

# به کارگیری روش‌های برسنجی چندمتغیره در شناسایی ترکیب‌های مؤثر در فعالیت ضد میکروبی برگ گیاه گردو با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع-طیف‌سنجی جرمی

سعید معصوم<sup>+</sup>\*

گروه شیمی تجزیه، دانشکده شیمی، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران

ناصر صمدی، بهاره مهرآرا

دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

زهرا زهرائی

گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده شیمی، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران

**چکیده:** برگ گیاه گردو دارای ویژگی‌های ضد اکسایشی، ضد قارچی و ضد میکروبی خوبی می‌باشد. در این مطالعه، برگ گیاه گردو از منطقه‌های گوناگون ایران جمع‌آوری شد و سپس عصاره آن به وسیله دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا-طیف‌سنجی جرمی مورد تجزیه قرار گرفت. ویژگی‌های ضد میکروبی عصاره برگ گیاه گردو به وسیله باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس اروئوس (ATCC29737) و باسیلوس سوبتیلیس (ATCC6633)، باکتری گرم منفی اشرشیا کلامی (ATCC10536) و مخمر کاندیدا آلیکانس (ATCC10231) ارزیابی شد و پیک‌های مسئول ویژگی ضد میکروبی با استفاده از چندین روش برسنجی چندمتغیره خطی، شناسایی شد. نتیجه‌های این روش‌ها به صورت نمودارهای برازش نمایش داده شدند که در آن‌ها پیک‌های ایجادکننده ویژگی ضد میکروبی دارای ضریب برازش منفی هستند. روش برازش اجزای مستقل به دلیل سادگی، تفسیرپذیری بهتر ضریب‌های برازش و تکرارپذیری بالا، برای نشان دادن ترکیب‌های مسئول فعالیت ضد میکروبی در نمونه‌ها ترجیح داده می‌شود. سرانجام برای مشخص کردن ساختار شیمیایی ترکیب‌های شناخته شده در فعالیت ضد میکروبی، از روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا-طیف‌سنجی جرمی استفاده شد.

**واژگان کلیدی:** برگ گیاه گردو، کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا-طیف‌سنجی جرمی، ترکیب‌های مسئول و ویژگی ضد میکروبی، برازش اجزای مستقل.

**KEYWORDS:** Walnut leaf, High-performance liquid chromatography-mass spectrometry, Potentially antimicrobial compounds, Independent component regression.

\* عهده‌دار مکاتبات

+E-mail: masoum@kashanu.ac.ir

## مقدمه

از نقطه نظر تاریخی، گیاهان دارویی اهمیت فراوانی در توسعه جامعه‌ها داشته‌اند ولی نکته دارای اهمیت جایی است که تنها کم‌تر از ۱۰٪ مجموع ۲۵۰۰۰۰ گونه گیاهی جهان برای بیش از یک عملکرد زیست‌شناختی، شناسایی و مورد استفاده قرار گرفته‌اند. گرایش عمومی جامعه به استفاده از داروها و درمان‌های گیاهی و به طور کلی فراورده‌های طبیعی به ویژه در طی سال‌های اخیر رو به افزایش بوده و مهم‌ترین دلیل‌های آن، اثبات اثرهای مخرب و جانبی داروهای شیمیایی و ناتوانی پزشکی کلاسیک در درمان بیماری‌های مزمن مانند آسم، دیابت، روماتیسم و فشارخون از یک سو و ایجاد آلودگی‌های زیست‌محیطی که کره زمین را تهدید می‌کند، از سوی دیگر بوده است. گیاهان دارویی به دلیل ماهیت طبیعی و وجود ترکیب‌های هومولوگ دارویی در کنار هم، با بدن سازگاری بهتری دارند و به‌طور معمول بدون عوارض ناخواسته هستند، به‌ویژه در مصرف طولانی و در بیماری‌های مزمن، بسیار مناسب می‌باشند. درخت گردو با نام علمی *Juglans regia* از درختان بسیار با ارزش و از پهن برگان است که در بسیاری از نقطه‌های جهان در نیمکره شمالی به طور طبیعی می‌رویند و کاشته می‌شوند. برگ درخت گردو دارای ترکیب‌های اینوزیت، الایک اسید، گالیک اسید، پارافین، تانن، مواد چرب و املاح معدنی مانند کلسیم، پتاسیم، منیزیم و باریم است و عصاره برگ درخت گردو ویژگی‌های میکروب‌کشی و باکتری‌کشی دلخواهی دارد [۱].

امروزه بررسی اثرهای ضد میکروبی اسانس و عصاره‌های گیاهی به‌ویژه گیاهانی که به صورت سنتی مصرف طبی دارند، یکی از مباحث‌های مورد علاقه پژوهشگران به شمار می‌رود. به طور کلی هر چه مقدار مواد فنولیک در اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی بیشتر باشد ویژگی‌های ضد میکروبی آن‌ها علیه پاتوژن‌های غذایی بیش‌تر خواهد بود. کم‌ترین غلظت مهارکننده‌ی رشد یا MIC<sup>۱</sup> به کم‌ترین مقدار از پادزی اطلاق می‌شود که می‌تواند به طور چشمگیری رشد یک ارگانیسم را پس از گذشت یک دوره انکوباسیون مشخص (۱۶ تا ۲۰ ساعت بسته به گونه باکتری) مهار نماید. کم‌ترین غلظت کشندگی یا MBC<sup>۲</sup> به کم‌ترین غلظت از پادزی اطلاق می‌شود که می‌تواند پس از گذشت ۲۴ ساعت جمعیت باکتریایی را به میزان ۹۹/۹٪ کاهش دهد، به عبارت دیگر، جمعیت اولیه را هزار بار کاهش دهد [۲]. MIC<sub>50</sub> کم‌ترین

دیفیوژن مورد استفاده قرار داده شد. کموتریکس (شیمی سنجی)، را به عنوان شاخه‌ای از علم شیمی که از ریاضی و آمار و کامپیوتر برای طراحی آزمایش‌های بهینه‌سازی، برقراری ارتباط بین نتیجه‌های آزمایش با متغیرهای آزمایشی و همچنین استخراج اطلاعات از سامانه‌های شیمیایی، استفاده می‌کند، تعریف کرده‌اند. با استفاده از تجزیه داده‌های شیمیایی به دست آمده از روش‌های کموتریکس، اطلاعات مفیدی استخراج می‌شود که با توجه به این اطلاعات می‌توان آزمایش‌های مورد نظر با بازدهی بهتر را طراحی کرد. در این پژوهش، روش‌های گوناگون برسنجی چندمتغیره شامل برازش جز اصلی<sup>۳</sup> [۳،۴]، برازش حداقل مربعات جزئی<sup>۴</sup> [۵-۷]، تصحیح علامت متعامد<sup>۵</sup> [۸،۹]، تصویرسازی متعامد ساختارهای نهفته<sup>۶</sup> [۱۰،۱۱]، برازش جزء مستقل<sup>۷</sup> [۱۲-۱۴] با پیش‌پردازش‌های متفاوت شامل تمرکز بر میانگین<sup>۸</sup>، بهنجارسازی<sup>۹</sup> و همبستگی بین همساز شده‌ی بهینه<sup>۱۰</sup> [۱۵]، انجام می‌پذیرد و سپس ضریب برازش بر حسب متغیرها رسم می‌شود. ترکیب داده‌ها از کروماتوگرام‌های برآمده از کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (شامل داده‌های HPLC-DAD) و داده‌های به‌دست آمده از ویژگی‌های ضد میکروبی با روش‌های کموتریکس به ما اجازه می‌دهد تا پیک‌های مسئول ویژگی ضد میکروبی را مشخص کنیم. با رسم نمودارهای متغیرها بر حسب ضریب برازش، پیک‌های مسئول ویژگی ضد میکروبی، خود را به صورت منفی نشان می‌دهند.

جلیلی و همکاران در سال ۲۰۱۲ میلادی محتوای فنولی برگ گردوی ایرانی را در نمونه خاک‌های متفاوت بررسی کرده و این اجزا را با استفاده از کروماتوگرافی مایع-طیف‌سنجی جرمی

(۱) Minimum inhibitory concentration

(۳) Principal components regression

(۵) Orthogonal signal correction

(۷) Independent component regression

(۹) Normalization

(۲) Minimum bactericidal concentration

(۴) Partial least squares

(۶) Orthogonal projections to latent structures

(۸) Mean centering

(۱۰) Correlation optimized warping

خریداری شده از شرکت پانریک با درجه خلوص بالای ۹۹/۹ درصد.

### روش‌های انجام آزمایش

ویژگی‌های ضد میکروبی عصاره برگ گیاه گردو به وسیله باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوسا روئوس<sup>۱</sup> (ATCC29737) و باسیلوس سوبتیلیس<sup>۲</sup> (ATCC 6633) باکتری گرم منفی اشرشیاکلائی<sup>۳</sup> (ATCC10536) و همچنین مخمر کاندیدا آلبیکانس<sup>۴</sup> (ATCC10231) توسط دو روش متفاوت دیسک دیفیوژن<sup>۵</sup> و میکروبراث دایلوژن<sup>۶</sup> مورد ارزیابی قرار گرفت.

### جمع‌آوری، خشک و آسیاب کردن گیاه

در اواخر تیر و اوایل مرداد ماه (زمان مناسب برای گرفتن عصاره گیاه برگ گردو) حدود ۲ کیلوگرم برگ تازه و جوان گیاه گردو از ۱۶ ناحیه گوناگون ایران (ارمک، بروجن، دره، قمصر، همدان، خرقان، خوی، محلات، مرق، میاندوآب، نراق، نیاسر، نور، نشوه، ارومیه و زنجان) جمع‌آوری شده و به مدت یک هفته در مکانی سایه، به طور کامل خشک شد. پس از خشک کردن، برگ‌ها آسیاب شده و پودر برگ‌های خشک شده، پس از عبور از الک مش ۲۰ برای عصاره‌گیری آماده شد.

### عصاره‌گیری

در این پژوهش، از روش ماسراسیون برای گرفتن عصاره برگ گیاه گردو استفاده شد و با استفاده از حمام فراصوت مدت زمان مورد نیاز کمتر شد. در این روش، ۵۰ گرم از برگ گیاه با ۵۰۰ میلی‌لیتر متانول در یک ارلن ریخته شد و ارلن به مدت یک روز در شیکر قرار گرفت. مخلوط به مدت ۲ ساعت در حمام فراصوت با دمای ۵۰ درجه سلسیوس قرار داده شد و سپس مخلوط به دست آمده با استفاده از کاغذصافی با اندازه منافذ ۲۴۰ نانومتر صاف شده و محلول زیر صافی با استفاده از روتاری تا خشک شدن کامل عصاره مورد نظر، حلال‌زدایی شد.

### روش اندازه‌گیری ویژگی ضد میکروبی

در این پژوهش، ویژگی‌های ضد میکروبی عصاره برگ گیاه گردو به وسیله باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوسا روئوس و باسیلوس

شناسایی نموده‌اند [۱۶]. در پژوهشی دیگر نومی و همکاران در سال ۲۰۱۲ میلادی به بررسی ویژگی‌های ضد اکسایشی و شناسایی اجزای فنولی تشکیل‌دهنده عصاره ایتیل استاتی گیاه گردوی تونس با استفاده از کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا پرداخته‌اند [۱۷]. رگویریرو و همکاران نیز، در پژوهشی دیگر در سال ۲۰۱۴ میلادی، اجزای پلی‌فنول در گردو را با به کارگیری کروماتوگرافی مایع تلفیقی با طیف‌سنجی جرمی شناسایی و جداسازی نمودند [۱۸].

پژوهش‌های دیگری در زمینه عصاره گیاه مالتوس در مورد شناسایی ترکیبات مؤثر در ویژگی‌های ضد اکسیدانی، توسط تیسارت و همکاران در دانشگاه بلژیک در سال ۲۰۰۹ و ۲۰۱۲ میلادی صورت گرفته است [۱۹،۲۰]. در این پژوهش نمونه‌های گیاه مالتوس از ۷۱ گونه‌ی گوناگون از منطقه‌های متفاوت ویتنام پس از عصاره‌گیری و انجام کروماتوگرافی مایع، نخست به وسیله روش‌های کمومتریک طبقه‌بندی و سپس با استفاده از روش حداقل مربعات جزیی و روش تصویرسازی متعامد ساختارهای نهفته، اجزای مؤثر در ویژگی ضد اکسیدانی آن‌ها شناسایی شده است. در پژوهشی دیگر معصوم و همکاران در سال ۲۰۱۸ میلادی افزون بر تعیین اجزای اسانس گیاهان مرزه و لعل کوهستان و تعیین خاصیت ضد میکروبی هر یک از آن‌ها، ارتباط بین خاصیت ضد میکروبی و اجزای تشکیل‌دهنده اسانس را توسط روش‌های گوناگون برسنجی چندمتغیره بررسی و اجزای مؤثر در ویژگی ضد میکروبی در ترکیب اسانس را شناسایی نموده‌اند [۲۱].

در پژوهش حاضر نشان داده می‌شود که از بین روش‌های کمومتریک مورد مطالعه، روش برازش اجزای مستقل به دلیل سادگی و تفسیرپذیری بهتر ضریب‌های برازش، برای نشان دادن ترکیب‌های مسئول ویژگی ضد میکروبی در نمونه‌ها دارای برتری بیش‌تری می‌باشد.

### بخش تجربی

#### مواد شیمیایی مورد نیاز

مواد شیمیایی که در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفته است شامل موارد زیر می‌باشد: متانول HPLC grade خریداری شده از شرکت سیگماآلدریج با درجه خلوص بالای ۹۹/۹ درصد، آب درجه HPLC تهیه شده از شرکت Chem Lab با درجه خلوص بیش از ۹۹/۹ درصد، استونیتریل HPLC grade خریداری شده از شرکت سیگماآلدریج با درجه خلوص بیش‌تر از ۹۹/۹ درصد، فرمیک اسید

(۱) Staphylococcus aureus

(۳) Escherichia coli

(۵) Disc diffusion assay

(۲) Bacillus subtilis

(۴) Candida albicans

(۶) Micro broth dilution assay

جدول ۱ - برنامه شستشوی نمونه عصاره گردو در دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا

درصد حلال استونیتریل	زمان بر حسب دقیقه
۱۵	۰
۴۰	۱۲
۶۰	۱۸
۸۰	۲۰
۸۵	۲۸

۱۰ میلی‌لیتر رساننده و برای حل شدن کامل مخلوط در متانول، به مدت ۳ دقیقه در حمام فراصوت با دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس محلول به دست آمده، از صافی سرسنگی ویژه HPLC عبور داده می‌شود تا مشکلی برای ستون HPLC ایجاد نکند. محلول آماده‌ی تزریق به دستگاه HPLC می‌باشد. مشخصات و شرایط دستگاه HPLC مورد استفاده در این پژوهش شامل موارد زیر می‌باشد: ستون Agilent C18 (SB-C18) با ارتفاع ۲۵۰ میلی‌متر، قطر درونی ۴/۶ میلی‌متر و قطر ذرات ۳/۵ میکرومتر، فاز متحرک استونیتریل و مخلوط آب و ۰/۱ درصد اسید فرمیک، سرعت جریان فاز متحرک ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه، حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر، زمان کل شویش ۳۷ دقیقه با آشکارساز آرایه‌ی دیودی.

برای انتخاب برنامه شستشو، با بررسی میزان کیفیت جداسازی پیک‌های به دست آمده توسط حلال‌های گوناگون از قبیل استونیتریل-آب، متانول-آب و استونیتریل-متانول، مخلوط استونیتریل-آب انتخاب شد و با توجه به این موضوع که استفاده از مخلوط آب با فرمیک اسید به جای آب خالص، باعث جداسازی بهتر پیک‌ها می‌شود حلال‌های استونیتریل-آب + ۰/۱ درصد فرمیک اسید انتخاب شدند.

برنامه شستشوی گرادینانی به کار برده شده در نمونه بر اساس درصد حلال استونیتریل از ۱۵ تا ۸۵ درصد در جدول ۱ آورده شده است.

#### تزریق عصاره به دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا - طیف‌سنجی جرمی (HPLC-MS)

برای تزریق عصاره برگ گردو از دستگاه HPLC-MS با مشخصات زیر استفاده شد: دستگاه HPLC با ستون Agilent (SB-C18) با ارتفاع ۲۵۰ میلی‌متر، قطر داخلی ۴/۶ میلی‌متر و قطر ذره‌های ۳/۵ میکرومتر، فاز متحرک شامل حلال‌های استونیتریل و آب با ۰/۱ درصد فرمیک اسید، با سرعت جریان حلال ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه و آشکارساز آرایه دیودی، حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر

سوبتیلیس، باکتری گرم منفی اشرشیاکالای و مخمر کاندیدا آلیکانس ارزیابی شد. سویه‌های باکتری روی نوترینت آگار و سویه مخمر روی ساوردکستروز آگار در دمای ۳۷ درجه سلسیوس رشد داده شدند. سوسپانسیون‌های میکروبی در سرم نرمال تهیه شدند و کدورت آن‌ها با نیم‌مک‌فارلند تنظیم شد. فعالیت ضد میکروبی توسط دو روش متفاوت دیسک دیفیوژن و میکروبراث دایلوژن مورد ارزیابی قرار گرفت. در روش دیسک دیفیوژن پس از تهیه محلول هموزن خود، با استفاده از یک سواب پنبه‌ای استریل، محلول را به هم زده و پس از آب‌کشی کردن سواب، برای باکتری‌ها به محیط کشت مولر هینتون و برای مخمر به ساوردکستروز آگار انتقال داده می‌شود. سپس دیسک‌های کاغذی استریل (قطر ۶ میلی‌متر) با ۱۰ میکرولیتر عصاره با غلظت ۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (در حلال متانول) بر روی محیط‌های کشت شده قرار داده می‌شود. کشت‌های باکتریایی و مخمری به ترتیب ۲۴ و ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه می‌گردند، سپس قطر هاله عدم رشد بر اساس میلی‌متر اندازه‌گیری شد.

در روش میکروبراث دایلوژن، هفت نمونه از هر عصاره با غلظت‌های در بازه‌ی ۸ - ۰/۳۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از هر غلظت به هر چاهک از شتابک ۹۶ تایی که بیشتر به آن ۹۵ میکرولیتر محلول استریل تریپتیک سوی براث (TSB) اضافه شده بود افزوده شد و ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی به هر چاهک افزوده شد و شتابک‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت برای باکتری‌ها و ۴۸ ساعت برای مخمر انکوبه شدند. اولین چاهک که در آن هیچ رشدی دیده نمی‌شود به عنوان MIC تعیین شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از غلظت MIC و چند غلظت بالاتر از آن روی محیط کشت منتقل شده و اولین غلظتی که در آن رشدی دیده نشد به عنوان MBC تعیین شد. سپس MIC برای هر یک از نمونه‌های عصاره به دست آمد. در این جا MIC‌های به دست آمده بر دار y و طیف HPLC-DAD ماتریس X را تشکیل می‌دهد.

#### تجزیه آماری

در این پژوهش از نرم افزار MATLAB™ 8.2 برای پردازش داده‌ها و برسنجی چندمتغیره استفاده شد.

#### تزریق عصاره به دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا

برای تزریق نمونه‌های عصاره به دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) نخست ۷/۵ میلی‌گرم از عصاره را با متانول به حجم

جدول ۲ - میزان قطر هاله‌ی عدم رشد، MIC و MBC در سویه‌های میکروارگانیسم‌های به کار برده شده برای نمونه‌های گردو با استفاده از روش دیسک دیفیوژن و میکروبراث دایلوژن

اشرشیا کلی			استافیلوکوکوس ارئوس			باسیلوس سوبتیلیس			کاندیدا آلیکانس			نمونه‌های گردو
DD	MBC	MIC	DD	MBC	MIC	DD	MBC	MIC	DD	MBC	MIC	
NE	۱۲۵/۰	۱۲۵/۰	NE	۱۲۵/۰	۱۲۵/۰	۱۰	۲۵۰/۰	۲۵۰/۰	NE	۱۲۵/۰	۱۲۵/۰	ارمک
NE	۵۰۰/۰	۵۰۰/۰	NE	۱۲۵/۰	۱۲۵/۰	NE	۱۲۵/۰	۱۲۵/۰	۹	۵۰۰/۰	۵۰۰/۰	بروجن
NE	۲۰۰۰/۰	۲۰۰۰/۰	۹	۲۵۰/۰	۱۲۵/۰	۹	۳۱/۲	۳۱/۲	NE	۲۵۰/۰	۲۵۰/۰	دره
NE	۱۲۵/۰	۱۲۵/۰	NE	۱۲۵/۰	۳۱/۲	NE	۲۵۰/۰	۱۲۵/۰	NE	۲۵۰/۰	۲۵۰/۰	قمصر
NE	۱۰۰۰/۰	۱۰۰۰/۰	NE	۱۲۵/۰	۱۲۵/۰	۱۱	۳۱/۲	۳۱/۲	NE	۳۱/۲	۳۱/۲	همدان
NE	۱۰۰۰/۰	۱۰۰۰/۰	NE	۱۲۵/۰	۱۲۵/۰	NE	۱۲۵/۰	۱۲۵/۰	NE	۲۵۰/۰	۲۵۰/۰	خرقان
NE	۸۰۰۰/۰	۸۰۰۰/۰	NE	۲۵۰/۰	۱۲۵/۰	۱۰	۲۵۰/۰	۲۵۰/۰	۹	۱۲۵/۰	۱۲۵/۰	خوی
NE	۲۰۰۰/۰	۲۰۰۰/۰	NE	۲۵۰/۰	۱۲۵/۰	NE	۲۵۰/۰	۲۵۰/۰	۹	۱۰۰۰/۰	۵۰۰/۰	محللات
NE	۲۰۰۰/۰	۲۰۰۰/۰	NE	۲۵۰/۰	۱۲۵/۰	۱۰	۲۵۰/۰	۱۲۵/۰	NE	۲۵۰/۰	۲۵۰/۰	مرق
۹	۱۰۰۰/۰	۱۰۰۰/۰	NE	۲۵۰/۰	۱۲۵/۰	۱۰	۲۵۰/۰	۱۲۵/۰	NE	۱۲۵/۰	۳۱/۲	میاندوآب
۹	۲۰۰۰/۰	۲۰۰۰/۰	NE	۱۲۵/۰	۱۲۵/۰	NE	۵۰۰/۰	۱۲۵/۰	NE	۲۵۰/۰	۲۵۰/۰	نراق
۹	۲۰۰۰/۰	۲۰۰۰/۰	NE	۱۲۵/۰	۱۲۵/۰	۹	۱۲۵/۰	۱۲۵/۰	NE	۱۲۵/۰	۱۲۵/۰	نیاسر
۹	۳۱/۲	۳۱/۲	NE	۲۵۰/۰	۱۲۵/۰	NE	۲۵۰/۰	۲۵۰/۰	NE	۵۰۰/۰	۵۰۰/۰	نور
NE	۱۲۵/۰	۱۲۵/۰	NE	۲۵۰/۰	۲۵۰/۰	NE	۲۵۰/۰	۲۵۰/۰	NE	۵۰۰/۰	۵۰۰/۰	نشوه
NE	۴۰۰۰/۰	۴۰۰۰/۰	NE	۱۲۵/۰	۳۱/۲	NE	۳۱/۲	۳۱/۲	NE	۳۱/۲	۳۱/۲	ارومیه
NE	۵۰۰/۰	۵۰۰/۰	۹	۲۵۰/۰	۱۲۵/۰	NE	۱۲۵/۰	۱۲۵/۰	NE	۲۵۰/۰	۲۵۰/۰	زنجان

DD (mm) = Disc diffusion, NE = No effect

این که در مورد عصاره برگ گردو، متانول مورد استفاده به عنوان حلال، فرار می‌باشد نتیجه‌های این آزمون به طور کامل توصیف‌کننده فعالیت ضد میکروبی نمونه نمی‌باشد و همان‌گونه که در جدول ۲ نشان داده شده نمونه‌هایی که در این مرحله روی میکروارگانیسم‌ها بی‌تأثیر بوده‌اند در آزمون میکروبراث دایلوژن دارای ویژگی بازدارندگی رشد و یا کشندگی می‌باشند و در نتیجه آزمایش دیسک دیفیوژن، همیشه معیار مناسبی برای تعیین فعالیت ضد میکروبی نمی‌باشد و در این زمینه، نتیجه‌های آزمون میکروبراث دایلوژن معتبرتر می‌باشد. به هر حال، با توجه به نتیجه‌های آزمون دیسک دیفیوژن موجود در جدول ۲ دیده می‌شود که باکتری گرم مثبت باسیلوس سوبتیلیس بیشترین حساسیت را نسبت به عصاره برگ گردو دارا می‌باشد و نمونه‌ها، دارای هاله‌های عدم رشد بزرگ‌تری می‌باشند که از این بین نمونه‌ی همدان دارای تأثیر بیش‌تری می‌باشد.

در آزمون میکروبراث دایلوژن، هرچه میزان فاکتور MIC کم‌تر باشد، ویژگی بازدارندگی رشد میکروارگانیسم‌ها توسط نمونه بیش‌تر و بهتر می‌باشد. با توجه به نتیجه‌های به دست آمده دیده می‌شود که عصاره برگ گردو، با توجه به مقدارهای MIC، بیش‌ترین ویژگی بازدارندگی رشد را به روی باکتری‌های گرم مثبت باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس ارئوس و کم‌ترین تأثیر را روی باکتری

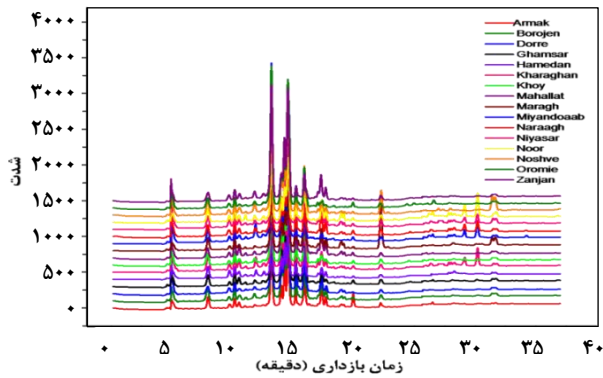
با زمان شویش ۳۷ دقیقه. دستگاه طیف‌سنج جرمی با نوع تجزیه‌گر جرمی چهار قطبی و منبع یونیزاسیون الکتروافشانه در حالت منفی با بازه‌ی m/z از ۱۰۰ تا ۱۵۰۰ و ولتاژ منبع ۳/۵ کیلو ولت.

## نتیجه‌ها و بحث

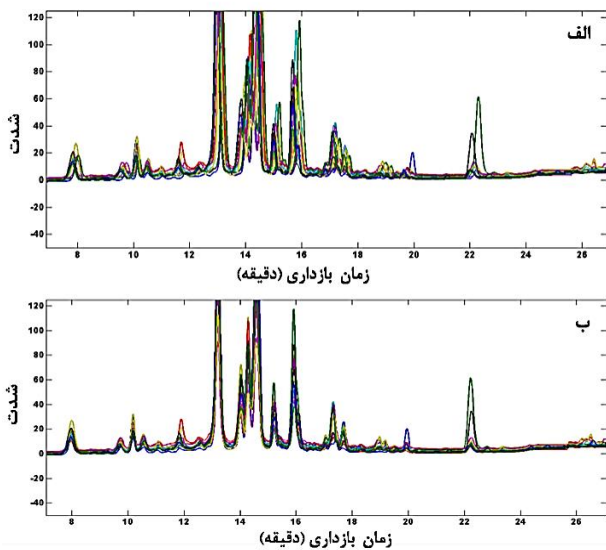
### تعیین ویژگی ضد میکروبی نمونه‌های عصاره برگ گردو

ویژگی‌های ضد میکروبی عصاره برگ گیاه گردو به وسیله‌ی باکتری‌های استافیلوکوکوس ارئوس، باسیلوس سوبتیلیس و اشرشیاکلاهی و مخمر کاندیدا آلیکانس توسط دو روش متفاوت دیسک دیفیوژن و میکروبراث دایلوژن مورد ارزیابی قرار گرفت و برای هر میکروارگانیسم، فاکتورهای MIC و MBC تعیین شد. در جدول ۲ میزان قطر هاله عدم رشد، MIC و MBC در سویه‌های گوناگون میکروارگانیسم‌های به کار برده شده، برای نمونه‌های عصاره برگ گردو گزارش شده است.

بر اساس آزمون دیسک دیفیوژن هر چه فاکتور قطر هاله عدم رشد بزرگ‌تر باشد میکروارگانیسم نسبت به نمونه حساس‌تر می‌باشد ولی در مورد نمونه‌های عصاره به دلیل این‌که فرایند انتشار آن‌ها در محیط آزمایش دیسک دیفیوژن به صورت کامل صورت نمی‌پذیرد و به‌ویژه



شکل ۱ - کروماتوگرام‌های نمونه‌های گوناگون عصاره گردو با شستشوی گرادایانی با فاز متحرک استونیتریل-آب + ۱٪ درصد اسید فرمیک



شکل ۲ - بازه‌ای از کروماتوگرام‌های نمونه‌ی برگ گردو (الف) پیش از هم‌ترازسازی با COW (ب) پس از هم‌ترازسازی با COW

مدل تجزیه اجزای مستقل<sup>۱</sup> ضرب دو ماتریس A و S می‌باشد که به صورت  $X = AS$  نشان داده می‌شود، که پارامتر A ماتریس مخلوط‌کننده و پارامتر S ماتریس اجزای مستقل می‌باشد [۱۲-۱۴]. در روش ICR نخست بر اساس روش تجزیه اجزای مستقل (ICA)، ماتریس مخلوط‌کننده (A) به دست می‌آید و سپس با استفاده از معادله  $y=Ab$  که در آن y بیانگر کمیت اندازه‌گیری شده (ویژگی ضد میکروبی، MIC) است، بردار ضریبها (b) تعیین می‌شود. برای اجرای مدل ICR لازم است تعداد اجزای مستقل تعیین شود که می‌توان این اجزا را به وسیله دو روش ICA-by-Blocks و معیار Durbin Watson تعیین نمود که در این پژوهش تعداد اجزای

گرم منفی اشرشیاکالای دارد. در کل، با توجه به نتیجه‌های موجود در جدول ۲ مشاهده می‌شود که نمونه ارومیه بیش‌ترین تأثیر را روی میکروارگانیزم‌های مورد مطالعه (به جز باکتری اشرشیاکالای) دارد.

### اجرای روش‌های برسنجی چندمتغیره روی ویژگی‌های ضد میکروبی عصاره برگ گردو

پس از به دست آمدن کروماتوگرام‌های مطلوب، کروماتوگرام‌ها توسط نرم افزار ORIGIN رسم شدند که در شکل ۱ نشان داده شده است. با پیش کروماتوگرام‌ها در هر ۰.۰۶۶۶ دقیقه، شدت کروماتوگرام‌ها در زمان‌های بازداري گوناگون به دست می‌آید. با در نظر گرفتن این نکته که زمان کل شویس ۳۷ دقیقه می‌باشد و با توجه به این که تعداد نمونه‌های برگ گردو مورد پژوهش قرار گرفته، ۱۶ عدد بود، یک ماتریس  $۱۶ \times ۵۵۲۵$  می‌شود که همان ماتریس X می‌باشد.

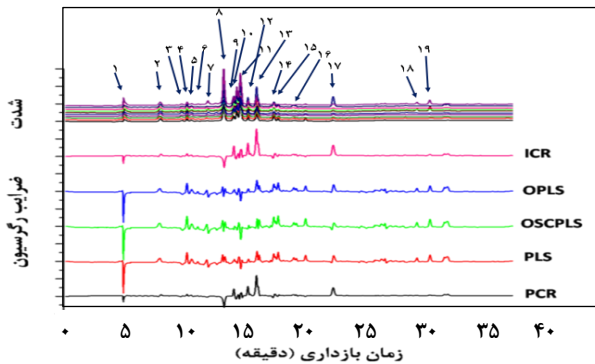
### هم‌ترازسازی کروماتوگرام‌ها با استفاده از پیش‌پردازش هم‌بستگی بین هم‌ساز شده بهینه

پیک‌های به دست آمده از نمونه‌های عصاره گوناگون به علت ناپایداری‌ها، نوسان‌های دستگاهی و خطاهای شخصی هنگام تزریق نمونه، به طور کامل بر هم منطبق نمی‌باشند، در نتیجه لازم است پیش از انجام برسنجی چندمتغیره، نخست باید داده‌ها را با استفاده از روش پیش‌پردازش هم‌بستگی بین هم‌ساز شده‌ی بهینه (COW) هم‌تراز شود تا موقعیت‌های همانند در یک جایگاه قرار بگیرند. کروماتوگرامی که بهترین جداسازی را داشته و دارای نوفه کم‌تری باشد به عنوان هدف انتخاب شده و بقیه کروماتوگرام‌ها با آن هم‌تراز می‌شوند. در نمونه عصاره برگ گردو، اندازه‌ی قطاع ۲۵ و اندازه قطعه ۲۲۱ مناسب‌ترین مقدار برای هم‌ترازسازی می‌باشد. تفاوت در موقعیت کروماتوگرام‌ها پیش و پس از استفاده از COW در شکل ۲ نشان داده شده است. در ادامه برای اجرای مدل‌های برسنجی چندمتغیره از داده‌های هم‌تراز شده استفاده می‌شود.

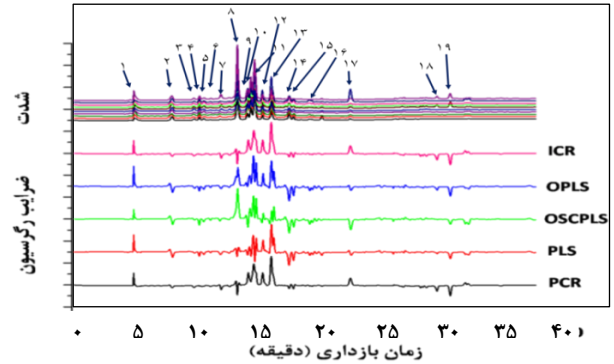
### اجرای روش‌های برسنجی چندمتغیره روی ویژگی‌های ضد میکروبی عصاره برگ گردو

پس از فراخوانی ماتریس X (داده‌ها از دستگاه HPLC-DAD) و بردار y (ویژگی ضد میکروبی نمونه‌های عصاره گردو) در نرم افزار MATLAB، بر روی کروماتوگرام‌های هم‌تراز ساز شده، روش‌های گوناگون برسنجی چندمتغیره از جمله OSC-PLS، PCR، PLS، OPLS و ICR با پیش‌پردازش‌های گوناگون صورت پذیرفت.

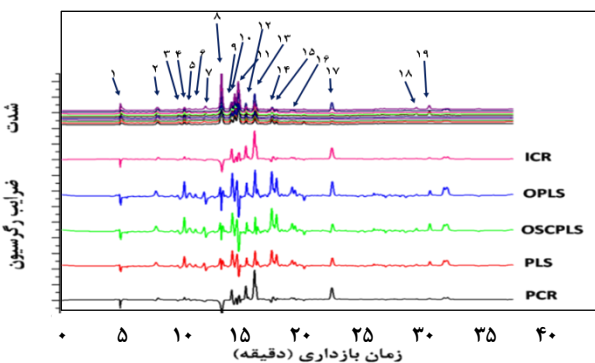
(۱) Independent component analysis (ICA)



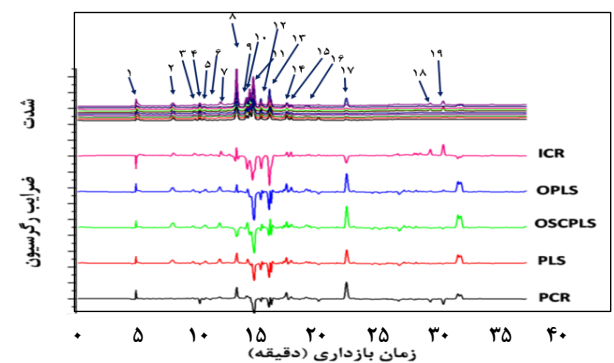
شکل ۵ - کروماتوگرام‌های HPLC-DAD و نمودارهای ضریب برازش به دست آمده از اجزای مدل‌های گوناگون روی داده‌ها برای باکتری باسیلوس سوبتیلیس در گیاه گردو



شکل ۳ - کروماتوگرام‌های HPLC-DAD و نمودارهای ضریب برازش به دست آمده از اجزای مدل‌های گوناگون روی داده‌ها برای باکتری اشرشیاکلاهی در گیاه گردو



شکل ۶ - کروماتوگرام‌های HPLC-DAD و نمودارهای ضریب برازش به دست آمده از اجزای مدل‌های گوناگون روی داده‌ها برای مخمر کاندیدا آلیکانس در گیاه گردو



شکل ۴ - کروماتوگرام‌های HPLC-DAD و نمودارهای ضریب برازش به دست آمده از اجزای مدل‌های گوناگون روی داده‌ها برای باکتری استافیلوکوکوس ارئوس

گزارش شده است. در بین این اجزا، ترکیب‌های ضد اکسایشی و ضد میکروبی ارزشمندی وجود دارند.

#### ضریب برازش

برای تشخیص اجزای مسئول ویژگی ضد میکروبی در عصاره برگ گردو، نمودارهای ضریب برازش به دست آمده از همه روش‌های ذکر شده برای هر یک از چهار میکروارگانیسم مورد مطالعه، رسم شد (شکل‌های ۳ تا ۶). با توجه به شکل‌های ۳ و ۴ و با توجه به مدل بهینه‌ی ICR، پیک‌های مسئول ویژگی ضد میکروبی به ترتیب زمان بازداری، در باکتری اشرشیاکلاهی ترکیب‌های ۳-پارا کومالوکوئینیک اسید، دیگالیول، هتروفیلین دی و گلانرجینین آ و در باکتری استافیلوکوکوس ارئوس، ترکیب‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۶، پنتاکالویل گلوکز، والونئیک اسید دیلاکتون، (+)-کاتچین، هتروفیلینین دی و گلانرجینین آ می‌باشند. همچنین بر اساس

مستقل دو می‌باشد. در شکل‌های ۳ تا ۶ نمودارهای ضریب برازش روش‌های گوناگون برسنجی چندمتغیره شامل PCR، OPLS، PLS، OSC-PLS و ICR برحسب زمان بازداری برای هر یک از میکروارگانیسم‌ها نشان داده شده است.

#### شناسایی ترکیب‌های موجود در عصاره گردو با استفاده از HPLC-MS

۱۶ نمونه عصاره گردو در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفتند که تعدادی از این نمونه‌ها برای شناسایی دقیق ترکیب‌های موجود در عصاره به دستگاه HPLC-MS تزریق شدند. کروماتوگرام‌های به دست آمده توسط نرم افزار CHEMSTATION به الگوهای طیفی هر جز تبدیل شده و از نظر شاخص تشابه با طیف جرمی ترکیب‌های استانداردشان مقایسه شدند و ترکیب‌های مؤثر در ویژگی ضد اکسایشی عصاره گردو شناسایی و تعیین شدند. در جدول ۳ اجزای شیمیایی نمونه عصاره برگ گردو محلات به همراه زمان‌های بازداری

جدول ۳ - اجزای شیمیایی نمونه عصاره برگ گردوی محلات

ردیف	زمان بازداری	نام ترکیب	جرم اندازه‌گیری شده	شکافتگی‌های جرمی (m/z)	فرمول شیمیایی
۱	۴/۹۵	مونوگالیول گلوکز	۳۳۲/۰۷۳۴	۱۶۹/۰۱، ۲۴۱/۰۳، ۲۷۱/۰۴	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>10</sub>
۲	۷/۹۵	(-) - اپی کاتچین	۲۹۰/۰۷۸۹	۲۴۵/۰۸، ۲۰۵/۰۵، ۱۷۹/۰۳	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>
۳	۹/۷۳	کلروجنیک اسید	۳۵۴/۰۹۴۷	۱۹۱/۰۶، ۱۷۹/۰۳۴، ۱۳۵/۰۴	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>
۴	۱۰/۱۸	الاجیک اسید	۳۰۲/۰۰۵۹	۲۸۳/۹۹، ۲۵۷/۰۱، ۲۲۹/۰۱، ۱۸۵/۰۲	C <sub>14</sub> H <sub>6</sub> O <sub>8</sub>
۵	۱۰/۵۶	کوماریک هگزوساید اسید	۳۳۶/۰۹۹۴	۲۵۶/۰۷، ۲۳۵/۰۶، ۲۰۵/۰۴۹، ۱۶۳/۰۴	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>
۶	۱۱/۰۹	پروسیانیدین دیمر	۸۶۶/۲۰۵۰	۴۵۱/۱۰، ۴۲۵/۰۹، ۴۰۷/۰۸، ۲۸۹/۰۷	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>
۷	۱۱/۸۱	۳-پارا کومالوکوئینیک اسید	۳۳۸/۰۹۹۳	۱۶۳/۰۴، ۱۱۹/۰۵	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>
۸	۱۳/۲۰	دیگالویل	۴۸۴/۰۸۷۴	۳۳۱/۰۷، ۳۱۳/۰۶، ۱۶۹/۰۱	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>14</sub>
۹	۱۴/۳۰	۱،۲،۳،۴،۶ پنتاگالیول گلوکز	۹۴۰/۱۱۷۰	۷۸۷/۰۹، ۷۶۹/۰۹، ۶۱۷/۰۸، ۴۳۱/۰۶	C <sub>41</sub> H <sub>32</sub> O <sub>26</sub>
۱۰	۱۴/۵۳	تلی ماگراندین	۹۳۸/۱۰۱۷	۷۸۵/۰۸، ۶۳۵/۰۸، ۴۸۳/۰۷، ۳۰۰/۹۹	C <sub>41</sub> H <sub>30</sub> O <sub>26</sub>
۱۱	۱۴/۷۲	والونئیک اسید دیلاکتون	۴۷۰/۰۱۱۹	۴۵۰/۹۹، ۴۲۵/۰۱، ۳۰۰/۹۹، ۱۶۶/۹۹	C <sub>21</sub> H <sub>10</sub> O <sub>13</sub>
۱۲	۱۵/۲۷	استریستینین	۶۳۴/۰۷۹۰	۴۶۳/۰۵، ۴۲۱/۰۴، ۳۰۰/۹۹، ۲۷۵/۰۲	C <sub>27</sub> H <sub>22</sub> O <sub>13</sub>
۱۳	۱۵/۹۵	(+) - کاتچین	۲۹۰/۰۷۸۹	۲۴۵/۰۸، ۲۰۵/۰۵، ۱۷۹/۰۳	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>
۱۴	۱۷/۳۲	پدونکولاجین	۷۸۴/۰۷۵۱	۴۸۱/۰۶، ۳۰۰/۹۹، ۲۷۵/۰۲	C <sub>34</sub> H <sub>24</sub> O <sub>22</sub>
۱۵	۱۸/۹۹	تری گالیول گلوکز	۶۳۶/۰۹۴۷	۴۸۳/۰۸، ۴۶۵/۰۷، ۴۳۳/۰۶، ۳۱۳/۰۶، ۱۶۹/۰۱	C <sub>27</sub> H <sub>24</sub> O <sub>18</sub>
۱۶	۱۹/۲۲	پرا اکسین آ	۹۵۲/۰۸۱۰	۹۰۷/۰۸، ۷۸۳/۰۷، ۴۸۱/۰۶، ۳۰۰/۹۹، ۲۷۵/۰۲	C <sub>41</sub> H <sub>28</sub> O <sub>18</sub>
۱۷	۲۲/۲۴	کاسوارین	۹۳۶/۰۸۵۶	۷۸۳/۰۷، ۶۳۳/۰۷، ۴۸۱/۰۶، ۳۰۰/۹۹، ۲۷۵/۰۲	C <sub>41</sub> H <sub>28</sub> O <sub>26</sub>
۱۸	۲۹/۱۳	هتروفیلینین دی	۱۸۷۰/۱۵۶۰	۱۰۸۵/۰۷، ۷۸۳/۰۷، ۶۳۳/۰۷، ۴۵۰/۹۹، ۳۰۰/۹۹	C <sub>82</sub> H <sub>54</sub> O <sub>52</sub>

گروه کربوکسی ترکیب ۴-کوماریک اسید با گروه هیدروکسیل ضد میکروبی عصاره برگ گردو در برابر باکتری‌های باسیلوس سوبتیلیس و مخمر کاندیدا آلبیکانس، ترکیب‌های مونوگالیول گلوکز و دیگالیول می‌باشند. همان‌گونه که در شکل‌های ۳ تا ۶ قابل دیدن است مدل ICR به علت هموارتر بودن و تفسیرپذیری بهتر نسبت به سایر روش‌های برسنجی چند متغیره ترجیح داده می‌شود. ۱،۲،۳،۴،۶ پنتاگالیول گلوکز یک استر پنتاهیدروکسی گالیک اسید از گلوکز است. این ترکیب به عنوان محافظت کننده پرتو به کار رفته و می‌تواند در برابر واکنش‌های اکسایشی که وابسته به pH هستند مقاومت نماید. والونئیک اسید دیلاکتون یک تانین قابل هیدرولیز می‌باشد که اثرهای بازداری بر روی آنزیم مؤثر در متابولیسم استروئیدها و سرطان پروستات دارد. (+) - کاتچین که یک نوع فنول طبیعی از ایزومرهای رایج کاتچین می‌باشد دارای ویژگی‌های ضد اکسایشی و ضد میکروبی قدرتمندی در بین سایر اعضای فلاونوئیدها می‌باشد. دیگالیول یک گالتانین است که اغلب در گونه‌های بلوط یافت می‌شود. از ویژگی‌های ضد میکروبی یا ضد اکسایشی دیگالیول تا به امروز منبعی در دسترس نمی‌باشد. ۳-پارا کومالوکوئینیک اسید ترکیبی استری است که در اثر واکنش

گروه کربوکسی ترکیب ۴-کوماریک اسید با گروه هیدروکسیل اولیه یا ثانویه شناخته شده است. مونوگالیول گلوکز ترکیبی است که از گالیک اسید و بتاگلوکز تشکیل شده است و بیشتر در میوه بلوط دیده می‌شود. این ترکیب مهارکننده آلدوز می‌باشد و نیمه عمر آن در بدن انسان هنوز ناشناخته است. هتروفیلینین دی متعلق به یک طبقه از ترکیب‌های آلی است که به عنوان تانن هیدرولیز شناخته می‌شوند و کاتچین در ساختار آن وجود دارد و گالانرجینین آ یکی از مشتق‌های جدید دی کربوکسیلیک اسید می‌باشد که در گیاه گردو موجود می‌باشد. هنوز اطلاعات مشخصی از تأثیرهای این دو ترکیب بر روی انسان در دسترس نیست.

### نتیجه‌گیری

نتیجه‌ای که از مقایسه طیف HPLC-MS عصاره برگ گردو و ویژگی ضد میکروبی نمونه‌های گوناگون آن گرفته می‌شود این است که عصاره برگ گردو به عنوان ترکیب ضد میکروبی خوبی عمل می‌کند و بیشترین تأثیر را روی باکتری‌های گرم مثبت دارد. ترکیب داده‌های به‌دست آمده از کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا و داده‌های به دست آمده



## قردانی

نویسندگان مقاله از حمایت‌های پژوهشی دانشگاه‌های کاشان و ارومیه کمال تقدیر و تشکر را دارند.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۶/۰۴؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۰۲

از ویژگی‌های ضد میکروبی و استفاده روش‌های کمومتریک به ما کمک می‌کند تا پیک‌های مسئول ویژگی ضد میکروبی را مشخص کنیم. هر چه مقدار ترکیب‌هایی که دارای مقدار ضریب برازش منفی تری هستند در نمونه عصاره برگ گردو بیشتر باشد به طبع، ویژگی ضد میکروبی آن نیز افزایش می‌یابد. سرانجام، نتیجه‌گیری می‌شود که روش برازش اجزای مستقل در تبیین ترکیب‌های مسئول ویژگی‌های ضد میکروبی عصاره برگ گیاه گردو نسبت به سایر روش‌های برسنجی چندمتغیره دارای برتری بیش‌تر و تفسیرپذیری بهتر می‌باشد.

## مراجع

- [1] <https://en.wikipedia.org/wiki/Walnut>
- [2] Mahboubi M., Kazempour N., *Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Satureja Hortensis and Trachyspermum Copticum Essential Oil*, *Iran J. Microbiol.*, **3**: 194-200 (2011).
- [3] Martens H., Martens M., "Multivariate Analysis of Quality an Introduction", John Wiley, Chichester (2001).
- [4] Draper N.R., Smith H., "Applied Regression Analysis", John Wiley, New York (1981).
- [5] Centner V., Massart D.L., de Noord O.E., de Jong S., Vandeginste B M, Sterna C, *Elimination of Uninformative Variables for Mutivariate Calibration*, *Anal. Chem.*, **68**: 3851-3858 (1996).
- [6] Vandeginste B.G.M., Massart D.L., Buydens L.M.C., De Jong S., Lewi P.G., Smeyers-Verbeke J., "Handbook of Chemometrics and Qualimetrics": Part B, Elsevier, Amsterdam (1998).
- [7] Geladi P., Kowalski B.R., Partial least-squares regression: a tutorial, *Anal. Chim. Acta*, **185**: 1-17 (1986).
- [8] Sjoblom J., Svensson O., Josefson M., Kullberg H., Wold S., *An Evaluation of Orthogonal Signal Correction Applied to Calibration Transfer of Near Infrared Spectra*, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **44**: 229-244 (1998).
- [9] Andersson C.A., *Direct Orthogonalization*, *Chemom Intell Lab Syst*, **47(1)**: 51-63 (1999).
- [10] Trygg J., Wold S., *Orthogonal Projections to Latent Structures (O-PLS)*, *J. Chemometr.*, **16**: 119-128 (2002).
- [11] Eriksson L., Byrne T., Johansson E., Trygg J., Vikström C., "Multi- and Megavariate Data Analysis. Part I, Basic Principles and Applications", Umetrics AB, Umea, 425 (2006).
- [12] Chen J., Wang X.Z., *A New Approach to Near-Infrared Spectral Data Analysis Using Independent Component Analysis*, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **41**: 992-1001 (2001).
- [13] Durbin J., Watson G.S., *Testing for Serial Correlation in Least Squares Regression*, *Biometrika*, **37**: 409-428 (1950).
- [14] Zhang Y., Zhang Y., *Complex Process Monitoring Using Modified Partial Least Squares Method of Independent Component Regression*, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **98**: 143-148 (2009).
- [15] Stenlund H., Gorzsas A., Persson P., Sundberg B., Trygg J., *Orthogonal Projections to Latent Structures Discriminant Analysis Modeling on in Situ Ft-Ir Spectral Imaging of Liver Tissue for Identifying Sources for Identifying Sources of Variability*, *Anal. Chem.*, **80**: 6898-6906 (2008).

- [16] Jalili A., Sadeghzade A, [Comparative Phenolic Profile of Persian Walnut \(\*Juglans Regia\* L.\) Leaves Cultivars Grown in Iran](#), *J. Biochem. Res.*, **6**: 33-38 (2012).
- [17] Noumi E., Snoussi M., Trabelsi N., Ksouri R., Hamdaoui G., Bouslama L., Bakhrouf A., [Antioxidant Activities and Reversed Phase -High Performance Liquid Chromatography \(RP-HPLC\) Identification of Polyphenols in the Ethyl Acetate Extract of Tunisian \*Juglans Regia\* L.Treated Barks](#), *J. Med. Plants Res.*, **6**: 1468-1475 (2012).
- [18] Regueiro J., Sánchez-González C., Vallverdú-Queralt A., Simal-Gándara J., Lamuela-Raventós R., Izquierdo-Pulido M., [Comprehensive Identification of Walnut Polyphenols by Liquid Chromatography Coupled to Linear Ion Trap–Orbitrap Mass Spectrometry](#), *Food Chem.*, **152**: 340-348 (2014).
- [19] Tistaert C., Dejaegher B., Nguyen Hoai N., Chataigné G., Rivière C., Nguyen Thi Hong V., ChauVanb M., Quetin-Leclercq J., Vander Heyden Y., [Potential Antioxidant Compounds in Mallotusspecies Fingerprints. Part I: Indication, Using Linear Multivariate Calibration Techniques](#), *Anal. Chim. Acta*, **652**: 189-197 (2009).
- [20] Tistaert C., Dejaeghera B., Chataignéb G., Rivièreb C., Nguyen Hoaic N., ChauVanc M., Quetin-Leclercqb J., Vander Heyden Y., [Potential Antioxidant Compounds in Mallotus Species Fingerprints. Part II: Fingerprint Alignment, Data Analysis and Peak Identification](#), *Anal. Chim. Acta*, **721**: 35–43 (2012).
- [21] Masoum S., Samadi N., Mehrara B., Mahboubi M., [Potentiality of Independent Component Regression in Assessment of the Peaks Responsible for Antimicrobial Activity of \*Satureja Hortensisl.\* and \*Oliveria Decumbensvent.\* Using GC–MS](#), *J. Iran. Chem. Soc. (JICS)*, **15**: 2007–2016 (2018).