

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه صنعتی شاهرود

دانشکده شیمی

گروه شیمی تجزیه

پایان نامه کارشناسی ارشد

تعیین مقدار آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید در مخلوط‌های

دوتایی آن‌ها، با استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری جدید

راضیه رهداری

استاد راهنما:

دکتر قدمعلی باقریان‌دهقی

استاد مشاور:

پروفسور منصور عرب‌چم‌جنگلی

شهریور ماه ۱۳۹۶

تقدیم به خانواده عزیزم؛

مهربان فرشتگانی که لحظات ناب باور بودن، لذت و غرور
دانستن، جسارت خواستن، عظمت رسیدن و تمام تجربه های
یکتا و زیبای زندگیم، مدیون حضور سبز آنهاست...

تشکر و قدردانی

امروز که به همت پروردگار بی همتا

و به مدد دعای پدر و مادر عزیزتر از جانم

و لطف و راهنمایی استاد گرانقدرم جناب آقای دکتر قدمعلی باقریان دهقی

و اساتید عزیز و بزرگوام جناب آقای دکتر منصور عرب چم جنگلی، جناب

آقای دکتر ناصر گودرزی و سرکار خانم دکتر مصدراامور

برگی دیگر از دفتر بزرگ علم و دانش را ورق زدم

خاضعانه دست بوس تمام کسانی ام

که باعث دلگرمی من بودند.

تعهد نامه

- اینجانب راضیه رهداری دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته شیمی تجزیه دانشکده شیمی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه تعیین مقدار آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید در مخلوط های دوتایی آن ها، 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 پژوهش های 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 .

امضای دانشجو

تاریخ

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 این پایان نامه شش روش اسپکتروفتومتری جدید، ساده، دقیق و صحیح برای تعیین همزمان آسکوربیک اسید (ویتامین C-) و استیل سالیسیلیک اسید (آسپرین) ارائه شده است. روش‌های اسپکتروفتومتری جدید روش توسعه یافته تفاضل نسبی (EXRSM)، روش کم کردن نسبی همزمان (SRSM)، کم کردن نسبی همزمان همراه با ضرب کردن مقدار ثابت (SRS-CM)، روش مرکز ثابت همراه با کم کردن طیفی (CC-SS)، روش اختلاف نسبی (RD) و روش افزایش استاندارد نقطه H نسبی (RHPSAM) می باشند. فاکتورهای موثر بر حساسیت روش‌ها مورد بررسی و بهینه‌سازی قرار گرفتند. دامنه خطی آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید برای روش‌های EXRSM، SRSM، SRS-CM، CC-SS، به ترتیب (۲/۰۰-۳۰/۰۰) و (۱۰/۰۰-۳۰/۰۰) میلی گرم بر لیتر و برای روش RHPSAM به ترتیب (۳/۰۰-۲۵/۰۰) و (۱۰/۰۰-۲۵/۰۰) میلی گرم بر لیتر به دست آمد. در روش‌های EXRSM، SRSM، SRS-CM، CC-SS، RD و RHPSAM حد تشخیص برای آسکوربیک اسید به ترتیب ۰/۴۳۵، ۰/۰۱۹، ۰/۰۱۹، ۰/۵۱۹، ۰/۱۱۵ و ۰/۲۵۶ میلی گرم بر لیتر و استیل-سالیسیلیک اسید به ترتیب ۱/۴۴، ۲/۸۱، ۴/۲۰، ۰/۸۳۳، ۰/۳۶۳ و ۱/۳۹ میلی گرم بر لیتر به دست آمد. اثر مزاحمت گونه‌های مختلف بر گزینش پذیری روش‌ها بررسی شد. روش‌های پیشنهادی برای اندازه‌گیری همزمان آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید در نمونه آب شهر و نمونه قرص سنتزی با دقت و صحت رضایت بخشی به کار برده شد.

لغات کلیدی: آسکوربیک اسید، استیل سالیسیلیک اسید، روش توسعه یافته تفاضل نسبی (EXRSM)، روش کم کردن نسبی همزمان (SRSM)، روش مرکز ثابت همراه با کم کردن طیفی (CC-SS) و روش افزایش استاندارد نقطه H نسبی (RHPSAM)

۱-مقدمه	۱
۱-۱- مقدمه	۲
۱-۲- آسکوربیک اسید	۲
۱-۳- استیل سالیسیلیک اسید	۴
۱-۴- مروری بر کارهای انجام شده در زمینه اندازه گیری همزمان آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید در مخلوط های دوتایی آنها	۴
۲- تئوری	۹
۲-۱- مقدمه ای بر اسپکتروسکوپی جذبی	۱۰
۲-۲- کالیبراسیون	۱۱
۲-۲-۱- کالیبراسیون یک متغیره	۱۲
۳- تجربی	۲۷
۱-۳- اندازه گیری همزمان استیل سالیسیلیک اسید و آسکوربیک اسید با استفاده از روش های اسپکتروفتومتری جدید	۲۸
۲-۳- مواد شیمیایی مورد استفاده	۲۸
۳-۳- محلول های مورد استفاده و طرز تهیه آنها	۲۸
۳-۴- دستگاه ها و وسایل مورد استفاده	۲۹
۳-۵- طیف جذبی	۳۰
۳-۶- بررسی و بهینه سازی پارامترهای موثر بر سیستم	۳۲
۳-۶-۱- بررسی اثر pH	۳۲
۳-۶-۲- بررسی اثر نوع بافر	۳۴
۳-۷- بررسی اثر حجم بافر	۳۵

- ۳-۸- بررسی اثر قدرت یونی ۳۷
- ۳-۹- شرایط بهینه ۳۸
- ۳-۱۰- رسم منحنی کالیبراسیون ۳۹
- ۳-۱۰-۱- تعیین دامنه خطی استیل سالیسیلیک اسید و آسکوربیک اسید به صورت جداگانه ۳۹
- ۳-۱۰-۲- محلول سازی سری ارزیابی و تست ۴۲
- ۳-۱۱- کاربرد روش توسعه یافته تفاضل نسبی (EXRSM) در تعیین غلظت آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید ۴۴
- ۳-۱۲- کاربرد روش کم کردن نسبی همزمان (SRSM) در تعیین غلظت آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید ۵۴
- ۳-۱۳- کاربرد روش کم کردن نسبی همزمان همراه با ضرب کردن مقدار ثابت (SRS-CM) در تعیین غلظت آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید ۵۹
- ۳-۱۴- کاربرد روش مرکز ثابت همراه با کم کردن طیفی (CC-SS) برای تعیین غلظت آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید ۶۱
- ۳-۱۵- کاربرد روش اختلاف نسبی (RD) در تعیین غلظت آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید ۶۹
- ۳-۱۶- کاربرد روش افزایش استاندارد نقطه H نسبی (RHPSAM) در تعیین غلظت آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید ۷۹
- ۳-۱۷- بررسی اثر مزاحمت ها در روشهای اسپکتروفتومتری جدید (EXRSM, SRSM, SRS-CM, RHPSAM, RD, CC-SS) ۸۷
- ۳-۱۸- حد تشخیص روش های EXRSM, SRSM, SRS-CM, RD, RHPSAM, CC-SS ۹۰
- ۳-۱۹- دقت و صحت روش های EXRSM, SRSM, SRS-CM, RD, RHPSAM ۹۱
- ۳-۲۰- کاربرد روش های EXRSM, SRSM, SRS-CM, RD, RHPSAM در آنالیز نمونه های حقیقی ۹۴
- ۳-۲۰-۱- کاربرد روش های EXRSM, SRSM, SRS-CM, RD, RHPSAM در آنالیز نمونه قرص سنتزی ۹۵

۳-۲۰-۲- کاربرد روش های EXRSM، SRSM، SRS-CM، CC-SS، RD و RHPSAM در آنالیز	
نمونه آب شهر شاهرود	۱۰۰
۴- بحث و نتیجه گیری	۱۰۴
۴-۱- اندازه گیری همزمان آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید در مخلوط دوتایی آن ها با	
استفاده از روش های اسپکتروفتومتری	۱۰۶
۴-۱-۱- بررسی و بهینه سازی پارامتر های تجربی	۱۰۶
۴-۱-۲- ارقام شایستگی روش ها	۱۰۸
۴-۱-۳- ارزیابی آماری روش ها	۱۰۹
۴-۱-۴- کاربرد روش	۱۱۸
۴-۱-۵- مقایسه روش های پیشنهادی با برخی از روش های موجود	۱۱۸

فهرست شکل ها

- شکل ۱-۱: فرمول ساختاری آسکوربیک اسید (الف) و استیل سالیسیلیک اسید (ب) ۳
- شکل ۱-۳: طیف جذبی ۱۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر آسکوربیک اسید (...), طیف جذبی ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر استیل سالیسیلیک اسید (- -) و طیف جذبی مخلوط ۱۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر آسکوربیک اسید و ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر و ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر استیل سالیسیلیک اسید در $pH=2/5$ () ۳۰
- شکل ۲-۳: بررسی اثر pH بر جذب آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید ۳۴
- شکل ۳-۳: بررسی اثر حجم بافر سیتراتی با $pH=2/5$ بر جذب آسکوربیک اسید (۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر) و استیل سالیسیلیک اسید (۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر) ۳۶
- شکل ۴-۳: بررسی اثر قدرت یونی. شرایط: محلول های ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر آسکوربیک اسید و یا ۱۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر استیل سالیسیلیک اسید، در حضور ۲/۰۰ میلی لیتر بافر سیتراتی با $pH=2/5$ ۳۸
- شکل ۵-۳: الف : منحنی کالیبراسیون استیل سالیسیلیک اسید (mg/L) و ب : منحنی کالیبراسیون آسکوربیک اسید (mg/L) در شرایط بهینه : ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفات با $pH=2/5$ ۴۱
- شکل ۶-۳: طیف های جذبی مخلوط های حاوی ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰، ۳۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر آسکوربیک اسید و ۱۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر استیل سالیسیلیک اسید در شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی لیتر محلول بافر سیتراتی با $pH=2/5$ ۴۵
- شکل ۷-۳: طیف های نسبی حاصل از تقسیم مخلوط های حاوی ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰، ۳۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر آسکوربیک اسید و ۱۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر استیل سالیسیلیک اسید بر طیف ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر استیل سالیسیلیک اسید (مقسوم علیه) ۴۵
- شکل ۸-۳: طیف های نسبی حاصل از تقسیم مخلوط های حاوی ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰، ۳۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر آسکوربیک اسید و ۱۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر استیل سالیسیلیک اسید بر طیف ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر استیل سالیسیلیک اسید بعد از کم کردن مقدار ثابت ۴۶
- شکل ۹-۳: طیف های جذبی مرتبه صفر به دست آمده از غلظت های ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰، ۳۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر آسکوربیک اسید و ۱۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر استیل سالیسیلیک اسید تقسیم شده بر طیف محلول ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر استیل سالیسیلیک اسید بعد از کم کردن مقدار ثابت و ضرب کردن در طیف محلول ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر استیل سالیسیلیک اسید ۴۷
- شکل ۱۰-۳: طیف های نسبی حاصل از تقسیم طیف های ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰، ۳۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر آسکوربیک اسید بر طیف محلول ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر آسکوربیک اسید (مقسوم علیه) ۵۰
- شکل ۱۱-۳: طیف های نسبی حاصل از تقسیم مخلوط های حاوی ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰، ۳۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر آسکوربیک اسید و ۱۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر استیل سالیسیلیک اسید بر طیف ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر آسکوربیک اسید (مقسوم علیه) ۵۱
- شکل ۱۲-۳: طیف های نسبی حاصل از تقسیم مخلوط های حاوی ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰، ۳۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر آسکوربیک اسید و ۱۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر استیل سالیسیلیک اسید بر طیف ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر آسکوربیک اسید (مقسوم علیه) بعد از کم کردن مقدار ثابت ۵۲

- شکل ۳-۱۳: طیف های جذبی مرتبه صفر غلظت ۱۰/۰۰ میلی گرم استیل سالیسیلیک اسید بعد از ضرب کردن طیف های متناظر آن در شکل ۳-۱۳ در طیف محلول ۲۰/۰۰ میلی گرم برلیتر آسکوربیک اسید (مقسوم علیه) ۵۲
- شکل ۳-۱۴: طیف های نسبی حاصل از تقسیم طیف محلول های ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۱۵/۰۰، ۲۰/۰۰، ۳۰/۰۰ میلی گرم برلیتر آسکوربیک اسید بر طیف ۲۰/۰۰ میلیگرم برلیتر استیل سالیسیلیک اسید (به عنوان مقسوم علیه) ۵۵
- شکل ۳-۱۵: منحنی کالیبراسیون آسکوربیک اسید در شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی لیتر بافر سیتراتی با pH= ۲/۵ در طول موج ۲۵۲/۶ نانومتر برای روش SRSM ۵۶
- شکل ۳-۱۶: طیف نسبی حاصل از تقسیم طیف محلول های ۱۰/۰۰، ۱۵/۰۰، ۲۰/۰۰، ۲۵/۰۰، ۳۰/۰۰ میلیگرم بر لیتر استیل سالیسیلیک اسید بر طیف محلول ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر استیل سالیسیلیک اسید (به عنوان مقسوم علیه) ۵۷
- شکل ۳-۱۷: منحنی کالیبراسیون استیل سالیسیلیک اسید در شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی لیتر بافر سیتراتی با pH= ۲/۵ برای روش SRSM ۵۷
- شکل ۳-۱۸: طیف های جذبی مرتبه صفر غلظت ۱۰/۰۰ میلی گرم استیل سالیسیلیک اسید بعد از ضرب کردن ثابت های متناظر استیل سالیسیلیک اسید در مخلوط ها (شکل ۳-۸) در طیف محلول ۲۰/۰۰ میلی گرم برلیتر استیل سالیسیلیک اسید (به عنوان مقسوم علیه) ۶۱
- شکل ۳-۱۹: طیف های نسبی حاصل از تقسیم محلول های ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰، ۳۰/۰۰ میلی گرم برلیتر استیل سالیسیلیک اسید بر طیف ۲۰/۰۰ میلی گرم برلیتر آسکوربیک اسید (مقسوم علیه) ۶۳
- شکل ۳-۲۰: نمودار حاصل از رسم اختلاف بزرگی دامنه های نسبی P_1 و P_2 به ترتیب در طول موج های ۲۸۰ و ۲۵۵ نانومتر بر حسب دامنه نسبی P_1 در طول موج ۲۸۰ نانومتر در روش CC-SS ۶۴
- شکل ۳-۲۱: طیف تقسیم شده مخلوط های ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰، ۳۰/۰۰ میلی گرم برلیتر آسکوربیک اسید و ۱۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر استیل سالیسیلیک اسید بر طیف محلول ۲۰/۰۰ میلی گرم برلیتر آسکوربیک اسید به عنوان مقسوم علیه ۶۴
- شکل ۳-۲۲: طیف های جذبی مرتبه صفر به دست آمده از ضرب کردن ثابت بدست آمده برای مخلوط های ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰، ۳۰/۰۰ میلی گرم برلیتر آسکوربیک اسید و ۱۰/۰۰ میلی گرم برلیتر استیل سالیسیلیک اسید در طیف محلول خالص ۲۰/۰۰ میلی گرم برلیتر آسکوربیک اسید (به عنوان مقسوم علیه) ۶۶
- شکل ۳-۲۳: طیف های جذبی مرتبه صفر استیل سالیسیلیک اسید حاصل از کم کردن از طیف های خالص آسکوربیک اسید به دست آمده برای هر مخلوط از طیف مخلوط های ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰، ۳۰/۰۰ میلی گرم برلیتر آسکوربیک اسید و ۱۰/۰۰ میلی گرم برلیتر استیل سالیسیلیک اسید ۶۶
- شکل ۳-۲۴: طیف جذبی ۱۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر آسکوربیک اسید (قرمز)، طیف جذبی ۲۰/۰۰ میلیگرم بر لیتر استیل سالیسیلیک اسید (آبی) در بافر سیتراتی با pH= ۲/۵ ۷۰
- شکل ۳-۲۵: طیف های جذبی مرتبه صفر محلول های ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰، ۳۰/۰۰ میلی گرم برلیتر

- ۷۰ pH = ۲/۵ در بافر سیتراتی با ۲/۵
 شکل ۳-۲۶: طیف های نسبی حاصل از تقسیم طیف محلول های ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰، ۳۰/۰۰ میلی گرم برلیتر آسکوربیک اسید بر طیف محلول ۲۰/۰۰ میلی گرم برلیتر استیل سالیسیلیک اسید به عنوان مقسوم علیه
 ۷۱
 شکل ۳-۲۷: نمودار کالیبراسیون آسکوربیک اسید در روش RD: حاصل از رسم اختلاف بزرگی دامنه های نسبی P₁ و P₂ به ترتیب در طول موج های ۲۵۸ و ۲۸۶/۲ نانومتر بر حسب غلظت متناظر آسکوربیک اسید (mg/L)
 ۷۲
 شکل ۳-۲۸: طیف های نسبی مخلوط های حاوی ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰، ۳۰/۰۰ میلی گرم برلیتر آسکوربیک اسید و ۱۰/۰۰ میلی گرم برلیتر استیل سالیسیلیک اسید بر طیف محلول ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر استیل سالیسیلیک اسید به عنوان مقسوم علیه در شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی لیتر محلول بافر سیتراتی با pH = ۲/۵
 ۷۳
 شکل ۳-۲۹: طیف های جذبی مرتبه صفر محلول های ۱۰/۰۰، ۱۵/۰۰، ۲۰/۰۰، ۳۰/۰۰ میلی گرم برلیتر استیل سالیسیلیک اسید در شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی لیتر محلول بافر سیتراتی با pH = ۲/۵
 ۷۴
 شکل ۳-۳۰: طیف های نسبی محلول های ۱۰/۰۰، ۱۵/۰۰، ۲۰/۰۰، ۳۰/۰۰ میلی گرم برلیتر استیل سالیسیلیک اسید بر طیف محلول ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر استیل سالیسیلیک اسید به عنوان مقسوم علیه در شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی لیتر محلول بافر سیتراتی با pH = ۲/۵
 ۷۴
 شکل ۳-۳۱: نمودار کالیبراسیون استیل سالیسیلیک اسید در روش RD: حاصل از رسم اختلاف بزرگی دامنه های نسبی P₁ و P₂ به ترتیب در طول موج های ۲۲۵ و ۲۵۵ نانومتر بر حسب غلظت متناظر استیل سالیسیلیک اسید
 ۷۵
 شکل ۳-۳۲: طیف های جذبی مخلوط های حاوی ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰، ۳۰/۰۰ میلی گرم برلیتر استیل سالیسیلیک اسید و ۱۰/۰۰ میلی گرم برلیتر آسکوربیک اسید در شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی لیتر محلول بافر سیتراتی با pH = ۲/۵
 ۷۶
 شکل ۳-۳۳: طیف های جذبی مخلوط های حاوی ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰، ۳۰/۰۰ میلی گرم برلیتر استیل سالیسیلیک اسید و ۱۰/۰۰ میلی گرم برلیتر آسکوربیک اسید بر طیف محلول ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر آسکوربیک اسید به عنوان مقسوم علیه در شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی لیتر محلول بافر سیتراتی با pH = ۲/۵
 ۷۶
 شکل ۳-۳۴: طیف های جذبی مخلوط های حاوی ۳/۰۰، ۵/۰۰، ۱۰/۰۰ و ۱۵/۰۰ میلی گرم برلیتر آسکوربیک اسید و ۱۵/۰۰ میلی گرم برلیتر استیل سالیسیلیک اسید در شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی لیتر محلول بافر سیتراتی با pH = ۲/۵
 ۸۰
 شکل ۳-۳۵: طیف های نسبی حاصل از تقسیم طیف مخلوط های حاوی ۳/۰۰، ۵/۰۰، ۱۰/۰۰ و ۱۵/۰۰ میلی گرم برلیتر آسکوربیک اسید و ۱۵/۰۰ میلی گرم برلیتر استیل سالیسیلیک اسید به طیف نرمال شده ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر استیل سالیسیلیک اسید به عنوان مقسوم علیه در شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی لیتر محلول بافر سیتراتی با pH = ۲/۵
 ۸۰
 شکل ۳-۳۶: نمودار های حاصل از رسم دامنه های P₁ و P₂ در طول موج های الف: ۲۴۳ و ۲۷۵، ب:

- ۲۴۹ و ۲۷۷، ج: ۲۶۰ و ۲۷۵ نانومتر بر حسب غلظت آسکوربیک اسید اضافه شده (۰/۰۰، ۲/۰۰، ۷/۰۰، ۱۲/۰۰ میلی گرم بر لیتر) ۸۱
- شکل ۳-۳۷: نمودارهای روش RHPSAM برای محلول های خالص استاندارد ۱۰/۰۰، ۱۵/۰۰ و ۳۰/۰۰ میلیگرم بر لیتر آسکوربیک اسید ۸۵
- شکل ۳-۳۸: نمودارهای روش RHPSAM برای محلول های خالص استاندارد ۳/۰۰، ۵/۰۰ میلیگرم بر لیتر آسکوربیک اسید با افزودن غلظت های ۲/۰۰، ۴/۰۰، ۷/۰۰ و ۱۲/۰۰ میلی گرم بر لیتر آسکوربیک اسید... ۸۶
- شکل ۴-۱: اثر pH بر شکل طیف جذبی استیل سالیسیلیک اسید (الف) و آسکوربیک اسید(ب) ۱۰۷
- شکل ۴-۲: نمایش میزان همبستگی غلظت های پیش بینی شده و غلظت های واقعی آسکوربیک اسید در مخلوط های سری تست، الف: در روش EXRSM، ب: در روش SRSM و SRS-CM، ج: روش CC-SS و د: روش RD ۱۱۲
- شکل ۴-۳: نمایش میزان همبستگی غلظت های پیش بینی شده و غلظت های واقعی استیل سالیسیلیک اسید در مخلوط های سری تست، الف: در روش EXRSM، ب: در روش SRSM، ج: در روش SRS-CM، د: روش CC-SS و ه: RD ۱۱۳
- شکل ۴-۴: نمودار باقیمانده ها بر حسب مقدار واقعی آسکوربیک اسید برای مخلوط های سری تست، الف: در روش EXRSM و ب: در روش SRSM و SRS-CM، ج: روش CC-SS و د: روش RD ۱۱۶
- شکل ۴-۵: نمودار باقیمانده ها بر حسب مقدار واقعی استیل سالیسیلیک اسید برای مخلوط های سری تست، الف: روش EXRSM، ب: در روش SRSM، ج: روش SRS-CM، د: روش CC-SS و ه: RD ۱۱۸

فهرست جدول ها

- جدول ۱-۳: مواد شیمیایی مورد استفاده ۲۸
- جدول ۲-۳: نتایج حاصل از بررسی pH با استفاده از بافر فسفاتی. ۳۴
- جدول ۳-۳: نتایج حاصل از بررسی نوع بافر ۳۵
- جدول ۴-۳: نتایج حاصل از بررسی اثر حجم بافر سیتراتی ۳۷
- جدول ۵-۳: نتایج حاصل از بررسی اثر قدرت یونی ۳۸
- جدول ۶-۳: نتایج حاصل از رسم منحنی کالیبراسیون منفرد برای آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید ۴۰
- جدول ۷-۳: نتایج حاصل از کالیبراسیون جداگانه دو گونه ۴۱
- جدول ۸-۳: ترکیب غلظتی محلول های سری ارزیابی ۴۳
- جدول ۹-۳: ترکیب غلظتی محلول های سری تست ۴۴
- جدول ۱۰-۳: نتایج حاصل از بهینه سازی غلظت استیل سالیسیلیک اسید به عنوان مقسوم علیه برای مخلوطهای سری ارزیابی در روش EXRSM ۴۷
- جدول ۱۱-۳: نتایج حاصل از بهینه سازی غلظت آسکوربیک اسید به عنوان مقسوم علیه در پیش بینی غلظت دو گونه در روش EXRSM برای سری ارزیابی ۵۳
- جدول ۱۲-۳: نتایج حاصل از روش EXRSM در پیش بینی غلظت دو گونه در مخلوط های سری تست .. ۵۴
- جدول ۱۳-۳: نتایج حاصل از بهینه سازی غلظت استیل سالیسیلیک اسید به عنوان مقسوم علیه در روش SRSM برای سری ارزیابی ۵۸
- جدول ۱۴-۳: نتایج حاصل از روش SRSM در پیش بینی غلظت دو گونه در مخلوط های سری ارزیابی ... ۵۸
- جدول ۱۵-۳: نتایج حاصل از روش SRSM در پیش بینی غلظت دو گونه در مخلوط های سری تست ۵۹
- جدول ۱۶-۳: نتایج حاصل از بهینه سازی غلظت استیل سالیسیلیک اسید به عنوان مقسوم علیه در روش SRS-CM ۶۱
- جدول ۱۷-۳: نتایج حاصل از روش SRS-CM در پیش بینی غلظت دو گونه در مخلوط های سری ارزیابی ۶۲
- جدول ۱۹-۳: نتایج حاصل از اندازه گیری بزرگی دامنه ها در طیفهای نسبی حاصل از شکل ۱۹-۳ در روش CC-SS ۶۳
- جدول ۲۰-۳: نتایج حاصل از روش CC-SS برای مخلوط های انتخاب شده حاوی ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰، ۳۰/۰۰ میلی گرم برلیتر آسکوربیک اسید و ۱۰/۰۰ میلی گرم برلیتر استیل سالیسیلیک اسید ۶۷
- جدول ۲۱-۳: نتایج حاصل از بهینه سازی غلظت آسکوربیک اسید به عنوان مقسوم علیه در روش CC-SS ۶۷
- جدول ۲۲-۳: نتایج حاصل از روش CC-SS در پیش بینی غلظت دو گونه در مخلوط های سری ارزیابی .. ۶۸
- جدول ۲۳-۳: نتایج حاصل از روش CC-SS در پیش بینی غلظت دو گونه در مخلوط های سری تست ۶۹
- جدول ۲۴-۳: نتایج حاصل از اندازه گیری بزرگی دامنه ها در طیف های نسبی حاصل از شکل ۲۸-۳ در

- روش RD ۷۱
- جدول ۳-۲۵: نتایج حاصل از اندازه گیری بزرگی دامنه ها در طیف های نسبی حاصل از شکل ۳-۲۱ در
- روش RD ۷۵
- جدول ۳-۲۶: نتایج حاصل از بهینه سازی غلظت آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید به عنوان
- مقسوم علیه به ترتیب در پیش بینی غلظت استیل سالیسیلیک اسید و آسکوربیک اسید برای روش RD ۷۷
- جدول ۳-۲۷: نتایج حاصل از روش RD در پیش بینی غلظت دو گونه در مخلوط های سری ارزیابی ۷۸
- جدول ۳-۲۸: نتایج حاصل از روش RD در پیش بینی غلظت دو گونه در مخلوط های سری تست ۷۹
- جدول ۳-۲۹: نتایج حاصل از روش RHPSAM برای مخلوط ۳/۰۰ میلی گرم بر لیتر آسکوربیک اسید و
- ۱۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر استیل سالیسیلیک اسید در طول موجهای انتخاب شده ۸۲
- جدول ۳-۳۰: نتایج حاصل از بهینه سازی طول موج در پیش بینی غلظت دو گونه در مخلوط های تهیه
- شده برای روش RHPSAM ۸۳
- جدول ۳-۳۱: نتایج حاصل از بهینه سازی غلظت طیف نرمال شده استیل سالیسیلیک اسید به عنوان
- مقسوم علیه در پیش بینی غلظت دو گونه در مخلوط های سری ارزیابی برای روش RHPSAM ۸۴
- جدول ۳-۳۲: نتایج حاصل از پیش بینی غلظت دو گونه در مخلوط های تهیه شده برای روش RHPSAM
- ۸۶
- جدول ۳-۳۳: نتایج حاصل از بررسی اثر گونه های مزاحم در اندازه گیری همزمان آسکوربیک اسید و استیل
- سالیسیلیک اسید با غلظت به ترتیب ۱۰/۰۰ و ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر در روشهای EXRSM،
- RHPSAM و RD، CC-SS، SRS-CM، SRSM ۸۹
- جدول ۳-۳۴: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش EXRSM ۹۲
- جدول ۳-۳۵: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش SRSM ۹۲
- جدول ۳-۳۶: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش SRS-CM ۹۳
- جدول ۳-۳۷: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش CC-SS ۹۳
- جدول ۳-۳۸: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش RD ۹۴
- جدول ۳-۳۹: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش RHPSAM ۹۴
- جدول ۳-۴۰: نتایج حاصل از اندازه گیری آسپیرین در نمونه قرص ۹۶
- جدول ۳-۴۱: نتایج حاصل از اندازه گیری ویتامین C در نمونه قرص ۹۷
- جدول ۳-۴۲: نتایج حاصل از اندازه گیری دو گونه در نمونه قرص به روش EXRSM ۹۸
- جدول ۳-۴۳: نتایج حاصل از اندازه گیری دو گونه در نمونه قرص به روش SRSM ۹۸
- جدول ۳-۴۴: نتایج حاصل از اندازه گیری دو گونه در نمونه قرص به روش SRS-CM ۹۹
- جدول ۳-۴۵: نتایج حاصل از اندازه گیری دو گونه در نمونه قرص به روش CC-SS ۹۹
- جدول ۳-۴۶: نتایج حاصل از اندازه گیری دو گونه در نمونه قرص به روش RD ۱۰۰
- جدول ۳-۴۷: نتایج حاصل از اندازه گیری آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید در اندازه گیری
- نمونه آب شهر شاهرود در ۱۰۱

جدول ۳-۴۸: نتایج حاصل از اندازه گیری آسکوربیک اسید و استیلسالسیلیک اسید در اندازه گیری نمونه آب شهر در روش SRSM.....	۱۰۲
جدول ۳-۴۹: نتایج حاصل از اندازه گیری آسکوربیک اسید و استیل سالسیلیک اسید در اندازه گیری نمونه آب شهر در روش SRS-CM.....	۱۰۲
جدول ۳-۵۰: نتایج حاصل از اندازه گیری آسکوربیک اسید و استیل سالسیلیک اسید در اندازه گیری آب شهر در روش CC-SS.....	۱۰۳
جدول ۳-۵۱: نتایج حاصل از اندازه گیری آسکوربیک اسید و استیل سالسیلیک اسید در اندازه گیری نمونه آب شهر در روش RHPSAM.....	۱۰۳
جدول ۴-۱: پارامترهای آماری محاسبه شده آسکوربیک اسید در مخلوط های سری تست برای روش های SRS-CM، SRSM، EXRSM، CC-SS و RD.....	۱۱۴
جدول ۴-۲: پارامترهای آماری محاسبه شده استیل سالسیلیک اسید در مخلوط های سری تست برای روشهای SRS-CM، SRSM، EXRSM، CC-SS و RD.....	۱۱۴

فصل اول :

مقدمه

۱-۱- مقدمه

آسکوربیک اسید^۱ (AA) که به نام ویتامین C شناخته می‌شود، مقاومت ارگانسمی بدن را در برابر میکروارگانسیم‌ها با تشکیل پادتن افزایش می‌دهد [۱]. استیل‌سالیسیلیک اسید^۲ (ASA) که با نام آسپرین^۳ شناخته می‌شود، برای بهبود سردرد و تب استفاده می‌شود [۲]. بنابراین شرکت‌های داروسازی مختلف، اقداماتی را برای تجاری شدن این داروها به صورت ترکیبی، در فرمولاسیون‌های دارویی آغاز کرده‌اند به صورتیکه امروزه ترکیبی از آسکوربیک اسید (AA) و استیل‌سالیسیلیک اسید (ASA) برای تسکین درد، تب از جمله تب همراه با سرماخوردگی، آنفلوآنزا و ... به کار گرفته می‌شود و از جمله داروهای پرمصرف در جهان می‌باشند [۱]، بنابراین توسعه روش‌های تحلیلی جدید، برای اندازه‌گیری همزمان این دو ترکیب در فرمولاسیون‌های دارویی اهمیت پیدا کرده است. و روش‌های مختلفی برای اندازه‌گیری آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید در متون علمی به چشم می‌خورد [۲]. با توجه به اینکه طیف جذبی این دو دارو در حضور یکدیگر دارای همپوشانی هستند لذا با روش‌های ساده اسپکتروفتومتری نمی‌توان آن‌ها را به صورت مستقیم اندازه‌گیری کرد [۳]. برای رفع این مشکل از روش‌های جدید اسپکتروفتومتری استفاده گردید. به همین منظور در این بخش مروری بر خواص فیزیکی و شیمیایی آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید و کاربردهایشان و کارهای انجام شده در زمینه اندازه‌گیری همزمان این ترکیب‌ها خواهیم داشت.

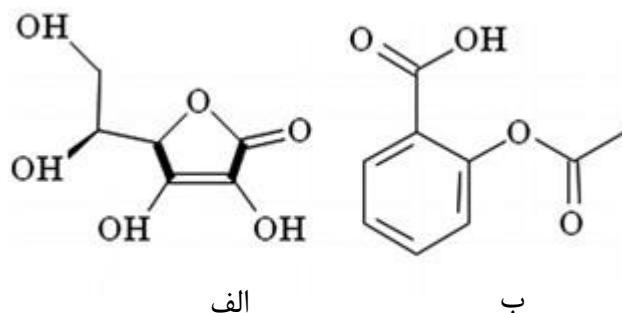
۱-۲- آسکوربیک اسید

فرمول شیمیایی آسکوربیک اسید (R)-۵-(S)-۱,۲-(دی‌هیدروکسی‌اتیل), ۴-دی‌هیدروکسی فوران-(H) ۲(۵)-اون می باشد. جرم مولی آن ۱۷۶/۱۲ g/mol و دانسیته آن ۱/۶۵ g/cm³ می‌باشد [۳]. ساختار آسکوربیک اسید در شکل ۱-۱ (الف) نشان داده شده است.

^۱Ascorbic acid

^۲Acetyl salicylic acid

^۳Asprin



شکل ۱-۰: فرمول ساختاری آسکوربیک اسید (الف) و استیل سالیسیلیک اسید (ب)

آسکوربیک اسید (ویتامین C) یک آنتی اکسیدان محلول در آب است. این اسید ناپایدار، به راحتی اکسید می‌شود و می‌تواند با اکسیژن و قلیا وارد واکنش شود و در اثر حرارت نابود می‌شود. بر خلاف حیوانات انسان نمی‌تواند این ویتامین را در بدن خود تولید کند، بنابراین تنها راه تأمین آن استفاده از مواد غذایی حاوی ویتامین C است. علت ناتوانی انسان برای تولید آسکوربیک اسید، عدم حضور آنزیم فعال ال-گلولاکتون اکسیداز^۱ کبد است. بدن انسان به ویتامین C برای فعالیت های روزانه طبیعی مثل سوخت و ساز تیروزین^۲، فولیک اسید^۳ و تریپتوفان^۴، کاهش کلسترول خون، سنتز اسیدهای آمینه کارنیتین^۵، سنتز کتکول آمین^۶ برای تنظیم سیستم عصبی، رشد بافت و بهبود زخم، شکل گیری انتقال دهنده های عصبی، افزایش جذب آهن در روده، محافظت از بدن در برابر اثرات مضر رادیکالهای آزاد و آلاینده ها نیاز دارد. مقادیر زیاد ویتامین C در درمان و پیشگیری تعداد زیادی از اختلالات مانند دیابت، آب مروارید، آب سیاه، تصلب شرایین، سکتة مغزی، بیماری های قلبی و سرطان استفاده می شود. کمبود این ویتامین می تواند به کم خونی، آسکوربوت (بیماری ناشی از کمبود ویتامین C)، عفونت، خونریزی لثه، انحطاط عضلانی، خونریزی مویرگی و اختلالات عصبی منجر شود. ویتامین C در درمان عفونت های مختلف و بیماری های عفونی مثل هپاتیت، ایدز، سرماخوردگی، آنفولانزا و آنفولانزای پیلوری و ... مفید است. ویتامین C، در شکل کاهش یافته (آسکوربیک

^۱L-gulonolactone oxidase

^۲tyrosine

^۳folic acid

^۴tryptophan

^۵carnitine

^۶catecholamine

اسید) و شکل اکسید یافته (دهیدروآسکوربیک اسید^۱) در دسترس است. این ویتامین در مرکبات، فلفل سبز، فلفل قرمز، توت فرنگی، گوجه فرنگی، کلم بروکلی، شلغم و دیگر سبزیجات برگ‌دار یافت می‌شود. ماهی و شیر نیز حاوی مقادیر کمی از ویتامین C است [۵].

۱-۳- استیل‌سالیسیلیک اسید

استیل‌سالیسیلیک اسید (ASA) با نام آیوپاک ۲- استوکسی بنزوئیک اسید^۲ و نام دارویی آسپرین شناخته می‌شود که ساختار آن در شکل ۱-۱ (ب) نشان داده شده است و اغلب به عنوان داروی ضد درد، ضد تب و ضد التهاب استفاده می‌شود [۲]. استفاده از آسپرین در کاهش عوارض قلبی و عروقی، مرگ و میر بیماران در معرض خطر سکته قلبی و مغزی موثر می‌باشد. مصرف مقدار بیش از حد آسپرین باعث سرگیجه، تعریق، تهوع، استفراغ، تغییر سوخت و ساز گلوکز در بدن، تنفس عمیق و سریع، اختلالات اسیدی - بازی در بدن و ... می‌شود. بنابراین، به منظور دستیابی به یک اثر درمانی بهتر و کاهش اثر سمیت ناشی از استیل‌سالیسیلیک اسید، کنترل سریع مقدار داروهای حاوی استیل‌سالیسیلیک اسید و ناخالصی حاصل از آن در ترکیب‌های دارویی اهمیت دارد [۲ و ۳].

۱-۴- مروری بر کارهای انجام شده در زمینه اندازه‌گیری همزمان آسکوربیک

اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید در مخلوط‌های دوتایی آن‌ها

مطالب ارائه شده در بخش‌های قبلی بیانگر این است که اندازه‌گیری آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید به صورت همزمان در ترکیب‌های دارویی به علت همپوشانی طیفی این دو ترکیب که اندازه‌گیری آن‌ها در حضور هم به روش‌های اسپکتروفتومتری معمولی را امکان ناپذیر می‌کند، دارای اهمیت است. بنابراین روش‌های متفاوتی برای اندازه‌گیری این داروها به صورت مجزا و همزمان ارائه شده است. این داروها، در ترکیب با دیگر ترکیبات فعال، توسط روش‌های کمی مختلف مانند ولتامتری [۶]، اسپکتروفتومتری مشتق شده [۸] و [۷]، روش حداقل مربعات جزئی (PLS) [۹، ۱۰]، رنگ سنجی [۱۱] و کروماتوگرافی مایع همراه با آشکارساز

^۱L-dehydroascorbic acid

^۲2-acetoxy benzoic acid

آرایه دیودی (PDA) اندازه گرفته شده‌اند [۱۲].

روش‌های اسپکتروفوتومتری مشتقی، مشکلاتی از جمله حل معادله‌های حاصل از طیف مخلوط با توجه به اینکه کاهش دامنه با افزایش مرتبه مشتق‌گیری زیاد می‌شود، دارند. PLS و دیگر روش‌های کمومتریکس نیاز به استفاده از مفاهیم ریاضی انتزاعی دارد و به‌کارگیری و درک تئوری کالیبراسیون حاصل از تکنیک‌های کمومتریکس آن آسان نیست. روش ولتامتری با اینکه از حساسیت خوبی برخوردارند اما نیاز به زمان طولانی برای تمیز کردن الکتروود دارند و از طرفی استفاده از پتانسیل بالا می‌تواند باعث آسیب سطح الکتروود شود. از سوی دیگر روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا مجهز به آشکارسازهای آرایه دیودی و طیف‌سنجی جرمی حساس هستند (HPLC-MS PDA) اما زمان تجزیه و تحلیل آن‌ها طولانی و گران قیمت می‌باشد [۲]. در این بخش به‌صورت کوتاه به مرور کارهای انجام شده در زمینه اندازه‌گیری همزمان آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید می‌پردازیم.

در سال ۱۹۹۹، آکای^۱ و همکارانش با استفاده از تکنیک کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا مجهز به آشکارساز آرایه دیودی به اندازه‌گیری همزمان آسکوربیک اسید، استیل‌سالیسیلیک اسید و استامینافن در شرایط ایزوکراتیک پرداختند. در این کار پارامترهایی مانند ترکیب فاز متحرک و pH بهینه شدند (pH=۳) و از محلول متانول:آب (۱:۲ v/v) به عنوان حلال استخراج استفاده گردید. درصد بازیابی برای آسکوربیک اسید، استیل‌سالیسیلیک اسید و استامینافن به ترتیب ۹۹/۶۷، ۹۹/۸۳ و ۱۰۰ درصد گزارش شده است [۱۳].

در سال ۲۰۰۰ سنا^۲ و همکارانش، مخلوطی از آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید را به صورت همزمان با روش اسپکتروفوتومتری ماوراء بنفش در محدوده ۲۱۰-۳۰۰ نانومتر با استفاده از تجزیه و تحلیل فاکتور موازی^۳ (PARAFAC) و روش حداقل مربعات جزئی^۴ (PLS) تعیین مقدار کردند. این مطالعات در محدوده pH ۱ تا ۵/۵ و محدوده خطی^۴ 1×10^{-5} تا 1×10^{-4} مول بر لیتر از هر دو گونه انجام گرفت و در صد

^۱Akay

^۲Sena

^۳ Parallel factor analysis

^۴Partial least square

بازیابی برای این داروها بین ۹۷/۶۰ تا ۱۰۳/۶۰ درصد گزارش شده است [۱].

در سال ۲۰۰۱ تورال^۱ و همکارانش با استفاده از تکنیک اسپکتروفتومتری مشتقی مرتبه اول به اندازه‌گیری همزمان آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید در ترکیبات دارویی (مخلوط‌های سنتزی) پرداختند. در این کار اثرات مربوط به حلال، مواد جانبی و متغیرهای طیفی موثر بر سیگنال تجزیه‌ای مورد بررسی قرار گرفتند. داروهای نام برده شده در حلال هیدروکلریک‌اسید ۰/۰۱ مولار تهیه شدند و سیگنال‌ها به صورت مستقیم با استفاده از تکنیک عبور صفر^۲ در طول موج‌های ۲۵۶ و ۲۴۵ نانومتر به ترتیب برای آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید اندازه‌گیری شدند. محدوده خطی برای آسکوربیک‌اسید^۳ $۳/۴ \times 10^{-۴}$ تا $۳/۴ \times 10^{-۴}$ مولار و استیل‌سالیسیلیک اسید^۴ $۶/۶ \times 10^{-۶}$ تا $۱/۵ \times 10^{-۴}$ مولار و انحراف استاندارد کمتر $۲/۰۰ \times 10^{-۶}$ درصد گزارش شده است [۱۴].

در سال ۲۰۰۵ دنیک و بالنو^۳ به تعیین مقدار همزمان آسکوربیک اسید، استیل‌سالیسیلیک اسید و پاراستامول در مخلوط‌های سنتزی و قرص جوشان با استفاده از تکنیک تبدیل موج پیوسته هار و مکزیکن^۴ (HAAR-CWT, MEXH-CWT) به همراه روش مقسوم علیه دوتایی^۵ پرداختند. پردازش سیگنال این روش‌ها بر اساس عملکرد HAAR-CWT MEXH-CWT و طیف تقسیم شده نسبی دوتایی^۶ (DDRS) بوده است. محدوده خطی برای این سه روش و هر سه دارو ۸ تا ۲۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است [۱۵].

در سال ۲۰۱۲ ریزوان خان^۷ و همکارانش به اندازه‌گیری همزمان آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید در قرص جوشان آسپرین-C با استفاده از تکنیک کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا مجهز به آشکارساز آرایه دیودی پرداختند. جداسازی بهینه در شرایط ایزوکراتیک در مخلوط دوتایی با استفاده از حلال آب و استونیتریل به همراه ۱ درصد فرمیک اسید (۲۵:۷۵ v/v) و $pH=۳/۵$ انجام گرفت. برای هر دو دارو LOD

^۱Toral

^۲Zero-crossing method

^۳Dinc and Baleanu

^۴Haar and Mexican continuous wavelet transforms

^۵Double divisor technique

^۶Double divisor-ratio spectra

^۷ Rizvan Khan

و LOQ بین $5/1 \times 10^{-4}$ تا $1/4 \times 10^{-3}$ میلی گرم بر میلی لیتر، حد تشخیص $0/09$ میکروگرم بر گرم، محدوده خطی $0/1$ تا $1/00$ میکروگرم بر گرم و RSD کمتر از ۲ درصد، درصد بازیابی بیشتر از ۹۸ درصد و ضریب همبستگی بیشتر از $0/997$ گزارش شده است [۲].

در سال ۲۰۱۵ ناصری زاده^۱ و همکارانش به تعیین همزمان آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید در نمونه قرص با الکتروود اصلاح شده کربن شیشه‌ای با نانولوله کربن آبی چند دیواره^۲ توسط ولتامتری چرخه‌ای و مطالعه فعالیت الکتروکاتالیزوری این الکتروود ساخته شده برای اکسیداسیون این گونه‌ها پرداختند که محدوده خطی $10^2 \times 1/8 - 4/3$ و $10^2 \times 16/4 - 200$ میکرومول بر لیتر و RSD٪ $1/9$ و $2/5$ به ترتیب برای آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید گزارش شده است [۱۶].

^۱ Nasirizadeh

^۲ Blue multi-wall carbon nanotube modified glassy carbon electrode

فصل دوم :

تئوری

۱-۲- مقدمه‌ای بر اسپکتروسکوپی جذبی

طیف بینی جذبی در ناحیه مرئی- ماورابنفش مبتنی بر جذب تابش الکترومغناطیس که در گستره طول موج ۱۹۰-۷۸۰ نانومتر اعمال پذیر است. اندازه‌گیری‌های جذبی در ناحیه ماورابنفش و مرئی برای تعیین کمی انواع زیادی از گونه‌های معدنی و آلی کاربرد گسترده‌ای پیدا کرده‌اند. طیف بینی جذب مولکولی بر اساس اندازه‌گیری عبور (T) یا جذب (A) محلول‌های موجود در سلول‌های شفاف استوار است. معمولاً غلظت (c) به طور خطی به جذب با معادله ۱-۲ ارتباط داده می‌شود [۱۷].

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

در معادله ۱-۲، P_0 توان تابش ورودی، P توان تابش خروجی، b طول مسیر تابش بر حسب سانتی‌متر، ϵ ضریب جذب مولی بر حسب $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ و A مقدار جذب در یک طول موج معین است. مساله مهم در آنالیز چند جزئی اسپکتروفتومتری یک متغیره، تعیین همزمان دو یا چند جز در یک مخلوط بدون جداسازی اولیه است [۱۸].

همپوشانی طیفی اجزای یک مخلوط دوتایی مانع از اندازه‌گیری اجزای یک مخلوط استفاده می‌شود [۱۹]. چندین روش اسپکتروفتومتری برای رفع مشکل همپوشانی طیف‌ها تاکنون ارائه شده است، که روش‌های اسپکتروفتومتری یک متغیره و روش‌های اسپکتروفتومتری چند متغیره را شامل می‌شوند.

روش‌های اسپکتروفتومتری یک متغیره شامل تکنیک اسپکتروفتومتری مشتقی^۱ [۲۰ و ۲۱]، روش میانگین‌گیری از مرکز^۲ [۲۲]، روش توسعه یافته تفاضل نسبی (EXRSM)^۳ [۱۸]، روش کم‌کردن نسبی همزمان (SRSM)^۴،

^۱ Derivative spectrophotometry technique

^۲ Mean Centering Method

^۳ Extended ratio subtraction method

^۴ Simultaneous ratio subtraction method

روش کم کردن نسبی همزمان همراه با ضرب کردن مقدار ثابت (SRS-CM)^۱، روش فاکتور جذب (AFM)^۲، روش مدولاسیون دامنه (AM)^۳ [۲۳]، روش افزایش استاندارد نقطه اچ (HPSAM)^۴ [۲۴]، روش مرکز ثابت همراه با کم کردن طیفی (CC-SS)^۵، روش اختلاف نسبی (RD)^۶ [۲۵] و... است.

در این کار اندازه‌گیری همزمان آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید در مخلوط دوتایی از آنها با استفاده از روش های EXRSM، SRSM، SRS-CM، CC-SS، RD و RHPSAM انجام شده است و نیز مطالعه مقایسه ای بین این شش روش صورت گرفته است.

۲-۲- کالیبراسیون

کالیبراسیون فرایندی است که به صورت یک رابطه ریاضی، سیگنال را به خاصیت مورد نظر از آنالیت (معمولا غلظت) مربوط می‌سازد. هر فرایند کالیبراسیون شامل دو مرحله مجزای کالیبراسیون (مدل سازی)^۷ و پیش‌بینی^۸ است. در مرحله کالیبراسیون، در چند غلظت معلوم از محلول‌های استاندارد آنالیت (متغیر مستقل X)، پاسخ (متغیر وابسته Y) اندازه‌گیری می‌شود. سپس مدلی از Y بر حسب X یا مدلی از X بر حسب Y ساخته می‌شود. در مرحله پیش‌بینی، مدل ساخته شده مورد ارزیابی قرار می‌گیرد و در صورت نیاز تغییراتی در آن ایجاد می‌شود. در مدل انتخابی با اندازه‌گیری پاسخ برای نمونه مجهول، غلظت آنالیت تعیین می‌شود.

^۱Simultaneous ratio subtraction method coupled with constant multiplication

^۲Absorption factor method

^۳Amplitude modulation method

^۴Ratio H-point standard addition method

^۵Constant center coupled with spectrum subtraction method

^۶Ratio difference method

^۷Modeling

^۸Prediction

۲-۲-۱- کالیبراسیون یک متغیره^۱

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

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

ضرایب b_0 و b_1 را می‌توان از روش رگرسیون حداقل مربعات محاسبه نمود. به مدل فوق مدل کلاسیک گفته می‌شود و خطای کالیبراسیون (e) به خطا در اندازه‌گیری پاسخ نسبت داده می‌شود.

در مدل دیگری که به آن مدل معکوس گفته می‌شود، فرض می‌گردد که اندازه‌گیری دستگاهی دقیق بوده و خطای کالیبراسیون مربوط به خطا در تهیه محلول‌های استاندارد است.

مدل معکوس به صورت معادله ۳-۲ نوشته می‌شود.

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

روش‌های تک متغیره برای نمونه‌های بسیار ساده و عاری از هر گونه مزاحمت مورد استفاده قرار می‌گیرد. برای استفاده از کالیبراسیون تک متغیره علاوه بر انتخاب روش‌هایی با گزینش پذیری بالا، باید از سیستم مورد آنالیز شناخت کافی داشت. کالیبراسیون تک متغیره برای روش‌هایی مانند اسپکتروسکوپی اتمی، کروماتوگرافی، اسپکتروسکوپی مشتقی و روش‌های مختلف الکتروشیمیایی با موفقیت به کار رفته است [۲۶]. در اسپکتروسکوپی، معمولاً از طول موج ماکزیمم آنالیت برای ساخت یک مدل کالیبراسیون تک متغیره استفاده می‌شود [۲۷].

برای ساخت مدل کالیبراسیون از طریق رگرسیون تک متغیره خطی، دو فرض مهم بایستی بررسی شود:

^۱Univariate Calibration

۱-گزینش پذیری: طبق این فرض، یک مدل کالیبراسیون تک متغیره، فقط در صورتی نتایج دقیق ارائه می دهد که سیگنال اندازه گیری، ناشی از آنالیت باشد.

۲- خطی بودن: باید بین غلظت آنالیت و سیگنال، رابطه خطی وجود داشته باشد؛ در غیر این صورت باید از روش های غیر خطی استفاده کرد [۲۷].

همان طور که در بخش ۱-۲ گفته شد، از جمله روش های اسپکتروفتومتری یک متغیره می توان به روش های EXRSM، SRSM، AFM، AM، H-point، MCR، CC-SS، RHPSAM، RD و SRS-CM اشاره کرد که به دلیل داشتن ویژگی هایی مانند دقت و صحت بالا و سادگی، گسترش یافته اند. این روش ها نیازی به دستگاه پیچیده و برنامه های کامپیوتری پیشرفته ندارند. در ادامه اساس روش های مذکور آورده شده است.

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

اخیرا روش های اسپکتروفتومتری جدید و ساده برای تجزیه و تحلیل همزمان مخلوط های دوتایی گسترش یافته است. در سال ۲۰۰۸ برای اولین بار بردیسی^۱ و همکارانش از روش تفاضل نسبی (RSM)^۲ برای اندازه گیری همزمان دو جز در یک مخلوط دوتایی استفاده کردند [۲۸]. سپس با استفاده از مبانی روش RSM، در سال ۲۰۱۲ روش EXRSM توسط لطفی^۳ و همکارانش ارائه شد [۲۹].

برای مخلوطی حاوی دو گونه X, Y که همپوشانی طیفی ندارند می توان با انتخاب طول موج مناسب دو جز را به صورت جداگانه اندازه گیری کرد (معادلات ۲-۴ و ۲-۵). برای مخلوطی حاوی دو گونه X, Y که همپوشانی طیفی دارند و با این فرض که طیف مرتبه صفر Y نسبت به طیف مرتبه صفر X گسترده تر است (در طول موج های بلندتری جذب آن صفر می شود)، می توان با استفاده از روش EXRSM، غلظت هر دو گونه را به دست

^۱Bardicy

^۲Ratio Subtraction Method

^۳Lotfy

برای تعیین غلظت جز X به صورت زیر عمل می شود:

طیف مخلوط حاوی Y و X (معادله ۲-۶) بر طیف غلظت معینی از گونه Y به عنوان مقسوم علیه (Y') تقسیم می گردد (معادله ۲-۷) ، پس از عمل تقسیم، طیف نسبی حاصل دارای مقدار ثابتی است که بیانگر $\frac{C_y}{C_x}$ است و به صورت خط مستقیم به موازات محور طول موج قرار دارد (به عبارت دیگر مقدار ثابت در همان ناحیه ای از طول موج دیده می شود که طیف گونه Y نسبت به X گسترده تر است). سپس این مقدار ثابت از طیف نسبی مخلوط کم می شود (معادله ۲-۸) و سپس طیف به دست آمده در طیف Y' (مقسوم علیه) ضرب می گردد، آنچه که به دست می آید در حقیقت طیف مرتبه صفر ترکیب X در مخلوط X+Y است . با اندازه گیری جذب در طول موج ماکزیمم گونه X از روی طیف مرتبه صفر به دست آمده و قرار دادن جذب آن در معادله رگرسیون حاصل از منحنی کالیبراسیون X ، غلظت گونه X تعیین می شود [۳۰].

بیان ریاضی مراحل گفته شده را می توان 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 A_x ، C_x و ϵ_x به ترتیب بیانگر جذب، غلظت و ضریب جذب مولی گونه X و A_y ، C_y و ϵ_y به ترتیب جذب، غلظت و ضریب جذب مولی گونه Y و b طول سل دستگاه اسپکتروفتومتر و $A_{x+y}(\text{mix})$ جذب مخلوط است.

$$\frac{b\varepsilon_x c_x + b\varepsilon_y c_y}{b\varepsilon_y c'_y} = \frac{b\varepsilon_x c_x}{b\varepsilon_y c'_y} + \frac{b\varepsilon_y c_y}{b\varepsilon_y c'_y} = \frac{\varepsilon_x c_x}{\varepsilon_y c'_y} + \frac{c_y}{c'_y} = \frac{\varepsilon_x c_x}{\varepsilon_y c'_y} + constant \quad \text{معادله ۷-۲}$$

$$\frac{\varepsilon_x c_x}{\varepsilon_y c'_y} + constant - constant = \frac{\varepsilon_x c_x}{\varepsilon_y c'_y} \quad \text{معادله ۸-۲}$$

$$\frac{\varepsilon_x c_x}{\varepsilon_y c'_y} \times b\varepsilon_y c'_y = b\varepsilon_x c_x \quad \text{معادله ۹-۲}$$

برای بسط دادن این روش به عنوان یک روش جدید ، برای تعیین غلظت گونه، Y به ترتیب زیر عمل می شود. طیف مرتبه صفر به دست آمده برای X (معادله ۹-۲) بر طیف غلظت معینی از X به عنوان مقسوم علیه (X') تقسیم می شود. عبارت $\frac{\varepsilon_x c_x}{\varepsilon_x c'_x} = \frac{c_x}{c'_x} = constant$ 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 حاصل از معادله ۱۰-۲، معادله ۱۱-۲ حاصل می شود و سپس از ضرب طیف به دست آمده در طیف مقسوم علیه X (X') ، طیف مرتبه صفر گونه Y به دست می آید (معادله ۱۲-۲).

به طور خلاصه می توان نوشت:

$$\frac{b\varepsilon_x c_x + b\varepsilon_y c_y}{b\varepsilon_x c'_x} = \frac{b\varepsilon_x c_x}{b\varepsilon_x c'_x} + \frac{b\varepsilon_y c_y}{b\varepsilon_x c'_x} = \frac{\varepsilon_x c_x}{\varepsilon_x c'_x} + \frac{\varepsilon_y c_y}{\varepsilon_x c'_x} = constant + \frac{\varepsilon_y c_y}{\varepsilon_x c'_x} \quad \text{معادله ۱۰-۲}$$

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

$$\frac{\varepsilon_y c_y}{\varepsilon_x c_x} \times b \varepsilon_x c_x = b \varepsilon_y c_y$$

معادله ۱۲-۲

با استفاده از معادله رگرسیون، که از رسم مقدار جذب گونه Y در طول موج ماکزیمم آن بر حسب غلظت متناظر Y به دست آمده است، غلظت گونه Y به دست می آید [۳۰].

۲-۱-۲-۲ روش کم کردن نسبی همزمان همراه با ضرب کردن مقدار ثابت (SRS-CM)

برای استفاده از روش SRS-CM باید مخلوطی حاوی دو جز (X و Y) با همپوشانی طیفی داشته باشیم که جذب یکی از اجزا نسبت به دیگری در طول موج های بلندتر صفر شود. به عبارت دیگر، طیف گسترده تری داشته باشد. در اینجا فرض بر این است که طیف جذبی گونه Y گسترده تر از گونه X می باشد. برای محاسبه غلظت گونه X با روش نام برده شده، طیف مخلوط این دو گونه بر غلظت معینی از Y (Y') به عنوان مقسوم علیه تقسیم می شود. پس از تقسیم طیف مخلوط بر طیف مقسوم علیه (Y')، طیف حاصل دارای مقدار ثابت ($\frac{c_y}{c'_y}$) است که به صورت خط مستقیم و موازی با محور طول موج قرار دارد، به عبارت دیگر مقدار ثابت در همان ناحیه ای از طول موج دیده می شود که طیف جذبی گونه Y نسبت به X گسترده تر است (معادله ۱۳-۲).

$$\frac{b \varepsilon_x c_x + b \varepsilon_y c_y}{b \varepsilon_y c'_y} = \frac{b \varepsilon_x c_x}{b \varepsilon_y c'_y} + \frac{b \varepsilon_y c_y}{b \varepsilon_y c'_y} = \frac{\varepsilon_x c_x}{\varepsilon_y c'_y} + \frac{c_y}{c'_y} = \frac{\varepsilon_x c_x}{\varepsilon_y c'_y} + constant \quad \text{معادله ۱۳-۲}$$

سپس این مقدار ثابت از طیف نسبی کم می شود، از روی طیف نسبی حاصل (پس از کم کردن مقدار ثابت)، مقدار نسبی جذب در طول موج ماکزیمم جذب X اندازه گیری می شود (معادله ۱۴-۲).

$$\frac{\varepsilon_x c_x}{\varepsilon_y c'_y} + constant - constant = \frac{\varepsilon_x c_x}{\varepsilon_y c'_y} \quad \text{معادله ۱۴-۲}$$

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

کالیبراسیون مربوط، غلظت x در مخلوط محاسبه می‌گردد.

برای رسم منحنی کالیبراسیون x ، طیف محلول‌های استاندارد x بر غلظت معینی از $Y(Y')$ به عنوان مقسوم علیه تقسیم می‌شود و سپس مقدار نسبی جذب در طول موج ماکزیمم X در هر محلول بر حسب غلظت X رسم می‌گردد.

برای به دست آوردن غلظت گونه Y در مخلوط، مقدار ثابت به دست آمده $(\frac{c_y}{c'_y})$ در معادله ۲-۱۳، در طیف محلول Y که به عنوان مقسوم علیه استفاده شده بود (Y') ، ضرب می‌گردد. از حاصل ضرب مقدار ثابت در طیف مقسوم علیه (Y') ، طیف خالص مرتبه صفر مربوط به گونه Y به دست می‌آید (معادله ۲-۱۵).

$$\frac{\epsilon_y c_y}{\epsilon_y c'_y} \times b \epsilon_y c'_y = b \epsilon_y c_y \quad \text{معادله ۲-۱۵}$$

برای رسم منحنی کالیبراسیون Y ، مقدار جذب در طول موج ماکزیمم جذب بر حسب غلظت Y رسم می‌شود. با اندازه گیری جذب در طول موج ماکزیمم طیف جذبی مرتبه صفر به دست آمده مربوط به Y و با استفاده از منحنی کالیبراسیون Y ، غلظت گونه Y محاسبه می‌گردد [۲۳].

۲-۲-۱-۳- روش کم کردن نسبی همزمان (SRSM)

برای استفاده از روش SRSM باید مخلوطی حاوی دو جز (Y و X) با همپوشانی طیفی داشته باشیم که جذب یکی از اجزا نسبت به دیگری در طول موج‌های بلندتر صفر شود. به عبارت دیگر، طیف گسترده تری داشته باشد. در اینجا فرض بر این است که طیف جذبی گونه Y گسترده تر از گونه X می‌باشد. در این روش غلظت گونه X مشابه روش SRS-CM به دست می‌آید.

غلظت گونه Y در روش SRS-CM با استفاده از مقدار ثابت^۱ تعیین می‌گردد. منحنی کالیبراسیون Y از تقسیم

^۱Constant value

طیف محلول‌های استاندارد خالص Y به طیف غلظت معینی از Y (طیف مقسوم علیه)، و سپس رسم مقدار ثابت های به دست آمده $(\frac{c_y}{c'_y})$ بر حسب غلظت‌های متناظر Y به دست می‌آید. سپس با جایگذاری مقدار ثابت حاصل (مقدار ثابت حاصل از معادله ۲-۱۴) از مخلوط Y+X در منحنی کالیبراسیون مربوط، غلظت گونه Y در مخلوط محاسبه می‌گردد [۲۳].

۲-۲-۱-۴- روش مرکز ثابت همراه با کم کردن طیفی (CC-SS)

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

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

ابتدا مقدار P پیش‌بینی شده $(P_{\text{postulated}} = \frac{\epsilon_y c_y}{\epsilon_x c_x})$ که مربوط به گونه Y است محاسبه می‌گردد. به این منظور طیف‌های استاندارد خالص گونه Y با غلظت‌های متفاوت، بر طیف غلظت مشخصی از گونه X به عنوان مقسوم‌علیه تقسیم می‌گردد. سپس دو طول موج انتخاب می‌شود (λ_1, λ_2) و مقدار دامنه‌های جذب نسبی $P_1 = \left(\frac{\epsilon_y c_y}{\epsilon_x c_x}\right)_1$ و $P_2 = \left(\frac{\epsilon_y c_y}{\epsilon_x c_x}\right)_2$ به ترتیب در λ_1 و λ_2 اندازه گرفته می‌شود و از هم کم می‌گردد، و این اختلاف دامنه‌ها بر حسب $P_1 = \left(\frac{\epsilon_y c_y}{\epsilon_x c_x}\right)_1$ رسم می‌گردند که یک خط با معادله زیر به دست می‌آید (معادله ۲-۱۶).

^۱Constant center

$$\Delta p = P_1 - P_2 = \text{slope } P_{(\text{postulated})} + \text{intercept} \quad \text{معادله ۱۶-۲}$$

در معادله ۱۶-۲، P_1 و P_2 به ترتیب دامنه‌های نسبی در طول موج λ_1 و λ_2 هستند.

لازم به ذکر است که طول موج‌ها به گونه‌ای انتخاب می‌گردند که مقدار P_1 و P_2 در طیف‌های استاندارد خالص گونه Y در دو طول موج مورد نظر دارای دامنه‌های یکسان باشند اما در طیف‌های استاندارد خالص گونه X دارای حداکثر اختلاف باشند، ($P_1 \neq P_2, \Delta P \neq 0$).

سپس طیف مخلوط X و Y بر غلظت معینی از گونه X به عنوان مقسوم‌علیه (X') تقسیم می‌شود. طیف

حاصل دارای مقدار ثابت ($\frac{c_x}{c'_x} = \text{constant}$) است. معادله (۱۷-۲)

$$\frac{b\varepsilon_x c_x + b\varepsilon_y c_y}{b\varepsilon_x c'_x} = \frac{b\varepsilon_y c_y}{b\varepsilon_x c'_x} + \frac{b\varepsilon_x c_x}{b\varepsilon_x c'_x} = \frac{\varepsilon_y c_y}{\varepsilon_x c'_x} + \frac{c_x}{c'_x} = \frac{\varepsilon_y c_y}{\varepsilon_x c'_x} + \text{constant} \quad \text{معادله ۱۷-۲}$$

سپس مقدار دامنه‌های نسبی (P_1, P_2) برای طیف مخلوط را در طول موج‌های λ_1 و λ_2 ثبت می‌شوند و از هم کم می‌گردند، (معادله ۲۰-۲).

$$\Delta P_{\text{Mix}} = P_1 - P_2 = \left(\frac{\varepsilon_y c_y}{\varepsilon_x c'_x} \right)_1 + \text{constant} - \left\{ \left(\frac{\varepsilon_y c_y}{\varepsilon_x c'_x} \right)_2 + \text{constant} \right\} \quad \text{معادله ۱۸-۲}$$

$$\Delta P_{\text{Mix}} = P_1 - P_2 = \left(\frac{\varepsilon_y c_y}{\varepsilon_x c'_x} \right)_1 - \left(\frac{\varepsilon_y c_y}{\varepsilon_x c'_x} \right)_2 \quad \text{معادله ۱۹-۲}$$

سپس ΔP_{Mix} را در معادله ۱۶-۲ قرار داده و با داشتن شیب و عرض از مبدا مقدار P پیش‌بینی شده

$$P_{\text{postulated}} = \frac{\varepsilon_y c_y}{\varepsilon_x c'_x} \text{ برای هر مخلوط به دست می‌آید.}$$

برای به دست آوردن مقدار ثابت ($\frac{c_x}{c'_x} = C.V$)، مقدار P پیش‌بینی شده ($P_{\text{postulated}} = \frac{\varepsilon_y c_y}{\varepsilon_x c'_x}$) محاسبه

شده از هر مخلوط از مقدار دامنه ثبت شده در λ_1 ($p_{\text{recorded}} = \left(\frac{\varepsilon_x c_x}{\varepsilon_x c'_x} + \frac{\varepsilon_y c_y}{\varepsilon_x c'_x} \right)_1$) در مخلوط مربوط کم می‌گردد

(معادله ۲-۲۰).

$$C.V = \frac{c_x}{c_x} = P_{recorded} - P_{postulated} = \left(\frac{\varepsilon_x c_x}{\varepsilon_x c_x} + \frac{\varepsilon_y c_y}{\varepsilon_x c_x} \right)_1 - \left(\frac{\varepsilon_y c_y}{\varepsilon_x c_x} \right)_1 \quad \text{معادله ۲-۲۰}$$

در مرحله بعد با ضرب کردن این مقدار ثابت (C.V) که از معادله ۲-۲۰ به دست آمده در طیف مرتبه صفر مقسوم علیه انتخاب شده از گونه X (X')، طیف مرتبه صفر گونه X به دست می آید. سپس با 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.

برای به دست آوردن غلظت گونه Y در هر مخلوط، طیف مرتبه صفر گونه X به دست آمده از مرحله قبل را از طیف مخلوط مربوط کم کرده و 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. (معادله ۲-۲۱) [۳۱].

$$(b\varepsilon_x \varepsilon_x + b\varepsilon_y \varepsilon_y) - (b\varepsilon_x \varepsilon_x) = b\varepsilon_y \varepsilon_y \quad \text{معادله ۲-۲۱}$$

۲-۲-۱-۵- روش اختلاف نسبی (RD)

دقت، سرعت و سادگی از ویژگی های بارز روش RD است. اگر مخلوطی از گونه X و Y داشته باشیم که طیف جذبی این دو گونه دارای همپوشانی باشند. برای تعیین غلظت گونه X و Y، شرط لازم برای اجرای روش RD پیدا کردن دو طول موج است که میزان جذب گونه مزاحم در این دو طول موج یکسان باشد در حالیکه میزان جذب ترکیب مورد نظر (آنالیت) در این طول موج ها متفاوت باشد.

برای تعیین غلظت گونه X به این صورت عمل می شود که؛

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

طیف مخلوط بر طیف مقسوم‌علیه (Y)، طیف حاصل دارای مقدار ثابتی متناسب با غلظت Y ($\frac{c_y}{c'_y} = \text{constant}$) است. (معادله ۲-۲۲)

$$\frac{b\varepsilon_x c_x + b\varepsilon_y c_y}{b\varepsilon_y c'_y} = \frac{b\varepsilon_x c_x}{b\varepsilon_y c'_y} + \frac{b\varepsilon_y c_y}{b\varepsilon_y c'_y} = \frac{\varepsilon_x c_x}{\varepsilon_y c'_y} + \frac{c_y}{c'_y} = \frac{\varepsilon_x c_x}{\varepsilon_y c'_y} + \text{constant} \quad \text{معادله ۲-۲۲}$$

سپس دامنه‌های نسبی P_1 و P_2 (جذب‌های طیف نسبی به دست آمده) از مخلوط به ترتیب در طول موج های λ_1 و λ_2 ثبت می‌گردد و در مرحله بعدی این دامنه‌ها از هم کم می‌گردند (معادله ۲-۲۳) که با این کار مقدار ثابت که ناشی از اثر مزاحمت گونه Y است، حذف می‌گردد. (معادله ۲-۲۴)

$$\Delta P_{Mix} = P_1 - P_2 = \left(\frac{\varepsilon_x c_x}{\varepsilon_y c'_y} \right)_1 + \text{constant} - \left\{ \left(\frac{\varepsilon_x c_x}{\varepsilon_y c'_y} \right)_2 + \text{constant} \right\} \quad \text{معادله ۲-۲۳}$$

$$\Delta P_{Mix} = P_1 - P_2 = \left(\frac{\varepsilon_x c_x}{\varepsilon_y c'_y} \right)_1 - \left(\frac{\varepsilon_x c_x}{\varepsilon_y c'_y} \right)_2 \quad \text{معادله ۲-۲۴}$$

سپس با قرار دادن ΔP_{mix} حاصل از هر مخلوط در معادله کالیبراسیون مربوط، غلظت گونه X به دست می‌آید. برای رسم منحنی کالیبراسیون گونه X به این صورت عمل شد که؛ طیف‌های استاندارد خالص از گونه X با غلظت‌های متفاوت تهیه گردید و این طیف‌ها بر غلظت مشخصی از گونه Y (غلظتی که به عنوان مقسوم‌علیه انتخاب شد) تقسیم گردید و دامنه‌های نسبی P_1 و P_2 (طیف نسبی حاصل از طیف‌های استاندارد خالص تقسیم شده بر مقسوم‌علیه) به ترتیب در طول موج های λ_1 و λ_2 مورد نظر ثبت گردید و از رسم اختلاف دامنه‌ها

ΔP بر حسب غلظت گونه X معادله کالیبراسیون مورد نظر به دست آمد. (معادله ۲-۲۵)

$$\Delta p = P_1 - P_2 = \text{slope } C_x + \text{intercept} \quad \text{معادله ۲-۲۵}$$

برای به دست آوردن غلظت گونه Y تمامی مراحل مثل تعیین غلظت گونه X است با این تفاوت که این بار

مخلوط‌های X و Y بر غلظت مشخصی از گونه X به عنوان مقسوم‌علیه تقسیم می‌گردند. و طول‌موج‌های مناسب تعیین غلظت گونه Y باید انتخاب گردد. [۳۲].

۲-۲-۱-۶- روش افزایش استاندارد نقطه H نسبی (RHPSAM)

روش افزایش استاندارد نقطه H نسبی (RHPSAM) یک روش جدید دو طول‌موجی اسپکتروفتومتری است که با بهره‌گیری از اصول اساسی روش اسپکتروفتومتری نسبی و روش افزایش استاندارد نقطه H، به حل مشکل همپوشانی طیفی در مخلوط‌ها پرداخته است. این روش به شدت حساس به غلظت طیف نرمال شده گونه مقسوم‌علیه می‌باشد.

برای تعیین مقدار همزمان هر دو ترکیب (X و Y) به‌وسیله این روش (RHPSAM)، باید غلظت مشخصی از یک گونه (فرضا گونه X) به مخلوط مورد نظر اضافه گردد. سپس طیف مخلوط X و Y بر طیف نرمال شده غلظت مشخصی از گونه‌ی دیگر (گونه Y) به عنوان مقسوم‌علیه (Y') تقسیم می‌گردد. (معادله ۲-۲۶)

$$\frac{A_{Mix}}{Y'} = \frac{b\varepsilon_x c_x + b\varepsilon_y c_y}{Y'} = \frac{\varepsilon_x c_x}{Y'} + \frac{\varepsilon_y c_y}{Y'} \quad \text{معادله ۲-۲۶}$$

در معادله ۲-۲۶ طیف نرمال شده گونه Y است. که از تقسیم طیف محلول استاندارد خالص گونه Y با یک غلظت مشخص به حاصل ضرب طول سل در غلظت متناظر گونه Y به‌دست آمده است. (معادله ۲-۲۷)

$$\frac{b\varepsilon_y c'_y}{bc'_y} = Y' \quad \text{معادله ۲-۲۷}$$

بعد از تقسیم کردن طیف مخلوط بر طیف نرمال شده گونه Y، عبارت $\frac{\varepsilon_y c_y}{Y'}$ برابر مقدار ثابتی است که در تمام طیف تقسیم شده گسترده است. بنابراین با انتخاب هر جفت طول‌موجی می‌توان غلظت دو گونه X و Y به روش RHPSAM به‌دست آورد. سپس بزرگی دامنه پیک P_1 و P_2 (معادله های ۲-۲۸ و ۲-۲۹) در طول‌موج‌های مورد نظر (λ_1 و λ_2) ثبت می‌گردد. و از رسم دامنه پیک‌های حاصل (P_1 و P_2) به‌ترتیب در λ_1 و λ_2 بر حسب غلظت

افزوده شده از گونه X دو خط صاف که در یک نقطه (RH point) با مختصات $(-P_{RH}, P_{RH})$ همدیگر را قطع کرده‌اند به دست می‌آید.

$$P_1 = \left(\frac{\varepsilon_x C_x}{Y'}\right)_{\lambda_1} + \left(\frac{\varepsilon_y C_y}{Y'}\right) + M_{\lambda_1} C_x \quad \text{معادله ۲-۲۸}$$

$$P_2 = \left(\frac{\varepsilon_x C_x}{Y'}\right)_{\lambda_2} + \left(\frac{\varepsilon_y C_y}{Y'}\right) + M_{\lambda_2} C_x \quad \text{معادله ۲-۲۹}$$

در معادله‌های ۲-۲۸ و ۲-۲۹ P_1 و P_2 به ترتیب بزرگی دامنه پیک در λ_1 و λ_2 ، $\left(\frac{\varepsilon_x C_x}{Y'}\right)_{\lambda_1}$ و $\left(\frac{\varepsilon_x C_x}{Y'}\right)_{\lambda_2}$ به

ترتیب دامنه نسبی گونه X در λ_1 و λ_2 ، $\left(\frac{\varepsilon_y C_y}{Y'}\right)$ مقدار ثابت مربوط به گونه Y در دو طول-موج مورد نظر، M_1 و M_2 شیب خط‌های کالیبراسیون افزایش استاندارد در λ_1 و λ_2 ، در روش RHPSAM و C_x غلظت افزوده شده از گونه X است.

در نقطه RH point، $P_1 = P_2 = P_{RH}$ می‌باشد. در نتیجه معادله‌های ۲-۲۸ و ۲-۲۹ با هم برابرند و از تساوی

آنها معادله ۲-۳۰ و ۲-۳۳ به دست می‌آید.

$$\left(\frac{\varepsilon_x C_x}{Y'}\right)_{\lambda_1} + \left(\frac{\varepsilon_y C_y}{\varepsilon_y Y'}\right) + M_{\lambda_1} C_x = \left(\frac{\varepsilon_x C_x}{Y'}\right)_{\lambda_2} + \left(\frac{\varepsilon_y C_y}{Y'}\right) + M_{\lambda_2} C_x \quad \text{معادله ۲-۳۰}$$

$$M_{\lambda_1} C_x - M_{\lambda_2} C_x = \left\{ \left(\frac{\varepsilon_x C_x}{Y'}\right)_{\lambda_2} + \left(\frac{\varepsilon_y C_y}{Y'}\right) \right\} - \left\{ \left(\frac{\varepsilon_x C_x}{Y'}\right)_{\lambda_1} + \left(\frac{\varepsilon_y C_y}{Y'}\right) \right\} \quad \text{معادله ۲-۳۱}$$

$$(M_{\lambda_1} - M_{\lambda_2}) C_x = \left(\frac{\varepsilon_x C_x}{Y'}\right)_{\lambda_2} + \left(\frac{\varepsilon_x C_x}{Y'}\right)_{\lambda_1} \quad \text{معادله ۲-۳۲}$$

$$C_x = -C_{RH} = \frac{\left(\frac{\varepsilon_x C_x}{Y'}\right)_{\lambda_2} + \left(\frac{\varepsilon_x C_x}{Y'}\right)_{\lambda_1}}{M_{\lambda_1} - M_{\lambda_2}} \quad \text{معادله ۲-۳۳}$$

به‌طور مشابه نقطه C_{RH} با استفاده از معادله‌های ۲-۲۸ و ۲-۲۹ به دست می‌آید و معادله‌های ۲-۳۴ و ۲-

۳۵ حاصل می‌شوند.

$$C_x = \frac{\left\{ P_1 - \left(\frac{\varepsilon_x C_x}{Y'} \right)_{\lambda_1} - \left(\frac{\varepsilon_y C_y}{Y'} \right) \right\}}{M_{\lambda_1}} \quad \text{معادله ۲-۳۴}$$

$$C_x = \frac{\left\{ P_2 - \left(\frac{\varepsilon_x C_x}{Y'} \right)_{\lambda_2} - \left(\frac{\varepsilon_y C_y}{Y'} \right) \right\}}{M_{\lambda_2}} \quad \text{معادله ۲-۳۵}$$

از تساوی معادله‌های ۲-۳۴ و ۲-۳۵ روابط زیر برقرار خواهد بود :

$$\frac{\left\{ P_1 - \left(\frac{\varepsilon_x C_x}{Y'} \right)_{\lambda_1} - \left(\frac{\varepsilon_y C_y}{Y'} \right) \right\}}{M_{\lambda_1}} = \frac{\left\{ P_2 - \left(\frac{\varepsilon_x C_x}{Y'} \right)_{\lambda_2} - \left(\frac{\varepsilon_y C_y}{Y'} \right) \right\}}{M_{\lambda_2}}$$

$$M_{\lambda_2} \left\{ P_1 - \left(\frac{\varepsilon_x C_x}{Y'} \right)_{\lambda_1} - \left(\frac{\varepsilon_y C_y}{Y'} \right) \right\} = M_{\lambda_1} \left\{ P_2 - \left(\frac{\varepsilon_x C_x}{Y'} \right)_{\lambda_2} - \left(\frac{\varepsilon_y C_y}{Y'} \right) \right\}$$

$$M_{\lambda_2} P_1 - M_{\lambda_2} \left(\frac{\varepsilon_x C_x}{Y'} \right)_{\lambda_1} - M_{\lambda_2} \left(\frac{\varepsilon_y C_y}{Y'} \right) = M_{\lambda_1} P_2 - M_{\lambda_1} \left(\frac{\varepsilon_x C_x}{Y'} \right)_{\lambda_2} - M_{\lambda_1} \left(\frac{\varepsilon_y C_y}{Y'} \right)$$

$$M_{\lambda_2} P_1 - M_{\lambda_1} P_2 = M_{\lambda_1} \left(\frac{\varepsilon_x C_x}{Y'} \right)_{\lambda_2} + M_{\lambda_1} \left(\frac{\varepsilon_y C_y}{\varepsilon_y} \right) - M_{\lambda_2} \left(\frac{\varepsilon_x C_x}{\varepsilon_y} \right)_{\lambda_1} + M_{\lambda_2} \left(\frac{\varepsilon_y C_y}{\varepsilon_y} \right)$$

و از آن جاییکه $P_1 = P_2 = P_{RH}$ ؛ بنابراین رابطه زیر برقرار خواهد بود و معادله ۲-۳۶ به دست می‌آید:

$$P_{RH} (M_{\lambda_2} - M_{\lambda_1}) = \left(\frac{\varepsilon_y C_y}{Y'} \right) (M_{\lambda_1} - M_{\lambda_2}) + M_{\lambda_1} \left(\frac{\varepsilon_x C_x}{Y'} \right)_{\lambda_2} - M_{\lambda_2} \left(\frac{\varepsilon_x C_x}{Y'} \right)_{\lambda_1}$$

$$P_{RH} = \left(\frac{\varepsilon_y C_y}{Y'} \right) + \frac{\left\{ M_{\lambda_1} \left(\frac{\varepsilon_x C_x}{Y'} \right)_{\lambda_2} - M_{\lambda_2} \left(\frac{\varepsilon_x C_x}{Y'} \right)_{\lambda_1} \right\}}{(M_{\lambda_2} - M_{\lambda_1})} \quad \text{معادله ۲-۳۶}$$

و چون $\frac{\left(\frac{\varepsilon_x C_x}{Y'} \right)_{\lambda_2}}{M_{\lambda_2}} = \frac{\left(\frac{\varepsilon_x C_x}{Y'} \right)_{\lambda_1}}{M_{\lambda_1}}$ پس $M_{\lambda_2} \left(\frac{\varepsilon_x C_x}{Y'} \right)_{\lambda_1} = \left(\frac{\varepsilon_x C_x}{Y'} \right)_{\lambda_2} M_{\lambda_1}$ خواهد بود و مقدار عبارت

در معادله برابر صفر خواهد بود و در نتیجه می توان نوشت :

$$P_{RH} = \left(\frac{\varepsilon_y c_y}{Y'} \right) = C_y \quad \text{معادله ۲-۳۷}$$

و در نهایت از معادله های ۲-۳۳ و ۲-۳۶ معادله های زیر حاصل می شوند:

$$C_x = \frac{B - A}{(M_1 - M_2)} \quad \text{معادله ۲-۳۸}$$

$$C_y = \frac{(BM_1 - AM_2)}{(M_1 - M_2)} \quad \text{معادله ۲-۳۹}$$

که در معادله های ۲-۳۸ و ۲-۳۹، A و B به ترتیب $\left(\frac{\varepsilon_x c_x}{Y'} \right)_{\lambda_1} + \left(\frac{\varepsilon_y c_y}{Y'} \right)$ و $\left(\frac{\varepsilon_x c_x}{Y'} \right)_{\lambda_2} + \left(\frac{\varepsilon_y c_y}{Y'} \right)$ یا به

عبارتی A و B عرض از مبدا خط های کالیبراسیون افزایش استاندارد به ترتیب در λ_1 و λ_2 ، M_1 و M_2 شیب

خط های کالیبراسیون افزایش استاندارد به ترتیب در λ_1 و λ_2 هستند و به این صورت غلظت گونه های X و Y

به روش RHPSAM به دست می آید [۳۳].

۲-۲-۲ کالیبراسیون چند متغیره^۱

کالیبراسیون چند متغیره یک اصطلاح کلی است که به توسعه یک مدل کمی برای پیش گویی صحیح ویژگی

های مورد نظر $(y_1, y_2, y_3, \dots, y_q)$ با استفاده از متغیرهای پیش گویی کننده $(x_1, x_2, x_3, \dots, x_q)$ اطلاق می شود. در

صورت عدم وجود روش های گزینش پذیر، با استفاده از کالیبراسیون چند متغیره می توان یک گونه را در حضور

گونه های مزاحم یا چند آنالیت را در حضور یکدیگر و بدون جداسازی آنالیز کرد [۲۶]. به بیان دیگر می توان گفت

آمار چند متغیره، مجموعه ای از ابزار قدرتمند ریاضی است و زمانی که بیش از یک اندازه گیری برای تجزیه و

تحلیل شیمیایی نمونه لازم است، به کار می رود [۳۴]. با استفاده از کالیبراسیون چند متغیره می توان گفت آمار

^۱Multivariate calibration

چند متغیره، می‌تواند با بررسی مزاحمت‌ها، نویز را کاهش داد و علاوه بر این؛ داده‌های خارج از محدوده خطی را کنترل کرد. به‌طور کلی می‌توان گفت کالیبراسیون چند متغیره جنبه اکتشافی دارد [۲۷]. از جمله روش‌های کالیبراسیون چند متغیره می‌توان به روش حداقل مربعات جزئی (PLS) اشاره کرد.

فصل سوم :

تجربی

۳-۱- اندازه‌گیری همزمان استیل‌سالیسیلیک اسید و آسکوربیک اسید با استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری جدید

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

۳-۲- مواد شیمیایی مورد استفاده

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

جدول ۳-۱: مواد شیمیایی مورد استفاده

نام ماده شیمیایی	فرمول	شرکت سازنده
آسکوربیک اسید	$C_6H_8O_6$	مرک
استیل‌سالیسیلیک اسید	$C_9H_8O_4$	مرک
سیتریک اسید منو هیدرات	$H_3C_6H_5O_7 \cdot H_2O$	مرک
پتاسیم دی هیدروژن فسفات	KH_2PO_4	مرک
دی سدیم هیدروژن فسفات	Na_2HPO_4	مرک
پتاسیم هیدروژن فتالات	$C_8H_5KO_4$	مرک
سدیم هیدروکسید	$NaOH$	مرک
هیدروکلریک اسید	HCl	مرک

۳-۳- محلول‌های مورد استفاده و طرز تهیه آن‌ها

در تهیه تمام محلول‌ها از آب مقطر و مواد شیمیایی با درجه خلوص تجزیه‌ای تهیه شده از شرکت مرک استفاده گردید. محلول مادر استیل‌سالیسیلیک اسید با غلظت ۵۰۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر از انحلال ۰/۰۵۰۰ گرم از استیل‌سالیسیلیک اسید خالص در ۱۰/۰۰ میلی‌لیتر از HCl یک مولار و رقیق سازی آن با آب مقطر در حجم ۱۰۰/۰ میلی‌لیتر تهیه گردید. محلول مادر ۵۰۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر آسکوربیک‌اسید هم

از انحلال ۰/۰۵۰۰ گرم آسکوربیک اسید خالص در آب مقطر در بالن حجمی ۱۰۰/۰ میلی لیتری تهیه گردید. سپس محلول های استاندارد از هر کدام از دو ماده با رقیق سازی روزانه از محلول مادر در غلظت های متفاوت ساخته شدند.

برای تهیه محلول های بافر فسفاتی با محدوده $\text{pH} = 5/0 - 9/0$ حجم های معین از محلول های ۰/۰۶۶۷ مولار دی سدیم هیدروژن فسفات و ۰/۰۶۶۷ مولار پتاسیم دی هیدروژن فسفات استفاده شد و سپس pH آن ها با pH متر تنظیم گردید [۳۶]. برای تهیه محلول بافر فسفاتی با $\text{pH} = 2/0 - 4/0$ از محلول های فسفریک اسید ۰/۱ مولار و پتاسیم دی هیدروژن فسفات ۰/۰۶۶۷ مولار استفاده شد. برای تهیه بافر سیتراتی با $\text{pH} = 2/5$ ابتدا ۰/۴۱۰۱ گرم از سیتریک اسید منوهیدرات به همراه ۲۰/۰۰ میلی لیتر سود ۰/۱۰ مولار به یک بالن حجمی ۱۰۰/۰ میلی لیتری اضافه گردید و با آب مقطر تا خط نشانه به حجم رسانده و یکنواخت شد. سپس ۴۰/۰ میلی لیتر از این محلول با ۶۰/۰ میلی لیتر از هیدروکلریک اسید ۰/۱۰ مولار مخلوط شد و pH محلول به کمک pH متر تا $\text{pH} = 2/5$ تنظیم شد [۳۵].

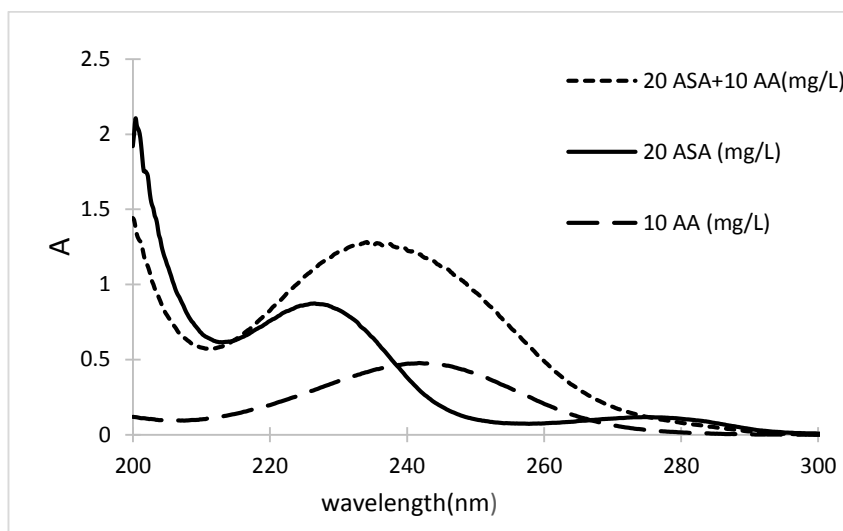
بافر فتالاتی با $\text{pH} = 2/5$ از مخلوط کردن حجم های معین از پتاسیم هیدروژن فتالات ۰/۲۰ مولار و HCl ۰/۱۰ مولار تنظیم و pH محلول به کمک pH متر تهیه گردید [۳۵].

۳-۴- دستگاه ها و وسایل مورد استفاده

برای ثبت طیف های جذبی گونه های مورد نظر در ناحیه مرئی- فرابنفش از دستگاه اسپکتروفوتومتر دو پرتوی ریلی مدل UV-2601 مجهز به یک جفت سل کوارتز یک سانتی متری و برای اندازه گیری pH از یک دستگاه pH - متر مترام مدل ۷۴۴ مجهز به یک الکتروود غشا شیشه کالومل (۳ مولار) و جهت توزین مواد از ترازوی سارتریوس مدل A200S با دقت ۰/۱ میلی گرم استفاده شد.

۳-۵- طیف جذبی

طیف جذبی محلول‌های استیل‌سالیسیلیک اسید، آسکوربیک اسید و مخلوط‌های دوتایی آن‌ها در گستره طول موج ۲۰۰-۳۲۰ نانومتر در شکل ۱-۳ نشان داده شده است.



شکل ۱-۳: طیف جذبی ۱۰/۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آسکوربیک اسید (---)، طیف جذبی ۲۰/۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر استیل‌سالیسیلیک اسید (—) و طیف جذبی مخلوط ۱۰/۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آسکوربیک اسید و ۲۰/۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در pH=۲/۵ (— · —).

برای ثبت طیف‌های جذبی نمونه به صورت زیر عمل شد:

برای تهیه محلول آسکوربیک اسید با غلظت ۱۰/۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر ۲/۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول ۵۰/۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آن، به همراه ۲/۱۰۰ میلی‌لیتر بافر سیتراتی با pH=۲/۵ به یک بالن ۱۰ میلی‌لیتری اضافه گردید و پس از به حجم رساندن محلول با آب مقطر و یکنواخت کردن آن، مقداری از محلول به سل کوارتز دستگاه منتقل شد و طیف آسکوربیک اسید با غلظت معین نسبت به محلول شاهد در گستره طول موج ۲۰۰-۳۲۰ نانومتر ثبت گردید. تهیه محلول شاهد هم مثل مراحل فوق بود با این تفاوت که به بالن حجمی ۱۰ میلی‌لیتری هیچ غلظتی از آسکوربیک اسید اضافه نگردید، که شکل طیف جذبی خالص آسکوربیک اسید در شکل ۳-۱ آورده شده است. این شکل یک طول موج ماکزیمم را برای آسکوربیک اسید در ۲۴۳ نانومتر نشان می‌دهد.

برای تهیه محلول استیل سالیسیلیک اسید با غلظت ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر، ۲/۰۰ میلی لیتر محلول ۱۰۰/۰ میلی گرم بر لیتر از آن را به همراه ۲/۰۰ میلی لیتر بافر سیتراتی با $\text{pH}=2/5$ به یک بالن ۱۰ میلی لیتری اضافه گردید، پس از به حجم رساندن محلول با آب مقطر و یکنواخت کردن آن، مقداری از محلول به سل کوارتز دستگاه منتقل شد و طیف استیل سالیسیلیک اسید نسبت به محلول شاهد در گستره طول موج ۳۲۰-۲۰۰ نانومتر ثبت گردید. (شکل ۳-۱)

این شکل دو طول ۲۲۵ و ۲۷۵ نانومتر را به عنوان طول موج ماکزیمم را برای استیل سالیسیلیک اسید نشان می دهد. برای این کار طول موج ۲۷۵ نانومتر به عنوان طول موج ماکزیمم استیل سالیسیلیک اسید برای انجام اندازه گیری های همزمان انتخاب گردید.

برای تهیه محلول مخلوط این دو ترکیب به این صورت عمل شد که مقدار ۲/۰۰ میلی لیتر از محلول ۵۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر آسکوربیک اسید و ۲/۰۰ میلی لیتر محلول ۱۰۰/۰ میلی گرم بر لیتر استیل سالیسیلیک اسید به همراه ۲/۰۰ میلی لیتر بافر سیتراتی با $\text{pH}=2/5$ به یک بالن ۱۰ میلی لیتری انتقال داده شد و با آب مقطر به حجم رسانده شد و بعد از یکنواخت کردن محلول حاصل، طیف جذبی مخلوط در گستره ۳۲۰-۲۰۰ نانومتر نسبت به محلول شاهد ثبت گردید. مراحل تهیه محلول شاهد مثل فوق است با این تفاوت که هیچ غلظتی از آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید به بالن ۱۰ میلی لیتری اضافه نگردید. برای مشاهده و مقایسه جزئیات طیفی محلول های آسکوربیک اسید، استیل سالیسیلیک اسید و مخلوط حاوی این دو، طیف ها در شکل ۳-۱ آورده شده است. همان طور که از شکل ۳-۱ استنباط می شود امکان اندازه گیری هر یک از دو گونه به صورت جداگانه در یک مخلوط به روش اسپکتروفوتومتری معمولی مستقیم امکان پذیر نمی باشد. لذا برای اندازه گیری این دو گونه در مخلوط از روش های اسپکتروفوتومتری جدید RHPSAM و RD ، RS-CM ، EXRSM ، SRSM گردید.

بررسی های بیشتر نشان داد که پیک های جذبی در طول موج های ۲۴۳ و ۲۷۵ نانومتر به ترتیب با غلظت

آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید متناسب است. بنابراین در بهینه‌سازی متغیرهای تجربی موثر بر حساسیت روش و استخراج منحنی‌های کالیبراسیون برای هر یک از ترکیبات از مقدار جذب محلول‌ها در طول موج‌های ذکر شده به عنوان سیگنال تجزیه‌ای استفاده شد.

۳-۶- بررسی و بهینه‌سازی پارامترهای موثر بر سیستم

به منظور فراهم نمودن بهترین حساسیت و گزینش‌پذیری و در نتیجه بهترین حد تشخیص، متغیرهای موثر بر میزان جذب آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید در طول موج‌های ماکزیمم هر یک مورد بررسی قرار گرفته و بهینه شدند. در بررسی متغیرها از روش بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان^۱ استفاده شد. در این روش برای بهینه‌سازی یک متغیر، سایر متغیرها ثابت در نظر گرفته می‌شود و فقط پارامتری که باید بهینه شود تغییر می‌کند تا بیشترین میزان پاسخ به دست آید. پارامترهای بررسی شده عبارتند از:

- اثر pH
- نوع بافر
- حجم بافر
- قدرت یونی

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

گیرد.

۳-۶-۱- بررسی اثر pH

اثر pH بر جذب و طول موج ماکزیمم جذب آسکوربیک اسید در دامنه ۲/۰۰-۹/۰۰ pH واحد مورد بررسی قرار گرفت. در بررسی اثر pH، محلول‌های بافر با pHهای ۲/۰۰-۹/۰۰ مطابق بخش ۳-۳ تهیه شد.

^۱One-at-a time

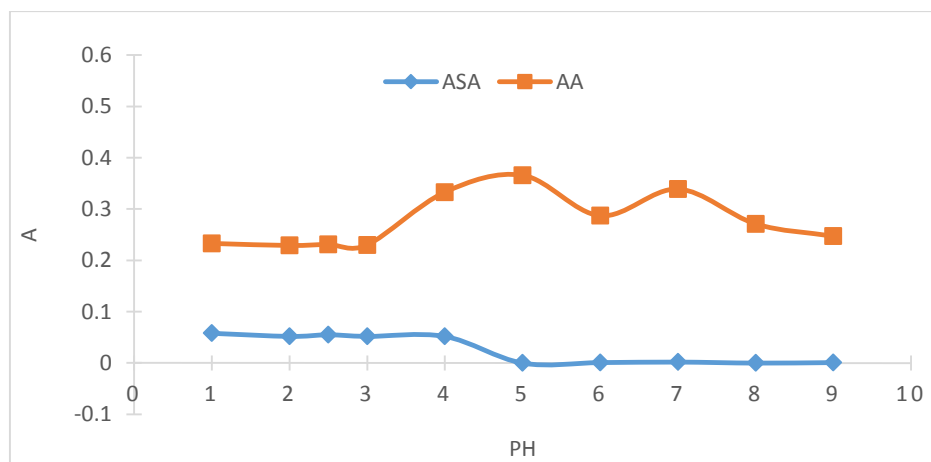
این بررسی به صورت زیر انجام گرفت:

ابتدا ۱/۰۰ میلی لیتر محلول ۵۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر از آسکوربیک اسید به همراه ۱/۰۰ میلی لیتر بافر در pH مورد نظر به بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری اضافه شد و با آب مقطر به حجم رسانده و یکنواخت شد. و سپس طیف محلول حاصل نسبت به محلول شاهد در محدوده ۲۰۰-۳۵۰ نانومتر ثبت شد. محلول شاهد به شکل فوق تهیه شد با این تفاوت که هیچ غلظتی از آسکوربیک اسید به آن اضافه نگردید. سپس در هر pH برای هر محلول، طول موجی که بیشترین جذب را داشت شناسایی و ثبت گردید. به همین ترتیب برای استیل سالیسیلیک اسید هم اثر pH بررسی شد، با این تفاوت که ۲/۰۰ میلی لیتر از محلول ۵۰/۰ میلی گرم بر لیتری به بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری انتقال داده شد.

نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۲-۳ و شکل ۲-۳ نشان می دهند که اختلاف طول موج ماکزیمم جذب آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید در pH های ۱/۰۰ تا ۳/۰۰ ثابت است و ۳۲ نانومتر است. و در $pH=4$ اختلاف طول موج ماکزیمم دو گونه (با تغییر طول موج ماکزیمم جذب آسکوربیک اسید از ۲۴۳ به ۲۸۶/۲ نانومتر) به ۱۲/۲ کاهش می یابد که بیانگر افزایش همپوشانی طیفها در این ناحیه از pH است. در گستره pH برابر ۵/۰ تا ۸/۰ اندازه گیری به دلیل تغییر طول موج ماکزیمم جذب آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید (استیل سالیسیلیک اسید در ۲۷۵ نانومتر جذب ندارد) به ترتیب به ۲۸۶/۲ و ۲۲۵ نانومتر مناسب نمی باشد. به همین جهت $pH=2/5$ به عنوان pH بهینه انتخاب گردید.

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

اختلاف طول موج دو گونه (نانومتر)	آسکوربیک اسید		استیل سالیسیلیک اسید		Ph
	جذب	طول موج ماکزیمم جذب (نانومتر)	جذب	طول موج ماکزیمم جذب (نانومتر)	
۳۲/۰	۰/۲۳۳	۲۴۳	۰/۰۵۸	۲۷۵	۱/۰۰
۳۲/۰	۰/۲۲۹	۲۴۳	۰/۰۵۲	۲۷۵	۲/۰۰
۳۲/۰	۰/۲۳۱	۲۴۳	۰/۰۵۵	۲۷۵	۲/۵۰
۳۲/۰	۰/۲۳۰	۲۴۳	۰/۰۵۲	۲۷۵	۳/۰۰
۱۲/۲	۰/۳۳۳	۲۶۲/۸	۰/۰۵۲	۲۷۵	۴/۰۰
۱۰/۴	۰/۳۶۶	۲۶۴/۶	۰/۰۰۰	۲۷۵	۵/۰۰
۱۰/۴	۰/۲۸۷	۲۶۴/۶	۰/۰۰۱	۲۷۵	۶/۰۰
۱۰/۰	۰/۳۳۹	۲۶۵	۰/۰۰۳	۲۷۵	۷/۰۰
۱۰/۰	۰/۲۷۱	۲۶۵	۰/۰۰۰	۲۷۵	۸/۰۰
۱۰/۰	۰/۲۴۷	۲۶۵	۰/۰۰۱	۲۷۵	۹/۰۰



شکل ۳-۲: بررسی اثر pH بر جذب آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید

شرایط: محلول‌های آسکوربیک اسید (۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر) و استیل سالیسیلیک اسید (۱۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر) در حضور ۱/۰۰ میلی لیتر بافر فسفاتی با pH های مختلف در بالن ۱۰/۰۰ میلی لیتری.

۳-۶-۲- بررسی اثر نوع بافر

پس از بررسی اثر pH بر روی میزان جذب برای دستیابی به حساسیت بیشتر، اثر نوع بافر بر روی جذب

آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید توسط بافرهای فسفاتی و سیتراتی با $\text{pH} = 2/5$ مورد بررسی قرار گرفت. در این مرحله روش کار برای آسکوربیک اسید به شیوه زیر بود :

ابتدا ۱/۰۰ میلی لیتر از بافر مورد نظر با $\text{pH} = 2/5$ و ۱/۰۰ میلی لیتر از محلول ۵۰/۰ میلی گرم بر لیتر آسکوربیک اسید به بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری منتقل شد و بعد از به حجم رساندن و یکنواخت کردن محلول، مقداری از آن به سل دستگاه منتقل شد و طیف محلول حاصل نسبت به شاهد در طول موج ماکزیمم اندازه گیری و ثبت گردید. محلول شاهد همانند محلول نمونه تهیه گردید با این تفاوت که هیچ غلظتی از آسکوربیک اسید به بالن اضافه نشد. به همین صورت برای استیل سالیسیلیک اسید عمل شد با این تفاوت که به جای محلول آسکوربیک اسید، ۲/۰۰ میلی لیتر محلول ۵۰/۰ میلی گرم بر لیتر استیل سالیسیلیک اسید به بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری اضافه گردید. نتایج حاصل از بررسی در جدول ۳-۳ نشان می دهند که سیگنال تجزیه ای دو گونه در حضور بافر سیتراتی و فسفاتی با $\text{pH} = 2/5$ با هم مساوی است. بنابراین به منظور کاهش مزاحمت های احتمالی و افزایش گزینش پذیری، بافر سیتراتی برای بررسی های بعدی انتخاب گردید.

جدول ۳-۳: نتایج حاصل از بررسی نوع بافر

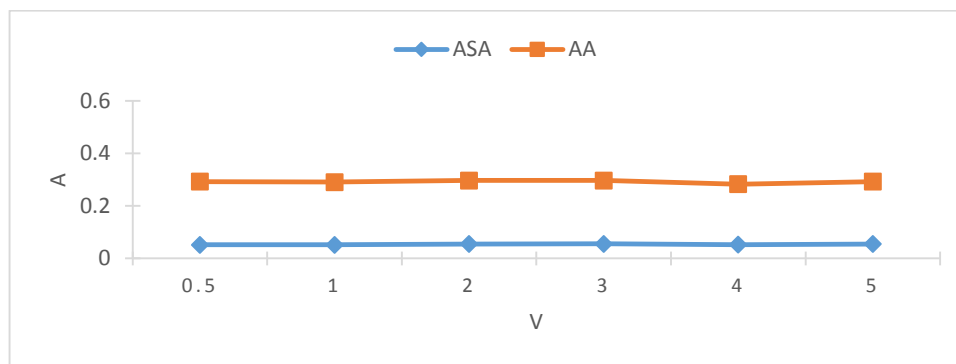
نوع بافر	جذب آسکوربیک اسید (۲۴۳ نانومتر)	جذب استیل سالیسیلیک اسید (۲۷۵ نانومتر)
سیتراتی	۰/۲۴۱	۰/۰۵۵
فسفاتی	۰/۲۴۱	۰/۰۵۶

۳-۷- بررسی اثر حجم بافر

بعد از بررسی اثر نوع بافر بر روی میزان جذب، اثر حجم بافر سیتراتی با $\text{pH} = 2/5$ در دامنه ۰/۵۰ تا ۵/۰۰ میلی لیتری از بافر سیتراتی مورد بررسی قرار گرفت. این بررسی به این صورت انجام شد:

۱/۰۰ میلی لیتر از محلول ۵۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر آسکوربیک اسید به همراه حجم های مختلفی از بافر

سیتراتی با $\text{pH} = 2/5$ به بالن حجمی ۱۰ میلی‌لیتری منتقل و با آب مقطر تا خط نشانه رقیق و یکنواخت گردید. سپس قسمتی از آن به سل دستگاه منتقل شد. محلول شاهد همانند محلول نمونه تهیه شد با این تفاوت که به آن محلول آسکوربیک اسید اضافه نشد. در نهایت طیف محلول حاصل نسبت به شاهد ثبت و جذب در طول موج ماکزیمم آسکوربیک اسید (۲۴۳ نانومتر) اندازه‌گیری و ثبت گردید. به همین صورت برای استیل‌سالیسیلیک اسید هم عمل شد با این تفاوت که به جای محلول آسکوربیک اسید ۲/۰۰ میلی‌لیتر محلول ۵۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر استیل‌سالیسیلیک اسید به بالن حجمی ۱۰ میلی‌لیتری منتقل شد و جذب در طول موج ماکزیمم استیل‌سالیسیلیک اسید (۲۷۵ نانومتر) اندازه‌گیری و ثبت گردید. نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۳-۴ و شکل ۳-۳ نشان می‌دهند که میزان جذب این داروها در حجم‌های متفاوت از بافر سیتراتی تقریباً ثابت است. برای اطمینان از کافی بودن ظرفیت بافری، حجم ۲/۰۰ میلی‌لیتر از محلول بافر سیتراتی برای مطالعات و بررسی‌های بعدی به عنوان حجم بهینه بافر انتخاب شد.



شکل ۳-۳: بررسی اثر حجم بافر سیتراتی با $\text{pH} = 2/5$ بر جذب آسکوربیک اسید (۵۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) و استیل‌سالیسیلیک اسید (۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر)

جدول ۳-۴: نتایج حاصل از بررسی اثر حجم بافر سیتراتی

حجم بافر (میلی لیتر)	جذب استیل سالیسیلیک اسید در طول موج ۲۷۵ نانومتر	جذب آسکوربیک اسید در طول موج ۲۴۳ نانومتر
۰/۵۰	۰/۰۵۲	۰/۲۴۱
۱/۰۰	۰/۰۵۲	۰/۲۳۹
۲/۰۰	۰/۰۵۵	۰/۲۴۲
۳/۰۰	۰/۰۵۶	۰/۲۴۱
۴/۰۰	۰/۰۵۳	۰/۲۳۰
۵/۰۰	۰/۰۵۵	۰/۲۳۸

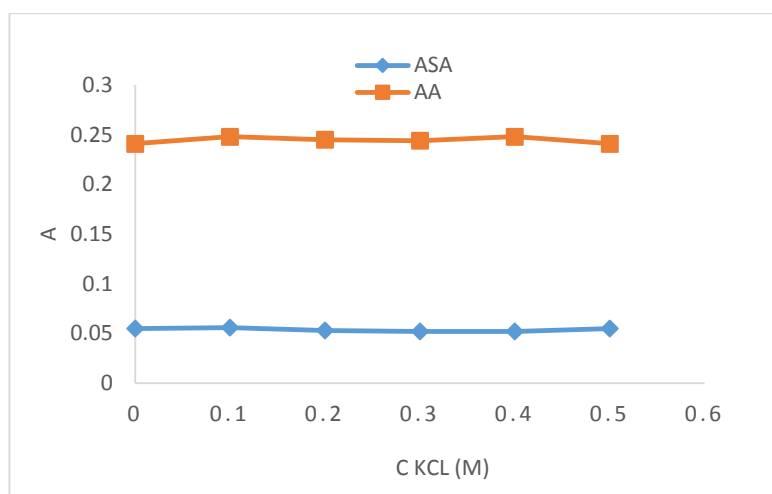
۳-۸- بررسی اثر قدرت یونی

پارامتر تاثیرگذار دیگر بر روی جذب محلول‌های مورد بررسی قدرت یونی است. به منظور این بررسی از محلول پتاسیم کلرید ۲/۰۰ مولار استفاده شد. این بررسی به صورت زیر انجام شد:

۱/۰۰ میلی لیتر محلول ۵۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر آسکوربیک اسید و ۲/۰۰ میلی لیتر محلول بافر سیتراتی با $\text{pH} = ۲/۵$ به همراه حجم‌های مختلفی از پتاسیم کلرید ۲/۰۰ مولار به بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری منتقل و محلول با آب مقطر تا خط نشانه رقیق و یکنواخت گردید. سپس قسمتی از آن به سل دستگاه منتقل شد. در نهایت طیف محلول آسکوربیک اسید نسبت به محلول شاهد ثبت گردید. به همین صورت برای استیل-سالیسیلیک اسید هم عمل شد با این تفاوت که به جای محلول آسکوربیک اسید ۲/۰۰ میلی لیتر محلول ۵۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر استیل سالیسیلیک اسید به بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری منتقل گردید. محلول شاهد هم با افزودن ۲/۰۰ میلی لیتر بافر سیتراتی با $\text{pH} = ۲/۵$ به بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری و به حجم رساندن محلول با آب مقطر تا خط نشانه و یکنواخت کردن تهیه شد. نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۳-۵ و شکل ۳-۴ نشان می دهد که در دامنه غلظتی ۰/۰۰ تا ۰/۵۰ مولار پتاسیم کلرید، قدرت یونی تاثیری بر میزان جذب دارو و حساسیت روش ندارد.

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

غلظت پتاسیم کلرید (مولار)	جذب استیل سالیسیلیک اسید (۲۷۵ نانومتر)	جذب آسکوربیک اسید (۲۴۳ نانومتر)
۰/۰۰	۰/۰۵۵	۰/۲۴۱
۰/۱۰	۰/۰۵۶	۰/۲۴۸
۰/۲۰	۰/۰۵۳	۰/۲۴۵
۰/۳۰	۰/۰۵۲	۰/۲۴۴
۰/۴۰	۰/۰۵۲	۰/۲۴۱
۰/۵۰	۰/۰۵۵	۰/۲۳۹



شکل ۳-۴: بررسی اثر قدرت یونی. شرایط: محلول‌های ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر آسکوربیک اسید و یا ۱۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر استیل-سالیسیلیک اسید، در حضور ۲/۰۰ میلی لیتر بافر سیتراتی با pH=۲/۵

۳-۹- شرایط بهینه

با توجه به نتایج تجربی حاصل در بررسی و بهینه سازی پارامترهای موثر بر میزان جذب آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید در طول موج‌های ماکزیمم مربوطه، شرایط بهینه با افزایش ۲/۰۰ میلی لیتر بافر سیتراتی با pH=۲/۵ حاصل شد.

۳-۱۰- رسم منحنی کالیبراسیون

۳-۱۰-۱- تعیین دامنه خطی استیل سالیسیلیک اسید و آسکوربیک اسید به صورت

جداگانه

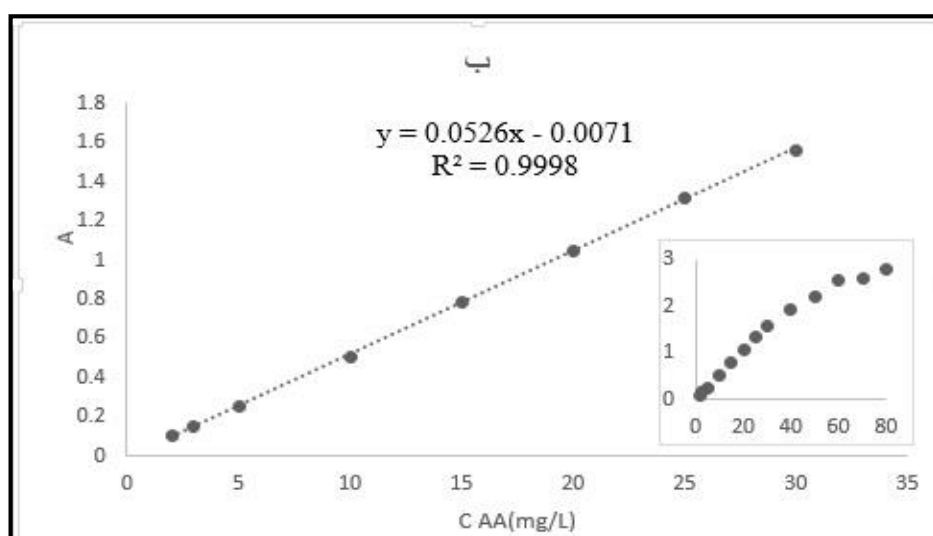
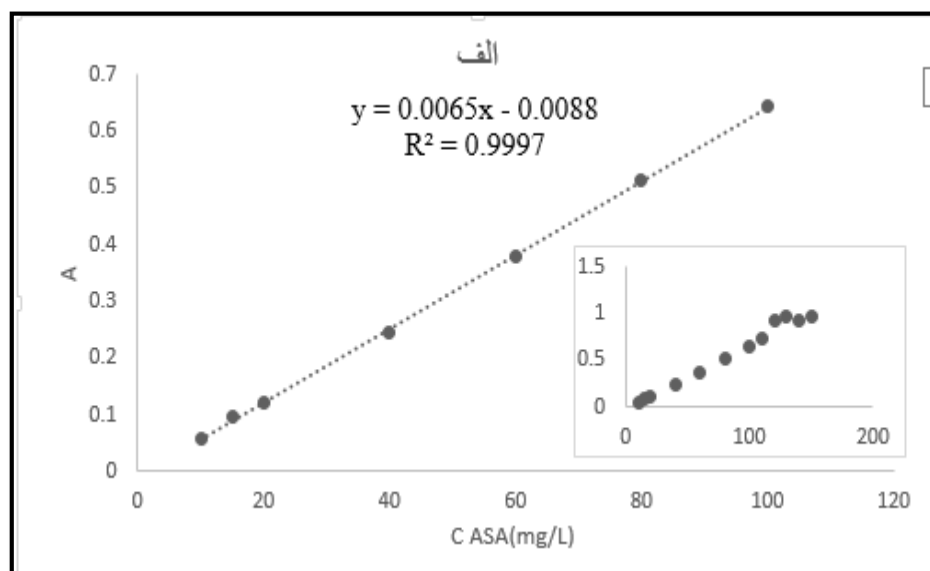
در شرایط بهینه، منحنی کالیبراسیون برای اندازه‌گیری آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید به صورت جداگانه برای هر یک به دست آمد. روش کار برای استخراج منحنی کالیبراسیون منفرد برای هر کدام از ترکیبات به صورت زیر بود:

به یک سری بالن حجمی ۱۰/۰ میلی‌لیتری، ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر سیتراتی با $\text{pH} = 2/5$ ، ۵/۰۰ تا ۸۰۰/۰ میکروگرم از آسکوربیک اسید یا ۵/۰۰ تا ۱۵۰۰/۰ میکروگرم بر لیتر استیل سالیسیلیک اسید به صورت جداگانه اضافه و با آب مقطر تا خط نشانه بالن رقیق گردید. سپس مقداری از آن به سل دستگاه منتقل شد و جذب هر محلول در طول موج ماکزیمم هر گونه (۲۴۳ و ۲۷۵ نانومتر به ترتیب برای آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید) نسبت به شاهد اندازه‌گیری و ثبت گردید. نتایج حاصل در جدول ۳-۶ آمده است. محلول شاهد برای هر دو گونه از انتقال ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر سیتراتی با $\text{pH} = 2/5$ به یک بالن ۱۰ میلی‌لیتری و رقیق کردن آن با آب مقطر تا خط نشانه به دست آمد.

معادله بهترین خط برای منحنی‌های کالیبراسیون از روش رگرسیون حداقل مربعات، استخراج شد. نتایج به دست آمده در شکل‌های ۳-۵ و جدول ۳-۷ آورده شده است.

جدول ۳-۶: نتایج حاصل از رسم منحنی کالیبراسیون منفرد برای آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید

جذب استیل سالیسیلیک اسید (۲۷۵ نانومتر)	جذب آسکوربیک اسید (۲۴۳ نانومتر)	غلظت (mg/L)
۰/۰۰۳	۰/۰۱۰	۰/۵۰
۰/۰۰۵	۰/۰۴۷	۱/۰۰
۰/۰۱۰	۰/۱۰۲	۲/۰۰
-	۰/۱۴۸	۳/۰۰
۰/۰۳۵	۰/۲۵۷	۵/۰۰
۰/۰۵۶	۰/۵۰۶	۱۰/۰
۰/۰۹۵	۰/۷۸۹	۱۵/۰
۰/۱۲۱	۱/۰۵	۲۰/۰
۰/۱۴۳	۱/۳۲	۲۵/۰
۰/۱۷۸	۱/۵۶	۳۰/۰
۰/۲۴۵	۲/۰۳۷	۴۰/۰
۰/۳۰۵	۲/۱۸۶	۵۰/۰
۰/۳۷۸	۲/۵۵۵	۶۰/۰
۰/۴۴۸	۲/۶۰۲	۷۰/۰
۰/۵۱۳	۲/۷۶۷	۸۰/۰
۰/۶۴۴	-	۱۰۰/۰
۰/۷۴۴	-	۱۱۰/۰
۰/۹۳۵	-	۱۲۰/۰
۰/۹۶۳	-	۱۳۰/۰
۰/۹۳۵	-	۱۴۰/۰
۰/۹۶۷	-	۱۵۰/۰



شکل ۳-۵: الف : منحنی کالیبراسیون استیل سالیسیلیک اسید (mg/L) و ب : منحنی کالیبراسیون آسکوربیک اسید (mg/L) در شرایط بهینه : ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفات با pH=۲/۵

جدول ۳-۷: نتایج حاصل از کالیبراسیون جداگانه دو گونه

ترکیب	آسکوربیک اسید ($\lambda_{max} = 243 \text{ nm}$)	استیل سالیسیلیک اسید ($\lambda_{max} = 275 \text{ nm}$)
ناحیه خطی (میلی گرم بر لیتر)	۲/۰۰ - ۳۰/۰	۱۰/۰ - ۱۰۰/۰
معادله رگرسیون	$y = 0/052C_{AA} - 0/007$ (n=۸)	$y = 0/0065 C_{ASA} - 0/008$ (n=۷)
R^2	۰/۹۹۹۸	۰/۹۹۹۷

در جدول ۳-۷، A سیگنال تجزیه‌ای مربوط به هر گونه (جذب محلول نمونه نسبت به محلول شاهد) در طول موج ماکزیمم مربوط به هر گونه، C_{AA} و C_{ASA} به ترتیب، غلظت آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید بر حسب میلی‌گرم برلیتر و R^2 مجذور ضریب همبستگی برای هر نمودار است.

۳-۱۰-۲- محلول سازی سری ارزیابی و تست

برای اندازه‌گیری همزمان آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید به روش‌های اسپکتروفتومتری جدید (EXRSM، SRS-CM، RD، CC-SS، RHPSAM)، محلول‌های سری ارزیابی و سری تست تهیه و طیف آن‌ها نسبت به محلول شاهد در دامنه ۲۰۰-۳۲۰ نانومتر ثبت گردید و مورد بررسی قرار گرفت. محلول‌های سری کالیبراسیون از انتقال مقادیر مختلف آسکوربیک اسید یا استیل‌سالیسیلیک اسید به همراه ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر سیتراتی $pH=2/5$ 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 ۲۰۰-۳۲۰ نانومتر ثبت و ذخیره شد. روش کار در تهیه محلول‌های سری ارزیابی و محلول‌های سری تست به این صورت بود که؛ به یک سری بالن حجمی ۱۰/۰ میلی‌لیتری، ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر سیتراتی با $pH=2/5$ و مقادیر مختلف از آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید منتقل شد و با آب مقطر تا خط نشانه رقیق گردید. محلول شاهد مثل محلول نمونه تهیه شد با این تفاوت که به آن آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید افزوده نشد. سپس طیف هر محلول نسبت به محلول شاهد در دامنه ۲۰۰-۳۲۰ نانومتر ثبت و ذخیره شد. ترکیب غلظتی مخلوط‌های سری ارزیابی و تست به ترتیب در جدول ۳-۸ و ۳-۹ آورده شده است.

جدول ۳-۸: ترکیب غلظتی محلول‌های سری ارزیابی

محلول	غلظت آسکوربیک اسید (mg/L)	غلظت استیل سالیسیلیک اسید (mg/L)
۱	۳/۰۰	۱۰/۰۰
۲	۳/۰۰	۱۵/۰۰
۳	۳/۰۰	۲۰/۰۰
۴	۳/۰۰	۳۰/۰۰
۵	۵/۰۰	۱۰/۰۰
۶	۵/۰۰	۱۵/۰۰
۷	۵/۰۰	۲۰/۰۰
۸	۵/۰۰	۳۰/۰۰
۹	۷/۰۰	۱۰/۰۰
۱۰	۷/۰۰	۱۵/۰۰
۱۱	۷/۰۰	۲۰/۰۰
۱۲	۷/۰۰	۳۰/۰۰
۱۳	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰
۱۴	۱۰/۰۰	۱۵/۰۰
۱۵	۱۰/۰۰	۲۰/۰۰
۱۶	۱۰/۰۰	۳۰/۰۰
۱۷	۲۰/۰۰	۱۰/۰۰
۱۸	۲۰/۰۰	۱۵/۰۰
۱۹	۲۰/۰۰	۲۰/۰۰
۲۰	۲۰/۰۰	۳۰/۰۰
۲۱	۳۰/۰۰	۱۰/۰۰
۲۲	۳۰/۰۰	۱۵/۰۰
۲۳	۳۰/۰۰	۲۰/۰۰
۲۴	۳۰/۰۰	۳۰/۰۰

جدول ۳-۹: ترکیب غلظتی محلول‌های سری تست

محلول	غلظت آسکوربیک‌اسید (mg/L)	غلظت استیل‌سالیسیلیک‌اسید (mg/L)
۱	۲/۰۰	۳۰/۰۰
۲	۲/۰۰	۱۰/۰۰
۳	۳/۰۰	۱۵/۰۰
۴	۹/۰۰	۱۰/۰۰
۵	۱۲/۰۰	۱۲/۰۰
۶	۱۵/۰۰	۱۵/۰۰
۷	۲۵/۰۰	۲۰/۰۰
۸	۲۸/۰۰	۲۸/۰۰

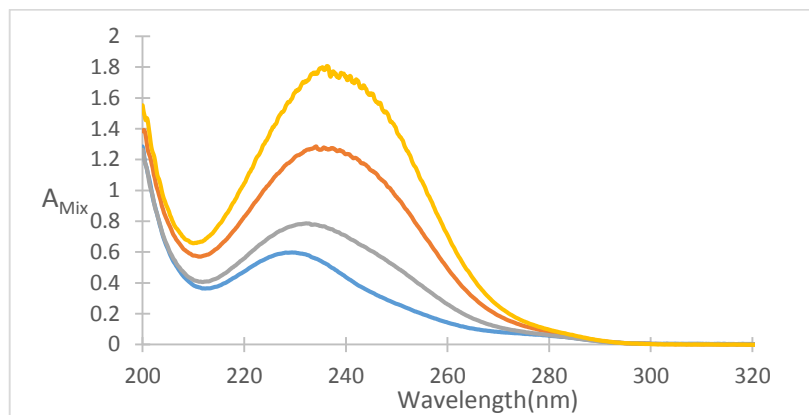
۳-۱۱- کاربرد روش توسعه یافته تفاضل نسبی (EXRSM) در تعیین غلظت آسکوربیک‌اسید و استیل‌سالیسیلیک‌اسید

اولین روش اسپکتروفتومتری جدیدی که برای تعیین مقدار غلظت‌های آسکوربیک‌اسید و استیل‌سالیسیلیک‌اسید در مخلوط‌ها به کار برده شد، روش EXRSM بود. در ابتدا روش به دست آوردن آسکوربیک‌اسید و استیل‌سالیسیلیک‌اسید در یک سری از مخلوط‌های سری ارزیابی توضیح داده می‌شود.

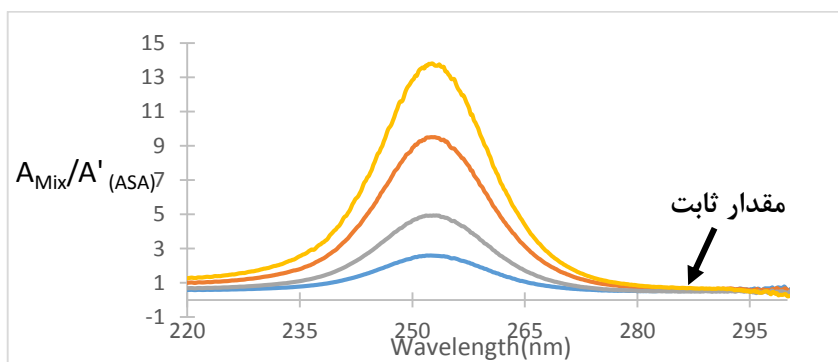
در این جا به عنوان مثال مخلوط‌هایی از سری ارزیابی انتخاب شدند که مقدار استیل‌سالیسیلیک‌اسید ثابت و مقدار آسکوربیک‌اسید متغیر دارند. در شکل ۳-۶ طیف جذبی مخلوط‌هایی با غلظت ثابت استیل‌سالیسیلیک‌اسید و غلظت متغیر آسکوربیک‌اسید آورده شده است. سپس طیف هر مخلوط بر طیف خالص استیل‌سالیسیلیک‌اسید (گونه‌ای که جذب آن در طول موج‌های بالاتر صفر می‌شود) با غلظت معینی (۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) به عنوان مقسوم علیه تقسیم شد. طیف‌های نسبی حاصل در طول موج‌های بلندتر از ۲۸۲ نانومتر دارای یک مقدار ثابت است. (شکل ۳-۷)

در شکل ۳-۷، A_{mix} و A' (ASA) به ترتیب بیانگر جذب مخلوط و جذب محلول استیل‌سالیسیلیک‌اسید

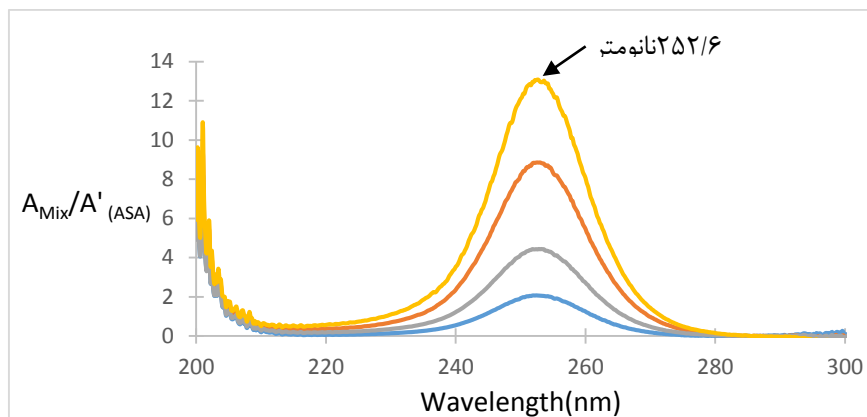
اسید (به عنوان مقسوم علیه) است. پس از تقسیم کردن طیف مخلوطها به طیف یک محلول استیل-سالیسیلیک اسید با غلظت معین، نشان داده شده که برای تمام مخلوطهای بالا، مقدار ثابت یکسان می باشد و به غلظت استیل سالیسیلیک اسید وابسته است. سپس مقدار ثابت حاصل از طیفهای نسبی شکل ۳-۷ کسر گردید و شکل ۳-۸ به دست آمد.



شکل ۳-۶: طیفهای جذبی مخلوطهای حاوی ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰، ۳۰/۰۰ میلی گرم برلیتر آسکوربیک اسید و ۱۰/۰۰ میلی گرم برلیتر استیل سالیسیلیک اسید در شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی لیتر محلول بافر سیتراتی با pH=۲/۵

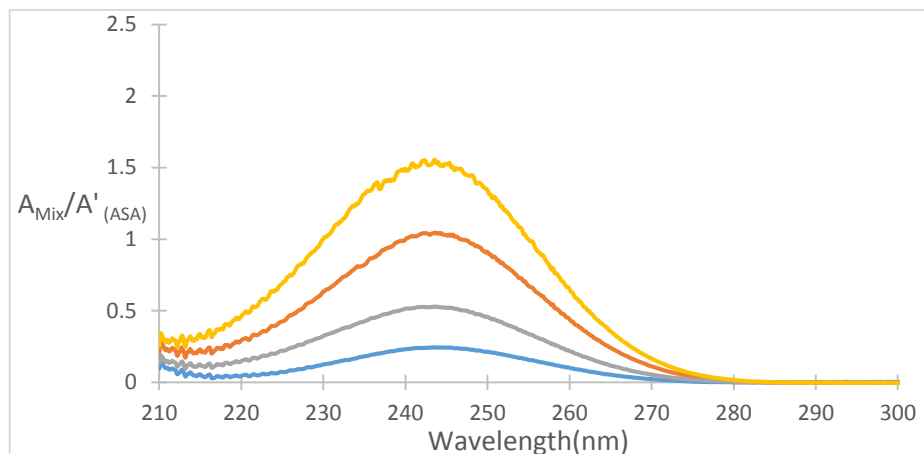


شکل ۳-۷: طیفهای نسبی حاصل از تقسیم مخلوطهای حاوی ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰، ۳۰/۰۰ میلی گرم برلیتر آسکوربیک اسید و ۱۰/۰۰ میلی گرم برلیتر استیل سالیسیلیک اسید بر طیف ۲۰/۰۰ میلی گرم برلیتر استیل سالیسیلیک اسید (مقسوم علیه)



شکل ۳-۸: طیف‌های نسبی حاصل از تقسیم مخلوط‌های حاوی ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰، ۳۰/۰۰ میلی گرم برلیتر آسکوربیک اسید و ۱۰/۰۰ میلی گرم برلیتر استیل‌سالیسیلیک اسید بر طیف ۲۰/۰۰ میلی گرم برلیتر استیل‌سالیسیلیک اسید بعد از کم کردن مقدار ثابت طیف‌های نسبی حاصل (شکل ۳-۸) در طیف محلول استیل‌سالیسیلیک اسید (که به عنوان مقسوم‌علیه استفاده شد) ضرب گردید که در این حالت طیف خالص آسکوربیک اسید موجود در هر مخلوط (۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰، ۳۰/۰۰) به دست آمد (شکل ۳-۹). جذب در طول موج ماکزیمم آسکوربیک اسید (۲۴۳ نانومتر) طیف‌های خالص به دست آمده برای آسکوربیک اسید، اندازه‌گیری شد و در منحنی کالیبراسیون آسکوربیک اسید (که از رسم جذب در طول موج ماکزیمم بر حسب غلظت آسکوربیک اسید رسم شده بود) قرار داده شد (شکل ۳-۵، ب) و غلظت آسکوربیک اسید در هر مخلوط به دست آمد.

برای رسیدن به بهترین صحت در روش EXRSM باید غلظت استیل‌سالیسیلیک اسید به عنوان مقسوم‌علیه بهینه شود. برای این منظور غلظت استیل‌سالیسیلیک اسید به عنوان مقسوم‌علیه در دامنه ۱۰/۰۰ تا ۳۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر تغییر داده شد و روش EXRSM بر روی مخلوط‌های سری ارزیابی امتحان گردید و میانگین مربع خطا (MSE) و میانگین خطای نسبی (MRE) غلظت آسکوربیک اسید برای این مخلوط‌ها محاسبه شد که طبق نتایج بدست آمده در جدول ۳-۱۰، مشاهده می‌شود که استفاده از غلظت ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر استیل‌سالیسیلیک اسید به عنوان مقسوم‌علیه در مرحله اول روش EXRSM، خطای کمتری را در نتایج گزارش شده از این روش نشان می‌دهد.



شکل ۳-۹: طیف‌های جذبی مرتبه صفر به دست آمده از غلظت‌های ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰، ۳۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر آسکوربیک اسید و ۱۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر استیل‌سالیسیلیک اسید تقسیم شده بر طیف محلول ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر استیل‌سالیسیلیک اسید بعد از کم کردن مقدار ثابت و ضرب کردن در طیف محلول ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر استیل‌سالیسیلیک اسید

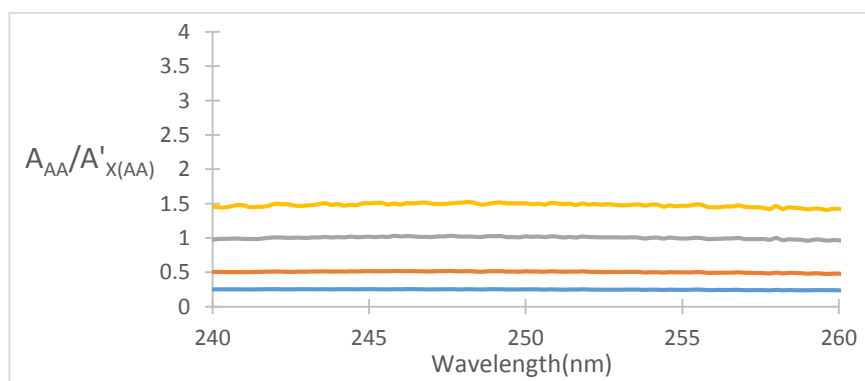
جدول ۳-۱۰: نتایج حاصل از بهینه سازی غلظت استیل سالیسیلیک اسید به عنوان مقسوم‌علیه برای مخلوط‌های سری ارزیابی در روش EXRSM

خطا MSE (MRE)	خطای نسبی (%)	غلظت آسکوربیک اسید پیش‌بینی (mg/L) شده	غلظت استیل- سالیسیلیک اسید به عنوان مقسوم علیه (mg/L)	غلظت (میلی گرم بر لیتر)		محلول
				استیل سالیسیلیک اسید (mg/L)	آسکوربیک اسید (mg/L)	
۱/۲۰ (۹/۶۱)	-۵/۶۶	۲/۸۳	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۳/۰۰	۱
	۰/۰	۳/۰۰	۱۰/۰۰	۱۵/۰۰	۳/۰۰	۲
	-۸/۶۶	۲/۷۴	۱۰/۰۰	۲۰/۰۰	۳/۰۰	۳
	۱۱/۶۶	۳/۳۵	۱۰/۰۰	۳۰/۰۰	۳/۰۰	۴
	-۱۰/۷۲	۴/۴۶	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۵/۰۰	۵
	-۴/۰۰	۴/۸۰	۱۰/۰۰	۱۵/۰۰	۵/۰۰	۶
	۳۵/۶۰	۶/۷۸	۱۰/۰۰	۲۰/۰۰	۵/۰۰	۷
	۴۴/۲۰	۷/۲۱	۱۰/۰۰	۳۰/۰۰	۵/۰۰	۸
	۰/۲۸	۷/۰۲	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۷/۰۰	۹
	-۷/۲۰	۹/۲۸	۱۰/۰۰	۱۵/۰۰	۷/۰۰	۱۰
	۴/۲۸	۷/۳۰	۱۰/۰۰	۲۰/۰۰	۷/۰۰	۱۱
	-۳/۱۴	۶/۷۸	۱۰/۰۰	۳۰/۰۰	۷/۰۰	۱۲
	۳/۱	۹/۶۹	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۳
	-۳/۰۰	۹/۷۰	۱۰/۰۰	۱۵/۰۰	۱۰/۰۰	۱۴
	-۱۰/۴	۸/۹۶	۱۰/۰۰	۲۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۵
	۱۲/۹	۱۱/۲۹	۱۰/۰۰	۳۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۶

	-1/30	19/74	10/00	10/00	20/00	17
	-4/00	19/20	10/00	15/00	20/00	18
	13/5	22/70	10/00	20/00	20/00	19
	0/53	20/07	10/00	30/00	20/00	20
	2/2	30/66	10/00	10/00	30/00	21
	1/83	30/55	10/00	15/00	30/00	22
	5/36	31/61	10/00	20/00	30/00	23
	1/23	30/37	10/00	30/00	30/00	24
6/34	27/33	3/82	15/00	10/00	3/00	25
(22/35)	40/66	4/22	15/00	15/00	3/00	26
	-18/00	2/46	15/00	20/00	3/00	27
	-6/66	2/80	15/00	30/00	3/00	28
	11/80	5/59	15/00	10/00	5/00	29
	-7/53	13/87	15/00	15/00	5/00	30
	29/80	6/49	15/00	20/00	5/00	31
	46/6	7/33	15/00	30/00	5/00	32
	19/00	8/33	15/00	10/00	7/00	33
	2/85	7/20	15/00	15/00	7/00	34
	7/42	7/52	15/00	20/00	7/00	35
	-3/14	6/78	15/00	30/00	7/00	36
	-8/40	10/84	15/00	10/00	10/00	37
	-4/66	14/30	15/00	15/00	10/00	38
	12/04	11/24	15/00	20/00	10/00	39
	13/01	11/31	15/00	30/00	10/00	40
	8/25	21/65	15/00	10/00	20/00	41
	6/55	21/31	15/00	15/00	20/00	42
	8/00	21/60	15/00	20/00	20/00	43
	-6/03	21/26	15/00	30/00	30/00	44
	12/56	33/77	15/00	10/00	30/00	45
	11/53	33/46	15/00	15/00	30/00	46
	4/46	31/34	15/00	20/00	30/00	47
	4/4	31/32	15/00	30/00	30/00	48
0/02	5/00	3/15	20/00	10/00	3/00	49
(1/42)	3/33	3/10	20/00	15/00	3/00	50
	-2/00	2/94	20/00	20/00	3/00	51
	2/66	3/08	20/00	30/00	3/00	52
	3/00	5/15	20/00	10/00	5/00	53

	۷/۳۰	۲۱/۴۶	۳۰/۰۰	۲۰/۰۰	۲۰/۰۰	۹۲
	۵/۶۰	۲۱/۱۲	۳۰/۰۰	۳۰/۰۰	۳۰/۰۰	۹۳
	۴/۴۰	۳۱/۳۲	۳۰/۰۰	۱۰/۰۰	۳۰/۰۰	۹۴
	۱/۲۳	۳۰/۳۷	۳۰/۰۰	۱۵/۰۰	۳۰/۰۰	۹۵
	۳/۷۶	۳۱/۱۳	۳۰/۰۰	۲۰/۰۰	۳۰/۰۰	۹۶
	۱/۴۳	۳۰/۴۳	۳۰/۰۰	۳۰/۰۰	۳۰/۰۰	۹۷

برای به دست آوردن غلظت استیل سالیسیلیک اسید در مخلوط‌های تهیه شده، ابتدا طیف‌های خالص مرتبه صفر محلول‌های آسکوربیک اسید به دست آمده از مرحله اول روش EXRSM (طیف‌های شکل ۳-۹) به طیف غلظت معینی از محلول آسکوربیک اسید (۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر) تقسیم شد. طیف‌های نسبی حاصل در دامنه ۲۴۵-۲۶۰ نانومتر دارای مقدار ثابتی متناظر با غلظت آسکوربیک اسید به موازات محور طول موج مطابق شکل ۳-۱۰ برای هر محلول می‌باشد.

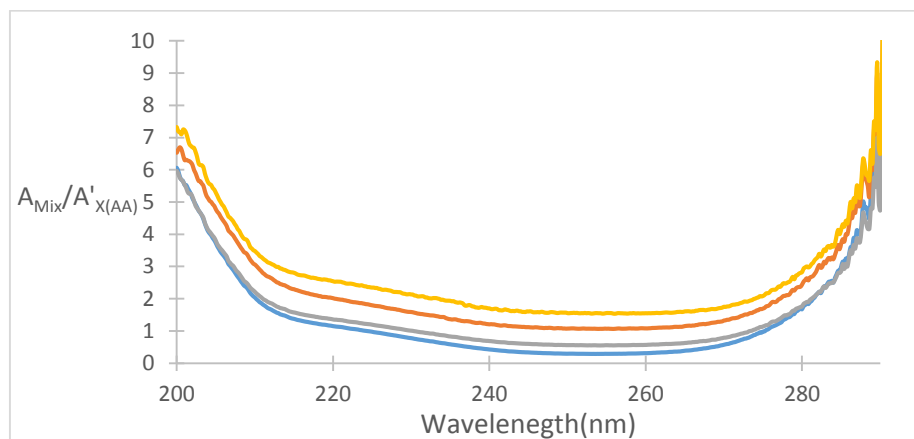


شکل ۳-۱۰: طیف‌های نسبی حاصل از تقسیم طیف‌های ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰، ۳۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر آسکوربیک اسید بر طیف محلول ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر آسکوربیک اسید (مقسوم علیه)

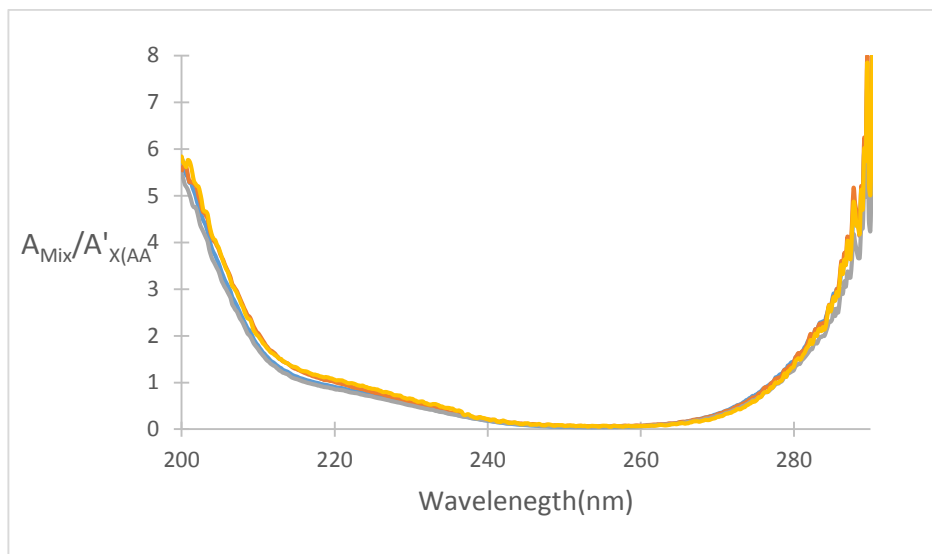
در شکل ۳-۱۰، بیانگر جذب طیف‌های خالص مرتبه صفر آسکوربیک اسید به دست آمده از مخلوط و $A'_x(AA)$ بیانگر جذب محلول آسکوربیک اسید با غلظت معین (به عنوان مقسوم علیه) است. مقادیر ثابت برای مخلوط‌ها به ترتیب ۰/۲۴۶، ۰/۵۰۲، ۱/۰۰، ۱/۴۷۷ به دست آمد. همچنین طیف مخلوط‌های سری ارزیابی (جدول ۳-۱۰) (مثلاً مخلوط‌های حاوی ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰، ۳۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر

آسکوربیک اسید و ۱۰/۰۰ میلی گرم برلیتر استیل سالیسیلیک اسید) بر طیف محلول آسکوربیک اسید با غلظت معین که به عنوان مقسوم علیه استفاده شد (۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر) تقسیم گردید (شکل ۳-۱۱). سپس مقدار ثابت حاصل از هر طیف نسبی آسکوربیک اسید خالص مرتبه صفر (شکل ۳-۱۰) از طیف نسبی مخلوط متناظر آن (شکل ۳-۱۱) کسر گردید که شکل ۳-۱۲ به دست آمد.

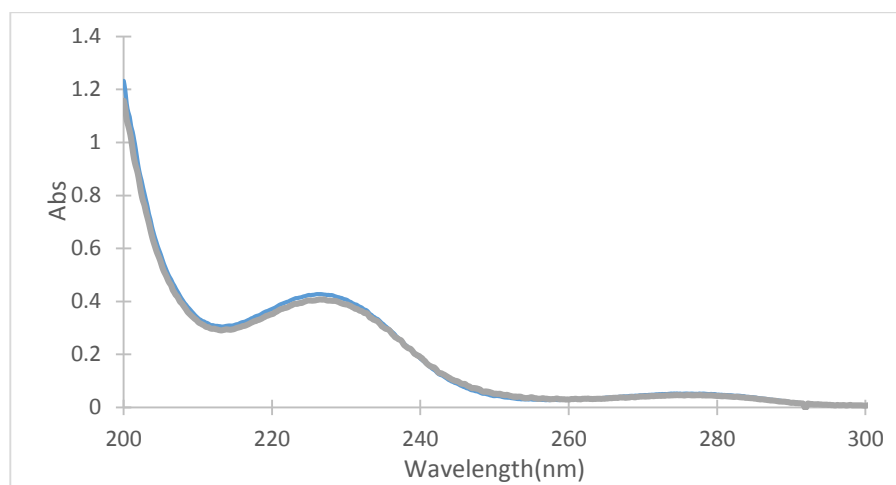
در مرحله بعد طیف های نسبی حاصل از مرحله قبل (شکل ۳-۱۲) در طیف محلول آسکوربیک اسید با غلظت معلوم به عنوان مقسوم علیه (۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر) ضرب گردید تا طیف های خالص استیل سالیسیلیک اسید در هر مخلوط به دست آید (شکل ۳-۱۳).



شکل ۳-۱۱: طیف های نسبی حاصل از تقسیم مخلوط های حاوی ۳۰/۰۰، ۲۰/۰۰، ۱۰/۰۰، ۵/۰۰ و ۱۰/۰۰ میلی گرم برلیتر آسکوربیک اسید و ۱۰/۰۰ میلی گرم برلیتر استیل سالیسیلیک اسید بر طیف ۲۰/۰۰ میلی گرم برلیتر آسکوربیک اسید (مقسوم علیه)



شکل ۳-۱۲: طیف‌های نسبی حاصل از تقسیم مخلوط‌های حاوی ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰، ۳۰/۰۰ میلی گرم برلیتر آسکوربیک اسید و ۱۰/۰۰ میلی گرم برلیتر استیل سالیسیلیک اسید بر طیف ۲۰/۰۰ میلی گرم برلیتر آسکوربیک اسید (مقسوم‌علیه) بعد از کم کردن مقدار ثابت



شکل ۳-۱۳: طیف‌های جذبی مرتبه صفر غلظت ۱۰/۰۰ میلی گرم استیل سالیسیلیک اسید بعد از ضرب کردن طیف‌های متناظر آن در شکل ۳-۱۲ در طیف محلول ۲۰/۰۰ میلی گرم برلیتر آسکوربیک اسید (مقسوم‌علیه)

با استفاده از طیف‌های خالص مرتبه صفر به دست آمده، جذب در طول موج ماکزیمم استیل سالیسیلیک اسید اندازه‌گیری شد و در منحنی کالیبراسیون استیل سالیسیلیک اسید (که از رسم جذب در طول موج ماکزیمم بر حسب غلظت استیل سالیسیلیک اسید رسم گردید) قرار داده شد (شکل ۳-۵، الف) و غلظت استیل سالیسیلیک اسید در هر مخلوط به دست آمد.

در روش EXRSM تاثیر غلظت آسکوربیک اسید به عنوان مقسوم علیه، بر خطای حاصل از پیش‌بینی غلظت استیل سالیسیلیک اسید بررسی شد. بهینه‌سازی غلظت مقسوم علیه آسکوربیک اسید مانند بهینه‌سازی غلظت مقسوم علیه استیل سالیسیلیک اسید صورت گرفت. غلظت استیل سالیسیلیک اسید در هر مخلوط با استفاده از غلظت‌های مختلف آسکوربیک اسید (به عنوان مقسوم علیه) محاسبه گردید. برای انتخاب غلظت آسکوربیک اسید به عنوان مقسوم علیه بهینه، میانگین مربع خطا و میانگین خطای نسبی (MSE و MRE) برای اندازه‌گیری غلظت استیل سالیسیلیک اسید برای سری ارزیابی محاسبه گردید و نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۱۱-۳ آورده شده است.

جدول ۱۱-۳: نتایج حاصل از بهینه‌سازی غلظت آسکوربیک اسید به عنوان مقسوم علیه در پیش‌بینی غلظت دو گونه در روش EXRSM برای سری ارزیابی

غلظت AA به عنوان مقسوم علیه (mg/L)	خطا (MSE) در پیش‌بینی غلظت (mg/L) ASA	خطا (MRE) در پیش‌بینی غلظت (mg/L) ASA
۱۰/۰۰	۱/۳۴	۱/۰۱
۱۵/۰۰	۰/۹۳۴۰	۰/۶۹۵۴
۲۰/۰۰	۰/۱۲۷۲	۰/۱۴۴
۳۰/۰۰	۰/۶۱۹۱	۰/۷۶۵۳

نتایج حاصل از جدول ۱۱-۳ نشان می‌دهد که تغییر غلظت آسکوربیک اسید به عنوان مقسوم علیه، بر خطای حاصل از پیش‌بینی غلظت استیل سالیسیلیک اسید موجود در مخلوط‌های سری ارزیابی موثر می‌باشد. بنابراین غلظت ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از آسکوربیک اسید به عنوان مقسوم علیه بهینه در مرحله دوم روش EXRSM انتخاب شد و در ادامه بررسی‌ها استفاده گردید. همچنین نتایج حاصل از به‌کار بردن روش EXRSM برای پیش‌بینی غلظت آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید موجود در محلول‌های سری تست، در جدول ۱۲-۳ آورده شده است. لازم به ذکر است در به‌دست آوردن غلظت محلول‌های سری تست، غلظت ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آسکوربیک اسید و ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر استیل سالیسیلیک اسید،

به عنوان مقسوم‌علیه بهینه به کار برده شد.

جدول ۳-۱۲: نتایج حاصل از روش EXRSM در پیش‌بینی غلظت دو گونه در مخلوط‌های سری تست

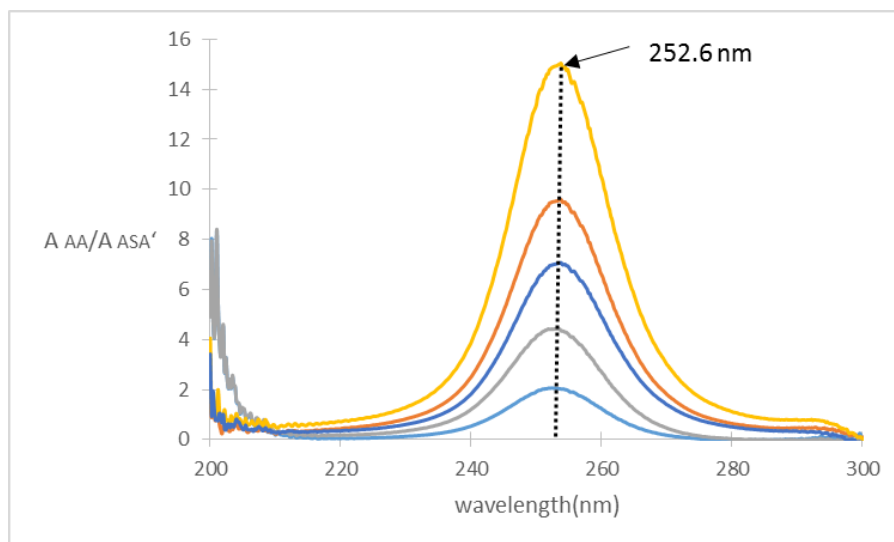
خطای نسبی (%)		غلظت پیش‌بینی شده (mg/L)		غلظت واقعی (mg/L)		محلول
ASA	AA	ASA	AA	ASA	AA	
-۰/۴۶	۱/۰۰	۲۹/۸۶	۲/۰۲	۳۰/۰۰	۲/۰۰	۱
-۰/۴۰	-۰/۴۰	۹/۹۶	۱/۹۲	۱۰/۰۰	۲/۰۰	۲
-۰/۸۶	-۰/۴۰	۱۴/۸۷	۱۴/۹۴	۱۵/۰۰	۱۵/۰۰	۳
۰/۸۳	-۰/۷۵	۱۲/۱۰	۱۲/۰۹	۱۲/۰۰	۱۲/۰۰	۴
۰/۵۰	۱/۳۳	۱۰/۰۵	۹/۱۲	۱۰/۰۰	۹/۰۰	۵
-۰/۴	۰/۴۰	۱۹/۹۲	۲۵/۱۰	۲۰/۰۰	۲۵/۰۰	۶
۰/۰۷	-۰/۳۵	۲۸/۰۲	۲۷/۹۰	۲۸/۰۰	۲۸/۰۰	۷
۱/۰۴	-۱/۳۳	۱۵/۲۱	۲/۹۶	۱۵/۰۰	۳/۰۰	۸

۳-۱۲- کاربرد روش کم کردن نسبی همزمان (SRSM) در تعیین غلظت آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید

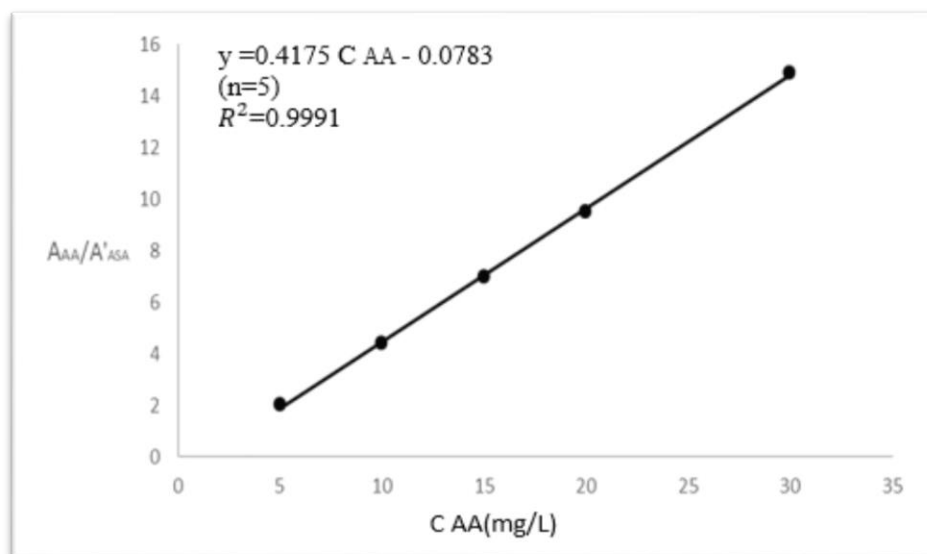
روش اسپکتروفتومتری دیگری که برای اندازه‌گیری همزمان آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید به کار برده شد، روش اندازه‌گیری همزمان با کم کردن نسبی همزمان (SRSM) بود. در این روش هم دو سری مخلوط ارزیابی و تست مورد استفاده قرار گرفت. در این روش طیف تعدادی از مخلوط‌های سری ارزیابی (شکل ۳-۶) بر طیف غلظت معینی (۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) از استیل‌سالیسیلیک اسید (به عنوان مقسوم‌علیه) تقسیم شد. پس از تقسیم کردن طیف مخلوط‌ها بر طیف مقسوم‌علیه، مقدار ثابت برای هر مخلوط در دامنه ۲۹۰-۲۸۲ نانومتر به دست آمد (شکل ۳-۷). سپس این مقدار ثابت به دست آمده از هر مخلوط، از طیف نسبی همان مخلوط کسر گردید. (شکل ۳-۸)

بعد از انجام مراحل فوق، جذب در طول موج ماکزیمم طیف نسبی حاصل (۲۵۲/۶ نانومتر) در شکل ۳-۹) برای هر مخلوط، اندازه‌گیری شد و در معادله کالیبراسیون مربوط قرار داده شد و غلظت آسکوربیک اسید محاسبه گردید. برای رسم معادله کالیبراسیون آسکوربیک اسید به این صورت عمل شد که؛ طیف‌های خالص

استاندارد آسکوربیک اسید با غلظت‌های ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰، ۳۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بر طیف غلظت مشخصی (۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) از استیل‌سالیسیلیک اسید (به عنوان مقسوم علیه) تقسیم گردید شکل (۳-۱۴). سپس مقدار جذب نسبی طیف‌های حاصل در طول موج ۲۵۲/۶ نانومتر (طول موج ماکزیمم نسبی) در هر محلول بر حسب غلظت متناظر آسکوربیک اسید رسم گردید که منحنی کالیبراسیون آسکوربیک اسید در شکل ۳-۱۵ نشان داده شده است.

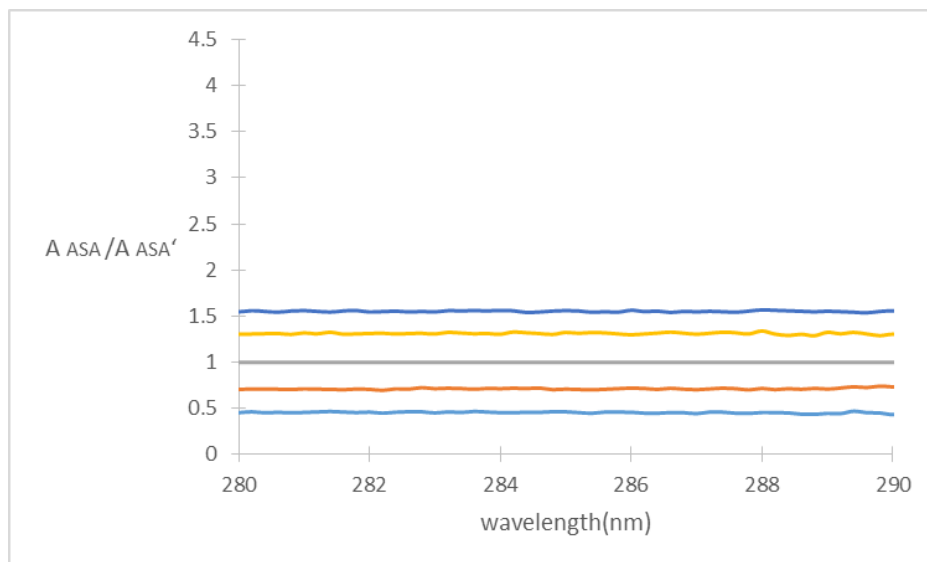


شکل ۳-۱۴: طیف‌های نسبی حاصل از تقسیم طیف محلول‌های ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۱۵/۰۰، ۲۰/۰۰، ۳۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آسکوربیک اسید بر طیف ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر استیل‌سالیسیلیک اسید (به عنوان مقسوم علیه)

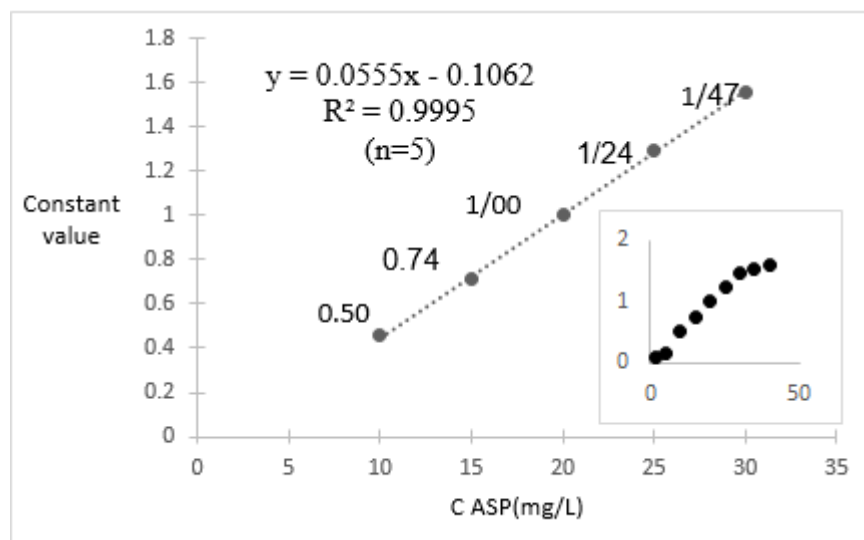


شکل ۳-۱۵: منحنی کالیبراسیون آسکوربیک اسید در شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی لیتر بافر سیترات با pH=۲/۵ در طول موج ۲۵۲/۶ نانومتر برای روش SRSM

برای به دست آوردن غلظت استیل سالیسیلیک اسید در هر مخلوط به این ترتیب عمل شد که؛ مقدار ثابت به دست آمده برای هر مخلوط در مرحله تعیین غلظت آسکوربیک اسید (شکل ۳-۶)، در نمودار کالیبراسیون مربوط قرار داده شد و غلظت استیل سالیسیلیک اسید از طریق آن محاسبه گردید. معادله کالیبراسیون تعیین غلظت استیل سالیسیلیک اسید در روش SRSM به این صورت به دست آمد که طیف محلول های خالص استاندارد استیل سالیسیلیک اسید با غلظت های متفاوت به غلظت مشخصی از استیل سالیسیلیک اسید (۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر که به عنوان مقسوم علیه از آن استفاده شد) تقسیم گردید که مشاهده شد در محدوده ۲۸۵-۲۹۵ نانومتر ثابت متناسب با غلظت استیل سالیسیلیک اسید می باشد (شکل ۳-۱۶). سپس از رسم ثابت های به دست آمده بر حسب غلظت متناظرشان، معادله کالیبراسیون مربوط به استیل-سالیسیلیک اسید در روش SRSM به دست آمد. که نتایج حاصل از رسم منحنی کالیبراسیون استیل-سالیسیلیک اسید در شکل (۳-۱۷) آورده شده است.



شکل ۳-۱۶: طیف نسبی حاصل از تقسیم طیف محلول‌های ۱۰/۱۰۰، ۱۵/۱۰۰، ۲۰/۱۰۰، ۲۵/۱۰۰، ۳۰/۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر استیل-سالیسیلیک اسید بر طیف محلول ۲۰/۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر استیل-سالیسیلیک اسید (به عنوان مقسوم‌علیه)



شکل ۳-۱۷: منحنی کالیبراسیون استیل-سالیسیلیک اسید در شرایط بهینه: ۲۰/۱۰۰ میلی‌لیتر بافر سیتراتی با pH=۲/۵ برای روش SRSM

لازم به ذکر است که بهینه‌سازی مقسوم‌علیه استیل-سالیسیلیک اسید هم مثل روش EXRSM انجام شد و غلظت ۲۰/۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر استیل-سالیسیلیک اسید به عنوان غلظت بهینه مقسوم‌علیه روش

SRSM طبق نتایج جدول ۳-۱۳ به دست آمد. روش SRSM بر روی مخلوط‌های سری ارزیابی و سری تست انجام شد و به ترتیب نتایج جدول‌های ۳-۱۴ و ۳-۱۵ به دست آمد.

جدول ۳-۱۳: نتایج حاصل از بهینه سازی غلظت استیل‌سالسیسیلیک اسید به عنوان مقسوم علیه در روش SRSM برای سری ارزیابی

خطا در پیش‌بینی غلظت ASA (mg/L)		خطا در پیش‌بینی غلظت AA (mg/L)		غلظت ASA به عنوان مقسوم علیه (mg/L)
MRE	MSE	MRE	MSE	
۹/۷۱	۰/۷۴۶۲	۵/۰۷	۰/۸۳۴۱	۱۰/۰۰
۷/۷۹	۰/۴۴۹۰	۵/۲۸	۹/۲۱	۱۵/۰۰
۰/۵۴۷	۰/۰۲۷	۱/۱۸	۰/۰۱۱	۲۰/۰۰
۱۱/۷۳	۱/۰۶	۶/۴۵	۵/۸۸	۳۰/۰۰

جدول ۳-۱۴: نتایج حاصل از روش SRSM در پیش‌بینی غلظت دو گونه در مخلوط‌های سری ارزیابی

خطای نسبی (%)	غلظت پیش‌بینی شده (mg/L)		غلظت واقعی (mg/L)		محلول
	ASA	AA	ASA	AA	
۰/۰	۱/۳۳	۱۰/۰۰	۳/۰۴	۱۰/۰۰	۱
۰/۶۶	۳/۳۳	۱۵/۱۰	۳/۱۰	۱۵/۰۰	۲
۰/۱۰	-۳/۰۰	۲۰/۰۲	۲/۹۱	۲۰/۰۰	۳
-۰/۱۶	۴/۰۰	۲۹/۹۵	۳/۱۲	۳۰/۰۰	۴
۰/۴	۳/۶	۹/۹۶	۵/۰۲	۱۰/۰۰	۵
-۱/۳۳	۱/۰۴	۱۴/۸۰	۵/۲۴	۱۵/۰۰	۶
۱/۵۰	۰/۰۰	۲۰/۳۰	۵/۰۰	۲۰/۰۰	۷
-۰/۴۶	۰/۶	۲۹/۸۶	۵/۰۳	۳۰/۰۰	۸
۰/۹	-۰/۵۷	۱۰/۰۹	۶/۹۶	۱۰/۰۰	۹
۰/۱۳	-۱/۱۴	۱۵/۰۲	۶/۹۲	۱۵/۰۰	۱۰
۰/۸۰	-۰/۴۲	۲۰/۱۶	۶/۹۷	۲۰/۰۰	۱۱
۰/۰۰	۱/۴۲	۳۰/۰۰	۷/۱۰	۳۰/۰۰	۱۲
-۱/۱	۰/۱۰	۹/۸۹	۱۰/۰۱	۱۰/۰۰	۱۳
۰/۷۳	۰/۶	۱۵/۱۱	۱۰/۰۶	۱۵/۰۰	۱۴
۰/۳۵	-۰/۷۰	۲۰/۰۷	۹/۹۳	۲۰/۰۰	۱۵
-۰/۶۵	-۱/۱	۲۹/۸۳	۹/۸۹	۳۰/۰۰	۱۶
۱/۰۰	-۰/۵۵	۱۰/۰۱	۱۹/۸۹	۱۰/۰۰	۱۷
-۰/۴۶	-۰/۵	۱۴/۹۳	۱۹/۹۰	۱۵/۰۰	۱۸
۰/۱۵	۰/۶۵	۲۰/۰۳	۲۰/۱۳	۲۰/۰۰	۱۹
-۰/۶۳	-۰/۱۵	۲۹/۸۹	۱۹/۹۷	۳۰/۰۰	۲۰
-۰/۹۰	۰/۷۶	۹/۹۱	۳۰/۲۳	۱۰/۰۰	۲۱
-۰/۶۴	-۰/۳۳	۱۴/۹۳	۲۹/۹۰	۱۵/۰۰	۲۲
۰/۱۵	۰/۵۳	۲۰/۰۳	۳۰/۱۶	۲۰/۰۰	۲۳
۰/۰۰	-۰/۱	۳۰/۰۰	۲۹/۹۷	۳۰/۰۰	۲۴

جدول ۳-۱۵: نتایج حاصل از روش SRSM در پیش بینی غلظت دو گونه در مخلوط‌های سری تست

خطای نسبی (%)		غلظت پیش‌بینی شده (mg L ⁻¹)		غلظت واقعی (mg L ⁻¹)		محلول
ASA	AA	ASA	AA	ASA	AA	
-۰/۱۶	۲/۵۰	۲۹/۹۵	۲/۰۵	۳۰/۰۰	۲/۰۰	۱
۰/۰	-۲/۵۰	۱۰/۰۰	۱/۹۵	۱۰/۰۰	۲/۰۰	۲
-۰/۴۶	-۱/۰۰	۱۴/۹۳	۱۵/۱۵	۱۵/۰۰	۱۵/۰۰	۳
۰/۱۶	۰/۵۸	۱۲/۰۲	۱۲/۰۷	۱۲/۰۰	۱۲/۰۰	۴
۱/۱	-۱/۳۳	۱۰/۱۱	۸/۸۸	۱۰/۰۰	۹/۰۰	۵
-۰/۸۰	-۰/۲۸	۱۹/۸۴	۲۴/۹۳	۲۰/۰۰	۲۵/۰۰	۶
۰/۶۷	۰/۱۰	۲۸/۱۹	۲۸/۰۳	۲۸/۰۰	۲۸/۰۰	۷
۱/۸	-۲/۳۳	۱۵/۲۷	۲/۹۳	۱۵/۰۰	۳/۰۰	۸

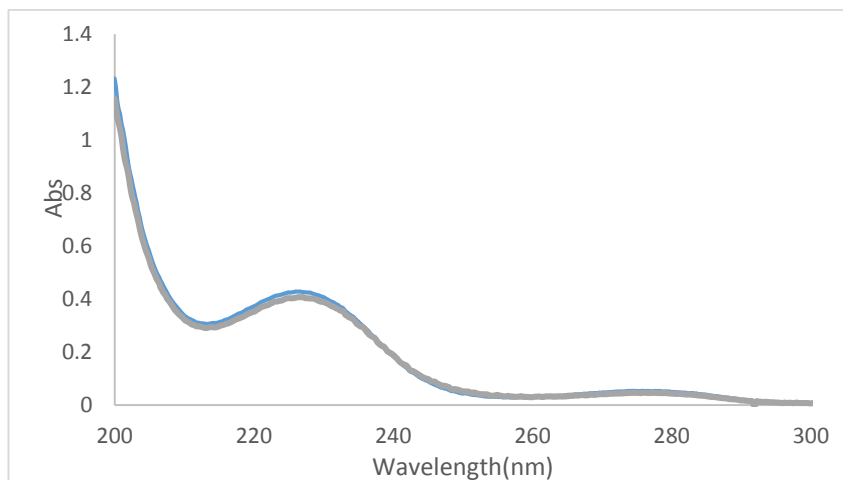
۳-۱۳- کاربرد روش کم‌کردن نسبی همزمان همراه با ضرب کردن مقدار ثابت (SRS-CM) در تعیین غلظت آسکوربیک اسید و استیل-سالیسیلیک اسید

روش اسپکتروفتومتری دیگری که برای اندازه‌گیری همزمان آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید به کار برده شد، روش کم‌کردن نسبی همزمان به همراه ضرب کردن ثابت (SRS-CM) است. در این روش هم دو سری مخلوط ارزیابی و تست مورد استفاده قرار گرفت. مرحله اول این روش یعنی به دست آوردن غلظت آسکوربیک اسید مانند روش SRSM می‌باشد. در این روش طیف مخلوط‌ها و طیف محلول‌های خالص استاندارد آسکوربیک اسید بر طیف غلظت معینی (۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) از استیل‌سالیسیلیک اسید (به عنوان مقسوم علیه) تقسیم شد. پس از تقسیم کردن طیف مخلوط‌ها بر طیف مقسوم علیه، مقدار ثابت برای هر مخلوط در دامنه ۲۸۲-۲۹۰ نانومتر به دست آمد، (شکل ۳-۷). سپس این مقدار ثابت به دست آمده از هر مخلوط از طیف نسبی همان مخلوط کسر گردید، (شکل ۳-۸).

بعد از انجام مراحل فوق، جذب در طول موج ماکزیمم طیف نسبی حاصل (۲۵۲/۶ نانومتر) در شکل ۳-۳-۸ برای هر مخلوط، اندازه‌گیری شد و در معادله کالیبراسیون مربوط قرار داده شد و غلظت آسکوربیک اسید محاسبه گردید. برای رسم معادله کالیبراسیون آسکوربیک اسید به این صورت عمل شد که؛ طیف‌های خالص آسکوربیک اسید با غلظت‌های متفاوت بر طیف غلظت مشخصی از استیل‌سالیسیلیک اسید (۲۰/۰۰ میلی-گرم بر لیتر به عنوان مقسوم علیه) تقسیم گردید و سپس مقدار جذب نسبی طیف‌های حاصل در طول موج ۲۵۲/۶ نانومتر (طول موج ماکزیمم نسبی) در هر محلول بر حسب غلظت متناظر آسکوربیک اسید رسم گردید. (شکل ۳-۹)

برای به دست آوردن غلظت استیل‌سالیسیلیک اسید در هر مخلوط هم به این صورت عمل شد که؛ مقدار ثابت به دست آمده در مرحله محاسبه غلظت آسکوربیک اسید در هر مخلوط (شکل ۳-۷) در طیف استیل-سالیسیلیک اسید با غلظت معین (طیف ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر که به عنوان مقسوم علیه استفاده شد) ضرب گردید و طیف خالص استیل‌سالیسیلیک اسید در هر مخلوط به دست آمد، (شکل ۳-۱۸). با استفاده از طیف‌های خالص مرتبه صفر به دست آمده، جذب در طول موج ماکزیمم استیل‌سالیسیلیک اسید اندازه‌گیری شد و در منحنی کالیبراسیون استیل‌سالیسیلیک اسید (که از رسم جذب در طول موج ماکزیمم بر حسب غلظت استیل‌سالیسیلیک اسید رسم شده بود) قرار داده شد (شکل ۳-۵، الف) و غلظت استیل‌سالیسیلیک اسید در هر مخلوط به دست آمد.

لازم به ذکر است که بهینه سازی مقسوم علیه استیل‌سالیسیلیک اسید هم مثل روش SRS-M انجام شد و غلظت ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر استیل‌سالیسیلیک اسید به عنوان غلظت بهینه مقسوم علیه روش SRS-CM طبق نتایج جدول ۳-۱۶ به دست آمد. همچنین نتایج حاصل از به کار بردن روش SRS-CM برای پیش‌بینی غلظت آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید موجود در محلول‌های سری ارزیابی و تست، به ترتیب در جدول‌های ۳-۱۷ و ۳-۱۸ آورده شده است.



شکل ۳-۱۸: طیف‌های جذبی مرتبه صفر غلظت ۱۰/۰۰ میلی گرم استیل سالیسیلیک اسید بعد از ضرب کردن ثابت های متناظر استیل سالیسیلیک اسید در مخلوط ها (شکل ۳-۸) در طیف محلول ۲۰/۰۰ میلی گرم برلیتر استیل سالیسیلیک اسید (به عنوان مقسوم- علیه)

جدول ۳-۱۶: نتایج حاصل از بهینه سازی غلظت استیل سالیسیلیک اسید به عنوان مقسوم علیه در روش SRS-CM

خطا در پیش‌بینی غلظت ASA (mg/L)		خطا در پیش‌بینی غلظت AA (mg/L)		غلظت ASA به عنوان مقسوم علیه (mg/L)
MRE	MSE	MRE	MSE	
۸/۷۷	۵/۰۲	۵/۰۷	۰/۸۳۴۱	۱۰/۰۰
۶/۹۷	۹/۰۶	۵/۲۸	۹/۲۱	۱۵/۰۰
۰/۵۷۷۰	۰/۰۳۶۰	۱/۱۸	۰/۰۱۱۰	۲۰/۰۰
۱/۳۱	۹/۸۲	۶/۴۵	۵/۸۸	۳۰/۰۰

۳-۱۴- کاربرد روش مرکز ثابت همراه با کم کردن طیفی (CC-SS) برای تعیین غلظت آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید

روش اسپکتروفتومتری دیگری که برای اندازه‌گیری همزمان آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید به کار برده شد، روش مرکز ثابت همراه با کم کردن طیفی (CC-SS) است. در این روش هم مخلوط‌های سری ارزیابی و تست مورد استفاده قرار گرفت. به این منظور طیف محلول‌های استاندارد خالص ۱۰/۰۰، ۱۵/۰۰، ۲۰/۰۰، ۳۰/۰۰ میلی گرم برلیتر استیل سالیسیلیک اسید بر طیف محلول آسکوربیک اسید با غلظت مشخصی (۲۰/۰۰ میلی گرم برلیتر) به عنوان مقسوم‌علیه تقسیم گردید. (شکل ۳-۱۹).

جدول ۳-۱۷: نتایج حاصل از روش SRS-CM در پیش بینی غلظت دو گونه در مخلوط‌های سری ارزیابی

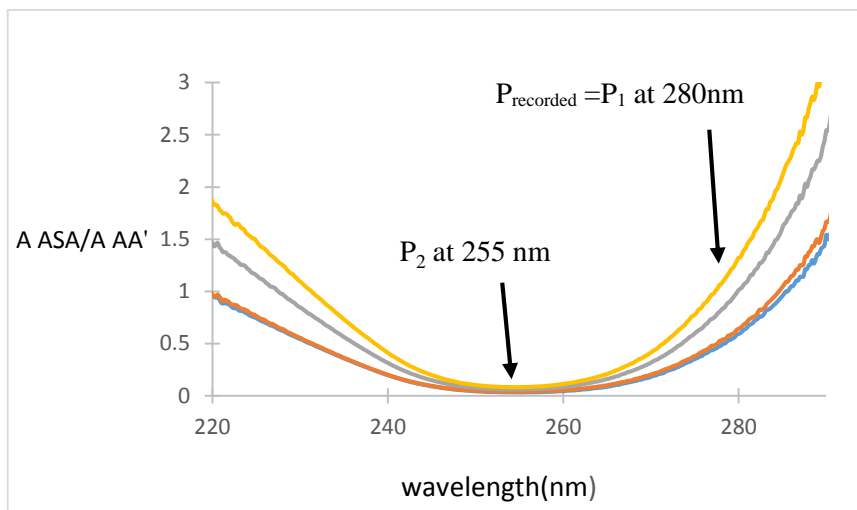
محلول	غلظت واقعی (mg/L)		غلظت پیش‌بینی شده (mg/L)		خطای نسبی (%)	
	ASA	AA	ASA	AA	ASA	AA
۱	۱۰/۰۰	۳/۰۰	۱۰/۰۰	۳/۰۴	۰/۰۰	۱/۳۳
۲	۱۵/۰۰	۳/۰۰	۱۵/۱۶	۳/۱۰	۱/۰۶	۳/۳۳
۳	۲۰/۰۰	۳/۰۰	۱۹/۸۱	۲/۹۱	-۰/۹۵	-۳/۰۰
۴	۳۰/۰۰	۳/۰۰	۳۰/۰۰	۳/۱۲	۰/۰۰	۴/۰۰
۵	۱۰/۰۰	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۵/۰۲	۰/۰۰	۳/۶
۶	۱۵/۰۰	۵/۰۰	۱۵/۱۰	۵/۲۴	۰/۶۶	۱/۰۴
۷	۲۰/۰۰	۵/۰۰	۲۰/۱۰	۵/۰۰	۰/۵۰	۰/۰۰
۸	۳۰/۰۰	۵/۰۰	۲۹/۸۶	۵/۰۳	-۰/۴۶	-۰/۶
۹	۱۰/۰۰	۷/۰۰	۱۰/۱۲	۶/۹۶	۱/۲	-۰/۵۷
۱۰	۱۵/۰۰	۷/۰۰	۱۵/۰۱	۶/۹۲	۰/۶۶	-۱/۱۴
۱۱	۲۰/۰۰	۷/۰۰	۲۰/۱۸	۶/۹۷	۰/۹۰	-۰/۴۲
۱۲	۳۰/۰۰	۷/۰۰	۳۰/۰۰	۷/۱۰	۰/۰۰	۱/۴۲
۱۳	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۹/۸۹	۱۰/۰۱	۵/۸۰	۰/۱۰
۱۴	۱۵/۰۰	۱۰/۰۰	۱۵/۱۱	۱۰/۰۶	۰/۷۳	-۰/۶
۱۵	۲۰/۰۰	۱۰/۰۰	۲۰/۰۲	۹/۹۳	۰/۱۰	-۰/۷۰
۱۶	۳۰/۰۰	۱۰/۰۰	۲۹/۳۶	۹/۸۹	-۲/۱۳	-۱/۱
۱۷	۱۰/۰۰	۲۰/۰۰	۱۰/۰۱	۱۹/۸۹	۰/۱۰	-۰/۵۵
۱۸	۱۵/۰۰	۲۰/۰۰	۱۴/۸۴	۱۹/۹۰	-۱/۰۶	-۰/۵
۱۹	۲۰/۰۰	۲۰/۰۰	۱۹/۹۳	۲۰/۱۳	-۰/۳۵	۰/۶۵
۲۰	۳۰/۰۰	۲۰/۰۰	۳۰/۵۰	۱۹/۹۷	۱/۶۶	-۰/۱۵
۲۱	۱۰/۰۰	۳۰/۰۰	۱۰/۰۰	۳۰/۲۳	۰/۰۰	۰/۷۶
۲۲	۱۵/۰۰	۳۰/۰۰	۱۵/۰۱	۲۹/۹۰	۰/۰۶	-۰/۳۳
۲۳	۲۰/۰۰	۳۰/۰۰	۲۰/۱۳	۳۰/۱۶	۰/۵۳	۰/۵۳
۲۴	۳۰/۰۰	۳۰/۰۰	۳۰/۰۲	۲۹/۹۷	-۰/۱	-۰/۱

سپس طول موج‌های ۲۸۰ و ۲۵۵ نانومتر به ترتیب به عنوان طول موج برای اندازه‌گیری دامنه جذب نسبی

P_1 و P_2 انتخاب گردید. مقدار دامنه‌های نسبی $P_1 = \left(\frac{\varepsilon_{ASA} C_{ASA}}{\varepsilon_{AA} C_{AA}} \right)_1$ و $P_2 = \left(\frac{\varepsilon_{ASA} C_{ASA}}{\varepsilon_{AA} C_{AA}} \right)_2$ به ترتیب در

۲۸۰ و ۲۵۵ نانومتر برای هر غلظت اندازه گرفته شد و از هم کم گردید، و این اختلاف دامنه‌ها بر

حسب $P_1 = \left(\frac{\varepsilon_{ASA} C_{ASA}}{\varepsilon_{AA} C_{AA}} \right)_1$ رسم گردید (شکل ۳-۲۰ و جدول ۳-۱۹).



شکل ۳-۱۹: طیف‌های نسبی حاصل از تقسیم محلول‌های ۱۰/۰۰، ۱۵/۰۰، ۲۰/۰۰، ۳۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر استیل‌سالیسیلیک-اسید بر طیف ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر آسکوربیک‌اسید (مقسوم علیه)

جدول ۳-۱۸: نتایج حاصل از اندازه‌گیری بزرگی دامنه‌ها در طیف‌های نسبی حاصل از شکل ۳-۱۹ در روش CC-SS

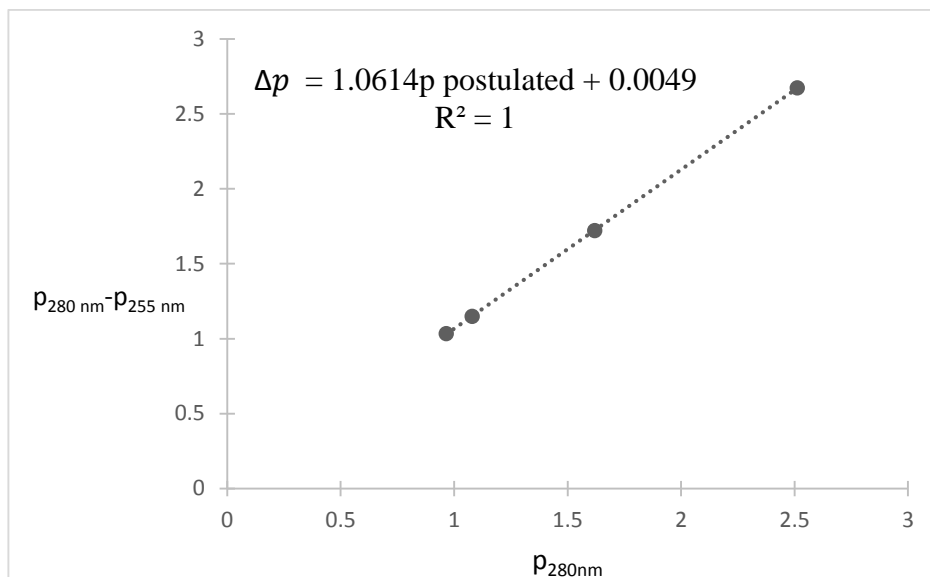
غلظت ASP (mg/L)	بزرگی دامنه در ۲۵۵ نانومتر (P_2)	بزرگی دامنه در ۲۸۰ نانومتر (P_1)	اختلاف بزرگی دامنه ها ($\Delta p = P_1 - P_2$)
۱۰/۰۰	۰/۰۶۷	۱/۰۳	۰/۹۶۵
۱۵/۰۰	۰/۰۶۸	۱/۱۴	۱/۶۱
۲۰/۰۰	۰/۱۰۲	۲/۰۷	۱/۰۷
۳۰/۰۰	۰/۱۶۰	۲/۶۷	۲/۵۱

در معادله خط شکل فوق Δp اختلاف دو دامنه در طول موج های ۲۵۵ و ۲۸۰ نانومتر و $P_{(postulated)}$

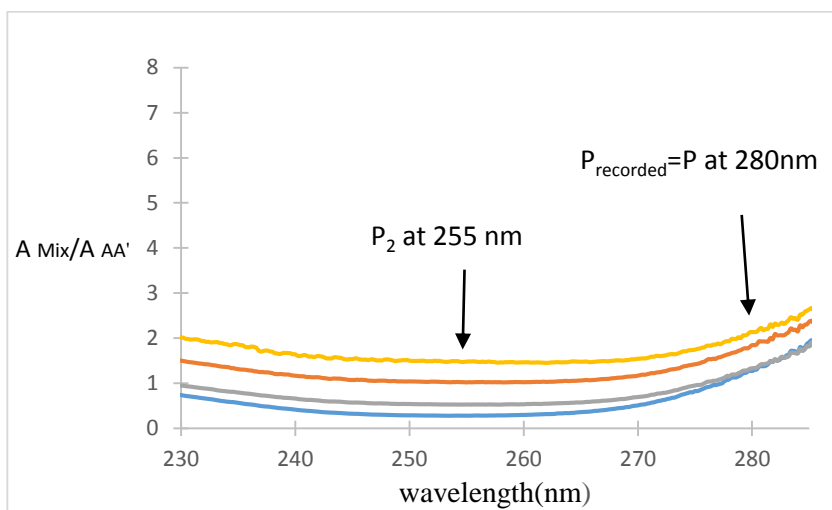
مقدار P پیش‌بینی شده $\left(P_{postulated} = \frac{\varepsilon_{ASA} C_{ASA}}{\varepsilon_{AA} C_{AA}} \right)$ که مربوط به گونه ASA است، می باشد.

سپس طیف تعدادی از مخلوط‌های سری ارزیابی بر طیف غلظت معینی (۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر) از

آسکوربیک اسید (به عنوان مقسوم‌علیه) تقسیم شد. (شکل ۳-۲۱)



شکل ۳-۲۰: نمودار حاصل از رسم اختلاف بزرگی دامنه های نسبی P_1 و P_2 به ترتیب در طول موج های ۲۸۰ و ۲۵۵ نانومتر بر حسب دامنه نسبی P_1 در طول موج ۲۸۰ نانومتر در روش CC-SS



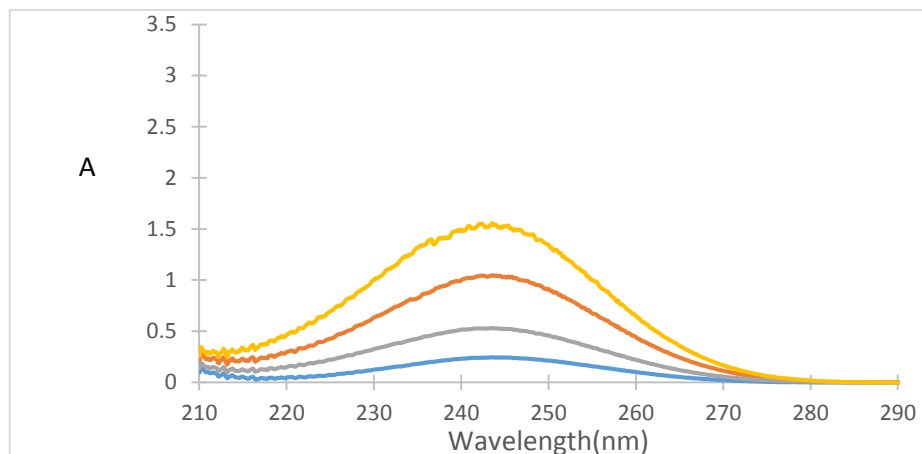
شکل ۳-۲۱: طیف تقسیم شده مخلوط های ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰، ۳۰/۰۰ میلی گرم برلیتر آسکوربیک اسید و ۱۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر استیل سالیسیلیک اسید بر طیف محلول ۲۰/۰۰ میلی گرم برلیتر آسکوربیک اسید به عنوان مقوم علیه

مقدار دامنه های P_1 و P_2 در هر مخلوط در طول موج های ۲۵۵ و ۲۸۰ نانومتر ثابت و از هم کم شدند و اختلاف آن ها (Δp_{Mix}) به دست آمد و در معادله مربوط (شکل ۳-۲۰) قرار داده شد و مقدار P پیش بینی شده ($P_{postulated}$) برای هر مخلوط به دست آمد. سپس از اختلاف مقدار دامنه ثابت شده در ۲۸۰ نانومتر برای هر مخلوط ($P_{recorded}$) و مقدار پیش بینی شده ($p_{postulated}$)، مقدار ثابت ($C.V$) برای هر مخلوط به

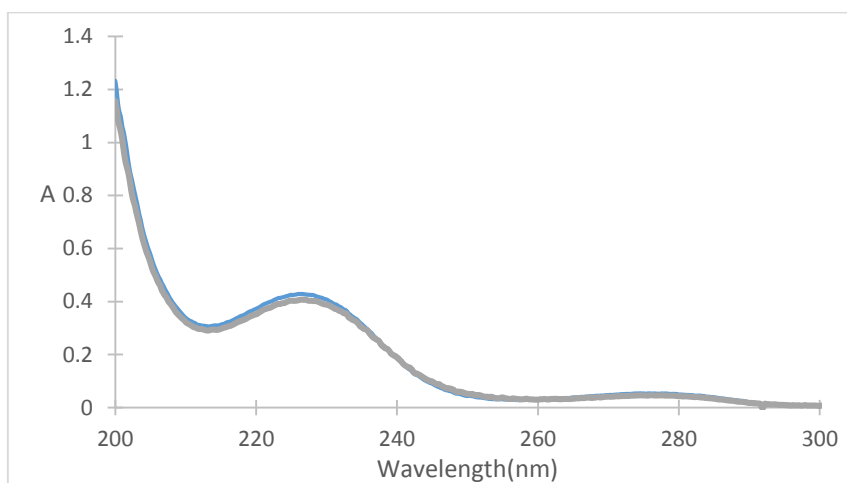
دست آمد. در مرحله آخر با ضرب مقدار ثابت به دست آمده از هر مخلوط در طیف محلول ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر آسکوربیک اسید که به عنوان مقسوم علیه استفاده شده بود، طیف مرتبه صفر آسکوربیک اسید مربوط به هر مخلوط به دست آمد (شکل ۳-۲۲)، که با اندازه گیری جذب آن در طول موج ماکزیمم (۲۴۳ نانومتر) و قرار دادن آن در معادله کالیبراسیون مربوط (شکل ۳-۵، ب)، غلظت آسکوربیک اسید در هر مخلوط به دست آمد.

برای به دست آوردن غلظت استیل سالیسیلیک اسید در هر مخلوط، طیف خالص آسکوربیک اسید به دست آمده از مرحله قبل از طیف مخلوط مجهول مورد نظر کم شد و طیف خالص استیل سالیسیلیک اسید برای هر مخلوط به دست آمد (شکل ۳-۲۳)، که با اندازه گیری جذب در طول موج ماکزیمم استیل-سالیسیلیک اسید (۲۷۵ نانومتر) و قرار دادن آن در معادله کالیبراسیون مربوط (شکل ۳-۵، الف) غلظت استیل سالیسیلیک اسید به دست آمد.

برای رسیدن به بهترین صحت در روش CC-SS باید غلظت آسکوربیک اسید به عنوان مقسوم علیه بهینه شود. برای این منظور غلظت آسکوربیک اسید به عنوان مقسوم علیه در دامنه ۱۰/۰۰ تا ۳۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر تغییر داده شد و روش CC-SS بر روی مخلوط های سری ارزیابی امتحان گردید و میانگین مربع خطا (MSE) و میانگین خطای نسبی (MRE) غلظت آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید برای این مخلوط ها محاسبه شد که طبق نتایج به دست آمده در جدول ۳-۲۱، مشاهده می شود که استفاده از غلظت ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر آسکوربیک اسید به عنوان مقسوم علیه در مرحله اول روش CC-SS، خطای کمتری را در نتایج گزارش شده از این روش نشان می دهد.



شکل ۳-۲۲: طیف‌های جذبی مرتبه صفر به دست آمده از ضرب کردن ثابت بدست آمده برای مخلوط‌های ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰، ۳۰/۰۰ میلی گرم برلیتر آسکوربیک اسید و ۱۰/۰۰ میلی گرم برلیتر استیل سالیسیلیک اسید در طیف محلول خالص ۲۰/۰۰ میلی گرم برلیتر آسکوربیک اسید (به عنوان مقسوم علیه)



شکل ۳-۲۳: طیف‌های جذبی مرتبه صفر استیل سالیسیلیک اسید حاصل از کم کردن از طیف‌های خالص آسکوربیک اسید به دست آمده برای هر مخلوط از طیف مخلوط‌های ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰، ۳۰/۰۰ میلی گرم برلیتر آسکوربیک اسید و ۱۰/۰۰ میلی گرم برلیتر استیل سالیسیلیک اسید

نتایج حاصل از روش CC-SS برای چند مخلوط انتخاب شده در جدول ۳-۲۰ آورده شده است.

جدول ۳-۱۹: نتایج حاصل از روش CC-SS برای مخلوط‌های انتخاب شده حاوی ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰، ۳۰/۰۰ میلی گرم برلیتر آسکوربیک اسید و ۱۰/۰۰ میلی گرم برلیتر استیل سالیسیلیک اسید

غلظت (mg/L)		اختلاف بزرگی دامنه‌ها در مخلوط (Δp_{mix})	مقدار ثبت شده ($P_{recorded}$)	مقدار پیش بینی شده ($p_{postulated}$)	مقدار ثابت ($C.V$)	غلظت پیش‌بینی شده (mg/L)		درصد خطای نسبی	
ASA	AA					AA	ASA	AA	ASA
۱۰/۰۰	۵/۰۰	۱/۰۳	۱/۲۲	۰/۹۶۵	۰/۲۵۵	۵/۰۳	۱۰/۲۰	۰/۶۰	۲/۰۰
۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۰/۸۴	۱/۳۰	۰/۷۸۶	۰/۵۳۴	۱۰/۰۱	۹/۹۳	۰/۱۰	-۰/۷
۱۰/۰۰	۲۰/۰۰	۰/۸۷	۱/۸۷	۰/۸۱۵	۱/۰۷	۲۰/۳۲	۱۰/۰۲	۱/۶۰	۰/۲۰
۱۰/۰۰	۳۰/۰۰	۰/۶۹	۲/۲۳	۰/۶۴۵	۱/۵۸	۲۹/۶۲	۹/۸۳	-۱/۲۶	-۱/۷

جدول ۳-۲۰: نتایج حاصل از بهینه‌سازی غلظت آسکوربیک اسید به عنوان مقسوم‌علیه در روش CC-SS

خطا در پیش‌بینی غلظت ASA		خطا در پیش‌بینی غلظت AA		غلظت AA به عنوان مقسوم‌علیه (mg/L)
MRE	MSE	MRE	MSE	
۶/۳۱	۱/۵۳	۵/۸۱	۱/۳۱	۱۰/۰۰
۱/۳۱	۰/۱۰۶	۱/۴۴	۰/۰۳۶	۲۰/۰۰
۲/۷۵	۱/۲۰	۲/۰۳	۰/۱۷	۳۰/۰۰

بنابراین در ادامه بررسی‌ها از غلظت ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر آسکوربیک اسید به عنوان مقسوم‌علیه بهینه استفاده شد. نتایج حاصل از به‌کار بردن روش CC-SS برای پیش‌بینی غلظت آسکوربیک اسید و استیل-سالیسیلیک اسید موجود در محلول‌های سری ارزیابی و تست، به ترتیب در جدول ۳-۲۲ و جدول ۳-۲۳ آورده شده است. لازم به‌ذکر است در به‌دست آوردن غلظت محلول‌های سری ارزیابی و تست، غلظت ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر آسکوربیک اسید، به عنوان مقسوم‌علیه بهینه به‌کار برده شد.

جدول ۳-۲۱: نتایج حاصل از روش CC-SS در پیش بینی غلظت دو گونه در مخلوط‌های سری ارزیابی

خطای نسبی (%)		غلظت پیش بینی شده (mg/L)		غلظت واقعی (mg/L)		محلول
استیل- سالیسیلیک اسید	آسکوربیک اسید	استیل سالیسیلیک اسید	آسکوربیک اسید	استیل سالیسیلیک اسید	آسکوربیک اسید	
-۱/۳	-۰/۳۳	۹/۸۷	۲/۹۹	۱۰/۰۰	۳/۰۰	۱
-۰/۷۳	۱/۶۰	۱۴/۸۹	۳/۰۵	۱۵/۰۰	۳/۰۰	۲
۰/۵۰	-۲/۳۳	۲۰/۱۰	۲/۹۳	۲۰/۰۰	۳/۰۰	۳
-۰/۳۶	۵/۰۰	۲۹/۸۹	۳/۱۵	۳۰/۰۰	۳/۰۰	۴
۲/۰۰	۰/۴۰	۱۰/۲۰	۵/۰۲	۱۰/۰۰	۵/۰۰	۵
۱/۰۰	۲/۸۰	۱۵/۱۵	۵/۱۴	۱۵/۰۰	۵/۰۰	۶
۰/۹۵	۱/۲۰	۲۰/۱۹	۵/۰۶	۲۰/۰۰	۵/۰۰	۷
۰/۰۶	-۵/۰۰	۳۰/۰۲	۴/۷۵	۳۰/۰۰	۵/۰۰	۸
۳/۵۰	-۲/۴۲	۱۰/۳۵	۶/۸۳	۱۰/۰۰	۷/۰۰	۹
۰/۰۶	۰/۷۱	۱۵/۰۱	۷/۰۵	۱۵/۰۰	۷/۰۰	۱۰
۴/۱۵	-۰/۸۵	۲۰/۸۳	۶/۹۴	۲۰/۰۰	۷/۰۰	۱۱
-۱/۶۶	۱/۷۱	۲۹/۵۰	۷/۱۲	۳۰/۰۰	۷/۰۰	۱۲
-۲/۰۰	-۰/۷۰	۹/۸۰	۹/۹۳	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۳
-۰/۸۰	۱/۱	۱۴/۸۸	۱۰/۱۱	۱۵/۰۰	۱۰/۰۰	۱۴
-۰/۹۰	۰/۲	۲۰/۱۸	۱۰/۰۲	۲۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۵
-۱/۳۶	-۱/۷۰	۲۹/۵۹	۹/۸۳	۳۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۶
۰/۶۰	-۰/۱۰	۱۰/۰۶	۱۹/۹۸	۱۰/۰۰	۲۰/۰۰	۱۷
-۲/۸۰	-۰/۱۰	۱۴/۵۸	۱۹/۹۸	۱۵/۰۰	۲۰/۰۰	۱۸
۱/۷۵	-۲/۲۰	۲۰/۳۵	۱۹/۵۶	۲۰/۰۰	۲۰/۰۰	۱۹
۰/۵۳	۱/۱۵	۳۰/۱۶	۲۰/۲۳	۳۰/۰۰	۲۰/۰۰	۲۰
۰/۰	-۰/۰۳	۱۰/۰۰	۲۹/۹۹	۱۰/۰۰	۳۰/۰۰	۲۱
۰/۶۰	-۰/۴۳	۱۵/۰۹	۲۹/۸۷	۱۵/۰۰	۳۰/۰۰	۲۲
-۰/۲۵	۰/۳۳	۱۹/۹۵	۳۰/۱۰	۲۰/۰۰	۳۰/۰۰	۲۳
-۱/۰۶	-۲/۰۶	۲۹/۶۸	۲۹/۳۸	۳۰/۰۰	۳۰/۰۰	۲۴

جدول ۳-۲۲: نتایج حاصل از روش CC-SS در پیش بینی غلظت دو گونه در مخلوط‌های سری تست

خطای نسبی (%)		غلظت پیش‌بینی شده (mg/L)		غلظت واقعی (mg/L)		محلول
ASA	AA	ASA	AA	ASA	AA	
۰/۴۰	۰/۰۰	۳۰/۱۲	۲/۰۰	۳۰/۰۰	۲/۰۰	۱
-۱/۳	۴/۵	۹/۸۷	۲/۰۹	۱۰/۰۰	۲/۰۰	۲
-۰/۸۶	-۲/۱۳	۱۴/۸۷	۱۵/۱۰	۱۵/۰۰	۱۵/۰۰	۳
-۰/۸۳	۲/۰۸	۱۱/۹۰	۱۲/۲۵	۱۲/۰۰	۱۲/۰۰	۴
۱/۸۰	-۱/۱۱	۱۰/۱۸	۸/۹۰	۱۰/۰۰	۹/۰۰	۵
۰/۷۵	۰/۶۰	۲۰/۱۵	۲۵/۱۵	۲۰/۰۰	۲۵/۰۰	۶
-۱/۷۸	-۱/۷۸	۲۷/۹۰	۲۷/۹۸	۲۸/۰۰	۲۸/۰۰	۷
۰/۰۸	۰/۶۶	۱۵/۱۰	۳/۰۲	۱۵/۰۰	۳/۰۰	۸

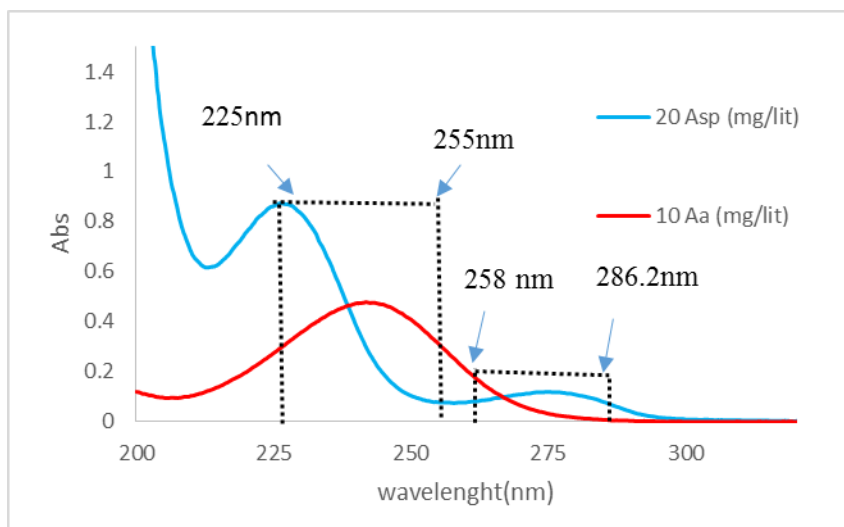
۳-۱۵- کاربرد روش اختلاف نسبی (RD) در تعیین غلظت آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید

روش اسپکتروفتومتری دیگری که برای اندازه‌گیری همزمان آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید به کار برده شد، روش اختلاف نسبی (RD) بود. در این روش هم دو سری مخلوط ارزیابی و تست مورد استفاده قرار گرفت. انتخاب طول موج در روش RD از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

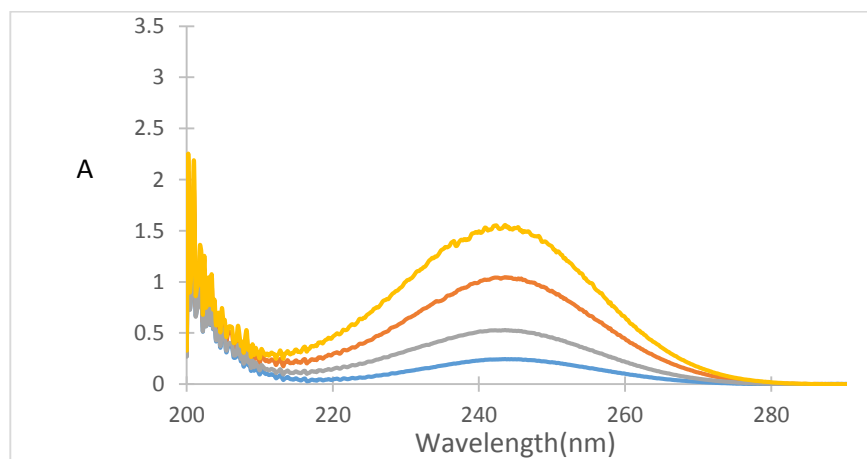
برای تعیین غلظت آسکوربیک اسید گام اول انتخاب طول موج مناسب است که به این منظور؛ ابتدا طیف محلول‌های استاندارد خالص ۱۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آسکوربیک اسید و ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر استیل‌سالیسیلیک اسید در شکل ۳-۲۴ آورده شده است. با توجه به شکل ۳-۲۴، طول موج‌های ۲۸۶/۲ و ۲۵۸ نانومتر به ترتیب به عنوان طول موج برای دامنه P_1 و P_2 به منظور تعیین غلظت آسکوربیک اسید انتخاب گردید. در این طول موج‌ها شرط مورد نظر روش RD برای انتخاب طول موج مناسب برقرار است: تقریباً جذب آسکوربیک اسید (گونه مورد نظر)، متفاوت از هم می‌باشد ولی استیل‌سالیسیلیک اسید (گونه مزاحم) جذبی تقریباً ثابت دارد.

سپس طیف محلول‌های استاندارد خالص ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰، ۳۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آسکوربیک اسید

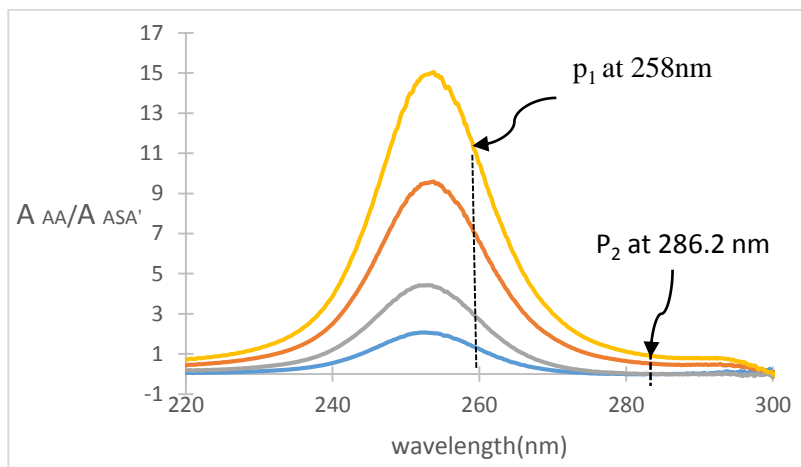
(گونه موردنظر) (شکل ۳-۲۵) بر طیف محلول با غلظت مشخصی (۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر) از استیل-سالیسیلیک اسید (گونه مزاحم) به عنوان مقسوم علیه تقسیم گردید. (شکل ۳-۲۶)



شکل ۳-۲۴: طیف جذبی ۱۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر آسکوربیک اسید (قرمز)، طیف جذبی ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر استیل سالیسیلیک اسید (آبی) در بافر سیتراتی با $\text{pH} = 2/5$



شکل ۳-۲۵: طیف‌های جذبی مرتبه صفر محلول های ۳۰/۰۰، ۲۰/۰۰، ۱۰/۰۰، ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر آسکوربیک اسید در بافر سیتراتی با $\text{pH} = 2/5$

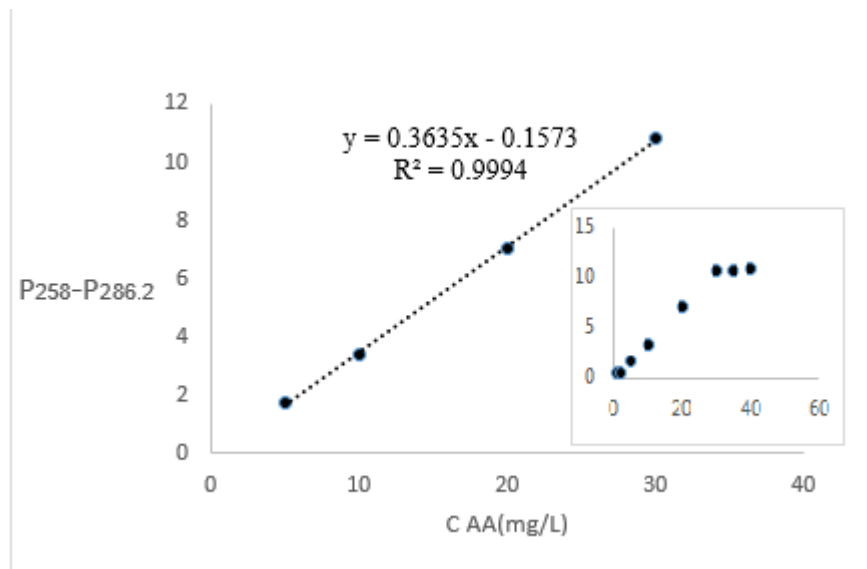


شکل ۳-۲۶: طیف‌های نسبی حاصل از تقسیم طیف محلول‌های ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰، ۳۰/۰۰ میلی گرم برلیتر آسکوربیک اسید بر طیف محلول ۲۰/۰۰ میلی گرم برلیتر استیل‌سالیسیلیک اسید به عنوان مقسوم‌علیه

در مرحله بعد بزرگی دامنه جذب نسبی P_1 و P_2 به ترتیب در طول موج ۲۵۵ و ۲۸۶/۲ نانومتر اندازه‌گیری شد و از هم کم گردید. از رسم اختلاف بزرگی دو دامنه در طول موج‌های ۲۵۵ و ۲۸۶/۲ نانومتر بر حسب غلظت متناظر آسکوربیک اسید، نمودار کالیبراسیون برای تعیین غلظت آسکوربیک اسید در روش RD به دست آمد. نتایج حاصل از رسم منحنی کالیبراسیون روش RD در شکل ۳-۲۷ و جدول ۳-۲۴ آورده شده است.

جدول ۳-۲۳: نتایج حاصل از اندازه‌گیری بزرگی دامنه‌ها در طیف‌های نسبی حاصل از شکل ۳-۲۸ در روش RD

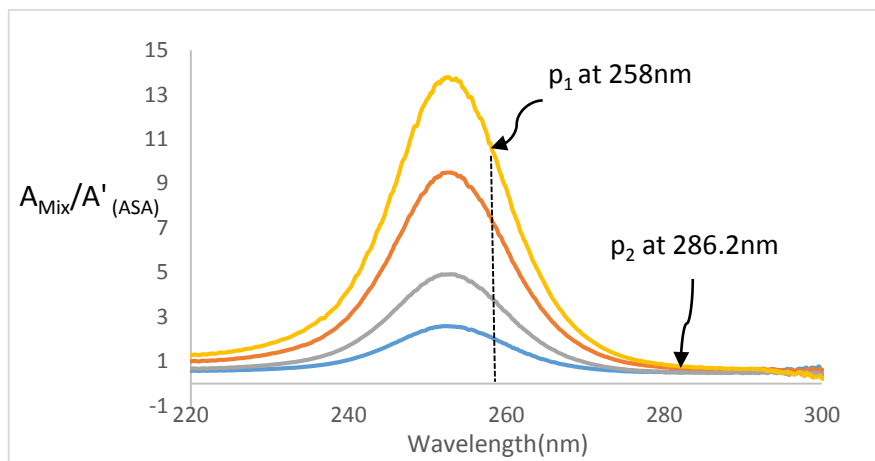
غلظت AA (mg/L)	بزرگی دامنه در ۲۸۶/۲ نانومتر (P_2)	بزرگی دامنه در ۲۵۵ نانومتر (P_1)	اختلاف بزرگی دامنه ها ($\Delta p = P_1 - P_2$)
۵/۰۰	-۰/۰۱	۱/۷۵	۱/۷۶
۱۰/۰۰	۰/۰۵۴	۳/۵۵	۳/۴۰
۲۰/۰۰	۰/۲۶	۷/۲۸	۷/۰۲
۳۰/۰۰	۰/۱۸	۱۱/۰۰	۱۰/۸۲



شکل ۳-۲۷: نمودار کالیبراسیون آسکوربیک اسید در روش RD: حاصل از رسم اختلاف بزرگی دامنه های نسبی P_2 و P_1 به ترتیب در طول موج های ۲۵۸ و ۲۸۶/۲ نانومتر بر حسب غلظت متناظر آسکوربیک اسید (mg/L)

سپس برای تعیین غلظت آسکوربیک اسید در مخلوط، مخلوط‌هایی از سری ارزیابی انتخاب شدند که مقدار استیل‌سالیسیلیک اسید ثابت و مقدار آسکوربیک اسید در مخلوط، مخلوط‌هایی از سری ارزیابی انتخاب شدند که مقدار طیف خالص استیل‌سالیسیلیک اسید با غلظت معینی (۲۰/۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) به عنوان مقسوم‌علیه تقسیم شد (شکل ۳-۲۸). بزرگی جذب نسبی (P_1 و P_2) به ترتیب در طول موج ۲۵۸ و ۲۸۶/۲ نانومتر در هر مخلوط اندازه‌گیری شده و از هم کم گردید. با این کار مقدار ثابت ناشی از اثر مزاحمت استیل‌سالیسیلیک اسید حذف می‌گردد. و اختلاف بزرگی دامنه‌ها (ΔP_{mix}) در معادله کالیبراسیون آسکوربیک اسید برای روش RD قرار داده شد (شکل ۳-۲۸) و غلظت آسکوربیک اسید در هر مخلوط محاسبه شد.

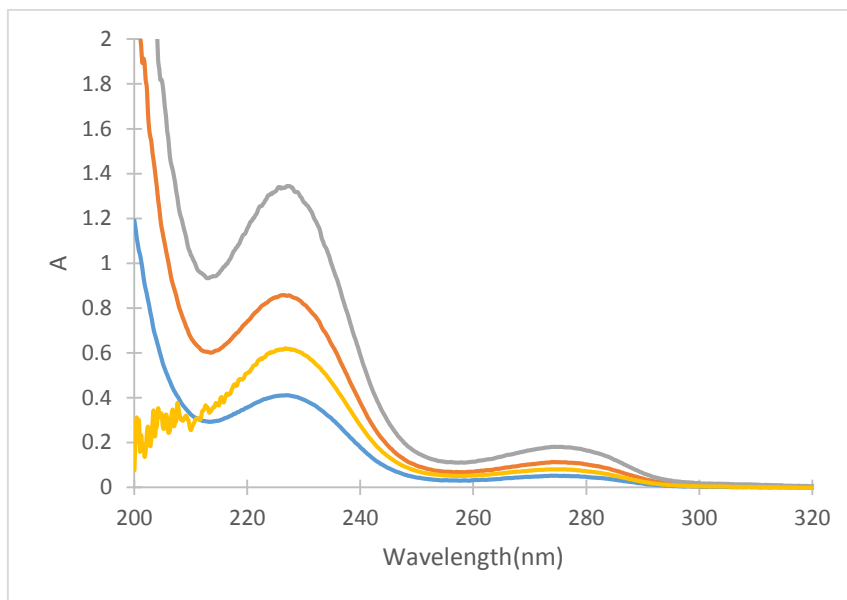
برای تعیین غلظت استیل‌سالیسیلیک اسید؛ با توجه به شکل ۳-۲۴، طول موج‌های ۲۵۵ و ۲۲۵ نانومتر به ترتیب به عنوان طول موج برای دامنه P_1 و P_2 انتخاب گردید. در این طول موج‌ها شرط مورد نظر روش RD برای انتخاب طول موج مناسب برقرار است:



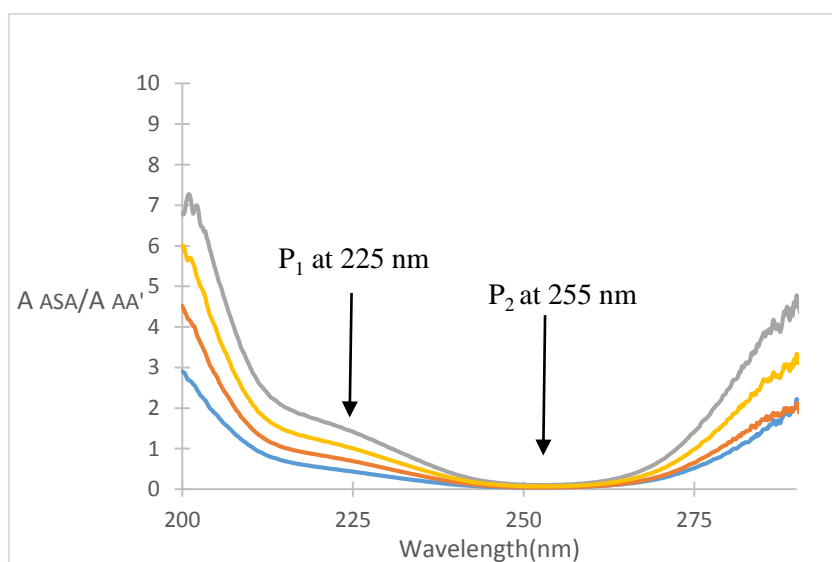
شکل ۳-۲۸: طیف‌های نسبی مخلوط‌های حاوی ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰، ۳۰/۰۰ میلی گرم برلیتر آسکوربیک اسید و ۱۰/۰۰ میلی-گرم برلیتر استیل سالیسیلیک اسید بر طیف محلول ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر استیل سالیسیلیک اسید به عنوان مقسوم‌علیه در شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی لیتر محلول بافر سیتراتی با pH=۲/۵

تقریباً جذب استیل سالیسیلیک اسید (گونه مورد نظر) متفاوت از هم می‌باشد ولی آسکوربیک اسید (گونه مزاحم) دارای مقدار جذب ثابت است.

سپس برای به دست آوردن معادله کالیبراسیون استیل سالیسیلیک اسید در روش RD، طیف محلول‌های استاندارد خالص ۱۰/۰۰، ۱۵/۰۰، ۲۰/۰۰، ۳۰/۰۰ میلی گرم برلیتر استیل سالیسیلیک اسید (شکل ۳-۲۹، گونه مورد نظر) بر طیف محلول ۲۰/۰۰ میلی گرم برلیتر آسکوربیک اسید (گونه مزاحم) به عنوان مقسوم‌علیه تقسیم گردید. (شکل ۳-۳۰). در مرحله بعد بزرگی جذب نسبی (P_1 و P_2) به ترتیب در طول موج ۲۵۵ و ۲۲۵ نانومتر اندازه‌گیری شد و از هم کم شد. (جدول ۳-۲۵). از رسم اختلاف بزرگی دو دامنه در طول موج‌های ۲۵۵ و ۲۲۵ نانومتر بر حسب غلظت متناظر استیل سالیسیلیک اسید، نمودار کالیبراسیون برای تعیین غلظت استیل سالیسیلیک اسید در روش RD به دست آمد. نتایج حاصل از رسم منحنی کالیبراسیون روش RD در شکل ۳-۳۱ آورده شده است.



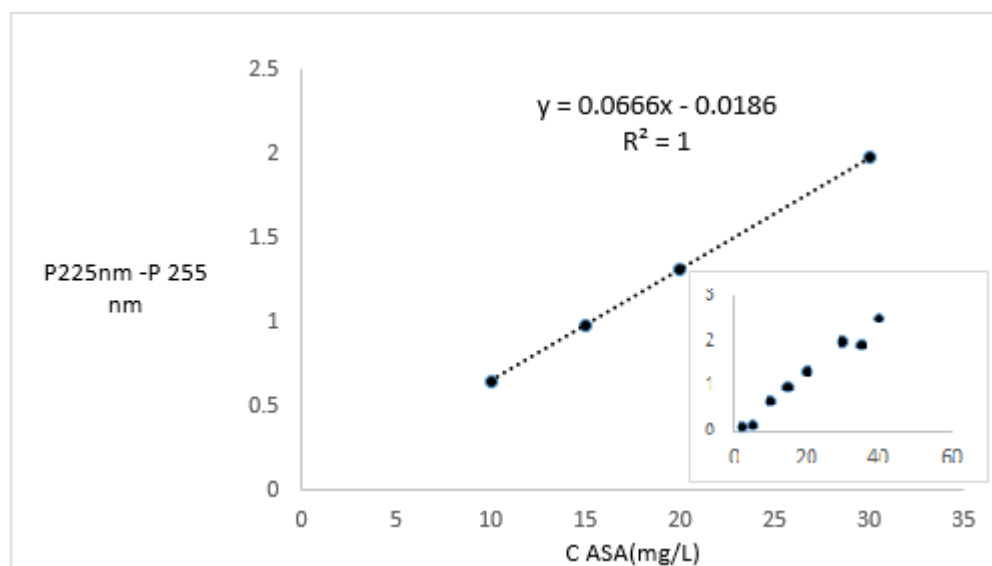
شکل ۲۹-۳: طیف‌های جذبی مرتبه صفر محلول‌های ۳۰/۱۰۰، ۲۰/۱۰۰، ۱۵/۱۰۰، ۱۰/۱۰۰ میلی گرم بر لیتر استیل سالیسیلیک اسید در شرایط بهینه: ۲/۱۰۰ میلی لیتر محلول بافر سیتراتی با $\text{pH} = 2/5$



شکل ۳۰-۳: طیف‌های نسبی محلول‌های ۳۰/۱۰۰، ۲۰/۱۰۰، ۱۵/۱۰۰، ۱۰/۱۰۰ میلی گرم بر لیتر استیل سالیسیلیک اسید بر طیف محلول ۲۰/۱۰۰ میلی گرم بر لیتر استیل سالیسیلیک اسید به عنوان مقسوم علیه در شرایط بهینه: ۲/۱۰۰ میلی لیتر محلول بافر سیتراتی با $\text{pH} = 2/5$

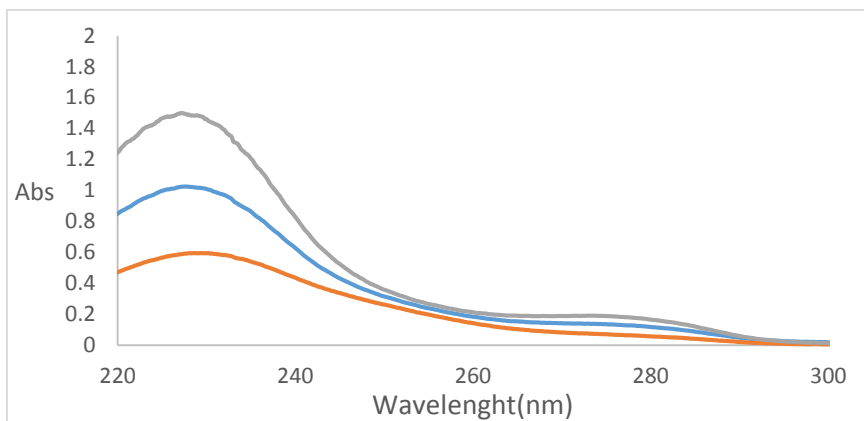
جدول ۳-۲۴: نتایج حاصل از اندازه‌گیری بزرگی دامنه‌ها در طیف‌های نسبی حاصل از شکل ۳-۲۱ در روش RD

غلظت ASA (mg/L)	بزرگی دامنه نسبی در ۲۵۵ نانومتر (P_2)	بزرگی دامنه نسبی در ۲۲۵ نانومتر (P_1)	اختلاف بزرگی دامنه ها ($\Delta p = P_1 - P_2$)
۱۰/۰۰	۰/۰۴	۰/۶۹	۰/۶۴
۱۵/۰۰	۰/۰۷	۱/۰۵	۰/۹۸
۲۰/۰۰	۰/۱۰	۱/۴۲	۱/۳۱
۳۰/۰۰	۰/۱۶	۲/۱۵	۱/۹۸

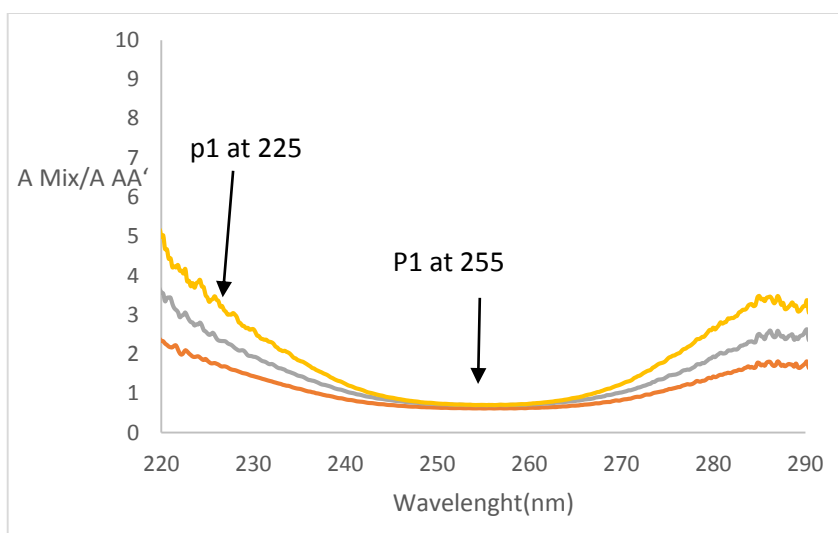


شکل ۳-۳۱: نمودار کالیبراسیون استیل سالیسیلیک اسید در روش RD: حاصل از رسم اختلاف بزرگی دامنه‌های نسبی P_1 و P_2 به ترتیب در طول موج‌های ۲۲۵ و ۲۵۵ نانومتر بر حسب غلظت متناظر استیل سالیسیلیک اسید

سپس به منظور تعیین غلظت استیل سالیسیلیک اسید در مخلوط، مخلوط‌هایی از سری ارزیابی انتخاب شدند که مقدار آسکوربیک اسید ثابت و مقدار استیل سالیسیلیک اسید متغیر دارند. در شکل ۳-۳۲ طیف جذبی مخلوط‌هایی با غلظت ثابت آسکوربیک اسید و غلظت متغیر استیل سالیسیلیک اسید آورده شده است. سپس طیف هر مخلوط بر طیف خالص آسکوربیک اسید با غلظت معینی (۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) به عنوان مقسوم‌علیه تقسیم شد (شکل ۳-۳۳).



شکل ۳-۳۲: طیف‌های جذبی مخلوط‌های حاوی ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰، ۳۰/۰۰ میلی گرم برلیتر استیل‌سالیسیلیک اسید و ۱۰/۰۰ میلی-گرم برلیتر آسکوربیک اسید در شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی‌لیتر محلول بافر سیتراتی با $\text{pH} = 2/5$



شکل ۳-۳۳: طیف‌های جذبی مخلوط‌های حاوی ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰، ۳۰/۰۰ میلی گرم برلیتر استیل‌سالیسیلیک اسید و ۱۰/۰۰ میلی-گرم برلیتر آسکوربیک اسید بر طیف محلول ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر آسکوربیک اسید به عنوان مقسوم‌علیه در شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی‌لیتر محلول بافر سیتراتی با $\text{pH} = 2/5$

سپس بزرگی دامنه جذب نسبی (P_1 و P_2) به ترتیب در طول موج ۲۵۵ و ۲۲۵ نانومتر در هر مخلوط اندازه‌گیری شده و از هم کم شد. با این کار مقدار ثابت ناشی از اثر مزاحمت آسکوربیک اسید حذف می‌گردد. سپس اختلاف بزرگی دامنه‌ها (ΔP_{mix}) در معادله کالیبراسیون استیل‌سالیسیلیک اسید برای روش RD قرار داده شد (شکل ۳-۳۱) و در نهایت غلظت استیل‌سالیسیلیک اسید در هر مخلوط به دست آمد.

برای رسیدن به بهترین صحت در روش RD باید غلظت آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید به عنوان مقسوم علیه بهینه شود. به این منظور غلظت آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید به عنوان مقسوم علیه در محدوده ۱۰/۰۰، ۲۰/۰۰ و ۳۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر تغییر داده شد و به ترتیب غلظت استیل سالیسیلیک اسید و آسکوربیک اسید محاسبه گردید. نتایج حاصل از بهینه سازی غلظت مقسوم- علیه‌ها در روش RD، در جدول ۳-۲۶ نشان داده است که استفاده از غلظت ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید بهترین نتایج را به همراه دارد. بنابراین غلظت ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید به عنوان غلظت بهینه مقسوم علیه‌های روش RD گزارش گردید.

جدول ۳-۲۵: نتایج حاصل از بهینه سازی غلظت آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید به عنوان مقسوم علیه به ترتیب در پیش بینی غلظت استیل سالیسیلیک اسید و آسکوربیک اسید برای روش RD

خطا در پیش‌بینی غلظت ASA		غلظت AA به‌عنوان مقسوم علیه (mg/L)
MRE	MSE	
۴/۲۷	۱/۳۲	۱۰/۰۰
۱/۲۸	۰/۰۸۳	۲۰/۰۰
۳/۵۳	۱/۱۷	۳۰/۰۰
خطا در پیش‌بینی غلظت AA		غلظت ASA به‌عنوان مقسوم علیه (mg/L)
MRE	MSE	
۵/۷۰	۰/۴۵۰	۱۰/۰۰
۲/۹۳	۰/۱۳۲	۲۰/۰۰
۳/۸۳	۰/۳۷۰	۳۰/۰۰

روش RD بر روی مخلوط‌های سری ارزیابی و سری تست در شرایط بهینه روش امتحان گردید. نتایج حاصل از روش RD بر مخلوط‌های سری ارزیابی و تست به ترتیب در جدول ۳-۲۷ و ۳-۲۸ آمده است.

جدول ۳-۲۶: نتایج حاصل از روش RD در پیش بینی غلظت دو گونه در مخلوط‌های سری ارزیابی

خطای نسبی (%)		غلظت پیش بینی شده (mg/L)		غلظت واقعی (mg/L)		محلول
استیل- سالیسیلیک- اسید	آسکوربیک- اسید	استیل- سالیسیلیک- اسید	آسکوربیک اسید	استیل سالیسیلیک اسید	آسکوربیک اسید	
۰/۶۶	۱/۰۰	۱۰/۰۵	۳/۰۲	۱۰/۰۰	۳/۰۰	۱
-۰/۶۰	-۰/۳۳	۱۴/۹۱	۲/۹۹	۱۵/۰۰	۳/۰۰	۲
-۰/۷۵	۰/۰۰	۱۹/۸۵	۳/۰۰	۲۰/۰۰	۳/۰۰	۳
-۰/۲۶	۳/۳۳	۲۹/۹۲	۳/۱۰	۳۰/۰۰	۳/۰۰	۴
-۰/۴۰	-۲/۸۰	۹/۹۶	۴/۸۶	۱۰/۰۰	۵/۰۰	۵
۰/۸۰	۲/۰۰	۱۵/۱۲	۵/۱۰	۱۵/۰۰	۵/۰۰	۶
-۱/۶۵	-۲/۱۴	۱۹/۶۷	۴/۸۸	۲۰/۰۰	۵/۰۰	۷
۱/۱۰	-۳/۶۰	۳۰/۳۳	۴/۸۲	۳۰/۰۰	۵/۰۰	۸
-۰/۵۰	۲/۱۴	۹/۹۵	۷/۱۵	۱۰/۰۰	۷/۰۰	۹
-۲/۷۳	-۳/۱۴	۱۴/۵۹	۶/۷۸	۱۵/۰۰	۷/۰۰	۱۰
۳/۳۰	-۱/۴۲	۲۰/۶۶	۷/۱۰	۲۰/۰۰	۷/۰۰	۱۱
-۱/۸۳	-۱/۵۷	۲۹/۴۵	۶/۸۹	۳۰/۰۰	۷/۰۰	۱۲
-۵/۶۰	-۲/۱	۹/۴۴	۹/۷۹	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۳
-۰/۵۳	-۰/۹۰	۱۴/۹۲	۱۰/۰۹	۱۵/۰۰	۱۰/۰۰	۱۴
-۱/۹۵	۰/۰۰	۱۹/۶۱	۱۰/۰۰	۲۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۵
۰/۱۳	-۱/۴۰	۳۰/۰۴	۹/۸۶	۳۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۶
-۳/۳۰	۰/۲۰	۹/۶۷	۲۰/۰۴	۱۰/۰۰	۲۰/۰۰	۱۷
-۱/۲۰	-۰/۱۵	۱۴/۸۲	۱۹/۹۷	۱۵/۰۰	۲۰/۰۰	۱۸
۰/۲۵	-۱/۵۰	۲۰/۰۵	۱۹/۷۰	۲۰/۰۰	۲۰/۰۰	۱۹
-۱/۰۳	-۲/۳۵	۲۹/۶۹	۱۹/۵۳	۳۰/۰۰	۲۰/۰۰	۲۰
۰/۰	-۳/۷۳	۱۰/۰۰	۲۸/۸۸	۱۰/۰۰	۳۰/۰۰	۲۱
-۰/۷۳	-۰/۳۶	۱۴/۸۹	۲۹/۸۹	۱۵/۰۰	۳۰/۰۰	۲۲
-۰/۳۰	۰/۳۳	۲۰/۲۸	۲۹/۹۱	۲۰/۰۰	۳۰/۰۰	۲۳
-۰/۳۰	-۲/۰۳	۲۹/۹۱	۲۹/۳۹	۳۰/۰۰	۳۰/۰۰	۲۴

جدول ۳-۲۷: نتایج حاصل از روش RD در پیش بینی غلظت دو گونه در مخلوط‌های سری تست

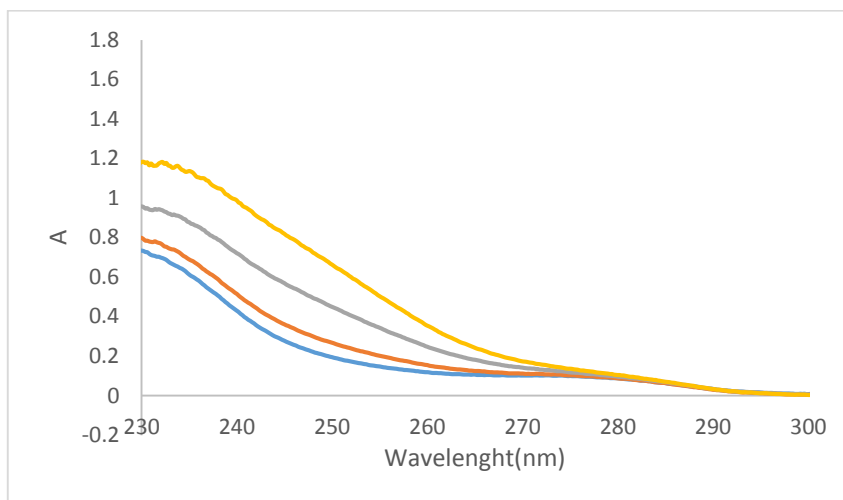
خطای نسبی (%)		غلظت پیش‌بینی شده (mg/L)		غلظت واقعی (mg/L)		محلول
ASA	AA	ASA	AA	ASA	AA	
۰/۰۳	-۴/۰۰	۳۰/۰۱	۱/۹۲	۳۰/۰۰	۲/۰۰	۱
-۰/۶۰	۵/۰۰	۹/۹۴	۲/۱۰	۱۰/۰۰	۲/۰۰	۲
-۰/۶۶	-۰/۶۰	۱۴/۹۰	۱۴/۹۱	۱۵/۰۰	۱۵/۰۰	۳
۰/۷۵	۰/۰	۱۲/۰۹	۱۲/۰۰	۱۲/۰۰	۱۲/۰۰	۴
۰/۲۰	-۱/۲۲	۱۰/۰۲	۸/۸۹	۱۰/۰۰	۹/۰۰	۵
۰/۲۵	۰/۳۶	۲۰/۰۵	۲۵/۰۹	۲۰/۰۰	۲۵/۰۰	۶
-۰/۵۷	۰/۰۷	۲۷/۸۴	۲۸/۰۲	۲۸/۰۰	۲۸/۰۰	۷
۰/۶۶	-۳/۰۰	۱۵/۱۰	۲/۹۱	۱۵/۰۰	۳/۰۰	۸

۳-۱۶- کاربرد روش افزایش استاندارد نقطه H نسبی (RHPSAM) در تعیین غلظت آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید

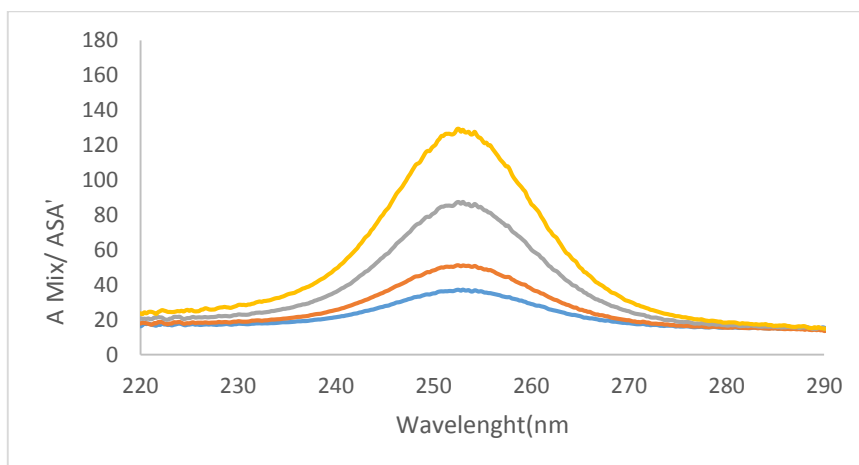
روش اسپکتروفتومتری دیگری که برای اندازه‌گیری همزمان آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید به‌کار برده شد، روش افزایش استاندارد نقطه H نسبی (RHPSAM) بود. غلظت مقسوم‌علیه انتخاب شده، در روش RHPSAM از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. این روش با در نظر گرفتن هر جفت طول موجی تقریباً می‌تواند به اندازه‌گیری همزمان آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید بپردازد. لذا به این منظور؛ جفت طول‌موج‌های (۲۴۳ و ۲۷۵)، (۲۴۹ و ۲۷۷)، (۲۶۰ و ۲۷۵) برای اندازه‌گیری انتخاب شدند.

سپس از سری مخلوط‌هایی استفاده گردید که در آن غلظت استیل‌سالیسیلیک اسید ثابت و غلظت آسکوربیک اسید متغیر است (شکل ۳-۳۴). سپس طیف هر مخلوط بر طیف نرمال شده استیل‌سالیسیلیک اسید (ASA') با غلظت معینی (۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) به عنوان مقسوم‌علیه تقسیم شد. (شکل ۳-۳۵) سپس دامنه‌های P_1 و P_2 در شکل ۳-۳۵ در جفت طول‌موج‌های (۲۴۳ و ۲۷۵)، (۲۴۹ و ۲۷۷)، (۲۶۰ و ۲۷۵) و از رسم دامنه‌های P_1 و P_2 در هر جفت طول‌موج بر حسب غلظت

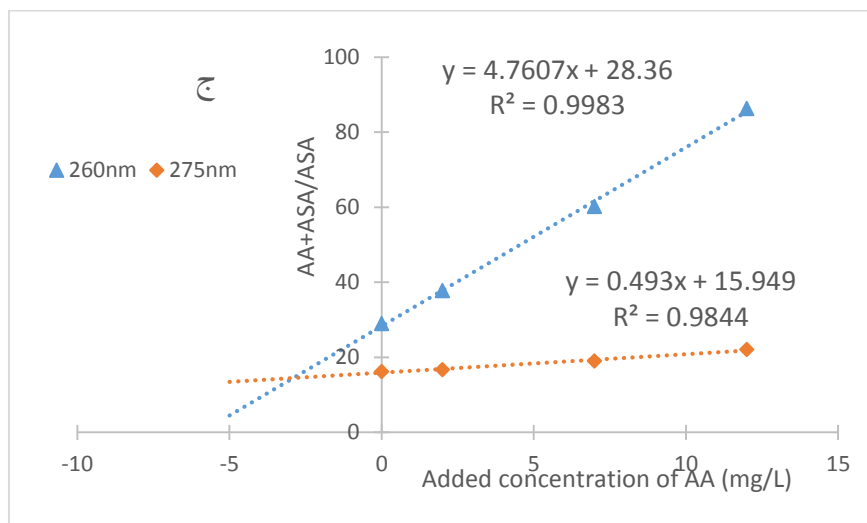
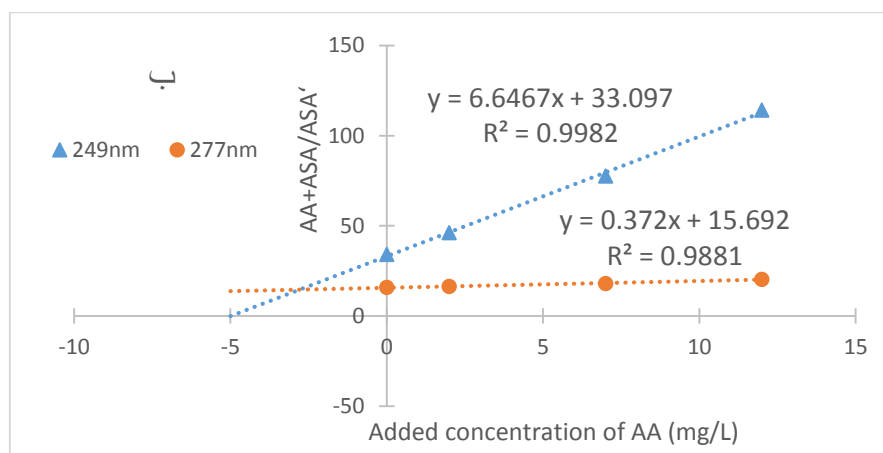
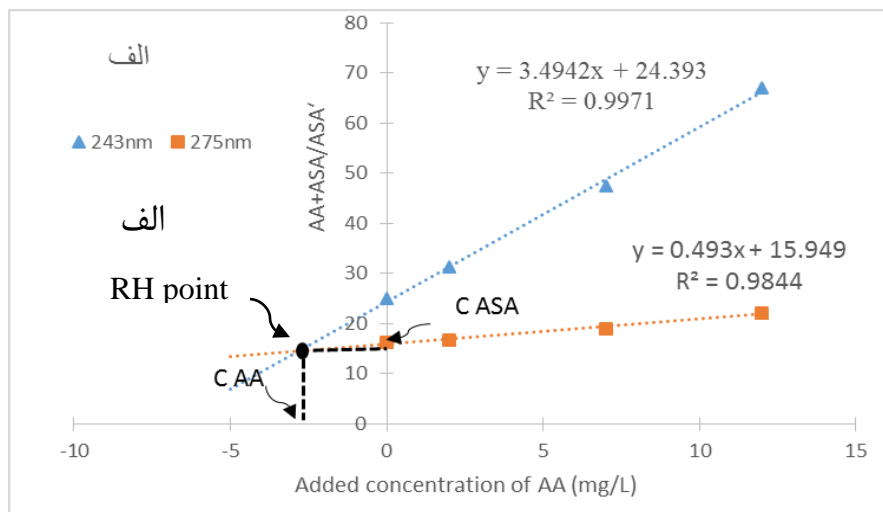
آسکوربیک اسید اضافه شده دو خط مستقیم به دست آمد که در یک نقطه (C_{RH}, P_{RH}) هم‌دیگر را قطع می‌کنند. (شکل ۳-۳۶)



شکل ۳-۳۴: طیف‌های جذبی مخلوط‌های حاوی ۳/۰۰، ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۱۵/۰۰ میلی گرم برلیتر آسکوربیک اسید و ۱۵/۰۰ میلی گرم برلیتر استیل‌سالیسیلیک اسید در شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی لیتر محلول بافر سیتراتی با $pH=2/5$



شکل ۳-۳۵: طیف‌های نسبی حاصل از تقسیم طیف مخلوط‌های حاوی ۳/۰۰، ۵/۰۰، ۱۰/۰۰ و ۱۵/۰۰ میلی گرم برلیتر آسکوربیک اسید و ۱۵/۰۰ میلی گرم برلیتر استیل‌سالیسیلیک اسید به طیف نرمال شده ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر استیل‌سالیسیلیک اسید به عنوان مقسوم علیه در شرایط بهینه: ۲/۰۰ میلی لیتر محلول بافر سیتراتی با $pH=2/5$



شکل ۳-۳۶: نمودارهای حاصل از رسم دامنه‌های P_1 و P_2 در طول موج‌های الف: ۲۴۳ و ۲۷۵، ب: ۲۴۹ و ۲۷۷، ج: ۲۶۰ و ۲۷۵ نانومتر بر حسب غلظت آسکوربیک اسید اضافه شده (۰/۰۰، ۲/۰۰، ۷/۰۰، ۱۲/۰۰ میلی گرم بر لیتر)

مولفه C_{RH} - نشان دهنده غلظت آسکوربیک اسید و مولفه P_{RH} نشان دهنده غلظت استیل سالیسیلیک اسید موجود در مخلوط مجهول (۳/۰۰ میلی گرم بر لیتر آسکوربیک اسید و ۱۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر استیل سالیسیلیک اسید) است. که با استفاده از معادله‌های ۲-۳۸ و ۲-۳۹ در بخش ۲-۲-۱-۶ به ترتیب غلظت آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید در مخلوط مجهول در جفت طول موج های ذکر شده، به صورت مستقیم محاسبه شد. (جدول ۳-۲۹)

جدول ۳-۲۸: نتایج حاصل از روش RHPSAM برای مخلوط ۳/۰۰ میلی گرم بر لیتر آسکوربیک اسید و ۱۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر استیل سالیسیلیک اسید در طول موج‌های انتخاب شده

درصد خطای نسبی %		غلظت محاسبه شده		R^2	معادله رگرسیون	طول موج (nm)
ASA	AA	ASA (mg/L)	AA (mg/L)			
-۲/۹۳	-۶/۳۳	۱۴/۵۶	۲/۸۱	۰/۹۹۷۱	$y=۳/۴۹۴۲x+۲۴/۳۹۳$	۲۴۳
				۰/۹۸۴۴	$y=۰/۴۹۳x+۱۵/۹۴۹$	۲۷۵
-۲/۳۳	-۷/۶۶	۱۴/۶۵	۲/۷۷	۰/۹۹۸۲	$y=۶/۶۴۶۷x+۳۳/۰۹۷$	۲۴۹
				۰/۹۹۸۱	$y=۰/۳۷۲x+۱۵/۶۹۲$	۲۷۷
-۳/۲۶	-۳/۳۳	۱۴/۵۱	۲/۹۰	۰/۹۹۸۳	$y=۴/۷۶۰۷x+۲۸/۳۶$	۲۶۰
				۰/۹۸۴۴	$y=۰/۴۹۳x+۱۵/۹۴۹$	۲۷۵

روش RHPSAM بر روی ۱۵ مخلوط متفاوت تهیه شده برای این روش، در این سه جفت طول موج امتحان گردید و میانگین مربع خطا (MSE) و میانگین خطای نسبی (MRE) غلظت آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید برای این مخلوط‌ها محاسبه شد که طبق نتایج بدست آمده در جدول ۳-۳۰، مشاهده می‌شود که استفاده از طول موج های ۲۴۳ و ۲۷۵ نانومتر در روش RHPSAM، خطای کمتری را در نتایج گزارش شده به دنبال خواهد داشت. لذا طول موج های ۲۴۳ و ۲۷۵ نانومتر به عنوان طول موج‌های بهینه در مراحل بعدی این روش انتخاب گردید.

جدول ۳-۲۹: نتایج حاصل از بهینه سازی طول موج در پیش‌بینی غلظت دو گونه در مخلوط‌های تهیه شده برای روش RHPSAM

خطا (MSE) در پیش‌بینی غلظت ASA (mg/L)	خطا (MSE) در پیش‌بینی غلظت AA (mg/L)	طول موج (nm)
۰/۷۱۴	۰/۵۸۸	۲۷۵ و ۲۴۳
۲/۹۵	۰/۵۱۵	۲۷۵ و ۲۶۰
۲/۷۲	۰/۵۵۷	۲۷۷ و ۲۴۹
خطا (MRE) در پیش‌بینی غلظت ASA (mg/L)	خطا (MRE) در پیش‌بینی غلظت AA (mg/L)	طول موج (nm)
۴/۱۴	۴/۶۱	۲۷۵ و ۲۴۳
۵/۱۹	۵/۴۶	۲۷۵ و ۲۶۰
۶/۳۱	۸/۰۰	۲۷۷ و ۲۴۹

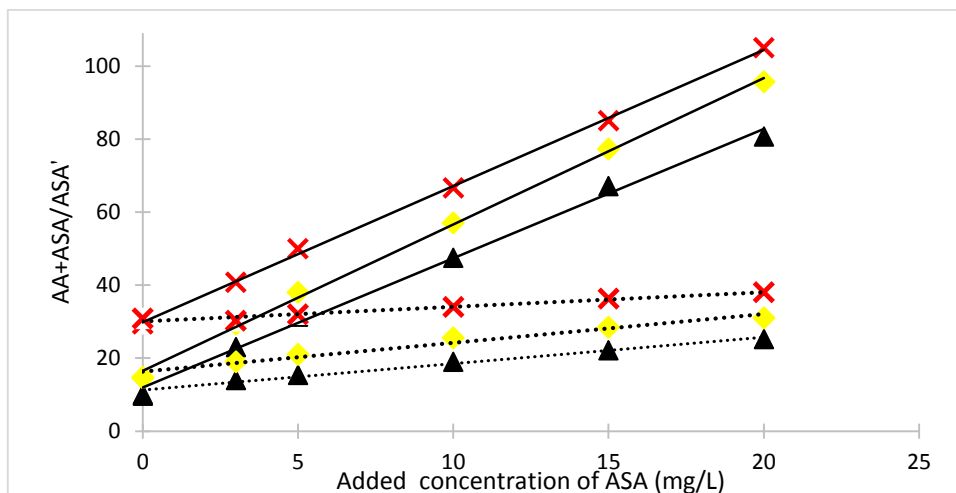
برای رسیدن به بهترین صحت در روش RHPSAM باید غلظت استیل‌سالیسیلیک اسید به عنوان مقسوم علیه نیز بهینه شود. برای این منظور غلظت طیف نرمال شده استیل‌سالیسیلیک اسید به عنوان مقسوم علیه در دامنه ۳۰/۰۰-۱۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر تغییر داده شد و روش RHPSAM بر روی مخلوط‌های سری ارزیابی امتحان گردید و میانگین مربع خطا (MSE) و میانگین خطای نسبی (MRE) غلظت آسکوربیک‌اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید برای این مخلوط‌ها محاسبه شد که طبق نتایج بدست آمده در جدول ۳-۳۱، مشاهده می‌شود که استفاده از طیف نرمال شده غلظت ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر استیل-سالیسیلیک اسید به عنوان مقسوم علیه، خطای کمتری را در نتایج گزارش شده از این روش نشان می‌دهد به دلیل اینکه ضریب جذب حاصل از غلظت ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر استیل‌سالیسیلیک اسید به ضریب جذب میانگین حاصل از سایر غلظت‌ها نزدیک‌تر است، مقادیر MSE و MRE به دست آمده نیز کمتر می‌باشند. و همچنین نتایج حاصل از این بهینه‌سازی نشان می‌دهند که استفاده از ضریب جذب غلظت‌های پایین محدوده خطی استیل‌سالیسیلیک اسید به عنوان مقسوم علیه خطای بیشتری را در پیش‌بینی غلظت‌های زیاد دو گونه (خصوصاً استیل‌سالیسیلیک اسید) و استفاده از ضریب جذب غلظت‌های بالای محدوده خطی استیل‌سالیسیلیک اسید به عنوان مقسوم علیه خطای بیشتری را در پیش‌بینی غلظت‌های پایین دو

گونه (خصوصاً استیل سالیسیلیک اسید) ایجاد می کند.

در شکل ۳-۳۷ نمودارهای افزایش استاندارد نقطه H نسبی، برای محلول‌های خالص استاندارد ۱۰/۰۰، ۱۵/۰۰ و ۳۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر استیل سالیسیلیک اسید که غلظت متغیر از آسکوربیک اسید (۳/۰۰، ۵/۰۰، ۱۰/۰۰، ۱۵/۰۰ و ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر) به آن‌ها اضافه شده است، در شرایط بهینه روش (استفاده از طیف نرمال شده غلظت ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر استیل سالیسیلیک اسید به عنوان مقسوم‌علیه و طول موج‌های ۲۴۳ و ۲۷۵ نانومتر) آورده شده است. در این شکل مشاهده می‌شود که با تغییر غلظت استیل سالیسیلیک اسید (گونه همجنس با مقسوم‌علیه) عرض از مبدا نمودارها متناسب با غلظت استیل سالیسیلیک اسید تغییر می‌کند.

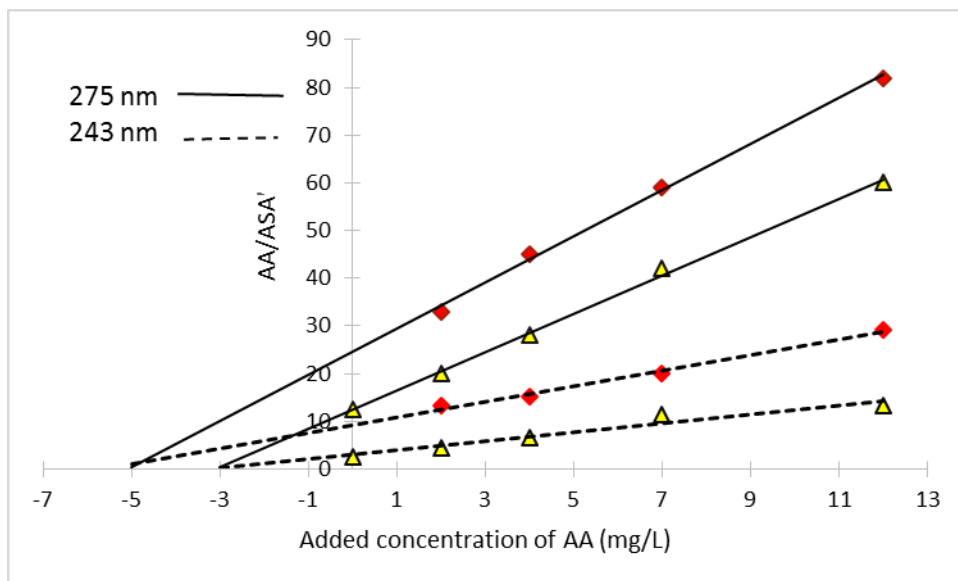
جدول ۳-۳۰: نتایج حاصل از بهینه سازی غلظت طیف نرمال شده استیل سالیسیلیک اسید به عنوان مقسوم‌علیه در پیش‌بینی غلظت دو گونه در مخلوط‌های سری ارزیابی برای روش RHPSAM

خطا در پیش‌بینی غلظت ASA (mg/L)		خطا در پیش‌بینی غلظت AA (mg/L)		غلظت ASA به عنوان مقسوم علیه (mg/L)
MRE	MSE	MRE	MSE	
۱۰/۹۷	۳/۴۷	۱۰/۲۰	۵/۱۲	۱۰/۰۰
۹/۹۳	۲/۷۳	۸/۶۸	۴/۵۳	۱۵/۰۰
۵/۰۲	۱/۲۵	۶/۳۲	۴/۲۳	۱۸/۰۰
۴/۱۴	۰/۷۱۴۶	۴/۶۱	۱/۳۶	۲۰/۰۰
۱۱/۱۷	۲/۳۶	۷/۲۱	۴/۴۴	۲۲/۰۰
۱۱/۶۴	۵/۲۸	۱۰/۶۲	۴/۶۴	۳۰/۰۰



شکل ۳-۳۷: نمودارهای روش RHPSAM برای محلول‌های خالص استاندارد ۱۰/۰۰، ۱۵/۰۰ و ۳۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر استیل سالیسیلیک اسید

همچنین در شکل ۳-۳۸ نمودارهای افزایش استاندارد نقطه H نسبی، برای محلول خالص استاندارد ۳/۰۰ و ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آسکوربیک اسید که غلظت متغیر از آسکوربیک اسید به آن‌ها اضافه شده است، در شرایط بهینه روش (استفاده از طیف نرمال شده غلظت ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر استیل سالیسیلیک اسید به عنوان مقسوم‌علیه و طول‌موج‌های ۲۴۳ و ۲۷۵ نانومتر) آورده شده است. در این شکل مشاهده می‌شود که با تغییر غلظت آسکوربیک اسید بدون حضور استیل سالیسیلیک اسید نمودارها در نقطه RH غلظت استیل سالیسیلیک اسید را صفر و غلظت آسکوربیک اسید را حدوداً ۳/۰۰ و ۵/۰۰ نشان می‌دهند.



شکل ۳-۳: نمودارهای روش RHPSAM برای محلول‌های خالص استاندارد ۳/۰۰، ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آسکوربیک اسید با افزودن غلظت‌های ۲/۰۰، ۴/۰۰، ۷/۰۰ و ۱۲/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آسکوربیک اسید

نتایج حاصل از غلظت‌های به‌دست آمده دو دارو در شرایط بهینه روش (طول‌موج ۲۴۳ و ۲۷۵ نانومتر و غلظت ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر طیف نرمال شده استیل‌سالپسیلیک اسید به‌عنوان مقسوم‌علیه) برای مخلوط‌های تهیه شده در جدول ۳-۳ آورده شده است.

جدول ۳-۳: نتایج حاصل از پیش‌بینی غلظت دو گونه در مخلوط‌های تهیه شده برای روش RHPSAM

درصد خطای نسبی %		غلظت محاسبه شده (mg/L)		R ²	معادله رگرسیون	غلظت واقعی (mg/L)		شماره
ASA	AA	ASA	AA			ASA	AA	
-۰/۱۰	-۴/۶۶	۹/۹۹	۲/۶۸	۰/۹۹۸۱ ۰/۹۹۹۲	$y=۳/۷۹۵x+۲۰/۲۰۶$ $y=۰/۶۳۰۸x+۱۱/۶۹۴$	۱۰/۰۰	۳/۰۰	۱
۸/۸۰	۰/۱۰	۱۰/۰۱	۵/۴۴	۰/۹۹۹۸ ۰/۹۹۶۵	$y=۳/۳۲۳x+۲۸/۱۱$ $y=۰/۵۴۶x+۱۲/۹۹$	۱۰/۰۰	۵/۰۰	۲
۵/۵۰	۱/۴۰	۱۰/۵۵	۱۰/۱۴	۰/۹۷۱۵ ۰/۹۹۱۸	$y=۳/۷۹۸x+۴۹/۰۸$ $y=۰/۶۱۵x+۱۶/۷۹$	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۳
۲/۱۰	۵/۵۰	۱۰/۲۱	۲۱/۱۰	۱/۰۰ ۱/۰۰	$y=۳/۶۷۹x+۸۷/۸۹$ $y=۰/۶۱۵x+۲۳/۲۰$	۱۰/۰۰	۲۰/۰۰	۴
-۵/۷۳	-۳/۰۰	۱۴/۱۴	۲/۹۱	۰/۹۹۷۲	$y=۳/۴۹۸x+۲۴/۳۵$	۱۵/۰۰	۳/۰۰	۵

				۰/۹۹۴۴	$y=۰/۵۲۲x + ۱۵/۶۷۲$			
-۵/۸۶	-۷/۴۰	۱۴/۱۲	۴/۶۳	۰/۹۹۶۷	$y=۳/۵۸۱x + ۳۰/۷۳$	۱۵/۰۰	۵/۰۰	۶
				۰/۹۹۲۴	$y=۰/۵۳۶x + ۱۶/۶۱$			
۲/۰۰	۱/۶۰	۱۵/۳۰	۱۰/۱۶	۰/۹۹۵۶	$y=۳/۳۴۱x + ۴۹/۲۸$	۱۵/۰۰	۱۰/۰۰	۷
				۰/۹۸۹۹	$y=۰/۵۰۷x + ۲۰/۴۶$			
۸/۲۰	۱/۰۰	۱۶/۲۳	۱۵/۱۵	۰/۹۹۸۵	$y=۳/۲۲۷x + ۶۷/۵۶$	۱۵/۰۰	۱۵/۰۰	۸
				۰/۹۹۲۷	$y=۰/۴۹۷x + ۲۳/۲۳$			
-۴/۷۳	۱/۰۲	۱۴/۲۹	۲۲/۷۳	۰/۹۹۹۳	$y=۳/۳۳۳x + ۹۰/۰۷$	۱۵/۰۰	۲۲/۵۰	۹
				۰/۹۷۱۴	$y=۰/۵۳۷x + ۲۶/۵۱$			
-۱/۰۸	-۲/۳۳	۲۴/۷۳	۲/۹۳	۰/۹۹۹۸	$y=۴/۸۷۰x + ۳۹/۰۱$	۲۵/۰۰	۳/۰۰	۱۰
				۰/۹۹۷۴	$y=۰/۸۱۲x + ۲۷/۱۲$			
۳/۲۰	۱۱/۱۴	۲۵/۸۰	۷/۷۸	۰/۹۹۹۸	$y=۴/۶۶۱x + ۶۲/۰۹$	۲۵/۰۰	۷/۰۰	۱۱
				۰/۹۹۹۶	$y=۰/۶۸x + ۳۱/۱۶۴$			
-۱/۶۸	۱/۴۰	۲۴/۵۸	۱۰/۱۴	۰/۹۹۸۴	$y=۴/۹۰۵x + ۷۴/۳۵$	۲۵/۰۰	۱۰/۰۰	۱۲
				۰/۹۹۳۱	$y=۰/۷۸۴x + ۳۲/۵۴$			
۱/۸۴	۰/۳۰	۲۵/۴۶	۲۰/۰۶	۰/۹۹۸۵	$y=۴/۹۶۰x + ۱۲۵/۰$	۲۵/۰۰	۲۰/۰۰	۱۳
				۰/۹۹۷۸	$y=۰/۷۸۰x + ۴۱/۱۲$			
-۱/۳۵	۷/۵۷	۱۹/۷۳	۶/۴۷	۱/۰۰	$y=۳/۵۹۰x + ۴۳/۰۰$	۲۰/۰۰	۷/۰۰	۱۴
				۱/۰۰	$y=۰/۵۲۶x + ۲۳/۱۵$			
-۲/۶۵	-۱/۵۰	۱۹/۴۷	۱۹/۷۰	۰/۹۹۹۳	$y=۴/۱۷۳x + ۱۰/۱۶۹$	۲۰/۰۰	۲۰/۰۰	۱۵
				۰/۹۷۱۴	$y=۰/۸۵۴x + ۳۶/۳۱$			

۳-۱۷- بررسی اثر مزاحمت‌ها در روش‌های اسپکتروفتومتری جدید (RHPSAM ,RD ,CC-SS ,SRS-CM ,SRSM ,EXRSM)

برای بررسی توانایی روش‌ها در اندازه‌گیری همزمان استیل‌سالیسیلیک اسید و آسکوربیک اسید در نمونه‌های حقیقی، اثر مزاحمت گونه‌های مختلف در اندازه‌گیری همزمان استیل‌سالیسیلیک اسید و آسکوربیک اسید مورد بررسی قرار گرفت. روش کار به این صورت بود که میزان جذب محلول ۱۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر

آسکوربیک اسید و ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر استیل سالیسیلیک اسید به ترتیب در طول موج ماکزیمم ۲۴۳ و ۲۷۵ نانومتر در غیاب گونه مزاحم در شرایط بهینه، برای ۶ مرتبه اندازه گیری 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 تجزیه ای و S_A انحراف استاندارد سیگنال تجزیه ای برای هر یک از روش های اسپکتروفتومتری است)؛ سپس برای بررسی اثر مزاحمت احتمالی هر گونه، گونه مورد نظر با نسبت ۱۰۰۰ برابر وزنی - وزنی به نمونه حاوی آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید اضافه گردید. سپس مقدار لازم از این محلول به دستگاه اسپکتروفتومتر منتقل شد و مقدار جذب در طول موج ماکزیمم آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید خوانده شد. در صورت وجود سیگنال در محدوده اطمینان ($\bar{A} \pm 3S_A$)، گونه مورد بررسی مزاحم در نظر گرفته نشد. در غیر این صورت نسبت وزنی گونه مزاحم به غلظت آسکوربیک اسید یا استیل سالیسیلیک اسید آن قدر کاهش داده شد تا سیگنال تجزیه ای در محدوده اطمینان قرار بگیرد. نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۳-۳ آورده شده است.

کاتیون Ag^+ به دلیل حضور آنیون Cl^- در بافر سیتراتی تشکیل رسوب سفید رنگ $AgCl$ می دهد. به منظور رفع مزاحمت ناشی از حضور Ag^+ در محیط، ۲/۰۰ میلی لیتر محلول ۵۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر آسکوربیک اسید و ۲/۰۰ میلی لیتر بافر سیتراتی $pH=2/5$ به همراه ۱۰۰۰/۰ میلی گرم بر لیتر کاتیون Ag^+ به بالن حجمی ۱۰/۰۰ میلی لیتری منتقل و محلول با آب مقطر تا خط نشانه رقیق و یکنواخت گردید.

سپس محلول حاصل به داخل لوله آزمایش منتقل و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ محلول فوقانی را از رسوب جدا کرده و قسمتی از آن به سل دستگاه منتقل شد و نسبت به شاهد طیف گرفته شد. برای رفع مزاحمت Ag^+ در استیل سالیسیلیک اسید هم به همین ترتیب عمل شد با این تفاوت که به جای آسکوربیک اسید، ۲۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر استیل سالیسیلیک اسید به همراه ۲۰۰۰/۰ میلی گرم بر لیتر کاتیون Ag^+ استفاده شد. به این ترتیب مزاحمت کاتیون Ag^+ تا ۱۰۰۰ برابر غلظت داروهای مورد

نظر برطرف شد.

جدول ۳-۳۲: نتایج حاصل از بررسی اثر گونه‌های مزاحم در اندازه‌گیری همزمان آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید با غلظت به ترتیب ۱۰/۰۰ و ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در روش‌های RHPSAM و RD، CC-SS، SRS-CM، SRSM، EXRSM

حد مجاز گونه مزاحم (وزنی-وزنی)	گونه‌های بررسی شده در اندازه‌گیری استیل سالیسیلیک اسید	گونه‌های بررسی شده در اندازه‌گیری آسکوربیک اسید
۱۰۰۰	EDTA, NH_4^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Al^{3+} , Br^- , F^- , Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- , CN^- , H_3PO_4 گلوکز	EDTA, NH_4^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Al^{3+} , Br^- , F^- , Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- , CN^- , H_3PO_4 گلوکز
۸۰۰	ساخارین	-
۲۰۰	-	-
۲۰	Ni^{2+}	ساخارین
۱۰	Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} , NO_2^- , NO_3^- , SCN^-	Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} , NO_2^- , NO_3^- , SCN^-
۱	Cd^{2+} , Ag^+ , فتالات	Cd^{2+} , Ag^+ , فتالات

سپس محلول حاصل به داخل لوله آزمایش منتقل و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ محلول فوقانی را از رسوب جدا کرده و قسمتی از آن به سل دستگاه منتقل شد و نسبت به شاهد طیف گرفته شد. برای رفع مزاحمت Ag^+ در استیل سالیسیلیک اسید هم به همین ترتیب عمل شد با این تفاوت که به جای آسکوربیک اسید، ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر استیل سالیسیلیک اسید به همراه ۲۰۰۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر کاتیون Ag^+ استفاده شد. به این ترتیب مزاحمت کاتیون Ag^+ تا ۱۰۰۰ برابر غلظت داروهای مورد نظر برطرف شد. لازم به ذکر است که می‌توان بافر سیتراتی با استفاده از سدیم سیترات و سیتریک اسید که حاوی یون کلرید نباشد نیز تهیه نمود. که در این صورت بافر حاوی یون کلرید نمی‌شود و یون Ag^+ مزاحمت نخواهد داشت. در روش‌های RHPSAM و CC-SS، RD، SRS-CM، SRSM، EXRSM مزاحمت NO_2^- و NO_3^- ناشی از جذب آن‌ها در دامنه طول‌موج ۲۱۰-۳۲۰ نانومتر است که ناشی از انتقالات n به π^* موجود در ساختار آن است (این انتقالات در ناحیه ۲۰۰-۷۰۰ نانومتر جذب دارند). و

Cd^{2+} ، Ni^{2+} ، Cu^{2+} و Co^{2+} از جمله یون‌های فلزات واسطه هستند و اکثر کمپلکس‌های یون‌های فلزات واسطه در نواحی ماورا بنفش و مرئی جذب دارند [۱۸]. به دلیل وجود حلقه بنزن در ساختار فتالات و ساخارین، این گونه‌ها در دامنه طول‌موج ۲۱۰-۳۲۰ نانومتر دارای جذب هستند و برای هر دو گونه ایجاد مزاحمت می‌کنند و میزان مزاحمت ساخارین برای آسکوربیک‌اسید به دلیل اینکه طول‌موج ماکزیمم آسکوربیک‌اسید و ساخارین در نواحی پایین‌تر است بیشتر می‌باشد. مزاحمت Fe^{2+} و Fe^{3+} ناشی از تشکیل کمپلکس سیترات با یون‌های آهن است که برای رفع آن می‌توان از بافر فسفاتی به جای بافر سیتراتی استفاده کرد. مزاحمت Cu^{2+} ناشی از اکسیداسیون آسکوربیک‌اسید در حضور این یون می‌باشد. بنابراین مزاحمت ناشی از گونه‌های فتالات، ساخارین، Ni^{2+} ، Cu^{2+} ، NO_3^- ، SCN^- ، Co^{2+} ، Cd^{2+} ، NO_2^- از نوع شاهد به حساب می‌آید و قابل بر طرف کردن نیست.

۳-۱۸- حد تشخیص روش‌های **CC-SS**، **SRS-CM**، **SRSM**، **EXRSM**، **RHPSAM**، **RD**،

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

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

$$S_{bl} = \text{انحراف استاندارد سیگنال شاهد}$$

$$m = \text{شیب منحنی کالیبراسیون}$$

$$K = \text{ضریب اطمینان}$$

طبق استدلال کیزر، مقدار منطقی و قابل قبول برای این ضریب ثابت، عدد $K = ۳/۰$ است.

به منظور بررسی حد تشخیص روش‌های EXRSM، SRSM، SRS-CM، CC-SS، RD و RHPSAM، ۱۰ اندازه‌گیری تکراری برای شاهد انجام شد و طیف هر محلول در محدوده طول‌موجی ۲۰۰-۳۲۰ نانومتر ثبت گردید و حد تشخیص استیل‌سالیسیلیک اسید و آسکوربیک اسید با استفاده از روش‌های EXRSM، SRSM، SRS-CM، CC-SS، RD و RHPSAM به دست آمد. در این روش‌ها از تقسیم سه برابر انحراف استاندارد سیگنال شاهد بر شیب منحنی کالیبراسیون، حد تشخیص به دست آمد [۳۷]. با توجه به تعریف فوق، حد تشخیص تجربی روش EXRSM برای آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید به ترتیب ۰/۴۳۵ و ۱/۴۴ میلی‌گرم بر لیتر، حد تشخیص روش SRSM برای آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید به ترتیب ۰/۰۱۹ و ۲/۸۱ میلی‌گرم بر لیتر، حد تشخیص روش SRS-CM برای آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید به ترتیب ۰/۰۱۹ و ۴/۲۰ میلی‌گرم بر لیتر، حد تشخیص روش CC-SS برای آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید به ترتیب ۰/۵۱۹ و ۰/۸۳۳ میلی‌گرم بر لیتر، حد تشخیص روش RD برای آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید به ترتیب ۰/۱۱۵ و ۰/۳۶۳ میلی‌گرم بر لیتر، حد تشخیص روش RHPSAM برای آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید به ترتیب ۰/۲۵۶ و ۱/۳۹ میلی‌گرم بر لیتر به دست آمد.

۳-۱۹- دقت و صحت روش‌های EXRSM، SRSM، SRS-CM، CC-SS، RD و RHPSAM،

برای بررسی دقت و صحت روش‌های EXRSM، SRSM، SRS-CM، CC-SS، RD و RHPSAM، محلول‌هایی با غلظت‌های متفاوت از آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید در شرایط بهینه ساخته شد. برای هر یک از مخلوط‌ها ۵ بار اندازه‌گیری تکراری انجام شد و طیف هر مخلوط در محدوده طول موج

۲۰۰-۳۲۰ نانومتر ثبت گردید؛ سپس غلظت آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید با استفاده از روش‌های EXRSM، SRSM، SRS-CM، CC-SS، RD و RHPSAM تعیین شد. مقادیر انحراف استاندارد در هر حالت محاسبه شد. نتایج حاصل از بررسی برای روش‌های EXRSM، SRSM، SRS-CM، CC-SS، RD و RHPSAM به ترتیب در جدول‌های ۳-۳۴، ۳-۳۵، ۳-۳۶، ۳-۳۷، ۳-۳۸ و ۳-۳۹ آورده شده است که نشان دهنده دقت و صحت خوب این روش‌ها می‌باشد.

جدول ۳-۳۳: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش EXRSM

شماره مخلوط	آسکوربیک اسید موجود (mg/L)	استیل سالیسیلیک اسید موجود (mg/L)	آسکوربیک اسید اندازه‌گیری شده (mg/L)	استیل سالیسیلیک اسید اندازه‌گیری شده (mg/L)	درصد بازیابی آسکوربیک اسید	درصد بازیابی استیل سالیسیلیک اسید
۱	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۵/۱۶±(۰/۱)*	۹/۵۵±(۰/۴)*	۱۰۳/۲	۹۴/۸
۲	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰/۰۴±(۰/۴)	۱۰/۰۰±(۰/۲)	۱۰۰/۴	۱۰۰/۰
۳	۱۰/۰۰	۱۵/۰۰	۱۰/۱۰±(۰/۲)	۱۴/۷۰±(۰/۴)	۱۰۱/۰	۹۸/۲۶
۴	۵/۰۰	۱۵/۰۰	۴/۶۳±(۰/۳)	۱۴/۸۸±(۰/۵)	۹۲/۶۰	۹۹/۲۰
۵	۲۰/۰۰	۲۵/۰۰	۱۹/۸۹±(۰/۲)	۲۵/۱۲±(۰/۴)	۹۹/۴۵	۱۰۰/۴
۶	۳۰/۰۰	۳۰/۰۰	۲۹/۷۶±(۰/۶)	۳۰/۰۲±(۰/۱)	۹۹/۲۰	۱۰۰/۰

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

جدول ۳-۳۴: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش SRSM

شماره مخلوط	آسکوربیک اسید موجود (mg/L)	استیل سالیسیلیک اسید موجود (mg/L)	آسکوربیک اسید اندازه‌گیری شده (mg/L)	استیل سالیسیلیک اسید اندازه‌گیری شده (mg/L)	درصد بازیابی آسکوربیک اسید	درصد بازیابی استیل سالیسیلیک اسید
۱	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۴/۹۳±(۰/۳)*	۱۰/۰۸±(۰/۱)*	۹۸/۶	۱۰۰/۸
۲	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰/۱۷±(۰/۲)	۱۰/۰۰±(۰/۴)	۱۰۱/۷	۱۰۰/۹
۳	۱۰/۰۰	۱۵/۰۰	۱۰/۰۸±(۰/۱)	۱۵/۱۲±(۰/۴)	۱۰۰/۸	۱۰۰/۸
۴	۵/۰۰	۱۵/۰۰	۴/۸۴±(۰/۲)	۱۵/۱۲±(۰/۷)	۹۶/۸۰	۱۰۰/۸
۵	۲۰/۰۰	۲۵/۰۰	۲۰/۱۰±(۰/۳)	۲۴/۹۱±(۰/۵)	۱۰۰/۵	۹۹/۶۴
۶	۳۰/۰۰	۳۰/۰۰	۲۹/۸۱±(۰/۴)	۳۰/۰۱±(۰/۲)	۹۹/۳۶	۱۰۰/۰۳

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

جدول ۳-۳۵: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش SRS-CM

شماره مخلوط	آسکوربیک اسید موجود (mg/L)	استیل سالیسیلیک / اسید موجود (mg/L)	آسکوربیک اسید اندازه گیری شده (mg/L)	استیل سالیسیلیک / اسید اندازه گیری شده (mg/L)	درصد بازایی آسکوربیک اسید	درصد بازایی استیل سالیسیلیک / اسید
۱	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۴/۹۳ ± (۰/۳)*	۹/۹۳ ± (۰/۲)*	۹۸/۶	۹۹/۳۰
۲	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰/۱۷ ± (۰/۲)	۱۰/۰۸ ± (۰/۳)	۱۰۱/۷	۱۰۰/۰۸
۳	۱۰/۰۰	۱۵/۰۰	۱۰/۰۸ ± (۰/۱)	۱۵/۱۶ ± (۰/۳)	۱۰۰/۰۸	۱۰۱/۰۶
۴	۵/۰۰	۱۵/۰۰	۴/۸۴ ± (۰/۲)	۱۵/۵۷ ± (۰/۷)	۹۶/۸۰	۱۰۳/۸
۵	۲۰/۰۰	۲۵/۰۰	۲۰/۱۰ ± (۰/۳)	۲۴/۹۰ ± (۰/۴)	۱۰۰/۵	۹۹/۶۰
۶	۳۰/۰۰	۳۰/۰۰	۲۹/۸۱ ± (۰/۴)	۳۰/۰۰ ± (۰/۱)	۹۹/۳۶	۱۰۰/۰

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

جدول ۳-۳۶: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش CC-SS

شماره مخلوط	آسکوربیک اسید موجود (mg/L)	استیل سالیسیلیک / اسید موجود (mg/L)	آسکوربیک اسید اندازه گیری شده (mg/L)	استیل سالیسیلیک / اسید اندازه گیری شده (mg/L)	درصد بازایی آسکوربیک اسید	درصد بازایی استیل سالیسیلیک / اسید
۱	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۵/۰۲ ± (۰/۱)*	۱۰/۱۱ ± (۰/۲)*	۱۰۰/۴	۱۰۱/۱
۲	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۹/۹۵ ± (۰/۳)	۹/۸۳ ± (۰/۳)	۹۹/۵۰	۹۸/۳۰
۳	۵/۰۰	۱۵/۰۰	۴/۹۱ ± (۰/۵)	۱۴/۸۸ ± (۰/۲)	۹۸/۲۰	۹۹/۲۰
۴	۱۰/۰۰	۱۵/۰۰	۱۰/۰۸ ± (۰/۱)	۱۵/۶۰ ± (۰/۶)	۱۰۰/۰۸	۱۰۴/۰۰
۵	۲۰/۰۰	۲۵/۰۰	۱۹/۸۱ ± (۰/۲)	۲۴/۹۱ ± (۰/۳)	۹۹/۰۵	۹۹/۶۴
۶	۳۰/۰۰	۳۰/۰۰	۲۹/۸۰ ± (۰/۵)	۲۹/۹۷ ± (۰/۲)	۹۹/۳۳	۹۹/۹۰

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

جدول ۳-۳۷: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش RD

شماره مخلوط	آسکوربیک اسید موجود (mg/L)	استیل سالیسیلیک / اسید موجود (mg/L)	آسکوربیک اسید اندازه گیری شده (mg/L)	استیل سالیسیلیک / اسید اندازه گیری شده (mg/L)	درصد باز یابی آسکوربیک اسید	درصد باز یابی سالیسیلیک / اسید
۱	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۴/۸۹ ± (۰/۳)*	۱۰/۰۲ ± (۰/۱)*	۹۷/۸۰	۱۰۰/۲۰
۲	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰/۱۴ ± (۰/۳)	۱۰/۰۲ ± (۰/۲)	۱۰۱/۴	۱۰۰/۲
۳	۱۰/۰۰	۱۵/۰۰	۹/۹۵ ± (۰/۱)	۱۴/۹۱ ± (۰/۲)	۹۹/۵۰	۹۹/۴۰
۴	۵/۰۰	۱۵/۰۰	۴/۸۴ ± (۰/۳)	۱۵/۴۰ ± (۰/۶)	۹۶/۸۰	۱۰۲/۶
۵	۲۰/۰۰	۲۵/۰۰	۱۹/۷۹ ± (۰/۴)	۲۵/۰۴ ± (۰/۱)	۹۸/۹۵	۱۰۰/۱
۶	۳۰/۰۰	۳۰/۰۰	۲۹/۸۱ ± (۰/۴)	۳۰/۰۳ ± (۰/۲)	۹۹/۳۶	۱۰۰/۱۰

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

جدول ۳-۳۸: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش RHPSAM

شماره مخلوط	آسکوربیک اسید موجود (mg/L)	استیل سالیسیلیک / اسید موجود (mg/L)	آسکوربیک اسید اندازه گیری شده (mg/L)	استیل سالیسیلیک / اسید اندازه گیری شده (mg/L)	درصد باز یابی آسکوربیک اسید	درصد باز یابی سالیسیلیک / اسید
۱	۳/۰۰	۱۵/۰۰	۲/۹۱ ± (۰/۲)	۱۴/۷۳ ± (۰/۵)	۹۷/۰۰	۹۸/۲۰
۲	۱۵/۰۰	۱۰/۰۰	۱۴/۹۳ ± (۰/۴)	۱۰/۳۳ ± (۰/۷)	۹۵/۵۳	۱۰۳/۳

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

۳-۲۰- کاربرد روش های RD، CC-SS، SRS-CM، SRSM، EXRSM

و RHPSAM در آنالیز نمونه های حقیقی

به منظور ارزیابی توانایی روش های RD، CC-SS، SRS-CM، SRSM، EXRSM و RHPSAM در

اندازه گیری همزمان آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید، اندازه گیری مقادیر ترکیبات ذکر شده در

نمونه قرص سنتزی و نمونه آب شهر شاهرود به عنوان بافت ثابت نمونه ها استفاده شد.

۳-۲۰-۱- کاربرد روش های RD، CC-SS، SRS-CM، SRSM، EXRSM و

RHPSAM در آنالیز نمونه قرص سنتزی

لازم به توضیح است که نمونه قرص حاوی آسپرین و ویتامین C- به نام قرص Asprin plus C در شرکت های دارویی کشورهای خارجی تولید می شود. در این بررسی قرص سنتزی بر اساس ترکیب درصد این دو دارو در نمونه قرص خارجی (۴۰۰ میلی گرم استیل سالیسیلیک اسید و ۲۴۰ میلی گرم آسکوربیک اسید) تهیه گردید.

برای تهیه محلول قرص آسپرین، ابتدا چهار عدد قرص آسپرین (۱۰۰ میلی گرم) با دقت وزن و کاملاً پودر گردید و $\frac{1}{4}$ آن به یک بشر ۱۰۰ میلی لیتری انتقال داده شد و سپس به آن ۱۰/۰۰ میلی لیتر HCl یک مولار و ۵۰ میلی لیتر آب مقطر افزوده شد. پس از انحلال کامل محلول صاف گردید و محلول زیر صافی به طور کمی یک بالن حجمی ۱۰۰/۰۰ میلی لیتری انتقال داده شد و با آب مقطر به حجم رسانده و یکنواخت شد.

سپس از محلول تهیه شده ۱۰/۰۰ میلی لیتر برداشته و به یک بالن حجمی ۱۰۰/۰۰ میلی لیتری منتقل شد و با آب مقطر به حجم رسانده و یکنواخت شد. سپس ۱/۰۰ میلی لیتر از این محلول به همراه حجم هایی از محلول های خالص استاندارد استیل سالیسیلیک اسید و ۲/۰۰ میلی لیتر بافر سیتراتی با $pH=2/5$ به بالن حجمی ۱۰/۰۰ میلی لیتری انتقال داده و با آب مقطر به حجم رسانده و یکنواخت شد. و طیف آن ها نسبت به محلول شاهد (که ۲/۰۰ میلی لیتر بافر سیتراتی با $pH=2/5$ به بالن حجمی ۱۰/۰۰ میلی لیتری اضافه گردید و با آب مقطر به حجم رسانده شد و یکنواخت گردید) در محدوده ۲۰۰-۳۲۰ نانومتر ثبت و ذخیره گردید و سپس اندازه گیری آسپرین به روش افزایش استاندارد (یا منحنی کالیبراسیون) تعیین گردید. مقادیر t محاسبه شده و درصد های بازیابی در جدول ۳-۴۰ نشان دهنده صحت خوب روش برای تعیین آسپرین در

نمونه قرص می باشد.

جدول ۳-۳۹: نتایج حاصل از اندازه گیری آسپرین در نمونه قرص

مقدار ASA در قرص (mg)	درصد بازیابی	مقدار t محاسبه شده	غلظت ASA به دست آمده (mg/L)	غلظت ASA افزوده شده به محلول قرص (mg/L)
۹۹/۱۰±(۰/۸)	۰/۰	۲/۵۰	۹/۹۱±(۰/۰)	۰/۰
	۹۸/۶۰	۰/۸۹۴	۱۴/۸۴±(۰/۴)	۵/۰۰
	۱۰۰/۲	۱/۰۸	۱۹/۹۳±(۰/۱)	۱۰/۰۰

برای تهیه محلول قرص آسکوربیک اسید به این ترتیب عمل شد: چهار عدد قرص ویتامین C (۲۵۰ میلی گرم) با دقت وزن و کاملاً پودر گردید. و $\frac{1}{4}$ وزن قرص‌ها به یک بشر ۱۰۰ میلی لیتری انتقال داده شد و ۵۰ میلی لیتر آب مقطر افزوده شد. پس از انحلال کامل محلول صاف گردید و محلول زیر صافی به طور کمی یک بالن حجمی ۱۰۰/۰۰ میلی لیتری انتقال داده شد و با آب مقطر به حجم رسانده و یکنواخت شد. از محلول ویتامین C- تهیه شده، ۲/۰۰ میلی لیتر به یک بالن حجمی ۱۰۰/۰۰ میلی لیتری منتقل شد و با آب مقطر به حجم رسانده و یکنواخت شد و سپس ۱/۰۰ میلی لیتر از این محلول به همراه حجم هایی از محلول های خالص استاندارد آسکوربیک اسید و ۲/۰۰ میلی لیتر بافر سیتراتی با pH= ۲/۵ به بالن حجمی ۱۰/۰۰ میلی لیتری انتقال داده و با آب مقطر به حجم رسانده و یکنواخت شد. و طیف آن ها نسبت به محلول شاهد (که ۲/۰۰ میلی لیتر بافر سیتراتی با pH= ۲/۵ به بالن حجمی ۱۰/۰۰ میلی لیتری اضافه گردید و با آب مقطر به حجم رسانده شد و یکنواخت گردید) در محدوده ۲۰۰-۳۲۰ نانومتر ثبت و ذخیره گردید و سپس اندازه گیری ویتامین C- به روش افزایش استاندارد (یا منحنی کالیبراسیون) تعیین گردید. مقادیر t محاسبه شده و درصد های بازیابی در جدول ۳-۴۱ نشان دهنده صحت خوب روش برای تعیین آسپرین در نمونه قرص می باشد.

جدول ۳-۴۰: نتایج حاصل از اندازه گیری ویتامین C در نمونه قرص

غلظت ASA افزوده شده به محلول قرص (mg/L)	غلظت ASA به دست آمده (mg/L)	مقدار t محاسبه شده	درصد بازیابی	مقدار ASA در قرص (mg)
۰/۰	۴/۸۹±(۰/۱)	۲/۰۴	۰/۰	۲۴۴/۵±(۶/۰)
۵/۰۰	۹/۹۸±(۰/۱)	۰/۴۳	۱۰۱/۸	
۱۰/۰۰	۱۴/۹۹±(۰/۱)	۰/۰۵	۱۰۱/۰	

سپس برای تهیه محلول‌های مخلوط سنتزی دو دارو، ۱/۰۰ میلی‌لیتر از محلول اولیه قرص آسپرین و ۲/۰۰ میلی‌لیتر از محلول مادر ویتامین C به یک بالن حجمی ۱۰۰/۰۰ میلی‌لیتری منتقل شد و با آب مقطر به حجم رسانده و یکنواخت شد و ۱/۰۰ میلی‌لیتر از این محلول مخلوط ساخته شده به همراه ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر سیتراتی با pH= ۲/۵ به بالن حجمی ۱۰/۰۰ میلی‌لیتری انتقال داده و با آب مقطر به حجم رسانده و یکنواخت شد. سپس طیف آن نسبت به محلول شاهد (که ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر سیتراتی با pH= ۲/۵ به بالن حجمی ۱۰/۰۰ میلی‌لیتری اضافه گردید و با آب مقطر به حجم رسانده شد و یکنواخت گردید) در محدوده ۲۰۰-۳۲۰ نانومتر ثبت و ذخیره گردید. سپس غلظت آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید در مخلوط‌های تهیه شده، با استفاده از روش افزایش استاندارد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از ۵ اندازه‌گیری تکراری برای روش EXRSM در جدول ۳-۴۲، روش SRSM در جدول ۳-۴۳، روش SRS- CM در جدول ۳-۴۴، روش CC-SS در جدول ۳-۴۵ و روش RD در جدول ۳-۴۶ آورده شده است. نتایج به دست آمده نشان می‌دهند که می‌توان غلظت استیل‌سالیسیلیک اسید و آسکوربیک اسید را به‌طور همزمان به روش‌های EXRSM، SRSM، SRS-CM، CC-SS، RD و RHPSAM در نمونه‌های قرص آسپرین C - با دقت و صحت خوبی تعیین کرد.

جدول ۳-۴۱: نتایج حاصل از اندازه‌گیری دو گونه در نمونه قرص به روش EXRSM

درصد بازیابی (mg/L)		مقدار اندازه‌گیری شده (mg/L)		مقدار افزوده شده (mg/L)	
ASA	AA	ASA	AA	ASA	AA
-	-	۹/۹۳± (۰/۵) *	۵/۰۴±(۰/۱)*	۰/۰۰	۰/۰۰
-	۹۶/۸	۱۰/۳۳±(۰/۴)	۹/۸۸±(۰/۲)	۰/۰۰	۵/۰۰
-	۹۹/۲۰	۱۰/۰۸±(۰/۲)	۱۴/۹۶±(۰/۲)	۰/۰۰	۱۰/۰۰
۱۰۵/۸	-	۱۵/۲۲±(۰/۶)	۵/۰۱±(۰/۱)	۵/۰۰	۰/۰۰
۱۰۶/۳	-	۲۰/۵۶±(۰/۲)	۵/۰۵±(۰/۱)	۱۰/۰۰	۰/۰۰
-	۱۰۱/۹	۹/۹۸±(۰/۳)	۲۰/۳۲±(۰/۴)	۰/۰۰	۱۵/۰۰
۹۹/۳	-	۲۴/۸۳±(۰/۴)	۵/۰۳ ±(۰/۱)	۱۵/۰۰	۰/۰۰

* پراوتز انحراف استاندارد حاصل از ۵ بار اندازه‌گیری تکراری است.

جدول ۳-۴۲: نتایج حاصل از اندازه‌گیری دو گونه در نمونه قرص به روش SRSM

درصد بازیابی (mg/L)		مقدار اندازه‌گیری شده (mg/L)		مقدار افزوده شده (mg/L)	
ASA	AA	ASA	AA	ASA	AA
-	-	۱۰/۰۸± (۰/۳)*	۴/۸۱±(۰/۳)*	۰/۰۰	۰/۰۰
-	۹۶/۴	۱۰/۲۵±(۰/۱)	۹/۶۳ ±(۰/۳)	۰/۰۰	۵/۰۰
-	۱۰۰/۹	۱۰/۱۸±(۰/۲)	۱۴/۹۰±(۰/۱)	۰/۰۰	۱۰/۰۰
۱۰۲/۲	-	۱۵/۱۹±(۰/۲)	۵/۰۱±(۰/۱)	۵/۰۰	۰/۰۰
۱۰۳/۸	-	۲۰/۴۶±(۰/۵)	۵/۰۰±(۰/۱)	۱۰/۰۰	۰/۰۰
-	۱۰۶/۲	۹/۸۹±(۰/۳)	۲۰/۱۲±(۰/۴)	۰/۰۰	۱۵/۰۰
۹۸/۱	-	۲۴/۸۰±(۰/۲)	۵/۰۴ ±(۰/۲)	۱۵/۰۰	۰/۰۰

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

جدول ۳-۴۳: نتایج حاصل از اندازه‌گیری دو گونه در نمونه قرص به روش SRS-CM

درصد بازیابی (mg/L)		مقدار اندازه‌گیری شده (mg/L)		مقدار افزوده شده (mg/L)	
ASA	AA	ASA	AA	ASA	AA
-	-	۱۰/۱۰ ± (۰/۲)	۴/۸۱ ± (۰/۳)*	۰/۰۰	۰/۰۰
-	۹۶/۴	۱۰/۳۰ ± (۰/۴)	۹/۶۳ ± (۰/۳)	۰/۰۰	۵/۰۰
-	۱۰۰/۹	۱۰/۱۰ ± (۰/۵)	۱۴/۹۰ ± (۰/۱)	۰/۰۰	۱۰/۰۰
۱۰۲/۰	-	۱۵/۲۰ ± (۰/۲)	۵/۰۱ ± (۰/۱)	۵/۰۰	۰/۰۰
۱۰۱/۶	-	۲۰/۲۶ ± (۰/۳)	۵/۰۰ ± (۰/۱)	۱۰/۰۰	۰/۰۰
-	۱۰۶/۲	۱۹/۶۶ ± (۰/۵)	۲۰/۱۲ ± (۰/۴)	۰/۰۰	۱۵/۰۰
۹۸/۳	-	۲۴/۸۴ ± (۰/۳)	۵/۰۴ ± (۰/۲)	۱۵/۰۰	۰/۰۰

* پیرانتز انحراف استاندارد حاصل از ۵ بار اندازه‌گیری تکراری است.

جدول ۳-۴۴: نتایج حاصل از اندازه‌گیری دو گونه در نمونه قرص به روش CC-SS

درصد بازیابی (mg/L)		مقدار اندازه‌گیری شده (mg/L)		مقدار افزوده شده (mg/L)	
ASA	AA	ASA	AA	ASA	AA
-	-	۱۰/۰۷ ± (۰/۲)	۵/۰۴ ± (۰/۱)*	۰/۰۰	۰/۰۰
-	۱۰۲/۸	۱۰/۳۷ ± (۰/۵)	۱۰/۱۸ ± (۰/۴)	۰/۰۰	۵/۰۰
-	۱۰۱/۲	۹/۷۸ ± (۰/۱)	۱۵/۱۶ ± (۰/۴)	۰/۰۰	۱۰/۰۰
۹۸/۶۶	-	۱۴/۸۲ ± (۰/۳)	۴/۸۵ ± (۰/۵)	۵/۰۰	۰/۰۰
۱۰۳/۶	-	۲۰/۴۳ ± (۰/۴)	۴/۹۶ ± (۰/۲)	۱۰/۰۰	۰/۰۰
-	۱۰۰/۵	۹/۸۷ ± (۰/۴)	۲۰/۱۲ ± (۰/۶)	۰/۰۰	۱۵/۰۰
۱۰۱/۴	-	۲۵/۳۱ ± (۰/۳)	۵/۰۱ ± (۰/۲)	۱۵/۰۰	/۰۰

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

جدول ۳-۴۵: نتایج حاصل از اندازه‌گیری دو گونه در نمونه قرص به روش RD

درصد بازیابی (mg/L)		مقدار اندازه‌گیری شده (mg/L)		مقدار افزوده شده (mg/L)	
ASA	AA	ASA	AA	ASA	AA
-	-	۹/۹۶±(۰/۵)*	۵/۰۴±(۰/۱)*	۰/۰۰	۰/۰۰
-	۹۶/۸	۱۰/۳۳±(۰/۴)	۹/۸۸±(۰/۲)	۰/۰۰	۵/۰۰
-	۹۹/۲	۱۰/۲۲±(۰/۲)	۱۴/۹۶±(۰/۲)	۰/۰۰	۱۰/۰۰
۱۰۵/۲	-	۱۵/۲۲±(۰/۶)	۵/۰۱±(۰/۱)	۵/۰۰	۰/۰۰
۱۰۶/۰	-	۲۰/۵۶±(۰/۲)	۵/۰۵±(۰/۱)	۱۰/۰۰	۰/۰۰
-	۱۰۱/۹	۹/۹۳±(۰/۳)	۲۰/۳۲±(۰/۴)	۰/۰۰	۱۵/۰۰
۹۹/۱	-	۲۴/۸۳±(۰/۴)	۲۰/۱۲±(۰/۱)	۱۵/۰۰	۰/۰۰

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

۳-۲۰-۲- کاربرد روش‌های EXRSM، SRSM، SRS-CM، CC-SS، RD و

RHPSAM در آنالیز نمونه آب شهر شاهرود

برای تهیه نمونه‌های حقیقی از آب شهر شاهرود به این صورت عمل شد که؛ ابتدا ۱۰/۰۰ میلی لیتر محلول ۵۰۰/۰ میلی گرم بر لیتر آسکوربیک اسید به یک بالن حجمی ۱۰۰/۰ میلی لیتری به همراه ۶۰ میلی لیتر آب شهر انتقال داده شد و با آب مقطر به حجم رسانده شد. و ۱۰/۰۰ میلی لیتر محلول ۵۰۰/۰ میلی گرم بر لیتر استیل سالیسیلیک اسید به یک بالن حجمی ۱۰۰/۰ میلی لیتری به همراه ۶۰ میلی لیتر آب شهر انتقال داده شد و با آب مقطر به حجم رسانده شد. سپس از این محلول‌ها، مخلوط‌هایی با نسبت‌های غلظتی مختلف از آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید به همراه ۲/۰۰ میلی لیتر بافر سیتراتی با pH= ۲/۵ به بالن حجمی ۱۰/۰۰ میلی لیتری تهیه و طیف آن‌ها نسبت به شاهد ثبت و ذخیره گردید.

سپس غلظت آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید در مخلوط‌های تهیه شده، با استفاده از روش

افزایش استاندارد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از ۵ بار اندازه‌گیری تکراری برای کاربرد روش‌های EXRSM، SRS-CM، SRS-CM، CC-SS و RHPSAM به ترتیب در جدول‌های ۳-۴۸، ۳-۴۹، ۳-۵۰، ۳-۵۱ و ۳-۵۲ آورده شده است. این نتایج نشان می‌دهد که می‌توان غلظت آسکوربیک اسید و استیل-سالیسیلیک اسید را به طور همزمان به روش‌های EXRSM، SRS-CM، SRS-CM و CC-SS در نمونه‌های آب شهر با دقت و صحت خوبی تعیین کرد.

جدول ۳-۴۶: نتایج حاصل از اندازه‌گیری آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید در اندازه‌گیری نمونه آب شهر شاهرود در

روش EXRSM

درصد بازیابی (mg/L)		مقدار اندازه‌گیری شده (mg/L)		مقدار افزوده شده (mg/L)		شماره مخلوط
ASA	AA	ASA	AA	ASA	AA	
-	-	کمتر از LOD روش	کمتر از LOD روش	۰/۰۰	۰/۰۰	۱
۹۹/۴	۱۰۷/۱	۱۴/۹۲±(۰/۳)*	۶/۴۳±(۰/۵)*	۱۵/۰۰	۶/۰۰	۲
۱۰۰/۴	۹۶/۵	۲۰/۰۹±(۰/۳)	۵/۷۹±(۰/۲)	۲۰/۰۰	۶/۰۰	۳
۹۲/۸	۱۰۰/۹	۹/۲۸±(۰/۶)	۲۰/۱۹±(۰/۲)	۱۰/۰۰	۲۰/۰۰	۴
۱۰۰/۱	۱۰۲/۳	۱۳/۰۲±(۰/۲)	۳/۰۷±(۰/۵)	۱۳/۰۰	۳/۰۰	۵
۹۷/۷۰	۹۸/۰۰	۹/۷۷±(۰/۴)	۲/۹۴±(۰/۱)	۱۰/۰۰	۳/۰۰	۶
۱۰۰/۱	۹۹/۱۳	۱۵/۰۲±(۰/۵)	۱۴/۸۷±(۰/۳)	۱۵/۰۰	۱۵/۰۰	۷

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

جدول ۳-۴۷: نتایج حاصل از اندازه‌گیری آسکوربیک اسید و استیل‌سالسیلیک اسید در اندازه‌گیری نمونه آب شهر در روش SRSM

شماره مخلوط	مقدار افزوده شده (mg/L)		مقدار اندازه‌گیری شده (mg/L)		درصد بازیابی (mg/L)	
	آسکوربیک اسید	استیل سالسیلیک اسید	آسکوربیک اسید	استیل سالسیلیک اسید	آسکوربیک اسید	استیل سالسیلیک اسید
۱	۰/۰۰	۰/۰۰	کمتر از LOD روش	کمتر از LOD روش	-	-
۲	۶/۰۰	۱۵/۰۰	۶/۲۲ ± (۰/۲)*	۱۵/۰۵ ± (۰/۲)*	۱۰۷/۱	۹۹/۵
۳	۶/۰۰	۲۰/۰۰	۵/۹۲ ± (۰/۱)	۱۹/۷۳ ± (۰/۲)	۹۶/۵	۱۰۰/۴
۴	۲۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۹/۹۶ ± (۰/۳)	۹/۸۵ ± (۰/۳)	۹۹/۸	۹۸/۵
۵	۳/۰۰	۱۳/۰۰	۲/۹۲ ± (۰/۱)	۱۲/۸۳ ± (۰/۴)	۱۰۲/۳	۱۰۰/۱
۶	۳/۰۰	۱۰/۰۰	۳/۰۲ ± (۰/۲)	۹/۸۸ ± (۰/۳)	۱۰۰/۷	۹۸/۸۰
۷	۱۵/۰۰	۱۵/۰۰	۱۴/۹۲ ± (۰/۳)	۱۵/۲۲ ± (۰/۴)	۹۹/۵	۱۰۱/۵

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

جدول ۳-۴۸: نتایج حاصل از اندازه‌گیری آسکوربیک اسید و استیل‌سالسیلیک اسید در اندازه‌گیری نمونه آب شهر در روش SRS-CM

شماره مخلوط	مقدار افزوده شده (mg/L)		مقدار اندازه‌گیری شده (mg/L)		درصد بازیابی (mg/L)	
	آسکوربیک اسید	استیل سالسیلیک اسید	آسکوربیک اسید	استیل سالسیلیک اسید	آسکوربیک اسید	استیل سالسیلیک اسید
۱	۰/۰۰	۰/۰۰	کمتر از LOD روش	کمتر از LOD روش	-	-
۲	۶/۰۰	۱۵/۰۰	۶/۲۲ ± (۰/۲)*	۱۴/۸۵ ± (۰/۲)*	۱۰۷/۱	۹۹/۰
۳	۶/۰۰	۲۰/۰۰	۵/۹۲ ± (۰/۱)	۱۹/۶۶ ± (۰/۵)	۹۶/۵	۹۸/۳
۴	۲۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۹/۹۶ ± (۰/۳)	۹/۷۵ ± (۰/۵)	۹۹/۸	۹۷/۵
۵	۳/۰۰	۱۳/۰۰	۲/۹۲ ± (۰/۱)	۱۳/۱۳ ± (۰/۳)	۱۰۲/۳	۱۰۱/۰
۶	۳/۰۰	۱۰/۰۰	۳/۰۲ ± (۰/۲)	۹/۸۹ ± (۴۰)	۱۰۰/۷	۹۸/۹
۷	۱۵/۰۰	۱۵/۰۰	۱۴/۹۲ ± (۰/۳)	۱۴/۹۱ ± (۰/۴)	۹۹/۵	۹۹/۴

جدول ۳-۴۹: نتایج حاصل از اندازه‌گیری آسکوربیک اسید و استیل‌سالسیلیک اسید در اندازه‌گیری آب شهر در روش CC-SS

درصد بازیابی (mg/L)		مقدار اندازه‌گیری شده (mg/L)		مقدار افزوده شده (mg/L)		شماره مخلوط
ASA	AA	ASA	AA	ASA	AA	
-	-	کمتر از LOD روش	کمتر از LOD روش	۰/۰۰	۰/۰۰	۱
۹۸/۷	۹۷/۰	۱۴/۸۰ ± (۰/۳)*	۵/۸۲ ± (۰/۲)*	۱۵/۰۰	۶/۰۰	۲
۹۸/۷	۹۷/۰	۱۹/۷۳ ± (۰/۴)	۵/۸۲ ± (۰/۲)	۲۰/۰۰	۶/۰۰	۳
۹۸/۴	۱۰۰/۸	۹/۸۴ ± (۰/۵)	۲۰/۱۶ ± (۰/۴)	۱۰/۰۰	۲۰/۰۰	۴
۹۸/۷	۱۰۴/۰	۱۲/۸۳ ± (۰/۴)	۳/۱۲ ± (۰/۱)	۱۳/۰۰	۳/۰۰	۵
۱۰۰/۹	۹۷/۰	۱۰/۰۹ ± (۰/۲)	۲/۹۱ ± (۰/۱)	۱۰/۰۰	۳/۰۰	۶
۱۰۰/۷	۹۸/۸	۱۵/۱۱ ± (۰/۴)	۱۴/۸۲ ± (۰/۴)	۱۵/۰۰	۱۵/۰۰	۷

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

جدول ۳-۵۰: نتایج حاصل از اندازه‌گیری آسکوربیک اسید و استیل‌سالسیلیک اسید در نمونه آب شهر در روش

RHPSAM

درصد بازیابی (mg/L)		مقدار اندازه‌گیری شده (mg/L)		مقدار افزوده شده (mg/L)		شماره مخلوط
ASA	AA	ASA	AA	ASA	AA	
-	-	کمتر از LOD روش	کمتر از LOD روش	۰/۰۰	۰/۰۰	۱
۹۲/۴	۹۸/۰	۹/۲۴ ± (۰/۶۴)*	۴/۹۰ ± (۰/۹۲)*	۱۰/۰۰	۵/۰۰	۲
۹۸/۸۵	۱۰۲/۶	۱۹/۷۷ ± (۰/۳)	۵/۱۳ ± (۰/۲)	۲۰/۰۰	۵/۰۰	۳
۱۰۰/۱	۱۰۲/۹	۲۰/۰۳ ± (۰/۴)	۱۰/۲۹ ± (۰/۴)	۲۰/۰۰	۱۰/۰۰	۴
۱۰۳/۶	۹۵/۵۳	۲۰/۷۲ ± (۰/۹)	۱۴/۳۳ ± (۰/۶)	۲۰/۰۰	۱۵/۰۰	۵

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

فصل چہارم:

بحث و نتیجہ گیری

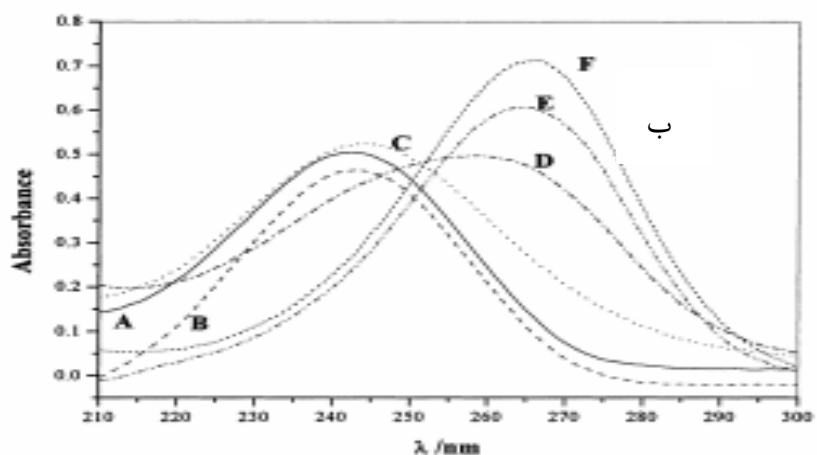
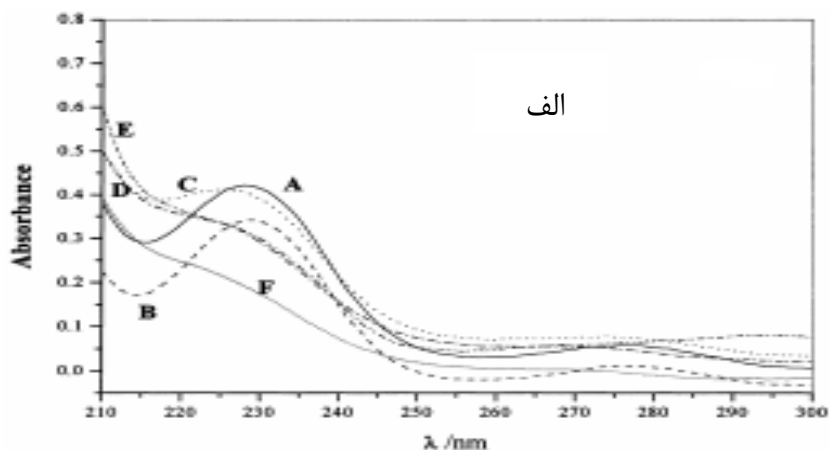
۴-۱- اندازه‌گیری همزمان آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید در مخلوط دوتایی آن‌ها با استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری

۴-۱-۱- بررسی و بهینه‌سازی پارامترهای تجربی

اثر pH در ناحیه ۹/۰-۱/۰ برای مخلوط آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۳-۲ و شکل ۳-۲ آورده شده است. برای آسکوربیک اسید در pH ۴/۰۰ و بالاتر، طول موج ماکزیمم از ۲۴۳ نانومتر به ۲۶۳ نانومتر انتقال می‌یابد که این جا به جایی طول موج ناشی از اکسید شدن آسکوربیک اسید و تبدیل آن به دهیدروآسکوربیک اسید است (شکل ۴-۱ب) [۳۶و۱].

برای استیل‌سالیسیلیک اسید هم استفاده از pH های بالای ۴/۰۰ مناسب نمی‌باشد زیرا این ترکیب در این pH ها هیدرولیز می‌شود و طیف جذبی آن در pH های بالای ۴/۰۰ در طول موج‌های ۲۵۰ نانومتر به بعد جذب صفر را نشان می‌دهد (شکل ۴-۱الف) [۳۶و۱].

هم‌چنین مشخص گردید، میزان جذب برای آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید در pH های ۱/۰۰ تا ۳/۰۰ بیشترین مقدار را دارد، به همین جهت با در نظر گرفتن حساسیت و گزینش‌پذیری، محلول بافری با pH= ۲/۵ به عنوان pH بهینه انتخاب گردید.



شکل ۴-۱: اثر pH بر شکل طیف جذبی استیل سالیسیلیک اسید (الف) و آسکوربیک اسید (ب)

(pH:A.1/08, B.2/11, C.3/37,D. 4/12, E.5/00, F.5/51)

اثر نوع بافر بر جذب آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید توسط بافرهای فسفات و سیتراتی با pH= ۲/۵ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۳-۳ نشان داد که با استفاده از میزان جذب آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید در هر دو بافر یکسان است. برای کاهش مزاحمت احتمالی گونه‌های مختلف، بافر سیتراتی با pH= ۲/۵ به عنوان بافر بهینه انتخاب گردید.

اثر حجم بافر سیتراتی با pH= ۲/۵ در دامنه ۵/۰۰ - ۰/۵۰ میلی لیتر از بافر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۳-۴ و شکل ۳-۳ نشان می‌دهند که میزان جذب داروها در حجم‌های مختلف از بافر سیتراتی ثابت است. برای اطمینان از کافی بودن ظرفیت بافری، حجم ۲/۰۰ میلی لیتر از بافر

سیتراتی انتخاب شد.

اثر قدرت یونی بر حساسیت، در شرایط بهینه و با استفاده از پتاسیم کلرید در محدوده‌ی ۰/۰۰ تا ۰/۵۰ مولار مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۳-۵ و شکل ۳-۴ نشان می‌دهند که قدرت یونی تأثیری بر میزان جذب آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید و حساسیت روش‌ها ندارد. عدم تأثیر حجم بافر بر سیگنال تجزیه‌ای هر دو گونه، تایید کننده عدم تأثیر قدرت یونی بر سیگنال تجزیه‌ای هر دو گونه است.

۴-۱-۲- ارقام شایستگی روش‌ها

بررسی‌ها نشان داد که رابطه خطی بین سیگنال اندازه‌گیری شده و غلظت محاسبه شده آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید در مخلوط‌ها برای روش‌های EXRSM، SRS-M، SRS-CM، CC-SS و RD به ترتیب در محدوده غلظتی ۲/۰۰-۳۰/۰۰ و ۱۰/۰۰-۳۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، و برای روش RHPSAM به ترتیب در محدوده غلظتی ۳/۰۰-۲۵/۰۰ و ۱۰/۰۰-۲۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر وجود دارد. نتایج حاصل از پیش‌بینی غلظت آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید برای محلول‌های سری تست در روش‌های EXRSM، SRS-M، SRS-CM، CC-SS، RD و RHPSAM به ترتیب در جدول‌های ۳-۱۲، ۳-۱۵، ۳-۱۸، ۳-۲۳ و ۳-۲۷ آورده شده است. بررسی‌ها نشان می‌دهد نتایج هر شش روش برای پیش‌بینی غلظت اجزای مخلوط دوتایی، قابل مقایسه است و دقت و صحت قابل قبولی دارد.

اثر مزاحمت گونه‌های مزاحم در اندازه‌گیری محلول ۱۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آسکوربیک اسید و ۲۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر استیل‌سالیسیلیک اسید در روش‌های EXRSM، SRS-M، SRS-CM، CC-SS، RD و RHPSAM در جدول ۳-۳۳ نشان می‌دهد که اکثر کاتیون‌ها و آنیون‌ها در این روش مزاحمتی ندارند و

روش‌های پیشنهادی از گزینش پذیری خوبی برخوردار هستند.

۴-۱-۳- ارزیابی آماری روش‌ها

چهار پارامتر آماری برای ارزیابی و بررسی توانایی روش‌های CC-SS, SRS-CM, SRSM, EXRSM

، RD در پیش‌بینی غلظت آسکوربیک اسید و استیل‌سالسیلیک اسید، 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 که نشان دهنده میزان برازش داده‌ها بر روی خط راست برای هر جز می‌باشد. مقدار R از معادله ۴-۱ محاسبه شد.

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

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

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

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

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

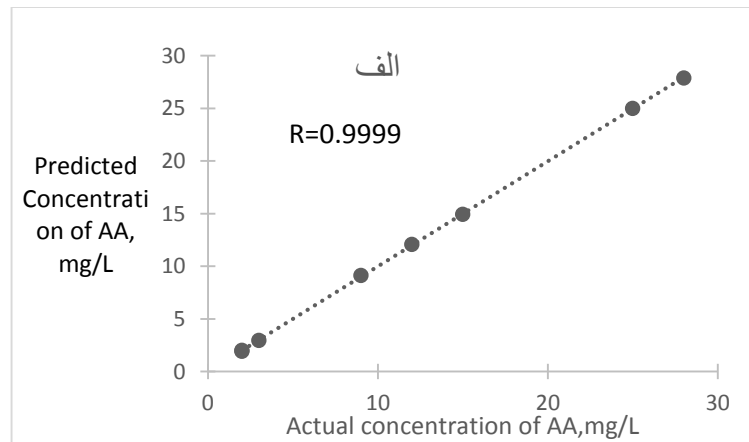
^۱Correlation coefficient

^۲Mean Absolute Error

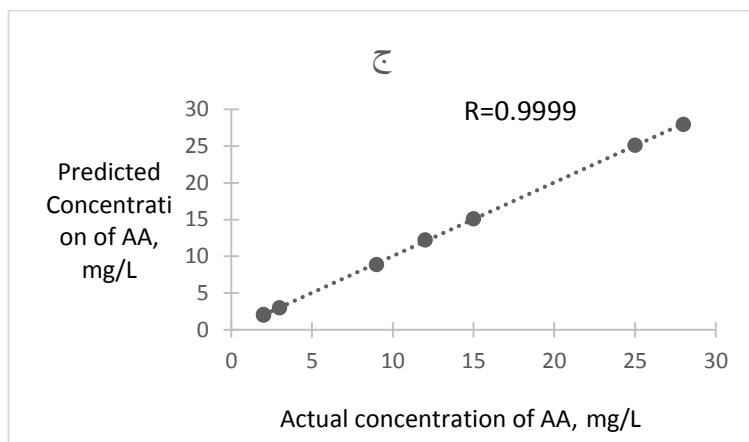
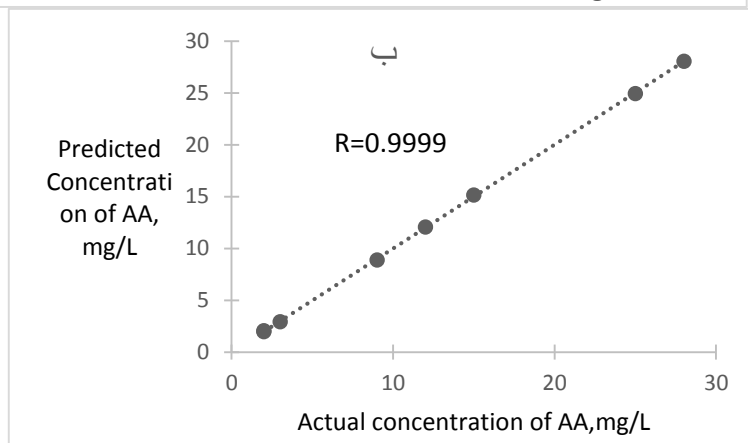
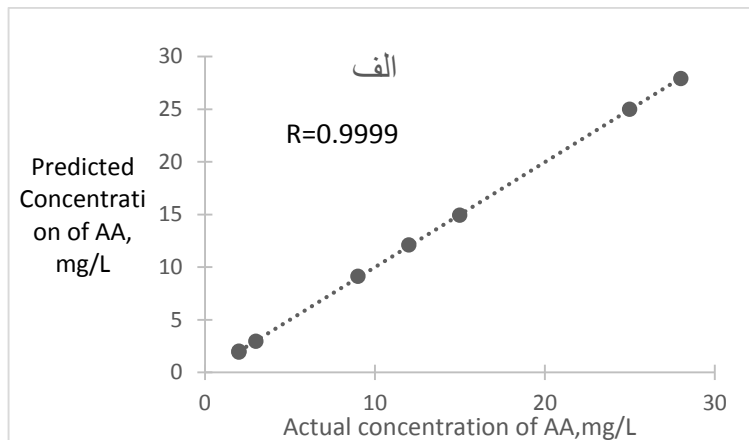
پارامتر آماری چهارم، میانگین خطای نسبی^۱ است که از معادله ۴-۴ محاسبه می‌شود.

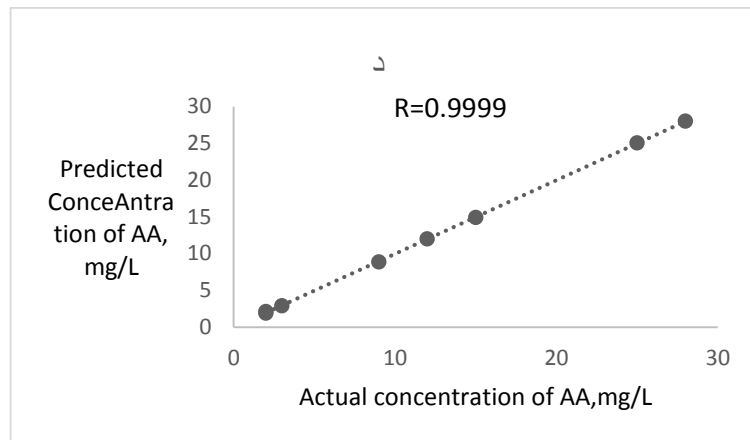
$$MRE = \frac{\sum_{i=1}^n \left| \frac{y_i - \hat{y}_i}{y_i} \right|}{n} \times 100 \quad \text{معادله ۴-۴}$$

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، میانگین غلظت واقعی در سری ارزیابی است. n تعداد محلول‌های سری ارزیابی است. برای روش‌های EXRSM، SRS-CM، SRS-SS، RD و نمودار غلظت پیش‌بینی شده برحسب غلظت واقعی برای آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید به ترتیب در شکل ۲-۴ و شکل ۳-۴ آورده شده است.

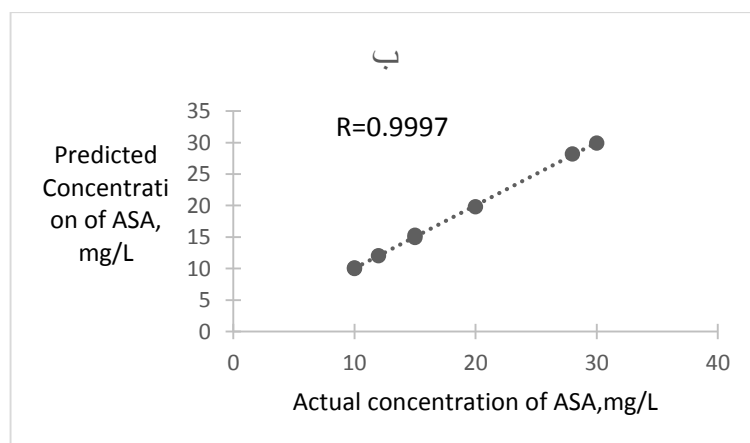
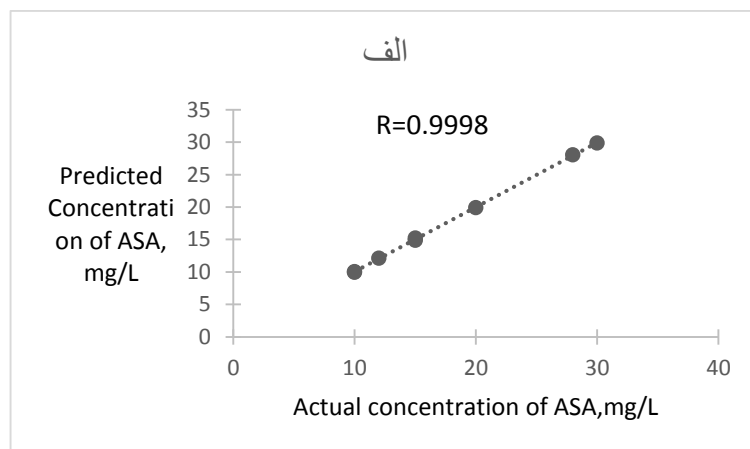


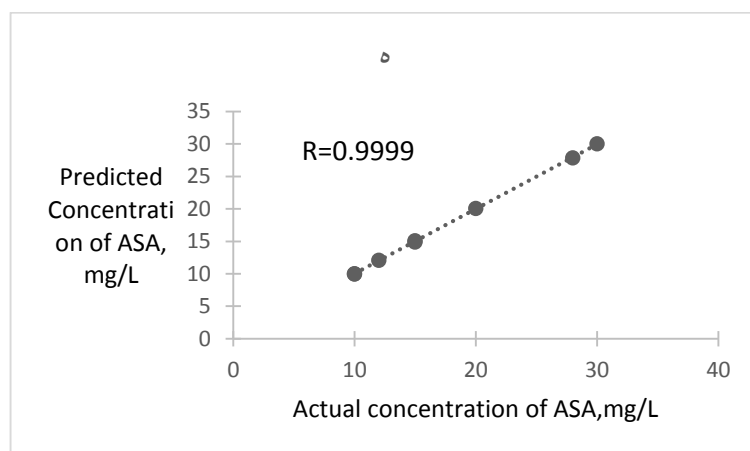
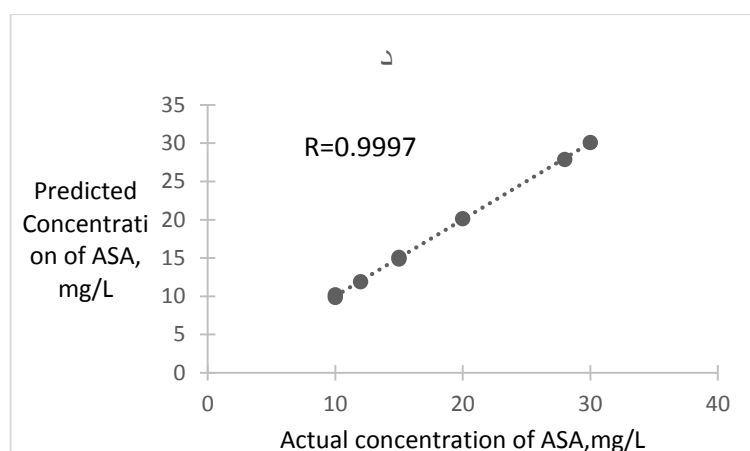
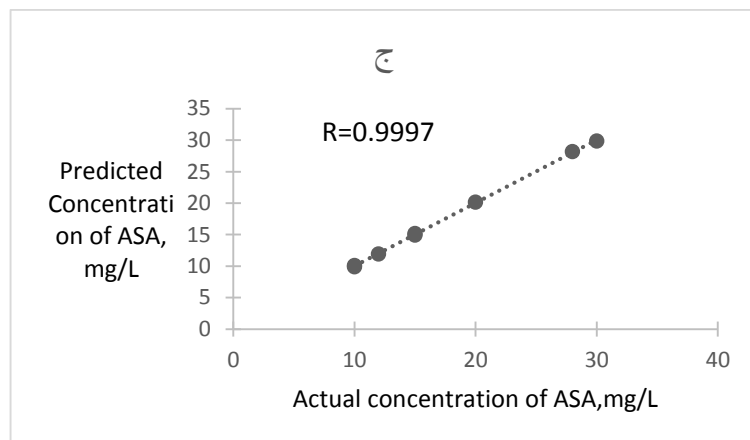
^۱ Mean Relative Error





شکل ۴-۲: نمایش میزان همبستگی غلظت‌های پیش‌بینی شده و غلظت‌های واقعی آسکوربیک اسید در مخلوط‌های سری تست، الف: در روش EXRSM، ب: در روش SRSM و SRS-CM، ج: روش CC-SS و د: روش RD





شکل ۳-۴: نمایش میزان همبستگی غلظت‌های پیش‌بینی شده و غلظت‌های واقعی استیل سالیسیلیک اسید در مخلوط‌های سری تست، الف: در روش EXRSM، ب: در روش SRSM، ج: در روش SRS-CM، د: CC-SS و ه: RD

ضریب همبستگی مشاهده شده بین مقادیر پیش‌بینی شده و مقادیر واقعی نشان دهنده میزان نزدیکی

غلظت پیش‌بینی شده توسط روش‌ها نسبت به مقدار واقعی آن است. همچنین برای ارزیابی و بررسی توانایی روش‌های مذکور در اندازه‌گیری همزمان آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید مقادیر MAE، MSE، MRE و R به ترتیب در جدول ۱-۴ و جدول ۲-۴ آورده شده است.

جدول ۱-۴: پارامترهای آماری محاسبه شده آسکوربیک اسید در مخلوط‌های سری تست برای روش‌های EXRSM، SRSM،

RD و CC-SS، SRS-CM،

RD	CC-SS	SRS-CM	SRSM	EXRSM	پارامتر آماری
۰/۹۹۹۹	۰/۹۹۹۹	۰/۹۹۹۹	۰/۹۹۹۹	۰/۹۹۹۹	R
۰/۰۷۲	۰/۰۹۱	۰/۰۷۶	۰/۰۷۶	۰/۰۶۵	MAE
۰/۰۰۶	۰/۰۱۴	۰/۰۰۷	۰/۰۰۷	۰/۰۰۵	MSE
۱/۷۸۱	۱/۲۱۲	۱/۳۲۹	۱/۳۲۹	۱/۱۵۱	MRE

مطابق پارامترهای آماری (جدول ۱-۴)، روش‌های EXRSM و CC-SS نتایج بهتری را به نسبت سایر روش‌ها برای پیش‌بینی غلظت آسکوربیک اسید در مخلوط دوتایی حاوی آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید ارائه می‌دهد.

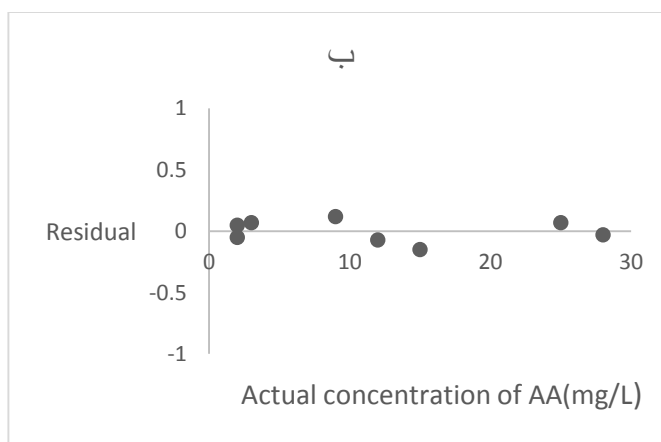
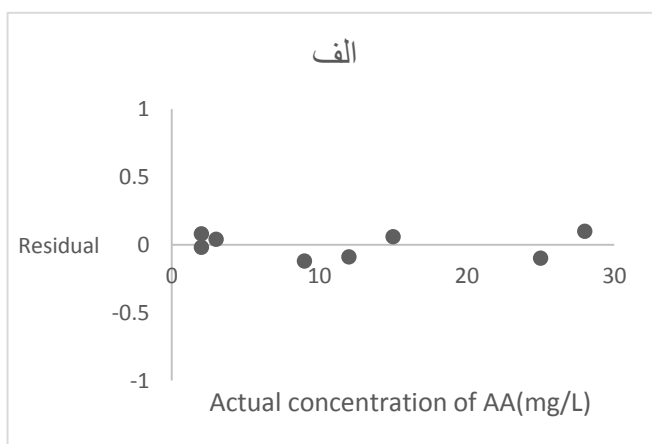
جدول ۲-۴: پارامترهای آماری محاسبه شده استیل‌سالیسیلیک اسید در مخلوط‌های سری تست برای روش‌های EXRSM،

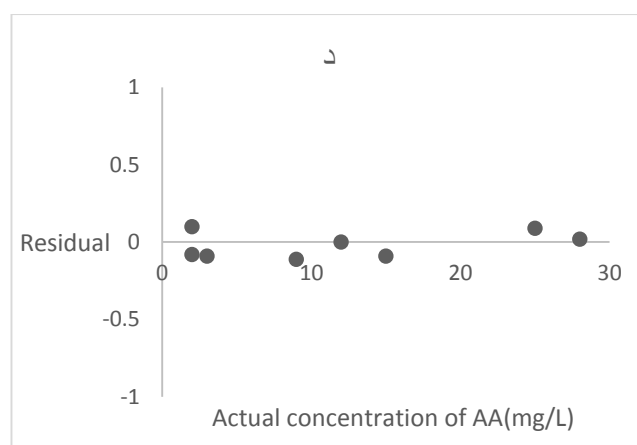
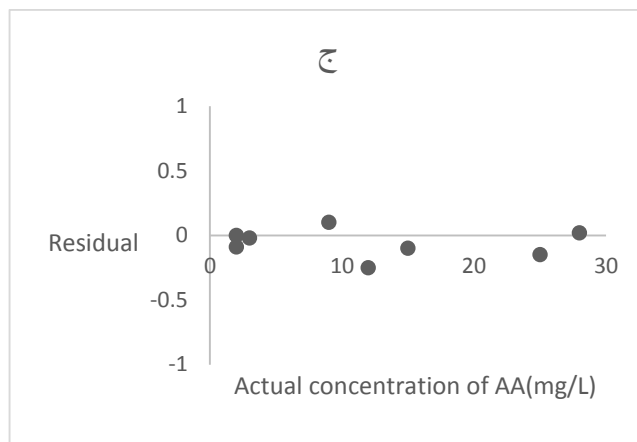
RD و CC-SS، SRS-CM، SRSM،

RD	CC-SS	SRS-CM	SRSM	EXRSM	پارامتر آماری
۰/۹۹۹۹	۰/۹۹۹۷	۰/۹۹۹۷	۰/۹۹۹۷	۰/۹۹۹۸	R
۰/۰۷۳	۰/۱۲۶	۰/۱۲۸	۰/۱۰۸	۰/۰۹۶	MAE
۰/۰۰۷	۰/۰۱۶	۰/۰۱۸	۰/۰۱۹	۰/۰۱۲	MSE
۰/۴۶۷	۰/۸۷۱	۰/۷۹۷	۰/۴۶۷	۰/۶۱۷	MRE

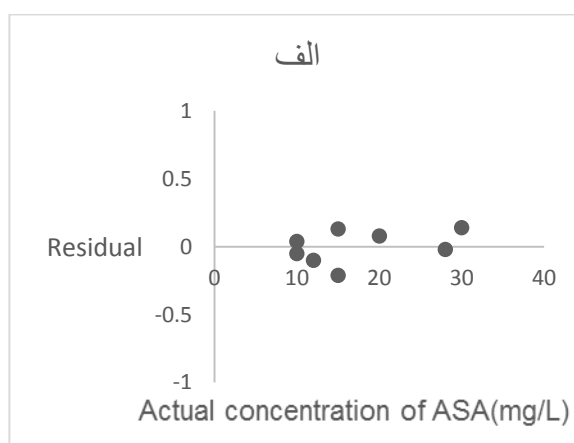
مطابق پارامترهای آماری (جدول ۲-۴)، روش‌های RD و EXRSM نتایج بهتری را به نسبت سایر روش‌ها برای پیش‌بینی غلظت استیل‌سالیسیلیک اسید در مخلوط دوتایی حاوی آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید ارائه می‌دهد.

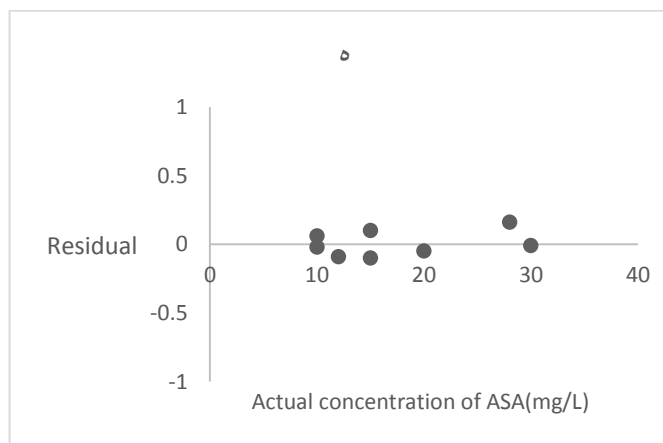
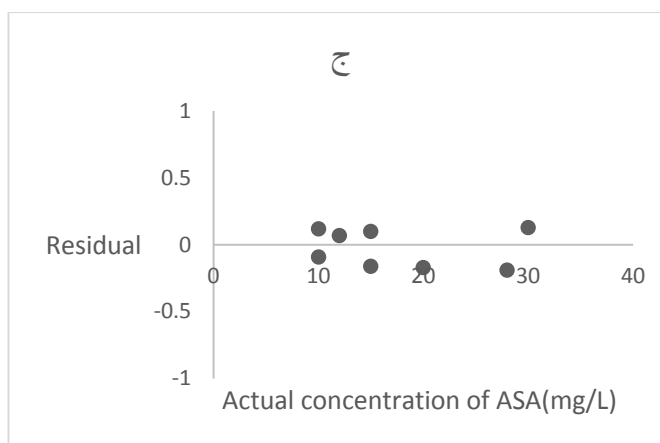
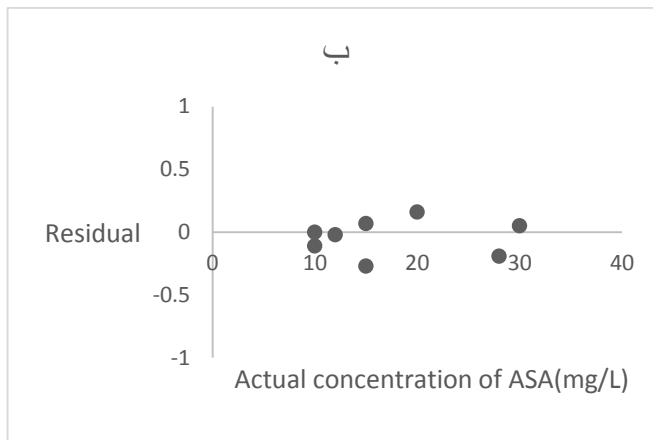
نمودار باقیمانده‌ها معیاری برای شایستگی مدل به دست آمده، می‌باشد و اگر باقیمانده، به طور یکنواخت حول محور افقی پراکنده باشند، نشان می‌دهند که مدل مناسبی به دست آمده و هیچ خطای سیستماتیکی وجود ندارد. شکل ۴-۴ نمودار باقیمانده‌ها را بر حسب مقدار واقعی آسکوربیک‌اسید و شکل ۴-۵ نمودار باقیمانده‌ها را بر حسب مقدار واقعی استیل‌سالیسیلیک‌اسید نشان می‌دهد. (باقیمانده از تفاضل مقدار واقعی از مقدار محاسبه شده توسط روش‌ها به دست می‌آید). تقارن پراکندگی نقاط در دو طرف محور افقی عدم وجود خطای سیستماتیک را نشان می‌دهد.

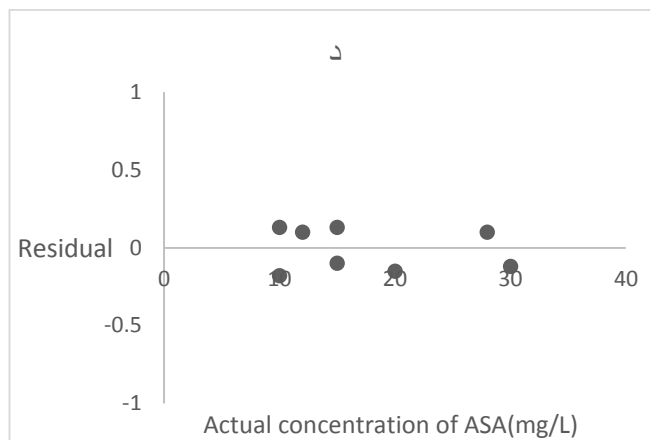




شکل ۴-۴: نمودار باقیمانده‌ها بر حسب مقدار واقعی آسکوربیک‌اسید برای مخلوط‌های سری تست، الف: در روش EXRSM و ب: در روش SRS-M و ج: روش CC-SS و د: روش RD







شکل ۴-۵: نمودار باقیمانده‌ها بر حسب مقدار واقعی استیل‌سالیسیلیک‌اسید برای مخلوط‌های سری تست، الف: روش EXRSM، ب: در روش SRSM، ج: روش SRS-CM، د: CC-SS و ه: RD

۴-۱-۴- کاربرد روش

کارایی این روش‌ها در اندازه‌گیری همزمان آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید با تجزیه نمونه‌های حقیقی مانند قرص سنتزی و آب شهر مورد بررسی قرار گرفت. مقادیر درصد بازیابی و انحراف استاندارد‌ها برای روش‌های EXRSM، SRS-CM، SRS-CM، CC-SS و RD در نمونه قرص سنتزی به ترتیب در جدول-های ۳-۴۲، ۳-۴۳، ۳-۴۴، ۳-۴۵ و ۳-۴۶ برای ترکیبات نامبرده شده و نمونه آب شهر برای روش‌های EXRSM، SRS-CM، SRS-CM و CC-SS به ترتیب در جدول‌های ۳-۴۷، ۳-۴۸، ۳-۴۹، ۳-۵۰ و ۳-۵۱ نشان دهنده دقت و صحت خوب این روش‌ها در اندازه‌گیری همزمان آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید در نمونه‌هایی با بافت پیچیده است. بنابراین می‌توان این روش‌ها را در اندازه‌گیری همزمان آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید در مخلوط‌های دوتایی آن‌ها در نمونه‌های حقیقی با موفقیت به کار برد.

۴-۱-۵- مقایسه روش‌های پیشنهادی با برخی از روش‌های موجود

در این کار، شش روش اسپکتروفتومتری جدید و ساده برای تعیین همزمان آسکوربیک اسید و استیل-سالیسیلیک اسید در مخلوط‌های دوتایی آن‌ها به کار برده شد. روش‌های پیشنهادی ساده، دقیق و صحیح اند و نیازی به مراحل اولیه جداسازی و دستگاه‌های پیچیده و برنامه‌های کامپیوتری ویژه ندارند.

روش‌های پیشنهادی نسبت به روش منبع [۱۷] دامنه بازیابی و ضریب همبستگی بهتری دارند. نسبت به روش منبع [۱۶] ساده ترند و محدوده خطی بهتری برای آسکوربیک اسید دارند. و همچنین نسبت به روش منبع [۱۸] محدوده خطی بهتری دارند.

✓ با استفاده از سایر روش‌های اسپکتروفتومتری جدید مانند روش فاکتور جذب^۱، روش مدولاسیون دامنه^۲، روش تفریق جذبی^۳، روش میانگین‌گیری مرکزی از طیف نسبی^۴، روش مدولاسیون دامنه هندسی^۵، روش مدولاسیون دامنه پیشرفته^۶، روش مدولاسیون دامنه القایی^۷، روش اختلاف دامنه به همراه مقدار ثابت^۸، روش اصلاح سطح زیر منحنی^۹ و... می‌توان غلظت آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید را در مخلوط‌های دوتایی از هر کدام، به دست آورد.

✓ با استفاده از روش‌های EXRSM، SRSM، SRS-CM، RD، CC-SS و RHPSAM می‌توان اجزای مخلوط‌های دو جزئی و چند جزئی ترکیبات و داروهای مختلف (مثلاً اندازه‌گیری همزمان آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید در حضور استامینافن یا کدئین در نمونه قرص‌های مسکن) را اندازه‌گیری کرد.

^۱ Absorption factor method

^۲ Amplitude modulation method

^۳ Absorption subtraction method

^۴ Mean centering method

^۵ Geometrical induced amplitude modulation method

^۶ Advanced amplitude modulation method

^۷ Induced amplitude modulation method

^۸ Constant value via amplitude difference

^۹ Area under the curve correction method

References

- [1]: Sena, M. M., Fernandes, J. C. B., Rover, L., Poppi, R. J., & Kubota, L. T. (2000). "Application of two-and three-way chemometric methods in the study of acetylsalicylic acid and ascorbic acid mixtures using ultraviolet spectrophotometry". *Analytica Chimica Acta*, 409(1), 159-170.
- [2]: Wabaidur, S. M., Alothman, Z. A., & Khan, M. R. (2013). "A rapid method for the simultaneous determination of l-ascorbic acid and acetylsalicylic acid in aspirin C effervescent tablet by ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry". *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 108, 20-25.
- [3]: Khan, M. R., Alothman, Z. A., Naushad, M., Ghfar, A. A., & Wabaidur, S. M. (2012). "Simultaneous analysis of vitamin c and aspirin in aspirin c effervescent tablets by high performance liquid chromatography–photodiode array detector". *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 35(17), 2454-2461.
- [4]: Hussein, A. Z. M. (2013). "Spectrophotometric Determination of Ascorbic acid in Aqueous Solutions and in Pharmaceuticals formulations". *Journal of Al-Nahrain University*, 16(3), 65-71.
- [5]: Iqbal, K., Khan, A., & Khattak, M. M. A. K. (2004). "Biological significance of ascorbic acid (Vitamin C) in human health—a review". *Pakistan Journal of Nutrition*, 3(1), 5-13.
- [6]: Lau, O. W., Luk, S. F., & Cheung, Y. M. (1989). "Simultaneous determination of ascorbic acid, caffeine and paracetamol in drug formulations by differential-pulse voltammetry using a glassy carbon electrode". *Analyst*, 114(9), 1047-1051.
- [7]: Toral, M. I., Lara, N., Richter, P., Tassara, A., Tapia, A. E., & Rodriguez, C. (2001). "Simultaneous determination of ascorbic acid and acetylsalicylic acid in pharmaceutical formulations". *Journal of AOAC International*, 84(1), 37-42.
- [8]: Dinç, E. (1999). "The spectrophotometric multicomponent analysis of a ternary mixture of ascorbic acid, acetylsalicylic acid and paracetamol by the double divisor-ratio spectra derivative and ratio spectra-zero crossing methods". *Talanta*, 48(5), 1145-1157.
- [9]: Dinç, E., Ozdemir, A., & Baleanu, D. (2005). "Comparative study of the continuous wavelet transform, derivative and partial least squares methods applied to the overlapping spectra for the simultaneous quantitative resolution of ascorbic acid and acetylsalicylic acid in effervescent tablets". *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 37(3), 569-575.
- [10]: Medina, A. R., de Córdova, M. F., & Molina-Diaz, A. (1999). "Simultaneous determination of paracetamol, caffeine and acetylsalicylic acid by means of a FI ultraviolet pls multiptosensing device". *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 21(5), 983-992
- [11]: Cofan, C., & Radovan, C. (2008). "Simultaneous chronoamperometric sensing of ascorbic acid and acetaminophen at a boron-doped diamond electrode". *Sensors*, 8(6), 3952-3969.

[12]: Tsvetkova, B., Pencheva, I., & Peikov, P. (2012). " Simultaneous high-performance liquid chromatography determination of paracetamol and ascorbic acid in tablet dosage forms". *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 6(17), 1332-1336.

[13]: Akay, C., Gümüşel, B., Degim, T., Tartilmis, S., & Cevheroglu, S. (1999). "Simultaneous determination of acetaminophen, acetylsalicylic acid and ascorbic acid in tablet form using HPLC". *Drug metabolism and drug interactions*, 15, 197-206.

[14]: Dinç, E., & Baleanu, D. (2008). "Application of Haar and Mexican hat wavelets to double divisor-ratio spectra for the multicomponent determination of ascorbic acid, acetylsalicylic acid and paracetamol in effervescent tablets". *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 19(3), 434-444.

[15]: Wabaidur, S. M., Alothman, Z. A., & Khan, M. R. (2013). " A rapid method for the simultaneous determination of l-ascorbic acid and acetylsalicylic acid in aspirin C effervescent tablet by ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry". *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 108, 20-25.

[16] : Nasirizadeh, N., Shekari, Z., Tabatabaee, M., & Ghaani, M. (2015). "Simultaneous Determination of Ascorbic Acid, L-Dopa, Uric Acid, Insulin, and Acetylsalicylic Acid on Reactive Blue 19 and Multi-Wall Carbon Nanotube Modified Glassy Carbon Electrode". *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 26(4), 713-722.

[17]: 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.

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

[19]: H. A. Darwish, F. H. Metwally and A. El Bayoumi, (2015). "Novel Ratio Subtraction and Isoabsorptive Point Methods for Determination of Ambroxol Hydrochloride and Doxycycline in their Combined Dosage Form: Development and Validation". *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, Vol. 14(1), pp.133-140.

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

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

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

Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, Vol. 153, pp. 132-142.

[23]: 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.

[24]: 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..

[25]: Fayez, 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.

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

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

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

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

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

[31]: 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.

[32]: Mohamed, H. M. (2015). "A study of selective spectrophotometric methods for simultaneous determination of Itopride hydrochloride and Rabepazole sodium binary mixture: Resolving sever overlapping spectra". *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 136, 1308-1315.

[33]: 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.

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

[35]: j. lurie, "Handbook of analytical chemistry. Moscow", English translation, MIR publishers Moscow, 1975.

[36]: Golubitskii, G. B., Budko, E. V., Basova, E. M., Kostarnoi, A. V., & Ivanov, V. M. **(2007)**. "Stability of ascorbic acid in aqueous and aqueous-organic solutions for quantitative determination. *Journal of Analytical Chemistry*, 62(8), 742-747.

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

Simultaneous determination of ascorbic acid and acetylsalicylic acid and ascorbic acid in their binary mixtures by novel spectrophotometric methods

Abstract

Six simple, accurate, and precise spectrophotometric methods, manipulating ratio spectra, were developed for simultaneous determination of aspirin (acetylsalicylic acid, ASA) and ascorbic acid (Vitamin-C, AA). These methods include extended ratio subtraction method (EXRSM), simultaneous ratio subtraction method (SRSM), simultaneous ratio subtraction coupled with constant multiplication method (SRS-CM), constant center coupled with spectrum subtraction (CC-SS), ratio difference (RD) and ratio H-point standard addition (R-HPSAM). In R-HPSAM method linear range of (ASA) and (AA) obtained and respectively are: (10-25) and (3-25) mg L⁻¹, in all five methods (EXRSM, SRSM, SRS-CM, CC-SS and RD) linear range of (ASA) and (AA) obtained and respectively are: (10-30) and (3-30) mg L⁻¹. In all six methods (EXRSM, SRSM, SRS-CM, CC-SS, RHPSAM and RD) detection limit of (ASA) obtained and respectively are 1.44, 2.81, 4.20, 0.833, 1.39 and 0.115 mg L⁻¹ and in all six methods (EXRSM, SRSM, SRS-CM, CC-SS, RHPSAM and RD) detection limit of (AA) obtained and respectively are 0.435, 0.019, 0.019, 0.519, 0.256 and 0.115 mg L⁻¹. Influence of different interferences on selectivity of methods are considered. All proposed methods have admissible precision and accuracy for determination of ASA and AA in their binary mixtures exist in tap water and the cited drugs in tablets.

Keywords: Acetylsalicylic acid, Ascorbic acid, Extended ratio subtraction, Simultaneous ratio subtraction, Constant center coupled with spectrum subtraction and Ratio H-point standard addition



Shahrood University of Technology

Faculty of Chemistry

**Simultaneous determination of ascorbic acid and
acetylsalicylic acid in their binary mixtures by novel
spectrophotometric methods.**

Raziyeh Rahdari

Supervisor:

Dr. Gh. Bagherian Dehaghi

Advisor:

Prof. M. Arab Chamjangali

Date: September – 2017