

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشکده شیمی

پایان نامه کارشناسی ارشد شیمی تجزیه

تعیین مقدار همزمان ایزومرهای پونسیو ۴آر و آمارانس در مخلوط‌های

دوتایی آن‌ها، با استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری جدید

هانیه برزویی

استاد راهنما:

دکتر قدمعلی باقریان دهقی

استاد مشاور:

دکتر فاطمه مصدرالامور

بهمن ماه ۱۳۹۶

تقدیم به:

## پدر و مادر

عزیز و بزرگوارم که علی‌رغم تحمل سختی‌ها  
و دشواری‌های فراوان مسیر پر پیچ و خم کسب دانش و  
معرفت را برایم هموار نموده و از دعای خیرشان بی‌نصیب  
نبوده‌ام.

## و همسر

مهربانم به پاس قدردانی از قلبی آکنده از  
عشق و معرفت که با صبر و شکیبایی خود محیطی سرشار از  
سلامت، امنیت، آرامش و زمینه مساعد را برای نگارش این  
پایان نامه فراهم نموده است.

## تشکر و قدردانی

تشکر و سپاس بی‌پایان مخصوص خدایی است که بشر را آفریده و به او قدرت اندیشیدن داده و توانایی‌های بالقوه را در وجود انسان قرار داده و او را امر به تلاش و کوشش نموده و راهنمایی را برای هدایت بشر فرستاده است.

امروز که به لطف و یاری خداوند بزرگ این دوره از تحصیلاتم را به پایان رساندم از زحمات فراوان پدر و مادر عزیزم و فداکاری‌های همسر مهربانم نهایت تشکر را دارم و آرزوی سلامتی را برایشان از پروردگار خویش خواهانم.

پس از ارادت خاضعانه به درگاه بی‌همتا، خانواده و همسر عزیزم لازم است از استاد ارجمند و بزرگواریم جناب آقای دکتر قدمعلی باقریان به‌خاطر سعه صدر و رهنمودهای دلسوزانه که در تهیه این پایان‌نامه مرا مورد لطف خود قرار دادند و راهنمایی‌های لازم را نمودند تشکر و قدردانی کنم و سلامتی و موفقیت این استاد عزیز را از درگاه احدیت خواهانم. از اساتید عزیز و بزرگواریم جناب آقای دکتر منصور عرب چم‌جنگلی، جناب آقای دکتر ناصر گودرزی و سرکار خانم دکتر مصدراامور نهایت تشکر و قدردانی را دارم و موفقیت روزافزون این بزرگواران را از خداوند منان خواهانم.

## تعهد نامه

- اینجانب **هانیه برزویی** دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته شیمی تجزیه دانشکده شیمی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه تعیین مقدار همزمان پونسیو ۴آر و آمارانس در مخلوط‌های دوتایی آن‌ها با استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری جدید تحت راهنمایی دکتر **قدمعلی باقریان‌دهقی** متعهد می‌شوم :
- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.
- در استفاده از نتایج پژوهش‌های محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می‌باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « Shahrood University of Technology » به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می‌گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده ( یا بافتهای آنها ) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است.

تاریخ

امضای دانشجو

### مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج ، کتاب ، برنامه های رایانه ای ، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است ) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می‌باشد . این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود .
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی‌باشد.

## چکیده

در این پایان نامه دو روش اسپکتروفتومتری ساده، صحیح و دقیق برای تعیین مقدار همزمان آمارانس و پونسیو ۴آر استفاده شده است. این روش‌ها شامل افزایش استاندارد نقطه H-نسبی (RHPSAM) و مرکز ثابت همراه با کم کردن طیف (CC-SS) است. در استفاده از این روش‌ها فاکتورهایی از جمله pH، نوع بافر و قدرت یونی مورد بررسی و بهینه‌سازی قرار گرفتند. گستره خطی آمارانس و پونسیو ۴آر برای هر دو روش CC-SS و RHPSAM ۰/۲-۴۰ میلی‌گرم بر لیتر به دست آمد. حد تشخیص آمارانس و پونسیو ۴آر در روش CC-SS به ترتیب ۰/۰۸۰ و ۰/۰۶۳ و در روش RHPSAM به ترتیب ۰/۱۴ و ۰/۰۹۶ میلی‌گرم بر لیتر به دست آمد. اثر مزاحمت گونه‌های مختلف بر گزینش‌پذیری روش‌ها بررسی شد. روش‌های پیشنهادی برای اندازه‌گیری همزمان هر دو گونه در نمونه نوشیدنی و نمونه آب شهر با دقت و صحت مطلوبی استفاده شد.

لغات کلیدی: آمارانس، پونسیو ۴آر، روش افزایش استاندارد نقطه H-نسبی (RHPSAM) و روش مرکز ثابت همراه با کم کردن طیف (CC-SS).

## فهرست مطالب:

- ۱- مقدمه ..... ۱
- ۱-۱- مقدمه ..... ۲
- ۲-۱- آمارانس ..... ۳
- ۳-۱- پونسیو آر۴ ..... ۴
- ۴-۱- مروری بر تحقیقات انجام شده در زمینه اندازه‌گیری همزمان آمارانس و پونسیو آر۴ در مخلوط‌های دوتایی آن‌ها ..... ۵
- ۲- تئوری ..... ۱۱
- ۱-۲- مقدمه‌ای بر اسپکتروسکوپی جذبی ..... ۱۲
- ۲-۲- کالیبراسیون ..... ۱۳
- ۱-۲-۲- کالیبراسیون یک متغیره ..... ۱۴
- ۱-۲-۲-۱- روش مرکز ثابت (CC) و روش مرکز ثابت همراه با کم کردن طیف (CC-SS) ..... ۱۶
- ۲-۲-۱-۲- روش افزایش استاندارد نقطه H-نسبی (RHPSAM) ..... ۱۸
- ۲-۲-۲- کالیبراسیون چند متغیره ..... ۲۲
- ۳- تجربی ..... ۲۵
- ۱-۳- اندازه‌گیری همزمان آمارانس و پونسیو آر۴ با استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری جدید ..... ۲۶
- ۲-۳- مواد شیمیایی مورد استفاده ..... ۲۶

- ۳-۳- محلول‌های مورد استفاده و طرز تهیه آن‌ها ..... ۲۷
- ۳-۴- دستگاه‌ها و وسایل مورد استفاده ..... ۲۷
- ۳-۵- طیف جذبی ..... ۲۸
- ۳-۶- بررسی و بهینه‌سازی پارامترهای موثر بر سیستم ..... ۳۰
- ۳-۶-۱- بررسی اثر pH ..... ۳۰
- ۳-۶-۲- بررسی اثر نوع بافر ..... ۳۴
- ۳-۶-۳- بررسی اثر قدرت یونی ..... ۳۴
- ۳-۷- شرایط بهینه ..... ۳۶
- ۳-۸- رسم منحنی کالیبراسیون ..... ۳۶
- ۳-۸-۱- تعیین دامنه خطی آمارانس و پونسیو ۴آر به صورت جداگانه ..... ۳۶
- ۳-۹- کاربرد روش افزایش استاندارد نقطه H-نسبی (RHPSAM) در تعیین غلظت آمارانس و پونسیو ۴آر ..... ۳۹
- ۳-۹-۱- محلول‌سازی سری ارزیابی و تست برای روش RHPSAM ..... ۴۳
- ۳-۹-۲- بهینه‌سازی مقسوم‌علیه در روش RHPSAM ..... ۴۵
- ۳-۹-۳- بهینه‌سازی طول موج در روش RHPSAM ..... ۴۶
- ۳-۱۰- بررسی اثر مزاحمت‌ها در روش افزایش استاندارد نقطه H-نسبی (RHPSAM) ..... ۵۳
- ۳-۱۱- حد تشخیص روش RHPSAM ..... ۵۵



۵۵	۱۲-۳- دقت و صحت روش RHPSAM
۵۶	۳-۳- کاربرد روش RHPSAM در آنالیز نمونه‌های حقیقی
۵۶	۱-۱۳-۳- کاربرد روش RHPSAM در آنالیز نمونه نوشیدنی
۵۸	۲-۱۳-۳- کاربرد روش RHPSAM در آنالیز نمونه آب شهر شاهرود
۵۹	۳-۱۴- کاربرد روش مرکز ثابت همراه با کم کردن طیف (CC-SS) با آمارانس به‌عنوان مقسوم‌علیه
۶۴	۳-۱۴-۱- محلول‌سازی سری ارزیابی و تست برای روش CC-SS
۶۶	۳-۱۴-۲- بهینه‌سازی غلظت آمارانس به‌عنوان مقسوم‌علیه در روش CC-SS
۶۷	۳-۱۴-۳- بهینه‌سازی طول موج در روش CC-SS با مقسوم‌علیه آمارانس
۶۹	۳-۱۵- کاربرد روش مرکز ثابت همراه با کم کردن طیف (CC-SS) با پونسیو ۴ آر به‌عنوان مقسوم‌علیه
۷۳	۳-۱۵-۱- بهینه‌سازی غلظت پونسیو ۴ آر به‌عنوان مقسوم‌علیه در روش CC-SS
۷۴	۳-۱۵-۲- بهینه‌سازی طول موج در روش CC-SS با مقسوم‌علیه پونسیو ۴ آر
۷۵	۳-۱۶- کاربرد روش مرکز ثابت (CC) برای اندازه‌گیری غلظت آمارانس و پونسیو ۴ آر
۸۰	۳-۱۷- بررسی اثر مزاحمت‌ها در روش مرکز ثابت همراه با کم کردن طیف (CC-SS)
۸۲	۳-۱۸- حد تشخیص روش CC-SS
۸۲	۳-۱۹- دقت و صحت روش CC-SS
۸۳	۳-۲۰- کاربرد روش CC-SS در آنالیز نمونه‌های حقیقی

۳-۲۰-۱- کاربرد روش CC-SS در آنالیز نمونه نوشیدنی ..... ۸۳

۳-۲۰-۲- کاربرد روش CC-SS در آنالیز نمونه آب شهر شاهرود ..... ۸۵

۴- بحث و نتیجه‌گیری ..... ۸۷

۴-۱- اندازه‌گیری همزمان آمارانس و پونسیو ۴آر در مخلوط دوتایی آن‌ها با استفاده از روش‌های

اسپکتروفتومتری ..... ۸۸

۴-۱-۱- بررسی و بهینه‌سازی پارامترهای تجربی ..... ۸۸

۴-۱-۲- ارقام شایستگی روش‌ها ..... ۸۹

۴-۱-۳- ارزیابی آماری روش‌ها ..... ۸۹

۴-۱-۴- گزینش پذیری روش ..... ۹۲

۴-۱-۵- کاربرد روش ..... ۹۲

۴-۱-۶- مقایسه روش‌های پیشنهادی با برخی از روش‌های موجود ..... ۹۳

۴-۱-۷- آینده‌نگری ..... ۹۶

## فهرست جداول:

- جدول ۱-۳: مواد شیمیایی مورد استفاده ..... ۲۶
- جدول ۲-۳: نتایج حاصل از بررسی pH با استفاده از بافر فسفاتی ..... ۳۱
- جدول ۳-۳: نتایج حاصل از بررسی نوع بافر ..... ۳۴
- جدول ۴-۳: نتایج حاصل از بررسی اثر قدرت یونی ..... ۳۵
- جدول ۵-۳: نتایج حاصل از رسم منحنی کالیبراسیون منفرد برای آمارانس و پونسو ۴ آر به صورت مجزا در شرایط بهینه ..... ۳۷
- جدول ۶-۳: نتایج حاصل از کالیبراسیون جداگانه دو گونه ..... ۳۹
- جدول ۷-۳: جذب نسبی به دست آمده برای مخلوط ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر آمارانس و ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر پونسو ۴ آر بعد از تقسیم بر طیف نرمال شده ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر آمارانس به عنوان مقسوم علیه در جفت طول موج ۴۷۵ و ۵۶۰ نانومتر برای هر مخلوط در روش RHPSAM ..... ۴۲
- جدول ۸-۳: ترکیب غلظتی محلول های سری ارزیابی برای روش RHPSAM ..... ۴۴
- جدول ۹-۳: ترکیب غلظتی محلول های سری تست برای روش RHPSAM ..... ۴۵
- جدول ۱۰-۳: نتایج حاصل از بهینه سازی غلظت طیف نرمال شده آمارانس به عنوان مقسوم علیه در پیش بینی غلظت دو گونه در مخلوط های سری ارزیابی برای روش RHPSAM در جفت طول موج ۴۷۵ و ۵۶۰ نانومتر ..... ۴۶
- جدول ۱۱-۳: نتایج حاصل از بهینه سازی طول موج در پیش بینی غلظت دو گونه در مخلوط های سری ارزیابی برای روش RHPSAM ..... ۴۷

- جدول ۳-۱۲: نتایج حاصل از به‌کارگیری روش RHPSAM برای پیش‌بینی غلظت اجزا در مخلوط‌های سری ارزیابی ..... ۵۱
- جدول ۳-۱۳: نتایج حاصل از به‌کارگیری روش RHPSAM برای پیش‌بینی غلظت اجزا در مخلوط‌های سری تست ..... ۵۲
- جدول ۳-۱۴: نتایج حاصل از بررسی اثر گونه‌های مزاحم در اندازه‌گیری همزمان آمارانس و پونسیو ۴آر با غلظت‌های یکسان و برابر ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در روش RHPSAM ..... ۵۴
- جدول ۳-۱۵: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش RHPSAM ..... ۵۶
- جدول ۳-۱۶: نتایج حاصل از اندازه‌گیری آمارانس و پونسیو ۴آر در نمونه نوشیدنی سون آپ در روش RHPSAM ..... ۵۷
- جدول ۳-۱۷: نتایج حاصل از اندازه‌گیری آمارانس و پونسیو ۴آر در نمونه آب شهر شاهرود در روش RHPSAM ..... ۵۹
- جدول ۳-۱۸: نتایج حاصل از اندازه‌گیری بزرگی دامنه‌ها در طیف‌های نسبی حاصل از شکل ۳-۱۵ در روش CC-SS ..... ۶۰
- جدول ۳-۱۹: نتایج حاصل از روش CC-SS برای مخلوط‌های انتخاب شده حاوی ۲/۰۰، ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰ و ۳۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس و ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پونسیو ۴آر ..... ۶۴
- جدول ۳-۲۰: ترکیب غلظتی محلول‌های سری ارزیابی برای روش CC-SS ..... ۶۵
- جدول ۳-۲۱: ترکیب غلظتی محلول‌های سری تست برای روش CC-SS ..... ۶۶
- جدول ۳-۲۲: نتایج حاصل از بهینه‌سازی غلظت آمارانس به‌عنوان مقسوم‌علیه در روش CC-SS برای

مخلوط‌های سری ارزیابی در جفت طول موج ۴۲۸ و ۵۶۰ نانومتر..... ۶۷

جدول ۳-۲۳: جفت طول موج‌های انتخابی برای روش CC-SS (محلول‌های با غلظت ۱۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس و پونسیو ۴ به‌طور جداگانه)..... ۶۸

جدول ۳-۲۴: نتایج حاصل از بهینه‌سازی جفت طول موج با غلظت ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از آمارانس به‌عنوان مقسوم‌علیه در روش CC-SS در مخلوط‌های سری ارزیابی..... ۶۸

جدول ۳-۲۵: نتایج حاصل از اندازه‌گیری بزرگی دامنه‌ها در طیف‌های نسبی حاصل از شکل ۳-۲۰ در روش CC-SS..... ۷۰

جدول ۳-۲۶: نتایج حاصل از روش CC-SS برای مخلوط‌های انتخاب شده حاوی ۲/۰۰، ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰ و ۳۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس و ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پونسیو ۴..... ۷۳

جدول ۳-۲۷: نتایج حاصل از بهینه‌سازی غلظت پونسیو ۴ به‌عنوان مقسوم‌علیه در روش CC-SS برای مخلوط‌های سری ارزیابی در جفت طول موج‌های ۵۰۰ و ۵۳۹/۴ نانومتر..... ۷۳

جدول ۳-۲۸: جفت طول موج‌های انتخابی برای روش CC-SS (محلول‌های با غلظت ۱۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس و پونسیو ۴ به‌طور جداگانه)..... ۷۴

جدول ۳-۲۹: نتایج حاصل از بهینه‌سازی جفت طول موج با غلظت ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از پونسیو ۴ به‌عنوان مقسوم‌علیه در روش CC-SS در مخلوط‌های سری ارزیابی..... ۷۵

جدول ۳-۲۹: نتایج حاصل از روش CC برای مخلوط‌های سری ارزیابی..... ۷۶

جدول ۳-۳۰: نتایج حاصل از روش CC-SS با غلظت ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس به‌عنوان مقسوم‌علیه و جفت طول موج ۴۲۸ و ۵۶۰ نانومتر برای مخلوط‌های سری ارزیابی..... ۷۶

- جدول ۳-۳۱: نتایج حاصل از روش CC-SS با غلظت ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پونسیو ۴آر به‌عنوان مقسوم‌علیه و جفت طول موج ۵۰۰ و ۵۳۹/۴ نانومتر برای مخلوط‌های سری ارزیابی ..... ۷۶
- جدول ۳-۳۲: نتایج حاصل از روش CC-SS در پیش‌بینی غلظت دو گونه در مخلوط‌های سری ارزیابی ۷۸.
- جدول ۳-۳۳: نتایج حاصل از روش CC-SS در پیش‌بینی غلظت دو گونه در مخلوط‌های سری تست .... ۷۹
- جدول ۳-۳۴: نتایج حاصل از بررسی اثر گونه‌های مزاحم در اندازه‌گیری همزمان آمارانس و پونسیو ۴آر با غلظت‌های یکسان و برابر ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در روش CC-SS ..... ۸۱
- جدول ۳-۳۵: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش CC-SS ..... ۸۳
- جدول ۳-۳۶: نتایج حاصل از اندازه‌گیری آمارانس و پونسیو ۴آر در نمونه نوشیدنی سون آپ در روش CC-SS ..... ۸۴
- جدول ۳-۳۷: نتایج حاصل از اندازه‌گیری آمارانس و پونسیو ۴آر در نمونه آب شهر شاهرود در روش CC-SS ..... ۸۶
- جدول ۴-۱: پارامترهای آماری محاسبه شده آمارانس در مخلوط‌های سری تست برای روش‌های CC-SS و RHPSAM ..... ۹۲
- جدول ۴-۲: پارامترهای آماری محاسبه شده پونسیو ۴آر در مخلوط‌های سری تست برای روش‌های CC-SS و RHPSAM ..... ۹۲
- جدول ۴-۳: مقایسه بین روش‌های اندازه‌گیری آمارانس و پونسیو ۴آر ..... ۹۴

## فهرست اشکال:

شکل ۱-۱: فرمول ساختاری آمارانس ..... ۳

شکل ۱-۲: فرمول ساختاری پونسیو آ۴ ..... ۴

شکل ۱-۳: طیف جذبی ۱۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر پونسیو آ۴ (- - -)، طیف جذبی ۱۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر

آمارانس (- - -) و طیف جذبی مخلوط ۱۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر آمارانس و ۱۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر پونسیو

آ۴ (—) در  $\text{pH} = 10/00$  ..... ۲۸

شکل ۲-۳: بررسی اثر  $\text{pH}$  بر جذب آمارانس و پونسیو آ۴، شرایط: محلول‌های آمارانس (۱۰/۰۰ میلی گرم

بر لیتر) و پونسیو آ۴ (۱۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر) در حضور ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفات با  $\text{pH}$ های

مختلف ..... ۳۲

شکل ۳-۳: بررسی اثر  $\text{pH}$  بر اختلاف طول موج‌های آمارانس و پونسیو آ۴، شرایط: محلول‌های آمارانس

(۱۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر) و پونسیو آ۴ (۱۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر) در حضور ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفات

با الف:  $\text{pH} = 6/00$  و ب:  $\text{pH} = 10/00$  ..... ۳۳

شکل ۳-۴: بررسی اثر قدرت یونی شرایط: محلول‌های ۱۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر آمارانس (طول موج ۵۲۰

نانومتر) و یا پونسیو آ۴ (طول موج ۵۰۷ نانومتر)، در حضور ۲/۰۰ میلی لیتر بافر بوراکسی با  $\text{pH} = 10/00$

$\text{pH}$  ..... ۳۵

شکل ۳-۵: الف: منحنی کالیبراسیون آمارانس (میلی گرم بر لیتر) و ب: منحنی کالیبراسیون پونسیو آ۴

(میلی گرم بر لیتر) در شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی لیتر بافر بوراکسی با  $\text{pH} = 10/00$  ..... ۳۸

شکل ۳-۶: طیف‌های جذبی محلول‌های خالص ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰، ۲۵/۰۰ و ۳۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر

آمارانس تحت شرایط: ۲/۰۰ میلی لیتر بافر بوراکسی با  $\text{pH} = 10/00$  ..... ۴۰

شکل ۳-۷: طیف‌های جذبی به‌دست آمده برای محلول‌های خالص ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰، ۲۵/۰۰ و ۳۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس بعد از تقسیم کردن به غلظت هر محلول تحت شرایط: ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر بوراکسی با  $\text{pH}=10/00$  ..... ۴۰

شکل ۳-۸: طیف جذبی مخلوط‌های حاوی ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰ و ۳۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پونسیو ۴ آر و ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس در شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی‌لیتر محلول بافر بوراکسی با  $\text{pH}=10/00$  ... ۴۱

شکل ۳-۹: طیف‌های نسبی حاصل از تقسیم طیف مخلوط‌های حاوی ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰ و ۳۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پونسیو ۴ آر و ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس به طیف نرمال شده ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس به‌عنوان مقسوم‌علیه در شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی‌لیتر محلول بافر بوراکسی با  $\text{pH}=10/00$  ..... ۴۲

شکل ۳-۱۰: نمودار افزایش استاندارد نقطه H-نسبی به‌همراه معادله برای مخلوط ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس و ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پونسیو ۴ آر ..... ۴۳

شکل ۳-۱۱: نمودار روش افزایش استاندارد نقطه H-نسبی برای محلول‌های خالص ۲/۰۰، ۵/۰۰ و ۱۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پونسیو ۴ آر ..... ۴۸

شکل ۳-۱۲: نمودار روش افزایش استاندارد نقطه H-نسبی برای محلول‌های خالص ۵/۰۰، ۱۰/۰۰ و ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس ..... ۴۹

شکل ۳-۱۳: نمودار روش افزایش استاندارد نقطه H-نسبی برای مخلوط‌های مختلف حاوی ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس با غلظت‌های ۵/۰۰، ۱۰/۰۰ و ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پونسیو ۴ آر ..... ۴۹

شکل ۳-۱۴: نمودار روش افزایش استاندارد نقطه H-نسبی برای مخلوط‌های مختلف حاوی ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پونسیو ۴ آر با غلظت‌های ۲/۰۰، ۵/۰۰، ۱۰/۰۰ و ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس ..... ۵۰

شکل ۳-۱۵: طیف‌های نسبی حاصل از تقسیم محلول‌های استاندارد ۱/۰۰، ۲/۰۰، ۵/۰۰، ۱۰/۰۰ و ۲۰/۰۰



۳۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر پونسیو ۴ آر بر طیف ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر آمارانس به عنوان مقسوم علیه..... ۶۰

شکل ۳-۱۶: نمودار حاصل از رسم اختلاف بزرگی دامنه های نسبی  $P_1$  و  $P_2$  به ترتیب در طول موج های ۴۲۸

و ۵۶۰ نانومتر بر حسب دامنه نسبی  $P_1$  در طول موج ۴۲۸ نانومتر در روش CC-SS..... ۶۱

شکل ۳-۱۷: طیف جذبی مخلوط های حاوی ۲/۰۰، ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰ و ۳۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر

آمارانس و ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر پونسیو ۴ آر در شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی لیتر بافر بوراکسی با  $pH=10/00$

..... ۶۲

شکل ۳-۱۸: طیف تقسیم شده مخلوط های ۲/۰۰، ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰ و ۳۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر آمارانس

و ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر پونسیو ۴ آر بر طیف محلول ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر آمارانس به عنوان مقسوم علیه

..... ۶۲

شکل ۳-۱۹: طیف های جذبی مرتبه صفر به دست آمده از ضرب کردن ثابت به دست آمده برای مخلوط های

۲/۰۰، ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰ و ۳۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر آمارانس و ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر پونسیو ۴ آر در

طیف محلول خالص ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر آمارانس به عنوان مقسوم علیه..... ۶۳

شکل ۳-۲۰: طیف های نسبی حاصل از تقسیم محلول های استاندارد ۱/۰۰، ۲/۰۰، ۵/۰۰، ۱۰/۰۰ و ۲۰/۰۰

۳۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر آمارانس بر طیف ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر پونسیو ۴ آر به عنوان مقسوم علیه..... ۶۹

شکل ۳-۲۱: نمودار حاصل از رسم اختلاف بزرگی دامنه های نسبی  $P_1$  و  $P_2$  به ترتیب در طول موج های ۵۰۰

و ۵۳۹/۴ نانومتر بر حسب دامنه نسبی  $P_1$  در طول موج ۵۰۰ نانومتر در روش CC-SS..... ۷۰

شکل ۳-۲۲: طیف تقسیم شده مخلوط های ۲/۰۰، ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰ و ۳۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر آمارانس

و ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر پونسیو ۴ آر بر طیف محلول ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر پونسیو ۴ آر به عنوان

مقسوم علیه..... ۷۱

شکل ۳-۲۳: طیف‌های جذبی مرتبه صفر به دست آمده از ضرب کردن ثابت به دست آمده برای مخلوط‌های  
۲/۰۰، ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰ و ۳۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر آمارانس و ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر پونسیو ۴ آر در  
طیف محلول خالص ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر پونسیو ۴ آر به عنوان مقسوم علیه ..... ۷۲

شکل ۴-۱: نمایش میزان همبستگی غلظت‌های پیش‌بینی شده و غلظت‌های واقعی آمارانس در مخلوط‌های  
سری تست، الف: در روش CC-SS ب: در روش RHPSAM ..... ۹۰

شکل ۴-۲: نمایش میزان همبستگی غلظت‌های پیش‌بینی شده و غلظت‌های واقعی پونسیو ۴ آر در  
مخلوط‌های سری تست، الف: در روش CC-SS ب: در روش RHPSAM ..... ۹۱



١- مقدمه

## ۱-۱- مقدمه

رنگ‌ها همیشه نقش مهمی را نسبت به مصرف‌کننده ایجاد می‌کنند. در نیمه اول سال ۱۹۷۴ در سوئد استفاده از رنگ‌ها به‌عنوان افزودنی در مواد غذایی مورد تحلیل و بحث قرار گرفت [۱]. رنگ‌های غذایی از جمله مواد افزودنی هستند که به‌دلایلی به مواد غذایی اضافه می‌شوند. از جمله این دلایل می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

۱- جبران از دست رفتن رنگ مواد غذایی به‌دلیل قرار گرفتن در معرض نور، هوا، حرارت و شرایط نگهداری

[۲]

۲- جلب توجه بیشتر به مواد غذایی و افزایش اشتها [۲]

۳- به‌دلیل بی‌رنگ بودن برخی مواد غذایی [۲]

رنگ‌های غذایی مواد تشکیل‌دهنده بسیاری از محصولات از جمله قنادی، دسر، ژلاتین، نوشیدنی‌ها و تنقلات می‌باشند [۳]. تا اواسط قرن نوزدهم، رنگ‌های مورد استفاده در مواد غذایی، مخدر و آرایشی از گیاهان، حیوانات و مواد معدنی به‌دست می‌آمد [۴]. این رنگ‌های طبیعی دارای معایبی همچون پایداری کم و مقاومت پایین نسبت به گرما، حرارت و نور می‌باشند [۴] و همچنین در حین پخت و پز به آسانی رنگ خود را از دست می‌هند [۵]. کشف اولین رنگ مصنوعی به نام ماوین<sup>۱</sup> توسط پیکیم<sup>۲</sup> موجب استفاده در مواد غذایی شد [۴]. رنگ‌های مصنوعی پایداری بالایی نسبت به نور، اکسیژن و pH دارند و یکنواختی رنگ آن‌ها بیشتر می‌باشد و همچنین آلودگی میکروبیولوژیکی و هزینه تولید کمتری نیز دارند [۵].

---

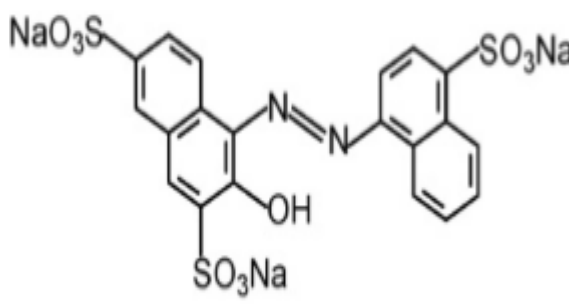
<sup>۱</sup> Mauvien

<sup>۲</sup> Peikim

اخیرا مسمومیت غذایی حاصل از رنگ‌های افزودنی در مواد غذایی مورد توجه قرار گرفته است که رنگ‌های افزودنی غذایی توسط سازمان غذا و کشاورزی (FAO)<sup>۱</sup> و سازمان بهداشت جهانی (WHO)<sup>۲</sup> نظارت می‌شوند [۲]. ایزومر آمارانس<sup>۳</sup> و پونسو<sup>۴</sup> از جمله رنگ‌های افزودنی مصنوعی هستند که در مواد غذایی مختلفی استفاده می‌شوند [۷۶]. با توجه به مطالب ذکر شده ابتدا مروری بر ویژگی‌های آمارانس و پونسو<sup>۴</sup> و کارهای گزارش شده در زمینه اندازه‌گیری همزمان این ایزومرها خواهیم داشت.

## ۱-۲- آمارانس

آمارانس به صورت پودر یا گرانول‌های قرمز رنگ می‌باشد که به طور معمول به صورت نمک سدیم، پتاسیم و یا کلسیم تامین می‌شوند [۵]. این رنگ مصنوعی با فرمول شیمیایی ( $C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$ ) [۸] از جمله رنگ‌های آزو می‌باشد و به عنوان افزودنی در مواد غذایی، آرایشی، نساجی و پزشکی استفاده می‌شود [۲]. آمارانس محلول در آب است اما در روغن‌های گیاهی غیر قابل حل می‌باشد [۵]. شکل ۱-۱ فرمول ساختاری آمارانس را نشان می‌دهد [۸]:



شکل ۱-۱: فرمول ساختاری آمارانس

۱ Food and Agriculture Organization

۲ World Health Organization

۳ Amaranth

۴ Ponceau 4R

آمارانس طبق اتحادیه اروپا (EU)<sup>۱</sup> دارای کد E1۲۳ می‌باشد [۶] و استفاده از آن طبق قوانین هر کشوری مجاز می‌باشد [۵]. این رنگ افزودنی ممکن است چندین اثر سمی بر روی بدن داشته باشد [۵] که اداره ایمنی مواد غذایی اروپا (EFSA)<sup>۲</sup> تمام رنگ‌های مصنوعی را در سال ۲۰۰۸ بررسی کرده است و به این نتیجه رسیدند که این رنگ‌ها با مصرف نرمال بعید است بر سلامتی انسان موثر باشند [۲]. بنابراین مقدار آن‌ها باید کنترل شود که مطابق سازمان غذا و کشاورزی و سازمان بهداشت جهانی مقدار مصرف روزانه قابل قبول برای آمارانس بین  $0-0/5 \text{ mg.kg}^{-1}$  وزن بدن است [۶].

### ۳-۱- پونسیو ۴آر

پونسیو ۴آر یک رنگ مصنوعی خوراکی است که به‌عنوان رنگ‌های آزو در مواد غذایی استفاده می‌شود [۹] و رنگ قرمز را در شراب، نوشیدنی‌ها و شیرینی‌ها ایجاد می‌کند [۱۰]. پونسیو ۴آر با فرمول شیمیایی  $\text{C}_{20}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{Na}_3\text{O}_{10}\text{S}_3$  [۸] ایزومر آمارانس است که در آب و اتانول محلول می‌باشد [۱۱]. این رنگ غذایی طبق اتحادیه اروپا دارای کد E124 است [۲] و مقدار مصرف نرمال و مجاز روزانه آن  $\text{mg.kg}^{-1}$  ۴-۰ وزن بدن می‌باشد [۲]. مصرف بیش از حد مجاز آن، باعث ایجاد مسمومیت می‌شود [۷]. ساختار پونسیو ۴آر در شکل ۲-۱ مشاهده می‌شود [۸]:



شکل ۲-۱: فرمول ساختاری پونسیو ۴آر

<sup>۱</sup> European Union

<sup>۲</sup> European Food Safety Authority

## ۱-۴- مروری بر تحقیقات انجام شده در زمینه اندازه‌گیری همزمان آمارانس و

### پونسیو ۴آر در مخلوط‌های دوتایی آن‌ها

با توجه به اینکه آمارانس و پونسیو ۴آر ایزومر هستند و دارای خواص، ساختار مشابه و همپوشانی طیفی بسیاری می‌باشند لذا اندازه‌گیری دو ترکیب در حضور هم به روش‌های اسپکتروفتومتری معمولی امکان‌پذیر نیست. همچنین با توجه به مطالب ارائه شده اندازه‌گیری آمارانس و پونسیو ۴آر در نمونه‌های مختلف از اهمیت زیادی برخوردار است که روش‌های متفاوتی برای اندازه‌گیری این ترکیبات به صورت مجزا و به صورت همزمان با سایر رنگ‌های مصنوعی ارائه شده است. از جمله این روش‌ها می‌توان به روش‌های کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا [۱۳]، ولتامتری [۹] و اسپکترومتری مشتق‌شده [۱۵] اشاره کرد. در ادامه برخی روش‌های گزارش شده از سال ۱۹۹۸ تا کنون برای تعیین مقدار آمارانس و پونسیو ۴آر آورده شده است.

در سال ۱۹۹۸ چن<sup>۱</sup> و همکارانش با استفاده از روش کروماتوگرافی یونی با عملکرد بالا بر روی ستون تعویض آنیونی با آب‌گریزی بسیار کم، غلظت هشت رنگ غذایی از جمله آمارانس و پونسیو ۴آر را اندازه‌گیری کردند. در این روش گرادیان شویشی با هیدروکلریک‌اسید-استونیتریل به منظور جداسازی رنگ‌ها و تمیز کردن ستون‌ها انجام شده است که با بهینه‌سازی پارامترها، گستره خطی برای آمارانس و پونسیو ۴آر به ترتیب ۲-۴۰ و ۱-۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است. همچنین حد تشخیص برای آمارانس و پونسیو ۴آر به ترتیب ۱ و ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است [۱۴].

در سال ۱۹۹۹ برزاس<sup>۲</sup> و همکارانش با استفاده از روش توسعه یافته الکتروفورز موئین ناحیه‌ای<sup>۳</sup>

---

۱ Chen

۲ Berzas

۳ Capillary zone electrophoresis



جداسازی و اندازه‌گیری همزمان هفت رنگ غذایی از جمله آمارانس و پونسیو ۴ آر را انجام دادند. در این روش از محلول بافر بوراتی با غلظت ۱۵ میلی‌مولار و  $\text{pH}=10/5$ ، ولتاژ ۲۰ کیلوولت، تزریق هیدرودینامیکی و آشکارساز اسپکتروفتومتری ماورابنفش-مرئی برای اندازه‌گیری استفاده شده است. گستره خطی برای همه رنگ‌ها از جمله آمارانس و پونسیو ۴ آر ۲۰۰-۴ میلی‌گرم بر لیتر گزارش شده است. همچنین حد تشخیص برای آمارانس و پونسیو ۴ آر به ترتیب ۰/۶۱ و ۰/۸۵ میلی‌گرم بر لیتر گزارش شده است [۲۲].

در سال ۲۰۰۵ زالاکاین<sup>۱</sup> و همکارانش با استفاده از روش اسپکترومتری فرابنفش-مرئی مشتقی شناسایی رنگ‌های مصنوعی از جمله آمارانس و پونسیو ۴ آر در زعفران را انجام دادند. این روش شامل حذف کروکین‌ها به وسیله رسوب‌گیری می‌باشد و سپس رنگ‌های مصنوعی بر روی کارتریج‌های پلی‌آمیدی جذب می‌شوند. آشکارسازی با اسپکترومتری مشتقی انجام گردید و از طیف مشتقی مرتبه دوم برای شناسایی رنگ‌های اضافه شده استفاده شد. نتایج نشان داده است که کمترین مقدار قابل تشخیص برای هر رنگ به ساختار شیمیایی آن بستگی دارد [۱۵].

در سال ۲۰۰۶ ما<sup>۲</sup> و همکارانش با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مجهز به آشکارسازهای آرایه دیودی-طیف‌سنجی جرمی چندین رنگ غذایی از جمله آمارانس و پونسیو ۴ آر را در پودر فلفل، ادویه‌جات فلفلی و نوشیدنی‌ها به‌طور همزمان اندازه‌گیری کردند. در این روش یون‌های انتخابی در مدهای متناوب مثبت و منفی برای به‌دست آوردن داده‌های طیفی جرمی جهت تحلیل ثبت شد. گستره خطی برای آمارانس و پونسیو ۴ آر ۴۰-۰/۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است. همچنین حد تشخیص برای آمارانس ۳ نانوگرم و برای پونسیو ۴ آر ۴ نانوگرم گزارش شده است [۱۶].

---

<sup>۱</sup> Zalacain

<sup>۲</sup> Ma

در سال ۲۰۰۷ ریولوا<sup>۱</sup> و همکارانش اندازه‌گیری رنگ‌های قرمز از جمله آمارانس و پونسیو آ۴ را با استفاده از روش‌های الکتروفورز موئینه با آشکارساز فلئوئورسانس انجام دادند. از لیزر جهت برانگیختگی استفاده کردند. گستره خطی برای آمارانس ۵۰۰ - ۰/۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای پونسیو آ۴ ۶۰۰ - ۰/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است. حد تشخیص برای آمارانس و پونسیو آ۴ به ترتیب ۰/۲ و ۰/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است [۱۷].

در سال ۲۰۰۹ نی<sup>۲</sup> و همکارانش با استفاده از تکنیک اسپکتروفتومتری و استفاده از روش‌های کمومتریکس از جمله PLS اندازه‌گیری همزمان چندین رنگ غذایی از جمله آمارانس و پونسیو آ۴ را انجام دادند. گستره خطی برای آمارانس و پونسیو آ۴ به ترتیب ۸-۰/۲ و ۶-۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر گزارش شده است. همچنین حد تشخیص برای آمارانس ۰/۰۹۵ و برای پونسیو آ۴ ۰/۱۷ میلی‌گرم بر لیتر گزارش شده است [۸].

در سال ۲۰۱۳ وو<sup>۳</sup> و همکارانش اندازه‌گیری همزمان شش رنگ غذایی از جمله آمارانس و پونسیو آ۴ را با استفاده از تکنیک میکرواستخراج فاز مایع پخشی با استفاده از مایع یونی<sup>۴</sup> انجام دادند. در این کار از جفت شدن کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با آشکارساز فرابنفش جهت اندازه‌گیری رنگ‌ها استفاده شد. دامنه خطی برای آمارانس و پونسیو آ۴ ۳۰۰-۰/۰۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است. حد تشخیص نیز برای آمارانس و پونسیو آ۴ به ترتیب ۰/۰۱۷ و ۰/۰۱۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است [۱۸].

در سال ۲۰۱۴ کومیسارچیک<sup>۵</sup> و همکارش اندازه‌گیری چندین رنگ غذایی از جمله آمارانس و

---

۱ Ryvolova

۲ Ni

۳ Wu

۴ Ionic liquid dispersive liquid phase microextraction

۵ Komissarchik

پونسیو ۴ آر را با استفاده از یک سیستم تشخیص سریع انجام دادند. این تشخیص بر اساس جذب انتخابی رنگ‌ها در نوشیدنی‌ها توسط یک جاذب خاص در سیستم است. این روش امکان آشکارسازی رنگ‌های غذایی در حضور رنگ‌های طبیعی در نمونه‌های غذایی را با استفاده از اسپکتروفتومتری مشتقی پس از عمل جذب رنگ فراهم می‌کند. جاذب به کار رفته امکان جذب رنگ مواد غذایی را فراهم می‌کند و با رنگ‌های طبیعی در نمونه ارتباط برقرار نمی‌کند. تحت این شرایط حد تشخیص برای این رنگ‌های مصنوعی ۰/۵ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر تا ۵۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر گزارش شده است [۱۹].

در سال ۲۰۱۴ زنگ<sup>۱</sup> و همکارانش اندازه‌گیری همزمان آمارانس و پونسیو ۴ آر را با استفاده از الکتروود خمیر گرافیتی انجام دادند. این الکتروود با مخلوط کردن پودر گرافیت انبساط یافته<sup>۲</sup> با پارافین جامد تهیه شد. این الکتروود در مقایسه با خمیر کربن و خمیر گرافیت ورقه‌ای، فعالیت الکتروکاتالیتیکی بیشتری در مقابل اکسیداسیون پونسیو ۴ آر و آمارانس نشان می‌دهد. تحت شرایط بهینه آزمایشگاهی گستره خطی برای پونسیو ۴ آر و آمارانس به ترتیب  $4 \times 10^{-6} - 6 \times 10^{-8}$  و  $4 \times 10^{-6} - 8 \times 10^{-8}$  مول بر لیتر گزارش شده است. همچنین حد تشخیص برای پونسیو ۴ آر و آمارانس به ترتیب ۲ و ۳۶ نانومولار گزارش شده است [۹].

در سال ۲۰۱۵ کی<sup>۳</sup> و همکارانش اندازه‌گیری همزمان و سریع یازده رنگ مصنوعی از جمله آمارانس و پونسیو ۴ آر را به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا جفت شده با آشکارساز آرایه دیودی-طیف‌سنجی جرمی متوالی انجام دادند. رنگ‌های افزودنی با آمونیاک-متانول استخراج و با روش استخراج فاز جامد پاک‌سازی شدند. گستره خطی برای رنگ‌های اندازه‌گیری شده ۰/۱-۱۰ mg/L و حد تشخیص نیز برای رنگ‌ها در گستره ۰/۰۹۶-۰/۰۰۷ گزارش شده است [۲۰].

---

۱ Zhang

۲ Expanded graphite

۳ Qi

در سال ۲۰۱۵ ونگ<sup>۱</sup> و همکارانش به روش ولتامتری اندازه‌گیری همزمان آمارانس و پونسیو آ۴ را در سطح الکتروود اصلاح شده با کامپوزیت‌های پلی‌پیرول-نانو لوله‌های کربنی انجام دادند. اکسایش آمارانس و پونسیو آ۴ با حساسیت و گزینش‌پذیری بیشتری در سطح الکتروود اصلاح شده انجام شده است. گستره خطی برای آمارانس  $5 \times 10^{-7}$  -  $5 \times 10^{-9}$  مولار و برای پونسیو آ۴  $1 \times 10^{-6}$  تا  $8 \times 10^{-9}$  مولار گزارش شده است. همچنین حد تشخیص برای آمارانس و پونسیو آ۴ به ترتیب  $5 \times 10^{-10}$  و  $1 \times 10^{-9}$  مولار گزارش شده است [۲۱].

در سال ۲۰۱۵ شا<sup>۲</sup> و همکارانش با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا اندازه‌گیری همزمان پنج رنگ غذایی از جمله آمارانس و پونسیو آ۴ را انجام دادند. برای استخراج رنگ‌ها از مایع یونی و برای اندازه‌گیری از آشکارساز فرابنفش استفاده شده است. با اعمال روش برای اندازه‌گیری پنج رنگ، حد تشخیص برای پنج رنگ اندازه‌گیری شده  $0.074-0.051$  نانوگرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است [۱۳].

با توجه به اینکه تا کنون گزارشی مبنی بر اندازه‌گیری همزمان آمارانس و پونسیو آ۴ با استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری جدید ارائه نشده است، لذا در این پروژه از روش‌های اسپکتروفتومتری جدید مرکز ثابت همراه با کم کردن طیف و افزایش استاندارد نقطه H-نسبی برای اندازه‌گیری همزمان آمارانس و پونسیو آ۴ استفاده خواهد شد.

---

<sup>۱</sup> Wang

<sup>۲</sup> Sha



٢- تئوری

## ۱-۲- مقدمه‌ای بر اسپکتروسکوپی جذبی

طیف‌بینی جذبی در ناحیه مرئی- ماورابنفش مبتنی بر جذب تابش الکترومغناطیس در گستره طول موج ۷۸۰-۱۹۰ نانومتر اعمال پذیر است. اندازه‌گیری‌های جذبی در ناحیه ماورابنفش و مرئی برای تعیین کمی انواع زیادی از گونه‌های معدنی و آلی کاربرد گسترده‌ای پیدا کرده‌اند. طیف‌بینی جذب مولکولی بر اساس اندازه‌گیری عبور (T) یا جذب (A) محلول‌های موجود در سلول‌های شفاف استوار است. معمولاً غلظت (c) به طور خطی به جذب با معادله ۱-۲ ارتباط داده می‌شود [۲۳].

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon bc \quad \text{معادله ۱-۲}$$

در معادله ۱-۲ که به معادله بیر یا بیر-لامبرت مشهور است،  $P_0$  توان تابش ورودی،  $P$  توان تابش خروجی،  $b$  طول مسیر تابش بر حسب سانتی‌متر،  $\epsilon$  ضریب جذب مولی بر حسب  $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$  و  $A$  مقدار جذب در یک طول موج معین است.

مشکل اصلی در آنالیز چند جزئی اسپکتروفوتومتری دو یا چند جزئی، تعیین همزمان دو یا چند جز در یک مخلوط، بدون جداسازی اولیه است [۲۴]. همپوشانی طیفی اجزای یک مخلوط دوتایی مانع از اندازه‌گیری اجزای مخلوط با استفاده از روش اسپکتروسکوپی مستقیم می‌شود [۲۵]. به همین دلیل چندین روش اسپکتروفوتومتری برای رفع همپوشانی طیفی اجزای یک مخلوط ارائه شده است، که شامل روش‌های اسپکتروفوتومتری یک متغیره و چند متغیره می‌شوند.

روش‌های اسپکتروفوتومتری یک متغیره شامل تکنیک اسپکتروفوتومتری مشتقی<sup>۱</sup> [۲۶ و ۲۷]، روش

---

<sup>۱</sup> Derivative spectrophotometry technique

میانگین‌گیری از مرکز<sup>۱</sup> [۲۸]، روش توسعه یافته تفاضل نسبی (EXRSM)<sup>۲</sup> [۲۴]، روش کم کردن نسبی همزمان (SRSM)<sup>۳</sup>، روش کم کردن نسبی همزمان همراه با ضرب کردن مقدار ثابت (SRS-CM)<sup>۴</sup>، روش فاکتور جذب (AFM)<sup>۵</sup>، روش مدولاسیون دامنه (AM)<sup>۶</sup> [۲۹]، روش افزایش استاندارد نقطه اچ (HPSAM)<sup>۷</sup> [۳۰]، روش مرکز ثابت همراه با کم کردن طیف (CC-SS)<sup>۸</sup>، روش اختلاف نسبی (RD)<sup>۹</sup> [۳۱] و غیره است. روش حداقل مربعات جزئی (PLS) از جمله روش‌های اسپکتروفتومتری چند متغیره برای اندازه‌گیری همزمان ترکیباتی است که همپوشانی طیفی دارند.

در این کار اندازه‌گیری همزمان آمارانس و پونسیو<sup>۴</sup> آر در مخلوط دوتایی از آن‌ها با استفاده از روش مرکز ثابت همراه با کم کردن طیف (CC-SS) و روش افزایش استاندارد نقطه H-نسبی (RHPSAM)<sup>۱۰</sup> انجام شده است.

## ۲-۲- کالیبراسیون

کالیبراسیون فرایندی است که به صورت یک رابطه ریاضی، سیگنال را به خاصیت مورد نظر از آنالیت (معمولاً غلظت) مربوط می‌سازد. هر فرایند کالیبراسیون شامل دو مرحله مجزای کالیبراسیون (مدل‌سازی)<sup>۱۱</sup> و پیش‌بینی<sup>۱۲</sup> است. در مرحله کالیبراسیون، در چند غلظت معلوم از محلول‌های استاندارد آنالیت (متغیر

- 
- ۱ Mean Centering Method
  - ۲ Extended ratio subtraction method
  - ۳ Simultaneous ratio subtraction method
  - ۴ Simultaneous ratio subtraction method coupled with constant multiplication
  - ۵ Absorption factor method
  - ۶ Amplitude modulation method
  - ۷ H-point standard addition method
  - ۸ Constant center coupled with spectrum subtraction method
  - ۹ Ratio difference method
  - ۱۰ Ratio H-point standard addition method
  - ۱۱ Modeling
  - ۱۲ Prediction



مستقل  $X$ )، پاسخ (متغیر وابسته  $Y$ ) اندازه‌گیری می‌شود. سپس مدلی از  $Y$  بر حسب  $X$  یا مدلی از  $X$  بر حسب  $Y$  ساخته می‌شود. در مرحله پیش‌بینی، مدل ساخته شده مورد ارزیابی قرار می‌گیرد و در صورت نیاز تغییراتی در آن ایجاد می‌شود. در مدل انتخابی با اندازه‌گیری پاسخ برای نمونه مجهول، غلظت آنالیت تعیین می‌شود.

## ۲-۲-۱- کالیبراسیون یک متغیره<sup>۱</sup>

در کالیبراسیون یک متغیره، فقط یک متغیر وابسته و یک متغیر مستقل وجود دارد. بهترین نمونه کالیبراسیون یک متغیره قانون بیر است که در اندازه‌گیری غلظت گونه‌ها به روش اسپکتروفتومتری جذب مولکولی استفاده می‌شود. در ساده‌ترین حالت معادله ۲-۲ برقرار است.

$$y = b_0 + b_1x + e \quad \text{معادله ۲-۲}$$

ضرایب  $b_0$  و  $b_1$  را می‌توان از روش رگرسیون حداقل مربعات محاسبه نمود. به مدل فوق مدل کلاسیک گفته می‌شود و خطای کالیبراسیون ( $e$ ) به خطا در اندازه‌گیری پاسخ نسبت داده می‌شود. در مدل دیگری که به آن مدل معکوس گفته می‌شود، فرض می‌گردد که اندازه‌گیری دستگاهی دقیق بوده و خطای کالیبراسیون مربوط به خطا در تهیه محلول‌های استاندارد است.

مدل معکوس به صورت معادله ۳-۲ نوشته می‌شود.

$$x = b_0 + b_1y + e \quad \text{معادله ۳-۲}$$

روش‌های تک متغیره برای نمونه‌های بسیار ساده و عاری از هر گونه مزاحمت مورد استفاده قرار

---

<sup>۱</sup>Univariate Calibration

می‌گیرد. برای استفاده از کالیبراسیون تک متغیره علاوه بر انتخاب روش‌هایی با گزینش پذیری بالا، باید از سیستم مورد آنالیز شناخت کافی داشت. کالیبراسیون تک متغیره برای روش‌هایی مانند اسپکتروسکوپی اتمی، کروماتوگرافی، اسپکتروسکوپی مشتقی و روش‌های مختلف الکتروشیمیایی با موفقیت به کار رفته است [۳۲]. در اسپکتروسکوپی، معمولا از طول موج ماکزیمم آنالیت برای ساخت یک مدل کالیبراسیون تک متغیره استفاده می‌شود [۳۳]. برای ساخت مدل کالیبراسیون از طریق رگرسیون تک متغیره خطی، دو فرض مهم بایستی بررسی شود:

۱- گزینش پذیری: طبق این فرض، یک مدل کالیبراسیون تک متغیره، فقط در صورتی نتایج صحیح ارائه می‌دهد که سیگنال اندازه‌گیری، ناشی از آنالیت باشد.

۲- خطی بودن: باید بین غلظت آنالیت و سیگنال، رابطه خطی وجود داشته باشد؛ در غیر این صورت باید از روش‌های غیر خطی استفاده کرد [۳۴].

همان‌طور که در بخش ۱-۲ گفته شد، از جمله روش‌های اسپکتروفتومتری یک متغیره می‌توان به روش‌های EXRSM، SRS-CM، AFM، AM، MCR، RD، CC-SS و RHPSAM اشاره کرد که به دلیل داشتن ویژگی‌هایی مانند دقت، صحت بالا و سادگی گسترش یافته‌اند. این روش‌ها نیازی به دستگاه پیچیده و برنامه‌های کامپیوتری پیشرفته ندارند. در ادامه اساس روش‌های CC-SS و RHPSAM آورده شده است.

## ۲-۲-۱-۱- روش مرکز ثابت (CC) و روش مرکز ثابت همراه با کم کردن طیف

### (CC-SS)

روش مرکز ثابت<sup>۱</sup> متشکل از دو مرحله مکمل یکدیگر است، مرحله اول محاسبه مقدار ثابت با استفاده از روش اختلاف دامنه و مرحله دوم ضرب کردن مقدار ثابت می‌باشد.

برای استفاده از روش CC-SS مخلوطی که حاوی دو جز (X و Y) با همپوشانی طیفی هستند باید به گونه‌ای باشند که جذب یکی از اجزا نسبت به دیگری در طول موج‌های بلندتر صفر شود. با این فرض که طیف مرتبه صفر Y نسبت به طیف مرتبه صفر X گسترده‌تر است (در طول موج‌های بلندتری جذب آن صفر می‌شود)، برای به دست آوردن غلظت گونه X به این صورت عمل می‌شود که :

ابتدا مقدار P پیش‌بینی شده  $\left( P_{\text{postulated}} = \frac{\varepsilon_Y C_Y}{\varepsilon_X C_X} \right)$  که مربوط به گونه Y است محاسبه می‌گردد. به این منظور طیف‌های استاندارد خالص گونه Y با غلظت‌های متفاوت، بر طیف غلظت مشخصی از گونه X به عنوان مقسوم‌علیه تقسیم می‌گردد. سپس دو طول موج انتخاب می‌شود  $(\lambda_2, \lambda_1)$  و مقدار دامنه‌های جذب نسبی  $P_2 = \left( \frac{\varepsilon_Y C_Y}{\varepsilon_X C_X} \right)_2$  و  $P_1 = \left( \frac{\varepsilon_Y C_Y}{\varepsilon_X C_X} \right)_1$  به ترتیب در  $\lambda_2$  و  $\lambda_1$  اندازه گرفته می‌شود و از هم کم می‌گردد، و این اختلاف دامنه‌ها بر حسب  $P_1 = \left( \frac{\varepsilon_Y C_Y}{\varepsilon_X C_X} \right)_1$  رسم می‌گردند که یک خط با معادله زیر به دست می‌آید (معادله ۲-۴).

$$\Delta P = P_1 - P_2 = \text{slope } P_{(\text{postulated})} + \text{intercept} \quad \text{معادله ۲-۴}$$

در معادله ۲-۴،  $P_1$  و  $P_2$  به ترتیب دامنه‌های نسبی در طول موج‌های  $\lambda_1$  و  $\lambda_2$  هستند.

<sup>۱</sup>Constant center

سپس طیف مخلوط X و Y بر غلظت معینی از گونه X به عنوان مقسوم علیه (X') تقسیم می شود. طیف

حاصل دارای مقدار ثابت  $(\frac{C_X}{C'_X} = \text{constant})$  است. (معادله ۲-۵)

$$\frac{b\varepsilon_X C_X + b\varepsilon_Y C_Y}{b\varepsilon_X C'_X} = \frac{b\varepsilon_Y C_Y}{b\varepsilon_X C'_X} + \frac{b\varepsilon_X C_X}{b\varepsilon_X C'_X} = \frac{\varepsilon_Y C_Y}{\varepsilon_X C'_X} + \frac{C_X}{C'_X} = \frac{\varepsilon_Y C_Y}{\varepsilon_X C'_X} + \text{constant} \quad \text{معادله ۲-۵}$$

سپس مقدار دامنه های نسبی  $P_1$  و  $P_2$  برای طیف مخلوط در طول موج های  $\lambda_1$  و  $\lambda_2$  ثبت می شوند

و از هم کم می گردند (معادله ۲-۶).

$$\Delta P_{Mix} = P_1 - P_2 = \left( \frac{\varepsilon_Y C_Y}{\varepsilon_X C'_X} \right)_1 + \text{constant} - \left\{ \left( \frac{\varepsilon_Y C_Y}{\varepsilon_X C'_X} \right)_2 + \text{constant} \right\} \quad \text{معادله ۲-۶}$$

$$\Delta P_{Mix} = P_1 - P_2 = \left( \frac{\varepsilon_Y C_Y}{\varepsilon_X C'_X} \right)_1 - \left( \frac{\varepsilon_Y C_Y}{\varepsilon_X C'_X} \right)_2 \quad \text{معادله ۲-۷}$$

سپس  $\Delta P_{Mix}$  را در معادله ۲-۴ قرار داده و با داشتن شیب و عرض از مبدا مقدار P پیش بینی شده

$$P_{\text{postulated}} = \frac{\varepsilon_Y C_Y}{\varepsilon_X C'_X}$$

برای هر مخلوط به دست می آید.

برای به دست آوردن مقدار ثابت  $(\frac{C_X}{C'_X} = C.V)$ ، مقدار P پیش بینی شده  $(P_{\text{postulated}} = \frac{\varepsilon_Y C_Y}{\varepsilon_X C'_X})$

محاسبه شده از هر مخلوط از مقدار دامنه ثبت شده در  $\lambda_1$   $(P_{\text{recorded}} = \left( \frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_X C'_X} + \frac{\varepsilon_Y C_Y}{\varepsilon_X C'_X} \right)_1)$  در مخلوط

مربوط کم می گردد (معادله ۲-۸).

$$C.V = \frac{C_X}{C'_X} = P_{\text{recorded}} - P_{\text{postulated}} = \left( \frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_X C'_X} + \frac{\varepsilon_Y C_Y}{\varepsilon_X C'_X} \right)_1 - \left( \frac{\varepsilon_Y C_Y}{\varepsilon_X C'_X} \right)_1 \quad \text{معادله ۲-۸}$$

در مرحله بعد با ضرب کردن این مقدار ثابت (C.V) که از معادله ۲-۸ به دست آمده در طیف

مرتبه صفر مقسوم علیه انتخاب شده از گونه X (X')، طیف مرتبه صفر گونه X به دست می آید. سپس با

اندازه‌گیری جذب در طول موج ماکزیمم گونه X برای هر مخلوط و قرار دادن آن در معادله کالیبراسیون گونه X، غلظت گونه X برای هر مخلوط به دست می‌آید.

برای به دست آوردن غلظت گونه Y به روش مرکز ثابت همانند گونه X عمل می‌شود.

غلظت گونه X به روش مرکز ثابت همراه با کم کردن طیف همانند روش مرکز ثابت تعیین می‌گردد. برای به دست آوردن غلظت گونه Y در هر مخلوط به روش مرکز ثابت همراه با کم کردن طیف، طیف مرتبه صفر گونه X به دست آمده از مرحله قبل را از طیف مخلوط مربوط کم کرده و سپس با اندازه‌گیری جذب در طول موج ماکزیمم گونه Y برای هر مخلوط و قرار دادن آن در معادله کالیبراسیون گونه Y، غلظت گونه Y برای هر مخلوط به دست می‌آید. (معادله ۹-۲) [۳۵].

$$(b\epsilon_X C_X + b\epsilon_Y C_Y) - (b\epsilon_X C_X) = b\epsilon_Y C_Y \quad \text{معادله ۹-۲}$$

## ۲-۲-۱-۲- روش افزایش استاندارد نقطه H-نسبی (RHPSAM)

با استفاده از مبانی روش نقطه H، این روش در سال ۲۰۱۳ توسط یحیی گزارش شد [۳۰]. روش افزایش استاندارد نقطه اچ نسبی (RHPSAM) یک روش جدید دو طول موجی اسپکتروفتومتری است که با بهره‌گیری از اصول اساسی روش اسپکتروفتومتری نسبی و روش افزایش استاندارد نقطه H، به حل مشکل همپوشانی طیفی در مخلوط‌ها پرداخته است.

برای تعیین مقدار همزمان هر دو ترکیب (X و Y) به وسیله این روش (RHPSAM)، غلظت مشخصی از یک گونه (فرضا گونه X) به مخلوط مورد نظر اضافه می‌گردد. سپس طیف مخلوط X و Y بر طیف نرمال شده غلظت مشخصی از گونه‌ی دیگر (گونه Y) به عنوان مقسوم‌علیه ( $\epsilon_Y$ ) تقسیم می‌گردد (معادله ۱۰-۲) [۳۰].

$$\frac{A_{Mix}}{\varepsilon_Y} = \frac{b\varepsilon_X C_X + b\varepsilon_Y C_Y}{\varepsilon_Y} = \frac{b\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y} + \frac{b\varepsilon_Y C_Y}{\varepsilon_Y} = \frac{b\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y} + bC_Y \quad \text{معادله ۱۰-۲}$$

در معادله ۱۰-۲  $\varepsilon_Y$  طیف نرمال شده گونه Y است که از تقسیم طیف محلول استاندارد خالص گونه Y با یک غلظت مشخص به حاصل ضرب طول سل در غلظت متناظر گونه Y به دست آمده است. (معادله ۱۱-۲) [۳۰].

$$\frac{b\varepsilon_Y C_Y}{bC_Y} = \varepsilon_Y \quad \text{معادله ۱۱-۲}$$

بعد از تقسیم کردن طیف مخلوط بر طیف نرمال شده گونه Y، عبارت  $bC_Y$  برابر مقدار ثابتی است که در تمام طیف تقسیم شده گسترده است. با فرض اینکه  $b=1/0.0$  سانتی متر باشد، مقدار ثابت برابر غلظت گونه Y ( $C_Y$ ) در مخلوط است. با انتخاب هر جفت طول موجی می توان غلظت دو گونه X و Y را به روش RHPSAM به دست آورد. برای به دست آوردن غلظت دو گونه X و Y باید بزرگی دامنه در  $P_1$  و  $P_2$  (معادله های ۱۲-۲ و ۱۳-۲) در طول موج های مورد نظر ( $\lambda_1$  و  $\lambda_2$ ) اندازه گیری گردد. از رسم دامنه حاصل ( $P_1$  و  $P_2$ ) به ترتیب در  $\lambda_1$  و  $\lambda_2$  بر حسب غلظت افزوده شده از گونه X دو خط مستقیم که در یک نقطه (RH point) با مختصات ( $C_{RH}$ ,  $-C_{RH}$ ) همدیگر را قطع می کنند، به دست می آید.

$$P_1 = \left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y}\right)_{\lambda_1} + \left(\frac{\varepsilon_Y C_Y}{\varepsilon_Y}\right)_{\lambda_1} + \left(\frac{\varepsilon_X}{\varepsilon_Y}\right)_{\lambda_1} C'_X = \left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y}\right)_{\lambda_1} + C_Y + M_{\lambda_1} C'_X \quad \text{معادله ۱۲-۲}$$

$$P_2 = \left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y}\right)_{\lambda_2} + \left(\frac{\varepsilon_Y C_Y}{\varepsilon_Y}\right)_{\lambda_2} + \left(\frac{\varepsilon_X}{\varepsilon_Y}\right)_{\lambda_2} C'_X = \left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y}\right)_{\lambda_2} + C_Y + M_{\lambda_2} C'_X \quad \text{معادله ۱۳-۲}$$

در معادله های ۱۲-۲ و ۱۳-۲  $P_1$  و  $P_2$  به ترتیب بزرگی دامنه در  $\lambda_1$  و  $\lambda_2$ ،  $\left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y}\right)_{\lambda_2}$  و  $\left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y}\right)_{\lambda_1}$

به ترتیب دامنه نسبی گونه X در  $\lambda_1$  و  $\lambda_2$ ،  $\left(\frac{\varepsilon_Y C_Y}{\varepsilon_Y}\right)$  مقدار ثابت مربوط به گونه Y در دو طول موج مورد

نظر،  $M_1$  و  $M_2$  شیب خطهای کالیبراسیون افزایش استاندارد در  $\lambda_1$  و  $\lambda_2$ ، در روش RHPSAM و  $C'_x$  غلظت افزوده شده از گونه X است.

در نقطه RH point،  $P_1 = P_2 = P_{RH}$  می باشد. در نتیجه معادله های ۱۲-۲ و ۱۳-۲ با هم برابرند و از تساوی آنها می توان معادله ۱۴-۲ را نوشت و سپس از آن معادله ۱۷-۲ را به دست آورد.

$$\left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y}\right)_{\lambda_1} + C_Y + M_{\lambda_1} C'_x = \left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y}\right)_{\lambda_2} + C_Y + M_{\lambda_2} C'_x \quad \text{معادله ۱۴-۲}$$

$$M_{\lambda_1} C'_x - M_{\lambda_2} C'_x = \left\{ \left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y}\right)_{\lambda_2} + C_Y \right\} - \left\{ \left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y}\right)_{\lambda_1} + C_Y \right\} \quad \text{معادله ۱۵-۲}$$

$$(M_{\lambda_1} - M_{\lambda_2}) C'_x = \left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y}\right)_{\lambda_2} - \left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y}\right)_{\lambda_1} \quad \text{معادله ۱۶-۲}$$

$$C'_x = -C_{RH} = \frac{\left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y}\right)_{\lambda_2} - \left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y}\right)_{\lambda_1}}{M_{\lambda_1} - M_{\lambda_2}} \quad \text{معادله ۱۷-۲}$$

به طور مشابه نقطه  $C_{RH}$  با استفاده از معادله های ۱۲-۲ و ۱۳-۲ به دست می آید و معادله های

۱۸-۲ و ۱۹-۲ حاصل می شوند.

$$C'_x = \frac{\left\{ P_1 - \left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y}\right)_{\lambda_1} - C_Y \right\}}{M_{\lambda_1}} \quad \text{معادله ۱۸-۲}$$

$$C'_x = \frac{\left\{ P_2 - \left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y}\right)_{\lambda_2} - C_Y \right\}}{M_{\lambda_2}} \quad \text{معادله ۱۹-۲}$$

از تساوی معادله‌های ۱۸-۲ و ۱۹-۲ روابط زیر برقرار خواهد بود :

$$\frac{\left\{ P_1 - \left( \frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y} \right)_{\lambda_1} - C_Y \right\}}{M_{\lambda_1}} = \frac{\left\{ P_2 - \left( \frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y} \right)_{\lambda_2} - C_Y \right\}}{M_{\lambda_2}}$$

$$M_{\lambda_2} \left\{ P_1 - \left( \frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y} \right)_{\lambda_1} - C_Y \right\} = M_{\lambda_1} \left\{ P_2 - \left( \frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y} \right)_{\lambda_2} - C_Y \right\}$$

$$M_{\lambda_2} P_1 - M_{\lambda_2} \left( \frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y} \right)_{\lambda_1} - M_{\lambda_2} C_Y = M_{\lambda_1} P_2 - M_{\lambda_1} \left( \frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y} \right)_{\lambda_2} - M_{\lambda_1} C_Y$$

$$M_{\lambda_2} P_1 - M_{\lambda_1} P_2 = -M_{\lambda_1} \left( \frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y} \right)_{\lambda_2} - M_{\lambda_1} C_Y + M_{\lambda_2} \left( \frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y} \right)_{\lambda_1} + M_{\lambda_2} C_Y$$

و از آن جایی که در نقطه H-نسبی،  $P_1 = P_2 = P_{RH}$  است؛ بنابراین رابطه زیر برقرار خواهد بود

و معادله ۲۰-۲ به دست می‌آید:

$$P_{RH} (M_{\lambda_2} - M_{\lambda_1}) = C_Y (M_{\lambda_2} - M_{\lambda_1}) - M_{\lambda_1} \left( \frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y} \right)_{\lambda_2} + M_{\lambda_2} \left( \frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y} \right)_{\lambda_1}$$

$$P_{RH} = C_Y - \frac{\left\{ M_{\lambda_1} \left( \frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y} \right)_{\lambda_2} - M_{\lambda_2} \left( \frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y} \right)_{\lambda_1} \right\}}{(M_{\lambda_2} - M_{\lambda_1})} \quad \text{معادله ۲۰-۲}$$

$$\frac{\left( \frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y} \right)_{\lambda_1}}{M_{\lambda_1}} = \frac{\left( \frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y} \right)_{\lambda_2}}{\left( \frac{\varepsilon_X}{\varepsilon_Y} \right)_{\lambda_2}} = C_X \quad \text{و} \quad \frac{\left( \frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y} \right)_{\lambda_2}}{M_{\lambda_2}} = \frac{\left( \frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y} \right)_{\lambda_2}}{\left( \frac{\varepsilon_X}{\varepsilon_Y} \right)_{\lambda_2}} = C_X \quad \text{و از آن جایی که}$$

$$\text{است، بنابراین} \quad \frac{\left( \frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y} \right)_{\lambda_2}}{M_{\lambda_2}} = \frac{\left( \frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y} \right)_{\lambda_1}}{M_{\lambda_1}} \quad \text{و سپس} \quad M_{\lambda_2} \left( \frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y} \right)_{\lambda_1} = M_{\lambda_1} \left( \frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y} \right)_{\lambda_2} \quad \text{می‌شود و مقدار}$$



عبارت  $M_{\lambda_1} \left( \frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y} \right)_{\lambda_2} - M_{\lambda_2} \left( \frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y} \right)_{\lambda_1}$  در معادله ۲۰-۲ برابر صفر می شود و در نتیجه می توان نوشت:

$$P_{RH} = \left( \frac{\varepsilon_Y C_Y}{\varepsilon_Y} \right) = C_Y \quad \text{معادله ۲۱-۲}$$

به عبارت دیگر غلظت گونه Y برابر با عرض نقطه H-نسبی روی منحنی های افزایش استاندارد می باشد.

در نهایت از معادله های ۱۷-۲ و ۲۰-۲ معادله های ۲۲-۲ و ۲۳-۲ حاصل می شوند:

$$C_X = \frac{B - A}{(M_1 - M_2)} \quad \text{معادله ۲۲-۲}$$

$$C_Y = \frac{(BM_1 - AM_2)}{(M_1 - M_2)} \quad \text{معادله ۲۳-۲}$$

که در معادله های ۲۲-۲ و ۲۳-۲، A و B به ترتیب  $C_Y + \left( \frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y} \right)_{\lambda_1}$  و  $C_Y + \left( \frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y} \right)_{\lambda_2}$  یا به عبارتی

A و B عرض از مبدا خط های کالیبراسیون افزایش استاندارد به ترتیب در  $\lambda_1$  و  $\lambda_2$ ،  $M_1$  و  $M_2$  شیب خط های کالیبراسیون افزایش استاندارد به ترتیب در  $\lambda_1$  و  $\lambda_2$  هستند و به این صورت غلظت گونه های X و Y ( $C_Y, C_X$ ) به روش RHPSAM به دست می آید [۳۰].

## ۲-۲-۲ - کالیبراسیون چند متغیره<sup>۱</sup>

کالیبراسیون چند متغیره یک اصطلاح کلی است که به توسعه یک مدل کمی برای پیش گویی صحیح ویژگی های مورد نظر ( $y_1, y_2, y_3, \dots, y_q$ ) با استفاده از متغیرهای پیش گویی کننده ( $x_1, x_2, x_3, \dots, x_q$ ) اطلاق می شود. در صورت عدم وجود روش های گزینش پذیر، با استفاده از کالیبراسیون چند متغیره می توان

<sup>۱</sup> Multivariate calibration

یک گونه را در حضور گونه‌های مزاحم یا چند آنالیت را در حضور یکدیگر و بدون جداسازی آنالیز کرد [۳۲]. به بیان دیگر می‌توان گفت آمار چند متغیره، مجموعه‌ای از ابزار قدرتمند ریاضی است و زمانی که بیش از یک اندازه‌گیری برای تجزیه و تحلیل شیمیایی نمونه لازم است، به کار می‌رود [۳۶]. با استفاده از کالیبراسیون چند متغیره می‌توان گفت با استفاده از آمار چند متغیره، می‌توان با بررسی مزاحمت‌ها، نویز را کاهش داد و علاوه بر این، داده‌های خارج از محدوده خطی را کنترل کرد. به‌طور کلی می‌توان گفت کالیبراسیون چند متغیره جنبه اکتشافی دارد [۳۷]. از جمله روش‌های کالیبراسیون چند متغیره می‌توان به روش حداقل مربعات جزئی (PLS) اشاره کرد [۸].



۳- تجرّبی

### ۳-۱- اندازه‌گیری همزمان آمارانس و پونسیو ۴آر با استفاده از روش‌های

#### اسپکتروفتومتری جدید

مطابق آنچه در فصل اول درباره اهمیت اندازه‌گیری همزمان ایزومرهای آمارانس و پونسیو ۴آر ذکر گردید و بر اساس مطالعات انجام شده، روش‌های RHPSAM و CC-SS برای اندازه‌گیری همزمان این دو رنگ افزودنی در نمونه‌های حقیقی با آشکارسازی اسپکتروفتومتری، طراحی و به‌کار گرفته شد. در این فصل نتایج تجربی حاصل از روش‌های به‌کار برده شده ارائه خواهد شد.

### ۳-۲- مواد شیمیایی مورد استفاده

لیست مواد شیمیایی مورد استفاده به‌همراه شرکت سازنده آن‌ها در جدول ۳-۱ آورده شده است. در تهیه تمام محلول‌ها از مواد شیمیایی با خلوص تجزیه‌ای استفاده شد.

جدول ۳-۱: مواد شیمیایی مورد استفاده

نام ماده شیمیایی	فرمول	شرکت سازنده
آمارانس	$C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$	آلدریچ <sup>۱</sup>
پونسیو ۴آر	$C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$	آلدریچ
دی سدیم بورات دکا هیدرات	$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$	مرک <sup>۲</sup>
پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات	$KH_2PO_4$	مرک
دی‌سدیم هیدروژن فسفات	$Na_2HPO_4$	مرک
سدیم هیدروکسید	$NaOH$	مرک
هیدروکلریک اسید	$HCl$	مرک

<sup>۱</sup> Aldrich

<sup>۲</sup> Merck

### ۳-۳- محلول‌های مورد استفاده و طرز تهیه آن‌ها

در تهیه تمام محلول‌ها از آب مقطر استفاده گردید. محلول مادر آمارانس با غلظت ۵۰۰/۰ میلی گرم بر لیتر از انحلال ۰/۰۲۵۰ گرم از آمارانس خالص و رقیق کردن آن با آب مقطر در حجم ۵۰/۰۰ میلی لیتر تهیه گردید. محلول مادر ۵۰۰/۰ میلی گرم بر لیتر پونسیو ۴ آر هم از انحلال ۰/۰۲۵۰ گرم پونسیو ۴ آر خالص در آب مقطر در بالن حجمی ۵۰/۰۰ میلی لیتری تهیه گردید. سپس محلول‌های استاندارد از هر کدام از دو ماده با رقیق‌سازی روزانه از محلول مادر در غلظت‌های متفاوت ساخته شدند. برای تهیه محلول‌های بافر فسفاتی با محدوده  $\text{pH} = 6/00 - 9/00$  حجم‌های معین از محلول‌های ۰/۰۶۶ مولار دی‌سدیم هیدروژن فسفات و ۰/۰۶۶ مولار پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات استفاده شد و سپس  $\text{pH}$  آن‌ها با  $\text{pH}$  متر تنظیم گردید [۳۷]. برای تهیه محلول بافر فسفاتی با  $\text{pH} = 4/00$  از محلول‌های فسفریک‌اسید ۰/۱۰ مولار و پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات ۰/۰۶۶ مولار استفاده شد. برای تهیه بافر فسفاتی با  $\text{pH} = 10/00$  ابتدا ۱/۱۸۶۲ گرم از دی‌سدیم هیدروژن فسفات به یک بالن ۱۰۰/۰ میلی لیتری اضافه شد و با آب مقطر تا خط نشانه به حجم رسانده و یکنواخت گردید و با کمک  $\text{pH}$  متر و افزودن سدیم هیدروکسید ۰/۱۰ مولار، محلول بافر با  $\text{pH} = 10/00$  تهیه گردید. برای تهیه بافر فسفاتی با  $\text{pH} = 11/00$  همانند  $\text{pH} = 10/00$  عمل شد با این تفاوت که تقریباً ۲/۰۰ میلی لیتر سدیم هیدروکسید ۰/۱۰ مولار به آن اضافه گردید.

بافر بوراکسی با  $\text{pH} = 10/00$  از اختلاط حجم‌های معین از دی‌سدیم بورات دکا هیدراته ۰/۰۶۶ مولار و سدیم هیدروکسید ۰/۱۰ مولار آماده شد و  $\text{pH}$  محلول به کمک  $\text{pH}$  متر تنظیم گردید [۳۷].

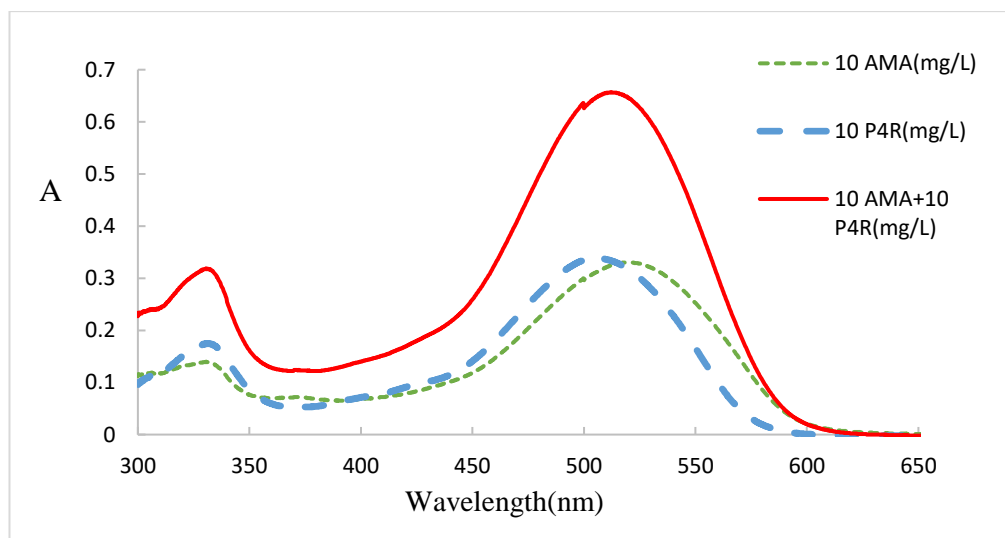
### ۳-۴- دستگاه‌ها و وسایل مورد استفاده

برای ثبت طیف‌های جذبی گونه‌های آمارانس و پونسیو ۴ آر در ناحیه مورد نظر (۳۰۰-۶۵۰ نانومتر)

از دستگاه اسپکتروفتومتر دو پرتوی ریلی مدل Uv- 2601<sup>۱</sup> مجهز به یک جفت سل کوارتز یک سانتی متری استفاده شد. برای اندازه گیری pH از یک دستگاه pH متر مترام<sup>۲</sup> مدل ۷۴۴ مجهز به یک الکتروود مرکب غشا شیشه-کالومل (۳مولار) و جهت توزین مواد از ترازوی سارتریوس مدل A200S با دقت ۰/۱ میلی گرم استفاده شد.

### ۳-۵- طیف جذبی

طیف جذبی محلول های آمارانس (AMA)، پونسیو ۴آر (P4R) و مخلوط های دوتایی آنها در گستره طول موج ۳۰۰-۶۵۰ نانومتر در شکل ۳-۱ نشان داده شده است.



شکل ۳-۱: طیف جذبی ۱۰/۱۰۰ میلی گرم بر لیتر پونسیو ۴آر (---)، طیف جذبی ۱۰/۱۰۰ میلی گرم بر لیتر آمارانس (---) و طیف جذبی مخلوط ۱۰/۱۰۰ میلی گرم بر لیتر آمارانس و ۱۰/۱۰۰ میلی گرم بر لیتر پونسیو ۴آر (—) در pH=۱۰/۰۰

<sup>۱</sup> Uv-2601 Reileigh

<sup>۲</sup> Metrohm 744

برای ثبت طیف‌های جذبی نمونه به این صورت عمل شد که:

برای تهیه محلول آمارانس یا پونسیو ۴آر با غلظت ۱۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر ۲/۰۰ میلی‌لیتر از محلول ۵۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس یا پونسیو ۴آر به همراه ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر بوراکسی با  $\text{pH}=10/00$  به یک بالن ۱۰/۰۰ میلی‌لیتری اضافه گردید و پس از به حجم رساندن محلول با آب مقطر و یکنواخت کردن آن، مقداری از محلول به سل کوارتز دستگاه منتقل شد و طیف آمارانس و پونسیو ۴آر با غلظت معین نسبت به محلول شاهد در گستره طول موج ۳۰۰-۶۵۰ نانومتر ثبت گردید. تهیه محلول شاهد هم مثل مراحل فوق بود با این تفاوت که به بالن حجمی ۱۰/۰۰ میلی‌لیتری از دو ترکیب مذکور اضافه نگردید. در شکل ۱-۳ طیف جذبی خالص آمارانس و پونسیو ۴آر آورده شده است که طول موج ماکزیمم را برای آمارانس در ۵۲۰ نانومتر و برای پونسیو ۴آر در ۵۰۷ نانومتر نشان می‌دهد.

برای تهیه محلول مخلوط این دو ترکیب به این صورت عمل شد که:

مقدار ۲/۰۰ میلی‌لیتر از محلول ۵۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس و ۲/۰۰ میلی‌لیتر محلول ۵۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پونسیو ۴آر به همراه ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر بوراکسی با  $\text{pH}=10/00$  به یک بالن ۱۰/۰۰ میلی‌لیتری انتقال داده شد و با آب مقطر به حجم رسانده شد و بعد از یکنواخت کردن محلول حاصل، طیف جذبی مخلوط در گستره ۳۰۰-۶۵۰ نانومتر نسبت به محلول شاهد ثبت گردید. مراحل تهیه محلول شاهد مثل فوق است با این تفاوت که هیچ غلظتی از دو ترکیب به بالن حجمی اضافه نگردید. برای مشاهده و مقایسه جزئیات طیفی محلول‌های آمارانس، پونسیو ۴آر و مخلوط حاوی این دو، طیف‌ها در شکل ۱-۳ آورده شده است. همان طور که از شکل ۱-۳ استنباط می‌شود امکان اندازه‌گیری هر یک از دو گونه به صورت جداگانه در یک مخلوط به روش اسپکتروفتومتری معمولی مستقیم امکان‌پذیر نمی‌باشد. لذا برای اندازه‌گیری این دو گونه در مخلوط از روش‌های اسپکتروفتومتری جدید استفاده گردید.



در بهینه‌سازی متغیرهای تجربی موثر بر حساسیت روش و استخراج منحنی‌های کالیبراسیون برای هر یک از ترکیبات، از مقدار جذب محلول هر ترکیب نسبت به شاهد در طول موج‌های ماکزیمم ذکر شده، به‌عنوان سیگنال تجزیه‌ای استفاده شد.

### ۳-۶- بررسی و بهینه‌سازی پارامترهای موثر بر سیستم

به‌منظور فراهم نمودن بهترین حساسیت و گزینش‌پذیری و در نتیجه بهترین حد تشخیص، متغیرهای موثر بر میزان جذب آمارانس و پونسیو ۴آر در طول موج‌های ماکزیمم هر یک مورد بررسی قرار گرفته و بهینه شدند. در بررسی متغیرها از روش بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان<sup>۱</sup> استفاده شد. در این روش برای بهینه‌سازی یک متغیر، سایر متغیرها ثابت در نظر گرفته می‌شود و فقط پارامتری که باید بهینه شود تغییر می‌کند تا بیشترین میزان پاسخ به‌دست آید.

پارامترهای بررسی شده عبارتند از:

✓ اثر pH

✓ نوع بافر

✓ قدرت یونی

در ادامه، نتیجه بررسی هر کدام از متغیرهای فوق بر میزان سیگنال تجزیه‌ای مورد بحث قرار می‌گیرد.

### ۳-۶-۱- بررسی اثر pH

اثر pH بر جذب و طول موج ماکزیمم جذب آمارانس و پونسیو ۴آر در دامنه ۱۱/۰۰-۴/۰۰ pH

---

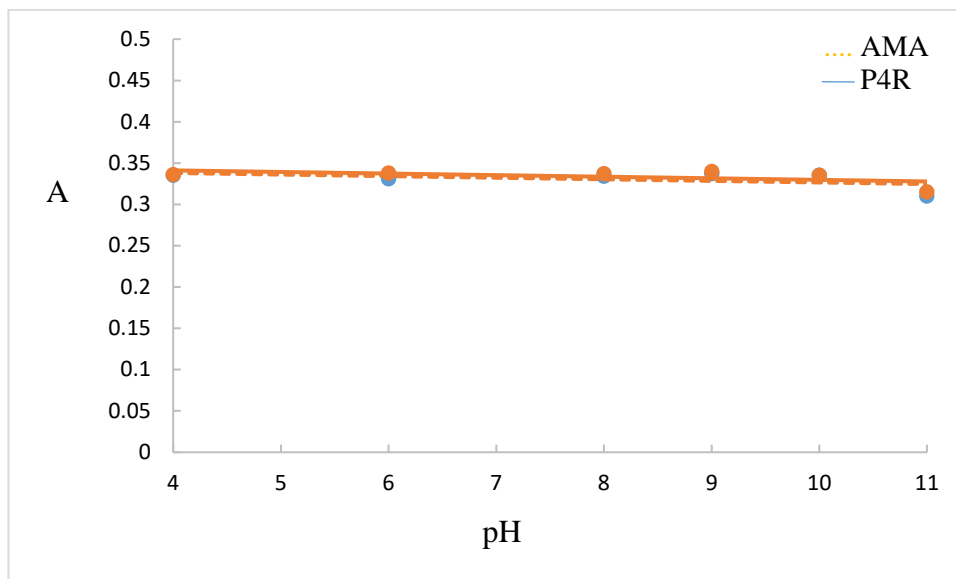
<sup>۱</sup>One-at-a time

واحد مورد بررسی قرار گرفت. در بررسی اثر pH، محلول‌های بافر با pHهای ۴/۰۰-۱۱/۰۰ مطابق بخش ۳-۳ تهیه شد. این بررسی به این صورت انجام گرفت که:

ابتدا ۲/۰۰ میلی‌لیتر محلول ۵۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از آمارانس یا پونسیو ۴ به همراه ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر در pH مورد نظر به بالن حجمی ۱۰/۰۰ میلی‌لیتری اضافه شد و با آب مقطر به حجم رسانده و یکنواخت شد و سپس طیف محلول حاصل نسبت به محلول شاهد در محدوده ۳۰۰-۶۵۰ نانومتر ثبت شد. محلول شاهد به شکل فوق تهیه شد با این تفاوت که به محلول شاهد، از گونه‌های مورد نظر اضافه نشد. نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۲-۳ و شکل ۲-۳ آورده شده است.

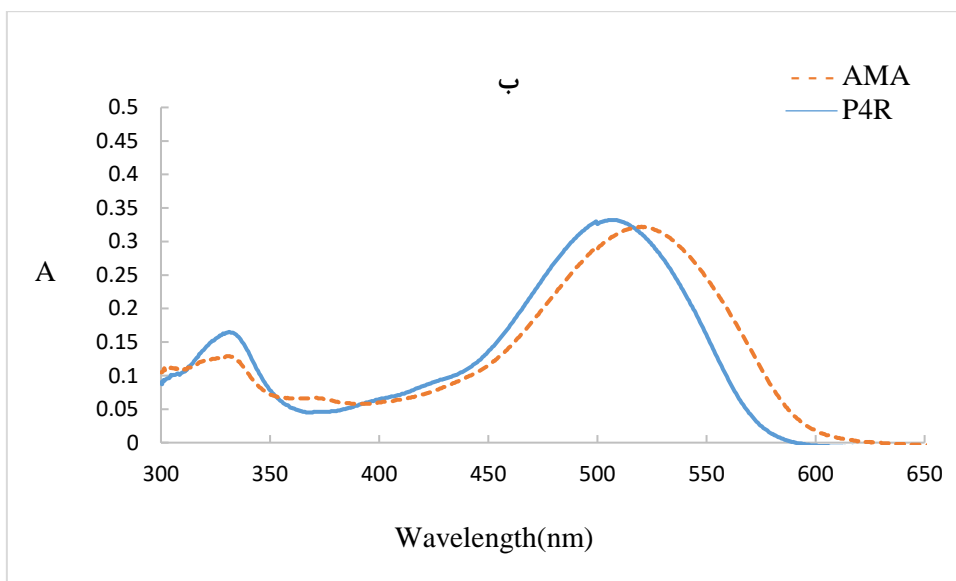
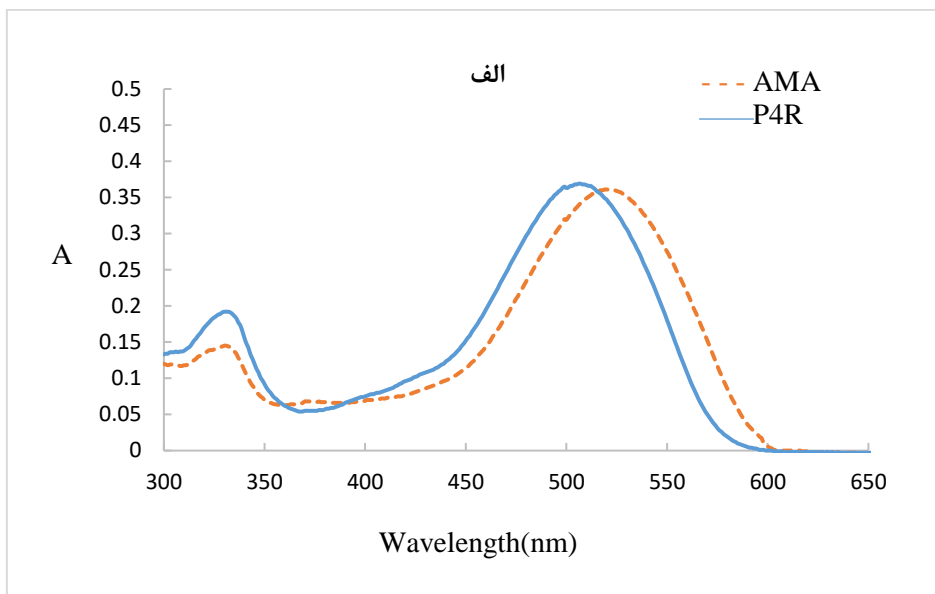
جدول ۲-۳: نتایج حاصل از بررسی pH با استفاده از بافر فسفاتی

پونسیو ۴ آر		آمارانس		pH
جذب	طول موج ماکزیمم جذب (نانومتر)	جذب	طول موج ماکزیمم جذب (نانومتر)	
۰/۳۳۶	۵۰۷	۰/۳۳۵	۵۲۰	۴/۰۰
۰/۳۳۸	۵۰۷	۰/۳۳۱	۵۲۰	۶/۰۰
۰/۳۳۷	۵۰۷	۰/۳۳۴	۵۲۰	۸/۰۰
۰/۳۴۰	۵۰۷	۰/۳۳۷	۵۲۰	۹/۰۰
۰/۳۳۵	۵۰۷	۰/۳۳۵	۵۲۰	۱۰/۰۰
۰/۳۱۵	۵۰۴	۰/۳۱۰	۵۱۸	۱۱/۰۰



شکل ۲-۳: بررسی اثر pH بر جذب آمارانس و پونسیو ۴آر، شرایط: محلول‌های آمارانس (۱۰/۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) و پونسیو ۴آر (۱۰/۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) در حضور ۲/۱۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفاتی با pHهای مختلف

نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۲-۳ و شکل ۲-۳ نشان می‌دهد که جذب و طول موج ماکزیمم جذب برای آمارانس و پونسیو ۴آر در طول موج‌های به ترتیب ۵۲۰ و ۵۰۷ نانومتر در ناحیه  $\text{pH}=4/00-10/00$  ثابت بوده و تغییرات محسوسی ندارد. در pHهای کمتر از ۱۰/۱۰۰ اختلاف طول موج آمارانس و پونسیو ۴آر در زمانی که جذب صفر می‌شود، کمتر است. در  $\text{pH}=11/00$  طول موج ماکزیمم هر دو گونه مذکور عوض شد و حساسیت کم گردید. در  $\text{pH}=10/00$  اختلاف طول موج که جذب دو گونه صفر می‌شود بیشتر شد که در شکل ۳-۳ برای دو pH نشان داده شده است. لذا جهت افزایش حساسیت و اختلاف بیشتر طول موج‌ها در زمان صفر شدن جذب هر دو گونه،  $\text{pH}=10/00$  به عنوان pH بهینه انتخاب گردید.



شکل ۳-۳: بررسی اثر pH بر اختلاف طول موج‌های آمارانس و پونسیو ۴آر، شرایط: محلول‌های آمارانس (۱۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) و پونسیو ۴آر (۱۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) در حضور ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات‌ی با الف: pH=۶/۰۰ و ب: pH=۱۰/۰۰

### ۳-۶-۲- بررسی اثر نوع بافر

پس از بررسی اثر pH بر روی میزان جذب برای دستیابی به گزینش پذیری و حساسیت بیشتر، اثر نوع بافر بر روی جذب آمارانس و پونسیو ۴آر توسط بافرهای فسفاتی و بوراکسی با  $\text{pH}=10/00$  مورد بررسی قرار گرفت. محلول‌های بافر مطابق بخش ۳-۳ تهیه شد و اثر نوع بافر بر سیگنال تجزیه‌ای هر دو گونه مورد بررسی قرار گرفت. برای این بررسی‌ها ابتدا  $2/00$  میلی‌لیتر از بافر مورد نظر با  $\text{pH}=10/00$  و  $2/00$  میلی‌لیتر از محلول  $50/00$  میلی‌گرم بر لیتر آمارانس یا پونسیو ۴آر به بالن حجمی  $10/00$  میلی‌لیتری منتقل شد و بعد از به حجم رساندن و یکنواخت کردن محلول، مقداری از آن به سل دستگاه منتقل شد و طیف محلول حاصل نسبت به شاهد در طول موج ماکزیمم اندازه‌گیری و ثبت گردید. محلول شاهد همانند محلول نمونه تهیه شد با این تفاوت که به محلول شاهد از گونه‌های مورد نظر اضافه نگردید. نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۳-۳ نشان می‌دهد که نوع بافر اثری بر سیگنال تجزیه‌ای دو گونه ندارد. لذا به منظور کاهش مزاحمت‌های احتمالی، بافر بوراکسی به‌عنوان بافر بهینه انتخاب گردید.

جدول ۳-۳: نتایج حاصل از بررسی نوع بافر

نوع بافر	جذب آمارانس ( $520$ نانومتر)	جذب پونسیو ۴آر ( $507$ نانومتر)
فسفاتی	$0/335$	$0/338$
بوراکسی	$0/334$	$0/340$

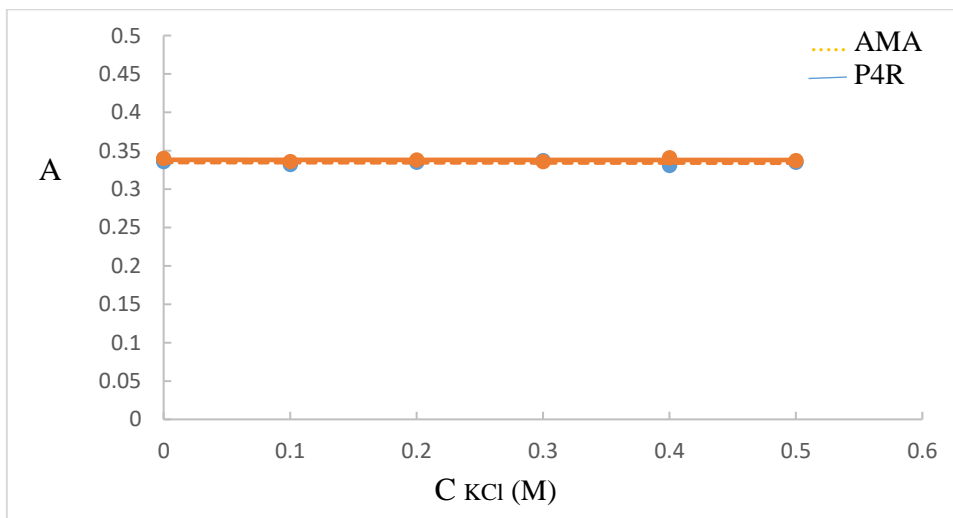
### ۳-۶-۳- بررسی اثر قدرت یونی

تاثیر قدرت یونی بر سیگنال تجزیه‌ای آمارانس و پونسیو ۴آر با استفاده از محلول پتاسیم کلرید در محدوده غلظتی  $0/0-0/50$  مولار مورد بررسی قرار داده شد. این بررسی به این صورت انجام شد که  $2/00$  میلی‌لیتر محلول  $50/00$  میلی‌گرم بر لیتر آمارانس یا پونسیو ۴آر و  $2/00$  میلی‌لیتر محلول بافر بوراکسی با  $\text{pH}=10/00$  به‌همراه حجم‌های مختلفی از پتاسیم کلرید  $1/00$  مولار به بالن حجمی  $10/00$  میلی‌لیتری

منتقل و محلول با آب مقطر تا خط نشانه رقیق و یکنواخت گردید. سپس قسمتی از آن به سل دستگاه منتقل شد. محلول شاهد همانند محلول نمونه تهیه شد با این تفاوت که به آن فقط بافر بوراکسی افزوده شد. جذب محلول نمونه نسبت به محلول شاهد در طول موج ماکزیمم جذب مربوطه اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۳-۴ و شکل ۳-۴ نشان می‌دهد که در دامنه غلظتی ۰/۰۰ تا ۰/۵۰ مولار پتاسیم کلرید، قدرت یونی تأثیری بر میزان جذب گونه‌های مورد نظر و حساسیت روش ندارد.

جدول ۳-۴: نتایج حاصل از بررسی اثر قدرت یونی

جذب پونسیو آر (۱۰ mg/L) در طول موج ۵۰۷ نانومتر	جذب آمارانس (۱۰ mg/L) در طول موج ۵۲۰ نانومتر	غلظت پتاسیم کلرید (مولار)
۰/۳۴۰	۰/۳۳۶	۰/۰۰
۰/۳۳۶	۰/۳۳۲	۰/۱
۰/۳۳۸	۰/۳۳۵	۰/۲
۰/۳۳۶	۰/۳۳۷	۰/۳
۰/۳۴۱	۰/۳۳۱	۰/۴
۰/۳۳۷	۰/۳۳۵	۰/۵



شکل ۳-۴: بررسی اثر قدرت یونی شرایط: محلول‌های ۱۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس (طول موج ۵۲۰ نانومتر) و یا پونسیو آر (طول موج ۵۰۷ نانومتر)، در حضور ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر بوراکسی با  $\text{pH} = 10.00$

### ۳-۷- شرایط بهینه

با توجه به نتایج تجربی حاصل در بررسی و بهینه‌سازی پارامترهای موثر بر میزان جذب در طول موج‌های ماکزیمم مربوط به دو ایزومر، شرایط بهینه با افزایش ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر بوراکسی با  $\text{pH}=10/00$  حاصل شد.

### ۳-۸- رسم منحنی کالیبراسیون

#### ۳-۸-۱- تعیین دامنه خطی آمارانس و پونسیو ۴آر به صورت جداگانه

در شرایط بهینه، منحنی کالیبراسیون برای اندازه‌گیری آمارانس و پونسیو ۴آر به صورت جداگانه برای هر یک به دست آمد. روش کار برای استخراج منحنی کالیبراسیون منفرد برای هر کدام از ترکیبات به این صورت بود که:

به یک سری بالن حجمی ۱۰/۰۰ میلی‌لیتری، ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر بوراکسی با  $\text{pH}=10/00$ ، مقادیر متفاوتی از هر دو ایزومر به صورت جداگانه اضافه و با آب مقطر تا خط نشانه بالن رقیق گردید. سپس مقداری از آن به سل دستگاه منتقل شد و جذب هر محلول در طول موج ماکزیمم هر گونه (۵۲۰ و ۵۰۷ نانومتر به ترتیب برای آمارانس و پونسیو ۴آر) نسبت به شاهد اندازه‌گیری و ثبت گردید. نتایج حاصل در جدول ۳-۵ آمده است. محلول شاهد برای هر دو گونه از انتقال ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر بوراکسی با  $\text{pH}=10/00$  به یک بالن ۱۰/۰۰ میلی‌لیتری و رقیق کردن آن با آب مقطر تا خط نشانه به دست آمد.

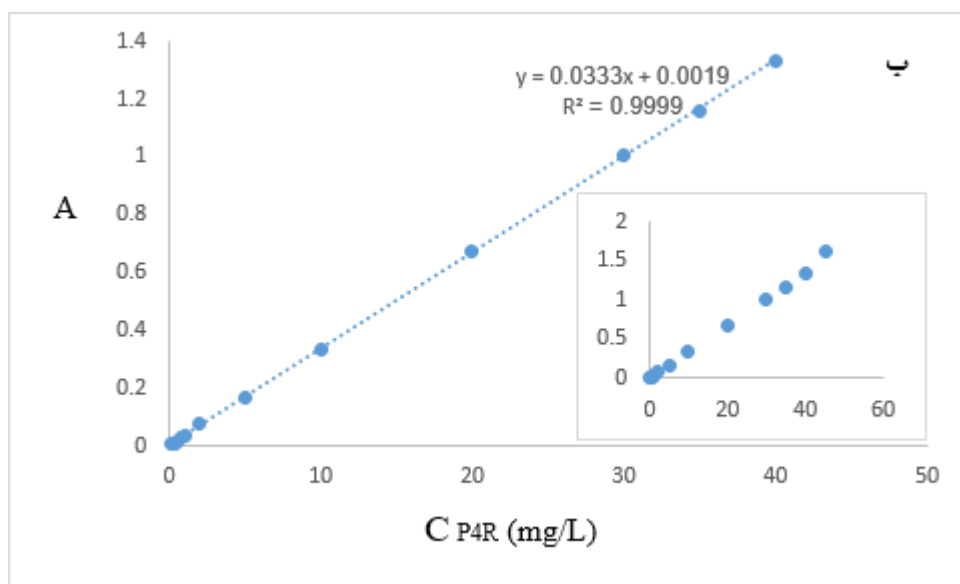
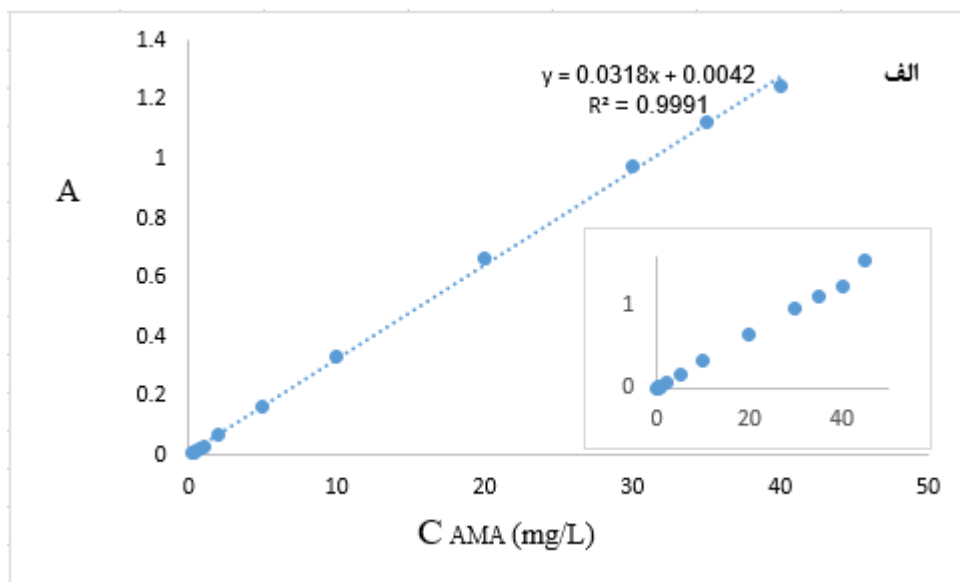
جدول ۳-۵: نتایج حاصل از رسم منحنی کالیبراسیون منفرد برای آمارانس و پونسیو ۴ به صورت مجزا در شرایط بهینه

جذب پونسیو ۴ آر (۵۰۷ نانومتر)	جذب آمارانس (۵۲۰ نانومتر)	غلظت (میلی گرم بر لیتر)
۰/۰۰۷	۰/۰۰۷	۰/۲۰
۰/۰۱۱	۰/۰۰۹	۰/۴۰
۰/۰۱۵	۰/۰۱۳	۰/۵۰
۰/۰۲۵	۰/۰۲۲	۰/۸۰
۰/۰۳۵	۰/۰۳۱	۱/۰۰
۰/۰۷۶	۰/۰۷۱	۲/۰۰
۰/۱۷۰	۰/۱۶۵	۵/۰۰
۰/۳۳۸	۰/۳۳۵	۱۰/۰
۰/۶۷۲	۰/۶۶۵	۲۰/۰
۱/۰۰۶	۰/۹۷۶	۳۰/۰
۱/۱۵۶	۱/۱۲۵	۳۵/۰
۱/۳۳۳	۱/۲۴۴	۴۰/۰
۱/۶۲۰	۱/۵۵۳	۴۵/۰

معادله بهترین خط برای منحنی‌های کالیبراسیون از روش رگرسیون حداقل مربعات، استخراج شد.

نتایج به دست آمده در شکل ۳-۵ و جدول ۳-۶ آورده شده است.





شکل ۳-۵: الف : منحنی کالیبراسیون آمارانس (میلی گرم بر لیتر) و ب : منحنی کالیبراسیون پونسیو ۴آر (میلی گرم بر لیتر) در شرایط بهینه : ۲/۰۰ میلی لیتر بافر بوراکسی با pH= ۱۰/۰۰

جدول ۳-۶: نتایج حاصل از کالیبراسیون جداگانه دو گونه

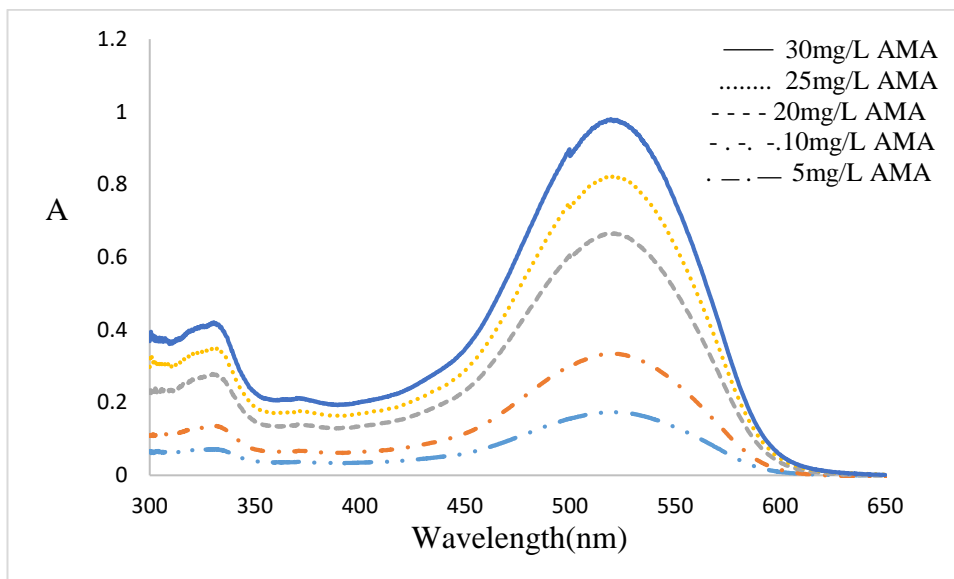
ترکیب	آمارانس ( $\lambda_{\max} = 520 \text{ nm}$ )	پونسیو ۴ آر ( $\lambda_{\max} = 507 \text{ nm}$ )
ناحیه خطی (میلی گرم بر لیتر)	۰/۲۰ - ۴۰/۰	۰/۲۰ - ۴۰/۰
معادله رگرسیون	$A = 0.0318 C_{\text{AMA}} + 0.0042$ ( $n=13$ )	$A = 0.0333 C_{\text{P4R}} + 0.0019$ ( $n=13$ )
$R^2$	۰/۹۹۹۱	۰/۹۹۹۹

در جدول ۳-۶، A سیگنال تجزیه‌ای مربوط به هر گونه (جذب محلول نمونه نسبت به محلول شاهد) در طول موج ماکزیمم مربوط به هر گونه،  $C_{\text{AMA}}$  و  $C_{\text{P4R}}$  به ترتیب، غلظت آمارانس و پونسیو ۴ آر بر حسب میلی گرم بر لیتر و  $R^2$  مجذور ضریب همبستگی برای هر نمودار است.

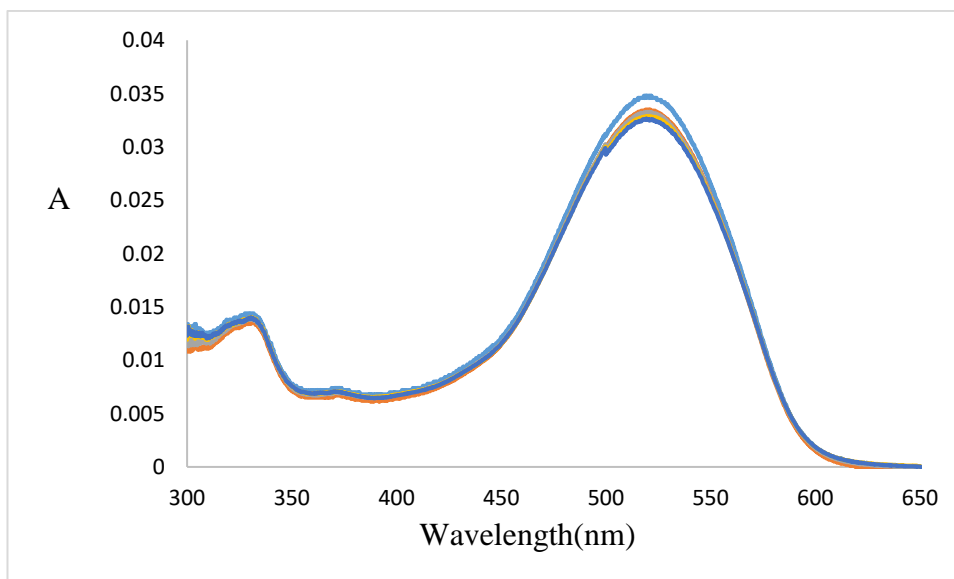
### ۳-۹- کاربرد روش افزایش استاندارد نقطه H-نسبی (RHPSAM) در تعیین

#### غلظت آمارانس و پونسیو ۴ آر

اولین روش که برای تعیین مقدار همزمان آمارانس و پونسیو ۴ آر به کار برده شد، روش افزایش استاندارد نقطه H-نسبی (RHPSAM) است. در روش RHPSAM، به طیف نرمال شده مقسوم علیه نیاز می‌باشد. برای به دست آوردن طیف نرمال شده آمارانس به عنوان مقسوم علیه، طیف‌های جذبی محلول‌های ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰، ۲۵/۰۰ و ۳۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر آن در بافر بوراکسی با  $\text{pH} = 10.00$  ثبت گردید (شکل ۳-۶) و طیف جذبی هر محلول به غلظت همان محلول تقسیم شد (شکل ۳-۷).



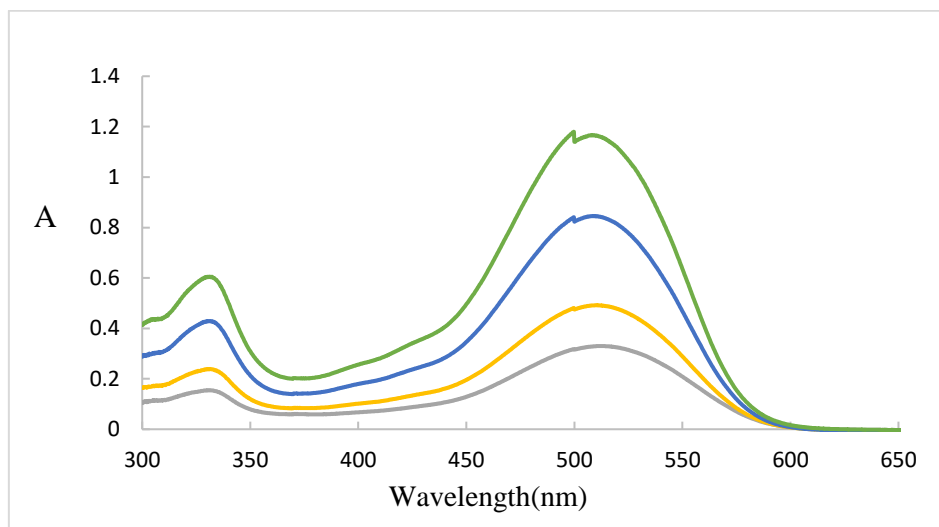
شکل ۳-۶: طیف‌های جذبی محلول‌های خالص ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰، ۲۵/۰۰ و ۳۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس تحت شرایط: ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر بوراکسی با  $\text{pH}=10.00$



شکل ۳-۷: طیف‌های جذبی به‌دست آمده برای محلول‌های خالص ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰، ۲۵/۰۰ و ۳۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس بعد از تقسیم کردن به غلظت هر محلول تحت شرایط: ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر بوراکسی با  $\text{pH}=10.00$

در ادامه تعیین همزمان غلظت دو گونه به روش RHPSAM آورده شده است:

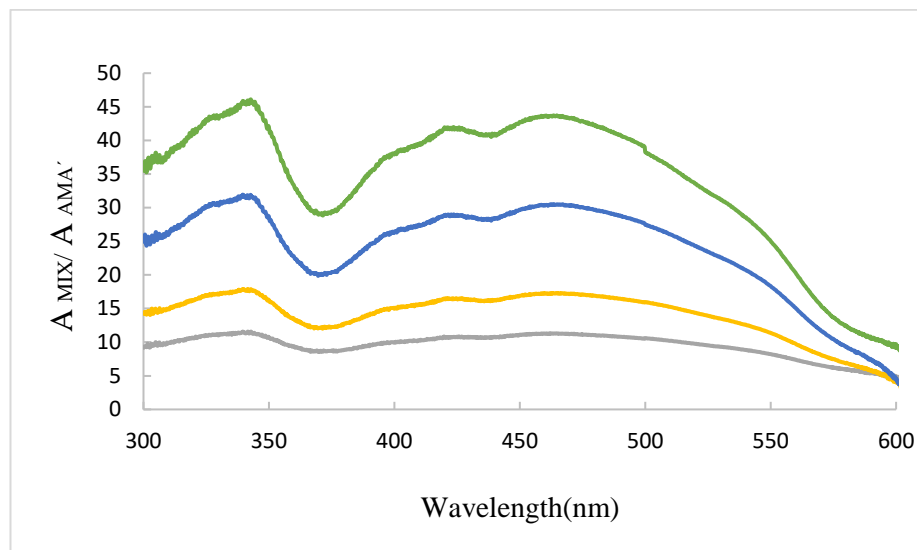
ابتدا طیف جذبی مخلوط مجهول ثبت گردید (مخلوط حاوی ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر آمارانس و ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر پونسیو ۴ آر). سپس همانند روش افزایش استاندارد، مقادیر مختلفی از گونه پونسیو ۴ آر (آنالیت) به مخلوط مجهول اضافه شد و طیف‌های حاوی مجهول و استاندارد ثبت شد (شکل ۳-۸).



شکل ۳-۸: طیف جذبی مخلوط‌های حاوی ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰ و ۳۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر پونسیو ۴ آر و ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر آمارانس در شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی لیتر محلول بافر بوراکسی با  $\text{pH}=10/00$

سپس طیف جذبی هر مخلوط به طیف نرمال شده محلول ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر آمارانس به عنوان

مقسوم‌علیه تقسیم گردید (شکل ۳-۹).



شکل ۳-۹: طیف‌های نسبی حاصل از تقسیم طیف مخلوط‌های حاوی ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰ و ۳۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پونسیو آ۴ و ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس به طیف نرمال شده ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس به‌عنوان مقسوم‌علیه در شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی‌لیتر محلول بافر بوراکسی با  $\text{pH}=10/00$

بر اساس تئوری روش هر جفت طول موجی را می‌توان برای تعیین مقدار همزمان آنالیت‌ها به روش

RHPSAM به کار برد که طول موج ۴۷۵ و ۵۶۰ نانومتر انتخاب شدند و جذب‌های نسبی (دامنه‌های نسبی)

در دو طول موج برای هر مخلوط (مجهول و مجهول به‌علاوه استانداردها) اندازه‌گیری شد (جدول ۳-۷).

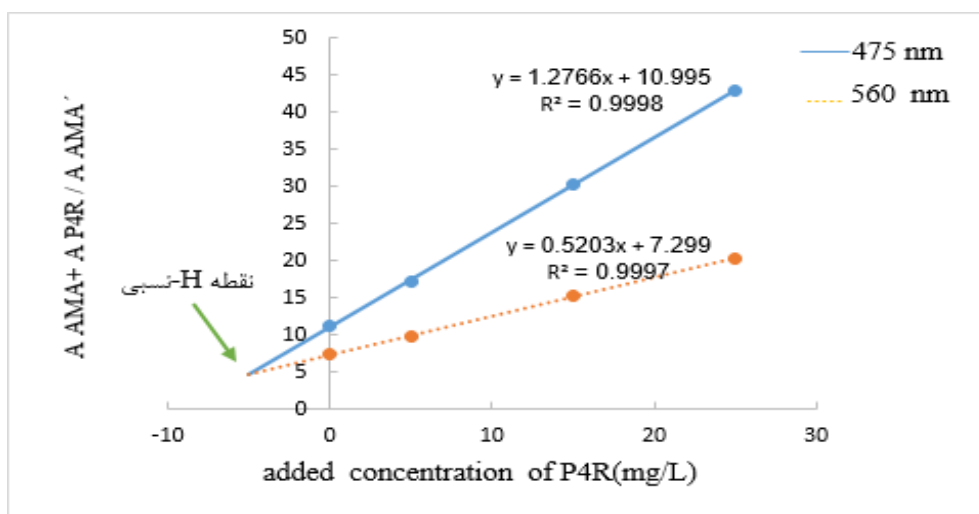
جدول ۳-۷: جذب نسبی به‌دست آمده برای مخلوط ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس و ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پونسیو آ۴ بعد از تقسیم بر طیف نرمال شده ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس به‌عنوان مقسوم‌علیه در جفت طول موج ۴۷۵ و ۵۶۰ نانومتر برای هر

مخلوط در روش RHPSAM

جذب نسبی در طول موج ۵۶۰ نانومتر	جذب نسبی در طول موج ۴۷۵ نانومتر	غلظت پونسیو آ۴ افزوده شده (میلی‌گرم بر لیتر)
۷/۳۹	۱۱/۱۸	۰
۹/۷۵	۱۷/۱۰	۵
۱۵/۱۷	۳۰/۲۵	۱۵
۲۰/۳۰	۴۲/۹۱	۲۵

سپس جذب‌های نسبی در دو طول موج بر حسب غلظت پونسیو ۴آر افزوده شده روی یک نمودار

رسم گردید ( شکل ۳-۱۰ ).



شکل ۳-۱۰: نمودار افزایش استاندارد نقطه H-نسبی به همراه معادله برای مخلوط ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر آمارانس و ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر پونسیو ۴آر

محل تقاطع دو خط مستقیم در دو طول موج، نقطه H-نسبی را نشان می‌دهد. با استفاده از

معادله‌های ۲۲-۲ و ۲۳-۲ به ترتیب غلظت پونسیو ۴آر و آمارانس محاسبه گردید که برای این مخلوط مقادیر

۴/۸۹ و ۴/۷۵ میلی گرم بر لیتر به ترتیب برای پونسیو ۴آر و آمارانس به دست آمد. برای بقیه مخلوط‌ها هم

روش کار به صورت فوق انجام شد.

### ۳-۹-۱- محلول‌سازی سری ارزیابی و تست برای روش RHPSAM

به منظور بهینه‌سازی پارامترها و رسیدن به بهترین صحت در روش‌های به کار رفته در این پروژه،

محلول‌های سری ارزیابی و سری تست تهیه و طیف آن‌ها نسبت به محلول شاهد در دامنه ۳۰۰-۶۵۰ نانومتر

ثبت گردید و مورد بررسی قرار گرفت. محلول‌های سری ارزیابی و سری تست از انتقال مقادیر مختلف این

دو ایزومر به همراه ۲/۰۰ میلی لیتر بافر بوراکسی pH=۱۰/۰ به بالن های حجمی ۱۰/۰ میلی لیتری و رقیق کردن آن ها تا خط نشانه با آب مقطر تهیه شد. سپس طیف هر محلول نسبت به محلول شاهد در دامنه ۳۰۰-۶۵۰ نانومتر ثبت و ذخیره گردید. محلول شاهد همانند محلول نمونه تهیه شد با این تفاوت که به آن هیچ مقداری از این دو ترکیب اضافه نشد.

ترکیب غلظتی محلول های سری ارزیابی و تست به ترتیب در جدول های ۳-۸ و ۳-۹ آورده شده است.

جدول ۳-۸: ترکیب غلظتی محلول های سری ارزیابی برای روش RHPSAM

محلول	غلظت آمارانس (میلی گرم بر لیتر)	غلظت پونسیو ۴آر (میلی گرم بر لیتر)
۱	۲/۰۰	۱/۰۰
۲	۲/۰۰	۲/۰۰
۳	۲/۰۰	۵/۰۰
۴	۲/۰۰	۱۰/۰۰
۵	۵/۰۰	۲/۰۰
۶	۵/۰۰	۵/۰۰
۷	۵/۰۰	۱۰/۰۰
۸	۵/۰۰	۲۰/۰۰
۹	۱۰/۰۰	۱/۰۰
۱۰	۱۰/۰۰	۲/۰۰
۱۱	۱۰/۰۰	۵/۰۰
۱۲	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰
۱۳	۱۰/۰۰	۲۰/۰۰
۱۴	۲۰/۰۰	۱/۰۰
۱۵	۲۰/۰۰	۲/۰۰
۱۶	۲۰/۰۰	۵/۰۰
۱۷	۲۰/۰۰	۱۰/۰۰
۱۸	۲۰/۰۰	۲۰/۰۰

جدول ۳-۹: ترکیب غلظتی محلول‌های سری تست برای روش RHPSAM

محلول	غلظت آمارانس (میلی گرم بر لیتر)	غلظت پونسیو ۴آر (میلی گرم بر لیتر)
۱	۵/۰۰	۵/۰۰
۲	۳/۰۰	۵/۰۰
۳	۳/۰۰	۱۵/۰۰
۴	۱۲/۰۰	۷/۰۰
۵	۵/۰۰	۷/۰۰

### ۳-۹-۲- بهینه‌سازی مقسوم‌علیه در روش RHPSAM

با توجه به اینکه برای به‌دست آوردن غلظت گونه‌های مجهول باید مقسوم‌علیه بهینه شود [۳۰]، لذا ابتدا مقسوم‌علیه بهینه گردید. برای انجام این کار مخلوط‌های سری ارزیابی مطابق بخش ۳-۹-۱ تهیه و به روش RHPSAM در جفت طول موج‌های ۴۷۵ و ۵۶۰ نانومتر غلظت هر گونه در آن‌ها با استفاده از هر مقسوم‌علیه تعیین گردید که نتایج به‌دست آمده در جدول ۳-۱۰ آورده شده است.

برای محاسبه پارامتر آماری میانگین مربع خطا (MSE)<sup>۱</sup> و میانگین خطای نسبی (MRE)<sup>۲</sup>، به‌ترتیب از معادلات ۳-۱ و ۳-۲ استفاده شد.

$$MSE = \frac{\sum_{i=1}^n (C_i - \hat{C}_i)^2}{n} \quad \text{معادله ۳-۱}$$

$$MRE = \frac{\sum_{i=1}^n \left| \frac{C_i - \hat{C}_i}{C_i} \right|}{n} \times 100 \quad \text{معادله ۳-۲}$$

۱ Mean Square Error

۲ Mean Relative Error



که در این معادلات  $C_i$  غلظت واقعی،  $\hat{C}_i$  غلظت محاسبه شده و  $n$  تعداد مخلوط‌های سری ارزیابی یا تست می‌باشد.

جدول ۳-۱۰: نتایج حاصل از بهینه‌سازی غلظت طیف نرمال شده آمارانس به‌عنوان مقسوم‌علیه در پیش‌بینی غلظت دو گونه در مخلوط‌های سری ارزیابی برای روش RHPSAM در جفت طول موج ۴۷۵ و ۵۶۰ نانومتر

خطا در پیش‌بینی غلظت پونسیو آ۴		خطا در پیش‌بینی غلظت آمارانس		غلظت آمارانس به عنوان مقسوم‌علیه (میلی‌گرم بر لیتر)
MRE	MSE	MRE	MSE	
۴/۰۱۶۹	۰/۰۴۹۵	۴/۹۰۴۳	۰/۵۵۷۳	۵/۰۰
۳/۶۳۲۷	۰/۰۳۰۲	۳/۱۷۳۳	۰/۷۹۱۶	۱۰/۰۰
۳/۶۱۱۴	۰/۰۲۸۱	۳/۱۱۹	۰/۷۸۸۹	۲۰/۰۰
۳/۶۱۱۴	۰/۰۲۸۱	۳/۱۱۹	۰/۷۸۸۹	۲۵/۰۰
۳/۶۳۲۷	۰/۰۳۰۲	۳/۱۷۳۳	۰/۷۹۱۶	۳۰/۰۰

با توجه به نتایج به‌دست آمده از جدول ۳-۱۰، در غلظت‌های ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰، ۲۵/۰۰ و ۳۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس به‌عنوان مقسوم‌علیه، مقادیر MSE و MRE برای آمارانس و پونسیو آ۴ تفاوت معناداری با هم ندارند، لذا طیف نرمال شده غلظت ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس به‌عنوان مقسوم‌علیه انتخاب شد.

### ۳-۹-۳- بهینه‌سازی طول موج در روش RHPSAM

بعد از انتخاب مقسوم‌علیه جفت طول موج بهینه شد. برای انتخاب جفت طول موج، دو سری طول موج انتخاب شدند. جفت طول موج‌هایی که بر اساس روش HPSAM انتخاب شدند و جفت طول موج‌هایی که بر اساس روش HPSAM انتخاب نشدند. در روش HPSAM در جفت طول موج‌های انتخاب شده باید جذب گونه مزاحم یکسان باشد ولی جذب آنالیت در دو طول موج با هم برابر نباشد [ ۳۹].

در این مطالعه جفت طول موج‌های ۴۷۵-۵۶۰، ۴۷۵-۵۷۱، ۴۵۷/۸-۵۷۱، ۴۹۷/۲-۵۴۱ و ۴۸۷-۵۴۹/۸ نانومتر جذب برای گونه آمارانس به‌عنوان گونه مزاحم با هم برابر است ولی جذب برای پونسیو ۴ به‌عنوان آنالیت با هم متفاوت است (جفت طول موج‌ها طبق شرایطی که در روش افزایش استاندارد نقطه H ذکر شده است انتخاب شدند). مثل بهینه‌سازی مقسوم‌علیه، غلظت هر دو گونه برای مخلوط‌های سری ارزیابی تعیین گردید. نتایج در جدول ۱۱-۳ آورده شده است.

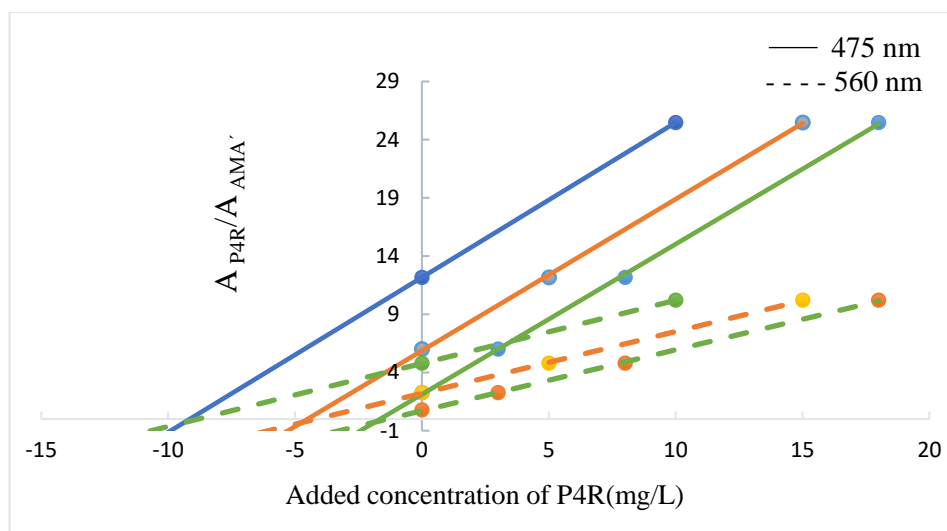
جدول ۱۱-۳: نتایج حاصل از بهینه‌سازی طول موج در پیش‌بینی غلظت دو گونه در مخلوط‌های سری ارزیابی برای روش RHPSAM

$\Delta(\Delta A)^*$ اختلاف جذب دو گونه در دو طول موج	خطا در پیش‌بینی غلظت پونسیو ۴ آر		خطا در پیش‌بینی غلظت آمارانس		طول موج (نانومتر)
	MRE	MSE	MRE	MSE	
۰/۰۶۲	۳/۶۱۱۴	۰/۰۲۸۱	۳/۱۱۹	۰/۷۸۸۹	۴۷۵ و ۵۶۰
۰/۰۶۵	۲/۲۷۵	۰/۰۳۰۵	۴/۳۷۴۱	۰/۸۶۳۹	۴۵۷/۸ و ۵۷۱
۰/۰۳۸	۸/۷۶۹۲	۰/۱۶۴۴	۴/۹۹۴۵	۱/۰۷۸۳	۴۹۷/۲ و ۵۴۱
۰/۰۴۸	۶/۱۰۱۱	۰/۰۷۰۵	۲/۷۳۸۵	۰/۷۷۲۷	۴۸۷ و ۵۴۹/۸
۰/۰۲۶	۱۱/۲۵	۰/۲۱۹۷	۶/۵۹۵۳	۱/۰۲۲۱	۴۷۸ و ۵۴۰
۰/۰۵۸	۶/۷۳۱۴	۰/۱۹۸۹	۳/۷۷۶۲	۰/۵۶۶	۴۶۰ و ۵۵۰
۰/۰۶۰	۸/۹۲۷۱	۰/۳۴۶۳	۵/۴۷۸۶	۰/۹۰۳۱	۵۳۰ و ۵۶۰
۰/۰۷۰	۴/۴۰۴	۰/۰۵۲۴	۳/۰۲۹۳	۰/۶۹۷۳	۴۶۳ و ۵۶۰
۰/۰۳۹	۶/۶۸۸۵	۰/۰۹۸۳	۵/۷۴۸۳	۶/۰۹۵۷	۴۸۹ و ۵۴۵

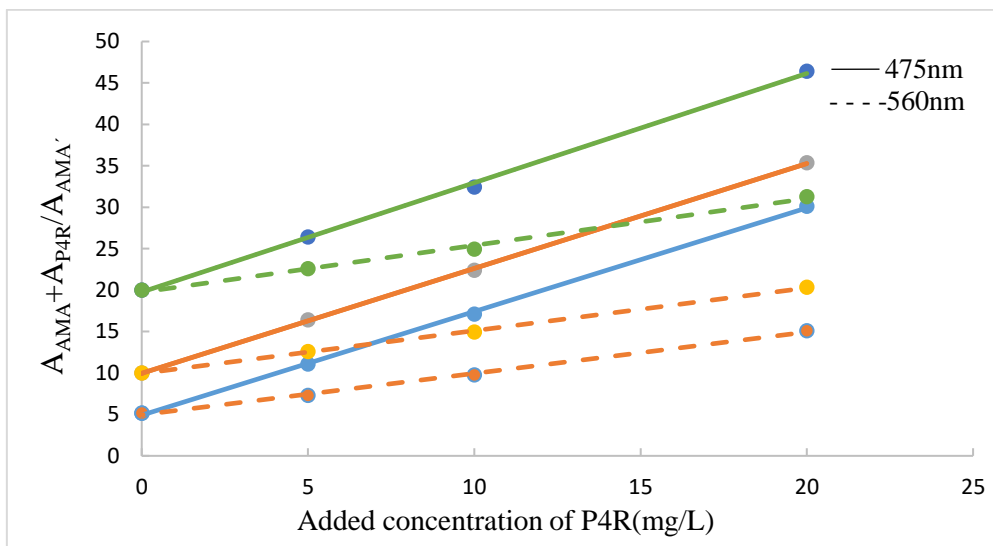
\*  $\Delta(\Delta A)$  اختلاف جذب ۱۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس و ۱۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پونسیو ۴ آر در جفت طول موج‌های انتخاب شده است.

برای جفت طول موج‌هایی که جذب گونه آمارانس یکسان است، جفت طول موج‌های ۴۷۵-۵۶۰ و ۴۵۷/۸-۵۷۱ نانومتر دارای خطای کمتری برای پیش‌بینی غلظت دو گونه در سری ارزیابی می‌باشد. در این جفت طول موج‌ها علاوه بر اینکه اختلاف جذب دو گونه زیاد است، اختلاف دو طول موج هم زیاد است. از بین دو جفت طول موج مذکور، جفت طول موج ۴۷۵ و ۵۶۰ نانومتر برای بررسی‌های بعدی انتخاب شد.

این روش همچنین قادر به تعیین مقدار هر ایزومر در نمونه‌های خالص می‌باشد که در شکل ۱۱-۳ و شکل ۱۲-۳ به خوبی نشان داده شده است. در شکل ۱۱-۳ نمونه‌ها فقط حاوی ایزومر پونسیو ۴ آر با غلظت‌های مختلف می‌باشند که محل تقاطع دو خط، مقدار پیش‌بینی شده به وسیله روش RHPSAM را برای غلظت پونسیو ۴ آر نشان می‌دهد. در شکل ۱۲-۳ نمونه‌ها فقط حاوی ایزومر آمارانس با غلظت‌های مختلف می‌باشند که محل تقاطع آن‌ها با هم (عرض از مبدا برای هر جفت خط) برابر غلظت آمارانس می‌باشد.



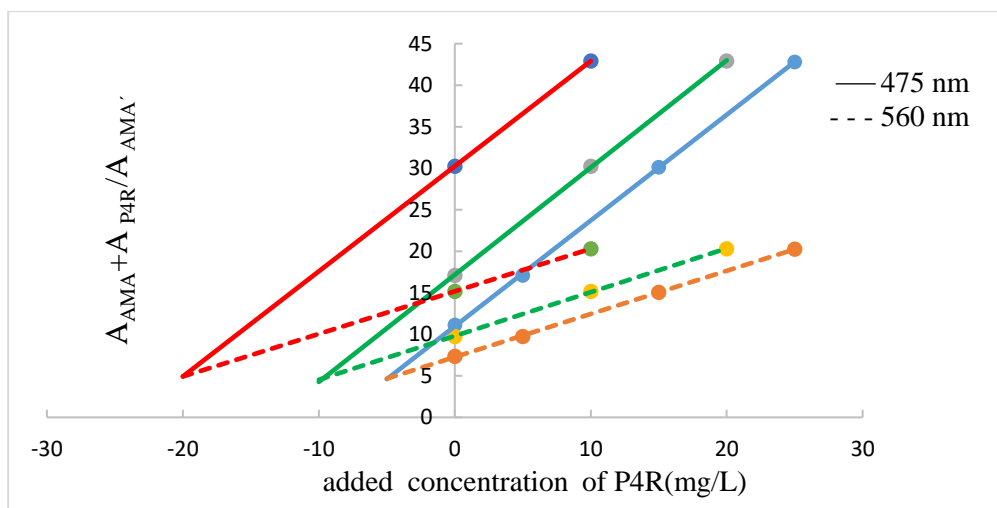
شکل ۱۱-۳: نمودار روش افزایش استاندارد نقطه H-نسبی برای محلول‌های خالص ۲/۰۰، ۵/۰۰ و ۱۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پونسیو ۴ آر



شکل ۳-۱۲: نمودار روش افزایش استاندارد نقطه H-نسبی برای محلول‌های خالص ۵/۰۰، ۱۰/۰۰ و ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس

در شکل ۳-۱۳ نمودار افزایش استاندارد مخلوط‌های حاوی مقدار یکسانی از آمارانس و مقادیر

مختلفی از ایزومر پونسیو ۴ آر آورده شده است.

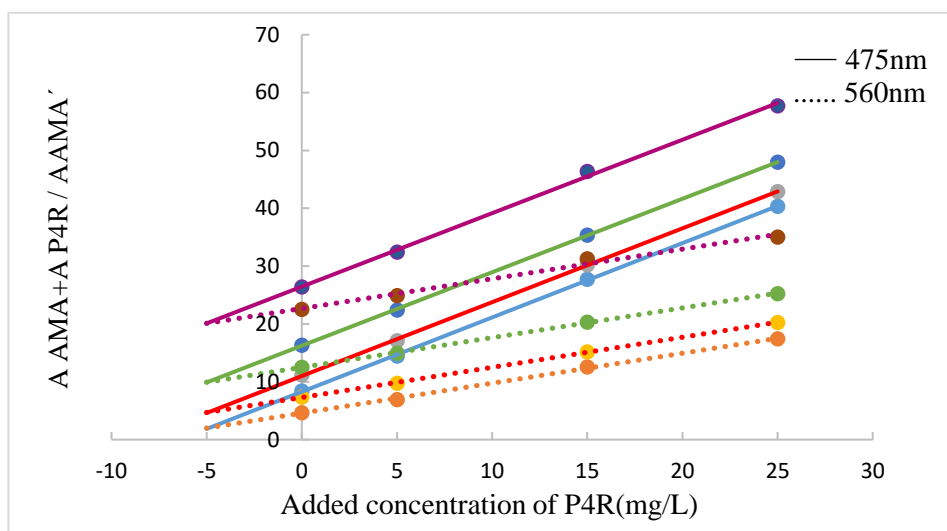


شکل ۳-۱۳: نمودار روش افزایش استاندارد نقطه H-نسبی برای مخلوط‌های مختلف حاوی ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس با

غلظت‌های ۵/۰۰، ۱۰/۰۰ و ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پونسیو ۴ آر

در شکل ۳-۱۴ نمودار مخلوط‌هایی با غلظت ثابتی از پونسیو ۴آر و غلظت متفاوتی از آمارانس آورده

شده است.



شکل ۳-۱۴: نمودار روش افزایش استاندارد نقطه H-نسبی برای مخلوط‌های مختلف حاوی ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پونسیو ۴آر با غلظت‌های ۲۰/۰۰، ۵۰/۰۰، ۱۰۰/۰۰ و ۲۰۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس

نتایج حاصل از به‌کار بردن روش RHPSAM برای محلول‌های سری ارزیابی و سری تست در شرایط

بهینه (مقسوم‌علیه ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس و طول موج ۴۷۵ و ۵۶۰ نانومتر) در جدول‌های به‌ترتیب

۳-۱۲ و ۳-۱۳ آورده شده است. معادلات کالیبراسیون برای مخلوط‌های سری ارزیابی و تست نیز در هر

طول موج حساب شده و تمام آن‌ها در جدول ۳-۱۲ و ۳-۱۳ آورده شده است.

در معادلات موجود در جدول‌های ۳-۱۲ و ۳-۱۳، P نشان دهنده بزرگی پیک (دامنه) نسبی و C

نشان دهنده غلظت پونسیو ۴آر بر حسب میلی‌گرم بر لیتر می‌باشد.

جدول ۳-۱۲: نتایج حاصل از به کار گیری روش RHPSAM برای پیش بینی غلظت اجزا در مخلوطهای سری ارزیابی

شماره	غلظت واقعی (میلی گرم بر لیتر)		طول موج (نانومتر)	معادله رگرسیون	R <sup>2</sup>	غلظت محاسبه شده (میلی گرم بر لیتر)		درصد خطای نسبی	
	آمارانس	پونسیو				آمارانس	پونسیو	آمارانس	پونسیو
۱	۲/۰۰	۱/۰۰	۴۷۵	$y=1/2874C+3/1482$	۰/۹۹۹۵	۱/۹۷	۰/۹۲	-۱/۵۰	-۸/۰۰
			۵۶۰	$y=0/5297C+2/4547$	۰/۹۹۷۲				
۲	۲/۰۰	۲/۰۰	۴۷۵	$y=1/2942C+4/3488$	۰/۹۹۹۴	۱/۹۲	۱/۸۷	-۴/۰۰	-۶/۵۰
			۵۶۰	$y=0/5344C+2/9235$	۰/۹۹۷۷				
۳	۲/۰۰	۵/۰۰	۴۷۵	$y=1/2831C+8/2742$	۰/۹۹۹۶	۲/۰۹	۴/۸۲	۴/۵۰	-۳/۶۰
			۵۶۰	$y=0/5175C+4/5846$	۰/۹۹۹۸				
۴	۲/۰۰	۱۰/۰۰	۴۷۵	$y=1/2956C+14/548$	۰/۹۹۹۸	۱/۹۸	۹/۷۱	-۱/۰۰	-۲/۹۰
			۵۶۰	$y=0/5246C+7/069$	۰/۹۹۸۳				
۵	۵/۰۰	۲/۰۰	۴۷۵	$y=1/2715C+7/2188$	۰/۹۹۹۹	۴/۸۰	۱/۹۰	-۴/۰۰	-۵/۰۰
			۵۶۰	$y=0/5174C+5/7861$	۰/۹۹۹۵				
۶	۵/۰۰	۵/۰۰	۴۷۵	$y=1/2766C+10/995$	۰/۹۹۹۸	۴/۷۵	۴/۸۹	-۵/۰۰	-۲/۲۰
			۵۶۰	$y=0/5203C+7/299$	۰/۹۹۹۷				
۷	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۴۷۵	$y=1/2906C+17/176$	۰/۹۹۹۹	۴/۷۲	۹/۶۶	-۵/۶۰	-۳/۴۰
			۵۶۰	$y=0/5271C+9/803$	۰/۹۹۹۷				
۸	۵/۰۰	۲۰/۰۰	۴۷۵	$y=1/266C+30/246$	۱/۰۰	۴/۹۳	۲۰/۰۰	-۱/۴۰	۰/۰۰
			۵۶۰	$y=0/5123C+15/172$	۱/۰۰				
۹	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۴۷۵	$y=1/2797C+11/071$	۰/۹۹۹۹	۹/۹۸	۰/۸۶	-۰/۲۰	-۱۴/۰۰
			۵۶۰	$y=0/5166C+10/417$	۰/۹۹۹۸				
۱۰	۱۰/۰۰	۲/۰۰	۴۷۵	$y=1/2725C+12/381$	۰/۹۹۹۹	۹/۹۴	۱/۹۳	-۰/۶۰	-۳/۵۰
			۵۶۰	$y=0/5151C+10/925$	۰/۹۹۹۷				
۱۱	۱۰/۰۰	۵/۰۰	۴۷۵	$y=1/2699C+16/243$	۰/۹۹۹۹	۹/۹۶	۴/۹۶	-۰/۴۰	-۰/۸۰
			۵۶۰	$y=0/5137C+12/497$	۰/۹۹۹۷				
۱۲	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۴۷۵	$y=1/2783C+22/471$	۰/۹۹۹۹	۱۰/۰۵	۹/۷۳	۰/۵۰	-۲/۷۰
			۵۶۰	$y=0/5148C+15/049$	۰/۹۹۹۴				
۱۳	۱۰/۰۰	۲۰/۰۰	۴۷۵	$y=1/2709C+35/468$	۱/۰۰	۱۰/۶۰	۱۹/۷۱	۶/۰۰	-۱/۴۵
			۵۶۰	$y=0/5025C+20/345$	۱/۰۰				
۱۴	۲۰/۰۰	۱/۰۰	۴۷۵	$y=1/2466C+21/872$	۰/۹۹۸۴	۲۰/۶۳	۰/۹۹	۳/۱۵	-۱/۰۰

				۰/۹۸۹۷	$y=۰/۴۹C+۲۱/۱۱۸$	۵۶۰			
۱/۵۰	۱/۵۰	۲/۰۳	۲۰/۳	۰/۹۹۷۹	$y=۱/۲۷۰۱C+۲۲/۸۶۱$	۴۷۵	۲/۰۰	۲۰/۰۰	۱۵
				۰/۹۸۹	$y=۰/۵۱۳C+۲۱/۳۲۴$	۵۶۰			
-۰/۲۰	۰/۵۵	۴/۹۹	۲۰/۱۱	۰/۹۹۸	$y=۱/۲۶۹۸C+۲۶/۴۵۴$	۴۷۵	۵/۰۰	۲۰/۰۰	۱۶
				۰/۹۸۸۱	$y=۰/۵۱۳۳C+۲۲/۶۷۳$	۵۶۰			
-۱/۷۰	۱/۵۰	۹/۸۳	۲۰/۳	۰/۹۹۶	$y=۱/۲۸۳۳C+۳۲/۸۳۳$	۴۷۵	۱۰/۰۰	۲۰/۰۰	۱۷
				۰/۹۷۷۹	$y=۰/۵۱۹۷C+۲۵/۳۲۵$	۵۶۰			
-۰/۵۰	۱۸/۷	۱۹/۹	۲۳/۷۴	۱/۰۰	$y=۱/۱۴۲۹C+۴۶/۶۰۱$	۴۷۵	۲۰/۰۰	۲۰/۰۰	۱۸
				۱/۰۰	$y=۰/۳۸۴۲C+۳۱/۴۲۹$	۵۶۰			

جدول ۳-۱۳: نتایج حاصل از به کار گیری روش RHPSAM برای پیش بینی غلظت اجزا در مخلوطهای سری تست

درصد خطای نسبی. %	غلظت محاسبه شده (میلی گرم بر لیتر)			R <sup>2</sup>	معادله رگرسیون	طول موج (نانومتر)	غلظت واقعی (میلی گرم بر لیتر)		شماره
	آمارانس	پونسیو	آمارانس				پونسیو	آمارانس	
	پونسیو	آمارانس	پونسیو	آمارانس			پونسیو	آمارانس	
	آر۴	آر۴	آر۴	آر۴			آر۴	آر۴	
-۰/۶۰	-۵/۶۶	۴/۹۷	۲/۸۳	۰/۹۹۹۸	$y=۱/۱۹۴۶C+۸/۷۶۰۳$	۴۷۵	۵/۰۰	۳/۰۰	۱
				۰/۹۹۹۶	$y=۰/۴۸۰۳C+۵/۲۱۳۵$	۵۶۰			
-۰/۸۰	-۳/۰۰	۱۴/۸۸	۲/۹۱	۱/۰۰	$y=۱/۱۹۸۵C+۲۰/۷۵۶$	۴۷۵	۱۵/۰۰	۳/۰۰	۲
				۱/۰۰	$y=۰/۴۹۶۳C+۱۰/۳۰۴$	۵۶۰			
-۲/۷۱	-۰/۸۳	۶/۸۱	۱۱/۹۰	۱/۰۰	$y=۱/۱۶۲۶C+۱۹/۸۰۲$	۴۷۵	۷/۰۰	۱۲/۰۰	۳
				۱/۰۰	$y=۰/۴۵۳۲C+۱۴/۹۷۵$	۵۶۰			
-۲/۸۵	-۲/۸۵	۶/۸۰	۴/۸۶	۱/۰۰	$y=۱/۲۵۶۲C+۱۳/۳۹۹$	۴۷۵	۷/۰۰	۵/۰۰	۴
				۱/۰۰	$y=۰/۵۱۷۲C+۸/۳۷۴۴$	۵۶۰			
-۰/۲۰	۰/۵۵	۴/۹۹	۲۰/۱۱	۰/۹۹۸	$y=۱/۲۶۹۸C+۲۶/۴۵۴$	۴۷۵	۵/۰۰	۲۰/۰۰	۵
				۰/۹۹۸۱	$y=۰/۵۱۳۳C+۲۲/۶۷۳$	۵۶۰			

### ۳-۱۰- بررسی اثر مزاحمت‌ها در روش افزایش استاندارد نقطه H-نسبی

#### (RHPSAM)

برای بررسی توانایی روش RHPSAM در اندازه‌گیری همزمان آمارانس و پونسیو ۴آر در نمونه‌های حقیقی، اثر مزاحمت گونه‌های مختلف در اندازه‌گیری همزمان آمارانس و پونسیو ۴آر مورد بررسی قرار گرفت. روش کار به این صورت بود که:

میزان جذب محلول ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس یا ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پونسیو ۴آر به ترتیب در طول موج ماکزیمم ۵۲۰ و ۵۰۷ نانومتر در غیاب گونه مزاحم در شرایط بهینه، برای ۵ مرتبه اندازه‌گیری شد و میانگین و انحراف استاندارد برای هر ترکیب محاسبه گردید. محدوده اطمینان با توجه به رابطه  $\bar{A} \pm 3S_A$  به دست آمد. در این رابطه  $\bar{A}$  میانگین سیگنال تجزیه‌ای و  $S_A$  انحراف استاندارد سیگنال تجزیه‌ای برای هر یک از روش‌های اسپکتروفتومتری است. سپس برای بررسی اثر مزاحمت احتمالی هر گونه، گونه مورد نظر با نسبت ۱۰۰۰ برابر وزنی - وزنی به نمونه حاوی آمارانس و پونسیو ۴آر اضافه گردید. سپس مقدار لازم از این محلول به دستگاه اسپکتروفتومتر منتقل شد و مقدار جذب در طول موج ماکزیمم آمارانس و پونسیو ۴آر اندازه‌گیری شد. در صورت وجود سیگنال در محدوده اطمینان ( $\bar{A} \pm 3S_A$ )، گونه مورد بررسی مزاحم در نظر گرفته نشد. در غیر این صورت نسبت وزنی گونه مزاحم به غلظت آمارانس یا پونسیو ۴آر آنقدر کاهش داده شد تا سیگنال تجزیه‌ای در محدوده اطمینان قرار بگیرد. نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۳-۱۴ آورده شده است.



جدول ۳-۱۴: نتایج حاصل از بررسی اثر گونه‌های مزاحم در اندازه‌گیری همزمان آمارانس و پونسیو ۴آر با غلظت‌های یکسان و برابر ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در روش RHPSAM

حد مجاز گونه مزاحم (وزنی-وزنی)	گونه‌های بررسی شده در اندازه‌گیری پونسیو ۴آر	گونه‌های بررسی شده در اندازه‌گیری آمارانس
۱۰۰۰	Ca <sup>2+</sup> , NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Li <sup>+</sup> , Ba <sup>2+</sup> , Al <sup>3+</sup> , Na <sup>+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , Br <sup>-</sup> , F <sup>-</sup> , I <sup>-</sup> , Cl <sup>-</sup> , Cr <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , SCN <sup>-</sup> , EDTA, Citrate	Ca <sup>2+</sup> , NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Li <sup>+</sup> , Ba <sup>2+</sup> , Al <sup>3+</sup> , Na <sup>+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , Br <sup>-</sup> , F <sup>-</sup> , I <sup>-</sup> , Cl <sup>-</sup> , Cr <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , SCN <sup>-</sup> , EDTA, Citrate
۵۰۰	Mg <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>
۲۰۰	Pb <sup>2+</sup>	Pb <sup>2+</sup>
۱۰۰	Ag <sup>+</sup>	Ag <sup>+</sup>
۱	Co <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup> , Cr <sup>3+</sup> , Sn <sup>2+</sup> , Tartrazine, Quinoline Yellow, Brown HT, Carmoisine	Co <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup> , Cr <sup>3+</sup> , Sn <sup>2+</sup> , Tartrazine, Quinoline Yellow, Brown HT, Carmoisine

یون‌های Sn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> و Cr<sup>3+</sup> به جز یون Sn<sup>2+</sup> بقیه از یون‌های فلزات واسطه هستند که اکثر آن‌ها در ناحیه مرئی دارای جذب هستند که یکی از دلایل مزاحمت احتمالی آن‌ها می‌باشد. علاوه بر این یون‌های مذکور می‌توانند با آمارانس و پونسیو ۴آر کمپلکس تشکیل دهند که باعث تغییر جذب آنالیت‌ها می‌گردد. لازم به ذکر است که ساختار آمارانس و پونسیو ۴آر مشابه ترکیب ۱-۲- تیازولیل آزو-۲-نفتل (TAN)<sup>۱</sup> می‌باشد که TAN با یون‌های مذکور کمپلکس تشکیل می‌دهد [۳۸]. تشکیل کمپلکس بین کاتیون‌های مذکور و آمارانس و پونسیو ۴آر احتمالاً از طریق نیتروژن‌های گروه آزو و هیدروکسیل روی حلقه آروماتیک می‌باشد. رنگ‌های خوراکی Tartrazine, Quinoline Yellow, Brown HT و Carmoisine نیز تا برابر و کمتر از یک برابر غلظت آمارانس و پونسیو ۴آر دارای جذب هستند و به‌عنوان مزاحم شناخته شدند.

<sup>۱</sup> 1-(2-thiazolyzalo)-2-naphthol

### ۳-۱۱- حد تشخیص روش RHPSAM

حد تشخیص یک روش، حداقل غلظت یا وزنی از آنالیت است که می‌تواند با سطح اطمینان مشخص آشکارسازی شود. برای محاسبه حد تشخیص از معادله ۳-۳ استفاده شد:

$$LOD = \frac{KS_{bl}}{m} \quad \text{معادله ۳-۳}$$

$S_{bl}$  = انحراف استاندارد سیگنال شاهد

$m$  = شیب منحنی کالیبراسیون

$K$  = ضریب اطمینان

طبق استدلال کیزر، مقدار منطقی و قابل قبول برای این ضریب ثابت، عدد  $K=3/0$  است. به منظور بررسی حد تشخیص روش RHPSAM، ۱۰ اندازه‌گیری تکراری برای شاهد انجام شد و طیف هر محلول در محدوده طول موجی ۳۰۰-۶۵۰ نانومتر ثبت گردید. در این روش از تقسیم سه برابر انحراف استاندارد سیگنال شاهد بر شیب منحنی کالیبراسیون، حد تشخیص به دست آمد. با توجه به تعریف فوق، حد تشخیص روش RHPSAM برای آمارانس و پونسیو ۴آر به ترتیب ۰/۱۴ و ۰/۰۹۶ میلی‌گرم بر لیتر به دست آمد.

### ۳-۱۲- دقت و صحت روش RHPSAM

برای بررسی دقت و صحت روش RHPSAM، محلول‌هایی با غلظت‌های متفاوت از هر دو ایزومر در شرایط بهینه ساخته شد. برای هر یک از مخلوط‌ها ۵ بار اندازه‌گیری تکراری انجام شد و طیف هر مخلوط در محدوده طول موج ۳۰۰-۶۵۰ نانومتر ثبت گردید؛ سپس غلظت آمارانس و پونسیو ۴آر با استفاده از روش RHPSAM تعیین شد. مقادیر انحراف استاندارد در هر حالت محاسبه شد. نتایج حاصل از این بررسی برای RHPSAM در جدول ۳-۱۵ آورده شده است که نشان دهنده دقت و صحت خوب این روش می‌باشد.

جدول ۳-۱۵: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش RHPSAM

شماره مخلوط	آمارانس موجود (میلی گرم بر سلیترا)	پونسیو آر موجود (میلی گرم بر لیتر)	آمارانس اندازه گیری شده (میلی گرم بر لیتر) (n=۵)	پونسیو آر اندازه گیری شده (میلی گرم بر لیتر) (n=۵)	درصد باز یابی آمارانس	درصد باز یابی پونسیو آر
۱	۵/۰۰	۲۰/۰۰	۴/۸۴ (±۰/۲۲) <sup>a</sup>	۱۹/۷۰ (±۰/۳۲) <sup>a</sup>	۹۶/۸ [۱/۶۲] <sup>b</sup>	۹۸/۵ [۲/۱۰] <sup>b</sup>
۲	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰/۰۸ (±۰/۵۴)	۹/۸۱ (±۰/۴۶)	۱۰۰/۸ [۰/۳۳]	۹۸/۱ [۰/۹۲]
۳	۲۰/۰۰	۵/۰۰	۲۰/۰۴ (±۰/۰۷)	۴/۹۶ (±۰/۱۶)	۱۰۰/۲ [۱/۲۸]	۹۹/۲ [۰/۵۶]
۴	۲/۰۰	۲/۰۰	۲/۰۷ (±۰/۰۷)	۱/۹۴ (±۰/۱۹)	۱۰۳/۵ [۲/۲۴]	۹۷/۰ [۰/۷۰]

<sup>a</sup> اعداد داخل پرانتز انحراف استاندارد حاصل از ۵ بار اندازه گیری تکراری است.

<sup>b</sup> اعداد داخل کروشه مقادیر t محاسبه شده را نشان می دهد. (مقدار t بحرانی برای ۴ درجه آزادی در سطح اطمینان ۹۵٪ برابر ۲/۷۸ می باشد).

### ۳-۱۳- کاربرد روش RHPSAM در آنالیز نمونه های حقیقی

به منظور ارزیابی توانایی روش RHPSAM در اندازه گیری همزمان آمارانس و پونسیو آر، اندازه گیری مقادیر ترکیبات ذکر شده در نمونه نوشیدنی سون آپ و نمونه آب شهر شاهرود به عنوان بافت ثابت نمونه ها استفاده شد.

#### ۳-۱۳-۱- کاربرد روش RHPSAM در آنالیز نمونه نوشیدنی

برای تهیه نمونه نوشیدنی به این صورت عمل شد که ابتدا ۵۰/۰۰ میلی لیتر نمونه نوشیدنی سون آپ به همراه ۱۰/۰۰ میلی لیتر محلول ۵۰۰/۰ میلی گرم بر لیتر آمارانس و ۱۰/۰۰ میلی لیتر محلول ۵۰۰/۰ میلی گرم بر لیتر پونسیو آر به یک بشر ۲۵۰/۰ میلی لیتری اضافه شد. سپس محلول تهیه شده به مدت ۴ دقیقه حرارت داده شد تا گاز دی اکسید کربن نوشیدنی خارج شود. محلول فوق به یک بالن حجمی ۱۰۰/۰ میلی لیتری منتقل گردید (انتقال کمی) و با آب مقطر به حجم رسانده شد. محلول ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر پونسیو آر نیز با برداشتن ۲۰/۰۰ میلی لیتر محلول ۱۰۰/۰ میلی گرم بر لیتر پونسیو آر در بالن حجمی

۱۰۰/۰ میلی لیتری تهیه شد. سپس از محلول ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر پونسیو ۴ آر و محلول نمونه تهیه شده، مخلوط‌هایی با غلظت‌های مختلف از آمارانس و پونسیو ۴ آر به همراه ۲/۰۰ میلی لیتر بافر بوراکسی با pH=۱۰/۰۰ به بالن حجمی ۱۰/۰۰ میلی لیتری منتقل و طیف آن‌ها نسبت به شاهد در محدوده طول موج ۳۰۰-۶۵۰ نانومتر ثبت و ذخیره گردید. سپس غلظت آمارانس و پونسیو ۴ آر در مخلوط‌های تهیه شده، با استفاده از روش افزایش استاندارد نقطه H-نسبی مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج حاصل از ۵ بار اندازه‌گیری تکراری برای کاربرد روش RHPSAM در جدول ۳-۱۶ آورده شده

است.

جدول ۳-۱۶: نتایج حاصل از اندازه‌گیری آمارانس و پونسیو ۴ آر در نمونه نوشیدنی سون آپ در روش RHPSAM

شماره مخلوط	مقدار افزوده شده (میلی گرم بر لیتر)		مقدار اندازه‌گیری شده (میلی گرم بر لیتر) (n=۵)		درصد بازیابی (میلی گرم بر لیتر)	
	آمارانس	پونسیو ۴ آر	آمارانس	پونسیو ۴ آر	آمارانس	پونسیو ۴ آر
۱	۰/۰۰	۰/۰۰	< LOD	< LOD	—	—
۲	۵/۰۰	۵/۰۰	۴/۹۴ (±۰/۰۹) <sup>a</sup>	۵/۰۸ (±۰/۲۱) <sup>a</sup>	۱۰۱/۶ [۰/۸۵] <sup>b</sup>	۹۸/۸ [۱/۴۹] <sup>b</sup>
۳	۵/۰۰	۷/۰۰	۷/۰۰ (±۰/۱۵)	۵/۰۹ (±۰/۲۶)	۱۰۱/۸ [۰/۷۷]	۱۰۰/۰ [۰/۰۰]
۴	۵/۰۰	۹/۰۰	۸/۸۵ (±۰/۲۲)	۵/۱۰ (±۰/۲۷)	۹۷/۶ [۰/۸۲]	۹۸/۳ [۱/۵۲]
۵	۵/۰۰	۱۱/۰۰	۱۱/۳۱ (±۰/۹۸)	۴/۷۳ (±۰/۴۴)	۹۴/۶ [۱/۳۷]	۱۰۲/۸ [۰/۷۱]

<sup>a</sup> اعداد داخل پرانتز انحراف استاندارد حاصل از ۵ بار اندازه‌گیری تکراری است.

<sup>b</sup> اعداد داخل کروشه مقادیر t محاسبه شده را نشان می‌دهد. (مقدار t بحرانی برای ۴ درجه آزادی در سطح اطمینان ۹۵٪ برابر ۲/۷۸ می‌باشد).

## ۳-۱۳-۲- کاربرد روش RHPSAM در آنالیز نمونه آب شهر شاهرود

برای تهیه محلول نمونه به این صورت عمل شد که ابتدا ۱۰/۰۰ میلی لیتر محلول ۵۰۰/۰ میلی گرم بر لیتر آمارانس به یک بالن حجمی ۱۰۰/۰ میلی لیتری به همراه ۷۰/۰۰ میلی لیتر آب شهر انتقال داده شد و با آب مقطر به حجم رسانده شد. ۱۰/۰۰ میلی لیتر محلول ۵۰۰/۰ میلی گرم بر لیتر پونسیو ۴ آر به یک بالن حجمی ۱۰۰/۰ میلی لیتری دیگر به همراه ۷۰/۰۰ میلی لیتر آب شهر انتقال داده شد و با آب مقطر به حجم رسانده شد. سپس از این محلول‌ها، مخلوط‌هایی با نسبت‌های غلظتی مختلف از آمارانس و پونسیو ۴ آر به همراه ۲/۰۰ میلی لیتر بافر بوراکسی با  $pH=10/00$  به بالن حجمی ۱۰/۰۰ میلی لیتری منتقل و طیف آن‌ها نسبت به شاهد در محدوده طول موج ۳۰۰-۶۵۰ نانومتر ثبت و ذخیره گردید. سپس غلظت آمارانس و پونسیو ۴ آر در مخلوط‌های تهیه شده، با استفاده از روش افزایش استاندارد نقطه H-نسبی مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج حاصل از ۵ بار اندازه‌گیری تکراری برای کاربرد روش RHPSAM در جدول ۳-۱۷ آورده شده

است.

جدول ۳-۱۷: نتایج حاصل از اندازه‌گیری آمارانس و پونسیو ۴آر در نمونه آب شهر شاهرود در روش RHPSAM

شماره مخلوط	مقدار افزوده شده (میلی گرم بر لیتر)		مقدار اندازه‌گیری شده (میلی گرم بر لیتر) (n=۵)		درصد بازیابی (میلی گرم بر لیتر)	
	آمارانس	پونسیو ۴آر	آمارانس	پونسیو ۴آر	آمارانس	پونسیو ۴آر
۱	۰/۰۰	۰/۰۰	< LOD	< LOD	—	—
۲	۵/۰۰	۵/۰۰	۴/۸۳ (±۰/۱۸) <sup>a</sup>	۵/۲۸ (±۰/۲۸) <sup>a</sup>	۱۰۵/۶ [۲/۲۴] <sup>b</sup>	۹۶/۶ [۲/۱۱] <sup>b</sup>
۳	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰/۲ (±۰/۳)	۴/۹۰ (±۰/۱۷)	۹۸/۲ [۱/۳۱]	۱۰۲/۰ [۱/۴۹]
۴	۱۰/۰۰	۵/۰۰	۵/۰۵ (±۰/۰۵)	۹/۹۷ (±۰/۰۳)	۹۹/۷ [۲/۲۴]	۱۰۱/۰ [۲/۲۴]

<sup>a</sup> اعداد داخل پرانتز انحراف استاندارد حاصل از ۵ بار اندازه‌گیری تکراری است.

<sup>b</sup> اعداد داخل کروشه مقادیر t محاسبه شده را نشان می‌دهد. (مقدار t بحرانی برای ۴ درجه آزادی در سطح اطمینان ۹۵٪ برابر ۲/۷۸ می‌باشد).

### ۳-۱۴- کاربرد روش مرکز ثابت همراه با کم کردن طیف (CC-SS) با آمارانس

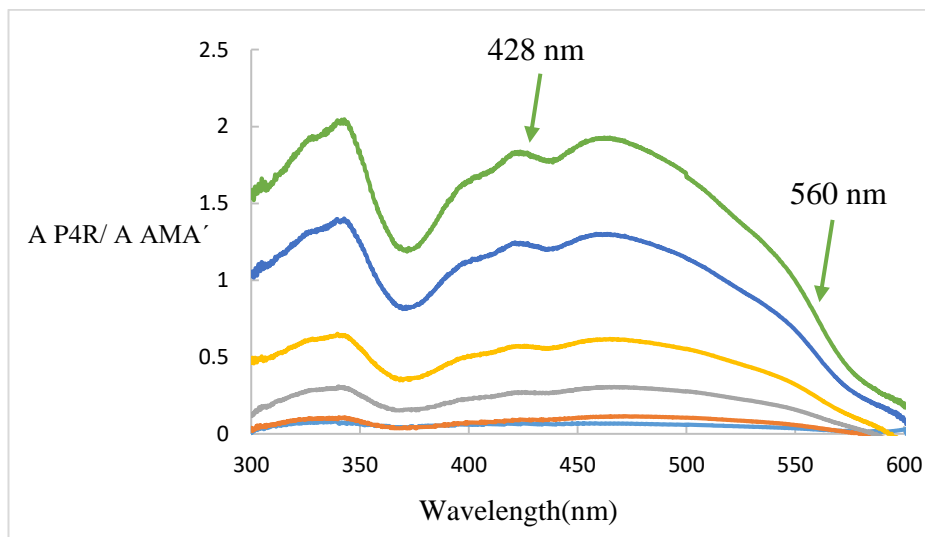
#### به‌عنوان مقسوم‌علیه

روش دوم که برای اندازه‌گیری آمارانس و پونسیو ۴آر استفاده شد، روش مرکز ثابت همراه با کم

کردن طیف (CC-SS) است. ابتدا طیف محلول‌های استاندارد خالص ۱/۰۰، ۲/۰۰، ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰ و

و ۳۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پونسیو ۴آر بر طیف محلول آمارانس با غلظت مشخص ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر

به‌عنوان مقسوم‌علیه تقسیم گردید. (شکل ۳-۱۵).

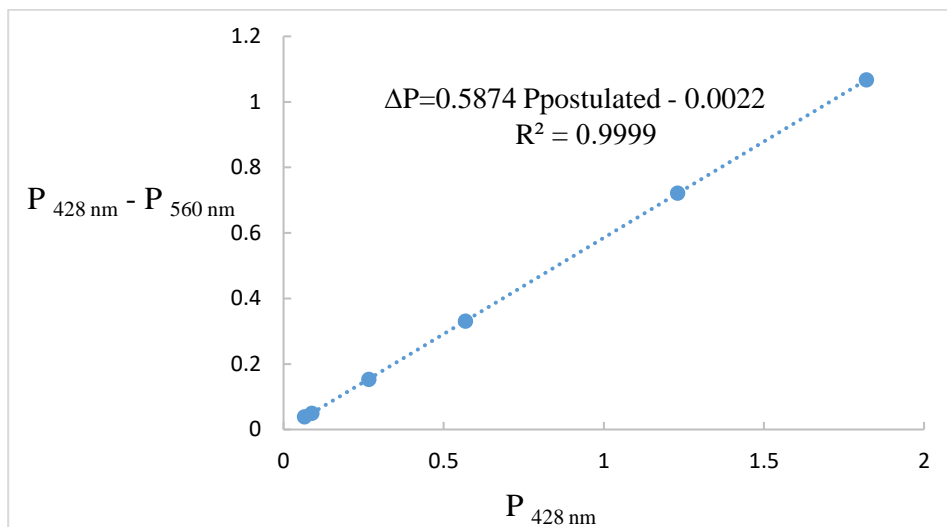


شکل ۳-۱۵: طیف‌های نسبی حاصل از تقسیم محلول‌های استاندارد ۱/۰۰، ۲/۰۰، ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰ و ۳۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پونسو ۴ آر بر طیف ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس به‌عنوان مقسوم‌علیه

سپس طول موج‌های ۴۲۸ و ۵۶۰ نانومتر به‌عنوان طول موج برای اندازه‌گیری دامنه جذب نسبی به‌ترتیب  $P_1$  و  $P_2$  انتخاب گردید. مقدار دامنه‌های نسبی  $P_1$  و  $P_2$  به‌ترتیب در طول موج‌های ۴۲۸ و ۵۶۰ نانومتر برای هر غلظت از پونسو ۴ آر اندازه گرفته شد و از هم کسر گردید و این اختلاف دامنه‌ها  $(\Delta P = P_1 - P_2)$  بر حسب  $P_1$  رسم شد که نتایج در جدول ۳-۱۸ و شکل ۳-۱۶ آورده شده است.

جدول ۳-۱۸: نتایج حاصل از اندازه‌گیری بزرگی دامنه‌ها در طیف‌های نسبی حاصل از شکل ۳-۱۵ در روش CC-SS

اختلاف بزرگی دامنه‌ها ( $\Delta P = P_1 - P_2$ )	بزرگی دامنه در ۵۶۰ نانومتر ( $P_2$ )	بزرگی دامنه در ۴۲۸ نانومتر ( $P_1$ )	غلظت پونسو ۴ آر (میلی‌گرم بر لیتر)
۰/۰۳۸	۰/۰۲۷	۰/۰۶۵	۱/۰۰
۰/۰۴۹	۰/۰۳۹	۰/۰۸۸	۲/۰۰
۰/۱۵۳	۰/۱۱۳	۰/۲۶۶	۵/۰۰
۰/۳۳۰	۰/۲۳۸	۰/۵۶۸	۱۰/۰۰
۰/۷۲۱	۰/۵۰۹	۱/۲۳	۲۰/۰۰
۱/۰۶۷	۰/۷۵۳	۱/۸۲۰	۳۰/۰۰



شکل ۳-۱۶: نمودار حاصل از رسم اختلاف بزرگی دامنه‌های نسبی  $P_1$  و  $P_2$  به ترتیب در طول موج‌های ۴۲۸ و ۵۶۰ نانومتر بر حسب دامنه نسبی  $P_1$  در طول موج ۴۲۸ نانومتر در روش CC-SS

در معادله خط شکل ۳-۱۶،  $\Delta P$  اختلاف دو دامنه در طول موج‌های ۴۲۸ و ۵۶۰ نانومتر

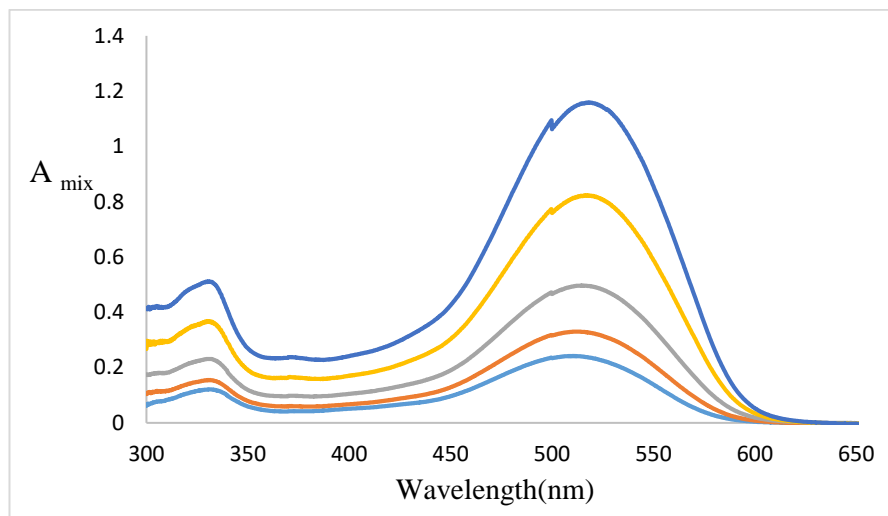
و  $P_{(postulated)}$  مقدار  $P$  پیش‌بینی شده می‌باشد.

در ادامه کار مخلوط‌های ۲/۰۰، ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰ و ۳۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس و ۵/۰۰

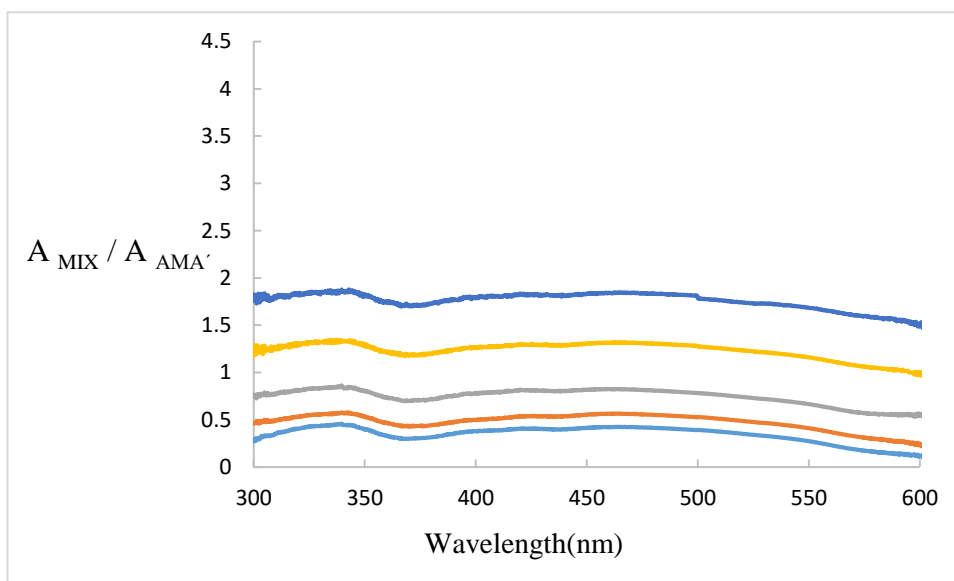
میلی‌گرم بر لیتر پونسیو ۴ آر انتخاب شد (شکل ۳-۱۷). طیف این مخلوط‌ها به همان مقسوم‌علیه قبل (۲۰/۰۰)

میلی‌گرم بر لیتر آمارانس) تقسیم شد که طیف‌های تقسیم شده در شکل ۳-۱۸ آورده شده است.





شکل ۳-۱۷: طیف جذبی مخلوط‌های حاوی ۲/۰۰، ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰ و ۳۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس و ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پونسیو ۴آر در شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر بوراکسی با  $\text{pH}=10.00$



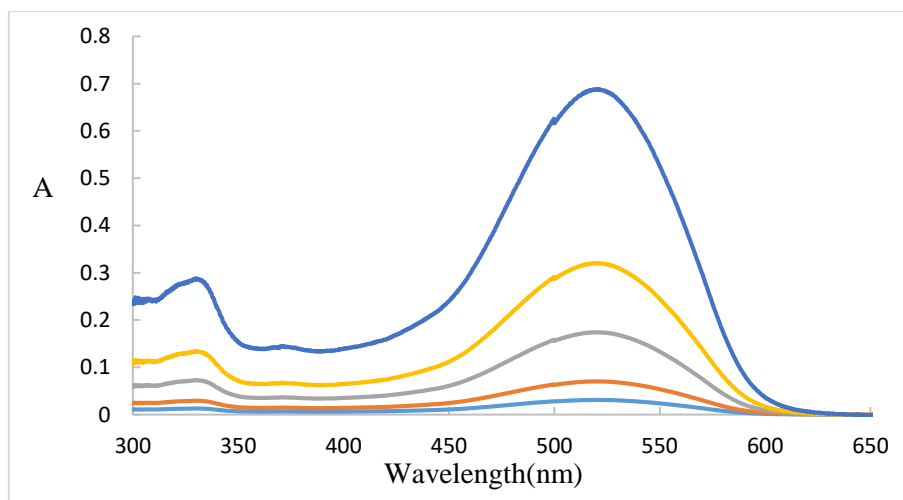
شکل ۳-۱۸: طیف تقسیم شده مخلوط‌های ۲/۰۰، ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰ و ۳۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس و ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پونسیو ۴آر بر طیف محلول ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس به‌عنوان مقسوم‌علیه

سپس دامنه‌های نسبی  $P_1$  ( $P_{\text{recorded}}$ ) و  $P_2$  برای مخلوط‌ها در طول موج‌های ۴۲۸ و ۵۶۰ نانومتر

ثابت و از یکدیگر کسر گردید ( $\Delta P_{\text{mix}}$ ). مقدار  $\Delta P_{\text{mix}}$  برای هر مخلوط در معادله به‌دست آمده در شکل

۳-۱۶ قرار داده شد و مقدار  $P$  پیش‌بینی شده ( $P_{\text{postulated}}$ ) برای هر مخلوط محاسبه گردید. با کسر کردن

مقدار  $P$  پیش‌بینی شده ( $P_{\text{postulated}}$ ) هر مخلوط از دامنه نسبی ثبت شده در طول موج ۴۲۸ نانومتر ( $P_{\text{recorded}}$ )، مقدار ثابت (C.V) برای هر مخلوط محاسبه گردید. با ضرب کردن مقدار ثابت (C.V) به دست آمده برای هر مخلوط در طیف مرتبه صفر ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس به‌عنوان مقسوم‌علیه، طیف مرتبه صفر آمارانس مربوط به هر مخلوط به دست آمد (شکل ۳-۱۹). در نهایت با اندازه‌گیری جذب آن در طول موج ماکزیمم ۵۲۰ نانومتر و قرار دادن در معادله کالیبراسیون مربوط به آمارانس (شکل ۳-۵ الف)، غلظت آمارانس در هر مخلوط به دست آمد.



شکل ۳-۱۹: طیف‌های جذبی مرتبه صفر به دست آمده از ضرب کردن ثابت به دست آمده برای مخلوط‌های ۱۰/۰۰، ۵/۰۰، ۲/۰۰، و ۱/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس و ۲۰/۰۰ و ۳۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پونسیو ۴آر در طیف محلول خالص ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس به‌عنوان مقسوم‌علیه

برای به دست آوردن غلظت پونسیو ۴آر در هر مخلوط، طیف خالص آمارانس به دست آمده از مرحله قبل از طیف مخلوط مجهول مورد نظر کم شد و طیف خالص پونسیو ۴آر برای هر مخلوط به دست آمد که با اندازه‌گیری جذب در طول موج ماکزیمم پونسیو ۴آر (۵۰۷ نانومتر) و قرار دادن آن در معادله کالیبراسیون مربوط به پونسیو ۴آر (شکل ۳-۵ ب) غلظت آن در هر مخلوط به دست آمد.

نتایج حاصل از روش CC-SS برای چند مخلوط انتخاب شده در جدول ۳-۱۹ آورده شده است.

جدول ۳-۱۹: نتایج حاصل از روش CC-SS برای مخلوط‌های انتخاب شده حاوی ۲/۰۰، ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰ و ۳۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس و ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پونسیو آر

درصد خطای نسبی %	غلظت پیش‌بینی شده (میلی‌گرم بر لیتر)		مقدار ثابت (C.V)	مقدار P پیش‌بینی شده (Ppostulated)	اختلاف بزرگی دامنه‌ها در مخلوط ( $\Delta P_{mix}$ )	P <sub>2</sub> (۵۶۰nm)	P <sub>1</sub> (۴۲۸nm)	غلظت واقعی (میلی‌گرم بر لیتر)	
	آمارانس	پونسیو						آمارانس	پونسیو
۲/۶۰	۰/۵۰	۵/۱۳	۲/۰۱	۰/۱۰۳	۰/۳۰۵	۰/۱۷۷	۰/۲۳۱	۵/۰۰	۲/۰۰
۰/۰۰	-۴/۶۰	۵/۰۰	۴/۷۷	۰/۲۴۶	۰/۲۹۲	۰/۱۶۹	۰/۳۶۹	۵/۰۰	۵/۰۰
۳/۴۰	-۲/۴۰	۵/۱۷	۹/۷۶	۰/۴۹۱	۰/۳۱۹	۰/۱۸۵	۰/۶۲۵	۵/۰۰	۱۰/۰۰
۰/۰۰	-۲/۰۰	۵/۰۰	۱۹/۶	۰/۹۹۳	۰/۳۰۲	۰/۱۷۵	۱/۱۲۰	۵/۰۰	۲۰/۰۰
-۵/۲۰	۲/۰۰	۴/۷۴	۳۰/۶	۱/۵۱۷	۰/۳۱۱	۰/۱۸۱	۱/۶۴۷	۵/۰۰	۳۰/۰۰

### ۳-۱۴-۱- محلول‌سازی سری ارزیابی و تست برای روش CC-SS

به‌منظور بهینه‌سازی پارامترها و رسیدن به بهترین صحت در روش‌های به‌کار رفته در این پروژه، محلول‌های سری ارزیابی و سری تست تهیه و طیف آن‌ها نسبت به محلول شاهد در دامنه ۳۰۰-۶۵۰ نانومتر ثبت گردید و مورد بررسی قرار گرفت. محلول‌های سری تست و سری ارزیابی از انتقال مقادیر مختلف این دو ایزومر به‌همراه ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر بوراکسی  $pH=۱۰/۰۰$  به بالن‌های حجمی ۱۰/۰۰ میلی‌لیتری و رقیق کردن آن‌ها تا خط نشانه با آب مقطر تهیه شد. سپس طیف هر محلول نسبت به محلول شاهد در دامنه ۳۰۰-۶۵۰ نانومتر ثبت و ذخیره گردید. محلول شاهد همانند محلول نمونه تهیه شد با این تفاوت که به آن هیچ مقداری از این دو ترکیب اضافه نشد.

ترکیب غلظتی محلول‌های سری ارزیابی و تست به‌ترتیب در جدول‌های ۳-۲۰ و ۳-۲۱ آورده شده

است.

جدول ۳-۲۰: ترکیب غلظتی محلول‌های سری ارزیابی برای روش CC-SS

محلول	غلظت آمارانس (میلی‌گرم بر لیتر)	غلظت پونسیو ۴ (میلی‌گرم بر لیتر)
۱	۱/۰۰	۱/۰۰
۲	۲/۰۰	۱/۰۰
۳	۵/۰۰	۱/۰۰
۴	۱۰/۰۰	۱/۰۰
۵	۲۰/۰۰	۱/۰۰
۶	۳۰/۰۰	۱/۰۰
۷	۱/۰۰	۲/۰۰
۸	۲/۰۰	۲/۰۰
۹	۵/۰۰	۲/۰۰
۱۰	۱۰/۰۰	۲/۰۰
۱۱	۲۰/۰۰	۲/۰۰
۱۲	۳۰/۰۰	۲/۰۰
۱۳	۱/۰۰	۵/۰۰
۱۴	۲/۰۰	۵/۰۰
۱۵	۵/۰۰	۵/۰۰
۱۶	۱۰/۰۰	۵/۰۰
۱۷	۲۰/۰۰	۵/۰۰
۱۸	۳۰/۰۰	۵/۰۰
۱۹	۱/۰۰	۱۰/۰۰
۲۰	۲/۰۰	۱۰/۰۰
۲۱	۵/۰۰	۱۰/۰۰
۲۲	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰
۲۳	۲۰/۰۰	۱۰/۰۰
۲۴	۳۰/۰۰	۱۰/۰۰
۲۵	۲/۰۰	۲۰/۰۰
۲۶	۵/۰۰	۲۰/۰۰
۲۷	۱۰/۰۰	۲۰/۰۰
۲۸	۲۰/۰۰	۲۰/۰۰
۲۹	۳۰/۰۰	۲۰/۰۰

۳۰/۰۰	۵/۰۰	۳۰
۳۰/۰۰	۱۰/۰۰	۳۱
۳۰/۰۰	۲۰/۰۰	۳۲

جدول ۳-۲۱: ترکیب غلظتی محلول‌های سری تست برای روش CC-SS

محلول	غلظت آمارانس (میلی گرم بر لیتر)	غلظت پونسیو آ۴ (میلی گرم بر لیتر)
۱	۵/۰۰	۳/۰۰
۲	۱۵/۰۰	۳/۰۰
۳	۲۵/۰۰	۳/۰۰
۴	۷/۰۰	۱۲/۰۰
۵	۱۲/۰۰	۱۲/۰۰
۶	۲۰/۰۰	۱۲/۰۰
۷	۳/۰۰	۲۵/۰۰
۸	۹/۰۰	۲۵/۰۰
۹	۲۵/۰۰	۲۵/۰۰

### ۳-۱۴-۲- بهینه‌سازی غلظت آمارانس به‌عنوان مقسوم‌علیه در روش CC-SS

برای دستیابی به صحت بالاتر در روش CC-SS با مقسوم‌علیه آمارانس، غلظت‌های متفاوتی از آمارانس انتخاب و به‌عنوان مقسوم‌علیه به‌کار برده شد و طبق روش CC-SS غلظت گونه‌های آمارانس و پونسیو آ۴ در مخلوط‌های سری ارزیابی همانند بخش ۳-۱۴ تعیین گردید. نتایج در جدول ۳-۲۲ آورده شده است.

جدول ۳-۲۲: نتایج حاصل از بهینه‌سازی غلظت آمارانس به‌عنوان مقسوم‌علیه در روش CC-SS برای مخلوط‌های سری ارزیابی در جفت طول موج ۴۲۸ و ۵۶۰ نانومتر

خطا در پیش‌بینی غلظت پونسو آ۴		خطا در پیش‌بینی غلظت آمارانس		غلظت آمارانس به‌عنوان مقسوم‌علیه (میلی‌گرم بر لیتر)
MRE	MSE	MRE	MSE	
۲/۵۹۲	۰/۱۸۷	۳/۱۲۷	۰/۱۲۲	۵/۰۰
۲/۶۱۸	۰/۱۸۱	۳/۰۸۱	۰/۱۴۱	۱۰/۰۰
۳/۵۱۴	۰/۳۴۹	۳/۴۶۶	۰/۰۸۶	۱۵/۰۰
۲/۲۳۷	۰/۲۵۴	۲/۹۹۳	۰/۰۷۷	۲۰/۰۰
۲/۰۸۱	۰/۱۸۸	۳/۱۶۷	۰/۱۳۵	۲۵/۰۰

این نتایج نشان می‌دهد زمانی که غلظت ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس (گونه گسترده‌تر) به‌عنوان مقسوم‌علیه به‌کار برده شد، خطاهای احتمالی کمتری برای پیش‌بینی غلظت هر دو گونه در مخلوط‌های سری ارزیابی به‌دست آمد. لذا غلظت ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس به‌عنوان مقسوم‌علیه بهینه انتخاب و در بررسی‌های بعدی به‌کار برده شد.

### ۳-۱۴-۳- بهینه‌سازی طول موج در روش CC-SS با مقسوم‌علیه آمارانس

برای انتخاب جفت طول موج به گونه‌ای عمل شد که اختلاف تفاوت جذب گونه‌ها ( $\Delta(\Delta A)$ ) در جفت طول موج‌های انتخابی با هم متفاوت باشد (جدول ۳-۲۳).

جدول ۳-۲۳: جفت طول موج‌های انتخابی برای روش CC-SS (محلول‌های با غلظت ۱۰/۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس و پونسیو آ۴ به‌طور جداگانه)

شماره	طول موج (نانومتر)	جذب آمارانس	جذب پونسیو آ۴	$\Delta A$	$\Delta(\Delta A)^*$
۱	۳۶۷	۰/۰۶۶	۰/۰۴۹	۰/۰۱۷	۰/۰۸۴
	۵۶۹	۰/۱۵	۰/۰۴۹	۰/۱۰۱	
۲	۴۲۸	۰/۰۸۲	۰/۰۹۶	۰/۰۱۴	۰/۰۹۲
	۵۶۰	۰/۲۰۳	۰/۰۹۷	۰/۱۰۶	
۳	۴۵۶/۸	۰/۱۳۳	۰/۱۶۳	۰/۰۳	۰/۰۶۲
	۵۵۰/۲	۰/۲۵۴	۰/۱۶۲	۰/۰۹۲	
۴	۴۷۵	۰/۲۰۳	۰/۲۴۷	۰/۰۴۴	۰/۰۶۲
	۵۶۰	۰/۲۰۳	۰/۰۹۷	۰/۱۰۶	
۵	۵۰۰	۰/۲۹۹	۰/۳۳	۰/۰۳۱	۰/۰۳۸
	۵۳۹/۴	۰/۲۹۹	۰/۲۳	۰/۰۶۹	

\*  $\Delta(\Delta A)$  اختلاف جذب ۱۰/۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس و ۱۰/۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پونسیو آ۴ در جفت طول موج‌های انتخاب شده است.

در جفت طول موج‌های انتخابی و غلظت ۲۰/۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس به‌عنوان مقسوم‌علیه، غلظت دو گونه در مخلوط‌های سری ارزیابی همانند بخش ۳-۱۴ محاسبه گردید. خطا در پیش‌بینی غلظت دو گونه در جفت طول موج‌های انتخابی در جدول ۳-۲۴ آورده شده است.

جدول ۳-۲۴: نتایج حاصل از بهینه‌سازی جفت طول موج با غلظت ۲۰/۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از آمارانس به‌عنوان مقسوم‌علیه در روش CC-SS در مخلوط‌های سری ارزیابی

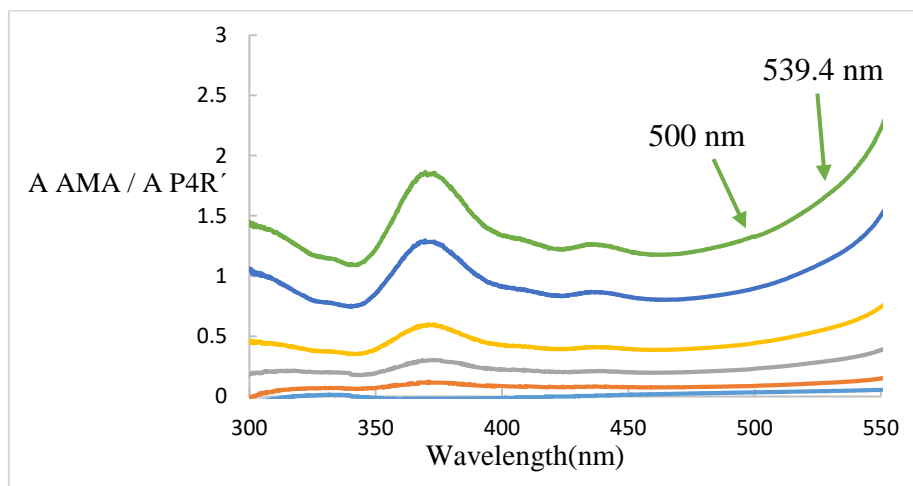
خطا در پیش‌بینی غلظت پونسیو آ۴		خطا در پیش‌بینی غلظت آمارانس		طول موج (نانومتر)
MRE	MSE	MRE	MSE	
۵/۶۰۷	۰/۵۲۲	۲/۴۷۹	۰/۰۸۶۸	۳۶۷ و ۵۶۹
۲/۲۳۷	۰/۲۵۴	۲/۹۹۳	۰/۰۷۷	۴۲۸ و ۵۶۰
۳/۷۳۶	۰/۲۵۱	۳/۲۱۴	۰/۰۸۲۷	۴۵۶/۸ و ۵۵۰/۲
۶/۹۶۴	۰/۴۹۸	۳/۳۶۰	۰/۱۴۵	۴۷۵ و ۵۶۰
۱۱/۱۵۴	۱۳/۱۳۰	۵/۰۷۳	۰/۶۵۵	۵۰۰ و ۵۳۹/۴

نتایج جدول ۳-۲۴ نشان می‌دهد که جفت طول موج ۴۲۸ و ۵۶۰ نانومتر برای پیش‌بینی غلظت دو گونه مناسب هستند. مطابق نتایج جدول ۳-۲۳، در جفت طول موج انتخاب شده (۴۲۸ و ۵۶۰ نانومتر) اختلاف تفاوت جذب گونه‌ها بیشترین مقدار است.

### ۳-۱۵- کاربرد روش مرکز ثابت همراه با کم کردن طیف (CC-SS) با پونسیو ۴آر

#### به‌عنوان مقسوم‌علیه

ابتدا طیف محلول‌های استاندارد خالص ۱/۰۰، ۲/۰۰، ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰ و ۳۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس بر طیف محلول پونسیو ۴آر با غلظت مشخص ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به‌عنوان مقسوم‌علیه تقسیم گردید. (شکل ۳-۲۰)



شکل ۳-۲۰: طیف‌های نسبی حاصل از تقسیم محلول‌های استاندارد ۱/۰۰، ۲/۰۰، ۵/۰۰، ۱۰/۰۰ و ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس بر طیف ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پونسیو ۴آر به‌عنوان مقسوم‌علیه

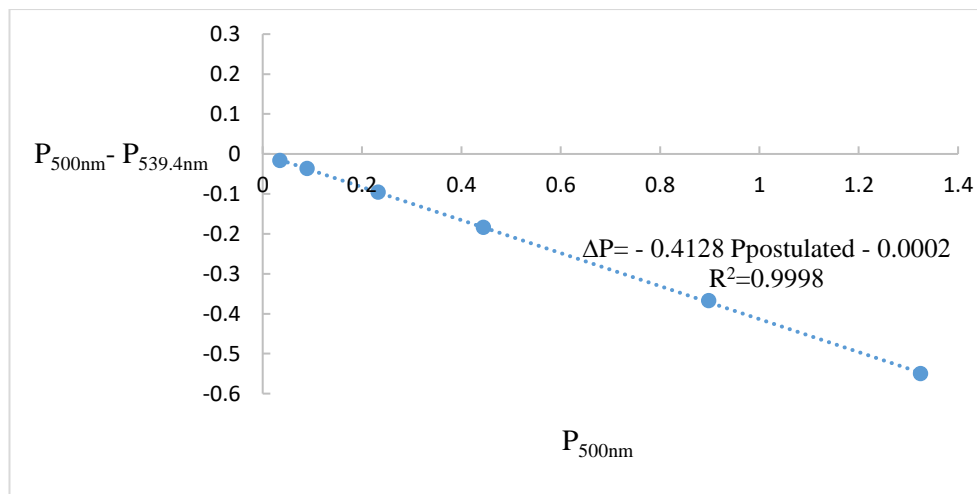
سپس طول موج‌های ۵۰۰ و ۵۳۹/۴ نانومتر به‌عنوان طول موج برای اندازه‌گیری دامنه جذب نسبی به ترتیب  $P_1$  و  $P_2$  انتخاب گردید. مقدار دامنه‌های نسبی  $P_1$  و  $P_2$  به ترتیب در طول موج‌های ۵۰۰ و ۵۳۹/۴



نانومتر برای هر غلظت از آمارانس اندازه گرفته شد و از هم کسر گردید و این اختلاف دامنه‌ها ( $\Delta P = P_1 - P_2$ ) بر حسب  $P_1$  رسم شد که نتایج در جدول ۳-۲۵ و شکل ۳-۲۱ آورده شده است.

جدول ۳-۲۵: نتایج حاصل از اندازه‌گیری بزرگی دامنه‌ها در طیف‌های نسبی حاصل از شکل ۳-۲۰ در روش CC-SS

اختلاف بزرگی دامنه‌ها ( $\Delta P = P_1 - P_2$ )	بزرگی دامنه در ۵۳۹/۴ نانومتر ( $P_2$ )	بزرگی دامنه در ۵۰۰ نانومتر ( $P_1$ )	غلظت آمارانس (میلی گرم بر لیتر)
-۰/۰۱۶	۰/۰۵۰	۰/۰۳۴	۱/۰۰
-۰/۰۳۷	۰/۱۲۶	۰/۰۸۹	۲/۰۰
-۰/۰۹۶	۰/۳۲۷	۰/۲۳۱	۵/۰۰
-۰/۱۸۴	۰/۶۲۸	۰/۴۴۴	۱۰/۰۰
-۰/۳۶۳	۱/۲۶۰	۰/۸۹۷	۲۰/۰۰
-۰/۵۵۰	۱/۸۷۰	۱/۳۲	۳۰/۰۰

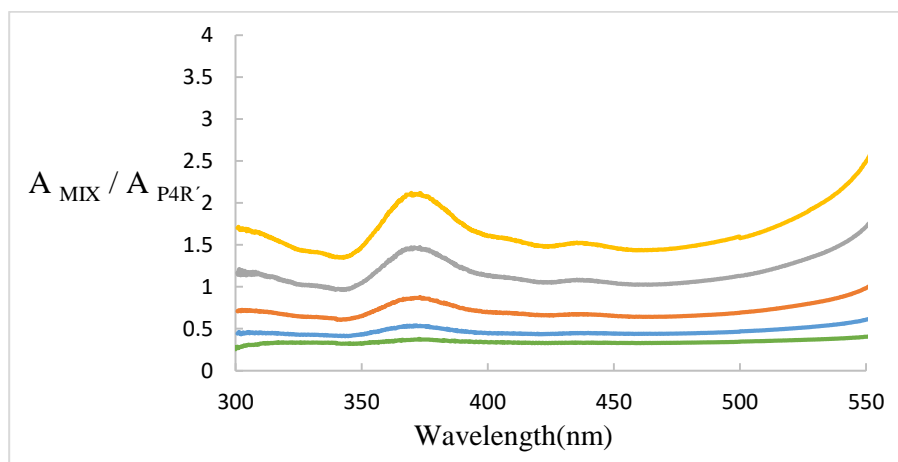


شکل ۳-۲۱: نمودار حاصل از رسم اختلاف بزرگی دامنه‌های نسبی  $P_1$  و  $P_2$  به ترتیب در طول موج‌های ۵۰۰ و ۵۳۹/۴ نانومتر بر حسب دامنه نسبی  $P_1$  در طول موج ۵۰۰ نانومتر در روش CC-SS

در معادله خط شکل ۳-۲۱،  $\Delta P$  اختلاف دو دامنه در طول موج‌های ۵۰۰ و ۵۳۹/۴ نانومتر

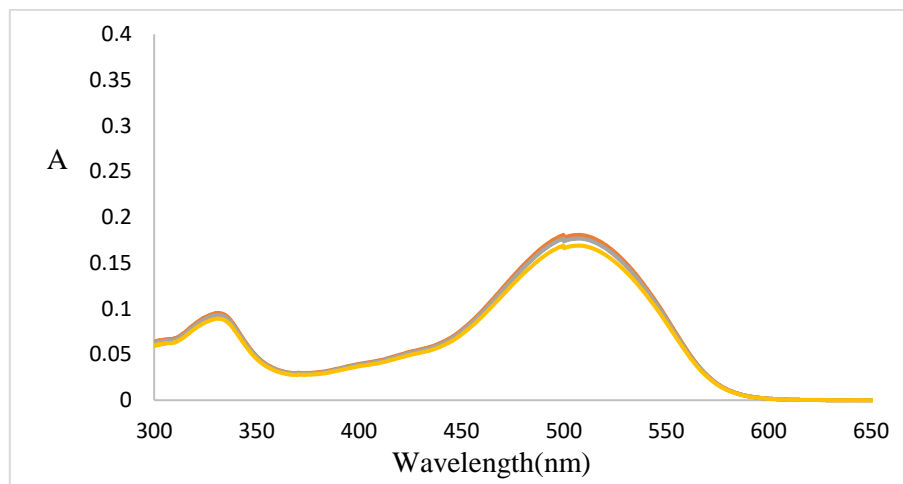
و  $P$  (postulated) مقدار  $P$  پیش‌بینی شده می‌باشد.

در ادامه کار مخلوط‌های ۲/۰۰، ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰ و ۳۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس و ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پونسیو ۴ آر انتخاب شد (شکل ۳-۱۷). طیف این مخلوط‌ها به همان مقسوم‌علیه قبل (۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پونسیو ۴ آر) تقسیم شد که طیف‌های تقسیم شده در شکل ۳-۲۲ آورده شده است.



شکل ۳-۲۲: طیف تقسیم شده مخلوط‌های ۲/۰۰، ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰ و ۳۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس و ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پونسیو ۴ آر بر طیف محلول ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پونسیو ۴ آر به‌عنوان مقسوم‌علیه

سپس دامنه‌های نسبی  $P_1$  ( $P_{\text{recorded}}$ ) و  $P_2$  برای مخلوط‌ها در طول موج‌های ۵۰۰ و ۵۳۹/۴ نانومتر ثبت و از یکدیگر کسر گردید ( $\Delta P_{\text{mix}}$ ). مقدار  $\Delta P_{\text{mix}}$  برای هر مخلوط در معادله به‌دست آمده در شکل ۳-۲۱ قرار داده شد و مقدار  $P$  پیش‌بینی شده ( $P_{\text{postulated}}$ ) برای هر مخلوط محاسبه گردید. با کسر کردن مقدار  $P$  پیش‌بینی شده ( $P_{\text{postulated}}$ ) هر مخلوط از دامنه نسبی ثبت شده در طول موج ۵۰۰ نانومتر ( $P_{\text{recorded}}$ )، مقدار ثابت (C.V) برای هر مخلوط محاسبه گردید. با ضرب کردن مقدار ثابت (C.V) به‌دست آمده برای هر مخلوط در طیف مرتبه صفر ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پونسیو ۴ آر به‌عنوان مقسوم‌علیه، طیف مرتبه صفر پونسیو ۴ آر مربوط به هر مخلوط به‌دست آمد (شکل ۳-۲۳). در نهایت با اندازه‌گیری جذب آن در طول موج ماکزیمم ۵۰۷ نانومتر و قرار دادن در معادله کالیبراسیون مربوط به پونسیو ۴ آر (شکل ۳-۵ ب)، غلظت پونسیو ۴ آر در هر مخلوط به‌دست آمد.



شکل ۳-۲۳: طیف‌های جذبی مرتبه صفر به‌دست آمده از ضرب کردن ثابت به‌دست آمده برای مخلوط‌های ۱۰/۰۰، ۵/۰۰، ۲/۰۰، ۳۰/۰۰ و ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس و ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پونسیو ۴آر در طیف محلول خالص ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پونسیو ۴آر به‌عنوان مقسوم‌علیه

برای به‌دست آوردن غلظت آمارانس در هر مخلوط، طیف خالص پونسیو ۴آر به‌دست آمده از مرحله قبل از طیف مخلوط مجهول مورد نظر کم شد و طیف خالص آمارانس برای هر مخلوط به‌دست آمد که با اندازه‌گیری جذب در طول موج ماکزیمم آمارانس (۵۲۰ نانومتر) و قرار دادن آن در معادله کالیبراسیون مربوط به آمارانس (شکل ۳-۵ الف) غلظت آن در هر مخلوط به‌دست آمد.

نتایج حاصل از روش CC-SS برای چند مخلوط انتخاب شده در جدول ۳-۲۶ آورده شده است.

جدول ۳-۲۶: نتایج حاصل از روش CC-SS برای مخلوط‌های انتخاب شده حاوی ۲/۰۰، ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰ و ۳۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس و ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پونسیو آر۴

درصد خطای نسبی %	غلظت پیش‌بینی شده (میلی‌گرم بر لیتر)		مقدار ثابت (C.V)	مقدار P پیش‌بینی شده (Ppostulated)	اختلاف بزرگی دامنه‌ها در مخلوط ( $\Delta P_{mix}$ )	P <sub>2</sub> (۵۳۹/۴nm)	P <sub>1</sub> (۵۰۰nm)	غلظت واقعی (میلی‌گرم بر لیتر)	
	آمارانس	پونسیو						آمارانس	پونسیو
۳/۶۰	۲/۰۰	۵/۱۸	۱/۹۶	۰/۲۵۹	۰/۰۸۸	-۰/۰۳۷	۰/۳۸۴	۰/۳۴۷	۵/۰۰
۵/۴۰	۱۰/۰۰	۵/۲۷	۴/۴۷	۰/۲۶۳	۰/۲۰۵	-۰/۰۸۵	۰/۵۵۴	۰/۴۶۹	۵/۰۰
۳/۲۰	۲۰/۰۰	۵/۱۶	۹/۷۴	۰/۲۵۸	۰/۴۳۴	-۰/۱۷۹	۰/۸۷۱	۰/۶۹۲	۵/۰۰
-۱/۴۰	۲۰/۰۰	۴/۹۳	۱۹/۵	۰/۲۴۶	۰/۸۸۰	-۰/۳۶۴	۱/۴۹۱	۱/۱۲۷	۵/۰۰
-۱۲/۰	۳۰/۰۰	۴/۴۰	۳۰/۸	۰/۲۲۰	۱/۳۵۷	-۰/۵۶۰	۲/۱۳۸	۱/۵۷۸	۵/۰۰

### ۳-۱۵-۱- بهینه‌سازی غلظت پونسیو آر۴ به‌عنوان مقسوم‌علیه در روش CC-SS

برای دستیابی به صحت بالاتر در روش CC-SS با مقسوم‌علیه پونسیو آر۴ (گونه غیر گسترده‌تر)،

غلظت‌های متفاوتی از پونسیو آر۴ انتخاب و به‌عنوان مقسوم‌علیه به‌کار برده شد و طبق روش CC-SS غلظت

گونه‌های آمارانس و پونسیو آر۴ در مخلوط‌های سری ارزیابی طبق روش آورده شده در قسمت ۳-۱۵ تعیین

گردید. نتایج در جدول ۳-۲۷ آورده شده است.

جدول ۳-۲۷: نتایج حاصل از بهینه‌سازی غلظت پونسیو آر۴ به‌عنوان مقسوم‌علیه در روش CC-SS برای مخلوط‌های سری ارزیابی در جفت طول موج‌های ۵۰۰ و ۵۳۹/۴ نانومتر

خطا در پیش‌بینی غلظت پونسیو آر۴		خطا در پیش‌بینی غلظت آمارانس		غلظت پونسیو آر۴ به‌عنوان مقسوم‌علیه (میلی‌گرم بر لیتر)
MRE	MSE	MRE	MSE	
۴/۹۳۷	۰/۴۹۷	۱۳/۴۵۳	۰/۴۷۱	۵/۰۰
۴/۶۱۸	۰/۴۱۹	۱۰/۳۰۶	۰/۳۴۳	۱۰/۰۰
۴/۴۳۸	۰/۳۴۵	۸/۷۳۸	۰/۲۶۱	۱۵/۰۰
۴/۲۲۴	۰/۱۲۴	۳/۶۱۱	۰/۰۹۳	۲۰/۰۰
۴/۵۴۷	۰/۱۰۷	۶/۱۹۷	۰/۱۲۵	۲۵/۰۰

این نتایج نشان می‌دهد که زمانی که غلظت ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پونسیو ۴ آر به‌عنوان مقسوم‌علیه به‌کار برده شد، کمترین MRE برای پیش‌بینی غلظت آمارانس و پونسیو ۴ آر در مخلوط‌های سری ارزیابی به‌دست آمد. لذا غلظت ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پونسیو ۴ آر به‌عنوان مقسوم‌علیه بهینه انتخاب و در بررسی‌های بعدی به‌کار برده شد.

### ۳-۱۵-۲- بهینه‌سازی طول موج در روش CC-SS با مقسوم‌علیه پونسیو ۴ آر

برای انتخاب جفت طول موج به گونه‌ای عمل شد که اختلاف تفاوت جذب گونه‌ها ( $\Delta(\Delta A)$ ) در

جفت طول موج‌های انتخابی با هم متفاوت باشد (جدول ۳-۲۸).

جدول ۳-۲۸: جفت طول موج‌های انتخابی برای روش CC-SS (محلول‌های با غلظت ۱۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس و پونسیو ۴ آر به‌طور جداگانه)

شماره	طول موج (نانومتر)	جذب آمارانس	جذب پونسیو ۴ آر	$\Delta A$	$\Delta(\Delta A)^*$
۱	۵۱۰	۰/۳۲۵	۰/۳۳۴	۰/۰۰۹	۰/۰۳۷
	۵۲۹/۸	۰/۳۲۵	۰/۲۷۹	۰/۰۴۶	۰/۰۳۷
۲	۴۵۰	۰/۱۱۵	۰/۱۳۸	۰/۰۲۳	۰/۰۸۳
	۵۶۰	۰/۲۰۳	۰/۰۹۷	۰/۱۰۶	۰/۰۸۳
۳	۴۷۵	۰/۲۰۳	۰/۲۴۷	۰/۰۴۴	۰/۰۶۲
	۵۶۰	۰/۲۰۳	۰/۰۹۷	۰/۱۰۶	۰/۰۶۲
۴	۵۰۰	۰/۲۹۹	۰/۳۳	۰/۰۳۱	۰/۰۳۸
	۵۳۹/۴	۰/۲۹۹	۰/۲۳	۰/۰۶۹	۰/۰۳۸
۵	۴۵۵	۰/۱۲۷	۰/۱۵۶	۰/۰۲۹	۰/۰۶۵
	۵۵۱	۰/۲۵۱	۰/۱۵۷	۰/۰۹۴	۰/۰۶۵

\*  $\Delta(\Delta A)$  اختلاف جذب ۱۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس و ۱۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پونسیو ۴ آر در جفت طول موج‌های انتخابی شده است.

در جفت طول موج‌های انتخابی و غلظت ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پونسیو ۴ آر به‌عنوان مقسوم‌علیه،

غلظت دو گونه در مخلوط‌های سری ارزیابی محاسبه گردید. خطا در پیش‌بینی غلظت دو گونه در جفت

طول موج‌های انتخابی در جدول ۳-۲۹ آورده شده است.

جدول ۳-۲۹: نتایج حاصل از بهینه‌سازی جفت طول موج با غلظت ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از پونسیو آ۴ به‌عنوان مقسوم‌علیه در روش CC-SS در مخلوط‌های سری ارزیابی

خطا در پیش‌بینی غلظت پونسیو آ۴		خطا در پیش‌بینی غلظت آمارانس		طول موج (نانومتر)
MRE	MSE	MRE	MSE	
۴/۵۷۶	۰/۱۸۵	۶/۱۲۶	۳/۸۰۶	۵۱۰ و ۵۲۹/۸
۵/۳۴۶	۰/۰۸۶	۶/۳۳۸	۰/۱۴۴	۴۵۰ و ۵۶۰
۴/۱۶۷	۰/۰۴۶	۶/۹۷۲	۰/۰۹۱	۴۷۵ و ۵۶۰
۴/۲۲۴	۰/۱۲۴	۳/۶۱۱	۰/۰۹۳	۵۰۰ و ۵۳۹/۴
۸/۳۳۳	۰/۱۴۷	۱۱/۱۰۵	۳/۸۲۲	۴۵۵ و ۵۵۱

نتایج این جدول نشان می‌دهد که جفت طول موج ۵۰۰ و ۵۳۹/۴ نانومتر برای پیش‌بینی غلظت دو گونه مناسب هستند.

### ۳-۱۶- کاربرد روش مرکز ثابت (CC) برای اندازه‌گیری غلظت آمارانس و پونسیو

#### آ۴

در این روش، در تعیین غلظت آمارانس، برای بهینه‌سازی مقسوم‌علیه زمانی که از آمارانس به‌عنوان مقسوم‌علیه استفاده شد مطابق روش ارائه شده در بخش ۳-۱۴-۲ عمل شد. سپس طول موج مطابق بخش ۳-۱۴-۳ بهینه شد.

در تعیین غلظت پونسیو آ۴، برای بهینه‌سازی مقسوم‌علیه زمانی که از پونسیو آ۴ به‌عنوان مقسوم‌علیه استفاده شد مطابق روش ارائه شده در بخش ۳-۱۵-۱ عمل شد. سپس طول موج مطابق بخش ۳-۱۵-۲ بهینه شد. نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۳-۲۹ آورده شده است.

جدول ۳-۲۹: نتایج حاصل از روش CC برای مخلوط‌های سری ارزیابی

غلظت ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پونسیو آر۴ به‌عنوان مقسوم‌علیه و طول موج ۴۷۵ و ۵۶۰ نانومتر		غلظت ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس به‌عنوان مقسوم‌علیه و طول موج ۳۶۷ و ۵۶۹ نانومتر	
پیش‌بینی غلظت پونسیو آر۴		پیش‌بینی غلظت آمارانس	
MRE	MSE	MRE	MSE
۴/۱۶۷	۰/۰۴۶	۲/۴۷۹	۰/۰۸۶۸

نتایج حاصل از روش CC با نتایج حاصل از روش CC-SS مقایسه شد که در جداول ۳-۳۰ و

۳-۳۱ آورده شده است.

جدول ۳-۳۰: نتایج حاصل از روش CC-SS با غلظت ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس به‌عنوان مقسوم‌علیه و جفت طول موج ۴۲۸ و ۵۶۰ نانومتر برای مخلوط‌های سری ارزیابی

خطا در پیش‌بینی غلظت پونسیو آر۴		خطا در پیش‌بینی غلظت آمارانس		طول موج (نانومتر)
MRE	MSE	MRE	MSE	
۲/۲۳۷	۰/۲۵۴	۲/۹۹۳	۰/۰۷۷	۴۲۸ و ۵۶۰

جدول ۳-۳۱: نتایج حاصل از روش CC-SS با غلظت ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پونسیو آر۴ به‌عنوان مقسوم‌علیه و جفت طول موج ۵۰۰ و ۵۳۹/۴ نانومتر برای مخلوط‌های سری ارزیابی

خطا در پیش‌بینی غلظت پونسیو آر۴		خطا در پیش‌بینی غلظت آمارانس		طول موج (نانومتر)
MRE	MSE	MRE	MSE	
۴/۲۲۴	۰/۱۲۴	۳/۶۱۱	۰/۰۹۳	۵۳۹/۴ و ۵۰۰

با مقایسه نتایج حاصل شده در شرایط بهینه برای تعیین غلظت آمارانس و پونسیو ۴ در مخلوط آن‌ها به وسیله سه روش (الف) CC-SS با آمارانس به عنوان مقسوم علیه (جدول ۳-۳۰)، (ب) CC-SS با پونسیو ۴ به عنوان مقسوم علیه (جدول ۳-۳۱) و (ج) CC (جدول ۳-۲۹)، می‌توان گفت روش CC-SS با آمارانس به عنوان مقسوم علیه برای پیش‌بینی غلظت در مخلوط‌های سری ارزیابی مناسب‌تر است. به عبارت دیگر زمانی که مقسوم علیه گونه با طیف گسترده‌تر باشد روش با صحت بیشتری غلظت گونه‌ها را در مخلوط پیش‌بینی می‌کند. بنابراین آمارانس با غلظت بهینه ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به عنوان مقسوم علیه بهینه در محاسبات بعدی استفاده شد. برای انتخاب طول موج نیز از طول موج‌هایی استفاده شد که اختلاف تفاوت جذب دو گونه در آن جفت طول موج بیشتر باشد که در جدول‌های ۳-۲۳ و ۳-۲۴ آورده شده است. در نتیجه برای استفاده از روش CC-SS مقسوم علیه از جنس گونه گسترده‌تر و طول موج‌هایی با بیشترین اختلاف تفاوت جذب دو گونه مورد استفاده قرار گرفت. بنابراین طول موج ۴۲۸-۵۶۰ به عنوان طول موج بهینه در محاسبات بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج حاصل از به کار بردن روش CC-SS برای پیش‌بینی غلظت آمارانس و پونسیو ۴ موجود در محلول‌های سری ارزیابی و تست، به ترتیب در جدول ۳-۳۲ و ۳-۳۳ آورده شده است. لازم به ذکر است که در به دست آوردن غلظت محلول‌های سری ارزیابی و تست، غلظت ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس به عنوان مقسوم علیه بهینه و جفت طول موج‌های ۴۲۸ و ۵۶۰ نانومتر به عنوان جفت طول موج بهینه به کار برده شد.



جدول ۳-۳۲: نتایج حاصل از روش CC-SS در پیش‌بینی غلظت دو گونه در مخلوط‌های سری ارزیابی

خطای نسبی (%)		غلظت پیش‌بینی شده (میلی گرم بر لیتر)		غلظت واقعی (میلی گرم بر لیتر)		محلول
پونسیو آر	آمارانس	پونسیو آر	آمارانس	پونسیو آر	آمارانس	
۸/۰۰	۵/۰۰	۱/۰۸	۱/۰۵	۱/۰۰	۱/۰۰	۱
-۱/۰۰	-۱/۰۰	۰/۹۹	۱/۹۸	۱/۰۰	۲/۰۰	۲
۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۱	۵/۰۵	۱/۰۰	۵/۰۰	۳
۴/۰۰	-۱/۹۰	۱/۰۴	۹/۸۱	۱/۰۰	۱۰/۰۰	۴
۹/۰۰	۲/۹۵	۱/۰۹	۲۰/۵۹	۱/۰۰	۲۰/۰۰	۵
-۱۰/۰۰	۰/۳۳	۰/۹۰	۳۰/۱۰	۱/۰۰	۳۰/۰۰	۶
-۰/۵۰	۵/۰۰	۱/۹۹	۱/۰۵	۲/۰۰	۱/۰۰	۷
۷/۰۰	-۰/۵۰	۲/۱۴	۱/۹۹	۲/۰۰	۲/۰۰	۸
-۳/۵	۱/۸۰	۱/۹۳	۵/۰۹	۲/۰۰	۵/۰۰	۹
۵/۵۰	-۱/۰۰	۲/۱۱	۹/۹۰	۲/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰
۹/۵۰	۱/۵۰	۲/۱۹	۲۰/۳۰	۲/۰۰	۲۰/۰۰	۱۱
-۲/۰۰	-۰/۳۳	۱/۹۶	۲۹/۹۱	۲/۰۰	۳۰/۰۰	۱۲
-۰/۲	۸/۰۰	۴/۹۹	۱/۰۸	۵/۰۰	۱/۰۰	۱۳
۲/۶۰	۰/۵۰	۵/۱۳	۲/۰۱	۵/۰۰	۲/۰۰	۱۴
۰/۰۰	-۴/۶۰	۵/۰۰	۴/۷۷	۵/۰۰	۵/۰۰	۱۵
۳/۴۰	-۲/۴۰	۵/۱۷	۹/۷۶	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۱۶
۰/۰۰	-۲/۰۰	۵/۰۰	۱۹/۶۰	۵/۰۰	۲۰/۰۰	۱۷
-۵/۲۰	۲/۱۰	۴/۷۴	۳۰/۶۳	۵/۰۰	۳۰/۰۰	۱۸
۰/۷۰	۱۲/۰۰	۱۰/۰۷	۱/۱۲	۱۰/۰۰	۱/۰۰	۱۹
۰/۳۰	-۱/۵۰	۱۰/۰۳	۱/۹۷	۱۰/۰۰	۲/۰۰	۲۰
-۲/۰۰	-۲/۴۰	۹/۸۰	۴/۸۸	۱۰/۰۰	۵/۰۰	۲۱
-۰/۱۰	-۲/۰۰	۹/۹۹	۹/۸۰	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۲۲
-۲/۳۰	-۲/۰۰	۹/۷۷	۱۹/۶۰	۱۰/۰۰	۲۰/۰۰	۲۳
-۶/۹۰	۰/۱۳	۹/۳۱	۳۰/۰۴	۱۰/۰۰	۳۰/۰۰	۲۴
-۰/۴۰	-۵/۵۰	۱۹/۹۲	۱/۸۹	۲۰/۰۰	۲/۰۰	۲۵
-۲/۰۰	۰/۸۰	۱۹/۶۰	۵/۰۴	۲۰/۰۰	۵/۰۰	۲۶
-۱/۲۰	-۰/۴۰	۱۹/۷۶	۹/۹۶	۲۰/۰۰	۱۰/۰۰	۲۷
۳/۵۰	۱/۴۵	۱۹/۳۰	۲۰/۲۹	۲۰/۰۰	۲۰/۰۰	۲۸
-۱۰/۴	-۰/۶۶	۱۷/۹۲	۲۹/۸۰	۲۰/۰۰	۳۰/۰۰	۲۹
-۱/۶۶	۰/۶۰	۲۹/۵۰	۵/۰۳	۳۰/۰۰	۵/۰۰	۳۰

۳۱	۱۰/۰۰	۳۰/۰۰	۱۰/۲۰	۲۹/۱۹	۲/۰۰	-۲/۷۰
۳۲	۲۰/۰۰	۳۰/۰۰	۱۹/۵۱	۲۷/۹۵	-۲/۴۵	-۶/۸۳

جدول ۳-۳: نتایج حاصل از روش CC-SS در پیش‌بینی غلظت دو گونه در مخلوط‌های سری تست

محلول	غلظت واقعی (میلی گرم بر لیتر)		غلظت پیش‌بینی شده (میلی گرم بر لیتر)		خطای نسبی (%)	
	آمارانس	پونسیو ۴آر	آمارانس	پونسیو ۴آر	آمارانس	پونسیو ۴آر
۱	۵/۰۰	۳/۰۰	۵/۰۳	۲/۹۰	۰/۶۰	-۳/۳۳
۲	۱۵/۰۰	۳/۰۰	۱۵/۳۰	۲/۷۰	۲/۰۰	-۱۰/۰۰
۳	۲۵/۰۰	۳/۰۰	۲۵/۱۱	۲/۷۱	۰/۴۴	-۹/۶۶
۴	۷/۰۰	۱۲/۰۰	۷/۱۰	۱۲/۰۲	۱/۴۲	۰/۱۶
۵	۱۲/۰۰	۱۲/۰۰	۱۱/۸۹	۱۲/۰۴	-۰/۹۱	۰/۳۳
۶	۲۰/۰۰	۱۲/۰۰	۱۹/۷۰	۱۱/۸۲	-۱/۵۰	-۱/۵۰
۷	۳/۰۰	۲۵/۰۰	۲/۹۳	۲۴/۹۵	-۲/۳۳	-۰/۲۰
۸	۹/۰۰	۲۵/۰۰	۸/۸۹	۲۴/۹۴	-۱/۲۲	-۰/۲۴
۹	۲۵/۰۰	۲۵/۰۰	۲۴/۷۲	۲۳/۱۷	-۱/۱۲	-۷/۳۲
<b>MRE</b>	—	—	—	—	۱/۲۵۹	۳/۵۷
<b>MSE</b>	—	—	—	—	۰/۳۵۳	۰/۳۵۹۲

مقادیر MRE به‌دست آمده برای مخلوط‌های سری تست (جدول ۳-۳) نشان می‌دهد که روش

CC-SS دارای صحت خوبی برای پیش‌بینی غلظت دو گونه در مخلوط‌ها می‌باشد.

لازم به‌ذکر است جهت بررسی بیشتر روش مرکز ثابت جهت انتخاب طول موج و مقسوم‌علیه، از این

روش برای تعیین مقدار کتکول<sup>۱</sup> و هیدروکینون<sup>۲</sup> در مخلوط‌های دوتایی آن‌ها استفاده شد. در اینجا نیز طول

موج‌ها به گونه ای انتخاب شدند که اختلاف تفاوت جذب گونه‌ها در جفت طول موج انتخابی بیشترین مقدار

۱ Catechol

۲ Hydroquinone

باشد و از گونه گسترده‌تر به عنوان مقسوم‌علیه استفاده شد. نتایج به‌دست آمده نتایج حاصل از انتخاب طول موج و مقسوم‌علیه به روش مرکز ثابت در تعیین مقدار آمارانس و پونسیو ۴ آر را تایید کرد.

### ۳-۱۷- بررسی اثر مزاحمت‌ها در روش مرکز ثابت همراه با کم کردن طیف (CC-SS)

برای بررسی توانایی روش CC-SS در اندازه‌گیری همزمان آمارانس و پونسیو ۴ آر در نمونه‌های حقیقی، اثر مزاحمت گونه‌های مختلف در اندازه‌گیری همزمان آمارانس و پونسیو ۴ آر مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار به این صورت بود که:

میزان جذب محلول ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس یا ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر پونسیو ۴ آر به ترتیب در طول موج ماکزیمم ۵۲۰ و ۵۰۷ نانومتر در غیاب گونه مزاحم در شرایط بهینه، برای ۵ مرتبه اندازه‌گیری شد و میانگین و انحراف استاندارد برای هر ترکیب محاسبه گردید. محدوده اطمینان با توجه به رابطه  $\bar{A} \pm 3S_A$  به‌دست آمد. در این رابطه  $\bar{A}$  میانگین سیگنال تجزیه‌ای و  $S_A$  انحراف استاندارد سیگنال تجزیه‌ای برای هر یک از روش‌های اسپکتروفتومتری است. سپس برای بررسی اثر مزاحمت احتمالی هر گونه، گونه مورد نظر با نسبت ۱۰۰۰ برابر وزنی - وزنی به نمونه حاوی آمارانس و پونسیو ۴ آر اضافه گردید. سپس مقدار لازم از این محلول به دستگاه اسپکتروفتومتر منتقل شد و مقدار جذب در طول موج ماکزیمم آمارانس و پونسیو ۴ آر اندازه‌گیری شد. در صورت وجود سیگنال در محدوده اطمینان ( $\bar{A} \pm 3S_A$ )، گونه مورد بررسی مزاحم در نظر گرفته نشد. در غیر این صورت نسبت وزنی گونه مزاحم به غلظت آمارانس یا پونسیو ۴ آر آنقدر کاهش داده شد تا سیگنال تجزیه‌ای در محدوده اطمینان قرار بگیرد. نتایج حاصل از این بررسی در

جدول ۳-۳ آورده شده است.

جدول ۳-۳: نتایج حاصل از بررسی اثر گونه‌های مزاحم در اندازه‌گیری همزمان آمارانس و پونسیو ۴آر با غلظت‌های یکسان و برابر ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در روش CC-SS

حد مجاز گونه مزاحم (وزنی- وزنی)	گونه‌های بررسی شده در اندازه‌گیری پونسیو ۴آر	گونه‌های بررسی شده در اندازه‌گیری آمارانس
۱۰۰۰	Ca <sup>2+</sup> , NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Li <sup>+</sup> , Ba <sup>2+</sup> , Al <sup>3+</sup> , Na <sup>+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , Br <sup>-</sup> , F <sup>-</sup> , I <sup>-</sup> , Cl <sup>-</sup> , Cr <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , SCN <sup>-</sup> , EDTA, Citrate	Ca <sup>2+</sup> , NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Li <sup>+</sup> , Ba <sup>2+</sup> , Al <sup>3+</sup> , Na <sup>+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , Br <sup>-</sup> , F <sup>-</sup> , I <sup>-</sup> , Cl <sup>-</sup> , Cr <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , SCN <sup>-</sup> , EDTA, Citrate
۵۰۰	Mg <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>
۲۰۰	Pb <sup>2+</sup>	Pb <sup>2+</sup>
۱۰۰	Ag <sup>+</sup>	Ag <sup>+</sup>
۱	Co <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup> , Cr <sup>3+</sup> , Sn <sup>2+</sup> , Tartrazine, Quinoline Yellow, Brown HT, Carmoisine	Co <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup> , Cr <sup>3+</sup> , Sn <sup>2+</sup> , Tartrazine, Quinoline Yellow, Brown HT, Carmoisine

یون‌های Sn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> و Cr<sup>3+</sup> به جز یون Sn<sup>2+</sup> بقیه از یون‌های فلزات واسطه هستند که اکثر آن‌ها در ناحیه مرئی دارای جذب هستند که یکی از دلایل مزاحمت احتمالی آن‌ها می‌باشد. علاوه بر این یون‌های مذکور می‌توانند با آمارانس و پونسیو ۴آر کمپلکس تشکیل دهند که باعث تغییر جذب آنالیت‌ها می‌گردد. لازم به ذکر است که ساختار آمارانس و پونسیو ۴آر مشابه ترکیب ۱- (۲-تiazolylazo)-۲-naphthol (TAN)<sup>۱</sup> می‌باشد که TAN با یون‌های مذکور کمپلکس تشکیل می‌دهد [۳۸]. تشکیل کمپلکس بین کاتیون‌های مذکور و آمارانس و پونسیو ۴آر احتمالاً از طریق نیتروژن‌های گروه آزو و هیدروکسیل روی حلقه آروماتیک می‌باشد. رنگ‌های خوراکی Tartrazine, Quinoline Yellow, Brown HT و Carmoisine نیز تا برابر و کمتر از یک برابر غلظت آمارانس و پونسیو ۴آر دارای جذب هستند و به‌عنوان مزاحم شناخته شدند.

<sup>۱</sup> 1-(2-thiazolylazo)-2-naphthol

### ۳-۱۸- حد تشخیص روش CC-SS

حد تشخیص یک روش، حداقل غلظت یا وزنی از آنالیت است که می‌تواند با سطح اطمینان مشخص آشکارسازی شود. برای محاسبه حد تشخیص از معادله ۳-۳ استفاده شد.

به‌منظور بررسی حد تشخیص روش CC-SS، ۱۰ اندازه‌گیری تکراری برای شاهد انجام شد و طیف هر محلول در محدوده طول موجی ۶۵۰-۳۰۰ نانومتر ثبت گردید. در این روش‌ها از تقسیم سه برابر انحراف استاندارد سیگنال شاهد بر شیب منحنی کالیبراسیون، حد تشخیص به‌دست آمد. با توجه به تعریف فوق، حد تشخیص تجربی روش CC-SS برای آمارانس و پونسیو ۴ به ترتیب ۰/۰۸۰ و ۰/۰۶۳ میلی‌گرم بر لیتر به‌دست آمد.

### ۳-۱۹- دقت و صحت روش CC-SS

برای بررسی دقت و صحت روش CC-SS، محلول‌هایی با غلظت‌های متفاوت از هر دو ایزومر در شرایط بهینه ساخته شد. برای هر یک از مخلوط‌ها ۵ بار اندازه‌گیری تکراری انجام شد و طیف هر مخلوط در محدوده طول موج ۶۵۰-۳۰۰ نانومتر ثبت گردید؛ سپس غلظت آمارانس و پونسیو ۴ با استفاده از روش CC-SS تعیین شد. مقادیر انحراف استاندارد در هر حالت محاسبه شد. نتایج حاصل از این بررسی برای روش CC-SS در جدول ۳-۳ آورده شده است که نشان دهنده دقت و صحت خوب این روش می‌باشد.

جدول ۳-۳۵: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش CC-SS

شماره مخلوط	آمارانس موجود (میلی گرم بر لیتر)	پونسیو آر۴ موجود (میلی گرم بر لیتر)	آمارانس اندازه‌گیری شده (میلی گرم بر لیتر) (n=۵)	پونسیو آر۴ اندازه‌گیری شده (میلی گرم بر لیتر) (n=۵)	درصد بازایی آمارانس	درصد بازایی پونسیو آر۴
۱	۲/۰۰	۱/۰۰	۱/۹۹ (±۰/۰۳۶) <sup>a</sup>	۰/۹۸ (±۰/۰۴۳) <sup>a</sup>	۹۹/۵ [۰/۶۲] <sup>b</sup>	۹۸/۰ [۱/۰۴] <sup>b</sup>
۲	۲۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۹/۷ (±۰/۴۰)	۱۰/۰۴ (±۰/۲۵)	۹۸/۵ [۱/۶۸]	۱۰۰/۴ [۰/۳۵]
۳	۳۰/۰۰	۲/۰۰	۲۹/۹ (±۰/۱۱)	۱/۹۳ (±۰/۱۴)	۹۹/۶ [۲/۰۳]	۹۶/۵ [۱/۱۲]
۴	۵/۰۰	۱/۰۰	۵/۰۴ (±۰/۰۳۶)	۱/۰۰ (±۰/۰۴۱)	۱۰۰/۸ [۲/۴۸]	۱۰۰/۰ [۰/۰۰]
۵	۲/۰۰	۲۰/۰۰	۲/۰۵ (±۰/۵۸)	۱۹/۹۰ (±۰/۴۷)	۱۰۲/۵ [۰/۱۹]	۹۹/۵ [۰/۴۷]

<sup>a</sup> اعداد داخل پرانتز انحراف استاندارد حاصل از ۵ بار اندازه‌گیری تکراری است.

<sup>b</sup> اعداد داخل کروشه مقادیر t محاسبه شده را نشان می‌دهد. (مقدار t بحرانی برای ۴ درجه آزادی در سطح اطمینان ۹۵٪ برابر ۲/۷۸ می‌باشد).

### ۳-۲۰-۳ کاربرد روش CC-SS در آنالیز نمونه‌های حقیقی

به‌منظور ارزیابی توانایی روش CC-SS در اندازه‌گیری همزمان آمارانس و پونسیو آر۴، اندازه‌گیری

مقادیر ترکیبات ذکر شده در نمونه نوشیدنی سون آپ و نمونه آب شهر شاهرود به‌عنوان بافت ثابت نمونه‌ها

استفاده شد.

### ۳-۲۰-۱ کاربرد روش CC-SS در آنالیز نمونه نوشیدنی

برای تهیه نمونه نوشیدنی به این صورت عمل شد که ابتدا ۵۰/۰۰ میلی‌لیتر نمونه نوشیدنی سون

آپ به‌همراه ۱۰/۰۰ میلی‌لیتر محلول ۵۰۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس و ۱۰/۰۰ میلی‌لیتر محلول ۵۰۰/۰

میلی‌گرم بر لیتر پونسیو آر۴ به یک بشر ۲۵۰/۰ میلی‌لیتری اضافه شد. سپس محلول تهیه شده به مدت ۴

دقیقه حرارت داده شد تا گاز دی اکسید کربن نوشیدنی خارج شود. محلول فوق به یک بالن حجمی ۱۰۰/۰ میلی لیتری منتقل گردید (انتقال کمی) و با آب مقطر به حجم رسانده شد. محلول ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر پونسو ۴ آر نیز با برداشتن ۲۰/۰۰ میلی لیتر محلول ۱۰۰/۰ میلی گرم بر لیتر پونسو ۴ آر در بالن حجمی ۱۰۰/۰ میلی لیتری تهیه شد. سپس از محلول ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر پونسو ۴ آر و محلول نمونه تهیه شده، مخلوط‌هایی با غلظت‌های مختلف از آمارانس و پونسو ۴ آر به همراه ۲/۰۰ میلی لیتر بافر بوراکسی با pH=۱۰/۰۰ به بالن حجمی ۱۰/۰۰ میلی لیتری منتقل و طیف آن‌ها نسبت به شاهد در محدوده طول موج ۳۰۰-۶۵۰ نانومتر ثبت و ذخیره گردید. سپس غلظت آمارانس و پونسو ۴ آر در مخلوط‌های تهیه شده، با استفاده از روش مرکز ثابت همراه با کم کردن طیف مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج حاصل از ۵ بار اندازه‌گیری تکراری برای کاربرد روش CC-SS در جدول ۳-۳۶ آورده شده

است.

جدول ۳-۳۶: نتایج حاصل از اندازه‌گیری آمارانس و پونسو ۴ آر در نمونه نوشیدنی سون آپ در روش CC-SS

شماره مخلوط	مقدار افزوده شده (میلی گرم بر لیتر)		مقدار اندازه‌گیری شده (میلی گرم بر لیتر) (n=۵)		درصد بازیابی (میلی گرم بر لیتر)	
	آمارانس	پونسو ۴ آر	آمارانس	پونسو ۴ آر	آمارانس	پونسو ۴ آر
۱	۰/۰۰	۰/۰۰	< LOD	< LOD	—	—
۲	۵/۰۰	۵/۰۰	۵/۰۱ (±۰/۱۰) <sup>a</sup>	۵/۰۹ (±۰/۱۱) <sup>a</sup>	۱۰۰/۲ [۰/۲۲] <sup>b</sup>	۱۰۱/۸ [۱/۸۳] <sup>b</sup>
۳	۵/۰۰	۷/۰۰	۴/۹۶ (±۰/۰۷)	۷/۰۴ (±۰/۱۲)	۹۹/۲ [۱/۲۸]	۱۰۰/۵ [۰/۷۴]
۴	۵/۰۰	۹/۰۰	۴/۸۸ (±۰/۱۱)	۹/۰۲ (±۰/۱۸)	۹۷/۶ [۲/۴۴]	۱۰۰/۲ [۰/۲۴]
۵	۵/۰۰	۱۱/۰۰	۴/۸۰ (±۰/۲۰)	۱۱/۰۹ (±۰/۱۸)	۹۶/۰ [۲/۲۴]	۱۰۰/۸ [۱/۱۲]
۶	۵/۰۰	۱۳/۰۰	۴/۸۵ (±۰/۱۳)	۱۳/۰۸ (±۰/۱۷)	۹۷/۰ [۲/۵۸]	۱۰۰/۹ [۱/۰۵]

<sup>a</sup> اعداد داخل پرانتز انحراف استاندارد حاصل از ۵ بار اندازه‌گیری تکراری است.

<sup>b</sup> اعداد داخل کروشه مقادیر t محاسبه شده را نشان می‌دهد. (مقدار t بحرانی برای ۴ درجه آزادی در سطح اطمینان ۹۵٪ برابر ۲/۷۸ می‌باشد).

نتایج حاصل از جدول ۳-۳۶ نشان می‌دهد که می‌توان غلظت آمارانس و پونسیو ۴ آر را به‌طور همزمان با روش CC-SS در نمونه نوشیدنی سون آپ با دقت و صحت خوبی تعیین کرد.

### ۳-۲۰-۲- کاربرد روش CC-SS در آنالیز نمونه آب شهر شاهرود

برای تهیه محلول نمونه به این صورت عمل شد که ابتدا ۱۰/۰۰ میلی‌لیتر محلول ۵۰۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر آمارانس به یک بالن حجمی ۱۰۰/۰ میلی‌لیتری به‌همراه ۷۰/۰۰ میلی‌لیتر آب شهر انتقال داده شد و با آب مقطر به حجم رسانده شد. ۱۰/۰۰ میلی‌لیتر محلول ۵۰۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر پونسیو ۴ آر به یک بالن حجمی ۱۰۰/۰ میلی‌لیتری دیگر به‌همراه ۷۰/۰۰ میلی‌لیتر آب شهر انتقال داده شد و با آب مقطر به حجم رسانده شد. سپس از این محلول‌ها، مخلوط‌هایی با نسبت‌های غلظتی مختلف از آمارانس و پونسیو ۴ آر به‌همراه ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر بوراکسی با  $\text{pH}=10/00$  به بالن حجمی ۱۰/۰۰ میلی‌لیتری منتقل و طیف آن‌ها نسبت به شاهد در محدوده طول موج ۳۰۰-۶۵۰ نانومتر ثبت و ذخیره گردید. سپس غلظت آمارانس و پونسیو ۴ آر در مخلوط‌های تهیه شده، با استفاده از روش روش مرکز ثابت همراه با کم کردن طیف مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج حاصل از ۵ بار اندازه‌گیری تکراری برای کاربرد روش CC-SS در جدول ۳-۳۷ آورده شده

است.



جدول ۳-۳۷: نتایج حاصل از اندازه‌گیری آمارانس و پونسیو آ۴ در نمونه آب شهر شاهرود در روش CC-SS

شماره مخلوط	مقدار افزوده شده (میلی‌گرم بر لیتر)		مقدار اندازه‌گیری شده (میلی‌گرم بر لیتر) (n=۵)		درصد بازیابی (میلی‌گرم بر لیتر)	
	آمارانس	پونسیو آ۴	آمارانس	پونسیو آ۴	آمارانس	پونسیو آ۴
۱	۰/۰۰	۰/۰۰	< LOD	< LOD	—	—
۲	۵/۰۰	۵/۰۰	۵/۱۱ (±۰/۱۶) <sup>a</sup>	۵/۰۶ (±۰/۰۸) <sup>a</sup>	۱۰۱/۲ [۱/۶۸] <sup>b</sup>	۱۰۲/۲ [۱/۵۴] <sup>b</sup>
۳	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۵/۰۱ (±۰/۰۵)	۱۰/۰۳ (±۰/۰۸)	۱۰۰/۳ [۰/۸۴]	۱۰۰/۳ [۰/۴۴]
۴	۵/۰۰	۱۵/۰۰	۴/۹۵ (±۰/۰۸)	۱۵/۱۰ (±۰/۱۰)	۱۰۰/۶ [۲/۲۴]	۹۹/۰ [۱/۴۰]
۵	۱۰/۰۰	۵/۰۰	۱۰/۰۶ (±۰/۱۰)	۴/۸۸ (±۰/۱۹)	۹۷/۶ [۱/۴۱]	۱۰۰/۶ [۱/۳۴]
۶	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۹/۸۹ (±۰/۱۱)	۱۰/۰۹ (±۰/۰۸)	۱۰۰/۹ [۲/۵۲]	۹۸/۹ [۲/۲۴]

<sup>a</sup> اعداد داخل پرانتز انحراف استاندارد حاصل از ۵ بار اندازه‌گیری تکراری است.

<sup>b</sup> اعداد داخل کروشه مقادیر t محاسبه شده را نشان می‌دهد. (مقدار t بحرانی برای ۴ درجه آزادی در سطح اطمینان ۹۵٪ برابر ۲/۷۸ می‌باشد.)

نتایج حاصل از جدول ۳-۳۷ نشان می‌دهد که می‌توان غلظت آمارانس و پونسیو آ۴ را به‌طور

همزمان با روش CC-SS در نمونه آب شهر با دقت و صحت خوبی تعیین کرد.

## ۴- بحث و نتیجه‌گیری

#### ۴-۱- اندازه‌گیری همزمان آمارانس و پونسیو ۴آر در مخلوط دوتایی آن‌ها با استفاده

#### از روش‌های اسپکتروفتومتری

#### ۴-۱-۱- بررسی و بهینه‌سازی پارامترهای تجربی

اثر pH در ناحیه ۴/۰۰-۱۱/۰۰ برای مخلوط آمارانس و پونسیو ۴آر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۲-۳ و شکل ۲-۳ نشان می‌دهد که جذب و طول موج ماکزیمم جذب برای آمارانس و پونسیو ۴آر در طول موج‌های به ترتیب ۵۲۰ و ۵۰۷ نانومتر در ناحیه ۴/۰۰-۱۱/۰۰ pH ثابت بوده و تغییرات محسوسی ندارد. در pHهای کمتر از ۱۰/۰۰ اختلاف طول موج آمارانس و پونسیو ۴آر در زمانی که جذب صفر می‌شود، کمتر است. در pH=۱۱/۰۰ طول موج ماکزیمم هر دو گونه مذکور عوض شد و حساسیت کم گردید. در pH=۱۰/۰۰ اختلاف طول موج که جذب دو گونه صفر می‌شود بیشتر شد که در شکل ۳-۳ برای دو pH نشان داده شده است. لذا جهت افزایش حساسیت و اختلاف بیشتر طول موج‌ها در زمان صفر شدن جذب هر دو گونه، pH=۱۰/۰۰ به عنوان pH بهینه انتخاب گردید.

اثر نوع بافر بر جذب آمارانس و پونسیو ۴آر توسط بافرهای فسفات و بوراکسی با pH=۱۰/۰۰ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۳-۳ نشان داد که سیگنال تجزیه‌ای در حضور بافر فسفات و بافر بوراکسی با pH=۱۰/۰۰ یکسان است. جهت کاهش خطاهای احتمالی بافر بوراکسی استفاده شد.

اثر قدرت یونی بر حساسیت، در شرایط بهینه و با استفاده از پتاسیم کلرید در محدوده‌ی ۰/۰۰ تا ۰/۵۰ مولار مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۳-۵ و شکل ۳-۵ نشان می‌دهند که قدرت یونی تأثیری بر میزان سیگنال تجزیه‌ای آمارانس و پونسیو ۴آر و حساسیت روش‌ها ندارد.

#### ۴-۱-۲- ارقام شایستگی روش‌ها

بررسی‌ها نشان داد که رابطه خطی بین سیگنال اندازه‌گیری شده و غلظت محاسبه شده برای هر دو ترکیب آمارانس و پونسیو ۴آر در مخلوط‌ها در روش CC-SS در محدوده غلظتی ۲۰-۳۰ میلی‌گرم بر لیتر و در روش RHPSAM نیز برای هر دو گونه در محدوده غلظتی ۲۰-۲ میلی‌گرم بر لیتر است. نتایج حاصل از پیش‌بینی غلظت آمارانس و پونسیو ۴آر برای محلول‌های سری تست در روش‌های CC-SS و RHPSAM به ترتیب در جدول‌های ۳-۳۳ و ۳-۱۳ آورده شده است.

#### ۴-۱-۳- ارزیابی آماری روش‌ها

چهار پارامتر آماری برای ارزیابی و بررسی توانایی روش‌های CC-SS و RHPSAM در پیش‌بینی غلظت آمارانس و پونسیو ۴آر محاسبه گردید.

اولین پارامتر آماری ضریب هم‌بستگی ( $R^2$ )<sup>۱</sup> است که میزان هم‌بستگی غلظت‌های پیش‌بینی شده توسط روش (مدل) و غلظت‌های واقعی را نشان می‌دهد که نشان دهنده میزان برازش داده‌ها بر روی خط راست برای هر جز می‌باشد. مقدار  $R^2$  از معادله ۴-۱ محاسبه شد.

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (C_i - \hat{C}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (C_i - \bar{C}_i)^2} \quad \text{معادله ۴-۱}$$

دومین پارامتر آماری خطای مطلق میانگین (MAE)<sup>۲</sup> است که از معادله ۴-۲ محاسبه شد.

$$MAE = \frac{\sum_{i=1}^n |C_i - \hat{C}_i|}{n} \quad \text{معادله ۴-۲}$$

---

<sup>۱</sup> Correlation coefficient

<sup>۲</sup> Mean Absolute Error

پارامتر آماری سوم، میانگین مربع خطا (MSE) است. برای محاسبه MSE از معادله ۱-۳ استفاده

شد.

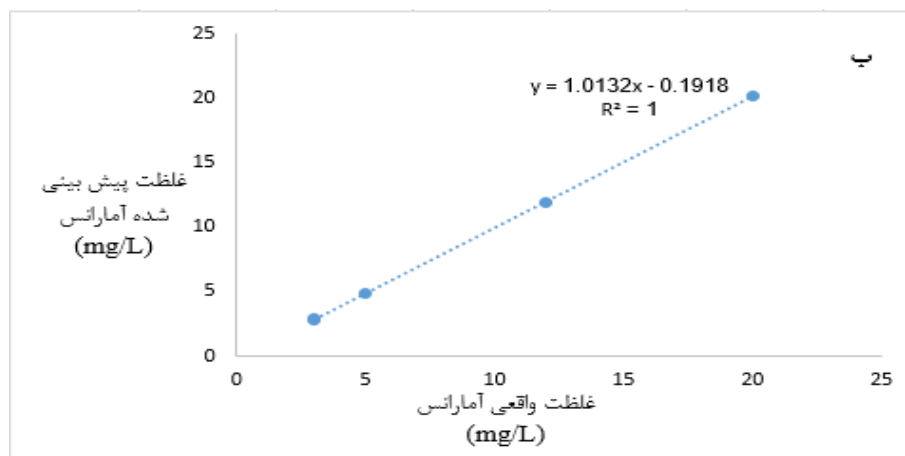
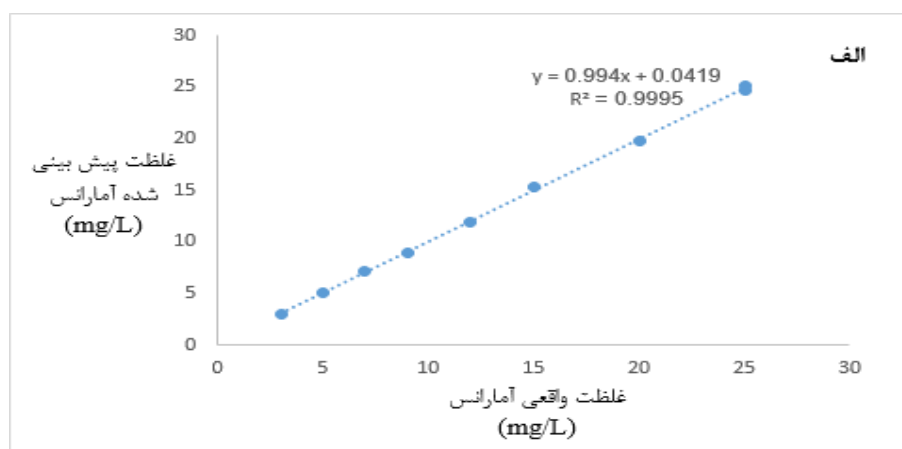
پارامتر آماری چهارم، میانگین خطای نسبی (MRE) است که از معادله ۲-۳ محاسبه شد.

در روابط فوق  $C_i$  غلظت واقعی گونه مورد نظر در نمونه  $i$  ام،  $\hat{C}_i$  غلظت پیش‌بینی شده گونه مورد

نظر در نمونه  $i$  ام،  $\bar{C}_i$  میانگین غلظت واقعی در سری تست است.  $n$  تعداد محلول‌های سری تست است.

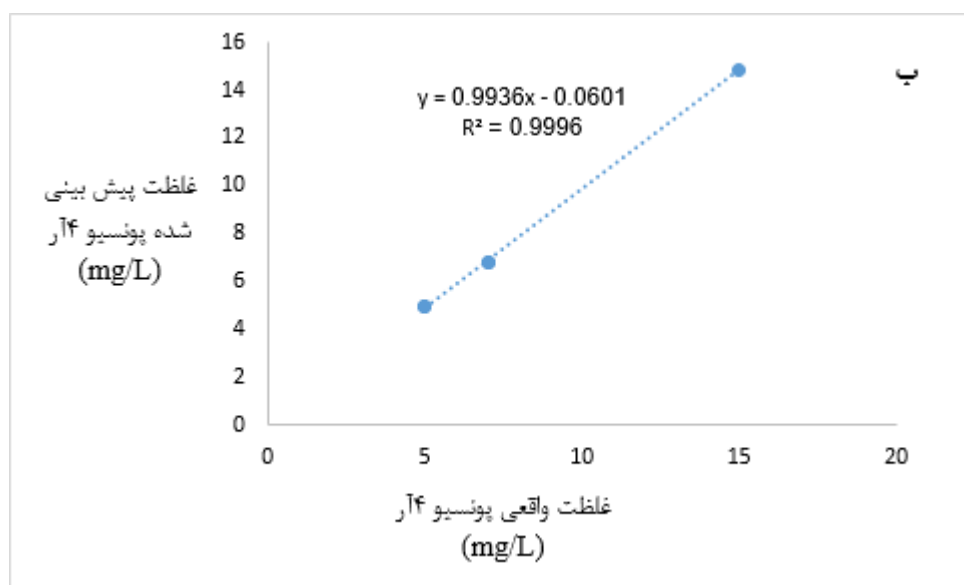
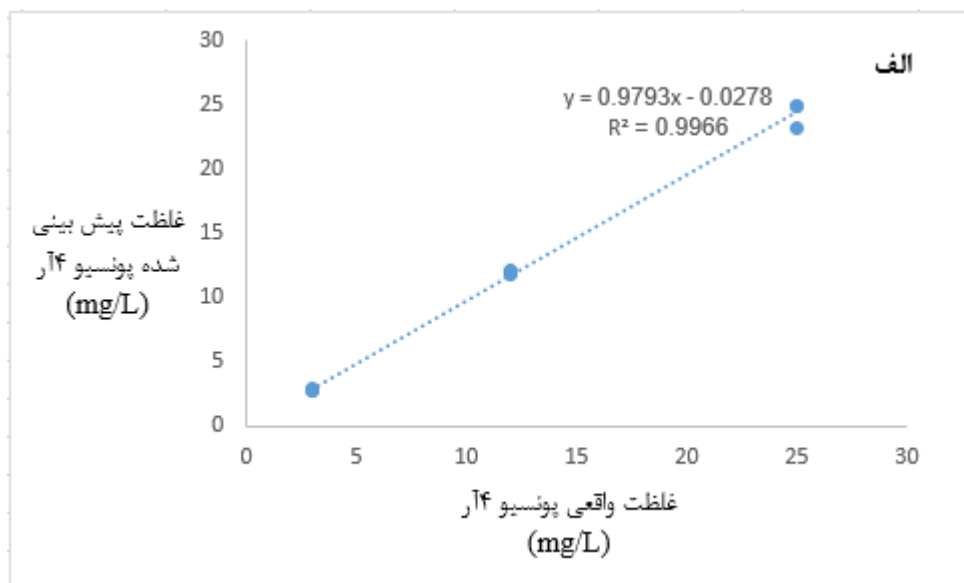
برای روش‌های CC-SS و RHPSAM نمودار غلظت پیش‌بینی شده برحسب غلظت واقعی برای

آمارانس و پونسیو ۴ آر به ترتیب در شکل ۱-۴ و شکل ۲-۴ آورده شده است.



شکل ۱-۴: نمایش میزان همبستگی غلظت‌های پیش‌بینی شده و غلظت‌های واقعی آمارانس در مخلوط‌های سری تست، الف: در روش

CC-SS ب: در روش RHPSAM



شکل ۴-۲: نمایش میزان همبستگی غلظت‌های پیش‌بینی شده و غلظت‌های واقعی پونسیو ۴آر در مخلوط‌های سری تست، الف: در روش CC-SS ب: در روش RHPSAM

ضریب همبستگی مشاهده شده بین مقادیر پیش‌بینی شده و مقادیر واقعی نشان دهنده میزان نزدیکی غلظت پیش‌بینی شده توسط روش‌ها نسبت به مقدار واقعی آن است. همچنین برای ارزیابی و بررسی توانایی روش‌های مذکور در اندازه‌گیری همزمان آماری و پونسیو ۴آر مقادیر MAE، MSE، MRE و  $R^2$

به ترتیب در جدول ۴-۱ و جدول ۴-۲ آورده شده است.

جدول ۴-۱: پارامترهای آماری محاسبه شده آمارانس در مخلوط‌های سری تست برای روش‌های CC-SS و RHPSAM

پارامتر آماری	CC-SS	RHPSAM
R <sup>2</sup>	۰/۹۹۹۵	۱/۰۰
MAE	۰/۱۵۴۷	۰/۱۱۹۷
MSE	۰/۰۳۵۳	۰/۰۱۵۰
MRE	۱/۲۵۹	۲/۴۶۷

جدول ۴-۲: پارامترهای آماری محاسبه شده پونسیو ۴آر در مخلوط‌های سری تست برای روش‌های CC-SS و RHPSAM

پارامتر آماری	CC-SS	RHPSAM
R <sup>2</sup>	۰/۹۹۶۶	۰/۹۹۹۶
MAE	۰/۳۱۶۱	۰/۱۰۵۷
MSE	۰/۳۹۵۲	۰/۰۱۷۱
MRE	۳/۵۷	۱/۳۶۴۶

#### ۴-۱-۴- گزینش پذیری روش

اثر مزاحمت گونه‌های مزاحم در اندازه‌گیری محلول ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر آمارانس و ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر پونسیو ۴آر در روش‌های CC-SS و RHPSAM به ترتیب در جدول‌های ۳-۳۴ و ۳-۱۴ نشان می‌دهند که اکثر کاتیون‌ها و آنیون‌ها در این روش مزاحمتی ندارند و روش‌های پیشنهادی از گزینش پذیری خوبی برخوردار هستند.

#### ۴-۱-۵- کاربرد روش

کارایی روش‌های CC-SS و RHPSAM در اندازه‌گیری همزمان آمارانس و پونسیو ۴آر با تجزیه

نمونه حقیقی نوشیدنی سون آپ و نمونه آب شهر شاهرود مورد بررسی قرار گرفت. مقادیر درصد بازیابی و انحراف استانداردها برای روش‌های CC-SS و RHPSAM در نمونه نوشیدنی سون آپ به ترتیب در جدول‌های ۳-۳۶ و ۳-۱۶ و در نمونه آب شهر به ترتیب در جدول‌های ۳-۳۷ و ۳-۱۷ برای مخلوط دوتایی آمارانس و پونسیو ۴آر نشان دهنده دقت و صحت خوب این روش‌ها در اندازه‌گیری همزمان این دو ایزومر در نمونه‌هایی با بافت پیچیده است. بنابراین می‌توان این روش‌ها را در اندازه‌گیری همزمان آمارانس و پونسیو ۴آر در مخلوط‌های دوتایی آن‌ها در نمونه نوشیدنی سون آپ و نمونه آب با موفقیت به کار برد.

#### ۴-۱-۶- مقایسه روش‌های پیشنهادی با برخی از روش‌های موجود

در این کار، روش‌های اسپکتروفتومتری جدید و ساده برای تعیین همزمان آمارانس و پونسیو ۴آر در مخلوط‌های دوتایی آن‌ها به کار برده شد. روش‌های پیشنهادی دقیق و صحیح‌اند و نیازی به مراحل اولیه جداسازی و دستگاه‌های پیچیده ندارند. این روش‌ها نسبت به روش‌های مشتقی ساده‌تر هستند زیرا مشکلاتی از جمله کاهش دامنه با افزایش مرتبه مشتق‌گیری را ندارند. روش‌های اسپکتروفتومتری جدید نسبت به روش‌های ولتامتری مشکلاتی از جمله زمان طولانی برای تمیزکردن الکتروود را ندارند. همچنین این روش‌ها نسبت به روش‌های کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا نیاز به تجهیزات گران قیمت و خرید حلال‌های گران قیمت ندارند. در جدول ۴-۳ مقایسه بین روش‌های اندازه‌گیری آمارانس و پونسیو ۴آر آورده شده است.



جدول ۳-۴: مقایسه بین روش‌های اندازه‌گیری آمارانس و پونسیو ۴آر

حد تشخیص		دامنه خطی		روش اندازه‌گیری
پونسیو ۴آر	آمارانس	پونسیو ۴آر	آمارانس	
۰/۵ µg/mL	۱ µg/mL	۱-۴۰ µg/mL	۲-۴۰ µg/mL	روش کروماتوگرافی یونی با عملکرد بالا [۱۴]
۰/۸۵ mg/L	۰/۶۱ mg/L	۴-۲۰۰ mg/L	۴-۲۰۰ mg/L	روش الکتروفورز کاپیلاری ناحیه‌ای [۲۲]
۴ ng	۳ ng	۰/۴۰-۴۰ µg/mL	۰/۴۰-۴۰ µg/mL	روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا مجهز به آشکارسازهای آرایه دیودی و طیف‌سنجی جرمی [۱۶]
۰/۳ µg/mL	۰/۲ µg/mL	۰/۳-۶۰۰ µg/mL	۰/۲-۵۰۰ µg/mL	روش الکتروفورز موئینه با آشکارساز فلئورسانس [۱۷]
۰/۱۷ mg/L	۰/۰۹۵ mg/L	۰/۵-۶ mg/L	۰/۲-۸ mg/L	روش‌های اسپکتروفتومتری و با استفاده از روش‌های کمومتریکس [۸]
۰/۰۱۵ ng/mL	۰/۰۱۷ ng/mL	۰/۰۵-۳۰۰ ng/mL	۰/۰۵-۳۰۰ ng/mL	روش میکرواستخراج فاز مایع پخشی با استفاده از مایع یونی [۱۸]
۳۶ nmol/L	۲ nmol/L	$4 \times 10^{-6} - 8 \times 10^{-8}$ mol/L	$4 \times 10^{-6} - 6 \times 10^{-8}$ mol/L	روش الکتروشیمی و استفاده از الکتروود خمیر گرافیتی [۹]
۰/۰۰۷-۰/۰۹۶ mg/Kg	۰/۰۰۷-۰/۰۹۶ mg/Kg	۰/۱-۱۰ mg/L	۰/۱-۱۰ mg/L	روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا مجهز به آشکارسازهای آرایه دیودی و طیف‌سنجی جرمی متوالی [۲۰]

$1 \times 10^{-9}$ mol/L	$5 \times 10^{-10}$ mol/L	$8 \times 10^{-9} - 1 \times 10^{-6}$ mol/L	$5 \times 10^{-9} - 5 \times 10^{-7}$ mol/L	روش الکتروشیمی و استفاده از الکتروود اصلاح شده [۲۱]
۰/۰۶۳ mg/L	۰/۰۸۰ mg/L	۲-۳۰ mg/L	۲-۳۰ mg/L	روش اسپکتروفوتومتری جدید مرکز ثابت همراه با کم کردن طیف (تحقیق حاضر)
۰/۰۹۶ mg/L	۰/۱۴ mg/L	۲-۲۰ mg/L	۲-۲۰ mg/L	روش اسپکتروفوتومتری جدید افزایش استاندارد نقطه H-نسبی (تحقیق حاضر)

برای اندازه‌گیری آمارانس و پونسیو ۴آر، روش‌های به‌کار برده شده در این پروژه (CC-SS) و RHPSAM در مقایسه با روش اسپکتروفوتومتری و استفاده از روش‌های کمومتریکس، دارای گستره خطی و حد تشخیص قابل مقایسه‌ای می‌باشند.

لازم به‌ذکر است تلاش‌های زیادی انجام شد تا با روش توسعه یافته تفاضل نسبی (EXRSM)<sup>۱</sup>، روش کم کردن نسبی همزمان (SRSM)<sup>۲</sup> و روش کم کردن نسبی همزمان همراه با ضرب کردن مقدار ثابت (SRS-CM)<sup>۳</sup> غلظت گونه‌های آمارانس و پونسیو ۴آر در مخلوط‌ها تعیین گردد که به علت همپوشانی طیفی شدید، تعیین غلظت گونه‌های مذکور در مخلوط آن‌ها با سه روش فوق امکان‌پذیر نشد. بنابراین با توجه به روش‌های به‌کار برده شده برای تعیین غلظت آمارانس و پونسیو ۴آر در مخلوط آن‌ها، می‌توان نتیجه گرفت زمانی که طیف دو گونه همپوشانی طیفی شدیدی دارند می‌توان از روش‌های RHPSAM و CC-SS برای

<sup>۱</sup> Extended ratio subtraction method

<sup>۲</sup> Simultaneous ratio subtraction method

<sup>۳</sup> Simultaneous ratio subtraction method coupled with constant multiplication

تعیین غلظت گونه‌ها استفاده کرد.

#### ۴-۱-۷- آینده‌نگری

با استفاده از سایر روش‌های اسپکتروفتومتری جدید مانند روش فاکتور جذب<sup>۱</sup>، روش مدولاسیون دامنه<sup>۲</sup>، روش تفریق جذبی<sup>۳</sup>، روش میانگین‌گیری مرکزی<sup>۴</sup>، روش مدولاسیون دامنه القایی هندسی<sup>۵</sup>، روش مدولاسیون دامنه پیشرفته<sup>۶</sup>، روش مدولاسیون دامنه القایی<sup>۷</sup>، روش اختلاف دامنه به‌همراه مقدار ثابت<sup>۸</sup>، روش اصلاح سطح زیر منحنی<sup>۹</sup> و ..... می‌توان غلظت آمارانس و پونسیو<sup>۴</sup> را در مخلوط‌های دوتایی از هر کدام، به‌دست آورد.

با استفاده از روش‌های CC-SS و RHPSAM می‌توان اجزای مخلوط‌های دو جزئی و چند جزئی ترکیبات و رنگ‌های افزودنی مختلف را اندازه‌گیری کرد.

با استفاده از روش RHPSAM می‌توان غلظت کتکول و هیدروکینون را در مخلوط‌های دوتایی از هر کدام به‌دست آورد.

- 
- ۱ Absorption factor method
  - ۲ Amplitude modulation method
  - ۳ Absorption subtraction method
  - ۴ Mean centering method
  - ۵ Geometrical induced amplitude modulation method
  - ۶ Advanced amplitude modulation method
  - ۷ Induced amplitude modulation method
  - ۸ Constant value via amplitude difference
  - ۹ Area under the curve correction method

## References:

- [1]: K. Sune Larsson, (1975), "A teratologic study with the dyes amaranth and ponceau 4r in mice", **Laboratory of teratology**, 4, 75-82.
- [2]: P. Amchova, H. Kotolova, J. Ruda-Kucerova, (2015), "Health safety issues of synthetic food colorants", **Regulatory toxicology and pharmacology**, 73(3), 914-922.
- [3]: J.J. Berzas Nevado, J. Rodriguez Flores, C. Guiberteau Cabanillas, M. J. Villasenor Llerena, A. Contento Salcedo, (1998), "Resolution of ternary mixtures of tartrazine, sunset yellow and ponceau 4r by derivative spectrophotometric ratio spectrum-zero crossing method in commercial foods", **Talanta**, 46, 933-942.
- [4]: L. Perez-Ibarbia, T. Majdanski, S. Stephanie, N. Windhab, U. S. Schubert, (2016), "Safety and regulatory review of dyes commonly used as excipients in pharmaceutical and nutraceutical applications", **European journal of pharmaceutical sciences**, 93, 264-273.
- [5]: K. Rovina. Sh. Siddiquee. Sh. Md. Shaarani, (2017), "Toxicology, extraction and analytical methods for determination of amaranth in food and beverage products", **Trends in food science & technology**, 65, 68-79.
- [6]: Y. Gao, L. Wang, Y. Zhang, L. Zoa, G. Li, B. Ye, (2017), "Electrochemical behavior of amaranth and its sensitive determination based on Pd-doped polyelectrolyte functionalized graphen modified electrode", **Talanta**, 168, 146-151.
- [7]: J. Huang, Q. Zeng, L. Wang, (2016), "Ultrasensitive electrochemical determination of ponceau 4r with a novel  $\epsilon$ -MnO<sub>2</sub> microspheres/chitosan modified glassy carbon electrode", **Electrochemical Acta**, 206, 176-183.
- [8]: Y. Ni, Y. Wang, S. Kokot, (2009), "Simultaneous kinetic spectrophotometric analysis of five synthetic food colorants with the aid of chemometrics", **Talanta**, 78, 432-441.
- [9]: J. Zhang, M. Wang, C. Shentu, W. Wang, Zh. Chen, (2014), "Simultaneous determination of the isomers of ponceau 4r and amaranth using an expanded graphite paste electrode", **Food chemistry**, 160, 11-15.
- [10]: Z. Wang, H. Zhang, ZH. Wang, J. Zhang, X. Duan, J. Xu, Y. Wen, (2015), "Trace analysis of ponceau 4r in soft drinks using differential pulse stripping voltammetry at SWCNTs composite electrodes based on PEDOT:PSS derivatives", **Food chemistry**, 180, 186-193.

[11]: K. Yamjala, M. S. Nainar, N. R. Ramiseti, (2016), "Methods for the analysis of azo dyes employed in food industry – A review", **Food chemistry**, 192, 813-824.

[12]: M. Bastaki Ph.D., T. Farrell Ph.D., S. Bhusari, B.V.Sc & AH, Ph.D., DABT, K. Pant, MS., R. Kulkarni, M.Sc., Ph.D., (2017), "Lack of genotoxicity in vivo for food color additive Allura Red AC", **Food and chemical Toxicology**, 105, 308-314.

[13]: O. Sha, X. Zhu, Y. Feng, W. Ma, (2015), "Aqueous two-phase based on ionic liquid liquid-liquid microextraction for simultaneous determination of five synthetic food colourants in different food samples by high-performance liquid chromatography", **Food chemistry**, 174, 380-386.

[14]: Q. Chen, Sh. Mou, X. Hou, J. M. Riviello, Zh. Ni, (1998), "Determination of eight synthetic food colorants in drinks by high-performance ion chromatography", **Journal of chromatography A**, 827, 73-81.

[15]: A. Zalacain, S. A. Ordoudi, I. Blazouez, E. M. Diaz-plaza, M. Carmona, M. Z. Tsimidou, &G. L. Alonso, (2005), "Screening method for the detection of artificial colours in saffron using derivative UV-Vis spectrometry after precipitation of crocetin", **Food additives and contaminants**, 22(7), 607-615.

[16]: M. Ma, X. Luo, B. Chen, Sh. Su, Sh. Yao, (2006), "Simultaneous determination of water-soluble and fat-soluble synthetic colorants in foodstuff by high-performance liquid chromatography-diode array detection-electrospray mass spectrometry", **Journal of chromatography A**, 1103, 170-176.

[17]: M. Ryvolova, P. Taborsky, P. Vrabel, P. Krasensky, J. Preisler, (2007), "Sensitive determination of erythrosine and other red food colorants using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection", **Journal of chromatography A**, 1141, 206-211.

[18]: H. Wu, J. Guo, L. Du, H. Tian, Ch. Hao, Zh. Wang, J. Wang, (2013), "A rapid shaking-based ionic liquid dispersive liquid phase microextraction for the simultaneous determination of six synthetic food colourants in soft drinks, sugar- and gelatin-based confectionery by high-performance liquid chromatography", **Food chemistry**, 141, 182-186.

[19]: S. Komissarchik, G. Nyanikova, (2014), "Test systems and a method for express detection of synthetic food dyes in drinks", **LWT-Food science and technology**, 58(2), 315-320.

[20]: P. Qi, Zh. Lin, G. Chen, J. Xiao, Zh. Liang, L. Luo, J. Zhou, X. Zhang, (2015), "Fast and simultaneous determination of eleven synthetic color additives in flour and meat products by liquid chromatography coupled with diode-array detector and tandem mass spectrometry", **Food chemistry**,

181, 101-110.

[21]: M. Wang, Y. Gao, Q. Sun, J. Zhao, (2015), "Ultrasensitive and simultaneous determination of the isomers of amaranth and ponceau 4R in foods based on new carbon nanotube/polypyrrole composites", **Food chemistry**, 172, 873-879.

[22]: J.J. Berzas Nevado, C. Guiberteau Cabanillas, A.M. Contento Salcedo, (1999), "Method development and validation for the simultaneous determination of dyes in foodstuffs by capillary zone electrophoresis", **Analytica Chimica Acta**, 378, 63-71.

[۲۳]: داگلاس ای. اسکوگ، اف جیمز هالر، تی مو تی ای. نیمن، (۱۳۸۶)، "اصول تجزیه دستگاهی". جلد اول، عبد الرضا سلاجقه، چاپ پنجم، مرکز نشر دانشگاهی، تهران، ۱۹۰.

[24]: H. M. Lotfy and M. A. M. Hegazy, (2013), "Simultaneous determination of some cholesterol-lowering drugs in their binary mixture by novel spectrophotometric methods", **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 113, 107-114.

[25]: H. A. Darwish, F. H. Metwally, A. E. Bayoumi, (2015), "Novel ratio subtraction and isoabsorptive point methods for determination of ambroxol hydrochloride and doxycycline in their combined dosage form: Development and validation", **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, 14(1), 133-140.

[26]: E. S. Elzanfaly, S. A. Hassan, M. Y. Salem, B. A. El-zeany, (2015), "Continuous Wavelet Transform, a powerful alternative to Derivative Spectrophotometry in analysis of binary and ternary mixtures: A comparative study", **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 151, 945-955.

[27]: E. Ekrami and M. Okazi, (2010), "Analysis of dye concentrations in binary dye solutions using derivative spectrophotometric techniques", **World Applied Sciences Journal**, 11, 1025-1034.

[28]: E. S. Elzanfaly, S. A. Hassan, M. Y. Salem and B. A. El-Zeany, (2016), "Mean centering of double divisor ratio spectra, a novel spectrophotometric method for analysis of ternary mixtures", **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 153, 132-142.

[29]: H. M. Lotfy, M. A. Hegazy, M. R. Rezk, Y. R. Omran, (2014), "Novel spectrophotometric methods for simultaneous determination of timolol and dorzolamide in their binary mixture", **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 126, 197-207.

[30]: M. A. Yehia, (2013), "Development and validation of new spectrophotometric ratio H-point standard addition method and application to gastrointestinal acting drugs mixtures", **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 109, 193-200.

[31]: Y. M. Fayez, (2014), "Simultaneous determination of some anti-hypertensive drugs in their binary mixture by novel spectrophotometric methods", **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 132, 446-451.

[۳۲]: کلوانی نیتلی، س، (۱۳۸۶)، پایان نامه ارشد، اندازه‌گیری همزمان مس (II) و نیکل (II) به روش اسپکتروفتومتری با استفاده از کالیبراسیون چند متغیره PLS و اندازه‌گیری مقادیر کم مس (II) به روش اسپکترومتری جذب اتمی، دانشکده شیمی، دانشگاه صنعتی شاهرود.

[33]: R. Bro, (2003), "Multivariate calibration: What is in chemometrics for the analytical chemist", **Analytica Chimica Acta**, 500(1), 185-194.

[34]: M. G. El-Bardicy, H. M. Lotfy, M. A. El-Sayed and M. F. El-Tarras, (2008), "Smart stability-indicating spectrophotometric methods for determination of binary mixtures without prior separation", **Journal of AOAC International**, 91(2), 299-310.

[35]: A. Samir, H. M. Lotfy, H. Salem, M. Abdelkawy, (2014), "Development and validation of simultaneous spectrophotometric and TLC-spectrodensitometric methods for determination of beclomethasone dipropionate and salbutamol in combined dosage form", **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 128, 127-136.

[36]: K. R. Beebe and B. R. Kowalski, (1987), "An introduction to multivariate calibration and analysis", **Analytical Chemistry**, 59(17), 1007A-1017A.

[37]: J. Iurie, 1975, **Handbook of analytical chemistry**. Moscow, English translation, MIR publishers Moscow.

[38]: A. Karmakar, (2017), "Charge-transfer complex of 1-(2-thiazolylzalo)-2-naphthol with aromatic nitro compounds: experimental and theoretical studies", **Journal of molecular liquids**, 247, 425-433.

[39]: J. Zholgharnein, H. Abdollahi, D. Jafearifar, G. H. Azimi, (2002), "Simultaneous determination of Fe(II) and Fe(III) by kinetic spectrophotometric H-point standard addition method", **Talanta**, 57, 1067-1073.

## **Abstract**

Two simple, accurate, and precise spectrophotometric methods, manipulating ratio spectra, were developed for the simultaneous determination of amaranth and ponceau 4r. These methods include constant center coupled with spectrum subtraction (CC-SS) and ratio H-point standard addition (R-HPSAM). Effective parameters including pH, ionic strength and type of buffer were evaluated and optimized. In both methods, the linear range for amaranth and ponceau 4r was obtained to be 0.2-40 mg L<sup>-1</sup>. In the CC-SS and RHP SAM methods, the detection limits for amaranth and ponceau 4r were obtained, respectively, to be 0.080, 0.063, and 0.14, 0.096 mg L<sup>-1</sup>. The proposed methods have an admissible precision and accuracy for determination of amaranth and ponceau 4r in their binary mixtures in drink sample and tap water.

keywords: Amaranth, ponceau 4r, ratio H-point standard addition and constant center coupled with spectrum subtraction.





**Shahrood University of Technology**

**Faculty of Chemistry**

**M.Sc. Thesis in Analytical Chemistry**

**Simultaneous determination of the isomers of ponceau 4r and amaranth  
in their binary mixtures by novel spectrophotometric methods**

**Haniye Borzooei**

Supervisor:

**Dr. Gh. Bagherian Dehaghi**

Advisor:

**Dr. F. Masdarolomoor**

Date: January– 2018