایر، روتاری، شیشه ساعت، بالن حجمی ۵ و ۱۰، ۱۰۰ میلی‌لیتری، پی‌پت ۱ و ۲ میلی‌لیتری، لوله آزمایش، آسیاب، الک مش ۲۰، شیشه‌ی نگهداری عصاره، فیلتر سرسرنگی مخصوص HPLC.

#### ۳-۳- روش‌های انجام آزمایش

پس از بررسی خاصیت ضداکسیدانی عصاره‌ی برگ گیاه گردو و با توجه به بالا بودن خاصیت ضداکسیدانی عصاره این گیاه با استفاده از روش رادیکال DPPH، برگ گیاه گردو، برای بررسی و پژوهش انتخاب گردید.

### ۳-۴- جمع‌آوری، خشک و آسیاب کردن گیاه

ابتدا حدود ۲ کیلوگرم برگ گیاه گردو در زمان مناسب برای گرفتن عصاره‌ی این گیاه (اواخر تیرماه و اوایل مردادماه) از ۱۶ ناحیه مختلف ایران (ارمک، بروجن، دُرّه، قمصر، همدان، خرقان، خوی، محلات، مرق، میاندوآب، نراق، نیاسر، نور، نشوه، ارومیه و زنجان) جمع‌آوری شد. برگ‌های تازه و جوان این گیاه جمع گردید و در سایه به مدت یک هفته کاملاً خشک گردید. پس از خشک کردن، برگ‌ها آسیاب گردیده و پودر برگ‌های خشک شده، پس از عبور از الک مش ۲۰ برای عصاره‌گیری آماده شد.

### ۳-۵- عصاره‌گیری

برای گرفتن عصاره‌ی برگ گیاه گردو، از روش ماسراسیون استفاده شد با این تفاوت که مدت زمان مورد نیاز به دلیل استفاده از حمام فرا صوت تسریع گردید. در این روش، ۵۰ گرم از برگ گیاه را با ۵۰۰ میلی‌لیتر متانول در یک ارلن ریخته و ارلن را به مدت یک روز در شیکر قرار می‌دهیم، سپس مخلوط را به مدت ۲ ساعت در حمام فراصوت با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار می‌دهیم. مخلوط حاصل را با استفاده از کاغذ صافی با اندازه منافذ ۲۴۰ نانومتر صاف نموده و محلول زیر صافی را با استفاده از روتاری تا خشک شدن کامل عصاره مورد نظر، حلال‌زدایی می‌کنیم.

### ۳-۶- روش اندازه‌گیری خاصیت ضداکسیدانی

برای اندازه‌گیری خاصیت ضداکسیدانی ابتدا محلول DPPH با غلظت ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر را ساخته و سپس محلول حاصل را با نمونه واکنش می‌دهیم. برای تهیه محلول‌های نمونه، ابتدا ۲۰ میلی‌گرم از نمونه‌های عصاره را با متانول به حجم ۵ میلی‌لیتر رسانده و سپس از این محلول مادر، چهار غلظت در محدوده‌ی غلظتی ۱۰ تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با رقیق کردن با متانول تهیه می‌شود. سپس ۲ میلی‌لیتر از محلول DPPH به ۲ میلی‌لیتر از هر یک از نمونه‌های تهیه شده اضافه می‌گردد. محلول شاهد نیز با اضافه کردن ۲ میلی‌لیتر محلول DPPH به ۲ میلی‌لیتر متانول تهیه می‌گردد. از هر غلظت سه نمونه ساخته شد. محلول‌های حاصل به مدت ۷۰ دقیقه در تاریکی قرار داده می‌شوند تا واکنش آن‌ها کامل گردد. سپس جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر در برابر شاهد متانول برای همه‌ی نمونه‌ها اندازه‌گیری می‌شود. میانگین جذب محاسبه و با استفاده از رابطه‌ی ۱-۶ درصد بازدارندگی به دست می‌آید.

$$\%I = (A_{\text{شاهد}} - A_{\text{نمونه}}) / A_{\text{شاهد}} \times 100 \quad (6-1)$$

که در این فرمول،  $A_{\text{شاهد}}$  جذب شاهد و  $A_{\text{نمونه}}$  جذب نمونه پس از ۷۰ دقیقه در طول موج ۵۱۷ نانومتر است.

سپس،  $IC_{50}$  را برای هر یک از نمونه‌های عصاره به دست می‌آوریم. در اینجا  $IC_{50}$ های به دست آمده بردار  $y$  و طیف HPLC-DAD ماتریس  $X$  را تشکیل می‌دهد.

### ۳-۷- آنالیز آماری



نرم افزار مورد استفاده ما برای پردازش داده‌ها در این پژوهش MATLAB<sup>TM</sup> 8.2 می‌باشد. این محیط عمدتاً جهت کار با داده‌های ماتریسی و اجرای توابع بی‌شمار ریاضی طراحی گردیده است. روش‌های PCR، PLS و OSC-PLS با استفاده از جعبه ابزار نصب شده روی برنامه ی MATLAB به نام PLS toolbox صورت می‌پذیرد که این جعبه ابزار محصول شرکت Eigen vector research می‌باشد

#### ۴- بخش دستگاهی

دستگاه‌های مورد استفاده در این مطالعه عبارتند از: طیف‌سنجی مرئی- فرابنفش مدل Biowave II آلمان، دستگاه HPLC مدل Agilent 1100 آمریکا، حمام فراصوت Elmasonic S30H آلمان، طیف‌سنج جرمی Biosystems AP1100 آمریکا.

#### ۴-۱- تزریق عصاره به دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا

برای تزریق نمونه‌های عصاره به دستگاه HPLC ابتدا ۷/۵ میلی‌گرم از عصاره را با متانول به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده و سپس مخلوط را به مدت ۳ دقیقه در حمام فراصوت با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده تا مخلوط در متانول کاملاً حل گردد. سپس محلول حاصل را از فیلتر سر سرنگی مخصوص HPLC عبور داده تا برای ستون HPLC مشکل ساز نباشد. محلول به دست آمده آماده‌ی تزریق به دستگاه HPLC می‌باشد. مشخصات و شرایط دستگاه HPLC مورد استفاده به شرح ذیل می‌باشد: ستون Agilent C18 (SB-C18) با طول ۲۵۰ میلی‌متر، قطر داخلی ۴/۶ میلی‌متر و قطر ذرات ۳/۵ میکرومتر، همراه با فاز متحرک استونیتریل و مخلوط آب و ۰/۱ درصد اسید فرمیک، سرعت جریان حلال ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه، آشکارساز آرایه‌ی دیودی، حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر و زمان کل شویش ۳۷ دقیقه.

برای انتخاب برنامه‌ی شستشو، پس از بررسی میزان کیفیت جداسازی پیک‌های به دست آمده توسط حلال‌های مختلف متانول - آب، استونیتریل - آب و استونیتریل - متانول، حلال‌های استونیتریل - آب انتخاب شد و با توجه به این‌که استفاده از مخلوط آب با اسید فرمیک به جای آب خالص، باعث جداسازی بیشتر و بهتر پیک‌ها می‌گردد حلال‌های استونیتریل - آب + ۰/۱ درصد اسید فرمیک برای ادامه‌ی کار انتخاب گردیدند. برنامه‌ی شستشوی نمونه در جدول ۱ خلاصه گردیده است:

جدول ۱- برنامه‌ی شستشوی نمونه‌ی عصاره‌ی گردو در دستگاه HPLC

#### ۴-۲- تزریق عصاره به دستگاه HPLC-MS

برای تزریق نمونه‌ی عصاره‌ی برگ گردو، مشخصات دستگاه HPLC-MS به این قرار است: دستگاه HPLC با ستون Agilent C18 (SB-C18) با طول ۲۵۰ میلی‌متر، قطر داخلی ۴/۶ میلی‌متر و قطر ذرات ۳/۵ میکرومتر. فاز متحرک شامل حلال‌های استونیتریل و آب با ۰/۱ درصد اسید فرمیک، با سرعت جریان حلال ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه، حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر و زمان کل شویش برابر با ۳۷ دقیقه. دستگاه طیف‌سنج جرمی با نوع تجزیه‌گر جرمی چهارقطبی و منبع یونیزاسیون الکتروافشانه در حالت منفی با محدوده ی m/z از ۱۰۰ تا ۱۵۰۰ و ولتاژ منبع ۳/۵ کیلو ولت.

#### ۵- نتایج و بحث

##### ۵-۱- تعیین خاصیت ضداکسیدانی نمونه‌های عصاره برگ گردو

مقدار IC <sub>50</sub> هریک از نمونه‌های DPPH اندازه‌گیری شد. در	طبق روش ذکر شده در بند ۳-۶	
	زمان بر حسب دقیقه	درصد حلال استونیتریل
هریک از نمونه‌های عصاره برگ	۰	۱۵
هرچه مقدار IC <sub>50</sub> کوچک باشد	۱۲	۴۰
تخریب رادیکال‌های آزاد نیاز	۱۸	۶۰
ضداکسیدانی بیشتری می‌باشد. با	۲۰	۸۰
مشاهده می‌شود که در	۲۸	۸۵

توجه به نتایج به‌دست آمده عصاره‌های برگ گیاه گردو، همه نمونه‌های مختلف جمع‌آوری شده، دارای خاصیت ضداکسیدانی قوی هستند که از میان آن‌ها نمونه‌ی دره دارای بیشترین خاصیت ضداکسیدانی و نمونه‌ی ارمک دارای کمترین خاصیت ضداکسیدانی می‌باشند.

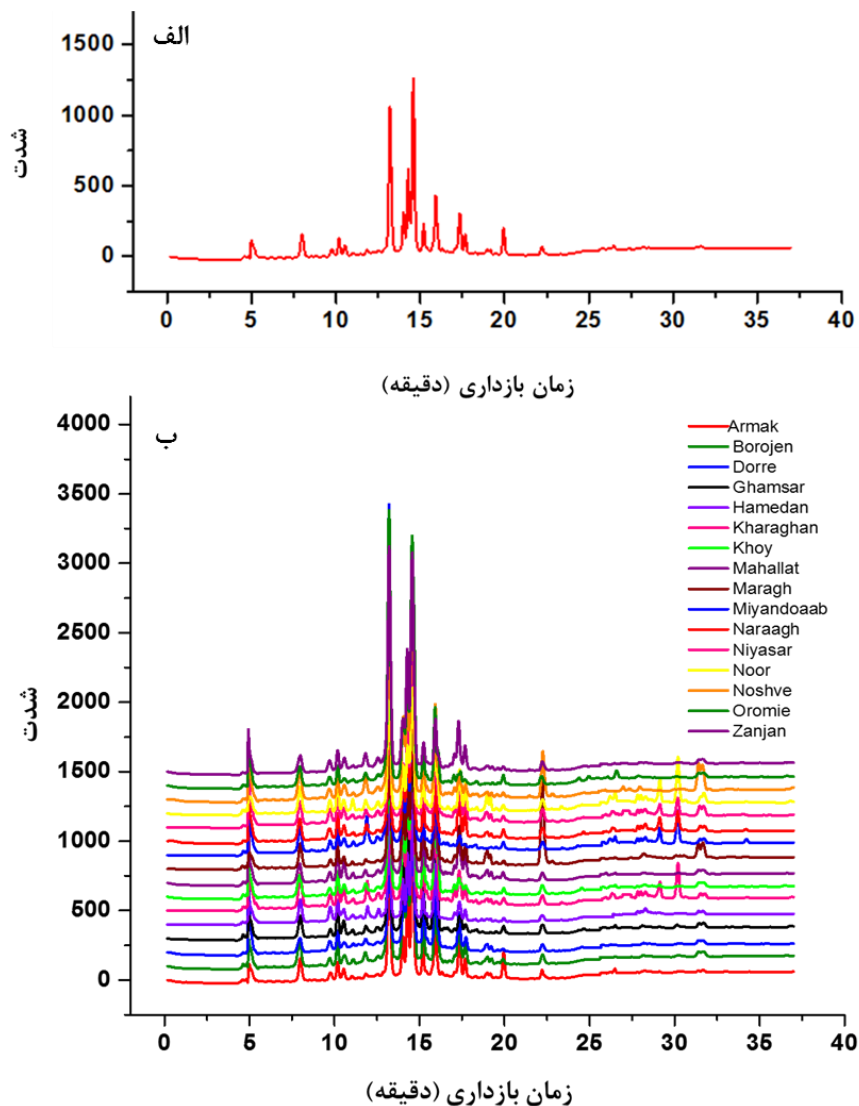
جدول ۲- میزان IC<sub>50</sub> برای عصاره‌های برگ گیاه گردو در مناطق مختلف

نام نمونه	نام علمی	منطقه‌ی برداشت	IC <sub>50</sub>
برگ گردو	Juglans regia L.	ارمک	۵۰/۲۵
برگ گردو	Juglans regia L.	بروجن	۳۴/۷۰

۱۳/۷۹	دره	Juglans regia L.	برگ گردو
۲۵/۳۵	قمصر	Juglans regia L.	برگ گردو
۲۰/۱۲	همدان	Juglans regia L.	برگ گردو
۲۳/۹۰	خرقان	Juglans regia L.	برگ گردو
۲۵/۷۵	خوی	Juglans regia L.	برگ گردو
۲۰/۱۰	محلات	Juglans regia L.	برگ گردو
۲۱/۹۲	مرق	Juglans regia L.	برگ گردو
۱۷/۳۵	میاندوآب	Juglans regia L.	برگ گردو
۱۶/۱۹	نراق	Juglans regia L.	برگ گردو
۱۶/۳۴	نیاسر	Juglans regia L.	برگ گردو
۳۱/۹۹	نور	Juglans regia L.	برگ گردو
۲۵/۱۸	نشوه	Juglans regia L.	برگ گردو
۱۹/۶۳	ارومیه	Juglans regia L.	برگ گردو
۱۸/۰۹	زنجان	Juglans regia L.	برگ گردو

#### ۵-۲- اجرای روش‌های کالیبراسیون چندمتغیره روی خواص ضداکسیدانی عصاره برگ گردو

پس از بهینه‌سازی و حاصل‌شدن کروماتوگرام‌های مطلوب، کروماتوگرام‌ها توسط نرم افزار ORIGIN رسم گردیدند که در شکل ۱ قابل مشاهده می‌باشد. شکل ۱- الف) کروماتوگرام نمونه ارمک و شکل ۱- ب) کروماتوگرام‌های نمونه‌های مختلف عصاره‌ی گردو با غلظت ۰/۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر را نشان می‌دهد. برای بررسی داده‌های حاصل از کروماتوگرافی باید ابتدا آن‌ها را برای ورود به نرم افزار MATLAB آماده کرد. با پایش کروماتوگرام‌ها هر ۰/۰۰۶۶۶ دقیقه، شدت کروماتوگرام‌ها که همان ارتفاع محور  $y$  است به‌دست می‌آید. با در نظر گرفتن این نکته که زمان کل شویس در HPLC برای عصاره‌ی برگ گیاه گردو، ۳۷ دقیقه به‌دست آمد و با توجه به این که تعداد نمونه‌های برگ گردو مورد پژوهش قرار گرفته، ۱۶ عدد بود، یک ماتریس  $۱۶ \times ۵۵۲۵$  به‌دست می‌آید که همان ماتریس  $X$  می‌باشد.

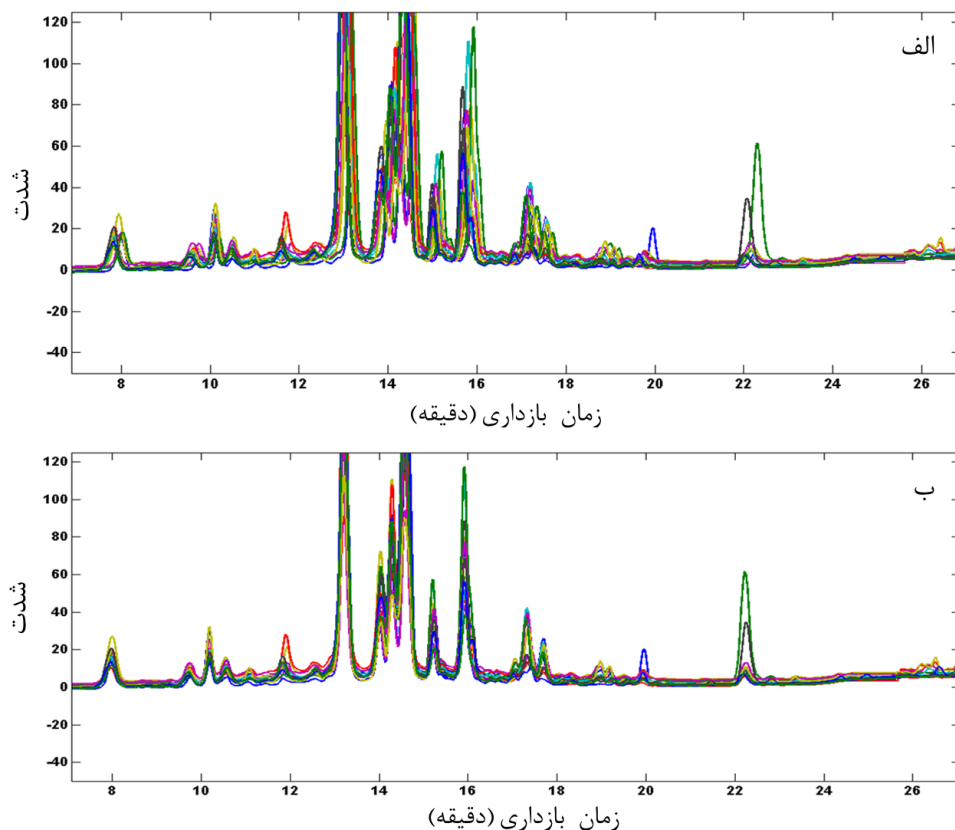


شکل ۱- الف) کروماتوگرام نمونه ارمک، ب) کروماتوگرام‌های نمونه‌های مختلف عصاره‌ی گردو با غلظت ۰/۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در طول موج ۲۵۴ نانومتر، فاز متحرک استونیتریل و مخلوط آب + ۰/۱ درصد اسید فرمیک و سرعت جریان حلال ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه

### ۵-۳- هم‌ترازسازی کروماتوگرام‌ها با استفاده از پیش‌پردازش هم‌بستگی بین هم‌سازشده‌ی بهینه

به‌علت ناپایداری‌ها و نوسانات دستگاهی و خطاهای شخصی موقع تزریق نمونه، پیک‌های به‌دست آمده از نمونه‌های عصاره مختلف کاملاً بر هم منطبق نمی‌باشند، برای همین لازم است در ابتدا و قبل از شروع هر گونه تجزیه و تحلیل روی داده‌ها ابتدا داده‌ها را با استفاده از پیش‌پردازش COW هم‌ترازسازی کنیم تا موقعیت‌های مشابه در یک مکان قرار بگیرند. در ابتدا کروماتوگرامی که دارای جدایی پیک‌های بهتر و نوفه‌ی کمتری است به‌عنوان هدف انتخاب شده و بقیه کروماتوگرام‌ها با آن هم‌تراز می‌گردند. در نمونه‌ی عصاره‌ی برگ گردو، اندازه‌ی قطعه ۲۲۱ و اندازه‌ی قطاع ۲۵ مناسب‌ترین مقدار جهت هم‌ترازی می‌باشد. شکل ۲ تفاوت موقعیت کروماتوگرام‌ها را قبل و بعد از استفاده از COW نشان می‌دهد. همان‌طور که در این شکل

مشاهده می‌شود هم‌ترازی موجب قرار گرفتن موقعیت‌های مشابه پیک‌ها به روی هم می‌گردد. به دلیل بهبود مدل‌سازی و به دست آوردن نمودارهای هموارتر ما در ادامه برای اجرای مدل‌های کالیبراسیون چندمتغیره از داده‌های هم‌تراز شده استفاده نمودیم.

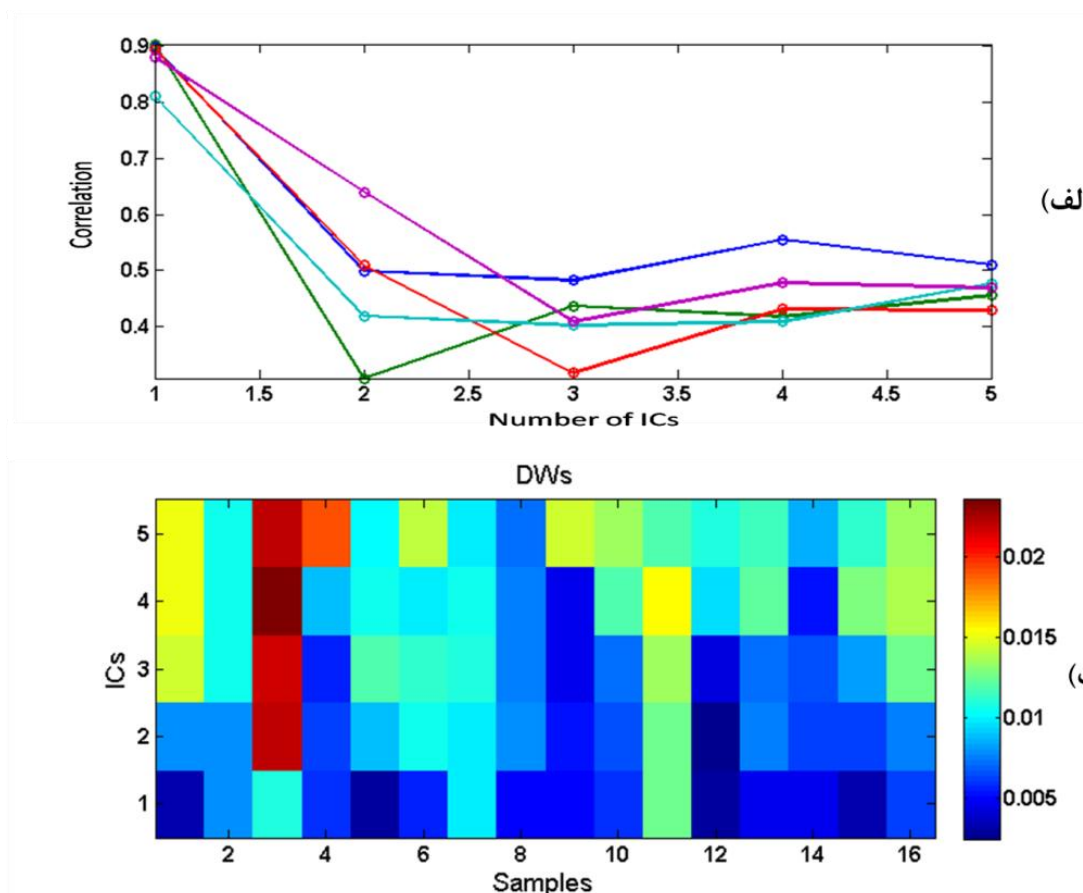


شکل ۲- محدوده‌ای از کروماتوگرام‌های نمونه‌ی برگ گردو با غلظت  $0/75$  میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در طول موج  $254$  نانومتر، فاز متحرک استونیتریل و مخلوط آب  $+ 0/1$  درصد اسید فرمیک و سرعت جریان حلال  $0/5$  میلی‌لیتر بر دقیقه (الف) قبل از هم‌ترازسازی با COW (ب) بعد از هم‌ترازسازی با COW

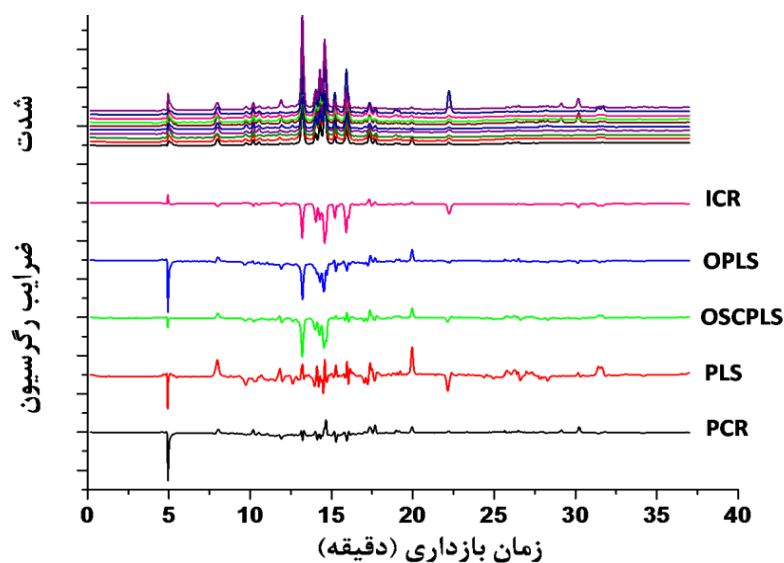
#### ۵-۴- اجرای روش‌های کالیبراسیون چندمتغیره روی خواص ضداکسیدانی عصاره برگ گردو

پس از فراخوانی ماتریس  $X$  (داده‌های حاصل از دستگاه HPLC-DAD) و بردار  $y$  (خاصیت ضداکسیدانی نمونه‌های عصاره‌ی گردو) در نرم افزار MATLAB، روی کروماتوگرام‌های هم‌ترازسازی شده با نرم افزار COW روش‌های مختلف کالیبراسیون چندمتغیره اعم از PCR، PLS، OSC-PLS، OPLS و ICR با پیش‌پردازش‌های متفاوت انجام می‌پذیرد. برای اجرای مدل ICR قبل از هر چیز باید تعداد اجزای مستقل تعیین گردد که می‌توان این اجزا را به وسیله دو روش ICA-by-Blocks و معیار Durbin Watson تعیین کرد. در این جا تعداد اجزای مستقل با توجه به شکل ۳، دو می‌باشد. در شکل ۴ نمودار ضریب

رگرسیون روش‌های مختلف کالیبراسیون چندمتغیره اعم از PCR، PLS، OSC-PLS، OPLS و ICR برحسب زمان بازداری رسم گردیده است.



شکل ۳- الف) نمودار تعیین اجزای مستقل به روش ICA By Block (ب) نمودار تعیین اجزای مستقل به روش معیار Dorbin Watson



شکل ۴- کروماتوگرام‌های HPLC-DAD و نمودارهای ضریب رگرسیون به‌دست آمده از اجرای مدل‌های مختلف روی داده‌ها در عصاره گیاه گردو با غلظت ۰/۷۵ میلی‌لیتر با فاز متحرک استونیتریل و مخلوط آب + ۰/۱ درصد اسید فرمیک و سرعت جریان حلال ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه

## ۵-۵- ضریب رگرسیون

برای مشخص کردن اجزای مسئول خاصیت ضداکسیدانی عصاره‌ی گردو، در نمودار ضریب رگرسیون به‌دست آمده از تمامی روش‌های ذکر شده در هر قسمتی که پیک‌های رگرسیون منفی شده‌اند همان جزء نقش بیشتری در خاصیت ضداکسیدانی دارد. همان‌طور که قبلاً اشاره شد مقادیر  $IC_{50}$  تشکیل بردار  $y$  را می‌دهد و در نتیجه ترکیباتی که بتوانند نقش موثرتر و مفیدتری در بیان مقادیر کمتر  $y$  داشته باشند، مهمتر می‌باشند. هر چه ضرایب رگرسیون مربوط به ترکیبات منفی‌تر باشند این ترکیبات نقش موثرتری در تعیین خاصیت ضداکسیدانی گیاه ایفا می‌نمایند. همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود نمودارهای مدل‌های  $OSC-PLS$ ،  $OPLS$  و  $ICR$  به یکدیگر شبیه و تیزتر از نمودارهای مدل‌های  $PCR$  و  $PLS$  می‌باشند و در این میان مدل  $ICR$  دارای نوفه‌های کمتر و نمودار هموارتری نسبت به نمودارهای دیگر می‌باشد و ترجیح داده می‌شود. روش  $ICR$  قدرت بیشتری در تجزیه مجموعه داده‌های چندمتغیره دارد زیرا آمار درجه بالاتر  $IC$ ها می‌تواند خواص ذاتی سیگنال‌های مخلوط را بهتر نشان بدهد. در جدول ۳ اجزای شیمیایی نمونه‌ی عصاره‌ی گردو به همراه زمان‌های بازداری گزارش گردیده است.

در بین این اجزاء نیز، ترکیبات ضداکسیدانی ارزشمندی وجود دارند. با توجه به شکل ۴ پیک‌های مسئول خاصیت ضداکسیدانی به‌ترتیب زمان بازداری، دیگالویل، ۱،۲،۳،۴،۶ پنتا گالویل گلوکز، تلی ماگراندین II، والونئیک اسید دیلاکتون، استریستینین، (+)-کاتچین و کاسورنین می‌باشند که شناسایی آن‌ها با استفاده از دستگاه  $HPLC-MS$  صورت پذیرفت.

با توجه به شکل ۴ مشخص است که دیگالویل و استریستینین منفی‌ترین ضریب رگرسیون را دارند، در نتیجه این دو ترکیب نسبت به بقیه ترکیبات دارای نقش بیشتر و اساسی‌تری در تعیین خواص ضداکسیدانی عصاره‌ی برگ گردو می‌باشند. در این شکل، نمودار پنج روش کالیبراسیون با استفاده از دو روش پیش‌پردازش هم‌ترازسازی و تمرکز بر میانگین رسم شده است و کروماتوگرام‌های  $HPLC-DAD$  به‌دست آمده برای چند نمونه‌ی عصاره گردو در بالای نمودار برای مقایسه رسم گردیده است. همان‌طوری که مشاهده می‌شود مدل  $ICR$  به دلیل تیزتر بودن پیک‌ها، نمودار هموارتر و قابلیت تفسیر بهتر نسبت به سایر روش‌ها، ترجیح داده می‌شود.

۱،۲،۳،۴،۶ پنتاگالویل گلوکز یک استر پنتاهیدروکسی گالیک‌اسید از گلوکز است. این ترکیب به‌عنوان محافظت‌کننده‌ی پرتو به‌کار می‌رود و هم‌چنین می‌تواند در برابر واکنش‌های اکسیداسیونی که وابسته به  $pH$  هستند مقاومت کند. تلی ماگراندین اولین الاجیتانین شکل گرفته از ۱،۲،۳،۴،۶ پنتاگالویل گلوکز می‌باشد که خواص ضد ویروس هرپس را دارا می‌باشد. والونئیک اسید دیلاکتون یک تانین قابل هیدرولیز است که اثرات بازداری را روی آنزیم موثر در متابولیسم استروئیدها و سرطان پروستات داراست. استریستینین از خانواده‌ی الاجیتانین‌های بیواکتیو شیمیایی می‌باشد که فعالیت ضد ویروس آنفلانزا را دارا می‌باشد. (+)-کاتچین یک نوع فنول طبیعی و از ایزومرهای رایج کاتچین می‌باشد که خواص ضداکسیدانی قدرتمندی در بین سایر اعضای

فلاونوئیدها دارد. کاسوارنین نیز یک الجیتانین است و به‌عنوان یک بازدارنده‌ی فعال کربنی مورد استفاده قرار می‌گیرد. دیگالویل یک گالوتانین است که بیشتر در گونه‌های بلوط دیده می‌شود. از خواص ضد میکروبی یا ضد اکسیدانی دیگالویل تا به امروز منبعی در دسترس نمی‌باشد.

## ۶- نتیجه گیری

عصاره‌ی برگ گیاه گردو دارای خواص ضد اکسیدانی نسبتاً مطلوبی می‌باشند. ترکیب داده‌های حاصل از کروماتوگرام‌های حاصل از کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا و داده‌های به‌دست آمده از خواص ضد اکسیدانی با روش‌های کمومتریک به ما اجازه می‌دهد تا پیک‌های مسئول خاصیت ضد اکسیدانی را مشخص کنیم. هر چه مقدار ترکیباتی که دارای مقدار ضریب رگرسیون منفی تری هستند در نمونه عصاره بیشتر باشد بالطبع، خاصیت ضد اکسیدانی آن نیز بیشتر می‌باشد و نمونه‌ی عصاره منطقه‌ی دره با دارا بودن بالاترین میزان دیگالویل و استریستینین دارای بالاترین خاصیت ضد اکسیدانی می‌باشد. از بین روش‌های کالیبراسیون خطی با پیش‌پردازش‌های متفاوت روی کروماتوگرام‌های عصاره برگ گیاه گردو، برای مشخص کردن پیک‌های مسئول خاصیت ضد اکسیدانی، روش رگرسیون اجزای مستقل به‌عنوان بهترین روش در نمونه‌های مورد بررسی شناخته شد. روش ICR قدرت بیشتری در تجزیه مجموعه داده‌های چندمتغیره دارد زیرا آمار درجه بالاتر ICها می‌تواند خواص ذاتی سیگنال‌های مخلوط را بهتر نشان بدهد و این روش، بهبود تفسیر ضریب رگرسیون را به همراه دارد.

۳- اجزای شیمیایی نمونه‌ی عصاره‌ی برگ گردوی محلات

## ۷- تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله از حمایت‌های پژوهشی دانشگاه‌های کاشان و ارومیه و نیز آقایان دکتر حسین حسینی و مهدی مهران از بخش تحقیق و توسعه شرکت داروسازی باریج اسانس کاشان به‌خاطر کمک‌ها و راهنمایی‌های ارزشمندشان کمال تقدیر و تشکر را دارند.

## ۸- مراجع

[۱] معاونی، پیام: گیاهان دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس، (۱۳۸۸) ص ۱۳۲.

[2] <http://www.niazemarkazi.com/papers/10002022.htm>



ردیف	زمان بازداری	نام ترکیب	جرم اندازه‌گیری شده	شکافتگی‌های جرمی (m/z)	فرمول شیمیایی
۱	۴/۹۵	Monogalloyl-glucose	۳۳۲/۰۷۳۴	۱۶۹/۰۱، ۲۴۱/۰۳، ۲۷۱/۰۴	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>10</sub>
۲	۷/۹۵	(-) Epicatechin	۲۹۰/۰۷۸۹	۲۴۵/۰۸، ۲۰۵/۰۵، ۱۷۹/۰۳	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>
۳	۹/۷۳	Chlorogenic acid	۳۵۴/۰۹۴۷	۱۹۱/۰۶، ۱۷۹/۰۳۴، ۱۳۵/۰۴	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>
۴	۱۰/۱۸	Elagic acid	۳۰۲/۰۰۵۹	۲۵۷/۰۱، ۲۲۹/۰۱، ۱۸۵/۰۲ ۲۸۳/۹۹.	C <sub>14</sub> H <sub>6</sub> O <sub>8</sub>
۵	۱۰/۵۶	Coumaric acid hexoside acid	۳۲۶/۰۹۹۴	۲۳۵/۰۶، ۲۰۵/۰۴۹، ۱۶۳/۰۴ ۲۵۶/۰۷.	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>
۶	۱۱/۰۹	Procyanidin dimer	۸۶۶/۲۰۵۰	۴۲۵/۰۹، ۴۰۷/۰۸، ۲۸۹/۰۷ ۴۵۱/۱۰.	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>
۷	۱۱/۸۱	3-p-coumaroylquinic acid	۳۳۸/۰۹۹۳	۱۶۳/۰۴، ۱۱۹/۰۵	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>
۸	۱۳/۲۰	Digalloyl	۴۸۴/۰۸۷۴	۳۳۱/۰۷، ۳۱۳/۰۶، ۱۶۹/۰۱	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>14</sub>
۹	۱۴/۳۰	1,2,3,4,6 pentagalloyl-glucose	۹۴۰/۱۱۷۰	۷۶۹/۰۹، ۶۱۷/۰۸، ۴۳۱/۰۶ ۷۸۷/۰۹.	C <sub>41</sub> H <sub>32</sub> O <sub>26</sub>
۱۰	۱۴/۵۳	Tellimagrandin II	۹۳۸/۱۰۱۷	۶۳۵/۰۸، ۴۸۳/۰۷، ۳۰۰/۹۹ ۷۸۵/۰۸.	C <sub>41</sub> H <sub>30</sub> O <sub>26</sub>
۱۱	۱۴/۷۲	Valoneicacidedilactone	۴۷۰/۰۱۱۹	۴۲۵/۰۱، ۳۰۰/۹۹، ۱۶۶/۹۹ ۴۵۰/۹۹.	C <sub>21</sub> H <sub>10</sub> O <sub>13</sub>
۱۲	۱۵/۲۷	Strictinin	۶۳۴/۰۷۹۰	۴۲۱/۰۴، ۳۰۰/۹۹، ۲۷۵/۰۲ ۴۶۳/۰۵.	C <sub>27</sub> H <sub>22</sub> O <sub>13</sub>
۱۳	۱۵/۹۵	(+)-Catechin	۲۹۰/۰۷۸۹	۲۴۵/۰۸، ۲۰۵/۰۵، ۱۷۹/۰۳	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>
۱۴	۱۷/۳۲	Pedunculagin	۷۸۴/۰۷۵۱	۴۸۱/۰۶، ۳۰۰/۹۹، ۲۷۵/۰۲	C <sub>34</sub> H <sub>24</sub> O <sub>22</sub>
۱۵	۱۸/۹۹	Trigalloyl-glucose isomer	۶۳۶/۰۹۴۷	۴۶۵/۰۷، ۴۲۳/۰۶، ۳۱۳/۰۶، ۱۶۹/۰۱ ۴۸۳/۰۸.	C <sub>27</sub> H <sub>24</sub> O <sub>18</sub>
۱۶	۱۹/۲۲	Praecoxin A	۹۵۲/۰۸۱۰	۴۸۱/۰۶، ۳۰۰/۹۹، ۲۷۵/۰۲ ۹۰۷/۰۸، ۷۸۳/۰۷.	C <sub>41</sub> H <sub>28</sub> O <sub>18</sub>
۱۷	۲۲/۲۴	Casuarinin	۹۳۶/۰۸۵۶	۴۸۱/۰۶، ۳۰۰/۹۹، ۲۷۵/۰۲ ۷۸۳/۰۷، ۶۳۳/۰۷	C <sub>41</sub> H <sub>28</sub> O <sub>26</sub>
۱۸	۲۹/۱۳	Heterophylliin D	۱۸۷۰/۱۵۶۰	۶۳۳/۰۷، ۴۵۰/۹۹، ۳۰۰/۹۹ ۱۰۸۵/۰۷، ۷۸۳/۰۷.	C <sub>82</sub> H <sub>54</sub> O <sub>52</sub>
۱۹	۳۰/۱۹	Glansreginin A	۵۹۳/۲۱۰	۲۸۳/۱۲، ۲۴۱/۱۱، ۱۹۷/۱۲ ۴۰۳/۱۶، ۳۴۳/۱۴.	C <sub>28</sub> H <sub>35</sub> NO <sub>13</sub>

- [3] Y.S. Velioglu, G. Mazza, L. Gao, B.D. Oomah, *Journal Agricultural and Food Chemistry*, **46**(1998) 4113.
- [4] H. Stenlund, A. Gorzsas, P. Persson, B. Sundberg, J. Trygg, *Analytical Chemistry*, **80** (2008) 6898.
- [5] H. Martens, M. Martens, *Multivariate Analysis of Quality, An Introduction*, Wiley, Chichester, (2001).
- [6] N.R. Draper, H. Smith, *Applied Regression Analysis*, Wiley, New York, (1981).
- [7] V. Centner, D.L. Massart, O.E. de Noord, S. de Jong, B.M. Vandeginste, C. Sterna, *Analytical Chemistry*, **68**(1996) 3851.
- [8] B. Vandeginste, D. Massart, L. Buydens, S. De Jong, P. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B*, Elsevier, Amsterdam, (1998).
- [9] J. Sjoblom, O. Svensson, M. Josefson, H. Kullberg, S. Wold, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **44** (1998) 229.
- [10] C.A. Andersson, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **47** (1999) 51.
- [11] J. Trygg, S. Wold, *Journal of Chemometrics*, **16** (2002) 119.
- [12] L. Eriksson, E. Johansson, N. Kettaneh-Wold, J. Trygg, C. Wikström, S. Wold, *Multi- and Megavariate Data Analysis. Part I, Basic Principles and Applications*, Umetrics AB, Umea, (2006) p. 425.
- [13] J. Chen, X.Z. Wang, *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, **41**(2001) 992.
- [14] J. Durbin, G.S. Watson, *Biometrika*, **37**(1950) 409.
- [15] Y.W. Zhang, Y. Zhang, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **98** (2009) 143.
- [16] E. Noumi, M. Snoussi, N. Trabelsi, R. Ksouri, G. Hamdaoui, L. Bouslama, A. Bakhrouf, *Journal of Medicinal Plants Research*, **6** (2012)1468.
- [17] A. Jalili, A. Sadeghzade, *Journal of Biochemistry Research*, **6** (2012)33.
- [18] J. Regueiro, C. Sánchez-González, A. Vallverdú-Queralt, J. Simal-Gándara, R. Lamuela-Raventós, M. Izquierdo-Pulido, *Food Chemistry*, **152** (2014) 340.
- [19] C. Tistaert, B. Dejaegher, N. Nguyen Hoai, G. Chataigné, C. Rivière, V. Nguyen Thi Hong, M. ChauVanb, J. Quetin-Leclercq, Y. Vander Heyden, *Analytica Chimica Acta*, **652** (2009) 189.
- [20] C. Tistaert, B. Dejaeghera, G. Chataignéb, C. Rivièreb, N. Nguyen Hoaic, M. ChauVanc, J. Quetin-Leclercqb, Y. Vander Heyden, *Analytica Chimica Acta*, **721** (2012) 35.
- [21] S. Masoum, M. Mehran, S. Ghaheri, *Journal of Separation Science*, **38** (2015) 410.
- [22] معصوم، سعید؛ قاسمی، نرجس، مجله شیمی کاربردی، شماره ۳۹ (۱۳۹۵) ص ۱۶۵.
- [23] B. G. M. Vandeginste, D. L. Massart, L. M. C. Buydens, S. deJong, P. J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics. Part A*, Elsevier, Amsterdam, (1998) 374.