



کاربرد انتقال کالیبراسیون در تحلیل بر پایه مدل داده
های سینتیکی-اسپکتروفتومتری حاصل از تغییرات شیمیایی
در سیستم های بیولوژیکی و محیطی و آنالیز چند راهی
داده های اسپکتروفلوریمتری سینتیک هیبریداسیون
DNA

پایان نامه دکتري

مریم خوشکام

استاد راهنما: دکتر محسن کمپانی زارع

استاد مشاور: دکتر فرانس وان دن برگ

شهریور ۱۳۹۱

بہ نام نزدان پاک

تقدیر و شکر

باسپاس از پروردگار متعال که توفیق انجام این کار را نصیب من کرد و امید بر خود لازم می دانم که از همه عزیزان و یاران که مراد این راه همراهی نموده اند قدر دانی نمایم.

شکر ویژه من تقدیم به پدر عزیز و مادر مهربانم که با بخشندگی بسیار از آرزوهای خودشان به خاطر آرزوهای من گذشتند.

از استاد عزیز و بزرگوار خود جناب آقای دکتر کمپانی برای تمام درسهایی که در عرصه علم و زندگی به من آموختند و همراهی و مساعدت ایشان در طی مراحل تحقیق و تدوین پایان نامه کمال اتقان را دارم. از استاد مشاور خود جناب آقای دکتر فرانس وان دن برک به خاطر همه جایتهما و راهنمایی هایشان سپاسگزارم.

از خواهر و برادر عزیزم و خانواده، همسرم به خاطر حمایت های بی دریغ و الطاف بیکرانشان شکر می نمایم.

از اساتید محترم گروه شیمی جناب آقای دکتر عبداللہی و دکتر حقیقی که افتخار شاگردی و کسب دانش و معرفت را از ایشان داشتم، سپاسگزارم. از اعضای محترم کمیته دفاع که زحمت داوری پایان نامه را بر عهده گرفتند، شکر کنم. از پروفور یوسف شوقی بنیانگذار محترم دانشگاه علوم پایه زنجان به خاطر هر آنچه که از ایشان آموختم شکر می کنم.

از تمامی دوستان عزیزم صمیمانه شکر نموده و برایشان آرزوی سعادت، سلامتی و پیروزی می نمایم.

چکیده

۱ روش های کالیبراسیون چندمتغیره^۱

روش های کالیبراسیون چند متغیره که در مقابل روش های کالیبراسیون تک متغیره قرار می گیرند، تکنیک های بسیار قوی برای استخراج اطلاعات کمی از داده های شیمیایی چند متغیره می باشند و در بسیاری از تکنیک های تجزیه ای و خصوصا طیف سنجی، کاربرد دارند. به عنوان مثال، داده های طیف سنجی مادون قرمز نزدیک (NIR)^۲ که بسیار پهن و غیر گزینش پذیر هستند، برای آنالیز کمی، وابسته به کالیبراسیون چندمتغیره می باشند. مهم ترین مزیت استفاده از روش های کالیبراسیون چند متغیره این است که اندازه گیری های تجزیه ای سریع، ارزان و غیر تخریبی می توانند برای اندازه گیری خصوصیت مورد نظر از نمونه مورد استفاده قرار گیرند که امکان استفاده از آن ها بدون این تکنیک ها وجود ندارد. به علاوه، کالیبراسیون چند متغیره امکان آنالیز کمی دقیق، حتی در حضور گونه های مزاحم را فراهم می کند.

روش های متعددی برای کالیبراسیون چند متغیره به کار برده شده اند. برخی از این روش ها عبارتند از: رگرسیون خطی چندگانه (MLR)^۳، رگرسیون مولفه اصلی (PCR)^۴، حداقل مربعات جزئی (PLS)^۵، شبکه های عصبی مصنوعی (ANN)^۶ و غیره. برای ساختن یک مدل کالیبراسیون چند متغیره قوی^۷، معمولا تعداد زیادی نمونه اندازه گیری می شوند و وقت و هزینه زیادی صرف می گردد. بنابراین مطلوب است که: این مدل ها در بازه زمانی وسیع و تحت شرایط مختلف قابل کاربرد باشند.

¹ - Multivariate Calibration Methods

² - Near-Infrared Spectroscopy

³ - Multiple Linear Regression(MLR)

⁴ - Principal Component Regression(PCR)

⁵ - Partial Least Squares (PLS)

⁶ - Artificial Neural Networks(ANN)

⁷ - Robust

۱-۱ محدودیت های روش های کالیبراسیون چند متغیره

یکی از محدودیت های این دسته از روش ها این است که گاهی مدل کالیبراسیون ساخته شده توسط یک دستگاه مشخص و در یک زمان مشخص، قابل استفاده برای اندازه گیری های حاصل از دستگاه دیگر و یا اندازه گیری های حاصل از همان دستگاه تحت شرایط محیطی و یا زمان متفاوت نیستند. در این حالت، اگر از مدل کالیبراسیون موجود استفاده شود، پیش بینی ها همراه با خطا خواهند بود. عوامل متعددی می توانند سبب بی ارزش شدن یک مدل کالیبراسیون شوند:

۱-۱-۱ عوامل دستگاهی

عدم ثبات^۸ دستگاه با زمان یکی از عواملی است که می تواند ارزش یک مدل کالیبراسیون را به شدت تحت تاثیر قرار دهد. تغییرات آرام و پیوسته دستگاهی^۹ که از مسائلی چون فرسودگی دستگاه ناشی می شوند (به عنوان مثال بی رنگ شدن فیلتر در دستگاه های فلورسانس) و هم چنین تغییرات ناگهانی مثل جایگزین یا تعمیر شدن یک قسمت از دستگاه، می توانند سبب تغییر در اندازه گیری ها نسبت به قبل شوند که نهایتاً می توانند خطاهای پیش بینی^{۱۰} بزرگی را منجر شوند.

۱-۱-۲ عوامل محیطی

شرایط اندازه گیری مثل دما و رطوبت، می توانند تاثیر به سزایی بر روی داده های حاصل از بسیاری از انواع اندازه گیری ها داشته باشند. این عوامل می توانند سبب شوند که فرضا یک مدل کالیبراسیون چند متغیره که در یک دمای مشخص ساخته شده است، برای داده های اندازه گیری شده در دماهای دیگر فاقد ارزش باشد.

۱-۱-۳ شرایط فیزیکی نمونه

تغییر در ترکیب فیزیکی نمونه، مثل اندازه ذرات، حتی وقتی ترکیب شیمیایی نمونه تغییر نکند، تاثیر قابل ملاحظه ای بر روی داده های طیف سنجی دارد. این به این معنی است که با استفاده از مدل کالیبراسیون قبلی، نتایج نادرستی حاصل خواهند شد و این مدل برای شرایط جدید فاقد ارزش است.

⁸ Instability

⁹ Drift

¹⁰ Prediction error

۲-۱ انتقال کالیبراسیون^{۱۱}

تجزیه دانان همواره سعی بر حفظ مدل کالیبراسیون با زمان برای یک دستگاه مشخص و یا قابل استفاده کردن مدل موجود، برای دستگاه های ثانویه دارند. در صورتی که مدل کالیبراسیون موجود، بنا به برخی از دلایل ذکر شده، قابل استفاده برای دستگاه یا شرایط متفاوت نباشد، برای رفع این مشکل و برای اجتناب از ساختن یک مدل کالیبراسیون جدید، روش های انتقال کالیبراسیون می توانند به کار روند. در این روش ها، چند نمونه با شرایط خاص، که به آن ها نمونه های انتقال^{۱۲} گفته می شود، از مدل کالیبراسیون موجود انتخاب می شوند و تحت شرایط جدید و یا دستگاه جدید اندازه گیری می شوند. سپس توسط روش های استاندارد کردن که به آن ها پرداخته خواهد شد، یک مدل بین داده حاصل از نمونه های انتقال و داده متناظر آن ها در مدل کالیبراسیون اولیه ساخته شده و یک ماتریس انتقال به دست می آید. با ضرب کردن این ماتریس انتقال در مدل کالیبراسیون اولیه، این مدل برای شرایط جدید نیز به خوبی و بدون خطای قابل ملاحظه استفاده می شود.

۱-۲-۱ روش های استاندارد کردن^{۱۳}

روش های استاندارد کردن، در تکنیک های انتقال کالیبراسیون برای محاسبه ماتریس انتقال مناسب استفاده می شوند. این روش ها، بر اساس شیوه ای که برای محاسبه ماتریس انتقال به کار می برند، انواع مختلفی دارند.

۱-۱-۲-۱ استاندارد کردن مستقیم^{۱۴}

روش استاندارد کردن مستقیم که توسط ونگ^{۱۵} و همکارانش معرفی شد، یک روش استاندارد کردن چند متغیره است که طی آن بین دو ماتریس داده متفاوت، یک ارتباط مستقیم ریاضی برقرار می گردد و یک مدل خطی بین آن ها ساخته می شود. این مدل خطی، توسط یک ماتریس انتقال T توصیف می گردد. در صورتی که S_1 و S_2 دو ماتریس داده باشند، این مدل را می توان به صورت زیر نوشت:

¹¹- Calibration Transfer

¹²- Transfer Samples

¹³- Standardization Methods

¹⁴- Direct Standardization (DS)

¹⁵- Wang

$$\mathbf{S}_{1(n \times m)} = \mathbf{S}_{2(n \times m)} \mathbf{T}_{(m \times m)} \quad (1)$$

ماتریس \mathbf{T} ، به صورت زیر محاسبه می گردد:

$$\mathbf{T} = \mathbf{S}_2^{-1} \mathbf{S}_1 \quad (2)$$

در استاندارد کردن مستقیم در جهت ستون ها، هر ستون از ماتریس \mathbf{S}_1 ، به همه ستون های ماتریس \mathbf{S}_2 به طور هم زمان مرتبط می شود و در واقع هر ستون از ماتریس \mathbf{S}_1 از ترکیب خطی همه ستون های ماتریس \mathbf{S}_2 ساخته می شود.

ماتریس \mathbf{T} با ضرب شدن در \mathbf{S}_1 قادر است آن را از بعد ستون ها به ماتریس \mathbf{S}_2 تبدیل کند. با استفاده از ماتریس انتقال حاصل، می توان هر ماتریس دیگری که شرایط مشابه \mathbf{S}_2 دارد را نیز به فضای \mathbf{S}_1 منتقل کرد.

۲-۱-۲-۱ استاندارد کردن مستقیم تکه ای^{۱۶}

استاندارد کردن مستقیم تکه ای روش دیگری است که توسط ونگ و همکارانش به عنوان حالت پیچیده تری از روش استاندارد کردن مستقیم ارائه شد. در این روش، هر ستون از ماتریس \mathbf{S}_1 از ترکیب خطی ستون متناظر آن در ماتریس \mathbf{S}_2 و یک پنجره کوچک اطراف آن ساخته می شود

پنجره ای که در نظر گرفته می شود، می تواند متقارن یا غیر متقارن باشد. در این حالت برای هر ستون، یک بردار انتقال^{۱۷} محاسبه خواهد شد. سپس این بردار های رگرسیون، به ترتیب در قطر اصلی ماتریس انتقال قرار می گیرند و یک ماتریس قطری باند شده^{۱۸} را به دست می دهند.

از آن جایی که روش استاندارد کردن مستقیم تکه ای، با یک پنجره متحرک کار می کند، در دو انتهای ماتریس، اثرات لبه^{۱۹} ممکن است اتفاق بیافتد، چرا که امکان تشکیل یک پنجره کامل در این نقاط وجود ندارد. در این موارد، لبه ها می توانند حذف شوند و یا این که با استفاده از برون یابی، پنجره های

¹⁶ Piecewise Direct Standardization (PDS)

¹⁷ Transfer Vector

¹⁸ Banded Diagonal Matrix

¹⁹ Edge Effect

کامل در لبه ها تشکیل گردند. مزیت اصلی این روش نسبت به روش استاندارد کردن مستقیم، محلی^{۲۰} بودن آن است. روش استاندارد کردن مستقیم تکه ای، به واسطه محلی بودن و چند متغیره بودن، امکان تصحیح همزمان تفاوت های شدتی، شیفیت ها و پهن شدگی پیک ها را فراهم می سازد.

روشهای ذکر شده در بالا روشهایی بودند که برای تصحیح تغییرات طیفی در روش های کالیبراسیون چند متغیره صورت گرفته است.

در آنالیز داده های سیستمی بر پایه مدل^{۲۱}، یکی از بهترین روشهای آنالیز داده ها استفاده از روش سرهم زدن داده ها^{۲۲} می باشد. در سیستم هایی که در آنها مشکل کمبود مرتبه^{۲۳} وجود ندارد سرهم زدن داده ها فقط باعث افزایش دقت در آنالیز سیستم سیستمی بر پایه مدل می شود و سرهم زدن برای آنالیز کامل سیستم ضروری نمی باشد. در حالیکه در داده هایی که دچار کمبود مرتبه هستند، آنالیز کامل داده ها به تنهایی امکان پذیر نمی باشد و تنها وقتی به صورت کامل حل می شود که داده ها سرهم زده شوند. اگر به عنوان مثال در یک سیستم سیستمی طول موجها در ستونها و زمانها در ردیف های ماتریس های داده باشند، فرض اصلی در سرهم زدن ستونی داده ها این است که طیف خالص اجزاء واکنش از یک ماتریس به ماتریس دیگر تفاوتی ندارند. موضوع حضور تفاوت های طیفی اجزاء خالص موضوعی است که در بخشی از این پایان نامه پرداخته شده است. در این قسمت نشان داده شده است که حضور تفاوت طیفی و نادیده گرفتن آنها صحت طیفی داده ها را تحت تاثیر قرار میدهد. لذا برای تصحیح این تغییرات طیفی از روش انتقال کالیبراسیون استفاده شده است و نشان داده شده است که به کار بردن روش انتقال کالیبراسیون منجر به تخمین صحیح پارامترها می شود. نکته بسیار مهم و حائز اهمیت در استفاده از روش انتقال کالیبراسیون در روشهای کالیبراسیون چند متغیره، انتخاب چند نمونه که نمایانگر کل داده ها می باشند، ضروری است. این دو نمونه در هر دو شرایط باید اندازه گیری شوند تا ماتریس انتقال **T** محاسبه شود. در این پایان نامه روشی جدید برای استفاده از روش انتقال کالیبراسیون در داخل فرایند برازش^{۲۴} ارائه شده است که در آن نیازی به انتخاب چند نمونه که نمایانگر کل داده ها می باشند، نیست و از کل فضای طیف های خالص اجزاء استفاده می شود. این فرآیند به صورت شماتیک نشان داده خواهد

²⁰ Local

²¹ Model based analysis

²² Global Analysis

²³ Rank deficiency

²⁴ Fitting

شد. در واقع اصلی ترین مشکل روش های انتقال کالیبراسیون انتخاب این نمونه ها می باشد که در این مطالعه این محدودیت حل شده است.

۲ بررسی سیستم سینتیکی مرتبه اول

در بخش اول یک سیستم سینتیکی مرتبه اول^{۲۵} مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا داده های مرتبه اول شبیه سازی^{۲۶} شدند. دو سری داده با سینتیک مرتبه اول شبیه سازی شد. در این دو سری داده، غلظت اولیه گونه واکنشگر^{۲۷} ثابت بوده و تفاوت این دو ماتریس داده در ثابت سرعت آنها می باشد. تفاوت این ثابت سرعت ها می تواند به دلیل تفاوت دما، pH و غیره در این دو ماتریس داده باشد. تفاوت دما را وقتی به کار می برند که هدف محاسبه پارامترهای فعال سازی^{۲۸} در سیستم مورد نظر باشد و تفاوت pH وقتی به کار می رود که هدف به عنوان مثال تعیین مرتبه واکنش نسبت به pH باشد. به هر ترتیب ثابت سرعت در این داده های شبیه سازی شده متفاوت است. همانطور که ذکر شد، در این سیستم مشکل کمبود مرتبه وجود ندارد و داده ها به صورت تکی^{۲۹} قابل آنالیز کردن می باشند. ولی نتایج آنالیز بر پایه مدل داده های شبیه سازی تایید می کند که آنالیز داده ها به صورت سرهم زده شده باعث افزایش دقت در پارامترهای تخمین زده شده می شود. برای نشان دادن این موضوع مقادیر مختلف برای ثابت سرعت اول k_1 ، و ثابت سرعت دوم k_2 ، برای داده های تکی و سرهم زده شده امتحان شد و مقدار جمع مربعات ماتریس باقیمانده (RSS)^{۳۰} به ازای هر کدام محاسبه شد. شکل ۱ مقادیر محاسبه شده RSS را با رویش^{۳۱} مقادیر k_1 و k_2 را نشان می دهد.

²⁵ First order kinetic

²⁶ Simulation

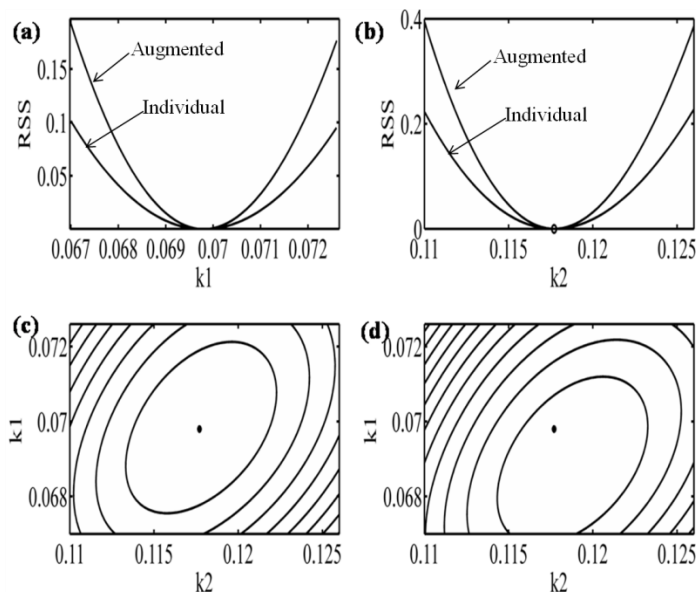
²⁷ Reactant

²⁸ Activation parameters

²⁹ Individual

³⁰ Residual Sum of Squares

³¹ Scan



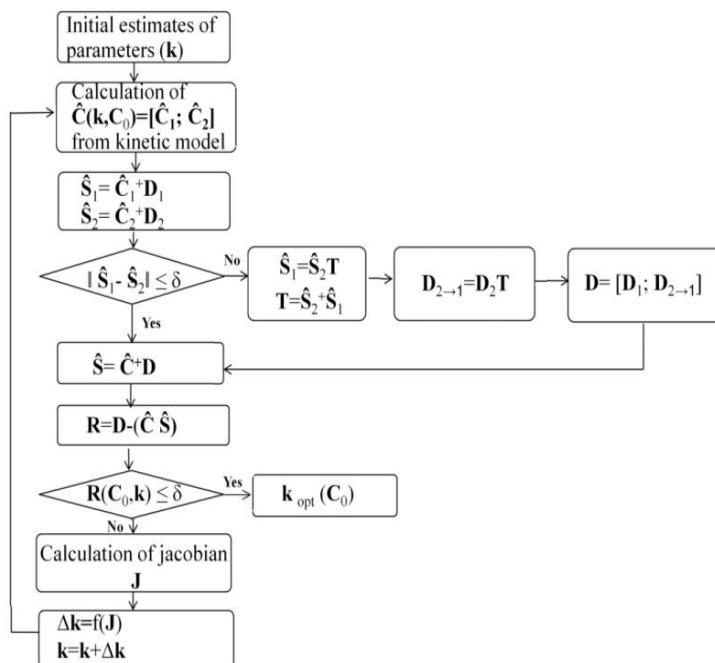
شکل ۱: مقدار RSS با روبش مقادیر k_1 و k_2 در داده های شبیه سازی شده. مقادیر صحیح شبیه سازی شده k_1 و k_2 به صورت یک نقطه در شکلها نشان داده شده است.

همانطور که در این شکل نشان داده شده است، آنالیز داده های سرهم زده شده، مینیمم تیزتر^{۳۲} و باریکتری^{۳۳} نسبت به داده های تکی داشته که این بیانگر دقت بالاتر روش سرهم زدن می باشد. در این داده ها فرض بر این است که تغییر شرایط باعث تغییر شکل طیف ها نمی شود. اما اگر بنا به هر دلیلی شکل طیف ها تغییر کند (و این تغییر مربوط به تغییر دما و یا pH نباشد) و این تغییر طیفی نادیده گرفته شود، نقطه مینیمم در سطح RSS به دست آمده در مکانی متفاوت از مقادیر شبیه سازی شده برای k_1 و k_2 به دست می آید. این پدیده به این معناست که صحت پارامترهای به دست آمده تحت تاثیر این تفاوت طیفی بوده و صحیح نمی باشند. همانطور که در این شکل نشان داده شده است، فقط در عدم حضور تفاوت های طیفی، پارامترهای تخمین زده شده از آنالیز داده های سرهم زده شده، صحیح می باشند.

بر این اساس با توجه به لزوم تصحیح این تفاوت های طیفی در صورت آنالیز داده های سرهم زده شده، اگر چنانچه در داخل الگوریتم برازش^{۳۴} بر اساس مدل، یک مرحله انتقال کالیبراسیون بین طیف خالص اجزاء تخمین زده شده انجام شود، و از ماتریس انتقال به دست آمده برای تصحیح تفاوت طیفی

³² Sharp
³³ narrow
³⁴ Fitting

در ماتریس دوم استفاده شود، نتایج صحیح از داده های سرهم زده شده به دست می آیند. الگوریتم روش پیشنهاد شده در این مطالعه در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲: الگوریتم روش پیشنهاد شده در رابطه با انجام یک مرحله انتقال کالیبراسیون در داخل آنالیز برپایه مدل

بعد از داده های شبیه سازی شده، تجزیه^{۳۵} علف کش کارباریل که یک سینتیک مکانیسم مرتبه اول دارد، با استفاده از تکنیک فلورسانس بررسی شد. سه سری داده آزمایشی در سه pH مختلف (D₁ (pH=9.35), D₂ (9.55) and D₃ (9.61)) در آزمایشگاه ثبت شد. در جدول 1 نتایج حاصل از آنالیز داده های تکی و سرهم زده شده نشان داده شده است.

جدول 1 ثابت سرعت های تخمین زده شده از تجزیه مرتبه اول کاربریل

Data	CT*	$k_1 \times 10^4$	$k_2 \times 10^4$	$k_3 \times 10^4$	RSS% $\times 10^2$
D_1	-	112.08(± 0.10)	—	—	0.22
D_2	-	—	261.26(± 1.47)	—	0.21
D_3	-	—	—	518.28(± 0.58)	0.32
[$D_1; D_2$]	No	116.77(± 3.59)	383.30(± 15.00)	—	0.34
	Yes	111.83(± 0.17)	261.42(± 1.11)	—	0.20
	LSMA	112.08(± 0.19)	261.26(± 1.47)	—	0.27
[$D_1; D_3$]	No	117.19(± 2.38)	—	911.78(± 20.00)	61.12
	Yes	111.90(± 0.14)	—	518.27(± 0.48)	0.17
	LSMA	112.08(± 0.15)	—	518.28(± 0.66)	0.25
[$D_2; D_3$]	No	—	275.54(± 3.09)	665.56(± 8.42)	17.21
	Yes	—	261.25(± 1.06)	518.22(± 0.55)	0.24
	LSMA	—	261.26(± 1.25)	518.28(± 0.73)	0.33
[$D_1; D_2; D_3$]	No	101.82(± 1.81)	330.68(± 5.88)	807.52(± 16.00)	51.22
	Yes	111.90(± 0.14)	261.25(± 0.95)	518.21(± 0.49)	0.18
	LSMA	112.08(± 0.16)	261.26(± 1.30)	518.28(± 0.75)	0.28

CT: Calibration Transfer; LSMA: Local Spectra Mode of Analysis which is illustrated in reference ¹⁹, RSS %: Residual

$$\text{Sum of Square percent. RSS\%} = \frac{\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n (D_{ij} - \hat{D}_{ij})^2}{\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n (D_{ij})^2} \times 100$$

همانطور که این جدول نشان می دهد استفاده از انتقال کالیبراسیون در آنالیز داده های سرهم زده شده منجر به جواب های صحیح می شود. روش پیشنهادی در این پایان نامه با روش پیشنهاد شده LSMA³⁶ مقایسه شد. نتایج حاصل از روش پیشنهادی در مقایسه با نتایج به دست آمده از LSMA بهتر بودند. به این معنی که اول اینکه خطای پارامترها از روش پیشنهادی کمتر از LSMA است و دوم اینکه مقدار عددی RSS در روش پیشنهادی کمتر است.

۳ بررسی سیستم سیتیکی مرتبه دوم متوالی

در بخش دوم یک سیستم سیتیکی مرتبه دوم متوالی بررسی شد. در این سیستم یکی از واکنشگرها در ناحیه مورد بررسی جذب نداشته و بنابراین مشکل کمبود مرتبه در این سیستم وجود ندارد. ابتدا روش پیشنهادی در شکل ۲ بر روی داده های شبیه سازی شده و سپس روی داده های آزمایشی استفاده شد. در داده های شبیه سازی شده اثر انواع تفاوت های طیفی شامل تفاوت های

³⁶ Local Spectra Mode of Analysis

شدتی^{۳۷}، پهن شدگی^{۳۸} و جابجایی^{۳۹}، امتحان شد. نکته حائز اهمیت این بود که تفاوت های شدتی علی رغم اینکه تاثیری در تعداد فاکتورهای معنادار سیستم ندارند و مرتبه سیستم را تغییر نمی دهند، ولی حضور آنها اثر بسیار زیادی روی صحت نتایج پارامترهای تخمین زده شده دارد. در واقع نتایج شبیه سازی نشان داد که حضور تفاوت شدتی، پهن شدگی و جابجایی و نادیده گرفتن آنها منجر به تخمین پارامترهای غیر صحیح می شود. مشابه بخش قبلی نشان داده شد که پارامترهای صحیح بعد از استفاده از روشهای انتفال کالیبراسیون به صورتی که در شکل ۲ نشان داده شد، به دست می آید. در این سیستم شبیه سازی شده اثر نویز و خطا در غلظت اولیه واکنشگرها بررسی شد. در این بخش مشاهده شد که خطا در غلظت اولیه منجر به تخمین غیر صحیح پارامترها می شود. حضور نویز در این داده ها هم باعث می شود که به جای یک جواب تنها^{۴۰}، یک محدوده جواب برای ثابت سرعت ها به دست آید. در نتیجه سیستم مورد بررسی به خطا در غلظت اولیه و نویز بالا در سیستم حساس است. در بخش تجربی، واکنش نمک دیازونیوم و ارتو آمینو بنزویک اسید در آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت. مکانیسم این واکنش درجه دو متوالی^{۴۱} است که چون ارتو آمینو بنزویک اسید در این ناحیه جذب ندارد، مشکل کمبود مرتبه در این سیستم وجود ندارد. روش پیشنهادی در این پایان نامه با روش پیشنهاد شده آنالیز محلی بعد طیفی شده^{۴۲} LSMA مقایسه شد. نتایج حاصل از روش پیشنهادی در مقایسه با نتایج به دست آمده از LSMA بهتر بودند. به این معنی که اول اینکه خطای پارامترها از روش پیشنهادی کمتر از LSMA است و دوم اینکه مقدار عددی RSS در روش پیشنهادی کمتر است.

۴ بررسی سیستم سینتیکی مرتبه دوم با کمبود مرتبه

در بخش سوم یک سیستم سینتیکی مرتبه دوم بررسی شد. این سیستم یک سیستم با کمبود مرتبه است و برخلاف سیستم های بررسی شده قبلی که در آنها سرهم زدن فقط به منظور افزایش دقت بود، در این سیستم سرهم زدن برای آنالیز کامل داده ها ضروری می باشد. مشابه بخش های قبلی نشان داده شده است که در صورتی که در آنالیز داده های سرهم زده شده تفاوت طیفی وجود داشته باشد و نادیده گرفته شود، صحت نتایج به دست آمده تحت تاثیر قرار گرفته و نتایج غیر صحیح به دست می آید. در

³⁷ Intensity

³⁸ Brodening

³⁹ Shift

⁴⁰ Unique

⁴¹ Second order consecutive

⁴² Local Spectra Mode of Analysis

واقع حضور تفاوت های طیفی و نادیده گرفتن آنها منجر به خطای سیستماتیک می شود. در این بخش هم نشان داده شده است که در صورتیکه به شیوه توضیح داده شده، تصحیح شوند پارامترهای صحیح به دست می آید. اما نکته قابل توجه در این سیستم به دنبال استفاده از روش انتقال کالیبراسیون، طیف های خالص تخمین زده شده می باشد. چون در این روش بر طبق الگوریتم پیشنهادی ماتریس انتقال T بین S_1 و S_2 به دست می آید و چون S_1 و S_2 از حداقل مربعات⁴³ ماتریس داده های تکی D_1 و D_2 ، با C_1 و C_2 به دست می آیند که دچار کمبود مرتبه هستند در نتیجه طیف های خالص به دست آمده از آنها، ترکیب خطی از طیف های صحیح می باشند و نه خود آنها. بنابراین ماتریس انتقال T بین دو ماتریس ترکیب خطی به دست آمده و با ماتریس انتقال T که از خود طیف های اصلی S_1 و S_2 که در شبیه سازی استفاده شدند، به دست آمده است، کمی فرق می کنند. در این قسمت ماتریس انتقالی اولی T_{S-hat} و ماتریس انتقال دومی که از طیف های اصلی محاسبه شده اند T_{ideal} نامیده شده است. بنابراین چون T_{S-hat} و T_{ideal} کمی با هم تفاوت دارند در نتیجه طیف خالص اجزاء قابل محاسبه نخواهند بود. در این مرحله روشی برای تخمین T_{ideal} از T_{S-hat} ارائه شده است. بدیهی است که در صورت محاسبه B_{ideal} ، با ضرب کردن آن در D_{2ideal} ، یعنی D_2 ای که طیف های آن با D_1 تفاوتی ندارد به دست آمده و با سرهم زدن D_1 و D_{2ideal} ، طیف خالص اجزاء به دست می آید.

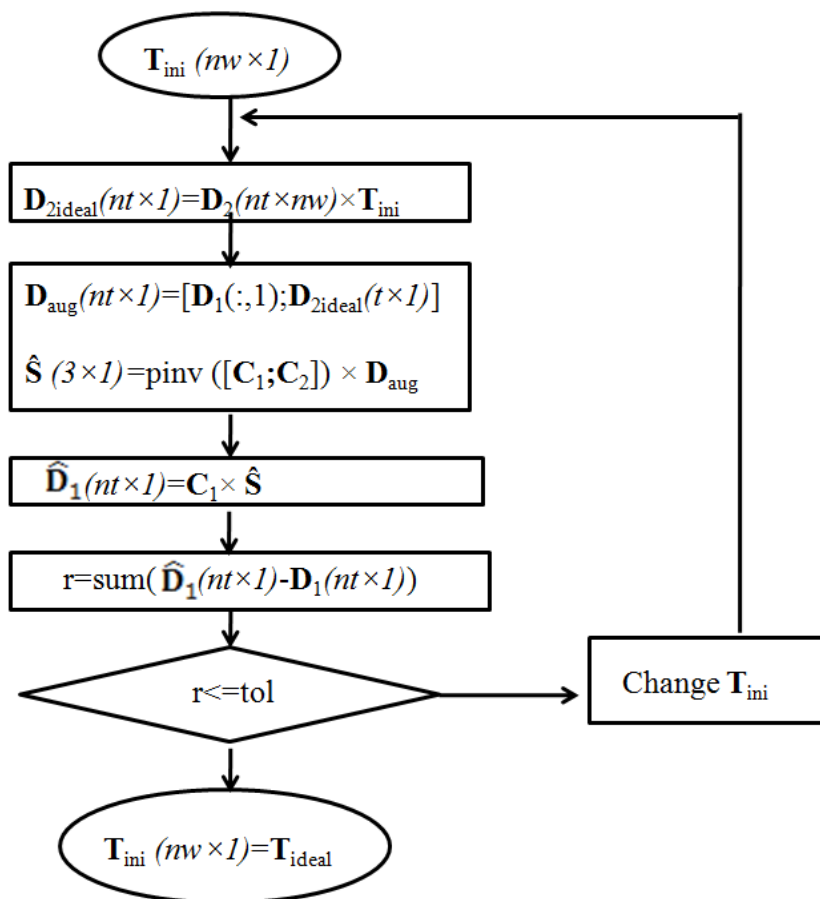
روش پیشنهادی در این مرحله بر اساس جستجوی شبکه ای⁴⁴ در فضای داده ها برای پیدا کردن T_{ideal} می باشد. شکل ۳، اساس روش پیشنهادی را نشان می دهد. این روش، برای تخمین هر یک از ستون های D_{2ideal} یکبار انجام می شود و هر بار یک ستون از D_{2ideal} ساخته می شود. شکل ۴ نشان می دهد که یک محدوده جواب برای T_{ideal} و در نتیجه ستون دوم ماتریس طیف های به دست آمده از آن، حاصل می گردد. از آنجاییکه برخی از این مقادیر منفی هستند با اعمال محدودیت منفی نبودن⁴⁵ جواب ها محدودتر می شوند. شکل ۵ محدوده جواب های مثبت را برای همه طول موجها نشان می دهد. بدیهی است که طیف های واقعی در محدوده جواب های مثبت به دست آمده هستند. به نظر می رسد که اطلاعات بیشتر درباره مرتبه محلی⁴⁶ طیف ها در کم کردن این محدوده تاثیر داشته باشد. ولی به هر ترتیب در این بخش از اطلاعات بیشتری استفاده نشد.

⁴³ Least Square

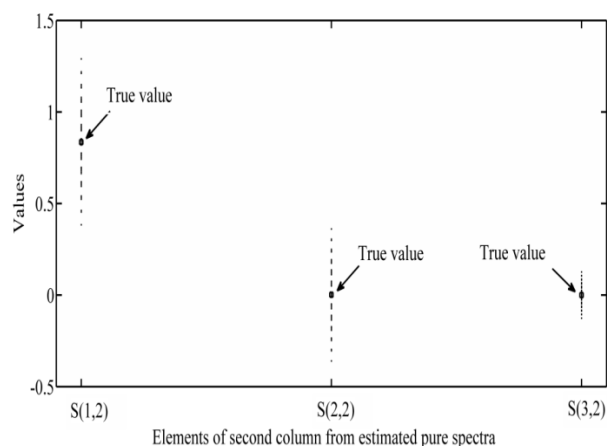
⁴⁴ Grid search

⁴⁵ Nonnegativity

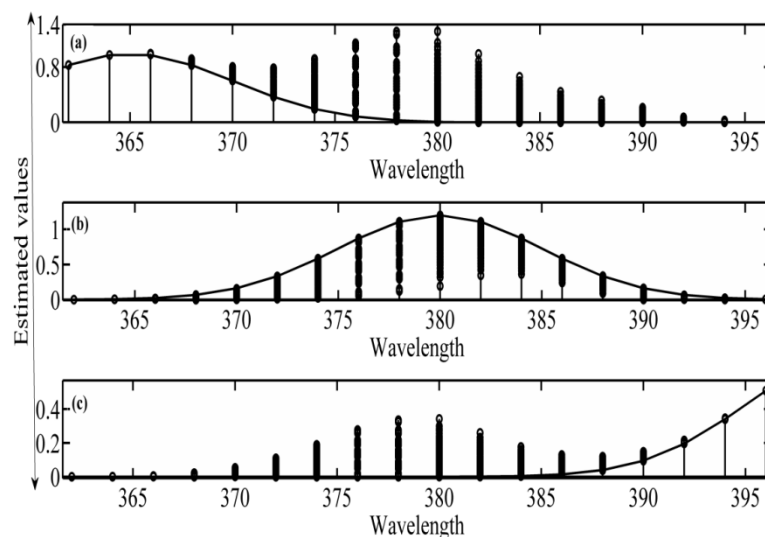
⁴⁶ Local Rank



شکل ۳: الگوریتم پیشنهاد شده برای پیدا کردن عناصر ماتریس T_{ideal}



شکل ۴ مقادیر محاسبه شده ستون دوم (در یک طول موج خاص) از ماتریس طیف خالص اجزاء از T_{ideal} تخمین زده شده



شکل ۵ پروفایل های طیفی مثبت تخمین زده شده در همه طول موج ها برای (a) واکنشگر A ، (b) واکنشگر B و (c) محصول C

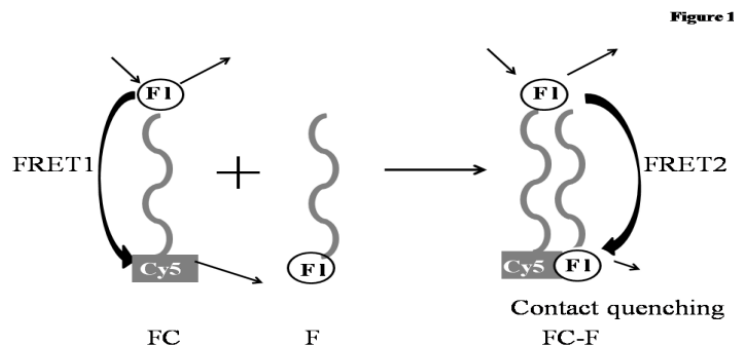
۵ بررسی سیستم سینتیک هیبریداسیون DNA

در بخش بعدی سینتیک هیبریداسیون DNA با استفاده از فلورسانس بررسی شد. تک رشته های DNA که در این قسمت استفاده شدند رشته های ده نوکلئوتیدی بودند که یکی از آنها در انتهای ۵' با فلورسین و در سر ۳' با Cy5 نشاندار شده بودند. این تک رشته ای FC نام گرفت. تک رشته ای دوم یک رشته ده نوکلئوتیدی مکمل رشته FC بود که در سر ۳' آن فلورسین قرار گرفته بود که این رشته F نامیده شد. در این قسمت با استفاده از تکنیک فلورسانس، ماتریس تهییج-نشر^{۴۷} EEM، هیبریداسیون این دو رشته با زمان ثبت و بررسی شد. شکل ۶، شکل شماتیک این واکنش را نشان می دهد. این آزمایش در سه غلظت اولیه مختلف از F انجام شد. نکته جالب توجه در این داده ها کاهش شدت پیک نشر فلورسین و Cy5 با زمان بود. انتظار می رفت که با هیبرید شدن دو رشته، زوج جدید انتقال انرژی با تشدید فلورسانس^{۴۸} FRET از Cy5 و فلورسین تشکیل شود و چون این دو رنگدانه به هم نزدیکترند،

⁴⁷ Excitation Emission Matrix

⁴⁸ Florescence Resonance Energy Transfer

FRET قوی تری بین آنها ایجاد شده و سیگنال آن افزایش می یابد. ولی مشاهدات نشان داد که هم FRET، هم Cy5 و هم فلورسین کاهش پیدا کردند. برای توجیه کاهش FRET با بررسی های بیشتر متوجه حضور پدیده ای به نام خاموش شدن ایستا⁴⁹ با هیبریداسیون این دو رشته شدیم. این پدیده که با FRET رقابت می کند به این دلیل ایجاد می شود که یک ترکیب سومی ایجاد می شود که نشر ندارد و همین باعث می شود در طول زمان FRET کاهش یابد.



شکل ۶ شکل شماتیک هیبریداسیون DNA

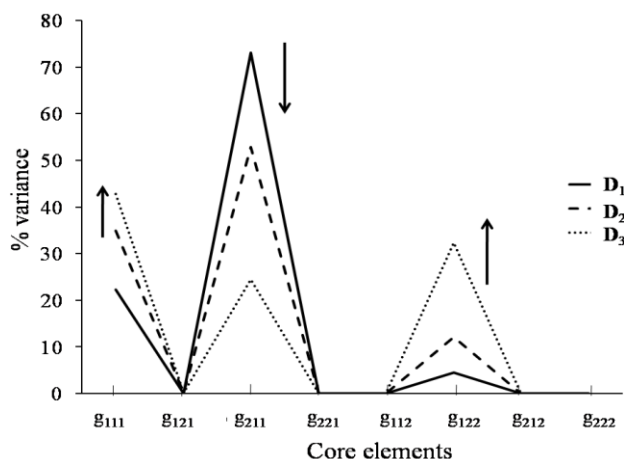
سیستم مورد بررسی یک مثال از یک داده سه بعدی است که از بعد غلظت به دلیل وجود کمبود مرتبه از نوع بسته بودن^{۵۰}، از بعد تهییج به دلیل یکسان بودن تهییج فلورسین و FRET و در بعد نشر به دلیل یکسان بودن نشر Cy5 با FRET، دچار کمبود مرتبه است. بنابراین این سیستم با دارا بودن مسئله کمبود مرتبه از هر سه طرف با روش تاکر ۳ محدود شده^{۵۱} آنالیز شد. نتایج حاصل از این آنالیز با روش PARAFAC مقایسه شد. در روش تاکر ۳ محدود شده، محدودیت هایی بر روی هسته^{۵۲} تاکر ۳ اعمال شد. این محدودیت ها بر اساس اطلاعات موجود از سیستم اعمال شد. نتایج آنالیز این سه داده در شکل ۷ نشان داده شده است.

⁴⁹ Static Quenching

⁵⁰ Closure rank deficiency

⁵¹ Restricted Tucker3

⁵² Core



شکل ۷ مقایسه واریانس عناصر هسته به دست آمده از تاکر ۳ محدود شده

۶ جمع بندی

به طور کلی در این پایان نامه از روش انتقال کالیبراسیون برای تصحیح تفاوت طیفی در آنالیز بر پایه مدل سیستم های سیستمی پرداخته شد و نشان داده شد که در حضور تفاوت طیفی و عدم استفاده از روش انتقال کالیبراسیون می تواند منجر به نتایج غیر صحیح شود. در حالی که به کار بردن این روش منجر به نتایج صحیح می شود. در این مطالعه نشان داده شد که حضور تفاوت های طیفی چه در داده هایی با مرتبه کامل و چه با کمبود مرتبه، صحت نتایج را تحت تاثیر قرار می دهد و استفاده از روش انتقال کالیبراسیون منجر به جواب های صحیح می شود. نکته ای که در آنالیز سیستم های با کمبود مرتبه وجود دارد، به تخمین طیف خالص اجزاء به دلایلی که ذکر شدند امکان پذیر نمی باشد. لذا برای محاسبه پروفایل های طیفی، روشی بر اساس روش های انتقال کالیبراسیون بر روی این داده ها پیشنهاد شده است. بنابراین در سیستم های با کمبود مرتبه، انتقال کالیبراسیون به دو منظور استفاده شده است. (۱) تصحیح تفاوت های طیفی و (۲) محاسبه طیف خالص اجزاء. روش پیشنهادی در این رساله قابل تعمیم به آنالیز همه سیستم هایی است که بر پایه مدل قابل حل هستند و در واقع یک مدل خاص برای آنها وجود دارد.

سپس سیستم هیبریداسیون DNA با استفاده از تکنیک فلورسانس بررسی شد. سیستم مورد بررسی یک مورد خاص با مشکل کمبود مرتبه در هر سه بعد بود. با اطلاعاتی که از سیستم موجود بود روش تاکر ۳ محدود شده برای آنالیز کیفی این داده های سه بعدی استفاده شد. در ادامه اثر دما بر روی

همین سیستم بررسی شد و دست آخر اینکه یگانه بودن^{۵۳} پروفایل های نشر و تهییج به دست آمده با استناد به شروطی که در آنالیز داده ها از آنها استفاده شد، اثبات شد. همانطور که نتایج آنالیز با تاکر ۳ محدود شده نشان داده شد، پروفایل های غلظتی به دست یگانه نبودند و یگانه بودن این پروفایل ها هم بر اساس اطلاعات موجود از سیستم اثبات نشد.

⁵³ Uniqueness

واژه نامه انگلیسی به فارسی

Activation parameters	پارامترهای فعال سازی
Artificial Neural Networks	شبکه های عصبی مصنوعی
Banded Diagonal Matrix	ماتریس قطری باند شده
Bilinear	دو خطی
Calibration Transfer	انتقال کالیبراسیون
Closure rank deficiency	کمبود مرتبه از نوع بسته بودن
Core	هسته
Degradation	تجزیه
Direct Standardization	استاندارد کردن مستقیم
Drift	تغییرات آرام و پیوسته دستگاه
Edge Effect	اثرات لبه
Excitation Emission Matrix	ماتریس تهییج-نشر
First order kinetic	سینتیک مرتبه اول
Fitting	برازش
Florescence Resonance Energy Transfer	انتقال انرژی با تشدید فلورسانس
Global Analysis	سرهم زدن داده ها
Grid search	جستجوی شبکه ای
Individual	تکی
Instability	عدم ثبات
Least Square	حداقل مربعات
Local	محلی
Local Rank	مرتبه محلی