بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده علوم

بخش شیمی

پایان نامه تحصیلی برای دریافت درجه کارشناسی ارشد رشته شیمی گرایش تجزیه

بهبود تجزیه کروماتوگرام های GC-MS حاصل از گیاهان بیدمشک و بابونه با استفاده از روش های تفکیک منحنی چند متغیره

مؤلف:

اسما نصیری بزنجانی

استادراهنما:

دکتر مهدی موسوی

آبان ماه1392

دانشگاه شهید باهنر کرمان

این پایان نامه به عنوان یکي از شرایط احراز درجه کارشناسی ارشدبه

گروه شیمی
دانشکده علوم
دانشگاه شهیدباهنرکرمان

تسلیم شده است وهیچ گونه مدرکي به عنوان فراغت از تحصیل دوره مزبور شناخته نمي شود.

دانشجو: خانم اسما نصیری بزنجانی

استاد راهنما: آقای دکتر مهدی موسوی

داور۱: آقای دکتر علی مصطفوی

داور۲: خانم دکتر زهرا گرکانی نژاد

نماینده تحصیلات تکمیلی: خانم دکتر بتول کرامت

معاون آموزشی وپژوهشی دانشکده: آقای دکتر عباس مرادیان

حق چاپ محفوظ و متعلق به دانشگاه شهید باهنر کرمان است

تقدیم:

به چشم های منتظر مادرم که تیغ نگاهش همواره مشعل راهم بوده است و

به زحمات پدرم که همواره در عرصه زندگی همراهم بوده است و

به همسرم که با تحمل مصائب خواهان ترقی من بوده است و

به خواهر وبرادران خوبم که وجودشان برایم گرانبهاترین هدیه خداوندی است

به پاس همراهی، هم فکری و محبت بی دریغشان.....

تشکر و قدردانی :

با حمد و سپاس خداوند منان که به ما توفیق اندیشیدن عنایت فرمود و با تشکر از تمامی افرادی که ما را در راه کسب علم و دانش بیشتر رهنمون شدند.

در تکمیل این پایان نامه به خاطر راهنمایی و اهتمام ارزشمند استاد با کمالات و شایسته، جناب آقای دکتر موسوی که در این مدت از محضر علمی و اخلاقی ایشان بهره بردم، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از اساتید فرزانه و دلسوز، جناب آقای دکتر مصطفوی و سرکار خانم دکتر گرکانی که زحمت داوری این پایان نامه را متقبل شدند و با پیشنهادات و نظرات مفید و ارزنده شان بنده را مورد لطف خود قرار دادند سپاسگزارم.

از خانواده مهربان خود وهمسرم به خاطر زحمات بی پایانشان برای همیشه سپاسگزارم.

در پایان از دوستان عزیزم و تمامی کسانی که با صبوری تمام، مرا در انجام این پژوهش یاری کردند، قدردانی می کنم.

باشد که این خردترین، بخشی از زحمات آنان را سپاس گوید.

چکیده :

اسانس ها[1] مواد با ارزشی هستند که در جهان بخاطر نقش آنها در جلوگیری و درمان بیماریها مشهورند. تکنیک GC-MS یکی از مهمترین روش ها جهت تجزیه این مواد است. به دلیل ماهیت پیچیده اسانس ها چندین مشکل اساسی مانند شویش همزمان[2] و وجود پیکهای همپوشانی کننده یا مخفی شده در آنالیز آنها به روش مستقیم وجود دارد. به منظور کمک به حل این مشکل روش های تفکیک منحنی چند متغیره برای تجزیه و تحلیل کروماتوگرام آنها به کار رفته است.

کار حاضر از دو بخش تجربی تشکیل شده است. بخش اول تجزیه کروماتوگرام حاصل از گیاه بیدمشک و بخش دوم تجزیه کروماتوگرام حاصل از گیاه بابونه با استفاده از روش های MCR می باشد. در بخش اول با توجه به اینکه گرفتن اسانس از گیاه بیدمشک مشکل است، ترکیبات فرار آن با استفاده از روش HS-SPME استخراج گردیده و سپس توسط دستگاه MS-GC تحت شرایط بهینه تجزیه شدند. به منظور استفاده از روش MCR ، کروماتوگرام حاصل به تعداد زیادی بخش کوچک که پیک کلاستر نامیده می شوند تقسیم شد. سپس با استفاده از نرم افزار Chem station هر پیک کلاستر به یک ماتریس داده تبدیل گردید. در مرحله نهایی با به کار گیری مراحل MCR روی هر پیک کلاستر، 133 ترکیب در این گیاه شناسایی و تعیین شدند. این ترکیبات جمعاً98/10% ازمقدارکل سطح زیر پیک ترکیبات فرار را تشکیل می دهند. از بین ترکیبات شناسایی شده 1و4 دی متوکسی بنزن عمده ترین جزء بیدمشک تشخیص داده شد. ضروری است تأکید شود که در تجزیه مستقیم این گیاه فقط 84 ترکیب شناسایی شده است.

در بخش تجربی دوم ابتدا اسانس گیاه بابونه با استفاده از روش تقطیر با آب، استخراج گردید و توسط دستگاه GC-MS در شرایط بهینه تجزیه شد. سپس جهت بهبود تجزیه کروماتوگرام حاصل روش MCR بر آن اعمال شد. بعد از به کار گیری مراحل روی هر پیک کلاستر از کروماتوگرام بدست آمده از بابونه، تعداد 174 ترکیب با شاخص مشابهت بالای 700 بدست آمدکه این تعداد 96/59% از مقدارکل سطح زیر پیک اسانس را تشکیل می دهند. این در حالی است که به روش مستقیم فقط 108 ترکیب شناسایی شده است. لازم به ذکر است که (Z)-1,6,10-dodecatriene,7,11-dimethyl-3-methylene عمده ترین جزء در این گیاه می باشد.

کلمات کلیدی: بیدمشک، ترکیبات فرار، SPME، بابونه، تفکیک منحنی چند متغیره

1 -Essential oils
2 -Co-elution

فهرست مطالب:

فصل اول : مقدمه ای بر روش های تفکیک منحنی

1-1 گیاهان دارویی 2
1-2 اسانس های گیاهی 3
1-3 استخراج اسانس های گیاهی 3
1-4 تجزیه ی اسانس های گیاهی 4
1-5 روش های تفکیک منحنی 5
1-6 بهبود تجزیه های GC-MS با استفاده از روش های MCR 6
1-6-1 استخراج داده ها 7
1-6-2 پیش پردازش داده 7
1-6-2-1 تصحیح خط زمینه 7
1-6-2-2 حذف نوفه و هموار سازی 8
1-6-2-2-1 روش هموار سازی متوسط گیری پنجره متحرک 9
1-6-2-2-2 روش هموار سازی ساویزکی-گولی 9
1-6-3 تعیین مرتبه شیمیایی 11
1-6-3-1 روش تجزیه جزء اصلی (PCA) 11
1-6-3-2 روش اسکور مورفو لوژیکی(MS) 13
1-6-4 تکنیک های تفکیک منحنی 16
1-6-5 تجزیه کیفی 18
1-6-6 تجزیه کمی 19
1-7 روش میکرو استخراج فاز جامد(SPME) 19
1-7-1 میکرو استخراج مستقیم 22
1-7-2 میکرو استخراج فضای فوقانی 22
1-7-3 میکرواستخراج با محافظت غشایی 22

فصل دوم : شناسایی ترکیبات گیاه بیدمشک با استفاده از روش HS-SPME-GC-MS/ MCR

2-1 بیدمشک 24
2-2 روش استخراج 24
2-3 وسایل و نرم افزارهای مورد استفاده 24
2-4 تجزیه گیاه بیدمشک 25
2-4-1 استخراج ترکیبات فرار گیاه بیدمشک 25
2-5 تجزیه مواد فرار بیدمشک با استفاده از روش های کمومتریکس 25
2-6کاربرد روش های MCR در تجزیه طیف GC-MS گیاه بیدمشک 30
2-6-1 استخراج داده ها 30
2-6-2 استفاده از روش های MCR 31
2-6-2-1 آنالیز مجموعه پیک A 31
2-6-2-1-1 پیش پردازش مجموعه پیک A 32
2-6-2-1-2 تعیین تعداد ترکیبات مجموعه پیک A 33
2-6-2-1-3 تفکیک مجموعه پیک A 34
2-6-2-1-4 شناسایی کیفی 35
2-7 شناسایی کمی 40
2-8 ارزیابی نتایج 49

فصل سوم : تجزیه اسانس گیاه بابونه با استفاده از روش GC-MS/ MCR

3-1 مشخصات گیاه مورد مطالعه 52
3-2 وسایل و نرم افزارهای مورد استفاده 52
3-3 تجزیه گیاه بابونه 53
3-3-1 جمع آوری و استخراج اسانس گیاه بابونه 53
3-3-2 مشخصات دستگاه GC-MS استفاده شده 53

3-4 تجزیه GC-MS 54
3-5 بخش اول: بررسی اثر حذف نوفه و هموارسازی در پیک های تیز 60
3-5-1 استفاده از روش های MCR 60
3-5-2 بررسی اثر حذف نوفه و هموارسازی در پیک های طیف بابونه 60
3-6 بخش دوم :چگونگی کاربرد روش MCR در تجزیه طیف گیاه بابونه 61
3-6-1 استخراج داده ها 61
3-6-2 به کار گیری روش MCR 61
3-7 تجزیه مجموعه پیک A 61
3-7-1 پیش پردازش مجموعه پیک A 62
3-7-2 تعیین تعداد ترکیبات مجموعه پیک A 63
3-7-3 تفکیک مجموعه پیک A 64
3-7-4 شناسایی کیفی 65
3-8 شناسایی کمی 67
3-9 خواص دارویی و کاربرد برخی از ترکیبات گیاه 80
3-10 نتیجه گیری 81
منابع 82

فصل اول
مقدمه ای بر
روش های تفکیک منحنی

1-1 گیاهان دارویی

استفاده از گیاهان دارویی به قدمت عمر انسان برمیگردد، چون بیماری ها با پیدایش بشر متولد شده اند و اسناد چند هزار ساله موجود درتاریخ طب و داروسازی حاوی تجربیات و اطلاعات ارزشمند گیاه درمانی می باشد. تا چند دهه گذشته آنچه که بعنوان دارو مورد استفاده قرار می گرفت از منابع طبیعی و به طور عمده از گیاهان بدست می آمد. در گذشته نه چندان دور، با پیشرفت سریع علوم از یک سو و در نظر گرفتن مسائل اقتصادی از سوی دیگر، از مصرف گیاهان دارویی به صورت گذشته کاسته شده و داروهای شیمیایی در بسیاری موارد جایگزین داروهای گیاهی شدند. ولی تجربه چند دهه اخیر نشان می دهد که داروهای شیمیایی علیرغم داشتن کارایی بالا، اثرات نامطلوب و ناگوار بسیاری به همراه دارند. علاوه بر این، امروزه ثابت شده است که کمتر ماده خالصی وجود دارد که دارای اثرات سوء نباشد، به همین دلیل در چند دهه اخیر بازگشت به استفاده از گیاهان دارویی مورد توجه بسیار قرار گرفته است و دانشگاه ها، مراکز تحقیقاتی،کارخانه ها و سازمان بهداشت جهانی برنامه های وسیعی جهت استفاده از گیاهان دارویی تدارک دیده، و نقش گیاهان دارویی را در قرن بیست و یکم سرنوشت ساز تلقی نموده اند. امروزه گرایش عمومی جامعه به استفاده از داروهای گیاهی به علت ایجاد تنوع در فرهنگ مصرف، اثبات اثرات مخرب و جانبی داروهای شیمیایی، افزایش اعتماد به استفاده از گیاهان دارویی در اجتماعات صنعتی و ایجاد آلودگیهای زیست محیطی ناشی از تولید آنها، باعث افزایش توجه به سمت درمان از طریق عصاره گیری و ساخت داروهای گیاهی و کاربرد گسترده اسانس گیاهان دارویی در طیف وسیعی از فرآورده های غذایی شده است. بررسی هایی که امروزه نیز بر ترکیبات شیمیایی گیاهان دارویی و استخراج آنها انجام گرفته موجب پیدایش مواد دارویی مفیدی شده است.

به طور کلی، مواد طبیعی گیاهی به دو دسته مواد اولیه[1] (ترکیبا ت عمومی) و ثانویه[2] تقسیم می شوند. تقسیم بندی مواد مؤثره گیاهان دارویی که امروزه مورد تایید می باشد به صورت چهار گروه اصلی آلکالوئیدها، گلیکوزیدها، روغن های فرار و سایر مواد مؤثره است. منظور از سایر مواد مؤثره، شامل ترکیباتی چون مواد تلخ، فلاون ها، فلاونوئیدها، موسیلاژها (وکربوهیدراتهای خاص مشابه آنها)، ویتامین ها، تانن ها و اسیدسیلیسیک (و اسیدهای خاص مشابه آن) و سایر ترکیباتی می باشد، که به دلیل ناهماهنگی و گستردگی ساختمان های شیمیایی شان در سه گروه قبلی جای نمی گیرند[1].

1 -Row material
2 -Secondry material

2-1 اسانس های گیاهی[1]

سومین گروه از مواد مؤثره موجود در گیاهان را اسانس ها تشکیل می دهند. اسانس ها مواد طبیعی با ارزشی هستند که اطلاعات خیلی محدودی در مورد ترکیبات شیمیایی آنها وجود دارد. این واقعیت اساسا ناشی از سیستم های چند جزئی و پیچیده اسانس ها که دارای ترکیبات فراوان و ناشناخته ای هستند، می باشد. اسانس ها در سلولها و کرکهای ترشحی منفرد یا مجتمع، غده های ترشحی، مجاری ترشحی در قسمتهای سطحی و درونی، اندامهای مختلف مانند برگ ها، میوه ها، جوانه ها و شاخه های گیاهان وجود دارند. سلولها و بافتهای ترشحی مذکور ممکن است تنها در یک اندام گیاه وجود داشته باشند (مثلاً تنها درگل یا میوه)، یا ممکن است در اندامهای مختلف گیاهان پراکنده باشند. در این صورت اسانس های حاصله از کمیت و کیفیت و همچنین اجزاء و عناصر تشکیل دهنده از اندامی به اندام دیگر تفاوت دارند. از این رو یکی از مهمترین مسائل گیاهان دارویی مطالعه و تحقیق در مورد اسانس موجود در اندامهای مختلف یک گیاه و مقایسه آنها از نظر کمیت و کیفیت با یکدیگر می باشد[1]. اسانس ها معمولاً در داخل سلول های گیاهی به شکل قطرات کروی و گلبول مانند جای گرفته اند.

3-1 استخراج اسانس های گیاهی

چندین تکنیک برای استخراج اسانس ها از بخش های متفاوت گیاهان وجود دارد. این روش ها می توانند به سه گروه روش های ناپیوسته[2]، روش های پیوسته[3] و روش های تلفیقی[4] تقسیم شوند[2]. روش های ناپیوسته یک حلال آلی یا آبی را به کار می برند. بازده استخر اج با حلال های آلی به کمک امواج فراصوت می تواند افزایش یابد[3]. تقطیر با بخارآب[5]، تقطیر با آب[6] و تقطیر در خلا[7] از جمله روش های پیوسته هستند. از جمله روش های ترکیبی هم می توان استخراج با سوکسله[4]، استخراج کمک شده با میکروویو[8] [5] و استخراج با سیال ابر بحرانی CO_2[9] [6] را را نام برد. علاوه بر روش های گفته شده در سالهای اخیر توجه گسترده ای بر روی کاربرد روش های متفاوت تکنیک های میکرواستخراج، مانندمیکرواستخراج قطره منفرد[10] (SDME) [7]،

1-Essences
2-Discontinous
3-Continous
4-Hybride approaches
5-Steam-distillation
6-Hydrodistillation
7-Vaccum distillation
8-Microware assisted extraction
9-Supercritical CO2 extraction
10-Single-drop micro-extraction

میکرواستخراج فاز مایع (LPME)[1] [8] و میکرواستخراج فاز جامد (SPME)[2] [9] برای جداسازی ترکیبات فرار از مواد گیاهی انجام شده است.

4-1 تجزیه ی اسانس های گیاهی

تکنیک های کروماتوگرافی پر کاربرد ترین روش های به کار گرفته شده برای تجزیه اسانس های گیاهی بوده اند. کروماتوگرافی گازی (GC) یکی از گسترده ترین و قدرتمندترین تکنیک های جداسازی برای مخلوط های چند جزئی آنالیت های موجود در اسانس هاست[10] که می تواند ترکیبات فرار و نیمه فرار را با تفکیک بالا جدا کند، اما نمی تواند آنها را با قطعیت بالا شناسایی کند. جهت آنالیز کیفی و کمی بهتر سیستم های تشخیص متفاوتی می توانند با GC همراه شوند. از این جمله می توان به آشکارساز یونش شعله ای، تبدیل فوریه مادون قرمز و طیف سنج جرمی (MS) اشاره کرد. دستگاه طیف نگار جرمی می تواند اطلاعات ساختاری دقیقی در مورد اکثر ترکیبات فراهم کند به طوری که آنها را می توان دقیقا شناسایی نمود. بنابراین کوپل شدن دو تکنیک GC و MS با هم میتواند مشکل یکدیگر را حل نموده و یک تکنیک تلفیقی مناسب هم برای جداسازی و هم برای شناسایی فراهم کند. امروزه این روش کاربردهای متنوع زیادی در شیمی و زیست شناسی پیدا کرده است. مزیت های عمده GC-MS توانایی در آنالیز تعداد زیادی آنالیت بطور همزمان، شناسایی ترکیبات جدا شده با استفاده از طیف جرمی، حساسیت بالا و حد تشخیص پایین می باشند. معهذا، به دلیل پیچیدگی اسانس ها، مشکلات متفاوتی در آنالیز آنها وجود دارد. این مشکلات می توانند علامات تجزیه ای حاصل را تحت تاثیر قرار داده بنحوی که نتایج نهایی آنالیزهای GC-MS از اعتبار بسیار بالایی برخوردار نباشند.

مشکلات اساسی در آنالیزهای GC-MS اسانس ها عبارتند از:

1) انحراف از خط زمینه و زمینه طیفی
2) وجود انواع مختلف نوفه (نامتناسب[3] و متناسب[4])
3) تغییر در شکل پیک ها (پیک های غیر گوسی شکل)
4) نسبت پایین سیگنال به نوفه
5) شویش همزمان (پیک های همپوشانی کننده یا مخفی شده)

1 -Liquid-phase micro-extraction
2 -Solid-phase micro-extraction
3 -Homoscedastic
4 -Heteroscedastic

از بین این مشکلات، شویش همزمان یکی از متداولترین مشکلات کروماتوگرافی است. سه راه حل کلی برای مواجهه با مشکل شویش همزمان وجود دارد. راه حل اول بهینه سازی پارامترهای کروماتوگرافی به منظور دست یابی به حداکثر جداسازی آنالیت ها می باشد. راهکار دوم استفاده از تکنیک های کروماتوگرافی پیشرفته تر و البته گران قیمت تر مانند کروماتوگرافی های چند بعدی می باشد. راه حل سوم استفاده از روش ها ی کمومتریکس به منظور استخراج حداکثر اطلاعات از داده های تجربی است .

روش های کمومتریکسی که به بررسی و حل این مشکلات می پردازند، اصطلاحاً روش های تفکیک منحنی چند متغیره[1] نامیده می شوند. به دلیل اهمیت موضوع، اساس این روش به اختصار در قسمتهای پایین آورده شده اند.

5-1 روش های تفکیک منحنی

تفکیک یک سیستم چند جزئی، شامل توصیف واریانس اندازه گیری ها به عنوان یک مدل جمع پذیر از سهم اجزای خالص آن است[11و12]. برای انجام چنین امری، داده های تجربی مناسب حاوی اطلاعات کافی مورد نیاز است. مانند اطلاعاتی که از آنالیز اسانس ها با یک تکنیک تلفیقی مثل GC-MS حاصل می شود. در چنین حالتی نتایج تمام اندازه گیری های انجام شده در یک جدول یا ماتریس داده ها جمع آوری می شود که در آن یک بعد ماتریس نشان دهنده ی تغییرات ترکیب شیمیایی در سیستم و بعد دیگر بیانگر تغییر در پاسخ جمع آوری شده است. تمامی روش های تفکیک به عنوان ابزاری جهت تبدیل پاسخ دستگاهی تجربی چند بعدی به سهم خالص هر جزء در سیستم استفاده می شوند. در واقع روشهای تفکیک این امکان را فراهم می آورند که ماتریس داده های اولیه (که به صورت X نشان داده می شود) را بتوان به دوماتریس C و S^T (T به معنای وارون است)، که هر کدام از آنها حاوی الگوهای پاسخ اجزاء خالص است، تجزیه نمود.

در محاسبات ماتریسی، رابطه کلی به صورت رابطه (1-1) نمایش داده می شود :

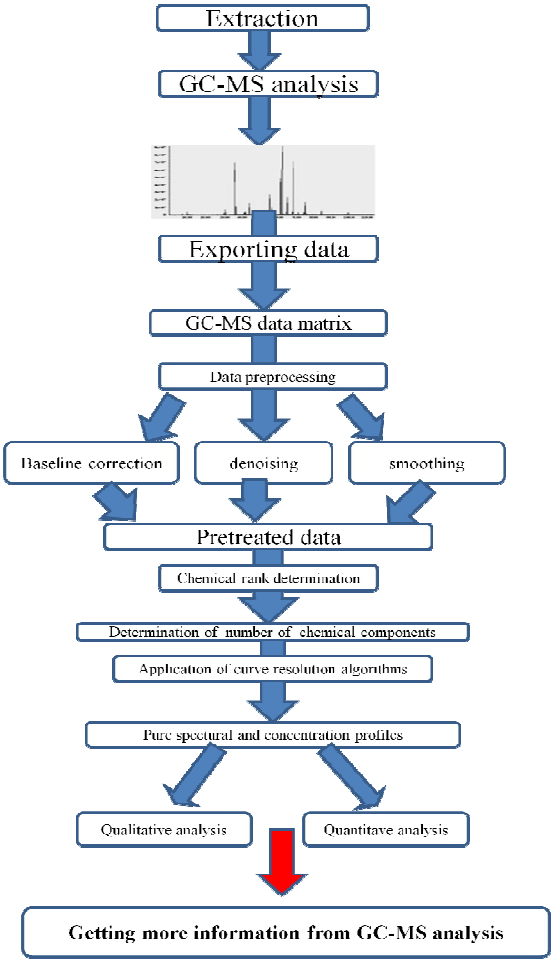
$$X=CS^T+ E \qquad (1\text{-}1)$$

که در آن X(I×J) ماتریس داده های اولیه GC-MS و C(I×n) و S(J×n) به ترتیب الگو های غلظتی و طیفی گونه های خالص می باشند. همچنین E(I×J) ماتریس خطا در تفکیک داده های اولیه می باشد. متغیرهای I و J به ترتیب نشان دهنده تعداد سطر و ستون های ماتریس داده اولیه، X هستند، و n نیز بیانگر تعداد ترکیبات شیمیایی موجود در مخلوط است.

1 -Multivariate curve resolution (MCR)

6-1 بهبود تجزیه های GC-MS با استفاده از روش های MCR

برای بهبودتجزیه های GC-MS به کمک روش های تفکیک منحنی باید یک روند سیستماتیک طی شود. شکل (1-1) چهارچوب کلی چنین تجزیه ای را نشان می دهد. دریک کار عملی هر یک از مراحل شکل (1-1) باید به طورجداگانه انجام شود. بطور کلی، بدین منظور ابتدا اسانس گیاهی استخراج و توسط دستگاه GC-MS تجزیه می شود، سپس داده های هر مجموعه پیک[1] از طیف GC-MS به یک برنامه ی محاسباتی وارد شده و مورد یک سری پیش پردازش قرار می گیرند. در ادامه، مرتبه ی شیمیایی هر مجموعه پیک تعیین شده و با استفاده از روش های تفکیک منحنی کروماتوگرام و طیف جرمی هر ترکیب موجود در مجموعه پیک به طور مجزا به دست می آید. در پایان می توان با استفاده از این دو مشخصه به ترتیب تجزیه های کیفی و کمی را انجام داد. در ادامه هر یک از مراحل شکل (1-1) به طور مجزا و مختصر شرح داده خواهند شد.



شکل (1-1) مراحل کلی به کارگیری روش ها ی MCR جهت بهبود داده های حاصل از GC-MS

1-Peak cluster

1-6-1 استخراج داده ها [1]

در مرحله ی استخراج داده ها که اولین مرحله از مراحل به کارگیری روش MCR است، اطلاعات هر مجموعه پیک باید به صورت داده ی ورودی یک برنامه ی محاسباتی مانند MATLAB درآید. بدلیل وجود تعداد ترکیبات زیاد در اسانس ها که احتمال همپوشانی پیک ها (شویش همزمان) را افزایش می دهد و باعث پیچیدگی کروماتوگرام می شوند، در اولین مرحله ی تجزیه ی MCR، کروماتوگرام به چندین مجموعه پیک تقسیم می شود و سپس اطلاعات مربوط به هر مجموعه پیک با استفاده از نرم افزار دستگاهی که با آن عمل طیف گیری انجام شده است به یک ماتریس داده (بافرمتASCII)[2] تبدیل می شود و به برنامه ی محاسبات عددی مورد نظر منتقل می شود[13و14].

1-6-2 پیش پردازش داده ها[3]

هر علامت GC-MS (X_{GC-MS}) می تواند از سه بخش علامت تجزیه ای ($X_{analyte}$)، علامت زمینه ($X_{background}$) و علامت مربوط به نوفه (X_{noise}) تشکیل شود، بنابراین آن را به صورت رابطه (2-1) در زیر فرمول بندی می کنند:

$$X_{noise} + X_{background} + X_{analyte} = X_{GC-MS} \qquad (2\text{-}1)$$

قبل از به کارگیری روش های تفکیک باید علامت مربوط به نوفه و علامت مربوط به طیف زمینه از ماتریس داده ها حذف گردند، بنابراین لازم است یک سری پیش پردازش روی داده های اولیه انجام گیرد[13]. مرحله پیش پردازش می تواند شامل تصحیح خط زمینه[4]، حذف نوفه و هموارسازی[5] باشد.

1-6-2-1 تصحیح خط زمینه

یکی از مشکلات مهم در تجزیه های GC-MS، انحراف خط زمینه در طول شویش کروماتوگرافی است. در صورت حضور این پدیده، محاسبات پیچیده تری برای تفکیک ماتریس داده مورد نیاز است. به طور قراردادی در نرم افزارهای GC-MS یک خط مستقیم (چند جمله ای درجه اول) برای اتصال دو انتهای پیک مورد نظر به کار گرفته می شود. در این روش چند جمله ای درجه اول به عنوان خط پایه در نظر گرفته شده و محاسبات بعدی سطح و ارتفاع پیک براساس آن انجام می شود[14]. یک تکنیک قدرتمند برای تصحیح انحراف خط پایه در داده های

1-Data exportation
2 -American Standard Code for Information Interchange (ASCII)
3 -Data preprocessing
4 -Baseline correction
5 -Smoothing

کروماتوگرافی، استفاده از تجزیه مطابقت[1] و تطابق حداقل مربعات[2] که توسط لیانگ و کوالهیم [15] توسعه داده شد، می باشد. در این روش ابتدا با استفاده از روش تجزیه منطقه ای مرتبه[3] مناطق فاقد گونه ی شیمیایی[4] در کروماتوگرام تشخیص داده می شود سپس از اطلاعات به دست آمده از این نواحی می توان برای انجام رگرسیون خطی با توجه به زمان های بازداری استفاده کرد و نهایتاً تصحیح خط زمینه انجام شود. در این روش با ورود نقاط (زمان های بازداری و یا شماره اسکن ها) در مناطق فاقد گونه، قبل و بعد از هر مجموعه پیک خط زمینه تصحیح می شود[13].

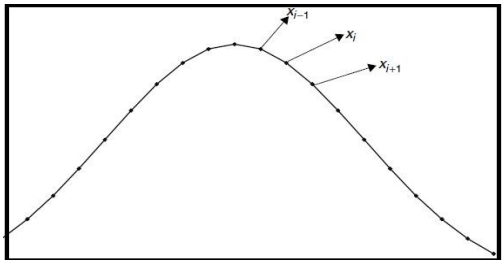
1-6-2-2 حذف نوفه و هموار سازی

در علم شیمی نوفه می تواند به عنوان یک سری نوسانات ناخواسته در علامت در نظرگرفته شود که حضور آن علامت های شیمیایی را پیچیده تر می سازد. هدف اکثر روش های پردازش سیگنال، دست یابی به اطلاعات خالص درباره علامت تجزیه ای در غیاب نوفه می باشد. روش های حذف نوفه و هموارسازی متفاوتی برای کاهش اثر نوفه در علامت ها توسعه پیدا کرده اند. به طور کلی روش های حذف نوفه علامت های کم شدت را بدون در نظر گرفتن فرکانس آن ها حذف می کنند از طرف دیگر علامت های با فرکانس بالا می توانند با روش های هموارسازی بدون در نظر گرفتن شدتشان حذف شوند[16و17]. یکی از مهمترین روش های کاهش نوفه روش تبدیل فوریه[5] می باشد. این روش علامت را از یک شکل به شکل دیگری تبدیل کرده و علامت ها را ساده می کند[16]. علاوه بر این، روش های دیگری نیز برای کاهش نوفه وجود دارند از جمله، روش اسکورمورفولوژیکی[6] که قادر است علامت را از نوفه تشخیص داده و با حذف کانال های طیفی[7] بعلت حضور نوفه، نوفه همگن را کاهش دهد. از این روش جهت تعیین مرتبه ی شیمیایی نیز می توان استفاده نمود[13]. روش دیگر برای حذف نوفه استفاده از روش های هموارسازی متوسط گیری پنجره متحرک [8] و فیلتر ساویزکی–گولی[9] است که متعاقباً شرح داده می شوند.

1-Congruence analysis
2-Least squares fit
3-Local rank analysis
4-Zero component regions
5-Fourier transform (FT)
6-Morphological score (MS)
7-Spectral channels
8-Moving –window average smoothing method
9-Savitzki-Golay filter

1-2-2-6-1 روش هموارسازی متوسط گیری پنجره متحرک

یکی از ساده ترین روش های هموارسازی جهت حذف نوفه، روش متوسط گیری پنجره متحرک می باشد[18]. به طور معمول این روش شامل استفاده از نقاط داده مجاور برای محاسبه یک مقدار جدید برای نقطه i است (شکل1-2).



شکل(1-2) چگونگی انتخاب نقاط برای استفاده در فیلترمتوسط گیری پنجره متحرک با سه نقطه

نمایش جبری این محاسبات به صورت معادله (1-3) است:

$$X_{i,new}=1/(2p+1)\sum^{p}_{j=-p} X_{i+j} \qquad (3-1)$$

در این معادله، $X_{i,new}$ مقدار هموارسازی شده و X_{i+j} مقدار داده های اولیه است. همچنین $(2p+1)$ اندازه پنجره و نشان دهنده تعداد داده هایی است که برای متوسط گیری و هموارسازی مورد استفاده قرار می گیرند. نقاط بیشتر در فیلتر باعث کاهش بیشتر در نوفه اما از طرف دیگر باعث افزایش شانس از دست رفتن علامت تجزیه ای می شوند. در مرحله بعد فیلتر در امتداد سری زمانی یا طیف حرکت می کند و نقاط داده به طور متوالی با نقاط داده ی فیلتر شده جایگزین می شود. بدین ترتیب نوفه تا حد زیادی از داده های اولیه حذف می شود.

1-2-2-6-2 روش هموارسازی ساویزکی-گولی

یکی دیگر از روش های هموارسازی استفاده از فیلتر ساویزکی-گولی است[18و19] که براساس تطبیق یک چند جمله ای بر ماتریس داده ی مورد نظر استوار است. مزیت عمده این روش سادگی و راحتی آن است. نمایش جبری فیلترساویزکی–گولی به صورت معادله (1-4) می باشد:

$$x_{i,new}=1/(2p+1)\sum^{p}_{j=-p} w_j\, x_{i+j} \qquad (4-1)$$

در این معادله نیز $x_{i,new}$ نشان دهنده مقدار هموارسازی شده و x_{i+j} مقدار داده های اولیه است.

در این روش مانند روش قبل، فیلتر در راستای داده های موجود حرکت کرده و نقاط جدید را جایگزین نقاط اولیه می کند.

مشکل اصلی در این روش چگونگی محاسبه اوزان w_j است. برای محاسبه این اوزان باید اندازه پنجره و مرتبه چند جمله ای مشخص باشد این پارامترهامی توانند براساس شدت سیگنال و میزان نوفه تغییر کنند. سپس طی یکسری فرآیند های جبری می توان ضرایب مربوطه را محاسبه کرد. اصولاً چون محاسبه این اوزان امری خسته کننده و وقتگیر است، ساویزکی و گولی برای مرتبه های مختلف چند جمله ای و اندازه های مختلف پنجره ضرایب مربوطه را محاسبه و در جداولی تنظیم کرده اند (جدول1-1).

(جدول1-1) ضرایب ساویزکی و گولی برای هموار سازی

Window size j	5	7	9	7	9
	Quadratic/cubic			Quartic/quintic	
−4			−21		15
−3		−2	14	5	−55
−2	−3	3	39	−30	30
−1	12	6	54	75	135
0	17	7	59	131	179
1	12	6	54	75	135
2	−3	3	39	−30	30
3		−2	14	5	−55
4			−21		15
Normalisation constant	35	21	231	231	429

البته باید خاطر نشان کرد که فیلتر ساویزکی-گولی تنها نقطه مرکزی در پنجره متحرک را جهت هموارسازی مورد استفاده قرار می دهد. لازم است تاکید شود که این دو پارامتر، یعنی تعداد نقاط در طرفین مرکز پنجره انتخاب شده از یک منحنی و درجه چند جمله ای لازم برای فرآیند تطبیق منحنی به شدت بر عملکرد روش مذکور تاثیرگذار هستند. بدین ترتیب که استفاده از تعداد زیادی از نقاط در داده های چند جمله ای درجه پایین منجر به هموارسازی خوب می شود، اما قسمت ها ی باریک منحنی پهن خواهد شد و همچنین استفاده از تعداد نقاط کمتر و چند جمله ای های درجه بالاتر منجر به هموارسازی ضعیف گردیده، اما انحراف کمتری در قسمت های باریک منحنی صورت خواهد گرفت. بنابراین انتخاب صحیح این دو پارامتر مقدار نوفه را به طور موثری کاهش داده و باعث حفظ داده ها می شود.

3-6-1 تعیین مرتبه شیمیایی[1]

تعیین تعداد ترکیبات شیمیایی، یک مرحله بحرانی و مهم در به کارگیری روش های تفکیک منحنی می باشد. اهمیت این مرحله بیشتر از این جهت است که تمامی آنالیزهای کیفی و کمی مراحل بعد تحت تاثیر این مرحله انجام می شود[13].

مرتبه ی ریاضی[2] یک ماتریس از داده ها به صورت مینیمم تعداد متغیر های مستقل خطی (سطرها یا ستون های ماتریس) تعریف می شود. از نقطه نظر شیمی تجزیه، مرتبه شیمیایی[3] یک ماتریس تعداد ترکیبات شیمیایی موجود در مجموعه داده ها است. در شرایط ایده آل (در غیاب نوفه) مرتبه شیمیایی و مرتبه ی ریاضی یک ماتریس از داده ها برابر خواهد بود[14]. یک سری از مسائل در داده های تجربی وجود دارد که تعیین مرتبه ی شیمیایی را دشوار می سازند از این جمله می توان به انحراف خط زمینه و زمینه ی طیفی، انواع مختلف نوفه، ناهمگن بودن نوفه، نسبت پایین علامت به نوفه و مسئله ی شویش همزمان در داده های کروماتوگرافی نام برد. روش های زیادی برای تعیین مرتبه ی شیمیایی وجود دارد. اغلب این روش ها براساس PCA[4] [20] یا SVD[5] [21] انجام می شوند. به علت تجمع نوفه در داده های کروماتوگرافی، تجزیه و تحلیل علامات تجزیه ای حاصل از سیستمها ی دستگاهی GC-MS و HPLC-DAD، که از ماتریس های مرتبه کامل[6] استفاده می کنند، به منظور رسیدن به یک نتیجه ی مطمئن دشوار و گاهاً غیر ممکن است[22]. بنابراین تکنیک هایی مانند مقایسه ی زیر فضا[7] [23] و اسکور مورفولوژیکی که بر اساس تجزیه متغیر های کلیدی[8] به جای تجزیه ماتریس های مرتبه کامل استوارند باید به کار برده شوند. با استفاده از این روش ها اثر نوفه کاهش یافته و نتایج معتبرتری حاصل می شود[13]. با توجه به اینکه روش تجزیه جزء اصلی اساس روش های تفکیک منحنی می باشد در ادامه شرح مختصری از این روش آورده شده است.

1-3-6-1 روش تجزیه جزء اصلی (PCA)

روش PCA می تواند به عنوان مادر همه روش ها در تجزیه داده های چند متغیره در نظر گرفته شود. هدف PCA کاهش ابعاد ماتریس داده هاست و این روش متداولترین روش به کار رفته

1-Chemical rank determination
2-Mathematical rank
3-Chemical rank
4-Principal component analysis
5-Singular value decomposition (SVD)
6-Full rank
7-Subspace comparision
8-Key variables