

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشکده شیمی

پایان نامه کارشناسی ارشد شیمی تجزیه

کاربرد روش‌های اسپکتروفتومتری جدید در تعیین همزمان ایزومرهای

نیتروآنیلین در مخلوط‌های دوتایی

سید علی صبوری

استاد راهنما:

دکتر قدمعلی باقریان‌دهقی

استاد مشاور

دکتر فاطمه مصدرالامور

شهریور ۱۳۹۶

تقدیم به همسر:

**که سایه مهربانیش سایه سار
زندگیم می باشد، او که اسوه صبر
و تحمل بوده و مشکلاتت مسیر را
برایم تسهیل نمود**

تشکر و قدردانی

اکنون که به یاری خداوند متعال این دوره از تحصیلاتم را به پایان رسانده‌ام، بر خود واجب می‌دانم، همراهی‌ها و فداکاری‌های همسر عزیزم را که در این مدت همواره یار و یاور بنده بوده است، ارج نهاده و مراتب قدردانی و تشکر قلبی خویش را از الطاف و مهربانی‌های ایشان 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 حق تعالی خواستارم.

تعهد نامه

- اینجانب سید علی صبوری دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته شیمی تجزیه دانشکده شیمی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه تعیین همزمان ایزومرهای نیتروآنیلین در مخلوط‌های دوتایی ، 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.

چکیده

در بخش اول این پایان نامه سه روش اسپکتروفتومتری جدید، ساده، دقیق و صحیح شامل روش تفاضل نسبی توسعه یافته (EXRSM)، روش مرکز ثابت ترکیب شده با تفریق طیف (CC-SS) و روش افزایش استاندارد نقطه اچ نسبی (RHPSAM) برای تعیین همزمان متا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین ارائه شده است. در بخش دوم، همان روش‌ها برای اندازه‌گیری همزمان پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین مورد بررسی قرار گرفت. فاکتورهای موثر بر حساسیت روش‌ها مورد بررسی و بهینه‌سازی قرار گرفتند. در بخش اول، برای روش‌های EXRSM و CC-SS، دامنه خطی متا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین به ترتیب $(40/00 - 5/00)$ و $(25/00 - 5/00)$ میلی‌گرم بر لیتر و برای روش RHPSAM، دامنه خطی متا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین به ترتیب $(30/00 - 5/00)$ و $(25/00 - 5/00)$ میلی‌گرم بر لیتر به دست آمد. در بخش دوم نیز برای هر سه روش، دامنه خطی پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین به ترتیب $(10/00 - 0/50)$ و $(20/00 - 2/00)$ میلی‌گرم بر لیتر به دست آمد. در بخش اول، در روش‌های EXRSM، CC-SS و RHPSAM حد تشخیص برای متا-نیتروآنیلین به ترتیب $0/32$ ، $0/03$ و $0/48$ میلی‌گرم بر لیتر و برای اورتو-نیتروآنیلین به ترتیب $0/09$ ، $0/09$ و $0/1$ میلی‌گرم بر لیتر به دست آمد. در بخش دوم در روش‌های EXRSM، CC-SS و RHPSAM حد تشخیص برای پارا-نیتروآنیلین به ترتیب $0/16$ ، $0/23$ و $0/06$ میلی‌گرم بر لیتر و برای اورتو-نیتروآنیلین به ترتیب $0/12$ ، $0/09$ و $0/08$ میلی‌گرم بر لیتر به دست آمد. اثر مزاحمت گونه‌های مختلف بر گزینش پذیری روش‌ها بررسی شد. روش‌های پیشنهادی برای اندازه‌گیری همزمان متا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین و برای اندازه‌گیری همزمان پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین در نمونه آب شهر با دقت و صحت رضایت‌بخشی به کار برده شد.

لغات کلیدی: متا-نیتروآنیلین، پارا-نیتروآنیلین، اورتو-نیتروآنیلین، روش توسعه یافته تفاضل نسبی (EXRSM)، روش مرکز ثابت ترکیب شده با تفریق طیف (CC-SS)، روش افزایش استاندارد نقطه اچ نسبی (RHPSAM)

فهرست مطالب:

۱ - مقدمه	۱
۱-۱- مقدمه	۲
۱-۲- پارا نیتروآنیلین	۳
۱-۳- متا- نیتروآنیلین	۴
۱-۴- اورتو- نیتروآنیلین	۵
۱-۵- مروری بر کارهای انجام شده در تعیین همزمان ایزومرهای نیتروآنیلین به صورت مخلوط‌های دوتایی و سه‌تایی	۵
۲- تئوری	۹
۲-۱- مقدمه ای بر اسپکتروفتومتری	۱۰
۲-۲-۱- کالیبراسیون	۱۱
۲-۱-۱- کالیبراسیون یک متغیره	۱۱
۳- تجربی	۲۳
۳-۱- اندازه‌گیری همزمان ایزومرهای اورتو-نیتروآنیلین و متا نیتروآنیلین با استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری جدید	۲۴
۳-۲- 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 بهینه‌سازی متغیرهای موثر بر حساسیت روش‌های اندازه‌گیری متا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین..... ۲۷
- ۳-۵-۱- بررسی اثر pH..... ۲۷
- ۳-۵-۲- بررسی نوع بافر..... ۲۹
- ۳-۵-۳- بررسی حجم بافر..... ۳۰
- ۳-۵-۴- بررسی اثر قدرت یونی..... ۳۱
- ۳-۶- شرایط بهینه..... ۳۲
- ۳-۷- تعیین دامنه خطی متا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین به صورت جداگانه..... ۳۳
- ۳-۸- محلول سازی سری ارزیابی و سری تست..... ۳۵
- ۳-۹- کاربرد روش تفاضل نسبی توسعه یافته (EXRSM) برای تعیین همزمان غلظت اورتو-نیتروآنیلین و متا-نیتروآنیلین..... ۳۷
- ۳-۱۰- کاربرد روش افزایش استاندارد نقطه اچ نسبی (RHPSAM) برای تعیین غلظت متا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین..... ۴۷
- ۳-۱۱- کاربرد روش مرکز ثابت ترکیب شده با تفریق طیف (CC-SS) برای تعیین غلظت متا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین..... ۵۵
- ۳-۱۱-۱- بررسی اثر مزاحمت‌ها در روش‌های اسپکتروفتومتری جدید (EXRS ، RHPSAM)..... ۶۲
- ۳-۱۱-۲- حد تشخیص روش EXRSM ، RHPSAM و CC-SS..... ۶۴
- ۳-۱۱-۳- دقت و صحت روش EXRSM ، RHPSAM و CC-SS..... ۶۵
- ۳-۱۱-۴- کاربرد روش‌های EXRSM ، RHPSAM و CC-SS در آنالیز نمونه‌های حقیقی..... ۶۶
- ۳-۱۲- اندازه‌گیری همزمان پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین با استفاده از روش‌های

- اسپکتروفتومتری جدید..... ۶۸
- ۱۳-۳- محلولهای مورد استفاده و طرز تهیه آنها..... ۶۸
- ۱۴-۳- طیف جذبی..... ۶۸
- ۱۵-۳- بررسی و بهینه‌سازی متغیرهای موثر بر حساسیت روش‌های اندازه‌گیری پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین..... ۷۰
- ۱۵-۳-۱- بررسی اثر pH..... ۷۱
- ۱۵-۳-۲- بررسی نوع بافر با $pH=7/0$ ۷۲
- ۱۵-۳-۳- بررسی حجم بافر..... ۷۳
- ۱۵-۳-۴- بررسی اثر قدرت یونی..... ۷۵
- ۱۶-۳- شرایط بهینه..... ۷۶
- ۱۶-۳-۲- محلول‌سازی و کالیبراسیون یک متغیره..... ۷۹
- ۱۷-۳- کاربرد روش تفاضل نسبی توسعه یافته (EXRSM) برای تعیین غلظت پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین..... ۸۰
- ۱۸-۳- کاربرد روش افزایش استاندارد نقطه اچ نسبی (RHPSAM) برای تعیین غلظت ایزومرهای پارا-نیتروآنیلین و اورتو نیتروآنیلین..... ۸۸
- ۱۹-۳- کاربرد روش مرکز ثابت ترکیب شده با تفریق طیف (CC-SS) برای تعیین غلظت پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین..... ۹۴
- ۱۹-۳-۱- بررسی اثر مزاحمت‌ها در روش‌های اسپکتروفتومتری جدید (EXRSM ، RHPSAM)..... ۱۰۰
- ۱۹-۳-۲- حد تشخیص روش‌های EXRSM ، CC-SS و RHPSAM..... ۱۰۱
- ۱۹-۳-۳- دقت و صحت روش‌های EXRSM ، CC-SS و RHPSAM..... ۱۰۲

۳-۱۹-۴- کاربرد روش‌های EXRSM، CC-SS و RHPSAM در آنالیز نمونه‌های حقیقی.. ۱۰۳

۴- بحث و نتیجه گیری ۱۰۷

۴-۱- اندازه‌گیری همزمان متا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین و اندازه‌گیری همزمان پارا-

نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین در مخلوط دوتایی از هر کدام با استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری ۱۰۸

۴-۱-۱- بررسی و بهینه‌سازی پارامترهای تجربی..... ۱۰۸

۴-۱-۲- ارقام شایستگی روشها..... ۱۰۹

۴-۱-۳- ارزیابی آماری..... ۱۰۹

۴-۱-۴- گزینش پذیری روش..... ۱۱۶

۴-۱-۵- کاربرد روش..... ۱۱۷

۴-۱-۶- مقایسه روش‌های پیشنهادی با برخی از روش‌های موجود..... ۱۱۷

۴-۱-۷- آینده‌نگری..... ۱۱۸

فهرست جداول:

جدول ۳-۱: مواد شیمیایی مورد استفاده..... ۲۴

جدول ۳-۲: نتایج حاصل از بررسی اثر pH..... ۲۸

جدول ۳-۳: نتایج حاصل از بررسی نوع بافر..... ۳۰

جدول ۳-۴: نتایج حاصل از بررسی حجم بافر فسفاتی.....	۳۱
جدول ۳-۵: نتایج حاصل از بررسی اثر قدرت یونی.....	۳۲
جدول ۳-۶: نتایج حاصل برای رسم منحنی کالیبراسیون متا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین به صورت مجزا.....	۳۳
جدول ۳-۷: نتایج حاصل از کالیبراسیون تک متغیره.....	۳۵
جدول ۳-۸: ترکیب غلظتی محلول‌های سری ارزیابی.....	۳۶
جدول ۳-۹: ترکیب غلظتی محلول‌های سری تست.....	۳۷
جدول ۳-۱۰: نتایج حاصل از بهینه‌سازی غلظت اورتو-نیتروآنیلین به‌عنوان مقسوم علیه برای سری ارزیابی.....	۴۰
جدول ۳-۱۱: نتایج حاصل از بهینه‌سازی غلظت متا-نیتروآنیلین به‌عنوان مقسوم علیه.....	۴۶
جدول ۳-۱۲: نتایج حاصل از به کارگیری روش EXRSM، برای پیش‌بینی غلظت اجزا در سری تست.....	۴۷
جدول ۳-۱۳: نتایج داده‌های آماری کمی برای دو جفت طول موج انتخابی.....	۴۹
جدول ۳-۱۴: نتایج حاصل از مقسوم علیه‌های مختلف.....	۴۹
جدول ۳-۱۵: نتایج حاصل از به کارگیری روش RHPSAM برای پیش‌بینی غلظت اجزای در سری ارزیابی به همراه معادلات.....	۵۳
جدول ۳-۱۶: نتایج حاصل از به کارگیری روش RHPSAM، برای پیش‌بینی غلظت اجزا در سری تست.....	۵۵
جدول ۳-۱۷: نتایج حاصل از اندازه‌گیری دامنه‌ها در طیف‌های نسبی شکل ۳-۲۳ در روش CC-SS.....	۵۷
جدول ۳-۱۸: نتایج حاصل از روش CC-SS برای مخلوط‌های شکل ۳-۲۱.....	۵۹
جدول ۳-۱۹: نتایج حاصل از به کارگیری روش CC-SS با جفت طول موج‌های مختلف.....	۶۰
جدول ۳-۲۰: نتایج حاصل از بهینه‌سازی مقسوم علیه برای به‌دست آوردن غلظت متا-نیتروآنیلین.....	۶۰
جدول ۳-۲۱: نتایج حاصل از به کارگیری روش CC-SS برای پیش‌بینی غلظت اجزا در سری ارزیابی.....	۶۰

۶۱
۶۲	جدول ۳-۲۲: نتایج حاصل از به کارگیری روش CC-SS برای پیش‌بینی غلظت اجزا در سری تست.
۶۳	جدول ۳-۲۳: نتایج حاصل از بررسی اثر گونه‌های مزاحم در اندازه‌گیری همزمان متا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین با غلظت‌های یکسان و برابر ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در روش EXRSM ، RHPSAM و CC-SS
۶۴
۶۵	جدول ۳-۲۴: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روشها.....
۶۷	جدول ۳-۲۵: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روشها در نمونه آب شهر و آب معدنی.....
۷۲	جدول ۳-۲۶: نتایج حاصل از بررسی اثر pH.....
۷۳	جدول ۳-۲۷: نتایج حاصل از بررسی نوع بافر.....
۷۴	جدول ۳-۲۸: نتایج حاصل از بررسی حجم بافر فسفاتی.....
۷۵	جدول ۳-۲۹: نتایج حاصل از بررسی اثر قدرت یونی.....
۷۷	جدول ۳-۳۰: نتایج حاصل برای رسم منحنی کالیبراسیون پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین به صورت مجزا.....
۷۸	جدول ۳-۳۱: نتایج حاصل از کالیبراسیون تک متغیره.....
۷۹	جدول ۳-۳۲: ترکیب غلظتی محلول‌های سری ارزیابی.....
۸۰	جدول ۳-۳۳: ترکیب غلظتی محلول‌های سری تست.....
۸۳	جدول ۳-۳۴: نتایج حاصل از بهینه‌سازی غلظت اورتو-نیتروآنیلین به‌عنوان مقسوم علیه برای سری ارزیابی.....
۸۷	جدول ۳-۳۵: نتایج حاصل از بهینه‌سازی غلظت پارا-نیتروآنیلین به‌عنوان مقسوم علیه در تعیین غلظت اورتو-نیتروآنیلین.....
۸۷	جدول ۳-۳۶: نتایج حاصل از به کارگیری روش EXRSM، برای پیش‌بینی غلظت اجزا در سری تست.....
۸۹	جدول ۳-۳۷: نتایج داده‌های آماری کمی برای دو جفت طول موج انتخابی.....

- جدول ۳-۳۸: نتایج حاصل از مقسوم علیه های مختلف..... ۹۰
- جدول ۳-۳۹: جدول سری ارزیابی برای روش RHPSAM..... ۹۳
- جدول ۳-۴۰: جدول نتایج حاصل از به کارگیری روش RHPSAM برای پیش بینی غلظت اجزا در
سری تست..... ۹۳
- جدول ۳-۴۱: مقادیر ثابت و پیش فرض برای مخلوطهای حاوی ۵۰/۵۰، ۱/۰۰، ۲/۰۰ و ۵/۰۰ میلی گرم
بر لیتر پارا-نیتروآنیلین با ۱۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین..... ۹۶
- جدول ۳-۴۲: نتایج حاصل از به کارگیری روش CC-SS با جفت طول موجهای مختلف..... ۹۷
- جدول ۳-۴۳: نتایج حاصل از بهینه کردن مقسوم علیه های مختلف برای بهدست آوردن غلظت پارا-
نیتروآنیلین..... ۹۸
- جدول ۳-۴۴: نتایج حاصل از به کارگیری روش CC-SS برای پیش بینی غلظت اجزا برای سری
ارزیابی..... ۹۹
- جدول ۳-۴۵: نتایج حاصل از به کارگیری روش CC-SS برای پیش بینی غلظت دو گونه در سری تست
..... ۹۹
- جدول ۳-۴۶: نتایج حاصل از بررسی اثر گونه های مزاحم در اندازه گیری همزمان پارا-نیتروآنیلین و
اورتو-نیتروآنیلین با غلظت های یکسان و برابر ۲/۰۰ میلی گرم بر لیتر در روش EXRSM، CC-SS و
RHPSAM..... ۱۰۱
- جدول ۳-۴۷: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش EXRSM و CC-SS..... ۱۰۲
- جدول ۳-۴۸: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش RHPSAM..... ۱۰۳
- جدول ۳-۴۹: نتایج حاصل از اندازه گیری پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین در نمونه های آب شهر با
استفاده از روش EXRSM..... ۱۰۴
- جدول ۳-۵۰: نتایج حاصل از اندازه گیری پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین در نمونه های آب شهر با
استفاده از روش CC-SS..... ۱۰۵
- جدول ۳-۵۱: نتایج حاصل از اندازه گیری پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین در نمونه های آب شهر با

- استفاده از روش RHPSAM ۱۰۵
- جدول ۱-۴: پارامترهای آماری محاسبه شده برای روش‌های EXRSM، RHPSAM و CC-SS ۱۱۳
- جدول ۲-۴: پارامترهای آماری محاسبه شده برای روش‌های EXRSM، CC-SS و RHPSAM ۱۱۳
- جدول ۳-۴: پارامترهای آماری محاسبه شده برای روش‌های EXRSM، CC-SS و RHPSAM ۱۱۶
- جدول ۴-۴: پارامترهای آماری محاسبه شده برای روش‌های EXRSM، CC-SS و RHPSAM ۱۱۶

فهرست اشکال:

- شکل ۱-۳: طیف جذبی ۱۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر متا نیتروآنیلین (— — —)، طیف جذبی ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین (· — · — · — ·) و طیف جذبی مخلوط ۱۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از متا نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین با غلظت ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از هر یک در pH=۷/۰ (—) ۲۶
- شکل ۲-۳: بررسی اثر pH، شرایط: ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفاتی و غلظت ۱۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نسبت به متا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین ۲۹
- شکل ۳-۳: بررسی اثر حجم بافر فسفاتی با pH= ۷/۰ در حضور غلظت ۱۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین (طول موج ۳۵۶ نانومتر) و یا اورتو-نیتروآنیلین (طول موج ۴۱۱ نانومتر) ۳۱
- شکل ۴-۳: بررسی اثر قدرت یونی. شرایط: محلول‌های ۱۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین (طول موج ۳۵۶ نانومتر) و یا اورتو-نیتروآنیلین (طول موج ۴۱۱ نانومتر)، در حضور ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفاتی با pH= ۷/۰ ۳۲
- شکل ۵-۳: الف: منحنی کالیبراسیون اورتو-نیتروآنیلین، ب: منحنی کالیبراسیون متا-نیتروآنیلین ۳۴
- شکل ۶-۳: طیف‌های جذبی مخلوط‌های حاوی ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۱۵/۰۰، ۲۰/۰۰ و ۲۵/۰۰ (میلی‌گرم بر

لیتر) متا-نیتروآنیلین و ۱۵/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) اورتو-نیتروآنیلین در شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفاتی با pH= ۷/۰..... ۳۸

شکل ۷-۳: طیف‌های جذبی حاصل از تقسیم طیف مخلوط‌های حاوی ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۱۵/۰۰، ۲۰/۰۰ و ۲۵/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) متا-نیتروآنیلین و ۱۵/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) اورتو-نیتروآنیلین بر طیف ۳۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین..... ۳۸

شکل ۸-۳: طیف‌های جذبی حاصل از تقسیم طیف مخلوط‌های حاوی ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۱۵/۰۰، ۲۰/۰۰ و ۲۵/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) متا-نیتروآنیلین و ۱۵/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) اورتو-نیتروآنیلین بر طیف ۳۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین (مقسوم علیه) بعد از کم کردن مقدار ثابت..... ۳۹

شکل ۹-۳: طیف جذبی مرتبه صفر ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۱۵/۰۰، ۲۰/۰۰ و ۲۵/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) متا-نیتروآنیلین، بعد از کم کردن مقدار ثابت و ضرب در طیف محلول ۳۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین..... ۴۰

شکل ۱۰-۳: طیف نسبی حاصل از تقسیم طیف‌های ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۱۵/۰۰، ۲۰/۰۰ و ۲۵/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) متا-نیتروآنیلین (شکل ۹-۳) بر ۳۰/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) متا-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه..... ۴۳

شکل ۱۱-۳: طیف‌های نسبی حاصل از تقسیم طیف مخلوط‌های حاوی ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۱۵/۰۰، ۲۰/۰۰ و ۲۵/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) متا-نیتروآنیلین و ۱۵/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) اورتو-نیتروآنیلین (A_{mix}) بر طیف ۳۰/۰ (میلی گرم بر لیتر) متا-نیتروآنیلین ($A'_{x(Met)}$)..... ۴۴

شکل ۱۲-۳: طیف‌های جذبی نسبی حاصل از تقسیم طیف مخلوط‌های حاوی ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۱۵/۰۰، ۲۰/۰۰ و ۲۵/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) متا-نیتروآنیلین و ۱۵/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) اورتو-نیتروآنیلین بر طیف ۳۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین (مقسوم علیه)، بعد از کم کردن مقدار ثابت..... ۴۴

شکل ۱۳-۳: طیف جذبی مرتبه صفر ۱۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین بعد از ضرب طیف‌های متناظر آن از شکل ۱۲-۳ در طیف محلول ۳۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین..... ۴۵

شکل ۱۴-۳: طیف‌های مخلوط حاوی غلظت‌های ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰ و ۳۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر متا-

نیتروآنیلین با ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین..... ۴۸

شکل ۳-۱۵: طیف خالص ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین (طیف آبی رنگ) و پارا-نیتروآنیلین (طیف نارنجی رنگ)..... ۴۸

شکل ۳-۱۶: طیف نسبی حاصل از مخلوطهای شکل ۳-۱۴ بر مقسوم علیه بهینه شده از اورتو-نیتروآنیلین..... ۵۱

شکل ۳-۱۷: نمودار کالیبراسیون به همراه معادله برای مخلوط ۵ میلی گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین به همراه ۵ میلی گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین..... ۵۱

شکل ۳-۱۸: نمودار روش افزایش استاندارد نقطه‌ی H نسبی برای محلولهای خالص ۵، ۱۰، ۱۵ میلی گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین..... ۵۲

شکل ۳-۱۹: نمودار روش افزایش استاندارد نقطه‌ی H نسبی برای محلولهای خالص ۵، ۱۰، ۲۰ میلی گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین..... ۵۲

شکل ۳-۲۰: نمودار کالیبراسیون روش افزایش استاندارد نقطه‌ی H نسبی برای مخلوطهای مختلف حاوی ۵ میلی گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین با غلظتهای ۵، ۱۰، ۱۵ میلی گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین..... ۵۳

شکل ۳-۲۱: طیفهای جذبی مخلوطهای حاوی ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۱۵/۰۰، ۲۰/۰۰ و ۲۵/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) متا-نیتروآنیلین و ۱۵/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) اورتو-نیتروآنیلین در شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفاتی با ۷/۰ pH..... ۵۶

شکل ۳-۲۲: معادله‌ی خط بین اختلاف دامنه‌های نسبی (P₄₂₁-P_{382.2}) بر حسب دامنه‌ی نسبی در طول موج ۳۸۲/۲..... ۵۷

شکل ۳-۲۳: طیفهای نسبی حاصل از تقسیم طیف مخلوطهای حاوی ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۱۵/۰۰، ۲۰/۰۰ و ۲۵/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) متا-نیتروآنیلین و ۱۵/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) اورتو-نیتروآنیلین بر طیف ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین (مقسوم علیه)..... ۵۸

شکل ۳-۲۴: طیف جذبی مرتبه صفر ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۱۵/۰۰، ۲۰/۰۰ و ۲۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین بعد از ضرب مقدار ثابت در طیف محلول ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین..... ۵۹

شکل ۳-۲۵: طیفهای خالص اورتو-نیتروآنیلین ۱۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر حاصل از روش CC-SS... ۶۱

شکل ۳-۲۶: طیف جذبی ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین (— — —)، طیف جذبی ۱۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین (— — — — —) و طیف جذبی مخلوط ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر از پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین با غلظت ۱۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر از هر یک در pH=۷/۰ (—)..... ۶۹

شکل ۳-۲۷: بررسی اثر pH شرایط: ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفاتی و غلظت ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر..... ۷۲

شکل ۳-۲۸: بررسی اثر حجم بافر فسفاتی با pH= ۷/۰ در حضور غلظت ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر..... ۷۴

شکل ۳-۲۹: بررسی اثر قدرت یونی. شرایط: محلولهای ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین (۳۸۱ نانومتر) و ۱۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین (۴۱۱ نانومتر)، در حضور ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفاتی با pH= ۷/۰..... ۷۶

شکل ۳-۳۰: الف: منحنی کالیبراسیون اورتو-نیتروآنیلین، ب: منحنی کالیبراسیون پارا-نیتروآنیلین..... ۷۸

شکل ۳-۳۱: طیفهای جذبی مخلوطهای حاوی ۰/۵۰، ۱/۰۰، ۲/۰۰، ۵/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) پارا-نیتروآنیلین و ۱۵/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) اورتو-نیتروآنیلین در شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفاتی با pH= ۷/۰..... ۸۱

شکل ۳-۳۲: طیفهای جذبی حاصل از تقسیم طیف مخلوطهای حاوی ۰/۵۰، ۱/۰۰، ۲/۰۰، ۵/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) پارا-نیتروآنیلین و ۱۵/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) اورتو-نیتروآنیلین بر طیف ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین..... ۸۲

شکل ۳-۳۳: طیفهای جذبی حاصل از تقسیم طیف مخلوطهای حاوی ۰/۵۰، ۱/۰۰، ۲/۰۰، ۵/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) پارا-نیتروآنیلین و ۱۵/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) اورتو-نیتروآنیلین بر طیف ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین (مقسوم علیه) بعد از کم کردن مقدار ثابت..... ۸۲

شکل ۳-۳۴: طیف جذبی مرتبه صفر غلظتهای ۰/۵۰، ۱/۰۰، ۲/۰۰، ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین، بعد از کم کردن..... ۸۳

شکل ۳-۳۵: طیف نسبی حاصل از تقسیم طیفهای مرتبه صفر به دست آمده ۰/۵۰، ۱/۰۰، ۲/۰۰ و ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین (شکل ۳-۳۴) بر ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین به عنوان

مقسوم علیه..... ۸۴

شکل ۳-۳۶: طیف‌های نسبی حاصل از تقسیم طیف مخلوط‌های حاوی ۵/۰۰، ۱/۰۰، ۲/۰۰ و ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین (مقسوم علیه)..... ۸۵

شکل ۳-۳۷: طیف‌های جذبی حاصل از تقسیم طیف مخلوط‌های حاوی ۵/۰۰، ۱/۰۰، ۲/۰۰ و ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین و ۱۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین بر طیف ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین (مقسوم علیه)، بعد از کم کردن مقدار ثابت..... ۸۵

شکل ۳-۳۸: طیف‌های جذبی مرتبه صفر ۱۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین حاصل از ضرب طیف‌های شکل (۳-۳۴) در طیف محلول ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین..... ۸۶

شکل ۳-۳۹: طیف خالص ۱/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین (طیف آبی رنگ) و طیف خالص ۲/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین (طیف نارنجی رنگ)..... ۸۸

شکل ۳-۴۰: طیف نسبی حاصل از تقسیم مخلوط‌های شامل ۵/۰۰، ۱/۰۰ و ۲/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین به همراه ۲/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین بر طیف نرمال شده ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین..... ۸۹

شکل ۳-۴۱: نمودار کالیبراسیون به همراه معادله برای مخلوط ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین به همراه ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین..... ۹۱

شکل ۳-۴۲: نمودار روش افزایش استاندارد نقطه‌ی H نسبی برای محلول‌های خالص ۱/۰۰ و ۲/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین..... ۹۱

شکل ۳-۴۳: نمودار روش افزایش استاندارد نقطه‌ی H نسبی برای محلول‌های خالص ۵، ۱۰، ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین..... ۹۲

شکل ۳-۴۴: طیف‌های جذبی مخلوط‌های حاوی ۵/۰۰، ۲/۰۰، ۱/۰۰، ۰/۵۰ (میلی‌گرم بر لیتر) پارا-نیتروآنیلین و ۱۵/۰۰ (میلی‌گرم بر لیتر) اورتو-نیتروآنیلین در شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات‌ی با pH= ۷/۰..... ۹۴

شکل ۳-۴۵: طیف‌های نسبی حاصل از تقسیم طیف مخلوط‌های حاوی ۰/۵۰ ، ۱/۰۰ ، ۲/۰۰ ، ۵/۰۰ (میلی‌گرم بر لیتر) پارا-نیتروآنیلین و ۱۵/۰۰ (میلی‌گرم بر لیتر) اورتو-نیتروآنیلین بر طیف ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین (مقسوم علیه)..... ۹۵

شکل ۳-۴۶: معادله‌ی خط بین تفاوت دامنه‌های نسبی (P₄₂₁-P_{382.2}) و دامنه‌ی نسبی در طول موج ۳۸۲/۲..... ۹۵

شکل ۳-۴۷: طیف‌ی جذبی مرتبه صفر به دست آمده ۰/۵۰ ، ۱/۰۰ ، ۲/۰۰ ، ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین بعد از ضرب مقدار ثابت در طیف محلول ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین..... ۹۷

شکل ۴-۱: نمایش میزان همبستگی غلظت‌های پیش‌بینی شده و غلظت‌های واقعی متا-نیتروآنیلین در مخلوط‌های سری تست، الف: در روش EXRSM، ب: در روش RHPSAM و ج: در روش CC-SS..... ۱۱۱

شکل ۴-۲: نمایش میزان همبستگی غلظت‌های پیش‌بینی شده و غلظت‌های واقعی اورتو-نیتروآنیلین در مخلوط‌های سری تست، الف: در روش EXRSM، ب: در روش CC-SS و ج: در روش RHPSAM..... ۱۱۲

شکل ۴-۳: نمایش میزان همبستگی غلظت‌های پیش‌بینی شده و غلظت‌های واقعی پارا-نیتروآنیلین در مخلوط‌های سری تست، الف: در روش EXRSM، ب: در روش CC-SS و ج: در روش RHPSAM..... ۱۱۴

شکل ۴-۴: نمایش میزان همبستگی غلظت‌های پیش‌بینی شده و غلظت‌های واقعی اورتو-نیتروآنیلین در مخلوط‌های سری تست، الف: در روش EXRSM، ب: در روش CC-SS و ج: در روش RHPSAM..... ۱۱۵

مقدمه

آنیلین^۱ و مشتقات آن جزء آمین‌های آروماتیک هستند و از جمله ترکیبات آلی می‌باشند که به طور گسترده در صنایع پلیمری، رنگ، لاستیک، آنتی‌اکسیدان‌ها، صنایع دارویی و غیره استفاده می‌شوند. آنیلین و مشتقات آن سرطان‌زا بوده و برای انسان و همچنین آبزیان بسیار سمی است [۲ و ۱]. یکی از مشتقات مهم آنیلین، ترکیب نیتروآنیلین^۲ است. نیتروآنیلین‌ها را می‌توان جزء ترکیبات نیتروآروماتیک^۳ و همچنین آمین‌های آروماتیک^۴ دانست. گروه نیترو دارای خاصیت الکترون گیرندگی و گروه آمین دارای خاصیت الکترون دهنده است که وجود هر دو این گروه‌ها بر روی حلقه‌ی بنزن ویژگی‌های الکترواستاتیکی خاصی به این ایزومرها می‌دهد. نیتروآنیلین‌ها به دلیل خواص گفته شده و همچنین سرطان‌زا بودن و تاثیرات موتاژنیک^۵، در سال‌های اخیر بسیار زیاد مورد توجه دانشمندان محیط زیست قرار گرفته است [۳ و ۴].

نیتروآنیلین‌ها از انواع مهم مواد اولیه شیمیایی به شمار می‌روند. این ایزومرها عمدتاً به عنوان واسطه در سنتز موادرنگی، داروها، آفت‌کش‌ها، علف‌کش‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها و لوازم آرایشی بهداشتی استفاده می‌شوند. سمیت نیتروآنیلین‌ها بسیار بیشتر از آنیلین است، و می‌توانند باعث بیماری‌هایی نظیر آگزمای پوست و غیره شوند. مکانیسم حاد سمیت این ترکیبات به این صورت است که هر دو گروه نیترو و آمینو موجود در حلقه آروماتیک می‌توانند با کاهش و اکسایش به گروه‌های نیتروزو^۶ و هیدروکسیل آمین^۷ تبدیل شوند. این گروه‌ها می‌توانند آهن (II) موجود در هموگلوبین^۸ خون را به

^۱ Aniline

^۲ Nitroaniline

^۳ Nitro-Aromatic

^۴ Aromatic Amines

^۵ Mutagenic

^۶ Nitroso

^۷ Hydroxylamine

^۸ Hemoglobine

آهن(III) اکسید کرده و باعث تبدیل هموگلوبین به متموگلوبین^۱ شوند. متموگلوبین قادر به حمل اکسیژن نبوده و بنابراین باعث ایجاد نارسایی در انتقال اکسیژن مورد نیاز بدن خواهد شد [۶ و ۵].

این ترکیبات می‌توانند به طور مستقیم به عنوان زباله‌های صنعتی یا به طور غیرمستقیم به عنوان محصولات تخریب علف‌کش‌ها، آفت‌کش‌ها و غیره به محیط زیست وارد شوند. پس از وارد شدن به محیط زیست تغییرات زیست محیطی پیچیده‌ای ایجاد کنند، بنابراین به طور بالقوه برای محیط زیست مضر هستند [۷]. آنیلین و مشتقات آن دارای حلالیت قابل توجه در آب هستند و به راحتی می‌توانند به خاک نفوذ کرده و آب‌های زمینی را آلوده کنند، که می‌توانند برای موجودات آبی مضر باشند و آسیب‌های طولانی مدت به محیط زیست وارد کنند. این ترکیبات می‌توانند از طریق پوست، دستگاه تنفسی و دستگاه گوارش وارد بدن انسان شده و موجب بیماری‌هایی نظیر زردی، کم خونی و غیره شوند [۸ و ۹].

به دلیل سمیت، توزیع آن‌ها در محیط زیست و پایداری این ترکیبات (به دلیل وجود یک گروه نیترو در حلقه آروماتیک) اندازه‌گیری این ترکیبات یکی از مطالعات مهم شیمی تجزیه به شمار می‌رود [۱۰]. بنابراین ابتدا مروری بر خواص فیزیکی و شیمیایی ایزومرهای پارا، اورتو و متا نیتروآنیلین و کارهای گزارش شده در زمینه اندازه‌گیری همزمان این ایزومرها خواهیم داشت.

۱-۲- پارا-نیتروآنیلین

پارا-نیتروآنیلین^۲ با نام‌های دیگری نظیر ۱-آمینو-۴-نیتروبنزن^۳، پارا نیتروفنیل آمین^۴ شناخته می‌شود. شکل ظاهری این ترکیب پودر زرد یا قهوه‌ای می‌باشد [۱۱ و ۱۲]. این ترکیب یکی از ساده‌ترین مولکول‌های آلی با خواص نوری قوی است که در حالت پایه دارای دو قطبی لحظه‌ای

^۱ Metmoglobine

^۲ Para-Nitroaniline

^۳ 1-Amino-4-nitrobenzene

^۴ p-Nitrophenylamine

است [۱۳]. پارا-نیتروآنیلین همچنین جزء ترکیبات نیتروآروماتیک سمی طبقه بندی می‌شود. این ایزومر یک ترکیب مهم است که به عنوان واسطه در سنتز مواد زیر کاربرد دارد:

۱-رنگ‌های آزو

۲-آنتی‌اکسیدان‌ها

۳-افزودنی‌های سوخت

۴-بازدارنده‌های خوردگی

۵-مواد ضد عفونی کننده

۶- داروهای پرورش طیور و آفت کش‌ها .

پارا-نیتروآنیلین حتی در مقادیر بسیار کم، بسیار سمی است. حضور پارا-نیتروآنیلین در آب ممکن است اثرات نامطلوب برای حیات آبریان و سلامتی انسان ایجاد کند. وجود یک گروه نیترو بر روی یک حلقه آروماتیک باعث افزایش پایداری ترکیب در برابر تخریب شیمیایی و بیولوژیکی^۱ می‌شود. به همین دلیل در بسیاری از کشورها به عنوان آلاینده در نظر گرفته شده است [۱۵ و ۱۴ و ۱۳]. این ترکیب در صورت تماس با پوست و یا از طریق استنشاق به سرعت جذب می‌شود، همچنین قرار گرفتن طولانی مدت در معرض پارا-نیتروآنیلین باعث آسیب دیدن اندام‌های داخلی می‌شود [۱۶]

۳-۱- متا- نیتروآنیلین

متا-نیتروآنیلین^۲ با نام‌های دیگری نظیر متا-آمینو نیتروبنزن^۳، متا-نیتروفنیل‌آمین^۴ نیز شناخته می‌شود. این ترکیب به شکل جامد زرد رنگ در دسترس است [۱۷]. متا-نیتروآنیلین نیز مانند پارا-نیتروآنیلین از ترکیبات آلی مهم است که به عنوان واسطه در سنتز موادی مانند رنگ‌های آزو و غیره کاربرد دارد [۱۸]. این ترکیب یک جامد پایدار غیر فرار است و در صورت تماس با پوست، یا استنشاق

^۱ Biologically

^۲ Meta-nitroaniline

^۳ Meta-aminonitrobenzene

^۴ Meta-nitrophenyleamine

کردن و بلعیدن ایجاد مسمومیت می‌کند. در صورت تماس طولانی مدت باعث آسیب اندام‌ها شده و برای آیزیان بسیار مضر می‌باشد [۱۷].

۱-۴- اورتو- نیتروآنیلین

اورتو-نیتروآنیلین^۱ یکی دیگر از ایزومرهای نیتروآنیلین است. این ترکیب با نام ۱-آمینو-۲-نیترو بنزن^۲ نیز شناخته می‌شود. دردمای محیط به صورت جامد نارنجی رنگ می‌باشد. این ترکیب از اجزای اصلی تولید دارو می‌باشد. [۱۱]. اورتو نیتروآنیلین مانند آنیلین‌های دیگر سمی و سرطان‌زا بوده و باعث افزایش قابل توجهی در مقدار متموگلوبین در خون می‌شود [۱۷].

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

به صورت مخلوط‌های دوتایی و سه تایی

به دلیل ساختار و خواص مشابه این ایزومرها، و همچنین مطالب گفته شده در قسمت‌های قبل تعیین همزمان این ترکیبات به یک چالش تبدیل شده است. روش‌های متعددی برای اندازه‌گیری این ایزومرها گزارش شده است که به برخی از آن‌ها در ادامه اشاره می‌شود.

در سال ۲۰۰۵ گوا و همکارانش یک روش الکتروفورز منطقه موئین با آشکارساز آمپرسنجی برای اندازه‌گیری ایزومرهای نیتروآنیلین معرفی کردند. اثرات چندین پارامتر نظیر بافر (بافر تارتاریک اسید- سدیم تارتارات با $\text{pH}=1/2$) و پتانسیل تشخیص ($1/10$ ولت) اندازه‌گیری شد. الکتروود کار در این روش الکتروود کربن بود. حد تشخیص برای متا-نیتروآنیلین، پار-نیتروآنیلین و اورتونیتروآنیلین در شرایط بهینه به ترتیب برابر 9×10^{-9} ، 8×10^{-8} و $3/92 \times 10^{-8}$ (مول بر لیتر) به دست آمد. انحراف استاندارد نسبی این روش برای متا-نیتروآنیلین، پار-نیتروآنیلین و اورتونیتروآنیلین به

^۱ Ortho-nitroaniline

^۲ 1-amino-2-Nitrobenzene

ترتیب ۱/۳، ۱/۵ و ۱/۸ گزارش شده است. از این روش برای اندازه‌گیری آب فاضلاب به صورت رضایت بخشی استفاده شد [۹].

در سال ۲۰۰۵ قاسمی^۱ و همکارانش به روش اسپکتروفتومتری با استفاده از مدل تصحیح سیگنال اورتوگونال (OSC)^۲ با روش حداقل مربعات جزئی (PLS)^۳، مخلوطی از ایزومرهای نیتروآنیلین را بطور همزمان تعیین مقدار کردند. ماتریس‌های کالیبراسیون برای متا-نیتروآنیلین، اورتو-نیتروآنیلین و پارا-نیتروآنیلین به ترتیب شامل ۱-۲۱، ۱-۱۵، ۱-۱۸ میکروگرم بر لیتر می‌باشد. میانگین خطای مطلق مربعات^۴ متا-نیتروآنیلین، اورتو-نیتروآنیلین و پارا-نیتروآنیلین با روش OSC آن به ترتیب ۰/۶۵۶۷، ۰/۲۶۹۲، ۰/۳۱۳۴ میلی گرم بر لیتر و بدون روش OSC به ترتیب ۱/۳۸۱۸، ۱/۲۱۸۱ و ۰/۳۹۵۳ میلی گرم بر لیتر گزارش شد. [۱۹].

در سال ۲۰۰۶ نیازی^۵ و همکارانش از روش استخراج نقطه ابری^۶ برای پیش تغلیط ایزومرهای نیتروآنیلین استفاده کرده و سپس این ایزومرها را به وسیله روش‌های اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری کردند. تفکیک مخلوط سه‌تایی ایزومرهای نیتروآنیلین با به‌کاربردن حداقل مربعات ماشین بردار پشتیبان^۷ انجام شد. پارامترهای موثر بر فاز جداسازی و فرایند آشکارسازی، مطالعه و بهینه شد. تحت شرایط بهینه نمودار کالیبراسیون در محدوده ۲۰-۰/۲، ۱۵-۰/۱، ۱۷-۰/۱ میلی گرم بر لیتر خطی بود. حد تشخیص برای اورتو-نیتروآنیلین، متا-نیتروآنیلین و پارا-نیتروآنیلین به ترتیب برابر ۰/۰۸، ۰/۰۵، ۰/۰۶ میلی گرم بر لیتر گزارش شده است. میانگین خطای مطلق مربعات برای ایزومرهای متا-نیتروآنیلین، اورتو-نیتروآنیلین و پارا-نیتروآنیلین به ترتیب ۰/۰۱۴۶، ۰/۰۳۰۸ و ۰/۰۳۰۴ میلی گرم بر لیتر گزارش شده است [۲۰].

^۱ Ghasemi

^۲ Orthogonal signal correction

^۳ Partial least squares

^۴ Root mean square error

^۵ Niazi

^۶ Cloud point extraction

^۷ Least-squares support vector machines

در سال ۲۰۱۲ گودرزی^۱ و همکارانش یک مدل الگوریتم ژنتیک^۲ (GA-PLS) برای اندازه‌گیری ایزومرهای نیتروآنیلین معرفی کردند. جذب مخلوط‌های کالیبراسیون در محدوده ۲۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر برای ۲۱ نمونه گرفته شد. محدوده خطی برای اورتو-نیتروآنیلین، متا-نیتروآنیلین و پارا-نیتروآنیلین به ترتیب ۱-۱۷، ۱-۱۵ و ۱-۱۸ میلی گرم بر لیتر به دست آمد. میانگین خطای مطلق مربعات برای اورتو-نیتروآنیلین، متا-نیتروآنیلین و پارا-نیتروآنیلین به ترتیب ۰/۷۸۴۸، ۰/۲۶۴۸ و ۰/۱۸۵۱ میلی‌گرم بر لیتر گزارش شد. روش مربوطه در نمونه‌های آب به طور موفقیت آمیزی مورد استفاده قرار گرفت [۲۱].

در سال ۲۰۱۴ هویکی^۳ و همکارانش با استفاده از یک روش مبنی بر استخراج نقطه ابری (CPE) که با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا کوپل شده بود، ایزومرهای نیتروآنیلین را اندازه‌گیری کردند. در این روش از یک سورفکتانت^۴ سازگار با محیط زیست استفاده شد. در این مقاله پارامترهایی نظیر غلظت سورفکتانت، غلظت نمک، دمای تعادل و pH نمونه بهینه شد. تحت شرایط بهینه محدوده خطی برای متا-نیتروآنیلین، پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین به ترتیب ۱-۰/۰۶، ۱-۰/۰۳ و ۱-۰/۰۱ میکروگرم بر میلی لیتر و حد تشخیص برای پارا-نیتروآنیلین، متا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین به ترتیب برابر ۰/۰۰۵، ۰/۰۱۵ و ۰/۰۰۲ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش شده است. انحراف استاندارد نسبی^۵ روزانه نیز در این روش کمتر از ۳/۱٪ و ۶/۵٪ است [۵].

^۱ Goodarzi

^۲ Genetic algorithm

^۳ Huiqi

^۴ Surfactant

^۵ Relative standard deviation

تئوری

۱-۲- مقدمه ای بر اسپکتروفتومتری

اندازه گیری های جذبی در ناحیه ماورا بنفش و مرئی کاربرد گسترده ای برای تعیین کمی انواع زیادی از گونه های معدنی و آلی پیدا کرده اند. گستره ی طول موجی این ناحیه ۷۸۰-۱۹۰ نانومتر است. طیف بینی جذب مولکولی بر اساس اندازه گیری عبور (T) یا جذب (A) محلول های موجود در سلول های شفاف استوار است. معمولا غلظت (C) به طور خطی به جذب با معادله ۱-۲ ارتباط داده می شود [۲۲].

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon bc$$

معادله ۱-۲

در معادله ۱-۲، A مقدار جذب در یک طول موج معین، b طول مسیر تابش بر حسب سانتی متر، ϵ ضریب جذب مولی بر حسب $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ، P_0 توان تابش ورودی، P توان تابش خروجی است.

مشکل اصلی در آنالیز چند جزئی اسپکتروفتومتری دو یا چند جزئی، تعیین همزمان دو یا چند جز در یک مخلوط، بدون جداسازی اولیه است [۲۳]. همپوشانی طیفی اجزای یک مخلوط دوتایی مانع از اندازه گیری اجزای مخلوط با استفاده از روش اسپکتروسکوپی مستقیم می شود [۲۴]. به همین دلیل چندین روش اسپکتروفتومتری برای رفع همپوشانی طیفی اجزای یک مخلوط ارائه شده است، که شامل روش های اسپکتروفتومتری یک متغیره و چند متغیره می شوند.

روش های اسپکتروفتومتری یک متغیره شامل تکنیک اسپکتروفتومتری مشتقی^۱ [۲۵]، روش میانگین گیری از مرکز^۲ [۲۶]، روش تفاضل نسبی توسعه یافته (EXRSM)^۳ [۲۷]، روش افزایش استاندارد نقطه اچ^۴ (HPSAM) [۲۸]، روش مدولاسیون دامنه (AM)^۵، روش فاکتور جذب

¹ Derivative spectrophotometry technique

² Mean Centering Method

³ Extended ratio subtraction method

⁴ H-point standard addition method

⁵ Amplitude modulation method

(AFM)^۱[۲۹] ، روش مرکز ثابت ترکیب شده با تفریق طیف(CC-SS)^۲ و غیره است . روش حداقل مربعات جرئی (PLS)^۳ از جمله روش های اسپکتروفتومتری چند متغیره برای اندازه گیری همزمان ترکیباتی است که همپوشانی طیفی دارند.

در این کار هدف، اندازه گیری همزمان ایزومرهای نیتروآنیلین در مخلوط های دوتایی با استفاده از روش های EXRSM، RHPSAM و CC-SS و نیز مطالعه مقایسه ای بین این سه روش است.

۱-۲-۲- کالیبراسیون

کالیبراسیون فرایندی است به صورت یک رابطه ریاضی، که پاسخ (سیگنال) را به خاصیت مورد نظر از آنالیت (که معمولا غلظت است) مربوط می سازد. هر فرایند کالیبراسیون به دو مرحله مجزای کالیبراسیون (مدل سازی)^۴ و پیش بینی^۵ تقسیم می شود. در مرحله کالیبراسیون، در چند غلظت مشخص از محلول های استاندارد آنالیت (متغیر مستقل X)، پاسخ (متغیر وابسته Y) اندازه گیری می شود. سپس مدلی از Y بر حسب X یا مدلی از X بر حسب Y ساخته می شود. در مرحله پیش بینی، مدل ساخته شده مورد ارزیابی قرار می گیرد و در صورت نیاز تغییراتی در آن ایجاد می شود. در مدل انتخابی با اندازه گیری Y برای نمونه مجهول، غلظت آنالیت تعیین می شود.

۲-۱-۱- کالیبراسیون یک متغیره^۶

در کالیبراسیون یک متغیره، فقط یک متغیر وابسته و یک متغیر مستقل وجود دارد. قانون بیر بهترین نمونه از کالیبراسیون یک متغیره است و در اندازه گیری غلظت گونه ها به روش اسپکتروفتومتری جذب مولکولی مورد استفاده قرار می گیرد. در ساده ترین حالت معادله ۲-۲ برقرار است.

^۱ Absorption factor method

^۲ Constant center coupled with spectrum subtractin

^۴ Partial least squares

^۵ Modeling

^۶ Prediction

^۷ Univariate Calibration

معادله ۲-۲

$$y = b_0 + b_1x + e$$

ضرایب b_0 و b_1 از روش رگرسیون حداقل مربعات قابل محاسبه هستند. به مدل فوق مدل کلاسیک گفته می‌شود و خطای کالیبراسیون (e) به خطا در اندازه‌گیری پاسخ نسبت داده می‌شود. در مدل دیگری که به آن مدل معکوس گفته می‌شود، فرض می‌گردد که اندازه‌گیری دستگامی دقیق بوده و خطای کالیبراسیون مربوط به خطا در تهیه محلول‌های استاندارد است و به صورت معادله ۲-۳ نوشته می‌شود.

$$x = b_0 + b_1 y + e$$

معادله ۳-۲

روش‌های یک متغیره برای نمونه‌های بسیار ساده و عاری از هر گونه مزاحمت مورد استفاده قرار می‌گیرد. بنابراین استفاده از کالیبراسیون یک متغیره نیازمند شناخت کافی از سیستم مورد آنالیز و همچنین انتخاب روش‌هایی با گزینش‌پذیری بالا است. کالیبراسیون تک متغیره برای روش‌هایی مانند اسپکتروسکوپی اتمی (روش‌های گزینش‌پذیری)، کروماتوگرافی (روش‌هایی که به راحتی آنالیت را از مزاحمت جدا می‌کنند)، اسپکتروسکوپی مشتقی و روش‌های مختلف الکتروشیمیایی با موفقیت به کار رفته است [۳۰]. در اسپکتروسکوپی، معمولاً از طول موج ماکزیمم آنالیت برای ساخت یک مدل کالیبراسیون تک متغیره استفاده می‌شود. برای ساخت مدل کالیبراسیون از طریق رگرسیون تک متغیره خطی، دو فرض مهم بایستی بررسی شود:

۱- گزینش‌پذیری: 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 [۳۱].

همان‌طور که در بخش ۱-۲ گفته شد، از جمله روش‌های اسپکتروفتومتری یک متغیره می‌توان به

روش‌های AFM، AM، RHPSAM، MCR، EXRSM و CC-SS اشاره کرد، این روش‌ها به دلیل داشتن ویژگی‌هایی مانند دقت، صحت بالا و سادگی، گسترش یافته‌اند. این روش‌ها نیازی به دستگاه پیچیده و برنامه‌های کامپیوتری پیشرفته ندارند. در این پایان نامه برای انجام این روش‌ها از نرم افزارهای Excel(2013) و Matlab(2014) استفاده شده است. در ادامه اساس روش‌های مذکور آورده شده است.

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

اخیرا روش‌های اسپکتروفتومتری جدید و ساده برای تجزیه و تحلیل همزمان مخلوط دوتایی گسترش یافته است. اولین بار بردیسی^۱ و همکارانش در سال ۲۰۰۸ از روش تفاضل نسبی (RSM)^۲ برای اندازه‌گیری همزمان دو جز در یک مخلوط دوتایی استفاده کردند [۳۱]. سپس با استفاده از مبانی این روش (RSM)، در سال ۲۰۱۲ روش EXRSM توسط لطفی^۳ و همکارانش ارائه شد [۳۲].

برای مخلوطی حاوی دو گونه X و Y (معادله ۲-۴ و معادله ۲-۵) که همپوشانی طیفی دارند و طیف مرتبه صفر Y نسبت به طیف مرتبه صفر X گسترده تر است (یعنی در طول موج‌های بلندتری نسبت به گونه‌ی دیگر جذب آن صفر می‌شود)، می‌توان غلظت هر دو گونه را با استفاده از روش EXRSM به‌دست آورد [۳۳].

برای تعیین غلظت جز X به‌صورت زیر عمل می‌شود:

طیف مخلوط حاوی X+Y (معادله ۲-۶) بر طیف مرتبه صفر غلظت معینی از گونه Y به‌عنوان مقسوم علیه (Y') تقسیم می‌شود (معادله ۲-۷). پس از تقسیم طیف مرتبه صفر مخلوط بر طیف مرتبه صفر غلظت معینی از Y (Y')، طیفی که از این مرحله به‌دست می‌آید دارای مقدار ثابتی است

¹ Bardicy

² Ratio Subtraction Method

³ Lotfy

که بیانگر $\frac{C_y}{C'_y}$ است و به صورت یک خط مستقیم به موازات محور طول موج قرار دارد (به عبارت دیگر مقدار ثابت در همان ناحیه‌ای از طول موج دیده می‌شود که طیف گونه Y نسبت به طیف گونه X گسترده‌تر است). سپس با کسر مقدار ثابت از طیف مخلوط یک طیف نسبی به دست می‌آید (معادله ۲-۸).

با ضرب طیف نسبی به دست آمده در طیف Y' (مقسوم علیه)، طیف مرتبه صفر گونه X به دست می‌آید (معادله ۲-۹). غلظت گونه X با اندازه‌گیری جذب در طول موج ماکزیمم طیف‌های خالص مرتبه صفر به دست آمده و قرار دادن، آن‌ها در معادله رگرسیون حاصل از منحنی کالیبراسیون گونه X تعیین می‌شود.

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

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

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

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

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.

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

$$\frac{A_{Mix}}{\varepsilon_y C'_y} - \text{constant} = \frac{\varepsilon_x C_x}{\varepsilon_y C'_y} \quad \text{معادله ۸-۲}$$

$$\left\{ \left(\frac{A_{Mix}}{\varepsilon_y C'_y} - \text{Constant} \right) \times \varepsilon_y C'_y \right\}_\lambda = \varepsilon_{x,\lambda} C_x \quad \text{معادله ۹-۲}$$

برای تعیین غلظت گونه Y، به ترتیب زیر عمل می‌شود. از طیف مرتبه صفر غلظت معینی از X به عنوان مقسوم علیه (X')، استفاده می‌شود. از تقسیم طیف مرتبه صفر گونه X به دست آمده از مرحله

قبل (معادله ۹-۲)، بر طیف مقسوم علیه (X')، مقدار ثابت $\frac{C_x}{C'_x}$ به دست می‌آید.

سپس طیف مخلوط حاوی X+Y بر طیف همان مقسوم علیه (X') تقسیم می‌شود. عبارت

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')، طیف مرتبه صفر گونه Y به دست

می‌آید (معادله ۱۲-۲). به طور خلاصه می‌توان نوشت:

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

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

$$\left\{ \left(\frac{A_{Mix}}{\varepsilon_x C'_x} - \text{Constant} \right) \times \varepsilon_x C'_x \right\}_\lambda = \varepsilon_{y,\lambda} C_y \quad \text{معادله ۱۲-۲}$$

با استفاده از معادله رگرسیون، که از رسم مقدار جذب گونه Y در طول موج ماکزیمم مربوط به

آن بر حسب غلظت آن، غلظت گونه Y به دست می‌آید [۳۴].

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

با استفاده از مبانی روش نقطه H، این روش در سال ۲۰۱۳ توسط یحیی گزارش شد [۳۵]. برای اندازه‌گیری دو ترکیب X و Y، ابتدا طیف مخلوط (X+Y) را به طیف نرمال شده‌ی از گونه‌ی Y (Y') تقسیم می‌کنیم. بزرگی پیک در دو طول موج انتخاب شده نسبت به غلظت اضافه شده از گونه X رسم می‌شود. حاصل دو خط مستقیم می‌باشد که دارای یک نقطه مشترک با مختصات (C_X-C_Y) هستند. C_Y و C_X به ترتیب برابر غلظت‌های ناشناخته از ترکیبات X و Y می‌باشند.

یک نمونه‌ی ناشناخته که حاوی دو ترکیب بالا است را در نظر بگیرید. برای تعیین مقدار همزمان هر دو ترکیب به وسیله این روش (RHPSAM)، باید مقدار معلومی از گونه‌ی X به مخلوط مورد نظر اضافه شود و طیف هر مخلوط به دست آید. سپس طیف هر مخلوط به طیف نرمال شده گونه Y (ε_y) تقسیم شود. باید توجه کرد که انتخاب مقسوم‌علیه مناسب یک مرحله‌ی بحرانی و حساس در این روش است [۳۵]. با تقسیم طیف مخلوط بر مقسوم‌علیه یک مقدار ثابت ایجاد می‌شود که در سراسر طیف نسبی به دست آمده وجود دارد. بنابراین هر دو طول موجی می‌تواند برای ایجاد منحنی کالیبراسیون در این روش استفاده شود. بزرگی پیک در دو طول موج انتخابی (λ₁ و λ₂) نسبت به غلظت اضافه شده از گونه‌ی X رسم می‌شود. روابط مربوطه در معادلات ۲-۱۳ و ۲-۱۴ آورده شده است.

$$P_1 = \left(\frac{A_{Mix}}{\varepsilon_y}\right) \lambda_1 + \left(\frac{\varepsilon_x}{\varepsilon_y}\right) \lambda_1 C_X$$

$$P_1 = \left(\frac{A_{Mix}}{\varepsilon_y}\right) \lambda_1 + M_1 C_X \quad \text{معادله ۲-۱۳}$$

$$P_2 = \left(\frac{A_{Mix}}{\varepsilon_y}\right)_{\lambda_2} + \left(\frac{\varepsilon_x}{\varepsilon_y}\right)_{\lambda_2} C_X$$

$$P_1 = \left(\frac{A_{Mix}}{\varepsilon_y}\right)_{\lambda_2} + M_2 C_X \quad \text{معادله ۱۴-۲}$$

در معادلات قبل P_1 و P_2 به ترتیب بزرگی طیف دامنه نسبی در طول موج های اول و دوم می باشند. M_1 و M_2 شیب نمودار کالیبراسیون روش افزایش استاندارد به دست آمده از روش در طول موج های اول و دوم هستند.

دو خط مستقیم به دست آمده از رسم بزرگی دامنه نسبی در دو طول موج نسبت به غلظت اضافه شده از گونه X در نقطه ای که اصطلاحاً آن را نقطه RH می نامند به هم برخورد می کنند. این نقطه دارای مختصات (P_{RH} و $-C_{RH}$) است. در این نقطه چون $P_1 = P_2 = P_{RH}$ است، با مساوی قرار دادن سمت راست معادلات (۲-۱۳) و (۲-۱۴) می توان معادله (۲-۱۵) را نوشت و سپس از آن معادله (۲-۱۶) را به دست آورد.

$$\left(\frac{A_{Mix}}{\varepsilon_y}\right)_{\lambda_1} + M_1(C_X) = \left(\frac{A_{Mix}}{\varepsilon_y}\right)_{\lambda_2} + M_2(C_X) \quad \text{معادله ۱۵-۲}$$

$$M_1(C_X) - M_2(C_X) = \left(\frac{A_{Mix}}{\varepsilon_y}\right)_{\lambda_2} - \left(\frac{A_{Mix}}{\varepsilon_y}\right)_{\lambda_1}$$

$$C_X(M_1 - M_2) = \left(\frac{A_{Mix}}{\varepsilon_y}\right)_{\lambda_2} - \left(\frac{A_{Mix}}{\varepsilon_y}\right)_{\lambda_1}$$

$$C_X = -C_{RH} = \left(\frac{A_{Mix}}{\varepsilon_y}\right)_{\lambda_2} - \left(\frac{A_{Mix}}{\varepsilon_y}\right)_{\lambda_1} / (M_1 - M_2) \quad \text{معادله ۱۶-۲}$$

باتوجه به معادله ۱۷-۲ می توان معادله ۱۶-۲ را به صورت معادله ۱۸-۲ نوشت.

$$\left(\frac{A_{mix}}{\varepsilon_y}\right) = \frac{A_{x,mix}}{\varepsilon_y} + \frac{A_{y,mix}}{\varepsilon_y} = \frac{A_{x,mix}}{\varepsilon_y} + C_{y,mix} \quad \text{معادله ۱۷-۲}$$

$$C_X = \left(\frac{A_{x,mix}}{\varepsilon_y} + C_{y,mix}\right)_{\lambda_2} - \left(\frac{A_{x,mix}}{\varepsilon_y} + C_{y,mix}\right)_{\lambda_1} / (M_1 - M_2)$$

$$C_X = \left(\frac{A_{x,mix}}{\varepsilon_y}\right)_{\lambda_2} - \left(\frac{A_{x,mix}}{\varepsilon_y}\right)_{\lambda_1} / (M_1 - M_2) \quad \text{معادله ۱۸-۲}$$

معادلات (۱۳-۲) و (۱۴-۲) را به ترتیب می‌توان به صورت معادلات (۱۹-۲) و (۲۰-۲) نوشت. سپس با مساوی قرار دادن سمت راست دو معادله اخیر $P_1=P_2=P_{RH}$ معادله ۲۱-۲ را به دست آورد.

$$C_X = [P_1 - \left(\frac{A_{x,mix}}{\varepsilon_y} + C_y\right)_{\lambda_1}] / M_1 \quad \text{معادله ۱۹-۲}$$

$$C_X = \left[P_2 - \left(\frac{A_{x,mix}}{\varepsilon_y} + C_y\right)_{\lambda_2} \right] / M_2 \quad \text{معادله ۲۰-۲}$$

$$P_{RH} = C_y + \left[M_1 \left(\frac{A_{x,mix}}{\varepsilon_y}\right)_{\lambda_2} - M_2 \left(\frac{A_{x,mix}}{\varepsilon_y}\right)_{\lambda_1} \right] / (M_1 - M_2) \quad \text{معادله ۲۱-۲}$$

با توجه با اینکه در نقطه RH ، $P_1=P_2=P_{RH}$ و مقدار C_y در دو طول موج انتخاب شده باهم

برابر است، می‌توان نوشت که $\left(\frac{A_x}{\varepsilon_y}\right)_{\lambda_1} / M_1 = \left(\frac{A_x}{\varepsilon_y}\right)_{\lambda_2} / M_2$ ، یا به عبارت دیگر می‌توان نوشت:

$$\left(\frac{A_{x,mix}}{\varepsilon_y}\right)_{\lambda_1} M_2 = \left(\frac{A_{x,mix}}{\varepsilon_y}\right)_{\lambda_2} M_1 \quad \text{معادله ۲۲-۲}$$

با قرار دادن معادله (۲۲-۲) در معادله (۲۱-۲) خواهیم داشت:

$$P_{RH} = C_Y \quad \text{معادله ۲۳-۲}$$

بنابراین می‌توان معادلات ۱۶-۲ و ۲۱-۲ را به صورت زیر نوشت:

$$C_X = B - A/(M_1 - M_2) \quad \text{معادله ۲۴-۲}$$

$$C_Y = (M_1 B - M_2 A)/(M_1 - M_2) \quad \text{معادله ۲۵-۲}$$

که در معادلات (۲۴-۲) و (۲۵-۲)، A و B عرض از مبدأ دو خط کالیبراسیون در طول موج‌های λ_1 و λ_2 می‌باشند [۳۵]. در معادلات ۱۳-۲ تا ۲۵-۲ منظور از M_1 و M_2 شیب منحنی‌های کالیبراسیون به ترتیب در دو طول موج λ_1 و λ_2 می‌باشند.

۲-۱-۱-۳- روش مرکز ثابت ترکیب شده با تفریق طیف (CC-SS)

این روش از دو مرحله مکمل تشکیل شده‌است، مرحله اول محاسبه مقدار ثابت با استفاده از روش اختلاف دامنه و مرحله دوم ضرب کردن مقدار ثابت می‌باشد.

برای استفاده از روش CC-SS باید مخلوطی از دو گونه (X و Y) که با یکدیگر همپوشانی طیفی دارند، داشته باشیم. مرحله اول شامل محاسبه ثابت به وسیله‌ی روش اختلاف دامنه است. برای اندازه‌گیری گونه Y به این صورت عمل می‌شود که:

ابتدا باید مقدار p پیش بینی شده ($P_{\text{postulated}}$) را به دست آوریم. به این منظور طیف های استاندارد خالص گونه X با غلظت های متفاوت، بر طیف غلظت مشخصی از گونه Y ، Y' به عنوان مقسوم علیه تقسیم می گردد. سپس دو طول موج انتخاب می شود (λ_1 و λ_2) و مقدار دامنه های نسبی P_1 و P_2 را به ترتیب در λ_1 و λ_2 اندازه گرفته می شود و از هم کم می گردد، و این اختلاف دامنه ها بر حسب P_1 رسم می گردند که یک خط مستقیم با معادله زیر به دست می آید:

$$\Delta p = P_1 - P_2 = \text{slope } P_{(\text{postulated})} + \text{intercept} \quad \text{معادله ۲-۲۶}$$

در معادله فوق (۲-۲۶)، P_1 و P_2 به ترتیب دامنه های نسبی در طول موج های λ_1 و λ_2 هستند.

در مرحله بعد طیف هر مخلوط به همان غلظت معین از گونه Y که به عنوان مقسوم علیه (Y') در قسمت قبل انتخاب شده بود، تقسیم می شود. طیف حاصل دارای مقدار ثابت ($\frac{c_y}{c'_y} = \text{constant}$) است. سپس مقدار دامنه های نسبی در طول موج های λ_1 و λ_2 ثبت می شوند و از یکدیگر کم می گردند.

$$\Delta P_{\text{Mix}} = P_1 - P_2 = \left(\frac{\varepsilon_x c_x}{\varepsilon_y c'_y} \right)_1 + \text{Constant} - \left(\frac{\varepsilon_x c_x}{\varepsilon_y c'_y} \right)_2 - \text{Constant} \quad \text{معادله ۲-۲۷}$$

سپس ΔP_{Mix} را در معادله ۲-۲۶ قرار داده و با داشتن شیب و عرض از مبدا مقدار P پیش بینی شده ($P_{\text{postulated}}$) برای هر مخلوط به دست می آید.

برای به دست آوردن مقدار ثابت ($C_Y / C_{Y'} = C.V$) مقدار P پیش بینی شده ($P_{\text{Postulated}}$) محاسبه شده برای هر مخلوط، از دامنه ثبت شده در λ_1 ، P_{recorded} در مخلوط مربوطه کسر می گردد (معادله ۲-۲۸).

$$C.V = \frac{c_y}{c'_y} = P_{recorded} - P_{postulated} = \left(\frac{\varepsilon_x c_x}{\varepsilon_y c'_y} + \frac{\varepsilon_y c_y}{\varepsilon_y c'_y} \right)_1 - \left(\frac{\varepsilon_y c_y}{\varepsilon_y c'_y} \right)_1 \quad \text{معادله ۲۸-۲}$$

با ضرب کردن این مقدار ثابت (C.V) که از معادله ۲۸-۲ به دست آمده در طیف مرتبه صفر مقسوم علیه انتخاب شده از گونه Y (Y')، طیف مرتبه صفر گونه Y به دست می آید (معادله ۲۹-۲).

$$C.V \times Y' = \frac{c_y}{c'_y} \times b \times \varepsilon_y \times C'_y = b \times \varepsilon_y \times C_y \quad \text{معادله ۲۹-۲}$$

سپس با اندازه گیری جذب در طول موج ماکزیمم گونه Y برای هر مخلوط و قرار دادن آن در معادله کالیبراسیون گونه Y، غلظت گونه Y برای هر مخلوط به دست می آید.

برای به دست آوردن غلظت گونه X در هر مخلوط، طیف مرتبه صفر گونه Y به دست آمده از مرحله قبل را از طیف مخلوط مربوطه کم کرده و سپس با اندازه گیری جذب در طول موج ماکزیمم گونه X برای هر مخلوط و قرار دادن آن در معادله کالیبراسیون گونه X، غلظت گونه X برای هر مخلوط به دست می آید. (معادله ۳۰-۲) [۳۶ و ۳۷].

$$b\varepsilon_x C_x = (b\varepsilon_x C_x + b\varepsilon_y C_y) - (b\varepsilon_y C_y) \quad \text{معادله ۳۰-۲}$$

تجربى

۳-۱- اندازه گیری همزمان ایزومرهای اورتو-نیتروآنیلین و متا-نیتروآنیلین با

استفاده از روش های اسپکتروفتومتری جدید

با توجه به اهمیت و کاربردهای متا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین که در فصل اول به آن ها اشاره گردید، ارائه روشی حساس، ساده و گزینش پذیر برای اندازه گیری مقادیر بسیار کم آن ها ضروری است. در این فصل سعی بر آن است که از سه روش اسپکتروفتومتری جدید برای اندازه گیری همزمان این دو ایزومر استفاده شود.

۳-۲- محلول های مورد استفاده و طرز تهیه آن ها

در تهیه تمام محلول ها از آب مقطر و مواد شیمیایی با خلوص تجزیه ای استفاده گردید. جدول زیر نشان دهنده مواد شیمیایی استفاده شده، فرمول شیمیایی آن ها و شرکت سازنده آن ها می باشد.

جدول ۳-۱: مواد شیمیایی مورد استفاده

نام ماده شیمیایی	فرمول	شرکت سازنده
اورتو-نیتروآنیلین	$C_6H_6N_2O_2$	آلدریچ ^۱
متا-نیتروآنیلین	$C_6H_6N_2O_2$	آلدریچ
پارا-نیتروآنیلین	$C_6H_6N_2O_2$	آلدریچ
سیتریک اسید منو هیدرات	$H_3C_6H_5O_7 \cdot H_2O$	مرک ^۲
پتاسیم دی هیدروژن فسفات	KH_2PO_4	مرک
دی سدیم هیدروژن فسفات	Na_2HPO_4	مرک
اتانول	C_2H_5OH	مرک
سدیم هیدروکسید	$NaOH$	مرک
هیدروکلریک اسید	HCl	مرک

محلول های مادر متا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین با غلظت های ۵۰۰/۰ میلی گرم بر لیتر، از انحلال ۰/۰۵۰۰ گرم ماده خالص این دو ترکیب در ۶/۰۰ میلی لیتر اتانول و رقیق کردن آن با آب مقطر، در بالن حجمی ۱۰۰ میلی لیتری تهیه شد. محلول های رقیق تر روزانه با رقیق سازی متوالی از محلول

^۱Aldrich

^۲Merck

۵۰۰/۰ میلی گرم بر لیتر تازه تهیه شده، ساخته شد. محلول‌های بافر فسفاتی با $\text{pH}=5/0-9/0$ ، از اختلاط 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 ۴/۰- $\text{pH}=2/0$ ، از محلول‌های فسفریک‌اسید 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.[۳۸].

۳-۳- دستگاه‌ها و وسایل مورد استفاده

برای ثبت طیف‌های جذبی محلول‌ها در ناحیه مورد نظر (ناحیه طول موجی ۲۵۰-۵۵۰ نانومتر)، از یک اسپکتروفوتومتر دو پرتوئی ریلی مدل UV-۲۶۰۱^۱ مجهز به یک جفت سل کوارتز ۱/۰ سانتی‌متری استفاده شد. برای اندازه‌گیری های pH از دستگاه pH -متر دیجیتالی ساخت شرکت متراهم^۲ مدل ۷۴۴ مجهز به یک الکتروود غشای شیشه-کالومل (۳ مولار) و جهت توزین مواد از ترازوی سارتریوس مدل A200S با دقت ۰/۱ میلی‌گرم استفاده شد.

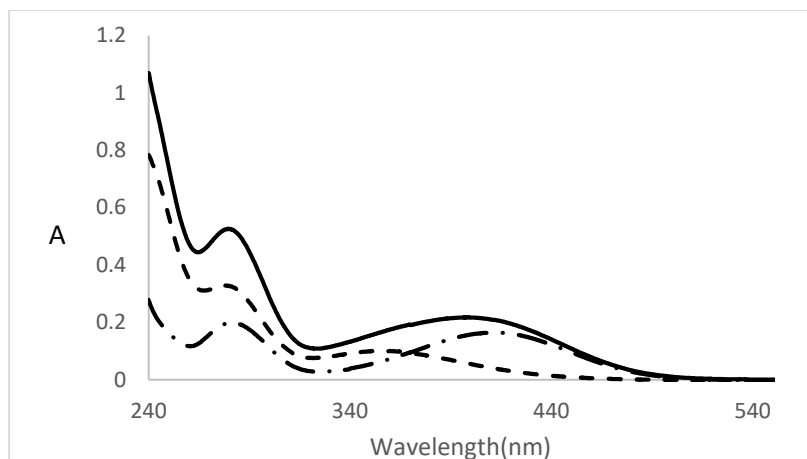
۳-۴- طیف جذبی

طیف جذبی محلول‌های متا-نیتروآنیلین، اورتو-نیتروآنیلین و مخلوط حاوی این دو گونه برای مقایسه در گستره طول موج ۲۴۰-۵۵۰ نانومتر در شکل ۳-۱ نشان داده شده است. برای ثبت طیف جذبی محلول نمونه به این ترتیب عمل شد که، به یک بالن حجمی ۱۰ میلی‌لیتری به ترتیب ۲/۰۰ میلی‌لیتر محلول متا-نیتروآنیلین یا ۱/۰۰ اورتو-نیتروآنیلین با غلظت ۵۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفاتی $\text{pH}=7/0$ اضافه شد و با آب مقطر تا خط نشانه بالن رقیق گردید. مقداری از این محلول پس از یکنواخت کردن به داخل سل اسپکتروفوتومتر

^۱ Uv- 2601 Reileigh

^۲ Metrohm 744

منتقل و طیف جذبی هر یک نسبت به شاهد در ناحیه ۲۴۰-۵۵۰ نانومتر، ثبت شد (شکل ۳-۱). تهیه شاهد نیز مانند مراحل فوق بود، با این تفاوت که به بالن حجمی هیچ غلظتی از دو ترکیب اضافه نشد.



شکل ۳-۱: طیف جذبی ۱۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین (---)، طیف جذبی ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین (· · · ·) و طیف جذبی مخلوطی از متا-نیتروآنیلین با غلظت ۱۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر و اورتو-نیتروآنیلین با غلظت ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر در pH=۷/۰ (—)

همان طور که در شکل ۳-۱ مشاهده می شود، طول موج ماکزیمم برای متا-نیتروآنیلین طول موج های ۲۷۸ و ۳۵۶ نانومتر و برای اورتو-نیتروآنیلین ۲۸۲ و ۴۱۱ نانومتر انتخاب گردید. با توجه به زیاد بودن مزاحمت های طیفی در محدوده زیر ۳۰۰ نانومتر در جذب، طول موج دوم این ترکیب ها (۳۵۶ نانومتر برای متا-نیتروآنیلین و ۴۱۱ نانومتر برای اورتو-نیتروآنیلین) به عنوان طول موج ماکزیمم انتخاب شده است. همان طور که در شکل ۳-۱ مشاهده می شود، امکان اندازه گیری هر یک از این دو ایزومر به طور جداگانه در مخلوط آن ها، به روش اسپکترومتری معمولی به طور مستقیم، امکان پذیر نیست. لذا برای اندازه گیری هر یک از این دو گونه در مخلوط، از روش های اسپکتروفوتومتری ارائه شده جدید استفاده شد [۲۲]. 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 ماکزیمم ذکر شده، به عنوان سیگنال تجزیه ای استفاده شد.

۳-۵- بررسی و بهینه‌سازی متغیرهای موثر بر حساسیت روش های اندازه‌گیری

متا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین

به منظور فراهم کردن بهترین گزینش پذیری و حساسیت و در نتیجه حد تشخیص بهتر، متغیرهایی که بر میزان جذب این دو ترکیب در طول موج ماکزیمم تاثیر دارند مورد بررسی قرار گرفت و بهینه شد. در این بررسی‌ها 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 این صورت عمل شد که یک بالن حجمی ۱۰ میلی‌لیتری، ۲/۰۰ میلی‌لیتر از بافر مورد نظر و ۲/۰۰ میلی‌لیتر از محلول ۵۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین و یا ۲/۰۰ میلی‌لیتر از محلول ۵۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین اضافه گردید، این محلول با آب مقطر تا خط نشانه به حجم رسانده شد. برای تهیه محلول شاهد نیز مانند روش فوق عمل شد، با این تفاوت که به محلول شاهد، هیچ غلظتی از اورتو-نیتروآنیلین و متا-نیتروآنیلین اضافه نشد.

۳-۵-۱- بررسی اثر pH

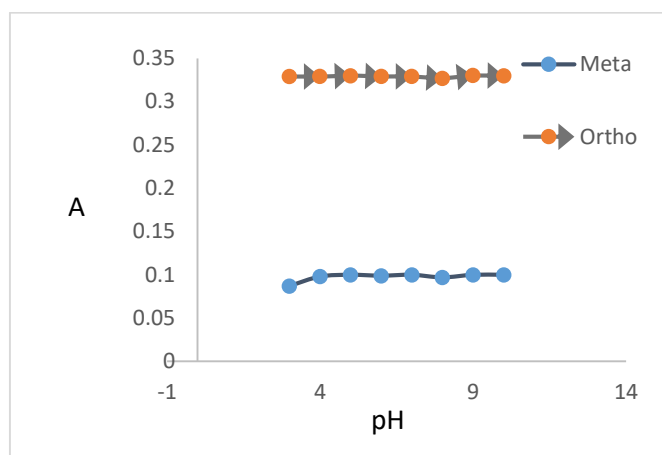
اثر pH بر جذب و طول موج ماکزیمم جذب اورتو-نیتروآنیلین و متا-نیتروآنیلین در ناحیه ۱۰/۰ - ۳/۰ مورد بررسی قرار گرفت. این بررسی در حضور غلظت ۱۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر متا-

^۱ One-at-a time

نیتروآنیلین و ۱۰/۰۰ میلی گرم برلیتر اورتو-نیتروآنیلین و ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفاتی با pH مورد نظر انجام شد. نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۲-۳ و شکل ۲-۳ نشان داده شده است. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که جذب و طول موج ماکزیمم جذب برای هردو ترکیب در طول موج‌های ۳۵۶ و ۴۱۱ نانومتر، در دامنه ۱۰/۰ - ۳/۰ pH ثابت بوده و تغییرات محسوسی ندارد. به دلیل وجود گروه کشنده الکترون (NO₂) بر روی حلقه آروماتیک زوج الکترون غیر پیوندی گروه آمین هم از طریق القایی و هم از طریق رزونانس در گیر حلقه آروماتیک می‌شود که به همین دلیل تغییرات pH تاثیر چندانی بر انتقال در این ناحیه ندارد، به همین دلیل در محدوده‌ی مورد نظر انتقال ثابت است. اما در pH های پایین تر به دلیل این که H⁺ خیلی قوی تر و واکنش پذیر تر است می‌تواند با زوج الکترون گروه آمین واکنش دهد و باعث از بین رفتن برخی از انتقال شود. در ایزومر متا-نیتروآنیلین گروه NO₂ در رزونانس شرکت نمی‌کند و فقط از طریق القایی زوج الکترون را درگیر می‌کند به همین دلیل تاثیرات pH روی آن در pH های پایین بیش تر است. لذا با در نظر گرفتن گزینش پذیری روش و با توجه به این که pH محلول این ترکیبات نزدیک به pH=۷/۰ می‌باشد، محلول بافری با pH= ۷/۰ برای مطالعات و بررسی‌های بعدی انتخاب گردید.

جدول ۲-۳: نتایج حاصل از بررسی اثر pH

pH	طول موج ماکزیمم متا-نیتروآنیلین	جذب متا-نیتروآنیلین	طول موج ماکزیمم اورتو-نیتروآنیلین	جذب اورتو-نیتروآنیلین
۳/۰	۳۵۶	۰/۰۸۷	۴۱۱	۰/۳۲۸
۴/۰	۳۵۶	۰/۰۹۸	۴۱۱	۰/۳۳۲
۵/۰	۳۵۶	۰/۱۰۲	۴۱۱	۰/۳۳۴
۶/۰	۳۵۶	۰/۰۹۹	۴۱۱	۰/۳۲۹
۷/۰	۳۵۶	۰/۱۰۰	۴۱۱	۰/۳۲۹
۸/۰	۳۵۶	۰/۰۹۷	۴۱۱	۰/۳۲۴
۹/۰	۳۵۶	۰/۱۰۲	۴۱۱	۰/۳۳۳
۱۰/۰	۳۵۶	۰/۱۰۲	۴۱۱	۰/۳۳۰



شکل ۳-۲: بررسی اثر pH، شرایط: ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفاتی و غلظت ۱۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر نسبت به متا-

نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین در طول موج ماکزیمم هریک

۳-۵-۲- بررسی نوع بافر

پس از بررسی اثر pH بر روی میزان جذب، برای دستیابی به حساسیت بیشتر، اثر نوع بافر نیز مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام این کار ابتدا محلول های بافر با $pH = 7.0$ از نوع فسفاتی و سیتراتی مطابق بخش ۳-۲- تهیه شد و اثر نوع بافر بر سیگنال تجزیه ای متا نیتروآنیلین و پارا- نیتروآنیلین مورد بررسی قرار گرفت. برای این بررسی ها به یک بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری ۲/۰۰ میلی لیتر از محلول ۵۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین یا اورتو-نیتروآنیلین و سپس ۲/۰۰ میلی لیتر از بافر مورد نظر اضافه و تا خط نشانه بالن با آب مقطر به حجم رسانده شد. برای تهیه محلول شاهد مانند روش فوق عمل شد، با این تفاوت که به محلول شاهد، از گونه های مورد نظر اضافه نگردید. سپس جذب هر محلول در طول موج ماکزیمم جذب مربوط اندازه گیری شد. نتایج حاصل در جدول ۳-۳ نشان داده شده است.

نتایج حاصل شده نشان می دهد که نوع بافر اثری بر سیگنال تجزیه ای هیچ یک از دو ترکیب مورد نظر ندارد. با توجه به اینکه ظرفیت بافر فسفاتی در $pH = 7.0$ بیشتر از بافر سیتراتی است، بافر

فسفاتی برای بررسی های بعدی انتخاب شد.

جدول ۳-۳: نتایج حاصل از بررسی نوع بافر

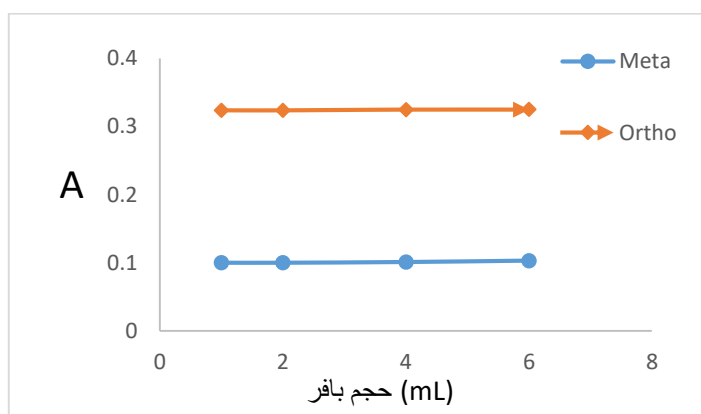
نوع بافر	جذب اورتو-نیتروآنیلین (۱۰ mg/L) در طول موج ۴۱۱ نانومتر	جذب متانیتروآنیلین (۱۰ mg/L) در طول موج ۳۵۶ نانومتر
سیتراتی	۰/۳۳۱	۰/۱۰۰
فسفاتی	۰/۳۲۹	۰/۱۰۰

۳-۵-۳- بررسی حجم بافر

پس از بررسی نوع بافر نوبت به بررسی اثر حجم بافر می‌رسد. برای بررسی اثر حجم بافر، از بافر فسفاتی با $\text{pH} = 7/0$ در دامنه $6/00 - 1/00$ میلی لیتر استفاده گردید. این بررسی در حضور محلول $10/00$ میلی گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین یا اورتو-نیتروآنیلین انجام شد. این بررسی به این صورت انجام شد که $2/00$ میلی لیتر محلول اورتو-نیتروآنیلین یا پارا-نیتروآنیلین $50/00$ میلی گرم بر لیتر، به یک بالن حجمی 10 میلی لیتری 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 اورتو-نیتروآنیلین و پارا-نیتروآنیلین افزوده نشد. جذب محلول نمونه نسبت به محلول شاهد در طول موج ماکزیمم جذب مربوط اندازه گیری شد. نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۳-۴ و شکل ۳-۳ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که در حجم‌های متفاوت بافر، سیگنال تجزیه‌ای ثابت و یکسان است. در بررسی های بعدی برای اطمینان از کافی بودن ظرفیت بافری حجم $2/00$ میلی لیتر بافر فسفاتی $\text{pH} = 7/0$ انتخاب شد.

جدول ۳-۴: نتایج حاصل از بررسی حجم بافر فسفاتی pH=۷/۰

جذب اورتو-نیتروآنیلین (۱۰ mg/L) در طول موج ۴۱۱ نانومتر	جذب متا-نیتروآنیلین (۱۰ mg/L) در طول موج ۳۵۶ نانومتر	حجم بافر (میلی لیتر)
۰/۳۲۴	۰/۱۰۰	۱/۰۰
۰/۳۲۲	۰/۱۰۰	۲/۰۰
۰/۳۲۴	۰/۱۰۱	۴/۰۰
۰/۳۲۸	۰/۱۰۳	۶/۰۰



شکل ۳-۳: بررسی اثر حجم بافر فسفاتی با pH= ۷/۰ در حضور غلظت ۱۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین (طول موج ۳۵۶ نانومتر) و یا اورتو-نیتروآنیلین (طول موج ۴۱۱ نانومتر)

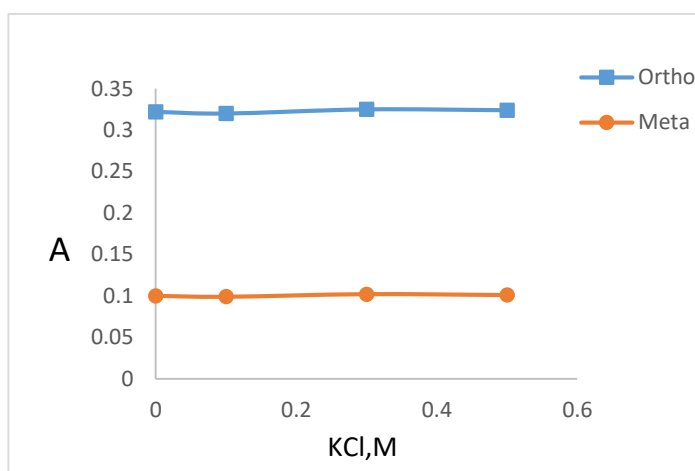
۳-۵-۴- بررسی اثر قدرت یونی

تاثیر قدرت یونی بر سیگنال تجزیه‌ای متا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین با استفاده از KCl در محدوده غلظتی ۰/۵۰ - ۰/۰ مولار مورد بررسی قرار گرفت. این بررسی به این صورت انجام شد که ۲/۰۰ میلی‌لیتر محلول متا-نیتروآنیلین و یا اورتو-نیتروآنیلین ۵۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفاتی pH= ۷/۰، به همراه حجم‌های مختلفی از محلول نمک KCl ۱/۰۰ مولار به یک بالن حجمی ۱۰ میلی‌لیتری منتقل شد و با آب مقطر تا خط نشانه بالن، رقیق گردید (محلول نمونه). سپس قسمتی از آن به سل دستگاه منتقل شد. محلول شاهد همانند محلول نمونه تهیه شد، با این تفاوت که به آن فقط بافر فسفاتی افزوده شد. جذب محلول نمونه نسبت به محلول شاهد در طول موج ماکزیمم جذب مربوطه اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل در جدول ۳-۵ و شکل ۳-۴ نشان داده شده

است. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که قدرت یونی بر جذب گونه‌های مورد نظر اثری ندارد.

جدول ۳-۵: نتایج حاصل از بررسی اثر قدرت یونی

جذب اورتو-نیتروآنیلین (۱۰ mg/L) در طول موج ۴۱۱ نانومتر	جذب متا-نیتروآنیلین (۱۰ mg/L) در طول موج ۳۵۶ نانومتر	KCl, (M)
۰/۳۲۲	۰/۱۰۰	۰/۰۰
۰/۳۲۰	۰/۰۹۹	۰/۱۰
۰/۳۲۵	۰/۱۰۲	۰/۳۰
۰/۳۲۴	۰/۱۰۱	۰/۵۰



شکل ۳-۴: بررسی اثر قدرت یونی. شرایط: محلول‌های ۱۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین (طول موج ۳۵۶ نانومتر) و یا اورتو-نیتروآنیلین (طول موج ۴۱۱ نانومتر)، در حضور ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفاتی با $\text{pH} = 7.0$

۳-۶- شرایط بهینه

با توجه به نتایج تجربی حاصل از بررسی و بهینه‌سازی پارامترهای موثر بر میزان جذب در طول موج‌های ماکزیمم مربوط به دو ایزومر مد نظر، ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفاتی با $\text{pH} = 7.0$ انتخاب شد و در آزمایش‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

۷-۳- تعیین دامنه خطی متا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین به صورت

جداگانه

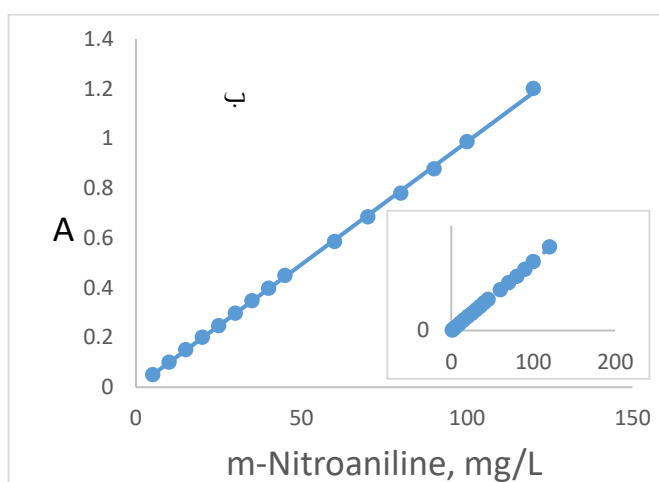
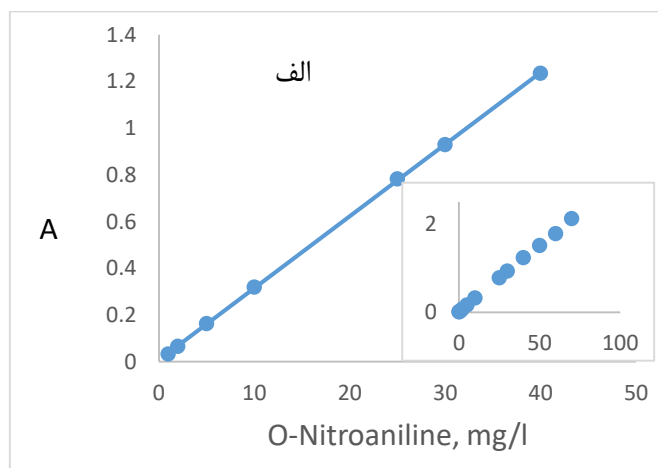
روش کار برای استخراج منحنی کالیبراسیون منفرد برای هر کدام از ترکیبات به صورت زیر بود. به یک سری بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری، ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفاتی با $\text{pH} = 7.0$ و مقادیر متفاوت از دو ایزومر به صورت جداگانه اضافه و با آب مقطر تا خط نشانه بالن رقیق گردید. مقداری از محلول به سل دستگاه اسپکتروفتومتر منتقل شده و جذب هر محلول در طول موج‌های ماکزیمم ۳۵۶ و ۴۱۱ نانومتر به ترتیب برای متا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین نسبت به محلول شاهد اندازه‌گیری و ثبت گردید و نتایج حاصل در جدول ۳-۶ آمده است.

جدول ۳-۶: نتایج حاصل برای رسم منحنی کالیبراسیون متا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین به صورت مجزا در شرایط بهینه

جذب محلول متا-نیتروآنیلین در طول موج ۳۵۶ نانومتر	جذب محلول اورتو- نیتروآنیلین در طول موج ۴۱۱ نانومتر	غلظت (میلی گرم بر لیتر)
-	۰/۰۰۸	۰/۱۰۰
-	۰/۰۱۴	۰/۲۰۰
۰/۰۰۸	۰/۰۳۳	۱/۰۰
۰/۰۱۸	۰/۰۶۶	۲/۰۰
۰/۰۵	۰/۱۶۳	۵/۰۰
۰/۱	۰/۳۲۴	۱۰/۰۰
۰/۱۵	۰/۴۸۰	۱۵/۰۰
۰/۲	۰/۶۴۲	۲۰/۰۰
۰/۲۴۷	۰/۷۹۲	۲۵/۰۰
۰/۲۹۷	۰/۹۴۷	۳۰/۰۰
۰/۳۹۷	۱/۲۶۷	۴۰/۰۰
۰/۴۸۳	۱/۵۱۴	۵۰/۰۰
۰/۵۸۵	۱/۷۸۳	۶۰/۰۰
۰/۶۸۴	۲/۱۲۳	۷۰/۰۰
۰/۷۷۹	-	۸۰/۰۰
۰/۸۸۱	-	۹۰/۰۰
۰/۹۹۳	-	۱۰۰/۰۰
۱/۱۸۹	-	۱۲۰/۰۰

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

شد. نتایج به‌دست آمده در شکل ۳-۵ و جدول ۳-۷ آورده شده است.



شکل ۳-۵: الف: منحنی کالیبراسیون اورتو-نیتروآنیلین، ب: منحنی کالیبراسیون متا-نیتروآنیلین.
تحت شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفاتی با pH= ۷/۰

جدول ۷-۳: نتایج حاصل از کالیبراسیون تک متغیره

ترکیب	متا نیتروآنیلین. ($\lambda_{\max} = 356 \text{ nm}$)	اورتو نیتروآنیلین ($\lambda_{\max} = 411 \text{ nm}$)
ناحیه خطی (میلی گرم بر لیتر)	۵/۰۰ - ۱۲۰/۰۰	۲/۰۰ - ۴۰/۰۰
معادله رگرسیون	$A = 0.0099 C_{m-NA} + 0.0007$ ($n=15$)	$A = 0.0307 C_{o-NA} + 0.01$ ($n=6$)
R^2	۰/۹۹۹۶	۰/۹۹۹۹

در جدول ۷-۳، A سیگنال تجزیه‌ای مربوط به هر گونه (جذب محلول نمونه نسبت به محلول شاهد) در طول موج مربوط به هر گونه، C_{m-NA} و C_{o-NA} به ترتیب، غلظت اورتو-نیتروآنیلین و متا-نیتروآنیلین بر حسب میلی گرم بر لیتر و R^2 مجذور ضریب همبستگی برای هر نمودار است.

۸-۳- محلول سازی سری ارزیابی و سری تست

به منظور بهینه سازی پارامترها و رسیدن به بهترین صحت در روش‌های به کار رفته در این پروژه، محلول‌های سری کالیبراسیون (محلول‌های خالص استاندارد)، محلول‌های سری ارزیابی و سری تست تهیه و طیف آن‌ها نسبت به محلول شاهد در دامنه ۲۴۰-۵۵۰ نانومتر ثبت گردید و مورد بررسی قرار گرفت. محلول‌های سری تست و سری ارزیابی از انتقال مقادیر مختلف این دو ایزومر به همراه ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفاتی $\text{pH}=7.00$ به بالن‌های حجمی ۱۰ میلی لیتری و رقیق کردن آن‌ها تا خط نشانه با آب مقطر تهیه شد. سپس طیف هر محلول نسبت به محلول شاهد در دامنه ۲۴۰-۵۵۰ نانومتر ثبت و ذخیره گردید. محلول شاهد مثل محلول نمونه تهیه شد با این تفاوت که به آن هیچ مقداری از این دو ترکیب اضافه نشد. سپس طیف هر ایزومر نسبت به محلول شاهد در دامنه ۲۴۰-۵۵۰ نانومتر ثبت گردید. ترکیب غلظتی برای محلول‌های سری ارزیابی و محلول‌های سری تست به ترتیب در جدول‌های ۸-۳ و ۹-۳ آورده شده است.

جدول ۳-۸: ترکیب غلظتی محلول‌های سری ارزیابی

غلظت متا-نیتروآنیلین (میلی‌گرم بر لیتر)	غلظت اورتو-نیتروآنیلین (میلی‌گرم بر لیتر)	محلول
۵/۰۰	۵/۰۰	۱
۱۰/۰۰	۵/۰۰	۲
۲۰/۰۰	۵/۰۰	۳
۳۰/۰۰	۵/۰۰	۴
۴۰/۰۰	۵/۰۰	۵
۵/۰۰	۱۰/۰۰	۶
۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۷
۲۰/۰۰	۱۰/۰۰	۸
۳۰/۰۰	۱۰/۰۰	۹
۴۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰
۵/۰۰	۱۵/۰۰	۱۱
۱۰/۰۰	۱۵/۰۰	۱۲
۱۵/۰۰	۱۵/۰۰	۱۳
۲۰/۰۰	۱۵/۰۰	۱۴
۲۵/۰۰	۱۵/۰۰	۱۵
۳۰/۰۰	۱۵/۰۰	۱۶
۴۰/۰۰	۱۵/۰۰	۱۷
۵/۰۰	۲۰/۰۰	۱۸
۱۰/۰۰	۲۰/۰۰	۱۹
۲۰/۰۰	۲۰/۰۰	۲۰
۳۰/۰۰	۲۰/۰۰	۲۱
۴۰/۰۰	۲۰/۰۰	۲۲
۵/۰۰	۲۵/۰۰	۲۳
۱۰/۰۰	۲۵/۰۰	۲۴
۱۵/۰۰	۲۵/۰۰	۲۵
۲۰/۰۰	۲۵/۰۰	۲۶
۲۵/۰۰	۲۵/۰۰	۲۷
۳۰/۰۰	۲۵/۰۰	۲۸
۴۰/۰۰	۲۵/۰۰	۲۹

جدول ۳-۹: ترکیب غلظتی محلول‌های سری تست

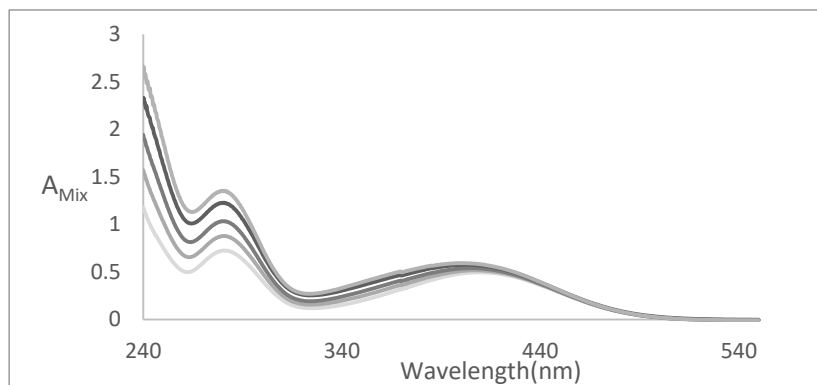
محلول	غلظت اورتو-نیتروآنیلین (میلی گرم بر لیتر)	غلظت متا-نیتروآنیلین (میلی گرم بر لیتر)
۱	۵/۰۰	۱۲/۰۰
۲	۵/۰۰	۱۸/۰۰
۳	۵/۰۰	۲۰/۰۰
۴	۱۲/۰۰	۶/۰۰
۵	۱۲/۰۰	۱۲/۰۰
۶	۱۲/۰۰	۱۸/۰۰
۷	۱۲/۰۰	۲۰/۰۰
۸	۱۸/۰۰	۶/۰۰
۹	۱۸/۰۰	۱۲/۰۰
۱۰	۱۸/۰۰	۱۸/۰۰

۳-۹- کاربرد روش تفاضل نسبی توسعه یافته (EXRSM) برای تعیین همزمان

غلظت اورتو-نیتروآنیلین و متا-نیتروآنیلین

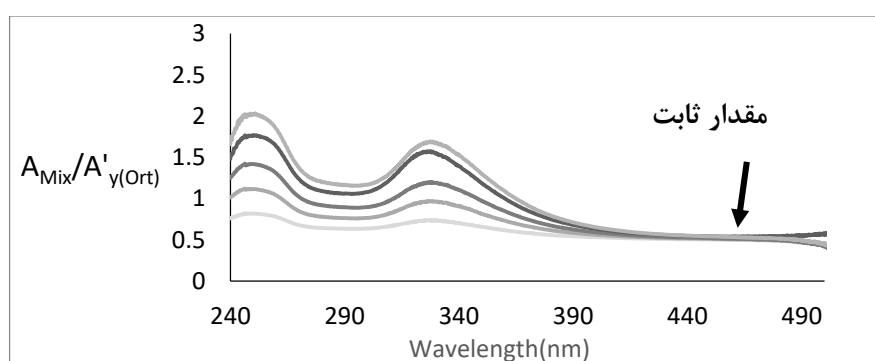
اولین روش اسپکتروفتومتری جدیدی که برای تعیین مقدار غلظت‌های این ایزومرها در مخلوط‌ها استفاده شد، روش EXRSM بود. ابتدا روش به دست آوردن غلظت‌های متا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین در یک سری از مخلوط‌های سری ارزیابی توضیح داده می‌شود. سپس روش بهینه سازی مقسوم علیه‌ها آورده می‌شود.

برای توضیح بهتر روش، مخلوط‌هایی از سری ارزیابی انتخاب شدند که غلظت اورتو-نیتروآنیلین موجود در مخلوط‌ها ثابت و غلظت متا-نیتروآنیلین در آن‌ها تغییر می‌کند. در شکل ۳-۶ طیف‌های جذبی مخلوط‌هایی با غلظت ثابت اورتو-نیتروآنیلین و غلظت متغیر متا-نیتروآنیلین آورده شده است.



شکل ۳-۶: طیف‌های جذبی مخلوط‌های حاوی ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۱۵/۰۰، ۲۰/۰۰ و ۲۵/۰۰ (میلی‌گرم بر لیتر) متا-نیتروآنیلین و ۱۵/۰۰ (میلی‌گرم بر لیتر) اورتو-نیتروآنیلین در شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفاتی با pH= ۷/۰

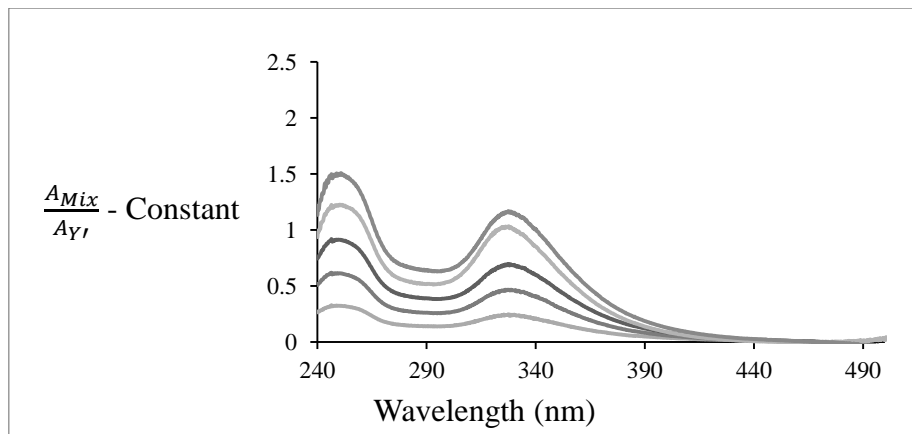
برای دست‌یابی به بهترین دقت و صحت باید مقدار مقسوم‌علیه (گونه‌ای که جذب آن در طول موج‌های بالاتر صفر می‌شود) که اورتو-نیتروآنیلین است بهینه شود. بنابراین طیف هر مخلوط بر طیف محلول ۳۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین تقسیم شد. طیف نسبی حاصل در ناحیه‌ای که ایزومر متا-نیتروآنیلین دارای جذب نمی‌باشد یعنی ناحیه طول‌موجی ۴۷۲-۴۷۰ نانومتر دارای مقدار ثابت است (شکل ۳-۷).



شکل ۳-۷: طیف‌های جذبی حاصل از تقسیم طیف مخلوط‌های حاوی ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۱۵/۰۰، ۲۰/۰۰ و ۲۵/۰۰ (میلی‌گرم بر لیتر) متا-نیتروآنیلین و ۱۵/۰۰ (میلی‌گرم بر لیتر) اورتو-نیتروآنیلین بر طیف ۳۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین

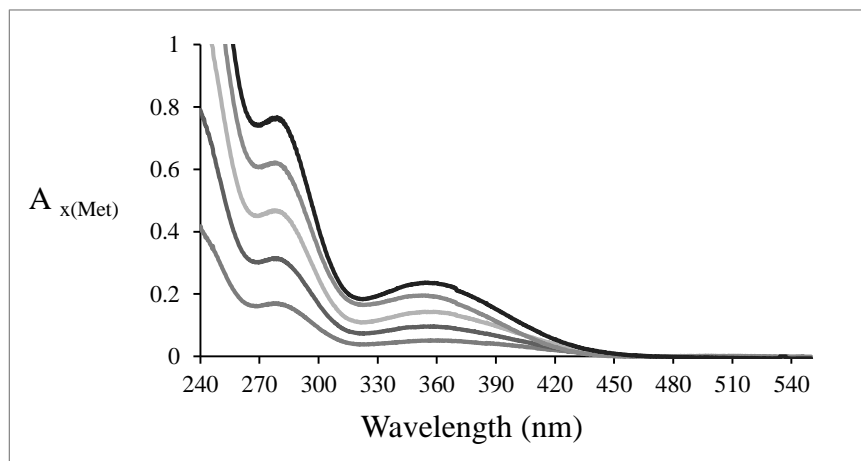
در شکل ۳-۷، A_{mix} و $A'_{y(Ort)}$ به ترتیب بیانگر جذب مخلوط و جذب محلول اورتو-نیتروآنیلین ۳۰ میلی گرم بر لیتر (به عنوان مقسوم علیه) است.

بعد از تقسیم کردن طیف مخلوطها به طیف مرتبه صفر یک محلول اورتو-نیتروآنیلین با غلظت معین، مقدار ثابت به دست آمده را از طیفهای نسبی کم کرده و طیفهای تفاضل نسبی شکل ۳-۸ به دست آمد.



شکل ۳-۸: طیفهای جذبی حاصل از تقسیم طیف مخلوطهای حاوی ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۱۵/۰۰، ۲۰/۰۰ و ۲۵/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) متا-نیتروآنیلین و ۱۵/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) اورتو-نیتروآنیلین بر طیف ۳۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین (مقسوم علیه) بعد از کم کردن مقدار ثابت

طیفهای نسبی شکل ۳-۸ در طیف محلول ۳۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین (به عنوان مقسوم علیه) ضرب شد که طیف مرتبه صفر خالص متا-نیتروآنیلین در مخلوط به دست آمد (شکل ۳-۹). با استفاده از این طیفهای خالص، جذب در طول موج ماکزیمم متا-نیتروآنیلین (۳۵۶ نانومتر) اندازه گیری شد و در منحنی کالیبراسیون حاصل از محلولهای استاندارد خالص متا-نیتروآنیلین قرار داده شد (شکل ۳-۵-ب) و غلظت متا-نیتروآنیلین در هر مخلوط به دست آمد.



شکل ۳-۹: طیف جذبی مرتبه صفر ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۱۵/۰۰، ۲۰/۰۰ و ۲۵/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) متا-نیتروآنیلین، بعد از کم کردن مقدار ثابت و ضرب در طیف محلول ۳۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین برای انتخاب غلظت اورتو-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه برای دستیابی به بهترین نتایج، ارزیابی از طریق شاخص‌های کمی میانگین خطای نسبی (MRE)^۱ و میانگین مربع خطا (MSE)^۲، در هر غلظت از اورتو-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه انجام شد. نتایج این محاسبات در جدول ۳-۱۰ آورده شده است و نشان می‌دهد که مقدار خطای حاصل از غلظت ۳۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر اورتو نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه از دیگر غلظت‌ها کمتر است. به همین دلیل این غلظت به عنوان غلظت بهینه اورتو-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه در محاسبات بعدی استفاده شد.

جدول ۳-۱۰: نتایج حاصل از بهینه‌سازی غلظت اورتو-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه برای سری ارزیابی

خطا MSE (MRE)	خطای نسبی (%)	غلظت متا- نیتروآنیلین پیش‌بینی شده (mg L ⁻¹)	غلظت اورتو- نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه (mg L ⁻¹)	غلظت‌های موجود در مخلوط		محلول
				متا نیتروآنیلین (mg L ⁻¹)	اورتو نیتروآنیلین (mg L ⁻¹)	
۱/۹۶ (۶/۳۷)	-۱/۰۰	۴/۹۵	۱۰/۰۰	۵/۰۰	۵/۰۰	۱
	-۲/۵۰	۹/۷۵	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۵/۰۰	۲
	-۰/۳۰	۱۹/۹۴	۱۰/۰۰	۲۰/۰۰	۵/۰۰	۳
	-۲/۶۰	۲۹/۲۲	۱۰/۰۰	۳۰/۰۰	۵/۰۰	۴

^۱ Mean Relative error

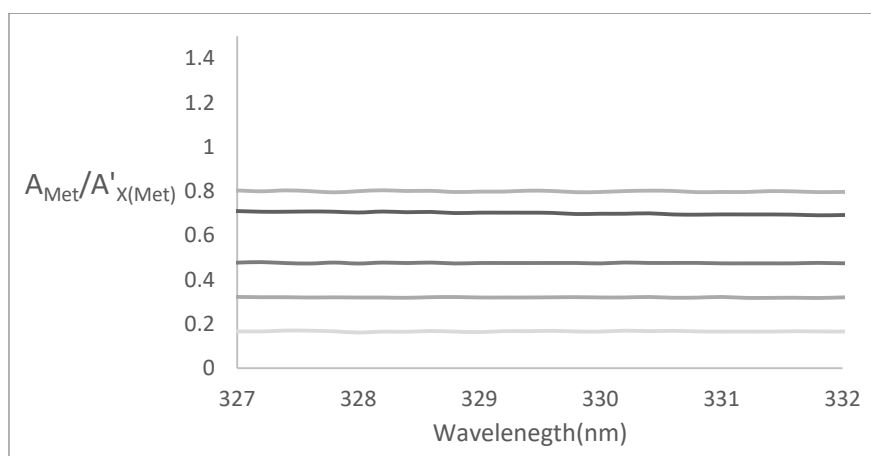
^۲ Mean square error

	-۲/۹۰	۳۸/۸۴	۱۰/۰۰	۴۰/۰۰	۵/۰۰	۵
	-۱/۰۰	۴/۹۵	۱۰/۰۰	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۶
	-۱/۰۰	۹/۹۰	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۷
	-۱/۲۵	۱۹/۷۵	۱۰/۰۰	۲۰/۰۰	۱۰/۰۰	۸
	-۳	۲۹/۱۰	۱۰/۰۰	۳۰/۰۰	۱۰/۰۰	۹
	-۵/۶۰	۳۷/۷۶	۱۰/۰۰	۴۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰
	-۴/۲۰	۴/۷۹	۱۰/۰۰	۵/۰۰	۱۵/۰۰	۱۱
	-۱/۸۰	۹/۸۲	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۵/۰۰	۱۲
	-۱/۳۴	۱۴/۸۰	۱۰/۰۰	۱۵/۰۰	۱۵/۰۰	۱۳
	-۲/۰۵	۱۹/۵۹	۱۰/۰۰	۲۰/۰۰	۱۵/۰۰	۱۴
	-۲/۵۲	۲۴/۳۷	۱۰/۰۰	۲۵/۰۰	۱۵/۰۰	۱۵
	-۴/۹۰	۲۸/۵۳	۱۰/۰۰	۳۰/۰۰	۱۵/۰۰	۱۶
	-۷/۲۲	۳۷/۱۱	۱۰/۰۰	۴۰/۰۰	۱۵/۰۰	۱۷
	-۴/۰۰	۴/۸۰	۱۰/۰۰	۵/۰۰	۲۰/۰۰	۱۸
	-۳/۰۰	۹/۷۰	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۲۰/۰۰	۱۹
	-۱/۶۰	۱۹/۶۸	۱۰/۰۰	۲۰/۰۰	۲۰/۰۰	۲۰
	-۴/۹۴	۲۸/۵۲	۱۰/۰۰	۳۰/۰۰	۲۰/۰۰	۲۱
	-۶/۲۵	۳۷/۵۰	۱۰/۰۰	۴۰/۰۰	۲۰/۰۰	۲۲
	-۱۳/۲۰	۴/۳۴	۱۰/۰۰	۵/۰۰	۲۵/۰۰	۲۳
	-۷/۶۰	۹/۲۴	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۲۵/۰۰	۲۴
	-۴/۸۰	۱۴/۲۸	۱۰/۰۰	۱۵/۰۰	۲۵/۰۰	۲۵
	-۳/۲۵	۱۹/۳۵	۱۰/۰۰	۲۰/۰۰	۲۵/۰۰	۲۶
	-۳/۳۲	۲۴/۱۷	۱۰/۰۰	۲۵/۰۰	۲۵/۰۰	۲۷
	-۵/۰۴	۲۸/۴۹	۱۰/۰۰	۳۰/۰۰	۲۵/۰۰	۲۸
	-۷/۴۰	۳۷/۰۴	۱۰/۰۰	۴۰/۰۰	۲۵/۰۰	۲۹
۰/۹۶ (۲/۳۵)	۰/۰۰	۵/۰۰	۲۰/۰۰	۵/۰۰	۵/۰۰	۱
	-۱/۴۰	۹/۸۶	۲۰/۰۰	۱۰/۰۰	۵/۰۰	۲
	۰/۰۰	۲۰/۰۰	۲۰/۰۰	۲۰/۰۰	۵/۰۰	۳
	-۲/۳۷	۲۹/۲۹	۲۰/۰۰	۳۰/۰۰	۵/۰۰	۴
	-۲/۷۰	۳۸/۹۲	۲۰/۰۰	۴۰/۰۰	۵/۰۰	۵
	-۰/۶۰	۴/۹۷	۲۰/۰۰	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۶
	-۸/۴۰	۹/۱۶	۲۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۷
	-۱/۲۰	۱۹/۷۶	۲۰/۰۰	۲۰/۰۰	۱۰/۰۰	۸
	-۲/۹۴	۲۹/۱۲	۲۰/۰۰	۳۰/۰۰	۱۰/۰۰	۹
	-۵/۵۸	۳۷/۷۷	۲۰/۰۰	۴۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰
	-۰/۸۰	۴/۹۶	۲۰/۰۰	۵/۰۰	۱۵/۰۰	۱۱
	۰/۰۰	۱۰	۲۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۵/۰۰	۱۲

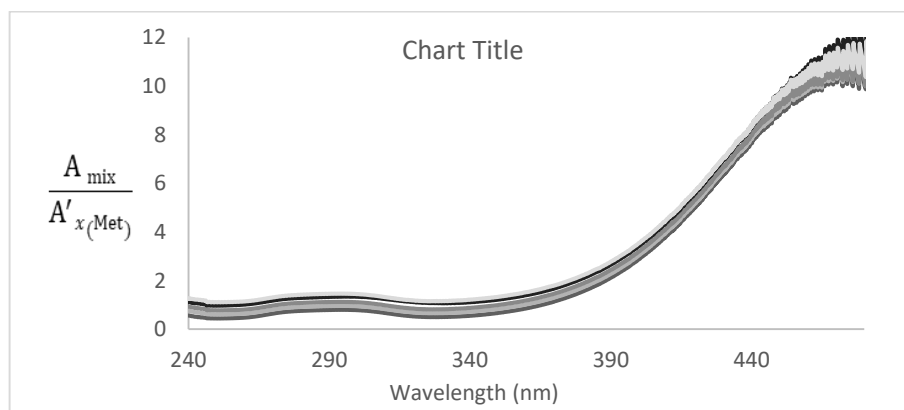
	-0/07	14/99	20/00	15/00	15/00	13
	-1/05	19/79	20/00	20/00	15/00	14
	-1/76	24/56	20/00	25/00	15/00	15
	-4/27	21/72	20/00	30/00	15/00	16
	-6/73	37/31	20/00	40/00	15/00	17
	-3/40	4/13	20/00	5/00	20/00	18
	-2/70	9/73	20/00	10/00	20/00	19
	-1/40	19/72	20/00	20/00	20/00	20
	-4/17	21/54	20/00	30/00	20/00	21
	-6/20	37/52	20/00	40/00	20/00	22
	-3/00	4/15	20/00	5/00	25/00	23
	-2/10	9/79	20/00	10/00	25/00	24
	-1	14/15	20/00	15/00	25/00	25
	-0/40	19/92	20/00	20/00	25/00	26
	-0/96	24/76	20/00	25/00	25/00	27
	-3/07	29/08	20/00	30/00	25/00	28
	-5/93	37/63	20/00	40/00	25/00	29
0/92 (1/64)	0/00	5/00	30/00	5/00	5/00	1
	0/20	10/02	30/00	10/00	5/00	2
	-0/05	19/99	30/00	20/00	5/00	3
	-0/94	29/72	30/00	30/00	5/00	4
	-2/90	31/14	30/00	40/00	5/00	5
	1/0	5/05	30/00	5/00	10/00	6
	0/00	10/00	30/00	10/00	10/00	7
	-0/70	19/16	30/00	20/00	10/00	8
	-2/60	29/22	30/00	30/00	10/00	9
	-5/30	37/11	30/00	40/00	10/00	10
	-0/20	4/99	30/00	5/00	15/00	11
	0/50	10/05	30/00	10/00	15/00	12
	0/00	15/00	30/00	15/00	15/00	13
	-0/15	19/13	30/00	20/00	15/00	14
	-1/60	24/60	30/00	25/00	15/00	15
	-4/14	21/76	30/00	30/00	15/00	16
	-6/63	37/35	30/00	40/00	15/00	17
	0/00	5/00	30/00	5/00	20/00	18
	-0/10	9/92	30/00	10/00	20/00	19
	-0/4	19/92	30/00	20/00	20/00	20

	-۲/۹۰	۲۹/۱۳	۳۰/۰۰	۳۰/۰۰	۲۰/۰۰	۲۱
	-۵/۷۰	۳۷/۷۲	۳۰/۰۰	۴۰/۰۰	۲۰/۰۰	۲۲
	-۲/۲۰	۴/۹۹	۳۰/۰۰	۵/۰۰	۲۵/۰۰	۲۳
	-۰/۶۰	۹/۹۴	۳۰/۰۰	۱۰/۰۰	۲۵/۰۰	۲۴
	۰/۰۰	۱۵/۰۰	۳۰/۰۰	۱۵/۰۰	۲۵/۰۰	۲۵
	۰/۳۵	۲۰/۰۷	۳۰/۰۰	۲۰/۰۰	۲۵/۰۰	۲۶
	-۰/۹۲	۲۴/۷۷	۳۰/۰۰	۲۵/۰۰	۲۵/۰۰	۲۷
	-۲/۵۷	۲۹/۲۳	۳۰/۰۰	۳۰/۰۰	۲۵/۰۰	۲۸
	-۵/۵۳	۳۷/۷۹	۳۰/۰۰	۴۰/۰۰	۲۵/۰۰	۲۹

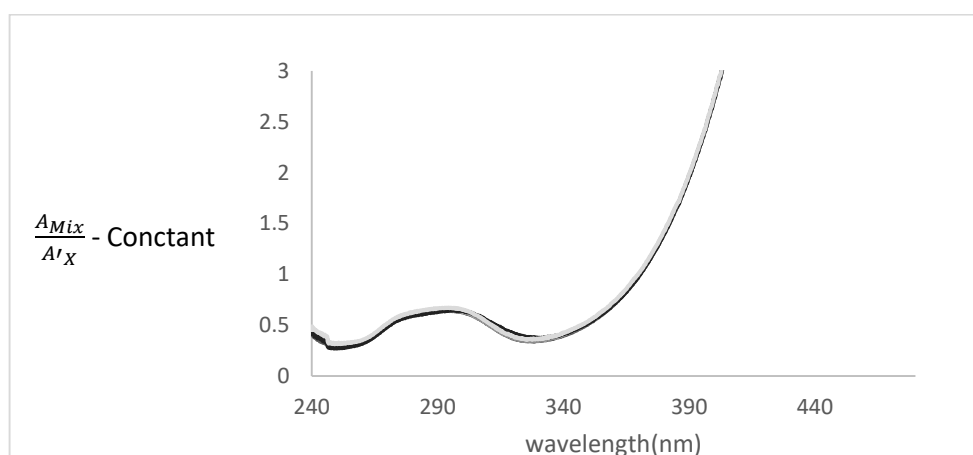
برای تعیین غلظت اورتو-نیتروآنیلین، ابتدا طیف‌های خالص مرتبه صفر به دست آمده برای متا-نیتروآنیلین (شکل ۳-۹)، به طیف مرتبه صفر محلول متا-نیتروآنیلین با غلظت معینی (مثلاً ۳۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر) تقسیم شد. طیف نسبی حاصل در دامنه ۳۲۷-۳۳۲ نانومتر دارای مقدار ثابتی برای هر مخلوط است (شکل ۳-۱۰). هم چنین طیف مخلوط‌های مورد ارزیابی بر طیف محلول متا-نیتروآنیلین با غلظت معین ۳۰/۰ میلی گرم بر لیتر تقسیم شد (شکل ۳-۱۱). در مرحله بعد ثابت به دست آمده برای هر مخلوط (شکل ۳-۱۰) از طیف نسبی مربوط به آن مخلوط (شکل ۳-۱۱) کم شد (شکل ۳-۱۲).



شکل ۳-۱۰: طیف نسبی حاصل از تقسیم طیف‌های ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۱۵/۰۰، ۲۰/۰۰ و ۲۵/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) متا-نیتروآنیلین (شکل ۳-۹) بر ۳۰/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) متا-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه

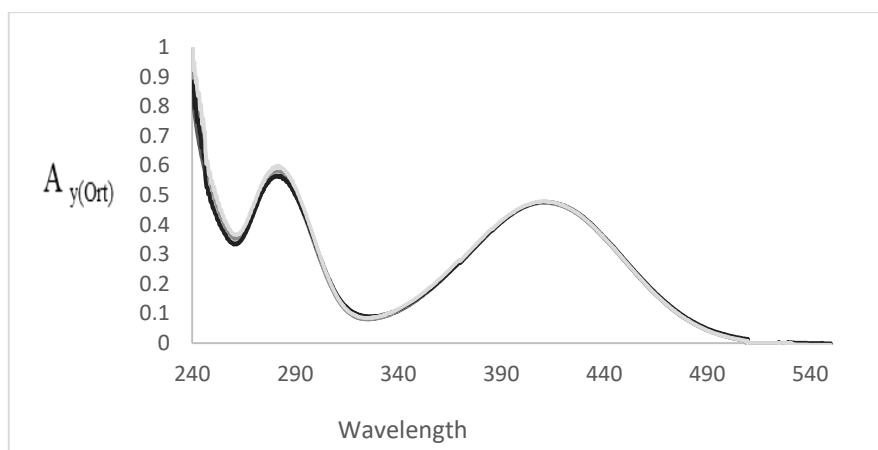


شکل ۳-۱۱: طیف‌های نسبی حاصل از تقسیم طیف مخلوط‌های حاوی ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۱۵/۰۰، ۲۰/۰۰ و ۲۵/۰۰ (میلی‌گرم بر لیتر) متا-نیتروآنیلین و ۱۵/۰۰ (میلی‌گرم بر لیتر) اورتو-نیتروآنیلین (A_{mix}) بر طیف ۳۰/۰ (میلی‌گرم بر لیتر) متا-نیتروآنیلین ($A'_{x(Met)}$)



شکل ۳-۱۲: طیف‌های جذبی نسبی حاصل از تقسیم طیف مخلوط‌های حاوی ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۱۵/۰۰، ۲۰/۰۰ و ۲۵/۰۰ (میلی‌گرم بر لیتر) متا-نیتروآنیلین و ۱۵/۰۰ (میلی‌گرم بر لیتر) اورتو-نیتروآنیلین بر طیف ۳۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین (مقسوم علیه)، بعد از کم کردن مقدار ثابت

در شکل ۳-۱۰، A_{Met} بیانگر جذب محلول‌های خالص مرتبه صفر متا-نیتروآنیلین و $A'_{x(Met)}$ در شکل‌های ۳-۱۱ و ۳-۱۲ بیانگر جذب محلول متا-نیتروآنیلین با غلظت معین (به عنوان مقسوم علیه) است. با ضرب طیف‌های تفاضل نسبی حاصل از مرحله قبل (شکل ۳-۱۲) در طیف محلول متا-نیتروآنیلین با غلظت معلوم به عنوان مقسوم علیه (۳۰/۱۰۰ میلی گرم بر لیتر)، طیف‌های خالص اورتو-نیتروآنیلین به دست آمد (شکل ۳-۱۳).



شکل ۳-۱۳: طیف جذبی مرتبه صفر ۱۵/۱۰۰ میلی گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین بعد از ضرب طیف‌های متناظر آن از شکل ۳-۱۲ در طیف محلول ۳۰/۱۰۰ میلی گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین

با استفاده از طیف‌های خالص مرتبه صفر به دست آمده، جذب در طول موج ماکزیمم اورتو-نیتروآنیلین اندازه‌گیری شد و در منحنی کالیبراسیون حاصل از محلول‌های استاندارد خالص اورتو-نیتروآنیلین قرار داده شد (شکل ۳-۵-الف) و غلظت گونه در هر مخلوط به دست آمد.

تأثیر غلظت متا-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه، بر خطای پیش بینی غلظت اورتو-نیتروآنیلین بررسی شد. بهینه‌سازی غلظت مقسوم علیه متا-نیتروآنیلین مانند بهینه‌سازی غلظت مقسوم علیه اورتو-نیتروآنیلین صورت گرفت و غلظت اورتو-نیتروآنیلین در هر مخلوط با استفاده از غلظت‌های مختلف متا-نیتروآنیلین (به عنوان مقسوم علیه) محاسبه گردید. برای انتخاب غلظت متا-

نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه بهینه، از شاخص‌های کمی که در مرحله قبل بکار برده شده بود (MSE و MRE) برای اندازه‌گیری غلظت اورتو-نیتروآنیلین برای سری ارزیابی استفاده گردید و نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۱۱-۳ آورده شده است.

جدول ۱۱-۳: نتایج حاصل از بهینه‌سازی غلظت متا-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه

غلظت متا-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه (mg L^{-1})	خطا (MSE) در پیش‌بینی غلظت اورتو-نیتروآنیلین	خطا (MRE) در پیش‌بینی غلظت اورتو-نیتروآنیلین
۱۰	۰/۰۷	۱/۵۵
۲۰	۰/۰۳۲	۱/۱۱
۳۰	۰/۰۳۸	۰/۹۳

نتایج حاصل از جدول ۱۱-۳ نشان می‌دهد که تغییر غلظت متا-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه، باعث تغییر در خطای حاصل از پیش‌بینی غلظت اورتو-نیتروآنیلین موجود در مخلوط‌های سری ارزیابی می‌شود که غلظت ۳۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر در این بین دارای میانگین نسبی خطای (MRE) کمتری برخوردار بوده و به عنوان مقسوم علیه در این مرحله انتخاب شد. نتایج حاصل از به کار بردن روش EXRSM برای پیش‌بینی غلظت متا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین موجود در محلول‌های سری تست، در جدول ۱۲-۳ آورده شده است. لازم به ذکر است در به‌دست آوردن غلظت محلول‌های سری تست، غلظت متا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین ۳۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر به عنوان مقسوم علیه به کار برده شد.

جدول ۳-۱۲: 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 (%)	
	اورتو- نیتروآنیلین	متا- نیتروآنیلین	اورتو- نیتروآنیلین	متا- نیتروآنیلین	اورتو- نیتروآنیلین	متا- نیتروآنیلین
۱	۵/۰۰	۱۲/۰۰	۴/۹۷	۱۲/۰۲	-۰/۶۰	۰/۱۷
۲	۵/۰۰	۱۸/۰۰	۴/۹۹	۱۷/۹۶	-۰/۲۰	-۰/۲۲
۳	۵/۰۰	۲۰/۰۰	۴/۹۸	۲۰	-۰/۴۰	۰/۰
۴	۱۲/۰۰	۶/۰۰	۱۲/۰۴	۵/۹۶	۰/۳۳	-۰/۶۷
۵	۱۲/۰۰	۱۲/۰۰	۱۱/۹۶	۱۲/۰۳	-۰/۳۳	۰/۲۵
۶	۱۲/۰۰	۱۸/۰۰	۱۲/۰۱	۱۷/۹۱	۰/۰۸	-۰/۵۰
۷	۱۲/۰۰	۲۰/۰۰	۱۲/۰۳	۱۹/۵۷	۰/۲۵	-۲/۱۵
۸	۱۸/۰۰	۱۲/۰۰	۱۷/۸۳	۱۲/۰۰	-۰/۹۴	۰/۰
۹	۱۸/۰۰	۱۸/۰۰	۱۷/۷۳	۱۷/۶۸	-۱/۴۰	-۱/۷۶
۱۰	۱۸/۰۰	۲۰/۰۰	۱۷/۹۱	۱۹/۳۲	-۰/۲۷	-۳/۴۰

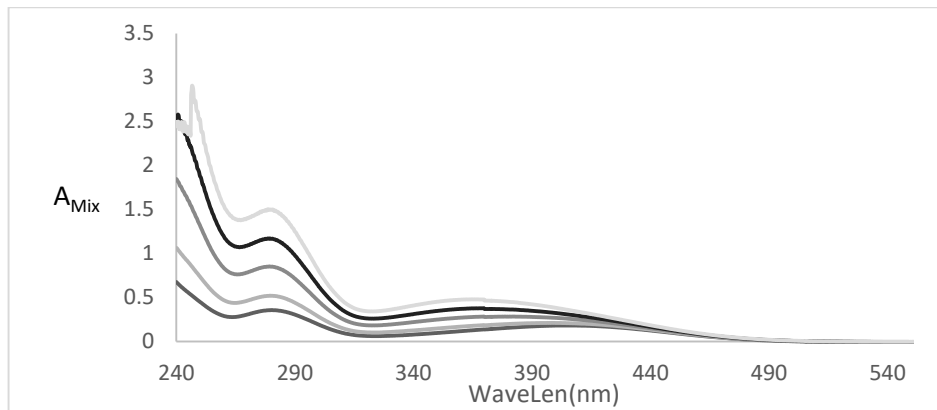
۳-۱۰- کاربرد روش افزایش استاندارد نقطه H نسبی (RHPSAM) برای

تعیین غلظت متا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین

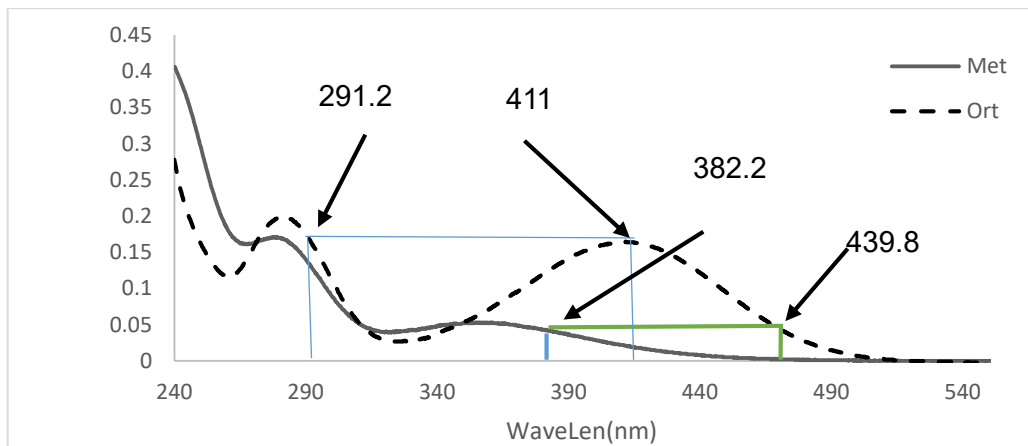
روش دیگری که برای اندازه‌گیری همزمان ایزومرهای متا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین استفاده شد روش افزایش استاندارد نقطه H نسبی است. این روش با در نظر گرفتن هر جفت طول موجی تقریباً می‌تواند به اندازه‌گیری همزمان متا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین بپردازد (شکل ۳-۱۵). این روش شامل دو مرحله است که به صورت زیر توضیح داده می‌شود.

در مرحله اول محلول‌های سری ارزیابی در جدول ۳-۱۰ بر طیف نرمال شده‌ی غلظت معینی از اورتو-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه تقسیم شد. طیف نرمال شده از تقسیم طیف مرتبه صفر خالص غلظت معینی از اورتو-نیتروآنیلین بر غلظت آن به دست می‌آید. در این مرحله مقسوم علیه را ثابت گرفته و هر دو طول موج بهینه شد، سپس دو جفت طول موج انتخاب شد. نتایج حاصل در جدول (۳-۱۳) آورده شده است. در شکل ۳-۱۴ طیف‌های مخلوط حاوی ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین با غلظت‌های ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰ و ۳۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین

آورده شده است. همچنین در شکل ۳-۱۵ طیف خالص ۵/۰۰ میلی گرم برلیتر متا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین آورده شده است. در این شکل طول موج‌های انتخابی نیز نشان داده شده است.



شکل ۳-۱۴: طیف‌های مخلوط حاوی غلظت‌های ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰ و ۳۰/۰۰ میلی گرم برلیتر متا-نیتروآنیلین با ۵/۰۰ میلی گرم برلیتر اورتو-نیتروآنیلین



شکل ۳-۱۵: طیف خالص ۵/۰۰ میلی گرم برلیتر متا-نیتروآنیلین (—) و اورتو-نیتروآنیلین (---)

جدول ۳-۱۳: نتایج داده های اماری کمی برای دو جفت طول موج انتخابی

MRE		MSE		طول موج
متا-نیتروآنیلین	اورتو-نیتروآنیلین	متا-نیتروآنیلین	اورتو-نیتروآنیلین	
۱/۲۹	۱/۶۹	۰/۲۱	۰/۱۱	۴۳۹/۸ و ۳۸۲/۲
۱/۶۵	۱/۶۱	۰/۲۶	۰/۱۲	۴۱۱ و ۲۹۱/۲

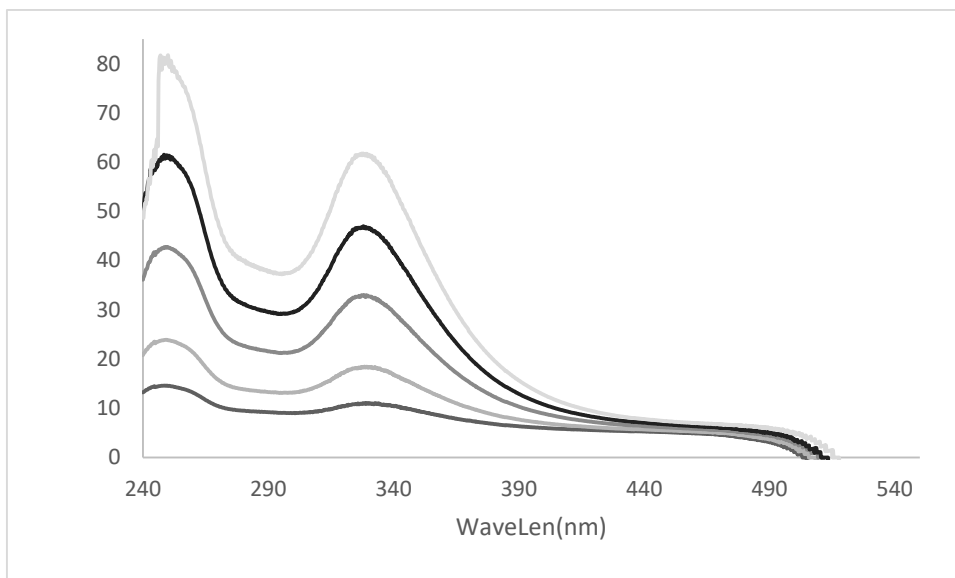
از جدول ۳-۱۳ نتیجه میگیریم که دو جفت طول موج انتخابی زیاد در نتایج با یکدیگر تفاوت ندارند. به دلیل اینکه جفت طول موج ۴۳۹/۸-۳۸۲/۲ مزاحمت های کمتری نسبت به جفت طول موج دیگر دارا می باشد، این طول موجها در محاسبات بعدی به کار برده شد. لازم به ذکر است که چندین جفت دیگر نیز بررسی گردید، که به دلیل خطای بالا از گزارش آنها صرف نظر شد. پس از انتخاب طول موجها، مرحله ی بعد مرحله انتخاب مقسوم علیه مناسب است. مرحله ی انتخاب مقسوم علیه دارای اهمیت زیادی است، به همین دلیل از طیف نرمال شده ی سه غلظت ۱۰ میلی گرم بر لیتر، ۲۰ میلی گرم بر لیتر و ۳۰ میلی گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین برای انتخاب مقسوم علیه استفاده شد. نتایج حاصل از این محاسبات در جدول ۳-۱۴ آورده شده است.

جدول ۳-۱۴: نتایج حاصل از مقسوم علیه های مختلف

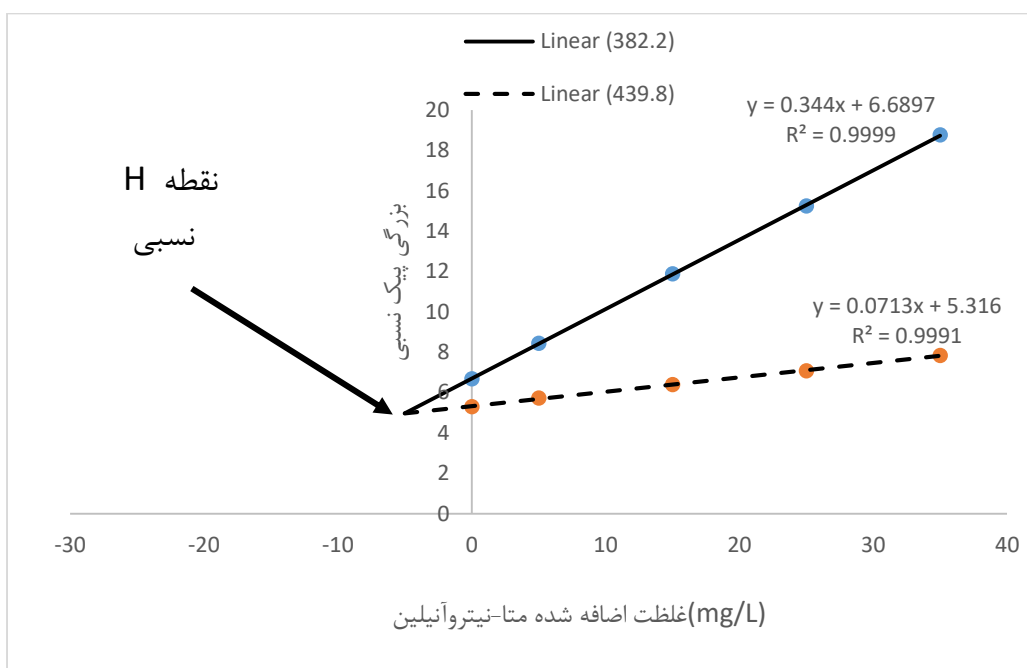
MRE		MSE		مقسوم علیه
متا-نیتروآنیلین	اورتو-نیتروآنیلین	متا-نیتروآنیلین	اورتو-نیتروآنیلین	
۳/۴۸	۲/۰۴	۰/۴۶	۰/۱۱	۱۰ (mg L ⁻¹)
۲/۰۲	۲/۴۴	۰/۲۸	۰/۲۴	۲۰ (mg L ⁻¹)
۱/۲۹	۱/۶۹	۰/۲۱	۰/۱۱	۳۰ (mg L ⁻¹)

با توجه به جدول بالا طیف نرمال شده‌ی ۳۰ میلی گرم برلیتر اورتو-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه برای مراحل بعدی انتخاب شد.

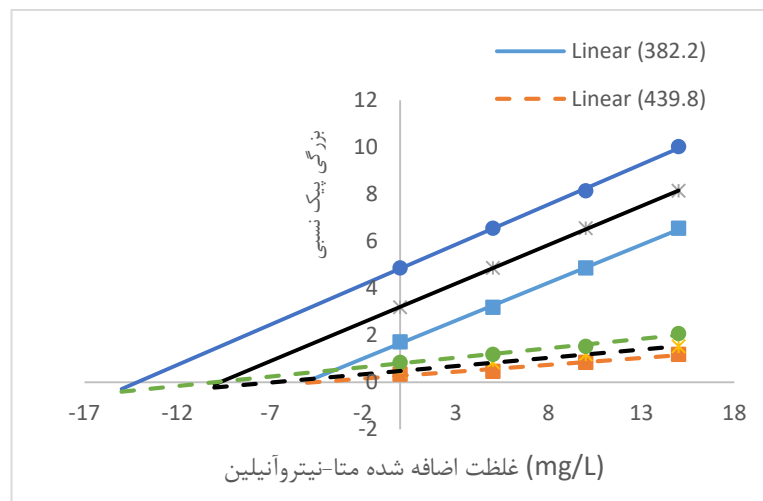
شکل ۳-۱۶ نشان دهنده طیف‌های نسبی حاصل تقسیم مخلوط‌های موجود در شکل ۳-۱۴ بر مقسوم علیه بهینه شده از اورتو-نیتروآنیلین می‌باشد. در شکل ۳-۱۷ نقطه‌ی H نسبی در یکی از مخلوط‌های سری ارزیابی برای درک بهتر، در شرایط بهینه، نشان داده شده است. این روش همچنین قادر به تعیین مقدار هر ایزومر در نمونه‌های خالص می‌باشد که این امر در شکل ۳-۱۸ و شکل ۳-۱۹ به خوبی نشان داده شده است. در شکل ۳-۱۸، نمونه‌ها فقط حاوی ایزومر متا-نیتروآنیلین با غلظت‌های مختلف می‌باشد که محل تقاطع دو خط، مقدار پیش بینی شده به وسیله روش RHPSAM را برای غلظت متا-نیتروآنیلین نشان می‌دهد. در شکل ۳-۱۹ نمونه‌ها فقط حاوی ایزومر اورتو-نیتروآنیلین با غلظت‌های مختلف می‌باشد که محل تقاطع آن‌ها باهم (عرض از مبدا برای هر جفت خط) برابر غلظت اورتو-نیتروآنیلین می‌باشد، در شکل ۳-۱۸ توجه نمایید که محل تقاطع دو خط، غلظت صفر متا-نیتروآنیلین را برای هر سه نمونه نشان می‌دهد. در شکل (۲۰-۳) نمودارهای افزایش استاندارد مخلوط‌های حاوی مقدار یکسانی از ایزومر متا-نیتروآنیلین و مقادیر مختلفی از ایزومر اورتو-نیتروآنیلین آورده شده است. در تمام این نمودارها مقدار اضافه شده متا-نیتروآنیلین است.



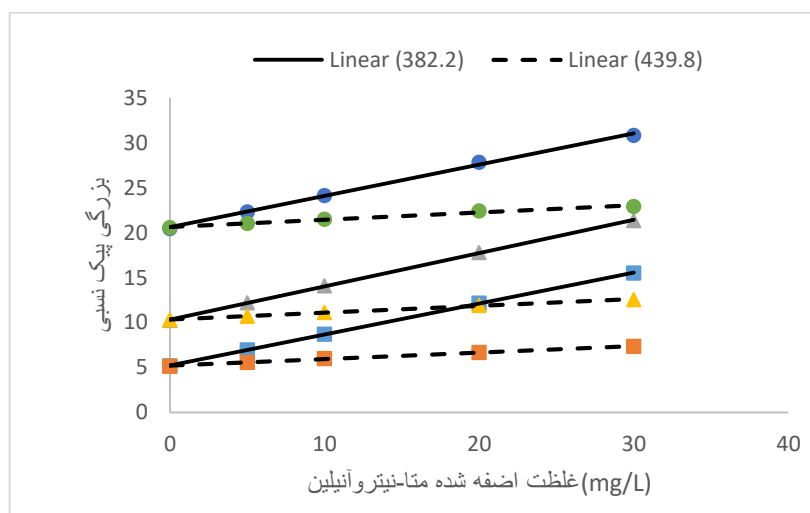
شکل ۳-۱۶: طیف نسبی حاصل از مخلوط‌های شکل ۳-۱۴ بر مقسوم علیه بهینه شده از اورتو-نیتروآنیلین



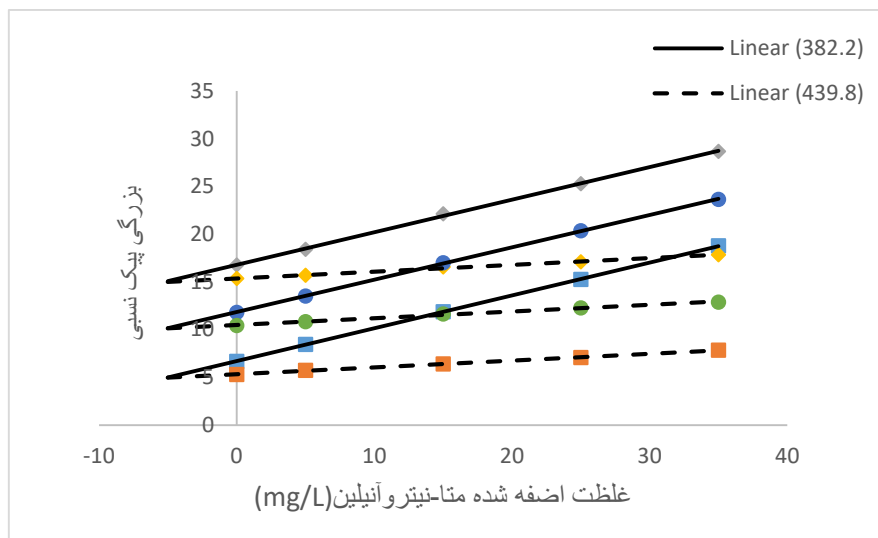
شکل ۳-۱۷: نمودار کالیبراسیون به همراه معادله برای مخلوط ۵ میلی گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین به همراه ۵ میلی گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین



شکل ۳-۱۸: نمودار روش افزایش استاندارد نقطه‌ی H نسبی برای محلول‌های خالص ۵، ۱۰، ۱۵ میلی گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین



شکل ۳-۱۹: نمودار روش افزایش استاندارد نقطه‌ی H نسبی برای محلول‌های خالص ۵، ۱۰، ۲۰ میلی گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین



شکل ۳-۲۰: نمودار کالیبراسیون روش افزایش استاندارد نقطه‌ی H نسبی برای مخلوط‌های مختلف حاوی ۵ میلی گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین با غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵ میلی گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین

نتایج حاصل از به کار بردن روش RHPSAM بر محلول‌های سری ارزیابی و سری تست در شرایط بهینه (مقسوم علیه ۳۰ میلی گرم بر لیتر و طول موج‌های ۳۸۲/۲ و ۴۳۹/۸ نانومتر)، در دو جدول ۳-۱۴ و ۳-۱۵ آورده شده است. معادلات کالیبراسیون برای مخلوط‌های سری ارزیابی نیز در هر طول موج حساب شده و تمام آنها در جدول (۳-۱۵) آورده شده است. معادلات موجود در جدول (۳-۱۵) نشان دهنده بزرگی پیک (دامنه) نسبی و C نشان دهنده غلظت متا-نیتروآنیلین بر حسب میلی گرم بر لیتر میباشد.

جدول ۳-۱۵: نتایج حاصل از به کارگیری روش RHPSAM برای پیش بینی غلظت اجزای در سری ارزیابی به همراه معادلات

خطای نسبی (%)		غلظت پیش‌بینی شده (mg L ⁻¹)		غلظت واقعی (mg L ⁻¹)		معادله کالیبراسیون	R ²	محلول
متا نیتروآنیلین	اورتو نیتروآنیلین	متا نیتروآنیلین	اورتو نیتروآنیلین	متا نیتروآنیلین	اورتو نیتروآنیلین			
۰/۸۰	-۰/۸۰	۵/۰۴	۴/۹۶	۵/۰۰	۵/۰۰	$p=۰/۳۴۴C+۶/۶۸۹۷$ $P=۰/۰۷۱۳C+۵/۳۱۶$	۰/۹۹۹۹ ۰/۹۹۹۹	۱
۰/۰۰	-۰/۲۰	۱۰/۰۰	۴/۹۹	۱۰/۰۰	۵/۰۰	$P=۰/۳۴۳۲C+۸/۴۲۵۲$ $P=۰/۰۷۰۲C+۵/۶۹۵۳$	۰/۹۹۹۹ ۰/۹۹۹۹	۲
۰/۷۵	-۱/۰۰	۲۰/۱۵	۴/۹۴	۲۰/۰۰	۵/۰۰	$P=۰/۳۴۴۱C+۱۱/۸۴۶$ $P=۰/۰۷۱۹C+۶/۳۷۵۲$	۰/۹۹۹۸ ۰/۹۹۸۸	۳
-۲/۵۰	۵/۸۰	۲۹/۲۵	۵/۲۹	۳۰/۰۰	۵/۰۰	$P=۰/۳۴۴۱C+۱۵/۳۵۷$ $P=۰/۰۶۳۵C+۷/۱۵۰۹$	۱ ۱	۴

•/λ•	1/3•	Δ/•4	1•/13	Δ/••	1•/••	$P=•/33λγC+11/λ34$ $P=•/•γ•1C+1•/$	•/999λ •/994Δ	Δ
1•/11	1/Δ•	9/λ9	1•/1Δ	1•/••	1•/••	$P=•/342C+13/Δ31$ $P=•/•γ19C+1•/λ6$	•/9999 •/99Δ4	6
-•/λ•	1/2•	19/λ4	1•/12	2•/••	1•/••	$P=•/342C + 16/9•9$ $P=•/•69λC + 11/Δ•9$	1 1	7
-2/Δγ	4/1•	29/22	1•/41	3•/••	1•/••	$P=•/3399C + 2•/3Δ$ $P=•/•63ΔC + 12/2γ1$		λ
1/••	-•/6•	Δ/•Δ	14/91	Δ/••	1Δ/••	$P=•/3432C + 16/64Δ$ $P=•/•γ•λC + 1Δ/2γ$	•/99λ9 •/9λ44	9
•/2•	-•/2γ	1•/•2	14/96	1•/••	1Δ/••	$P=•/3422C + 1λ/3λγ$ $P=•/•γ16C + 1Δ/6γ4$	1 1	1•
•/Δ3	-1/••	1Δ/•λ	14/λΔ	1Δ/••	1Δ/••	$P=•/34•λC + 19/9λ6$ $P=•/•γ16C + 1Δ/92γ$	1 1	11
1/1Δ	2/1•	2•/23	14/6λ	2•/••	1Δ/••	$P=•/34γ1C + 21/γ•4$ $P=•/•γγ9C + 16/2Δγ$	1 •/999λ	12
1/Δ6	-•/4•	2Δ/39	1Δ/•9	2Δ/••	1Δ/••	$P=•/3366C + 23/6•4$ $p=•/•6γ4C + 16/γγ$	1 1	13
2/9•	-•/6γ	3•/λγ	14/9•	3•/••	1Δ/••	$P=•/3366C + 2Δ/2λλ$ $P=•/•γ16C + 1γ/1•γ$	1 1	14
-1/4•	2/2•	4/93	2•/44	Δ/••	2•/••	$P=•/3342C + 22/•λ9$ $P=•/•γ•1C + 2•/γλγ$	•/9999 •/99λ1	1Δ
-•/19	2/4•	9/9λ	2•/4λ	1•/••	2•/••	$P=•/33ΔγC + 23/λ22$ $P=•/•γ19C + 21/199$	1 1	16
•/γ•	3/4•	2•/14	2•/6λ	2•/••	2•/••	$P=•/332γC + 2γ/2γ2$ $P=•/•63ΔC + 21/961$	•/999Δ 1	1γ
Δ/12	3/94	2λ/46	2•/γ9	3•/••	2•/••	$P=•/3399C + 3•/462$ $P=•/•63ΔC + 22/Δ9Δ$	1 1	1λ
1/••	-1/4λ	Δ/•Δ	24/63	Δ/••	2Δ/••	$P=•/34ΔΔC + 26/3γ6$ $P=•/•γλλC + 2Δ/•3$	1 •/99λ	19
-2/4•	-•/γ2	9/γ6	24/λ2	1•/•	2Δ/••	$P=•/33λλC + 2λ/122$ $P=•/•6γΔC + 2Δ/4λΔ$	•/999λ 1	2•
•/2•	-•/λλ	1Δ/•3	24/γλ	1Δ/•	2Δ/••	$P=•/334γC + 29/λ19$ $P=•/•γ3ΔC + 2Δ/λ11$		21
•/γ•	-1/4λ	2•/14	24/63	2•/•	2Δ/••	$P=•/339ΔC + 31/469$ $P=•/•γΔ9C + 26/16$		22
1/36	-1/γ2	2Δ/34	24/Δγ	2Δ/•	2Δ/••	$P=•/33γ1C + 23/11λ$ $P=•/•γΔ9C + 26/49λ$	1 1	23
1/33	-1/••	3•/4•	24/γΔ	3•/•	2Δ/••	$P=•/3329C + 24/λ6γ$ $P=•/•γ1γC + 26/92γ$	•/999Δ •/99λλ	24

جدول ۳-۱۶: نتایج حاصل از به کارگیری روش RHPSAM، برای پیش‌بینی غلظت اجزا در سری تست

خطای نسبی (%)		غلظت پیش‌بینی شده (mg L ⁻¹)		غلظت واقعی (mg L ⁻¹)		محلول
متا نیتروآنیلین	اورتو نیتروآنیلین	متا نیتروآنیلین	اورتو نیتروآنیلین	متا نیتروآنیلین	اورتو نیتروآنیلین	
۲/۶۷	-۰/۸۰	۱۲/۳۲	۴/۹۶	۱۲/۰۰	۵/۰۰	۱
۱/۶۷	-۰/۶۰	۱۸/۳۰	۴/۹۷	۱۸/۰۰	۵/۰۰	۲
۰/۷۰	۲/۰۰	۲۰/۱۴	۵/۱۰	۲۰/۰۰	۵/۰۰	۳
۱/۸۳	۱/۸۳	۶/۱۱	۱۲/۳۶	۶/۰۰	۱۲/۰۰	۴
-۰/۲۵	۱/۰۰	۱۱/۹۷	۱۲/۱۲	۱۲/۰۰	۱۲/۰۰	۵
۰/۰۶	-۱/۲۵	۱۸/۰۱	۱۱/۸۵	۱۸/۰۰	۱۲/۰۰	۶
۱/۳۰	۰/۴۲	۲۰/۲۶	۱۲/۰۵	۲۰/۰۰	۱۲/۰۰	۷
۰/۵۰	-۲/۱۱	۱۲/۰۶	۱۷/۶۲	۱۲/۰۰	۱۸/۰۰	۸

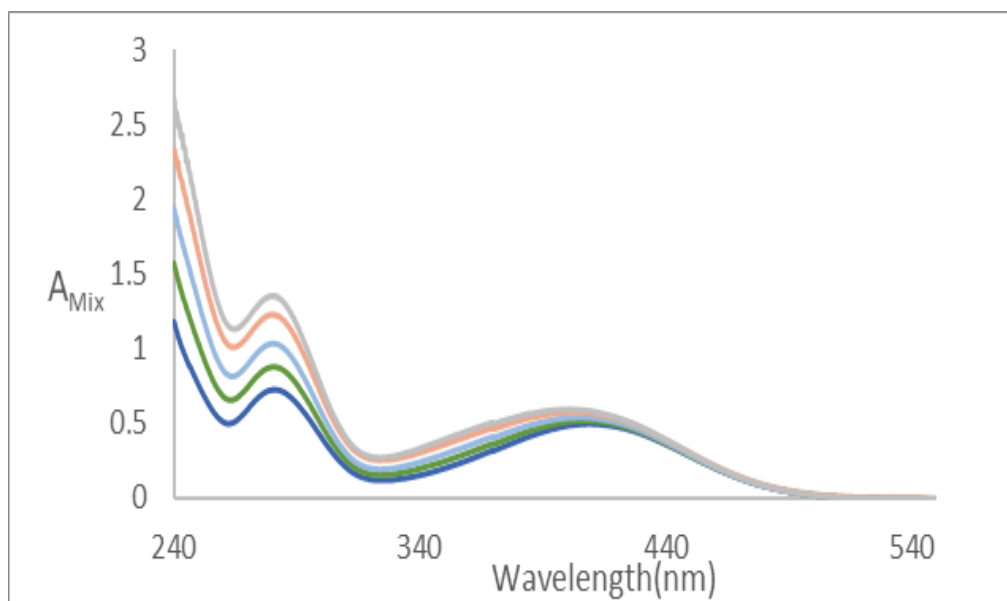
۳-۱۱- کاربرد روش مرکز ثابت ترکیب شده با تفریق طیف (CC-SS) برای

تعیین غلظت متا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین

در این قسمت اندازه‌گیری این ایزومرها با استفاده از روش مرکز ثابت ترکیب شده با تفریق طیف شرح داده می‌شود. ابتدا روش به‌دست آوردن غلظت‌های متا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین در یک سری از مخلوط‌های سری ارزیابی توضیح داده می‌شود. سپس روش بهینه‌سازی مقسوم علیه‌ها آورده می‌شود.

برای توضیح بهتر روش، مخلوط‌های سری ارزیابی انتخاب شدند که غلظت اورتو-نیتروآنیلین

موجود در مخلوط‌ها ثابت و غلظت متا-نیتروآنیلین در آن‌ها تغییر می‌کند. شکل (۲۱-۳)

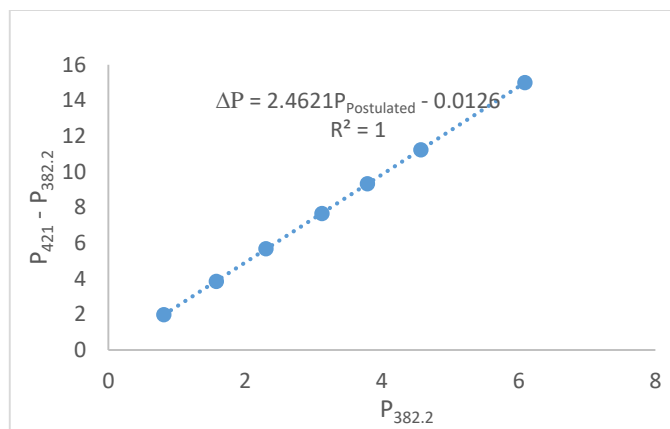


شکل ۳-۲۱: طیف‌های جذبی مخلوط‌های حاوی ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۱۵/۰۰، ۲۰/۰۰ و ۲۵/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) متا-نیتروانیلین و ۱۵/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) اورتو-نیتروانیلین در شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفات با $\text{pH} = 7.0$

این روش شامل دو بخش می‌باشد که در بخش اول غلظت متا-نیتروانیلین محاسبه شده و در بخش دوم غلظت اورتو-نیتروانیلین محاسبه می‌شود. بخش اول شامل چندین مرحله است، در مرحله اول باید مقدار P پیش بینی شده ($P_{\text{postulated}}$) به دست آید. برای انجام این کار طیف محلول‌های اورتو-نیتروانیلین خالص بر طیف خالص غلظت معینی از متا-نیتروانیلین (۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر) به عنوان مقسوم علیه تقسیم شد (شکل ۳-۲۳)، در طیف‌های نسبی به دست آمده و دو طول موج انتخاب شد و بزرگی طیف‌های (دامنه‌ها) نسبی (P_1 و P_2) در دو طول موج انتخاب شده اندازه‌گیری شد (جدول ۳-۱۷). از رسم اختلاف دامنه‌های نسبی ($\Delta P = P_2 - P_1$) بر حسب P_1 ، یک خط مستقیم به دست می‌آید (شکل ۳-۲۲)

جدول ۳-۱۷: نتایج حاصل از اندازه‌گیری دامنه‌ها در طیف‌های نسبی شکل ۳-۲۳ در روش CC-SS

$\Delta P = P_2 - P_1$	دامنه نسبی در λ_2 (P_2)	دامنه نسبی در λ_1 (P_1)	غلظت اورتو-نیتروآنیلین (mg/L)
۱/۹۸۵۴	۲/۷۹۳۱	۰/۸۰۷۷	۵/۰۰
۳/۸۵۴۱	۵/۴۳۱۰	۱/۵۷۶۹	۱۰/۰۰
۵/۶۸۱۵	۷/۹۸۲۸	۲/۳۰۱۳	۱۵/۰۰
۷/۶۵۴۱	۱۰/۷۷۵۹	۳/۱۲۱۸	۲۰/۰۰
۹/۳۱۵۰	۱۳/۱۰۳۵	۳/۷۸۸۴	۲۵/۰۰
۱۱/۲۲۲۶	۱۵/۷۹۳۱	۴/۵۷۰۵	۳۰/۰۰
۱۴/۹۹۶۵	۲۱/۰۸۶۲	۶/۰۸۹۷	۴۰/۰۰



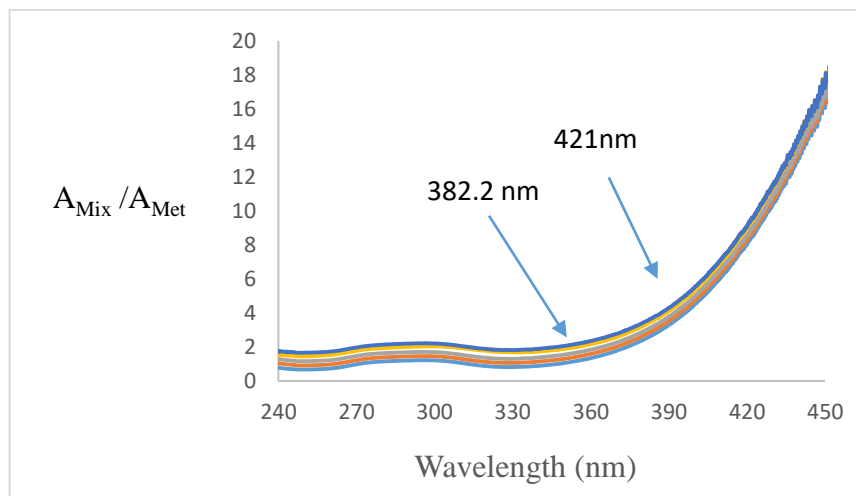
شکل ۳-۲۲: معادله‌ی خط بین اختلاف دامنه‌های نسبی ($P_{421} - P_{382.2}$) بر حسب دامنه‌ی نسبی در طول

موج ۳۸۲/۲

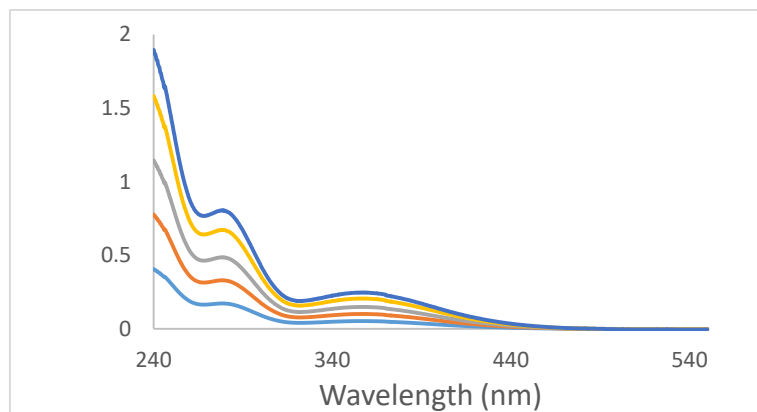
در مرحله دوم طیف هر مخلوط به همان مقسوم علیه که در مرحله قبل انتخاب شد تقسیم می‌شوند (شکل ۳-۲۳). در این مرحله نیز مقدار دامنه‌های نسبی ثبت شده و از یکدیگر کسر

می‌گردند (ΔP_{Mix}). به دست آمده را در معادله مرحله قبل قرار داده و مقدار P پیش بینی شده ($P_{\text{Postulated}}$) برای هر مخلوط به دست آمد.

در مرحله سوم مقدار ثابت از اختلاف بین مقدار P پیش بینی شده ($P_{\text{Postulated}}$) و دامنه ی ثبت شده در طول موج اول (P_{Recorded}) در هر مخلوط به دست آمد. در مرحله چهارم مقدار ثابت به دست آمده در طیف مرتبه ی صفر متا-نیتروآنیلین که به عنوان مقسوم علیه انتخاب شده بود (۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر) ضرب شد. حاصل این مرحله طیف مرتبه ی صفر متا-نیتروآنیلین است (شکل ۳-۲۴)، جذب در طول موج ماکزیمم هر طیف ثبت شده و با قرار دادن در معادله ی کالیبراسیون متا-نیتروآنیلین (شکل ۳-۵-ب) غلظت متا-نیتروآنیلین به دست آمد.



شکل ۳-۲۳: طیف‌های نسبی حاصل از تقسیم طیف مخلوط‌های حاوی ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۱۵/۰۰، ۲۰/۰۰ و ۲۵/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) متا-نیتروآنیلین و ۱۵/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) اورتو-نیتروآنیلین بر طیف ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین (مقسوم علیه)



شکل ۳-۲۴: طیف جذبی مرتبه صفر ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۱۵/۰۰، ۲۰/۰۰ و ۲۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین بعد از ضرب مقدار ثابت در طیف محلول ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین

جدول ۳-۱۸: نتایج حاصل از روش CC-SS برای مخلوط‌های شکل ۳-۲۱

مقدار ثابت C.V	P_{recorded} (P_1)	$P_{\text{postulated}}$	$\Delta P = P_2 - P_1$	دامنه نسبی در λ_1 (P_1)	دامنه نسبی در λ_2 (P_2)
۰/۲۷۰۲	۲/۵۹۶۲	۲/۳۲۶۰	۵/۷۱۴۲	۲/۵۹۶۲	۸/۳۱۰۳
۰/۵۱۶۷	۲/۸۴۶۲	۲/۳۲۹۵	۵/۷۲۲۸	۲/۸۴۶۲	۸/۵۶۹۰
۰/۷۶۱۲	۳/۰۸۹۷	۲/۳۲۸۶	۵/۷۲۰۶	۳/۰۸۹۷	۸/۸۱۰۳
۱/۰۵۲۸	۳/۴۱۶۷	۲/۳۶۳۷	۵/۸۰۷۵	۳/۴۱۶۷	۹/۲۲۴۱
۱/۲۶۰۲	۳/۶۰۹۰	۲/۳۴۸۸	۵/۷۷۰۳	۳/۶۰۹۰	۹/۳۷۹۳

طول موج های انتخابی در این مرحله برای دست یابی به دقت و صحت بیشتر با ثابت گرفتن مقسوم علیه بهینه شد. برای این کار از سه جفت طول موج استفاده شد و نتایج این محاسبات در جدول ۳-۱۹ آورده شده است.

جدول ۳-۱۹: نتایج حاصل از به کارگیری روش CC-SS با جفت طول موج‌های مختلف

طول موج	MSE	MRE
۴۲۱ و ۳۸۲/۲	/۰۲۷	۰/۸۳
۴۳۹/۸ و ۳۸۲/۲	۰/۱۰۸	۱/۷۷۴
۴۱۱ و ۲۹۱/۴	۰/۷۷۰	۱/۸۱۵

با توجه به جدول بالا نتایج حاصل از جفت طول موج ۴۲۱ و ۳۸۲/۲ از سایر طول موج‌ها بهتر است به همین دلیل از این طول موج‌ها برای مراحل بعدی استفاده شد. بعد از بهینه کردن طول موج مقسوم علیه نیز بهینه شد. نتایج آن در جدول ۲۰-۳ آورده شده است.

جدول ۳-۲۰: نتایج حاصل از بهینه سازی مقسوم علیه برای به دست آوردن غلظت متا-نیتروآنیلین

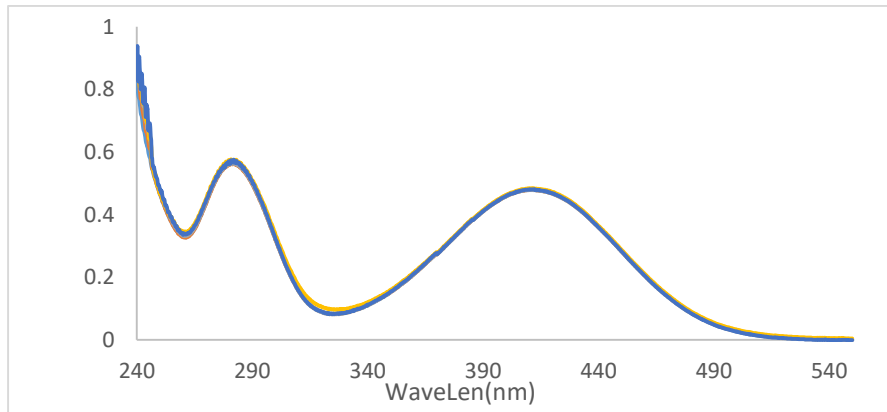
غلظت متا-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه (mg. L^{-1})	MSE	MRE
۱۰	۰/۱۹۴	۲/۲۷۵
۲۰	۰/۰۳۲	۰/۹۶
۳۰	۰/۰۸۱	۱/۳۸

با توجه به جدول ۳-۲۰ غلظت ۲۰ میلی گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین دارای کمترین خطا برای پیش بینی غلظت متا-نیتروآنیلین است، بنابراین از این غلظت به عنوان مقسوم علیه در محاسبات بعدی استفاده شد.

در بخش دوم غلظت اورتو-نیتروآنیلین اندازه گیری شد. در این مرحله با استفاده از طیف مرتبه‌ی صفر متا-نیتروآنیلین به دست آمده از مرحله‌ی قبل (شکل ۳-۲۴) و کم کردن آن از طیف مخلوط، طیف مرتبه صفر اورتو-نیتروآنیلین به دست آمد (شکل ۳-۲۵). سپس جذب در طول موج ماکزیمم هر طیف ثبت شده و با استفاده از معادله کالیبراسیون اورتو-نیتروآنیلین (شکل ۳-۵-الف) غلظت تعیین

شد. نتایج حاصل از این محاسبات برای مخلوط‌های سری ارزیابی و سری تست به ترتیب در جدول

۲۱-۳ و جدول ۲۲-۳ آورده شده است.



شکل ۲۵-۳: طیف‌های خالص اورتو-نیتروآنیلین ۱۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر حاصل از روش CC-SS

جدول ۲۱-۳: نتایج حاصل از به کارگیری روش CC-SS برای پیش‌بینی غلظت اجزا در سری ارزیابی

محلول	غلظت واقعی (mg L^{-1})		غلظت پیش‌بینی شده (mg L^{-1})		خطای نسبی (%)	
	اورتو نیتروآنیلین	متا نیتروآنیلین	اورتو نیتروآنیلین	متا نیتروآنیلین	اورتو نیتروآنیلین	متا نیتروآنیلین
۱	۵/۰۰	۵/۰۰	۵/۰۱	۴/۹۹	۰/۲۰	-۰/۲۰
۲	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۵/۰۴	۹/۹۸	۰/۸۰	-۰/۲۰
۳	۵/۰۰	۲۰/۰۰	۵/۰۹	۲۰/۱۰	۱/۸۰	-۰/۵۰
۴	۵/۰۰	۳۰/۰۰	۵/۱۳	۳۰/۱۰	۲/۶۰	-۰/۳۳
۵	۵/۰۰	۴۰/۰۰	۵/۲۲	۴۰/۱۰	۴/۴۰	-۰/۲۵
۶	۱۰/۰۰	۵/۰۰	۱۰/۰۱	۵/۰۹	۰/۱۰	۱/۸۰
۷	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰/۱۰	۱۰/۱۶	۱/۰۰	۱/۶۰
۸	۱۰/۰۰	۲۰/۰۰	۱۰/۱۲	۲۰/۱۶	۱/۲۰	-۰/۸۰
۹	۱۰/۰۰	۳۰/۰۰	۱۰/۲۲	۳۰/۰۶	۲/۲۰	-۰/۲۰
۱۰	۱۰/۰۰	۴۰/۰۰	۱۰/۲۰	۴۰/۰۶	۰/۰۰	-۰/۱۵
۱۱	۱۵/۰۰	۵/۰۰	۱۴/۹۲	۴/۹۸	-۰/۵۳	-۰/۴۰
۱۲	۱۵/۰۰	۱۰/۰۰	۱۴/۹۶	۱۰/۰۶	-۰/۲۷	-۰/۶۰
۱۳	۱۵/۰۰	۱۵/۰۰	۱۴/۹۸	۱۵/۰۳	-۰/۱۳	-۰/۲۰
۱۴	۱۵/۰۰	۲۰/۰۰	۱۴/۹۶	۲۰/۲۰	-۰/۲۷	۱/۰۰
۱۵	۱۵/۰۰	۲۵/۰۰	۱۵/۰۶	۲۴/۹۶	۰/۴۰	-۰/۱۶
۱۶	۱۵/۰۰	۳۰/۰۰	۱۵/۱۹	۳۰/۳۰	۱/۲۷	۱/۰۰
۱۷	۱۵/۰۰	۴۰/۰۰	۱۵/۲۲	۳۹/۷۰	۱/۴۷	-۰/۷۵
۱۸	۲۰/۰۰	۵/۰۰	۱۹/۹۵	۵/۲۹	-۰/۲۵	۵/۸۰

۲/۶۰	۰/۹۰	۱۰/۳۶	۲۰/۱۸	۱۰/۰۰	۲۰/۰۰	۱۹
۲/۳۰	۱/۲۰	۲۰/۴۶	۲۰/۲۴	۲۰/۰۰	۲۰/۰۰	۲۰
-۰/۲۰	۱/۲۵	۲۹/۹۴	۲۰/۲۵	۳۰/۰۰	۲۰/۰۰	۲۱
۰/۱۵	۰/۸۰	۴۰/۰۶	۲۰/۱۶	۴۰/۰۰	۲۰/۰۰	۲۲
-۰/۸۰	۰/۰۸	۴/۹۶	۲۵/۰۲	۵/۰۰	۲۵/۰۰	۲۳
۰/۴۰	۰/۱۶	۱۰/۰۴	۲۵/۰۴	۱۰/۰۰	۲۵/۰۰	۲۴
۰/۲۷	۰/۳۶	۱۵/۰۴	۲۵/۰۹	۱۵/۰۰	۲۵/۰۰	۲۵
۰/۲۰	۰/۶۰	۲۰/۰۴	۲۵/۱۵	۲۰/۰۰	۲۵/۰۰	۲۶
۰/۱۶	۰/۲۵	۲۵/۰۴	۲۵/۰۶	۲۵/۰۰	۲۵/۰۰	۲۷
-۰/۳۳	۰/۸۸	۲۹/۹۰	۲۵/۲۲	۳۰/۰۰	۲۵/۰۰	۲۸
-۰/۶۸	۱/۴۴	۳۹/۷۳	۲۵/۳۶	۴۰/۰۰	۲۵/۰۰	۲۹

جدول ۳-۲۲: نتایج حاصل از به کارگیری روش CC-SS برای پیش‌بینی غلظت اجزا در سری تست

خطای نسبی (%)		غلظت پیش‌بینی شده (mg L ⁻¹)		غلظت واقعی (mg L ⁻¹)		محلول
متا	اورتو	متا	اورتو	متا	اورتو	
نیتروآنیلین	نیتروآنیلین	نیتروآنیلین	نیتروآنیلین	نیتروآنیلین	نیتروآنیلین	۱
-۰/۲۵	-۱/۲۰	۱۱/۹۷	۴/۹۴	۱۲/۰۰	۵/۰۰	۱
۱/۳۹	۰/۴۰	۱۷/۷۵	۵/۰۲	۱۸/۰۰	۵/۰۰	۲
۱/۱۰	-۰/۱۰	۲۰/۲۲	۴/۹۹	۲۰/۰۰	۵/۰۰	۳
۳/۵۰	۱/۳۰	۶/۲۱	۱۲/۱۶	۶/۰۰	۱۲/۰۰	۴
۱/۰۰	۰/۴۲	۱۲/۱۲	۱۲/۰۵	۱۲/۰۰	۱۲/۰۰	۵
-۰/۰۶	۰/۵۸	۱۷/۹۹	۱۲/۰۷	۱۸/۰۰	۱۲/۰۰	۶
-۰/۱۰	۰/۰۸	۱۹/۸۰	۱۲/۰۱	۲۰/۰۰	۱۲/۰۰	۷
۰/۸۳	-۱/۱۰	۱۲/۱۰	۱۷/۸۰	۱۲/۰۰	۱۸/۰۰	۸
-۱/۵۶	-۱/۴۴	۱۷/۷۲	۱۷/۷۴	۱۸/۰۰	۱۸/۰۰	۹

۳-۱۱-۱- بررسی اثر مزاحمت‌ها در روش‌های اسپکتروفتومتری جدید

(CC-SS, RHPSAM, EXRSM)

برای بررسی توانایی روش‌ها در اندازه‌گیری همزمان دو ایزومر مد نظر در نمونه‌های حقیقی، اثر

مزاحمت گونه‌های مختلف در اندازه‌گیری همزمان آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. روش کار به این

صورت بود که میزان جذب محلول ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین یا ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر

اورتو-نیتروآنیلین به ترتیب در طول موج ماکزیمم ۳۵۶ و ۴۱۱ نانومتر در غیاب گونه مزاحم و در شرایط بهینه، برای ۵ مرتبه اندازه‌گیری شد و میانگین و انحراف استاندارد برای هر ترکیب محاسبه گردید. محدوده اطمینان با توجه به رابطه $\bar{A} \pm 3S_A$ به دست آمد (در این رابطه \bar{A} میانگین سیگنال تجزیه‌ای و S_A انحراف استاندارد سیگنال تجزیه‌ای برای هر یک از روش‌های اسپکتروفوتومتری است)؛ سپس برای بررسی اثر مزاحمت احتمالی هر گونه، گونه مورد نظر با نسبت ۱۰۰۰ برابر وزنی- وزنی، به نمونه حاوی هر کدام از ایزومرها اضافه گردید. سپس مقدار لازم از این محلول به دستگاه اسپکتروفوتومتر منتقل و مقدار جذب در طول موج ماکزیمم متا-نیتروآنیلین یا اورتو-نیتروآنیلین 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 آن قدر کاهش داده شد تا سیگنال در محدوده اطمینان قرار گیرد. نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۳-۲۳ آورده شده است.

جدول ۳-۲۳: نتایج حاصل از بررسی اثر گونه‌های مزاحم در اندازه‌گیری همزمان متا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین با غلظت‌های یکسان و برابر ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در روش EXRSM، RHPSAM و CC-SS

حد مجاز گونه مزاحم (وزنی- وزنی)	گونه‌های بررسی شده در اندازه‌گیری اورتو-نیتروآنیلین	گونه‌های بررسی شده در اندازه‌گیری متا-نیتروآنیلین
۱۰۰۰	NH ₄ ⁺ , Cl ⁻ , EDTA, SO ₄ ²⁻ , Ca ²⁺ , F ⁻ , Mn ²⁺ , Ba ²⁺ , I ⁻ , HCO ₃ ⁻ , Mg ²⁺ , Br ⁻ فنل، رزورسینول، هیدروکینون، اسید سیتربک، گلوکز،	NH ₄ ⁺ , Cl ⁻ , EDTA, SO ₄ ²⁻ , Ca ²⁺ , F ⁻ , Mn ²⁺ , Ba ²⁺ , I ⁻ , HCO ₃ ⁻ , Mg ²⁺ , Br ⁻ فنل، رزورسینول، هیدروکینون، اسید سیتربک، گلوکز،
۵۰۰	Al ³⁺ , SCN ⁻ , Zn ²⁺ , Li ⁺ آنیلین، پتاسیم هیدروژن فتالات،	Li ⁺ , SCN ⁻ پتاسیم هیدروژن فتالات، آنیلین،
۵۰	NO ₃ ⁻	NO ₃ ⁻ , Zn ²⁺
۱۰	Ni ²⁺	Ni ²⁺ , Al ³⁺
۱	*Cu ²⁺ , NO ₂ ⁻ , Fe ³⁺ , Fe ²⁺	*Cu ²⁺ , NO ₂ ⁻ , Fe ³⁺ , Fe ²⁺

برای روش‌های به کار برده شده، مزاحمت Fe²⁺، Fe³⁺ به دلیل تشکیل رسوب این کاتیون‌ها با فسفات ناشی از بافر است. علت مزاحمت NO₂⁻ به دلیل جذب بالای این ترکیب در ناحیه‌ی مورد

نظر است که ناشی از انتقالات n به π^* می باشد [۲۲]. برای رفع مزاحمت Cu^{2+} ابتدا به محلول حاوی کاتیون و نمونه دو قطره سود یک مولار اضافه شد تا تشکیل رسوب دهد بعد بافر اضافه شد سپس رسوب جدا شده و طیف محلول گونه گرفته شد.

۳-۱۱-۲- حد تشخیص روش EXRSM، RHPSAM و CC-SS

حد تشخیص یک روش، حداقل غلظت یا وزنی از آنالیت است که می تواند با سطح اطمینان مشخص آشکارسازی شود. برای محاسبه حد تشخیص از معادله ۱-۳ استفاده شد.

$$\text{LOD} = \frac{KS_{bl}}{m} \quad \text{معادله ۱-۳}$$

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 $K=3/00$ است. به منظور بررسی حد تشخیص روش های EXRSM، RHPSAM و CC-SS، ۱۰ اندازه گیری تکراری برای شاهد انجام شد و طیف هر محلول در محدوده طول موجی ۲۴۰-۵۵۰ نانومتر ثبت گردید. در این روش ها از تقسیم سه برابر انحراف استاندارد سیگنال شاهد بر شیب منحنی کالیبراسیون، حد تشخیص به دست آمد. با توجه به تعریف فوق، حد تشخیص روش EXRSM برای متا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین به ترتیب ۰/۲۹ و ۰/۰۹ میلی گرم بر لیتر و حد تشخیص روش CC-SS برای متا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین به ترتیب ۰/۰۳ و ۰/۰۹ میلی گرم بر لیتر به دست آمد. همچنین حد تشخیص روش RHPSAM برای متا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین به ترتیب ۰/۲۹ و ۰/۱ میلی گرم بر لیتر به دست آمد.

۳-۱۱-۳- دقت و صحت روش CC-SS و RHPSAM، EXRSM

برای بررسی دقت و صحت روش‌ها، مخلوط‌های متفاوتی از هردو ایزومر ساخته شد. برای هر یک از مخلوط‌ها ۵ بار اندازه‌گیری تکراری انجام شد و طیف هر مخلوط در محدوده طول موج ۲۴۰-۵۵۰ نانومتر ثبت گردید، سپس غلظت متا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین با استفاده از روش‌های نام برده تعیین شد. مقادیر انحراف استاندارد نسبی در هر حالت محاسبه شد. نتایج حاصل از این بررسی برای روش‌های CC-SS و RHPSAM، EXRSM در جدول ۳-۲۴ آورده شده است که نشان دهنده دقت و صحت خوب این روش‌ها می‌باشد.

جدول ۳-۲۴: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش‌ها

درصد بازیابی		RSD% (n=5)		میانگین مقدار پیش بینی شده در مخلوط (میلی گرم بر لیتر)		غلظت‌های موجود در مخلوط (میلی گرم بر لیتر)		روش مورد استفاده
متا نیتروآنیلین	اورتو نیتروآنیلین	متا نیتروآنیلین	اورتو نیتروآنیلین	متا نیتروآنیلین	اورتو نیتروآنیلین	متا نیتروآنیلین	اورتو نیتروآنیلین	
۱۰۰/۲	۱۰۰/۲	۱/۹۶	۱/۲۰	۵/۰۱	۵/۰۱	۵/۰۰	۵/۰۰	RHPSAM
۱۰۱/۳	۹۹/۹	۲/۰۶	۲/۱۸	۱۲/۱۵	۱۱/۹۹	۱۲/۰۰	۱۲/۰۰	
۱۰۰/۶	۹۹/۷	۲/۶۰	۱/۳۸	۱۸/۱۰	۱۱/۹۶	۱۸/۰۰	۱۲/۰۰	
۱۰۰/۸	۹۸/۸	۱/۰۶	-۰/۵۲	۱۵/۱۲	۲۴/۷۰	۱۵/۰۰	۲۵/۰۰	
۱۰۰/۰	۱۰۰/۰	۱/۶۰	۲/۰۰	۵/۰۰	۵/۰۰	۵/۰۰	۵/۰۰	EXRSM
۹۹/۸	۹۹/۷	۱/۶۰	-۰/۸۴	۱۱/۹۷	۱۱/۹۶	۱۲/۰۰	۱۲/۰۰	
۹۹/۱	۱۰۰/۰	۱/۷۴	-۰/۸۳	۱۷/۸۴	۱۲/۰۰	۱۸/۰۰	۱۲/۰۰	
۱۰۰/۳	۱۰۰/۰	-۰/۷۵	-۰/۴۸	۱۵/۰۴	۲۵/۰۱	۱۵/۰۰	۲۵/۰۰	
۹۹/۸	۹۹/۶	۱/۴۷	۱/۶۹	۴/۹۹	۴/۹۸	۵/۰۰	۵/۰۰	CC-SS
۹۹/۸	۱۰۰/۴	۱/۵۰	-۰/۸۳	۱۱/۹۸	۱۲/۰۵	۱۲/۰۰	۱۲/۰۰	
۱۰۰/۳	۱۰۰/۷	-۰/۹۰	۱/۲۰	۱۸/۰۶	۱۲/۰۸	۱۸/۰۰	۱۲/۰۰	
۱۰۰/۵	۱۰۰/۲	-۰/۸۶	-۰/۳۳	۱۵/۰۷	۲۵/۰۵	۱۵/۰۰	۲۵/۰۰	

۳-۱۱-۴- کاربرد روش های EXRSM، RHPSAM و CC-SS در

آنالیز نمونه‌های حقیقی

به منظور ارزیابی توانایی روش EXRSM، RHPSAM و CC-SS در اندازه‌گیری همزمان متا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین، اندازه‌گیری مقادیر ترکیبات ذکر شده در نمونه آب شهر و آب معدنی مورد بررسی قرار گرفت. برای تهیه نمونه‌های حقیقی از آب شهر شاهرود و آب معدنی بلورسا به عنوان بافت ثابت نمونه‌ها استفاده شد. برای تهیه محلول نمونه به صورت زیر عمل شد:

برای محلول نمونه‌ی اول (شماره ۱ و ۲) ابتدا ۷/۰۰ میلی‌لیتر محلول ۵۰۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین به یک بالن حجمی ۵۰ میلی‌لیتری و ۱۲/۰۰ میلی‌لیتر محلول ۵۰۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین به همان بالن حجمی ۵۰ میلی‌لیتری، انتقال داده شد و با آب شهر به حجم رسانده شد. سپس ۱/۰۰ میلی‌لیتر از محلول فوق را با حجم‌های مختلفی از محلول ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین به همراه ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفاتی $\text{pH} = 7$ در بالن‌های حجمی ۱۰ میلی‌لیتری منتقل کرده و طیف آن‌ها نسبت به شاهد ثبت و ذخیره گردید. سپس غلظت متا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین در مخلوط‌های تهیه شده، با استفاده از روش افزایش استاندارد مورد بررسی قرار گرفت.

برای مخلوط‌های سری دوم (شماره ۳ و ۴) به ترتیب ۱۳/۰۰ و ۱۲/۰۰ میلی‌لیتر از محلول‌های ۵۰۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از متا-نیتروآنیلین و پارا-نیتروآنیلین به بالن حجمی ۵۰ میلی‌لیتری منتقل شده و با آب شهر به حجم رسانده شد، در ادامه مانند مرحله‌ی قبل عمل شد.

برای مخلوط سوم (شماره ۵ و ۶) نیز مقدار ۶/۰۰ میلی‌لیتر از محلول ۵۰۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین و ۱۴/۰۰ میلی‌لیتر از محلول ۵۰۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اورتونیتروآنیلین برداشته و به بالن حجمی ۵۰ میلی‌لیتری منتقل کرده و با آب معدنی بلورسا به حجم رسانده شد. در ادامه مانند مراحل قبل عمل شد. نتایج حاصل از ۵ بار اندازه‌گیری تکراری برای تمام روش‌ها در جدول ۳-۲۵ آورده شده است.

جدول ۳-۲۵: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش‌ها در نمونه آب شهر و آب معدنی

درصد بازیابی		RSD% (n=5)		میانگین مقدار پیش بینی شده در مخلوط (میلی گرم بر لیتر)		غلظت‌های موجود در مخلوط (میلی گرم بر لیتر)		شماره		روش مورد استفاده
متا نیتروآنیلین	اورتو نیترو آنیلین	متا نیترو آنیلین	اورتو نیترو آنیلین	متا نیترو آنیلین	اورتو نیترو آنیلین	متا نیترو آنیلین	اورتو نیترو آنیلین			
۱۰۰/۵۷	۱۰۰/۰۸	۱/۱۴	۰/۶۷	۷/۰۴	۱۲/۰۱	۷/۰۰	۱۲/۰۰	۱	آب	EXRSM
۱۰۰/۴۴	۱۰۰/۰۸	۱/۰۶	۰/۹۵	۹/۰۴	۱۲/۰۱	۹/۰۰	۱۲/۰۰	۲	شهر	
۱۰۰/۴۶	۱۰۰/۰۸	۰/۸۷	۰/۸۳	۱۳/۰۶	۱۲/۰۱	۱۳/۰۰	۱۲/۰۰	۳		
۱۰۰	۱۰۰/۵۰	۱/۵۵	۰/۷۲	۱۵/۰۰	۱۲/۰۶	۱۵/۰۰	۱۲/۰۰	۴		
۱۰۰/۸۷	۱۰۰/۷۱	۱/۸۳	۰/۸۰	۶/۰۵	۱۴/۱۰	۶/۰۰	۱۴/۰۰	۵	آب	معدنی
۱۰۰/۵۲	۱۰۰/۴۰	۲/۴۹	۰/۹۴	۱۰/۰۵	۱۴/۰۶	۱۰/۰۰	۱۴/۰۰	۶		
۱۰۱/۹۵	۱۰۰/۴۷	۲/۷۸	۰/۸۱	۷/۱۴	۱۲/۰۶	۷/۰۰	۱۲/۰۰	۱	آب شهر	RHPSAM
۱۰۰/۹۲	۱۰۰/۰۸	۱/۰۴	۰/۹۷	۹/۰۸	۱۲/۰۱	۹/۰۰	۱۲/۰۰	۲		
۱۰۰/۳۱	۹۸/۸۵	۰/۹۰	۰/۷۵	۱۳/۰۴	۱۱/۸۶	۱۳/۰۰	۱۲/۰۰	۳		
۱۰۰/۳۴	۹۸/۹۲	۱/۸۰	۱/۵۰	۱۵/۰۵	۱۱/۸۷	۱۵/۰۰	۱۲/۰۰	۴		
۱۰۰/۷۵	۱۰۰/۵۸	۳/۲۵	۱/۴۳	۶/۰۵	۱۴/۰۸	۶/۰۰	۱۴/۰۰	۵	آب	معدنی
۱۰۱/۳۰	۱۰۱/۷۰	۱/۶۶	۱/۰۴	۱۰/۱۳	۱۴/۲۴	۱۰/۰۰	۱۴/۰۰	۶		
۱۰۰/۱۴	۱۰۰/۰۸	۱/۱۴	۰/۹۹	۷/۰۱	۱۲/۰۱	۷/۰۰	۱۲/۰۰	۱	آب شهر	CC-SS
۹۹/۱۸	۱۰۰/۳۳	۲/۰۳	۰/۸۳	۸/۹۲	۱۲/۰۴	۹/۰۰	۱۲/۰۰	۲		
۱۰۱/۲	۱۰۰/۳	۱/۴۰	۱/۶۷	۱۳/۱۵	۱۲/۰۳	۱۳/۰۰	۱۲/۰۰	۳		
۱۰۰/۳	۱۰۰/۸	۰/۶۶	۱/۱۰	۱۵/۰۴	۱۲/۰۹	۱۵/۰۰	۱۲/۰۰	۴		
۱۰۰/۲	۱۰۰/۶	۳/۴۶	۰/۸۱	۶/۰۱	۱۴/۰۸	۶/۰۰	۱۴/۰۰	۵		
۱۰۱/۵	۱۰۰/۵	۳/۱۰	۰/۸۴	۱۰/۱۵	۱۴/۰۷	۱۰/۰۰	۱۴/۰۰	۶		

این نتایج نشان می‌دهد که می‌توان غلظت هردو ایزومر را به‌طور همزمان با روش EXRSM.

در نمونه‌های آب شهر و آب معدنی با دقت و صحت خوبی تعیین کرد. RHPSAM, CC-SS

۳-۱۲- اندازه‌گیری همزمان پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین با استفاده از

روش‌های اسپکتروفتومتری جدید

با توجه به اهمیت و کاربردهای پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین که در فصل اول به آن‌ها اشاره گردید، ارائه روشی حساس، ساده و گزینش‌پذیر برای اندازه‌گیری مقادیر بسیار کم آن‌ها ضروری است. در این فصل سعی بر آن است که از سه روش اسپکتروفتومتری جدید برای اندازه‌گیری همزمان این دو ایزومر استفاده شود.

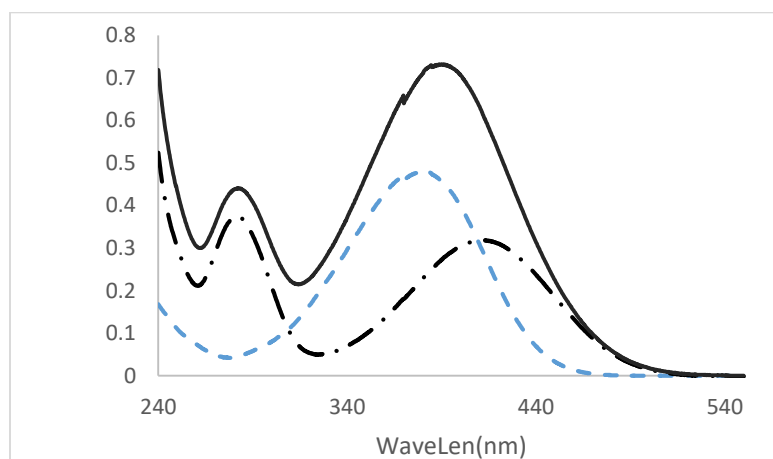
۳-۱۳- محلول‌های مورد استفاده و طرز تهیه آن‌ها

محلول‌های مادر پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین با غلظت‌های ۵۰۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر، از انحلال ۰/۰۵۰۰ گرم ماده خالص این دو ترکیب بطور جداگانه در ۶ میلی لیتر اتانول در دو بالن حجمی ۱۰۰ میلی لیتری و رقیق کردن آن با آب مقطر تهیه شدند. محلول‌های رقیق‌تر روزانه 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 اختلاط حجم‌های معین از محلول‌های ۰/۰۶۰ مولار دی‌سدیم هیدروژن فسفات و ۰/۰۶۰ مولار 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. [۳۸].

۳-۱۴- طیف جذبی

طیف جذبی محلول‌های پارا-نیتروآنیلین، اورتو-نیتروآنیلین و مخلوط حاوی این دو گونه برای مقایسه در گستره طول‌موج ۲۴۰-۵۵۰ نانومتر در شکل ۳-۲۶ 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 پارا-نیتروآنیلین یا ۲/۰۰ میلی‌لیتر محلول اورتو-نیتروآنیلین 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. محلول موردنظر تا حجم ۱۰/۰۰ میلی‌لیتر با آب مقطر رقیق گردید. مقداری از این محلول را پس از یکنواخت کردن به داخل سل اسپکتروفتومتر منتقل و طیف جذبی هر یک نسبت به شاهد در ناحیه ۲۴۰-۵۵۰ نانومتر، ثبت شد (شکل ۳-۲۶). تهیه شاهد نیز مانند مراحل فوق بود، با این تفاوت که به بالن حجمی هیچ غلظتی از دو ترکیب اضافه نشد.



شکل ۳-۲۶: طیف جذبی ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین (---)، طیف جذبی ۱۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین (·-·-·) و طیف جذبی مخلوط ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین با غلظت ۱۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از هر یک در pH=۷/۰ (—)

همان‌طور که در شکل ۳-۲۶، مشاهده می‌شود، طول موج ماکزیمم برای پارا-نیتروآنیلین ۳۸۱ نانومتر و برای اورتو-نیتروآنیلین ۴۱۱ نانومتر و ۲۸۰ نانومتر می‌باشد. با توجه به زیاد بودن مزاحمت‌های طیفی در محدوده زیر ۳۰۰ نانومتر در جذب، طول موج (۲۸۰ نانومتر) این ترکیب‌ها به عنوان طول موج ماکزیمم انتخاب شده است. همان‌طور که در شکل ۳-۲۶ مشاهده می‌شود، امکان اندازه‌گیری 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 اسپکتروفوتومتری ارائه شده جدید استفاده شد [۲۴]. شکل ۳-۲۶ نشان می دهد که پیک های جذبی در طول موج های ۳۸۱ و ۴۱۱ نانومتر به ترتیب با غلظت پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین 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.

۳-۱۵- بررسی و بهینه سازی متغیرهای موثر بر حساسیت روش های اندازه گیری

پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین

به منظور فراهم کردن بهترین گزینش پذیری و حساسیت و در نتیجه حد تشخیص بهتر، متغیرهایی که بر میزان جذب این دو ترکیب در طول موج ماکزیمم تاثیر دارند مورد بررسی قرار گرفت و بهینه شد. در این بررسی ها از روش بهینه سازی 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 می شود 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 تجزیه ای مورد بحث قرار می دهیم. برای بهینه سازی متغیرها به این صورت عمل شد که یک بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری، ۲/۰۰

^۱ One-at-a time

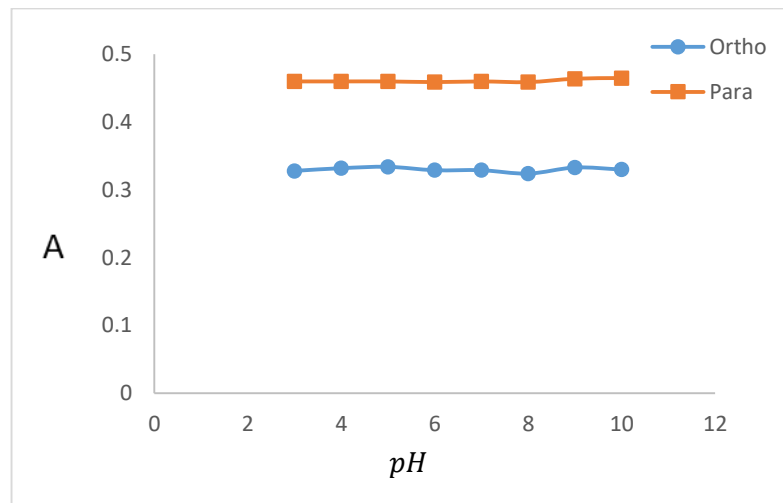
میلی لیتر از بافر مورد نظر و ۲/۰۰ میلی لیتر از محلول ۵۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین و یا ۲/۰۰ میلی لیتر از محلول ۵۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین اضافه گردید، این محلول با آب مقطر تا خط نشانه به حجم رسانده شد. برای تهیه محلول شاهد نیز مانند روش فوق عمل شد، با این تفاوت که به محلول شاهد، هیچ غلظتی از اورتو-نیتروآنیلین و متا-نیتروآنیلین اضافه نشد.

۳-۱۵-۱- بررسی اثر pH

اثر pH بر جذب و طول موج ماکزیمم جذب اورتو-نیتروآنیلین و متا-نیتروآنیلین در ناحیه ۱۰/۰ - ۳/۰ مورد بررسی قرار گرفت. این بررسی در حضور غلظت ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین و ۱۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین و ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفاتی انجام شد. نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۳-۲۶ و شکل ۳-۲۷ نشان داده شده است. نتایج نشان داد مقادیر جذب و طول موج ماکزیمم جذب برای پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین به ترتیب در ۲۷۲ و ۲۸۶/۵ نانومتر، در دامنه ۱۰/۰ - ۳/۰ pH ثابت است. به دلیل وجود گروه کشنده الکترون (NO_2) بر روی حلقه آروماتیک زوج الکترون غیر پیوندی گروه آمین هم از طریق القایی و هم از طریق رزونانس در گیر حلقه آروماتیک می شود که به همین دلیل تغییرات pH تاثیر چندانی بر انتقال در این ناحیه ندارد، به همین دلیل در محدوده‌ی مورد نظر انتقال ثابت است. اما در pH های پایین تر به دلیل این که H^+ خیلی قوی تر و واکنش پذیر تر است می تواند با زوج الکترون گروه آمین واکنش دهد و باعث از بین رفتن برخی از انتقال شود. لذا با در نظر گرفتن گزینش پذیری روش و با توجه به این که pH این ترکیبات نزدیک به pH=۷/۰ می باشد و در مقالات نیز از این pH استفاده شده است، محلول بافری با pH= ۷/۰ برای مطالعات و بررسی های بعدی انتخاب گردید.

جدول ۳-۲۶: نتایج حاصل از بررسی اثر pH

pH	طول موج ماکزیمم پارا- نیتروآنیلین	جذب پارا- نیتروآنیلین	طول موج ماکزیمم اورتو- نیتروآنیلین	جذب اورتو- نیتروآنیلین
۳/۰	۳۸۱	۰/۴۶۰	۴۱۱	۰/۳۲۸
۴/۰	۳۸۱	۰/۴۶۰	۴۱۱	۰/۳۳۲
۵/۰	۳۸۱	۰/۴۶۰	۴۱۱	۰/۳۳۴
۶/۰	۳۸۱	۰/۴۵۹	۴۱۱	۰/۳۲۹
۷/۰	۳۸۱	۰/۴۶۰	۴۱۱	۰/۳۲۹
۸/۰	۳۸۱	۰/۴۵۹	۴۱۱	۰/۳۲۴
۹/۰	۳۸۱	۰/۴۶۴	۴۱۱	۰/۳۳۳
۱۰/۰	۳۸۱	۰/۴۶۵	۴۱۱	۰/۳۳۰



شکل ۳-۲۷: بررسی اثر pH شرایط: ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفاتی و غلظت ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین و ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین

۳-۱۵-۲- بررسی نوع بافر با pH= ۷/۰

پس از بررسی اثر pH بر روی میزان جذب، برای دستیابی به حساسیت بیشتر، اثر نوع بافر نیز مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام این کار ابتدا محلول های بافر با pH= ۷/۰ از نوع فسفاتی و سیتراتی مطابق بخش ۳-۲- تهیه شد و اثر نوع بافر بر سیگنال تجزیه ای پارا-نیتروآنیلین و اورتو- نیتروآنیلین مورد بررسی قرار گرفت. برای این بررسی ها به یک بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری حاوی

۱/۰۰ میلی لیتر از محلول ۵۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین یا ۲/۰۰ میلی لیتر از محلول ۵۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین به اضافه‌ی ۲/۰۰ میلی لیتر از بافر مورد نظر اضافه و تا خط نشانه بالن با آب مقطر به حجم رسانده شد. برای تهیه محلول شاهد مانند روش فوق عمل شد، با این تفاوت که به محلول شاهد، از گونه‌های مورد نظر اضافه نگردید. سپس جذب هر محلول در طول موج ماکزیمم جذب خودش اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل در جدول ۳-۲۷ نشان داده شده است. نتایج حاصل شده نشان داد سیگنال تجزیه‌ای در حضور بافر فسفاتی با $\text{pH} = 7.0$ و سیتراتی با هم برابر است. با توجه به اینکه ظرفیت بافر فسفاتی بیشتر از بافر فسفاتی است، بافر فسفاتی برای بررسی‌های بعدی انتخاب شد. لازم به ذکر است با توجه به تغییر طول موج‌ها، می‌توانستیم در حضور بافر فتالاتی بررسی را انجام دهیم.

جدول ۳-۲۷: نتایج حاصل از بررسی نوع بافر

نوع بافر	جذب پارا نیتروآنیلین در طول موج ۳۸۱ نانومتر	جذب اورتو نیتروآنیلین در طول موج ۴۱۱ نانومتر
سیتراتی	۰/۴۶۳	۰/۳۳۱
فسفاتی	۰/۴۶۲	۰/۳۲۹

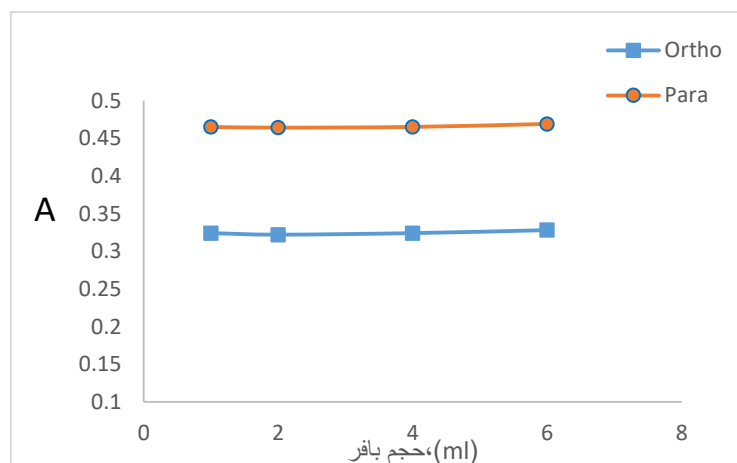
۳-۱۵-۳- بررسی حجم بافر

اثر حجم بافر فسفاتی در $\text{pH} = 7.0$ در دامنه ۶/۰۰- ۱/۰۰ میلی لیتر مورد بررسی قرار گرفت. این بررسی در حضور محلول ۵۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین یا اورتو-نیتروآنیلین انجام شد. این بررسی به این صورت انجام شد که ۱/۰۰ میلی لیتر محلول پارا-نیتروآنیلین یا ۲/۰۰ میلی لیتر محلول اورتو-نیتروآنیلین ۵۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر، به یک بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری 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 از دو

ترکیب فوق افزوده نشد. جذب محلول نمونه نسبت به محلول شاهد در طول موج ماکزیمم جذب مربوط اندازه گیری شد. نتایج حاصل از این بررسی جدول ۳-۲۸ و شکل ۳-۲۸ نشان داده شده است. نتایج نشان می دهد که در حجم های متفاوت بافر، سیگنال تجزیه ای ثابت و یکسان است. در بررسی های بعدی برای اطمینان از کافی بودن ظرفیت بافری حجم ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفاتی $pH=7/0$ انتخاب شد.

جدول ۳-۲۸: نتایج حاصل از بررسی حجم بافر فسفاتی

جذب اورتو نیتروآنیلین در طول موج ۴۱۱ نانومتر	جذب پارا-نیتروآنیلین در طول موج ۳۸۱ نانومتر	حجم بافر (میلی لیتر)
۰/۳۲۲	۰/۴۶۵	۱/۰۰
۰/۳۲۲	۰/۴۶۴	۲/۰۰
۰/۳۲۴	۰/۴۶۵	۴/۰۰
۰/۳۲۸	۰/۴۶۹	۶/۰۰



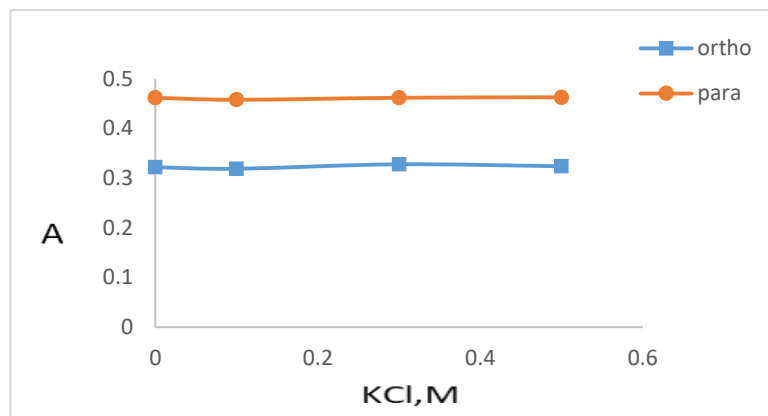
شکل ۳-۲۸: بررسی اثر حجم بافر فسفاتی با $pH=7/0$ در حضور غلظت ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین (۳۸۱ نانومتر) و ۱۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین (۴۱۱ نانومتر)

۳-۱۵-۴- بررسی اثر قدرت یونی

تأثیر قدرت یونی بر سیگنال تجزیه‌ای پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین 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 پارا-نیتروآنیلین یا ۲/۰۰ میلی‌لیتر محلول اورتو-نیتروآنیلین ۵۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفاتی pH= ۷/۰، به همراه حجم‌های مختلفی از محلول نمک KCl ۱/۰۰ مولار به یک بالن حجمی ۱۰ میلی‌لیتری منتقل شد و با آب مقطر تا خط نشانه بالن، رقیق گردید (محلول نمونه). سپس قسمتی از آن به سل دستگاه منتقل شد. محلول شاهد همانند محلول نمونه تهیه شد، با این تفاوت که به آن اورتو-نیتروآنیلین، پارا-نیتروآنیلین و یا KCl افزوده نشد. جذب محلول نمونه نسبت به محلول شاهد در طول موج ماکزیمم جذب مربوطه اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل در جدول ۳-۲۹ و شکل ۳-۲۹ نشان داده شده است. نتایج به‌دست آمده بیانگر این است که قدرت یونی بر جذب پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین اثری ندارد.

جدول ۳-۲۹: نتایج حاصل از بررسی اثر قدرت یونی

غلظت پتاسیم کلرید (مولار)	جذب پارا نیتروآنیلین در طول موج ۳۸۱ نانومتر	جذب اورتو نیتروآنیلین در طول موج ۴۱۱ نانومتر
۰/۰۰	۰/۴۶۲	۰/۳۲۲
۰/۱۰	۰/۴۵۸	۰/۳۱۹
۰/۳۰	۰/۴۶۲	۰/۳۲۸
۰/۵۰	۰/۴۶۳	۰/۳۲۴



شکل ۳-۲۹: بررسی اثر قدرت یونی. شرایط: محلول‌های ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین (۳۸۱ نانومتر) و ۱۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین (۴۱۱ نانومتر)، در حضور ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفاتی با $\text{pH} = 7/0$

۳-۱۶- شرایط بهینه

با توجه به نتایج تجربی حاصل از بررسی و بهینه‌سازی پارامترهای موثر بر میزان جذب در طول موج‌های ماکزیمم مربوط به دو ایزومر مد نظر، ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفاتی با $\text{pH} = 7/0$ انتخاب شد و در آزمایش‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

۳-۱۶-۱- تعیین دامنه خطی پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین به صورت جداگانه

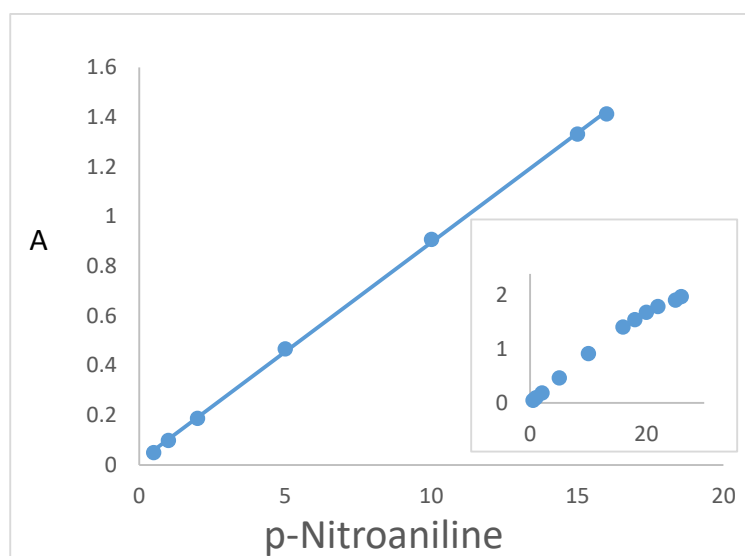
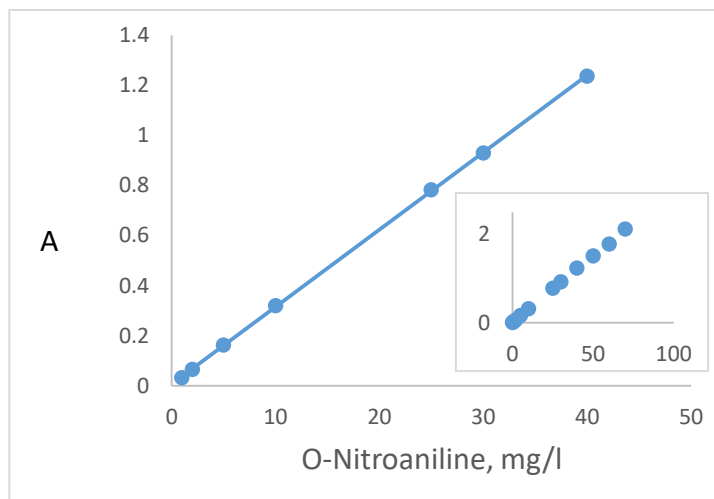
منحنی کالیبراسیون برای اندازه‌گیری پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین به طور جداگانه در شرایط بهینه برای هر یک به دست آمد. روش کار برای استخراج منحنی کالیبراسیون منفرد برای هر کدام از ترکیبات به صورت زیر بود. به بالن حجمی ۱۰ میلی‌لیتری، ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفاتی با $\text{pH} = 7/0$ و مقادیر متفاوت از دو ایزومر به صورت جداگانه اضافه و با آب مقطر تا خط نشانه بالن رقیق گردید. مقداری از محلول به سل دستگاه اسپکتروفتومتر منتقل شده و جذب هر محلول در طول موج ماکزیمم ۳۸۱ و ۴۱۱ نانومتر به ترتیب برای پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین نسبت به محلول شاهد اندازه‌گیری و ثبت گردید و نتایج حاصل در جدول ۳-۳۰ آورده شد.

جدول ۳-۳۰: نتایج حاصل برای رسم منحنی کالیبراسیون پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین به صورت مجزا

جذب محلول اورتو نیتروآنیلین در طول موج ۴۱۱ نانومتر	جذب محلول پارا- نیتروآنیلین در طول موج ۳۸۱ نانومتر	غلظت (میلی گرم بر لیتر)
۰/۰۰۸		۰/۱۰
۰/۰۱۴		۰/۲۰
-	۰/۰۴۸	۰/۵۰
۰/۰۳۳	۰/۰۹۶	۱/۰۰
۰/۰۶۴	۰/۱۸۸	۲/۰۰
۰/۱۶۳	۰/۴۶۷	۵/۰۰
۰/۳۲۴	۰/۹۱۹	۱۰/۰۰
۰/۴۸۰	۱/۳۳۳	۱۵/۰۰
-	۱/۴۱۴	۱۶/۰۰
-	۱/۵۴۷	۱۸/۰۰
۰/۴۶۲	۱/۶۸۴	۲۰/۰۰
-	۱/۷۹۳	۲۲/۰۰
۰/۷۹۲	۱/۹۱۱	۲۵/۰۰
-	۱/۹۸	۲۶/۰۰
۰/۹۴۷	-	۳۰/۰۰
۱/۲۶۷	-	۴۰/۰۰
۱/۵۱۴	-	۵۰/۰۰
۱/۷۸۳	-	۶۰/۰۰
۲/۱۲۳	-	۷۰/۰۰

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

نتایج به دست آمده در شکل ۳-۳۰ و در جدول ۳-۳۱، آمده است.



شکل ۳-۳۰: الف: منحنی کالیبراسیون اورتو-نیتروآنیلین، ب: منحنی کالیبراسیون پارا-نیتروآنیلین. تحت شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفات با pH= ۷/۰

جدول ۳-۳۱: نتایج حاصل از کالیبراسیون تک متغیره

اورتو نیتروآنیلین ($\lambda_{\max} = 411 \text{ nm}$)	پارا-نیتروآنیلین ($\lambda_{\max} = 381 \text{ nm}$)	ترکیب
۲/۰۰ - ۴۰/۰۰	۰/۵۰ - ۱۵/۰	ناحیه خطی (میلی گرم بر لیتر)
$A = 0.0307 C_{\text{Ort}} + 0.1$ (n=۶)	$A = 0.0917 C_{\text{Par}} + 0.0045$ (n=۵)	معادله رگرسیون
۰/۹۹۹۹	۰/۹۹۹۹	R^2

در جدول ۳-۳۱، A سیگنال تجزیه‌ای مربوط به هر گونه (جذب محلول نمونه نسبت به محلول شاهد) در طول موج مربوط به هر گونه، C_{Par} و C_{Ort} به ترتیب، غلظت پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین بر حسب میلی‌گرم بر لیتر و R^2 مجذور ضریب همبستگی برای هر نمودار است.

۳-۱۶-۲- محلول‌سازی و کالیبراسیون یک متغیره

به منظور بهینه‌سازی پارامترها و رسیدن به بهترین صحت در روش‌های به کار شده در این پروژه، محلول‌های سری کالیبراسیون (محلول‌های خالص استاندارد)، محلول‌های سری ارزیابی و سری تست تهیه و طیف آن‌ها نسبت به محلول شاهد در دامنه ۲۴۰-۵۵۰ نانومتر ثبت گردید و مورد بررسی قرار گرفت. محلول‌های سری تست و سری ارزیابی از انتقال مقادیر مختلف این دو ایزومر به همراه ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفاتی $pH=7/00$ 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 ۲۴۰-۵۵۰ نانومتر ثبت و ذخیره گردید. محلول شاهد مثل محلول نمونه تهیه شد با این تفاوت که به آن هیچ مقداری از این دو ترکیب اضافه نشد. سپس طیف هر ایزومر نسبت به محلول شاهد در دامنه ۲۴۰-۵۵۰ نانومتر ثبت گردید. ترکیب غلظتی برای محلول‌های سری ارزیابی و محلول‌های سری تست در جدول ۳-۳۲ و جدول ۳-۳۳ آورده شده است.

جدول ۳-۳۲: ترکیب غلظتی محلول‌های سری ارزیابی

محلول	غلظت پارا-نیتروآنیلین (میلی‌گرم بر لیتر)	غلظت اورتو-نیتروآنیلین (میلی‌گرم بر لیتر)
۱	۰/۵۰	۲/۰۰
۲	۱/۰۰	۲/۰۰
۳	۲/۰۰	۲/۰۰
۴	۵/۰۰	۲/۰۰
۵	۱۰/۰۰	۲/۰۰
۶	۰/۵۰	۵/۰۰
۷	۱/۰۰	۵/۰۰

۵/۰۰	۲/۰۰	۸
۵/۰۰	۵/۰۰	۹
۵/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰
۱۰/۰۰	۰/۵۰	۱۱
۱۰/۰۰	۱/۰۰	۱۲
۱۰/۰۰	۲/۰۰	۱۳
۱۰/۰۰	۵/۰۰	۱۴
۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۵
۱۵/۰۰	۰/۵۰	۱۶
۱۵/۰۰	۱/۰۰	۱۷
۱۵/۰۰	۲/۰۰	۱۸
۱۵/۰۰	۵/۰۰	۱۹
۱۵/۰۰	۱۰/۰۰	۲۰
۲۰/۰۰	۰/۵۰	۲۱
۲۰/۰۰	۱/۰۰	۲۲
۲۰/۰۰	۲/۰۰	۲۳
۲۰/۰۰	۵/۰۰	۲۴
۲۰/۰۰	۱۰/۰۰	۲۵

جدول ۳-۳۳: ترکیب غلظتی محلول‌های سری تست

غلظت اورتو-نیتروآنیلین (میلی گرم بر لیتر)	غلظت پارا-نیتروآنیلین (میلی گرم بر لیتر)	محلول
۵/۰۰	۳/۰۰	۱
۵/۰۰	۶/۰۰	۲
۱۰/۰۰	۳/۰۰	۳
۱۰/۰۰	۶/۰۰	۴
۲۰/۰۰	۴/۰۰	۵

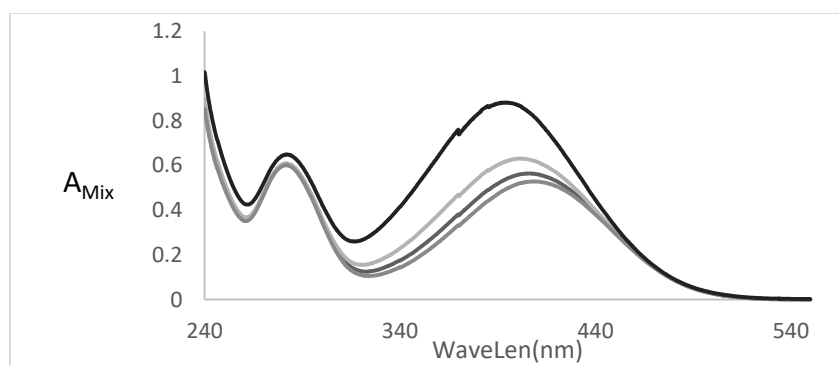
۳-۱۷- کاربرد روش تفاضل نسبی توسعه یافته (EXRSM) برای تعیین غلظت

پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین

اولین روش اسپکتروفتومتری جدیدی که برای تعیین مقدار غلظت‌های این ایزومرها در مخلوط‌ها استفاده شد، روش EXRSM بود. ابتدا روش به دست آوردن غلظت‌های پارا-نیتروآنیلین و

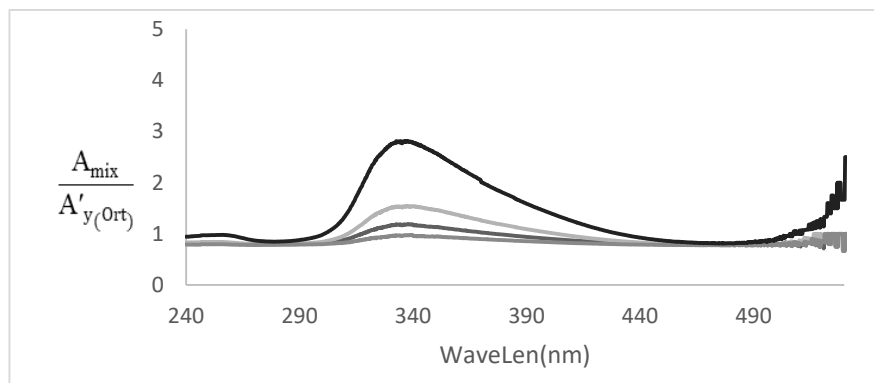
اورتو-نیتروآنیلین در یک سری از مخلوط‌های سری ارزیابی توضیح داده می‌شود. سپس روش بهینه سازی مقسوم علیه‌ها آورده می‌شود..

برای توضیح بهتر روش، مخلوط‌های سری ارزیابی انتخاب شدند که غلظت اورتو-نیتروآنیلین موجود در مخلوط‌ها ثابت و غلظت پارا-نیتروآنیلین در آن‌ها تغییر می‌کند. در شکل ۳-۳۱ طیف‌های جذبی مخلوط‌هایی با غلظت ثابت اورتو-نیتروآنیلین و غلظت متغیر پارا-نیتروآنیلین آورده شده است.



شکل ۳-۳۱: طیف‌های جذبی مخلوط‌های حاوی ۰/۵۰، ۱/۰۰، ۲/۰۰، ۵/۰۰ (میلی‌گرم بر لیتر) پارا-نیتروآنیلین و ۱۵/۰۰ (میلی‌گرم بر لیتر) اورتو-نیتروآنیلین در شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات با Ph= ۷/۰

برای دست‌یابی به بهترین دقت و صحت باید مقدار مقسوم علیه (گونه‌ای که جذب آن در طول موج‌های بالاتر صفر می‌شود) که اورتو-نیتروآنیلین است بهینه شود. پس طیف هر مخلوط بر طیف محلول ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین تقسیم شد. طیف نسبی حاصل در ناحیه‌ای که ایزومر پارا-نیتروآنیلین دارای جذب نمی‌باشد یعنی ناحیه طول‌موجی ۴۶۵-۴۷۵ نانومتر دارای مقدار ثابت است (شکل ۳-۳۲).



شکل ۳-۳۲: طیف‌های جذبی حاصل از تقسیم طیف مخلوط‌های حاوی ۰/۵۰، ۱/۰۰، ۲/۰۰، ۵/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) پارا-نیتروآنیلین و ۱۵/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) اورتو-نیتروآنیلین بر طیف ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین

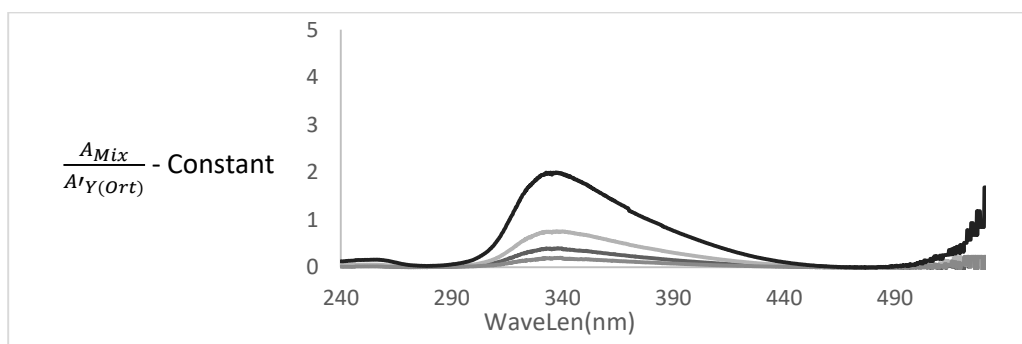
در شکل ۳-۳۲، A_{mix} و $A'_{y(Ort)}$ به ترتیب بیانگر جذب مخلوط و جذب محلول ۲۰/۰۰ میلی

گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین (به عنوان مقسوم علیه) است.

بعد از تقسیم کردن طیف مخلوط‌ها به طیف مرتبه صفر یک محلول اورتو-نیتروآنیلین با غلظت

معین ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر، مقدار ثابت به دست آمده را از طیف‌های نسبی کم کرده و طیف‌های

نسبی شکل ۳-۳۳ به دست آمد.

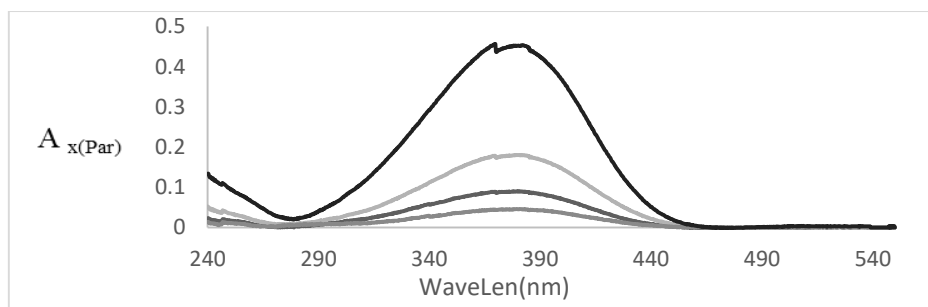


شکل ۳-۳۳: طیف‌های جذبی حاصل از تقسیم طیف مخلوط‌های حاوی ۰/۵۰، ۱/۰۰، ۲/۰۰، ۵/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) پارا-نیتروآنیلین و ۱۵/۰۰ (میلی گرم بر لیتر) اورتو-نیتروآنیلین بر طیف ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین (مقسوم علیه) بعد از کم کردن مقدار ثابت

طیف‌های نسبی شکل ۳-۳۳ در طیف محلول ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین

(به عنوان مقسوم علیه) ضرب شد که طیف‌های مرتبه‌ی صفر خالص پارا-نیتروآنیلین در مخلوط

به دست آمد (شکل ۳-۳۴). جذب در طول موج ماکزیمم پارا-نیتروآنیلین (۳۸۱ نانومتر) در طیف های مرتبه صفر پارا-نیتروآنیلین به دست آمده اندازه گیری شد و در منحنی کالیبراسیون حاصل از محلول های استاندارد خالص پارا-نیتروآنیلین قرار داده شد (شکل ۳-۳۰) و غلظت پارا-نیتروآنیلین در هر مخلوط به دست آمد.



شکل ۳-۳۴: طیف جذبی مرتبه صفر غلظت های ۵/۰۰، ۲/۰۰، ۱/۰۰، ۰/۵۰ میلی گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین، بعد از کم کردن مقدار ثابت و ضرب در طیف محلول ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین

برای انتخاب غلظت اورتو-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه برای دستیابی به بهترین نتایج، ارزیابی از طریق شاخص های کمی MRE^1 و MSE^2 در هر غلظت از اورتو-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه انجام شد. نتایج این محاسبات در جدول ۳-۳۴ آورده شده است و نشان می دهد که مقدار خطای حاصل از غلظت ۲۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر اورتو نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه از دیگر غلظت ها کمتر است. به همین دلیل این غلظت به عنوان غلظت بهینه اورتو-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه در محاسبات بعدی استفاده شد.

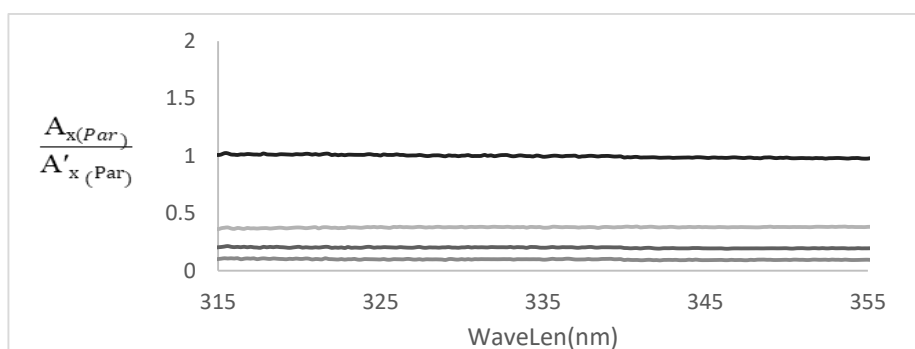
جدول ۳-۳۴: نتایج حاصل از بهینه سازی غلظت اورتو-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه برای سری ارزیابی

غلظت اورتو-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه ($mg L^{-1}$)	MSE در پیش بینی غلظت پارا-نیتروآنیلین	MRE در پیش بینی غلظت پارا-نیتروآنیلین
۵/۰۰	۰/۰۶	۶/۴۲
۱۰/۰۰	۰/۰۵	۴/۰۵
۲۰/۰۰	۰/۰۳۹	۱/۴۹

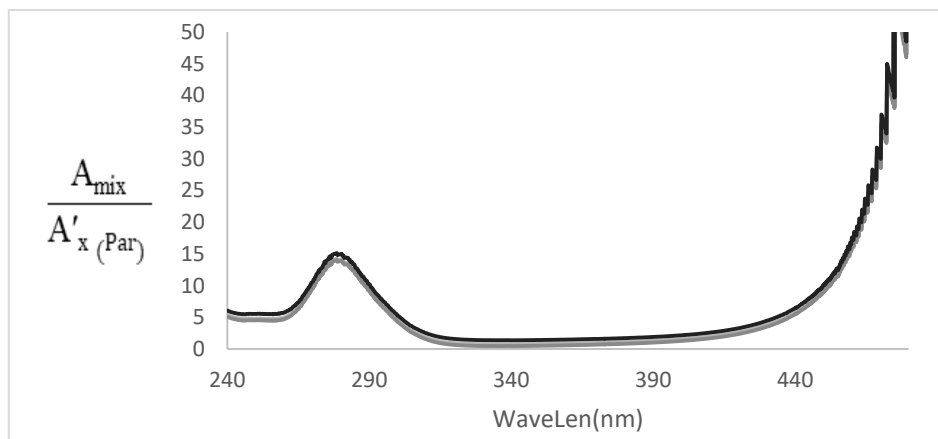
¹ Mean Ratio Error

² Mean Square Error

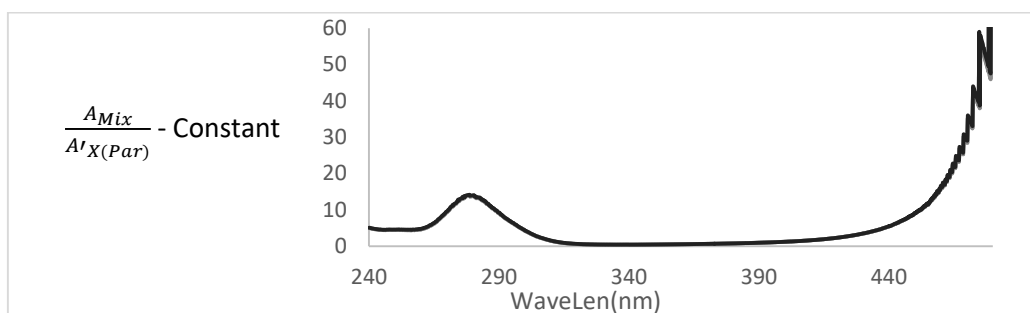
برای به دست آوردن غلظت اورتو-نیتروآنیلین در سری ارزیابی به صورت زیر عمل شد: ابتدا طیف‌های خالص مرتبه صفر به دست آمده برای پارا-نیتروآنیلین (شکل ۳-۳۴)، به طیف مرتبه صفر با غلظت معینی (مثلاً ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر) از محلول پارا-نیتروآنیلین تقسیم شد. طیف نسبی حاصل در دامنه ۳۱۵-۳۵۵ نانومتر دارای مقدار ثابتی برای هر محلول است (شکل ۳-۳۵). هم چنین طیف مخلوط‌های سری ارزیابی بر طیف محلول پارا-نیتروآنیلین با غلظت معین ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر تقسیم شد (شکل ۳-۳۶). در مرحله بعد ثابت به دست آمده که خطوطی به موازات محور طول موج در محدوده‌ی گفته شده هستند، برای هر مخلوط از طیف نسبی مربوط به آن مخلوط کم شد (شکل ۳-۳۷).



شکل ۳-۳۵: طیف نسبی حاصل از تقسیم طیف‌های مرتبه صفر به دست آمده ۵/۰۰، ۱/۰۰، ۲/۰۰ و ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین (شکل ۳-۳۴) بر ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه

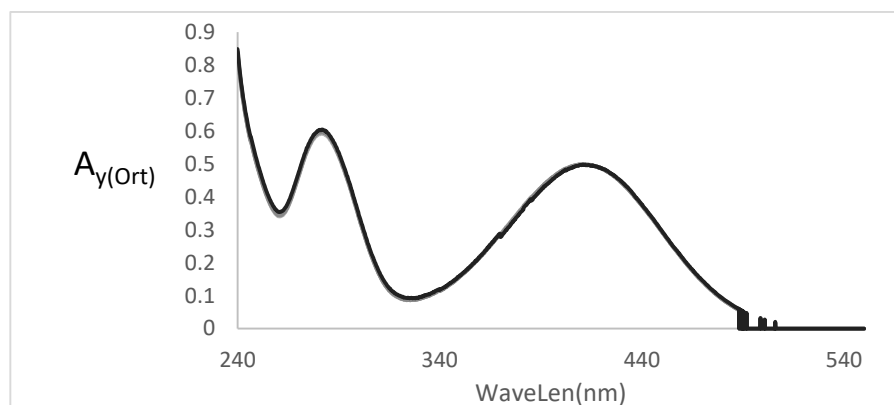


شکل ۳-۳۶: طیف‌های نسبی حاصل از تقسیم طیف مخلوط‌های حاوی ۵/۰، ۱/۰۰، ۲/۰۰ و ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین و ۱۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین بر طیف ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین (مقسوم علیه)



شکل ۳-۳۷: طیف‌های جذبی حاصل از تقسیم طیف مخلوط‌های حاوی ۵/۰، ۱/۰۰، ۲/۰۰ و ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین و ۱۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین بر طیف ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین (مقسوم علیه)، بعد از کم کردن مقدار ثابت

با ضرب طیف‌های نسبی حاصل از مرحله قبل (شکل ۳-۳۷) در طیف محلول پارا-نیتروآنیلین با غلظت معلوم به‌عنوان مقسوم علیه (۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر)، طیف خالص اورتو-نیتروآنیلین در هر مخلوط به‌دست آمد (شکل ۳-۳۸).



شکل ۳-۳۸: طیف های جذبیه مرتبه صفر ۱۵/۰۰ میلی گرم برلیتر اورتو-نیتروآنیلین حاصل از ضرب طیف های شکل (۳-۳۴) در طیف محلول ۵/۰۰ میلی گرم برلیتر پارا-نیتروآنیلین

با استفاده از طیف های خالص اورتو-نیتروآنیلین مرتبه صفر به دست آمده برای هر مخلوط، جذب در طول موج ماکزیمم هر طیف اندازه گیری شد و در منحنی کالیبراسیون حاصل از محلول های استاندارد خالص اورتو-نیتروآنیلین قرار داده شد (شکل ۳-۳۰) و غلظت اورتو-نیتروآنیلین در هر مخلوط به دست آمد.

در روش EXRSM تاثیر غلظت پارا-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه، بر خطای حاصل از پیش بینی غلظت اورتونیتروآنیلین بررسی شد. بهینه سازی غلظت مقسوم علیه پارا-نیتروآنیلین مانند بهینه سازی غلظت مقسوم علیه اورتو-نیتروآنیلین صورت گرفت. غلظت اورتو-نیتروآنیلین در هر مخلوط با استفاده از غلظت های مختلف پارا-نیتروآنیلین (به عنوان مقسوم علیه) محاسبه گردید. برای انتخاب غلظت پارا-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه بهینه، میانگین مربع خطا (MSE) و میانگین خطای نسبی (MRE) برای اندازه گیری غلظت اورتو-نیتروآنیلین برای سری ارزیابی محاسبه گردید و نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۳-۳۵ آورده شده است.

جدول ۳-۳۵: نتایج حاصل از بهینه‌سازی غلظت پارا-نیتروآنیلین به‌عنوان مقسوم علیه در تعیین غلظت اورتو-نیتروآنیلین

غلظت پارا-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه (mg L^{-1})	MSE در پیش‌بینی غلظت اورتو-نیتروآنیلین	MRE در پیش‌بینی غلظت اورتو-نیتروآنیلین
۲/۰۰	۰/۱۷	۴/۲۰
۵/۰۰	۰/۰۰۸	۱/۳۶
۱۰/۰۰	۰/۰۲۸	۲/۵۴

نتایج حاصل از جدول ۳-۳۵ نشان می‌دهد که با انتخاب محلول ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین به‌عنوان مقسوم علیه، خطای حاصل از پیش‌بینی غلظت اورتو-نیتروآنیلین موجود در مخلوط‌های سری ارزیابی کمتر است. نتایج حاصل از به‌کار بردن روش EXRSM برای پیش‌بینی غلظت پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین موجود در محلول‌های سری تست، در جدول ۳-۳۳ آورده شده است. لازم به ذکر است در به‌دست آوردن غلظت محلول‌های سری تست، غلظت ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین و ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین به‌عنوان مقسوم علیه به‌کار برده شد.

جدول ۳-۳۶: نتایج حاصل از به‌کارگیری روش EXRSM، برای پیش‌بینی غلظت اجزا در سری تست

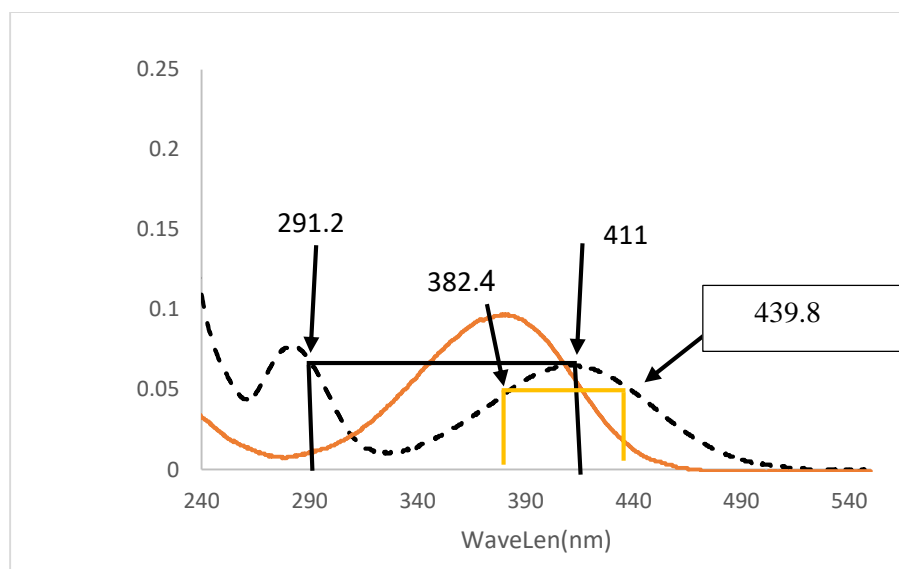
محللول	غلظت واقعی (mg L^{-1})		غلظت پیش‌بینی شده (mg L^{-1})		خطای نسبی (%)	
	پارا	اورتو	پارا	اورتو	پارا	اورتو
۱	۳/۰۰	۵/۰۰	۳/۰۰	۵/۰۸	۰/۰۰	۱/۶۰
۲	۶/۰۰	۵/۰۰	۵/۹۹	۵/۱۸	-۰/۱۷	۳/۶۰
۳	۳/۰۰	۱۰/۰۰	۳/۰۰	۱۰/۰۳	۰/۰۰	۰/۳۰
۴	۶/۰۰	۱۰/۰۰	۵/۹۵	۱۰/۰۰	-۰/۸۳	۰/۰۰
۵	۴/۰۰	۲۰/۰۰	۳/۸۰	۱۹/۹۵	-۵/۰۰	-۰/۲۵

۳-۱۸- کاربرد روش افزایش استاندارد نقطه اچ نسبی (RHPSAM) برای

تعیین غلظت ایزومرهای پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین

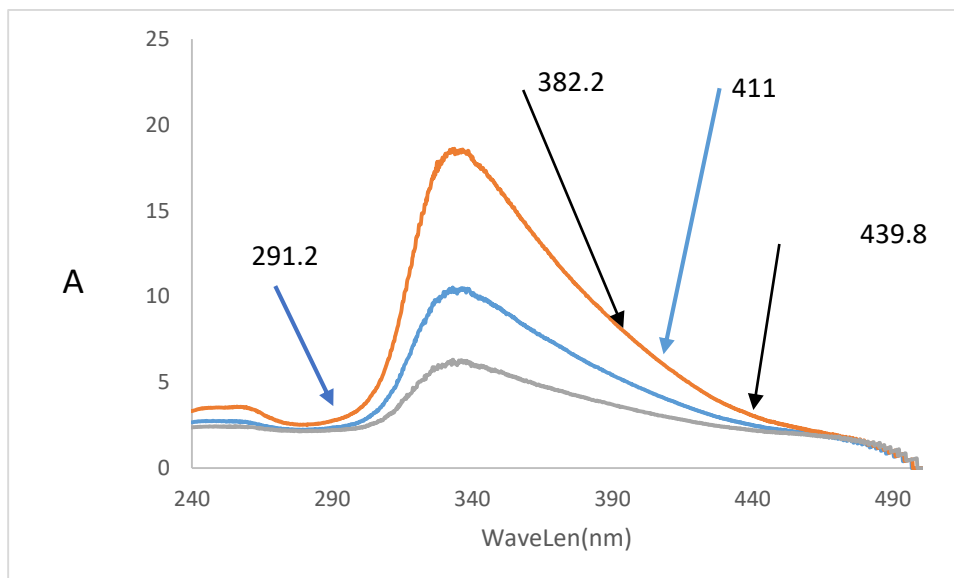
روش دیگری که برای اندازه‌گیری همزمان ایزومرهای پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین استفاده شد روش افزایش استاندارد نقطه H نسبی است. در این روش می‌توان با در نظر گرفتن هر جفت طول موج، هر دو گونه را بطور همزمان تعیین مقدار کرد. در شکل ۳-۳۶ طیف خالص پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین برای درک بهتر طول موج‌ها آورده شده است. این روش شامل دو مرحله است که در زیر توضیح داده می‌شود.

در مرحله اول محلول‌های سری ارزیابی بر طیف نرمال شده‌ی غلظت معینی از اورتو-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه تقسیم شد (شکل ۳-۳۷). طیف نرمال شده حاصل تقسیم طیف مرتبه صفر خالص یک گونه بر غلظت آن می‌باشد. در این مرحله مقسوم علیه را ثابت گرفته و جفت طول موج بهینه شد، سپس دو جفت طول موج انتخاب شد. نتایج حاصل در جدول ۳-۳۴ آورده شده است.



شکل ۳-۳۹: طیف خالص ۱/۰۰ میلی گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین (—) و طیف خالص ۲/۰۰ میلی گرم بر لیتر

اورتو-نیتروآنیلین (-----)



شکل ۳-۴: طیف نسبی حاصل از تقسیم مخلوط‌های شامل ۰/۵۰، ۱/۰۰ و ۲/۰۰ میلی گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین به همراه ۲/۰۰ میلی گرم بر لیتر اورتو نیتروآنیلین بر طیف نرمال شده ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر اورتو نیتروآنیلین

جدول ۳-۳: نتایج داده های آماری کمی برای دو جفت طول موج انتخابی

MRE		MSE		طول موج
پارا-نیتروآنیلین	اورتو-نیتروآنیلین	پارا-نیتروآنیلین	اورتو-نیتروآنیلین	
۲/۱۷	۰/۹۴	۰/۰۰۲	۰/۰۲	۴۳۹/۸ و ۳۸۲/۴
۶/۶۷	۱/۳۶	۰/۰۱۱	۰/۰۴	۴۱۱ و ۲۹۱/۲

از جدول ۳-۳ نتیجه میگیریم که جفت طول ۴۳۹/۸ و ۳۸۲/۴ دارای نتایج بهتری است. از طرف دیگر در این جفت طول موج مزاحمت های احتمالی نسبت به جفت طول موج دیگر کم تر می باشد، این طول موجها (۴۳۹/۸ و ۳۸۲/۴) در محاسبات بعدی به کار برده شد.

پس از انتخاب طول موجها، مرحله ی بعد مرحله انتخاب مقسوم علیه مناسب است. مرحله ی انتخاب مقسوم علیه دارای اهمیت زیادی است، به همین دلیل از طیف نرمال شده ی سه غلظت ۱۰ میلی گرم بر لیتر، ۲۰ میلی گرم بر لیتر و ۵ میلی گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین برای انتخاب مقسوم

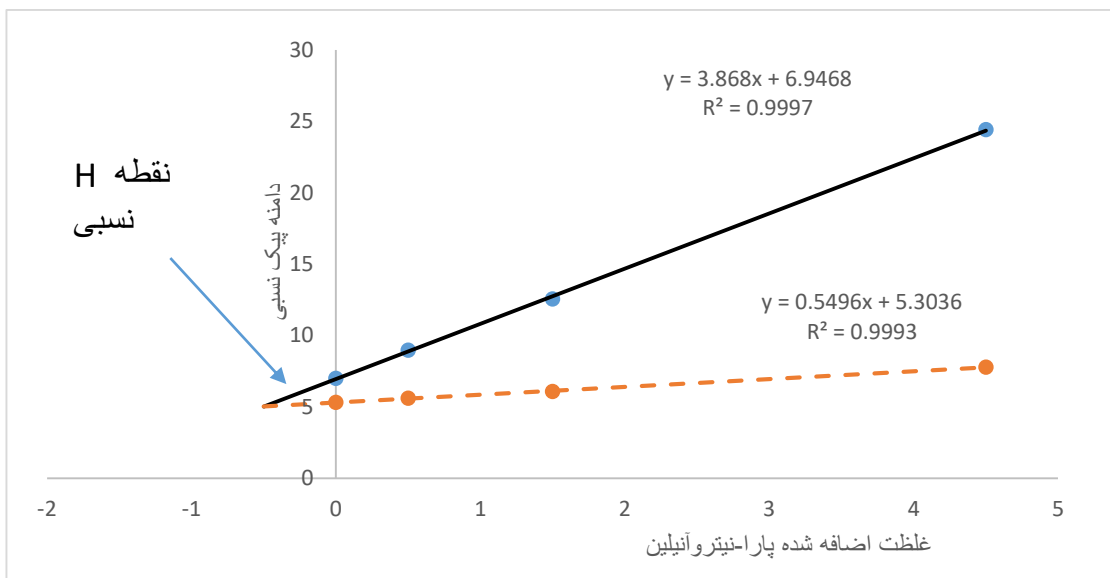
علیه استفاده شد. نتایج حاصل از این محاسبات در جدول ۳-۳۸ آورده شده است.

جدول ۳-۳۸: نتایج حاصل از مقسوم علیه های مختلف

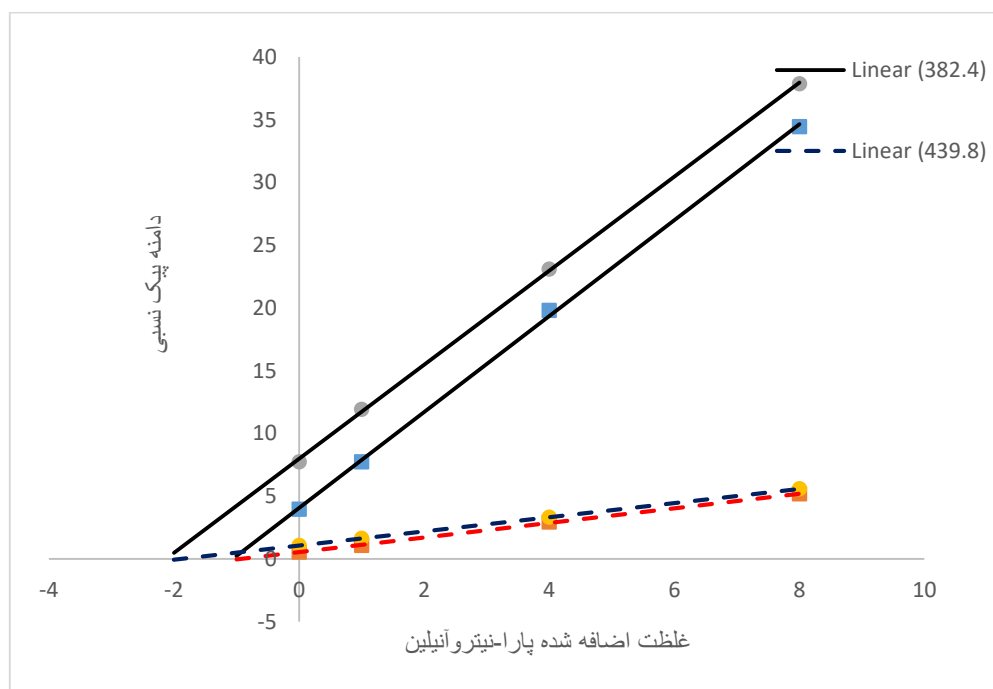
MRE		MSE		طیف نرمال شده (به عنوان مقسوم علیه)
پارا-نیتروآنیلین	اورتو- نیتروآنیلین	پارا-نیتروآنیلین	اورتو-نیتروآنیلین	
۷/۲۶	۱/۷۱	۰/۰۰۸	۰/۰۱۸	۵ (mg L ⁻¹)
۹/۴۴	۱/۷۶	۰/۰۱۳	۰/۰۲۸	۱۰ (mg L ⁻¹)
۲/۱۷	۰/۹۴	۰/۰۰۲	۰/۰۲	۲۰ (mg L ⁻¹)

با توجه به جدول بالا طیف نرمال شده‌ی ۲۰/۰۰ میلی گرم برلیتر اورتو-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه برای مراحل بعدی انتخاب شد.

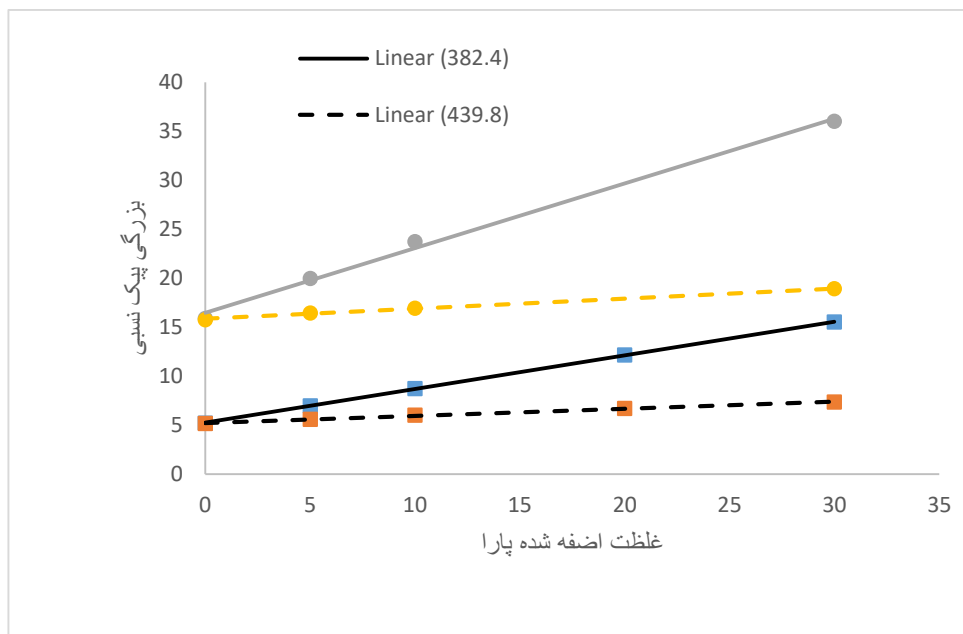
در شکل ۳-۴۱ نقطه‌ی H نسبی در یکی از مخلوط‌های سری ارزیابی برای درک بهتر، در شرایط بهینه، نشان داده شده است. این روش همچنین قادر به تعیین مقدار هر ایزومر در نمونه‌های خالص آن‌ها می‌باشد که این امر در شکل ۳-۴۲ و شکل ۳-۴۳ به خوبی نشان داده شده است. در شکل ۳-۴۲ نمونه‌ها فقط حاوی پارا-نیتروآنیلین با غلظت‌های مختلف می‌باشد که محل تقاطع دو خط، مقدار پیش بینی شده به وسیله روش RHPSAM را برای غلظت پارا-نیتروآنیلین نشان می‌دهد. در شکل ۳-۴۳ نمونه‌ها فقط حاوی ایزومر اورتو-نیتروآنیلین با غلظت‌های مختلف می‌باشد که محل تقاطع آن‌ها باهم (عرض از مبدا برای هر جفت خط) برابر غلظت اورتو-نیتروآنیلین می‌باشد، در شکل توجه نمایید که محل تقاطع دو خط، غلظت صفر متا-نیتروآنیلین را برای هر سه نمونه نشان می‌دهد. در تمام این نمودارها مقدار اضافه شده متا-نیتروآنیلین است.



شکل ۳-۴۱: نمودار کالیبراسیون به همراه معادله برای مخلوط ۰/۵۰ میلی گرم بر لیتر پار-نیتروآنیلین به همراه ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین



شکل ۳-۴۲: نمودار روش افزایش استاندارد نقطه‌ی H نسبی برای محلول‌های خالص ۱/۰۰ و ۲/۰۰ میلی گرم بر لیتر پار-نیتروآنیلین



شکل ۳-۴۳: نمودار روش افزایش استاندارد نقطه‌ی H نسبی برای محلول‌های خالص ۵، ۱۰، ۲۰ میلی گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین

نتایج حاصل از به کار بردن روش RHPSAM بر محلول‌های سری ارزیابی و سری تست در شرایط بهینه (مقسوم علیه ۳۰ میلی گرم بر لیتر و طول موج‌های ۳۸۲/۲ و ۴۳۹/۸ نانومتر)، در دو جدول ۳-۳۹ و ۳-۴۰ آورده شده است. معادلات کالیبراسیون برای مخلوط‌های سری ارزیابی نیز در هر طول موج حساب شده و تمام آنها در جدول آورده شده است.

جدول ۳-۳۹: جدول سری ارزیابی برای روش RHPSAM

خطای نسبی (%)		غلظت پیش بینی شده (mg/L)		غلظت واقعی (mg/L)		R ²	معادله کالیبراسیون	محل
پارا	اورتو	پارا	اورتو	پارا	اورتو			
نیتروآنیلین	۲/۰۰	نیتروآنیلین	۰/۵۰	نیتروآنیلین	۲/۰۰	۰/۹۹۹۳ ۰/۹۹۹۵	p= ۴/۱۱۹۴ Cx + ۴/۱۱۸۸ p= ۰/۶۲۴ Cx + ۲/۳۲۷۳	۱
نیتروآنیلین	۱/۵۰	نیتروآنیلین	۰/۹۷	نیتروآنیلین	۲/۰۱	۰/۹۹۹۵ ۰/۹۹۹۹	p=۴/۱۲۴۱ Cx + ۶/۰۱۱۶ p=۰/۶۲۶۷ Cx + ۲/۶۱۸۶	۲
نیتروآنیلین	۳/۵۰	نیتروآنیلین	-۲/۰۰	نیتروآنیلین	۱/۹۶	۰/۹۹۹۴ ۰/۹۹۹۶	p=۳/۹۷۲۳ Cx + ۱۰/۱۹۷ p=۰/۶۱۴ Cx + ۰/۲۳۶۵	۳
نیتروآنیلین	۰/۰۰	نیتروآنیلین	۰/۶۰	نیتروآنیلین	۵/۰۳	۰/۹۹۹۷ ۰/۹۹۹۳	p=۳/۸۶۸ Cx + ۶/۹۴۶۸ p= ۰/۵۴۹۶ Cx + ۵/۳۰۳۶	۴
نیتروآنیلین	۱/۰۰	نیتروآنیلین	۰/۹۹	نیتروآنیلین	۵/۰۳	۰/۹۹۹۷ ۰/۹۹۹۱	p= ۳/۸۷۸۸ Cx + ۸/۸۴۸۵ p= ۰/۵۵۲۳ Cx + ۵/۵۷۰۳	۵
نیتروآنیلین	۴/۰۰	نیتروآنیلین	۰/۰۰	نیتروآنیلین	۵/۰۰	۱ ۱	p= ۳/۹۴۶۱ Cx + ۱۲/۵۶۶ p= ۰/۵۶۸ Cx + ۶/۰۸۵۲	۶
نیتروآنیلین	۰/۰۰	نیتروآنیلین	۲/۰۰	نیتروآنیلین	۱۵/۳۰	۰/۹۹۹۸ ۰/۹۹۸۲	p= ۳/۸۷۰۷ Cx + ۱۷/۲۴۴ p= ۰/۶۰۷۸ Cx + ۱۵/۶۰۷	۷
نیتروآنیلین	۰/۰۰	نیتروآنیلین	۱/۹۰	نیتروآنیلین	۱۵/۲۹	۰/۹۹۹۸ ۰/۹۹۷۶	p= ۳/۸۷۷۵ Cx + ۱۹/۱۵۹ p= ۰/۶۱۱۹ Cx + ۱۵/۸۹۹	۸
نیتروآنیلین	۳/۵۰	نیتروآنیلین	۰/۵۳	نیتروآنیلین	۱۴/۹۲	۰/۹۹۹۴ ۰/۹۹۴۶	p= ۳/۷۶۰۴ Cx + ۲۲/۶۹۱ p= ۰/۶۴۳۹ Cx + ۱۶/۲۴۷	۹

جدول ۳-۴۰: جدول نتایج حاصل از به کارگیری روش RHPSAM برای پیش بینی غلظت اجزا در سری تست

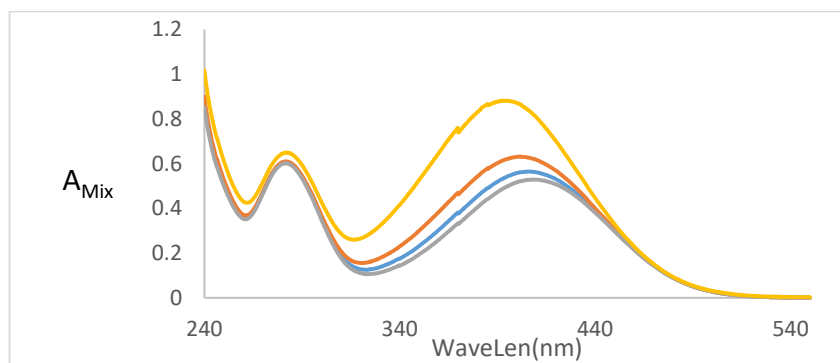
خطای نسبی (%)		غلظت پیش بینی شده (mg L ⁻¹)		غلظت واقعی (mg L ⁻¹)		محل
پارا	اورتو	پارا	اورتو	پارا	اورتو	
پارا	۲/۰۰	پارا	۳/۴۰	پارا	۳/۰۰	۱
اورتو	۳/۴۰	اورتو	۳/۰۶	اورتو	۵/۰۰	۱
پارا	۱/۰۰	پارا	۳/۰۳	پارا	۳/۰۰	۲
اورتو	۲/۸۰	اورتو	۱۰/۲۸	اورتو	۱۰/۰۰	۲
پارا	۵/۰۰	پارا	۶/۳۰	پارا	۶/۰۰	۳
اورتو	۰/۵۰	اورتو	۹/۹۵	اورتو	۱۰/۰۰	۳
پارا	-۴/۱۰	پارا	۴/۱۰	پارا	۴/۰۰	۴
اورتو	-۱/۵۰	اورتو	۱۹/۷۰	اورتو	۲۰/۰۰	۴

۳-۱۹- کاربرد روش مرکز ثابت ترکیب شده با تفریق طیف (CC-SS) برای

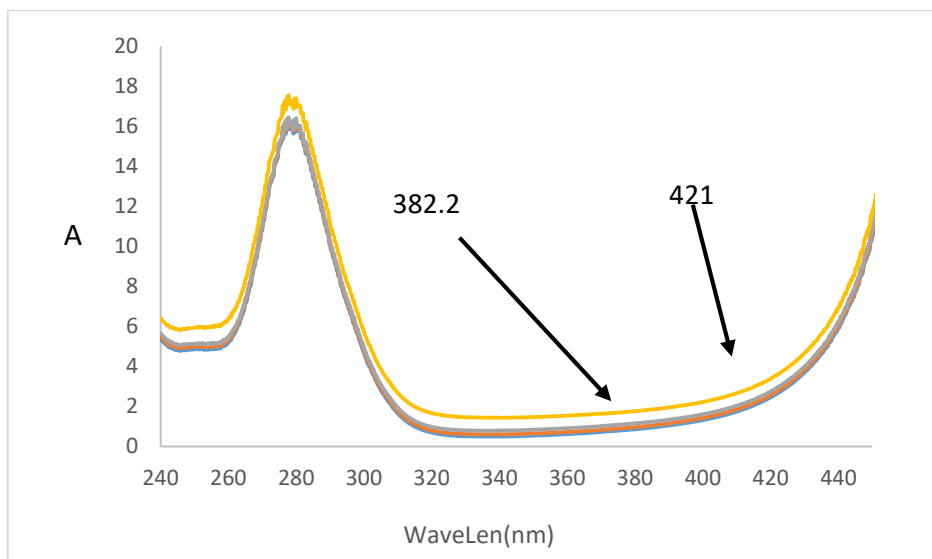
تعیین غلظت پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین

در این قسمت اندازه گیری این ایزومرها با استفاده از روش مرکز ثابت ترکیب شده با تفریق طیف شرح داده می شود. ابتدا روش به دست آوردن غلظت های پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین در یک سری از مخلوط های سری ارزیابی توضیح داده می شود. سپس روش بهینه سازی مقسوم علیه ها آورده می شود.

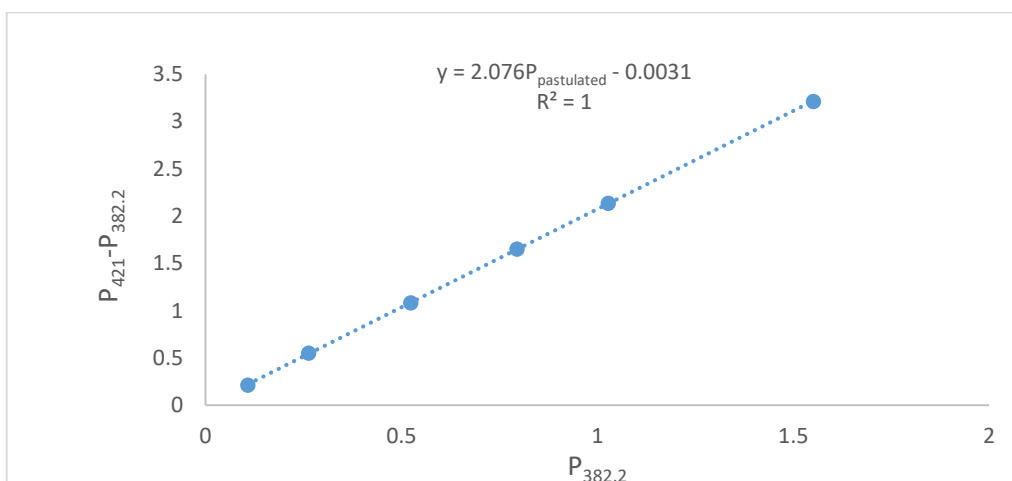
این روش شامل دو بخش می باشد که در بخش اول غلظت پارا-نیتروآنیلین و در بخش دوم غلظت اورتو-نیتروآنیلین محاسبه می شود. بخش اول شامل چندین مرحله است، در مرحله اول باید مقدار P پیش بینی شده ($P_{Postulated}$) به دست آید. برای به دست آوردن P پیش بینی شده ($P_{Postulated}$) باید طیف محلول های استاندارد خالص اورتو-نیتروآنیلین بر طیف خالص استاندارد غلظت معینی از پارا-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه ($5/00$ میلی گرم بر لیتر) تقسیم شد. در طیف های نسبی به دست آمده دو طول موج انتخاب شد. در دو طول موج انتخاب شده (λ_1 و λ_2)، به ترتیب دامنه های نسبی P_1 و P_2 اندازه گیری و ثبت شد و سپس اختلاف دامنه های نسبی $\Delta P = P_1 - P_2$ بر حسب دامنه نسبی در $(P_1)\lambda_1$ رسم گردید که یک خط مستقیم به دست می آید (شکل ۳-۴۶).



شکل ۳-۴۴: طیف های جذبی مخلوط های حاوی $5/00$ ، $2/00$ ، $1/00$ ، $0/50$ (میلی گرم بر لیتر) پارا-نیتروآنیلین و $15/00$ (میلی گرم بر لیتر) اورتو-نیتروآنیلین در شرایط بهینه: $2/00$ میلی لیتر بافر فسفات با $pH=7/0$



شکل ۳-۴۵: طیف‌های نسبی حاصل از تقسیم طیف مخلوط‌های حاوی ۰/۵۰، ۱/۰۰، ۲/۰۰، ۵/۰۰ (میلی‌گرم بر لیتر) پارا-نیتروانیلین و ۱۵/۰۰ (میلی‌گرم بر لیتر) اورتو-نیتروانیلین بر طیف ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پارا-نیتروانیلین (مقسوم علیه)



شکل ۳-۴۶: معادله‌ی خط بین تفاوت دامنه‌های نسبی ($P_{421}-P_{382.2}$) و دامنه‌ی نسبی در طول موج ۳۸۲/۲

برای توضیح بهتر روش، مخلوط‌هایی از سری ارزیابی انتخاب شدند که غلظت اورتو-نیتروانیلین موجود در مخلوط‌ها ثابت و غلظت پارا-نیتروانیلین در آنها تغییر می‌کند. در شکل ۳-۴۴ طیف‌های جذبی مخلوط‌هایی با غلظت ثابت اورتو-نیتروانیلین و غلظت متغیر پارا-نیتروانیلین آورده شده است.

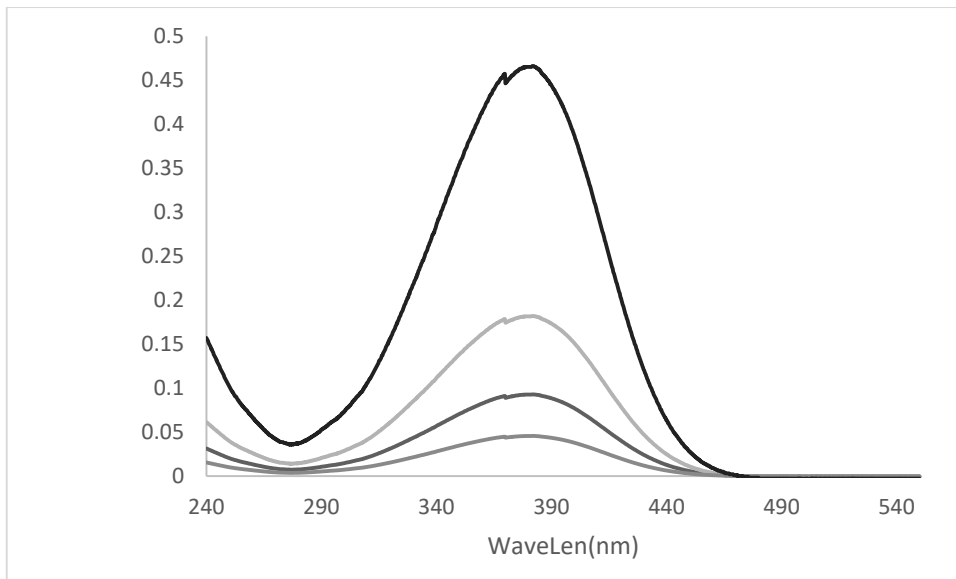
در مرحله دوم طیف هر مخلوط به همان مقسوم علیه که در مرحله قبل انتخاب شد (۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر) تقسیم شدند (شکل ۳-۴۵). در این مرحله نیز مقدار دامنه‌های نسبی در دو طول موج ۳۸۲/۲ و ۴۲۱ نانومتر ثابت و اختلاف آن‌ها ($\Delta P_{Mix} = P_1 = P_2$) محاسبه گردید (جدول ۳-۴۱). ΔP_{Mix} به دست آمده برای هر مخلوط در معادله شکل شکل ۳-۴۶ قرار داده شد و مقدار P پیش بینی شده ($P_{Postulated}$) برای هر مخلوط محاسبه شد

در مرحله سوم مقدار ثابت (C.V.) از اختلاف بین مقدار P پیش بینی شده ($P_{Postulated}$) و دامنه ی ثابت شده در طول موج ۳۸۲/۲ نانومتر ($P_{recorded}$) در هر مخلوط به دست آمد. در مرحله چهارم مقدار ثابت به دست آمده در طیف مرتبه‌ی صفر مقسوم علیه انتخاب شده (۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین) ضرب شد، که طیف‌های مرتبه‌ی صفر پارا-نیتروآنیلین در مخلوط به دست آمد (شکل ۳-۴۷)، جذب در طول موج ماکزیمم هر طیف مرتبه صفر پارا-نیتروآنیلین به دست آمده ثبت شد و با قرار دادن در معادله‌ی کالیبراسیون آن (شکل ۳-۳۰) غلظت پارا-نیتروآنیلین تعیین شد. در جدول ۳-۴۱ مقادیر مربوط به P_1 و P_2 ، مقدار P پیش بینی شده ($P_{Postulated}$) و همچنین مقدار ثابت (C.V.) برای مخلوط‌های مورد مطالعه در جفت طول موج ۳۸۲/۲ و ۴۲۱، آورده شده است.

جدول ۳-۴۱: مقادیر ثابت و پیش فرض برای مخلوط‌های حاوی ۰،۰۰/۵۰، ۰،۰۱/۰۰، ۲/۰۰ و ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر پارا-

نیتروآنیلین با ۱۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین

C.V	$P_{recorded}$	$P_{Pastuulated}$	ΔP_{Mix}	P_{421}	$P_{382.2}$	مخلوط
۰/۰۹۶	۰/۸۹۶	۰/۷۷۹۷	۱/۶۵۷	۲/۵۵۳	۰/۸۹۶	۱
۰/۱۹۶	۱/۰۰۰	۰/۸۳۵۱	۱/۶۶۵	۲/۶۶۵	۱/۰۰۰	۲
۰/۳۸۶	۱/۱۸۹	۰/۸۰۳۰	۱/۶۶۴	۲/۸۵۳	۱/۱۸۹	۳
۰/۹۸۷	۱/۸۰۳	۰/۸۱۵۶	۱/۶۹۰	۳/۴۹۲	۱/۸۰۳	۴



شکل ۳-۴۷: طیف‌هی جذبی مرتبه صفر به دست آمده ۰/۵۰، ۱/۰۰، ۲/۰۰، ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین بعد از ضرب مقدار ثابت در طیف محلول ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین

طول موج های انتخابی در این مرحله برای دست یابی به دقت و صحت بیشتر با ثابت گرفتن مقسوم علیه بهینه شد. برای این کار از سه جفت طول موج استفاده شد و نتایج این محاسبات در جدول ۳-۴۲ آورده شده است.

جدول ۳-۴۲: نتایج حاصل از به کارگیری روش CC-SS با جفت طول موج های مختلف

MRE غلظت پیش بینی شده پارا-نیتروآنیلین	MSE غلظت پیش بینی شده پارا-نیتروآنیلین	جفت طول موج
۱/۰۳	۰/۰۱۴	۴۲۱ و ۳۸۲/۲
۳/۱۶	۰/۰۱۳	۴۳۹/۸ و ۳۸۲/۲
۴/۹۹	۰/۰۱۵	۴۱۱ و ۲۹۱/۲

با توجه به جدول بالا نتایج حاصل از جفت طول موج ۳۸۲/۲ - ۴۲۱ دارای MRE کمتر از سایر طول موج ها است به همین دلیل از این طول موج ها (۳۸۲/۲ - ۴۲۱ نانومتر) برای مراحل بعدی استفاده شد. بعد از بهینه کردن طول موج مقسوم علیه نیز بهینه شد. که برای این کار از سه غلظت ۲/۰۰،

۵/۰۰ و ۱۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر پارا-نیترو آنیلین استفاده شد. نتایج در جدول ۳-۴۲ آورده شده است.

جدول ۳-۴۳: نتایج حاصل از بهینه کردن مقسوم علیه های مختلف برای به دست آوردن غلظت پارا-نیترو آنیلین

MRE غلظت پیش بینی شده پارا-نیترو آنیلین	MSE غلظت پیش بینی شده پارا-نیترو آنیلین	غلظت پارا-نیترو آنیلین mg/L (به عنوان مقسوم علیه)
۱/۳۲	۰/۰۲۳	۲/۰
۱/۰۳	۰/۰۱۴	۵/۰
۱/۳۰	۰/۰۱۴	۱۰/۰

باتوجه به جدول ۳-۴۲ غلظت ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر پارا-نیترو آنیلین دارای کمترین خطا است.

بنابراین از این غلظت به عنوان مقسوم علیه در محاسبات بعدی استفاده شد.

در بخش دوم غلظت اورتو نیترو آنیلین اندازه گیری شد. در این مرحله با استفاده از طیف مرتبه ی

صفر به دست آمده برلی پارا-نیترو آنیلین از مرحله ی قبل (شکل ۳-۴۷) و کم کردن آن از طیف مخلوط

مربوطه، طیف مرتبه صفر اورتو نیترو آنیلین به دست آمد. سپس جذب در طول موج ماکزیمم طیف

مرتبه صفر اورتو-نیترو آنیلین اندازه گیری و با استفاده از منحنی کالیبراسیون آن (شکل ۳-۳۰)، غلظت

اورتو-نیترو آنیلین در مخلوط تعیین گردید. نتایج حاصل از این محاسبات برای مخلوط های سری

ارزیابی و سری تست به ترتیب در جدول ۳-۴۴ و جدول ۳-۴۵ آورده شده است.

جدول ۳-۴۴: نتایج حاصل از به کارگیری روش CC-SS برای پیش بینی غلظت اجزا برای سری ارزیابی

خطای نسبی (%)		غلظت پیش بینی شده (mg L^{-1})		غلظت واقعی (mg L^{-1})		محلول
پارا نیتروآنیلین	اورتو نیتروآنیلین	پارا نیتروآنیلین	اورتو نیتروآنیلین	پارا نیتروآنیلین	اورتو نیتروآنیلین	
۴/۰۰	-۲/۰۰	۰/۵۲	۱/۹۶	۰/۵۰	۲/۰۰	۱
۰/۰۰	۰/۰۰	۱/۰۰	۲/۰۰	۱/۰۰	۲/۰۰	۲
۰/۰۰	-۱/۰۰	۲/۰۰	۱/۹۸	۲/۰۰	۲/۰۰	۳
۰/۴۰	۰/۰۰	۵/۰۲	۲/۰۰	۵/۰۰	۲/۰۰	۴
۰/۳۰	۱۶/۵	۱۰/۰۳	۲/۳۳	۱۰/۰۰	۲/۰۰	۵
-۲/۰۰	-۰/۶۰	۰/۴۹	۴/۹۷	۰/۵۰	۵/۰۰	۶
۰/۰۰	-۲/۴۰	۱/۰۰	۴/۸۸	۱/۰۰	۵/۰۰	۷
-۰/۵۰	-۶/۰۰	۱/۹۹	۴/۷۰	۲/۰۰	۵/۰۰	۸
-۰/۲۰	۲/۸۰	۴/۹۹	۵/۱۴	۵/۰۰	۵/۰۰	۹
-۱/۷۰	۱۶/۶	۹/۸۳	۵/۸۳	۱۰/۰۰	۵/۰۰	۱۰
۰/۰۰	۰/۱۳	۰/۵۰	۱۵/۰۲	۰/۵۰	۱۵/۰۰	۱۱
۰/۰۰	۰/۱۳	۱/۰۰	۱۵/۰۲	۱/۰۰	۱۵/۰۰	۱۲
۰/۰۰	۰/۷۰	۲/۰۰	۱۵/۰۱	۲/۰۰	۱۵/۰۰	۱۳
-۰/۶۳۰	۱/۳	۴/۹۷	۱۵/۲۰	۵/۰۰	۱۵/۰۰	۱۴
-۳/۰۰	۵/۲	۹/۷۱	۱۵/۷۸	۱۰/۰۰	۱۵/۰۰	۱۵
۰/۰۰	-۰/۴۰	۰/۵۰	۱۹/۹۲	۰/۵۰	۲۰/۰۰	۱۶
۰/۰۰	۰/۶۷	۱/۰۰	۲۰/۱۳	۱/۰۰	۲۰/۰۰	۱۷
۰/۰۰	۰/۱۰	۲/۰۰	۲۰/۰۲	۲/۰۰	۲۰/۰۰	۱۸
-۱/۴۰	۰/۱۰	۴/۹۳	۲۰/۰۲	۵/۰۰	۲۰/۰۰	۱۹
-۴/۶۰	۳/۲۵	۹/۵۴	۲۰/۶۵	۱۰/۰۰	۲۰/۰۰	۲۰

جدول ۳-۴۵: نتایج حاصل از به کارگیری روش CC-SS برای پیش بینی غلظت دو گونه در سری تست

خطای نسبی (%)		غلظت پیش بینی شده (mg L^{-1})		غلظت واقعی (mg L^{-1})		محلول
پارا نیتروآنیلین	اورتو نیتروآنیلین	پارا نیتروآنیلین	اورتو نیتروآنیلین	پارا نیتروآنیلین	اورتو نیتروآنیلین	
-۰/۳۳	-۰/۲۰	۲/۹۹	۴/۹۹	۳/۰۰	۵/۰۰	۱
۰/۳۳	۵/۱۱	۵/۹۶	۵/۲۸	۶/۰۰	۵/۰۰	۲
۰/۶۷	۰/۶۰	۳/۰۲	۱۰/۰۶	۳/۰۰	۱۰/۰۰	۳
-۰/۶۷	۰/۸۰	۵/۹۶	۱۰/۰۸	۶/۰۰	۱۰/۰۰	۴
۰/۰۰	-۰/۲۵	۴/۰۰	۱۹/۹۵	۴/۰۰	۲۰/۰۰	۵

۳-۱۹-۱- بررسی اثر مزاحمت‌ها در روش‌های اسپکتروفتومتری

جدید (CC-SS ,RHPSAM , EXRSM)

برای بررسی توانایی روش‌ها در اندازه‌گیری همزمان دو ایزومر مد نظر در نمونه‌های حقیقی، اثر مزاحمت گونه‌های مختلف در اندازه‌گیری همزمان آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. روش کار به این صورت بود که میزان جذب محلول ۲/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین یا ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین به ترتیب در طول موج ماکزیمم ۳۸۱ و ۴۱۱ نانومتر در غیاب گونه مزاحم و در شرایط بهینه، برای ۵ مرتبه اندازه‌گیری شد و میانگین و انحراف استاندارد برای هر ترکیب محاسبه گردید. محدوده اطمینان با توجه به رابطه $\bar{A} \pm 3S_A$ به دست آمد (در این رابطه \bar{A} میانگین سیگنال تجزیه‌ای و S_A انحراف استاندارد سیگنال تجزیه‌ای برای هر یک از روش‌های اسپکتروفتومتری است)؛ سپس برای بررسی اثر مزاحمت احتمالی هر گونه، گونه مورد نظر با نسبت ۱۰۰۰ برابر وزنی- وزنی، به نمونه حاوی هر کدام از ایزومرها اضافه گردید. سپس مقدار لازم از این محلول به دستگاه اسپکتروفتومتر منتقل و مقدار جذب در طول موج ماکزیمم پارا-نیتروآنیلین یا اورتو-نیتروآنیلین 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 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 پارا-نیتروآنیلین با غلظت ۲/۰۰ و اورتو-

نیتروآنیلین با غلظت ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در روش CC-SS, EXRSM و RHPSAM

حد مجاز گونه مزاحم (وزنی-وزنی)	گونه‌های بررسی شده در اندازه‌گیری اورتو-نیتروآنیلین	گونه‌های بررسی شده در اندازه‌گیری پارا-نیتروآنیلین
۱۰۰۰	NH ₄ ⁺ , Cl ⁻ , EDTA, SO ₄ ²⁻ , Ca ²⁺ , F ⁻ , Mn ²⁺ , Ba ²⁺ , I ⁻ , HCO ₃ ⁻ , Mg ²⁺ , Br ⁻ فنل، رزورسینول، هیدروکینون، اسید سیتریک، گلوکز،	NH ₄ ⁺ , Cl ⁻ , EDTA, SO ₄ ²⁻ , Ca ²⁺ , F ⁻ , Mn ²⁺ , Ba ²⁺ , I ⁻ , HCO ₃ ⁻ , Mg ²⁺ , Br ⁻ فنل، رزورسینول، هیدروکینون، اسید سیتریک، گلوکز،
۵۰۰	, Al ³⁺ SCN ⁻ , Zn ²⁺ , Li ⁺ آنیلین، پتاسیم هیدروژن فتالات،	Al ³⁺ SCN ⁻ , Zn ²⁺ , Li ⁺ آنیلین، پتاسیم هیدروژن فتالات،
۵۰	NO ₃ ⁻	NO ₃ ⁻
۱۰	Ni ²⁺	Ni ²⁺
۱	*Cu ²⁺ , NO ₂ ⁻ , Fe ³⁺ , Fe ²⁺	*Cu ²⁺ , NO ₂ ⁻ , Fe ³⁺ , Fe ²⁺

برای روش‌های به کار برده شده، مزاحمت Fe²⁺, Fe³⁺ به دلیل تشکیل رسوب این کاتیون‌ها با فسفات ناشی از بافر است. علت مزاحمت NO₂⁻ به دلیل جذب بالای این ترکیب در ناحیه‌ی مورد نظر است که ناشی از انتقالات n به π* می‌باشد [۲۲]. برای رفع مزاحمت Cu²⁺ ابتدا به محلول حاوی کاتیون و نمونه دو قطره سود یک مولار اضافه شد تا تشکیل رسوب دهد بعد بافر اضافه شد سپس رسوب جداشده و طیف محلول گونه گرفته شد.

۳-۱۹-۲- حد تشخیص روش‌های CC-SS, EXRSM و RHPSAM

به منظور بررسی حد تشخیص روش ۱۰ مرتبه طیف محلول شاهد گرفته شد و طیف هر محلول در محدوده طول موجی ۲۴۰-۵۵۰ نانومتر ثبت گردید و غلظت اورتو-نیتروآنیلین و پارا-نیتروآنیلین با استفاده از هر روش به دست آمد. در این روش از تقسیم سه برابر انحراف استاندارد سیگنال شاهد بر شیب منحنی کالیبراسیون، حد تشخیص به دست آمد [۳۸]. با توجه به تعریف فوق، حد تشخیص روش EXRSM برای پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین به ترتیب ۰/۱۵ و ۰/۱۲ میلی‌گرم بر لیتر، حد تشخیص روش CC-SS برای پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین به ترتیب ۰/۲۳ و ۰/۰۹۱ میلی‌گرم بر لیتر و حد تشخیص روش RHPSAM برای پارا-نیتروآنیلین و اورتونیتروآنیلین به ترتیب ۰/۰۷۱ و ۰/۰۵۲ به دست آمد.

۳-۱۹-۳- دقت و صحت روش‌های EXRSM, CC-SS و RHPSAM

برای بررسی دقت و صحت روش‌های EXRSM, CC-SS و RHPSAM محلول‌هایی با غلظت‌های متفاوت از پارانیتروانیلین و اورتو-نیتروآنیلین 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 پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین با استفاده از روش‌های گفته شده تعیین شد. مقادیر انحراف استاندارد برای هر غلظت محاسبه شد. نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت برای روش EXRSM و روش CC-SS در جدول ۳-۴۷ و برای روش RHPSAM در جدول ۳-۴۸ آورده شده است که نشان دهنده دقت و صحت خوب این روش‌ها می‌باشد.

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

درصد بازیابی		% RSD (n=5)		میانگین مقدار پیش بینی شده در مخلوط (میلی گرم بر لیتر)		غلظت‌های موجود در مخلوط (میلی گرم بر لیتر)		روش
		پارا نیتروآنیلین	اورتو نیتروآنیلین	پارا نیتروآنیلین	اورتو نیتروآنیلین	پارا نیتروآنیلین	اورتو نیتروآنیلین	
۱۰۰/۷	۱۰۱/۷	۱/۵۴	۱/۱۳	۳/۰۲	۵/۰۶	۳/۰۰	۵/۰۰	EXRSM
۱۰۰/۵	۱۰۰/۸	۱/۳۵	۰/۹۵	۳/۰۲	۱۰/۰۸	۳/۰۰	۱۰/۰۰	
۱۰۰/۹	۱۰۰/۰	۱/۵۵	۲/۰۰	۱/۰۱	۲/۰۰	۱/۰۰	۲/۰۰	
۱۰۰/۰	۱۰۱/۷	۱/۳۵	۱/۴۰	۲/۰۰	۲/۰۳	۲/۰۰	۲/۰۰	
۱۰۰/۷	۹۹/۹	۱/۳۲	۱/۵۰	۳/۰۲	۴/۹۹	۳/۰۰	۵/۰۰	CC-SS
۱۰۱/۴	۱۰۰/۷	۱/۶۴	۲/۳۳	۳/۰۴	۱۰/۰۷	۳/۰۰	۱۰/۰۰	
۱۰۳/۱	۹۷/۹	۲/۲۹	۱/۹۱	۱/۰۳	۱/۹۶	۱/۰۰	۲/۰۰	
۱۰۱/۲	۹۹/۴	۱/۴۸	۱/۳۳	۲/۰۲	۱/۹۹	۲/۰۰	۲/۰۰	

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

درصد بازیابی		% RSD (n=5)		میانگین مقدار پیش بینی شده در مخلوط (میلی گرم بر لیتر)		غلظت‌های موجود در مخلوط (میلی گرم بر لیتر)		شماره محلول
		پارا نیتروآنیلین	اورتو نیتروآنیلین	پارا نیتروآنیلین	اورتو نیتروآنیلین	پارا نیتروآنیلین	اورتو نیتروآنیلین	
۱۰۲/۷	۱۰۰/۸	۲/۲۷	۱/۷۵	۳/۰۸	۵/۰۴	۳/۰۰	۵/۰۰	۱
۱۰۲/۸	۱۰۲/۱	۲/۶۰	۲/۱۰	۳/۰۸	۱۰/۲۰	۳/۰۰	۱۰/۰۰	۲
۱۰۰/۰	۱۰۰/۹	۱/۸۰	۱/۶۳	۱/۰۰	۲/۰۲	۱/۰۰	۲/۰۰	۳
۱۰۳/۱	۹۹/۴	۲/۹۱	۱/۷۶	۲/۰۶	۱/۹۹	۲/۰۰	۲/۰۰	۴

۳-۱۹-۴- کاربرد روش‌های CC-SS, EXRSM و RHPSAM در آنالیز

نمونه‌های حقیقی

به منظور ارزیابی توانایی روش CC-SS, EXRSM و RHPSAM در اندازه‌گیری همزمان پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین، 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؛

برای محلول نمونه‌ی اول ابتدا ۱۰/۰۰ میلی‌لیتر محلول ۵۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین به یک بالن حجمی ۵۰ میلی‌لیتری و ۸/۰۰ میلی‌لیتر محلول ۵۰۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین به همان بالن حجمی ۵۰ میلی‌لیتری، انتقال داده شد و با آب شهر به حجم رسانده شد. سپس از این محلول‌ها، مخلوط‌هایی با نسبت‌های غلظتی مختلف از دو ایزومر 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 پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین در مخلوط‌های تهیه شده، با استفاده از روش افزایش استاندارد مورد بررسی قرار گرفت.

برای مخلوط‌های سری دوم به ترتیب ۴/۰۰ و ۱۰/۰۰ میلی لیتر از محلول‌های ۵۰۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر از پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین به بالن حجمی ۵۰ میلی لیتری منتقل شده و با آب شهر به حجم رسانده شد، در ادامه مانند مرحله‌ی قبل عمل شد.

نتایج حاصل از ۵ بار اندازه‌گیری تکراری برای روش EXRSM در جدول ۳-۴۹ و برای روش CC-SS در جدول ۳-۵۰ آورده شده است.

جدول ۳-۴۹: نتایج حاصل از اندازه‌گیری پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین در نمونه‌های آب شهر با استفاده از روش

EXRSM

درصد بازیابی		%RDS (n=5)		مقدار اندازه‌گیری شده (میلی گرم بر لیتر)		مقدار افزوده شده (میلی گرم بر لیتر)		نمونه
پارا نیترو آنیلین	اورتو نیترو آنیلین	پارا نیترو آنیلین	اورتو نیترو آنیلین	پارا نیترو آنیلین	اورتونیترو آنیلین	پارانیترو آنیلین	اورتو نیترو آنیلین	
۱۰۰/۰۰	۱۰۰/۵	۲/۵۵	۱/۹۷	۲/۰۱	۵/۰۳	۲/۰۰	۵/۰۰	آب شهر
۱۰۳/۳	۹۹/۹	۳/۰۱	۱/۴۴	۲/۵۸	۴/۹۹	۲/۵۰	۵/۰۰	آب شهر
۱۰۱/۷	۹۹/۴	۱/۹۹	۱/۵۳	۳/۰۵	۴/۹۷	۳/۰۰	۵/۰۰	آب شهر
۱۰۵/۰۰	۹۹/۹	۳/۹۳	۲/۳۸	۱/۰۵	۳/۹۹	۱/۰۰	۴/۰۰	آب شهر
۱۰۳/۴	۱۰۰/۸	۳/۲۴	۲/۷۰	۲/۰۷	۴/۰۳	۲/۰۰	۴/۰۰	آب شهر
۱۰۱/۸	۱۰۱/۷	۲/۴۵	۲/۳۳	۳/۰۵	۴/۰۷	۳/۰۰	۴/۰۰	آب شهر
۱۰۳/۳	۱۰۰/۴	۳/۶۹	۱/۶۸	۱/۰۳	۸/۰۳	۱/۰۰	۸/۰۰	آب شهر
۱۰۳/۱	۱۰۱/۰	۲/۷۶	۱/۷۸	۲/۰۶	۸/۰۸	۲/۰۰	۸/۰۰	آب شهر
۱۰۱/۲	۱۰۱/۲	۲/۳۶	۱/۵۱	۳/۰۳	۸/۰۹	۳/۰۰	۸/۰۰	آب شهر

جدول ۳-۵: نتایج حاصل از اندازه‌گیری پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین در نمونه‌های آب شهر با استفاده از روش CC-SS

نمونه	مقدار افزوده شده (میلی گرم بر لیتر)		مقدار اندازه‌گیری شده (میلی گرم بر لیتر)		%RSD (n=5)		درصد بازیابی	
	پارا نیتروآنیلین	اورتو نیتروآنیلین	پارا نیتروآنیلین	اورتو نیتروآنیلین	پارا نیتروآنیلین	اورتو نیتروآنیلین	پارا نیتروآنیلین	اورتو نیتروآنیلین
آب شهر	۵/۰۰	۲/۰۰	۵/۰۱	۲/۰۴	۱/۴۵	۳/۴۸	۱۰۰/۱	۱۰۱/۹
آب شهر	۵/۰۰	۲/۵۰	۴/۹۵	۲/۵۹	۱/۰۹	۳/۵۷	۹۹/۰	۱۰۳/۸
آب شهر	۵/۰۰	۳/۰۰	۴/۹۷	۳/۰۸	۱/۲۰	۲/۳۶	۹۹/۵	۱۰۳/۲
آب شهر	۸/۰۰	۱/۰۰	۸/۰۵	۱/۰۳	۱/۰۱	۳/۵۳	۱۰۰/۶	۱۰۲/۵
آب شهر	۸/۰۰	۲/۰۰	۸/۰۹	۲/۰۶	۱/۳۷	۲/۹۶	۱۰۱/۲	۱۰۳/۲
آب شهر	۸/۰۰	۳/۰۰	۸/۰۹	۳/۰۷	۱/۲۶	۲/۵۰	۱۰۱/۱	۱۰۲/۴
آب شهر	۴/۰۰	۱/۰۰	۴/۰۰	۱/۰۱	۱/۲۰	۲/۹۸	۱۰۰/۰	۱۰۰/۰
آب شهر	۴/۰۰	۲/۰۰	۳/۹۹	۲/۰۵	۱/۲۵	۱/۴۶	۹۹/۸	۱۰۲/۶
آب شهر	۴/۰۰	۳/۰۰	۴/۰۲	۳/۰۵	۱/۲۴	۱/۳۱	۱۰۰/۴	۱۰۱/۷

جدول ۳-۵۱: نتایج حاصل از اندازه‌گیری پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین در نمونه‌های آب شهر با استفاده از روش

RHPSAM

نمونه	مقدار افزوده شده (میلی گرم بر لیتر)		مقدار اندازه‌گیری شده (میلی گرم بر لیتر)		%RSD (n=5)		درصد بازیابی	
	پارا نیتروآنیلین	اورتو نیتروآنیلین	پارا نیتروآنیلین	اورتو نیتروآنیلین	پارا نیتروآنیلین	اورتو نیتروآنیلین	پارا نیتروآنیلین	اورتو نیتروآنیلین
آب شهر	۵/۰۰	۲/۰۰	۴/۹۶	۲/۰۳	۱/۶۳	۲/۴۶	۹۹/۲	۱۰۱/۵
آب شهر	۵/۰۰	۲/۵۰	۴/۸۹	۲/۵۵	۱/۸۸	۲/۳۵	۹۷/۸	۱۰۲/۰
آب شهر	۵/۰۰	۳/۰۰	۴/۹۰	۳/۰۲	۱/۶۳	۱/۸۶	۹۸/۰	۱۰۰/۷
آب شهر	۸/۰۰	۱/۰۰	۸/۰۷	۱/۰۱	۰/۹۹	۱/۶۰	۱۰۰/۹	۱۰۱/۰
آب شهر	۸/۰۰	۲/۰۰	۸/۱۴	۲/۰۷	۱/۸۴	۲/۹۰	۱۰۱/۸	۱۰۳/۵
آب شهر	۸/۰۰	۳/۰۰	۷/۹۶	۳/۰۸	۱/۰۵	۳/۲۰	۹۹/۵	۱۰۳/۶
آب شهر	۴/۰۰	۱/۰۰	۳/۹۵	۱/۰۰	۱/۹۸	۲/۴۰	۹۸/۸	۱۰۰/۰
آب شهر	۴/۰۰	۲/۰۰	۳/۸۹	۲/۰۷	۲/۵۰	۳/۳۸	۹۷/۳	۱۰۳/۶

این نتایج نشان می‌دهد که می‌توان غلظت پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین را به‌طور

همزمان با روش‌های EXRSM، RHPSAM و CC-SS در نمونه‌های آب شهر با دقت و صحت

خوبی تعیین کرد.

بحث و نتیجه گیری

۴-۱- اندازه‌گیری همزمان متا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین و اندازه‌گیری

همزمان پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین در مخلوط دوتایی از هر

کدام با استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری

۴-۱-۱- بررسی و بهینه‌سازی پارامترهای تجربی

اثر pH در ناحیه ۱۰/۰-۳/۰ برای مخلوط پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین و مخلوط متا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این بررسی برای مخلوط متا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین در جدول ۲-۳ و شکل ۲-۳ و برای مخلوط پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین در جدول ۳-۲۶ و شکل ۳-۲۷ نشان می‌دهد که تغییرات pH بر میزان سیگنال تجزیه‌ای متا-نیتروآنیلین، پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین و طول موج ماکزیمم جذب آن‌ها تاثیر ندارد. لذا با در نظر گرفتن pH محلول نمونه‌های آلی حاوی ترکیبات مذکور، بافر با pH= ۷/۰ برای مطالعات و بررسی‌های بعدی انتخاب گردید.

نتایج حاصل از بررسی نوع بافر برای مخلوط متا-نیتروآنیلین و پارا-نیتروآنیلین و برای مخلوط پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین به ترتیب در جدول ۳-۳ و جدول ۳-۲۷ آورده شده است. نتایج نشان داد سیگنال تجزیه‌ای در حضور بافر فسفاتی با pH= ۷/۰ و در حضور بافر سیتراتی یکسان است. بنابراین با توجه با اینکه ظرفیت بافری بافر فسفاتی بیشتر است، بافر فسفاتی برای بررسی‌های بعدی انتخاب شد.

در بهینه‌سازی حجم بافر فسفاتی با pH= ۷/۰ اثر حجم بافر در ناحیه ۶/۰۰-۱/۰۰ میلی‌لیتر بررسی شد. نتایج جدول ۳-۴ و شکل ۳-۳ برای مخلوط متا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین و نتایج جدول ۳-۲۸ و شکل ۳-۲۸ برای مخلوط پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین نشان می‌دهد که سیگنال تجزیه‌ای برای هر سه ایزومر با تغییرات حجم بافر ثابت است. بنابراین برای اطمینان از ظرفیت بافری 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 حجمی ۰/۵۰-۰/۰۰ مولار مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این بررسی برای مخلوط متا-نیتروآنیلین و اورتونیتروآنیلین در جدول ۳-۵ و شکل ۳-۴ و برای مخلوط پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین در جدول ۳-۲۹ و شکل ۳-۲۹ نشان می‌دهد که قدرت یونی بر سیگنال تجزیه‌ای اثر ندارد.

۴-۱-۲- ارقام شایستگی روش‌ها

بررسی‌ها نشان داد که برای هر سه روش اسپکتروفتومتری جدید (EXRSM, RHPSAM و CC-SS) دامنه خطی برای متا-نیتروآنیلین ۴۰/۰۰-۵/۰۰، برای اورتو-نیتروآنیلین ۲۵/۰۰-۲/۰۰ و برای پارا-نیتروآنیلین ۱۰/۰۰-۰/۵۰ میلی‌گرم بر لیتر است. نتایج حاصل از پیش‌بینی غلظت متا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین برای محلول‌های سری تست در روش EXRSM, CC-SS و RHPSAM به ترتیب در جدول ۳-۱۲، جدول ۳-۲۲ و جدول ۳-۱۶ آورده شده است. نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت به وسیله هر سه روش برای مخلوط‌های حاوی اورتو-نیتروآنیلین و متا-نیتروآنیلین در جدول (۳-۲۴) و برای مخلوط‌های حاوی اورتو-آنیلین و پارا-نیتروآنیلین در جدول‌های (۳-۴۷) و (۳-۴۸) نشان می‌دهد که روش‌های ارائه شده دارای دقت و صحت خوبی هستند. حد تشخیص روش‌های EXRSM, CC-SS, RHPSAM به ترتیب برای اورتو-نیتروآنیلین ۰/۰۹، ۰/۱۰ و ۰/۰۹، برای متا-نیتروآنیلین ۰/۳۲، ۰/۰۳ و ۰/۴۸، و برای پارا-نیتروآنیلین ۰/۱۶، ۰/۲۳ و ۰/۰۵۶ میلی‌گرم بر لیتر می‌باشد. نتایج حاصل از پیش‌بینی غلظت پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین برای محلول‌های سری تست در روش‌های EXRSM, CC-SS, RHPSAM به ترتیب در جدول ۳-۳۶، جدول ۳-۴۰ و جدول ۳-۴۵ آورده شده است.

۴-۱-۳- ارزیابی آماری

چهار پارامتر آماری برای ارزیابی و بررسی توانایی روش‌های EXRSM, CC-SS, RHPSAM در

پیش‌بینی غلظت متا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین، محاسبه گردید.

اولین پارامتر آماری ضریب هم‌بستگی (R)^۱ 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 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)^۲ 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 است که از معادله ۴-۴ محاسبه می‌شود.

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

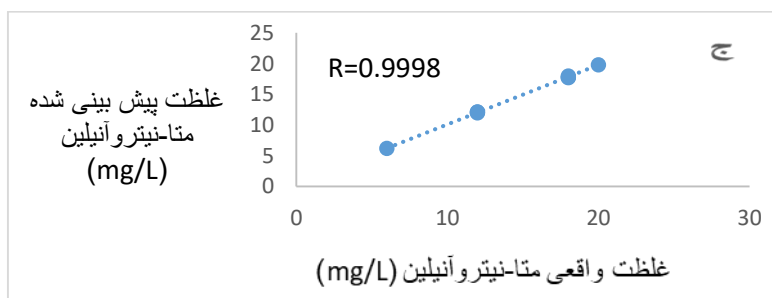
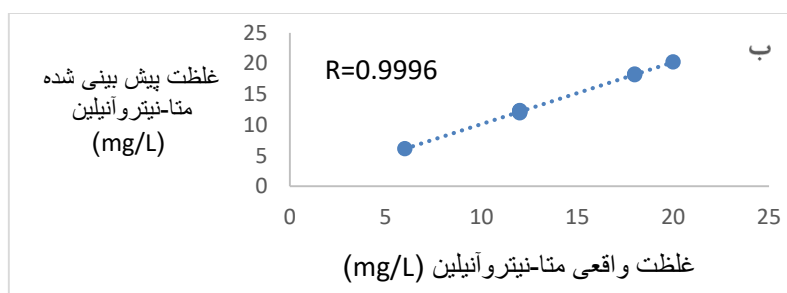
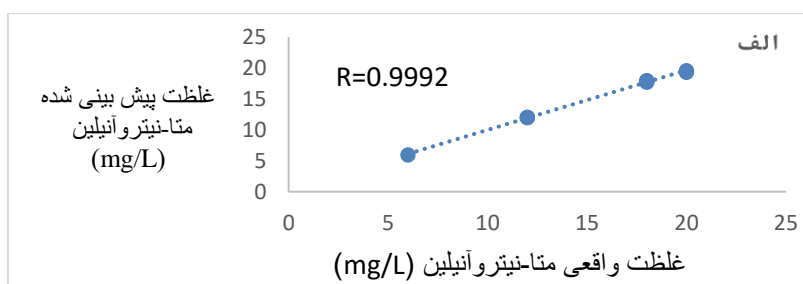
در روابط فوق y_i غلظت واقعی گونه مورد نظر در نمونه i ام، \hat{y}_i غلظت پیش‌بینی شده گونه مورد نظر در نمونه i ام، \bar{y} میانگین غلظت واقعی در سری تست است. n تعداد محلول‌های سری تست است. برای روش‌های EXRSM، CC-SS و RHPSAM نمودار غلظت پیش‌بینی شده بر حسب غلظت واقعی برای متا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین به ترتیب در شکل ۱-۴ و شکل ۲-۴

^۱ Correlation coefficient

^۲ Mean Absolute Error

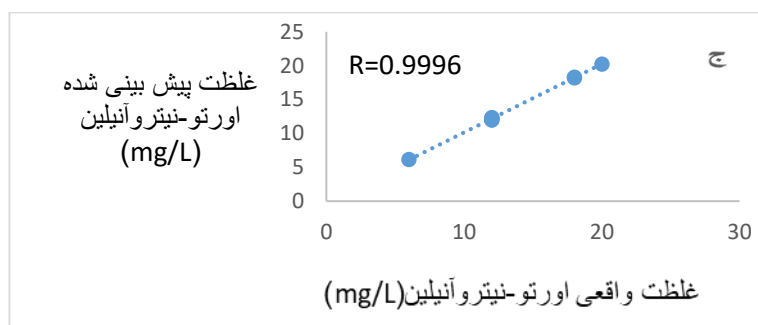
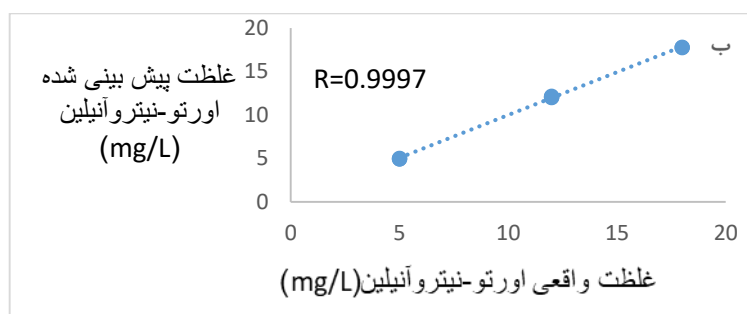
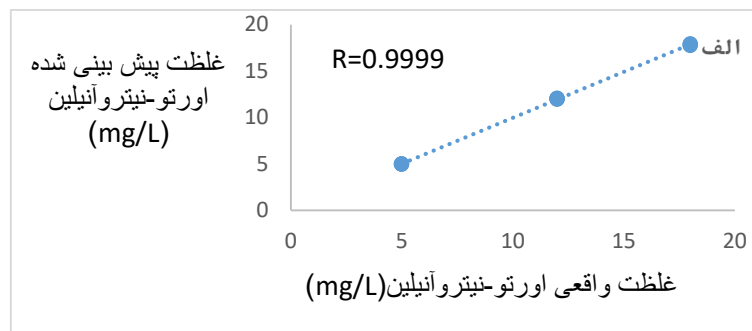
آورده شده است. مقادیر محاسبه شده R ، MAE ، MSE و MRE برای متا-نیتروآنیلین و اورنو-

نیتروآنیلین 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 متا-نیتروآنیلین در مخلوط‌های سری تست،

الف: در روش EXRSM، ب: در روش RHPSAM و ج: در روش CC-SS



شکل ۴-۲: نمایش میزان همبستگی غلظت‌های پیش‌بینی شده و غلظت‌های واقعی اورتو-نیتروآنیلین در مخلوط‌های تست، الف: در روش EXRSM، ب: در روش CC-SS و ج: در روش RHPSAM

ضریب همبستگی مشاهده شده بین مقادیر پیش‌بینی شده و مقادیر واقعی برای متا-

نیتروآنیلین در شکل ۴-۱ و برای اورتو-نیتروآنیلین در شکل ۴-۲، نشان‌دهنده میزان نزدیکی غلظت

پیش‌بینی شده توسط روش‌ها به مقدار واقعی آن است.

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

متا-نیتروآنیلین			پارامتر آماری
RHPSAM	CC-SS	EXRSM	
۰/۹۹۹۶	۰/۹۹۹۸	۰/۹۹۹۲	R
۰/۱۹۰	۰/۱۵۰	۰/۱۸۰	MAE
۱/۴۲۰	۱/۲۰۰	۱/۰۱۵	MRE
۰/۴۷۰	۰/۰۳۰	۰/۰۸۵	MSE

نتایج حاصل از جدول ۱-۴ نشان می‌دهد که خطای حاصل از پیش‌بینی غلظت متا-نیتروآنیلین

با استفاده از روش EXRSM و CC-SS در مقایسه با روش RHPSAM کمتر است.

جدول ۲-۴: پارامترهای آماری محاسبه شده برای روش‌های EXRSM، CC-SS و RHPSAM در سری تست

اورتو-نیتروآنیلین			پارامتر آماری
RHPSAM	CC-SS	EXRSM	
۰/۹۹۹۶	۰/۹۹۹۷	۰/۹۹۹۹	R
۰/۱۵۴	۰/۰۹۳	۰/۰۷۶	MAE
۱/۴۰۰	۰/۷۵۲	۰/۵۰۵	MRE
۰/۴۱۰	۰/۰۱۶	۰/۰۱۳	MSE

محاسبه پارامترهای آماری (جدول ۲-۴) نشان می‌دهد پیش‌بینی غلظت اورتو-نیتروآنیلین با

استفاده از روش RHPSAM نسبت به روش‌های CC-SS و EXRSM خطای بیشتری دارد.

برای ارزیابی و بررسی توانایی روش‌های EXRSM، CC-SS و RHPSAM در پیش‌بینی

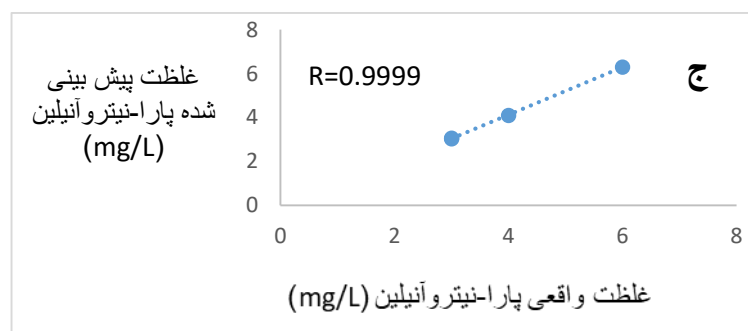
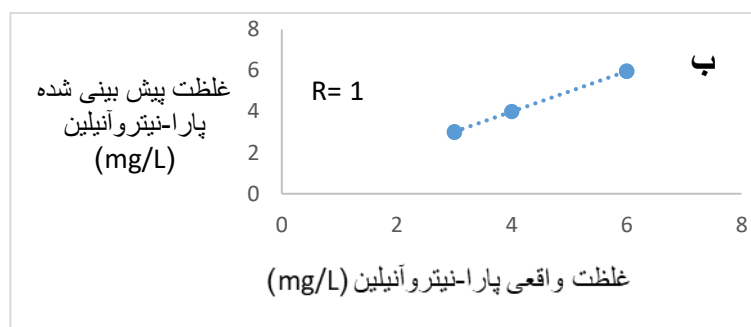
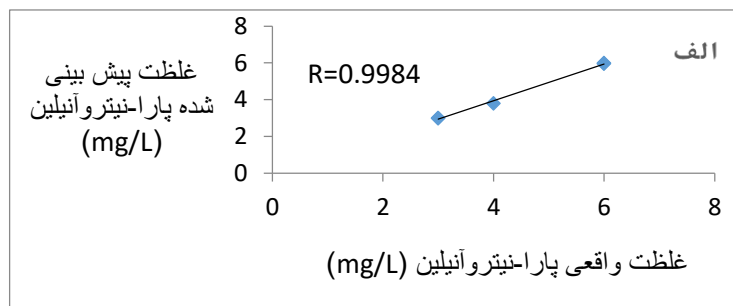
غلظت پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین نیز، چهار پارامتر آماری مذکور محاسبه گردید.

برای روش‌های EXRSM، CC-SS و RHPSAM نمودار غلظت پیش‌بینی شده بر حسب

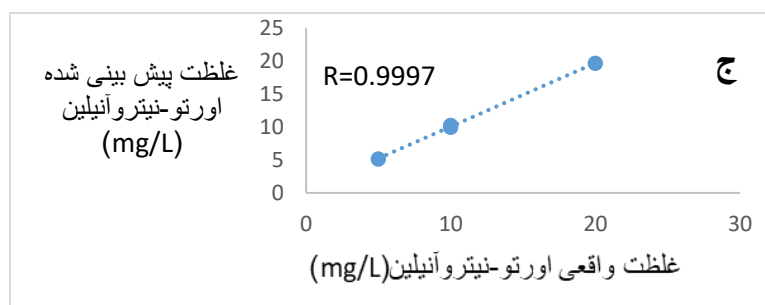
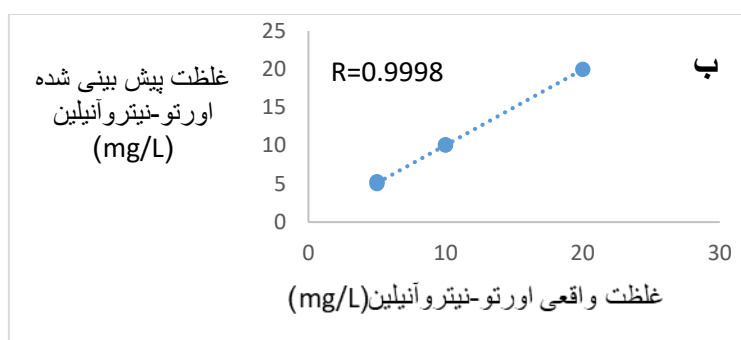
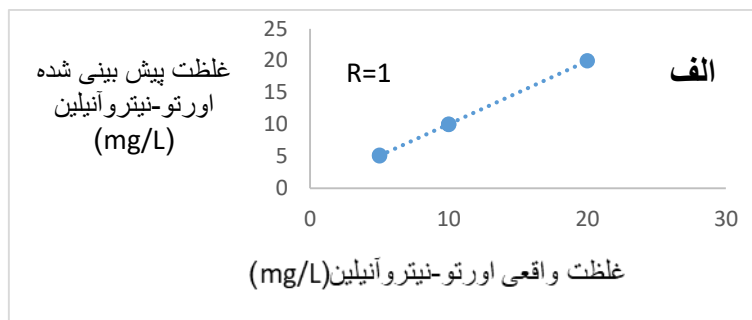
غلظت واقعی برای پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین به ترتیب در شکل ۳-۴ و شکل ۴-۴ آورده شده

است. مقادیر محاسبه شده R، MAE، MSE و MRE برای پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین

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 پارانیتروانیلین در مخلوط‌های سری تست، الف: در روش EXRSM، ب: در روش CC-SS و ج: در روش RHPSSAM



شکل ۴-۴: نمایش میزان همبستگی غلظت‌های پیش‌بینی شده و غلظت‌های واقعی اورتو-نیتروآنیلین در مخلوط‌های سری تست، الف: در روش EXRSM، ب: در روش CC-SS و ج: در روش RHPSAM

ضریب همبستگی مشاهده شده بین مقادیر پیش‌بینی شده و مقادیر واقعی (برای پارا-

نیتروآنیلین در شکل ۳-۴ و برای اورتو-نیتروآنیلین در شکل ۴-۴)، نشان‌دهنده میزان نزدیکی غلظت

پیش‌بینی شده توسط روش‌ها به مقدار واقعی آن است.

جدول ۳-۴: پارامترهای آماری محاسبه شده برای روش‌های EXRSM، CC-SS و RHPSAM در سری تست

پارا-نیتروآنیلین			پارامتر آماری
RHPSAM	CC-SS	EXRSM	
۰/۹۹۹	۱/۰۰۰	۰/۹۹۸۴	R
۰/۱۲۳	۰/۰۲۲	۰/۰۵۲	MAE
۲/۶۳۰	۰/۴۶۷	۱/۲۰۰	MRE
۰/۰۲۶	۰/۰۰۱	۰/۰۰۹	MSE

مطابق جدول ۳-۴، روش‌های EXRSM و CC-SS نسبت به روش RHPSAM نتایج بهتری برای پیش‌بینی غلظت پارا-نیتروآنیلین در مخلوط دوتایی حاوی پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین ارائه می‌دهند.

جدول ۴-۴: پارامترهای آماری محاسبه شده برای روش‌های EXRSM، CC-SS و RHPSAM در سری تست

اورتو-نیتروآنیلین			پارامتر آماری
RHPSAM	CC-SS	EXRSM	
۰/۹۹۹۷	۰/۹۹۹۸	۱/۰۰۰	R
۰/۲۰۰	۰/۰۹۶	۰/۰۶۸	MAE
۲/۰۵۰	۱/۴۹۰	۱/۱۵۰	MRE
۰/۰۵۰	۰/۰۱۸	۰/۰۰۸	MSE

با توجه به نتایج جدول ۴-۴، می‌توان با استفاده از روش‌های EXRSM و CC-SS غلظت اورتو-نیتروآنیلین را با خطای کمتری نسبت به روش RHPSAM پیش‌بینی کرد.

۴-۱-۴ - گزینش پذیری روش

اثر مزاحمت گونه‌های مزاحم در اندازه‌گیری محلول حاوی ۱۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین و محلول ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین (در محلول‌های جداگانه) در روش‌های EXRSM، RHPSAM و CC-SS در جدول ۳-۳ نشان می‌دهد که اکثر کاتیون‌ها و آنیون‌ها در این روش‌ها مزاحمتی ندارند و همچنین مشتقات فنلی و آنیلین نیز اکثراً دارای مزاحمت نیستند و

روش‌های پیشنهادی از گزینش‌پذیری خوبی برخوردار هستند.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری محلول حاوی ۲/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین و محلول ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اورتو-نیتروآنیلین (محلول‌های جداگانه) در حضور گونه‌های مزاحم، با استفاده از روش‌های EXRSM، RHPSAM و CC-SS در جدول ۳-۴۶ آورده شده است. این نتایج نشان می‌دهد، روش‌های پیشنهادی از گزینش‌پذیری خوبی برخوردار هستند.

۴-۱-۵- کاربرد روش

کارایی این روش‌ها در اندازه‌گیری همزمان متا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین و اندازه‌گیری همزمان پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین با تجزیه نمونه‌های حقیقی مانند آب شهر و آب معدنی مورد بررسی قرار گرفت. مقادیر درصد بازیابی و انحراف استاندارد برای روش EXRSM، CC-SS و RHPSAM به ترتیب در جدول ۳-۲۵ برای مخلوط دوتایی متا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین و در جدول ۳-۴۹، جدول ۳-۵۰ و ۳-۵۱ برای مخلوط دوتایی پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین، نشان دهنده دقت و صحت خوب این روش‌ها در اندازه‌گیری همزمان متا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین و اندازه‌گیری همزمان پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین در نمونه‌هایی با بافت نسبتاً پیچیده است. مقادیر درصد‌های بازیابی صحت خوب روش‌های جدید را نشان می‌دهند. بنابراین می‌توان این روش‌ها را در اندازه‌گیری همزمان متا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین یا پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین 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 تحقیق روش‌های اسپکتروفتومتری جدید و ساده برای تعیین همزمان متا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین یا پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین در مخلوط‌های دوتایی آن‌ها به کار گرفته شد. روش‌های پیشنهادی ساده، دقیق و صحیح اند و نیازی به مراحل اولیه جداسازی و دستگاه‌های پیچیده و برنامه‌های کامپیوتری ویژه ندارند. روش‌های به‌کاربرده شده در این تحقیق گزینش‌پذیری خوبی

نسبت به فنل و آنیلین دارد. میانگین خطای مربعات سه روش به کار برده شده در این تحقیق نسبت به روش‌های OSC و الگوریتم ژنتیک [۱۹ و ۲۱] کمتر به دست آمد. روش‌های این تحقیق نسبت به روش استخراج نقطه‌ی ابری [۲۲] انحراف استاندارد بهتری دارند. روش‌های پیشنهادی نسبت به روش‌های مرجع [۲۱ و ۲۲] از درصد بازیابی بهتری در نمونه حقیقی برخوردار است.

۴-۱-۷- آینده‌نگری

با استفاده از سایر روش‌های اسپکتروفتومتری جدید مانند روش اسپکتروفتومتری اختلاف نسبی^۱ و روش فاکتور جذب^۲ می‌توان غلظت متا-نیتروآنیلین، اورتو-نیتروآنیلین و پارا-نیتروآنیلین را در مخلوط‌های دوتایی از هر کدام، به دست آورد [۲۹ و ۴۰].

با استفاده از روش‌های EXRSM، CC-SS و RHPSAM می‌توان اجزای مخلوط‌های دو جزئی و چند جزئی را اندازه‌گیری کرد.

^۱ Ratio difference spectrophotometric method

^۲ Absorption factor method

References

- [1]: Note, T. S. A. (2012). 292: "Determination of Aniline and Nitroanilines in Environmental and Drinking Waters by On-Line SPE". *Sunnyvale, CA [Online] www. dionex. com/en-uswebdocs/111209-AN292-LC-Aniline-Nitroaniline-Water-SPE-05Oct2012-AN70232_E. pdf (accessed Dec 4, 2012).*
- [2]: Yazdi, A. S., Mofazzeli, F., & Es'haghi, Z. (2009). "Determination of 3-nitroaniline in water samples by directly suspended droplet three-phase liquid-phase microextraction using 18-crown-6 ether and high-performance liquid chromatography". *Journal of Chromatography A*, 1216(26), 5086-5091.
- [3]: Mohammad, A., & Hina, S. (2005). "Simultaneous separation of nitroaniline isomers with a water-in-oil microemulsion". *Acta Chromatographica*, 15, 238.
- [4]: Ma, W., & Fang, Y. (2006). "Experimental (SERS) and theoretical (DFT) studies on the adsorption of p-, m-, and o-nitroaniline on gold nanoparticles". *Journal of colloid and interface science*, 303(1), 1-8.
- [5]: Wang, H., Jiang, H., Song, N., Liu, X., & Jia, Q. (2014). "Application of cloud point methodology to the determination of nitroanilines in natural water". *Korean Journal of Chemical Engineering*, 31(12), 2261-2265.
- [6]: Xiang, G., Tong, C., & Lin, H. (2007). "Nitroaniline isomers interaction with bovine serum albumin and toxicological implications". *Journal of fluorescence*, 17(5), 512-521.
- [7]: Tong, C., Guo, Y., & Liu, W. (2010). "Simultaneous determination of five nitroaniline and dinitroaniline isomers in wastewaters by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection". *Chemosphere*, 81(3), 430-435.
- [8]: Hasani, M., & Emami, F. (2008). "Evaluation of feed-forward back propagation and radial basis function neural networks in simultaneous kinetic spectrophotometric determination of nitroaniline isomers". *Talanta*, 75(1), 116-126.
- [9]: Guo, X., Lv, J., Zhang, W., Wang, Q., He, P., & Fang, Y. (2006). "Separation and determination of nitroaniline isomers by capillary zone electrophoresis with amperometric detection". *Talanta*, 69(1), 121-125.
- [10]: Oturan, M. A., Peirotten, J., Chartrin, P., & Acher, A. J. (2000). "Complete destruction of p-nitrophenol in aqueous medium by electro-Fenton method". *Environmental Science & Technology*, 34(16), 3474-3479.
- [11]: <http://www.sigmaldrich.com>
- [12]: Kovalenko, S. A., Schanz, R., Farztdinov, V. M., Hennig, H., & Ernsting, N. P. (2000). "Femtosecond relaxation of photoexcited para-nitroaniline: solvation, charge transfer, internal conversion and cooling". *Chemical Physics Letters*, 323(3), 312-322.
- [13]: Li, K., Zheng, Z., Feng, J., Zhang, J., Luo, X., Zhao, G., & Huang, X. (2009). "Adsorption of p-nitroaniline from aqueous solutions onto activated carbon fiber prepared from cotton stalk". *Journal of hazardous materials*, 166(2), 1180-1185.
- [14]: Li, K., Li, Y., & Zheng, Z. (2010). "Kinetics and mechanism studies of p-nitroaniline adsorption on activated carbon fibers prepared from cotton stalk by NH₄H₂PO₄ activation and

subsequent gasification with steam". *Journal of hazardous materials*, 178(1), 553-559.

[15]: Sun, J. H., Sun, S. P., Fan, M. H., Guo, H. Q., Qiao, L. P., & Sun, R. X. (2007). "A kinetic study on the degradation of p-nitroaniline by Fenton oxidation process". *Journal of hazardous materials*, 148(1), 172-177.

[16]: Shkir, M., Riscob, B., Hasmuddin, M., Singh, P., Ganesh, V., Wahab, M. A., & Bhagavannarayana, G. (2014). "Optical spectroscopy, crystalline perfection, etching and mechanical studies on P-nitroaniline (PNA) single crystals". *Optical Materials*, 36(3), 675-681.

[17]: <http://www.merckmillipore.com>

[18]: Zhu, J., Li, M., Zhang, H., Ning, Y., & Jin, J. (2014). "Determination and calculation for solubility of m-nitroaniline and its mixture in supercritical carbon dioxide". *Chemical Engineering Research and Design*, 92(12), 2806-2813.

[19]: Ghasemi, J., & Niazi, A. (2005). "Spectrophotometric simultaneous determination of nitroaniline isomers by orthogonal signal correction-partial least squares". *Talanta*, 65(5), 1168-1173.

[20]: Niazi, A., Ghasemi, J., & Yazdanipour, A. (2007). "Simultaneous spectrophotometric determination of nitroaniline isomers after cloud point extraction by using least-squares support vector machines". *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 68(3), 523-530.

[21]: Goodarzi, M., Malik, A. K., & Goudarzi, N. (2012). "Simultaneous spectrophotometric determination of nitroanilines using genetic-algorithm-based wavelength selection in principal component-artificial neural network". *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 6(3), 135-143.

[۲۲]: داگلاس ای. اسکوگ، اف جیمز هالر، تی مو تی ای. نیمن، (1386)، "اصول تجزیه دستگاہی". جلد اول، عبد الرضا

سلاجقه، چاپ پنجم، مرکز نشر دانشگاهی، تهران، ۱۹۰.

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

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

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

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

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

[28]: Eskandari, H. (2006). "H-point standard addition method—First derivative spectrophotometry

for simultaneous determination of palladium and cobalt". *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 63(2), 391-397.

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

[۳۰]: 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.

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

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

[33]: Lotfy, H. M., & Hagazy, M. A. M. (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*, 96, 259-270.

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

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

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

[37]: Lotfy, H. M. (2012). "Determination of simvastatin and ezetimibe in combined tablet dosage forms by constant center spectrophotometric method". *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, vol 4, 673-679.

[38]: hand book

[39]: Niazi, A. (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.

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

Abstract

In the first section of this thesis three novel spectrometric methods including extended ratio subtraction method (EXRSM) Constant center coupled with spectrum subtraction (CC-SS) Ratio H-point standard addition method (RHPSAM) were presented for simultaneous determination of m-Nitroaniline and o-Nitroaniline. In the second section, same methods were considered for simultaneous determination of p-Nitroaniline and o-Nitroaniline. effective factors on sensitivity of method were considered and optimised. In the first section of this thesis, for the three methods used, Linear range of 5-40 and 5-25 mg.L⁻¹ were respectively obtained for m-Nitroaniline and o-Nitroaniline, However, the Linear range were 0.5-10 and 2-20 mg.L⁻¹ respectively for p-Nitroaniline and o-Nitroaniline using the three methods in the second part

of research. In the first section, using EXRSM, CC-SS and RHPSAM methods, the detection limit for m-Nitroaniline were respectively 0.320, 0.030, 0.480 mg.L⁻¹ and the detection limit for o-Nitroaniline were respectively 0.09, 0.09 and 0.1 mg.L⁻¹. In the second section, the detection limit for p-Nitroaniline were 0.160, 0.023 and 0.56 mg.L⁻¹ and for o-Nitroaniline were 0.120, 0.090 and .083 mg.L⁻¹, respectively for EXRSM, CC-SS and RHPSAM methods. the Influence of different interferences on the selectivity of the methods were also considered. All proposed methods have admissible precision and accuracy for determination of m-Nitroaniline, p-Nitroaniline and o-Nitroaniline in their binary mixtures exist in tap water.

keywords: m-Nitroaniline, p-Nitroaniline, O-Nitroaniline, extended ratio subtraction method, Constant center coupled with spectrum subtraction method, Ratio H-point standard addition



Shahrood University of Technology

Faculty of Chemistry

**Application of novel spectrophotometric methods for
simultaneous determination of Nitroaniline isomers in binary
mixtures**

Seyed Ali Sabuori

Supervisors:

Dr. Gh. Bagherian Dehaghi

Advisor:

Dr. F. Masdarolomoor

September 2017