

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشکده شیمی

گروه شیمی تجزیه

پایان نامه کارشناسی ارشد

تعیین همزمان مقدار کتکول و هیدروکینون و تعیین همزمان مقدار

رزورسینول و هیدروکینون در مخلوط‌های هر کدام، با استفاده از روش های

اسپکتروفتومتری جدید

فاطمه صالحی مبارکه

اساتید راهنما:

دکتر قدمعلی باقریان دهقی

دکتر منصور عرب چم جنگلی

اسفند ۱۳۹۴

اگر شایسته تقدیم باشد:

تقدیم به پدر و مادر عزیزم
همسر مهربانم و برادران نازنینم

آنان که وجودم برایشان همه رنج بود

و

وجودشان برایم همه مهر

تشکر و قدردانی

اکنون که به یاری خداوند متعال این دوره از تحصیلاتم را به پایان رسانده‌ام، بر خود واجب می‌دانم، تلاش‌های خستگی ناپذیر پدر و مادر دلسوزم، همسر عزیزم و برادران مهربانم که همواره ره‌گشای مشکلاتم در تمامی مراحل زندگی بوده، ارج نهاده و مراتب قدردانی و تشکر قلبی خویش را از الطاف و مهربانی‌های آنها ابراز دارم. همچنین لازم می‌دانم از زحمات فراوان استاد فرهیخته و بزرگوارم جناب آقای دکتر قدمعلی باقریان که راهنمایی‌ها و نظرات ارزنده و صبر و حوصله فراوان ایشان نقش مهمی در به ثمر رساندن این پروژه داشت، صمیمانه تشکر کنم. از اساتید عزیز و بزرگوارم جناب آقای دکتر منصور عرب چم جنگلی، جناب آقای دکتر ناصر گودرزی و سرکار خانم دکتر مصدرالامور نیز نهایت قدردانی را دارم و سلامتی و موفقیت همیشگی این بزرگواران را از درگاه یزدان پاک خواستارم.

تعهد نامه

- اینجانب فاطمه صالحی مبارکه دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته شیمی تجزیه دانشکده شیمی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه تعیین همزمان مقدار کتکول و هیدروکینون و تعیین همزمان مقدار رزورسینول و هیدروکینون در مخلوط‌های هر کدام، با استفاده از روش های اسپکتروفتومتری جدید تحت راهنمایی دکتر قدمعلی باقریان دهقی متعهد می شوم :
- 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 می باشد 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 می گردد.
- 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 می باشد . 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 نمی باشد.

تعیین همزمان مقدار کتکول و هیدروکینون و تعیین همزمان مقدار رزورسینول و هیدروکینون در مخلوط‌های هر کدام، با استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری جدید

چکیده

در بخش اول این پایان نامه دو روش اسپکتروفتومتری جدید، ساده، دقیق و صحیح برای تعیین همزمان کتکول و هیدروکینون ارائه شده است. در بخش دوم، همان روش‌ها برای اندازه‌گیری همزمان رزورسینول و هیدروکینون مورد بررسی قرار گرفت. روش‌های اسپکتروفتومتری جدید روش توسعه یافته تفاضل نسبی (EXRSM) و روش کم کردن نسبی همزمان (SRSM)) با روش حداقل مربعات جزئی (PLS) مقایسه شد. فاکتورهای موثر بر حساسیت روش‌ها مورد بررسی و بهینه‌سازی قرار گرفتند. در بخش اول، برای هر سه روش، دامنه خطی کتکول و هیدروکینون به ترتیب (۱۵/۰۰-۱/۰۰) و (۱۲/۰۰-۱/۰۰) میلی گرم بر لیتر و در بخش دوم نیز برای هر سه روش، دامنه خطی رزورسینول و هیدروکینون به ترتیب (۱۵/۰۰-۱/۰۰) و (۱۲/۰۰-۱/۰۰) میلی گرم بر لیتر به دست آمد. در بخش اول، در روش‌های EXRSM، SRSM و PLS حد تشخیص برای کتکول به ترتیب ۰/۱۶۹، ۰/۰۷۴۵ و ۰/۲۱۶ میلی گرم بر لیتر و برای هیدروکینون به ترتیب ۰/۱۳۲، ۰/۱۳۲ و ۰/۲۴۳ میلی گرم بر لیتر به دست آمد. در بخش دوم حد تشخیص برای رزورسینول به ترتیب ۰/۱۶۸، ۰/۱۰۱ و ۰/۱۰۸ میلی گرم بر لیتر و برای هیدروکینون به ترتیب ۰/۱۳۲، ۰/۱۳۲ و ۰/۱۳۹ میلی گرم بر لیتر به دست آمد. اثر مزاحمت گونه‌های مختلف بر گزینش پذیری روش‌ها بررسی شد. روش‌های پیشنهادی برای اندازه‌گیری همزمان کتکول و هیدروکینون و برای اندازه‌گیری همزمان رزورسینول و هیدروکینون در نمونه آب شهر با دقت و صحت رضایت‌بخشی به کار برده شد.

لغات کلیدی: کتکول، رزورسینول، هیدروکینون، روش توسعه یافته تفاضل نسبی (EXRSM)، روش کم کردن نسبی همزمان (SRSM)، حداقل مربعات جزئی (PLS)

فهرست مطالب:

۱ - مقدمه	۱
۱-۱- مقدمه	۲
۲-۱- هیدروکینون	۳
۳-۱- کتکول	۴
۴-۱- رزورسینول	۵
۵-۱- مروری بر کارهای انجام شده در تعیین همزمان هیدروکینون، کتکول و رزورسینول به صورت مخلوط‌های دوتایی و سه‌تایی	۵
۲- تئوری	۱۱
۱-۲- مقدمه ای بر اسپکتروفتومتری	۱۲
۲-۲- کالیبراسیون	۱۳
۱-۲-۲- کالیبراسیون یک متغیره	۱۳
۲-۲-۲- کالیبراسیون چند متغیره	۱۹
۳- تجربی	۲۳
۱-۳- اندازه‌گیری همزمان کتکول و هیدروکینون با استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری جدید	۲۴
۲-۳- محلولهای مورد استفاده و طرز تهیه آنها	۲۴
۳-۳- دستگاهها و وسایل مورد استفاده	۲۵

- ۳-۴- طیف جذبی..... ۲۵
- ۳-۵- بررسی و بهینه سازی متغیرهای موثر بر حساسیت روش های اندازه گیری کتکول و هیدروکینون..... ۲۶
- ۳-۵-۱- بررسی اثر pH..... ۲۷
- ۳-۵-۲- بررسی نوع بافر با $pH=7/0$ ۲۸
- ۳-۵-۳- بررسی حجم بافر..... ۲۹
- ۳-۵-۴- بررسی اثر قدرت یونی..... ۳۰
- ۳-۶- شرایط بهینه..... ۳۱
- ۳-۷- رسم منحنی کالیبراسیون..... ۳۲
- ۳-۷-۱- کالیبراسیون یک متغیره..... ۳۲
- ۳-۷-۲- محلول سازی و کالیبراسیون یک متغیره..... ۳۸
- ۳-۷-۳- بررسی اثر مزاحمت ها در روش های اسپکتروفتومتری جدید (EXRSM و SRSM) ... ۶۰
- ۳-۷-۴- حد تشخیص روش EXRSM و SRSM..... ۶۱
- ۳-۷-۵- دقت و صحت روش EXRSM و SRSM..... ۶۲
- ۳-۷-۶- کاربرد روش های EXRSM و SRSM در آنالیز نمونه های حقیقی..... ۶۳
- ۳-۷-۷- کالیبراسیون چند متغیره و محلول سازی..... ۶۶
- ۳-۷-۸- حد تشخیص روش PLS..... ۷۵
- ۳-۷-۹- دقت و صحت روش PLS..... ۷۱
- ۳-۷-۱۰- کاربرد روش PLS در آنالیز نمونه های حقیقی..... ۷۲
- ۳-۸- اندازه گیری همزمان رزورسینول و هیدروکینون با استفاده از روش های اسپکتروفتومتری

جدید.....	۷۴
۹-۳- محلولهای مورد استفاده و طرز تهیه آنها.....	۷۴
۱۰-۳- دستگاهها و وسایل مورد استفاده.....	۷۵
۱۱-۳- طیف جذبی.....	۷۵
۱۲-۳- بررسی و بهینهسازی متغیرهای موثر بر حساسیت روشهای اندازهگیری رزورسینول و هیدروکینون.....	۷۷
۱-۱۲-۳- بررسی اثر pH.....	۷۷
۲-۱۲-۳- بررسی نوع بافر با pH= ۷/۰.....	۷۹
۳-۱۲-۳- بررسی حجم بافر.....	۷۹
۴-۱۲-۳- بررسی اثر قدرت یونی.....	۸۰
۱۳-۳- شرایط بهینه.....	۸۱
۱۴-۳- رسم منحنی کالیبراسیون.....	۸۲
۱-۱۴-۳- کالیبراسیون یک متغیره.....	۸۲
۲-۱۴-۳- محلول سازی و کالیبراسیون یک متغیره.....	۸۵
۳-۱۴-۳- بررسی اثر مزاحمت در روشهای اسپکتروفتومتری جدید (EXRSM و SRSM).....	۱۰۲
۴-۱۴-۳- حد تشخیص روشهای EXRSM و SRSM.....	۱۰۴
۵-۱۴-۳- دقت و صحت روشهای EXRSM و SRSM.....	۱۰۴

۳-۱۴-۶- کاربرد روش‌های EXRSM و SRSM در آنالیز نمونه‌های حقیقی..... ۱۰۵

۳-۱۴-۷- کالیبراسیون چند متغیره و محلول‌سازی..... ۱۰۷

۳-۱۴-۸- حد تشخیص روش PLS..... ۱۱۱

۳-۱۴-۹- دقت و صحت روش PLS..... ۱۱۱

۳-۱۴-۱۰- کاربرد روش PLS در آنالیز نمونه‌های حقیقی..... ۱۱۲

۴- بحث..... ۱۱۵

۴-۱- اندازه‌گیری همزمان کتکول و هیدروکینون و اندازه‌گیری همزمان رزورسینول و هیدروکینون

در مخلوط دوتایی از هر کدام با استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری..... ۱۱۶

۴-۱-۱- بررسی و بهینه‌سازی پارامترهای تجربی..... ۱۱۶

۴-۱-۲- کالیبراسیون..... ۱۱۷

۴-۱-۳- ارزیابی آماری..... ۱۱۷

۴-۱-۴- گزینش پذیری روش..... ۱۲۹

۴-۱-۵- کاربرد روش..... ۱۲۹

۴-۱-۶- مقایسه روش‌های پیشنهادی با برخی از روش‌های موجود..... ۱۲۹

۴-۱-۷- آینده نگری..... ۱۱۰

فهرست جداول:

- جدول ۱-۳: نتایج حاصل از بررسی اثر pH..... ۲۸
- جدول ۲-۳: نتایج حاصل از بررسی نوع بافر..... ۲۹
- جدول ۳-۳: نتایج حاصل از بررسی حجم بافر فسفاتی..... ۳۰
- جدول ۴-۳: نتایج حاصل از بررسی اثر قدرت یونی..... ۳۱
- جدول ۵-۳: نتایج حاصل برای رسم منحنی کالیبراسیون کتکول و هیدروکینون به صورت مجزا..... ۳۳
- جدول ۶-۳: نتایج حاصل از کالیبراسیون تک متغیره..... ۳۴
- جدول ۷-۳: نتایج حاصل از بررسی منحنی کالیبراسیون کتکول در حضور هیدروکینون..... ۳۶
- جدول ۸-۳: نتایج حاصل از بررسی کالیبراسیون کتکول در حضور ۵۰/۱۰۰ میلی گرم بر لیتر هیدروکینون..... ۳۶
- جدول ۹-۳: نتایج حاصل از بررسی منحنی کالیبراسیون هیدروکینون در حضور کتکول..... ۳۷
- جدول ۱۰-۳: نتایج حاصل از بررسی منحنی کالیبراسیون هیدروکینون..... ۳۸
- جدول ۱۱-۳: ترکیب غلظتی محلول‌های سری ارزیابی..... ۴۰
- جدول ۱۲-۳: ترکیب غلظتی محلول‌های سری تست..... ۴۱
- جدول ۱۳-۳: نتایج حاصل از بهینه‌سازی غلظت هیدروکینون به‌عنوان مقسوم علیه برای سری ارزیابی..... ۴۵
- جدول ۱۴-۳: نتایج حاصل از بهینه‌سازی غلظت کتکول به‌عنوان مقسوم علیه..... ۵۱
- جدول ۱۵-۳: نتایج حاصل از به کارگیری روش EXRSM، برای پیش‌بینی غلظت اجزا در سری تست..... ۵۲
- جدول ۱۶-۳: نتایج حاصل از بررسی منحنی کالیبراسیون نسبی کتکول..... ۵۶

جدول ۳-۱۷: نتایج حاصل از رسم منحنی کالیبراسیون نسبی کتکول.....	۵۶
جدول ۳-۱۸: نتایج حاصل از بهینه‌سازی غلظت هیدروکینون به‌عنوان مقسوم علیه در روش SRSM	۵۸
جدول ۳-۱۹: نتایج حاصل از به کارگیری روش SRSM برای پیش‌بینی غلظت اجزا در سری ارزیابی	۵۹
جدول ۳-۲۰: نتایج حاصل از به کارگیری روش SRSM برای پیش‌بینی غلظت اجزا در سری تست. ۶۰	۶۰
جدول ۳-۲۱: نتایج حاصل از بررسی اثر گونه‌های مزاحم در اندازه‌گیری همزمان کتکول و هیدروکینون	۶۱
با غلظت‌های یکسان و برابر ۲/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در روش EXRSM و SRSM.....	۶۱
جدول ۳-۲۲: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش EXRSM.....	۶۳
جدول ۳-۲۳: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش EXRSM.....	۶۳
جدول ۳-۲۴: نتایج حاصل از اندازه‌گیری همزمان کتکول و هیدروکینون در نمونه‌های آب شهر با	۶۴
استفاده از روش EXRSM.....	۶۴
جدول ۳-۲۵: نتایج حاصل از اندازه‌گیری همزمان کتکول و هیدروکینون در نمونه‌های آب شهر با	۶۵
استفاده از روش SRSM.....	۶۵
جدول ۳-۲۶: نتایج حاصل از بهینه‌سازی دامنه طول‌موج و تعداد فاکتور PLS برای نمونه‌های سری	۶۷
کالیبراسیون.....	۶۷
جدول ۳-۲۷: نتایج حاصل از به کارگیری روش PLS برای پیش‌بینی غلظت اجزا در سری کالیبراسیون	۷۰
جدول ۳-۲۸: نتایج حاصل از به کارگیری روش PLS برای پیش‌بینی غلظت اجزا در سری ارزیابی... ۷۱	۷۱
جدول ۳-۲۹: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش PLS.....	۷۱
جدول ۳-۳۰: نتایج حاصل از اندازه‌گیری همزمان کتکول و هیدروکینون در نمونه‌های آب شهر با	۷۳
استفاده از روش PLS.....	۷۳
جدول ۳-۳۱: نتایج حاصل از بررسی اثر pH.....	۷۸

- جدول ۳-۳۲: نتایج حاصل از بررسی نوع بافر..... ۷۹
- جدول ۳-۳۳: نتایج حاصل از بررسی حجم بافر فسفاتی..... ۸۰
- جدول ۳-۳۴: نتایج حاصل از بررسی اثر قدرت یونی..... ۸۱
- جدول ۳-۳۵: نتایج حاصل برای رسم منحنی کالیبراسیون رزورسینول و هیدروکینون به صورت مجزا
..... ۸۳
- جدول ۳-۳۶: نتایج حاصل از کالیبراسیون تک متغیره..... ۸۴
- جدول ۳-۳۷: ترکیب غلظتی محلول‌های سری ارزیابی..... ۸۶
- جدول ۳-۳۸: ترکیب غلظتی محلول‌های سری تست..... ۸۷
- جدول ۳-۳۹: نتایج حاصل از بهینه‌سازی غلظت هیدروکینون به‌عنوان مقسوم علیه برای سری ارزیابی
..... ۹۰
- جدول ۳-۴۰: نتایج حاصل از بهینه‌سازی غلظت رزورسینول به‌عنوان مقسوم علیه..... ۹۳
- جدول ۳-۴۱: نتایج حاصل از به کارگیری روش EXRSM، برای پیش‌بینی غلظت اجزا در سری تست
..... ۹۴
- جدول ۳-۴۲: نتایج حاصل از بررسی منحنی کالیبراسیون نسبی رزورسینول..... ۹۸
- جدول ۳-۴۳: نتایج حاصل از رسم منحنی کالیبراسیون نسبی رزورسینول..... ۹۹
- جدول ۳-۴۴: نتایج حاصل از بهینه‌سازی غلظت هیدروکینون به‌عنوان مقسوم علیه در روش SRSM
..... ۱۰۱
- جدول ۳-۴۵: نتایج حاصل از به کارگیری روش SRSM برای پیش‌بینی غلظت دو گونه در سری تست
..... ۱۰۲
- جدول ۳-۴۶: نتایج حاصل از بررسی اثر گونه‌های مزاحم در اندازه‌گیری همزمان رزورسینول و

- هیدروکینون با غلظت‌های یکسان و برابر ۲/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در روش EXRSM و SRSM ۱۰۳
- جدول ۳-۴۷: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش EXRSM ۱۰۵
- جدول ۳-۴۸: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش SRSM ۱۰۵
- جدول ۳-۴۹: نتایج حاصل از اندازه‌گیری رزورسینول و هیدروکینون در نمونه‌های آب شهر با استفاده از روش EXRSM ۱۰۶
- جدول ۳-۵۰: نتایج حاصل از اندازه‌گیری رزورسینول و هیدروکینون در نمونه‌های آب شهر با استفاده از روش SRSM ۱۰۷
- جدول ۳-۵۱: نتایج حاصل از بهینه‌سازی دامنه طول‌موج و تعداد فاکتور PLS برای نمونه‌های سری کالیبراسیون ۱۰۹
- جدول ۳-۵۲: نتایج حاصل از به کارگیری روش PLS برای پیش‌بینی غلظت دو گونه در سری ارزیابی ۱۱۱
- جدول ۳-۵۳: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش PLS ۱۱۲
- جدول ۳-۵۴: نتایج حاصل از اندازه‌گیری رزورسینول و هیدروکینون در نمونه‌های آب شهر با استفاده از روش PLS ۱۱۳
- جدول ۴-۱: پارامترهای آماری محاسبه شده برای روش‌های EXRSM، SRSM و PLS ۱۲۱
- جدول ۴-۲: پارامترهای آماری محاسبه شده برای روش‌های EXRSM، SRSM و PLS ۱۲۱
- جدول ۴-۳: پارامترهای آماری محاسبه شده برای روش‌های EXRSM، SRSM و PLS ۱۲۴
- جدول ۴-۴: پارامترهای آماری محاسبه شده برای روش‌های EXRSM، SRSM و PLS ۱۲۴

فهرست اشکال:

- شکل ۱-۳: طیف جذبی ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر کتکول (— — —)، طیف جذبی ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر هیدروکینون (— — — — —) و طیف جذبی مخلوط ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر از کتکول و هیدروکینون با غلظت ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر از هر یک در $pH=7/00$ (—)..... ۲۶
- شکل ۲-۳: بررسی اثر pH شرایط: ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفاتی و غلظت ۲/۰۰ میلی گرم بر لیتر کتکول و هیدروکینون..... ۲۸
- شکل ۳-۳: بررسی اثر حجم بافر فسفاتی با $pH=7/00$ در حضور غلظت ۲/۰۰ میلی گرم بر لیتر کتکول و یا هیدروکینون..... ۳۰
- شکل ۴-۳: بررسی اثر قدرت یونی. شرایط: محلول های ۲/۰۰ میلی گرم بر لیتر کتکول و هیدروکینون،..... ۳۱
- شکل ۵-۳: الف: منحنی کالیبراسیون کتکول، ب: منحنی کالیبراسیون هیدروکینون..... ۳۴
- شکل ۶-۳: منحنی کالیبراسیون کتکول در حضور ۵۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر هیدروکینون در شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفاتی با $pH=7/00$ ۳۶
- شکل ۷-۳: منحنی کالیبراسیون هیدروکینون در حضور ۶۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر کتکول. در شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفاتی با $pH=7/00$ ۳۸
- شکل ۸-۳: طیف های جذبی مخلوط های حاوی ۴/۰۰، ۷/۰۰، ۹/۰۰، ۱۲/۰۰ و ۱۵/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) کتکول و ۶/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) هیدروکینون در شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفاتی با $pH=7/00$ =..... ۴۲
- شکل ۹-۳: طیف های جذبی حاصل از تقسیم طیف مخلوط های حاوی ۴/۰۰، ۷/۰۰، ۹/۰۰، ۱۲/۰۰ و ۱۵/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) کتکول و ۶/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) هیدروکینون بر طیف ۲/۰۰ میلی گرم بر لیتر

هیدروکینون.....۴۲

شکل ۳-۱۰: طیف‌های جذبی حاصل از تقسیم طیف مخلوط‌های حاوی ۴/۰۰، ۷/۰۰، ۹/۰۰، ۱۲/۰۰ و

۱۵/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) کتکول و ۶/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) هیدروکینون بر طیف ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر

هیدروکینون (مقسوم علیه) بعد از کم کردن مقدار ثابت.....۴۳

شکل ۳-۱۱: طیف جذبی مرتبه صفر غلظت‌های ۴/۰۰، ۷/۰۰، ۹/۰۰، ۱۲/۰۰ و ۱۵/۰۰ میلی گرم بر

لیتر کتکول، بعد از کم کردن مقدار ثابت و ضرب در طیف محلول ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر هیدروکینون.....۴۳

شکل ۳-۱۲: طیف نسبی حاصل از تقسیم طیف‌های ۴/۰۰، ۷/۰۰، ۹/۰۰، ۱۲/۰۰ و ۱۵/۰۰ (میلی گرم

بر لیتر) کتکول (شکل ۳-۱۱) بر ۱۵/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) کتکول به عنوان مقسوم علیه.....۴۹

شکل ۳-۱۳: طیف‌های نسبی حاصل از تقسیم طیف مخلوط‌های حاوی ۴/۰۰، ۷/۰۰، ۹/۰۰، ۱۲/۰۰ و

۱۵/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) کتکول و ۶/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) هیدروکینون بر طیف ۱۵/۰ میلی گرم بر لیتر

کتکول (مقسوم علیه).....۵۰

شکل ۳-۱۴: طیف‌های جذبی حاصل از تقسیم طیف مخلوط‌های حاوی ۴/۰، ۷/۰، ۹/۰، ۱۲/۰ و ۱۵/۰

(میلی گرم بر لیتر) کتکول و ۶/۰ (میلی گرم بر لیتر) هیدروکینون بر طیف ۱۵/۰ میلی گرم بر لیتر کتکول

(مقسوم علیه)، بعد از کم کردن مقدار ثابت.....۵۰

شکل ۳-۱۵: طیف جذبی مرتبه صفر ۶/۰۰ میلی گرم بر لیتر هیدروکینون بعد از ضرب طیف‌های شکل

۳-۱۴ در طیف محلول ۱۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر کتکول.....۵۱

شکل ۳-۱۶: طیف جذبی مرتبه صفر محلول‌های ۱/۰۰، ۳/۰۰، ۶/۰۰، ۹/۰۰، ۱۲/۰۰ و ۱۵/۰۰

میلی گرم.....۵۴

شکل ۳-۱۷: طیف جذبی مرتبه صفر محلول‌های ۱/۰۰، ۳/۰۰، ۶/۰۰، ۹/۰۰ و ۱۲/۰۰ میلی گرم بر

لیتر هیدروکینون در شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفاتی با pH=۷/۰۰.....۵۴

شکل ۳-۱۸: طیف‌های جذبی مخلوط‌های حاوی ۴/۰۰، ۷/۰۰، ۹/۰۰، ۱۲/۰۰ و ۱۵/۰۰ (میلی گرم بر

لیتر) کتکول و ۶/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) هیدروکینون در شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفاتی با pH=

pH.....۵۵

شکل ۳-۱۹: طیف‌های جذبی حاصل از تقسیم طیف ۱/۰۰، ۴/۰۰، ۷/۰۰، ۹/۰۰، ۱۲/۰۰ و ۱۵/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) کتکول بر طیف ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر هیدروکینون..... ۵۵

شکل ۳-۲۰: منحنی کالیبراسیون کتکول در شرایط بهینه: ۲/۰ میلی لیتر بافر فسفاتی با $\text{pH}=7/0$.

(A CatA Hyd) بیانگر تقسیم طیف محلول‌های خالص کتکول بر طیف غلظت معینی از هیدروکینون (به‌عنوان مقسوم علیه) است)..... ۵۶

شکل ۳-۲۱: طیف‌های جذبی حاصل از تقسیم طیف مخلوط‌های حاوی ۴/۰۰، ۷/۰۰، ۹/۰۰، ۱۲/۰۰ و ۱۵/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) کتکول و ۶/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) هیدروکینون بر طیف ۲۰/۰ میلی گرم بر لیتر هیدروکینون..... ۵۷

شکل ۳-۲۲: طیف‌های جذبی حاصل از تقسیم طیف مخلوط‌های حاوی ۴/۰۰، ۷/۰۰، ۹/۰۰، ۱۲/۰۰ و ۱۵/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) کتکول و ۶/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) هیدروکینون بر طیف ۲۰/۰ میلی گرم بر لیتر هیدروکینون (مقسوم علیه) بعد از کم کردن مقدار ثابت..... ۵۷

شکل ۳-۲۳: طیف جذبی مرتبه صفر ۶/۰۰ میلی گرم بر لیتر هیدروکینون بعد از ضرب مقدار ثابت (شکل ۳-۲۱) در طیف محلول ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر هیدروکینون..... ۵۸

شکل ۳-۲۴: طیف جذبی محلول‌های سری ارزیابی حاوی کتکول و هیدروکینون در محدوده طول موج ۲۷۰-۲۹۰ نانومتر..... ۶۹

شکل ۳-۲۵: طیف جذبی ۷/۰۰ میلی گرم بر لیتر رزورسینول (— — —)، طیف جذبی ۶/۰۰ میلی گرم بر لیتر هیدروکینون (— — — — —) و طیف جذبی مخلوط حاوی ۷/۰۰ میلی گرم بر لیتر رزورسینول و ۶/۰۰ میلی گرم بر لیتر هیدروکینون در $\text{pH}=7/0$ (—)..... ۷۶

شکل ۳-۲۶: بررسی اثر pH شرایط: ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفاتی و غلظت ۲/۰۰ میلی گرم بر لیتر..... ۷۸

شکل ۳-۲۷: بررسی اثر حجم بافر فسفاتی با $\text{pH}=7/0$ در حضور غلظت ۲/۰۰ میلی گرم بر لیتر..... ۸۰

شکل ۳-۲۸: بررسی اثر قدرت یونی. شرایط: محلول‌های ۲/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر رزورسینول و هیدروکینون..... ۸۱

شکل ۳-۲۹: الف: منحنی کالیبراسیون رزورسینول، ب: منحنی کالیبراسیون هیدروکینون..... ۸۴

شکل ۳-۳۰: طیف‌های جذبی مخلوط‌های حاوی ۱/۰۰، ۳/۰۰، ۶/۰۰، ۹/۰۰ و ۱۲/۰۰ (میلی‌گرم بر لیتر) هیدروکینون و ۷/۰۰ (میلی‌گرم بر لیتر) رزورسینول در شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات با pH= ۷/۰۰..... ۸۸

شکل ۳-۳۱: طیف‌های جذبی حاصل از تقسیم طیف مخلوط‌های حاوی ۱/۰۰، ۳/۰۰، ۶/۰۰، ۹/۰۰ و ۱۲/۰۰ (میلی‌گرم بر لیتر) هیدروکینون و ۷/۰۰ (میلی‌گرم بر لیتر) رزورسینول بر طیف ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیدروکینون..... ۸۸

شکل ۳-۳۲: طیف‌های جذبی حاصل از تقسیم طیف مخلوط‌های حاوی ۱/۰۰، ۳/۰۰، ۶/۰۰، ۹/۰۰ و ۱۲/۰۰ (میلی‌گرم بر لیتر) هیدروکینون و ۷/۰۰ (میلی‌گرم بر لیتر) رزورسینول بر طیف ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیدروکینون (مقسوم علیه) بعد از کم کردن مقدار ثابت..... ۸۹

شکل ۳-۳۳: طیف جذبی مرتبه صفر غلظت ۷/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر رزورسینول، بعد از کم کردن..... ۸۹

شکل ۳-۳۴: طیف نسبی حاصل از تقسیم طیف‌های ۷/۰۰ (میلی‌گرم بر لیتر) رزورسینول (شکل ۳-۳۳) بر ۲۰/۰۰ (میلی‌گرم بر لیتر) رزورسینول به عنوان مقسوم علیه..... ۹۱

شکل ۳-۳۵: طیف‌های نسبی حاصل از تقسیم طیف مخلوط‌های حاوی ۱/۰۰، ۳/۰۰، ۶/۰۰، ۹/۰۰ و ۱۲/۰۰ (میلی‌گرم بر لیتر) هیدروکینون و ۷/۰۰ (میلی‌گرم بر لیتر) رزورسینول بر طیف ۲۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر رزورسینول (مقسوم علیه)..... ۹۲

شکل ۳-۳۶: طیف‌های جذبی حاصل از تقسیم طیف مخلوط‌های حاوی ۱/۰۰، ۳/۰۰، ۶/۰، ۹/۰ و ۱۲/۰ (میلی‌گرم بر لیتر) رزورسینول و ۷/۰ (میلی‌گرم بر لیتر) هیدروکینون بر طیف ۲۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر رزورسینول (مقسوم علیه)، بعد از کم کردن مقدار ثابت..... ۹۲

شکل ۳-۳۷: طیف جذبی مرتبه صفر ۱/۰۰، ۳/۰۰، ۶/۰۰، ۹/۰۰ و ۱۲/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیدروکینون بعد از ضرب طیف‌های شکل ۳-۳۶ در طیف محلول ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر رزورسینول..... ۹۳

شکل ۳-۳۸: طیف جذبی مرتبه صفر محلول‌های ۱/۰۰، ۴/۰۰، ۷/۰۰، ۹/۰۰، ۱۲/۰۰ و ۱۵/۰۰ میلی‌گرم..... ۹۶

شکل ۳-۳۹: طیف جذبی مرتبه صفر محلول‌های ۱/۰۰، ۳/۰۰، ۶/۰۰، ۹/۰۰ و ۱۲/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیدروکینون در شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفاتی با $\text{pH}=7$ ۹۷

شکل ۳-۴۰: طیف‌های جذبی مخلوط‌های حاوی ۱/۰۰، ۳/۰۰، ۶/۰۰، ۹/۰۰ و ۱۲/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیدروکینون و ۷/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر رزورسینول در شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفاتی با $\text{pH}=7$ ۹۷

شکل ۳-۴۱: طیف‌های جذبی حاصل از تقسیم طیف ۱/۰۰، ۴/۰۰، ۷/۰۰، ۹/۰۰، ۱۲/۰۰ و ۱۵/۰۰ (میلی‌گرم بر لیتر) رزورسینول بر طیف ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیدروکینون..... ۹۸

شکل ۳-۴۲: منحنی کالیبراسیون رزورسینول در شرایط بهینه: ۲/۰ میلی‌لیتر بافر فسفاتی با $\text{pH}=7$ (به‌عنوان مقسوم علیه) است)..... ۹۹

شکل ۳-۴۳: طیف‌های جذبی حاصل از تقسیم طیف مخلوط‌های حاوی ۱/۰۰، ۳/۰۰، ۶/۰۰، ۹/۰۰ و ۱۲/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیدروکینون و ۷/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر رزورسینول بر طیف ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیدروکینون..... ۹۹

شکل ۳-۴۴: طیف‌های جذبی حاصل از تقسیم طیف مخلوط‌های ۱/۰۰، ۳/۰۰، ۶/۰۰، ۹/۰۰ و ۱۲/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیدروکینون (مقسوم علیه) بعد از کم کردن مقدار ثابت..... ۱۰۰

شکل ۳-۴۵: طیف جذبی مرتبه صفر ۱/۰۰، ۳/۰۰، ۶/۰۰، ۹/۰۰ و ۱۲/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیدروکینون بعد از ضرب مقدار ثابت (شکل ۳-۴۴) در طیف محلول ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیدروکینون..... ۱۰۱

- شکل ۳-۴۶: طیف جذبی محلول‌های سری کالیبراسیون حاوی رزورسینول و هیدروکینون در محدوده طول‌موج ۲۶۰-۳۰۰ نانومتر..... ۱۱۰
- شکل ۴-۱: نمایش میزان همبستگی غلظت‌های پیش‌بینی شده و غلظت‌های واقعی کتکول در مخلوط‌های سری تست، الف:..... ۱۱۹
- شکل ۴-۲: نمایش میزان همبستگی غلظت‌های پیش‌بینی شده و غلظت‌های واقعی هیدروکینون در مخلوط‌های تست، الف: در روش EXRSM، ب: در روش SRSM و ج: در روش PLS..... ۱۲۰
- شکل ۴-۳: نمایش میزان همبستگی غلظت‌های پیش‌بینی شده و غلظت‌های واقعی رزورسینول در مخلوط‌های سری تست، الف:..... ۱۲۲
- شکل ۴-۴: نمایش میزان همبستگی غلظت‌های پیش‌بینی شده و غلظت‌های واقعی هیدروکینون در مخلوط‌های سری تست، الف: در روش EXRSM، ب: در روش SRSM و ج: در روش PLS..... ۱۲۳

١ - مقدمه

۱-۱- مقدمه

توسعه صنعت باعث افزایش انتشار ترکیبات سمی به اتمسفر، آب و خاک شده است. بنزن و ترکیبات ناشی از سوخت و ساز^۱ آن، سهم زیادی در مشکلات بهداشت عمومی دارند [۱]. تعیین ترکیبات فنولی در بسیاری از زمینه‌ها مانند شیمی اعصاب، شیمی دارویی و شیمی بالینی اهمیت زیادی دارد [۲]. از جمله ترکیبات فنولی می‌توان به کتکول^۲، هیدروکینون^۳ و رزورسینول^۴ اشاره کرد. این ترکیبات ایزومرهای دی‌هیدروکسی بنزن هستند [۳]. با توجه به ساختار و خواص مشابه ایزومرها، جداسازی و تعیین این ترکیبات مشکل است [۴]. از طرف دیگر با توجه به اهمیت وجود این ایزومرها در منابع مختلف (از قبیل پساب‌های صنعتی، مواد دارویی و غذایی، آب و خاک) به دلیل سمیت بالا و زیست تخریب پذیری کم آن‌ها در محیط زیست، گسترش روش‌های سریع و ساده جهت تشخیص و تعیین این ترکیبات در مخلوط ضروری است [۵]. سازمان‌های بین‌المللی از جمله آژانس حفاظت از محیط زیست آمریکا (EPA)^۵ و اتحادیه اروپا (EU)^۶ این ترکیب را در اولویت آلاینده‌های مخرب محیط زیست گنجانده‌اند [۴]. ترکیبات فنولی آلاینده‌های سمی اند و یک خطر بالقوه برای سلامت انسان و موجودات آبی به‌شمار می‌روند. این ترکیبات اغلب از طریق باقیمانده‌های صنعتی ناشی از تولید پلاستیک، رنگ، مواد مخدر، رزین، آفت‌کش‌ها و خصوصاً کاغذ و سلولز وارد محیط‌های آبی می‌شوند [۶]. بنابراین ابتدا مروری بر خواص فیزیکی و شیمیایی کتکول، هیدروکینون و رزورسینول و کاربردها و کارهای گزارش شده در زمینه اندازه‌گیری همزمان این ایزومرها خواهیم داشت.

^۱ Metabolism

^۲ Catechol

^۳ Hydroquinone

^۴ Resorcinol

^۵ US Environmental Protection Agency

^۶ European Union

۱-۲- هیدروکینون

هیدروکینون (بنزن ۱-۴ دی ال) یک ترکیب آروماتیک متشکل از یک حلقه بنزن حاوی دو گروه OH در موقعیت پاراست. هیدروکینون به صورت کریستال‌های سفید است اما در تماس با هوا یا نور اکسید شده و تیره می‌گردد [۱]. هیدروکینون در آب و اتانول و اتر حل می‌شود، اما حلالیت هیدروکینون نسبت به دو ایزومر دیگر هیدروکسی بنزن کم‌تر است [۱].

هیدروکینون یکی از عمده‌ترین محصولات متابولیک بنزن است، که با آسیب به DNA و اختلال در سیستم ایمنی بدن به عنوان عامل سرطان‌زا شناخته شده است. غلظت بالای هیدروکینون می‌تواند به سردرد، خستگی، وزوز گوش، سرگیجه، تهوع، تورم اندام‌های داخلی، آسیب کلیوی و سوزش پوست منجر شود [۷]. انسان از طریق غذا، محیط زیست و محیط کار در معرض هیدروکینون قرار می‌گیرد [۱].

میکروارگانیسیم‌ها (مانند باکتری‌ها و قارچ‌ها) با کمک سیستم‌های آنزیمی بسیار پیچیده قادر به سوخت و ساز هیدروکینون تحت شرایط هوازی یا غیر هوازی هستند [۱]. از جمله کاربردهای هیدروکینون می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

۱- تثبیت کننده رنگ [۱]

۲- تولید روغن جلا و سوخت‌های موتور [۱]

۳- به عنوان آنتی‌اکسیدان [۱ و ۸]

۴- سفید کننده پوست با کاهش تولید ملانین پوست [۱۱] و صنایع داروسازی [۸]

۵- صنایع چرم‌سازی [۹]

۶- تهیه مواد شیمیایی مورد استفاده در عکاسی [۹]

۷- پالایشگاه نفت و صنایع پلاستیک [۱۰]

هیدروکینون به طور طبیعی در بسیاری از غذاهای گیاهی مانند میوه‌ها و گندم و نوشیدنی‌ها مانند قهوه دم کرده، چای، آب جو و شراب قرمز وجود دارد. هیدروکینون مصنوعی از متابولیسم (زیست دگرگونی) فنل یا بنزن ایجاد می‌شود [۱]. علاوه بر این هیدروکینون در ضایعات پالایشگاه نفت، زغال سنگ و قطران

زغال سنگ و هم‌چنین ضایعات کارخانه تولید فولاد و چرم وجود دارد [۱۱].

۱-۳- کتکول

کتکول، نام تجاری بنزن ۱-۲ دی ال است [۱۱].

کتکول سمی است و باعث کاهش عملکرد کبد می‌شود. غلظت بالای کتکول باعث افسردگی و اختلال

سیستم عصبی در انسان می‌شود [۳ و ۷].

کتکول به طور طبیعی در میوه‌ها و سبزیجات به میزان بسیار کم وجود دارد هم‌چنین در ضایعات

پالایشگاه نفت، زغال سنگ و قطران زغال سنگ، دود سیگار و هم‌چنین ضایعات کارخانه تولید فولاد و چرم

یافت می‌شود [۱۲].

از جمله کاربردهای کتکول می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

- ۱- حد واسط سنتز مواد شیمیایی کشاورزی، آفت کش‌ها و ترکیبات دارویی [۱]
- ۲- عامل ضد خوردگی [۱]
- ۳- حد واسط تهیه عطر و اسانس و مواد آرایشی [۱] و محصولات بهداشتی شخصی و خانگی [۱۳]
- ۴- آنتی اکسیدان برای صنایع لاستیک [۹]
- ۵- به عنوان مواد طعم‌دهنده در صنایع غذایی [۹]
- ۶- مهار کننده پلیمریزاسیون در داروسازی [۸]
- ۷- صنایع رنگ و عکاسی [۹ و ۱۳]
- ۸- صنایع نساجی [۷]

۱-۴- رزورسینول

رزورسینول یک ترکیب آروماتیک متشکل از یک حلقه بنزن حاوی دو گروه OH در موقعیت ارتو است [۱۴].

رزورسینول در طول تولید، پردازش و استفاده از محصولات حاوی رزورسینول و تخریب دیگر آلاینده‌های محیط زیست به ویژه مشتقات رزورسینول، به محیط زیست وارد می‌شود. قرار گرفتن در معرض رزورسینول باعث تحریک شدید پوست و سوزش و اگزمای پوستی، سوزش چشم و ورم ملتحمه خواهد شد. رزورسینول از طریق پوست و ریه جذب می‌شود [۱۴].

از جمله علائم مسمومیت ناشی از رزورسینول می‌توان به اسهال، تهوع، درد معده، سرگیجه و سر درد شدید، خواب آلودگی، عصبی بودن و یا بی‌قراری، تنگی نفس، خستگی یا ضعف غیر معمول اشاره کرد. استنشاق غلظت بالای رزورسینول می‌تواند منجر به مرگ انسان شود [۱۵].

برخی از کاربردهای رزورسینول در زیر آورده شده است.

۱- تولید رنگ، چسب و محصولات لاستیکی [۱۴].

۲- کاربرد اصلی رزورسینول در درمان جوش صورت (آکنه) و سایر بیماری‌های مربوط به پوست چرب است ولی در درمان اگزمای مزمن، پسوریازیس و هیدرادنیت عفونی نیز به کار می‌رود [۱۴].

۳- تهیه رنگ مو و لوازم آرایشی و بهداشتی [۱۴].

۱-۵- مروری بر کارهای انجام شده در تعیین همزمان

هیدروکینون، کتکول و رزورسینول به صورت مخلوط‌های

دوتایی و سه‌تایی

به دلیل ساختار و خواص مشابه ایزومرها، تعیین همزمان این ترکیبات به یک چالش تبدیل شده است [۴]. علاوه بر این با توجه به مطالب ارائه شده در بخش‌های قبل، اندازه‌گیری هیدروکینون، کتکول و

رزورسینول در نمونه‌های مختلف از اهمیت زیادی برخوردار است. بنابراین روش‌های متفاوتی برای اندازه‌گیری این ترکیبات به صورت مجزا و به صورت همزمان ارائه شده است. از جمله این روش‌ها می‌توان به روش‌های الکتروشیمیایی [۱۵]، نورتابی شیمیایی [۶]، اسپکترومتری جرمی [۱۷] و فلوئورسانس [۶ و ۱۸]، نورتابی الکتروشیمیایی [۱۲] و کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا [۱۱]، کروماتوگرافی گازی-اسپکترومتری جرمی [۹]، کروماتوگرافی موئینگی [۹] و اسپکتروفتومتری [۱۶] اشاره کرد.

در سال ۱۹۹۹ سوئی^۱ و همکارانش بر اساس مهار نورتابی شیمیایی حاصل از واکنش لومینول-پتاسیم هگزا سیانو فرات توسط فنول‌ها، با استفاده از یک آشکارساز نورتابی شیمیایی برای تشخیص پلی فنول‌ها و جداسازی آن‌ها توسط کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا، غلظت ترکیبات فنولی را اندازه‌گیری کردند. در این روش محدوده خطی کالیبراسیون برای کتکول، هیدروکینون و رزورسینول به ترتیب $(5 \times 10^{-8} - 5 \times 10^{-6})$ ، $(10^{-6} - 10^{-5})$ و $(5 \times 10^{-9} - 1/3 \times 10^{-8})$ گرم بر میلی‌لیتر و حد تشخیص روش برای سه ترکیب فوق به ترتیب $(3/7 \times 10^{-8})$ ، (2×10^{-9}) و $(6/8 \times 10^{-7})$ گرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است [۱۹].

در سال ۲۰۰۰ پندر^۲ و نسترنکو^۳ با استفاده از تکنیک کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا مجهز به دتکتور اسپکتروفتومتری میکرو-UVIS 20^۴، ایزومرهای دی هیدروکسی بنزن را در رنگ مو، به طور همزمان اندازه‌گیری کردند. در این کار با بهینه‌سازی پارامترهایی مانند غلظت و pH استونیتریل به عنوان شوینده و غلظت بافر گونه‌های فنولی از هم جدا شدند. در این روش، دامنه خطی برای کتکول، هیدروکینون و رزورسینول به ترتیب $0/2 - 50$ ، $0/5 - 40$ و $0/2 - 50$ میلی‌گرم بر لیتر و حد تشخیص برای سه ترکیب به ترتیب $0/11$ ، $0/06$ و $0/09$ میلی‌گرم بر لیتر گزارش شده است [۲۰].

^۱ Cui

^۲ Penner

^۳ Nesterenko

^۴ Micro-UVIS 20 spectrophotometric detector

در سال ۲۰۰۷ زائو^۱ و همکارانش با استفاده از یک روش نورتابی شیمیایی گرینش پذیر، کتکول و هیدروکینون را تعیین کردند. این روش بر اساس مهار واکنش نورتابی شیمیایی لومینول-پتاسیم پرمنگنات-بتا سیکلودکسترین (β -CD)^۲ است. بتا سیکلودکسترین به طور موثر می تواند باعث افزایش نورتابی ناشی از واکنش بین لومینول و پتاسیم پرمنگنات شود. در صورتی که وجود کتکول و هیدروکینون نورتابی حاصل از واکنش بین لومینول و پتاسیم پرمنگنات را به شدت کاهش می دهد. غلظت کتکول و هیدروکینون موجود در محیط با میزان کاهش نورتابی حاصل از این واکنش رابطه مستقیم دارد. دامنه خطی برای کتکول ۱-۲۰ و برای هیدروکینون ۱-۱۰ میکروگرم بر لیتر و حد تشخیص برای کتکول و هیدروکینون به ترتیب ۰/۴ و ۰/۱ میکروگرم بر لیتر است [۲۱].

در سال ۲۰۱۰ پیستونسی^۳ و همکارانش با استفاده از روش اسپکتروفلوریمتری و تکنیک های PLS و MLR هیدروکینون، رزورسینول، فنول، متا کرزول و پارا کرزول را اندازه گیری کردند. در این کار ابتدا عملیات میانگین گیری مرکزی^۴ روی طیف ترکیبات ذکر شده اعمال گردید و سپس غلظت هر گونه با استفاده از رگرسیون حداقل مربعات جزئی (PLS)^۵ و رگرسیون خطی چندگانه (MLR)^۶ پیش بینی شد. دامنه خطی برای رزورسینول و هیدروکینون به ترتیب (۰/۰۵-۰/۶) و (۰/۰۲-۰/۵) میلی گرم بر لیتر گزارش شده است [۲۲].

در سال ۲۰۱۴ کتکول و هیدروکینون به طور همزمان و با استفاده از الکتروکربن شیشه ای اصلاح شده با کمپلکس مس و نانو تیوب کربنی تک دیواره، توسط الشهرانی^۷ و همکارانش ولتامتری چرخه ای و ولتامتری پالس تفاضلی تعیین شد. نانو لوله های کربنی با تثبیت کمپلکس مس، مساحت سطح بالایی را جهت انتقال الکترون ایجاد می کنند. مس باعث انتقال پتانسیل اکسیداسیون کتکول و هیدروکینون به سمت پتانسیل های منفی می شود. ضخامت فیلم مس رفتار الکتروشیمیایی کتکول و هیدروکینون را تحت تاثیر قرار

^۱ Zhao

^۲ luminol-KMnO₄- β -cyclodextrin

^۳ Pistonesi

^۴ mean-centered

^۵ partial least square

^۶ multiple linear regression

^۷ Alshahrani

می‌دهد. محدوده خطی کالیبراسیون برای کتکول و هیدروکینون به ترتیب ۲۱۵-۵ و ۳۷۰-۵ میکرومولار و حد تشخیص برای کتکول و هیدروکینون به ترتیب ۳/۵ و ۱/۴۶ میکرو مولار گزارش شده است [۱۵].

در سال ۲۰۱۴ یانگ^۱ و لی^۲ برای اندازه‌گیری همزمان هیدروکینون، کتکول و رزورسینول از الکتروود اصلاح شده با نانو تیوب کربنی چند جداره استفاده کردند. هگزا دسیل تری متیل آمونیوم برماید (CTAB)^۳ با گرافن اکسید (GO) عامل‌دار شد. سپس کامپوزیت CTAB-GO و نانوتیوب کربنی چند جداره برای اصلاح الکتروود کربن شیشه‌ای استفاده شد. الکتروود اصلاح شده به‌عنوان کاتالیزور برای اکسیداسیون هیدروکینون، کتکول و رزورسینول استفاده گردید. از تکنیک ولتامتری چرخه‌ای در این اندازه‌گیری استفاده شد. دامنه خطی برای هیدروکینون، کتکول و رزورسینول به ترتیب $(10^{-4}-4 \times 10^{-7})$ ، $(10^{-4}-2 \times 10^{-7})$ و $(10^{-6}-10^{-4})$ مولار است. در این روش، حد تشخیص برای هیدروکینون، کتکول و رزورسینول به ترتیب 3×10^{-8} ، 10^{-8} و 10^{-7} 2×10^{-8} مولار است [۲۳].

در سال ۲۰۱۵ حسین^۴ و همکارانش با استفاده از ولتامتری چرخه‌ای و ولتامتری پالس تفاضلی هیدروکینون، کتکول و رزورسینول را اندازه‌گیری کردند. این کار با استفاده از الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با پلی گلوتامیک اسید انجام شد. الکتروود اصلاح شده با پلی گلوتامیک اسید به‌عنوان یک سنسور الکتروشیمیایی با تثبیت پتانسیل برای اندازه‌گیری این سه ایزومر به کار رفت. پیک ردوکس ایزومرها در حضور الکتروود شیشه‌ای کربن اصلاح شده با پلی گلوتامیک اسید در مقایسه با الکتروود کربن شیشه‌ای همپوشانی کمتری دارد. حد تشخیص برای هر سه ایزومر در حد میکرو مولار گزارش شده است. دامنه خطی برای هیدروکینون در حضور کتکول و رزورسینول $10^{-3}-10^{-1}$ میکرومولار و برای کتکول در حضور هیدروکینون

^۱ Yang

^۲ Li

^۳ Hexadecyl trimethyl ammonium bromide

^۴ Hossain

۳/۰-۱۵/۰ میکرومولار گزارش شده است [۲۴].

٢ - تئوری

۱-۲- مقدمه ای بر اسپکتروفتومتری

طیف‌بینی جذبی در ناحیه مرئی- ماورا بنفش مبتنی بر جذب تابش الکترومغناطیس که در گستره طول موج ۷۸۰-۱۹۰ نانومتر اعمال پذیر است. اندازه‌گیری‌های جذبی در ناحیه ماورا بنفش و مرئی کاربرد گسترده‌ای برای تعیین کمی انواع زیادی از گونه‌های معدنی و آلی پیدا کرده‌اند. طیف‌بینی جذب مولکولی بر اساس اندازه‌گیری عبور (T) یا جذب (A) محلول‌های موجود در سلول‌های شفاف استوار است. معمولاً غلظت (c) به‌طور خطی به جذب با معادله ۱-۲ ارتباط داده می‌شود [۲۵].

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

در معادله ۱-۲، P_0 توان تابش ورودی، P توان تابش خروجی، b طول مسیر تابش بر حسب سانتی‌متر و ϵ ضریب جذب مولی است.

مساله مهم در آنالیز چند جزئی اسپکتروفتومتری یک متغیره، تعیین همزمان دو یا چند جز در یک مخلوط، بدون جداسازی اولیه است [۲۶]. همپوشانی طیفی اجزای یک مخلوط دوتایی مانع از اندازه‌گیری اجزای مخلوط با استفاده از روش اسپکتروسکوپی مستقیم می‌شود [۲۷]. بنابراین روش‌های اسپکتروفتومتری یک متغیره و روش‌های اسپکتروفتومتری چند متغیره برای رفع همپوشانی طیفی اجزای یک مخلوط استفاده می‌شود. روش‌های اسپکتروفتومتری یک متغیره شامل تکنیک اسپکتروفتومتری مشتقی^۱ [۲۸ و ۲۹]، روش میانگین‌گیری از مرکز^۲ [۳۰]، روش توسعه یافته تفاضل نسبی (EXRSM)^۳، روش کم کردن نسبی همزمان

¹ Derivative spectrophotometry technique

² Mean Centering Method

³ Extended ratio subtraction method

(SRSM)^۱ و روش افزایش استاندارد نقطه اچ^۲ است. روش حداقل مربعات جرئی (PLS)^۳ از جمله روش‌های اسپکتروفتومتری چند متغیره برای اندازه‌گیری همزمان ترکیباتی است که همپوشانی طیفی دارند. در این کار هدف، اندازه‌گیری همزمان کتکول و هیدروکینون و اندازه‌گیری همزمان رزورسینول و هیدروکینون در مخلوط دوتایی از هر کدام با استفاده از روش‌های EXRSM، SRSM و PLS و مطالعه مقایسه‌ای این سه روش 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)^۴ و پیش‌بینی^۵ است. در مرحله کالیبراسیون، در چند غلظت معلوم از محلول‌های استاندارد آنالیت (متغیر 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^۶

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

^۱ Simultaneous ratio subtraction methods

^۲ H-point standard addition method

^۳ Partial least squares

^۴ Modeling

^۵ Prediction

^۶ Univariate Calibration

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 ۲-۳ نوشته می‌شود.

$$x = b_0 + b_1 y + e \quad \text{معادله ۲-۳}$$

روش‌های تک متغیره برای نمونه‌های بسیار ساده و عاری از هر گونه مزاحمت مورد استفاده قرار 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 [۳۱]. در اسپکتروسکوپی، معمولاً از طول موج ماکزیم آنالیت برای ساخت یک مدل کالیبراسیون تک متغیره استفاده می‌شود [۳۲]. 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 دقیق 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 آنالیز غیر خطی استفاده کرد [۳۲].

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

۲-۱-۱- روش گسترش یافته تفاضل نسبی (EXRSM)

اخیرا روش‌های اسپکتروفتومتری جدید و ساده برای تجزیه و تحلیل همزمان مخلوط دوتایی گسترش یافته است.

در سال ۲۰۰۸ برای اولین بار بردیسی^۱ و همکارانش از روش تفاضل نسبی (RSM)^۲ برای اندازه‌گیری همزمان دو جز در یک مخلوط دوتایی استفاده کردند [۳۳]. سپس با استفاده از مبانی روش RSM، در سال ۲۰۱۲ روش EXRSM توسط لطفی^۳ و همکارانش ارائه شد [۳۳ و ۳۴].

برای مخلوطی حاوی دو گونه X و Y (معادله ۲-۴ و معادله ۲-۵) که همپوشانی طیفی دارند و طیف یکی نسبت به دیگری گسترده تر است، می‌توان با استفاده از روش EXRSM، غلظت هر دو گونه را به‌دست آورد [۳۵].

برای تعیین غلظت جز X به‌صورت زیر عمل می‌شود:

طیف مخلوط حاوی X+Y (معادله ۲-۶) بر طیف غلظت معینی از گونه Y به‌عنوان مقسوم علیه (Y') تقسیم می‌شود (معادله ۲-۷). Y گونه‌ای است که جذب آن در طول موج‌های بلندتر صفر می‌شود و به‌عبارت دیگر دارای طیف گسترده‌تری است.

پس از تقسیم طیف مخلوط بر طیف غلظت معینی از Y (Y')، طیف حاصل دارای مقدار ثابتی است که بیانگر $\frac{C_x}{C_y}$ است و به‌صورت خط مستقیم به موازات محور طول‌موج قرار دارد (به‌عبارت دیگر مقدار ثابت در همان ناحیه‌ای از طول‌موج دیده می‌شود که طیف گونه Y نسبت به طیف گونه X گسترده‌تر است). سپس مقدار ثابت از طیف نسبی کم می‌شود (معادله ۲-۸). با ضرب طیف نسبی به‌دست آمده در طیف Y' (مقسوم علیه)، طیف مرتبه صفر گونه X به‌دست می‌آید (معادله ۲-۹). با اندازه‌گیری جذب در طول‌موج ماکزیمم گونه X از روی طیف مرتبه صفر به‌دست آمده و قرار دادن جذب آن در معادله رگرسیون حاصل از منحنی کالیبراسیون X، غلظت گونه X تعیین می‌شود [۳۶].

^۱ Bardicy

^۲ Ratio Subtraction Method

^۳ Lotfy

بیان ریاضی عملیات گفته شده را می توان به صورت زیر خلاصه کرد:

$$A_x = \epsilon_x b C_x \quad \text{معادله ۴-۲}$$

$$A_y = \epsilon_y b C_y \quad \text{معادله ۵-۲}$$

$$A_{x+y(\text{mix})} = \epsilon_x b C_x + \epsilon_y b C_y \quad \text{معادله ۶-۲}$$

در روابط بالا C_x و ϵ_x به ترتیب بیانگر غلظت و ضریب جذب مولی گونه X و C_y و ϵ_y به ترتیب غلظت و ضریب جذب مولی گونه Y و b طول سل دستگاه اسپکتروفتومتری است.

$$\frac{b\epsilon_x C_x + b\epsilon_y C_y}{b\epsilon_y C'_y} = \frac{b\epsilon_x C_x}{b\epsilon_y C'_y} + \frac{b\epsilon_y C_y}{b\epsilon_y C'_y} = \frac{\epsilon_x C_x}{\epsilon_y C'_y} + \frac{C_y}{C'_y} = \frac{\epsilon_x C_x}{\epsilon_y C'_y} + \text{constant} \quad \text{معادله ۷-۲}$$

$$\frac{\epsilon_x C_x}{\epsilon_y C'_y} + \text{constant} - \text{constant} = \frac{\epsilon_x C_x}{\epsilon_y C'_y} \quad \text{معادله ۸-۲}$$

$$\frac{\epsilon_x C_x}{\epsilon_y C'_y} \times \epsilon_y C'_y = \epsilon_x C_x \quad \text{معادله ۹-۲}$$

برای بسط دادن این روش و به عنوان یک رویکرد جدید، برای تعیین غلظت گونه Y ، به ترتیب زیر عمل می شود.

طیف مرتبه صفر به دست آمده برای X (معادله ۹-۲) بر طیف غلظت معینی از X به عنوان مقسوم علیه (X') ، تقسیم می شود. مقدار ثابت $\frac{C_x}{C'_x}$ حاصل از این تقسیم، به صورت خط مستقیم و موازی با محور طول موج دیده می شود.

سپس طیف مخلوط حاوی $X+Y$ بر طیف همان مقسوم علیه X (X') تقسیم می‌شود. عبارت $\frac{C_x}{C'_x}$ در معادله ۱۰-۲ همان مقدار ثابتی است که از تقسیم طیف مرتبه صفر به دست آمده برای X ، بر طیف غلظت معینی از X (به عنوان مقسوم علیه) به دست آمده بود. سپس با کسر مقدار ثابت (معادله ۱۱-۲) و ضرب طیف به دست آمده در طیف مقسوم علیه X (X')، طیف مرتبه صفر گونه Y به دست می‌آید (معادله ۱۲-۲).

به‌طور خلاصه می‌توان نوشت:

$$\frac{b\varepsilon_x C_x + b\varepsilon_y C_y}{b\varepsilon_x C'_x} = \frac{b\varepsilon_x C_x}{b\varepsilon_x C'_x} + \frac{b\varepsilon_y C_y}{b\varepsilon_x C'_x} = \frac{\varepsilon_x C_x}{\varepsilon_x C'_x} + \frac{\varepsilon'_y C'_y}{\varepsilon_x C'_x} = \frac{\varepsilon_y C_y}{\varepsilon_x C'_x} + \text{constant} \quad \text{معادله ۱۰-۲}$$

$$\frac{\varepsilon_y C_y}{\varepsilon_x C'_x} + \text{constant} - \text{constant} = \frac{\varepsilon_y C_y}{\varepsilon_x C'_x} \quad \text{معادله ۱۱-۲}$$

$$\frac{\varepsilon_y C_y}{\varepsilon_x C'_x} \times \varepsilon_x C'_x = \varepsilon_y C_y \quad \text{معادله ۱۲-۲}$$

با استفاده از معادله رگرسیون، که ناشی از رسم مقدار جذب گونه Y در طول موج ماکزیمم مربوط به آن بر حسب غلظت آن است، غلظت گونه Y به دست می‌آید [۳۶].

۲-۱-۲-۲- روش اندازه‌گیری کم کردن نسبی همزمان (SRSM)

روش SRSM بر مبنای روش RSM استوار است [۲۶ و ۳۳]. برای استفاده از روش SRSM باید مخلوطی حاوی دو جز (X و Y) با همپوشانی طیفی داشته باشیم که یکی از اجزا نسبت به دیگری در دامنه طول موج وسیع‌تری جذب دارد. به عبارت دیگر، طیف گسترده‌تری داشته باشد (مثلاً گونه Y). در این روش طیف مخلوط بر طیف غلظت معینی از Y (Y')، به عنوان مقسوم علیه) تقسیم می‌شود. پس از تقسیم طیف مخلوط بر طیف مقسوم علیه (Y')، طیف حاصل دارای مقدار ثابت $(\frac{C_y}{C'_y})$ است که به صورت خط مستقیم و موازی با محور طول موج قرار دارد (معادله ۱۳-۲).

$$\frac{b\varepsilon_x C_x + b\varepsilon_y C_y}{b\varepsilon_y C'_y} = \frac{b\varepsilon_x C_x}{b\varepsilon_y C'_y} + \frac{b\varepsilon_y C_y}{b\varepsilon_y C'_y} = \frac{\varepsilon_x C_x}{\varepsilon_y C'_y} + \frac{C_y}{C'_y} = \frac{\varepsilon_x C_x}{\varepsilon_y C'_y} + \text{constant}$$

معادله ۱۳-۲

سپس مقدار ثابت $(\frac{C_y}{C'_y})$ از طیف نسبی کم می‌شود و از روی طیف نسبی حاصل (پس از کم کردن

مقدار ثابت)، مقدار نسبی جذب در طول موج ماکزیمم جذب X اندازه‌گیری می‌شود (معادله ۱۴-۲).

$$\frac{\varepsilon_x C_x}{\varepsilon_y C'_y} + \text{constant} - \text{constant} = \frac{\varepsilon_x C_x}{\varepsilon_y C'_y}$$

معادله ۱۴-۲

سپس با قرار دادن مقدار نسبی جذب به دست آمده برای مخلوط (در طول موج ماکزیمم گونه X) در

منحنی کالیبراسیون مربوط، غلظت X در مخلوط محاسبه می‌گردد.

برای رسم منحنی کالیبراسیون X، طیف محلول‌های خالص X بر طیف غلظت معینی از Y ('Y')،

به‌عنوان مقسوم علیه) تقسیم می‌شود و سپس مقدار نسبی جذب در طول موج ماکزیمم X در هر محلول بر

حسب غلظت X در آن رسم می‌گردد.

برای به دست آوردن غلظت گونه Y، مقدار ثابت به دست آمده $(\frac{C_y}{C'_y})$ برای مخلوط در طیف محلول Y که به‌عنوان

مقسوم علیه استفاده شده بود ('Y')، ضرب می‌گردد. حاصل ضرب مقدار ثابت در طیف مقسوم علیه ('Y')، طیف

خالص مرتبه صفر مربوط به گونه Y را به دست می‌دهد (معادله ۱۵-۲).

$$\frac{\varepsilon_y C_y}{\varepsilon_y C'_y} \times \varepsilon_y C'_y = \varepsilon_y C_y$$

معادله ۱۵-۲

برای رسم منحنی کالیبراسیون Y، مقدار جذب در طول موج ماکزیمم جذب بر حسب غلظت Y رسم

می‌شود. با اندازه‌گیری جذب در طول موج ماکزیمم طیف خالص مرتبه صفر به دست آمده مربوط به Y و با

استفاده از منحنی کالیبراسیون Y، غلظت گونه Y محاسبه می‌گردد [۲۶].

روش دیگر برای محاسبه غلظت گونه Y به صورت زیر است.

با تقسیم طیف محلول‌های خالص (محلول‌های استاندارد Y) به طیف غلظت معینی از Y (طیف مقسوم علیه)، مقدار ثابت برای هر محلول استاندارد به دست می‌آید ($\frac{C_y}{C_{IY}}$). منحنی کالیبراسیون با رسم مقدار ثابت بر حسب غلظت Y، به دست می‌آید. سپس با جایگذاری مقدار ثابت حاصل از هر مخلوط در منحنی کالیبراسیون مربوط (مقدار ثابت بر حسب غلظت Y) غلظت گونه Y محاسبه می‌گردد [۳۵].

۲-۲-۲- کالیبراسیون چند متغیره^۱

کالیبراسیون چند متغیره یک اصطلاح کلی است که به توسعه یک مدل کمی برای پیش‌گویی صحیح ویژگی‌های مورد نظر ($y_1, y_2, y_3, \dots, y_q$) با استفاده از متغیرهای پیش‌گویی کننده ($x_1, x_2, x_3, \dots, x_q$) اطلاق می‌شود. در صورت عدم وجود روش‌های گزینش‌پذیر، با استفاده از کالیبراسیون چند متغیره می‌توان یک گونه را در حضور گونه‌های مزاحم یا چند آنالیت را در حضور یکدیگر و بدون جداسازی آنالیز کرد [۳۱]. 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 [۳۸]. با استفاده از کالیبراسیون چند متغیره می‌توان با بررسی مزاحمت‌ها، نویز را کاهش داد و علاوه بر این؛ داده‌های خارج از محدوده خطی را کنترل کرد. به طور کلی می‌توان گفت کالیبراسیون چند متغیره جنبه اکتشافی دارد [۳۲]. از جمله روش‌های کالیبراسیون چند متغیره می‌توان به روش حداقل مربعات جزئی (PLS) اشاره کرد.

۲-۲-۲-۱- حداقل مربعات جزئی (PLS)

الگوریتم اصلی PLS برای اولین بار در سال ۱۹۷۰ توسط ولد^۲ نوشته شد [۳۱]. امروزه PLS تکنیک اصلی برای آنالیز داده‌های چند متغیره به حساب می‌آید. یکی از جنبه‌های علمی و مهم روش PLS این است که خطاها را علاوه بر داده‌های غلظتی به داده‌های طیفی هم نسبت می‌دهد. برای انجام این کار کوواریانس (کوواریانس اندازه تغییرات هماهنگ بین دو متغیر تصادفی است و در یک حالت ایده آل منابع تغییرات در

^۱ Multivariate calibration

^۲ Wold

داده های اسپکتروسکوپی هم ارز منابع تغییرات در داده های غلظتی هستند) بین دو نوع متغیر یعنی متغیر R (داده های اسپکتروسکوپی) و متغیر C (داده های غلظتی) باید به حداقل برسد. در روش PLS فاکتورها طوری تعیین می شوند که هم تغییرات R و هم تغییرات C در نظر گرفته شود. در این عمل از داده های C برای محاسبه فاکتورهای R و از داده های R برای محاسبه فاکتورهای C استفاده می شود.

۲-۲-۱-۱- نحوه انتخاب تعداد فاکتورها در روش PLS

در سیستم هایی با رفتار مناسب و در حالت ایده آل تعداد فاکتورها برابر با تعداد گونه های موجود در یک نمونه (آنالیت ها) است. در صورتی که تعداد مناسب فاکتورها در محاسبات وارد نشود خطای پیش گویی زیاد خواهد بود. به این ترتیب که اگر تعداد فاکتورهای مورد استفاده در محاسبات بیش از تعداد فاکتورهای مورد نیاز باشد نویز وارد مدل کالیبراسیون شده و موجب کاهش قدرت پیش گویی مدل می شود. در صورتی که تعداد فاکتورهای وارد شده در محاسبات کمتر از تعداد فاکتورهای مورد نیاز باشد، موجب حذف بخشی از اطلاعات و سیگنال ها شده و قدرت پیش گویی مدل کالیبراسیون کاهش می یابد. بنابراین باید تعداد فاکتورهای مناسب را با استفاده از یک روش مطمئن تعیین کرد.

قبل از بیان نحوه انتخاب تعداد بهینه فاکتورهای PLS، ماتریس امتیاز و ماتریس بارگیری به طور مختصر شرح داده می شود.

PCA^۱ روش آماری مبتنی بر فاکتورها می باشد که قادر است با چرخش محور مختصات حول مبدا، اطلاعات زاید موجود در ماتریس جذب را حذف کند و فقط اطلاعات مفید آن را در ماتریسی با ابعاد کوچک تر ارائه دهد. این کار با به دست آوردن حداقل بردارهای عمود بر هم (فاکتورها) که شامل همه اطلاعات مفید و مهم هستند، انجام می گیرد [۳۱].

^۱ Principal Component Analysis

داده‌های شیمیایی حاوی منابع زیادی از تغییرات هستند، این تغییرات مربوط به تغییر در ترکیب نمونه‌ها و تغییر تدریجی در سیستم اندازه‌گیری و نویز است. PCA این منابع تغییرات را از هم جدا کرده و داده‌ها را به صورت یک ترکیب خطی از مشاهدات نشان می‌دهد. در نتیجه پیچیدگی داده‌های زیاد کاهش یافته و مسائل تجزیه‌ای آسان می‌شود. در واقع تکنیک PCA، ماتریس داده‌ها (ماتریس R) با ابعاد $n \times m$ را به دو ماتریس کوچک‌تر تقسیم می‌کند. یکی از آن‌ها ماتریس امتیاز $(T)^1$ و دیگری ماتریس بارگیری $(P)^2$ می‌باشد که بر هم عمودند [۳۱].

برای انتخاب تعداد بهینه فاکتورها (بردارها)، در هر مرحله ابتدا برای T (ماتریس امتیاز) و P (ماتریس بارگیری) یک فاکتور محاسبه شده و غلظت گونه مجهول به وسیله مدل تعیین می‌شود. در این روش دو سری محلول جداگانه برای ارزیابی و پیش‌بینی وجود دارد. ابتدا با استفاده از نمونه‌های ارزیابی، مدل‌سازی انجام می‌شود و سپس غلظت نمونه‌های تست به وسیله مدل تعیین می‌گردد. روش مورد استفاده برای تعیین تعداد فاکتورها در این پروژه، محاسبه خطا برای سری تست می‌باشد. در این روش برای سری ارزیابی، تعداد فاکتورها را تغییر داده و هر بار خطا برای سری تست محاسبه می‌شود. تعداد فاکتوری با کمترین میزان خطا به عنوان تعداد فاکتور بهینه انتخاب می‌شود. محاسبه فاکتورهای PLS یک فرایند تکراری است [۳۱].

¹ Score Matrix

² Loading Matrix

۳ - تجرّبی

۳-۱- اندازه گیری همزمان کتکول و هیدروکینون با استفاده از

روش های اسپکتروفتومتری جدید

با توجه به اهمیت و کاربردهای کتکول و هیدروکینون که در فصل اول به آن‌ها اشاره گردید، ارائه روشی حساس، ساده و گزینش پذیر برای اندازه گیری مقادیر بسیار کم آن‌ها ضروری است. در این فصل دو روش اسپکتروفتومتری جدید برای اندازه گیری همزمان این دو ترکیب ارائه شده است.

۳-۲- محلول های مورد استفاده و طرز تهیه آن‌ها

در تهیه تمام محلول‌ها از آب مقطر و مواد شیمیایی با خلوص تجزیه‌ای تهیه شده از شرکت مرک^۱ استفاده گردید. محلول‌های هیدروکینون و کتکول با غلظت‌های ۵۰۰/۰ میلی گرم بر لیتر، از انحلال ۰/۰۵۰۰ گرم هیدروکینون خالص و رقیق کردن آن با آب مقطر، در بالن حجمی ۱۰۰ میلی لیتری تهیه شد. محلول‌های رقیق تر هر روز با رقیق سازی متوالی از محلول ۵۰۰/۰ میلی گرم بر لیتر تازه تهیه شده، ساخته شد. محلول‌های بافر فسفاتی با $pH=5/0-9/0$ ، از مخلوط کردن حجم‌های معین از محلول‌های ۰/۰۶۰ مولار دی سدیم هیدروژن فسفات و ۰/۰۶۰ مولار پتاسیم دی هیدروژن فسفات در بالن حجمی ۱۰۰ میلی لیتری تهیه شد. برای تهیه محلول‌هایی با $pH=2/0-4/0$ ، از محلول‌های فسفریک اسید ۱/۰۰ مولار و پتاسیم دی هیدروژن فسفات ۰/۰۶۰ مولار استفاده شد. برای تهیه بافر سیتراتی با $pH=7/0$ حجم‌های معین از محلول‌های ۰/۱۰ مولار سیتریک اسید و ۰/۱۰ مولار سدیم هیدروکسید استفاده شد. بافر فتالاتی $pH=7/0$ با مخلوط کردن حجم‌های معین از محلول پتاسیم هیدروژن فتالات ۰/۲۰ نرمال و محلول سدیم هیدروکسید ۰/۱۰ مولار تهیه شد. pH

^۱ Merck

محلول‌های تهیه شده با افزودن قطراتی از زوج اسیدی و یا زوج بازی مربوط به هر بافر و با استفاده از pH متر، تنظیم گردید [۳۹].

۳-۳- دستگاه‌ها و وسایل مورد استفاده

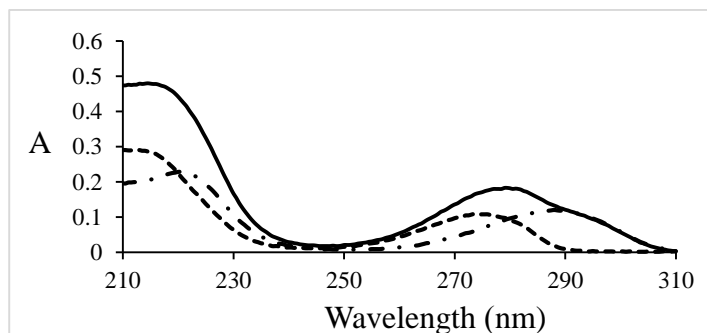
برای ثبت طیف‌های جذبی در ناحیه مرئی- فرابنفش از یک اسپکتروفوتومتر دو پرتوئی ریلی مدل ۲۶۰۱ UV- مجهز به یک جفت سل کوارتز ۱/۰ سانتی‌متری و برای اندازه‌گیری pH از دستگاه pH- متر مترام^۲ مدل ۷۴۴ مجهز به یک الکتروود غشای شیشه-کالومل (۳ مولار) استفاده شد.

۳-۴- طیف جذبی

طیف جذبی محلول‌های کتکول، هیدروکینون و مخلوط حاوی این دو گونه در گستره طول‌موج ۲۱۰-۳۱۰ نانومتر در شکل ۱-۳ نشان داده شده است. برای ثبت طیف جذبی محلول نمونه به این ترتیب عمل شد که، به یک بالن حجمی ۱۰ میلی‌لیتری به ترتیب ۱/۰۰ میلی‌لیتر محلول هیدروکینون یا کتکول با غلظت ۵۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفاتی pH=۷/۰ اضافه شد و با آب مقطر تا خط نشانه بالن رقیق گردید. برای ثبت طیف جذبی مخلوط به این ترتیب عمل شد که، به یک بالن حجمی ۱۰ میلی‌لیتری به ترتیب ۱/۰ میلی‌لیتر محلول هیدروکینون و ۱/۰۰ میلی‌لیتر محلول کتکول با غلظت ۵۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفاتی pH=۷/۰ اضافه شد. محلول حاصل تا حجم ۱۰/۰۰ میلی‌لیتر با آب مقطر رقیق گردید. پس از یکنواخت کردن محلول، مقداری از آن به داخل سل اسپکتروفوتومتر منتقل و طیف جذبی هر یک نسبت به شاهد در ناحیه ۲۱۰-۳۱۰ نانومتر، ثبت شد (شکل ۱-۳). برای تهیه محلول شاهد مانند روش فوق عمل شد، با این تفاوت که به محلول شاهد، کتکول و یا هیدروکینون اضافه نشد.

^۱ Uv- 2601 Reileigh

^۲ Metrohm 744



شکل ۳-۱: طیف جذبی ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر کتکول (- - -)، طیف جذبی ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر هیدروکینون (· - · - ·) و طیف جذبی مخلوط ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر از کتکول و هیدروکینون با غلظت ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر از هر یک در $\text{pH}=7/0$ (—)

با توجه به شکل ۳-۱، ماکزیمم مقدار جذب برای کتکول در طول موج ۲۷۵ نانومتر و برای هیدروکینون در ۲۸۶/۵ نانومتر مشاهده شد. همان طور که در شکل ۳-۱ مشاهده می شود، امکان اندازه گیری هر یک از این دو ایزومر به طور جداگانه در یک مخلوط، به روش اسپکترومتری معمولی به طور مستقیم، امکان پذیر نیست. لذا برای اندازه گیری این دو گونه در مخلوط، از روش های اسپکتروفتومتری ارائه شده جدید [۲۶] استفاده شد. نتایج نشان داد که پیک های جذبی در طول موج های ۲۷۵ و ۲۸۶/۵ نانومتر به ترتیب با غلظت کتکول و هیدروکینون متناسب است. بنابراین در بهینه سازی متغیرهای تجربی موثر بر حساسیت روش و استخراج منحنی های کالیبراسیون برای هر یک از ترکیبات، از مقدار جذب محلول هر ترکیب نسبت به شاهد در طول موج های ذکر شده، به عنوان سیگنال تجزیه ای استفاده شد.

۳-۵- بررسی و بهینه سازی متغیرهای موثر بر حساسیت روش های

اندازه گیری کتکول و هیدروکینون

برای رسیدن به بهترین گزینش پذیری و حساسیت در نتیجه حد تشخیص بهتر، متغیرهای موثر بر میزان جذب کتکول و هیدروکینون مورد بررسی قرار گرفت و بهینه شد. در بررسی متغیرهای موثر از روش

بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان^۱ استفاده گردید. در این روش تمام متغیرها ثابت در نظر گرفته شده و متغیری که بایستی بهینه شود، تغییر داده می‌شود تا مقدار بهینه آن مشخص گردد. متغیرهایی که مورد بررسی قرار گرفتند به ترتیب عبارتند از:

۱- pH محلول بافر

۲- نوع بافر

۳- حجم بافر

۴- قدرت یونی

در ادامه، نتیجه بررسی هر کدام از متغیرهای فوق را بر میزان سیگنال تجزیه‌ای مورد بحث قرار می‌دهیم. برای بهینه‌سازی متغیرها به صورت زیر عمل شد: به یک بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری، ۲/۰۰ میلی لیتر از بافر مورد نظر و ۱/۰۰ میلی لیتر از محلول ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر کتکول یا هیدروکینون اضافه گردید، محلول حاصل با آب مقطر تا خط نشانه بالن رقیق شد. برای تهیه محلول شاهد مانند روش فوق عمل شد، با این تفاوت که به محلول شاهد، کتکول و یا هیدروکینون اضافه نشد.

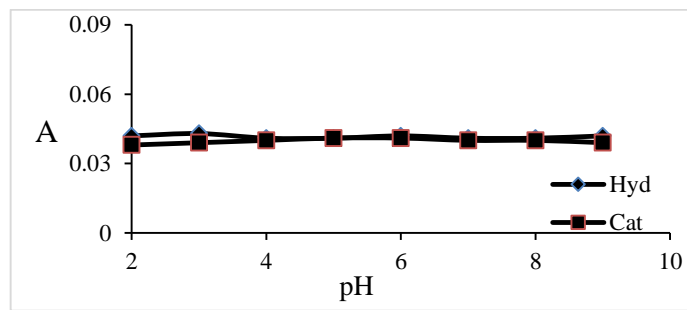
۳-۵-۱- بررسی اثر pH

اثر pH بر جذب و طول موج ماکزیمم جذب هیدروکینون و کتکول در ناحیه ۹/۰ - ۲/۰ مورد بررسی قرار گرفت. این بررسی در حضور غلظت ۲/۰۰ میلی گرم بر لیتر کتکول یا هیدروکینون و ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفاتی انجام شد. نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۳-۱ و شکل ۳-۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد مقادیر جذب و طول موج ماکزیمم جذب برای کتکول و هیدروکینون به ترتیب در ۲۷۵ و ۲۸۶/۵ نانومتر، در دامنه ۹/۰ - pH=۲/۰ ثابت است. لذا با در نظر گرفتن گزینش پذیری روش و با توجه به این که در pH های اسیدی امکان هیدرولیز کتکول و یا هیدروکینون و در pH های بازی احتمال رسوب گونه‌های مزاحم وجود دارد، محلول بافری با pH=۷/۰ برای مطالعات و بررسی‌های بعدی انتخاب گردید.

^۱ One-at-a time

جدول ۳-۱: نتایج حاصل از بررسی اثر pH

pH	جذب هیدروکینون	طول موج ماکزیمم هیدروکینون	جذب کتکول	طول موج ماکزیمم کتکول
۲/۰	۰/۰۴۵	۲۸۶/۵	۰/۰۳۸	۲۷۵
۳/۰	۰/۰۴۶	۲۸۶/۵	۰/۰۳۹	۲۷۵
۴/۰	۰/۰۴۴	۲۸۶/۵	۰/۰۴۱	۲۷۵
۵/۰	۰/۰۴۴	۲۸۶/۵	۰/۰۴۱	۲۷۵
۶/۰	۰/۰۴۵	۲۸۶/۵	۰/۰۴۰	۲۷۵
۷/۰	۰/۰۴۴	۲۸۶/۵	۰/۰۴۰	۲۷۵
۸/۰	۰/۰۴۴	۲۸۶/۵	۰/۰۳۹	۲۷۵
۹/۰	۰/۰۴۵	۲۸۶/۵	۰/۰۳۹	۲۷۵



شکل ۳-۲: بررسی اثر pH، شرایط: ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفات و غلظت ۲/۰۰ میلی گرم بر لیتر کتکول و هیدروکینون

۳-۵-۲- بررسی نوع بافر با pH= ۷/۰

برای انجام این کار ابتدا محلول های بافر با pH= ۷/۰ از نوع فسفات، فتالاتی و سیتراتی مطابق بخش ۳-۲- تهیه شد و اثر نوع بافر بر سیگنال تجزیه ای کتکول و هیدروکینون مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی به یک بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری حاوی ۱/۰۰ میلی لیتر محلول ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر کتکول یا هیدروکینون، ۲/۰۰ میلی لیتر از بافر مورد نظر اضافه و تا خط نشانه بالن با آب مقطر رقیق گردید. برای تهیه محلول شاهد مانند روش فوق عمل شد، با این تفاوت که به محلول شاهد، کتکول و یا هیدروکینون اضافه

نشد. سپس جذب هر محلول در طول موج ماکزیمم جذب خودش اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۲-۳ نشان داده شده است.

نتایج نشان داد سیگنال تجزیه‌ای در حضور بافر فسفات‌ی با $\text{pH} = 7/0$ در مقایسه با بافر سیتراتی تقریباً ثابت است، بنابراین به منظور دستیابی به حساسیت بیشتر و حد تشخیص بهتر، بافر فسفات‌ی برای بررسی‌های بعدی انتخاب شد. به دلیل وجود حلقه بنزن در ساختار بافر فتالاتی، جذب کتکول و هیدروکینون در مقایسه با جذب بافر فتالاتی در ناحیه طول‌موج ۳۱۰-۲۱۰ نانومتر، ناچیز بود بنابراین از بافر فتالاتی نمی‌توان استفاده کرد.

جدول ۲-۳: نتایج حاصل از بررسی نوع بافر

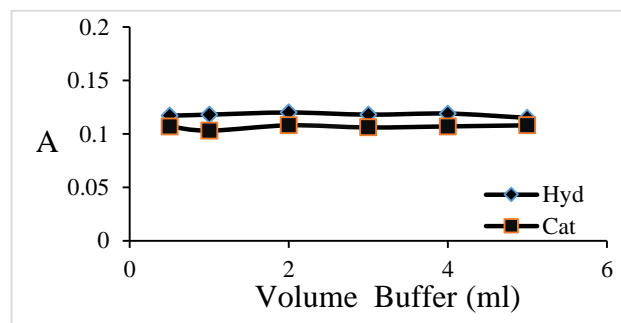
نوع بافر	جذب هیدروکینون در طول‌موج ۲۸۶/۵ نانومتر	جذب کتکول در طول‌موج ۲۷۵ نانومتر
سیتراتی	۰/۰۴۴	۰/۰۴۰
فسفات‌ی	۰/۰۴۷	۰/۰۴۳

۳-۵-۳- بررسی حجم بافر

اثر حجم بافر فسفات‌ی با $\text{pH} = 7/0$ در دامنه ۵/۰۰ - ۰/۵۰ میلی‌لیتر مورد بررسی قرار گرفت. این بررسی در حضور محلول ۲/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کتکول یا هیدروکینون انجام شد. این بررسی به این صورت انجام شد که ۱/۰۰ میلی‌لیتر محلول هیدروکینون یا کتکول ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، به یک بالن حجمی ۱۰ میلی‌لیتری منتقل گردید. سپس حجم مورد نظر از بافر فسفات‌ی $\text{pH} = 7/0$ به آن افزوده شد و با آب مقطر تا خط نشانه بالن، رقیق شد (محلول نمونه). محلول شاهد مثل محلول نمونه تهیه گردید، با این تفاوت که به آن هیدروکینون و یا کتکول افزوده نشد. جذب محلول نمونه نسبت به محلول شاهد در طول موج ماکزیمم جذب مربوط اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۳-۳ و شکل ۳-۳ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که در حجم‌های متفاوت بافر، سیگنال تجزیه‌ای ثابت و یکسان است. در بررسی‌های بعدی برای اطمینان از کافی بودن ظرفیت بافری حجم ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات‌ی $\text{pH} = 7/0$ انتخاب شد.

جدول ۳-۳: نتایج حاصل از بررسی حجم بافر فسفاتی

حجم بافر (میلی لیتر)	جذب هیدروکینون در طول موج ۲۸۶/۵ نانومتر	جذب کتکول در طول موج ۲۷۵ نانومتر
۰/۵۰	۰/۰۴۷	۰/۰۴۳
۱/۰۰	۰/۰۴۷	۰/۰۴۱
۲/۰۰	۰/۰۴۸	۰/۰۴۳
۳/۰۰	۰/۰۴۷	۰/۰۴۲
۴/۰۰	۰/۰۴۸	۰/۰۴۳
۵/۰۰	۰/۰۴۶	۰/۰۴۳



شکل ۳-۳: بررسی اثر حجم بافر فسفاتی با $\text{pH} = 7/0$ در حضور غلظت $2/00$ میلی گرم بر لیتر کتکول (طول موج ۲۷۵ نانومتر) و یا هیدروکینون (طول موج ۲۸۶/۵ نانومتر)

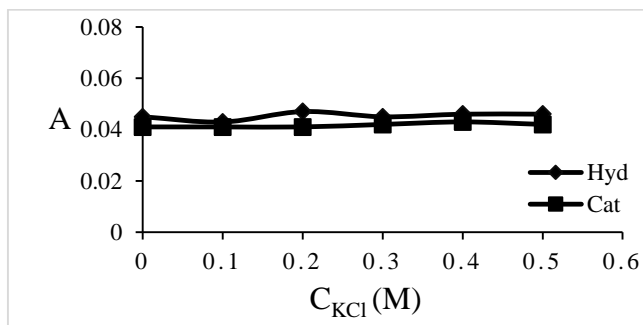
۳-۵-۴- بررسی اثر قدرت یونی

تاثیر قدرت یونی بر سیگنال تجزیه‌ای کتکول و هیدروکینون با استفاده از KCl در محدوده غلظتی $0/50 - 0/10$ مولار مورد بررسی قرار گرفت. این بررسی به این صورت انجام شد که $1/00$ میلی لیتر محلول هیدروکینون یا کتکول $20/00$ میلی گرم بر لیتر و $2/00$ میلی لیتر بافر فسفاتی $\text{pH} = 7/0$ ، به یک بالن حجمی 10 میلی لیتری منتقل شد. سپس حجم مورد نظر از محلول KCl با غلظت $1/00$ مولار، به آن افزوده گردید و با آب مقطر تا خط نشانه بالن، رقیق گردید (محلول نمونه). محلول شاهد مثل محلول نمونه تهیه شد، با این تفاوت که به آن هیدروکینون، کتکول و یا KCl افزوده نشد. جذب محلول نمونه نسبت به محلول شاهد در طول موج ماکزیمم جذب مربوط اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل در جدول ۳-۴ و شکل ۳-۴ نشان داده شده

است. نتایج به دست آمده بیانگر این است که قدرت یونی بر جذب کتکول و هیدروکینون اثری ندارد.

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

غلظت پتاسیم کلرید (مولار)	جذب هیدروکینون در طول موج ۲۸۶/۵ نانومتر	جذب کتکول در طول موج ۲۷۵ نانومتر
۰/۰۰	۰/۰۴۵	۰/۰۴۱
۰/۱۰	۰/۰۴۳	۰/۰۴۱
۰/۲۰	۰/۰۴۷	۰/۰۴۱
۰/۳۰	۰/۰۴۵	۰/۰۴۲
۰/۴۰	۰/۰۴۶	۰/۰۴۳
۰/۵۰	۰/۰۴۶	۰/۰۴۲



شکل ۳-۴: بررسی اثر قدرت یونی. شرایط: محلول‌های ۲/۰۰ میلی گرم بر لیتر کتکول (طول موج ۲۷۵ نانومتر) و یا هیدروکینون (طول موج ۲۸۶/۵ نانومتر)، در حضور ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفات با $pH = 7/0$

۳-۶- شرایط بهینه

با توجه به نتایج تجربی حاصل از بررسی و بهینه‌سازی پارامترهای موثر بر جذب در طول موج‌های

ماکزیمم مربوط به کتکول و هیدروکینون، ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفات با $pH = 7/0$ انتخاب شد و در

آزمایش‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

۷-۳- رسم منحنی کالیبراسیون

در شرایط بهینه، منحنی کالیبراسیون برای اندازه‌گیری کتکول و هیدروکینون به دست آمد. روش کار

به صورت زیر بود:

۱-۷-۳- کالیبراسیون یک متغیره

۱-۱-۷-۳- تعیین دامنه خطی کتکول و هیدروکینون به صورت جداگانه

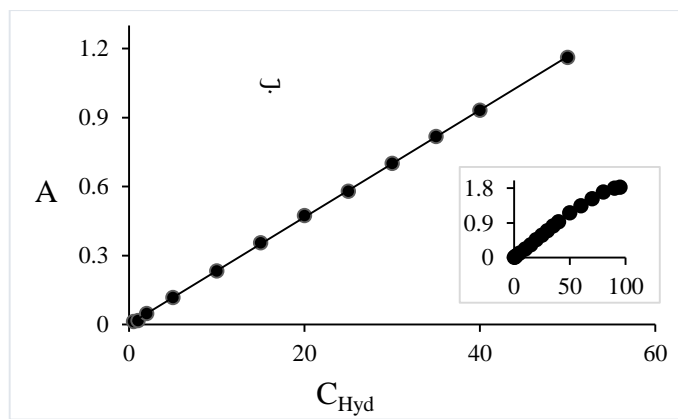
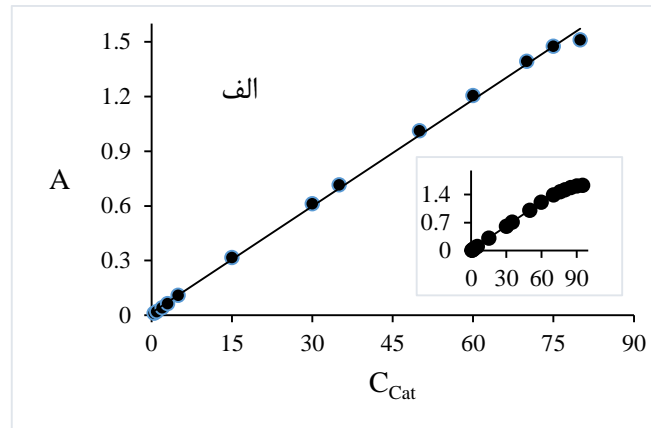
در شرایط بهینه، منحنی کالیبراسیون برای اندازه‌گیری کتکول و هیدروکینون به طور جداگانه برای هر یک به دست آمد. روش کار برای استخراج منحنی کالیبراسیون منفرد برای هر کدام از ترکیبات به صورت زیر بود. به یک سری بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری، ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفات با $\text{pH} = 7.0$ و مقادیر متفاوت از کتکول یا هیدروکینون اضافه و با آب مقطر تا خط نشانه بالن رقیق گردید. مقدار لازم از محلول به سل دستگاه اسپکتروفتومتر منتقل شده و جذب هر محلول در طول موج ماکزیمم ۲۷۵ و ۲۸۶/۵ نانومتر به ترتیب برای کتکول و هیدروکینون نسبت به شاهد اندازه‌گیری و ثبت گردید و نتایج حاصل در جدول ۳-۵ آمده است.

جدول ۵-۳: نتایج حاصل برای رسم منحنی کالیبراسیون کتکول و هیدروکینون به صورت مجزا

غلظت (میلی گرم بر لیتر)	جذب محلول کتکول در طول موج ۲۷۵ نانومتر	جذب محلول هیدروکینون در طول موج ۲۸۶/۵ نانومتر
۰/۵۰	۰/۰۱۱	۰/۰۱۳
۱/۰۰	۰/۰۲۰	۰/۰۱۸
۲/۰۰	۰/۰۴۰	۰/۰۴۸
۵/۰۰	۰/۱۰۹	۰/۱۱۸
۱۵/۰۰	۰/۳۱۶	۰/۳۵۵
۳۰/۰۰	۰/۶۱۱	۰/۷۰۱
۳۵/۰۰	۰/۷۱۵	۰/۸۱۸
۵۰/۰۰	۱/۰۱۲	۱/۱۶۱
۶۰/۰۰	۱/۲۰۶	۱/۳۶۱
۷۰/۰۰	۱/۳۹۴	۱/۵۷۳
۸۰/۰۰	۱/۵۱۱	۱/۷۵۶
۹۰/۰۰	۱/۶۶۷	۱/۷۵۶
۹۵/۰۰	۱/۵۶۳	۱/۸۲۰

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

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



شکل ۳-۵: الف: منحنی کالیبراسیون کتکول، ب: منحنی کالیبراسیون هیدروکینون.
تحت شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفات با pH=۷/۰

جدول ۳-۶: نتایج حاصل از کالیبراسیون تک متغیره

هیدروکینون ($\lambda_{max} = 286/5 \text{ nm}$)	کتکول ($\lambda_{max} = 275 \text{ nm}$)	ترکیب
۰/۵۰-۵۰/۰	۰/۵۰-۸۰/۰	ناحیه خطی (میلی گرم بر لیتر)
$A = 0.0233 C_{Hyd} + 0.0013$ (n=12)	$A = 0.0195 C_{Cat} + 0.0131$ (n=13)	معادله رگرسیون
۰/۹۹۹۹	۰/۹۹۸۶	R^2

در جدول ۳-۶، A سیگنال تجزیه‌ای مربوط به هر گونه (جذب محلول نمونه نسبت به محلول شاهد) در طول موج مربوط به هر گونه، C_{Cat} و C_{Hyd} به ترتیب، غلظت کتکول و هیدروکینون بر حسب میلی‌گرم بر لیتر و R^2 مجذور ضریب همبستگی برای هر نمودار است.

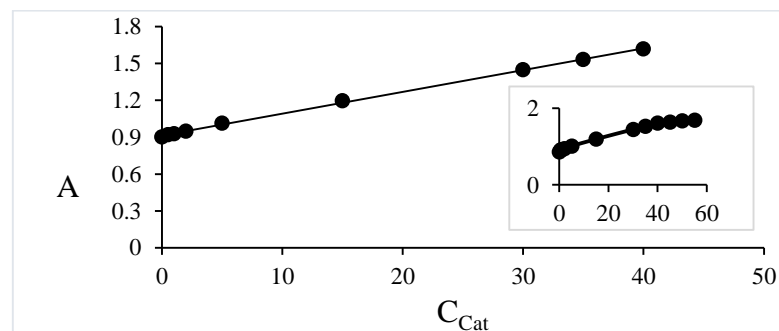
۳-۷-۱-۲- تعیین دامنه خطی کتکول و هیدروکینون در حضور یکدیگر

در طول موج ماکزیمم هر یک از گونه‌ها، گونه دیگر دارای جذب است، بنابراین ممکن است در حضور کتکول یا هیدروکینون ارتباط خطی بین غلظت و جذب در غلظت‌های بالای هیدروکینون یا کتکول از بین برود؛ از این رو محدوده خطی هر گونه در حضور دیگری بررسی گردید. روش کار در استخراج منحنی کالیبراسیون کتکول و هیدروکینون در حضور هم، مانند تعیین منحنی کالیبراسیون منفرد برای کتکول یا هیدروکینون است، با این تفاوت که در این مرحله کتکول و هیدروکینون، هر دو حضور دارند. ابتدا؛ خطی بودن رابطه جذب بر حسب غلظت کتکول در حد بالای دامنه خطی هیدروکینون (۵۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر) بررسی شد. ۲/۰۰ میلی‌لیتر محلول ۲۵۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیدروکینون و ۲/۰۰ میلی‌لیتر محلول بافر ۷/۰ pH= به یک بالن ۱۰ میلی‌لیتری منتقل شد و سپس حجم‌های مختلفی از محلول کتکول به آن منتقل شد و با آب مقطر رقیق گردید. محلول شاهد مثل محلول نمونه تهیه شد، با این تفاوت که به آن محلول‌های کتکول یا هیدروکینون افزوده نشد. سپس جذب هر محلول نمونه نسبت به محلول شاهد در طول موج ماکزیمم جذب کتکول (۲۷۵ نانومتر) اندازه‌گیری و ثبت شد (جدول ۳-۷).

نتایج جدول ۳-۷ و شکل ۳-۶ نشان می‌دهد که جذب با غلظت کتکول در دامنه ۴۰/۰۰-۵۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر، در حضور ۵۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر هیدروکینون رابطه خطی دارد. در جدول ۳-۸ معادله رگرسیون و مجذور ضریب همبستگی آورده شده است.

جدول ۳-۷: نتایج حاصل از بررسی منحنی کالیبراسیون کتکول در حضور هیدروکینون

محلول	غلظت کتکول در حضور ۵۰/۰ میلی گرم بر لیتر هیدروکینون	جذب محلول در طول موج ماکزیمم کتکول (۲۷۵ نانومتر)
۱	۰/۰۰	۰/۹۰۱
۲	۰/۵۰	۰/۹۱۹
۳	۱/۰۰	۰/۹۲۷
۴	۲/۰۰	۰/۹۴۸
۵	۵/۰۰	۱/۰۱۴
۶	۱۵/۰۰	۱/۱۹۶
۷	۳۰/۰۰	۱/۴۴۹
۸	۳۵/۰۰	۱/۵۳۱
۹	۴۰/۰۰	۱/۶۱۸
۱۰	۴۵/۰۰	۱/۶۴۶
۱۱	۵۰/۰۰	۱/۶۷۷
۱۲	۵۵/۰۰	۱/۶۹۰



شکل ۳-۶: منحنی کالیبراسیون کتکول در حضور ۵۰/۰ میلی گرم بر لیتر هیدروکینون در شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفات با pH=۷/۰

جدول ۳-۸: نتایج حاصل از بررسی کالیبراسیون کتکول در حضور ۵۰/۰ میلی گرم بر لیتر هیدروکینون

۰/۵۰- ۴۰/۰۰	ناحیه خطی (میلی گرم بر لیتر)
$A = 0.0178 C_{Cat} + 0.9134$ (n= ۸)	معادله رگرسیون
۰/۹۹۹۱	R^2

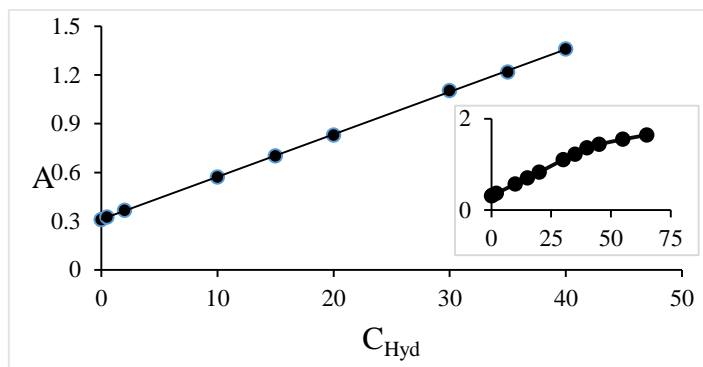
در جدول ۳-۸، A سیگنال تجزیه‌ای کتکول (جذب محلول نمونه نسبت به محلول شاهد) در طول موج

ماکزیمم (۲۷۵ نانومتر)، C_{Cat} غلظت کتکول بر حسب میلی گرم بر لیتر و R^2 مجذور ضریب همبستگی نمودار است.

سپس خطی بودن رابطه جذب بر حسب غلظت هیدروکینون در حد بالای دامنه خطی کتکول (۸۰/۰) میلی گرم بر لیتر) بررسی شد. ۲/۰۰ میلی لیتر محلول ۳۰۰/۰ میلی گرم بر لیتر کتکول و ۲/۰۰ میلی لیتر محلول بافر $pH=7/00$ به یک بالن ۱۰ میلی لیتری منتقل شد و سپس حجم‌های مختلفی از محلول هیدروکینون به آن منتقل و با آب مقطر رقیق شد. محلول شاهد مثل محلول نمونه تهیه گردید، با این تفاوت که به آن محلول‌های کتکول یا هیدروکینون افزوده نشد. سپس جذب هر محلول نمونه نسبت به محلول شاهد در طول موج ماکزیمم جذب هیدروکینون (۲۸۶/۵ نانومتر) اندازه‌گیری و ثبت شد (جدول ۳-۸). نتایج جدول ۳-۹ و شکل ۳-۷ نشان می‌دهد که جذب با غلظت هیدروکینون در دامنه ۰/۵۰-۳۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر، در حضور ۶۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر کتکول رابطه خطی دارد.

جدول ۳-۹: نتایج حاصل از بررسی منحنی کالیبراسیون هیدروکینون در حضور کتکول

محلول	غلظت هیدروکینون در حضور ۶۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر کتکول	جذب محلول در طول موج ماکزیمم هیدروکینون (۲۸۶/۵ نانومتر)
۱	۰/۰۰	۰/۳۱۰
۲	۰/۵۰	۰/۳۲۵
۳	۲/۰۰	۰/۳۶۶
۴	۱۰/۰۰	۰/۵۷۲
۵	۱۵/۰۰	۰/۷۰۱
۶	۲۰/۰۰	۰/۸۳۰
۷	۳۰/۰۰	۱/۱۰۴
۸	۳۵/۰۰	۱/۲۱۹
۹	۴۰/۰۰	۱/۳۶۱
۱۰	۴۵/۰۰	۱/۴۴۰
۱۱	۵۵/۰۰	۱/۵۵۰
۱۲	۶۵/۰۰	۱/۶۴۵



شکل ۳-۷: منحنی کالیبراسیون هیدروکینون در حضور ۶۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر کتکول. در شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفاتی با pH = ۷/۰

جدول ۳-۱۰: نتایج حاصل از بررسی منحنی کالیبراسیون هیدروکینون

در حضور یکدیگر ۶۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر کتکول

۰/۵۰-۳۵/۰۰	ناحیه خطی (میلی گرم بر لیتر)
$A = 0.0262 C_{Hyd} + 0.3109$ (n= ۸)	معادله رگرسیون
۰/۹۹۹۸	R^2

در جدول ۳-۱۰، A سیگنال تجزیه‌ای مربوط به هیدروکینون (جذب محلول نمونه نسبت به محلول

شاهد) در طول موج ماکزیمم (۲۸۶/۵ نانومتر)، C_{Hyd} غلظت هیدروکینون بر حسب میلی گرم بر لیتر و R^2 مجذور ضریب همبستگی نمودار است.

۳-۷-۲- محلول سازی و کالیبراسیون یک متغیره

در کالیبراسیون تک متغیره برای اندازه‌گیری همزمان کتکول و هیدروکینون از روش‌های اسپکتروفتومتری جدید (EXRSM و SRSM) استفاده شد. به منظور بهینه‌سازی پارامترها و رسیدن به بهترین صحت در این روش‌ها، محلول‌های سری کالیبراسیون (محلول‌های خالص)، سری ارزیابی و سری تست تهیه و طیف آن‌ها نسبت به محلول شاهد در دامنه ۲۱۰-۳۱۰ نانومتر ثبت گردید و مورد بررسی قرار گرفت. محلول‌های سری کالیبراسیون از انتقال مقادیر مختلف کتکول و یا هیدروکینون به همراه ۲/۰۰ میلی لیتر بافر

فسفاتی $\text{pH}=7/00$ به بالن‌های حجمی ۱۰ میلی‌لیتری و رقیق کردن آن‌ها تا خط نشانه با آب دوبار تقطیر تهیه شد. سپس طیف هر محلول نسبت به محلول شاهد در دامنه ۳۱۰-۲۱۰ نانومتر ثبت و ذخیره گردید. روش کار در تهیه محلول‌های سری ارزیابی و محلول‌های سری تست به این صورت بود که؛ به یک سری بالن حجمی ۱۰ میلی‌لیتری، ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفاتی $\text{pH}=7/0$ و مقادیر مختلف از کتکول و هیدروکینون منتقل شد و تا خط نشانه با آب مقطر، رقیق گردید. محلول شاهد مثل محلول نمونه تهیه شد با این تفاوت که به آن کتکول و هیدروکینون افزوده نشد. سپس طیف هر یک نسبت به محلول شاهد در دامنه ۳۱۰-۲۱۰ نانومتر ثبت گردید. ترکیب غلظتی محلول‌های سری ارزیابی و محلول‌های سری تست در جدول ۳-۱۱ و جدول ۳-۱۲ آورده شده است.

جدول ۳-۱۱: ترکیب غلظتی محلول‌های سری ارزیابی

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

جدول ۳-۱۲: ترکیب غلظتی محلول‌های سری تست

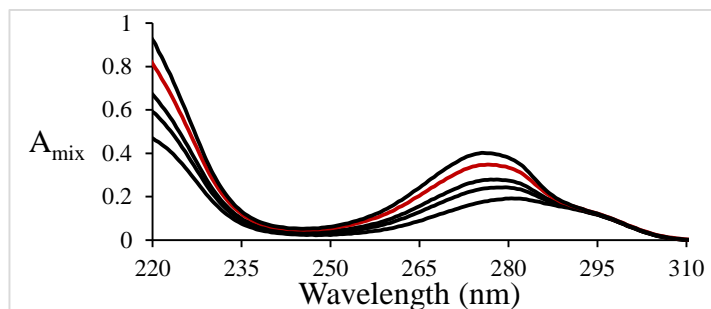
محلول	غلظت کتکول (میلی‌گرم بر لیتر)	غلظت هیدروکینون (میلی‌گرم بر لیتر)
۱	۲/۰۰	۳/۰۰
۲	۳/۰۰	۶/۰۰
۳	۵/۰۰	۴/۰۰
۴	۸/۰۰	۵/۰۰
۵	۸/۰۰	۸/۰۰
۶	۱۰/۰۰	۴/۰۰
۷	۱۰/۰۰	۶/۰۰
۸	۱۰/۰۰	۹/۰۰
۹	۱۴/۰۰	۲/۰۰
۱۰	۱۵/۰۰	۴/۰۰

۳-۷-۲-۱- نحوه محاسبه غلظت کتکول و هیدروکینون با استفاده از

روش توسعه یافته تفاضل نسبی (EXRSM)

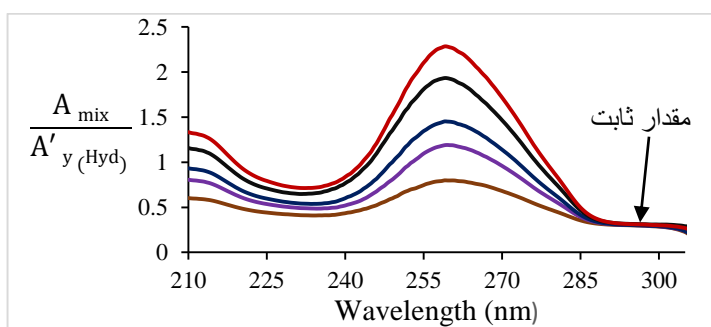
اولین روش اسپکتروفتومتری جدیدی که برای تعیین مقدار غلظت‌های هیدروکینون و کتکول در مخلوط‌ها به کار برده شد، روش EXRSM بود. در ابتدا روش به دست آوردن غلظت‌های هیدروکینون و کتکول در یک سری از مخلوط‌های سری ارزیابی توضیح داده می‌شود. سپس روش بهینه‌سازی مقسوم علیه‌ها آورده می‌شود.

در این جا به عنوان مثال مخلوط‌هایی از سری ارزیابی انتخاب شدند که مقدار هیدروکینون موجود در مخلوط‌ها ثابت و مقدار کتکول آن‌ها تغییر می‌کند. در این روش پس از تهیه مخلوط‌ها (Cat+Hyd)، طیف هر یک نسبت به محلول شاهد در دامنه طول موجی مورد نظر ثبت گردید. در شکل ۳-۸ طیف‌های جذبی مخلوط‌هایی با غلظت ثابت هیدروکینون و غلظت متغیر کتکول آورده شده است.



شکل ۳-۸: طیف‌های جذبی مخلوط‌های حاوی ۴/۰۰، ۷/۰۰، ۹/۰۰، ۱۲/۰۰ و ۱۵/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) کتکول و ۶/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) هیدروکینون در شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفات با pH=۷/۰

سپس طیف هر مخلوط بر طیف محلول ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر هیدروکینون (گونه‌ای است که جذب آن در طول موج‌های بالاتر صفر می‌شود) به‌عنوان مقسوم علیه تقسیم شد. طیف نسبی حاصل در طول موج‌های بلندتر از ۲۹۰ نانومتر دارای مقدار ثابت است (شکل ۳-۹).

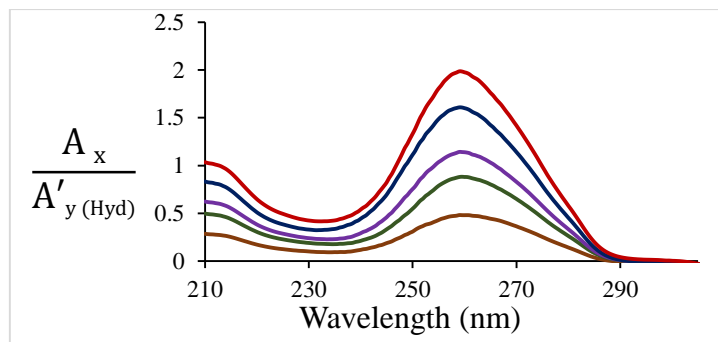


شکل ۳-۹: طیف‌های جذبی حاصل از تقسیم طیف مخلوط‌های حاوی ۴/۰۰، ۷/۰۰، ۹/۰۰، ۱۲/۰۰ و ۱۵/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) کتکول و ۶/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) هیدروکینون بر طیف ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر هیدروکینون

در شکل ۳-۹، A_{mix} و $A'_{y(Hyd)}$ به ترتیب بیانگر جذب مخلوط و جذب محلول هیدروکینون (به عنوان مقسوم علیه) است.

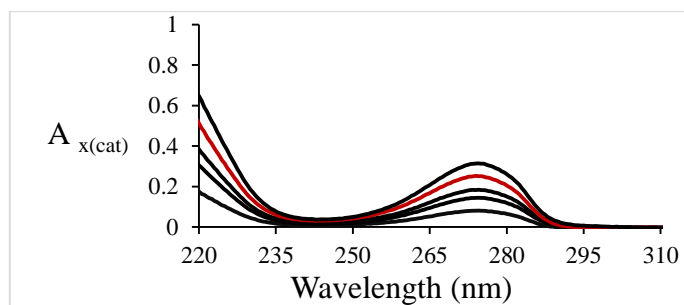
پس از تقسیم کردن طیف مخلوط‌ها به طیف یک محلول هیدروکینون با غلظت معین، نشان داده شد که برای تمام مخلوط‌های بالا، مقدار ثابت (۰/۳۰۳ = مقدار ثابت) یکسان می‌باشد و به غلظت هیدروکینون

بستگی دارد. پس از کم کردن مقدار ثابت از طیف‌های نسبی، طیف‌های نسبی شکل ۳-۱۰ به دست آمد.



شکل ۳-۱۰: طیف‌های جذبی حاصل از تقسیم طیف مخلوط‌های حاوی ۴/۱۰۰، ۷/۱۰۰، ۹/۱۰۰، ۱۲/۱۰۰ و ۱۵/۱۰۰ (میلی‌گرم بر لیتر) کتکول و ۶/۱۰۰ (میلی‌گرم بر لیتر) هیدروکینون بر طیف ۲۰/۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیدروکینون (مقسوم علیه) بعد از کم کردن مقدار ثابت

طیف‌های نسبی شکل ۳-۱۰ در طیف محلول ۲۰/۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیدروکینون (به‌عنوان مقسوم علیه) ضرب شد که در این حالت طیف خالص محلول‌های ۴/۱۰۰، ۷/۱۰۰، ۹/۱۰۰، ۱۲/۱۰۰ و ۱۵/۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کتکول به دست آمد (شکل ۳-۱۱). همان‌طور که مشاهده شد از طیف مخلوط دو گونه که با یکدیگر هم پوشانی دارند، طیف خالص مرتبه صفر کتکول به دست آمد. با استفاده از طیف‌های خالص به دست آمده، جذب در طول موج ماکزیمم کتکول (۲۷۵ نانومتر) اندازه‌گیری شد و در منحنی کالیبراسیون حاصل از محلول‌های استاندارد خالص کتکول قرار داده شد (شکل ۳-۵) و غلظت کتکول در هر مخلوط به دست آمد.



شکل ۳-۱۱: طیف جذبی مرتبه صفر غلظت‌های ۴/۱۰۰، ۷/۱۰۰، ۹/۱۰۰، ۱۲/۱۰۰ و ۱۵/۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کتکول، بعد از کم کردن مقدار ثابت و ضرب در طیف محلول ۲۰/۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیدروکینون

در روش EXRSM تاثیر غلظت هیدروکینون به عنوان مقسوم علیه، بر خطای حاصل از پیش‌بینی غلظت کتکول بررسی شد. برای انجام این کار علاوه بر محلول‌های سری ارزیابی (جدول ۳-۱۱)، در بالن‌های

حجمی ۱۰ میلی لیتری حاوی ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفات $\text{pH}=7/0$ ، محلول های هیدروکینون خالص (با غلظت ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۱۵/۰۰، ۲۰/۰۰ و ۲۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر) و محلول های کتکول خالص تهیه گردید. سپس طیف محلول های سری ارزیابی، محلول های هیدروکینون خالص و محلول های کتکول خالص نسبت به محلول شاهد (۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفات $\text{pH}=7/0$ در بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری) در گستره ۳۱۰-۲۱۰ نانومتر ثبت و ذخیره گردید. منحنی کالیبراسیون کتکول با اندازه گیری جذب هر محلول کتکول در طول موج ماکزیمم جذب آن (۲۷۵ نانومتر) و رسم جذب بر حسب غلظت کتکول به دست آمد (شکل ۳-۵). طیف جذبی هر مخلوط (محلول های سری ارزیابی) در جدول ۳-۱۱ بر طیف جذبی محلول هیدروکینون با غلظت معین تقسیم شد. سپس مقدار ثابت هر طیف نسبی در طول موج های بلند تر از ۲۹۰ نانومتر از هر طیف نسبی کسر گردید. هر طیف نسبی پس از کسر کردن مقدار ثابت آن، در طیف جذبی محلول هیدروکینون با غلظت معین اولیه ضرب شد تا طیف خالص مرتبه صفر کتکول در هر مخلوط به دست آید. با اندازه گیری جذب در طول موج ۲۷۵ نانومتر از روی طیف خالص مرتبه صفر کتکول حاصل و با استفاده از منحنی کالیبراسیون کتکول، غلظت کتکول در هر مخلوط محاسبه شد؛ که نتایج آن در جدول ۳-۱۳ آورده شده است.

برای انتخاب غلظت هیدروکینون به عنوان مقسوم علیه بهینه، میانگین مربع خطا (MSE)^۱ غلظت کتکول برای سری ارزیابی محاسبه شد که نتایج آن در جدول ۳-۱۳ آورده شده است.

^۱ - Mean Square Error

جدول ۳-۱۳: نتایج حاصل از بهینه‌سازی غلظت هیدروکینون به‌عنوان مقسوم علیه برای سری ارزیابی

خطا (MSE)	خطای نسبی (%)	غلظت کتکول پیش‌بینی شده (mg L ⁻¹)	غلظت هیدروکینون به عنوان مقسوم علیه (mg L ⁻¹)	غلظت‌های موجود در مخلوط		محلول
				هیدروکینون (mg L ⁻¹)	کتکول (mg L ⁻¹)	
۰/۰۰۴	۳/۰۰	۱/۰۳	۵/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱
	۳/۰۰	۱/۰۳	۵/۰۰	۳/۰۰	۱/۰۰	۲
	۰/۰۰	۱/۰۰	۵/۰۰	۶/۰۰	۱/۰۰	۳
	۷/۰۰	۱/۰۷	۵/۰۰	۹/۰۰	۱/۰۰	۴
	۷/۰۰	۱/۰۷	۵/۰۰	۱۲/۰۰	۱/۰۰	۵
	-۱/۰۰	۳/۹۶	۵/۰۰	۱/۰۰	۴/۰۰	۶
	-۰/۲۵	۳/۹۹	۵/۰۰	۳/۰۰	۴/۰۰	۷
	۲/۲۵	۴/۰۹	۵/۰۰	۶/۰۰	۴/۰۰	۸
	۱/۵۰	۴/۰۶	۵/۰۰	۹/۰۰	۴/۰۰	۹
	۲/۰۰	۴/۰۸	۵/۰۰	۱۲/۰۰	۴/۰۰	۱۰
	۱/۰۰	۷/۰۷	۵/۰۰	۱/۰۰	۷/۰۰	۱۱
	-۰/۷۱	۶/۹۵	۵/۰۰	۳/۰۰	۷/۰۰	۱۲
	۱/۰۰	۷/۰۷	۵/۰۰	۶/۰۰	۷/۰۰	۱۳
	۰/۷۱	۷/۰۵	۵/۰۰	۹/۰۰	۷/۰۰	۱۴
	۱/۰۰	۷/۰۷	۵/۰۰	۱۲/۰۰	۷/۰۰	۱۵
	-۰/۶۷	۸/۹۴	۵/۰۰	۱/۰۰	۹/۰۰	۱۶
	-۰/۲۲	۸/۹۸	۵/۰۰	۳/۰۰	۹/۰۰	۱۷
	-۰/۷۸	۸/۹۳	۵/۰۰	۶/۰۰	۹/۰۰	۱۸
	۰/۸۹	۹/۰۸	۵/۰۰	۹/۰۰	۹/۰۰	۱۹
	-۰/۴۴	۸/۹۶	۵/۰۰	۱۲/۰۰	۹/۰۰	۲۰
	۰/۲۵	۱۲/۰۳	۵/۰۰	۱/۰۰	۱۲/۰۰	۲۱
	-۰/۲۵	۱۱/۹۷	۵/۰۰	۳/۰۰	۱۲/۰۰	۲۲
	۰/۵۸	۱۲/۰۷	۵/۰۰	۶/۰۰	۱۲/۰۰	۲۳
	۰/۷۵	۱۲/۰۹	۵/۰۰	۹/۰۰	۱۲/۰۰	۲۴
	۰/۵۸	۱۲/۰۷	۵/۰۰	۱۲/۰۰	۱۲/۰۰	۲۵
	-۰/۲۶	۱۴/۹۶	۵/۰۰	۱/۰۰	۱۵/۰۰	۲۶
	۰/۲۶	۱۵/۰۴	۵/۰۰	۳/۰۰	۱۵/۰۰	۲۷
	۰/۳۳	۱۵/۰۵	۵/۰۰	۶/۰۰	۱۵/۰۰	۲۸
	-۱/۰۰	۱۴/۸۵	۵/۰۰	۹/۰۰	۱۵/۰۰	۲۹
	۰/۳۳	۱۵/۰۵	۵/۰۰	۱۲/۰۰	۱۵/۰۰	۳۰
۰/۰۰۴	۳/۰۰	۱/۰۳	۱۰/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱
	۳/۰۰	۱/۰۳	۱۰/۰۰	۳/۰۰	۱/۰۰	۲
	۰/۰۰	۱/۰۰	۱۰/۰۰	۶/۰۰	۱/۰۰	۳
	۷/۰۰	۱/۰۷	۱۰/۰۰	۹/۰۰	۱/۰۰	۴
	۷/۰۰	۱/۰۷	۱۰/۰۰	۱۲/۰۰	۱/۰۰	۵
	-۱/۰۰	۳/۹۶	۱۰/۰۰	۱/۰۰	۴/۰۰	۶
	-۰/۲۵	۳/۹۹	۱۰/۰۰	۳/۰۰	۴/۰۰	۷
	۲/۲۵	۴/۰۹	۱۰/۰۰	۶/۰۰	۴/۰۰	۸

	1/50	4/06	10/00	9/00	4/00	9
	2/00	4/08	10/00	12/00	4/00	10
	1/00	7/07	10/00	1/00	7/00	11
	-0/71	6/95	10/00	3/00	7/00	12
	1/00	7/07	10/00	6/00	7/00	13
	-0/71	7/05	10/00	9/00	7/00	14
	1/00	7/07	10/00	12/00	7/00	15
	-0/67	8/94	10/00	1/00	9/00	16
	-0/22	8/98	10/00	3/00	9/00	17
	-0/78	8/93	10/00	6/00	9/00	18
	-0/89	9/08	10/00	9/00	9/00	19
	-0/44	8/96	10/00	12/00	9/00	20
	-0/25	12/03	10/00	1/00	12/00	21
	-0/25	11/97	10/00	3/00	12/00	22
	-0/58	12/07	10/00	6/00	12/00	23
	-0/75	12/09	10/00	9/00	12/00	24
	-0/58	12/07	10/00	12/00	12/00	25
	-0/26	14/96	10/00	1/00	15/00	26
	-0/26	15/04	10/00	3/00	15/00	27
	-0/33	15/05	10/00	6/00	15/00	28
	-1/00	14/85	10/00	9/00	15/00	29
	-0/00	15/00	10/00	12/00	15/00	30
0/004	3/00	1/03	15/00	1/00	1/00	1
	3/00	1/03	15/00	3/00	1/00	2
	0/00	1/00	15/00	6/00	1/00	3
	7/00	1/07	15/00	9/00	1/00	4
	7/00	1/07	15/00	12/00	1/00	5
	-1/00	3/96	15/00	1/00	4/00	6
	-0/25	3/99	15/00	3/00	4/00	7
	2/25	4/09	15/00	6/00	4/00	8
	1/50	4/06	15/00	9/00	4/00	9
	2/00	4/08	15/00	12/00	4/00	10
	1/00	7/07	15/00	1/00	7/00	11
	-0/71	6/95	15/00	3/00	7/00	12
	1/00	7/07	15/00	6/00	7/00	13
	-0/71	7/05	15/00	9/00	7/00	14
	1/00	7/07	15/00	12/00	7/00	15

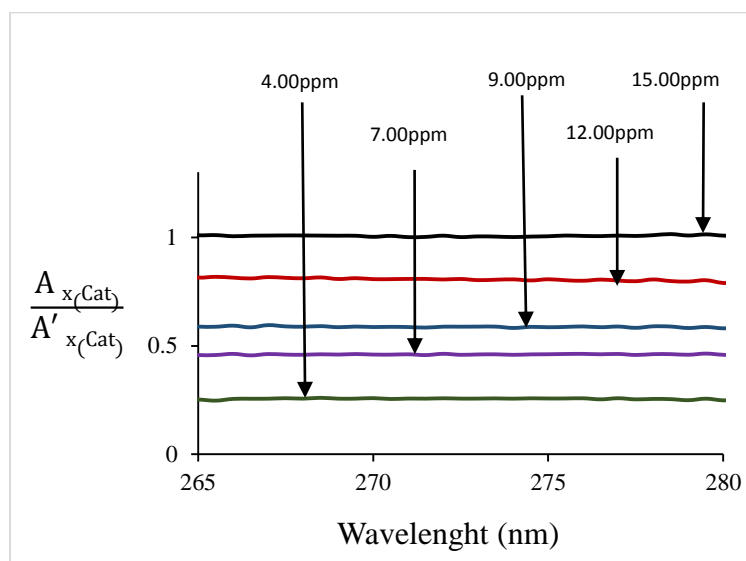
	-./67	8/94	15/00	1/00	9/00	16
	-./22	8/98	15/00	3/00	9/00	17
	-./78	8/93	15/00	6/00	9/00	18
	-./89	9/08	15/00	9/00	9/00	19
	-./44	8/96	15/00	12/00	9/00	20
	-./25	12/03	15/00	1/00	12/00	21
	-./25	11/97	15/00	3/00	12/00	22
	-./58	12/07	15/00	6/00	12/00	23
	-./75	12/09	15/00	9/00	12/00	24
	-./58	12/07	15/00	12/00	12/00	25
	-./26	14/96	15/00	1/00	15/00	26
	-./26	15/04	15/00	3/00	15/00	27
	-./33	15/05	15/00	6/00	15/00	28
	-1/00	14/85	15/00	9/00	15/00	29
	-./00	15/00	15/00	12/00	15/00	30
./004	3/00	1/03	20/00	1/00	1/00	1
	3/00	1/03	20/00	3/00	1/00	2
	-./00	1/00	20/00	6/00	1/00	3
	7/00	1/07	20/00	9/00	1/00	4
	7/00	1/07	20/00	12/00	1/00	5
	-1/00	3/96	20/00	1/00	4/00	6
	-./25	3/99	20/00	3/00	4/00	7
	2/25	4/09	20/00	6/00	4/00	8
	1/50	4/06	20/00	9/00	4/00	9
	2/00	4/08	20/00	12/00	4/00	10
	1/00	7/07	20/00	1/00	7/00	11
	-./71	6/95	20/00	3/00	7/00	12
	1/00	7/07	20/00	6/00	7/00	13
	-./71	7/05	20/00	9/00	7/00	14
	1/00	7/07	20/00	12/00	7/00	15
	-./67	8/94	20/00	1/00	9/00	16
	-./22	8/98	20/00	3/00	9/00	17
	-./78	8/93	20/00	6/00	9/00	18
	-./89	9/08	20/00	9/00	9/00	19
	-./44	8/96	20/00	12/00	9/00	20
	-./25	12/03	20/00	1/00	12/00	21
	-./25	11/97	20/00	3/00	12/00	22
	-./58	12/07	20/00	6/00	12/00	23
	-./75	12/09	20/00	9/00	12/00	24
	-./58	12/07	20/00	12/00	12/00	25
	-./26	14/96	20/00	1/00	15/00	26
	-./26	15/04	20/00	3/00	15/00	27
	-./33	15/05	20/00	6/00	15/00	28

	-۱/۰۰	۱۴/۸۵	۲۰/۰۰	۹/۰۰	۱۵/۰۰	۲۹
	۰/۰۰	۱۵/۰۰	۲۰/۰۰	۱۲/۰۰	۱۵/۰۰	۳۰
۰/۰۰۴	۳/۰۰	۱/۰۳	۲۵/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱
	۳/۰۰	۱/۰۳	۲۵/۰۰	۳/۰۰	۱/۰۰	۲
	۰/۰۰	۱/۰۰	۲۵/۰۰	۶/۰۰	۱/۰۰	۳
	۷/۰۰	۱/۰۷	۲۵/۰۰	۹/۰۰	۱/۰۰	۴
	۷/۰۰	۱/۰۷	۲۵/۰۰	۱۲/۰۰	۱/۰۰	۵
	-۱/۰۰	۳/۹۶	۲۵/۰۰	۱/۰۰	۴/۰۰	۶
	-۰/۲۵	۳/۹۹	۲۵/۰۰	۳/۰۰	۴/۰۰	۷
	۲/۲۵	۴/۰۹	۲۵/۰۰	۶/۰۰	۴/۰۰	۸
	۱/۵۰	۴/۰۶	۲۵/۰۰	۹/۰۰	۴/۰۰	۹
	۲/۰۰	۴/۰۸	۲۵/۰۰	۱۲/۰۰	۴/۰۰	۱۰
	۱/۰۰	۷/۰۷	۲۵/۰۰	۱/۰۰	۷/۰۰	۱۱
	-۰/۷۱	۶/۹۵	۲۵/۰۰	۳/۰۰	۷/۰۰	۱۲
	۱/۰۰	۷/۰۷	۲۵/۰۰	۶/۰۰	۷/۰۰	۱۳
	۰/۷۱	۷/۰۵	۲۵/۰۰	۹/۰۰	۷/۰۰	۱۴
	۱/۰۰	۷/۰۷	۲۵/۰۰	۱۲/۰۰	۷/۰۰	۱۵
	-۰/۶۷	۸/۹۴	۲۵/۰۰	۱/۰۰	۹/۰۰	۱۶
	-۰/۲۲	۸/۹۸	۲۵/۰۰	۳/۰۰	۹/۰۰	۱۷
	-۰/۷۸	۸/۹۳	۲۵/۰۰	۶/۰۰	۹/۰۰	۱۸
	۰/۸۹	۹/۰۸	۲۵/۰۰	۹/۰۰	۹/۰۰	۱۹
	-۰/۴۴	۸/۹۶	۲۵/۰۰	۱۲/۰۰	۹/۰۰	۲۰
	۰/۲۵	۱۲/۰۳	۲۵/۰۰	۱/۰۰	۱۲/۰۰	۲۱
	-۰/۲۵	۱۱/۹۷	۲۵/۰۰	۳/۰۰	۱۲/۰۰	۲۲
	۰/۵۸	۱۲/۰۷	۲۵/۰۰	۶/۰۰	۱۲/۰۰	۲۳
	۰/۷۵	۱۲/۰۹	۲۵/۰۰	۹/۰۰	۱۲/۰۰	۲۴
	۰/۵۸	۱۲/۰۷	۲۵/۰۰	۱۲/۰۰	۱۲/۰۰	۲۵
	-۰/۲۶	۱۴/۹۶	۲۵/۰۰	۱/۰۰	۱۵/۰۰	۲۶
	۰/۲۶	۱۵/۰۴	۲۵/۰۰	۳/۰۰	۱۵/۰۰	۲۷
	۰/۳۳	۱۵/۰۵	۲۵/۰۰	۶/۰۰	۱۵/۰۰	۲۸
	-۱/۰۰	۱۴/۸۵	۲۵/۰۰	۹/۰۰	۱۵/۰۰	۲۹
	۰/۰۰	۱۵/۰۰	۲۵/۰۰	۱۲/۰۰	۱۵/۰۰	۳۰

نتایج به دست آمده از جدول ۳-۱۳ نشان می‌دهد که تغییر غلظت هیدروکینون به عنوان مقسوم علیه،

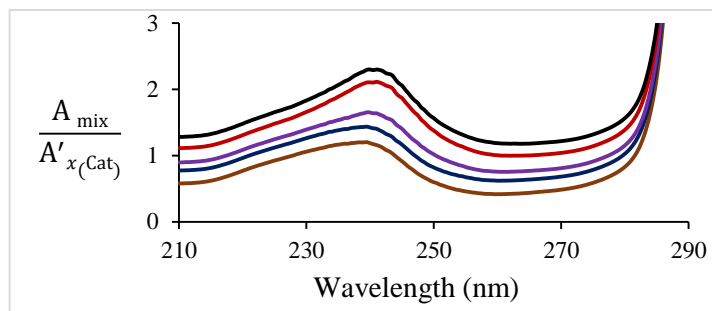
بر خطای حاصل از پیش‌بینی غلظت کتکول موجود در مخلوط‌های سری ارزیابی تاثیری ندارد.

برای به دست آوردن غلظت هیدروکینون در مخلوط های تهیه شده، ابتدا طیف های خالص مرتبه صفر به دست آمده برای کتکول (شکل ۳-۱۱)، به طیف غلظت معلوم (مثلا ۱۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر) از محلول کتکول تقسیم شد. طیف نسبی حاصل در دامنه ۲۸۰-۲۶۵ نانومتر دارای مقدار ثابتی برای هر محلول است که همان طور که در شکل ۳-۱۲ مشاهده می شود، برای هر محلول خط صافی به موازات محور طول موج می باشد.



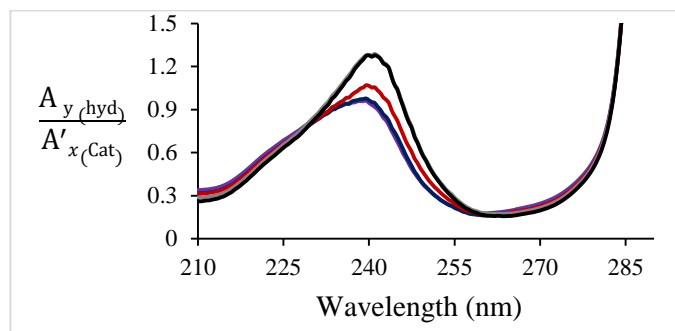
شکل ۳-۱۲: طیف نسبی حاصل از تقسیم طیف های ۴/۰۰، ۷/۰۰، ۹/۰۰، ۱۲/۰۰ و ۱۵/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) کتکول شکل ۳-۱۱) بر ۱۵/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) کتکول به عنوان مقسوم علیه

در شکل ۳-۱۲، $A_{x(Cat)}$ بیانگر جذب محلول های خالص مرتبه صفر کتکول و $A'_{x(Cat)}$ بیانگر جذب محلول کتکول با غلظت معین (به عنوان مقسوم علیه) است. هم چنین طیف مخلوط های سری ارزیابی (جدول ۳-۱۱) (مثلا مخلوط های حاوی ۴/۰۰، ۷/۰۰، ۹/۰۰، ۱۲/۰۰ و ۱۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر کتکول و ۶/۰۰ میلی گرم بر لیتر هیدروکینون) بر طیف محلول کتکول با غلظت معین (مثلا ۱۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر) تقسیم شد (شکل ۳-۱۳). مقادیر ثابت برای مخلوط ها به ترتیب ۰/۲۳۹، ۰/۴۵۹، ۰/۵۸۴، ۰/۸۲۶ و ۱/۰۲۱ است.



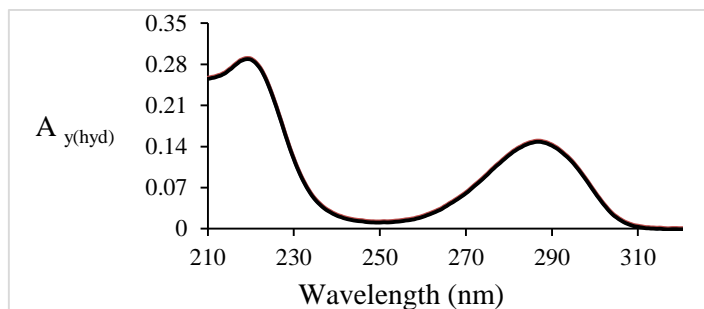
شکل ۳-۱۳: طیف‌های نسبی حاصل از تقسیم طیف مخلوط‌های حاوی ۰/۴، ۰/۷، ۰/۹، ۰/۱۲ و ۰/۱۵ (میلی گرم بر لیتر) کتکول و ۰/۶ (میلی گرم بر لیتر) هیدروکینون (A_{mix}) بر طیف ۰/۱۵ میلی گرم بر لیتر کتکول ($A'_{x(Cat)}$)

سیس مقدار ثابت حاصل از هر طیف نسبی کتکول خالص مرتبه صفر (شکل ۳-۱۲) از طیف نسبی مخلوط متناظر آن (شکل ۳-۱۳) کسر گردید و شکل ۳-۱۴ حاصل شد.



شکل ۳-۱۴: طیف‌های جذبی حاصل از تقسیم طیف مخلوط‌های حاوی ۰/۴، ۰/۷، ۰/۹، ۰/۱۲ و ۰/۱۵ (میلی گرم بر لیتر) کتکول و ۰/۶ (میلی گرم بر لیتر) هیدروکینون بر طیف ۰/۱۵ میلی گرم بر لیتر کتکول (مقسوم علیه)، بعد از کم کردن مقدار ثابت

با ضرب طیف‌های نسبی حاصل از مرحله قبل (شکل ۳-۱۴) در طیف محلول کتکول با غلظت معلوم به‌عنوان مقسوم علیه (مثلاً ۰/۱۵ میلی گرم بر لیتر)، طیف خالص هیدروکینون به‌دست آمد (شکل ۳-۱۵).



شکل ۳-۱۵: طیف جذبی مرتبه صفر ۶/۰۰ میلی گرم بر لیتر هیدروکینون بعد از ضرب طیف‌های متناظر آن از شکل ۳-۱۴ در طیف محلول ۱۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر کتکول

با استفاده از طیف‌های خالص مرتبه صفر به دست آمده، جذب در طول موج ماکزیمم هیدروکینون اندازه‌گیری شد و در منحنی کالیبراسیون حاصل از محلول‌های استاندارد خالص هیدروکینون قرار داده شد (شکل ۳-۵) و غلظت هیدروکینون در هر مخلوط به دست آمد. در روش EXRSM تاثیر غلظت کتکول به عنوان مقسوم علیه، بر خطای حاصل از پیش‌بینی غلظت هیدروکینون بررسی شد. بهینه‌سازی غلظت مقسوم علیه کتکول مانند بهینه‌سازی غلظت مقسوم علیه هیدروکینون صورت گرفت. غلظت هیدروکینون در هر مخلوط با استفاده از غلظت‌های مختلف کتکول (به عنوان مقسوم علیه) محاسبه گردید. برای انتخاب غلظت کتکول به عنوان مقسوم علیه بهینه، میانگین مربع خطا (MSE) برای اندازه‌گیری غلظت هیدروکینون برای سری ارزیابی محاسبه گردید و نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۳-۱۴ آورده شده است.

جدول ۳-۱۴: نتایج حاصل از بهینه‌سازی غلظت کتکول به عنوان مقسوم علیه

غلظت کتکول به عنوان مقسوم علیه (mg L^{-1})	خطا (MSE) در پیش‌بینی غلظت هیدروکینون (mg L^{-1})
۵	۰/۰۰۸۶
۱۰	۰/۰۰۸۶
۱۵	۰/۰۰۸۶
۲۰	۰/۰۰۸۶
۲۵	۰/۰۰۸۶

نتایج حاصل از جدول ۳-۱۴ نشان می‌دهد که تغییر غلظت کتکول به عنوان مقسوم علیه، تاثیری بر خطای حاصل از پیش‌بینی غلظت هیدروکینون موجود در مخلوط‌های سری ارزیابی ندارد. نتایج حاصل از

به کار بردن روش EXRSM برای پیش‌بینی غلظت کتکول و هیدروکینون موجود در محلول‌های سری تست، در جدول ۳-۱۵ آورده شده است. لازم به ذکر است در به‌دست آوردن غلظت محلول‌های سری تست، غلظت هیدروکینون و غلظت کتکول به ترتیب ۲۰/۰۰ و ۱۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به‌عنوان مقسوم علیه به کار برده شد.

جدول ۳-۱۵: نتایج حاصل از به کارگیری روش EXRSM، برای پیش‌بینی غلظت اجزا در سری تست

محلول	غلظت واقعی (mg L^{-1})		غلظت پیش‌بینی شده (mg L^{-1})		خطای نسبی (%)	
	کتکول	هیدروکینون	کتکول	هیدروکینون	کتکول	هیدروکینون
۱	۲/۰۰	۳/۰۰	۲/۰۷	۳/۰۴	۳/۵۰	۱/۳۳
۲	۳/۰۰	۶/۰۰	۳/۰۰	۵/۹۵	۰/۰۰	-۰/۸۳
۳	۵/۰۰	۴/۰۰	۵/۰۸	۴/۱۰	۱/۶۰	۲/۵۰
۴	۸/۰۰	۵/۰۰	۸/۰۱	۵/۰۹	۰/۱۲	۱/۸۰
۵	۸/۰۰	۸/۰۰	۷/۹۳	۷/۹۳	-۰/۸۷	-۰/۸۷
۶	۱۰/۰۰	۴/۰۰	۹/۹۳	۴/۱۳	-۰/۷۰	۳/۲۵
۷	۱۰/۰۰	۶/۰۰	۹/۹۶	۶/۰۲	-۰/۴۰	۰/۳۳
۸	۱۰/۰۰	۹/۰۰	۹/۹۳	۸/۹۵	-۰/۷۰	-۰/۵۶
۹	۱۴/۰۰	۲/۰۰	۱۴/۰۴	۲/۰۴	۰/۲۸	۲/۰۰
۱۰	۱۵/۰۰	۴/۰۰	۱۴/۹۶	۴/۰۴	-۰/۲۷	۱/۰۰

۳-۷-۲-۲- نحوه محاسبه غلظت کتکول و هیدروکینون با استفاده از روش

روش کم کردن نسبی همزمان (SRSM)

روش اسپکتروفتومتری دیگری که برای اندازه‌گیری همزمان کتکول و هیدروکینون به کار برده شد، روش روش کم کردن نسبی همزمان (SRSM) بود. در این روش هم دو سری مخلوط (مخلوط‌های سری ارزیابی و مخلوط‌های سری تست) مورد استفاده قرار گرفت. در این روش طیف مخلوط‌ها و طیف محلول‌های خالص استاندارد کتکول بر طیف غلظت معینی از هیدروکینون (به عنوان مقسوم علیه) تقسیم شد. پس از تقسیم طیف مخلوط‌ها بر طیف مقسوم علیه، مقدار ثابت برای هر مخلوط در دامنه طول موج ۲۹۰-۳۰۵

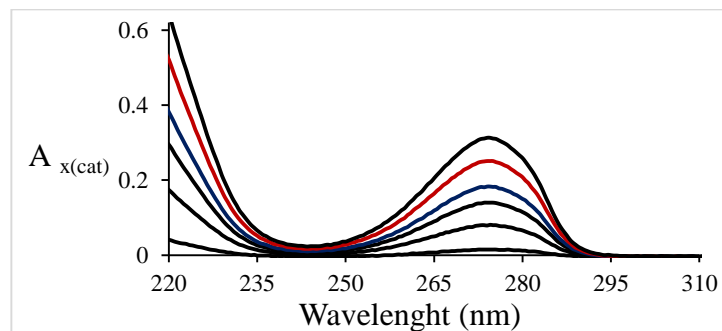
نانومتر به دست آمد. سپس مقدار ثابت هر مخلوط از طیف نسبی همان مخلوط کم شد. سپس مقدار نسبی جذب در طول موج ۲۷۵ نانومتر (طول موج ماکزیمم جذب کتکول) برای هر مخلوط از روی طیف نسبی حاصل پس از کم کردن مقدار ثابت، اندازه گیری شد. سپس با استفاده از مقدار نسبی جذب در طول موج ۲۷۵ نانومتر برای هر مخلوط و منحنی کالیبراسیون مربوط، غلظت کتکول در هر مخلوط محاسبه شد. برای رسم منحنی کالیبراسیون کتکول به این صورت عمل شد که طیف محلول های خالص استاندارد کتکول بر طیف غلظت معینی از هیدروکینون (به عنوان مقسوم علیه) تقسیم شد و سپس مقدار نسبی جذب در طول موج ۲۷۵ نانومتر در هر محلول بر حسب غلظت کتکول در آن رسم گردید. برای به دست آوردن غلظت هیدروکینون به صورت زیر عمل شد که مقدار ثابت به دست آمده برای هر مخلوط در طیف محلول هیدروکینون که به عنوان مقسوم علیه استفاده شده بود، ضرب گردید. حاصل ضرب مقدار ثابت هر مخلوط در طیف مقسوم علیه، طیف خالص مرتبه صفر مربوط به هیدروکینون در هر مخلوط را به دست می دهد. سپس با استفاده از طیف خالص مرتبه صفر به دست آمده، جذب در $286/5$ نانومتر اندازه گیری می شود و با استفاده از منحنی کالیبراسیون هیدروکینون، غلظت هیدروکینون در هر مخلوط محاسبه می شود.

برای رسم منحنی کالیبراسیون هیدروکینون به این صورت عمل شد که محلول هایی با غلظت های مختلف هیدروکینون به صورت خالص تهیه و طیف آن ها نسبت به شاهد در گستره $310-210$ نانومتر ثبت و ذخیره گردید. مقدار جذب در طول موج ماکزیمم جذب ($286/5$ نانومتر) بر حسب غلظت هیدروکینون رسم شد (رسم منحنی کالیبراسیون). روش دیگر برای محاسبه غلظت هیدروکینون به صورت زیر است.

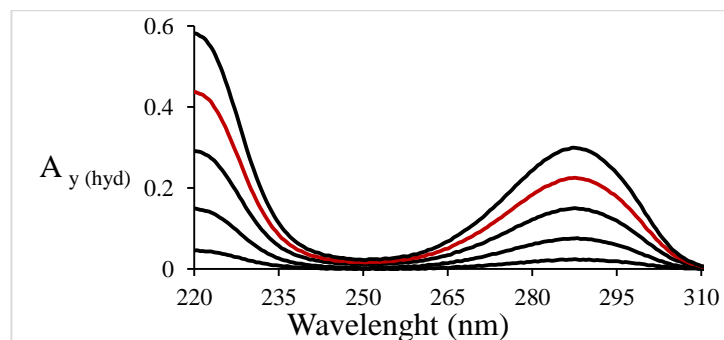
طیف محلول های خالص استاندارد هیدروکینون به طیف غلظت معینی از هیدروکینون (طیف مقسوم علیه) تقسیم می شود. سپس با اندازه گیری مقدار ثابت برای محلول استاندارد و رسم مقدار ثابت بر حسب غلظت هیدروکینون، منحنی کالیبراسیون رسم گردید. سپس مقدار ثابت حاصل از هر مخلوط، اندازه گیری و در منحنی کالیبراسیون مربوط (مقدار ثابت بر حسب غلظت هیدروکینون) وارد می شود و غلظت هیدروکینون محاسبه می گردد.

با توجه به مطالب مذکور، ابتدا باید غلظت هیدروکینون به عنوان مقسوم علیه، بهینه شود. برای انجام این کار از مخلوط های سری ارزیابی (جدول ۳-۱۱) استفاده شد. روش کار به این صورت بود که محلول هایی با

غلظت‌های ۱۵/۰۰-۱/۰۰ میلی گرم بر لیتر کتکول در بالن‌های حجمی ۱۰ میلی لیتری حاوی ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفات $\text{pH}=7/0$ تهیه شد و طیف آن‌ها نسبت به محلول شاهد در گستره ۲۱۰-۳۱۰ نانومتر ثبت و ذخیره گردید (شکل ۳-۱۶). هم‌چنین محلول‌های ۱۲/۰۰-۱/۰۰ میلی گرم بر لیتر هیدروکینون در بالن‌های حجمی ۱۰ میلی لیتری حاوی ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفات $\text{pH}=7/0$ تهیه شد و طیف آن‌ها نسبت به محلول شاهد در دامنه ۲۱۰-۳۱۰ نانومتر ثبت و ذخیره گردید (شکل ۳-۱۷).



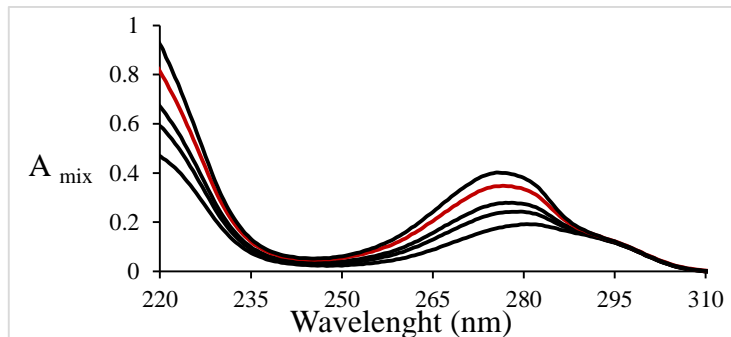
شکل ۳-۱۶: طیف جذبی مرتبه صفر محلول‌های ۱۵/۰۰ و ۱۲/۰۰، ۹/۰۰، ۷/۰۰، ۴/۰۰، ۱/۰۰ میلی گرم بر لیتر کتکول در شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفات $\text{pH}=7/0$



شکل ۳-۱۷: طیف جذبی مرتبه صفر محلول‌های ۱۲/۰۰ و ۹/۰۰، ۶/۰۰، ۳/۰۰، ۱/۰۰ میلی گرم بر لیتر هیدروکینون در شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفات $\text{pH}=7/0$

هم‌چنین محلول‌هایی حاوی غلظت‌های مختلف از هیدروکینون و کتکول در بافر $\text{pH}=7/0$ در بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری تهیه و طیف هر یک نسبت به محلول شاهد در دامنه ۲۱۰-۳۱۰ نانومتر ثبت و ذخیره

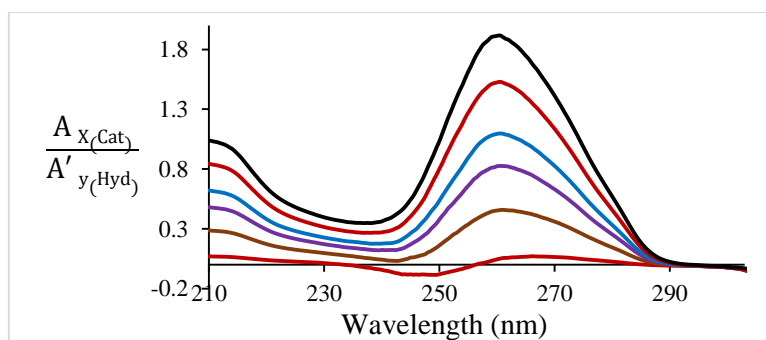
گردید. به عنوان مثال طیف های جذبی مخلوط های حاوی ۴/۰۰، ۷/۰۰، ۹/۰۰، ۱۲/۰۰ و ۱۵/۰۰ و ۶/۰۰ میلی گرم بر لیتر هیدروکینون در شکل ۳-۱۸ آورده شده است.



شکل ۳-۱۸: طیف های جذبی مخلوط های حاوی ۴/۰۰، ۷/۰۰، ۹/۰۰، ۱۲/۰۰ و ۱۵/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) کتکول و ۶/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) هیدروکینون در شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفاتی با pH=۷/۰

با استفاده از طیف های هیدروکینون خالص، جذب هر محلول در طول موج ماکزیمم آن اندازه گیری و بر حسب غلظت هیدروکینون رسم شد (جدول ۳-۵ و شکل ۳-۵ ب). نتایج حاصل از رسم منحنی کالیبراسیون هیدروکینون در جدول ۳-۶ آورده شده است.

طیف محلول های خالص کتکول بر طیف غلظت معینی از هیدروکینون مثلا ۲۰/۰ میلی گرم بر لیتر (به عنوان مقسوم علیه) تقسیم گردید (شکل ۳-۱۹).



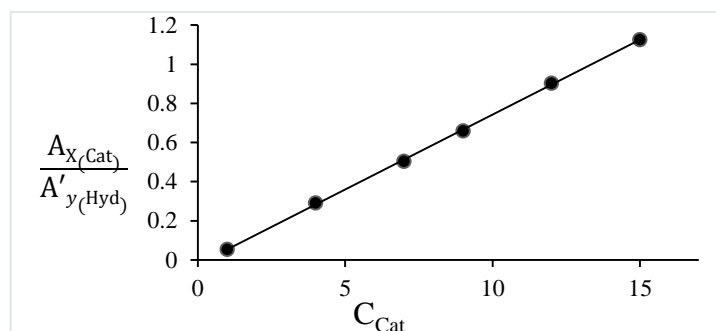
شکل ۳-۱۹: طیف های جذبی حاصل از تقسیم طیف ۱/۰۰، ۴/۰۰، ۷/۰۰، ۹/۰۰، ۱۲/۰۰ و ۱۵/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) کتکول بر طیف ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر هیدروکینون

سپس مقدار جذب نسبی در طول موج ۲۶۰ نانومتر (طول موج ماکزیمم طیف های نسبی) و طول موج ۲۷۵ نانومتر (طول موج ماکزیمم طیف های خالص مرتبه صفر کتکول) با استفاده از طیف نسبی برای هر

محلول کتکول اندازه‌گیری شد (جدول ۳-۱۶) و بر حسب غلظت کتکول رسم گردید. با توجه به اینکه خطای حاصل از پیش‌بینی غلظت کتکول و هیدروکینون در مخلوط‌ها، در طول موج ۲۷۵ نانومتر در مقایسه با طول موج ۲۶۰ نانومتر کمتر بود، طول موج ۲۷۵ نانومتر انتخاب شد. نتایج حاصل از رسم منحنی کالیبراسیون کتکول در شکل ۳-۲۰ و جدول ۳-۱۷ آورده شده است.

جدول ۳-۱۶: نتایج حاصل از بررسی منحنی کالیبراسیون نسبی کتکول

محلول	غلظت کتکول (میلی‌گرم بر لیتر)	جذب در طول موج ماکزیمم (۲۷۵ نانومتر)
۱	۱/۰۰	۰/۰۵۴
۲	۴/۰۰	۰/۲۹۱
۳	۷/۰۰	۰/۵۰۳
۴	۹/۰۰	۰/۶۵۸
۵	۱۲/۰۰	۰/۹۰۳
۶	۱۵/۰۰	۱/۱۲۵



شکل ۳-۲۰: منحنی کالیبراسیون کتکول در شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات با pH=۷/۰.

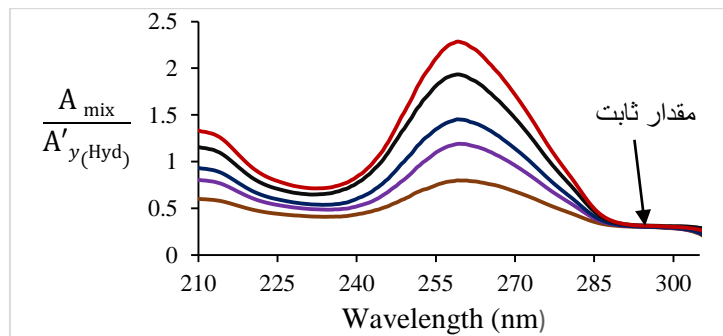
جدول ۳-۱۷: نتایج حاصل از رسم منحنی کالیبراسیون نسبی کتکول

$A = 0.0765 C_{Cat} - 0.231$ (n=۶)	معادله رگرسیون
۰/۹۹۹۷	R^2

در جدول ۳-۱۷، A سیگنال تجزیه‌ای کتکول (جذب نسبی) در طول موج ماکزیمم (۲۷۵ نانومتر)، C_{Cat}

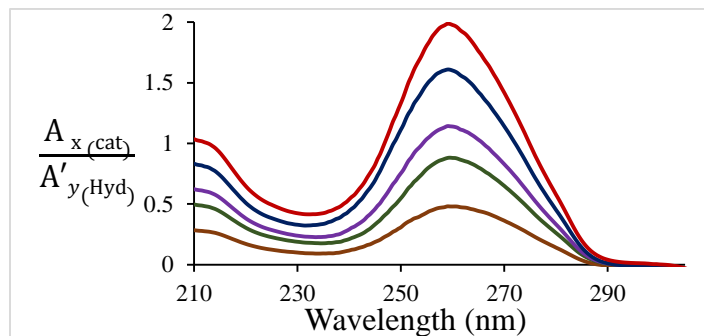
غلظت کتکول بر حسب میلی گرم بر لیتر و R^2 مجذور ضریب همبستگی نمودار است.

برای به دست آوردن غلظت کتکول در هر مخلوط، طیف هر مخلوط بر طیف همان غلظت هیدروکینون که طیف محلول های خالص استاندارد کتکول تقسیم شده بود (مثلا $20/100$ میلی گرم بر لیتر) تقسیم گردید (شکل ۳-۲۱).



شکل ۳-۲۱: طیف های جذبی حاصل از تقسیم طیف مخلوط های حاوی $4/100$ ، $7/100$ ، $9/100$ ، $12/100$ و $15/100$ (میلی گرم بر لیتر) کتکول و $6/100$ (میلی گرم بر لیتر) هیدروکینون بر طیف $20/100$ میلی گرم بر لیتر هیدروکینون

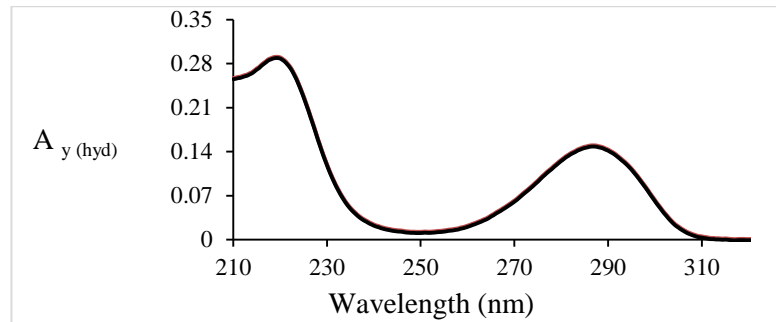
سپس مقدار ثابت ($0/303 =$ مقدار ثابت) هر طیف از همان طیف کم شد (شکل ۳-۲۲).



شکل ۳-۲۲: طیف های جذبی حاصل از تقسیم طیف مخلوط های حاوی $4/100$ ، $7/100$ ، $9/100$ ، $12/100$ و $15/100$ (میلی گرم بر لیتر) کتکول و $6/100$ (میلی گرم بر لیتر) هیدروکینون بر طیف $20/100$ میلی گرم بر لیتر هیدروکینون (مقسوم علیه) بعد از کم کردن مقدار ثابت

با استفاده از طیف های حاصل (شکل ۳-۲۲)، در طول موج 275 نانومتر مقدار جذب نسبی برای هر مخلوط اندازه گیری شد و با استفاده از منحنی کالیبراسیون مربوط (شکل ۳-۲۰)، غلظت کتکول در هر مخلوط محاسبه گردید. به همان صورت که در روش EXRSM بیان گردید، این کار برای محلول های هیدروکینون با غلظت $5/100$ ، $10/100$ ، $15/100$ ، $20/100$ و $25/100$ میلی گرم بر لیتر به عنوان مقسوم علیه انجام شد و غلظت

کتکول و MSE غلظت کتکول برای مخلوط‌های سری ارزیابی، محاسبه گردید (جدول ۳-۱۸). با توجه به نتایج به‌دست آمده، غلظت ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیدروکینون به‌عنوان غلظت مقسوم علیه بهینه انتخاب شد. سپس مقدار ثابت هر طیف در طیف مقسوم علیه مربوط (مثلاً ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیدروکینون) ضرب شد تا طیف هیدروکینون در هر مخلوط به‌دست آید (شکل ۳-۲۳).



شکل ۳-۲۳: طیف جذبی مرتبه صفر ۶/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیدروکینون بعد از ضرب مقدار ثابت (شکل ۳-۲۱) در طیف محلول ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیدروکینون

با استفاده از طیف هیدروکینون حاصل از ضرب مقدار ثابت هر طیف برای مخلوط در مقسوم علیه، جذب در طول موج ماکزیمم جذب طیف هیدروکینون حاصل اندازه‌گیری شد و با استفاده از منحنی کالیبراسیون مربوط به هیدروکینون، غلظت هیدروکینون در هر مخلوط و MSE آن برای مخلوط‌های سری ارزیابی محاسبه گردید. نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۳-۱۸ آورده شده است.

جدول ۳-۱۸: نتایج حاصل از بهینه‌سازی غلظت هیدروکینون به‌عنوان مقسوم علیه در روش SRSM

غلظت هیدروکینون به‌عنوان مقسوم علیه (mg L^{-1})	خطا (MSE) در پیش‌بینی غلظت کتکول (mg L^{-1})	خطا (MSE) در پیش‌بینی غلظت هیدروکینون (mg L^{-1})
۵/۰۰	۰/۰۰۸۰	۰/۰۱۴۸
۱۰/۰۰	۰/۰۰۷۸	۰/۰۱۳۹
۱۵/۰۰	۰/۰۰۷۴	۰/۰۱۳۳
۲۰/۰۰	۰/۰۰۷۲	۰/۰۱۰۹
۲۵/۰۰	۰/۰۰۷۹	۰/۰۱۷

نتایج حاصل از به کار بردن غلظت ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر هیدروکینون به عنوان مقسوم علیه بهینه برای مخلوط‌های سری ارزیابی و مخلوط‌های سری ارزیابی به ترتیب در جدول ۳-۱۹ و جدول ۳-۲۰ آورده شده است. این نتایج نشان می‌دهد که می‌توان غلظت دو جز در یک مخلوط را با خطای خیلی کم و قابل قبول به دست آورد، که نشان دهنده صحت خوب روش SRSM در تعیین همزمان مقدار کتکول و هیدروکینون است.

جدول ۳-۱۹: نتایج حاصل از به کارگیری روش SRSM برای پیش‌بینی غلظت اجزا در سری ارزیابی

محلول	غلظت واقعی (mg L ⁻¹)		غلظت پیش‌بینی شده (mg L ⁻¹)		خطای نسبی (%)	
	کتکول	هیدروکینون	کتکول	هیدروکینون	کتکول	هیدروکینون
۱	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۹	۱/۰۳	۹/۰۰	۳/۰۰
۲	۱/۰۰	۳/۰۰	۱/۰۵	۳/۰۶	۵/۰۰	۲/۰۰
۳	۱/۰۰	۶/۰۰	۰/۹۸	۵/۸۵	-۲/۰۰	-۲/۵۰
۴	۱/۰۰	۹/۰۰	۱/۰۱	۸/۹۴	۱/۰۰	-۰/۶۷
۵	۱/۰۰	۱۲/۰۰	۱/۰۹	۱۱/۹۷	۹/۰۰	-۰/۲۵
۶	۴/۰۰	۱/۰۰	۴/۰۵	۰/۹۷	۱/۲۵	-۳/۰۰
۷	۴/۰۰	۳/۰۰	۴/۰۹	۳/۰۸	۲/۵۰	۲/۶۷
۸	۴/۰۰	۶/۰۰	۴/۱	۶/۱۰	۳/۵۰	۱/۶۷
۹	۴/۰۰	۹/۰۰	۴/۱۴	۹/۰۳	۰/۵۰	۰/۳۳
۱۰	۴/۰۰	۱۲/۰۰	۴/۲۰	۱۲/۰۹	۱/۲۸	۰/۷۵
۱۱	۷/۰۰	۱/۰۰	۷/۰۹	۱/۰۰	-۲/۱۴	۰/۰۰
۱۲	۷/۰۰	۳/۰۰	۶/۸۵	۲/۹۸	۱/۰۰	-۰/۶۷
۱۳	۷/۰۰	۶/۰۰	۷/۰۷	۶/۰۶	۱/۰۰	۱/۰۰
۱۴	۷/۰۰	۹/۰۰	۷/۰۷	۸/۹۶	۱/۱۴	-۰/۴۴
۱۵	۷/۰۰	۱۲/۰۰	۷/۰۸	۱۲/۰۱	۰/۲۲	۰/۰۸
۱۶	۹/۰۰	۱/۰۰	۹/۰۲	۱/۰۷	۰/۵۵	۷/۰۰
۱۷	۹/۰۰	۳/۰۰	۹/۰۵	۳/۰۴	۰/۱۱	۱/۳۳
۱۸	۹/۰۰	۶/۰۰	۹/۰۱	۵/۹۸	۱/۱۱	-۰/۳۳
۱۹	۹/۰۰	۹/۰۰	۹/۱	۹/۰۸	۰/۵۵	۰/۸۹
۲۰	۹/۰	۱۲/۰	۹/۰۵	۱۲/۰۸	۰/۳۳	۰/۶۷
۲۱	۱۲/۰	۱/۰	۱۲/۱۱	۱/۰۸	۰/۹۲	۸/۰۰
۲۲	۱۲/۰	۳/۰	۱۲/۰۹	۳/۱	۰/۷۵	۳/۳۳
۲۳	۱۲/۰	۶/۰	۱۲/۱۰	۶/۰۵	۰/۸۳	۰/۸۳
۲۴	۱۲/۰	۹/۰	۱۲/۱۰	۹/۰۹	۰/۸۳	۱/۰۰
۲۵	۱۲/۰	۱۲/۰	۱۲/۱۰	۱۲/۲۸	۰/۸۳	۲/۳۳
۲۶	۱۵/۰	۱/۰	۱۴/۹۱	۰/۹۹	-۰/۶	-۱/۰۰
۲۷	۱۵/۰	۳/۰	۱۵/۰۰	۲/۹۴	۰/۰۰	-۲/۰۰
۲۸	۱۵/۰	۶/۰	۱۵/۰۲	۵/۹۳	۰/۱۳	-۱/۱۷
۲۹	۱۵/۰	۹/۰	۱۴/۹۰	۹/۰۷	-۰/۶۷	۰/۷۸
۳۰	۱۵/۰	۱۲/۰	۱۵/۰۰	۱۲/۰۵	۰/۰۰	۰/۴۲

جدول ۳-۲۰: نتایج حاصل از به کارگیری روش SRSM برای پیش‌بینی غلظت اجزا در سری تست

محلول	غلظت واقعی (mg L^{-1})		غلظت پیش‌بینی شده (mg L^{-1})		خطای نسبی (%)	
	کتکول	هیدروکینون	کتکول	هیدروکینون	کتکول	هیدروکینون
۱	۲/۰۰	۳/۰۰	۲/۱۰	۳/۰۹	۵/۰۰	۳/۰۰
۲	۳/۰۰	۶/۰۰	۳/۱۰	۶/۰۷	۳/۳۳	۱/۱۷
۳	۵/۰۰	۴/۰۰	۵/۱۰	۴/۱۰	۲/۰۰	۲/۵۰
۴	۸/۰۰	۵/۰۰	۸/۰۹	۵/۱۰	۱/۱۲	۲/۰۰
۵	۸/۰۰	۸/۰۰	۸/۱۰	۸/۰۶	۱/۲۵	۰/۷۵
۶	۱۰/۰۰	۴/۰۰	۱۰/۰۹	۴/۱۶	۰/۹۰	۴/۰۰
۷	۱۰/۰۰	۶/۰۰	۱۰/۰۳	۶/۰۸	۰/۳۰	۱/۳۳
۸	۱۰/۰۰	۹/۰۰	۱۰/۰۹	۹/۰۰	۰/۹۰	۰/۰۰
۹	۱۴/۰۰	۲/۰۰	۱۴/۱۴	۲/۰۵	۱/۰۰	۲/۵۰
۱۰	۱۵/۰۰	۴/۰۰	۱۴/۹۷	۳/۹۸	-۰/۲۰	-۰/۵۰

۳-۷-۳- بررسی اثر مزاحمت‌ها در روش‌های اسپکتروفتومتری

جدید (EXRSM و SRSM)

برای بررسی توانایی روش‌ها در اندازه‌گیری همزمان کتکول و هیدروکینون در نمونه‌های حقیقی، اثر مزاحمت گونه‌های مختلف در اندازه‌گیری همزمان کتکول و هیدروکینون مورد بررسی قرار گرفت. روش کار به این صورت بود که میزان جذب محلول ۲/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کتکول یا هیدروکینون به ترتیب در طول موج ماکزیمم ۲۷۵ و ۲۸۶/۵ نانومتر در غیاب گونه مزاحم و در شرایط بهینه، برای ۶ 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 هیدروکینون یا کتکول اضافه گردید. سپس مقدار لازم از این محلول به دستگاه اسپکتروفتومتر منتقل و مقدار جذب در طول موج ماکزیمم کتکول یا هیدروکینون خوانده

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 کتکول یا هیدروکینون آن قدر کاهش داده شد تا سیگنال در محدوده اطمینان قرار گیرد. نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۳-۲۱ آورده شده است.

جدول ۳-۲۱: نتایج حاصل از بررسی اثر گونه‌های مزاحم در اندازه‌گیری همزمان کتکول و هیدروکینون با غلظت‌های یکسان و برابر ۲/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در روش EXRSM و SRSM

حد مجاز گونه مزاحم (وزنی - وزنی)	گونه‌های بررسی شده در اندازه‌گیری هیدروکینون	گونه‌های بررسی شده در اندازه‌گیری کتکول
۱۰۰۰	$K^+, Na^+, NH_4^+, Cl^-, Mg^{2+}, Ni^{2+}, Br^-, EDTA, SO_4^{2-}, Ca^{2+}, F^-$	$Ca^{2+}, F^-, K^+, SO_4^{2-}, Ni^{2+}, Br^-, EDTA, Na^+, Cl^-, Mg^{2+}, NH_4^+$
۴۰۰	Co^{2+}	Co^{2+}
۲۰۰	Fe^{2+}, Al^{3+} سیتریک اسید	Fe^{2+}, Al^{3+} سیتریک اسید
۱۰۰	گلوکز	گلوکز
۵۰	NO_3^-	NO_3^-
۱۰	رزورسینول- فنول	-
۱	سدیم فتالات، $Fe^{3+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, NO_2^-$	سدیم فتالات، رزورسینول، فنول، $Cd^{2+}, NO_2^-, Zn^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{3+}$

برای روش EXRSM و SRSM، مزاحمت Fe^{3+} ، Cu^{2+} و Zn^{2+} به دلیل تشکیل رسوب این کاتیون‌ها با فسفات ناشی از بافر است. علت مزاحمت NO_2^- ، جذب آن در دامنه طول موج ۳۱۰-۲۱۰ نانومتر است که ناشی از انتقالات n به π^* موجود در ساختار آن است. Cd^{2+} از جمله فلزات واسطه است و اکثر یون‌های فلزات واسطه در نواحی ماورا بنفش و مرئی جذب دارند [۲۵]. رزورسینول یکی دیگر از ایزومرهای دی هیدروکسی فنول است، بنابراین در ناحیه طول موج ۳۱۰-۲۱۰ نانومتر دارای جذب است. به دلیل وجود حلقه بنزن در ساختار سدیم فتالات و فنول، جذب کتکول و هیدروکینون در دامنه طول موج ۳۱۰-۲۱۰ نانومتر در مقایسه با جذب سدیم فتالات و فنول در این دامنه طول موج ناچیز است. بنابراین مزاحمت ناشی از گونه‌های سدیم فتالات، رزورسینول، فنول، Cd^{2+} ، NO_2^- از نوع شاهد به حساب می‌آید و قابل بر طرف کردن نیست.

۳-۷-۴ - حد تشخیص روش EXRSM و SRSM

حد تشخیص یک روش، حداقل غلظت یا وزنی از آنالیت است که می‌تواند با سطح اطمینان مشخص

آشکارسازی شود. برای محاسبه حد تشخیص از

$$LOD = \frac{KS_{bl}}{m}$$

معادله ۱-۳ استفاده شد:

$$LOD = \frac{KS_{bl}}{m}$$

معادله ۱-۳

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 روش‌های EXRSM و SRSM، ۱۰ اندازه‌گیری تکراری برای شاهد انجام شد و طیف هر محلول در محدوده طول موجی ۳۱۰-۲۱۰ نانومتر ثبت گردید و غلظت کتکول و هیدروکینون با استفاده از روش EXRSM و SRSM به دست آمد. در این روش‌ها از تقسیم سه برابر انحراف استاندارد سیگنال شاهد بر شیب منحنی کالیبراسیون، حد تشخیص به دست آمد [۴۰]. با توجه به تعریف فوق، حد تشخیص تجربی روش EXRSM برای کتکول و هیدروکینون به ترتیب ۰/۱۶۹ و ۰/۱۳۲ میلی گرم بر لیتر و حد تشخیص تجربی روش SRSM برای کتکول و هیدروکینون به ترتیب ۰/۰۷۴۵ و ۰/۱۳۲ میلی گرم بر لیتر به دست آمد.

۳-۷-۵- دقت و صحت روش EXRSM و SRSM

برای بررسی دقت و صحت روش EXRSM، محلول‌هایی با غلظت‌های متفاوت از کتکول و

هیدروکینون در شرایط بهینه ساخته شد. برای هر یک از مخلوط‌ها ۵ بار اندازه‌گیری تکراری انجام شد و طیف هر مخلوط در محدوده طول موج ۳۱۰-۲۱۰ نانومتر ثبت گردید؛ سپس غلظت کتکول و هیدروکینون با استفاده از روش‌های EXRSM و SRSM تعیین شد. مقادیر انحراف استاندارد در هر حالت محاسبه شد. نتایج حاصل از این بررسی برای روش‌های EXRSM و SRSM به ترتیب در جدول ۳-۲۲ و در جدول ۳-۲۳ آورده شده است که نشان دهنده دقت و صحت خوب این روش‌ها می‌باشد.

جدول ۳-۲۲: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش EXRSM

شماره مخلوط	کتکول موجود (mg L^{-1})	هیدروکینون موجود (mg L^{-1})	کتکول اندازه‌گیری شده (mg L^{-1})	هیدروکینون اندازه‌گیری شده (mg L^{-1})	درصد بازیابی کتکول	درصد بازیابی هیدروکینون
۱	۱/۰۰	۳/۰۰	$۱/۰۱ \pm (۰/۰۲)^*$	$۳/۰۵ \pm (۰/۰۸)$	۱۰۱/۷	۱۰۱/۰
۲	۳/۰۰	۹/۰۰	$۲/۹۹ \pm (۰/۰۲)$	$۸/۹۴ \pm (۰/۰۵)$	۹۹/۳	۹۹/۷
۳	۱۵/۰۰	۵/۰۰	$۱۵/۰۲ \pm (۰/۰۵)$	$۵/۰۷ \pm (۰/۰۸)$	۱۰۱/۴	۱۰۰/۱
۴	۲/۰۰	۲/۰۰	$۱/۹۹ \pm (۰/۰۱)$	$۲/۰۰ \pm (۰/۰۱)$	۱۰۰/۰	۹۹/۵

* اعداد داخل پرانتز انحراف استاندارد حاصل از ۵ بار اندازه‌گیری تکراری است.

جدول ۳-۲۳: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش EXRSM

شماره مخلوط	کتکول موجود (mg L^{-1})	هیدروکینون موجود (mg L^{-1})	کتکول اندازه‌گیری شده (mg L^{-1})	هیدروکینون اندازه‌گیری شده (mg L^{-1})	درصد بازیابی کتکول	درصد بازیابی هیدروکینون
۱	۱/۰۰	۳/۰۰	$۰/۹۹ \pm (۰/۰۱)^*$	$۲/۹۷ \pm (۰/۰۹)$	۹۹/۰	۹۹/۰
۲	۳/۰۰	۹/۰۰	$۳/۰۰ \pm (۰/۰۱)$	$۹/۰۹ \pm (۰/۱۳)$	۱۰۱/۰	۱۰۰/۰
۳	۱۵/۰۰	۵/۰۰	$۱۵/۰۵ \pm (۰/۰۱)$	$۴/۹۸ \pm (۰/۰۲)$	۹۹/۶	۱۰۰/۳
۴	۲/۰۰	۲/۰۰	$۱/۹۹ \pm (۰/۰۱)$	$۲/۰۲ \pm (۰/۰۲)$	۱۰۱/۰	۹۹/۵

* اعداد داخل پرانتز انحراف استاندارد حاصل از ۵ بار اندازه‌گیری تکراری است.

۳-۷-۶- کاربرد روش‌های EXRSM و SRSM در آنالیز نمونه‌های

حقیقی

به منظور ارزیابی توانایی روش EXRSM و SRSM در اندازه‌گیری همزمان کتکول و هیدروکینون،

اندازه‌گیری مقادیر ترکیبات ذکر شده در نمونه آب شهر مورد بررسی قرار گرفت. برای تهیه نمونه‌های حقیقی

از آب شهر شاهرود به عنوان بافت ثابت نمونه‌ها استفاده شد. روش کار به این صورت بود که؛ محلول حاوی ۱۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کتکول و ۱۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیدروکینون به‌عنوان محلول استاندارد تهیه شد. برای تهیه محلول نمونه به‌صورت زیر عمل شد که ابتدا ۵/۰۰ میلی‌لیتر محلول ۵۰۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر کتکول به یک بالن حجمی ۱۰۰ میلی‌لیتری و ۵/۰۰ میلی‌لیتر محلول ۵۰۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر هی‌دروکینون به یک بالن حجمی ۱۰۰ میلی‌لیتری دیگر، انتقال داده شد و با آب شهر به حجم رسانده شد. سپس از این محلول‌ها، مخلوط‌هایی با نسبت‌های غلظتی مختلف از هیدروکینون و کتکول به همراه ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفاتی pH= ۷/۰ در بالن‌های حجمی ۱۰ میلی‌لیتری تهیه و طیف آن‌ها نسبت به شاهد ثبت و ذخیره گردید. سپس غلظت کتکول و هیدروکینون در مخلوط‌های تهیه شده، با استفاده از روش افزایش استاندارد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از ۵ بار اندازه‌گیری تکراری برای روش EXRSM در جدول ۳-۲۴ و برای روش SRSM در جدول ۳-۲۵ آورده شده است.

جدول ۳-۲۴: نتایج حاصل از اندازه‌گیری همزمان کتکول و هیدروکینون در نمونه‌های آب شهر با استفاده از روش EXRSM

نمونه	مقدار افزوده شده (میلی‌گرم بر لیتر)		مقدار اندازه‌گیری شده (میلی‌گرم بر لیتر)		درصد بازیابی	
	کتکول	هیدروکینون	کتکول	هیدروکینون	کتکول	هیدروکینون
آب شهر	۲/۰۰	۴/۰۰	۲/۰۰±(۰/۰۴)*	۴/۰۷±(۰/۰۷)	۱۰۰/۰	۱۰۱/۷
آب شهر	۳/۰۰	۵/۰۰	۳/۰۵±(۰/۰۵)	۵/۰۵±(۰/۰۶)	۱۰۰/۳	۱۰۱/۰
آب شهر	۴/۰۰	۶/۰۰	۴/۰۰±(۰/۰۴)	۶/۰۵±(۰/۰۵)	۱۰۰/۰	۱۰۰/۸
آب شهر	۵/۰۰	۷/۰۰	۵/۰۰±(۰/۰۵)	۷/۰۰±(۰/۰۲)	۱۰۰/۰	۱۰۰/۰
آب شهر	۶/۰۰	۸/۰۰	۶/۰۰±(۰/۰۴)	۸/۰۰±(۰/۰۵)	۱۰۰/۰	۱۰۰/۰
آب شهر	۷/۰۰	۹/۰۰	۷/۰۶±(۰/۰۷)	۹/۰۰±(۰/۰۵)	۱۰۱/۴	۱۰۰/۰
آب شهر	۱/۰۰	۱/۰۰	۰/۹۹±(۰/۰۵)	۱/۰۱±(۰/۰۴)	۹۹/۰	۱۰۱/۰
آب شهر	۲/۰۰	۲/۰۰	۲/۰۰±(۰/۰۷)	۲/۰۵±(۰/۰۶)	۱۰۰/۰	۱۰۲/۵
آب شهر	۳/۰۰	۳/۰۰	۳/۰۰±(۰/۰۴)	۳/۰۰±(۰/۰۲)	۱۰۰/۰	۱۰۰/۰
آب شهر	۴/۰۰	۴/۰۰	۴/۰۰±(۰/۰۳)	۴/۰۰±(۰/۰۲)	۱۰۰/۰	۱۰۰/۰

* اعداد داخل پرانتز انحراف استاندارد حاصل از ۵ بار اندازه‌گیری تکراری است.

جدول ۳-۲۵: نتایج حاصل از اندازه‌گیری همزمان کتکول و هیدروکینون در نمونه‌های آب شهر با استفاده از روش SRSM

درصد بازیابی		مقدار اندازه‌گیری شده (میلی‌گرم بر لیتر)		مقدار افزوده شده (میلی‌گرم بر لیتر)		نمونه
کتکول	هیدروکینون	کتکول	هیدروکینون	کتکول	هیدروکینون	
۱۰۲/۵	۱۰۰/۵	۴/۰۵±(۰/۰۷)	۲/۰۱±(۰/۰۴)*	۴/۰۰	۲/۰۰	آب شهر
۱۰۰/۶	۱۰۰/۰	۵/۰۳±(۰/۰۴)	۳/۰۰±(۰/۰۲)	۵/۰۰	۳/۰۰	آب شهر
۱۰۱/۳	۱۰۰/۲	۶/۰۸±(۰/۰۹)	۴/۰۱±(۰/۰۳)	۶/۰۰	۴/۰۰	آب شهر
۱۰۱/۱	۱۰۱/۰	۷/۰۸±(۰/۱۱)	۵/۰۵±(۰/۰۵)	۷/۰۰	۵/۰۰	آب شهر
۹۹/۳	۱۰۰/۰	۷/۹۴±(۰/۰۶)	۶/۰۰±(۰/۰۴)	۸/۰۰	۶/۰۰	آب شهر
۱۰۰/۰	۱۰۶/۰	۹/۰۰±(۰/۰۶)	۷/۰۴±(۰/۰۶)	۹/۰۰	۷/۰۰	آب شهر
۱۰۷/۰	۹۵/۰	۱/۰۷±(۰/۱۰)	۰/۹۵±(۰/۰۵)	۱/۰۰	۱/۰۰	آب شهر
۱۰۳/۰	۱۰۰/۰	۲/۰۶±(۰/۰۷)	۲/۰۰±(۰/۰۶)	۲/۰۰	۲/۰۰	آب شهر
۱۰۰/۰	۱۰۱/۳	۳/۰۴±(۰/۰۵)	۳/۰۰±(۰/۰۲)	۳/۰۰	۳/۰۰	آب شهر
۱۰۰/۰	۱۰۱/۰	۴/۰۰±(۰/۱۴)	۴/۰۴±(۰/۰۴)	۴/۰۰	۴/۰۰	آب شهر

* اعداد داخل پرانتز انحراف استاندارد حاصل از ۵ بار اندازه‌گیری تکراری است.

این نتایج نشان می‌دهد که می‌توان غلظت هیدروکینون و کتکول را به‌طور همزمان به روش EXRSM

و SRSM در نمونه‌های آب شهر با دقت و صحت خوبی تعیین کرد.

۳-۷-۷- کالیبراسیون چند متغیره و محلول سازی

در کالیبراسیون چند متغیره برای اندازه گیری همزمان کتکول و هیدروکینون از روش PLS استفاده شد. به منظور بهینه سازی پارامترها و رسیدن به بهترین صحت در این روش، محلول های سری ارزیابی و محلول های سری تست تهیه و طیف آن ها نسبت به محلول شاهد در دامنه ۳۱۰-۲۱۰ نانومتر ثبت گردید و مورد بررسی قرار گرفت. ترکیب غلظتی محلول های سری ارزیابی و محلول های سری پیش بینی به ترتیب در جدول ۳-۱۱ و جدول ۳-۱۲ آورده شده است. محلول های سری کالیبراسیون (همان محلول های سری ارزیابی روش های EXRSM و SRSM هستند) و محلول های سری ارزیابی (همان محلول های سری تست روش های EXRSM و SRSM هستند) مانند آنچه در بخش ۳-۷-۲- گفته شد، تهیه گردید.

۳-۷-۷-۱- روش حداقل مربعات جزئی (PLS)

به منظور مقایسه نتایج روش های اسپکتروفتومتری جدید EXRSM و SREM، با نتایج یک روش دیگر، روش رگرسیون حداقل مربعات جزئی (PLS) به کار برده شد. برای انجام رگرسیون PLS محلول های سری و محلول های سری تست تهیه شده در بخش ۳-۷-۲- مورد استفاده قرار گرفت. در این صورت برای هر محلول ۲۰۱ داده جذبی در ۲۰۱ طول موج متفاوت ثبت شد. داده های ثبت شده به صورت دو ماتریس ۲۰۱×۳۰ و ۲۰۱×۱۰ در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت. سری اول از این محلول ها (سری کالیبراسیون)، برای مدل سازی به روش حداقل مربعات جزئی و سری دوم محلول ها (سری ارزیابی)، برای سنجش توانایی مدل ساخته شده در پیش بینی غلظت، به کار گرفته شد. ترکیب محلول های سری ارزیابی و سری تست به ترتیب در جدول ۳-۱۱ و جدول ۳-۱۲ آمده است.

روش کار در تهیه و اندازه گیری جذب محلول های سری ارزیابی و محلول های سری تست مانند روش

به کار گرفته شده در روش های EXRSM و SRSM بود. در روش PLS دامنه طول موج و تعداد فاکتور PLS برای رسیدن به بهترین صحت به طور همزمان بهینه شدند. برای هر دامنه طول موج، ابتدا با استفاده از نمونه های سری کالیبراسیون، مدل سازی انجام شد و سپس مدل ساخته شده برای محاسبه غلظت نمونه های سری ارزیابی به کار برده شد. عمل مدل سازی و پیش بینی با در نظر گرفتن تعداد فاکتورهای PLS از ۱ تا ۷ تکرار گردید. دامنه طول موجی و تعداد فاکتور PLS که کمترین خطا را برای پیش بینی غلظت کتکول و هیدروکینون ایجاد می کنند؛ به عنوان بهترین دامنه طول موج و تعداد فاکتور PLS برای مدل سازی مورد استفاده قرار گرفت. نتایج حاصل از بررسی و بهینه سازی دامنه طول موج و تعداد فاکتور PLS برای کتکول و هیدروکینون در جدول ۳-۲۶ آورده شده است.

جدول ۳-۲۶: نتایج حاصل از بهینه سازی دامنه طول موج و تعداد فاکتور PLS برای نمونه های سری کالیبراسیون

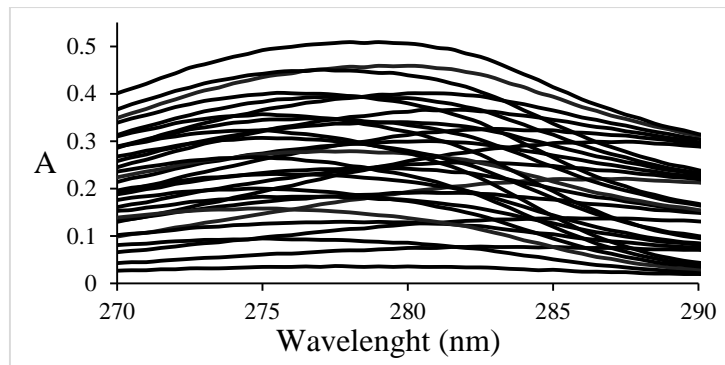
دامنه طول موج ۲۸۰-۲۶۰ نانومتر (۴۱ نقطه)			دامنه طول موج ۲۶۰-۲۵۰ نانومتر (۲۱ نقطه)		
MSE هیدروکینون	MSE کتکول	تعداد فاکتور	MSE هیدروکینون	MSE کتکول	تعداد فاکتور
۱۲/۵۵۲	۵/۴۲۳	۱	۱۴/۹۶۷	۳/۹۹۲	۱
۰/۰۲۹	۰/۱۰۶	۲	۴/۶۲۶	۰/۱۱۰	۲
۱۵/۴۰۱	۱/۴۷۱	۳	۱۶/۱۰۵	۰/۷۸۹	۳
۱۵/۳۴۸	۱/۴۲۰	۴	۱۳/۱۶۳	۰/۷۶۲	۴
۱۵/۳۴۷	۱/۴۱۸	۵	۳۲/۲۳۹	۱/۳۴۸	۵
۱۵/۳۹۴	۱/۵۰۳	۶	۳۷/۳۵۰	۱/۴۶۵	۶
۱۵/۳۹۹	۱/۵۴۹	۷	۳۲/۱۹۰	۱/۳۶۱	۷
دامنه طول موج ۲۹۰-۲۷۰ نانومتر (۴۱ نقطه)			دامنه طول موج ۲۷۰-۲۶۰ نانومتر (۲۱ نقطه)		
MSE هیدروکینون	MSE کتکول	تعداد فاکتور	MSE هیدروکینون	MSE کتکول	تعداد فاکتور
۱/۲۷۲	۱۱/۱۱۷	۱	۱۵/۸۵۶	۳/۰۰۸	۱
۰/۰۲۵	۰/۰۲۲	۲	۲/۱۳۶	۰/۷۵۹	۲
۵/۰۶۴	۷/۴۳۰	۳	۲۲/۵۴۵	۰/۳۸۸	۳
۵/۰۳۸	۷/۴۱۶	۴	۱۷/۹۱۷	۱/۳۳۰	۴
۵/۰۴۴	۷/۴۴۵	۵	۱۷/۸۱۱	۱/۲۲۱	۵
۵/۱۱۳	۷/۵۴۸	۶	۱۸/۹۶۸	۱/۶۷۴	۶
۵/۱۳۸	۷/۵۶۲	۷	۱۹/۱۸۴	۱/۶۵۷	۷
دامنه طول موج ۲۸۹-۲۷۲ نانومتر (۳۵ نقطه)			دامنه طول موج ۲۸۰-۲۷۰ نانومتر (۲۱ نقطه)		
MSE هیدروکینون	MSE کتکول	تعداد فاکتور	MSE هیدروکینون	MSE کتکول	تعداد فاکتور
۷/۰۸۶	۱۱/۵۵۶	۱	۱۱/۵۰۱	۶/۴۷۱	۱
۰/۰۲۶	۰/۰۲۰	۲	۰/۰۱۰	۰/۰۴۱	۲
۴/۶۹۷	۷/۹۱۹	۳	۱۲/۵۴۲	۲/۱۳۱	۳
۴/۶۷۵	۷/۹۰۹	۴	۱۲/۵۳۷	۲/۱۱۳	۴
۴/۷۷۶	۸/۰۲۸	۵	۱۲/۵۷۲	۲/۲۵۶	۵

۴/۷۶۱	۸/۰۵۵	۶	۱۲/۵۹۲	۲/۱۸۵	۶
۴/۸۰۰	۸/۰۷۸	۷	۱۲/۶۳۲	۲/۲۸۶	۷
دامنه طول موج ۲۹۰-۳۰۰ نانومتر (۲۱ نقطه)			دامنه طول موج ۲۸۰-۲۹۰ نانومتر (۲۱ نقطه)		
MSE هیدروکینون	MSE کتکول	تعداد فاکتور	MSE هیدروکینون	MSE کتکول	تعداد فاکتور
۰/۰۷۳	۳۸/۴۸۱	۱	۳/۳۸۰	۱۹/۴۹۹	۱
۰/۰۵۲	۲/۰۲۲	۲	۰/۰۳۰	۰/۰۱۷	۲
۰/۰۰۹	۸/۷۰۸	۳	۰/۹۷۲	۲۴/۵۸۷	۳
۰/۴۶۹	۷/۸۱۳	۴	۰/۹۵۹	۲۴/۵۸۱	۴
۰/۴۲۶	۷/۸۰۵	۵	۱/۰۹۳	۲۴/۶۸۰	۵
۰/۴۵۷	۷/۸۴۹	۶	۱/۰۳۹	۲۴/۷۱۵	۶
۰/۴۷۳	۷/۸۷۲	۷	۱/۲۲۵	۲۴/۷۱۳	۷
دامنه طول موج ۲۸۵-۲۸۰ نانومتر (۱۱ نقطه)			دامنه طول موج ۲۷۵-۲۷۰ نانومتر (۱۱ نقطه)		
MSE هیدروکینون	MSE کتکول	تعداد فاکتور	MSE هیدروکینون	MSE کتکول	تعداد فاکتور
۵/۰۱۸	۱۶/۰۳۶	۱	۱۳/۱۸۷	۴/۹۵۱	۱
۰/۰۲۷	۰/۰۱۹	۲	۰/۰۲۷	۰/۰۷۶	۲
۲/۰۹۲	۱۴/۹۸۳	۳	۱۶/۹۵۷	۱/۲۱۸	۳
۲/۰۸۸	۱۴/۹۸۱	۴	۱۶/۹۴۲	۱/۲۰۲	۴
۲/۱۱۸	۱۴/۹۹۲	۵	۱۶/۹۹۴	۱/۴۵۱	۵
۲/۱۰۸	۱۴/۹۹۲	۶	۱۶/۹۷۶	۱/۳۰۱	۶
۲/۱۶۰	۱۴/۹۸۶	۷	۱۷/۰۰۴	۱/۴۰۴	۷
دامنه طول موج ۲۸۵-۲۹۰ نانومتر (۲۱ نقطه)			دامنه طول موج ۲۷۵-۲۸۰ نانومتر (۲۱ نقطه)		
MSE هیدروکینون	MSE کتکول	تعداد فاکتور	MSE هیدروکینون	MSE کتکول	تعداد فاکتور
۰/۷۶۲	۳۰/۵۷۱	۱	۹/۶۸۸	۹/۵۵۸	۱
۰/۰۳۲	۰/۰۱۹	۲	۰/۰۱۸	۰/۰۲۹	۲
۰/۰۵۹	۶۸/۳۹۸	۳	۸/۴۷۳	۳/۸۰۶	۳
۰/۰۵۶	۶۸/۳۹۳	۴	۸/۴۶۵	۳/۸۰۰	۴
۰/۱۵۳	۶۸/۴۰۸	۵	۸/۵۰۷	۳/۸۶۷	۵
۰/۰۷۷	۶۸/۴۰۱	۶	۸/۵۱۱	۳/۸۶۴	۶
۰/۱۵۳	۶۴/۴۱۱	۷	۸/۵۰۶	۳/۸۵۸	۷

با توجه به نتایج جدول ۳-۲۶ دامنه طول موج ۲۹۰-۲۷۰ نانومتر با فواصل ۰/۵ نانومتری به عنوان

دامنه طول موج بهینه و تعداد فاکتور ۲ و ۲ به ترتیب برای کتکول و هیدروکینون انتخاب شد. در شکل ۳-۲۴

طیف محلول‌های سری ارزیابی در دامنه طول‌موج بهینه مشاهده می‌شود.



شکل ۳-۲۴: طیف جذبی محلول‌های سری ارزیابی حاوی کتکول و هیدروکینون در محدوده طول‌موج ۲۷۰-۲۹۰ نانومتر

با توجه به جدول ۳-۲۶ تعداد فاکتورهای ۲ و ۲ به ترتیب برای اندازه‌گیری کتکول و هیدروکینون در

مدل‌سازی PLS انتخاب شد.

نتایج حاصل از تخمین غلظت کتکول و هیدروکینون با استفاده از روش PLS در محلول‌های سری

کالیبراسیون و محلول‌های سری ارزیابی در شرایط بهینه، به ترتیب در جدول ۳-۲۷ و جدول ۳-۲۸ آورده

شده است.

جدول ۳-۲۷: نتایج حاصل از به کارگیری روش PLS برای پیش‌بینی غلظت اجزا در سری کالیبراسیون

خطای نسبی (%)		غلظت پیش‌بینی شده (mg L^{-1})		غلظت واقعی (mg L^{-1})		محلول
هیدروکینون	کتکول	هیدروکینون	کتکول	هیدروکینون	کتکول	
-۱۶/۰۰	۲۲/۰۰	۰/۸۴	۱/۲۲	۱/۰۰	۱/۰۰	۱
-۱۷/۰۰	۱/۵۰	۱/۸۳	۴/۰۶	۱/۰۰	۴/۰۰	۲
-۱۵/۰۰	۱/۰۰	۰/۸۵	۷/۰۷	۱/۰۰	۷/۰۰	۳
-۶/۰۰	-۰/۵۵	۰/۹۴	۸/۹۵	۱/۰۰	۹/۰۰	۴
-۱۱/۰۰	۱/۳۳	۰/۸۹	۱۲/۱۶	۱/۰۰	۱۲/۰۰	۵
-۱۴/۰۰	-۱/۱۳	۰/۸۶	۱۴/۸۳	۱/۰۰	۱۵/۰۰	۶
-۱/۶۷	-۳/۰	۲/۹۵	۰/۹۷	۳/۰۰	۱/۰۰	۷
-۱/۰۰	۱/۵۰	۲/۹۷	۴/۰۶	۳/۰۰	۴/۰۰	۸
۲/۰۰	-۵/۰۰	۳/۰۶	۶/۶۵	۳/۰۰	۷/۰۰	۹
-۱/۰۰	-۰/۲۲	۲/۹۷	۸/۹۸	۳/۰۰	۹/۰۰	۱۰
۶/۶۷	۱/۲۵	۳/۲۰	۱۲/۱۶	۳/۰۰	۱۲/۰۰	۱۱
۰/۳۳	-۰/۵۳	۳/۰۱	۱۴/۹۲	۳/۰۰	۱۵/۰۰	۱۲
-۸/۳۳	-۱۱/۰۰	۵/۵۰	۰/۸۹	۶/۰۰	۱/۰۰	۱۳
۰/۰۰	۳/۲۵	۶/۰۰	۴/۱۳	۶/۰۰	۴/۰۰	۱۴
۰/۰۰	۰/۲۸	۶/۰۰	۷/۰۲	۶/۰۰	۷/۰۰	۱۵
-۱/۰۰	-۰/۶۷	۵/۹۴	۸/۹۴	۶/۰۰	۹/۰۰	۱۶
۱/۰۰	۱/۵۸	۶/۰۶	۱۲/۱۹	۶/۰۰	۱۲/۰۰	۱۷
-۰/۳۳	-۰/۷۳	۵/۹۸	۱۴/۸۹	۶/۰۰	۱۵/۰۰	۱۸
-۱/۴۴	-۱۱/۰	۸/۸۷	۰/۸۹	۹/۰۰	۱/۰۰	۱۹
-۰/۶۷	۱/۵۰	۸/۹۴	۴/۰۶	۹/۰۰	۴/۰۰	۲۰
-۰/۶۷	-۰/۸۶	۸/۹۴	۶/۹۴	۹/۰۰	۷/۰۰	۲۱
-۰/۲۲	۱/۰۰	۹/۰۲	۹/۰۹	۹/۰۰	۹/۰۰	۲۲
-۱/۱۱	-۰/۷۵	۸/۹۰	۱۲/۰۹	۹/۰۰	۱۲/۰۰	۲۳
-۰/۵۵	-۱/۰۷	۸/۹۵	۱۴/۸۴	۹/۰۰	۱۵/۰۰	۲۴
۰/۴۲	-۱۱/۰	۱۲/۰۵	۰/۸۹	۱۲/۰۰	۱/۰۰	۲۵
۰/۱۷	۲/۵۰	۱۲/۰۲	۴/۱۰	۱۲/۰۰	۴/۰۰	۲۶
۰/۱۷	-۰/۴۳	۱۲/۰۲	۶/۹۷	۱۲/۰۰	۷/۰۰	۲۷
۰/۹۲	-۰/۴۴	۱۲/۱۱	۸/۹۶	۱۲/۰۰	۹/۰۰	۲۸
۱/۳۳	۱/۵۸	۱۲/۱۶	۱۲/۱۹	۱۲/۰۰	۱۲/۰۰	۲۹
۱/۲۵	-۰/۴۰	۱۲/۱۵	۱۴/۹۴	۱۲/۰۰	۱۵/۰۰	۳۰

جدول ۳-۲۸: نتایج حاصل از به کارگیری روش PLS برای پیش‌بینی غلظت اجزا در سری ارزیابی

محلول	غلظت واقعی (mg L^{-1})		غلظت پیش‌بینی شده (mg L^{-1})		خطای نسبی (%)	
	کتکول	هیدروکینون	کتکول	هیدروکینون	کتکول	هیدروکینون
۱	۲/۰۰	۳/۰۰	۱/۹۸	۳/۰۴	-۱/۰۰	۱/۳۳
۲	۳/۰۰	۶/۰۰	۳/۰۶	۵/۹۶	۲/۰۰	-۰/۶۷
۳	۵/۰۰	۴/۰۰	۵/۰۲	۴/۰۷	۰/۴۰	۱/۷۵
۴	۸/۰۰	۵/۰۰	۸/۰۱	۵/۰۴	۰/۱۲	-۰/۸۰
۵	۸/۰۰	۸/۰۰	۸/۰۸	۷/۹۶	۱/۰۰	-۰/۵۰
۶	۱۰/۰۰	۴/۰۰	۹/۹۵	۴/۰۶	-۰/۵۰	۱/۵۰
۷	۱۰/۰۰	۶/۰۰	۹/۹۲	۵/۹۹	-۰/۸۰	-۰/۱۷
۸	۱۰/۰۰	۹/۰۰	۱۰/۰۵	۸/۹۴	۰/۵۰	-۰/۶۷
۹	۱۴/۰۰	۲/۰۰	۱۴/۱۲	۲/۰۰	۰/۸۶	۰/۰۰
۱۰	۱۵/۰۰	۴/۰۰	۱۴/۹۲	۴/۱۱	-۰/۶۷	۲/۷۵

۳-۷-۸- دقت و صحت روش PLS

برای بررسی دقت و صحت روش PLS، محلول‌هایی با غلظت‌های متفاوت از کتکول و هیدروکینون در شرایط بهینه ساخته شد. برای هر یک از مخلوط‌ها ۵ بار اندازه‌گیری تکراری انجام شد و طیف هر مخلوط در محدوده طول موج ۳۱۰-۲۱۰ نانومتر ثبت گردید؛ سپس غلظت کتکول و هیدروکینون با استفاده از روش‌های PLS پیش‌بینی شد. مقادیر انحراف استاندارد در هر حالت محاسبه شد. نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۳-۲۹ آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد که روش PLS با دقت و صحت خوبی برای تعیین همزمان کتکول و هیدروکینون قابل کاربرد است.

جدول ۳-۲۹: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش PLS

شماره مخلوط	کتکول موجود (mg L^{-1})	هیدروکینون موجود (mg L^{-1})	کتکول اندازه‌گیری شده (mg L^{-1})	هیدروکینون اندازه‌گیری شده (mg L^{-1})	درصد بازیابی کتکول	درصد بازیابی هیدروکینون
۱	۱/۰۰	۳/۰۰	$۱/۰۳ \pm (۰/۰۷)$	$۳/۰۲ \pm (۰/۰۴)$	۱۰۳/۰	۱۰۷/۰
۲	۳/۰۰	۹/۰۰	$۲/۹۴ \pm (۰/۱۱)$	$۸/۹۷ \pm (۰/۱۳)$	۹۸/۰	۹۹/۷
۳	۱۵/۰۰	۵/۰۰	$۱۵/۰۵ \pm (۰/۰۷)$	$۴/۹۳ \pm (۰/۰۹)$	۱۰۰/۵	۹۸/۶
۴	۲/۰۰	۲/۰۰	$۲/۰۴ \pm (۰/۰۸)$	$۱/۹۴ \pm (۰/۰۷)$	۱۰۴/۵	۹۷/۰

* اعداد داخل پرانتز انحراف استاندارد حاصل از ۵ بار اندازه‌گیری تکراری است.

۳-۷-۹- کاربرد روش PLS در آنالیز نمونه‌های حقیقی

به منظور ارزیابی توانایی روش PLS در اندازه‌گیری همزمان کتکول و هیدروکینون، اندازه‌گیری مقادیر ترکیبات ذکر شده در نمونه آب شهر مورد بررسی قرار گرفت. برای تهیه نمونه‌های حقیقی از آب شهر شاهرود به عنوان بافت ثابت نمونه‌ها استفاده شد. روش کار به این صورت بود که؛ محلول حاوی ۱۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کتکول و ۱۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیدروکینون به‌عنوان محلول استاندارد تهیه شد. برای تهیه محلول نمونه به‌صورت زیر عمل شد که ابتدا ۵/۰۰ میلی‌لیتر محلول ۵۰۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر کتکول به یک بالن حجمی ۱۰۰ میلی‌لیتری و ۵/۰۰ میلی‌لیتر محلول ۵۰۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر هیدروکینون به یک بالن حجمی ۱۰۰ میلی‌لیتری دیگر، انتقال داده شد و با آب شهر به حجم رسانده شد. سپس از این محلول‌ها، مخلوط‌هایی با نسبت‌های غلظتی مختلف از هیدروکینون و کتکول به همراه ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات $\text{pH} = 7.0$ در بالن‌های حجمی ۱۰ میلی‌لیتری تهیه و طیف آن‌ها نسبت به شاهد ثبت و ذخیره گردید. سپس غلظت کتکول و هیدروکینون در مخلوط‌های تهیه شده، با استفاده از روش افزایش استاندارد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از ۵ بار اندازه‌گیری تکراری برای روش PLS در جدول ۳-۳ آورده شده است.

جدول ۳-۳: نتایج حاصل از اندازه‌گیری همزمان کتکول و هیدروکینون در نمونه‌های آب شهر با استفاده از روش PLS

درصد بازیابی		مقدار اندازه‌گیری شده (میلی گرم بر لیتر)		مقدار افزوده شده (میلی گرم بر لیتر)		نمونه
هیدروکینون	کتکول	هیدروکینون	کتکول	هیدروکینون	کتکول	
۹۶/۷	۱۰۳/۵	۳/۸۷±(۰/۱۳)	۲/۰۷±(۰/۰۴)*	۴/۰۰	۲/۰۰	آب شهر
۹۹/۶	۱۰۳/۳	۴/۹۸±(۰/۰۶)	۳/۱۰±(۰/۱۰)	۵/۰۰	۳/۰۰	آب شهر
۹۹/۰	۱۰۰/۰	۵/۹۴±(۰/۰۶)	۴/۰۰±(۰/۰۴)	۶/۰۰	۴/۰۰	آب شهر
۱۰۰/۴	۱۰۰/۴	۷/۰۳±(۰/۰۶)	۵/۰۲±(۰/۰۵)	۷/۰۰	۵/۰۰	آب شهر
۱۰۰/۲	۱۰۰/۰	۸/۰۲±(۰/۰۹)	۶/۰۰±(۰/۰۳)	۸/۰۰	۶/۰۰	آب شهر
۱۰۱/۰	۱۰۰/۰	۹/۰۹±(۰/۱۲)	۷/۰۰±(۰/۰۵)	۹/۰۰	۷/۰۰	آب شهر
۱۰۰/۰	۱۰۰/۰	۱/۰۰±(۰/۰۴)	۱/۰۰±(۰/۰۵)	۱/۰۰	۱/۰۰	آب شهر
۹۷/۰	۱۰۲/۰	۱/۹۴±(۰/۰۶)	۲/۰۴±(۰/۰۶)	۲/۰۰	۲/۰۰	آب شهر
۹۹/۳	۱۰۲/۰	۲/۹۸±(۰/۰۵)	۳/۰۶±(۰/۰۹)	۳/۰۰	۳/۰۰	آب شهر
۱۰۱/۷	۱۰۱/۷	۴/۰۷±(۰/۱۱)	۴/۰۷±(۰/۱۱)	۴/۰۰	۴/۰۰	آب شهر

* اعداد داخل پرانتز انحراف استاندارد حاصل از ۵ بار اندازه‌گیری تکراری است.

۳-۸- اندازه‌گیری همزمان رزورسینول و هیدروکینون با استفاده

از روش‌های اسپکتروفتومتری جدید

با توجه به اهمیت و کاربردهای رزورسینول و هیدروکینون که در فصل اول به آن‌ها اشاره گردید، ارائه روشی حساس، ساده و گزینش‌پذیر برای اندازه‌گیری مقادیر بسیار کم آن‌ها ضروری است. در ادامه این فصل روش‌های EXRSM، SRSM و PLS برای اندازه‌گیری همزمان این دو ترکیب آورده شده است.

۳-۹- محلول‌های مورد استفاده و طرز تهیه آن‌ها

در تهیه تمام محلول‌ها از آب مقطر و مواد شیمیایی با خلوص تجزیه‌ای تهیه شده از شرکت مرک^۱ استفاده گردید. محلول‌های هیدروکینون و رزورسینول با غلظت‌های ۵۰۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر، از انحلال ۰/۰۵۰۰ گرم هیدروکینون خالص و رقیق کردن آن با آب مقطر، در بالن حجمی ۱۰۰ میلی‌لیتری تهیه شد. محلول‌های رقیق‌تر هر روز با رقیق‌سازی متوالی از محلول ۵۰۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر تازه تهیه شده، ساخته شد. محلول‌های بافر فسفاتی با $\text{pH}=5/0-9/0$ ، از مخلوط کردن حجم‌های معین از محلول‌های ۰/۰۶۰ مولار دی‌سدیم هیدروژن فسفات و ۰/۰۶۰ مولار پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات در بالن حجمی ۱۰۰ میلی‌لیتری تهیه شد. برای تهیه محلول‌هایی با $\text{pH}=2/0-4/0$ ، از محلول‌های فسفریک اسید ۱/۰۰ مولار و پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات ۰/۰۶۰ مولار استفاده شد. برای تهیه بافر سیتراتی با $\text{pH}=7/0$ حجم‌های معین از محلول‌های ۰/۱۰ مولار سیتریک اسید و ۰/۱۰ مولار سدیم هیدروکسید استفاده شد. بافر فتالاتی با $\text{pH}=7/0$ با مخلوط کردن حجم‌های معین از محلول پتاسیم هیدروژن فتالات ۰/۲۰ نرمال و محلول سدیم هیدروکسید ۰/۱۰ مولار تهیه

^۱- Merck

شد. pH محلول‌های تهیه شده با استفاده از pH متر، تنظیم گردید [۳۹].

۳-۹-۱- حد تشخیص روش PLS

به منظور بررسی حد تشخیص روش PLS، ۱۰ اندازه‌گیری تکراری برای شاهد انجام شد و طیف هر محلول در محدوده طول موجی ۲۱۰-۳۱۰ نانومتر ثبت گردید و غلظت کتکول و هیدروکینون با استفاده از این روش به دست آمد. حد تشخیص در روش PLS، سه برابر انحراف استاندارد غلظت اندازه‌گیری شده برای هر جز در نظر گرفته شد [۴۱]. با توجه به تعریف فوق، حد تشخیص تجربی روش PLS برای کتکول و هیدروکینون به ترتیب ۰/۲۱۶ و ۰/۲۴۳ میلی‌گرم بر لیتر به دست آمد.

۳-۱۰- دستگاه‌ها و وسایل مورد استفاده

برای ثبت طیف‌های جذبی در ناحیه مرئی-فرابنفش از یک اسپکتروفتومتر دو پرتویی ریلی مدل ۲۶۰۱ UV- مجهز به یک جفت سل کوارتز ۱/۰ سانتی‌متری و برای اندازه‌گیری pH از دستگاه pH-متر متراهم^۲ مدل ۷۴۴ مجهز به یک الکتروود غشای شیشه-کالومل (۳ مولار) استفاده شد.

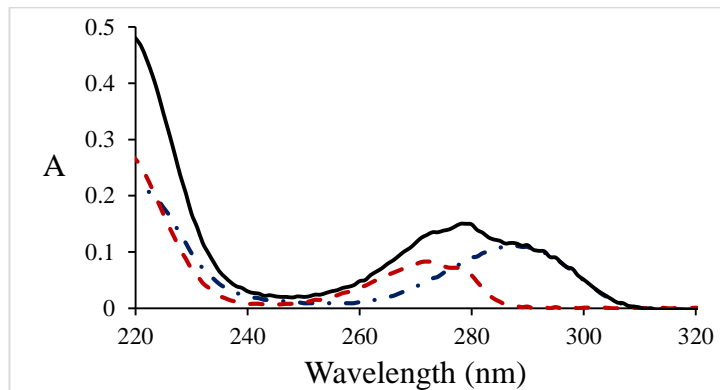
۳-۱۱- طیف جذبی

طیف جذبی محلول‌های رزورسینول، هیدروکینون و مخلوط حاوی این دو گونه در شکل ۳-۲۵ نشان داده شده است. برای ثبت طیف جذبی محلول نمونه به این ترتیب عمل شد که، به یک بالن حجمی ۱۰ میلی‌لیتری به ترتیب ۱/۰۰ میلی‌لیتر محلول هیدروکینون یا رزورسینول هر کدام با غلظت ۵۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات $\text{pH}=7.0$ اضافه شد و با آب مقطر تا خط نشانه بالن حجمی، رقیق گردید. برای ثبت طیف جذبی مخلوط به این ترتیب عمل شد که، به یک بالن حجمی ۱۰ میلی‌لیتری به ترتیب ۱/۰۰ میلی‌لیتر محلول هیدروکینون و ۱/۰۰ میلی‌لیتر محلول رزورسینول با

^۲ - Uv- 2601 Reileigh

^۱ Metrohm 744

غلظت ۵۰/۰ میلی گرم بر لیتر و ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفات $\text{pH}=7/0$ اضافه شد. محلول حاصل تا حجم ۱۰/۰۰ میلی لیتر با آب مقطر رقیق گردید. پس از یکنواخت کردن محلول، مقداری از آن به داخل سل اسپکتروفتومتر منتقل و طیف جذبی هر یک نسبت به شاهد در ناحیه ۲۱۰-۳۲۰ نانومتر، ثبت شد (شکل ۳-۲۵). برای تهیه محلول شاهد مانند روش فوق عمل شد، با این تفاوت که به محلول شاهد، رزورسینول و یا هیدروکینون اضافه نشد.



شکل ۳-۲۵: طیف جذبی ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر کتکول (---)، طیف جذبی ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر هیدروکینون (-.-) و طیف جذبی مخلوط ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر از کتکول و هیدروکینون با غلظت ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر از هر یک در $\text{pH}=7/0$ (—)

با توجه به شکل ۳-۲۵، ماکزیمم مقدار جذب برای رزورسینول در طول موج ۲۷۲ نانومتر و برای هیدروکینون در ۲۸۶/۵ نانومتر مشاهده شد. همان طور که در شکل ۳-۲۵ مشاهده می شود، امکان اندازه گیری هر یک از این دو ایزومر به طور جداگانه در یک مخلوط، به روش اسپکترومتری معمولی به طور مستقیم، امکان پذیر نیست. لذا برای اندازه گیری این دو گونه در مخلوط، از روش های اسپکتروفتومتری ارائه شده جدید استفاده شد [۲۵]. نتایج نشان داد که پیک های جذبی در طول موج های ۲۷۲ و ۲۸۶/۵ نانومتر به ترتیب با غلظت رزورسینول و هیدروکینون متناسب است. بنابراین در بهینه سازی متغیرهای تجربی موثر بر حساسیت روش و استخراج منحنی های کالیبراسیون برای هر یک از ترکیبات، از مقدار جذب محلول هر ترکیب نسبت به شاهد در طول موج های ذکر شده، به عنوان سیگنال تجزیه ای استفاده شد.

۱۲-۳- بررسی و بهینه‌سازی متغیرهای موثر بر حساسیت

روش‌های اندازه‌گیری رزورسینول و هیدروکینون

برای رسیدن به بهترین گزینش‌پذیری و حساسیت و در نتیجه حد تشخیص بهتر، متغیرهای موثر بر میزان جذب رزورسینول و هیدروکینون مورد بررسی قرار گرفت و بهینه شد. در بررسی متغیرهای موثر از روش بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان^۱ استفاده گردید. در این روش تمام متغیرها ثابت در نظر گرفته شده و متغیری که بایستی بهینه شود، تغییر داده می‌شود تا مقدار بهینه آن مشخص گردد. متغیرهایی که مورد بررسی قرار گرفتند به ترتیب عبارتند از:

۱- pH محلول بافر

۲- نوع بافر

۳- حجم بافر

۴- قدرت یونی

در ادامه، نتیجه بررسی هر کدام از متغیرهای فوق را بر میزان سیگنال تجزیه‌ای مورد بحث قرار می‌دهیم. برای بهینه‌سازی متغیرها به صورت زیر عمل شد: به یک بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری، ۲/۰۰ میلی لیتر از بافر مورد نظر و ۱/۰۰ میلی لیتر از محلول ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر رزورسینول یا هیدروکینون اضافه گردید، محلول حاصل با آب مقطر تا خط نشانه بالن رقیق شد. برای تهیه محلول شاهد مانند روش فوق عمل شد، با این تفاوت که به محلول شاهد، رزورسینول و یا هیدروکینون اضافه نشد.

۱۲-۳-۱- بررسی اثر pH

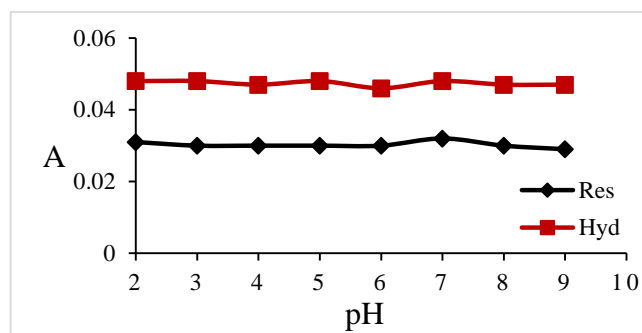
اثر pH بر جذب و طول موج ماکزیمم جذب هیدروکینون و رزورسینول در ناحیه ۹/۰ - ۲/۰ مورد بررسی قرار گرفت. این بررسی در حضور غلظت ۲/۰۰ میلی گرم بر لیتر رزورسینول یا هیدروکینون و ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفاتی انجام شد. نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۳-۳۱ و شکل ۳-۲۶ نشان داده شده

^۱ One-at-a time

است. نتایج نشان داد مقادیر جذب و طول موج ماکزیمم جذب برای رزورسینول و هیدروکینون به ترتیب در ۲۷۲ و ۲۸۶/۵ نانومتر، در دامنه ۹/۰ - ۲/۰ pH ثابت است. لذا با در نظر گرفتن گزینش پذیری روش و با توجه به این که در pH های اسیدی، هیدرولیز رزورسینول و یا هیدروکینون امکان پذیر است و در pH های بازی احتمال رسوب گونه های مزاحم وجود دارد، محلول بافری با pH= ۷/۰ برای مطالعات و بررسی های بعدی انتخاب گردید.

جدول ۳-۳۱: نتایج حاصل از بررسی اثر pH

pH	جذب هیدروکینون	طول موج ماکزیمم هیدروکینون	جذب رزورسینول	طول موج ماکزیمم رزورسینول
۲/۰	۰/۰۴۸	۲۸۶/۵	۰/۰۳۱	۲۷۲
۳/۰	۰/۰۴۸	۲۸۶/۵	۰/۰۳۰	۲۷۲
۴/۰	۰/۰۴۷	۲۸۶/۵	۰/۰۳۰	۲۷۲
۵/۰	۰/۰۴۸	۲۸۶/۵	۰/۰۳۰	۲۷۲
۶/۰	۰/۰۴۶	۲۸۶/۵	۰/۰۲۸	۲۷۲
۷/۰	۰/۰۴۸	۲۸۶/۵	۰/۰۳۳	۲۷۲
۸/۰	۰/۰۴۷	۲۸۶/۵	۰/۰۳۰	۲۷۲
۹/۰	۰/۰۴۷	۲۸۶/۵	۰/۰۲۹	۲۷۲



شکل ۳-۲۶: بررسی اثر pH شرایط: ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفات و غلظت ۲/۰۰ میلی گرم بر لیتر رزورسینول و هیدروکینون

۳-۱۲-۲- بررسی نوع بافر با $\text{pH} = 7/0$

برای انجام این کار ابتدا محلول‌های بافر با $\text{pH} = 7/0$ از نوع فسفات‌ی، فتالاتی و سیتراتی مطابق بخش ۳-۹- تهیه شد. اثر نوع بافر بر سیگنال تجزیه‌ای رزورسینول و هیدروکینون مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی به یک بالن حجمی ۱۰ میلی‌لیتری حاوی ۱/۰۰ میلی‌لیتر محلول ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر رزورسینول یا هیدروکینون، ۲/۰۰ میلی‌لیتر از بافر مورد نظر اضافه و تا خط نشانه بالن با آب مقطر رقیق گردید. سپس جذب هر محلول در طول موج ماکزیمم جذب خودش اندازه‌گیری شد. برای تهیه محلول شاهد مانند روش فوق عمل شد، با این تفاوت که به محلول شاهد، رزورسینول و یا هیدروکینون اضافه نشد. نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۳-۳۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد سیگنال تجزیه‌ای در حضور بافر فسفات‌ی با $\text{pH} = 7/0$ در مقایسه با بافر سیتراتی تقریباً یکسان است. بافر فسفات‌ی برای بررسی‌های بعدی انتخاب شد. به دلیل وجود حلقه بنزن در ساختار بافر فتالاتی، جذب رزورسینول و هیدروکینون در مقایسه با جذب بافر فتالاتی در ناحیه طول‌موج ۳۲۰-۲۱۰ نانومتر، ناچیز بود، بنابراین از بافر فتالاتی نمی‌توان استفاده کرد.

جدول ۳-۳۲: نتایج حاصل از بررسی نوع بافر

نوع بافر	جذب هیدروکینون در طول موج ۲۸۶/۵ نانومتر	جذب رزورسینول در طول موج ۲۷۵ نانومتر
سیتراتی	۰/۰۴۵	۰/۰۲۹
فسفات‌ی	۰/۰۴۷	۰/۰۳۲

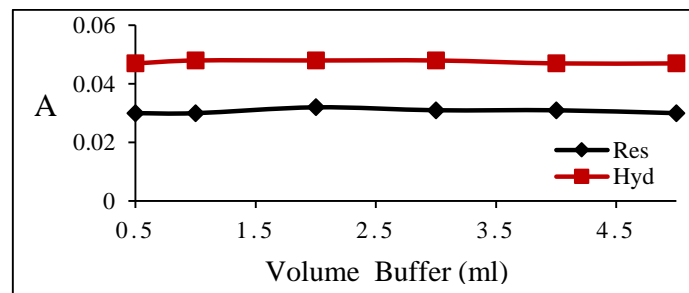
۳-۱۲-۳- بررسی حجم بافر

اثر حجم بافر فسفات‌ی با $\text{pH} = 7/0$ در دامنه ۵/۰۰-۰/۵۰ میلی‌لیتر مورد بررسی قرار گرفت. این بررسی در حضور محلول ۲/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر رزورسینول یا هیدروکینون انجام شد. این بررسی به این صورت انجام شد که ۱/۰۰ میلی‌لیتر محلول هیدروکینون یا رزورسینول ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، به یک بالن حجمی ۱۰ میلی‌لیتری منتقل گردید. سپس حجم مورد نظر از بافر فسفات‌ی $\text{pH} = 7/0$ به آن افزوده شد و با آب مقطر تا خط نشانه بالن، رقیق شد (محلول نمونه). محلول شاهد مانند محلول نمونه تهیه گردید، با این تفاوت که به

آن هیدروکینون و یا رزورسینول افزوده نشد. جذب محلول نمونه نسبت به محلول شاهد در طول موج ماکزیمم جذب مربوط اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۳-۳۳ و شکل ۳-۲۷ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که در حجم‌های متفاوت بافر، سیگنال تجزیه‌ای ثابت و یکسان است. در بررسی‌های بعدی برای اطمینان از کافی بودن ظرفیت بافری حجم ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفاتی $\text{pH} = 7/0$ انتخاب شد.

جدول ۳-۳۳: نتایج حاصل از بررسی حجم بافر فسفاتی

حجم بافر (میلی لیتر)	جذب هیدروکینون در طول موج ۲۸۶/۵ نانومتر	جذب رزورسینول در طول موج ۲۷۲ نانومتر
۰/۵۰	۰/۰۴۷	۰/۰۳۰
۱/۰۰	۰/۰۴۸	۰/۰۳۰
۲/۰۰	۰/۰۴۸	۰/۰۳۲
۳/۰۰	۰/۰۴۸	۰/۰۳۱
۴/۰۰	۰/۰۴۷	۰/۰۳۱
۵/۰۰	۰/۰۴۷	۰/۰۳۰



شکل ۳-۲۷: بررسی اثر حجم بافر فسفاتی با $\text{pH} = 7/0$ در حضور غلظت ۲/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر رزورسینول (۲۷۲ نانومتر) و یا هیدروکینون (۲۸۶/۵ نانومتر)

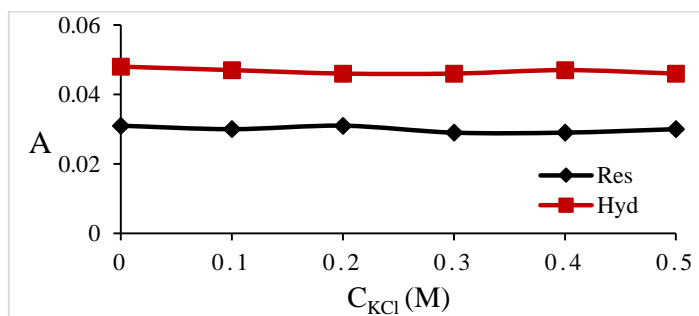
۳-۱۲-۴- بررسی اثر قدرت یونی

تاثیر قدرت یونی بر سیگنال تجزیه‌ای رزورسینول و هیدروکینون با استفاده از KCl در محدوده غلظتی ۰/۵۰ - ۰/۰- مولار مورد بررسی قرار گرفت. این بررسی به این صورت انجام شد که ۱/۰۰ میلی‌لیتر محلول

هیدروکینون یا رزورسینول ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر و ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفات $\text{pH} = 7.0$ ، به یک بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری منتقل شد. سپس حجم مورد نظر از محلول KCl با غلظت ۱/۰۰ مولار، به آن افزوده گردید و با آب مقطر تا خط نشانه بالن، رقیق گردید (محلول نمونه). محلول شاهد، مانند محلول نمونه تهیه شد، با این تفاوت که به آن هیدروکینون، رزورسینول و یا KCl افزوده نشد. جذب محلول نمونه نسبت به محلول شاهد در طول موج ماکزیمم جذب مربوط اندازه گیری شد. نتایج حاصل در جدول ۳-۳۴ و شکل ۳-۲۸ نشان داده شده است. نتایج به دست آمده بیانگر این است که قدرت یونی بر جذب رزورسینول و هیدروکینون اثری ندارد.

جدول ۳-۳۴: نتایج حاصل از بررسی اثر قدرت یونی

غلظت پتاسیم کلرید (مولار)	جذب هیدروکینون در طول موج ۲۶۸/۵ نانومتر	جذب رزورسینول در طول موج ۲۷۵ نانومتر
۰/۰۰	۰/۰۴۸	۰/۰۳۱
۰/۱۰	۰/۰۴۷	۰/۰۳۰
۰/۲۰	۰/۰۴۶	۰/۰۳۱
۰/۳۰	۰/۰۴۶	۰/۰۳۰
۰/۴۰	۰/۰۴۷	۰/۰۲۹
۰/۵۰	۰/۰۴۶	۰/۰۳۰



شکل ۳-۲۸: بررسی اثر قدرت یونی. شرایط: محلول های ۲/۰۰ میلی گرم بر لیتر رزورسینول (۲۷۲ نانومتر) و هیدروکینون (۲۶۸/۵ نانومتر)، در حضور ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفات با $\text{pH} = 7.0$

۳-۱۳- شرایط بهینه

با توجه به نتایج تجربی حاصل از بررسی و بهینه سازی پارامترهای موثر بر جذب در طول موج های

ماکزیمم مربوط به رزورسینول و هیدروکینون، ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفاتی با $\text{pH} = 7/0$ انتخاب شد و در آزمایش‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

۱۴-۳- رسم منحنی کالیبراسیون

در شرایط بهینه، منحنی کالیبراسیون برای اندازه‌گیری رزورسینول و هیدروکینون به دست آمد. روش کار به صورت زیر بود:

۱-۱۴-۳- کالیبراسیون یک متغیره

۱-۱-۱۴-۳- تعیین دامنه خطی رزورسینول و هیدروکینون به صورت

جداگانه

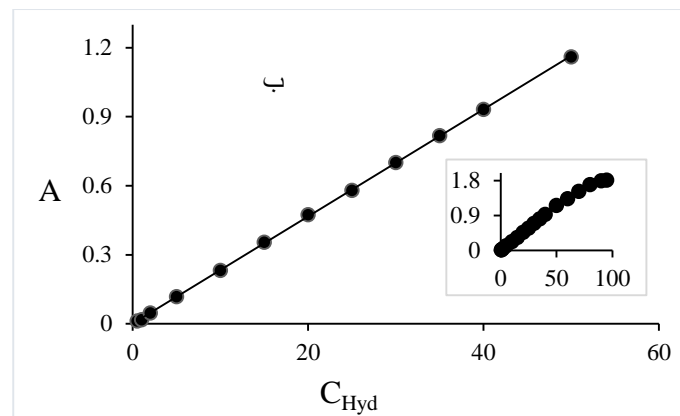
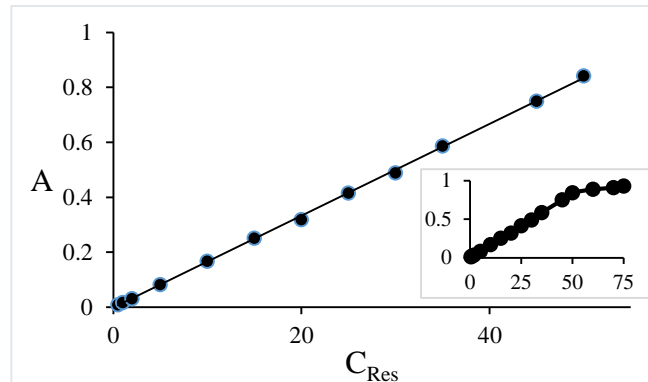
در شرایط بهینه، منحنی کالیبراسیون برای اندازه‌گیری رزورسینول و هیدروکینون به طور جداگانه برای هر یک به دست آمد. روش کار برای استخراج منحنی کالیبراسیون منفرد برای هر کدام از ترکیبات به صورت زیر بود. به یک سری بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری، ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفاتی با $\text{pH} = 7/0$ و ۵/۰۰ تا ۵۰۰/۰ میکرو گرم از رزورسینول یا هیدروکینون به صورت محلول اضافه و با آب مقطر تا خط نشانه بالن رقیق گردید. مقدار لازم از محلول به سل دستگاه اسپکتروفتومتر منتقل شده و جذب هر محلول در طول موج ماکزیمم ۲۷۲ و ۲۸۶/۵ نانومتر به ترتیب برای رزورسینول و هیدروکینون نسبت به شاهد اندازه‌گیری و ثبت گردید و نتایج حاصل در جدول ۳-۳۵ آورده شد.

جدول ۳-۳۵: نتایج حاصل برای رسم منحنی کالیبراسیون رزورسینول و هیدروکینون به صورت مجزا

غلظت (میلی گرم بر لیتر)	جذب محلول رزورسینول در طول موج ۲۷۲ نانومتر	جذب محلول هیدروکینون در طول موج ۲۸۶/۵ نانومتر
۰/۵۰	۰/۰۱۰	۰/۰۱۳
۱/۰۰	۰/۰۱۸	۰/۰۱۸
۲/۰۰	۰/۰۳۲	۰/۰۴۸
۵/۰۰	۰/۰۸۳	۰/۱۱۸
۱۰/۰۰	۰/۱۶۸	۰/۲۳۳
۱۵/۰۰	۰/۲۵۲	۰/۳۵۵
۲۰/۰۰	۰/۳۱۹	۰/۴۶۶
۲۵/۰۰	۰/۴۱۶	۰/۵۸۰
۳۰/۰۰	۰/۴۸۹	۰/۷۰۱
۳۵/۰۰	۰/۵۸۷	۰/۸۱۸
۴۰/۰۰	۰/۶۷۵	۰/۹۳۲
۴۵/۰۰	۰/۷۵۰	۱/۰۶۶
۵۰/۰۰	۰/۸۴۲	۱/۱۶۱
۶۰/۰۰	۰/۸۹۰	۱/۳۶۱
۷۰/۰۰	۰/۹۱۰	۱/۵۷۳
۸۰/۰۰	۰/۹۳۰	۱/۷۵۶

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

به‌دست آمده در شکل ۳-۲۹ و در جدول ۳-۳۶ آمده است.



شکل ۳-۲۹: الف: منحنی کالیبراسیون رزورسینول، ب: منحنی کالیبراسیون هیدروکینون.
تحت شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفات با pH=۷/۰

جدول ۳-۳۶: نتایج حاصل از کالیبراسیون تک متغیره

ترکیب	رزورسینول ($\lambda_{\max} = 272 \text{ nm}$)	هیدروکینون ($\lambda_{\max} = 286/5 \text{ nm}$)
ناحیه خطی (میلی گرم بر لیتر)	۰/۵۰-۵۰/۰۰	۰/۵۰-۵۰/۰۰
معادله رگرسیون	$A = 0.0167 C_{\text{Res}} + 0.0016$ (n=12)	$A = 0.0233 C_{\text{Hyd}} + 0.0013$ (n=9)
R^2	۰/۹۹۹۵	۰/۹۹۹۹

در جدول ۳-۳۶، A سیگنال تجزیه‌ای مربوط به هر گونه (جذب محلول نمونه نسبت به محلول شاهد) در طول موج مربوط به هر گونه، C_{Res} و C_{Hyd} به ترتیب، غلظت رزورسینول و هیدروکینون بر حسب میلی‌گرم بر لیتر و R^2 مجذور ضریب همبستگی برای هر نمودار است.

۳-۱۴-۲- محلول‌سازی و کالیبراسیون یک متغیره

در کالیبراسیون تک متغیره برای اندازه‌گیری همزمان رزورسینول و هیدروکینون از روش‌های اسپکتروفتومتری جدید (EXRSM و SRSM) استفاده شد. به منظور بهینه‌سازی پارامترها و رسیدن به بهترین صحت در این روش‌ها، محلول‌های سری ارزیابی و محلول‌های سری تست تهیه و طیف آن‌ها نسبت به محلول شاهد در دامنه ۲۱۰-۳۲۰ نانومتر ثبت گردید و مورد بررسی قرار گرفت. محلول‌های سری کالیبراسیون از انتقال مقادیر مختلف رزورسینول و یا هیدروکینون به همراه ۲/۰ میلی‌لیتر بافر فسفاتی $pH=7/0$ به بالن‌های حجمی ۱۰ میلی‌لیتری و رقیق کردن آن‌ها تا خط نشانه با آب مقطر تهیه شد. سپس طیف هر محلول نسبت به محلول شاهد در دامنه ۲۱۰-۳۲۰ نانومتر ثبت و ذخیره شد. روش کار در تهیه محلول‌های سری ارزیابی و محلول‌های سری تست به این صورت بود که؛ به یک سری بالن حجمی ۱۰ میلی‌لیتری، ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفاتی $pH=7/0$ و مقادیر مختلف از رزورسینول و هیدروکینون منتقل شد و تا خط نشانه با آب مقطر، رقیق گردید. محلول شاهد مثل محلول نمونه تهیه شد با این تفاوت که به آن رزورسینول و هیدروکینون افزوده نشد. سپس طیف هر یک نسبت به محلول شاهد در دامنه ۲۱۰-۳۲۰ نانومتر ثبت گردید. ترکیب غلظتی محلول‌های سری ارزیابی و محلول‌های سری تست در جدول ۳-۳۷ و جدول ۳-۳۸ آورده شده است.

جدول ۳-۳۷: ترکیب غلظتی محلول‌های سری ارزیابی

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

جدول ۳-۳۸: ترکیب غلظتی محلول‌های سری تست

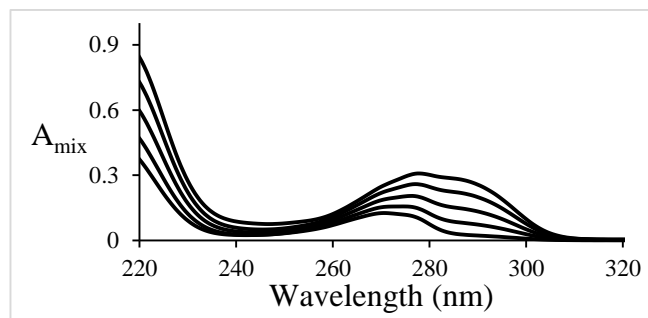
محلول	غلظت رزورسینول (میلی‌گرم بر لیتر)	غلظت هیدروکینون (میلی‌گرم بر لیتر)
۱	۲/۰۰	۳/۰۰
۲	۳/۰۰	۶/۰۰
۳	۵/۰۰	۴/۰۰
۴	۸/۰۰	۵/۰۰
۵	۸/۰۰	۸/۰۰
۶	۱۰/۰۰	۴/۰۰
۷	۱۰/۰۰	۶/۰۰
۸	۱۰/۰۰	۹/۰۰
۹	۱۰/۰۰	۲/۰۰
۱۰	۱۵/۰۰	۴/۰۰
۱۱	۹/۰۰	۸/۰۰

۳-۱۴-۲-۱- نحوه محاسبه غلظت رزورسینول و هیدروکینون با استفاده

از روش توسعه یافته تفاضل نسبی (EXRSM)

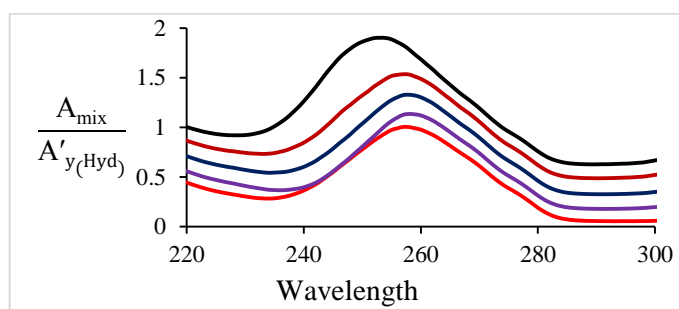
اولین روش اسپکتروفتومتری جدیدی که برای تعیین مقدار غلظت‌های هیدروکینون و رزورسینول در مخلوط‌ها به کار برده شد، روش EXRSM بود. در ابتدا روش به دست آوردن غلظت‌های هیدروکینون و رزورسینول در یک سری از مخلوط‌های سری ارزیابی توضیح داده می‌شود. سپس روش بهینه‌سازی مقسوم علیه‌ها آورده می‌شود.

در این جا به عنوان مثال، مخلوط‌هایی از سری ارزیابی انتخاب شدند که در آن‌ها مقدار رزورسینول موجود ثابت و مقدار هیدروکینون تغییر می‌کند. در این روش پس از تهیه مخلوط‌ها (Res+Hyd)، طیف هر یک نسبت به محلول شاهد در دامنه طول موجی مورد نظر ثبت گردید. در شکل ۳-۳۰ طیف‌های جذبی مخلوط‌هایی با غلظت ثابت هیدروکینون و غلظت متغیر رزورسینول آورده شده است.



شکل ۳-۳۰: طیف‌های جذبی مخلوط‌های حاوی ۱/۰۰، ۳/۰۰، ۶/۰۰، ۹/۰۰ و ۱۲/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیدروکینون و ۷/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر رزورسینول در شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات با pH= ۷/۰

سپس طیف هر مخلوط بر طیف محلول ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیدروکینون (گونه‌ای است که جذب آن در طول موج‌های بالاتر صفر می‌شود) به‌عنوان مقسوم علیه تقسیم شد. طیف نسبی حاصل در طول موج‌های بلندتر ۲۹۰ نانومتر دارای مقدار ثابت است (شکل ۳-۳۱).

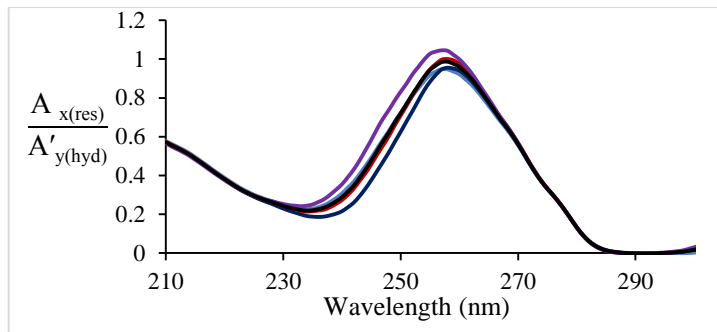


شکل ۳-۳۱: طیف‌های جذبی حاصل از تقسیم طیف مخلوط‌های حاوی ۱/۰۰، ۳/۰۰، ۶/۰۰، ۹/۰۰ و ۱۲/۰۰ (میلی‌گرم بر لیتر) هیدروکینون و ۷/۰ (میلی‌گرم بر لیتر) رزورسینول بر طیف ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیدروکینون

در شکل ۳-۳۱، A_{mix} و $A'_{y(Hyd)}$ به ترتیب بیانگر جذب مخلوط و جذب محلول هیدروکینون (به عنوان مقسوم علیه) است. شکل ۳-۳۱ نشان می‌دهد که مقدار ثابت هر طیف به غلظت هیدروکینون بستگی دارد و با افزایش غلظت هیدروکینون، مقدار ثابت نیز افزایش می‌یابد. مقدار ثابت برای مخلوط‌ها به ترتیب ۰/۰۵۵، ۰/۱۷۹، ۰/۳۲۷، ۰/۴۸۹ و ۰/۶۳۰ است.

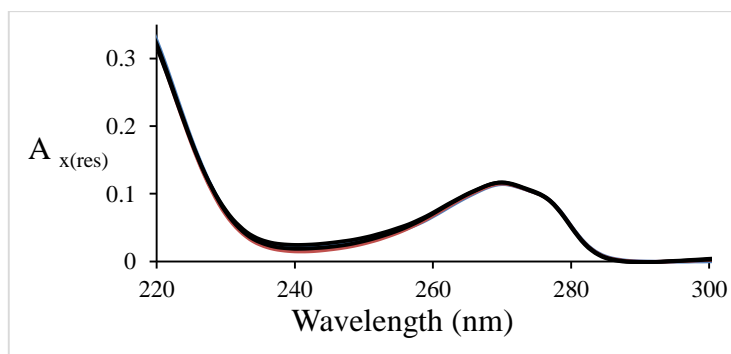
پس از کم کردن مقدار ثابت هر طیف از طیف‌های نسبی متناظر، طیف‌های نسبی شکل ۳-۳۲ به دست

آمد.



شکل ۳-۳۲: طیف‌های جذبی حاصل از تقسیم طیف مخلوط‌های حاوی ۱/۰۰، ۳/۰۰، ۶/۰۰، ۹/۰۰ و ۱۲/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) هیدروکینون و ۷/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) رزورسینول بر طیف ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر هیدروکینون (مقسوم علیه) بعد از کم کردن مقدار ثابت

طیف‌های نسبی شکل ۳-۳۲ در طیف محلول ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر هیدروکینون (به‌عنوان مقسوم علیه) ضرب شد که در این حالت طیف خالص مرتبه صفر محلول ۷/۰۰ میلی گرم بر لیتر رزورسینول به‌دست آمد (شکل ۳-۳۳). همان‌طور که مشاهده شد از طیف مخلوط دو گونه که با یکدیگر هم‌پوشانی دارند، طیف خالص رزورسینول به‌دست آمد. با استفاده از طیف خالص به‌دست آمده، جذب در طول موج ماکزیمم رزورسینول (۲۷۲ نانومتر) اندازه‌گیری شد و در منحنی کالیبراسیون حاصل از محلول‌های استاندارد خالص رزورسینول قرار داده شد (شکل ۳-۲۹) و غلظت رزورسینول در هر مخلوط به‌دست آمد.



شکل ۳-۳۳: طیف جذبی مرتبه صفر غلظت ۷/۰۰ میلی گرم بر لیتر رزورسینول، بعد از کم کردن مقدار ثابت و ضرب در طیف محلول ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر هیدروکینون

در روش EXRSM تاثیر غلظت هیدروکینون به‌عنوان مقسوم علیه، بر خطای حاصل از پیش‌بینی غلظت کتکول بررسی شد. برای انجام این کار علاوه بر محلول‌های سری ارزیابی (جدول ۳-۳۷)، در بالن‌های

حجمی ۱۰ میلی‌لیتری حاوی ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات $\text{pH}=7/0$ ، محلول‌های هیدروکینون خالص (با غلظت ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۱۵/۰۰، ۲۰/۰۰ و ۲۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) و محلول‌های رزورسینول خالص تهیه گردید. سپس طیف محلول‌های سری ارزیابی، محلول‌های هیدروکینون خالص و محلول‌های رزورسینول خالص نسبت به محلول شاهد (۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات $\text{pH}=7/0$ در بالن حجمی ۱۰ میلی‌لیتری) در گستره ۲۱۰-۳۲۰ نانومتر ثبت و ذخیره گردید. منحنی کالیبراسیون رزورسینول با اندازه‌گیری جذب هر محلول رزورسینول در طول موج ماکزیمم جذب آن (۲۷۲ نانومتر) و رسم جذب بر حسب غلظت رزورسینول به‌دست آمد. طیف جذبی هر مخلوط (محلول‌های سری ارزیابی) در جدول ۳-۳۷ بر طیف جذبی محلول هیدروکینون با غلظت معین تقسیم شد. سپس مقدار ثابت هر طیف نسبی در طول موج‌های بلند تر از ۲۹۰ نانومتر از هر طیف نسبی کسر گردید. هر طیف نسبی پس از کسر کردن مقدار ثابت آن، در طیف جذبی محلول هیدروکینون با غلظت معین اولیه ضرب شد تا طیف خالص مرتبه صفر رزورسینول در هر مخلوط به‌دست آید. با اندازه‌گیری جذب در طول موج ۲۷۲ نانومتر از روی طیف خالص مرتبه صفر رزورسینول حاصل و با استفاده از منحنی کالیبراسیون رزورسینول، غلظت رزورسینول در هر مخلوط محاسبه شد؛ که نتایج آن در جدول ۳-۳۹ آورده شده است.

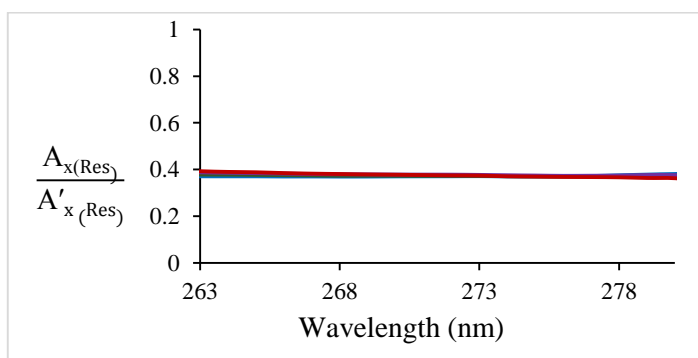
برای انتخاب غلظت هیدروکینون به عنوان مقسوم علیه بهینه، میانگین مربع خطا (MSE) غلظت رزورسینول برای سری ارزیابی محاسبه شد که نتایج آن در جدول ۳-۳۹ آورده شده است.

جدول ۳-۳۹: نتایج حاصل از بهینه‌سازی غلظت هیدروکینون به‌عنوان مقسوم علیه برای سری ارزیابی

غلظت هیدروکینون به عنوان مقسوم علیه (mg L^{-1})	خطا (MSE) در پیش‌بینی غلظت رزورسینول (mg L^{-1})
۵/۰۰	۰/۰۰۵۳
۱۰/۰۰	۰/۰۰۵۳
۱۵/۰۰	۰/۰۰۵۲

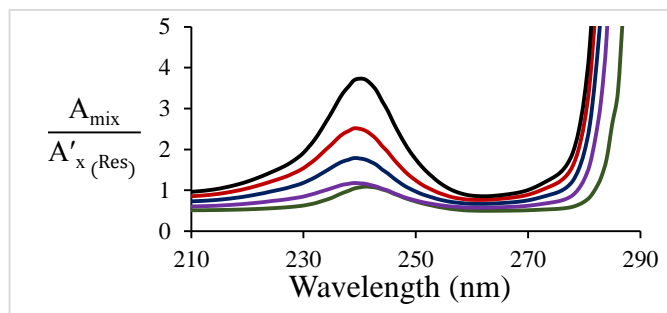
۰/۰۰۴۸	۲۰/۰۰
۰/۰۰۵۵	۲۵/۰۰

نتایج به دست آمده از جدول ۳-۳۹ نشان می‌دهد که با انتخاب محلول ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیدروکینون به عنوان مقسوم علیه، خطای حاصل از پیش‌بینی غلظت رزورسینول موجود در مخلوط‌های سری ارزیابی کمتر است. بنابراین برای رسیدن به بهترین صحت، محلول ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیدروکینون به عنوان مقسوم علیه بهینه انتخاب شد. برای به دست آوردن غلظت هیدروکینون در مخلوط‌های تهیه شده، ابتدا طیف‌های خالص به دست آمده برای رزورسینول (شکل ۳-۳۳)، به طیف غلظت معلوم (مثلاً ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) از محلول رزورسینول تقسیم شد. طیف نسبی حاصل در دامنه ۲۸۰-۲۶۳ نانومتر دارای مقدار ثابتی برای هر محلول است که همان طور که در شکل ۳-۳۴ مشاهده می‌شود، برای هر محلول خط صافی به موازات محور طول موج می‌باشد و مقدار آن برابر ۰/۳۶۱ است



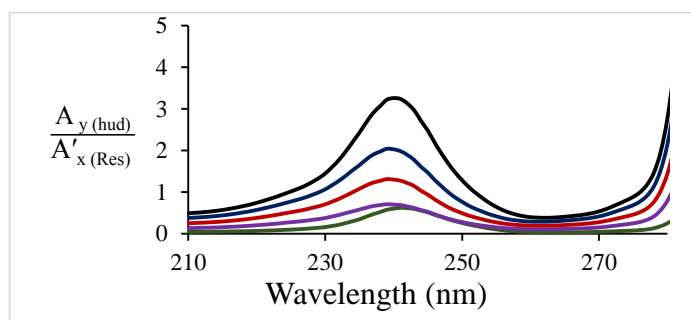
شکل ۳-۳۴: طیف نسبی حاصل از تقسیم طیف‌های ۷/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر رزورسینول (شکل ۳-۳۳) بر ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر رزورسینول به عنوان مقسوم علیه

در شکل ۳-۳۴، A_{Res} مقسوم بیانگر جذب محلول‌های خالص مرتبه صفر رزورسینول و A'_{Res} مقسوم علیه بیانگر جذب محلول رزورسینول با غلظت معین است. هم‌چنین طیف مخلوط‌های سری ارزیابی (جدول ۳-۳۷) (مثلاً مخلوط‌های حاوی ۱/۰۰، ۳/۰۰، ۶/۰۰، ۹/۰۰ و ۱۲/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیدروکینون و ۷/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر رزورسینول) بر طیف محلول رزورسینول با غلظت معین (مثلاً ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) تقسیم شد (شکل ۳-۳۵).



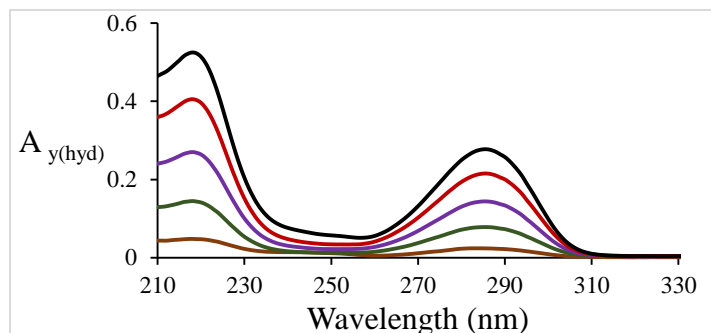
شکل ۳-۳۵: طیف‌های نسبی حاصل از تقسیم طیف مخلوط‌های حاوی ۱/۰۰، ۳/۰۰، ۶/۰۰، ۹/۰۰ و ۱۲/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیدروکینون و ۷/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر رزورسینول بر طیف ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر رزورسینول (مقسوم علیه)

سپس مقدار ثابت حاصل از هر طیف نسبی رزورسینول خالص مرتبه صفر (شکل ۳-۳۴) از طیف نسبی مخلوط متناظر آن (شکل ۳-۳۵) کسر گردید و شکل ۳-۳۶ حاصل شد.



شکل ۳-۳۶: طیف‌های جذبی حاصل از تقسیم طیف مخلوط‌های حاوی ۱/۰۰، ۳/۰۰، ۶/۰۰، ۹/۰۰ و ۱۲/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر رزورسینول و ۷/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیدروکینون بر طیف ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر رزورسینول (مقسوم علیه)، بعد از کم کردن مقدار ثابت

با ضرب طیف‌های نسبی حاصل از مرحله قبل (شکل ۳-۳۶) در طیف محلول رزورسینول با غلظت معلوم به‌عنوان مقسوم علیه (مثلاً ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر)، طیف خالص هیدروکینون به‌دست آمد (شکل ۳-۳۷).



شکل ۳-۳۷: طیف جذبی مرتبه صفر ۱/۰۰، ۳/۰۰، ۶/۰۰، ۹/۰۰ و ۱۲/۰۰ میلی گرم بر لیتر هیدروکینون بعد از ضرب طیف‌های شکل ۳-۳۶ در طیف محلول ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر رزورسینول

با استفاده از طیف‌های خالص مرتبه صفر به دست آمده، جذب در طول موج ماکزیمم هیدروکینون اندازه‌گیری شد و در منحنی کالیبراسیون حاصل از محلول‌های استاندارد خالص هیدروکینون قرار داده شد (شکل ۳-۲۹) و غلظت هیدروکینون در هر مخلوط به دست آمد.

در روش EXRSM تاثیر غلظت رزورسینول به عنوان مقسوم علیه، بر خطای حاصل از پیش‌بینی غلظت هیدروکینون بررسی شد. بهینه‌سازی غلظت مقسوم علیه رزورسینول مانند بهینه‌سازی غلظت مقسوم علیه هیدروکینون صورت گرفت. غلظت هیدروکینون در هر مخلوط با استفاده از غلظت‌های مختلف رزورسینول (به عنوان مقسوم علیه) محاسبه گردید. برای انتخاب غلظت رزورسینول به عنوان مقسوم علیه بهینه، میانگین مربع خطا (MSE) برای اندازه‌گیری غلظت هیدروکینون برای سری ارزیابی محاسبه گردید و نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۳-۴۰ آورده شده است.

جدول ۳-۴۰: نتایج حاصل از بهینه‌سازی غلظت رزورسینول به عنوان مقسوم علیه

غلظت رزورسینول به عنوان مقسوم علیه (mg L^{-1})	خطا (MSE) در پیش‌بینی غلظت هیدروکینون (mg L^{-1})
۵/۰۰	۰/۰۰۸۱
۱۰/۰۰	۰/۰۰۸۱
۱۵/۰۰	۰/۰۰۸۲
۲۰/۰۰	۰/۰۰۷۴
۲۵/۰۰	۰/۰۰۷۶

نتایج حاصل از جدول ۳-۴۰ نشان می‌دهد که با انتخاب محلول ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر رزورسینول به عنوان مقسوم علیه، خطای حاصل از پیش‌بینی غلظت هیدروکینون موجود در مخلوط‌های سری ارزیابی

کمتر است. نتایج حاصل از به کار بردن روش EXRSM برای پیش بینی غلظت رزورسینول و هیدروکینون موجود در محلول های سری تست، در جدول ۳-۴۱ آورده شده است. لازم به ذکر است در به دست آوردن غلظت محلول های سری تست، غلظت هیدروکینون و غلظت رزورسینول به ترتیب ۲۰/۰۰ و ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر به کار برده شد.

جدول ۳-۴۱: نتایج حاصل از به کارگیری روش EXRSM، برای پیش بینی غلظت اجزا در سری تست

محلول	غلظت واقعی (mg L^{-1})		غلظت پیش بینی شده (mg L^{-1})		خطای نسبی (%)	
	هیدروکینون	رزورسینول	هیدروکینون	رزورسینول	هیدروکینون	رزورسینول
۱	۳/۰۰	۲/۰۰	۲/۹۴	۲/۰۵	۱/۳۳	۳/۵۰
۲	۶/۰۰	۳/۰۰	۵/۹۵	۳/۱۰	-۰/۸۳	۰/۰۰
۳	۴/۰۰	۵/۰۰	۴/۱۰	۵/۰۸	۲/۵۰	۱/۶۰
۴	۵/۰۰	۸/۰۰	۵/۰۹	۸/۰۷	۱/۸۰	۰/۱۲
۵	۸/۰۰	۸/۰۰	۷/۹۳	۷/۹۳	-۰/۸۷	-۰/۸۷
۶	۴/۰۰	۱۰/۰۰	۴/۱۳	۹/۹۳	۳/۲۵	-۰/۷۰
۷	۶/۰۰	۱۰/۰۰	۶/۰۲	۹/۹۶	۰/۳۳	-۰/۴۰
۸	۹/۰۰	۱۰/۰۰	۸/۹۵	۹/۹۳	-۰/۵۶	-۰/۷۰
۹	۲/۰۰	۱۰/۰۰	۲/۰۴	۱۰/۰۴	۲/۰۰	۰/۲۸
۱۰	۴/۰۰	۱۵/۰۰	۴/۰۴	۱۴/۹۶	۱/۰۰	-۰/۲۷
۱۱	۸/۰۰	۹/۰۰	۸/۰۱	۸/۹۵	۰/۱۲	-۰/۵۵

۳-۱۴-۲-۲- نحوه محاسبه غلظت رزورسینول و هیدروکینون با استفاده

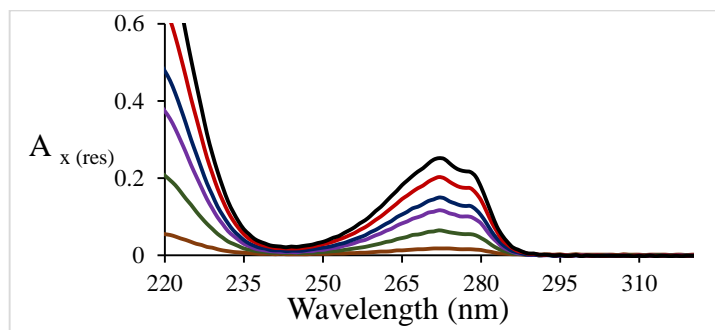
از روش کم کردن نسبی همزمان (SRSM)

روش اسپکتروفتومتری دیگری که برای اندازه گیری همزمان رزورسینول و هیدروکینون به کار برده شد، روش کم کردن نسبی همزمان (SRSM) بود. در این روش هم دو سری مخلوط (مخلوط های سری ارزیابی و مخلوط های سری تست) مورد استفاده قرار گرفت. در این روش طیف مخلوط ها و طیف محلول های

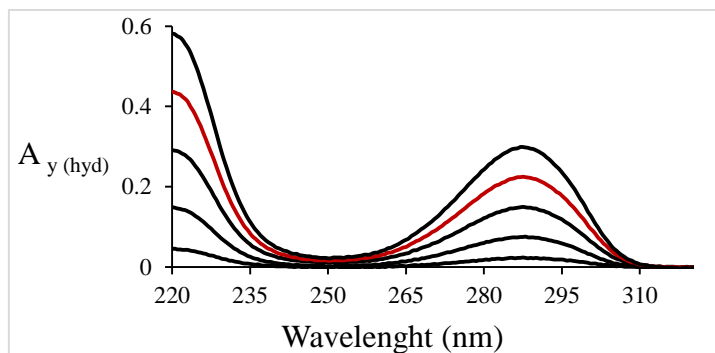
خالص استاندارد رزورسینول بر طیف غلظت معینی از هیدروکینون (به عنوان مقسوم علیه) تقسیم شد. پس از تقسیم طیف مخلوط‌ها بر طیف مقسوم علیه، مقدار ثابت برای مخلوط در دامنه طول موج ۲۹۰-۳۰۵ نانومتر به دست می‌آید. سپس مقدار ثابت هر مخلوط از هر طیف نسبی همان مخلوط کم شد. سپس مقدار نسبی جذب در طول موج ۲۷۲ نانومتر (طول موج ماکزیمم جذب رزورسینول) برای هر مخلوط از روی طیف نسبی حاصل پس از کم کردن مقدار ثابت، اندازه‌گیری شد. سپس با استفاده از مقدار نسبی جذب در طول موج ۲۷۲ نانومتر برای هر مخلوط و منحنی کالیبراسیون مربوط، غلظت رزورسینول در هر مخلوط محاسبه شد. برای رسم منحنی کالیبراسیون رزورسینول به این صورت عمل شد که طیف محلول‌های خالص استاندارد رزورسینول بر طیف غلظت معینی از هیدروکینون (به عنوان مقسوم علیه) تقسیم شد و سپس مقدار نسبی جذب در طول موج ۲۷۲ نانومتر در هر محلول بر حسب غلظت رزورسینول در آن رسم گردید. برای به دست آوردن غلظت هیدروکینون به صورت زیر عمل شد که مقدار ثابت به دست آمده برای هر مخلوط در طیف محلول هیدروکینون که به عنوان مقسوم علیه استفاده شده بود، ضرب گردید. حاصل ضرب مقدار ثابت هر مخلوط در طیف مقسوم علیه، طیف خالص مرتبه صفر مربوط به هیدروکینون در هر مخلوط را به دست می‌دهد. حال با استفاده از طیف خالص مرتبه صفر به دست آمده، جذب در $286/5$ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود و با استفاده از منحنی کالیبراسیون هیدروکینون، غلظت هیدروکینون در هر مخلوط محاسبه می‌شود. برای رسم منحنی کالیبراسیون هیدروکینون به این صورت عمل شد که محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف هیدروکینون تهیه و طیف آن‌ها نسبت به شاهد در گستره $220-320$ نانومتر ثبت و ذخیره گردید. مقدار جذب در طول موج ماکزیمم جذب ($286/5$ نانومتر) بر حسب غلظت هیدروکینون رسم شد (رسم منحنی کالیبراسیون). روش دیگر برای محاسبه غلظت هیدروکینون به صورت زیر است.

طیف محلول‌های خالص استاندارد هیدروکینون به طیف غلظت معینی از هیدروکینون (طیف مقسوم علیه) تقسیم می‌شود. سپس با اندازه‌گیری مقدار ثابت برای محلول استاندارد و رسم مقدار ثابت بر حسب غلظت هیدروکینون، منحنی کالیبراسیون رسم گردید. سپس مقدار ثابت حاصل از هر مخلوط، اندازه‌گیری و در منحنی کالیبراسیون مربوط (مقدار ثابت بر حسب غلظت هیدروکینون) وارد می‌شود و غلظت هیدروکینون محاسبه می‌گردد.

با توجه به مطالب مذکور، ابتدا باید غلظت هیدروکینون به عنوان مقسوم علیه، بهینه شود. برای انجام این کار از مخلوط‌های سری ارزیابی (جدول ۳-۳۷) استفاده شد. روش کار به این صورت بود که محلول‌هایی با غلظت‌های ۱۵/۰۰-۱/۰۰ میلی گرم بر لیتر رزورسینول در بالن‌های حجمی ۱۰ میلی لیتری حاوی ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفاتی pH=۷/۰ تهیه شد و طیف آن‌ها نسبت به محلول شاهد در گستره ۲۱۰-۳۲۰ نانومتر ثبت و ذخیره گردید (شکل ۳-۳۸). هم‌چنین محلول‌های ۱۲/۰۰-۱/۰۰ میلی گرم بر لیتر هیدروکینون در بالن‌های حجمی ۱۰ میلی لیتری حاوی ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفاتی pH=۷/۰ تهیه شد و طیف آن‌ها نسبت به محلول شاهد در دامنه ۲۱۰-۳۲۰ نانومتر ثبت و ذخیره گردید (شکل ۳-۳۹).



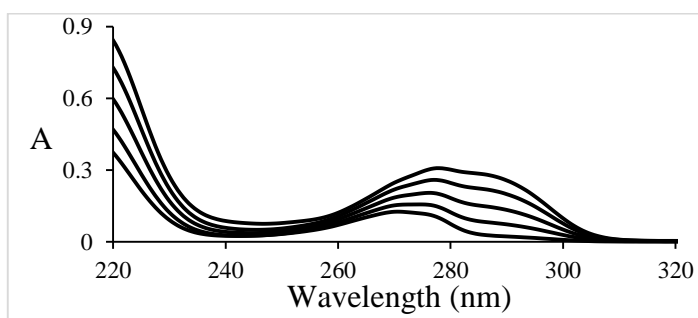
شکل ۳-۳۸: طیف جذبی مرتبه صفر محلول‌های ۱۵/۰۰ و ۱۲/۰۰، ۹/۰۰، ۷/۰۰، ۴/۰۰، ۱/۰۰ میلی گرم بر لیتر رزورسینول در شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفاتی با pH= ۷/۰



شکل ۳-۳۹: طیف جذبی مرتبه صفر محلول‌های ۱۲/۱۰۰ و ۹/۱۰۰، ۶/۱۰۰، ۳/۱۰۰، ۱/۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیدروکینون در

شرایط بهینه: ۲/۱۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات با $\text{pH} = 7/0$

هم‌چنین محلول‌هایی با نسبت‌های غلظتی مختلف از هیدروکینون به رزورسینول در بافر $\text{pH} = 7/0$ در بالن حجمی ۱۰ میلی‌لیتری تهیه و طیف هر یک نسبت به محلول شاهد در دامنه ۲۲۰-۳۲۰ نانومتر ثبت و ذخیره گردید. به‌عنوان مثال طیف‌های جذبی مخلوط‌های حاوی ۱۲/۱۰۰، ۹/۱۰۰، ۶/۱۰۰، ۳/۱۰۰ و ۱/۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیدروکینون و ۷/۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر رزورسینول در شکل ۳-۴۰ آورده شده است.



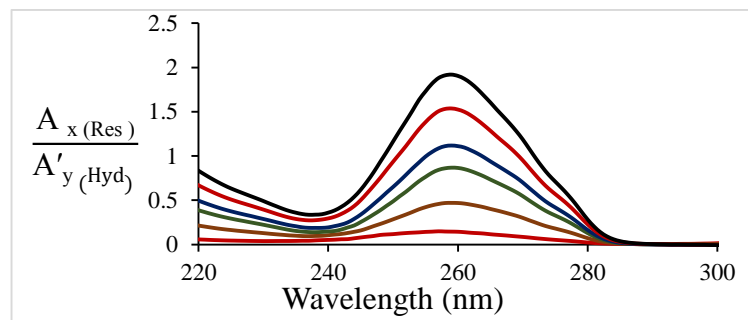
شکل ۳-۴۰: طیف‌های جذبی مخلوط‌های حاوی ۱۲/۱۰۰ و ۹/۱۰۰، ۶/۱۰۰، ۳/۱۰۰، ۱/۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیدروکینون و ۷/۱۰۰

میلی‌گرم بر لیتر رزورسینول در شرایط بهینه: ۲/۱۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات با $\text{pH} = 7/0$

با استفاده از طیف‌های هیدروکینون خالص، جذب هر محلول در طول موج ماکزیمم آن اندازه‌گیری و بر حسب غلظت هیدروکینون رسم شد. نتایج حاصل از رسم منحنی کالیبراسیون هیدروکینون در جدول ۳-۳۶ آورده شده است.

طیف محلول‌های خالص رزورسینول بر طیف غلظت معینی از هیدروکینون مثلاً ۲۰/۱۰۰ میلی‌گرم بر

لیتر (به‌عنوان مقسوم علیه) تقسیم گردید (شکل ۳-۴۱).

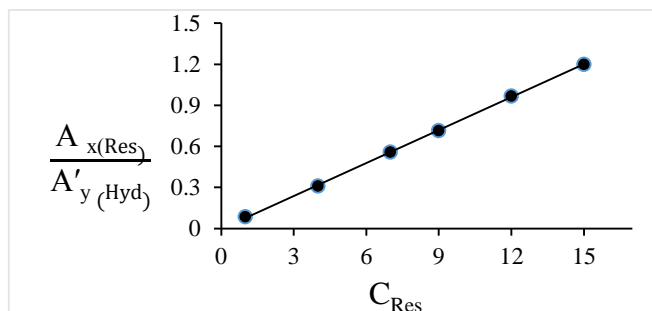


شکل ۳-۴۱: طیف‌های جذبی حاصل از تقسیم طیف ۱/۰۰، ۴/۰۰، ۷/۰۰، ۹/۰۰، ۱۲/۰۰ و ۱۵/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) رزورسینول بر طیف ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر هیدروکینون

سپس مقدار جذب نسبی در طول موج ۲۶۰ نانومتر (ماکزیمم جذب نسبی) و طول موج ۲۷۲ نانومتر (ماکزیمم جذب محلول‌های خالص مرتبه صفر رزورسینول) با استفاده از طیف نسبی برای هر محلول رزورسینول اندازه‌گیری شد (جدول ۳-۴۲) و بر حسب غلظت رزورسینول رسم گردید. با توجه به اینکه خطای حاصل از پیش‌بینی غلظت رزورسینول و هیدروکینون در مخلوط‌ها، در طول موج ۲۷۲ نانومتر در مقایسه با طول موج ۲۶۰ نانومتر کمتر بود، طول موج ۲۷۰ نانومتر انتخاب شد. نتایج حاصل از رسم منحنی کالیبراسیون رزورسینول در شکل ۳-۴۲ و جدول ۳-۴۳ آورده شده است.

جدول ۳-۴۲: نتایج حاصل از بررسی منحنی کالیبراسیون نسبی رزورسینول

محلول	غلظت رزورسینول (میلی گرم بر لیتر)	جذب در طول موج ماکزیمم (۲۷۲ نانومتر)
۱	۱/۰۰	۰/۰۸۶
۲	۴/۰۰	۰/۳۰۹
۳	۷/۰۰	۰/۵۵۷
۴	۹/۰۰	۰/۷۱۴
۵	۱۲/۰۰	۰/۹۶۷
۶	۱۵/۰۰	۱/۲۰۰

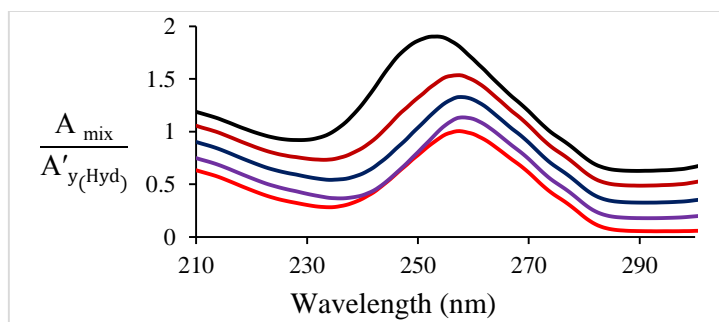


شکل ۳-۴۲: منحنی کالیبراسیون رزورسینول در شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفات با pH=۷/۰.

جدول ۳-۴۳: نتایج حاصل از رسم منحنی کالیبراسیون نسبی رزورسینول

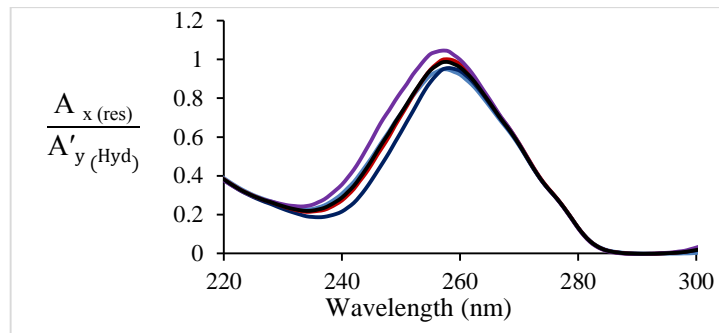
$A = 0.0802 C_{Res} - 0.0027 \quad (n=6)$	معادله رگرسیون
۰/۹۹۹۷	R^2

در جدول ۳-۴۳، A سیگنال تجزیه‌ای رزورسینول (جذب نسبی) در طول موج ماکزیمم (۲۷۲ نانومتر)، C_{Res} غلظت رزورسینول بر حسب میلی گرم بر لیتر و R^2 مجذور ضریب همبستگی نمودار است. برای به دست آوردن غلظت رزورسینول در هر مخلوط، طیف هر مخلوط بر طیف همان غلظت هیدروکینون که طیف محلول‌های خالص استاندارد رزورسینول تقسیم شده بود (مثلاً ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر) تقسیم گردید (شکل ۳-۴۳). مقادیر ثابت به دست آمده برای مخلوط‌ها به ترتیب ۰/۰۵۵، ۰/۱۷۹، ۰/۳۲۷، ۰/۴۸۹ و ۰/۶۳۰ است.



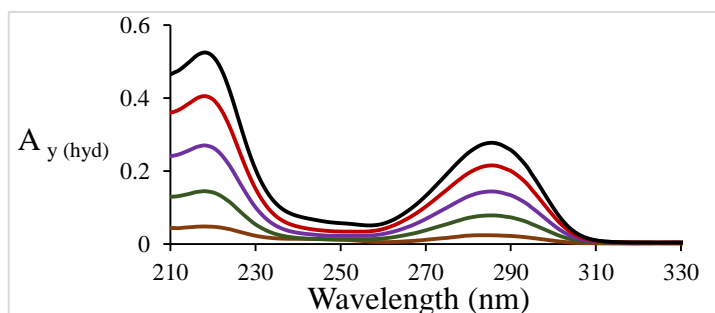
شکل ۳-۴۳: طیف‌های جذبی حاصل از تقسیم طیف مخلوط‌های حاوی ۱/۰۰، ۳/۰۰، ۶/۰۰، ۹/۰۰ و ۱۲/۰۰ میلی گرم بر لیتر هیدروکینون و ۷/۰۰ میلی گرم بر لیتر رزورسینول بر طیف ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر هیدروکینون

سپس مقدار ثابت هر طیف از همان طیف کم شد (شکل ۳-۴۴).



شکل ۳-۴۴: طیف‌های جذبی حاصل از تقسیم طیف مخلوط‌های ۱/۰۰، ۳/۰۰، ۶/۰۰، ۹/۰۰ و ۱۲/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیدروکینون و ۷/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر رزورسینول بر طیف ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیدروکینون (مقسوم علیه) بعد از کم کردن مقدار ثابت

با استفاده از طیف‌های حاصل (شکل ۳-۴۴)، در طول موج ۲۷۲ نانومتر مقدار جذب نسبی برای هر مخلوط اندازه‌گیری شد و با استفاده از منحنی کالیبراسیون مربوط (شکل ۳-۴۲)، غلظت رزورسینول در هر مخلوط محاسبه گردید. به همان صورت که در روش EXRSM بیان گردید، این کار برای محلول‌های هیدروکینون با غلظت ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۱۵/۰۰، ۲۰/۰۰ و ۲۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به‌عنوان مقسوم علیه انجام شد و غلظت رزورسینول و MSE غلظت رزورسینول برای مخلوهای سری ارزیابی محاسبه گردید (جدول ۳-۴۴). با توجه به نتایج به‌دست آمده، غلظت ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیدروکینون به‌عنوان مقسوم علیه بهینه انتخاب شد. سپس مقدار ثابت هر طیف در طیف مقسوم علیه مربوط (مثلاً ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیدروکینون) ضرب شد تا طیف هیدروکینون در هر مخلوط به‌دست آید (شکل ۳-۴۵).



شکل ۳-۴۵: طیف جذبی مرتبه صفر ۱/۱۰۰، ۳/۱۰۰، ۶/۱۰۰، ۹/۱۰۰ و ۱۲/۱۰۰ میلی گرم بر لیتر هیدروکینون بعد از ضرب مقدار ثابت (شکل ۳-۴۴) در طیف محلول ۲۰/۱۰۰ میلی گرم بر لیتر هیدروکینون

با استفاده از طیف هیدروکینون حاصل از ضرب مقدار ثابت هر طیف برای مخلوط در مقسوم علیه، جذب در طول موج ماکزیمم جذب طیف هیدروکینون حاصل اندازه گیری شد و با استفاده از منحنی کالیبراسیون مربوط به هیدروکینون، غلظت هیدروکینون در هر مخلوط و MSE آن برای مخلوط‌های سری ارزیابی محاسبه گردید. نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۳-۱۸ آورده شده است.

جدول ۳-۴۴: نتایج حاصل از بهینه‌سازی غلظت هیدروکینون به‌عنوان مقسوم علیه در روش SRSM

غلظت هیدروکینون به عنوان مقسوم علیه (mg L^{-1})	خطا (MSE) در پیش‌بینی غلظت رزورسینول (mg L^{-1})	خطا (MSE) در پیش‌بینی غلظت هیدروکینون (mg L^{-1})
۵/۰۰	۰/۰۰۶۲	۰/۰۰۷۸
۱۰/۰۰	۰/۰۰۶۱	۰/۰۰۷۷
۱۵/۰۰	۰/۰۰۶۱	۰/۰۰۷۷
۲۰/۰۰	۰/۰۰۵۸	۰/۰۰۷۳
۲۵/۰۰	۰/۰۰۶۰	۰/۰۰۷۳

نتایج حاصل از به‌کار بردن غلظت ۲۰/۱۰۰ میلی گرم بر لیتر هیدروکینون به‌عنوان مقسوم علیه بهینه برای مخلوط‌های سری تست در جدول ۳-۴۵ آورده شده است. این نتایج نشان می‌دهد که می‌توان غلظت دو جز در یک مخلوط را با خطای خیلی کم و قابل قبول به‌دست آورد که نشان دهنده صحت خوب روش SRSM در تعیین همزمان مقدار رزورسینول و هیدروکینون است.

جدول ۳-۴۵: نتایج حاصل از به کارگیری روش SRSM برای پیش‌بینی غلظت دو گونه در سری تست

محلول	غلظت واقعی (mg L^{-1})		غلظت پیش‌بینی شده (mg L^{-1})		خطای نسبی (%)	
	هیدروکینون	رزورسینول	هیدروکینون	رزورسینول	هیدروکینون	رزورسینول
۱	۳/۰۰	۲/۰۰	۳/۱۰	۲/۰۵	۳/۳۳	۲/۵۰
۲	۶/۰۰	۳/۰۰	۵/۹۱	۳/۰۷	-۱/۵۰	۲/۳۳
۳	۴/۰۰	۵/۰۰	۴/۰۸	۵/۱۱	۲/۰۰	۲/۲۰
۴	۵/۰۰	۸/۰۰	۵/۰۴	۸/۰۷	۰/۸۰	۰/۸۷
۵	۸/۰۰	۸/۰۰	۷/۹۰	۸/۰۶	-۱/۲۵	۰/۷۵
۶	۴/۰۰	۱۰/۰۰	۴/۰۹	۱۰/۰۵	۲/۲۵	۰/۵۰
۷	۶/۰۰	۱۰/۰۰	۶/۰۶	۹/۹۲	۱/۰۰	-۰/۸۰
۸	۹/۰۰	۱۰/۰۰	۹/۱۱	۹/۸۹	۱/۲۲	-۱/۱۰
۹	۲/۰۰	۱۰/۰۰	۲/۰۲	۹/۹۷	۱/۰۰	-۰/۳۰
۱۰	۴/۰۰	۱۵/۰۰	۳/۹۶	۱۵/۰۹	-۱/۰۰	۰/۶۰
۱۱	۸/۰۰	۹/۰۰	۷/۹۷	۸/۹۳	-۰/۳۷	-۰/۷۸

۳-۱۴-۳- بررسی اثر مزاحمت در روش های اسپکتروفتومتری جدید

(SRSM و EXRSM)

برای بررسی توانایی روش‌ها در اندازه‌گیری همزمان رزورسینول و هیدروکینون در نمونه‌های حقیقی، اثر مزاحمت گونه‌های مختلف در اندازه‌گیری همزمان رزورسینول و هیدروکینون مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی مزاحمت در روش EXRSM و SRSM نحوه کار به این صورت بود که طیف محلول ۲/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر رزورسینول یا هیدروکینون ثبت و ذخیره گردید و به ترتیب در طول موج ماکزیمم ۲۷۲ و ۲۸۶/۵ نانومتر در غیاب گونه مزاحم و در شرایط بهینه، برای ۶ مرتبه اندازه‌گیری شد و میانگین سیگنال تجزیه‌ای (\bar{A}) و انحراف استاندارد آن (S_A) برای هر ترکیب محاسبه گردید. محدوده اطمینان با توجه به رابطه $\bar{A} \pm 3S_A$ به دست آمد؛ سپس برای بررسی اثر مزاحمت احتمالی هر گونه، گونه مورد نظر با نسبت ۱۰۰۰ برابر وزنی- وزنی نسبت به هیدروکینون یا رزورسینول، به نمونه حاوی هیدروکینون یا رزورسینول اضافه

گردید. سپس مقدار لازم از این محلول به دستگاه اسپکتروفتومتر منتقل و طیف آن ثبت و ذخیره گردید. سیگنال تجربه‌ای هر ترکیب در طول موج ماکزیمم جذب آن 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 رزورسینول یا هیدروکینون آن قدر کاهش داده شد تا سیگنال در محدوده اطمینان قرار گیرد. نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۳-۴۶ آورده شده است.

جدول ۳-۴۶: نتایج حاصل از بررسی اثر گونه‌های مزاحم در اندازه‌گیری همزمان رزورسینول و هیدروکینون با غلظت‌های یکسان و برابر ۲/۰ میلی‌گرم بر لیتر در روش EXRSM و SRSM

حد مجاز گونه مزاحم (وزنی-وزنی)	گونه‌های بررسی شده در اندازه‌گیری هیدروکینون	گونه‌های بررسی شده در اندازه‌گیری رزورسینول
۱۰۰۰	$K^+, Na^+, NH_4^+, Cl^-, Mg^{2+}, Ni^{2+}, Br^-, EDTA, SO_4^{2-}, Ca^{2+}, F^-$	$Ca^{2+}, F^-, K^+, SO_4^{2-}, Ni^{2+}, Br^-, EDTA, Na^+, Cl^-, Mg^{2+}, NH_4^+$
۴۰۰	Co^{2+}	Co^{2+}
۲۰۰	Fe^{2+}, Al^{3+} سیتریک اسید	Fe^{2+}, Al^{3+} سیتریک اسید
۱۰۰	گلوکز	گلوکز
۵۰	NO_3^-	NO_3^-
۱۰	کتکول- فنول	-
۱	سدیم فتالات، $Fe^{3+}, Cd^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, NO_2^-$	سدیم فتالات، کتکول، فنول، $Cd^{2+}, NO_2^-, Zn^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{3+}$

برای روش EXRSM و SRSM، مزاحمت Fe^{3+}, Cu^{2+} و Zn^{2+} به دلیل تشکیل رسوب این کاتیون‌ها با فسفات ناشی از بافر است. علت مزاحمت NO_2^- ، جذب آن در دامنه طول موج ۳۲۰-۲۱۰ نانومتر است که ناشی از انتقالات n به π^* موجود در ساختار آن است (این انتقالات در ناحیه ۷۰۰-۲۰۰ نانومتر جذب دارند). Cd^{2+} از جمله فلزات واسطه است و اکثر یون‌های فلزات واسطه در نواحی ماورا بنفش و مرئی جذب دارند [۲۵]. کتکول یکی دیگر از ایزومرهای دی هیدروکسی فنول است، بنابراین در ناحیه طول موج ۳۲۰-۲۱۰ نانومتر دارای جذب است. به دلیل وجود حلقه بنزن در ساختار سدیم فتالات و فنول، جذب این گونه‌ها در دامنه طول موج ۳۲۰-۲۱۰ نانومتر دارای جذب هستند. بنابراین مزاحمت ناشی از گونه‌های سدیم فتالات، کتکول، فنول، Cd^{2+} ، NO_2^- از نوع شاهد به حساب می‌آید و قابل بر طرف کردن نیست.

۳-۱۴-۴ - حد تشخیص روش‌های EXRSM و SRSM

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 ۲-۳ استفاده شد:

$$LOD = \frac{KS_{bl}}{m}$$

معادله ۲-۳

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 EXRSM و SRSM، ۱۰ اندازه‌گیری تکراری برای شاهد انجام

شد و طیف هر محلول در محدوده طول موجی ۲۱۰-۳۲۰ نانومتر ثبت گردید و غلظت رزورسینول و

هیدروکینون با استفاده از روش EXRSM و SRSM به دست آمد. در این روش از تقسیم سه برابر انحراف

استاندارد سیگنال شاهد بر شیب منحنی کالیبراسیون، حد تشخیص به دست آمد [۴۰]. با توجه به تعریف

فوق، حد تشخیص تجربی روش EXRSM برای رزورسینول و هیدروکینون به ترتیب ۰/۱۶۸ و ۰/۱۳۲

میلی گرم بر لیتر و حد تشخیص تجربی روش SRSM برای رزورسینول و هیدروکینون به ترتیب ۰/۱۰۱ و

۰/۱۳۲ میلی گرم بر لیتر به دست آمد.

۳-۱۴-۵ - دقت و صحت روش‌های EXRSM و SRSM

برای بررسی دقت و صحت روش‌های EXRSM و SRSM، محلول‌هایی با غلظت‌های متفاوت از

رزورسینول و هیدروکینون در شرایط بهینه ساخته شد. برای هر یک از مخلوط‌ها ۵ بار اندازه‌گیری تکراری

انجام شد و طیف هر مخلوط در محدوده طول موج ۳۲۰-۲۱۰ نانومتر ثبت گردید؛ سپس غلظت رزورسینول و هیدروکینون با استفاده از روش‌های EXRSM و SRSM تعیین شد. مقادیر انحراف استاندارد برای هر غلظت محاسبه شد. نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت برای روش EXRSM در جدول ۳-۴۷ و برای روش SRSM در جدول ۳-۴۸ آورده شده است که نشان دهنده دقت و صحت خوب روش‌های EXRSM و SRSM می‌باشد.

جدول ۳-۴۷: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش EXRSM

شماره مخلوط	رزورسینول موجود (mg L ⁻¹)	هیدروکینون موجود (mg L ⁻¹)	اندازه‌گیری شده (mg L ⁻¹)	رزورسینول اندازه‌گیری شده (mg L ⁻¹)	هیدروکینون اندازه‌گیری شده (mg L ⁻¹)	درصد بازایی رزورسینول	درصد بازایی هیدروکینون
۱	۱/۰۰	۳/۰۰	۱/۰۶±(۰/۰۷)*	۳/۰۳±(۰/۰۸)	۱۰۶/۰	۱۰۱/۰	
۲	۳/۰۰	۹/۰۰	۲/۹۲±(۰/۱۱)	۹/۰۸±(۰/۰۹)	۹۷/۳	۱۰۰/۹	
۳	۱۵/۰۰	۵/۰۰	۱۵/۰۶±(۰/۰۸)	۵/۰۹±(۰/۰۹)	۱۰۰/۴	۱۰۱/۸	
۴	۲/۰۰	۲/۰۰	۲/۰۴±(۰/۰۷)	۱/۹۰±(۰/۱۰)	۱۰۲/۰	۹۵/۰	

* اعداد داخل پرانتز انحراف استاندارد حاصل از ۵ بار اندازه‌گیری تکراری است.

جدول ۳-۴۸: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش SRSM

شماره مخلوط	رزورسینول موجود (mg L ⁻¹)	هیدروکینون موجود (mg L ⁻¹)	اندازه‌گیری شده (mg L ⁻¹)	رزورسینول اندازه‌گیری شده (mg L ⁻¹)	هیدروکینون اندازه‌گیری شده (mg L ⁻¹)	درصد بازایی رزورسینول	درصد بازایی هیدروکینون
۱	۱/۰۰	۳/۰۰	۱/۰۹±(۰/۱۱)*	۳/۰۷±(۰/۰۹)	۱۰۹/۰	۱۰۲/۳	
۲	۳/۰۰	۹/۰۰	۲/۹۶±(۰/۰۸)	۹/۱۱±(۰/۱۳)	۹۸/۷	۱۰۱/۲	
۳	۱۵/۰۰	۵/۰۰	۱۵/۰۷±(۰/۰۸)	۵/۰۶±(۰/۰۹)	۱۰۶/۰	۱۰۱/۲	
۴	۲/۰۰	۲/۰۰	۲/۰۹±(۰/۱۰)	۲/۰۳±(۰/۰۷)	۱۰۴/۵	۱۰۱/۵	

* اعداد داخل پرانتز انحراف استاندارد حاصل از ۵ بار اندازه‌گیری تکراری است.

۳-۱۴-۶- کاربرد روش‌های EXRSM و SRSM در آنالیز نمونه‌های

حقیقی

به منظور ارزیابی توانایی روش EXRSM و SRSM در اندازه‌گیری همزمان رزورسینول و هیدروکینون، اندازه‌گیری مقادیر ترکیبات ذکر شده در نمونه آب شهر مورد بررسی قرار گرفت. برای تهیه نمونه‌های حقیقی

از آب شهر شاهرود به عنوان بافت ثابت نمونه‌ها استفاده شد. روش کار به این صورت بود که؛ محلول حاوی ۱۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر رزورسینول و ۱۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیدروکینون به‌عنوان محلول استاندارد تهیه شد. برای تهیه محلول نمونه به‌صورت زیر عمل شد که ابتدا ۵/۰۰ میلی‌لیتر محلول ۵۰۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر رزورسینول به یک بالن حجمی ۱۰۰ میلی‌لیتری و ۵/۰۰ میلی‌لیتر محلول ۵۰۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر هیدروکینون به یک بالن حجمی ۱۰۰ میلی‌لیتری دیگر، انتقال داده شد و با آب شهر به حجم رسانده شد. سپس از این محلول‌ها، مخلوط‌هایی با نسبت‌های غلظتی مختلف از هیدروکینون و رزورسینول به همراه ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفاتی ۷/۰ pH= در بالن‌های حجمی ۱۰ میلی‌لیتری تهیه و طیف آن‌ها نسبت به شاهد ثبت و ذخیره گردید. سپس غلظت رزورسینول و هیدروکینون در مخلوط‌های تهیه شده، با استفاده از روش افزایش استاندارد تعیین مقدار گردید. نتایج حاصل از ۵ بار اندازه‌گیری تکراری برای روش EXRSM در جدول ۳-۴۹ و برای روش SRSM در جدول ۳-۵۰ آورده شده است.

جدول ۳-۴۹: نتایج حاصل از اندازه‌گیری رزورسینول و هیدروکینون در نمونه‌های آب شهر با استفاده از روش EXRSM

نمونه	مقدار افزوده شده (میلی‌گرم بر لیتر)		مقدار اندازه‌گیری شده (میلی‌گرم بر لیتر)		درصد بازیابی	
	رزورسینول	هیدروکینون	رزورسینول	هیدروکینون	رزورسینول	هیدروکینون
آب شهر	۲/۰۰	۴/۰۰	۲/۰۵±(۰/۰۶)*	۴/۰۸±(۰/۱۱)	۱۰۲/۵	۱۰۲/۰
آب شهر	۳/۰۰	۵/۰۰	۳/۰۹±(۰/۱۰)	۵/۰۲±(۰/۰۶)	۱۰۳/۰	۱۰۰/۴
آب شهر	۴/۰۰	۶/۰۰	۴/۰۸±(۰/۰۸)	۶/۰۹±(۰/۰۷)	۱۰۲/۰	۱۰۱/۵
آب شهر	۵/۰۰	۷/۰۰	۴/۹۷±(۰/۰۵)	۶/۹۴±(۰/۱۰)	۹۹/۴	۹۹/۱
آب شهر	۶/۰۰	۸/۰۰	۶/۰۳±(۰/۰۶)	۸/۰۲±(۰/۰۹)	۱۰۰/۵	۱۰۰/۲
آب شهر	۷/۰۰	۹/۰۰	۷/۰۶±(۰/۰۶)	۹/۰۰±(۰/۰۹)	۱۰۰/۸	۱۰۰/۰
آب شهر	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۹±(۰/۰۹)	۱/۰۹±(۰/۰۹)	۱۱۰/۰	۱۰۹/۰
آب شهر	۲/۰۰	۲/۰۰	۲/۰۹±(۰/۱۰)	۲/۰۵±(۰/۰۶)	۱۰۴/۵	۱۰۲/۵
آب شهر	۳/۰۰	۳/۰۰	۲/۹۴±(۰/۰۵)	۲/۹۱±(۰/۱۰)	۹۸/۰	۹۷/۰
آب شهر	۴/۰۰	۴/۰۰	۳/۹۳±(۰/۱۰)	۴/۰۸±(۰/۰۷)	۹۸/۲	۱۰۲/۰

* اعداد داخل پرانتز انحراف استاندارد حاصل از ۵ بار اندازه‌گیری تکراری است.

جدول ۳-۵: نتایج حاصل از اندازه‌گیری رزورسینول و هیدروکینون در نمونه‌های آب شهر با استفاده از روش SRSM

درصد بازیابی		مقدار اندازه‌گیری شده (میلی‌گرم بر لیتر)		مقدار افزوده شده (میلی‌گرم بر لیتر)		نمونه
هیدروکینون	رزورسینول	هیدروکینون	رزورسینول	هیدروکینون	رزورسینول	
۱۰۲/۷	۱۰۲/۰	۴/۰۳±(۰/۰۹)	۲/۰۴±(۰/۰۴)*	۴/۰۰	۲/۰۰	آب شهر
۱۰۰/۸	۱۰۰/۷	۵/۰۴±(۰/۰۶)	۳/۰۲±(۰/۰۲)	۵/۰۰	۳/۰۰	آب شهر
۱۰۰/۳	۱۰۱/۲	۶/۰۲±(۰/۰۹)	۴/۰۵±(۰/۰۳)	۶/۰۰	۴/۰۰	آب شهر
۹۹/۴	۹۹/۰	۶/۹۶±(۰/۱۱)	۴/۹۵±(۰/۰۵)	۷/۰۰	۵/۰۰	آب شهر
۹۹/۹	۱۰۰/۵	۷/۹۹±(۰/۰۸)	۶/۰۳±(۰/۰۴)	۸/۰۰	۶/۰۰	آب شهر
۹۹/۸	۱۰۰/۳	۸/۹۸±(۰/۰۶)	۷/۰۲±(۰/۰۷)	۹/۰۰	۷/۰۰	آب شهر
۱۰۳/۰	۱۰۸/۰	۱/۰۳±(۰/۰۹)	۱/۰۸±(۰/۰۴)	۱/۰۰	۱/۰۰	آب شهر
۱۰۳/۵	۱۰۲/۵	۲/۰۷±(۰/۰۷)	۲/۰۵±(۰/۰۶)	۲/۰۰	۲/۰۰	آب شهر
۱۰۰/۷	۹۹/۳	۳/۰۲±(۰/۰۵)	۲/۹۸±(۰/۰۲)	۳/۰۰	۳/۰۰	آب شهر
۱۰۱/۰	۱۰۰/۰	۴/۰۴±(۰/۱۰)	۴/۰۰±(۰/۰۴)	۴/۰۰	۴/۰۰	آب شهر

* اعداد داخل پرانتز انحراف استاندارد حاصل از ۵ بار اندازه‌گیری تکراری است.

این نتایج نشان می‌دهد که می‌توان غلظت رزورسینول و هیدروکینون را به‌طور همزمان به روش

EXRSM و روش SRSM در نمونه‌های آب شهر با دقت و صحت خوبی تعیین کرد.

۳-۱۴-۷- کالیبراسیون چند متغیره و محلول‌سازی

در کالیبراسیون چند متغیره برای اندازه‌گیری همزمان رزورسینول و هیدروکینون از روش PLS

استفاده شد. به‌منظور بهینه‌سازی پارامترها و رسیدن به بهترین صحت در این روش، محلول‌های سری

کالیبراسیون و محلول‌های سریارزیابی تهیه و طیف آن‌ها نسبت به محلول شاهد در دامنه ۲۱۰-۳۲۰ نانومتر

ثبت گردید و مورد بررسی قرار گرفت. ترکیب غلظتی محلول‌های سری کالیبراسیون و محلول‌های سری

ارزیابی به ترتیب در جدول ۳-۳۷ و جدول ۳-۳۸ آورده شده است. محلول‌های سری کالیبراسیون (همان

محلول‌های سری ارزیابی روش‌های EXRSM و SRSM هستند) و محلول‌های سری ارزیابی (همان

محلول‌های سری تست روش‌های EXRSM و SRSM هستند) مانند آنچه در بخش ۳-۱۴-۲- گفته شد، تهیه

گردید.

۳-۱۴-۷-۱- روش حداقل مربعات جزئی (PLS)

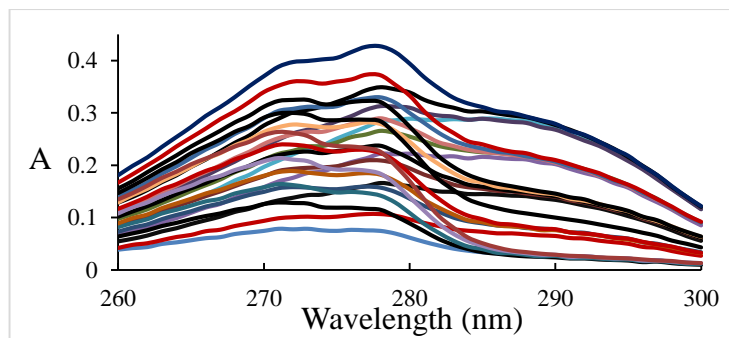
به منظور مقایسه نتایج روش های اسپکتروفتومتری جدید EXRSM و SREM، با نتایج یک روش دیگر، روش رگرسیون حداقل مربعات جزئی (PLS) به کار برده شد. برای انجام رگرسیون PLS محلول های سری ارزیابی و محلول های سری تست تهیه شده در بخش ۳-۱۴-۲- به ترتیب به عنوان محلول های سری کالیبراسیون و محلول های سری ارزیابی مورد استفاده قرار گرفت. در این صورت برای هر محلول ۱۴۱ داده جذبی در ۱۴۱ طول موج متفاوت ثبت شد. داده های ثبت شده به صورت دو ماتریس 141×11 و 141×30 در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت. سری اول از این محلول ها (سری کالیبراسیون)، برای مدل سازی به روش حداقل مربعات جزئی و سری دوم محلول ها (سری ارزیابی)، برای سنجش توانایی مدل ساخته شده در پیش بینی غلظت، به کار گرفته شد. ترکیب محلول های سری کالیبراسیون و سری ارزیابی به ترتیب در جدول ۳-۳۷ و جدول ۳-۳۸ آمده است.

روش کار در تهیه و اندازه گیری جذب محلول های سری کالیبراسیون و محلول های سری ارزیابی مانند روش به کار گرفته شده در روش های EXRSM و SRSM بود. در روش PLS دامنه طول موج و تعداد فاکتور PLS برای رسیدن به بهترین صحت به طور همزمان بهینه شدند. برای هر دامنه طول موج، ابتدا با استفاده از نمونه های سری کالیبراسیون، مدل سازی انجام شد و سپس مدل ساخته شده برای محاسبه غلظت نمونه های سری ارزیابی به کار برده شد. عمل مدل سازی و پیش بینی با در نظر گرفتن تعداد فاکتورهای PLS از ۱ تا ۷ تکرار گردید. دامنه طول موجی و تعداد فاکتور PLS که کمترین خطا را برای پیش بینی غلظت رزورسینول و هیدروکینون ایجاد می کنند؛ به عنوان بهترین دامنه طول موج و تعداد فاکتور PLS برای مدل سازی مورد استفاده قرار گرفت. نتایج حاصل از بررسی و بهینه سازی دامنه طول موج و تعداد فاکتور PLS برای رزورسینول و هیدروکینون در جدول ۳-۵۱ آورده شده است.

جدول ۳-۵۱: نتایج حاصل از بهینه‌سازی دامنه طول موج و تعداد فاکتور PLS برای نمونه‌های سری کالیبراسیون

دامنه طول موج ۲۸۰-۲۹۰ نانومتر (۱۱ نقطه)			دامنه طول موج ۲۵۰-۳۰۰ نانومتر (۶۱ نقطه)		
MSE هیدروکینون	MSE رزورسینول	تعداد فاکتور	MSE هیدروکینون	MSE رزورسینول	تعداد فاکتور
۰/۷۹۳	۲۵/۴۵۲	۱	۴/۵۴۱	۱۲/۵۵۴	۱
۰/۰۱۴	۰/۰۱۳	۲	۰/۰۱۵	۰/۰۰۹	۲
۰/۰۶۴	۴۶/۶۹۰	۳	۲/۲۵۸	۸/۷۵۵	۳
۰/۰۶۰	۴۶/۶۸۵	۴	۲/۲۵۲	۸/۷۵۳	۴
۰/۰۸۵	۴۶/۷۱۴	۵	۲/۳۶۶	۸/۷۸۵	۵
۰/۱۰۹	۴۶/۷۷۴	۶	۲/۲۹۴	۸/۸۴۶	۶
۰/۱۴۷	۴۶/۷۹۶	۷	۲/۳۷۴	۸/۹۰۳	۷
دامنه طول موج ۲۷۰-۲۸۹ نانومتر (۲۰ نقطه)			دامنه طول موج ۲۶۰-۳۰۰ نانومتر (۴۱ نقطه)		
MSE هیدروکینون	MSE رزورسینول	تعداد فاکتور	MSE هیدروکینون	MSE رزورسینول	تعداد فاکتور
۴/۱۵۶	۱۴/۰۸۰	۱	۴/۴۳۵	۱۲/۹۲۸	۱
۰/۰۱۴	۰/۰۱۱	۲	۰/۰۱۱	۰/۰۰۸	۲
۱/۷۲۳	۱۰/۵۲۸	۳	۲/۰۹۸	۹/۳۰۹	۳
۱/۷۱۹	۱۰/۵۲۵	۴	۲/۰۹۳	۹/۳۰۵	۴
۱/۷۸۲	۱۰/۵۷۳	۵	۲/۱۴۰	۹/۳۸۷	۵
۱/۸۴۹	۱۰/۶۳۱	۶	۲/۱۶۰	۹/۴۱۶	۶
۱/۸۶۲	۱۰/۶۶۷	۷	۲/۲۷۷	۹/۴۲۲	۷
دامنه طول موج ۲۷۰-۲۹۵ نانومتر (۲۶ نقطه)			دامنه طول موج ۲۷۰-۲۹۰ نانومتر (۲۱ نقطه)		
MSE هیدروکینون	MSE رزورسینول	تعداد فاکتور	MSE هیدروکینون	MSE رزورسینول	تعداد فاکتور
۳/۴۴۴	۱۵/۷۶۹	۱	۴/۱۵۶	۱۴/۰۸۰	۱
۰/۰۱۴	۰/۰۱۱	۲	۰/۰۱۴	۰/۰۱۱	۲
۱/۲۰۲	۱۳/۸۲۹	۳	۱/۷۲۳	۱۰/۵۲۸	۳
۱/۱۹۹	۱۳/۸۲۶	۴	۱/۷۱۹	۱۰/۵۲۵	۴
۱/۲۶۴	۱۳/۸۷۵	۵	۱/۷۸۲	۱۰/۵۷۳	۵
۱/۳۳۷	۱۳/۹۳۷	۶	۱/۸۴۹	۱۰/۶۳۱	۶
۱/۳۶۸	۱۳/۹۷۸	۷	۱/۸۶۲	۱۰/۶۶۷	۷
دامنه طول موج ۲۷۰-۲۸۰ نانومتر (۱۱ نقطه)					
MSE هیدروکینون		MSE رزورسینول		تعداد فاکتور	
۷/۵۶۰		۸/۳۲۴		۱	
۰/۰۱۱		۰/۰۱۳		۲	
۵/۳۹۹		۳/۰۴۶		۳	
۵/۳۹۷		۳/۰۴۴		۴	
۵/۴۰۳		۳/۰۵۶		۵	
۵/۴۲۴		۳/۰۶۹		۶	
۵/۵۷۳		۳/۰۸۶		۷	

با توجه به نتایج جدول ۳-۵۱ دامنه طول موج ۲۶۰-۳۰۰ نانومتر با فواصل ۱ نانومتری به عنوان دامنه طول موج بهینه و تعداد فاکتور ۲ و ۲ به ترتیب برای رزورسینول و هیدروکینون انتخاب شد. در شکل ۳-۴۶ طیف محلول‌های سری کالیبراسیون در دامنه طول موج بهینه مشاهده می‌شود.



شکل ۳-۴۶: طیف جذبی محلول‌های سری کالیبراسیون حاوی رزورسینول و هیدروکینون در محدوده طول موج ۲۶۰-۳۰۰ نانومتر

با توجه به جدول ۳-۵۱ تعداد فاکتورهای ۲ و ۲ به ترتیب برای اندازه‌گیری رزورسینول و هیدروکینون در مدل‌سازی PLS انتخاب شد.

نتایج حاصل از تخمین غلظت رزورسینول و هیدروکینون در محلول‌های سری ارزیابی در شرایط بهینه با استفاده از روش PLS در جدول ۳-۵۲ آورده شده است.

جدول ۳-۵۲: نتایج حاصل از به کارگیری روش PLS برای پیش‌بینی غلظت دو گونه در سری ارزیابی

محلول	غلظت واقعی (mg L^{-1})		غلظت پیش‌بینی شده (mg L^{-1})		خطای نسبی (%)	
	رزورسینول	هیدروکینون	رزورسینول	هیدروکینون	رزورسینول	هیدروکینون
۱	۲/۰۰	۳/۰۰	۲/۱۰	۳/۰۸	۵/۰۰	۲/۶۷
۲	۳/۰۰	۶/۰۰	۳/۰۷	۶/۰۵	۲/۴۹	۰/۹۲
۳	۵/۰۰	۴/۰۰	۵/۰۹	۴/۰۵	۱/۸۰	۱/۲۵
۴	۸/۰۰	۵/۰۰	۸/۰۹	۵/۱۴	۱/۲۰	۲/۸۲
۵	۸/۰۰	۸/۰۰	۸/۰۷	۷/۹۹	۰/۸۸	-۰/۱۷
۶	۱۰/۰۰	۴/۰۰	۱۰/۱۴	۴/۰۴	۱/۴۰	۱/۱۲
۷	۱۰/۰۰	۶/۰۰	۱۰/۱۴	۵/۹۹	۱/۴۰	-۰/۱۰
۸	۱۰/۰۰	۹/۰۰	۱۰/۰۱	۸/۹۷	۰/۱۰	-۰/۳۳
۹	۱۰/۰۰	۲/۰۰	۱۰/۰۱	۲/۰۹	۰/۱۰	۴/۵۰
۱۰	۱۵/۰۰	۴/۰۰	۱۵/۰۰	۴/۰۶	۰/۰۰	۱/۴۰
۱۱	۹/۰۰	۸/۰۰	۸/۹۹	۷/۸۹	-۰/۱۵	-۱/۳۷

۳-۱۴-۸- حد تشخیص روش PLS

به منظور بررسی حد تشخیص روش PLS، ۱۰ اندازه‌گیری تکراری برای شاهد انجام شد و طیف هر محلول در محدوده طول موجی ۲۱۰-۳۲۰ نانومتر ثبت گردید و غلظت رزورسینول و هیدروکینون با استفاده از این روش به دست آمد. حد تشخیص در روش PLS، سه برابر انحراف استاندارد غلظت اندازه‌گیری شده برای هر جز در نظر گرفته شد [۴۱]. با توجه به تعریف فوق، حد تشخیص تجربی روش PLS برای رزورسینول و هیدروکینون به ترتیب ۰/۱۰۸ و ۰/۱۳۹ میلی‌گرم بر لیتر به دست آمد.

۳-۱۴-۹- دقت و صحت روش PLS

برای بررسی دقت و صحت روش PLS، محلول‌هایی با غلظت‌های متفاوت از رزورسینول و هیدروکینون در شرایط بهینه ساخته شد. برای هر یک از مخلوط‌ها ۵ بار اندازه‌گیری تکراری انجام شد و طیف هر مخلوط در محدوده طول موج ۲۱۰-۳۲۰ نانومتر ثبت گردید؛ سپس غلظت رزورسینول و هیدروکینون با استفاده از روش‌های PLS پیش‌بینی شد. مقادیر انحراف استاندارد در هر حالت محاسبه شد. نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۳-۵۳ آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد که روش PLS با دقت و صحت خوبی برای تعیین همزمان رزورسینول و هیدروکینون قابل کاربرد است.

جدول ۳-۵۳: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش PLS

شماره مخلوط	رزورسینول موجود (mg L ⁻¹)	هیدروکینون موجود (mg L ⁻¹)	رزورسینول اندازه‌گیری شده (mg L ⁻¹)	هیدروکینون اندازه‌گیری شده (mg L ⁻¹)	درصد بازایی رزورسینول	درصد بازایی هیدروکینون
۱	۱/۰۰	۳/۰۰	۱/۰۵ ± (۰/۰۷)	۲/۹۸ ± (۰/۰۳)	۱۰۵/۰	۹۹/۳
۲	۳/۰۰	۹/۰۰	۲/۹۱ ± (۰/۱۱)	۹/۰۳ ± (۰/۱۳)	۹۷/۰	۱۰۰/۳
۳	۱۵/۰۰	۵/۰۰	۱۵/۰۳ ± (۰/۰۷)	۴/۹۲ ± (۰/۰۹)	۱۰۰/۲	۹۸/۴
۴	۲/۰۰	۲/۰۰	۲/۰۴ ± (۰/۰۸)	۲/۰۶ ± (۰/۰۷)	۱۰۲/۰	۱۰۳/۰

* اعداد داخل پرانتز انحراف استاندارد حاصل از ۵ بار اندازه‌گیری تکراری است.

۳-۱۴-۱۰- کاربرد روش PLS در آنالیز نمونه‌های حقیقی

به منظور ارزیابی توانایی روش PLS در اندازه‌گیری همزمان رزورسینول و هیدروکینون، اندازه‌گیری مقادیر ترکیبات ذکر شده در نمونه آب شهر مانند آن چه در بخش ۳-۷-۶- گفته شد، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از ۵ بار اندازه‌گیری تکراری برای روش PLS در جدول ۳-۵۴ آورده شده است. این نتایج نشان داد که روش PLS با صحت خوبی برای تعیین همزمان رزورسینول و هیدروکینون در نمونه‌های آب شهر قابل کاربرد است.

جدول ۳-۵۴: نتایج حاصل از اندازه‌گیری رزورسینول و هیدروکینون در نمونه‌های آب شهر با استفاده از روش PLS

درصد بازیابی		مقدار اندازه‌گیری شده (میلی گرم بر لیتر)		مقدار افزوده شده (میلی گرم بر لیتر)		نمونه
هیدروکینون	رزورسینول	هیدروکینون	رزورسینول	هیدروکینون	رزورسینول	
۹۹/۷	۱۰۰/۵	۳/۹۹±(۰/۰۵)	۲/۰۱±(۰/۰۹)*	۴/۰۰	۲/۰۰	آب شهر
۹۹/۲	۱۰۰/۰	۴/۹۶±(۰/۰۹)	۳/۰۰±(۰/۱۱)	۵/۰۰	۳/۰۰	آب شهر
۱۰۱/۰	۱۰۱/۰	۶/۰۶±(۰/۰۶)	۴/۰۴±(۰/۰۴)	۶/۰۰	۴/۰۰	آب شهر
۱۰۰/۶	۱۰۱/۰	۷/۰۴±(۰/۰۷)	۵/۰۱±(۰/۰۵)	۷/۰۰	۵/۰۰	آب شهر
۹۹/۰	۹۹/۵	۷/۹۲±(۰/۰۹)	۵/۹۷±(۰/۰۳)	۸/۰۰	۶/۰۰	آب شهر
۹۹/۵	۹۹/۷	۸/۹۶±(۰/۱۲)	۶/۹۸±(۰/۰۵)	۹/۰۰	۷/۰۰	آب شهر
۱۰۹/۰	۱۰۴/۰	۱/۰۹±(۰/۰۸)	۱/۰۴±(۰/۰۶)	۱/۰۰	۱/۰۰	آب شهر
۹۷/۰	۱۰۱/۵	۱/۹۴±(۰/۱۰)	۲/۰۳±(۰/۰۹)	۲/۰۰	۲/۰۰	آب شهر
۱۰۰/۰	۱۰۱/۳	۳/۰۰±(۰/۰۳)	۳/۰۴±(۰/۰۵)	۳/۰۰	۳/۰۰	آب شهر
۱۰۲/۰	۱۰۰/۲	۴/۰۸±(۰/۰۹)	۴/۰۱±(۰/۱۱)	۴/۰۰	۴/۰۰	آب شهر

* اعداد داخل پرانتز انحراف استاندارد حاصل از ۵ بار اندازه‌گیری تکراری است.

۴ - بحث

و

نتیجہ گیری

۴-۱- اندازه‌گیری همزمان کتکول و هیدروکینون و اندازه‌گیری

همزمان رزورسینول و هیدروکینون در مخلوط دوتایی از هر

کدام با استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری

۴-۱-۱- بررسی و بهینه‌سازی پارامترهای تجربی

اثر pH در ناحیه ۹/۰-۲/۰ برای مخلوط کتکول و هیدروکینون و مخلوط رزورسینول و هیدروکینون مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این بررسی برای مخلوط کتکول و هیدروکینون در جدول ۳-۱ و شکل ۳-۲ و برای مخلوط رزورسینول و هیدروکینون در جدول ۳-۳ و شکل ۳-۲۶ نشان می‌دهد که تغییرات pH بر میزان سیگنال تجزیه‌ای کتکول، هیدروکینون و رزورسینول و طول موج ماکزیمم جذب آن‌ها تاثیر ندارد. لذا با در نظر گرفتن حساسیت و گزینش‌پذیری روش، محلول بافری با $pH=7/0$ برای مطالعات و بررسی‌های بعدی انتخاب گردید.

نتایج حاصل از بررسی نوع بافر برای مخلوط کتکول و هیدروکینون و برای مخلوط رزورسینول و هیدروکینون به ترتیب در جدول ۳-۲ و جدول ۳-۳ آورده شده است. نتایج نشان داد سیگنال تجزیه‌ای در حضور بافر فسفاتی با $pH=7/0$ در مقایسه با بافر سیتراتی اندکی بیشتر است، بنابراین به منظور دست‌یابی به حساسیت بیشتر و حد تشخیص بهتر، بافر فسفاتی برای بررسی‌های بعدی انتخاب شد. به دلیل وجود حلقه بنزن در ساختار بافر فتالاتی، جذب کتکول و هیدروکینون در مقایسه با جذب بافر فتالاتی در ناحیه طول‌موج ۳۲۰-۲۱۰ نانومتر، ناچیز بود بنابراین از بافر فتالاتی استفاده نشد.

در بهینه‌سازی حجم بافر فسفاتی با $pH=7/0$ اثر حجم بافر در ناحیه ۵/۰۰-۱/۰۰ میلی‌لیتر بررسی شد. نتایج جدول ۳-۳ و شکل ۳-۳ برای مخلوط کتکول و هیدروکینون و نتایج جدول ۳-۳۳ و شکل ۳-۲۷

برای مخلوط رزورسینول و هیدروکینون نشان می‌دهد که سیگنال تجزیه‌ای برای کتکول، هیدروکینون و رزورسینول با تغییرات حجم بافر ثابت است. بنابراین برای اطمینان از ظرفیت بافری و هم‌چنین کاهش مزاحمت‌های احتمالی غلظت بالای بافر، حجم ۲/۰۰ میلی‌لیتر برای بررسی‌های بعدی انتخاب شد. اثر قدرت یونی بر حساسیت، در شرایط بهینه و با استفاده از پتاسیم کلرید در محدوده ۰/۵۰-۰/۰۰ مولار مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این بررسی برای مخلوط کتکول و هیدروکینون در جدول ۳-۴ و شکل ۳-۴ و برای مخلوط رزورسینول و هیدروکینون در جدول ۳-۳ و شکل ۳-۲۸ نشان می‌دهد که قدرت یونی بر سیگنال تجزیه‌ای اثر ندارد.

۴-۱-۲- کالیبراسیون

بررسی‌ها نشان داد که برای هر سه روش دامنه خطی برای کتکول و رزورسینول ۱۵/۰۰-۱/۰۰ و برای هیدروکینون ۱۲/۰۰-۱/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر است. نتایج حاصل از پیش‌بینی غلظت کتکول و هیدروکینون برای محلول‌های سری تست (در روش EXRSM و SRSM) و برای سری ارزیابی (در روش PLS) به ترتیب در جدول ۳-۱۵، جدول ۳-۲۰ و جدول ۳-۲۸ آورده شده است. نتایج حاصل از پیش‌بینی غلظت رزورسینول و هیدروکینون برای محلول‌های سری تست (در روش EXRSM و SRSM) و برای سری ارزیابی (در روش PLS) به ترتیب در جدول ۳-۴۱، جدول ۳-۴۵ و جدول ۳-۵۲ آورده شده است. بررسی‌ها نشان می‌دهد نتایج هر سه روش برای پیش‌بینی غلظت اجزای مخلوط دوتایی، قابل مقایسه است و دقت و صحت قابل قبولی دارد.

۴-۱-۳- ارزیابی آماری

چهار پارامتر آماری برای ارزیابی و بررسی توانایی روش‌های EXRSM، SRSM و PLS در پیش‌بینی غلظت کتکول و هیدروکینون، محاسبه گردید.

اولین پارامتر آماری ضریب هم‌بستگی (R) است که میزان هم‌بستگی غلظت‌های پیش‌بینی شده توسط روش (مدل) و غلظت‌های واقعی را نشان می‌دهد و نشان دهنده میزان برازش داده‌ها بر روی خط راست

^۱ Correlation coefficient

برای هر جز می‌باشد. مقدار R از معادله ۱-۴ محاسبه شد.

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

دومین پارامتر آماری خطای مطلق میانگین (MAE)^۱ است که از معادله ۲-۴ محاسبه شد.

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

پارامتر آماری سوم، میانگین مربع خطا است. برای محاسبه MSE از معادله ۳-۴ استفاده شد.

$$MSE = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n} \quad \text{معادله ۳-۴}$$

چهارمین پارامتر آماری، میانگین خطای نسبی^۲ است که از معادله ۴-۴ محاسبه می‌شود.

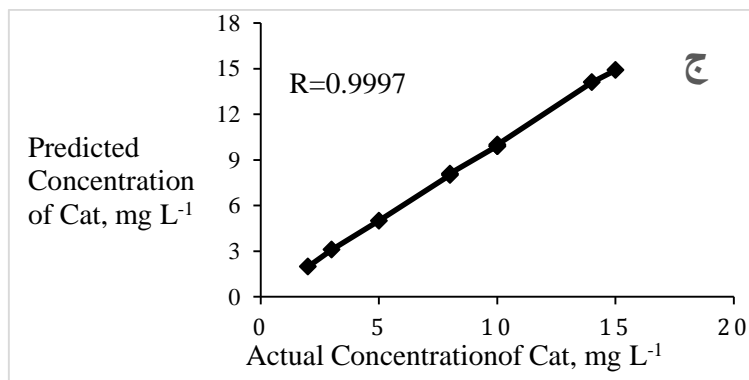
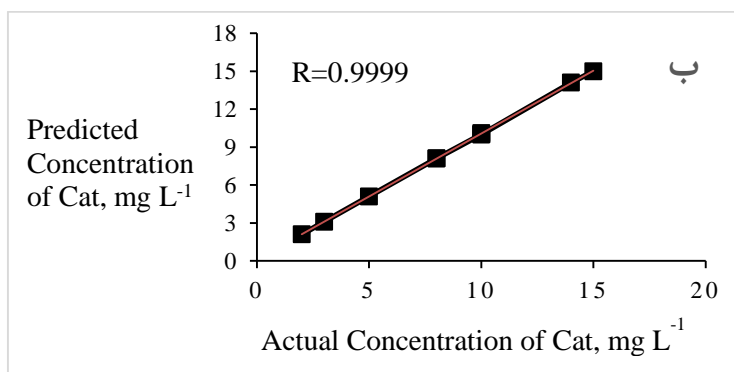
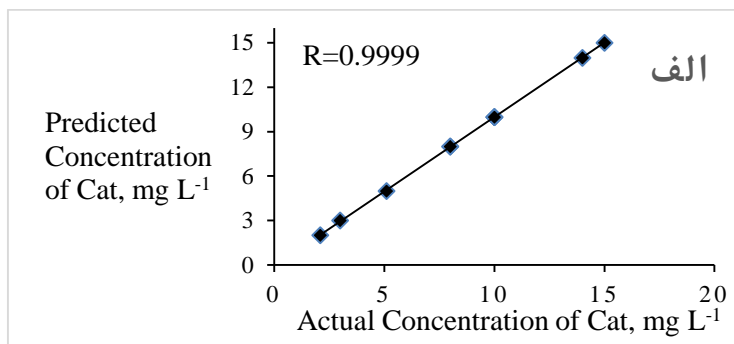
$$MRE = \frac{\sum_{i=1}^n \left| \frac{y_i - \hat{y}_i}{y_i} \right|}{n} \times 100 \quad \text{معادله ۴-۴}$$

در روابط فوق y_i غلظت واقعی گونه مورد نظر در نمونه i ام، \hat{y}_i غلظت پیش‌بینی شده گونه مورد نظر در نمونه i ام، \bar{y} میانگین غلظت واقعی در سری ارزیابی (برای PLS) و سری تست (برای EXRSM و SRSM) است. n تعداد محلول‌های سری ارزیابی است. برای روش‌های EXRSM، SRSM و PLS نمودار غلظت پیش‌بینی شده بر حسب غلظت واقعی برای کتکول و هیدروکینون به ترتیب در شکل ۱-۴ و شکل ۲-۴ آورده

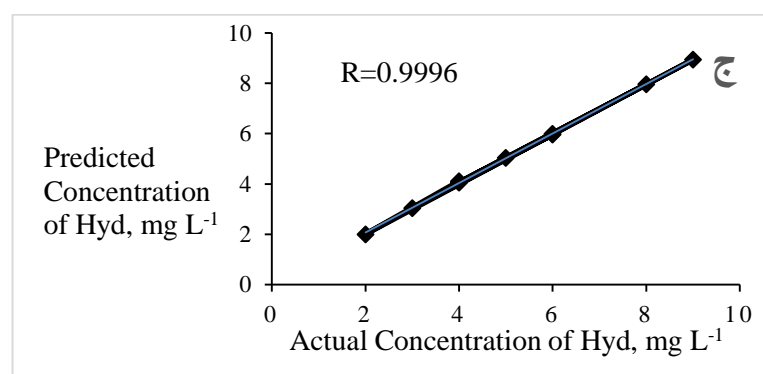
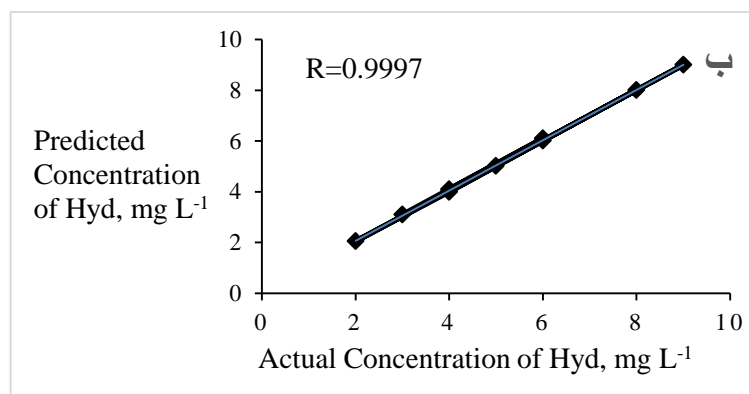
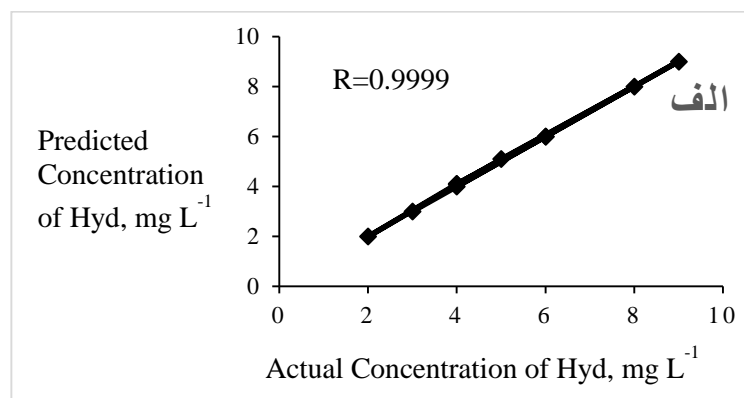
^۱ Mean Absolute Error

^۲ Mean Relative Error

شده است. مقادیر محاسبه شده R، MAE، MSE و MRE برای کتکول و هیدروکینون به ترتیب در جدول ۱-۴ و جدول ۲-۴ آورده شده است.



شکل ۱-۴: نمایش میزان همبستگی غلظت‌های پیش‌بینی شده و غلظت‌های واقعی کتکول در مخلوط‌های سری تست، الف: در روش EXRS، ب: در روش SRS، ج: در مخلوط‌های سری ارزیابی در روش PLS



شکل ۲-۴: نمایش میزان همبستگی غلظت‌های پیش‌بینی شده و غلظت‌های واقعی هیدروکینون در مخلوط‌های تست، الف: در روش EXRSM، ب: در روش SRSM و ج: در مخلوط‌های سری ارزیابی در روش PLS

ضریب همبستگی مشاهده شده بین مقادیر پیش‌بینی شده و مقادیر واقعی (برای کتکول در شکل ۱-۴

و برای هیدروکینون در شکل ۲-۴، نشان‌دهنده میزان نزدیکی غلظت پیش‌بینی شده توسط روش‌ها نسبت به

مقدار واقعی آن است.

جدول ۱-۴: پارامترهای آماری محاسبه شده برای روش‌های EXRSM، SRSM و PLS

کتکول			پارامتر آماری
PLS	SRSM	EXRSM	
۰/۹۹۹۷	۰/۹۹۹۹	۰/۹۹۹۹	R
۰/۰۵۷	۰/۰۸۷	۰/۰۴۹	MAE
۰/۰۰۴	۰/۰۸۶	۰/۰۰۳	MSE
۰/۷۷۱	۱/۶۰۱	۰/۸۴۵	MRE

نتایج حاصل از جدول ۱-۴ نشان می‌دهد که خطای حاصل از پیش‌بینی غلظت کتکول با استفاده از روش EXRSM و PLS در مقایسه با روش SRSM کمتر است.

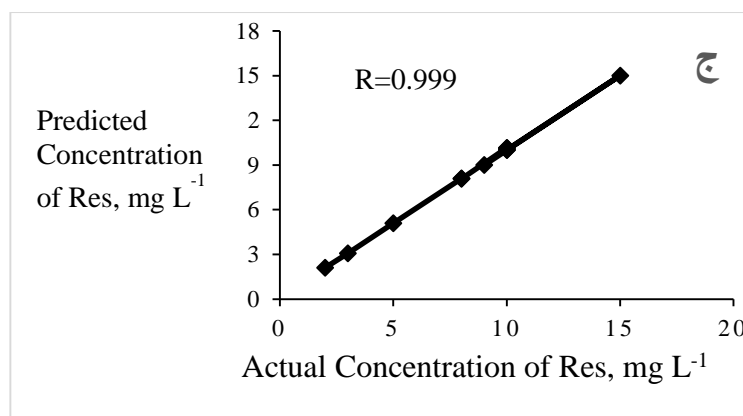
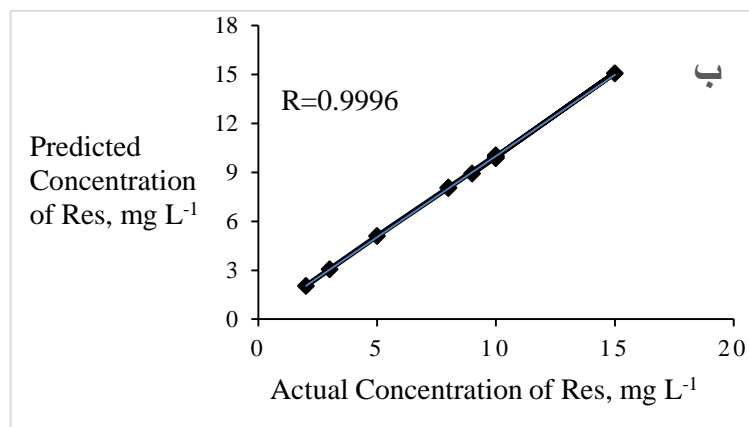
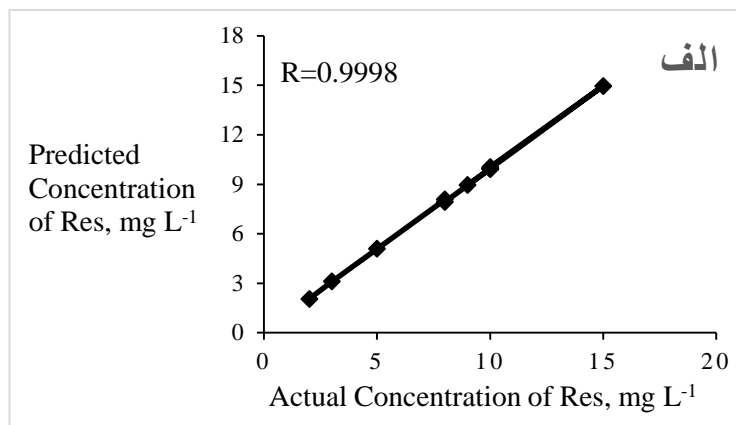
جدول ۲-۴: پارامترهای آماری محاسبه شده برای روش‌های EXRSM، SRSM و PLS

هیدروکینون			پارامتر آماری
PLS	SRSM	EXRSM	
۰/۹۹۹۶	۰/۹۹۹۷	۰/۹۹۹۹	R
۰/۰۴۷	۰/۰۷۳	۰/۰۶۳	MAE
۰/۰۰۳	۰/۰۰۷	۰/۰۰۵	MSE
۱/۱۱۳	۱/۷۷۵	۱/۴۴۸	MRE

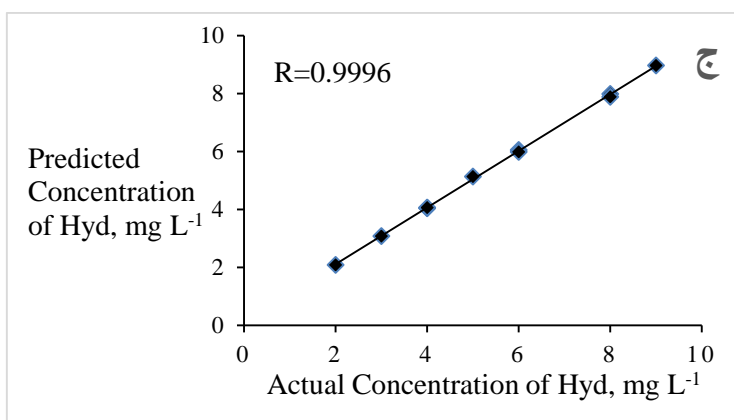
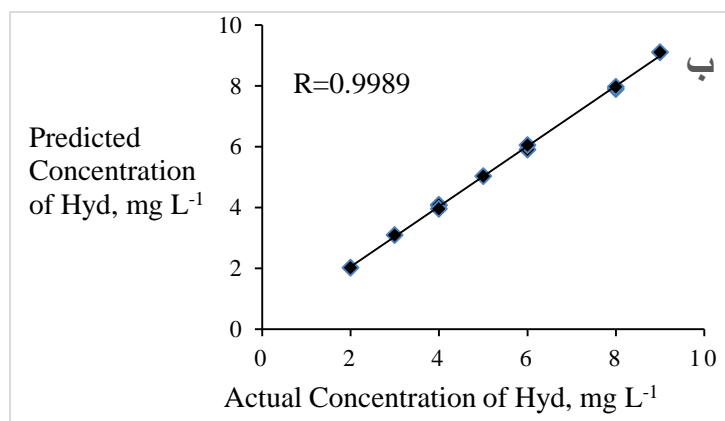
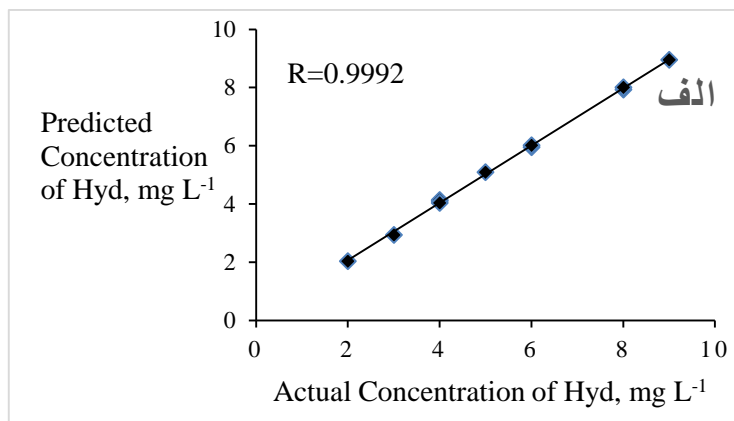
محاسبه پارامترهای آماری (جدول ۲-۴) نشان می‌دهد پیش‌بینی غلظت هیدروکینون با استفاده از روش PLS نسبت به روش‌های SRSM و EXRSM خطای کمتری دارد.

برای ارزیابی و بررسی توانایی روش‌های EXRSM، SRSM و PLS در پیش‌بینی غلظت رزورسینول و هیدروکینون، چهار پارامتر آماری مذکور محاسبه گردید.

برای روش‌های EXRSM، SRSM و PLS نمودار غلظت پیش‌بینی شده بر حسب غلظت واقعی برای رزورسینول و هیدروکینون به ترتیب در شکل ۳-۴ و شکل ۴-۴ آورده شده است. مقادیر محاسبه شده R، MAE، MSE و MRE برای رزورسینول و هیدروکینون به ترتیب در جدول ۳-۴ و جدول ۴-۴ نشان داده شده است.



شکل ۳-۴: نمایش میزان همبستگی غلظت‌های پیش‌بینی شده و غلظت‌های واقعی رزورسینول در مخلوط‌های سری تست، الف: در روش EXRSM، ب: در روش SRS و ج: در مخلوط‌های سری ارزیابی در روش PLS



شکل ۴-۴: نمایش میزان همبستگی غلظت‌های پیش‌بینی شده و غلظت‌های واقعی هیدروکینون در مخلوط‌های سری تست، الف: در روش EXRSM، ب: در روش SRSM و ج: در مخلوط‌های سری ارزیابی در روش PLS

ضریب همبستگی مشاهده شده بین مقادیر پیش‌بینی شده و مقادیر واقعی (برای رزورسینول در شکل

۳-۴ و برای هیدروکینون در شکل ۴-۴)، نشان‌دهنده میزان نزدیکی غلظت پیش‌بینی شده توسط روش‌ها

نسبت به مقدار واقعی آن است.

جدول ۳-۴: پارامترهای آماری محاسبه شده برای روش‌های EXRSM، SRSM و PLS

رزورسینول			پارامتر آماری
PLS	SRSM	EXRSM	
۰/۹۹۹	۰/۹۹۹۶	۰/۹۹۹۸	R
۰/۰۶۶۴	۰/۰۷۱۸	۰/۰۵۹۱	MAE
۰/۰۰۶۹	۰/۰۰۵۷	۰/۰۰۴۳	MSE
۱/۴۱۴	۱/۱۵۸	۱/۰۶۲	MRE

مطابق جدول ۳-۴، روش EXRSM نسبت به روش‌های PLS و SRSM نتایج بهتری برای پیش‌بینی

غلظت رزورسینول در مخلوط دوتایی حاوی رزورسینول و هیدروکینون ارائه می‌دهد.

جدول ۴-۴: پارامترهای آماری محاسبه شده برای روش‌های EXRSM، SRSM و PLS

هیدروکینون			پارامتر آماری
PLS	SRSM	EXRSM	
۰/۹۹۹۶	۰/۹۹۸۹	۰/۹۹۹۲	R
۰/۰۶۰۹	۰/۰۶۹۱	۰/۰۵۹۱	MAE
۰/۰۰۵۲	۰/۰۰۵۷	۰/۰۰۴۵	MSE
۱/۵۰۴	۱/۴۳۰	۱/۲۲۸	MRE

با توجه به نتایج جدول ۴-۴، می‌توان با استفاده از روش EXRSM غلظت هیدروکینون را با خطای

کمتری نسبت به روش‌های PLS و SRSM پیش‌بینی کرد.

نمودار باقیمانده‌ها معیاری برای شایستگی مدل به دست آمده، می‌باشد و اگر باقیمانده‌ها به طور

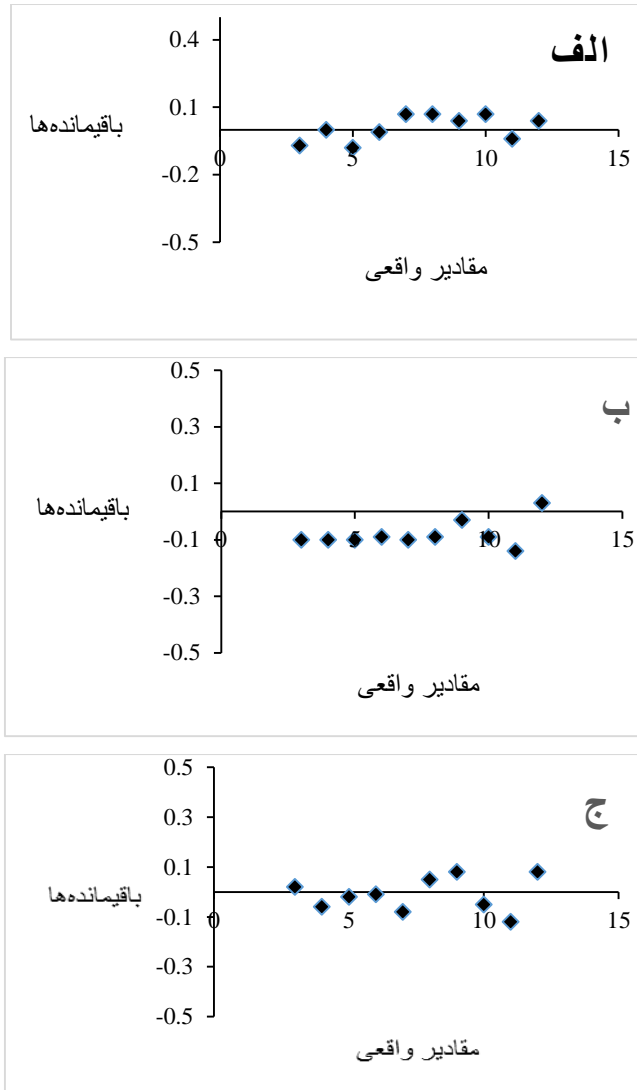
یکنواخت حول محور افقی پراکنده باشند، نشان می‌دهد که مدل مناسبی به دست آمده و هیچ خطای

سیستماتیکی وجود ندارد. شکل ۴-۵ نمودار باقیمانده‌ها را بر حسب مقدار واقعی کتکول و شکل ۴-۶ نمودار

باقیمانده‌ها را بر حسب مقدار واقعی هیدروکینون نشان می‌دهد (باقیمانده از تفاضل مقدار واقعی از مقدار

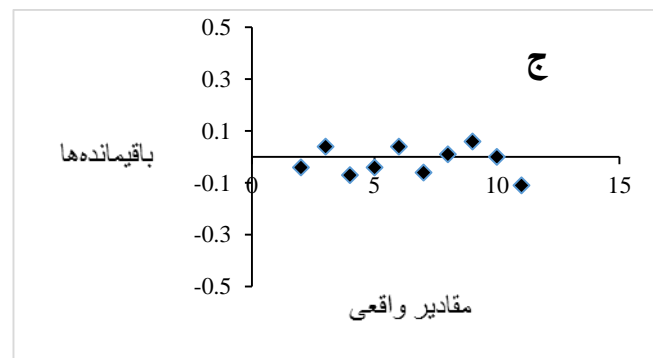
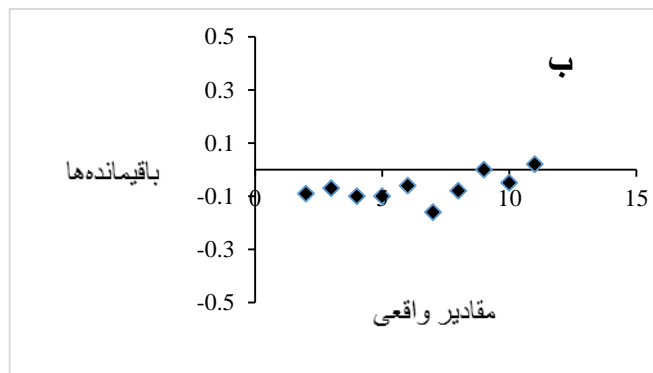
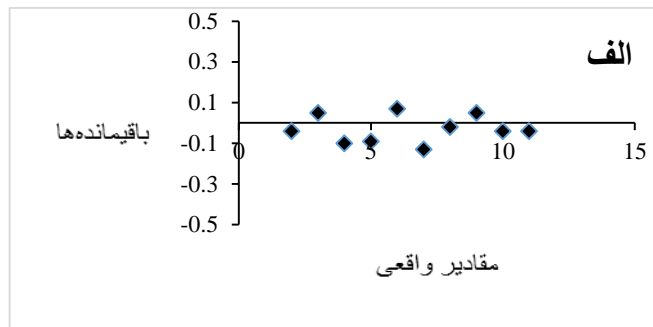
محاسبه شده توسط روش‌ها به دست می‌آید). تقارن پراکندگی نقاط در دو طرف محور افقی عدم وجود خطای

سیسماتیک را نشان می‌دهد.



شکل ۴-۵: نمودار باقیمانده‌ها بر حسب مقدار واقعی کنترول برای مخلوط‌های سری تست، الف: در روش EXRSM و ب: در

روش SRSR و ج: در مخلوط‌های سری ارزیابی در روش PLS



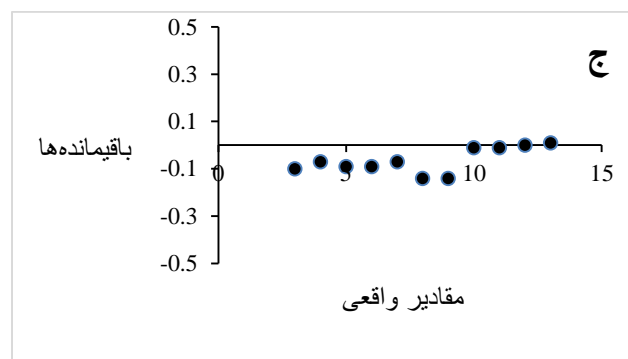
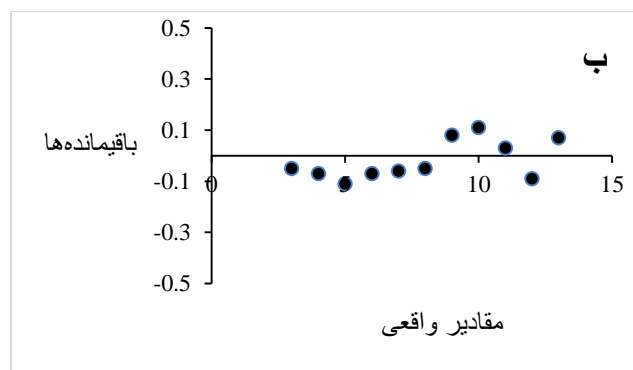
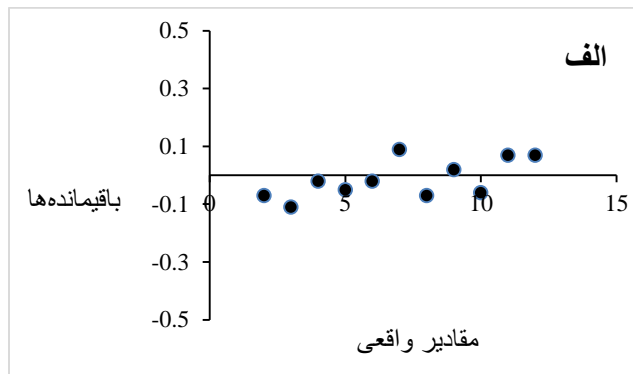
شکل ۴-۶: نمودار باقیمانده‌ها بر حسب مقدار واقعی هیدروکینون برای مخلوط‌های سری تست، الف: در روش EXRSM و ب:

در روش SRSM و ج: در مخلوط‌های سری ارزیابی در روش PLS

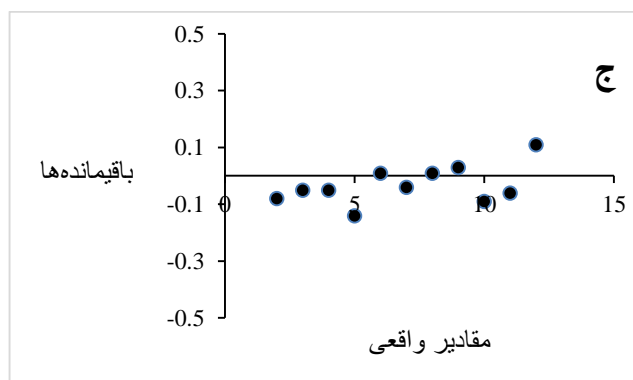
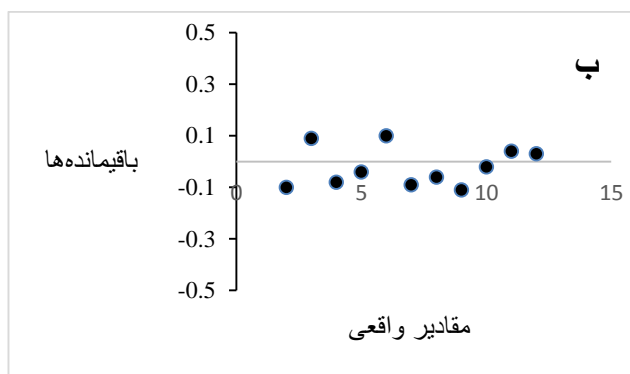
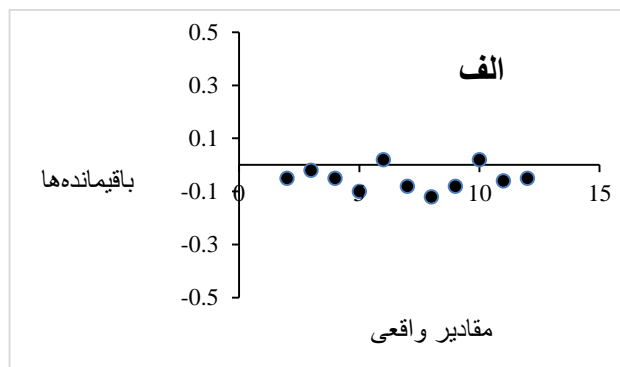
شکل ۴-۷: نمودار باقیمانده‌ها را بر حسب مقدار واقعی رزورسینول و شکل ۴-۸: نمودار باقیمانده‌ها

را بر حسب مقدار واقعی هیدروکینون نشان می‌دهد (باقیمانده از تفاضل مقدار واقعی از مقدار محاسبه

شده توسط روش‌ها به دست می‌آید). تقارن پراکندگی نقاط در دو طرف محور افقی عدم وجود خطای سیستماتیک را نشان می‌دهد.



شکل ۴-۷: نمودار باقیمانده‌ها بر حسب مقدار واقعی رزورسینول برای مخلوط‌های سری تست، الف: در روش EXRSM و ب: در روش SRSM و ج: در مخلوط‌های سری ارزیابی در روش PLS



شکل ۴-۸: نمودار باقیمانده‌ها بر حسب مقدار واقعی هیدروکینون برای مخلوط‌های سری تست، الف: در روش EXRSM و ب:

در روش SRSR و ج: در مخلوط‌های سری ارزیابی در روش PLS

۴-۱-۴- گزینش پذیری روش

اثر مزاحمت گونه‌های مزاحم در اندازه‌گیری محلول ۲/۰۰ میلی گرم بر لیتر کتکول و محلول ۲/۰۰ میلی گرم بر لیتر هیدروکینون در روش‌های EXRSM و SRSM در جدول ۳-۲۱ نشان می‌دهد که اکثر کاتیون‌ها و آنیون‌ها در این روش‌ها مزاحمتی ندارند و روش‌های پیشنهادی از گزینش پذیری خوبی برخوردار هستند.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری محلول ۲/۰۰ میلی گرم بر لیتر رزورسینول و محلول ۲/۰۰ میلی گرم بر لیتر هیدروکینون در حضور گونه‌های مزاحم، با استفاده از روش‌های EXRSM و SRSM در جدول ۳-۴۶ آورده شده است. این نتایج نشان می‌دهد، روش‌های پیشنهادی از گزینش پذیری خوبی برخوردار هستند.

۴-۱-۵- کاربرد روش

کارایی این روش‌ها در اندازه‌گیری همزمان کتکول و هیدروکینون و اندازه‌گیری همزمان رزورسینول و هیدروکینون با تجزیه نمونه‌های حقیقی مانند آب مورد بررسی قرار گرفت. مقادیر درصد بازیابی و انحراف استاندارد برای روش EXRSM، SRSM و PLS به ترتیب در جدول ۳-۲۴، جدول ۳-۲۵ و جدول ۳-۳۰ برای مخلوط دوتایی کتکول و هیدروکینون و در جدول ۳-۴۹، جدول ۳-۵۰ و جدول ۳-۵۴ برای مخلوط دوتایی رزورسینول و هیدروکینون نشان دهنده دقت و صحت بالای این روش‌ها در اندازه‌گیری همزمان کتکول و هیدروکینون و اندازه‌گیری همزمان رزورسینول و هیدروکینون در نمونه‌هایی با بافت نسبتاً پیچیده است. آزمون F هم نشان داد که دقت روش PLS با روش‌های اسپکتروفتومتری جدید (EXRSM و SRSM) تفاوت معناداری با هم ندارند. مقادیر درصد بازیابی صحت خوب روش‌های جدید را نشان می‌دهند. بنابراین می‌توان این روش‌ها را در اندازه‌گیری همزمان کتکول و هیدروکینون یا رزورسینول و هیدروکینون در مخلوط‌های دوتایی آن‌ها در نمونه‌های حقیقی 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 کتکول و هیدروکینون یا

رزورسینول و هیدروکینون در مخلوط‌های دوتایی آن‌ها استفاده شد. روش‌های پیشنهادی ساده، دقیق و صحیح اند و نیازی به مراحل اولیه جداسازی و دستگاه‌های پیچیده و برنامه‌های کامپیوتری ویژه ندارند، بنابراین در آزمایشگاه‌های کنترل کیفی با دقت و صحت قابل مقایسه با سایر روش‌های اسپکتروفتومتری گزارش شده، برای اندازه‌گیری همزمان مخلوط‌های دوتایی مذکور قابل کاربرد هستند.

روش‌های پیشنهادی در مقایسه با روش منبع [۲۹] از دامنه بازیابی بهتری برخوردار است. علاوه بر این روش SRSM در مقایسه با روش منبع [۲۹] حد تشخیص بهتری برای کتکول دارد. روش‌های پیشنهادی در مقایسه با روش منبع [۲۳] دامنه خطی و حد تشخیص بهتری برای کتکول و هیدروکینون دارد. روش‌های پیشنهادی نسبت به روش منبع [۲۳] دامنه خطی، گزینش‌پذیری و حد تشخیص بهتری دارند.

۴-۱-۷- آینده‌نگری

با استفاده از سایر روش‌های اسپکتروفتومتری جدید مانند روش اسپکتروفتومتری اختلاف نسبی^۱ و روش فاکتور جذب^۲ می‌توان غلظت کتکول، هیدروکینون و رزورسینول را در مخلوط‌های دوتایی از هر کدام، به‌دست آورد [۳۴].

با استفاده از روش‌های EXRSM و SRSM می‌توان اجزای مخلوط‌های دو جزئی و چند جزئی را اندازه‌گیری کرد.

^۱ Ratio difference spectrophotometric method

^۲ Absorption factor method

References

- [1]: D. W. Dockery, C. A. Pope, X. Xu, J. D. Spengler, J. H. Ware, M. E. Fay and F. E. Speizer, (1993). "An association between air pollution and mortality in six US cities", *New England journal of medicine*, Vol. 329(24), pp. 1753-1759.
- [2]: M. Hasani, M. Mohammadi, M. Shariati-Rad and H. Abdollahi, (2012) "H-point curve isolation method for determination of catechol in complex unknown mixtures", *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, Vol. 96, pp. 563-568.
- [3]: Y. J. Yang and L. Weikun, (2015). "Simultaneous Determination of Catechol, Hydroquinone, and Resorcinol on CTAB Functionalized Graphene Oxide/Multiwalled Carbon Nanotube Modified Electrode". *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures*, Vol. 23(5), pp. 410-417.
- [4]: Y. H. Huang, J. H. Chen, X. Sun, Z. B. Su, H. T. Xing, S. R. Hu and Y. San He, (2015). "One-pot hydrothermal synthesis carbon nanocages-reduced graphene oxide composites for simultaneous electrochemical detection of catechol and hydroquinone". *Sensors and Actuators B: Chemical*, Vol. 212, pp. 165-173.
- [5]: F. J. Enguita and A. L. Leitão, (2013). "Hydroquinone: environmental pollution, toxicity, and microbial answers". *BioMed research international*, Vol. 2013, pp. 1-14.
- [6]: F. C. Vicentini, L. L. Garcia, L. C. Figueiredo-Filho, B. C. Janegitz and O. Fatibello-Filho, (2016). "A biosensor based on gold nanoparticles, dihexadecylphosphate, and tyrosinase for the determination of catechol in natural water". *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 84, pp. 17-23.
- [7]: S. Eroglu, S. Z. Bas, M. Ozmen and S. Yildiz, (2015). "A new electrochemical sensor based on Fe₃O₄ functionalized graphene oxide-gold nanoparticle composite film for simultaneous determination of catechol and hydroquinone". *Electrochimica Acta*, Vol. 186, pp. 302-313.
- [8]: X. Jian, X. Liu, H. Yang, M. Guo, X. Song, H. Dai and Z. Liang., (2015). "A new electrochemical sensor based on Fe₃O₄ functionalized graphene oxide-gold nanoparticle composite film for simultaneous determination of catechol and hydroquinone". *Electrochimica Acta*, vol. 186, pp. 302-313.
- [9]: H. Zhang, X. Bo and L. Guo, (2015). "Electrochemical preparation of porous graphene and its electrochemical application in the simultaneous determination of hydroquinone, catechol, and resorcinol." *Sensors and Actuators B: Chemical*, Vol. 220, pp. 919-926.
- [10]: U. Hossain, T. Rahman and M Q. Ehsan, (2015). "Simultaneous Detection and Estimation of Catechol, Hydroquinone, and Resorcinol in Binary and Ternary Mixtures Using Electrochemical Techniques". *International Journal of Analytical Chemistry*, Vol. 2015, pp.8.
- [11]: R. Madhu, S. Palanisamy, S. M. Chen and S. Piraman, (2014). "A low temperature synthesis of activated carbon from the bio waste for simultaneous electrochemical determination of hydroquinone and catechol". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, Vol. 727, pp.84-90.
- [12]: P. S. Ganesh and B. K. Swamy, (2015). "Simultaneous electroanalysis of hydroquinone and catechol at poly (brilliant blue) modified carbon paste electrode: A voltammetric study". *Journal of*

Electroanalytical Chemistry, Vol. 756, pp. 193-200.

[13]: L. Tang, Y. Zhou, G. Zeng, Z. Li, Y. Liu, Y. Zhang and M. Wu, (2013). "A tyrosinase biosensor based on ordered mesoporous carbon–Au/l-lysine/Au nanoparticles for simultaneous determination of hydroquinone and catechol". *Analyst*, Vol. 138(12), pp. 3552-3560.

[14]: L. Ma and G. C. Zhao, (2012). "Simultaneous determination of hydroquinone, catechol and resorcinol at graphene doped carbon ionic liquid electrode". *International Journal of Electrochemistry*, Vol. 2012, pp. 1-8.

[15]: L. A. Alshahrani, X. Li, H. Luo, L. Yang, M. Wang, S. Yan and Q. Li, (2014). "The Simultaneous Electrochemical Detection of Catechol and Hydroquinone with [Cu (Sal-β-Ala)(3, 5-DMPz) 2]/SWCNTs/GCE". *Sensors*, Vol. 14(12), pp. 22274-22284.

[16]: H. Zhang, Y. Huang, S. Hu, Q. Huang, C. Wei, W. Zhang and A. Hao, (2015). "Self-assembly of graphitic carbon nitride nanosheets–carbon nanotube composite for electrochemical simultaneous determination of catechol and hydroquinone". *Electrochimica Acta*, Vol. 176, pp. 28-35.

[17]: J. Zhou, X. Li, L. Yang, S. Yan, M. Wang, D. Cheng and C. Zhang, (2015). "The Cu-MOF-199/single-walled carbon nanotubes modified electrode for simultaneous determination of hydroquinone and catechol with extended linear ranges and lower detection limits". *Analytica chimica acta*, Vol. 899, pp. 57-65.

[18]: X. Xia and H. Sun, (2013). "Development of synchronous fluorescence methodology for highly sensitive and simultaneous determination of three dihydroxybenzene isomers using curve fitting". *Analytical Methods*, Vol. 5(21), pp. 6135-6140.

[19]: H. Cui, C. He and G. Zhao, (1999). "Determination of polyphenols by high-performance liquid chromatography with inhibited chemiluminescence detection". *Journal of chromatography A*, Vol. 855(1), pp. 171-179.

[20]: N. A. Penner and P. N. Nesterenko, (2000). "Simultaneous determination of dihydroxybenzenes, aminophenols and phenylenediamines in hair dyes by high-performance liquid chromatography on hypercross-linked polystyrene". *Analyst*, Vol. 125(7), pp. 1249-1254.

[21]: L. Zhao, B. Lv, H. Yuan, Z. Zhou and D. Xiao, (2007). "A Sensitive Chemiluminescence Method for Determination of Hydroquinone and Catechol". *Sensors*, Vol. 7(4), pp. 578–588.

[22]: M. F. Pistonesi, M. S. Di Nezio, M. E. Centurión, A. G. Lista, W. D. Fragoso, M. J. Pontes and B. S. F. Band, (2010). "Simultaneous determination of hydroquinone, resorcinol, phenol, m-cresol and p-cresol in untreated air samples using spectrofluorimetry and a custom multiple linear regression-successive projection algorithm". *Talanta*, Vol. 83(2), pp. 320-323.

[23]: Y. J. Yang and L. Weikun, (2015). "Simultaneous Determination of Catechol, Hydroquinone, and Resorcinol on CTAB Functionalized Graphene Oxide/Multiwalled Carbon Nanotube Modified Electrode". *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures*, Vol. 23(5), pp. 410-417.

[24]: M. U. Hossain, M. T. Rahman and M. Q. Ehsan, (2015). "Simultaneous Detection and Estimation of Catechol, Hydroquinone, and Resorcinol in Binary and Ternary Mixtures Using Electrochemical Techniques". *International journal of analytical chemistry*, Vol. 2015, pp. 8.

[۲۵]: داگلاس ای. اسکوگ، اف جیمز هالر، تی مو تی ای. نیمن، (1386)، "اصول تجزیه دستگاهی". جلد اول، عبد الرضا سلاجقه، چاپ پنجم، مرکز نشر دانشگاهی، تهران، ۱۹۰.

[26]: 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*, Vol. 113, pp.107-114.

[27]: H. A. Darwish, F. H. Metwally and A. El 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*, Vol. 14(1), pp.133-140.

[28]: E. S. Elzanfaly, S. A. Hassan, M. Y. Salem and 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*, Vol. 151, pp. 945-955.

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

[30]: S. A. Hassan, E. S. Elzanfaly, 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*, Vol. 153, pp. 132-142.

[۳۱]: کلوانی نیتلی، س، (1386)، پایان نامه ارشد، اندازه گیری همزمان مس (II) و نیکل (II) به روش اسپکتروفتومتری با استفاده از کالیبراسیون چند متغیره PLS و اندازه گیری مقادیر کم مس (II) به روش اسپکترومتری جذب اتمی، دانشکده شیمی، دانشگاه صنعتی شاهرود.

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

[33]: 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*, Vol. 91(2), pp. 299-310.

[34]: H. M. Lotfy and M. A. M. Hagazy, (2012). "Comparative study of novel spectrophotometric methods manipulating ratio spectra: an application on pharmaceutical ternary mixture of omeprazole, tinidazole and clarithromycin". *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, Vol. 96, pp. 259-270.

[35]: H. M. Lotfy, M. A. Hegazy, M. R. Rezk and 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*, Vol. 126, pp. 197-207.

[36]: A. M. Mohsen, H. M. Lotfy, A. M. Badawey, H. Salem and S. Z. Elkhateeb, (2013). "application of three novel Spectrophotometric methods manipulating ratio spectra for resolving a pharmaceutical mixture of Chlorpheniramine hydrochloride and caffeine". *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. Vol. 5, pp. 478-487.

[37]: K. M. Kelani, A. A. Shalaby, M. Y. Elmaamly and M. K. Halim, (2014). "Spectrophotometric and Chemometric Methods for Simultaneous Determination of Two Anti-Hypertensive Drugs in their Combined Dosage Form". *Pharm Anal Acta*, Vol. 6(321), pp. 2.

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

[39]: hand book

[40]: Skoog D A., Holler F J., Crouch S R., (1985). "Principles of instrumental analysis". Sander College, New York.

[41]: A. Niazi, (2006). "Simultaneous spectrophotometric determination of FeII and FeIII in pharmaceuticals by partial least squares with chromogenic mixed reagents". *Croatica chemica acta*, Vol. 79(4), pp. 573-579.

Simultaneous determination of Catechol and Hydroquinone and that of Resorcinol and Hydroquinone in their binary mixtures by novel spectrophotometric methods.

Abstract

In the first section of this thesis two novel methods of spectrophotometry were presented for simultaneous determination of Catechol (Cat) and hydroquinone (Hyd). In the second section, same methods were considered for simultaneous determination of Resorcinol (Res) and hydroquinone (Hyd). Novel methods of spectrophotometry extended ratio subtraction (EXRSM), simultaneous ratio subtraction (SRSM) are compared with partial least square (PLS). All effective factors on sensitivity of methods were considered and optimised. In the first section of this thesis, in all three methods linear range of (Cat) and (Hyd) obtained and respectively are: (1-15) and (1-12) mg L⁻¹. In the second section, for all three methods linear range of (Res) and (Hyd) obtained and respectively are: (1-15) and (1-12) mg L⁻¹. In the first section, in all three methods (EXRSM, SRSM, PLS) detection limit of (Cat) obtained and respectively are 0.169, 0.074 and 0.216 mg L⁻¹ and detection limit of (Hyd) obtained and respectively are 0.132, 0.132, 0.243 mg L⁻¹. In the second section, in all three methods (EXRSM, SRSM, PLS) detection limit of (Res) obtained and respectively are 0.168, 0.101 and 0.108 mg L⁻¹ and detection limit of (Hyd) obtained and respectively are 0.132, 0.132, 0.139 mg L⁻¹. Influence of different interferences on selectivity of methods are considered. All proposed methods have admissible precision and accuracy for determination of Cat and Hyd and that of Res and Hyd in their binary mixtures exist in tap water.

keywords: catechol, Resorcinol, hydroquinone, extended ratio subtraction, simultaneous ratio subtraction, partial least square



Shahrood University of Technology

Faculty of Chemistry

**Simultaneous determination of Catechol and
Hydroquinone and that of Resorcinol and Hydroquinone in
their binary mixtures by novel spectrophotometric methods.**

Fateme Salehi Mobarakeh

Supervisors:

Dr. Gh. Bagherian dehaghi

Dr. M. Arab Chamjangali

Date: March – 2016