





دانشکده شیمی

پایان نامه کارشناسی ارشد شیمی تجزیه

مطالعه مقایسه ای روش های اسپکتروفتومتری جدید برای تعیین مقدار همزمان گونه های با همپوشانی طیفی شدید در مخلوط های دوتایی آن ها

نگارنده: فاطمه مسیبی

استاد راهنما

دکتر قدمعلی باقریان دهقی

استاد مشاور

دکتر منصور عرب چم جنگلی

شهریور ۱۳۹۸

تقدیم اثر

پس از سپاس و شمای بی حد بر آستان صفات بی ہمتای احدیت کہ در کمال رافت و در نہایت عظوفت رخصت اتمام این پایان نامہ را بہ

ایجاب عطا فرمودہ است؛ در کمال مودت و مسرت، این پایان نامہ را تقدیم می نمایم بہ:

استاد کرامتدارم جناب آقای دکتر قدسعلی باقریان، دہمی کہ آموخت مرا تا، یاموزم

پدرم، کوبی استوار و حامی من در تمام طول زندگی

مادرم، سنگ صبور بی کہ الفبای زندگی بہ من آموخت

برادرانم و خواہرانم، کہ در طول تحصیل محنت زحمتم بودند و وجودشان مایہ دگر می و نگیہ گاہ من در مواجہ با مشکلات بود

مشکر و قدردانی

سپاس و تسلیش خدای را که آثار قدرت او بر چهره روز روشن، تابان است و انوار حکمت او در دل شب تار، درخشان. آفریدگاری که خویشتن را به ما شناساند و درهای علم را بر ما گشود و عمری و فرصتی عطا فرمود تا بدان، بنده ضعیف خویش را در طریق علم و معرفت میازاید نمیتوانم معنایی بالاتر از تقدیر و مشکر بر زبانم جاری سازم و سپاس خود را در وصف استادان خویش آشکار نمایم، که هر چه گویم و سراپم، کم گفته ام. به مصداق «من لم یشکر المخلوق لم یشکر الخالق»

بسی شایسته است از اساتید فرهیخته و فرزانه جناب آقای دکتر قد معلی باقریان، دهقی و دکتر منصور عرب چم. جنجلی که با کرامتی چون خورشید، سرزمین دل را روشنی بخشیدند و گلشن سرای علم و دانش را با راهنمایی های کار ساز و سازنده بارور ساختند، تقدیر و مشکر نمایم. همچنین از خانواده عزیزم که آرامش روحی و آسایش فکری فراهم نمودند تا با حمایت های همه جانبه در محیطی مطلوب، این مراتب تحصیلی و نیز پایان نامه درسی را به نحو احسن به اتمام برسانم، سپاسگزارم نمایم.

با مشکر و سپاس از اساتید عزیز و بزرگوارم جناب آقای دکتر ناصر کوردزی و سرکار خانم دکتر مصدر الامور که از محضر پر فیض تدریسشان، بهره ما برده ام و آرزوی سلامتی و موفقیت همیشگی این بزرگواران را از دگاه حق تعالی خواستارم

همچنین از کارشناسان محترم آزمایشگاه جناب آقای دکتر کلکی و مهندس یزدانی، مهندس مومنی و مهندس طاهری سپاس گزارم که از هیچ کوششی دریغ نفرمودند.

تعمیر نامه

اینجانب فاطمه مسیبی دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته شیمی تجزیه دانشکده شیمی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه مطالعه مقایسه ای روش های اسپکتروفتومتری جدید برای تعیین مقدار همزمان گونه های با هم پوشانی طیفی شدید در مخلوط های دوتایی آنها تحت راهنمایی قدمعلی باقریان دهقی متعهد می شوم.

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است .
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است .
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است .
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « Shahrood University of Technology » به چاپ خواهد رسید .
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است .
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاقی انسانی رعایت شده است .

تاریخ

امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج ، کتاب ، برنامه های رایانه ای ، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد . این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود .

چکیده

در این پایان نامه چهار روش اسپکتروفتومتری جدید، شامل روش‌های مرکز ثابت (CC)، اختلاف نسبی (RD)، روش افزایش استاندارد نقطه H-نسبی (RHPSAM) و روش افزایش استاندارد نقطه H (HPSAM) به کار برده شده است. هدف، انتخاب بهترین روش در تعیین مقدار گونه‌های با هم پوشانی طیفی شدید می‌باشد. در این پروژه دو مخلوط که هر یک حاوی دو گونه با همپوشانی شدید طیفی هستند به طور جداگانه مورد بررسی قرار گرفتند که کتکول و رزورسینول با هم در یک مخلوط و ایزومر های پارا و متا-نیتروآنیلین در مخلوطی دیگر مورد مطالعه قرار گرفتند، که اندازه گیری آن‌ها نیازمند جداسازی می‌باشد. تعیین مقدار یکی از گونه‌ها در مخلوط دوتایی آن‌ها با روش‌های اسپکتروفتومتری ساده امکان پذیر نمی‌باشد. مطالعه مقایسه‌ای نتایج حاصل از این پروژه نشان داد که از چهار روش به کار برده شده، روش‌های CC و RD دارای کمترین خطا در تعیین غلظت گونه‌های دارای هم پوشانی شدید طیفی است. در هر دو روش CC و RD دامنه خطی برای هر دو گونه ی، کتکول و رزورسینول ۲۰/۰-۲/۵۰ میلی‌گرم بر لیتر می‌باشد و حد تشخیص روش‌های CC و RD برای کتکول به ترتیب ۰/۵۸۲ و ۰/۲۹۲ میلی‌گرم بر لیتر و برای رزورسینول به همین ترتیب ۰/۸۸۰ و ۰/۳۵۵ میلی‌گرم بر لیتر می‌باشد. دامنه خطی برای گونه متا-نیترو آنیلین ۶۰/۰-۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و برای گونه پارا-نیتروآنیلین ۱۰/۰-۱/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در هر دو روش CC و RD به دست آمد. حد تشخیص روش‌های CC و RD برای متا-نیتروآنیلین به ترتیب ۰/۴۷۵ و ۰/۴۹۸ میلی‌گرم بر لیتر و برای پارا-نیتروآنیلین نیز به ترتیب ۰/۰۴۷ و ۰/۰۴۸ میلی‌گرم بر لیتر به دست آمد.

کلمات کلیدی: مرکز ثابت (CC)، اختلاف نسبی (RD)، روش افزایش استاندارد نقطه H-نسبی (RHPSAM)، روش افزایش استاندارد نقطه H (HPSAM)

لیست مقالات مستخرج از پایان نامه

۱- اندازه گیری همزمان کتکول ورزورسینول با روش های جدید اسپکتروفوتومتری، بیست

پنجمین سمینار شیمی تجزیه-دانشگاه تبریز تبریز، شهریور ۱۳۹۷

فهرست مطالب

۱-مقدمه.....	۱
۱-۱- مقدمه.....	۲
۲-۱- ایزومرهای بنزن دی ال ها.....	۲
۱-۲-۱- کتکول.....	۲
۲-۲-۱- رزورسینول.....	۳
۳-۲-۱- مروری بر کارهای انجام شده در زمینه اندازه گیری همزمان کتکول و رزورسینول در مخلوط های دو تایی و سه تایی آنها.....	۴
۳-۱- ایزومرهای نیتروآنیلین.....	۷
۱-۳-۱- متا-نیتروآنیلین.....	۷
۲-۳-۱- پارا-نیتروآنیلین.....	۷
۳-۳-۱- مروری بر کارهای انجام شده در زمینه اندازه گیری همزمان متا و پارا-نیتروآنیلین در مخلوط های دو تایی آنها.....	۸
۲- تئوری.....	۱۱
۱-۲- مقدمه ای بر اسپکتروسکوپی جذبی.....	۱۲
۲-۲- کالیبراسیون.....	۱۴
۱-۲-۲- کالیبراسیون یک متغیره.....	۱۴
۱-۱-۲-۲- روش مرکز ثابت (CC).....	۱۵
۲-۱-۲-۲- روش تفاضل نسبی (RD).....	۱۷
۳-۱-۲-۲- روش افزایش استاندارد نقطه H (HPSAM).....	۱۸
۴-۱-۲-۲- روش افزایش استاندارد نقطه H-نسبی (RHPSAM).....	۲۲
۳-۲- پارامترهای آماری.....	۲۶
۳- تجربی.....	۲۷
۱-۳- اندازه گیری همزمان کتکول و رزورسینول و پارا و متا-نیتروآنیلین با استفاده از روش های اسپکتروفوتومتری جدید.....	۲۸
۲-۳- مواد شیمیایی مورد استفاده.....	۲۸
۳-۳- محلول های مورد استفاده و طرز تهیه آنها.....	۲۸
۴-۳- دستگاه های مورد استفاده.....	۲۹
۵-۳- اندازه گیری گونه های کتکول و رزورسینول در مخلوط.....	۲۹

۲۹	۱-۵-۳ - طیف جذبی.....
۳۱	۲-۵-۳ - بررسی و بهینه سازی پارامترهای موثر سیستم.....
۳۲	۳-۵-۳ - رسم منحنی کالیبراسیون.....
۳۳	۴-۵-۳ - محلول سازی سری ارزیابی و تست.....
۳۵	۵-۵-۳ - روش های اسپکتروفتومتری به کار برده شده جهت اندازه گیری ه.....
۳۵	۱-۵-۵-۳ - روش مرکز ثابت(CC).....
۴۲	۲-۵-۵-۳ - روش تفاضل نسبی(RD).....
۴۹	۳-۵-۵-۳ - روش افزایش استاندارد نقطه H در دو طول موج (HPSAM).....
۵۲	۴-۵-۵-۳ - روش افزایش استاندارد نقطه H-نسبی (RHPSAM).....
۵۶	۶-۵-۳ - حدتشخیص روش(RD, CC).....
۵۷	۷-۵-۳ - دقت و صحت روش های (HPSAM و RHPSAM, RD, CC).....
۵۹	۶-۳ - تعیین مقدار ایزومرهای متا و پارا- نیتروآنیلین در مخلوط.....
۵۹	۱-۶-۳ - طیف جذبی.....
۶۰	۱-۱-۶-۳ - بررسی و بهینه سازی پارامترهای موثر سیستم.....
۶۰	۲-۱-۶-۳ - رسم منحنی کالیبراسیون.....
۶۲	۲-۶-۳ - محلول سازی سری ارزیابی و سری تست.....
۶۳	۳-۶-۳ - روش های اسپکتروفتومتری به کار برده شده جهت اندازه گیری همزمان.....
۶۳	۱-۳-۶-۳ - روش مرکز ثابت(CC).....
۷۰	۲-۳-۶-۳ - روش تفاضل نسبی(RD).....
۷۶	۳-۳-۶-۳ - روش افزایش استاندارد نقطه H- دو طول موج (HPSAM).....
۷۸	۴-۳-۶-۳ - روش افزایش استاندارد نقطه H-نسبی (RHPSAM).....
۸۲	۴-۶-۳ - حدتشخیص روش(RD, CC).....
۸۲	۵-۶-۳ - دقت و صحت روش های (HPSAM, RHPSAM, RD, CC).....
۸۴	۶-۶-۳ - کاربرد روشهای CC و RD در آنالیز نمونه آب شهر شاهرود.....
۸۶	۷-۳ - مطالعه مقایسه ای روش های اسپکتروفتومتری جدید برای تعیین مقدار همزمان گونه های با هم پوشانی طیفی شدید در مخلوط های دوتایی آنها.....
۸۶	۸-۳ - بررسی و بهینه سازی پارامترهای تجربی.....
۸۶	۹-۳ - ارقام شایستگی روش ها.....
۸۹	۱-۹-۳ - ارزیابی آماری روش ها.....
۹۵	۴ - بحث و نتیجه گیری.....
۹۶	۱-۴ - جمع بندی.....
۹۹	۲-۴ - مقایسه روشها پیشنهادی با برخی از روش های موجود.....

فهرست جداول

جدول ۱-۳: مواد شیمیایی مورد استفاده	۲۹
جدول ۲-۳: نتایج حاصل برای رسم منحنی کالیبراسیون کتکول و رزورسینول به صورت منفرد	۳۲
جدول ۳-۳: نتایج حاصل از بررسی کالیبراسیون تک متغیره رزورسینول و کتکول	۳۳
جدول ۴-۳: ترکیب غلظتی محلول های سری تست	۳۴
جدول ۵-۳: ترکیب غلظتی محلول های سری ارزیابی	۳۵
جدول ۶-۳: نتایج حاصل از اندازه گیری بزرگی دامنه ها در طیف های نسبی حاصل از شکل ۳-۴	۳۷
جدول ۷-۳: نتایج حاصل از روش CC برای تعیین غلظت کتکول در مخلوط های انتخاب شده از سری ارزیابی	۳۸
جدول ۸-۳: نتایج حاصل از بهینه سازی غلظت کتکول به عنوان مقسوم علیه و جفت طول موج های انتخابی برای روش CC در تعیین غلظت کتکول در مخلوط های سری ارزیابی	۳۸
جدول ۹-۳: نتایج حاصل از اندازه گیری بزرگی دامنه ها در طیف های نسبی حاصل در شکل ۳-۶	۴۰
جدول ۱۰-۳: نتایج حاصل از روش CC برای تعیین غلظت رزورسینول در مخلوط های انتخاب شده از سری ارزیابی	۴۱
جدول ۱۱-۳: نتایج حاصل از بهینه سازی جفت طول موج و غلظت رزورسینول به عنوان مقسوم علیه در پیش بینی غلظت رزورسینول در روش CC	۴۱
جدول ۱۲-۳: نتایج حاصل از اندازه گیری بزرگی دامنه در طیف نسبی حاصل شکل ۳-۶ در روش RD	۴۳
جدول ۱۳-۳: نتایج حاصل از روش RD برای تعیین غلظت کتکول در مخلوط های انتخاب شده از سری ارزیابی	۴۴
جدول ۱۴-۳: نتایج حاصل از بهینه سازی جفت طول موج و غلظت رزورسینول به عنوان مقسوم علیه در پیش بینی غلظت کتکول در روش RD	۴۵
جدول ۱۵-۳: نتایج حاصل از اندازه گیری بزرگی دامنه در طیف نسبی حاصل در (شکل ۳-۹) روش RD	۴۶
جدول ۱۶-۳: نتایج حاصل از روش RD برای تعیین غلظت رزورسینول در مخلوط های انتخاب شده از سری ارزیابی در طول موج های ۲۲۷/۲ و ۲۷۸/۲ نانومتر	۴۷
جدول ۱۷-۳: نتایج حاصل از بهینه سازی جفت طول موج و غلظت کتکول به عنوان مقسوم علیه در پیش بینی غلظت رزورسینول در روش RD	۴۸
جدول ۱۸-۳: جذب به دست آمده برای مخلوط ۲۰/۰ میلی گرم بر لیتر کتکول و ۲/۵۰ میلی گرم بر لیتر رزورسینول در جفت طول موج ۲۷۸/۸ و ۲۲۷/۴ نانومتر برای هر مخلوط در روش HPSAM	۵۰
جدول ۱۹-۳: نتایج حاصل از به کارگیری روش HPSAM برای پیش بینی غلظت اجزا در مخلوط سری ارزیابی	۵۱
جدول ۲۰-۳: نتایج حاصل از بهینه سازی طول موج در پیش بینی غلظت دو گونه در سری ارزیابی در روش HPSAM	۵۱

جدول ۳-۲۱: جذب نسبی به دست آمده برای مخلوط ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر کتکول و ۲/۵۰ میلی گرم بر لیتر رزورسینول بعد از تقسیم بر میانگین طیف های نرمان کتکول به عنوان مقسوم علیه در جفت طول موج ۲۲۷/۴ و ۲۷۹/۴ نانومتر برای هر مخلوط در روش RHPSAM ۵۴

جدول ۳-۲۲: نتایج حاصل از به کارگیری روش RHPSAM برای پیش بینی غلظت اجزا در مخلوط سری ارزیابی ۵۵

جدول ۳-۲۳: نتایج حاصل از بهینه سازی طول موج و مقسوم علیه در پیش بینی غلظت دو گونه در سری ارزیابی در روش RHPSAM ۵۵

جدول ۳-۲۴: نتایج حاصل از بررسی حدتشخیص در روش-های HPSAM, RHPSAM, RD, CC ۵۷

جدول ۳-۲۵: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت در روش CC ۵۷

جدول ۳-۲۶: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت در روش RD ۵۸

جدول ۳-۲۷: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت در روش RHPSAM ۵۸

جدول ۳-۲۸: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت در روش HPSAM ۵۸

جدول ۳-۲۹: نتایج حاصل برای رسم منحنی کالیبراسیون متا-نیتروانیلین و پارا-نیتروانیلین به صورت مجزا ۶۱

جدول ۳-۳۰: نتایج حاصل از کالیبراسیون تک متغیره ۶۲

جدول ۳-۳۱: ترکیب غلظتی محلول های سری ارزیابی ۶۳

جدول ۳-۳۲: ترکیب غلظتی محلول های سری تست ۶۳

جدول ۳-۳۳: نتایج حاصل از اندازه گیری بزرگی دامنه ها در طیف های نسبی حاصل شکل ۳-۲۰ ۶۵

جدول ۳-۳۴: نتایج حاصل از روش CC برای تعیین غلظت متا-نیتروانیلین در مخلوط های انتخاب شده از سری ارزیابی ۶۶

جدول ۳-۳۵: نتایج حاصل از بهینه سازی غلظت متا-نیتروانیلین به عنوان مقسوم علیه و جفت طول موج های انتخابی برای روش CC در تعیین غلظت متا-نیتروانیلین در مخلوط های سری ارزیابی ۶۶

جدول ۳-۳۶: نتایج حاصل از اندازه گیری بزرگی دامنه ها در طیف های نسبی حاصل شکل ۳-۲۲ ۶۸

جدول ۳-۳۷: نتایج حاصل از روش CC برای تعیین غلظت پارا-نیتروانیلین در مخلوط های انتخاب شده از سری ارزیابی ۶۹

جدول ۳-۳۸: نتایج حاصل از بهینه سازی غلظت پارا نیتروانیلین به عنوان مقسوم علیه و جفت طول موج های انتخابی برای روش CC در تعیین غلظت پارا نیتروانیلین در مخلوط های سری ارزیابی ۷۰

جدول ۳-۳۹: نتایج حاصل از اندازه گیری بزرگی دامنه در طیف نسبی حاصل در روش RD ۷۱

جدول ۳-۴۰: نتایج حاصل از روش RD برای تعیین غلظت متا-نیتروانیلین در مخلوط های انتخاب شده از سری ارزیابی ۷۲

جدول ۳-۴۱: نتایج حاصل از بهینه سازی غلظت پارا-نیتروانیلین به عنوان مقسوم علیه و جفت طول موج های انتخابی برای روش RD در تعیین غلظت متا-نیتروانیلین در مخلوط های سری ارزیابی ۷۳

جدول ۳-۴۲: نتایج حاصل از اندازه گیری بزرگی دامنه در طیف نسبی حاصل در روش RD ۷۴

جدول ۳-۴۳: نتایج حاصل از روش RD برای تعیین غلظت پارا-نیتروانیلین در مخلوط های انتخاب شده از سری ارزیابی ۷۵

جدول ۳-۴۴: نتایج حاصل از بهینه سازی جفت طول موج و غلظت متا-نیتروانیلین به عنوان مقسوم علیه در پیش بینی

۷۵.....	غلظت پارا-نیتروآنیلین در روش RD
جدول ۳-۴۵:	جذب به دست آمده برای مخلوط های شکل ۳-۲۸ در جفت طول موج ۳۵۳/۸ و ۴۰۰ نانومتر برای هر مخلوط
۷۷.....	در روش HPSAM
جدول ۳-۴۶:	نتایج حاصل از بهینه سازی طول موج در پیش بینی غلظت دوگانه در سری ارزیابی در روش HPSAM
جدول ۳-۴۷:	نتایج حاصل از به کارگیری روش RHPSAM برای پیش بینی غلظت تعدادی از مخلوط های سری ارزیابی
۷۸.....	
جدول ۳-۴۸:	جذب نسبی به دست آمده برای مخلوط ۲/۵۰ میلی گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین و ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر
متا-نیتروآنیلین بعد از تقسیم بر میانگین طیف نورمان پارا-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه در جفت طول موج ۳۴۱ و	
۴۰۹/۸ نانومتر برای هر مخلوط در شکل ۳-۳۳.....	
جدول ۳-۴۹:	نتایج حاصل از به کارگیری روش RHPSAM برای پیش بینی غلظت تعدادی از مخلوط های سری ارزیابی
۸۱.....	
جدول ۳-۵۰:	نتایج حاصل از بهینه سازی طول موج و مقسوم علیه در پیش بینی غلظت دو گونه در سری ارزیابی در
روش RHPSAM	
۸۲.....	
جدول ۳-۵۱:	نتایج حاصل از بررسی حدتشخیص در روش های CC . RD . RHPSAM . HPSAM
۸۲.....	
جدول ۳-۵۲:	نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت در روش CC
۸۳.....	
جدول ۳-۵۳:	نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت در روش RD
۸۳.....	
جدول ۳-۵۴:	نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت در روش RHPSAM
۸۴.....	
جدول ۳-۵۵:	نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت در روش HPSAM
۸۴.....	
جدول ۳-۵۶:	نتایج حاصل از اندازه گیری متا و پارا-نیتروآنیلین در نمونه آب شهر شاهرود به روش CC
۸۵.....	
جدول ۳-۵۷:	نتایج حاصل از اندازه گیری متا و پارا-نیتروآنیلین در اندازه گیری نمونه آب شهر شاهرود با روش RD
۸۵.....	
جدول ۳-۵۸:	نتایج حاصل از به کار بردن روش های CC.RD.HPSAM و RHPSAM در شرایط بهینه برای اندازه
گیری غلظت کتکول و رزورسینول در مخلوط های سری تست.....	
۸۸.....	
جدول ۳-۵۹:	نتایج حاصل از به کارگیری روش های CC.RD.HPSAM و RHPSAM در شرایط بهینه برای اندازه
گیری غلظت متا و پارا-نیتروآنیلین در مخلوط های سری تست.....	
۸۸.....	
جدول ۱-۱:	نتایج حاصل از بهینه سازی طول موج ها در پیش بینی غلظت ایزومرهای بنزن دی ال (کتکول - رزورسینول)
ایزومر های پارا و متا نیتروآنیلین در روش CC.....	
۹۵.....	
جدول ۱-۲:	نتایج حاصل از بهینه سازی طول موج ها در پیش بینی غلظت ایزومرهای بنزن دی ال (کتکول - رزورسینول)
ایزومر های پارا و متا نیتروآنیلین در روش RD.....	
۹۶.....	
جدول ۱-۳:	نتایج حاصل از بهینه سازی طول موج ها در پیش بینی غلظت ایزومرهای بنزن دی ال (کتکول - رزورسینول)
ایزومر های پارا و متا نیتروآنیلین در روش RHPSAM.....	
۹۶.....	

فهرست اشکال

- شکل ۱-۱: ساختار شیمیایی کتکول ۳
- شکل ۲-۱: ساختار رزورسینول ۴
- شکل ۳-۱: ساختار شیمیایی متانیترو آنیلین ۷
- شکل ۴-۱: ساختار شیمیایی پارانیترو آنیلین ۸
- شکل ۱-۲: خطوط حاصل از افزایش استاندارد آنالیت در دو طول موج 1λ و 2λ ۲۰
- شکل ۱-۳: طیف جذبی $10/0$ میلی گرم بر لیتر رزورسینول (RES)، طیف جذبی $10/0$ میلی گرم بر لیتر کتکول (CAT)، و طیف جذبی مخلوط $10/0$ میلی گرم بر لیتر کتکول و $10/0$ میلی گرم بر لیتر رزورسینول ۳۰
- شکل ۲-۳: منحنی کالیبراسیون کتکول ۳۳
- شکل ۳-۳: منحنی کالیبراسیون رزورسینول ۳۳
- شکل ۴-۳: طیف نسبی حاصل از تقسیم محلول های استاندارد $2/50$ ، $5/00$ ، $10/00$ و $20/00$ میلی گرم بر لیتر رزورسینول بر طیف $10/0$ میلی گرم بر لیتر کتکول به عنوان مقسوم علیه ۳۶
- شکل ۵-۳: نمودار اختلاف دامنه های نسبی (ΔP) بر حسب P ۳۷
- شکل ۶-۳: طیف نسبی حاصل از تقسیم محلول های استاندارد $2/50$ ، $5/00$ ، $10/00$ و $20/00$ میلی گرم بر لیتر کتکول بر طیف $10/0$ میلی گرم بر لیتر رزورسینول به عنوان مقسوم علیه ۳۹
- شکل ۷-۳: نمودار اختلاف دامنه های نسبی (ΔP) و بر حسب P ۴۰
- شکل ۸-۳: نمودار کالیبراسیون کتکول در روش RD ۴۳
- شکل ۹-۳: طیف نسبی حاصل از تقسیم محلول های استاندارد $2/50$ ، $5/00$ ، $10/00$ و $20/00$ میلی گرم بر لیتر رزورسینول بر طیف $20/00$ میلی گرم بر لیتر کتکول به عنوان مقسوم علیه ۴۶
- شکل ۱۰-۳: نمودار کالیبراسیون رزورسینول در روش RD ۴۷
- شکل ۱۱-۳: طیف جذبی مخلوط های حاوی، $2/50$ ، $5/00$ ، $10/00$ ، $15/00$ و $20/00$ میلی گرم بر لیتر رزورسینول و $20/00$ میلی گرم بر لیتر کتکول ۴۹
- شکل ۱۲-۳: نمودار افزایش استاندارد نقطه H- به همراه معادله برای مخلوط $2/50$ میلی گرم بر لیتر رزورسینول و $20/00$ میلی گرم بر لیتر کتکول ۵۰
- شکل ۱۳-۳: طیف جذبی محلول های خالص $2/50$ ، $5/00$ ، $10/00$ و $20/00$ میلی گرم بر لیتر کتکول ۵۲
- شکل ۱۴-۳: طیف های جذبی نرمال شده محلول های خالص $2/50$ ، $5/00$ ، $10/00$ و $20/00$ میلی گرم بر لیتر کتکول بعد از تقسیم کردن به غلظت هر محلول ۵۲
- شکل ۱۵-۳: طیف جذبی مخلوط های حاوی، $2/50$ ، $5/00$ ، $10/00$ ، $15/00$ و $20/00$ میلی گرم بر لیتر رزورسینول و $10/00$ میلی گرم بر لیتر کتکول ۵۳

شکل ۳-۱۶: نمودار افزایش استاندارد نقطه H- نسبی به همراه معادله برای مخلوط ۲/۵۰ میلی گرم بر لیتر رزورسینول و ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر کتکول..... ۵۴

شکل ۳-۱۷: طیف های جذب ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین (Meta)، طیف جذبی ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین (Par) و مخلوط ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین و ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین..... ۵۹

شکل ۳-۱۸: منحنی کالیبراسیون پارا-نیتروآنیلین..... ۶۱

شکل ۳-۱۹: منحنی کالیبراسیون متا-نیتروآنیلین..... ۶۲

شکل ۳-۲۰: طیف نسبی حاصل از تقسیم محلول های استاندارد ۱/۰۰، ۲/۰۰، ۵/۰۰ و ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین بر طیف ۲۰/۰ میلی گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه..... ۶۴

شکل ۳-۲۱: نمودار اختلاف دامنه های نسبی (ΔP) و بر حسب P..... ۶۵

شکل ۳-۲۲: طیف نسبی حاصل از تقسیم محلول های خالص ۵/۰۰، ۱۰/۰، ۲۰/۰، ۴۰/۰ و ۸۰/۰ میلی گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین بر طیف ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه..... ۶۷

شکل ۳-۲۳: نمودار اختلاف دامنه های نسبی (ΔP) بر حسب P..... ۶۸

شکل ۳-۲۴: طیف نسبی حاصل از تقسیم محلول های استاندارد ۵/۰۰، ۱۰/۰، ۲۰/۰، ۴۰/۰ و ۸۰/۰ میلی گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین بر طیف ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه..... ۷۱

شکل ۳-۲۵: نمودار کالیبراسیون متا-نیتروآنیلین در روش RD..... ۷۲

شکل ۳-۲۶: طیف نسبی حاصل از تقسیم محلول های استاندارد خالص ۱/۰۰، ۲/۰۰، ۵/۰۰ و ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین بر طیف ۴۰/۰ میلی گرم بر لیتر کتکول به عنوان مقسوم علیه..... ۷۴

شکل ۳-۲۷: نمودار کالیبراسیون پارا-نیتروآنیلین در روش RD..... ۷۴

شکل ۳-۲۸: طیف جذبی مخلوط های حاوی، ۱۰/۰، ۲۰/۰، ۴۰/۰، ۶۰/۰ و ۸۰/۰ میلی گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین و ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین..... ۷۶

شکل ۳-۲۹: نمودار افزایش استاندارد نقطه H- به همراه معادله برای مخلوط های شکل ۳-۲۸..... ۷۷

شکل ۳-۳۰: منحنی کالیبراسیون پارا-نیتروآنیلین در طول موج ۴۰۰ نانومتر در روش HPSAM..... ۷۷

شکل ۳-۳۱: طیف جذبی محلول های، خالص ۱/۰۰، ۲/۰۰، ۵/۰۰ و ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین..... ۷۹

شکل ۳-۳۲: طیف های نرمال شده محلول های خالص ۱/۰۰، ۲/۰۰، ۵/۰۰ و ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین..... ۷۹

شکل ۳-۳۳: طیف جذبی مخلوط های حاوی، ۱۰/۰، ۲۰/۰، ۴۰/۰ و ۸۰/۰ میلی گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین و ۲/۵۰ میلی گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین..... ۸۰

شکل ۳-۳۴: نمودار افزایش استاندارد نقطه H- نسبی به همراه معادله برای مخلوط ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین و ۲/۵۰ میلی گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین..... ۸۱

شکل ۳-۳۵: نمایش میزان همبستگی غلظت پیش بینی شده و غلظت واقعی کتکول در مخلوط سری تست به ترتیب در روش های a: CC، b: RD، c: RHPSAM و d: HPSAM..... ۹۰

شکل ۳-۳۶: نمایش میزان همبستگی غلظت پیش بینی شده و غلظت واقعی رزورسینول در مخلوط سری تست به ترتیب در روش های a: CC، b: RD، c: RHPSAM و d: HPSAM..... ۹۱

شکل ۳-۳۷: نمایش میزان همبستگی غلظت پیش بینی شده و غلظت واقعی متا-نیتروآنیلین در مخلوط سری تست به ترتیب در روش های a: CC، b: RD، c: RHPSAM و d: HPSAM..... ۹۳

شکل ۳-۳۸: نمایش میزان همبستگی غلظت پیش بینی شده و غلظت واقعی پارا-نیتروآنیلین در مخلوط سری تست به ترتیب در روش های a: CC، b: RD، c: RHPSAM و d: HPSAM ۹۴

١- مقدمه

۱-۱ مقدمه

در روش‌های تجزیه‌ای اندازه‌گیری آنالیت در حضور یک یا چند گونه موجود در نمونه لازم است. بنابراین هر چه روش تجزیه‌ای گزینش پذیرتر باشد، آن روش برای اندازه‌گیری مناسب‌تر است و از اهمیت بیشتری برخوردار می‌باشد.

با توجه به اینکه روش‌ها زیادی به منظور افزایش گزینش پذیری تجزیه‌ای پیشنهاد و پیشرفت‌های قابل ملاحظه‌ای در این زمینه صورت گرفته است که بیشتر در حوزه طیف بینی می‌باشد. با توجه به تحقیقات گسترده-ای که در این زمینه صورت گرفته است، دستیابی به نتایج قابل اعتماد در مورد نمونه‌های که اجزایی با طیف‌های ناشناخته یا طیف‌های با همپوشانی زیاد دارند مشکل می‌باشد.

بنابراین انتخاب روشی که دقت و صحت بالا برخوردار باشد مشکل است. با توجه به این که روش‌های اسپکتروفتومتری جدید در سال‌های اخیر رو به افزایش هستند، انتخاب روش مناسب، برای گونه‌های که هم پوشانی شدید طیفی دارند از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. روش‌های اسپکتروفتومتری جدید، نیازمند دستگاه‌های پیچیده نیستند و این روش‌ها ساده و کم هزینه هستند [۱].

۲-۱ ایزومرهای بنزن دی‌ال‌ها

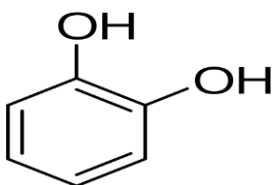
۱-۲-۱ کتکول

کتکول^۱ یک ترکیب پلی فنولی به عنوان پیرو کتکول یا ۲،۱-دی هیدروکسی بنزن شناخته می‌شود. ساختار شیمیایی کتکول در شکل (۱-۱) نشان داده شده است.

کتکول اولین بار در سال ۱۹۳۸ توسط H. Reinch از تقطیر Catechin (آب هندی) به دست آمد. این ماده

^۱ Catechol

سفید رنگ است که در طبیعت وجود دارد و به طور گسترده‌ای در سبزیجات، میوه‌ها و چای‌ها وجود دارد و سالانه ۲۰۰۰۰ تن از این ترکیب تولید می‌شود که در صنایع لوازم آرایشی، داروها، آنتی‌اکسیدان‌ها، رنگ، لاستیک، حشره کش و ... استفاده می‌شود [۲ و ۳] و به عنوان یکی از فراوان‌ترین ترکیبات آلی در دود سیگار شناخته شده است. این ماده از دستگاه گوارش جذب می‌شود و به لوله‌های کلیه آسیب می‌زند و باعث کاهش عملکرد کبد و نهایتاً ابتلا به سرطان می‌شود.



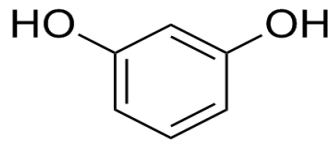
شکل ۱-۱: ساختار شیمیایی کتکول

میزان زیاد کتکول باعث سرکوب سیستم عصبی مرکزی می‌شود. علاوه بر آن مانع تکثیر DNA شده و منجر به انحرافات کروموزومی می‌شود. با توجه به سمیت بالا و اثرات مضر آن برای محیط زیست و سلامتی انسان و از طرفی تجزیه پذیری کم کتکول در محیط زیست، اندازه‌گیری کمی آن از اهمیت زیادی برخوردار است [۴].

۲-۲-۱ رزورسینول

رزورسینول^۱ یکی دیگر از ایزومرهای دی‌هیدروکسی بنزن‌ها بوده که فرمول شیمیایی آن به صورت $C_6H_4(OH)_2$ می‌باشد. گروه‌های OH در موقعیت متا نسبت به یکدیگر قرار دارند (شکل (۲-۱)). این ترکیب هم سفید رنگ می‌باشد.

^۱ Resorcinol



شکل ۱-۲: ساختار رزورسینول

قرار گرفتن در معرض رزورسینول و محصولات حاوی رزورسینول باعث تحریک شدید پوست و سوزش و آگزمای پوستی و سوزش چشم می‌شود. استنشاق غلظت بالای رزورسینول می‌تواند منجر به مرگ انسان شود. از طریق پوست و ریه جذب بدن می‌شود و این ایزومر از جمله مواد آلاینده محیط زیست می‌باشد [۵].

رزورسینول و مشتقات آن کاربرد فراوانی دارند در تهیه محلول‌های گندزدا و ضدعفونی کننده و نیز در ساخت رنگ مو و لوازم آرایشی و بهداشتی کاربرد دارد. علاوه بر آن در صنایع تولید چسب و لاستیک مورد استفاده قرار می‌گیرد [۳].

۱-۲-۳ مروری بر کارهای انجام شده در زمینه اندازه‌گیری همزمان کتکول و رزورسینول در مخلوط‌های دو تایی و سه تایی آنها

با توجه به سمیت بالا و اثرات مضر آنها برای محیط زیست و سلامتی انسان اندازه‌گیری کمی آنها از اهمیت زیادی برخوردار است. برای اندازه‌گیری دی‌هیدروکسی بنزن‌ها، روش‌های مختلفی از جمله: لومینسانس شیمیایی، فلورسانس، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، الکتروشیمی، الکتروفورز موینه ارائه شده‌اند.

در سال ۲۰۰۰ پنا^۱ و نسترنکو^۲ با استفاده از تکنیک‌های کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا مجهز به دکتور

^۱ Penner

^۲ Nesterenko

اسپکتروفوتومتری میکرو^۱-UVIS 20، ایزومرهای دی هیدروکسی بنزن را در رنگ مو به طور همزمان اندازه‌گیری کردند. در این کار با بهینه سازی پارامترهایی مانند غلظت و pH استونیتریل به عنوان شوینده و غلظت بافر گونه-های فنولی از هم جدا شدند. در این روش دامنه خطی برای کتکول، هیدروکینون و رزورسینول به ترتیب ۵۰-۰/۲، ۵-۰/۴۰ و ۵۰-۰/۲ میلی گرم برلیتر و حد تشخیص برای سه ترکیب به ترتیب ۰/۱۱، ۰/۶۰، ۰/۰۹۰ میلی گرم برلیتر گزارش شده است [۶].

در سال ۲۰۱۰ پیستونسی^۲ و همکارانش با استفاده از روش اسپکتروفلوریمتری و تکنیک‌های PLS و MLR هیدروکینون و رزورسینول، فنول، متا کروزول و پارا کروزول را اندازه‌گیری کردند. در این کار ابتدا عملیات میانگین‌گیری مرکز^۳ روی طیف ترکیبات ذکر شده اعمال گردید و سپس غلظت هر گونه با استفاده از رگرسیون حداقل مربعات جزئی (PLS)^۴ و رگرسیون خطی چند گانه (MLR)^۵ پیش بینی شد. دامنه خطی برای رزورسینول و هیدرو کینون به ترتیب (۰/۰۵-۰/۰۶) و (۰/۰۲۰-۰/۰۵) میلی گرم برلیتر گزارش شده است [۷].

در سال ۲۰۱۴ یانگ^۶ و لی^۷ برای اندازه‌گیری همزمان هیدروکینون، کتکول و رزورسینول از الکتروود اصلاح شده با نانو لوله کربنی چند جداره استفاده کردند. هگزادسیل تری متیل آمونیوم برماید (CTAB)^۸ با گرافن اکسید (GO) عامل دار شد. سپس کامپوزیت CTAB-GO و نانو لوله کربنی چند جداره برای اصلاح الکتروود کربن

^۱ Micro-UVIS20 spectrophotometric detector

^۲ Pistonesi

^۳ Mean Centered

^۴ Partial least square

^۵ Multiple linear regrssion

^۶ Yang

^۷ Li

^۸ Hexadecyl trimethyl ammonium bromide

شیشه ای استفاده شد. الکتروود اصلاح شده به عنوان کاتالیزور برای اکسیداسیون هیدروکینون، کتکول و رزورسینول استفاده گردید. از تکنیک و لتامتری چرخه‌ای در این اندازه‌گیری استفاده شد [۸].

در سال ۲۰۱۷ مائو^۱ و همکارانش سطح یک الکتروود شیشه را با نانو ذرات پلی اتیلن/گرافن اکسید پلی اتیلن^۲ اصلاح کردند که قادر به اندازه‌گیری همزمان کتکول و هیدروکینون با حساسیت و گزینش پذیری بالا بود [۹].

در سال ۲۰۱۸ عرب چم جنگلی^۳ و همکارانش سیستم تزریق در جریان پیوسته-^۴(FIA) اسپکتروفوتومتر بر پایه واکنش سینتیکی ساده جهت اندازه‌گیری هم‌زمان، سینتیکی هیدروکینون و کتکول استفاده شد. با توجه به تفاوت سرعت واکنش بین هیدروکینون و کتکول با Fe^{3+} در حضور ۱ و ۱۰ - فنانترولین، اساس روش می باشد. روش مدل های تصمیم‌گیری چند معیاره^۵ (MCDM) جهت انتخاب مناسب ترین شرایط بهینه، با توجه به معیارهای مورد نیاز، به کار گرفته شد. حد تشخیص ها برای هیدروکینون و کتکول به ترتیب ۰/۰۵ و ۰/۰۷ میلی گرم بر لیتر بود. روش جهت اندازه‌گیری هیدروکینون و کتکول در نمونه های آب حقیقی به کار برده شد [۱۰].

در سال ۲۰۱۹ مقدم و همکارانش یک روش الکتروشیمیایی بسیار حساس مبتنی بر ترکیبی از ولتامتری موج مربع تبدیل فوریه و کالیبراسیون چند متغیره را برای اندازه‌گیری هم‌زمان ایزومرهای دی هیدروکسی بنزن، از جمله کتکول، هیدروکینون و رزورسینول، در نمونه های محیطی به کار بردند. یک حسگر الکتروشیمیایی می- باشد که رسوب گرافن توسط نیتروژن بر روی الکتروود کربن شیشه ای قرار گرفته است. این روش به عنوان آنالیز

^۱ Hui Mao

^۲ poly(4-vinylphenylboronic acid) functionalized polypyrrole/graphene oxide

^۳ Arab Chamjangali

^۴ Flow injection analysis

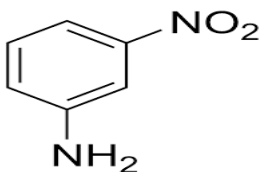
^۵ Multi Criteria Decision Making Models

چند عنصری به کار برده شده است. کالیبراسیون حداقل مربعات جزئی (PLS) به کار برده شد. حدود تشخیص و انحراف استاندارد نسبی کتکول، هیدروکینون و رزورسینول به ترتیب ۰/۰۴۶، ۰/۰۴۶ و ۰/۰۴۵ میکرومولار و ۳/۶، ۴/۴ و ۳٪ می باشد. [۱۱].

۳-۱ ایزومرهای نیتروآنیلین

۱-۳-۱ متا-نیتروآنیلین

متا-نیتروآنیلین^۱ دارای یک حلقه بنزنی است که یک گروه آمینو و یک گروه نیترو در موقعیت متا بر روی آن قرار گرفته‌اند (شکل (۱-۳)). این ترکیب به عنوان یک ماده واسطه در فرآیند تولید بسیاری از محصولات مختلف مانند رنگ، آفت کش‌ها و . . . به کار می‌رود. استفاده روز افزون از این ماده در صنایع مختلف باعث افزایش حضور این ماده در محیط زیست شده است که باعث آلودگی آب و خاک شده است [۱۲].



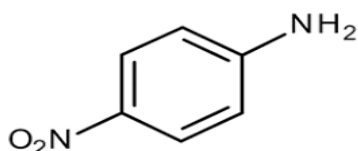
شکل ۱-۳: ساختار شیمیایی متا نیترو آنیلین

۲-۳-۱ پارا نیتروآنیلین^۲

پارا-نیتروآنیلین یا ۴-نیتروآنیلین با فرمول شیمیایی $C_6H_6N_2O_2$ ، ایزومر دیگر متا-نیتروآنیلین است (شکل (۱-۴)). پارا-نیترو آنیلین خالص، به رنگ زرد یا قهوه‌ای است.

^۱ Meta-nitroaniline

^۲ Para-nitroaniline



شکل ۱-۴: ساختار شیمیایی پارانیتروآنیلین

این ترکیب سمی است و جزء آلاینده‌های آب می‌باشد. این ماده شیمیایی معمولاً به عنوان واسط در سنتز رنگ، آنتی‌اکسیدان‌ها، داروها، افزودنی‌های سوختی و سموم دفع آفات به کار می‌رود [۱۳].

۱-۳-۳ مروری بر کارهای انجام شده در زمینه اندازه‌گیری همزمان متا و پارا-نیتروآنیلین در مخلوط‌های دوتایی آن‌ها

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

در سال ۲۰۰۵ گوا و همکارانش یک روش الکتروفورز منطقه موئین با آشکارساز آمپرسنجی برای اندازه‌گیری ایزومرهای نیتروآنیلین معرفی کردند. الکتروود کار در این روش الکتروود کربن بود. حد تشخیص برای متا-نیتروآنیلین، پارا-نیتروآنیلین و اورتو نیتروآنیلین در شرایط بهینه به ترتیب برابر $9/06 \times 10^{-9}$ و $2/40 \times 10^{-8}$ و $3/92 \times 10^{-10}$ (مول بر لیتر) به دست آمد. انحراف استاندارد نسبی این روش برای متا-نیتروآنیلین، پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین به ترتیب $1/3\%$ ، $1/5\%$ و $1/8\%$ گزارش شده است [۱۴].

در سال ۲۰۰۶ نیازی^۱ و همکارانش از روش استخراج نقطه ابری^۲ برای پیش‌تخلیط ایزومرهای نیتروآنیلین

^۱ Niazi

^۲ Clou Point extraction

استفاده کرده و سپس این ایزومرها را به وسیله روش‌های اسپکتروفوتومتری اندازه‌گیری کردند. تفکیک مخلوط سه تایی ایزومرهای نیتروآنیلین با به کار بردن حداقل مربعات ماشین بردار پشتیبان^۱ انجام شد. پارامترهای موثر بر فاز جداسازی و فرایند آشکارسازی، مطالعه و بهینه شد. تحت شرایط بهینه نمودار کالیبراسیون در محدوده ۰/۲-۲۰، ۰/۱-۱۵ و ۰/۱-۱۷ میلی گرم بر لیتر خطی بود. حد تشخیص برای اورتو- نیتروآنیلین، متا- نیترو آنیلین و پارا- نیتروآنیلین به ترتیب برابر ۰/۰۸، ۰/۰۵ و ۰/۰۶ میلی گرم بر لیتر گزارش شده است. میانگین خطای مطلق مربعات (MSE) برای ایزومرهای متا- نیتروآنیلین، اورتو- نیتروآنیلین و پارا- نیتروآنیلین به ترتیب ۰/۰۱۴۶، ۰/۰۳۰۸ و ۰/۰۳۰۴ میلی گرم بر لیتر گزارش شده است [۱۵].

در سال ۲۰۱۲ گودرزی^۲ و همکارانش یک مدل الگوریتم ژنتیک و مدل شبکه عصبی مصنوعی اصلی^۳ (PC- GA-ANN) برای اندازه‌گیری ایزومرهای نیتروآنیلین معرفی کردند. جذب مخلوط‌های کالیبراسیون در محدوده ۲۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر برای ۲۱ نمونه گرفته شد. محدوده خطی برای اورتو- نیتروآنیلین، متا- نیتروآنیلین و پارا- نیتروآنیلین به ترتیب ۱-۱۷، ۱-۱۵، ۱-۱۸ میلی گرم بر لیتر به دست آمد. میانگین خطای مطلق مربعات (MSE) برای اورتو- نیتروآنیلین، متا- نیتروآنیلین و پارا- نیتروآنیلین به ترتیب ۰/۷۸۴۸، ۰/۲۶۴۸ و ۰/۱۸۵۱ میلی گرم بر لیتر گزارش شد. روش مربوطه در نمونه‌های آب به طور موفقیت آمیزی مورد استفاده قرار گرفت [۱۶].

در سال ۲۰۱۴ هوییکی^۴ و همکارانش با استفاده از یک روش مبنی بر استخراج نقطه ابری (CPE) که با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا کوپل شده بود، ایزومرهای نیتروآنیلین را اندازه‌گیری کردند. در این روش از یک سورفکتانت سازگار با محیط زیست استفاده شد. در این مقاله پارامترهایی نظیر غلظت سورفکتانت، غلظت نمک،

^۱ Least-squares support vector machines

^۲ Goodarzi

^۳ Genetic algorithm principal component artificial neural network model

^۴ Huiqi

دمای تعادل و pH نمونه بهینه شد. تحت شرایط بهینه محدوده خطی برای متا-نیتروآنیلین، پارا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین به ترتیب ۰/۰۶-۱، ۰/۰۳-۱ و ۰/۰۱-۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر و حد تشخیص برای پارا-نیتروآنیلین، متا-نیتروآنیلین و اورتو-نیتروآنیلین به ترتیب برابر ۰/۰۰۵، ۰/۰۱۵ و ۰/۰۰۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است [۱۷].

هدف از اجرای این پروژه، جدا کردن طیف هر گونه در یک مخلوط دوتایی که همپوشانی شدید دارند با چهار روش مرکز ثابت (CC)^۱، روش تفاضل نسبی (RD)^۲، روش افزایش استاندارد نقطه H-نسبی (RHPSAM)^۳ و روش افزایش استاندارد نقطه H (HPSAM)^۴ و سپس مقایسه کارایی روش‌های فوق از نظر صحت و دقت می‌باشد، به منظور انجام این مطالعه دو مخلوط هر یک حاوی دو گونه با هم پوشانی شدید طیفی انتخاب شد. مخلوط اول شامل کتکول و رزورسینول بود که ایزومرهای بنزن دی‌ال‌ها هستند مخلوط دوم شامل ایزومرهای پارا و متا نیتروآنیلین بود، با هر چهار روش مذکور گونه‌ها در مخلوط به طور جداگانه تعیین گردید و کارایی روش‌ها مقایسه شد.

^۱ Constant Center

^۲ Ratio difference

^۳ Ratio H-point Standard addition method

^۴ H-point Standard addition method

۲- توری

۱-۲ مقدمه ای بر اسپکتروسکوپی جذبی

طیف بینی جذبی در ناحیه مرئی- ماورا بنفش براساس جذب تابش الکترومغناطیس در گستره‌ی طول موجی ۷۸۰-۱۹۰ نانومتر می‌باشد. جذب^۱ فرآیندی است که در آن یک ماده به طور گزینشی، انرژی فرکانس‌های خاصی از تابش الکترومغناطیسی را جذب نموده و در نتیجه پرتو تابشی اولیه را تضعیف می‌کند. طیف سنجی فرابنفش و مرئی، جذب تابش الکترومغناطیسی توسط ماده در ناحیه فرابنفش / مرئی است. مولکول‌های آلی، گونه-های معدنی و کمپلکس‌های انتقال بار، سه دسته مهم از جاذب‌ها در طیف سنجی فرابنفش و مرئی هستند. اندازه-گیری جذبی در این نواحی برای تعیین کمی انواع زیادی از گونه-های معدنی و آلی کاربرد پیدا کرده است. طیف بینی جذب ملکولی براساس اندازه گیری عبور (T) یا جذب (A) محلول‌های موجود در سلول‌های شفاف استوار است. معمولا غلظت (C) به طور خطی به جذب طبق معادله (۱-۲) ارتباط داده می‌شود.

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

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

مسئله اساسی در آنالیز اسپکتروفتومتری دو یا چند جزئی، تعیین همزمان دو یا چند جز در یک مخلوط بدون جداسازی اولیه است. همپوشانی طیفی اجزای یک مخلوط دوتایی مانع از اندازه‌گیری اجزای مخلوط با استفاده از روش اسپکتروسکوپی مستقیم می‌شود [۲۲].

به همین دلیل روش‌های اسپکتروفتومتری زیر برای تعیین دو یا چند جزء در یک مخلوط که اجزای آن

^۱ Absorption

همپوشانی طیفی دارند، ارائه شده است، که شامل:

۱. روش‌های اسپکتروفتومتری یک متغیره مانند تکنیک اسپکتروفتومتری مشتقی^۱ [۱۸]، روش میانگین‌گیری از مرکز (MCR)^۲ [۱۹]. روش تفاضل نسبی توسعه یافته (EXRSM)^۳ [۲۰]، روش افزایش استاندارد نقطه اچ (HPSAM) [۲۱]، روش مدولاسیون دامنه (AM)^۴، روش فاکتور جذب (AFM)^۵ [۲۰]، روش مرکز ثابت (CC) [۱۹] و غیره.

۲. روش‌های اسپکتروفتومتری چند متغیره مانند روش حداقل مربعات جزئی (PLS)^۶

در این کار هدف، اندازه‌گیری همزمان گونه‌هایی است، که همپوشانی شدید طیفی دارند. به این منظور، دو جفت گونه با همپوشانی شدید طیفی به طور جداگانه مورد مطالعه قرار گرفتند، کتکول و رزورسینول با هم در یک مخلوط و ایزومرهای پارا و متا-نیتروآنیلین در مخلوط دیگر مورد بررسی قرار گرفتند.

برای تعیین مقدار همزمان این گونه‌ها از روش‌های روش مرکز ثابت (CC)، روش تفاضل نسبی (RD)، روش افزایش استاندارد نقطه H-نسبی (RHPSAM) و روش افزایش استاندارد نقطه H (HPSAM) استفاده و مقایسه بین این روش‌ها انجام شد.

^۱ Derivative spectrophotometry technique

^۲ Mean centering method

^۳ Extended ratio subtraction method

^۴ Amplitude modulation method

^۵ Absorption factor method

^۶ Partial least squares

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 مجزا کالیبراسیون (مدل سازی)^۱ و پیش-بینی^۲ 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.

۱-۲-۲ کالیبراسیون یک متغیره^۳

تاریخچه بسیار وسیعی در مورد کاربرد کالیبراسیون تک متغیره در روش‌های اسپکتروفتومتری وجود دارد یکی از ساده‌ترین این روش‌ها استفاده از یک پاسخ (به عنوان یک متغیر وابسته) برای تعیین غلظت یک گونه (به عنوان یک متغیر مستقل) می‌باشد. در این شرایط یک رابطه خطی بین متغیر مستقل و وابسته وجود دارد. بهترین نمونه کالیبراسیون یک متغیره قانون بیر است که در اندازه‌گیری غلظت گونه‌ها به روش اسپکتروفتومتری جذب مولکولی استفاده می‌شود.

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 گزینش‌پذیری بالا، باید از سیستم مورد آنالیز شناخت کافی داشت. کالیبراسیون تک متغیره برای روش‌هایی مانند اسپکتروسکوپی اتمی، کروماتوگرافی،

^۱ Modeling

^۲ prediction

^۳ Univariate calibration

اسپکتروسکوپی مشتقی و روش‌های مختلف الکتروشیمیایی با موفقیت به کار رفته است. در اسپکتروسکوپی، معمولاً از طول موج ماکزیمم آنالیت برای ساخت یک مدل کالیبراسیون تک متغیره استفاده می‌شود. برای ساخت مدل کالیبراسیون از طریق رگرسیون تک متغیره خطی، دو فرض مهم بایستی بررسی شود:

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

۲- خطی بودن: باید بین غلظت آنالیت و سیگنال، رابطه خطی وجود داشته باشد؛ در غیر این صورت باید از روش‌های آنالیز غیر خطی استفاده کرد [۲۳].

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

۲-۱-۱ روش مرکز ثابت (CC)

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 در مقسوم علیه می‌باشد.

برای به دست آوردن غلظت گونه X در مخلوطی حاوی دو جزء (X و Y) با همپوشانی طیفی، به صورت زیر باید عمل کرد:

ابتدا مقدار P پیش‌بینی شده ($P_{postulated} = \frac{\varepsilon_y c_y}{\varepsilon_x c_x}$) که مربوط به گونه Y است محاسبه می‌گردد. به این

^۱ Constant center

منظور طیف‌های استاندارد خالص گونه Y با غلظت‌های متفاوت، بر طیف غلظت مشخصی از گونه X به عنوان مقسوم علیه تقسیم (X') می‌گردد. سپس دو طول موج انتخاب می‌شود (λ_1 و λ_2) و مقدار دامنه جذب نسبی $P_1 = \left(\frac{\varepsilon_Y C_Y}{\varepsilon_X C_X'}\right)_1$ و $P_2 = \left(\frac{\varepsilon_Y C_Y}{\varepsilon_X C_X'}\right)_2$ به ترتیب در λ_1 و λ_2 اندازه‌گرفته می‌شود و از هم کم می‌گردد، و این اختلاف دامنه بر حسب $P_1 = \left(\frac{\varepsilon_Y C_Y}{\varepsilon_X C_X'}\right)_1$ رسم می‌گردد که یک خط با معادله زیر به دست می‌آید (معادله (۲-۲)).

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

در معادله (۲-۲)، P_1 و P_2 به ترتیب دامنه‌های نسبی در طول موج‌های λ_1 و λ_2 هستند.

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

حاصل دارای مقدار ثابت $\frac{C_X}{C_X'} = \text{Constant} = C.V$ است. (معادله (۳-۲)).

$$P_{\text{Mix}} = \frac{b\varepsilon_X C_X + b\varepsilon_Y C_Y}{b\varepsilon_X C_X'} = \frac{b\varepsilon_Y C_Y}{b\varepsilon_X C_X'} + \frac{b\varepsilon_X C_X}{b\varepsilon_X C_X'} = \frac{\varepsilon_Y C_Y}{\varepsilon_X C_X'} + \frac{C_X}{C_X'} = \frac{\varepsilon_Y C_Y}{\varepsilon_X C_X'} + \text{Constant} \quad \text{معادله (۳-۲)}$$

سپس دامنه‌های نسبی P_1 و P_2 برای طیف مخلوط در طول موج‌های λ_1 و λ_2 ثبت می‌شوند و از هم کم می‌گردند ((معادله های (۲-۴) و (۲-۵)).

$$\Delta P_{\text{Mix}} = P_1 - P_2 = \left(\frac{\varepsilon_Y C_Y}{\varepsilon_X C_X'}\right)_1 + \text{Constant} - \left\{ \left(\frac{\varepsilon_Y C_Y}{\varepsilon_X C_X'}\right)_2 + \text{constant} \right\} \quad \text{معادله (۴-۲)}$$

$$\Delta P_{\text{Mix}} = P_1 - P_2 = \left(\frac{\varepsilon_Y C_Y}{\varepsilon_X C_X'}\right)_1 - \left(\frac{\varepsilon_Y C_Y}{\varepsilon_X C_X'}\right)_2 \quad \text{معادله (۵-۲)}$$

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

$$\left(P_{\text{Postulated Mix}} = \frac{\varepsilon_Y C_Y}{\varepsilon_X C_X'} \right) \text{ برای هر مخلوط به دست می‌آید.}$$

برای به دست آوردن مقدار ثابت $\left(\frac{C_X}{C_X'} = \text{Constant}\right)$ مقدار P پیش‌بینی شده $\left(P_{\text{Postulated Mix}} = \frac{\varepsilon_Y C_Y}{\varepsilon_X C_X'}\right)$

محاسبه شده از هر مخلوط از مقدار دامنه ثبت شده در λ_1 $\left(p_{\text{Recorded}} = \left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_X C_X'} + \frac{\varepsilon_Y C_Y}{\varepsilon_X C_X'}\right)_1\right)$ در مخلوط مربوط

کم می‌گردد (معادله (۶-۲)).

$$C.V = \frac{C_X}{C'_X} = P_{Recorded_{Mix}} - P_{postulated} = \left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_X C'_X} + \frac{\varepsilon_Y C_Y}{\varepsilon_X C'_X} \right)_{1(Mix)} - \left(\frac{\varepsilon_Y C_Y}{\varepsilon_X C'_X} \right)_{1(Mix)} \quad \text{معادله (۶-۲)}$$

در مرحله بعد با ضرب کردن این مقدار ثابت (C. V) که از معادله (۶-۲) به دست آمده در طیف مرتبه صفر مقسوم علیه انتخاب شده از گونه X (X')، طیف مرتبه صفر گونه X به دست می‌آید. سپس جذب در طول موج ماکزیمم گونه X برای هر مخلوط اندازه‌گیری و با قرار دادن آن در معادله کالیبراسیون گونه X، غلظت گونه X برای هر مخلوط به دست می‌آید [۲۴]. برای به دست آوردن غلظت گونه Y به روش مرکز ثابت همانند گونه X عمل می‌شود. در این روش معیار مشخصی برای انتخاب طول موج‌ها گزارش نشده است. این پروژه جفت طول موج‌های مختلفی انتخاب گردید تا یک معیار واحدی برای انتخاب طول موج‌ها گزارش شود

۲-۱-۲-۲ روش تفاضل نسبی (RD)

روش تفاضل نسبی یکی از روش‌های اسپکتروفتومتری جدید می‌باشد که برای گونه‌های با هم‌پوشانی طیفی به کار برده می‌شود.

برای تعیین غلظت گونه X مراحل زیر باید انجام شود:

مرحله اول، رسم منحنی کالیبراسیون:

طیف‌های خالص با غلظت‌های مختلف گونه X بر طیف خالص گونه Y به عنوان مقسوم علیه (Y') تقسیم می‌شود. سپس در طول موج‌های λ_1 و λ_2 جذب نسبی آنها با عنوان P_1 و P_2 اندازه‌گیری و اختلاف بین آنها $(\Delta P = P_1 - P_2)$ محاسبه می‌شود.

سپس نمودار ΔP بر حسب غلظت گونه X رسم می‌شود. (معادله (۷-۲)).

$$\Delta P = P_1 - P_2 = \text{slope } C_X + \text{intercept} \quad \text{معادله (۷-۲)}$$

مرحله دوم تعیین غلظت گونه X در مخلوط (X و Y):

طیف مخلوط حاصل از X و Y برطیف گونه Y' به عنوان مقسوم علیه تقسیم می‌شود (معادله (۸-۲)).

$$P_{Mix} = \frac{b\varepsilon_X C_X + b\varepsilon_Y C_Y}{b\varepsilon_Y C_Y'} = \frac{b\varepsilon_X C_X}{b\varepsilon_Y C_Y'} + \frac{b\varepsilon_Y C_Y}{b\varepsilon_Y C_Y'} = \frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y C_Y'} + \frac{C_Y}{C_Y'} = \frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y C_Y'} + \text{Constant} \quad \text{معادله (۸-۲)}$$

که طیف نسبی مخلوط، دارای مقداری ثابت متناسب با غلظت Y در معادله (۸-۲) می‌باشد. برای کم کردن

مقدار ثابت در طیف نسبی مخلوط، باید مقادیر P_1 و P_2 در دو طول موج λ_1 و λ_2 طیف نسبی مخلوط اندازه‌گیری

و اختلاف آن‌ها محاسبه گردد (معادله (۹-۲)).

$$\Delta P_{Mix} = P_1 - P_2 = \left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y C_Y'} \right)_1 + \text{Constant} - \left\{ \left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y C_Y'} \right)_2 + \text{Constant} \right\} \quad \text{معادله (۹-۲)}$$

مقدار ثابت در دو طول موج λ_1 و λ_2 ، با هم مساوی است. با قراردادن ΔP_{Mix} در منحنی کالیبراسیون

گونه X (معادله (۷-۲)) غلظت گونه X در مخلوط به دست می‌آید.

برای تعیین غلظت گونه Y در مخلوط همانند روش تعیین غلظت گونه X عمل می‌شود. با این تفاوت که

در دو طول موج مناسب برای گونه Y، منحنی کالیبراسیون آن از تقسیم طیف غلظت‌های مختلف گونه Y برگونه

X به عنوان مقسوم علیه (X') به دست می‌آید [۲۵]. همچنین در این روش برای دست یابی به معیار مشخص در

انتخاب جفت طول موج، تعداد زیادی طول موج مورد بررسی قرار گرفت.

۳-۱-۲-۲ روش افزایش استاندارد نقطه H (HPSAM)

روش افزایش استاندارد نقطه اچ در سال ۱۹۸۸ ارائه گردید که بر پایه اسپکتروفوتومتری دو طول موجی و

روش افزایش استاندارد می‌باشد. مهمترین مزیت روش افزایش استاندارد نقطه اچ این است که می‌توان خطاهای

ناشی از حضور یک واکنشگر شاهد و مزاحم را برطرف کرد. این روش خطای غیرقابل اصلاح ایجاد شده، در اثر

حضور یک مزاحمت مستقیم را به یک خطای سیستماتیک ثابت قابل اصلاح تبدیل می‌کند.

با این روش امکان اندازه‌گیری دو گونه‌ای که طیف‌های آن‌ها به مقدار زیادی هم‌پوشانی دارند، فراهم می‌شود. در یک مخلوط حاوی گونه X و Y، گونه X به عنوان آنالیت و گونه Y را به عنوان مزاحم در نظر بگیرید. در این روش، دو طول موج باید به نحوی انتخاب شود که در آن‌ها سیگنال‌های تجزیه‌ای گونه Y با هم برابر و سیگنال‌های تجزیه‌ای برای گونه X (آنالیت) تا حد ممکن اختلاف داشته باشد. در مخلوط‌های گونه کتکول و رزورسینول، گونه مزاحم کتکول و ثابت می‌باشد و گونه رزورسینول به عنوان آنالیت در نظر گرفته شد و این گونه به مخلوط‌ها اضافه گردید. همچنین برای مخلوط ایزومرهای نیتروآنیلین گونه پارا-نیتروآنیلین که، به عنوان مزاحم در نظر گرفته شد و گونه متا-نیتروآنیلین به عنوان آنالیت، به مخلوط‌ها اضافه گردید.

با رسم سیگنال تجزیه‌ای اندازه‌گیری شده در دو طول موج بر حسب غلظت اضافه‌شده روی یک نمودار، دو خط راست به دست می‌آید که در یک نقطه مشترک با مختصات $(A_H \text{ و } -C_H) H$ دارند، که $-C_H$ غلظت گونه X در مجهول و A_H سیگنال تجزیه‌ای ناشی از گونه Y است.

در انتخاب طول موج‌های دوگانه λ_1 و λ_2 باید اصول زیر را در نظر بگیریم:

- در این طول موج‌های انتخاب شده سیگنال آنالیت باید رابطه خطی با غلظت‌ها داشته‌باشد.

- باید جذب گونه مزاحم در دو طول موج یکسان باشد.

- اختلاف شیب‌های دو خط در دو طول موج انتخابی تا حد ممکن بزرگ باشد.

تئوری روش افزایش استاندارد نقطه اچ:

یک محلول حاوی آنالیت X و مزاحم Y در نظر می‌گیریم. دو طول موج λ_1 و λ_2 را انتخاب می‌کنیم. سپس

مقدار معلومی از گونه X به طور متوالی به مخلوط اضافه کرده و جذب حاصله در دو طول موج اندازه‌گیری می‌شود.

شود.

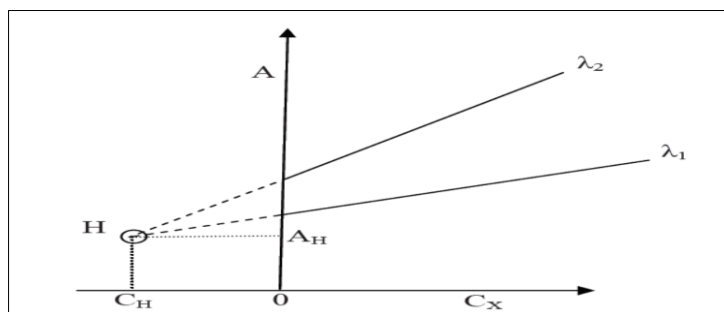
$$A_1 = b_0 + b + M_1 C \quad \text{معادله (۱۰-۲)}$$

$$A_2 = A_0 + A' + M_2 C \quad \text{معادله (۱۱-۲)}$$

که b_0 و A_0 سیگنال تجزیه‌ای اصلی گونه X در طول موج‌های به ترتیب λ_1 و λ_2 می‌باشند ($A_0 \neq b_0$).

b و A' سیگنال تجزیه‌ای گونه Y در λ_1 و λ_2 هستند ($A^0 = b$). M_1 و M_2 شیب خطوط کالیبراسیون افزایش استاندارد در λ_1 و λ_2 هستند و C غلظت گونه افزوده شده X می‌باشد.

اگر مقدار جذب اندازه‌گیری شده در دو طول موج λ_1 و λ_2 بر حسب غلظت X اضافه شده روی یک نمودار رسم گردد، دو خط راست به دست می‌آید که در یک نقطه مشترک H با مختصات (A_H و $-C_H$) یکدیگر را قطع می‌کنند (شکل ۱-۲).



شکل ۱-۲: خطوط حاصل از افزایش استاندارد آنالیت در دو طول موج λ_1 و λ_2

در نقطه H می‌توان نوشت: $A_1 = A_2 = A_H$ پس می‌توان نوشت (معادله ۱۲-۲):

$$b_0 + b + M_{\lambda_1}(-C_H) = A_0 + A' + M_{\lambda_2}(-C_H) \quad \text{معادله (۱۲-۲)}$$

$$-C_H = C_X = \frac{(A_0 - b_0) + (A' - b)}{M_{\lambda_1} - M_{\lambda_2}} \quad \text{معادله (۱۳-۲)}$$

با توجه به معادله (۱۳-۲) نتیجه می‌شود که اگر Y یک گونه مزاحم مشخص باشد سیگنال تجزیه‌ای Y

(یعنی b در λ_1 و A' در λ_2) با افزایش‌های آنالیت X تغییر نکند در این صورت $A=b$ بوده و برابر با مقدار ثابتی

است، پس می توان نوشت:

$$-C_H = C_X = \frac{(A_0 - b_0)}{M_{\lambda_1} - M_{\lambda_2}} \quad \text{معادله (۱۴-۲)}$$

در معادله (۱۴-۲) چون C_H فقط به متغیرهای مربوط به آنالیت وابسته است، بنابراین $C_H = C_X$ می باشد.

اگر مقدار C_H را به جای C_X در معادله (۱۰-۲) قرار دهیم خواهیم داشت:

$$A_H = b_0 + b + M_1(-C_H) \quad \text{معادله (۱۵-۲)}$$

با توجه به معادله (۱۴-۲) می توان نوشت:

$$b_0 = M_1 C_H \quad \text{معادله (۱۶-۲)}$$

اگر مقدار معادله (۱۶-۲) در معادله (۱۵-۲) قرار داده شود خواهیم داشت (معادله (۱۷-۲)):

$$A_H = b \quad \text{معادله (۱۷-۲)}$$

اگر مقدار C_H به جای C_X در معادله (۱۱-۲) قرار داده شود، خواهیم داشت (معادله (۱۸-۲)):

$$A_H = A_0 + A' + M_2(-C_H) \quad \text{معادله (۱۸-۲)}$$

با توجه به معادله (۱۴-۲) می توان نوشت:

$$A_0 = M_2 C_H \quad \text{معادله (۱۹-۲)}$$

اگر مقدار معادله (۱۹-۲) در معادله (۱۸-۲) قرار داده شود خواهیم داشت:

$$A_H = A' \quad \text{معادله (۲۰-۲)}$$

همان گونه که قبلا اشاره شد A' و b سیگنال های تجزیه ای Y به ترتیب در λ_1 و λ_2 هستند. بنابراین A_H

فقط به سیگنال Y در طول موج انتخابی بستگی دارد.

برای تعیین غلظت گونه مزاحم Y می توان به یکی از دو روش زیر عمل نمود:

۱- در این حالت فرض می کنیم که Y آنالیت است و X گونه مزاحم است لذا با انتخاب طول موج های جدید روش افزایش استاندارد نقطه اچ را برای گونه Y انجام می دهیم در حالی که غلظت X ثابت است.

۲- از A_H استفاده می کنیم که در این صورت بایستی با استفاده از محلول های استاندارد Y، یک منحنی کالیبراسیون از رسم A در یکی از دو طول موج λ_1 و λ_2 برحسب غلظت Y تهیه گردد، سپس با قرار دادن A_H در معادله کالیبراسیون، غلظت Y به دست می آید [۲۶ و ۲۷].

۲-۲-۱-۴ روش افزایش استاندارد نقطه H-نسبی (RHPSAM)

یک روش جدید دو طول موجی اسپکتروفتومتری است که بر مبنای روش های اسپکتروفتومتری نسبی و روش افزایش استاندارد نقطه H، مشکل هم پوشانی طیف ها را در مخلوط برطرف کرده است.

برای تعیین مقدار همزمان هر دو ترکیب (X و Y) به وسیله این روش (RHPSAM)، غلظت مشخصی از یک گونه (مثل گونه X) به مخلوط مورد نظر اضافه می گردد. سپس طیف مخلوط X و Y برطیف نرمال شده غلظت مشخصی از گونه دیگر (گونه Y) به عنوان مقسوم علیه (ϵ_Y) تقسیم می گردد (معادله (۲-۲۱)).

$$\frac{A_{Mix}}{\epsilon_Y} = \frac{b\epsilon_X C_X + b\epsilon_Y C_Y}{\epsilon_Y} = \frac{b\epsilon_X C_X}{\epsilon_Y} + \frac{b\epsilon_Y C_Y}{\epsilon_Y} = \frac{b\epsilon_X C_X}{\epsilon_Y} + bC_Y \quad \text{معادله (۲-۲۱)}$$

در معادله (۲-۲۱) ϵ_Y طیف نرمال شده گونه Y است که از تقسیم طیف محلول استاندارد خالص گونه Y

با یک غلظت مشخص به حاصل ضرب طول سل در غلظت متناظر گونه Y به دست آمده است (معادله (۲-۲۲)).

$$\frac{b\epsilon_Y C_Y}{bC_Y} = \epsilon_Y \quad \text{معادله (۲-۲۲)}$$

بعد از تقسیم کردن طیف مخلوط برطیف نرمال شده گونه Y، عبارت bC_Y برابر مقدار ثابتی است که در تمام طیف تقسیم شده گسترده است. با فرض اینکه $b = 1/0.0$ سانتی متر باشد، مقدار ثابت برابر غلظت گونه Y (C_Y) در

مخلوط است. با انتخاب هر جفت طول موجی می توان غلظت دو گونه X و Y را به روش RHPSAM به دست آورد. برای به دست آوردن غلظت دو گونه X و Y باید در دو طول موج مورد نظر (λ_1 و λ_2)، بزرگی طیف نسبی در P_1 و P_2 (معادله های (۲۳-۲) و (۲۴-۲)) اندازه گیری شود. از رسم دامنه های حاصل (P_2 و P_1) به ترتیب در λ_2 و λ_1 بر حسب غلظت افزوده شده از گونه X دو خط مستقیم به دست می آید که در یک نقطه (RHpoint) با مختصات ($-C_{RH}, P_{RH}$) همدیگر را قطع می کنند.

$$P_1 = \left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y}\right)_{\lambda_1} + \left(\frac{\varepsilon_Y C_Y}{\varepsilon_Y}\right)_{\lambda_1} + \left(\frac{\varepsilon_X}{\varepsilon_Y}\right)_{\lambda_1} C'_X = \left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y}\right)_{\lambda_1} + C_Y + M_{\lambda_1} C'_X \quad \text{معادله (۲۳-۲)}$$

$$P_2 = \left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y}\right)_{\lambda_2} + \left(\frac{\varepsilon_Y C_Y}{\varepsilon_Y}\right)_{\lambda_2} + \left(\frac{\varepsilon_X}{\varepsilon_Y}\right)_{\lambda_2} C'_X = \left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y}\right)_{\lambda_2} + C_Y + M_{\lambda_2} C'_X \quad \text{معادله (۲۴-۲)}$$

در معادله های (۲۳-۲) و (۲۴-۲) P_2 و P_1 به ترتیب بزرگی طیف نسبی مخلوط در λ_2 و λ_1 $\left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y}\right)_{\lambda_1}$ و $\left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y}\right)_{\lambda_2}$ به ترتیب دامنه نسبی گونه X در λ_2 و λ_1 مقدار ثابت مربوط به گونه Y در طیف نسبی مخلوط در طول موج مورد نظر، M_1 و M_2 شیب خط کالیبراسیون افزایش استاندارد در λ_1 و λ_2 ، در روش RHPSAM و C'_X غلظت افزوده شده از گونه X است.

در نقطه RHpoint، $P_1 = P_2 = P_{RH}$ می باشد. در نتیجه معادله (۲۳-۲) و معادله (۲۴-۲) با هم برابری و

از تساوی آنها می توان معادله (۲۵-۲) را نوشت و سپس از آن معادله (۲۸-۲) را به دست آورد.

$$\left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y}\right)_{\lambda_1} + C_Y + M_{\lambda_1} C'_X = \left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y}\right)_{\lambda_2} + C_Y + M_{\lambda_2} C'_X \quad \text{معادله (۲۵-۲)}$$

$$M_{\lambda_1} C'_X - M_{\lambda_2} C'_X = \left[\left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y}\right)_{\lambda_2} + C_Y \right] - \left[\left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y}\right)_{\lambda_1} + C_Y \right] \quad \text{معادله (۲۶-۲)}$$

$$(M_{\lambda_1} - M_{\lambda_2})C'_X = \left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y}\right)_{\lambda_2} - \left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y}\right)_{\lambda_1} \quad \text{معادله (۲۷-۲)}$$

$$C'_X = -C_{RH} = \frac{\left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y}\right)_{\lambda_2} - \left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y}\right)_{\lambda_1}}{M_{\lambda_1} - M_{\lambda_2}} \quad \text{معادله (۲۸-۲)}$$

به طور مشابه نقطه C_{RH} با استفاده از معادله (۲۳-۲) و از معادله (۲۴-۲) به دست می‌آید که معادله (۲)-

(۲۹) و نیز معادله (۳۰-۲) حاصل می‌شود.

$$C'_X = \frac{\left[P_1 - \left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y}\right)_{\lambda_1} - C_Y \right]}{M_{\lambda_1}} \quad \text{معادله (۲۹-۲)}$$

$$C'_X = \frac{\left[P_2 - \left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y}\right)_{\lambda_2} - C_Y \right]}{M_{\lambda_2}} \quad \text{معادله (۳۰-۲)}$$

از تساوی معادله های (۲۹-۲) و (۳۰-۲) روابط زیر برقرار خواهد بود:

$$\frac{\left[P_1 - \left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y}\right)_{\lambda_1} - C_Y \right]}{M_{\lambda_1}} = \frac{\left[P_2 - \left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y}\right)_{\lambda_2} - C_Y \right]}{M_{\lambda_2}} \quad \text{معادله (۳۱-۲)}$$

$$M_{\lambda_2} \left[P_1 - \left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y}\right)_{\lambda_1} - C_Y \right] = M_{\lambda_1} \left[P_2 - \left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y}\right)_{\lambda_2} - C_Y \right] \quad \text{معادله (۳۲-۲)}$$

$$M_{\lambda_2} P_1 - M_{\lambda_1} P_2 = -M_{\lambda_1} \left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y}\right)_{\lambda_2} - M_{\lambda_1} C_Y + M_{\lambda_2} \left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y}\right)_{\lambda_1} + M_{\lambda_2} C_Y \quad \text{معادله (۳۳-۲)}$$

و از آنجایی که در نقطه H نسبی $P_1 = P_2 = P_{RH}$ است. با قراردادن P_{RH} به جای P_1 و P_2 در معادله‌های

(۳۳-۲)، (۳۴-۲) و (۲-۳۵) دست می‌آید:

$$P_{RH}(M_{\lambda_2} - M_{\lambda_1}) = C_Y(M_{\lambda_2} - M_{\lambda_1}) - M_{\lambda_1} \left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y}\right)_{\lambda_2} + M_{\lambda_2} \left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y}\right)_{\lambda_1} \quad \text{معادله (۳۴-۲)}$$

$$P_{RH} = C_Y + \frac{\left[M_{\lambda_2} \left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y} \right)_{\lambda_1} + M_{\lambda_1} \left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y} \right)_{\lambda_2} \right]}{(M_{\lambda_2} - M_{\lambda_1})} \quad \text{معادله (۳۵-۲)}$$

و از آن جایی که $C_X = \frac{\left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y} \right)_1}{\left(\frac{\varepsilon_X}{\varepsilon_Y} \right)_{\lambda_1}} = \frac{\left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y} \right)_{\lambda_2}}{M_{\lambda_2}}$ و $C_X = \frac{\left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y} \right)_{\lambda_1}}{\left(\frac{\varepsilon_X}{\varepsilon_Y} \right)_{\lambda_2}} = \frac{\left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y} \right)_{\lambda_2}}{M_{\lambda_1}}$ است، بنابراین $\frac{\left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y} \right)_{\lambda_2}}{M_{\lambda_2}} = \frac{\left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y} \right)_{\lambda_1}}{M_{\lambda_1}}$

و سپس $\frac{\left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y} \right)_{\lambda_1}}{M_{\lambda_1}} = M_{\lambda_1} \left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y} \right)_{\lambda_1} = M_{\lambda_2} \left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y} \right)_{\lambda_2}$ می‌شود و مقدار عبارت $-M_{\lambda_2} \left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y} \right)_{\lambda_1} + M_{\lambda_1} \left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y} \right)_{\lambda_2}$ در معادله (۳۵-۲) برابر صفر می‌شود و در نتیجه می‌توان نوشت (معادله (۳۶-۲)):

$$P_{RH} = \left(\frac{\varepsilon_Y C_Y}{\varepsilon_Y} \right) = C_Y \quad \text{معادله (۳۶-۲)}$$

به عبارت دیگر غلظت گونه Y برابر با عرض نقطه H- نسبی روی منحنی افزایش استاندارد می‌باشد. در نهایت از معادله‌های (۲۸-۲) و (۳۵-۲)، معادله‌های (۳۷-۲) و (۳۸-۲) حاصل می‌شوند:

$$C_X = \frac{B - A}{(M_1 - M_2)} \quad \text{معادله (۳۷-۲)}$$

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

که در معادله‌های (۳۷-۲) و (۳۸-۲)، A و B به ترتیب $C_Y + \left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y} \right)_{\lambda_1}$ و $C_Y + \left(\frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_Y} \right)_{\lambda_2}$ یا به عبارتی

A و B از مبدا خط‌های کالیبراسیون افزایش استاندارد به ترتیب در λ_1 و λ_2 ، M_1 و M_2 شیب خط‌های

کالیبراسیون افزایش استاندارد به ترتیب در λ_1 و λ_2 هستند و به این صورت غلظت گونه‌های X و Y (C_X ، C_Y) به

روش RHPSAM به دست می‌آید [۲۸ و ۲۹]. در روش RHPSAM هم از نظر تئوری گزارش شده است که هر

جفت طول موجی را می‌توان برای اندازه‌گیری به کاربرد. در این پایان نامه جفت طول موج‌های مختلفی به کار برده

شد تا صحت این مطلب بررسی گردد

۳-۲ پارامترهای آماری

چهار پارامتر آماری برای ارزیابی و بررسی توانایی روش‌ها در پیش‌بینی غلظت ترکیبات مورد استفاده به کار برده شد. در روابط (۲-۳۹) تا (۲-۴۲) y_i غلظت واقعی گونه مورد نظر در نمونه i ام، \hat{y}_i غلظت پیش‌بینی شده گونه مورد نظر در نمونه i ام، \bar{y}_i میانگین غلظت واقعی در سری ارزیابی و یا سری تست و n تعداد محلول‌های سری ارزیابی و یا سری تست می‌باشد.

$$1 - \text{ضریب هم بستگی } (R)$$

میزان هم بستگی غلظت واقعی با غلظت پیش‌بینی شده توسط روش ارائه شده را نشان می‌دهد که از معادله (۲-۳۹) محاسبه می‌شود.

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y}_i)^2} \quad \text{معادله (۲-۳۹)}$$

$$2 - \text{میانگین مربع خطا (MSE)}$$

میانگین مربع خطا از معادله (۲-۴۰) محاسبه می‌گردد.

$$MSE = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n} \quad \text{معادله (۲-۴۰)}$$

$$3 - \text{میانگین خطای نسبی (MRE)}$$

میانگین خطای نسبی از معادله (۲-۴۱) محاسبه گردید.

$$MRE = \frac{\sum_{i=1}^n \left| \frac{y_i - \hat{y}_i}{y_i} \right|}{n} \times 100 \quad \text{معادله (۲-۴۱)}$$

^۱ Correlation coefficient

^۱ Mean Square Error

^۲ Mean Relative Error

۳- تجربی

۱-۳ اندازه‌گیری همزمان کتکول و رزورسینول و پارا و متا- نیتروآنیلین با استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری جدید

با توجه به موارد بیان شده در فصل قبل اندازه‌گیری همزمان دو گونه موجود در یک مخلوط که همپوشانی طیفی شدید دارند از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد. برای اندازه‌گیری همزمان این دو گونه با همپوشانی طیفی شدید چهار روش شامل RD، CC، RHPSAM و HPSAM به کار برده شد. برای بررسی و مقایسه روش‌ها، دو جفت گونه که در هر جفت، گونه‌ها دارای همپوشانی طیفی شدید هستند به طور جداگانه مورد مطالعه قرار گرفتند. در قسمت اول مخلوط گونه‌های کتکول و رزورسینول و در قسمت دوم مخلوط ایزومرهای پارا-نیتروآنیلین و متا-نیتروآنیلین، مورد مطالعه قرار گرفتند.

۲-۳ مواد شیمیایی مورد استفاده

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

۳-۳ - محلول‌های مورد استفاده و طرز تهیه آنها

در تهیه محلول‌های گونه‌های کتکول و رزورسینول از آب مقطر استفاده گردید. ۰/۰۵۰۰ گرم از هر یک از آنها به طور جداگانه به بالن‌های حجمی ۱۰۰/۰ میلی‌لیتری منتقل گردید و با آب مقطر به حجم رسانده شد، تا محلول ۵۰۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر از هر ترکیب تهیه شود. فقط در تهیه محلول‌های متا و پارا-نیتروآنیلین به هر بالن حجمی، ۱۰/۰ میلی‌لیتر اتانول افزوده شد تا هر کدام به طور کامل حل شود و با آب مقطر به حجم رسانده شد، تا محلول ۵۰۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر از هر ترکیب تهیه شود.

سپس محلول‌های استاندارد گونه‌ها با غلظت‌های متفاوت با رقیق‌سازی روزانه از محلول مادر ساخته

شدند.

جدول ۳-۱: مواد شیمیایی مورد استفاده

نام ماده شیمیایی	فرمول	شرکت سازنده
کتکول	$C_6H_6O_2$	مرک ^۱
رزورسینول	$C_6H_6O_2$	مرک
پارا-نیتروآنیلین	$C_6H_6N_2O_2$	آلدریچ ^۲
متا-نیتروآنیلین	$C_6H_6N_2O_2$	آلدریچ
اتانول	C_2H_5OH	مرک

۴-۳ دستگاه های مورد استفاده

برای ثبت طیف های جذبی گونه های کتکول و رزورسینول در ناحیه ۲۰۰-۳۵۰ نانومتر و طیف جذبی گونه های پارا و متا-نیتروآنیلین در ناحیه ۲۳۵-۵۱۰ نانومتر از دستگاه اسپکتروفتومتری دوپرتوی ریلی مدل Uv-2601 مجهز به یک جفت سل کوارتز یک سانتی متری استفاده شد.

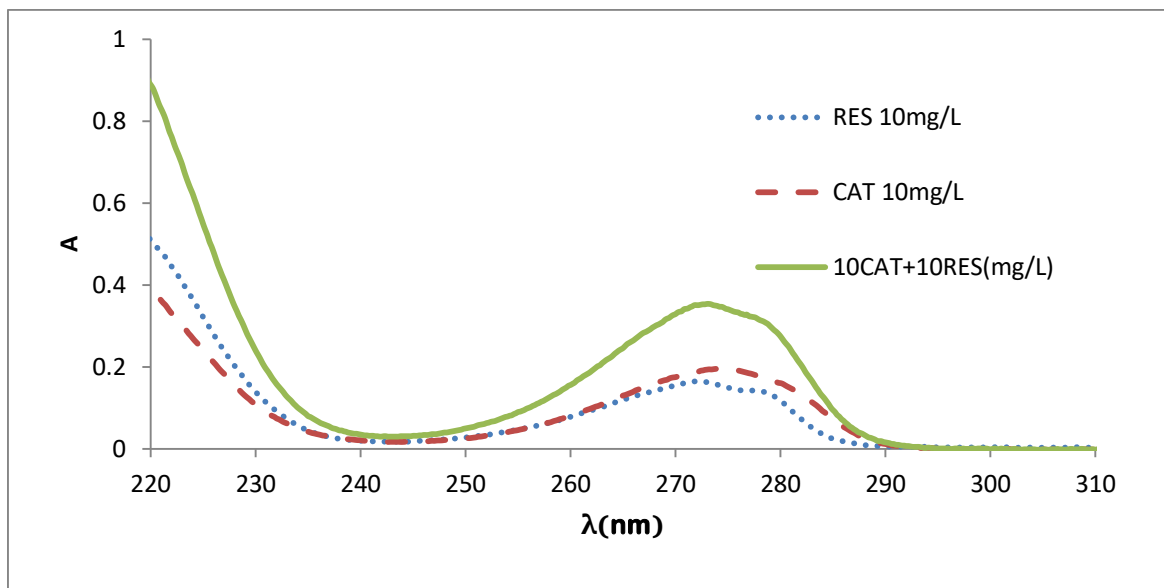
۵-۳ اندازه گیری گونه های کتکول و رزورسینول در مخلوط

۱-۵-۳ طیف جذبی

طیف جذبی محلول های کتکول (CAT)، رزورسینول (RES) و مخلوط های دوتایی آنها در گستره طول موجی ۲۰۰-۳۱۰ نانومتر در شکل (۳-۱) نشان داده شده است.

^۱ Merck

^۲ Aldrich



شکل ۳-۱: طیف جذبی ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر رزورسینول (RES)، طیف جذبی ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر کتکول (CAT)، و طیف جذبی مخلوط ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر کتکول و ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر رزورسینول

برای ثبت طیف‌های جذبی کتکول و رزورسینول و مخلوط آن‌ها به این صورت عمل شد که:

برای تهیه محلول کتکول یا رزورسینول با غلظت ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر ۲/۰ میلی لیتر از محلول ۵۰/۰ میلی گرم بر لیتر کتکول یا رزورسینول به یک بالن ۱۰/۰ میلی لیتری انتقال یافت و سپس با آب مقطر به حجم رسانده شد و مقداری از محلول به سل کوارتز دستگاه منتقل شد و طیف جذبی کتکول و رزورسینول با غلظت معین نسبت به محلول شاهد آب مقطر در گستره طول موج ۲۰۰-۳۵۰ نانومتر ثبت گردید.

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

حجم ۲/۰۰ میلی لیتر از محلول‌های ۵۰/۰ میلی گرم بر لیتر رزورسینول و کتکول به طور جداگانه به یک بالن حجمی ۱۰/۰ میلی لیتری انتقال داده شد و مخلوط حاصله با آب مقطر به حجم رسانیده شد و بعد از یکنواخت کردن محلول، طیف جذبی آن در گستره ۲۰۰-۳۵۰ نانومتر نسبت به شاهد آب مقطر ثبت گردید. برای مشاهده و

مقایسه جزئیات طیفی محلول‌های کتکول، رزورسینول و مخلوط حاوی دو گونه، طیف‌ها در شکل (۱-۳) آورده شده است. این شکل همپوشانی طیفی شدید دو گونه را به خوبی نشان می‌دهد. همان‌طور که از شکل (۱-۳) استنباط می‌شود، امکان اندازه‌گیری هر یک از دو گونه به صورت جداگانه در یک مخلوط به روش اسپکتروفتومتری معمولی مستقیم امکان پذیر نمی‌باشد. لذا برای اندازه‌گیری این دو گونه در مخلوط از روش‌های اسپکتروفتومتری جدید استفاده گردید. شکل (۱-۳) نشان می‌دهد که طول موج ماکزیمم جذب برای کتکول و رزورسینول به ترتیب ۲۷۴/۰ و ۲۷۲/۴ نانومتر می‌باشد.

۲-۵-۳ بررسی و بهینه سازی پارامترهای موثر بر سیستم

برای دستیابی به بهترین حساسیت و گزینش پذیری و بهترین حدتشخیص متغیرهای موثر بر میزان جذب کتکول و رزورسینول در طول موج ماکزیمم هر یک بایستی بررسی شوند. متغیرهای که باید مورد بررسی قرار گیرند به ترتیب عبارتند از:

۱- pH محلول بافر

۲- نوع بافر

۳- حجم بافر

۴- قدرت یونی

بر اساس نتایج و بررسی‌های قبلی انجام شده [۲۳] این پارامترها بر میزان گزینش‌پذیری و حساسیت تاثیر نداشتند و تمام اندازه‌گیری‌ها در غیاب هر گونه بافر یا الکتروولیت انجام شده است. به عبارت دیگر در تمام اندازه‌گیری‌ها، محلول‌های خالص و مخلوط در آب مقطر تهیه و به کار برده شدند.

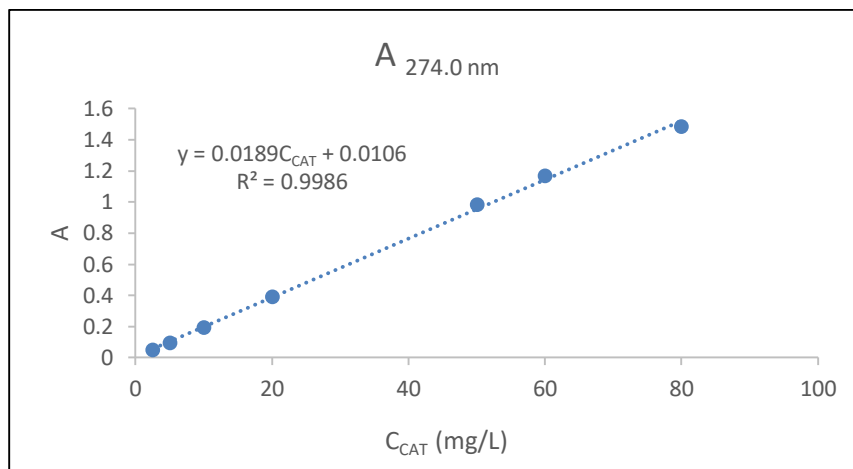
۳-۵-۳ رسم منحنی کالیبراسیون

تعیین دامنه خطی کتکول و رزورسینول به صورت جداگانه

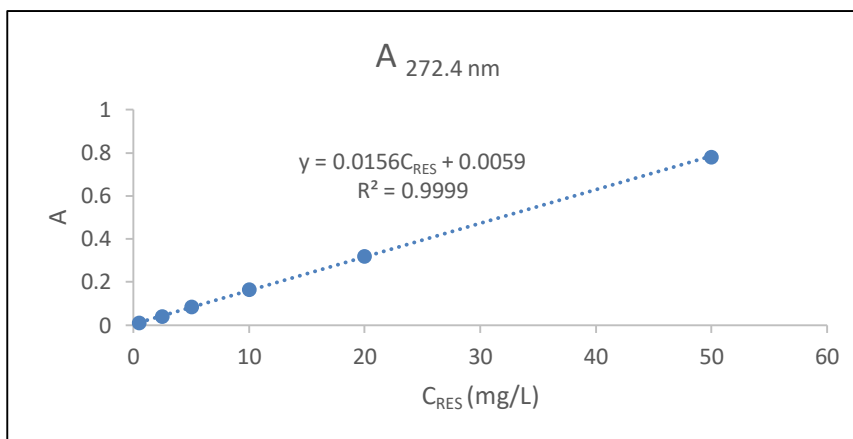
برای رسم منحنی کالیبراسیون برای هر ماده به صورت زیر عمل شد. در بالن حجمی ۱۰/۰ میلی لیتری مقادیر متفاوتی از کتکول و یا رزورسینول منتقل شد و سپس با آب مقطر به حجم رسانده شد. مقداری از محلول به سل کوارتزی دستگاه منتقل و جذب هر محلول نسبت به شاهد (آب مقطر) در طول موج های ۲۷۴/۰ و ۲۷۲/۴ نانومتر به ترتیب برای کتکول و رزورسینول ثبت شد. نتایج در جدول (۲-۳) آورده شده است. لازم به ذکر می باشد با توجه به بررسی های قبلی [۲۳] در اینجا معادله کالیبراسیون فقط در ناحیه خطی رسم شد. معادله بهترین خط برای منحنی کالیبراسیون از روش رگرسیون حداقل مربعات، استخراج شد که منحنی های کالیبراسیون و نتایج مربوط در شکل های (۲-۳) و (۳-۳) و جدول (۳-۳) آورده شده است.

جدول ۲-۳: نتایج حاصل برای رسم منحنی کالیبراسیون کتکول و رزورسینول به صورت منفرد

غلظت (میلی گرم بر لیتر)	جذب محلول کتکول در طول موج ۲۷۴/۰ نانومتر	جذب محلول رزورسینول در طول موج ۲۷۲/۴ نانومتر
۰/۰۵۰	-	۰/۰۱۱
۲/۵۰	۰/۰۴۹	۰/۰۴۱
۵/۰۰	۰/۰۹۸	۰/۰۸۴
۱۰/۰	۰/۱۹۵	۰/۱۶۵
۲۰/۰	۰/۳۹۲	۰/۳۲۱
۵۰/۰	۰/۹۸۴	۰/۷۸۲
۶۰/۰	۱/۱۶۵	-
۸۰/۰	۱/۴۸۸	-



شکل ۲-۳: منحنی کالیبراسیون کتکول



شکل ۳-۳: منحنی کالیبراسیون رزورسینول

جدول ۳-۳: نتایج حاصل از بررسی کالیبراسیون تک متغیره رزورسینول و کتکول

کتکول ($\lambda_{max} = 274 \text{ nm}$)	رزورسینول ($\lambda_{max} = 272/4 \text{ nm}$)	ترکیب
۰/۵۰ - ۸۰/۰	۰/۵۰ - ۵۰/۰	ناحیه خطی (میلی گرم بر لیتر)
$y = 0.0189C_{CAT} + 0.0106$	$y = 0.0156C_{RES} + 0.0059$	معادله رگرسیون
۰/۹۹۸	۰/۹۹۹	R^2

۴-۵-۳ محلول سازی سری ارزیابی و تست

به منظور بهینه سازی پارامترهای موثر و رسیدن به بهترین صحت در روش‌های به کار رفته در این پروژه،

محلول‌های سری کالیبراسیون (محلول‌های خالص استاندارد)، سری ارزیابی و سری تست تهیه و طیف آنها نسبت به محلول شاهد در دامنه ۲۰۰-۳۱۰ نانومتر ثبت گردید. محلول‌های سری ارزیابی و سری تست از انتقال مقادیر مختلف این دو ایزومر به بالن حجمی ۱۰/۰ میلی‌لیتری و رقیق کردن آن تا خط نشانه با آب مقطر تهیه شد و طیف آن‌ها ثبت و ذخیره گردید. محلول شاهد فقط آب مقطر می‌باشد. ترکیب غلظتی محلول‌های سری تست و سری ارزیابی به ترتیب در جدول‌های (۳-۴) و (۳-۵) آورده شده است.

جدول ۳-۴: ترکیب غلظتی محلول‌های سری تست

غلظت کتکول (mg/L)	غلظت رزورسینول (mg/L)	محلول
۵/۰۰	۵/۰۰	۱
۶/۰۰	۱۵/۰	۲
۱۲/۰	۳/۰۰	۳
۰/۰۰	۱۲/۰	۴
۱۵/۰	۰/۰۰	۵

جدول ۳-۵: ترکیب غلظتی محلول‌های سری ارزیابی

غلظت رزورسینول (mg/L)	غلظت کتکول (mg/L)	شماره محلول	غلظت رزورسینول (mg/L)	غلظت کتکول (mg/L)	شماره محلول
۱۵/۰	۱۰/۰	۱۴	۲/۵۰	۲/۵۰	۱
۲۰/۰	۱۰/۰	۱۵	۲/۵۰	۵/۰۰	۲
۲/۵۰	۱۵/۰	۱۶	۲/۵۰	۱۰/۰	۳
۵/۰۰	۱۵/۰	۱۷	۲/۵۰	۱۵/۰	۴
۱۰/۰	۱۵/۰	۱۸	۲/۵۰	۲۰/۰	۵
۱۵/۰	۱۵/۰	۱۹	۵/۰۰	۲/۵۰	۶
۲۰/۰	۱۵/۰	۲۰	۵/۰۰	۵/۰۰	۷
۲/۵۰	۲۰/۰	۲۱	۵/۰۰	۱۰/۰	۸
۵/۰۰	۲۰/۰	۲۲	۵/۰۰	۱۵/۰	۹
۱۰/۰	۲۰/۰	۲۳	۵/۰۰	۲۰/۰	۱۰
۱۵/۰	۲۰/۰	۲۴	۱۰/۰	۲/۵۰	۱۱
۲۰/۰	۲۰/۰	۲۵	۱۰/۰	۵/۰۰	۱۲
		۲۶	۱۰/۰	۱۰/۰	۱۳

۳-۵-۵ روش‌های اسپکتروفتومتری به کاربرده شده جهت اندازه‌گیری همزمان

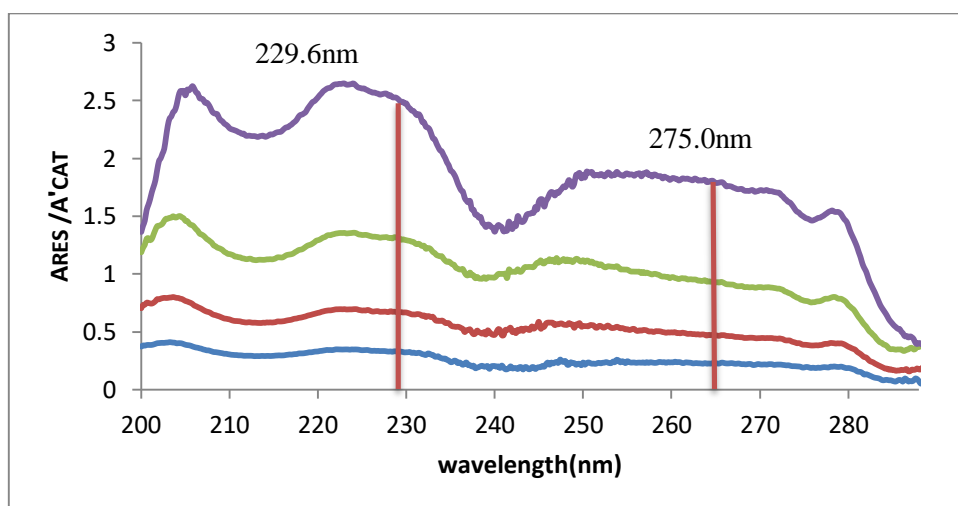
۳-۵-۵-۱ روش مرکز ثابت (CC)

روش مرکز ثابت برای اندازه‌گیری هم‌زمان کتکول و رزورسینول استفاده شد. در این روش مقسوم علیه و

طول موج بهینه به طور همزمان می‌شدند.

الف- بهینه سازی مقسوم علیه و طول موج در تعیین غلظت کتکول در روش (CC)

برای تعیین غلظت گونه کتکول به صورت زیر عمل شد: ابتدا طیف محلول‌های استاندارد خالص ۲/۵۰، ۵/۰۰، ۱۰/۰ و ۲۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر رزورسینول (پیوست ۱ شکل الف) بر طیف محلول کتکول با غلظت مشخص ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر به عنوان مقسوم علیه تقسیم گردید (شکل (۳-۴)).



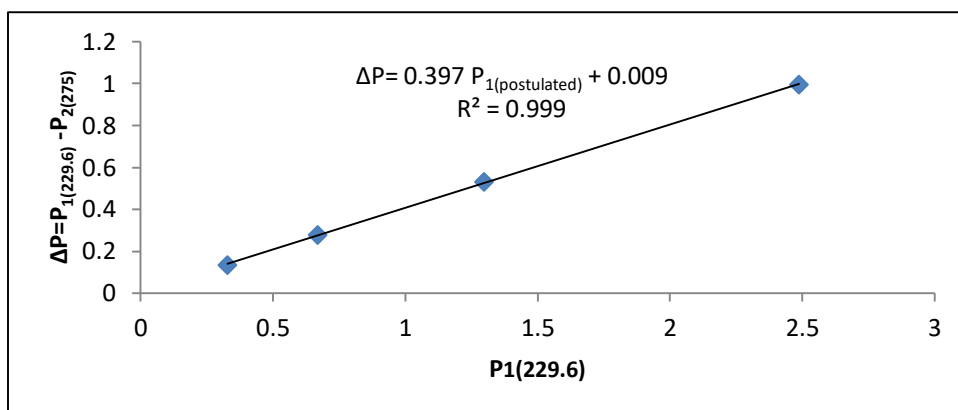
شکل ۳-۴: طیف نسبی حاصل از تقسیم محلول‌های استاندارد ۲/۵۰، ۵/۰۰، ۱۰/۰ و ۲۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر رزورسینول بر طیف ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر کتکول به عنوان مقسوم علیه در مرحله بعد یک جفت طول موج (مثلاً ۲۲۹/۶ و ۲۷۵/۰ نانومتر) انتخاب و دامنه جذب نسبی در آن جفت طول موج (P_2 و P_1) اندازه‌گیری گردید. اختلاف دامنه جذب نسبی ($\Delta P = P_1 - P_2$) برای طیف نسبی هر محلول محاسبه گردید (جدول (۳-۶)). اختلاف دامنه نسبی ΔP برحسب P_1 رسم گردید (شکل (۳-۵)) که معادله خط مستقیم حاصل (معادله (۳-۱)) به صورت زیر است:

$$\Delta P = 0.397 P_{POS} + 0.009 \quad R^2 = 0.999 \quad \text{معادله (۳-۱)}$$

در مرحله بعد طیف هر مخلوط به طیف ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر کتکول تقسیم شد. سپس مقدار دامنه نسبی در دو طول موج ۲۲۹/۶ و ۲۷۵/۰ نانومتر اندازه‌گیری و اختلاف آنها ($\Delta P_{mix} = P_1 - P_2$) محاسبه شد این مقدار ΔP در معادله (۳-۱) قرار داده شده و $P_{postulated}$ (پیش‌بینی شده) برای هر مخلوط محاسبه شد.

جدول ۳-۶: نتایج حاصل از اندازه گیری بزرگی دامنه‌ها در طیف‌های نسبی حاصل از شکل (۳-۴)

غلظت رزورسینول (mg/L)	بزرگی دامنه در ۲۲۹/۶ نانومتر (P ₁)	بزرگی دامنه در ۲۷۵/۰ نانومتر (P ₂)	اختلاف بزرگی دامنه‌ها (ΔP=P ₁ -P ₂)
۲/۵۰	۰/۳۲۷	۰/۱۹۳	۰/۱۳۴
۵/۰۰	۰/۶۶	۰/۳۹۰	۰/۲۷۰
۱۰/۰	۱/۲۹	۰/۷۶۸	۰/۵۲۲
۲۰/۰	۲/۴۸	۱/۴۹۳	۰/۹۸۷



شکل ۳-۵: نمودار اختلاف دامنه‌های نسبی (ΔP) بر حسب P₁

با به دست آوردن اختلاف بین مقدار P پیش بینی شده (P_{postulated}) و دامنه نسبی اندازه‌گیری شده برای هر مخلوط در طول موج ۲۲۹/۶ نانومتر (P_{recorded})، مقدار ثابت (C. V) در هر مخلوط به دست آمد. سپس مقدار ثابت به دست آمده در طیف مرتبه صفر مقسوم علیه بهینه شده ضرب شد که در این مرحله طیف مرتبه صفر کتکول در مخلوط به دست آمد. جذب کتکول در طول موج ماکزیمم (۲۷۴/۰ نانومتر) از روی طیف مرتبه صفر کتکول اندازه‌گیری و در منحنی کالیبراسیون مربوط (شکل (۳-۲)) قرار داده شد و غلظت کتکول در هر مخلوط به دست آمد. نتایج جدول (۳-۷) نشان می‌دهد که مقدار ثابت به دست آمده (C.V) به غلظت کتکول بستگی دارد و مستقل از غلظت رزورسینول می‌باشد.

جدول ۳-۷: نتایج حاصل از روش CC برای تعیین غلظت کتکول در مخلوط‌های انتخاب شده از سری ارزیابی

درصد خطای نسبی	غلظت پیش‌بینی شده کتکول (mg/L)	C. V	P _{recorded}	P _{postulated}	Δp	P _r	P _l	Mix	
								CAT	RES
۰/۸	۲/۵۲	۰/۲۵۴	۰/۸۶۱	۰/۶۰۷	۰/۲۵۰	۰/۶۱۱	۰/۸۶۱	۲/۵۰	۵/۰۰
۱/۸	۵/۰۹	۰/۵۱۱	۲/۳۳۵	۱/۸۲۴	۰/۷۳۳	۱/۶۰۲	۲/۳۳۵	۵/۰۰	۱۵/۰
-۲	۱۴/۷	۱/۴۷۹	۲/۸۰۹	۱/۳۳	۰/۵۳۹	۲/۲۷۰	۲/۸۰۹	۱۵/۰	۱۰/۰
۴	۲۰/۸	۲/۰۲۴	۲/۴۴۷	۰/۴۲۳	۰/۱۷۷	۲/۲۷۰	۲/۴۴۷	۲۰/۰	۲/۵۰

جدول ۳-۸: نتایج حاصل از بهینه سازی غلظت کتکول به عنوان مقسوم علیه و جفت طول موج‌های انتخابی برای روش CC در تعیین غلظت کتکول در مخلوط‌های سری ارزیابی

خطا در پیش بینی غلظت کتکول							طول موج (نانومتر)
Δλ	ΔA*(RES- ۱۰/۰mg/L)	ΔA*(CAT- ۱۰/۰mg/L)	غلظت ۲۰/۰ میلی گرم بر لیتر کتکول به عنوان مقسوم علیه		غلظت ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر کتکول به عنوان مقسوم علیه		
			MRE	MSE	MRE	MSE	
۴۹	۰/۰۰۰۶	۰/۰۶۵	۰/۰۷۱	۰/۴۵۹	۰/۰۶۴	۰/۳۶۸	۲۳۰/۴ و ۲۷۹/۴
۳۵/۶	۰/۰۰۱	۰/۰۳۹	۰/۱۵۷	۲/۰۲	۰/۱۶۵	۲/۵۵	۲۳۰/۴ و ۲۶۶
۴۸/۴	۰/۰۰۶	۰/۰۶۶	۰/۰۶۹	۰/۴۹۳	۰/۰۵۸	۰/۳۰	۲۳۰ و ۲۷۸/۴
۴۸/۶	۰/۰۰۱	۰/۰۶۵	۰/۰۷۶	۰/۵۸۰	۰/۰۵۸	۰/۲۵۷	۲۳۰ و ۲۷۸/۶
۹	۰/۰۰۰۳	۰/۰۲۵	۰/۱۷۳	۲/۶۵	۰/۱۷۰	۲/۶۸	۲۶۸ و ۲۷۷
۳۹/۸	-۰/۰۰۶	۰/۰۵۵	۰/۱۲۳	۱/۲۰	۰/۱۱۶	۱/۲۷	۲۲۹/۶ و ۲۶۹/۴
۴۵/۴	۰/۰۰۱	۰/۰۷۸	۰/۰۶۱	۰/۳۸۹	۰/۰۵۲	۰/۲۷۳	۲۲۹/۶ و ۲۷۵
۴۳	۰/۰۰۴	۰/۰۵۹	۰/۰۹۱	۰/۷۴۱	۰/۰۹۰	۰/۷۱۵	۲۲۹ و ۲۷۲
۲۷/۲	-۰/۰۰۱۶	۰/۰۱۷	۰/۳۵۴	۹/۳۴	۰/۴۰۶	۱۵/۵۹	۲۳۲/۸ و ۲۶۰
۵۱/۴	۰/۰۸۹	۰/۰۰۶	۰/۰۷۵	۰/۶۳	۰/۰۷۲	۰/۶۰	۲۲۷/۲ و ۲۷۸/۸

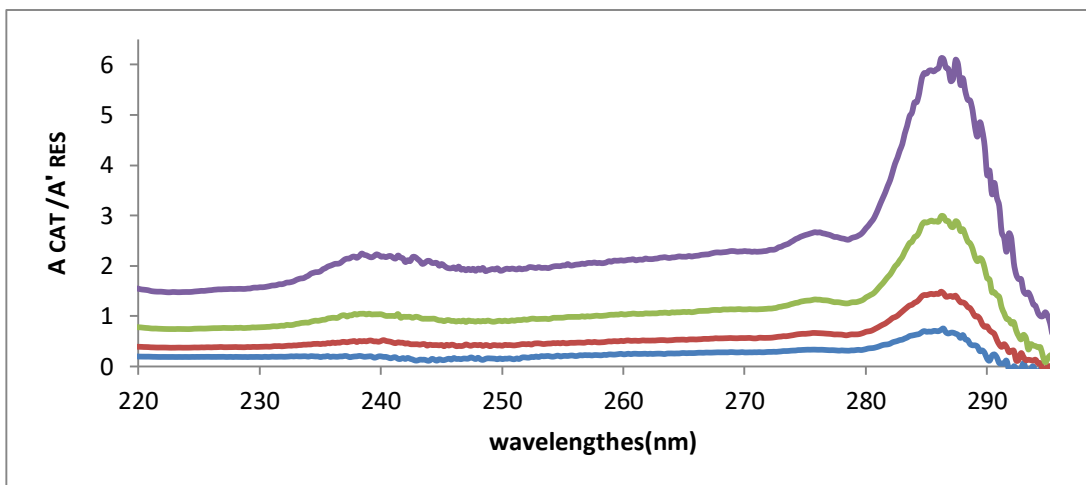
* اختلاف طیف جذبی (کتکول یا رزورسینول) در جفت طول موج‌های مختلف می باشد.

برای رسیدن به معیار مشخصی برای انتخاب جفت طول موج‌ها در این روش برای اندازه گیری غلظت کتکول (آنالیت) از جفت طول موج‌های مختلف استفاده شد. جفت طول موج‌های که مثل ۲۳۰/۴-۲۷۹/۴، ۲۳۰/۴-۲۶۶/۰، ۲۳۰/۴-۲۷۸/۴، ۲۳۰/۴-۲۷۸/۶، ۲۳۰/۴-۲۶۸/۰، ۲۶۸/۰-۲۷۷/۰، ۲۲۹/۶-۲۶۹/۴، ۲۲۹/۶-۲۷۵/۰، ۲۲۹/۶-۲۷۲/۰، ۲۳۲/۸-۲۶۰/۰ و ۲۷۲/۰-۲۶۰/۰ نانومتر اختلاف سیگنال جذب گونه کتکول (آنالیت) صفر نمی باشد ولی در این جفت

طول موج ها گونه رزورسینول (مزامم) دارای جذب یکسانی می باشد و همچنین در جفت طول موج ۲۲۷/۲- ۲۷۸/۸ نانومتر گونه کتکول دارای جذب یکسان و گونه رزورسینول جذب های متفاوتی دارد. علاوه بر بهینه شدن جفت طول موج باید غلظت مقسوم علیه بهینه شود که غلظت های ۱۰/۰ و ۲۰/۰ میلی گرم بر لیتر کتکول به عنوان مقسوم علیه در نظر گرفته شد، غلظت کتکول برای تمامی محلول های سری ارزیابی، تعیین شد و مقادیر MSE و MRE در شرایط به کار رفته محاسبه گردید که نتایج آن در جدول (۳-۸) آورده شده است. نتایج نشان می دهد که جفت طول موج بهینه، ۲۲۹/۶ و ۲۷۵/۰ نانومتر (گونه کتکول دارای جذبی متفاوت و گونه رزورسینول جذبی یکسان دارد)، و غلظت مقسوم علیه بهینه، ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر کتکول می باشد.

ب- بهینه سازی مقسوم علیه و طول موج در تعیین غلظت رزورسینول در روش (CC)

برای تعیین غلظت گونه رزورسینول در مخلوط به صورت زیر عمل شد ابتدا طیف محلول های استاندارد خالص ۲/۵۰، ۵/۰۰، ۱۰/۰ و ۲۰/۰ میلی گرم بر لیتر، کتکول بر طیف خالص محلول رزورسینول با غلظت مشخص ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر به عنوان مقسوم علیه تقسیم گردید. (شکل (۳-۶)).



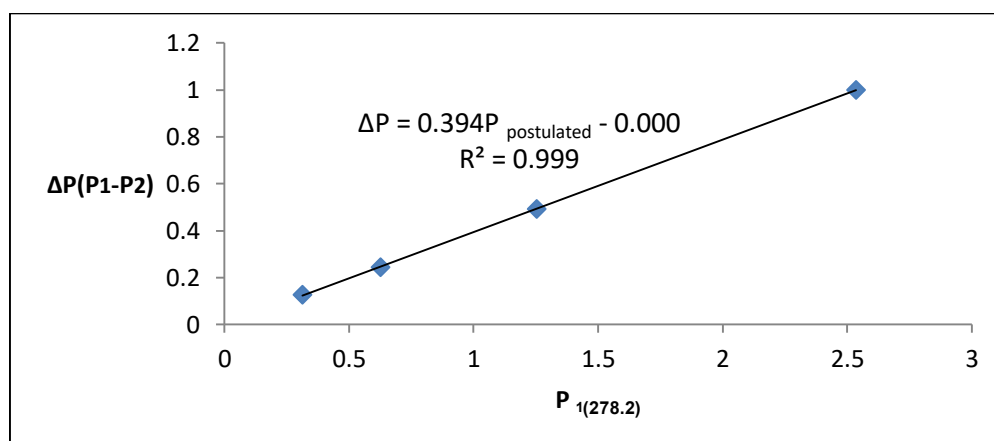
شکل ۳-۶: طیف نسبی حاصل از تقسیم محلول های استاندارد ۲/۵۰، ۵/۰۰، ۱۰/۰ و ۲۰/۰ میلی گرم بر لیتر کتکول بر طیف ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر رزورسینول به عنوان مقسوم علیه
 سپس دو جفت طول موج ۲۲۷/۲ و ۲۷۸/۲ نانومتر به عنوان طول موج برای اندازه گیری دامنه نسبی P_1 و P_2

انتخاب گردید. مقدار دامنه نسبی برای هر غلظت اندازه گرفته شد و اختلاف آن‌ها محاسبه گردید ($\Delta P = P_1 - P_2$).

سپس نمودار اختلاف دامنه ΔP بر حسب P_1 رسم گردید (جدول (۳-۹) و شکل (۳-۷)).

جدول ۳-۹: نتایج حاصل از اندازه گیری بزرگی دامنه‌ها در طیف‌های نسبی حاصل در شکل (۳-۶)

اختلاف بزرگی دامنه‌ها ($\Delta P = P_1 - P_2$)	بزرگی دامنه در $278/2$ نانومتر (P_2)	بزرگی دامنه در $278/2$ نانومتر (P_1)	غلظت کتکول (mg/L)
۰/۱۲۷	۰/۱۸۵	۰/۳۱۲	۲/۵۰
۰/۲۴۳	۰/۳۸۳	۰/۶۲۶	۵/۰۰
۰/۴۹۲	۰/۷۶۰	۱/۲۵۲	۱۰/۰
۱/۰۰	۱/۵۳	۲/۵۳۲	۲۰/۰



شکل ۳-۷: نمودار اختلاف دامنه‌های نسبی (ΔP) و بر حسب P_1

در مرحله بعد طیف هر مخلوط به طیف رزورسینول با غلظت ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر به عنوان مقسوم علیه تقسیم شد. سپس دامنه نسبی در دو طول موج ذکر شده اندازه گیری شده و از یکدیگر کسر گردید. ΔP_{Mix} حاصل شده در معادله خط مستقیم در شکل (۳-۷) قرار داده شد و مقدار P پیش‌بینی شده ($P_{postulated}$) برای مخلوط محاسبه شد.

برای تعیین مقدار ثابت (C.V) در هر مخلوط، اختلاف بین مقدار P پیش‌بینی شده و دامنه نسبی اندازه‌گیری شده برای هر مخلوط در طول موج $278/2$ نانومتر ($P_{recorded}$)، به دست آمد. سپس مقدار به دست آمده در طیف مرتبه صفر مقسوم علیه بهینه شده ضرب شد، که طیف خالص رزورسینول در هر مخلوط به دست آمد. با

قراردادن جذب حاصل از طیف خالص به دست آمده در طول موج ماکزیمم، در منحنی کالیبراسیون رزورسینول (شکل (۳-۳))، غلظت رزورسینول موجود در مخلوط به دست آمد. در جدول (۳-۱۰) غلظت پیش‌بینی شده رزورسینول به روش CC برای تعدادی از مخلوط‌های سری ارزیابی آورده شده است.

جدول ۳-۱۰: نتایج حاصل از روش CC برای تعیین غلظت رزورسینول در مخلوط‌های انتخاب شده از سری ارزیابی

درصد خطای نسبی	غلظت پیش‌بینی شده رزورسینول (mg/L)	C. V	P _{recorded}	P _{postulated}	ΔP	P _{۲۲۷۲}	P _{۲۷۸۲}	Mix	
								CAT	RES
۱/۲	۵/۰۶	۰/۵۰۶	۰/۷۹۲	۰/۲۷۸	۰/۱۱۲	۰/۶۸۰	۰/۷۹۲	۲/۵۰	۵/۰۰
-۴/۹۳	۱۴/۲۶	۱/۴۲	۲/۰۷۱	۰/۶۴۷	۰/۳۵۵	۱/۸۱۶	۲/۰۷۱	۵/۰۰	۱۵/۰
-۵/۱	۹/۴۹	۰/۹۴۷	۲/۹۰	۱/۹۵	۰/۷۶۹	۲/۱۳۱	۲/۹۰	۱۵/۰	۱۰/۰
۸	۲/۷۰	۰/۲۷۰	۲/۸۳	۲/۵۶۵	۱/۰۱۰	۱/۸۲۴	۲/۸۳	۲۰/۰	۲/۵۰

جدول ۳-۱۱: نتایج حاصل از بهینه‌سازی جفت طول موج و غلظت رزورسینول به عنوان مقسوم علیه در پیش‌بینی غلظت رزورسینول در روش CC

خطادر پیش‌بینی غلظت رزورسینول							طول موج (نانومتر)
$\Delta\lambda$	$\Delta A(\text{RES}-10/0 \text{ mg/L})$	$\Delta A(\text{CAT}-10/0 \text{ mg/L})$	غلظت ۲۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر رزورسینول به عنوان مقسوم علیه		غلظت ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر رزورسینول به عنوان مقسوم علیه		
			MRE	MSE	MRE	MSE	
۴۲	۰/۰۷	۰/۰۰۱	۰/۰۵۹	۰/۴۸۶	۰/۰۵۹	۰/۴۹۸	۲۶۹/۴ و ۲۲۷/۴
۹/۴	۰/۰۱۶	۰/۰۰۰۳	۰/۱۹۳	۴/۱۴	۰/۱۶۸	۳/۱۰۵	۲۷۸/۸ و ۲۶۹/۴
۵۱	۰/۰۹۲	۰/۰۰۱	۰/۰۴۴	۰/۲۵۷	۰/۰۴۲	۰/۲۶۸	۲۷۸/۲ و ۲۲۷/۲
۴/۴	۰/۰۲۱	۰/۰۰۳	۰/۱۹۹	۲/۲۱	۰/۲۶۷	۴/۶۲	۲۷۶/۴ و ۲۷۲
۴۵/۴	۰/۰۹	۰/۰۰۴	۰/۰۶۹	۰/۵۶۸	۰/۰۶	۰/۴۰۸	۲۷۲ و ۲۲۶/۶
۳۲/۸	۰/۰۳۸	۰/۰۰۱	۰/۰۹۹	۱/۳۸۹	۰/۰۸۵	۱/۰۹۱	۲۶۲/۸ و ۲۳۰
۴۵/۴	۰/۰۰۱	۰/۰۷۸	۰/۱۱۳	۱/۵۰۲	۰/۰۸۵۵	۰/۳۷۱	۲۷۵ و ۲۲۹/۶

نتایج نشان می‌دهد که مقدار ثابت به دست آمده. برای هر مخلوط به غلظت رزورسینول وابسته است ولی

مستقل از غلظت کتکول می‌باشد. برای دست یابی به بهترین صحت در روش CC در تعیین غلظت رزورسینول، پارامترهای بهینه شده شامل:

۱- مقسوم علیه (غلظت رزورسینول).

۲- جفت طول موج های مختلفی که در آن ها اختلاف جذب گونه رزورسینول (آنالیت) متفاوت باشد و جذب گونه کتکول ثابت (مثل ۲۲۷/۴ - ۲۶۹/۴، ۲۶۹/۴ - ۲۷۸/۸، ۲۷۸/۸ - ۲۲۷/۲، ۲۷۸/۲ - ۲۷۲/۰، ۲۷۲/۰ - ۲۲۶/۶ - ۲۷۲/۰ و ۲۳۰/۰ - ۲۶۲/۸ نانومتر) یا طول موج هایی که اختلاف سیگنال جذب گونه رزورسینول ثابت و گونه کتکول (مزاحم) متفاوت می باشد (مثل طول موج ۲۲۹/۶ - ۲۷۵/۰ نانومتر).

این دو پارامتر بر روی محلول‌های سری ارزیابی به صورت هم زمان بهینه شد. نتایج حاصل در جدول (۱۱-۳) گزارش شده است که نشان می‌دهد جفت طول موج بهینه، ۲۲۷/۲ و ۲۷۸/۲ نانومتر که در این جفت طول موج جذب گونه کتکول (مزاحم) ثابت و جذب گونه رزورسینول (آنالیت) متفاوت می باشد و غلظت مقسوم علیه بهینه، ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر رزورسینول انتخاب شد.

۳-۵-۲ روش تفاضل نسبی (RD)

روش اسپکتروفتومتری دیگر که برای اندازه‌گیری همزمان غلظت کتکول و رزورسینول در مخلوط به کاربرده شد روش اختلاف نسبی (RD) می‌باشد.

الف - بهینه سازی مقسوم علیه و طول موج در تعیین غلظت کتکول در روش RD

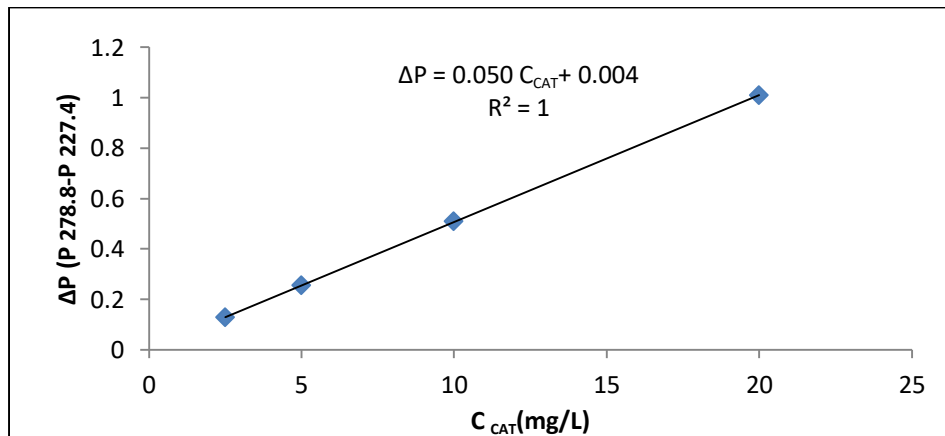
برای به دست آوردن غلظت کتکول در مخلوط به روش زیر عمل شد:

در مرحله اول طیف محلول‌های استاندارد خالص ۲/۵۰، ۵/۰۰، ۱۰/۰ و ۲۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر کتکول بر طیف محلول رزورسینول با غلظت مشخص ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر به عنوان مقسوم علیه تقسیم گردید (شکل ۳-۳). سپس یک جفت طول موج (مثلا ۲۷۸/۸ و ۲۲۷/۴ نانومتر) برای اندازه‌گیری دامنه نسبی P_1 و P_2 انتخاب

گردید. مقدار دامنه نسبی برای هر غلظت اندازه‌گیری شد و از یک دیگر کسر گردید ($\Delta P = P_1 - P_2$). سپس نمودار اختلاف دامنه (ΔP) بر حسب غلظت کتکول (C_{CAT}) رسم شد (جدول (۳-۱۲) و شکل (۳-۸)). در مرحله بعد طیف مخلوط بر طیف خالص رزورسینول با غلظت ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر به عنوان مقسوم علیه تقسیم شد. سپس بزرگی جذب نسبی در P_1 و P_2 اندازه‌گیری شد و اختلاف آن‌ها محاسبه گردید و با جایگذاری ΔP_{Mix} حاصل شده در معادله خط شکل (۳-۸)، غلظت کتکول در هر مخلوط محاسبه شد.

جدول ۳-۱۲: نتایج حاصل از اندازه‌گیری بزرگی دامنه در طیف نسبی حاصل از شکل (۳-۶) در روش RD

اختلاف بزرگی دامنه‌ها .. ($\Delta P = P_1 - P_2$)	بزرگی دامنه در نانومتر (P_2)	بزرگی دامنه در نانومتر (P_1)	غلظت کتکول (mg/L)
۰/۱۳۱	۰/۱۸۵	۰/۳۱۶	۲/۵۰
۰/۲۵۵	۰/۳۸۴	۰/۶۳۹	۵/۰۰
۰/۵۰۱	۰/۷۵۹	۱/۲۶۹	۱۰/۰
۱/۰۱۱	۱/۵۳۲	۲/۵۴۸	۲۰/۰



شکل ۳-۸: نمودار کالیبراسیون کتکول در روش RD

جدول ۳-۱۳: نتایج حاصل از روش RD برای تعیین غلظت کتکول در مخلوط‌های انتخاب شده از سری ارزیابی

درصد خطای نسبی	غلظت پیش بینی شده کتکول (mg/L)	ΔP	$P_{227/4}$	$P_{278/8}$	Mix	
					CAT	RES
۲/۸	۲/۵۷	۰/۱۳۵	۰/۶۷۲	۰/۸۰۷	۲/۵۰	۵/۰۰
۴/۵۸	۵/۲۴	۰/۲۷۱	۱/۸۲۵	۲/۰۹۶	۵/۰۰	۱۵/۰
۲	۲۰/۴۰	۱/۰۴۴	۱/۸۳	۲/۸۷۴	۲۰/۰	۲/۵۰
-۰/۳	۹/۹۷	۰/۵۱۲	۱/۰۲۸	۱/۵۴۰	۱۰/۰	۲/۵۰

نتایج حاصل در جدول (۳-۱۳) برای تعدادی از محلول‌های سری ارزیابی، در غلظت گونه کتکول با استفاده از روش RD آورده شده است. برای دست یابی به بهترین صحت در روش RD برای تعیین غلظت کتکول، پارامترهای مقسوم علیه و طول موج بهینه شد. این دو پارامتر بر روی مخلوط‌های سری ارزیابی به صورت همزمان بهینه شد. با توجه به اینکه معیاری برای انتخاب جفت طول موج‌ها گزارش نشده است، جفت طول موج‌های مختلفی انتخاب شد که در آن‌ها سیگنال جذب گونه کتکول (آنالیت) متفاوت باشد مثل ۲۳۰/۴-۲۷۹/۴، ۲۳۰/۴-۲۶۶/۰، ۲۶۶/۰-۲۳۰/۴، ۲۳۰/۴-۲۷۸/۴، ۲۳۰/۴-۲۷۸/۶، ۲۶۸/۰-۲۶۸/۰، ۲۶۸/۰-۲۶۹/۴، ۲۶۹/۴-۲۲۹/۶، ۲۶۹/۴-۲۲۹/۶، ۲۷۵/۰-۲۲۹/۶، ۲۷۵/۰-۲۹۹/۰، ۲۷۲/۰-۲۳۲/۸، ۲۳۲/۸-۲۶۰/۰ نانومتر و یا اینکه جفت طول موج‌های که سیگنال جذب گونه کتکول ثابت باشد (مثل ۲۲۷/۴-۲۷۸/۸ نانومتر). اساس انتخاب آن‌ها با کمک پارامترهای آماری نظیر میانگین مربع خطا و میانگین خطای نسبی (MRE و MSE) می‌باشد. نتایج حاصل در جدول (۳-۱۴) گزارش شد.

جدول ۳-۱۴: نتایج حاصل از بهینه سازی جفت طول موج و غلظت رزورسینول به عنوان مقسوم علیه در پیش بینی غلظت کتکول در روش RD

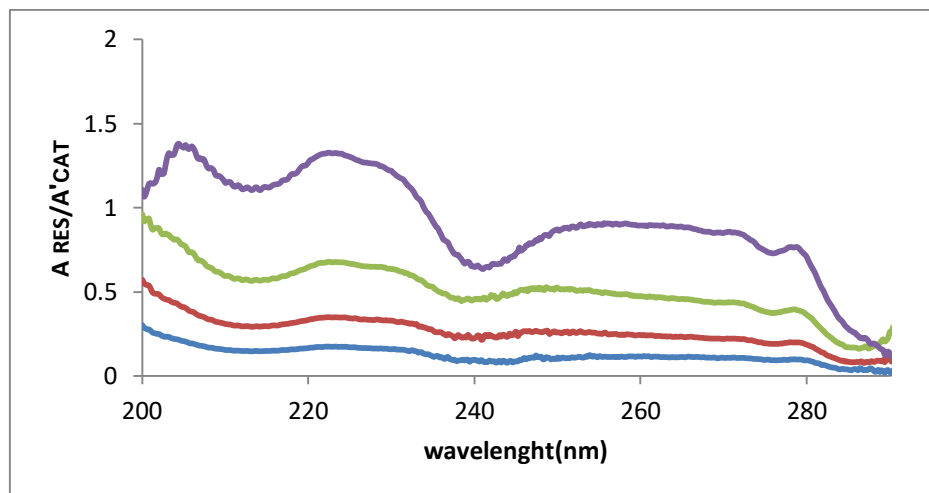
خطادر پیش بینی غلظت کتکول							طول موج(نانومتر)
$\Delta\lambda$	$\Delta A(\text{RES}-10/10\text{mg/L})$	$\Delta A(\text{CAT}-10/10\text{mg/L})$	غلظت ۲۰/۱۰ میلی گرم بر لیتر رزورسینول به عنوان مقسوم علیه		غلظت ۱۰/۱۰ میلی گرم بر لیتر رزورسینول به عنوان مقسوم علیه		
			MRE	MSE	MRE	MSE	
۴۹	۰/۰۰۰۶	۰/۰۶۵	۰/۰۵۹	۰/۵۲۲	۰/۰۶۵	۰/۳۵۱	۲۷۹/۴ و ۲۳۰/۴
۳۵/۶	۰/۰۰۱	۰/۰۳۹	۰/۰۸۹	۰/۹۰۲	۰/۱۰۲	۱/۱۶۲	۲۶۶/۰ و ۲۳۰/۴
۴۸/۴	۰/۰۰۶	۰/۰۶۶	۰/۰۵۱	۰/۳۸۸	۰/۰۴۴	۰/۲۸۷	۲۷۸/۴ و ۲۳۰
۴۸/۶	۰/۰۰۱	۰/۰۶۵	۰/۰۴۵	۰/۳۱۰	۰/۰۴۵	۰/۳۰۶	۲۷۸/۶ و ۲۳۰
۹	۰/۰۰۰۳	۰/۰۲۵	۰/۲۰۹	۶/۳۴	۰/۱۹۳	۲/۵۳	۲۷۷ و ۲۶۸
۳۹/۸	-۰/۰۰۶	۰/۰۵۵	۰/۰۸۱	۰/۸۴۲	۰/۰۸۸	۰/۹۰۳	۲۶۹/۴ و ۲۲۹/۶
۴۵/۴	۰/۰۰۱	۰/۰۷۸	۰/۰۵۵	۰/۱۶۰	۰/۰۴۴	۰/۲۴۷	۲۷۵ و ۲۲۹/۶
۴۳	۰/۰۰۴	۰/۰۵۹	۰/۰۸۸	۰/۸۷۰	۰/۰۷۳	۰/۷۰۲	۲۷۲ و ۲۲۹
۲۷/۲	-۰/۰۰۱۶	۰/۰۱۷	۰/۲۰۱	۴/۲۰۴	۰/۲۸۰	۶/۵۸	۲۶۰ و ۲۳۲/۸
۵۱/۴	۰/۰۸۹	۰/۰۰۶	۰/۰۶۱	۰/۷۵۷	۰/۰۳۹	۰/۲۹۸	۲۷۸/۸ و ۲۲۷/۴

جفت طول موج ۲۲۷/۴ و ۲۷۸/۸ نانومتر به عنوان بهترین جفت طول موج (جذب گونه کتکول ثابت و گونه رزورسینول متفاوت) می باشد و همچنین غلظت ۱۰/۱۰ میلی گرم بر لیتر از رزورسینول به عنوان مقسوم علیه بهینه انتخاب شد.

ب - بهینه سازی مقسوم علیه و طول موج در تعیین غلظت رزورسینول در روش (RD)

برای تعیین غلظت رزورسینول در مخلوط به صورت زیر عمل می کنیم .

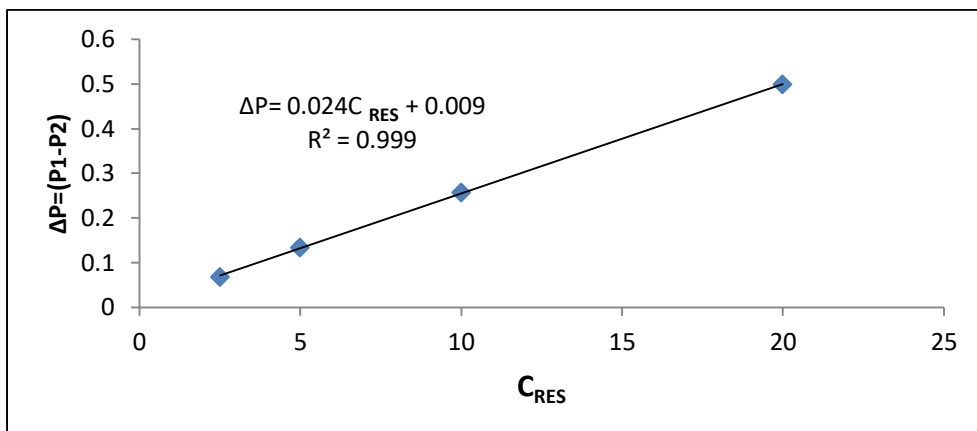
ابتدا برای رسم منحنی کالیبراسیون، طیف محلول های استاندارد خالص ۲/۵۰، ۵/۰۰، ۱۰/۰ و ۲۰/۰ میلی گرم بر لیتر رزورسینول بر طیف محلول کتکول با غلظت مشخص ۲۰/۱۰ میلی گرم بر لیتر به عنوان مقسوم علیه تقسیم گردید (شکل (۳-۹)).



شکل ۳-۹: طیف نسبی حاصل از تقسیم محلول‌های استاندارد ۲/۵۰، ۵/۰۰، ۱۰/۰ و ۲۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر رزورسینول بر طیف ۲۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر کتکول به عنوان مقسوم علیه در مرحله بعد طیف نسبی محلول‌های بالا در طول موج‌های (P_۱) ۲۲۷/۲ و (P_۲) ۲۷۸/۲ نانومتر ثبت گردید و اختلاف (ΔP) آن‌ها محاسبه گردید. نمودار اختلاف نسبی (ΔP) بر حسب غلظت رزورسینول رسم شد (جدول (۳-۱۵) و شکل (۳-۱۰)).

جدول ۳-۱۵: نتایج حاصل از اندازه‌گیری بزرگی دامنه در طیف نسبی حاصل در (شکل ۳-۹) روش RD

اختلاف بزرگی دامنه - ها (ΔP=P _۱ - P _۲)	بزرگی دامنه در نانومتر (P _۲) ۲۷۸/۲	بزرگی دامنه در نانومتر (P _۱) ۲۲۷/۲	غلظت رزورسینول (mg/L)
۰/۰۶۷	۰/۰۹۸	۰/۱۶۶	۲/۵۰
۰/۱۳۴	۰/۲	۰/۳۳۴	۵/۰۰
۰/۲۵۷	۰/۳۹۴	۰/۶۵۱	۱۰/۰
۰/۴۹۹	۰/۷۶۵	۱/۲۶۴	۲۰/۰



شکل ۳-۱۰: نمودار کالیبراسیون رزورسینول در روش RD

سپس طیف هر مخلوط بر طیف خالص ۲۰٪ میلی گرم بر لیتر کتکول تقسیم شد و دامنه نسبی در دو طول موج ۲۲۷/۲ و ۲۷۸/۲ نانومتر ثبت گردید. سپس اختلاف آن‌ها محاسبه شد (ΔP_{Mix})، با قراردادن اختلاف آن‌ها در معادله خط منحنی کالیبراسیون رزورسینول (شکل ۳-۱۰)، غلظت رزورسینول موجود در هر مخلوط محاسبه شد. نتایج حاصل از به کار بردن روش RD برای پیش‌بینی غلظت رزورسینول موجود در محلول‌های سری ارزیابی در جدول (۳-۱۶) آورده شده است.

جدول ۳-۱۶: نتایج حاصل از روش RD برای تعیین غلظت رزورسینول در مخلوط‌های انتخاب شده از سری ارزیابی در طول موج‌های ۲۲۷/۲ و ۲۷۸/۲ نانومتر

درصد خطای نسبی	غلظت پیش‌بینی شده رزورسینول (mg/L)	ΔP	$P_{278/2}$	$P_{227/2}$	Mix	
					CAT	RES
-۹/۶	۲/۲۶۶	۰/۰۶۳	۰/۲۳۰	۰/۲۹۴	۲/۵۰	۲/۵۰
-۰/۸	۱۴/۸۸	۰/۳۶۶	۰/۸۱۶	۱/۱۸۳	۵/۰۰	۱۵/۰
۰/۲۵	۲۰/۰۵	۰/۴۹۰	۱/۲۴۷	۱/۷۳۸	۱۰/۰	۲۰/۰
۰/۸	۵/۰۴	۰/۱۳۰	۰/۹۵۲	۱/۰۸۲	۱۵/۰	۵/۰۰
۴/۴	۱۵/۶۶	۰/۳۸۵	۱/۶۰۸	۱/۹۹۳	۲۰/۰	۱۵/۰

برای رسیدن به بهترین گزینش‌پذیری و حساسیت باید متغیرهای موثر بر غلظت رزورسینول در روش RD بهینه شوند. این متغیرها غلظت کتکول به عنوان مقسوم علیه و جفت طول موج می‌باشد. این دو متغیر همزمان روی مخلوط‌های سری ارزیابی بهینه شد.

جدول ۳-۱۷: نتایج حاصل از بهینه سازی جفت طول موج و غلظت کتکول به عنوان مقسوم علیه در پیش بینی غلظت رزورسینول در روش RD

خطادر پیش بینی غلظت رزورسینول							طول موج(نانومتر)
$\Delta\lambda$	$\Delta A(\text{RES}-1\%/0\text{mg/L})$	$\Delta A(\text{CAT}-1\%/0\text{mg/L})$	غلظت ۲۰/۰ میلی گرم بر لیتر کتکول به عنوان مقسوم علیه		غلظت ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر کتکول به عنوان مقسوم علیه		
			MRE	MSE	MRE	MSE	
۵۱/۴	۰/۰۸۹	۰/۰۰۶	۰/۰۴۰	۰/۱۷۲	۰/۰۳۷	۰/۱۸۱	۲۷۸/۸ و ۲۲۷/۴
۴۲	۰/۰۷	۰/۰۰۱	۰/۰۶۰	۰/۴۷۱	۰/۰۵۳	۰/۳۹۶	۲۶۹/۴ و ۲۲۷/۴
۹/۴	۰/۰۱۶	۰/۰۰۰۳	۰/۱۶۳	۲/۹۸۸	۰/۱۶۸	۳/۳۴	۲۷۸/۸ و ۲۶۹/۴
۵۱	۰/۰۹۲	۰/۰۰۱	۰/۰۳۵	۰/۱۶۳	۰/۰۵۰	۰/۳۱۶	۲۷۸/۲ و ۲۲۷/۲
۴/۴	۰/۰۲۱	۰/۰۰۳	۰/۱۷۶	۱/۴۶۵	۰/۱۴۷	۱/۲۴۵	۲۷۶/۴ و ۲۷۲
۴۵/۴	۰/۰۹	۰/۰۰۴	۰/۰۴۹	۰/۲۷۶	۰/۰۵۲	۰/۲۸۰	۲۷۲ و ۲۲۶/۶
۳۲/۸	۰/۰۳۸	۰/۰۰۱	۰/۰۸۹	۱/۱۰۴	۰/۰۹۴	۰/۹۵۶	۲۶۲/۸ و ۲۳۰
۴۵/۴	۰/۰۰۱	۰/۰۷۸	۰/۰۶۶	۰/۴۷۹	۰/۰۷۷	۰/۷۰۸	۲۷۵ و ۲۲۹/۶
۴۳	۰/۰۰۴	۰/۰۵۹	۰/۰۸۱	۰/۶۰۱	۰/۰۸۳	۰/۶۵۷	۲۷۲ و ۲۲۹

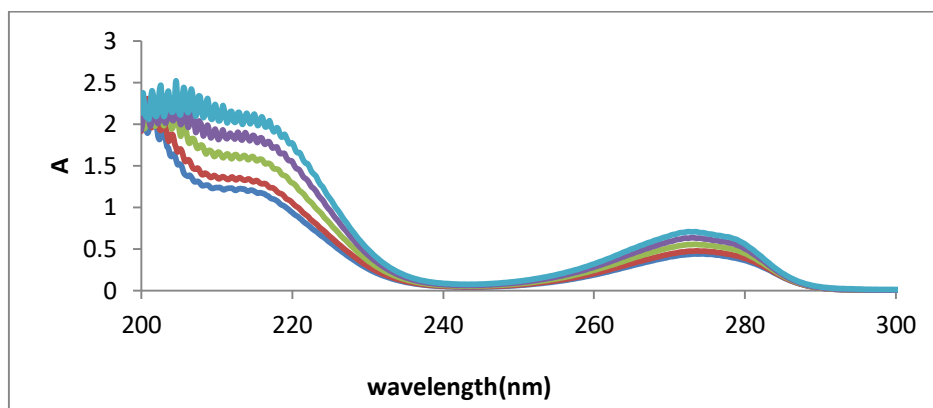
نتایج حاصل از جدول (۳-۱۵) نشان می دهد، که تغییر غلظت کتکول به عنوان مقسوم علیه و همچنین تغییر جفت طول موجها بر خطای حاصل از پیش بینی غلظت رزورسینول موجود در مخلوطهای سری ارزیابی موثر می باشد، پس برای دست یابی به معیار مشخصی در انتخاب جفت طول موجها در روش RD از جفت طول موج های مختلف استفاده شد که در آن ها جذب گونه رزورسینول (آنالیت) متفاوت باشد (مثل ۲۲۷/۴ - ۲۷۸/۸، ۲۲۷/۴ - ۲۶۹/۴، ۲۶۹/۴ - ۲۷۸/۸، ۲۲۷/۲ - ۲۷۸/۲، ۲۷۲/۰ - ۲۲۶/۶، ۲۷۶/۴ - ۲۷۲/۰، ۲۷۲/۰ - ۲۲۹/۰ و ۲۳۰/۰ - ۲۶۲/۸ نانومتر) و نیز جذب گونه رزورسینول یکسان نباشد (مثل ۲۲۹/۶ - ۲۷۵/۰ و ۲۲۹/۰ - ۲۷۲/۰ نانومتر) پس بنابراین غلظت بهینه کتکول ۲۰/۰ میلی گرم بر لیتر به عنوان مقسوم علیه و جفت طول موج بهینه که ۲۲۷/۲ و ۲۷۸/۲ نانومتر که در آن جذب گونه رزورسینول متفاوت و جذب گونه کتکول ثابت می باشد.

۳-۵-۵-۳ روش افزایش استاندارد نقطه H در دو طول موج (HPSAM)

به دلیل اینکه در این پایان نامه یکی از روش های به کار برده شده روش افزایش استاندارد نقطه H نسبی (RHPSAM) بود، که اساس این روش افزایش استاندارد نقطه H (HPSAM) می باشد، غلظت گونه ها در مخلوط به روش HPSAM هم اندازه گیری و با روش RHPSAM مقایسه گردید

مراحل تعیین غلظت کتکول و رزورسینول در مخلوطها:

ابتدا طیف هر مخلوط ثبت شد. سپس همانند روش افزایش استاندارد مقادیر متفاوتی از گونه رزورسینول به مخلوط (۲۰/۰ میلی گرم بر لیتر کتکول و ۲/۵۰ میلی گرم بر لیتر رزورسینول) اضافه و طیف آنها ثبت شد (شکل (۳-۱۱)). سپس در جفت طول موج های انتخاب شده مناسب (مثلا طول موج های ۲۲۷/۴ و ۲۷۸/۸ نانومتر) جذب هر مخلوط اندازه گیری و ثبت گردید (جدول (۳-۱۸)). سپس جذب در دو طول موج برحسب غلظت رزورسینول اضافه شده روی یک نمودار رسم گردید (شکل (۳-۱۲)).

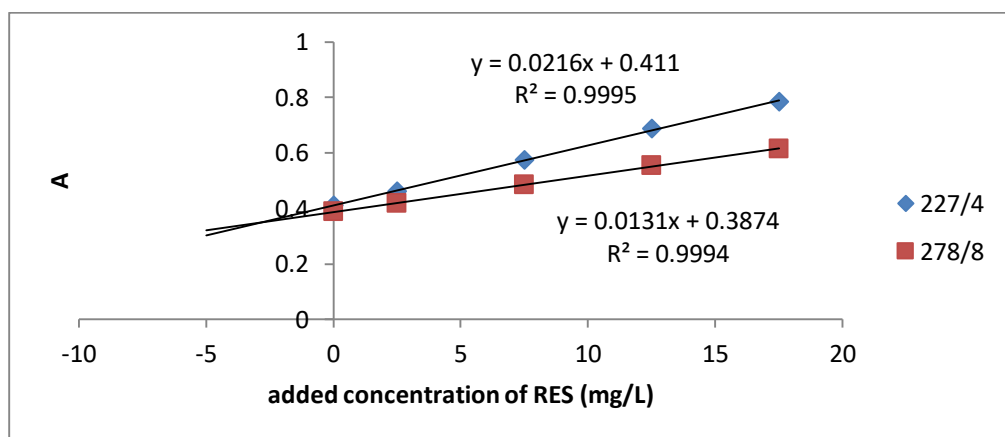


شکل ۳-۱۱: طیف جذبی مخلوط های حاوی، ۲/۵۰، ۵/۱۰۰، ۱۰/۰، ۱۵/۰ و ۲۰/۰ میلی گرم بر لیتر رزورسینول و ۲۰/۰ میلی گرم بر لیتر کتکول

جدول ۳-۱۸: جذب به دست آمده برای مخلوط ۲۰/۰ میلی گرم بر لیتر کتکول و رزورسینول با غلظت های مختلف در جفت طول موج ۲۷۸/۸ و ۲۲۷/۴ نانومتر برای هر مخلوط در روش HPSAM

غلظت رزورسینول اضافه شده (میلی گرم بر لیتر)	جذب در طول موج ۲۷۸/۸ نانومتر	جذب در طول موج ۲۲۷/۴ نانومتر
۰	۰/۳۸۸	۰/۴۱۱
۲/۵۰	۰/۴۱۸	۰/۴۶۳
۷/۵۰	۰/۴۸۶	۰/۵۷۴
۱۲/۵۰	۰/۵۵۴	۰/۶۸۷
۱۷/۵۰	۰/۶۱۴	۰/۷۸۶

محل تقاطع دو خط مستقیم در دو طول موج، نقطه H را نشان می دهد. با استفاده از معادله های (۲-۱۴) و (۲-۲۰) به ترتیب غلظت رزورسینول و جذب کتکول محاسبه گردید. سپس در یکی از طول موج های ۲۲۷/۴ یا ۲۷۸/۸ نانومتر منحنی کالیبراسیون کتکول رسم شد (معادله (۲-۳)) و با قرار دادن عرض نقطه H (A_H) در معادله (۲-۳) کالیبراسیون کتکول، غلظت کتکول محاسبه شد. برای بقیه مخلوط های سری ارزیابی و تست به همین روش انجام شد. جدول (۳-۱۹) نتایج حاصل از به کار بردن روش HPSAM در تعدادی از مخلوط های سری ارزیابی را نشان می دهد.



شکل ۳-۱۲: نمودار افزایش استاندارد نقطه H- به همراه معادله برای مخلوط ۲/۵۰ میلی گرم بر لیتر رزورسینول و ۲۰/۰ میلی گرم بر لیتر کتکول

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

درصد خطای نسبی %		غلظت محاسبه شده (mg/L)		R ²	معادله رگرسیون	طول موج (نانومتر)	غلظت واقعی (mg/L)	
رزورسینول	کتکول	رزورسینول	کتکول				رزورسینول	کتکول
-۴/۶	۱۰/۰	۴/۷۷	۲/۷۵	۰/۹۹۹	$Y = 0.022 C + 0.152$	۲۲۷/۴	۵/۰۰	۲/۵۰
				۰/۹۹۹	$Y = 0.013 C + 0.109$	۲۷۸/۸		
-۸/۹	۱۵/۰	۹/۱۱	۱۱/۵۰	۰/۹۹۹	$Y = 0.021 C + 0.387$	۲۲۷/۴	۱۰/۰	۱۰/۰
				۰/۹۹۹	$Y = 0.012 C + 0.305$	۲۷۸/۸		
۱۰/۰	۳/۱۳	۵/۵۰	۱۵/۴۷	۰/۹۹۹	$Y = 0.020 C + 0.373$	۲۲۷/۴	۵/۰۰	۱۵/۰
				۰/۹۹۹	$Y = 0.012 C + 0.329$	۲۷۸/۸		
۱۲/۵	۳/۵۰	۱۱/۲۵	۲۰/۷	۰/۹۹۸	$Y = 0.020 C + 0.577$	۲۲۷/۴	۱۰/۰	۲۰/۰
				۰/۹۹۸	$Y = 0.012 C + 0.487$	۲۷۸/۸		

برای دستیابی به بهترین صحت و حساسیت باید زوج طول موجی انتخاب شود که سیگنال تجزیه‌ای (جذب) گونه مزاحم (کتکول) در دو طول موج با هم برابر باشد و علاوه بر آن سیگنال تجزیه‌ای گونه آنالیت (رزورسینول) تا حد امکان باهم اختلاف داشته باشند.

$$\lambda_{278.8} \rightarrow A = 0.0170C_{CAT} - 0.0002 \quad R^2 = 1 \quad \text{(معادله ۳-۲)}$$

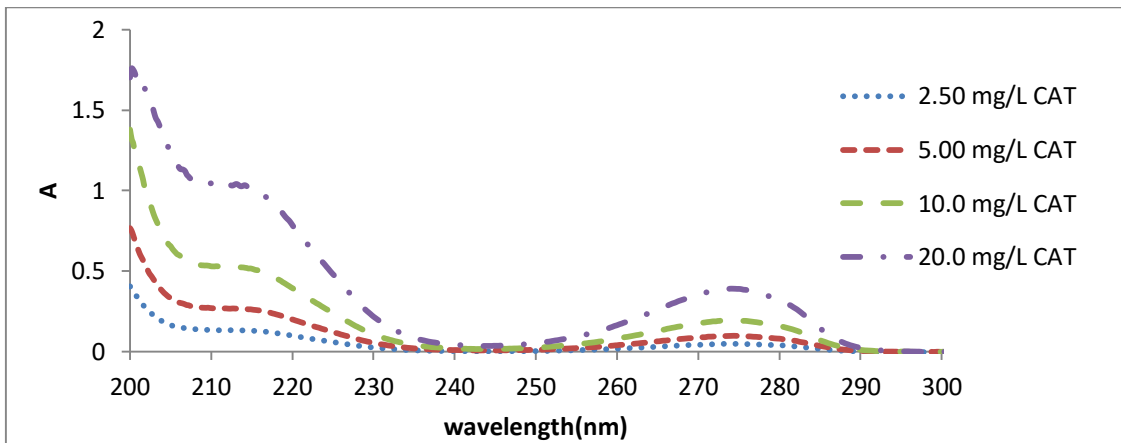
در جدول (۳-۲۰) نتایج مخلوط‌های سری ارزیابی نشان می‌دهد که بهترین طول موج ۲۲۷/۴ و ۲۷۸/۸ نانومتر می‌باشد. که کمترین خطا را در تعیین غلظت‌های ایجاد می‌کنند. لازم به ذکر است که جفت طول موج‌های انتخابی طبق شرایط مذکور در روش HPSAM انتخاب شدند.

جدول ۳-۲۰: نتایج حاصل از بهینه سازی طول موج در پیش‌بینی غلظت دو گونه در سری ارزیابی در روش HPSAM

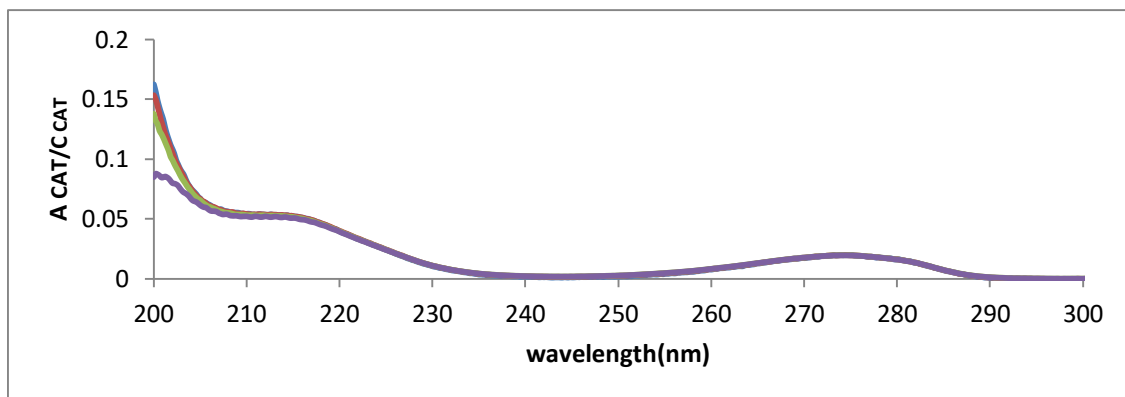
خطادر پیش بینی غلظت رزورسینول		خطادر پیش بینی غلظت کتکول		طول موج
MER	MSE	MER	MSE	
۰/۰۹۳	۱/۸۹	۰/۱۲۶	۱/۲۷	۲۲۷/۴ و ۲۷۸/۸
۰/۰۹۲	۲/۵۴	۰/۱۴۴	۱/۸۷	۲۲۶/۶ و ۲۷۴/۸
۰/۲۱۷	۸/۱۸	۰/۳۰۲	۶/۴۱	۲۳۰ و ۲۶۲/۸
۰/۱۴۴	۷/۱۸	۰/۲۰۱	۱۰/۶۲	۲۲۷/۴ و ۲۶۹/۴

۳-۵-۴ روش افزایش استاندارد نقطه H-نسبی (RHPSAM)

روش اسپکتروفوتومتری دیگری که برای اندازه‌گیری همزمان کتکول و رزورسینول به کار برده شده است. روش افزایش استاندارد نقطه H نسبی است. در این روش از طیف نرمال کتکول به عنوان مقسوم علیه استفاده شده است. برای دستیابی به طیف نرمال کتکول، طیف جذبی خالص (شکل ۳-۱۳) هر محلول به غلظت همان محلول تقسیم شد (شکل ۳-۱۴).

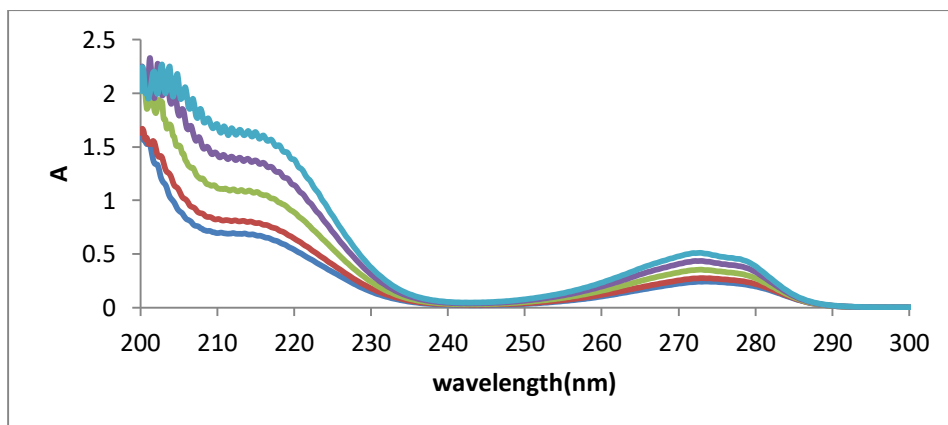


شکل ۳-۱۳: طیف جذبی محلول‌های خالص ۲/۵۰، ۵/۰۰، ۱۰/۰ و ۲۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر کتکول



شکل ۳-۱۴: طیف‌های جذبی نرمال شده محلول‌های خالص ۲/۵۰، ۵/۰۰، ۱۰/۰ و ۲۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر کتکول بعد از تقسیم کردن به غلظت هر محلول

برای تعیین کتکول و رزورسینول در مخلوط، ابتدا طیف هر مخلوط ثبت شد. به عنوان مثال طیف برای مخلوط ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر کتکول و ۲/۵۰ میلی گرم بر لیتر رزورسینول ثبت گردید. سپس همانند روش افزایش استاندارد مقادیر متفاوتی از گونه رزورسینول به مخلوط اضافه و طیف آن ثبت شد (شکل ۳-۱۵)). سپس طیف‌های مخلوط‌های با کتکول ثابت و مقادیر رزورسینول متفاوت بر میانگین طیف‌های نرمال گونه کتکول به عنوان مقسوم علیه تقسیم گردید و در طول موج‌های ۲۲۷/۴ و ۲۷۹/۴ نانومتر جذب نسبی برای هر مخلوط اندازه گیری شد (جدول ۳-۲۱)). سپس جذب نسبی در دو طول موج برحسب غلظت رزورسینول اضافه شده روی یک نمودار رسم گردید (شکل ۳-۱۶)). محل تقاطع دو خط مستقیم در دو طول موج، نقطه H-نسبی را نشان می‌دهد. با استفاده از معادله‌های (۲-۳۷) و (۲-۳۸) غلظت رزورسینول و کتکول به ترتیب ۲/۵۵ و ۱۰/۳۴ میلی گرم بر لیتر برای مخلوط به کار رفته در جدول (۳-۲۱) محاسبه شد. غلظت بقیه مخلوط‌های سری ارزیابی و تست نیز به همین روش تعیین شد. در جدول (۳-۲۲) نتایج حاصل از به کار بردن روش RHPSAM برای تعدادی از محلول‌های سری ارزیابی در تعیین غلظت گونه‌های کتکول و رزورسینول آورده شده است.

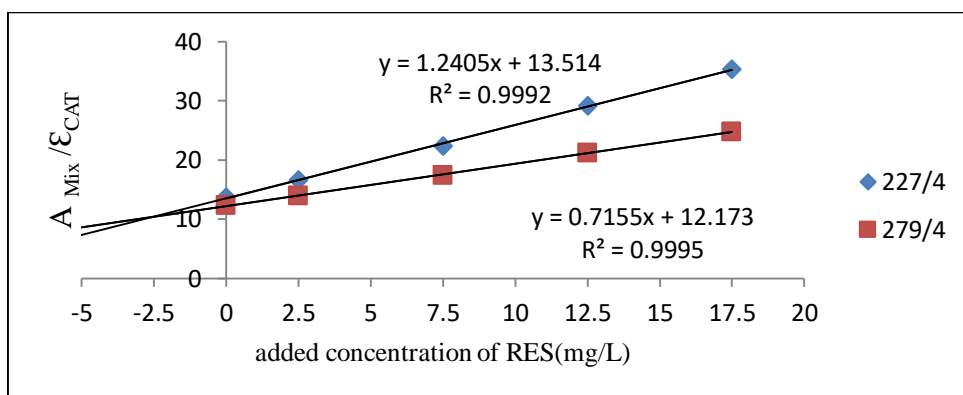


شکل ۳-۱۵: طیف جذبی مخلوط‌های حاوی، ۲/۵۰، ۵/۱۰۰، ۱۰/۱۰۰، ۱۵/۱۰۰ و ۲۰/۱۰۰ میلی گرم بر لیتر رزورسینول و ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر کتکول

جدول ۳-۲۱: جذب نسبی به دست آمده برای مخلوط ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر کتکول و مقادیر مختلفی از رزورسینول بعد از تقسیم بر میانگین طیف‌های نرمان کتکول به عنوان مقسوم علیه در جفت طول موج ۲۲۷/۴ و ۲۷۹/۴ نانومتر برای هر

مخلوط در روش RHPSAM

جذب نسبی در طول موج ۲۲۷/۴ نانومتر	جذب نسبی در طول موج ۲۷۹/۴ نانومتر	غلظت رزورسینول اضافه شده (میلی گرم بر لیتر)
۱۳/۷۱	۱۲/۳۱	۰
۱۶/۶۴	۱۳/۸۹	۲/۵۰
۲۲/۳۸	۱۷/۳۸	۷/۵۰
۲۹/۱۲	۲۱/۱۸	۱۲/۵۰
۳۵/۳۳	۲۴/۷۳	۱۷/۵۰



شکل ۳-۱۶: نمودار افزایش استاندارد نقطه H- نسبی به همراه معادله برای مخلوط ۲/۵۰ میلی گرم بر لیتر رزورسینول و ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر کتکول

جدول ۳-۲۲: نتایج حاصل از به کارگیری روش RHPSAM برای پیش بینی غلظت اجزا در مخلوط سری ارزیابی

درصد خطای نسبی %		غلظت محاسبه شده (mg/L)		R ²	معادله رگرسیون	طول موج (نانومتر)	غلظت واقعی (mg/L)	
رزورسینول	کتکول	رزورسینول	کتکول				رزورسینول	کتکول
-۴/۳	۱۰/۸	۹/۵۷	۵/۵۴	۰/۹۹۹	$Y=1/253C+17/52$	۲۲۷/۴	۱۰/۰	۵/۰۰
				۰/۹۹۸	$Y=0/716C+12/39$	۲۷۹/۴		
-۰/۸	۱۱/۵	۱۴/۸۸	۱۱/۱۵	۱/۰۰	$Y=1/207C+29/12$	۲۲۷/۴	۱۵/۰	۱۰/۰
				۱/۰۰	$Y=0/673C+21/17$	۲۷۹/۴		
۱۸/۸	۰/۱۳۳	۲/۹۷	۱۵/۰۲	۰/۹۹۹	$Y=1/215C+18/66$	۲۲۷/۴	۲/۵۰	۱۵/۰
				۰/۹۹۹	$Y=0/713C+17/17$	۲۷۹/۴		
۵/۰	۲/۹۵	۵/۲۵	۲۰/۵۹	۰/۹۹۹	$Y=1/268C+27/25$	۲۲۷/۴	۵/۰۰	۲۰/۰
				۰/۹۹۷	$Y=0/738C+24/47$	۲۷۹/۴		

جدول ۳-۲۳: نتایج حاصل از بهینه سازی طول موج و مقسوم علیه در پیش بینی غلظت دو گونه در سری ارزیابی در

روش RHPSAM

Δλ	ΔA(RES-10/0mg/L)	ΔA(CAT-10/0mg/L)	طیف نرمال غلظت ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر کتکول به عنوان مقسوم علیه				میانگین طیف نرمال کتکول با غلظت- های مختلف به عنوان مقسوم علیه				طول موجها
			خطا در پیش بینی غلظت رزورسینول		خطا در پیش بینی غلظت کتکول		خطا در پیش بینی غلظت رزورسینول		خطا در پیش بینی غلظت کتکول		
			MRE	MSE	MRE	MSE	MRE	MSE	MRE	MSE	
۴۹	۰/۰۰۰۶	۰/۰۶۵	۰/۰۸۳	۱/۶۰	۰/۰۹۱	۱/۵۱	۰/۰۸۴	۱/۵۸	۰/۰۹	۱/۴۴	۲۳۰/۴ و ۲۷۹/۴
۵۱/۴	۰/۰۸۹	۰/۰۰۰۶	۰/۰۷۹	۱/۱۰۲	۰/۰۶۸	۰/۵۶	۰/۰۸۵	۱/۱۶	۰/۰۶۳	۰/۵۳۱	۲۲۷/۴ و ۲۷۸/۸
۵۲	۰/۰۰۹۶	۰/۰۰۰۵	۰/۰۵۷	۱/۰۱۰	۰/۰۸۸	۱/۱۴	۰/۰۵۶	۰/۹۴	۰/۰۸۸	۱/۱۴۳	۲۲۷/۴ و ۲۷۹/۴
۲۲/۲	۰/۰۰۴	-۰/۰۰۲	۰/۳۷۵	۶۹/۴۶	۰/۹۵	۷۴/۹۱	۰/۵۳	۸۵/۱۵	۱/۱۴	۱۰۶/۴۲	۲۳۴ و ۲۵۶/۲
۴۲/۲	۰/۰۰	۰/۰۶	۰/۱۴۶	۳/۴۲	۰/۱۲۷	۱۰/۰۵	۰/۱۴۰	۳/۹۵	۰/۱۱۱	۲/۱۲۷	۲۲۹/۲ و ۲۷۱/۴
۳/۴	۰/۰۲	۰/۰۰۳	۰/۱۴۸	۸/۳۰	۰/۲۲۱	۵/۲۷	۰/۱۵۴	۸/۵۳	۰/۲۲۶	۵/۴۶	۲۷۲/۶ و ۲۷۶
۴۸/۲	۰/۱۰۴	۰/۰۰۱	۰/۰۸۱	۱/۱۱۲	۰/۰۷۷	۰/۶۳	۰/۱۰۱	۳/۱۳	۰/۱۸۶	۱۲/۶۴	۲۲۶/۶ و ۲۷۴/۸
۴۶	۰/۰۸۹	۰/۰۰۱	۰/۰۹۷	۲/۱۹۹	۰/۰۸۶	۱/۰۵۶	۰/۰۸۶	۲/۰۷	۰/۰۸۵	۱/۰۲	۲۲۶/۶ و ۲۷۲/۶

برای رسیدن به بهترین صحت و حساسیت، پارامترهای موثر، مثل مقسوم علیه (طیف نرمال) و طول موج بهینه

شد که این دو پارامتر همزمان بهینه شد و مقدار بهینه آن‌ها با بررسی پارامترهای آماری میانگین خطای نسبی (MRE) و میانگین مربع خطا (MSE) انتخاب شد. با توجه به گزارشات انجام شده از هر جفت طول موج می توان استفاده کرد. برای بررسی درستی این مطلب از جفت طول موج های مختلفی استفاده شد. جفت طول موج های که جذب گونه مزاحم (کتکول) ثابت باشد (مثل ۲۲۷/۴ - ۲۷۸/۸، ۲۲۷/۴ - ۲۷۹/۴، ۲۳۴/۰ - ۲۵۶/۲، ۲۷۲/۶ - ۲۷۶/۰، ۲۷۶/۰ - ۲۲۶/۶ و ۲۷۴/۸ - ۲۲۶/۶ - ۲۷۲/۶ نانومتر) یا جذب گونه مزاحم متفاوت باشد (مثل ۲۳۰/۴ - ۲۷۹/۴ و ۲۲۹/۲ - ۲۷۱/۴ نانومتر). با توجه به نتایج (جدول (۳-۳)) حاصل شده از سری ارزیابی، بهترین جفت طول موج، ۲۲۷/۴ و ۲۷۹/۴ نانومتر (جذب گونه مزاحم (کتکول) ثابت می باشد) و میانگین طیف‌های نرمال کتکول به عنوان مقسوم علیه انتخاب شد.

۳-۵-۶ حد تشخیص روش (RD. CC)

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

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

که در این معادله S_{bl} ، انحراف استاندارد سیگنال شاهد و m ، شیب منحنی کالیبراسیون و نیز K ، ضریب اطمینان می باشد. با توجه به استدلال کیزر، مقدار منطقی و قابل قبول برای این ضریب ثابت، عدد $k = ۳/۰۰$ است.

به منظور بررسی حد تشخیص روش های RD و CC، ۱۰ اندازه گیری تکراری برای شاهد انجام شد و طیف در محدوده طول موجی ۲۰۰-۳۱۰ نانومتر ثبت گردید و در این روش‌ها از تقسیم سه برابر انحراف استاندارد سیگنال شاهد بر شیب منحنی کالیبراسیون، حد تشخیص به دست آمد. با توجه به تعریف فوق، حد تشخیص تجربی روش‌ها در جدول (۳-۲۴) برای کتکول و رزورسینول آورده شده است.

۳-۲۴: نتایج حاصل از بررسی حد تشخیص در روش-های CC، RD، RHPsAM و HPSAM

روش مورد استفاده	حد تشخیص برای کتکول (mg/L)	حد تشخیص برای رزورسینول (mg/L)
CC	۰/۵۸	۰/۸۸
RD	۰/۲۹	۰/۳۶

۳-۵-۷ دقت و صحت روش‌های (CC، RD، RHPsAM و HPSAM)

برای بررسی دقت و صحت روش‌های CC، RD، RHPsAM و HPSAM محلول‌های سری تست با غلظت متفاوت از کتکول و رزورسینول در شرایط بهینه ساخته شد. برای هر مخلوط ۳ بار اندازه‌گیری تکراری انجام شد و طیف هر مخلوط در محدوده طول موجی ۳۱۰-۲۰۰ نانومتر ثبت گردید. سپس غلظت کتکول و رزورسینول با روش‌های CC، RD، RHPsAM و HPSAM تعیین شد. مقادیر انحراف استاندارد در هر حالت محاسبه شد و نتایج آن در جدول‌های (۳-۲۵)، (۳-۲۶)، (۳-۲۷) و (۳-۲۸) آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد در تعیین غلظت گونه‌های کتکول و رزورسینول روش‌های CC و RD از دقت و صحت بیشتری برخوردار می‌باشد.

جدول ۳-۲۵: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت در روش CC

شماره مخلوط	کتکول (mg/L)	رزورسینول (mg/L)	کتکول اندازه‌گیری شده (mg/L)	رزورسینول اندازه‌گیری شده (mg/L)	درصد بازیابی کتکول	درصد بازیابی رزورسینول
۱	۵/۰۰	۵/۰۰	۵/۰۳±(۰/۳۰)*	۵/۱۰±(۰/۱۰)*	۱۰۰/۶۶	۱۰۲/۰
۲	۶/۰۰	۱۵/۰	۶/۰۹±(۰/۲۳)	۱۵/۳±(۰/۴)	۱۰۱/۵	۱۰۱/۸۶
۳	۱۲/۰	۳/۰۰	۱۲/۱±(۰/۱)	۲/۸۶±(۰/۱۹)	۱۰۱/۰۸	۹۵/۳۳
۴	۰/۰	۱۲/۰	۰/۰±(۰/۰)	۱۲/۱±(۰/۰۵)	۱۰۰/۰	۱۰۰/۹۱
۵	۱۵/۰	۰/۰	۱۵/۶±(۰/۳)	۰/۰±(۰/۰)	۱۰۳/۷۳	۱۰۰/۰

*اعداد داخل پرانتز انحراف استاندارد حاصل ۳ بار اندازه‌گیری تکراری است.

جدول ۳-۲۶: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت درروش RD

شماره مخلوط	کتکول (mg/L)	رزورسینول (mg/L)	کتکول اندازه گیری شده (mg/L)	رزورسینول اندازه گیری شده (mg/L)	درصد بازیابی کتکول	درصد بازیابی رزورسینول
۱	۵/۰۰	۵/۰۰	۵/۰۹±(۰/۱۸)*	۴/۹۸±(۰/۱۱)*	۱۰۱/۸	۹۹/۶۶
۲	۶/۰۰	۱۵/۰	۵/۹۹±(۰/۱۰)	۱۴/۸±(۰/۳)	۹۹/۸	۹۹/۲
۳	۱۲/۰	۳/۰۰	۱۲/۱±(۰/۱)	۲/۷۳±(۰/۱۸)	۱۰۰/۶	۹۱/۰
۴	۰/۰	۱۲/۰	۰/۰۰±(۰/۰۰)	۱۱/۹±(۰/۱)	۱۰۰/۰	۹۸/۸۳
۵	۱۵/۰	۰/۰	۱۵/۴±(۰/۳)	۰/۰۰±(۰/۰۰)	۱۰۲/۷	۱۰۰/۰

*اعداد داخل پرانتز انحراف استاندارد حاصل ۳ بار اندازه گیری تکراری است.

جدول ۳-۲۷: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت درروش RHPSAM

شماره مخلوط	کتکول (mg/L)	رزورسینول (mg/L)	کتکول اندازه گیری شده (mg/L)	رزورسینول اندازه گیری شده (mg/L)	درصد بازیابی کتکول	درصد بازیابی رزورسینول
۱	۵/۰۰	۵/۰۰	۵/۳۰±(۰/۲۱)*	۵/۲۱±(۰/۴۲)*	۱۰۶/۰	۱۰۴/۲
۲	۶/۰۰	۱۵/۰	۵/۳۹±(۰/۳۴)	۱۶/۳±(۱/۳)	۸۹/۸۳	۱۰۸/۵۳
۳	۱۲/۰	۳/۰۰	۱۱/۴±(۰/۲)	۳/۴۵±(۰/۰۷)	۹۴/۸۳	۱۰۸/۳۳
۴	۰/۰	۱۲/۰	۰/۰۰±(۰/۰۰)	۱۲/۷±(۰/۲)	۱۰۰/۰	۱۰۵/۶۶
۵	۱۵/۰	۰/۰	۱۴/۶±(۰/۱)	۰/۰۰±(۰/۰۰)	۹۷/۰۶۶	۱۰۰/۰

*اعداد داخل پرانتز انحراف استاندارد حاصل ۳ بار اندازه گیری تکراری است.

جدول ۳-۲۸: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت درروش HPSAM

شماره مخلوط	کتکول (mg/L)	رزورسینول (mg/L)	کتکول اندازه گیری شده (mg/L)	رزورسینول اندازه گیری شده (mg/L)	درصد بازیابی کتکول	درصد بازیابی رزورسینول
۱	۵/۰۰	۵/۰۰	۵/۱۳±(۰/۳۷)*	۵/۹۱±(۰/۴۸)*	۱۰۲/۴	۱۱۸/۲
۲	۶/۰۰	۱۵/۰	۵/۰۵±(۰/۲۲)	۱۷/۴±(۱/۴۰)	۸۴/۱۶	۱۱۶/۲۶
۳	۱۲/۰	۳/۰۰	۱۱/۴±(۰/۲)	۴/۵۹±(۰/۱۳)	۹۵/۱۶	۱۵۳/۰
۴	۰/۰	۱۲/۰	۰/۰۰±(۰/۰۰)	۱۳/۰±(۰/۴)	۱۰۰/۰	۱۰۸/۵۳
۵	۱۵/۰	۰/۰	۱۴/۶±(۰/۲)	۱/۱۱±(۰/۱۹)	۹۷/۶	۱۰۰/۰

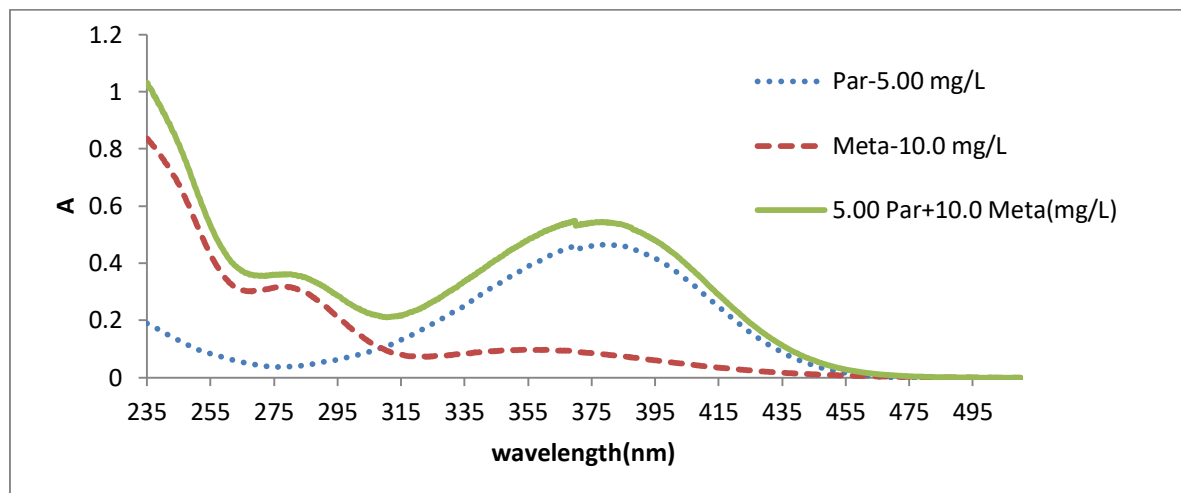
*اعداد داخل پرانتز انحراف استاندارد حاصل ۳ بار اندازه گیری تکراری است

۶-۳ تعیین مقدار ایزومرهای متا و پارا- نیتروآنیلین در مخلوط

۱-۶-۳ طیف جذبی

طیف جذبی محلول‌های متا-نیتروآنیلین (Meta)، پارا-نیتروآنیلین (Para) و مخلوط دوتایی آن‌ها در گستره

طول موجی ۲۳۵-۵۱۰ نانومتر در شکل (۱۷-۳) نشان داده شده است.



شکل ۱۷-۳: طیف‌های جذب ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین (Meta)، طیف جذبی ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پارا- نیتروآنیلین (Par) و مخلوط ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین و ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین

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

برای تهیه محلول پارا و متا-نیتروآنیلین با غلظت‌های ۵/۰۰ و ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر به ترتیب ۱/۰۰ و ۲/۰۰ میلی‌لیتر از محلول ۵۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر در یک از محلول‌های پارا و متا-نیتروآنیلین به بالن‌های حجمی ۱۰/۰ میلی‌لیتری به طور جداگانه منتقل گردید و با آب مقطر به حجم رسانده و یکنواخت شد. سپس مقداری از هر محلول استاندارد آن گونه به سل کوارتز دستگاه منتقل شد و طیف جذبی هر محلول نسبت به محلول شاهد (آب مقطر) در گستره طول موجی ۲۳۵-۵۱۰ نانومتر ثبت گردید (شکل (۱۷-۳)). با توجه به شکل (۱۷-۳) طول موج ماکزیمم جذب برای ایزومر متا، ۳۵۹/۴ نانومتر و برای ایزومر پارا، ۳۸۲/۰ نانومتر می‌باشد. برای تهیه محلول

مخلوط این دو ترکیب به این صورت عمل شد که: حجم ۲/۰۰ میلی لیتر از محلول ۵۰/۰ میلی گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین و ۱/۰۰ میلی لیتر از محلول ۵۰/۰ میلی گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین به یک بالن حجمی ۱۰/۰ میلی-لیتری انتقال داده شد و با آب مقطر به حجم رسانده شد. بعد از یکنواخت کردن محلول حاصل، طیف جذبی آن در گستره ۲۳۵-۵۱۰ نانومتر نسبت به شاهد (آب مقطر) ثبت گردید. برای مشاهده و مقایسه جزئیات طیفی محلول-های متا و پارا-نیتروآنیلین و مخلوط حاوی این دو گونه، طیف‌ها در شکل (۳-۱۷) آورده شده است. همان طور که از شکل (۳-۱۷) استنباط می‌شود امکان اندازه‌گیری هر یک از دو گونه به صورت جداگانه در یک مخلوط به روش اسپکتروفتومتری معمولی مستقیم امکان پذیر نمی‌باشد. لذا برای اندازه‌گیری این دو گونه در مخلوط از روش‌های اسپکتروفتومتری جدید استفاده گردید.

۳-۶-۱- بررسی و بهینه سازی پارامترهای موثر بر سیستم

برای دستیابی به بهترین حساسیت و گزینش پذیری و بهترین حد تشخیص باید متغیرهای موثر مثل pH محلول، نوع بافر، حجم بافر و قدرت یونی بر میزان جذب متا و پارا-نیتروآنیلین در طول موج ماکزیمم، هریک مورد بررسی قرار گیرند. باتوجه به بررسی‌های قبلی صورت گرفته این پارامترها بر میزان حساسیت و گزینش-پذیری تاثیر نداشته و تمام اندازه‌گیری‌ها در محلول‌های خالص و مخلوط بدون استفاده از محلول بافر انجام شد و در تهیه تمام محلول‌های خالص و مخلوط از آب مقطر استفاده شد [۳۰].

۳-۶-۲- رسم منحنی کالیبراسیون

تعیین دامنه خطی متا-پارا نیتروآنیلین به صورت جداگانه

برای استخراج منحنی کالیبراسیون جدا برای هر ایزومر به صورت زیر عمل شد. به بالن حجمی‌های ۱۰/۰ میلی لیتری مقادیر متفاوتی از متا یا پارا-نیتروآنیلین منتقل شد سپس با آب مقطر به حجم رسانده شد. مقداری از محلول به سل کوارتزی دستگاه منتقل و جذب هر محلول نسبت به شاهد (آب مقطر) در طول موج ۳۸۲/۰ و ۳۵۹/۴ نانومتر به ترتیب برای ایزومرهای پارا و متا ثبت شد. نتایج در جدول (۳-۲۹) آورده شده است. با توجه به

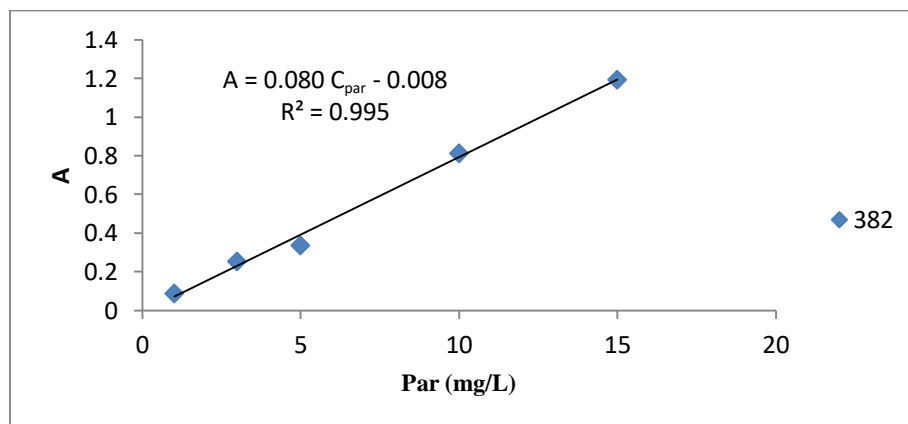
بررسی‌های قبلی صورت‌گرفته [۳۰]، اندازه‌گیری جذب این دو ایزومر فقط در ناحیه خطی انجام شد.

جدول ۳-۲۹: نتایج حاصل برای رسم منحنی کالیبراسیون متا-نیتروآنیلین و پارا-نیتروآنیلین به صورت مجزا

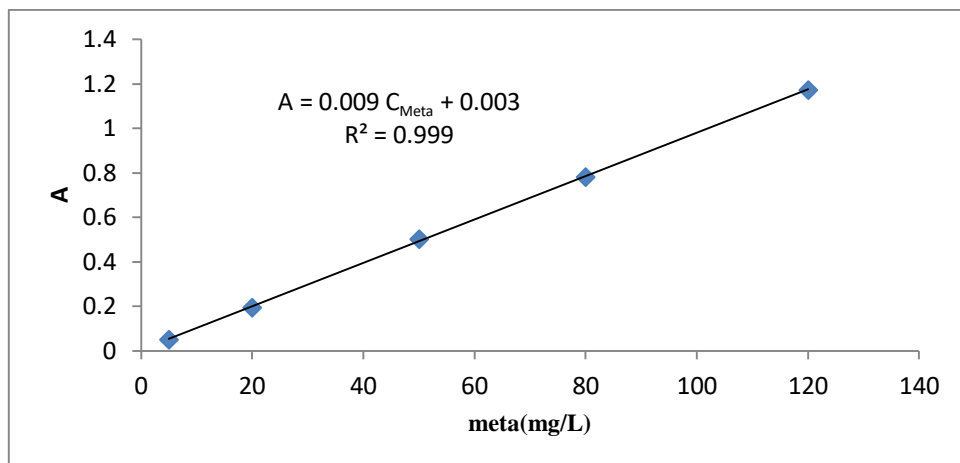
جذب متا در طول ماکزیمم ۳۵۹/۴ نانومتر	جذب پارا در طول ماکزیمم ۳۸۲/۰ نانومتر	غلظت (میلی گرم برلیتر)
-	۰/۰۸۶	۱/۰۰
-	۰/۲۵۲	۳/۰۰
۰/۰۵۱	۰/۳۳۶	۵/۰۰
-	۰/۸۱۳	۱۰/۰
-	۱/۱۹۳	۱۵/۰
۰/۱۹۴	-	۲۰/۰
۰/۵۰۳	-	۵۰/۰
۰/۷۸۱	-	۸۰/۰
۱/۱۷۳	-	۱۲۰/۰

معادله بهترین خط برای کالیبراسیون از روش رگرسیون حداقل مربعات، استخراج شد. نتایج به دست آمده

در شکل‌های (۱۸-۳) و (۱۹-۳) و جدول (۳۰-۳) آورده شده است.



شکل ۳-۱۸: منحنی کالیبراسیون پارا-نیتروآنیلین



شکل ۳-۱۹: منحنی کالیبراسیون متا-نیتروآنیلین

جدول ۳-۳۰: نتایج حاصل از کالیبراسیون تک متغیره

متا-نیتروآنیلین ($\lambda_{\max} = 359/4 \text{ nm}$)	پارا-نیتروآنیلین ($\lambda_{\max} = 382/0 \text{ nm}$)	ترکیب
۵/۰۰ - ۱۲۰/۰	۰/۵۰ - ۱۵/۰	ناحیه خطی (میلی گرم بر لیتر)
$A = 0.009 C_{\text{meta}} - 0.003$	$A = 0.080 C_{\text{par}} - 0.008$	معادله رگرسیون
۰/۹۹۹	۰/۹۹۵	R^2

۳-۶-۲ محلول سازی سری ارزیابی و سری تست

برای اندازه گیری همزمان متا و پارا-نیتروآنیلین به روش‌های اسپکتروفتومتری جدید (CC، RD، HPSAM و RHPSAM)، محلول‌های سری ارزیابی و سری تست تهیه و طیف آن‌ها نسبت به شاهد (آب مقطر) در دامنه ۲۳۵-۵۱۰ نانومتر ثبت گردید. هدف از بهینه سازی پارامترها رسیدن به بهترین صحت در روش‌های به کاررفته در این پروژه است برای تهیه محلول‌های سری کالیبراسیون (محلول‌های خالص استاندارد)، محلول‌های سری ارزیابی و سری تست از انتقال مقادیر مختلف این دو ایزومر به بالن حجمی ۱۰/۰ میلی لیتری و رقیق کردن آن تا خط نشانه با آب مقطر تهیه شد و طیف آن‌ها ثبت نسبت به شاهد و ذخیره گردید. محلول شاهد فقط آب مقطر می‌باشد. ترکیب غلظتی محلول‌های سری ارزیابی و سری تست به ترتیب در جدول‌های (۳-۳۱) و (۳-۳۲) آورده شده است.

جدول ۳-۳۱: ترکیب غلظتی محلول‌های سری ارزیابی

شماره محلول	غلظت پارا- نیتروآنیلین (mg/L)	غلظت متا- نیتروآنیلین (mg/L)	شماره محلول	غلظت پارا- نیتروآنیلین (mg/L)	غلظت متا- نیتروآنیلین (mg/L)
۱	۱/۰۰	۵/۰۰	۹	۵/۰۰	۵/۰۰
۲	۱/۰۰	۱۰/۰	۱۰	۱۰/۰	۱۰/۰
۳	۱/۰۰	۴۰/۰	۱۱	۴۰/۰	۴۰/۰
۴	۱/۰۰	۶۰/۰	۱۲	۶۰/۰	۶۰/۰
۵	۲/۵۰	۱۰/۰	۱۳	۵/۰۰	۵/۰۰
۶	۲/۵۰	۱۰/۰	۱۴	۱۰/۰	۱۰/۰
۷	۲/۵۰	۱۰/۰	۱۵	۴۰/۰	۴۰/۰
۸	۲/۵۰	۱۰/۰	۱۶	۶۰/۰	۶۰/۰

جدول ۳-۳۲: ترکیب غلظتی محلول‌های سری تست

شماره محلول	غلظت پارا-نیتروآنیلین (mg/L)	غلظت متا-نیتروآنیلین (mg/L)
۱	۳/۰۰	۳۰/۰
۲	۶/۰۰	۴۵/۰
۳	۳/۰۰	۰/۰۰
۴	۰/۰۰	۱۸/۰

۳-۶-۳ روش‌های اسپکتروفتومتری به کاربرده شده جهت اندازه گیری همزمان

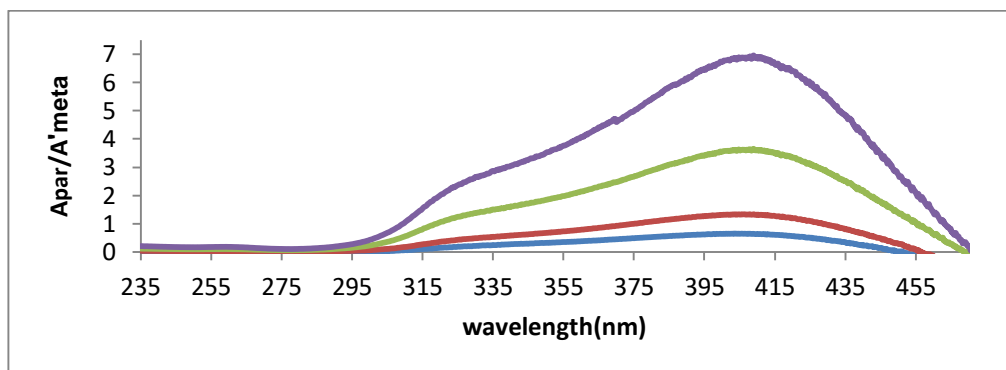
۳-۶-۳-۱ روش مرکز ثابت (CC)

یکی از روش‌های اسپکتروفتومتری روش مرکز ثابت است که این روش شامل دو مرحله است. مرحله اول محاسبه مقدار ثابت با استفاده از اختلاف دامنه و مرحله دوم ضرب کردن مقدار ثابت در طیف مقسوم علیه است، که منجر به به دست آمدن طیف گونه مورد نظر در مخلوط می‌شود. پارامترهای موثر بر این روش شامل غلظت مقسوم علیه و جفت طول موج‌ها است که بهینه شدند.

الف - بهینه سازی غلظت مقسوم علیه و طول موج در تعیین غلظت متا-نیتروآنیلین

ابتدا طیف محلول‌های خالص ۱/۰۰، ۲/۰۰، ۵/۰۰ و ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین بر طیف محلول خالص ۲۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه تقسیم شد (شکل (۳-۲۰)).

سپس در دو طول موج ۴۰۹/۸ و ۳۴۱/۰ نانومتر، دامنه جذب نسبی در این دو طول موج به ترتیب P_1 و P_2 اندازه‌گیری شد و اختلاف دامنه نسبی ($\Delta P = P_1 - P_2$) به دست آمد (جدول (۳-۳۳)). از رسم اختلاف دامنه نسبی ΔP بر حسب P_1 یک معادله حاصل شد (شکل (۳-۲۱)).



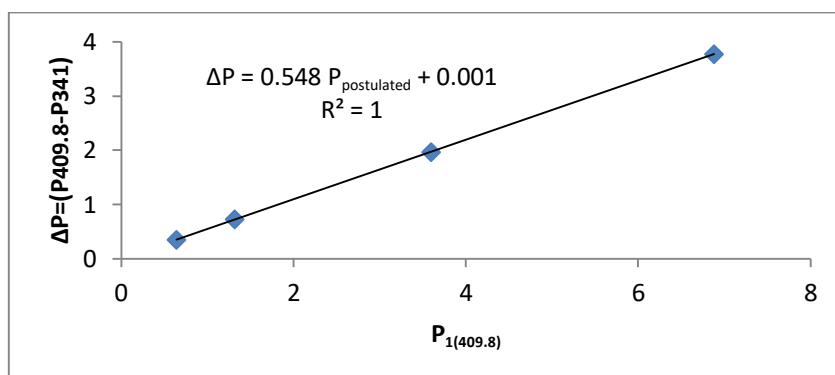
شکل ۳-۲۰: طیف نسبی حاصل از تقسیم محلول‌های استاندارد ۱/۰۰، ۲/۰۰، ۵/۰۰ و ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین بر طیف ۲۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه

طیف مخلوط را به طیف ۲۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین (مقسوم علیه) تقسیم شد و سپس دامنه نسبی در P_1 و P_2 اندازه‌گیری شد و اختلاف آن‌ها محاسبه شد (ΔP_{Mix}) با قرار دادن آن در معادله خط شکل (۳-۲۱)، مقدار P پیش‌بینی شده ($P_{postulated}$) برای مخلوط به دست آمد. در این مرحله از اختلاف بین مقدار P پیش‌بینی شده و دامنه نسبی اندازه‌گیری شده در طول موج اول ($P_{recorded} = P_1$)، مقدار ثابت برای هر مخلوط به دست می‌آید. با ضرب کردن مقدار ثابت در طیف ۲۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین طیف خالص متا-نیتروآنیلین در هر مخلوط به دست آمد. با استفاده از طیف متا-نیتروآنیلین خالص به دست آمده، در طول موج ماکزیمم آن (۳۵۹/۴ نانومتر)، جذب یادداشت و در معادله منحنی کالیبراسیون متا-نیتروآنیلین (شکل (۳-۱۹))، غلظت متا

نیتروآنیلین در مخلوط محاسبه شد. نتایج حاصل از روش CC برای چند مخلوط انتخاب شده از سری ارزیابی در جدول (۳-۳۴) آورده شده است.

جدول ۳-۳۳: نتایج حاصل از اندازه‌گیری بزرگی دامنه‌ها در طیف‌های نسبی حاصل شکل (۳-۲۰)

غلظت پارا-نیترو آنیلین (mg/L)	بزرگی دامنه در ۴۰۹/۸ نانومتر (P_1)	بزرگی دامنه در ۳۴۱/۰ نانومتر (P_2)	اختلاف بزرگی دامنه‌ها ($\Delta P = P_1 - P_2$)
۱/۰۰	۰/۶۴۲	۰/۲۸۷	۰/۳۵۴
۲/۰۰	۱/۳۱۵	۰/۵۹۱	۰/۷۲۳
۵/۰۰	۳/۵۹۳	۱/۶۲۴	۱/۹۶۹
۱۰/۰	۶/۸۷۸	۳/۱۰۴	۳/۷۷۴



شکل ۳-۲۱: نمودار اختلاف دامنه‌های نسبی (ΔP) و برحسب P_1

جدول ۳-۳۴: نتایج حاصل از روش CC برای تعیین غلظت متا-نیتروآنیلین در مخلوط‌های انتخاب شده از سری ارزیابی

درصد خطای نسبی	غلظت پیش بینی شده متا نیتروآنیلین (mg/L)	C. V	P _{Recorded}	P _{postulated}	ΔP	P _{۴۰.۹/۸}	P _{۳۴.۱/۰}	Mix	
								Para	Meta
۲	۱۰/۲۰	۰/۴۶۷	۱/۲۰۷	۰/۷۴۰	۰/۴۰۷	۱/۲۰۷	۰/۸۰۰	۱/۰۰	۱۰/۰
-۳/۲۷	۳۸/۶۹	۱/۷۷	۵/۵۸	۳/۸۱	۲/۰۹	۵/۵۸	۳/۴۹۵	۵/۰۰	۴۰/۰
۳/۶۳	۶۲/۱۸	۲/۹۴	۵/۰۷	۲/۱۳۰	۱/۱۶۸	۵/۰۷	۳/۹۰۲	۲/۵۰	۶۰/۰
-۸	۴/۶۰	۰/۲۰۲	۳/۸۴۳	۳/۶۴۱	۱/۹۹۶	۳/۸۳۴	۱/۸۳۸	۵/۰۰	۵/۰۰

جدول ۳-۳۵: نتایج حاصل از بهینه سازی غلظت متا-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه و جفت طول موج‌های انتخابی

برای روش CC در تعیین غلظت متا-نیتروآنیلین در مخلوط‌های سری ارزیابی

خطادر پیش بینی غلظت متا نیترو آنیلین									طول موج(نانومتر)
Δλ	ΔA(meta- ۱۰/۰ mg/L)	ΔA(para- ۵/۰۰ mg/L)	غلظت متا-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه ۴۰/۰ mg / L		غلظت متا-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه ۲۰/۰ mg / L		غلظت متا-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه ۱۰/۰ mg / L		
			MRE	MSE	MRE	MSE	MRE	MSE	
۴۶/۲	۰/۰۴	۰/۰۰۲	۰/۰۶۶	۴/۳۸	۰/۰۵۹	۳/۴۴	۰/۰۶۶	۲/۶۲	۴۰۰/۰ و ۳۵۳/۸
۶۸/۸	۰/۰۵	۰/۰۰	۰/۰۵۵	۳/۰۷	۰/۰۵۱	۲/۵۰	۰/۰۵۱	۲/۷۲۶	۳۴۱/۰ و ۴۰۹/۸
۳۴/۶	۰/۰۳۶	۰/۰۰۰۵	۰/۱۱۶	۱۰/۵۱	۰/۱۱۳	۹/۸۱	۰/۱۰۰	۶/۳۸۱	۳۶۰/۰ و ۳۹۵/۶
۶۳/۸	۰/۰۰۱	۰/۳۳	۰/۲۶۳	۲۷/۷۲	۰/۲۶۵	۲۷/۳۳	۰/۲۹۵	۳۴/۷۵	۳۱۵/۰ و ۳۷۸/۸
۲۱/۶	۰/۰۲	۰/۰۴۸	۰/۴۰۹	۶۱/۷۰	۰/۴۱۰	۶۲/۰۱	۰/۴۰۱	۵۶/۹۵	۳۸۱/۲ و ۳۵۹/۶
۵۴/۶	۰/۰۴۷	۰/۰۰۰۵	۰/۰۶۰	۴/۲۹	۰/۰۵۴	۳/۱۲	۰/۰۵۲	۲/۷۵	۴۰۳/۸ و ۳۴۹/۲

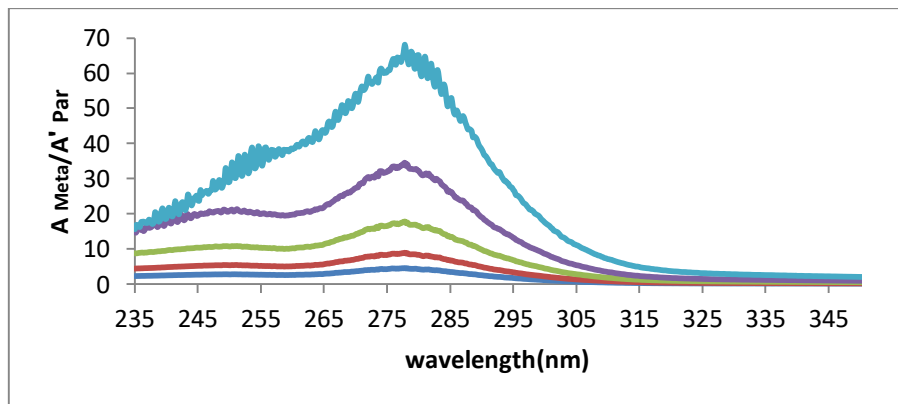
به منظور بهینه سازی پارامترهای و رسیدن بهترین صحت در روش CC ، برای تعیین غلظت متا-نیتروآنیلین، جفت طول موج‌ها و غلظت متا-نیتروآنیلین که به عنوان مقسوم علیه است، بهینه شد. در این روش از طول موج های مختلفی مورد بررسی قرار گرفت. جفت طول موج های که جذب گونه پارا-نیتروآنیلین ثابت باشد مثل

گونه متا-نیتروآنیلین ثابت باشد (مثل ۳۷۸/۸ - ۳۱۵/۰ نانومتر) و یا اینکه جذب هر دو گونه متا و پارا-نیتروآنیلین متفاوت باشد (مثل ۳۵۹/۶ - ۳۸۱/۲ نانومتر). جدول (۳-۳۵) نتایج حاصله با اعمال روش CC بر روی محلول‌های سری ارزیابی را نشان می‌دهد، که بهترین جفت طول موج ۳۴۱/۰ و ۴۰۹/۸ نانومتر و غلظت ۲۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه انتخاب شد.

ب - بهینه سازی مقسوم علیه و طول موج در تعیین غلظت پارا نیتروآنیلین

طیف محلول‌های خالص ۵/۰۰، ۱۰/۰، ۲۰/۰، ۴۰/۰ و ۸۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر متا-نیترو آنیلین (پیوست ۱

شکل ب) بر طیف خالص ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پارا-نیترو آنیلین (مقسوم علیه) تقسیم شد (شکل (۳-۲۲)).



شکل ۳-۲۲: طیف نسبی حاصل از تقسیم محلول‌های خالص ۵/۰۰، ۱۰/۰، ۲۰/۰، ۴۰/۰ و ۸۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر متا-

نیتروآنیلین بر طیف ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه

سپس همانند بخش قبلی دو طول موج (۳۲۰/۰ nm) P_1 و در (۳۸۴/۲ nm) P_2 انتخاب شد و اختلاف آن‌ها محاسبه

شد (جدول (۳-۳۶)) سپس از رسم نمودار اختلاف دامنه (ΔP) بر حسب P_1 معادله خط شکل (۳-۲۳) حاصل شد.

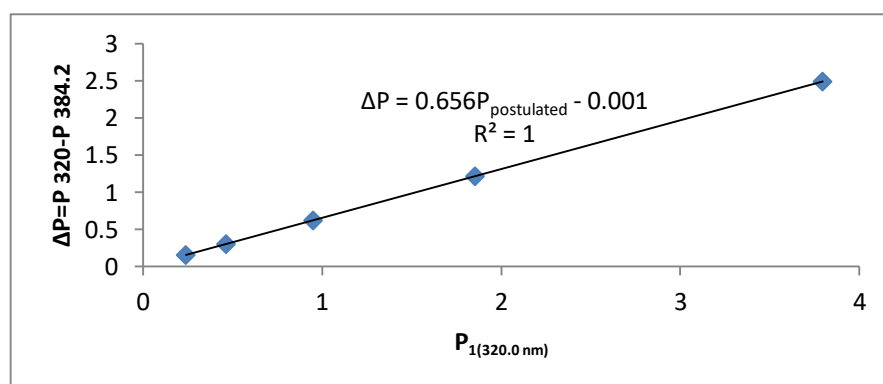
سپس طیف مخلوط بر طیف ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین تقسیم شد و دامنه نسبی آن‌ها در دو طول

موج ذکر شده اندازه‌گیری شد، و اختلاف آن‌ها (ΔP_{mix}) محاسبه شد و در معادله خط شکل (۳-۲۳) جایگذاری-

شد و مقدار $P_{postulated}$ (P پیش‌بینی شده) برای هر مخلوط محاسبه شد.

جدول ۳-۳۶: نتایج حاصل از اندازه‌گیری بزرگی دامنه‌ها در طیف‌های نسبی حاصل شکل ۳-۲۲)

اختلاف بزرگی دامنه‌ها ($\Delta P = P_1 - P_2$)	بزرگی دامنه در. نانومتر (۳۸۴/۲) (P_2)	بزرگی دامنه در ۳۲۰/۰ نانومتر (P_1)	غلظت متا-نیترو آنیلین (mg/L)
۰/۱۵۶	۰/۰۸۲	۰/۲۳۸	۵/۰۰
۰/۳۰۵	۰/۱۶۰	۰/۴۶۵	۱۰/۰
	۰/۳۲۷	۰/۹۴۹	۲۰/۰
۱/۲۱	۰/۶۴۰	۱/۵۸	۴۰/۰
۲/۴۹	۱/۳۰	۳/۷۹	۸۰/۰



شکل ۳-۲۳: نمودار اختلاف دامنه‌های نسبی (ΔP) بر حسب P_1

سپس با به دست آوردن اختلاف بین مقدار P پیش‌بینی شده ($P_{\text{postulated}}$) و دامنه نسبی ثبت شده در طول موج ۳۲۰/۰ نانومتر (P_{recorded})، مقدار ثابت (C.V) در هر مخلوط به دست آمد. سپس مقدار ثابت به دست آمده در طیف مرتبه صفر مقسوم علیه (۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین) ضرب شد که در این مرحله طیف مرتبه صفر پارا-نیتروآنیلین در مخلوط به دست آمد و با جایگذاری جذب آن در طول موج ماکزیمم (۳۲۰/۰ نانومتر) در معادله خط (شکل ۳-۱۸)، غلظت پارانیتروآنیلین در هر مخلوط به دست آمد. در جدول (۳-۳۷) برای تعدادی از مخلوط‌های سری ارزیابی که غلظت پارا در آن‌ها تعیین شده است، گزارش شد.

جدول ۳-۳۷: نتایج حاصل از روش CC برای تعیین غلظت پارا-نیتروآنیلین در مخلوط‌های انتخاب شده از سری ارزیابی

درصد خطای نسبی	غلظت پیش بینی شده پارا-نیتروآنیلین (mg/L)	C. V	P _{recorded}	P _{postulated}	ΔP	P _{۳۸۴/۲}	P _{۳۲۰/۰}	Mix	
								Para	Meta
۱/۶	۱/۰۱۶	۰/۱۹۷	۰/۴۴۰	۰/۲۴۳	۰/۱۵۹	۰/۲۸۱	۰/۴۴۰	۱/۰۰	۱۰/۰
۶	۵/۳۰	۱/۰۰	۲/۸۱۷	۱/۸۱۶	۱/۱۹۰	۱/۶۲۷	۲/۸۱۷	۵/۰۰	۴۰/۰
۴/۸	۲/۶۲	۰/۵۳۱	۳/۳۶۲	۲/۸۳۱	۱/۸۵۶	۱/۵۰۶	۳/۳۶۲	۲/۵۰	۶۰/۰
-۰/۵	۹/۹۵	۱/۸۷۳	۲/۳۱۴	۰/۴۴۱	۰/۲۸۸	۲/۰۲۶	۲/۳۱۴	۱۰/۰	۱۰/۰

پارامترهای مؤثر که در تعیین غلظت متا-نیتروآنیلین اشاره شد برای گونه پارا نیز بهینه شد. برای دست-

یابی به این هدف روش CC در تعیین غلظت پارا-نیتروآنیلین بر روی طیف‌های مخلوط سری ارزیابی اعمال شد تا در آن جفت طول موج و غلظت مقسوم علیه بهینه شود. در این روش از جفت طول موج‌های مختلفی استفاده شد طول موج‌های که جذب گونه پارا-نیتروآنیلین متفاوت باشد مانند ۳۳۳/۸ - ۳۷۷/۰، ۳۸۴/۲ - ۳۲۰/۰، ۳۳۱/۸ - ۳۱۵/۰، ۳۱۵/۰ - ۳۷۸/۸، ۳۱۵/۰ - ۳۵۵/۰، ۳۱۰/۰ - ۳۸۳/۸ و ۳۲۵/۰ نانومتر و نیز جفت طول موج‌های که جذب گونه پارا ثابت (مثل ۳۵۳/۸ - ۴۰۰/۰ نانومتر) باشد یا جفت طول موجی که هر دو ایزومر جذب‌های متفاوتی (مثل ۳۸۴/۲ - ۳۵۵/۰ نانومتر) داشته باشند. با توجه به نتایج در جدول (۳-۳۸) بهترین طول موج‌ها ۳۲۰/۰ و ۳۸۴/۲ نانومتر می‌باشد و غلظت ۵/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه، انتخاب شد.

جدول ۳-۳۸: نتایج حاصل از بهینه سازی غلظت پارا نیترو آنیلین به عنوان مقسوم علیه و جفت طول موج های انتخابی برای روش CC در تعیین غلظت پارا نیترو آنیلین در مخلوط های سری ارزیابی

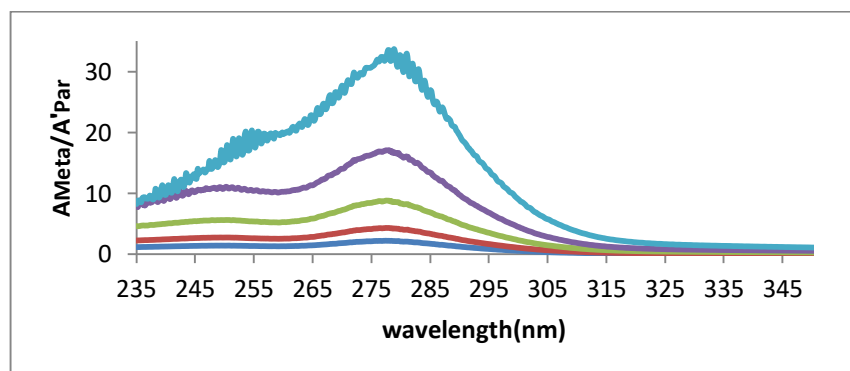
خطادر پیش بینی غلظت پار نیترو آنیلین							طول موج(نانومتر)
$\Delta\lambda$	$\Delta A(\text{meta-} 10/0 \text{ mg/L})$	$\Delta A(\text{para-} 5/00 \text{ mg/L})$	غلظت پارا-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه 10/0 mg / L		غلظت پارا-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه 5/00 mg / L		
			MRE	MSE	MRE	MSE	
43/2	0/002	0/22	0/053	0/197	0/046	0/277	333/8 و 377/0
64/2	0/00	0/3	0/034	0/043	0/030	0/043	384/2 و 320/0
16/8	0/0005	0/1	0/059	0/061	0/058	0/0594	315/0 و 331/8
63/8	0/001	0/33	0/032	0/101	0/032	0/129	315/0 و 378/8
45	0/001	0/280	0/059	0/060	0/053	0/041	310/0 و 355
58/8	0/001	0/274	0/035	0/052	0/033	0/054	325/0 و 383/8
29/2	0/023	0/073	0/049	0/092	0/045	0/092	355/0 و 384/2
46	0/044	0/002	0/056	0/052	0/063	0/085	400/0 و 353/8

۳-۳-۶-۲ روش تفاضل نسبی (RD)

در این روش همانطور که در فصل های قبلی بیان شد معیار مشخصی برای انتخاب جفت طول موج ها بیان نشده است. ما در این پروژه جفت طول موج های مختلفی مورد بررسی قرار دادیم. جفت طول موج های که جذب گونه متا ثابت باشد و گونه پارا جذبی متفاوت داشته باشد، مانند طول موج های 377/0-333/8، 320/0-384/2، 315/0-331/8، 315/0-378/8، 310/0-355/0، 315/0-383/8 و 325/0-384/2 نانومتر و طول موج هایی که گونه پارا ثابت باشد ولی متا متفاوت باشد مانند 353/8-400/0، 409/8-341/0، 359/6-360/0 و 349/2-403/8 نانومتر یا طول موج هایی جذب هر دو ایزومر متفاوت باشد مانند 359/6-381/2 و 384/2-355/0 نانومتر. بر اساس اختلاف جذب طیف های 10/0 میلی گرم بر لیتر متا- نیتروآنیلین و 5/00 میلی گرم بر لیتر پارا- نیتروآنیلین در جفت طول موج های ذکر شده در جدول (3-41) برای تعیین غلظت متا و جدول (3-44) برای تعیین غلظت پارا-نیتروآنیلین آورده شده است.

الف - بهینه سازی غلظت مقسوم علیه و طول موج در تعیین غلظت متا-نیتروآنیلین

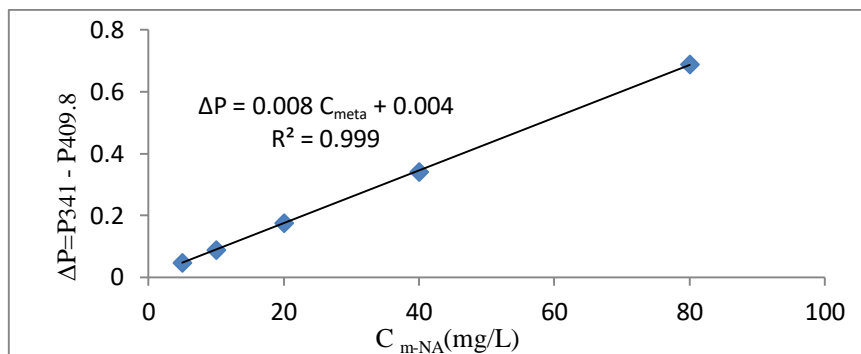
طیف‌های خاص متا-نیتروآنیلین بر طیف ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر بر پارا-نیتروآنیلین تقسیم شد (شکل ۳-۳). در طول موج‌های (P₁) ۳۴۱/۰ و (P₂) ۴۰۹/۸ نانومتر، اختلاف جذب نسبی محاسبه گردید (ΔP). سپس نمودار ΔP بر حسب غلظت متا-نیتروآنیلین رسم شد (جدول ۳-۳۹) و شکل ۳-۳۵)).



شکل ۳-۳۴: طیف نسبی حاصل از تقسیم محلول‌های استاندارد ۵/۰۰، ۱۰/۰، ۲۰/۰، ۴۰/۰ و ۸۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر متا نیترو آنیلین بر طیف ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه

جدول ۳-۳۹: نتایج حاصل از اندازه گیری بزرگی دامنه در طیف نسبی حاصل در روش RD

اختلاف بزرگی دامنه‌ها ($\Delta P = P_1 - P_2$)	بزرگی دامنه در ۴۰۹/۸ نانومتر (P ₂)	بزرگی دامنه در ۳۴۱/۰ نانومتر (P ₁)	غلظت متا-نیترو آنیلین (mg/L)
۰/۰۴۷	۰/۰۳۵	۰/۰۸۲	۵/۰۰
۰/۰۸۹	۰/۰۶۹	۰/۱۵۸	۱۰/۰
۰/۱۷۶	۰/۱۴۵	۰/۳۲۲	۲۰/۰
۰/۳۴۱	۰/۲۸۴	۰/۶۲۵	۴۰/۰
۰/۶۸۷	۰/۵۸۶	۱/۲۷۴	۸۰/۰



شکل ۳-۲۵: نمودار کالیبراسیون متا-نیتروآنیلین در روش RD

برای تعیین غلظت ایزومر متا در مخلوط ابتدا طیف مخلوط دو ایزومر را بر طیف خالص ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر تقسیم شد و در دوطول موج ۳۴۱/۰ و ۴۰۹/۸ نانومتر، اختلاف جذب نسبی ΔP_{mix} به دست آمد و با جایگذاری در معادله خط شکل (۳-۲۵)، غلظت متا موجود در مخلوط محاسبه شد. در جدول (۳-۴۰) نتایج حاصل از روش RD در تعیین غلظت متا-نیتروآنیلین در مخلوط آورده شده است.

جدول ۳-۴۰: نتایج حاصل از روش RD برای تعیین غلظت متا-نیتروآنیلین در مخلوط‌های انتخاب شده از سری ارزیابی

درصد خطای نسبی	غلظت پیش بینی شده متا-نیتروآنیلین (mg/L)	ΔP	$P_{409.8}$	$P_{341.0}$	Mix (mg/L)	
					Para	Meta
۰/۰	۵/۰۰	۰/۰۴۴	۰/۱۳۷	۰/۱۸۱	۱/۰۰	۵/۰۰
-۱/۸۷	۳۹/۲۵	۰/۳۱۸	۰/۸۱۵	۱/۱۳۳	۵/۰۰	۴۰/۰
-۳/۵۳	۵۷/۸۸	۰/۴۶۷	۱/۴۵۳	۱/۹۲	۱۰/۰	۶۰/۰
-۷/۵۰	۹/۲۵	۰/۰۷۸	۰/۳۲۲	۰/۴۰	۲/۵۰	۱۰/۰

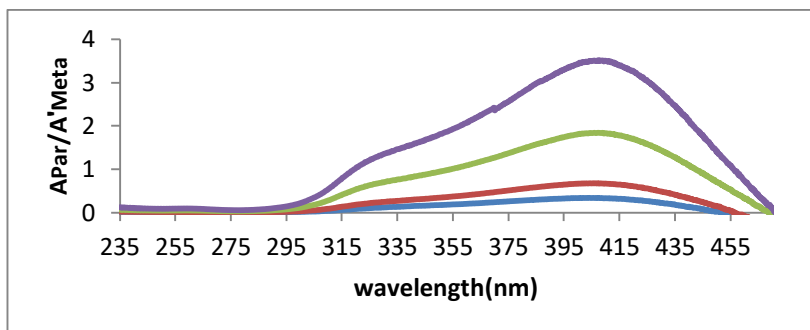
دو پارامتر، غلظت مقسوم علیه (غلظت پارا-نیتروآنیلین) و جفت طول موج‌ها در تعیین غلظت متا، با روش RD بهینه شد و نتایج حاصل در جدول (۳-۴۱) آورده شده است که غلظت ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر از پارا-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه و طول موج های ۳۴۱/۰ و ۴۰۹/۸ نانومتر (جذب گونه پارا (مزاحم) ثابت می باشد) به عنوان پارامترهای بهینه انتخاب گردیدند.

جدول ۳-۴۱: نتایج حاصل از بهینه سازی غلظت پارا-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه و جفت طول موج‌های انتخابی برای روش RD در تعیین غلظت متا-نیتروآنیلین در مخلوط‌های سری ارزیابی

خطادر پیش بینی غلظت متا-نیترو آنیلین							طول موج(نانومتر)
$\Delta\lambda$	$\Delta A(\text{meta-} 10/0 \text{ mg/L})$	$\Delta A(\text{para-} 5/00 \text{ mg/L})$	غلظت پارا-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه ۱۰/۰ mg / L		غلظت پارا-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه ۵/۰۰ mg / L		
			MRE	MSE	MRE	MSE	
۴۶/۲	۰/۰۴	۰/۰۰۲	۰/۰۹۰	۱۶/۷۱	۰/۰۶۵	۱/۹۵	۴۰۰/۰ و ۳۵۳/۸
۶۸/۸	۰/۰۵	۰/۰۰	۰/۰۴۴	۱/۹۵	۰/۰۶۰	۳/۷۲	۳۴۱/۰ و ۴۰۹/۸
۳۴/۶	۰/۰۳۶	۰/۰۰۰۵	۰/۱۱۳	۱۲/۰۴	۰/۰۹۴	۷/۵۶	۳۶۰/۰ و ۳۹۵/۶
۶۳/۸	۰/۰۰۱	۰/۳۳	۰/۰۶۱	۴/۷۲	۰/۰۹۵	۴/۸۹	۳۱۵/۰ و ۳۷۸/۸
۲۱/۶	۰/۰۲	۰/۰۴۸	۰/۱۵۵	۴۳/۶۲	۰/۱۸۱	۵۵/۱۱	۳۸۱/۲ و ۳۵۹/۶
۵۴/۶	۰/۰۴۷	۰/۰۰۰۵	۰/۰۹۳	۱۵/۵۹	۰/۰۷۴	۲/۴۶	۴۰۳/۸ و ۳۴۹/۲

ب - بهینه سازی غلظت مقسوم علیه و طول موج در تعیین غلظت پارا نیتروآنیلین

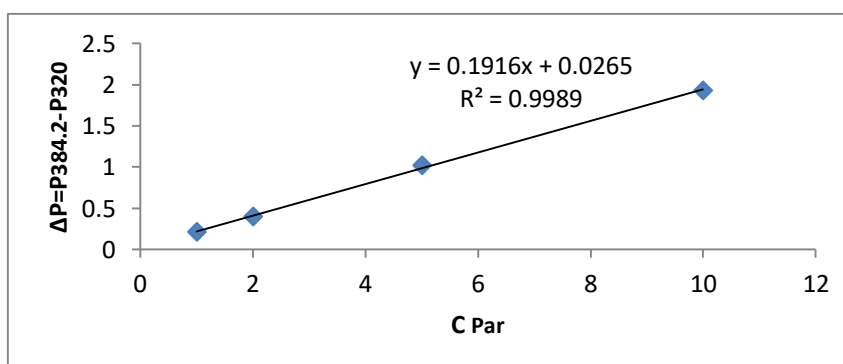
طیف محلول های خالص ۱/۰۰، ۲/۰۰، ۵/۰۰ و ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین بر طیف محلول خالص متا-نیتروآنیلین با غلظت مشخص ۴۰/۰ میلی گرم بر لیتر به عنوان مقسوم علیه تقسیم شد (شکل ۳-۲۶). اختلاف نسبی آن‌ها در طول موج‌های (P_1) ۳۸۴/۲ و (P_2) ۳۲۰/۰ نانومتر محاسبه شد و نمودار اختلاف نسبی (ΔP) برحسب غلظت پارا-نیتروآنیلین رسم شد (جدول ۳-۴۲) و شکل ۳-۲۷).



شکل ۳-۲۶: طیف نسبی حاصل از تقسیم محلول‌های استاندارد خالص ۱/۱۰۰، ۲/۱۰۰، ۵/۱۰۰ و ۱۰/۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین بر طیف ۴۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر کتکول به عنوان مقسوم علیه

جدول ۳-۴۲: نتایج حاصل از اندازه‌گیری بزرگی دامنه در طیف نسبی حاصل در روش RD

اختلاف بزرگی دامنه‌ها ($\Delta P = P_1 - P_2$)	بزرگی دامنه در ۳۲۰/۰ نانومتر (P_2)	بزرگی دامنه در ۳۸۴/۲ نانومتر (P_1)	غلظت پارا-نیتروآنیلین (mg/L)
۰/۲۰۷	۰/۰۷۹	۰/۲۸۷	۱/۰۰
۰/۳۹۷	۰/۱۸۴	۰/۵۸۲	۲/۰۰
۱/۰۲۲	۰/۵۳۸	۱/۵۶۱	۵/۰۰
۱/۹۲۷	۱/۰۳۲	۲/۹۵۹	۱۰/۰



شکل ۳-۲۷: نمودار کالیبراسیون پارا-نیتروآنیلین در روش RD

طیف هر مخلوط بر طیف ۴۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین، تقسیم شد و اختلاف جذب نسبی

(ΔP_{mix}) در دو طول موج λ_1 و λ_2 محاسبه شد و در معادله خط شکل (۳-۲۷) جایگذاری شد و غلظت پارا-

نیتروآنیلین در مخلوط به دست آمد. در جدول (۳-۴۳) نتایج حاصل از به کار بردن روش RD برای تعدادی از

محللول‌های سری ارزیابی آورده شده است.

جدول ۳-۴۳: نتایج حاصل از روش RD برای تعیین غلظت پارا-نیتروآنیلین در مخلوط‌های انتخاب شده از سری ارزیابی

درصد خطای نسبی	غلظت پیش بینی شده پارا نیتروآنیلین (mg/L)	ΔP	P_{22}	$P_{384/2}$	Mix(mg/L)	
					Para	Meta
-۴/۱	۰/۹۶	۰/۲۰۹	۰/۳۵۲	۰/۵۶۱	۱/۰۰	۱۰/۰
۳/۶	۵/۱۸	۱/۰۱۶	۱/۵۱۱	۲/۵۲۷	۵/۰۰	۴۰/۰
-۵/۶	۹/۴۴	۱/۸۲۹	۲/۵۳۲	۴/۳۶۲	۱۰/۰	۶۰/۰
-۲/۸۰	۲/۴۳	۰/۵۱۰	۰/۴۸۶	۰/۹۹۶	۲/۵۰	۱۰/۰

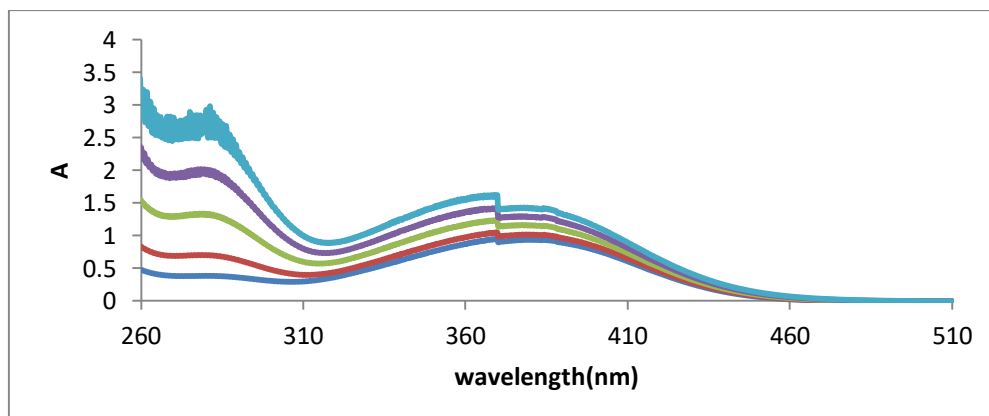
نتایج گزارش شده در جدول (۳-۴۴) حاصل از بهینه شدن پارامترهای مؤثر بر غلظت پارا-نیتروآنیلین می-باشد که بهترین صحت طول موج ۳۲۰/۰ و ۳۸۴/۲ نانومتر (جذب گونه متا به عنوان مزاحم، ثابت می باشد) و غلظت ۴۰/۰ میلی گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه بهینه می‌باشد.

جدول ۳-۴۴: نتایج حاصل از بهینه سازی جفت طول موج و غلظت متا-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه در پیش بینی غلظت پارا-نیتروآنیلین در روش RD

خطادر پیش بینی غلظت پارا نیترو آنیلین									
$\Delta\lambda$	$\Delta A(\text{meta-} 100 \text{ mg/L})$	$\Delta A(\text{para-} 500 \text{ mg/L})$	غلظت متا- نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه ۴۰/۰ mg / L		غلظت متا- نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه ۲۰/۰ mg / L		غلظت متا- نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه ۱۰/۰ mg / L		طول موج(نانومتر)
			MRE	MSE	MRE	MSE	MRE	MSE	
۴۳/۲	۰/۰۰۲	۰/۲۲	۰/۱۰۸	۰/۳۴۱	۰/۱۱۹	۰/۳۶۸	۰/۱۸۵	۰/۵۹۱	۳۳۳/۸ و ۳۷۷/۰
۶۴/۲	۰/۰۰	۰/۳	۰/۰۴۷	۰/۰۴۹	۰/۰۵۰	۰/۰۵۴	۰/۰۶۰	۰/۰۶۹	۳۸۴/۲ و ۳۲۰/۰
۱۶/۸	۰/۰۰۰۵	۰/۱	۰/۵۰۳	۴/۷۸	۰/۰۸۱	۰/۰۷۴	۰/۰۹۹	۰/۱۱۸	۳۱۵/۰ و ۳۳۱/۸
۶۳/۸	۰/۰۰۱	۰/۳۳	۰/۰۷۹	۰/۱۵۲	۰/۰۸۰	۱/۱۵۴	۰/۰۹۸	۰/۱۸۷	۳۱۵/۰ و ۳۷۸/۸
۴۵	۰/۰۰۱	۰/۲۸۰	۰/۰۵۷	۰/۰۴۵	۰/۰۵۸	۰/۰۴۹	۰/۰۶۴	۰/۰۶۲	۳۱۰/۰ و ۳۵۵/۰
۵۸/۸	۰/۰۰۱	۰/۲۷۴	۰/۰۶۲	۰/۰۷۱	۰/۰۷۲	۰/۰۸۷	۰/۱۰۷	۰/۱۵۴	۳۲۵/۰ و ۳۸۳/۸
۲۹/۲	۰/۰۲۳	۰/۰۷۳	۰/۰۵۸	۰/۱۰۰	۰/۰۶۴	۰/۰۹۱	۰/۰۸۷	۰/۰۹۶	۳۵۵/۰ و ۳۸۴/۲
۴۶	۰/۰۴۴	۰/۰۰۲	۰/۰۴۷	۰/۰۴۹	۰/۱۳۴	۱/۷۱۱	۰/۰۷۴	۰/۰۷۹	۴۰۰/۰ و ۳۵۳/۸

۳-۳-۶-۳ روش افزایش استاندارد نقطه H- دو طول موج (HPSAM)

روش دیگری که برای اندازه‌گیری همزمان دو ایزومر به کار برده شد، روش افزایش استاندارد نقطه H دو طول موجی است که گونه پارا به عنوان مزاحم در نظر گرفته شده و غلظت متا-نیتروآنیلین به عنوان آنالیت اضافه شد. ابتدا طیف هر مخلوط (مثل مخلوط ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر از پارا-نیتروآنیلین و ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر از متا-نیتروآنیلین) ثبت شد. سپس افزایش استاندارد گونه متا-نیتروآنیلین انجام شد و هر بار طیف مخلوط ثبت شد (شکل ۳-۲۸). سپس جذب آن‌ها در طول موج‌های ۳۵۳/۸ و ۴۰۰/۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (جدول ۳-۴۵) و نمودار جذب در هر جفت طول موج (مثلاً در طول موج‌های ۳۵۳/۸ و ۴۰۰/۰ نانومتر) برحسب غلظت اضافه شده از متا-نیتروآنیلین رسم شد و از روی نقطه تقاطع دو خط به دست آمده (نقطه اچ)، که غلظت متا-نیتروآنیلین (معادله ۲-۱۴) محاسبه شد (شکل ۳-۲۹).

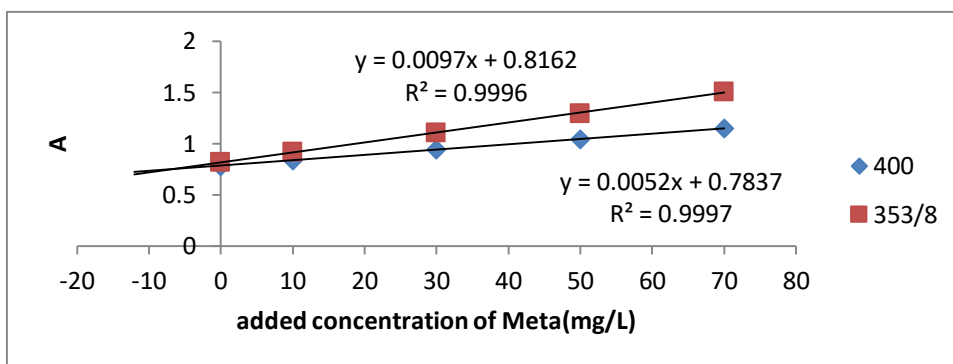


شکل ۳-۲۸: طیف جذبی مخلوط‌های حاوی، ۱۰/۰، ۲۰/۰، ۴۰/۰، ۶۰/۰ و ۸۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین و ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین
سپس با استفاده از معادله (۲-۲۰) جذب گونه پارا به دست آمد و با قراردادن آن در معادله خط شکل (۳-۳۰) منحنی، کالیبراسیون پارا-نیتروآنیلین در طول موج ۴۰۰/۰ نانومتر، غلظت پارا در مخلوط به دست آمد. برای مخلوط مذکور، غلظت‌های پیش‌بینی شده متا و پارا-نیتروآنیلین به ترتیب ۸/۲۵ و ۱۰/۱۶ میلی‌گرم بر لیتر به دست آمد.

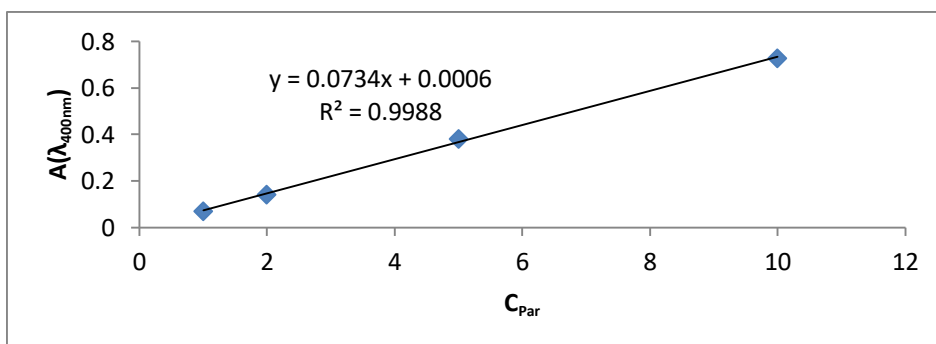
جدول ۳-۴۵: جذب به دست آمده برای مخلوط‌های شکل (۳-۲۸) در جفت طول موج ۳۵۳/۸ و ۴۰۰/۰ نانومتر برای هر

مخلوط در روش HPSAM

جذب در طول موج ۴۰۰/۰ نانومتر	جذب در طول موج ۳۵۳/۸ نانومتر	غلظت متانیتروآنیلین اضافه شده (میلی- گرم بر لیتر)
۰/۷۸۲	۰/۸۱۷	۰/۰۰
۰/۸۳۸	۰/۹۱۸	۱۰/۰
۰/۹۴۳	۱/۱۰۳	۳۰/۰
۱/۰۴۲	۱/۲۹۵	۵۰/۰
۱/۱۵۲	۱/۵۰۳	۷۰/۰



شکل ۳-۲۹: نمودار افزایش استاندارد نقطه H- به همراه معادله برای مخلوط‌های شکل (۳-۲۸)



شکل ۳-۳۰: منحنی کالیبراسیون پارا-نیتروآنیلین در طول موج ۴۰۰/۰ نانومتر در روش HPSAM

جدول ۳-۴۷) نتایج حاصل به کار بردن روش HPSAM در تعدادی از مخلوط‌های سری ارزیابی را نشان

می دهد، از پارامترهای موثر بر این روش انتخاب طول موج مناسب می باشد که در جدول (۳-۴۶) آورده شده است که بهترین جفت طول موج بهینه ۳۵۳/۸ و ۴۰۰/۰ نانومتر است.

جدول ۳-۴۶: نتایج حاصل از بهینه سازی طول موج در پیش بینی غلظت دوگونه در سری ارزیابی در روش HPSAM

خطا در پیش بینی غلظت پارا-نتروآنیلین		خطا در پیش بینی غلظت متا-نتروآنیلین		طول موج (نانومتر)
MRE	MSE	MER	MSE	
۰/۰۷۴	۰/۱۲۰	۰/۱۲۰	۲/۲۹	۴۰۰/۰ و ۳۵۳/۸
۰/۱۳۲	۰/۲۶۵	۰/۲۶۳	۲۶/۴۳	۳۴۱/۰ و ۴۰۹/۸
۰/۱۷۹	۰/۶۱۶	۰/۲۲۵	۴۱/۹۰	۳۶۰/۰ و ۳۹۴/۶

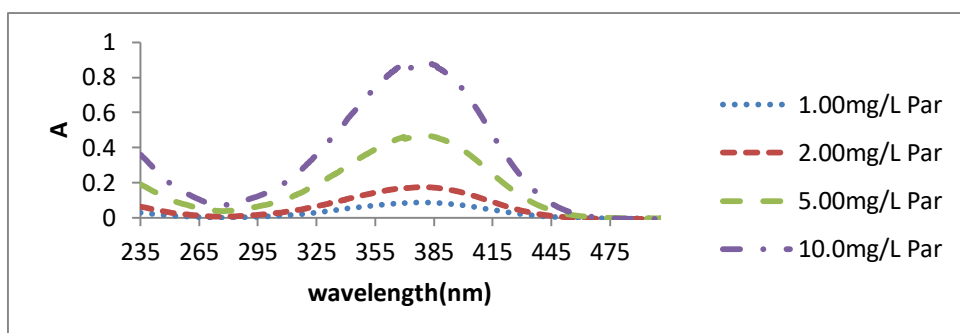
جدول ۳-۴۷: نتایج حاصل از به کارگیری روش RHPSAM برای پیش بینی غلظت تعدادی از مخلوطهای سری ارزیابی

درصد خطای نسبی %		غلظت محاسبه شده (mg/L)		R ²	معادله رگرسیون	طول موج (نانومتر)	غلظت واقعی (mg/L)	
Par	Meta	Par	Meta				Para	Meta
۱	۱۰/۰	۱/۰۱	۵/۵۰	۰/۹۹۹	$Y = ۰/۰۰۹ C + ۰/۱۲۳$	۳۵۳/۸	۱/۰۰	۵/۰۰
				۱/۰۰	$Y = ۰/۰۰۵ C + ۰/۱۰۱$	۴۰۰/۰		
۴/۸	-۱۵/۰	۵/۲۴	۸/۵۰	۰/۹۹۹	$Y = ۰/۰۰۹ C + ۰/۴۶۲$	۳۵۳/۸	۵/۰۰	۱۰/۰
				۰/۹۹۹	$Y = ۰/۰۰۵ C + ۰/۴۲۸$	۴۰۰/۰		
-۰/۹	۸/۷۵	۹/۹۱	۴۳/۵۰	۰/۹۹۷	$Y = ۰/۰۰۹ C + ۱/۱۱۵$	۳۵۳/۸	۱۰/۰	۴۰/۰
				۰/۹۹۸	$Y = ۰/۰۰۵ C + ۰/۹۴۱$	۴۰۰/۰		
۱۷/۲	۱/۶۷	۲/۹۳	۶۱/۰	۱/۰۰	$Y = ۰/۰۰۹ C + ۰/۷۶۸$	۳۵۳/۸	۲/۵۰	۶۰/۰
				۱/۰۰	$Y = ۰/۰۰۵ C + ۰/۵۲۴$	۴۰۰/۰		

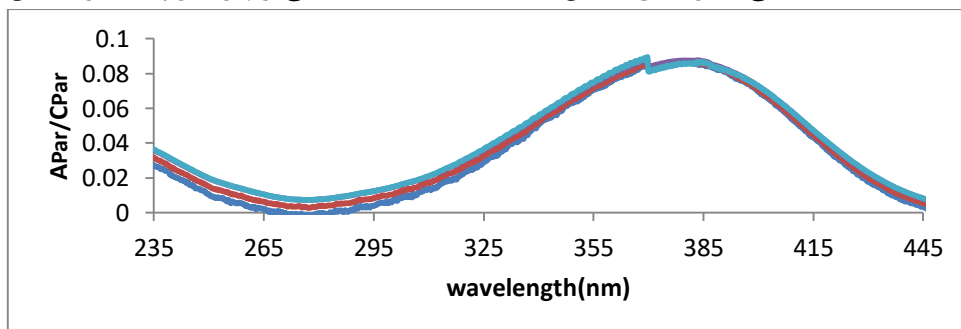
۳-۳-۴ روش افزایش استاندارد نقطه H-نسبی (RHPSAM)

یکی دیگر از روشهای به کار گرفته شده در این پروژه، روش افزایش استاندارد نقطه H-نسبی است. که در این روش برای بررسی صحت انتخاب هر جفت طول موج، طول موج های مختلفی انتخاب گردید. جفت طول موج های که جذب گونه متا ثابت باشد و گونه پارا جذبی متفاوت داشته باشد، مانند طول موج های ۳۲۰/۰-۳۸۴/۲ و ۳۷۸/۸-۳۱۵/۰، نانومتر و طول موج هایی که گونه پارا ثابت باشد ولی متا متفاوت باشد مانند ۳۵۳/۸-۴۰۰/۰،

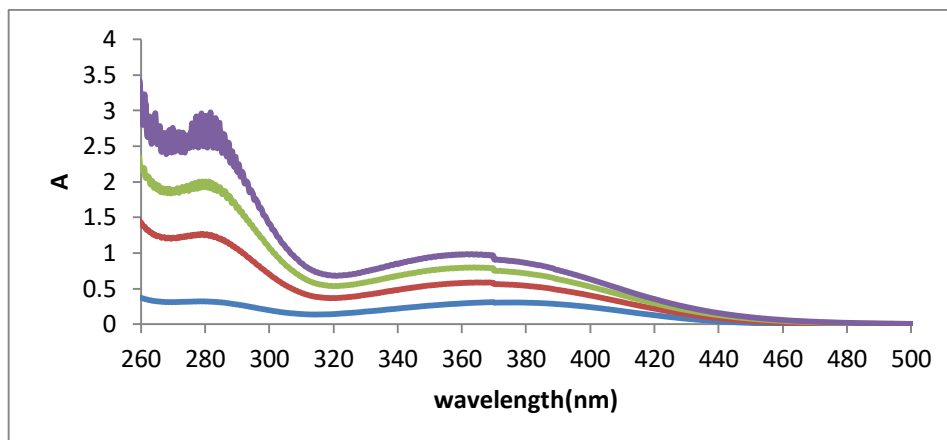
۳۸۴/۲-۴۰۹/۸ -۳۴۱/۰ و ۳۵۹/۶-۳۶۰/۰ نانومتر یا طول موج هایی جذب هر دو ایزومر متفاوت باشد مانند ۳۸۴/۲-۳۵۵/۰ نانومتر، برای اندازه گیری همزمان ایزومرهای متا و پارا-نیتروآنیلین استفاده شد که در این روش از طیف نرمال پارا-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه استفاده شد، اگر طیف جذبی خالص (شکل ۳-۳۱)) هر محلول به غلظت همان محلول تقسیم شود طیف نرمال پارا-نیتروآنیلین حاصل می شود که در شکل (۳-۳۲) آورده شده- است.



شکل ۳-۳۱ طیف جذبی محلول های، خالص ۱/۰۰، ۲/۰۰، ۵/۰۰ و ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین



شکل ۳-۳۲: طیف های نرمال شده محلول های خالص ۱/۰۰، ۲/۰۰، ۵/۰۰ و ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین ابتدا طیف هر مخلوط نسبت به شاهد ثبت شد. مثلاً برای مخلوط ۲/۵۰ میلی گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین و ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین طیف آن ثبت شد. مثل روش افزایش استاندارد، مقادیر متفاوتی از ایزومر متا-نیتروآنیلین به مخلوط اضافه شد و طیف آن ثبت شد (شکل ۳-۳۳)).

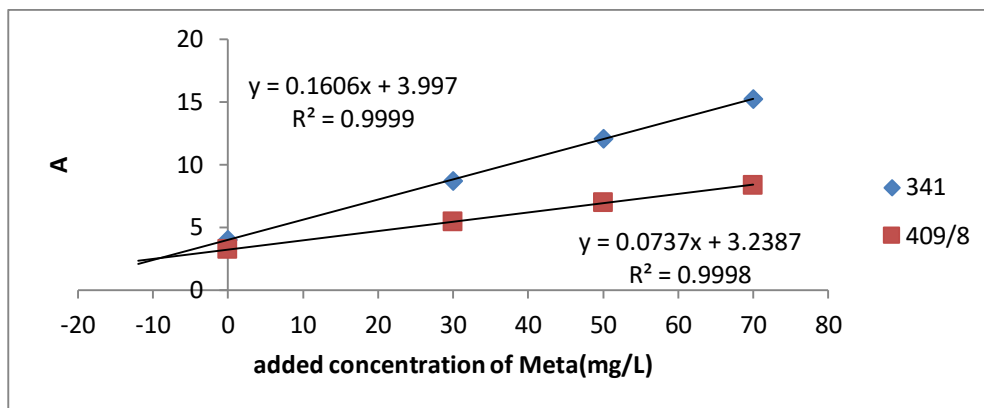


شکل ۳-۳: طیف جذبی مخلوط‌های حاوی، ۱۰/۰، ۲۰/۰، ۴۰/۰ و ۸۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین و ۲/۵۰ میلی‌گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین

سپس طیف‌های مخلوط حاوی غلظت پارا ثابت و متا متفاوت را بر میانگین طیف نرمال پارا-نیتروآنیلین تقسیم شد و جذب نسبی در طول موج‌های ۳۴۱/۰ و ۴۰۹/۸ نانومتر ثبت گردید و نمودار افزایش استاندارد متا-نیتروآنیلین در دو طول موج ذکر شده روی یک نمودار رسم گردید (جدول (۳-۴۸) و شکل (۳-۳۴)). محل تقاطع دو خط مستقیم در دو طول موج، نقطه H نسبی را نشان می‌دهد. با استفاده از معادله‌های (۲-۳۷) و (۲-۳۸) به ترتیب غلظت متا-نیتروآنیلین و پارا-نیتروآنیلین محاسبه شد. (غلظت پارا-پیش‌بینی شده ۲/۶۰ میلی‌گرم بر لیتر و متا آن ۸/۷۰ میلی‌گرم بر لیتر به دست آمد). برای بقیه مخلوط‌های سری ارزیابی و تست به همین شیوه عمل شد.

جدول ۳-۴۸: جذب نسبی به دست آمده برای مخلوط ۲/۵۰ میلی‌گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین و ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر متا-نیتروآنیلین بعد از تقسیم بر میانگین طیف نرمال پارا-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه در جفت طول موج ۳۴۱/۰ و ۴۰۹/۸ نانومتر برای هر مخلوط در شکل (۳-۳۳)

غلظت متا-نیتروآنیلین اضافه شده (میلی‌گرم بر لیتر)	جذب نسبی در طول موج ۳۴۱/۰ نانومتر	جذب نسبی در طول موج ۴۰۹/۸ نانومتر
۰/۰	۴/۰۳۰	۳/۲۳۷
۳۰/۰	۸/۷۲۱	۵/۴۳۰
۵۰/۰	۱۲/۰۷۲	۶/۹۷۱
۷۰/۰	۱۵/۲۳	۸/۳۷۶



شکل ۳-۳: نمودار افزایش استاندارد نقطه H- نسبی به همراه معادله برای مخلوط ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر متا- نیتروآنیلین و ۲/۵۰ میلی گرم بر لیتر پارا-نیتروآنیلین
 نتایج گزارش شده در جدول (۳-۴۹)، حاصل از به کار بردن روش RHPSAM برای تعدادی از محلول‌های سری ارزیابی در تعیین غلظت گونه‌های متا و پارا-نیتروآنیلین آورده شده است.

جدول ۳-۴۹: نتایج حاصل از به کارگیری روش RHPSAM برای پیش بینی غلظت تعدادی از مخلوط‌های سری ارزیابی

درصد خطای نسبی %		غلظت محاسبه شده (mg/L)		R ²	معادله	طول موج (نانومتر)	غلظت واقعی (mg/L)	
Par	Meta	Par	Meta				Para	Meta
۰/۱۰	۵/۶	۱/۰۰	۵/۲۸	۱/۰۰	$Y = 0.1606 C + 3.997$	۳۴۱	۱/۰۰	۵/۰۰
				۰/۹۹۹	$Y = 0.0737 C + 3.2387$	۴۰۹/۸		
۱۴/۶	-۳/۷۳	۵/۷۲	۵۷/۷۵	۱/۰۰	$Y = 0.158 C + 14.85$	۳۴۱	۵/۰۰	۶۰/۰
				۱/۰۰	$Y = 0.073 C + 9.941$	۴۰۹/۸		
۳/۹	-۸/۹۲	۱۰/۳۹	۳۶/۴۳	۰/۹۹۹	$Y = 0.156 C + 16.07$	۳۴۱	۱۰/۰	۴۰/۰
				۰/۹۹۸	$Y = 0.072 C + 13.01$	۴۰۹/۸		
۲۲/۷	-۳/۳۳	۳/۰۷	۵۸/۰	۱/۰۰	$Y = 0.154 C + 12.00$	۳۴۱	۲/۵۰	۶۰/۰
				۱/۰۰	$Y = 0.067 C + 6.954$	۴۰۹/۸		

دو پارامتر مؤثر در تعیین غلظت ایزومرها، غلظت طیف نرمال شده پارا-نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه و جفت طول موج اندازه گیری می‌باشد که نتایج در جدول (۳-۵۰) گزارش شده است. بهترین طول موج ۳۴۱/۰ و ۴۰۹/۸ نانومتر (جذب گونه مزاحم (پارا) ثابت) می‌باشد و میانگین طیف‌های نرمال پارا-نیتروآنیلین به عنوان

مقسوم علیه، انتخاب گردید.

جدول ۳-۵: نتایج حاصل از بهینه سازی طول موج و مقسوم علیه در پیش بینی غلظت دو گونه در سری ارزیابی در

روش RHPSAM

غلظت ۱۰/۰ میلی گرم برلیتر پارا نیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه				غلظت ۵/۰۰ میلی گرم برلیتر پارانیتروآنیلین به عنوان مقسوم علیه				میانگین طیف نرمال پارانیتروآنیلین با غلظتهای مختلف به عنوان مقسوم علیه				طول موج-ها
خطا در پیش بینی غلظت متا نیتروآنیلین		خطادر پیش بینی غلظت پارا نیتروآنیلین		خطا در پیش بینی غلظت متانیتروآنیلین		خطادر پیش بینی غلظت پارا نیتروآنیلین		خطا در پیش بینی غلظت متا نیتروآنیلین		خطادر پیش بینی غلظت پارا نیتروآنیلین		
MRE	MSE	MRE	MSE	MRE	MSE	MRE	MSE	MRE	MSE	MRE	MSE	
۰/۰۹۰	۹/۶۲	۰/۰۷۱	۰/۱۰۳	۰/۰۶۶	۸/۵۵	۰/۰۶۰	۰/۰۹۰	۰/۰۸۵	۹/۰۶۴	۰/۰۷۰	۰/۰۹۸	۳۵۳/۸ و ۴۰۰
۰/۰۷۰	۶/۶۱	۰/۰۵۷	۰/۰۸۷	۰/۰۷۸	۷/۶۰	۰/۰۵۶	۰/۰۶۱	۰/۰۶۹	۶/۴۰۲	۰/۰۵۶	۰/۰۹۵	۴۰۹/۸ و ۳۴۱
۰/۱۵۴	۲۳/۰۸	۰/۱۰۷	۰/۳۳۹	۱/۲۱	۲۰/۳۶	۰/۰۸۳	۰/۱۷۰	۰/۱۴۹	۲۱/۱۹	۰/۱۰۴	۰/۳۲۰	۳۹۴/۶ و ۳۶۰
۰/۰۷۶	۵/۹۷	۰/۰۹۴	۰/۱۱۳	۰/۰۸۴	۵/۶۲	۰/۰۶۱	۰/۰۸۸	۰/۰۶۶	۴/۸۵۱	۰/۰۷۲	۰/۰۷۷	۳۲۰ و ۳۸۴/۲
۰/۰۷۷	۴/۱۹	۰/۱۲۷	۰/۱۸۰	۰/۰۹۸	۱۲/۶۲	۰/۱۱۵	۰/۱۵۹	۰/۰۶۷	۳/۳۳۳	۰/۱۰۲	۰/۱۳۶	۳۷۸/۸ و ۳۱۵
۰/۱۴۱	۲۹/۱۱	۰/۱۴۱	۰/۴۱۴	۰/۱۲۱	۲۲/۲۷۴	۰/۰۹۶	۰/۱۹۶	۰/۱۳۴	۲۴/۴۳	۰/۱۰۶	۰/۳۳۱	۳۸۴/۲ و ۳۵۵

۳-۶-۴ حد تشخیص روش (CC، RD)

به منظور بررسی حد تشخیص روش‌ها ی RD، CC، ۱۰ ، اندازه‌گیری تکراری برای شاهد انجام‌شد و طیف در محدوده طول موجی ۲۳۵-۵۱۰ نانومتر ثبت گردید و در این روش‌ها از تقسیم سه برابر انحراف استاندارد سیگنال شاهد بر شیب منحنی کالیبراسیون، حد تشخیص طبق معادله (۳-۳) به دست آمد. باتوجه به تعریف فوق، حدتشخیص تجربی روش‌ها در جدول (۳-۵۱) برای پارا و متا-نیتروآنیلین بیان شده است.

جدول ۳-۵۱: نتایج حاصل از بررسی حدتشخیص در روش‌های RD، CC، RHPSAM، HPSAM

روش مورد استفاده	حد تشخیص برای پارا- نیتروآنیلین (mg/L)	حد تشخیص برای متا- نیتروآنیلین (mg/L)
CC	۰/۰۴۷	۰/۴۷۵
RD	۰/۰۴۸	۰/۴۹۸

۳-۶-۵ دقت و صحت روش‌های (RD، CC، RHPSAM و HPSAM)

برای بیان دقت و صحت در روش‌های RD، CC، RHPSAM و HPSAM محلول‌های با غلظت متفاوت از پارا و متا-نیتروآنیلین در شرایط بهینه ساخته شد. برای هر مخلوط ۳ بار اندازه‌گیری تکراری انجام شد و طیف هر

مخلوط در محدوده طول موجی ۵۱۰-۲۳۵ نانومتر ثبت گردید. سپس غلظت پارا و متا-نیتروآنیلین با روش‌های CC, RD, RHP SAM و HPSAM تعیین شد. مقادیر انحراف استاندارد در هر حالت محاسبه شد و نتایج آن در جدول‌های (۳-۵۲)، (۳-۵۳)، (۳-۵۴) و (۳-۵۵) آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد روش‌های CC و RD در پیش بینی غلظت این دو ایزومر موفق و از صحت و دقت بالای برخوردارند.

جدول ۳-۵۲: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت در روش CC

شماره مخلوط	متا-نیتروآنیلین (mg/L)	پارا-نیتروآنیلین (mg/L)	متا-نیتروآنیلین اندازه‌گیری شده (mg/L)	پارا-نیتروآنیلین اندازه‌گیری شده (mg/L)	درصد بازیابی متا-نیتروآنیلین	درصد بازیابی پارا-نیتروآنیلین
۱	۳۰/۰	۳/۰۰	۳۰/۸۳±(۰/۵۷۷)*	۲/۹۵±(۰/۰۳۸)*	۱۰۲/۷	۹۸/۳۳
۲	۴۵/۰	۶/۰۰	۴۵/۸±(۰/۷۰۱)	۶/۱۳±(۰/۰۸۱)	۱۰۱/۶	۱۰۵/۶
۳	۰/۰۰	۳/۰۰	۰/۰۰±(۰/۰۰)	۳/۰۱±(۰/۰۳۰)	۱۰۰/۰	۱۰۰/۲۳
۴	۱۸/۰	۰/۰۰	۱۸/۵±(۰/۳۳)	۰/۰۰±(۰/۰۰)	۱۰۲/۵	۱۰۰/۰
۵	۱۰/۰	۱۰/۰	۱۰/۱±(۰/۱۵۳)	۹/۷۹±(۰/۱۴۴)	۱۰۰/۸۲	۹۷/۹

*اعداد داخل پرانتز انحراف استاندارد حاصل ۳ بار اندازه‌گیری تکراری است

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

شماره مخلوط	متا-نیتروآنیلین (mg/L)	پارا-نیتروآنیلین (mg/L)	متا-نیتروآنیلین اندازه‌گیری شده (mg/L)	پارا-نیتروآنیلین اندازه‌گیری شده (mg/L)	درصد بازیابی متا-نیتروآنیلین	درصد بازیابی پارا-نیتروآنیلین
۱	۳۰/۰	۳/۰۰	۳۰/۷۳±(۰/۵۸۴)*	۳/۰۳±(۰/۰۴۰)*	۱۰۲/۴۳	۱۰۱/۰
۲	۴۵/۰	۶/۰۰	۴۵/۹۰±(۰/۷۰۹)	۶/۰۴±(۰/۰۸۲)	۱۰۲/۰	۱۰۰/۶۶
۳	۰/۰۰	۳/۰۰	۰/۰۰±(۰/۰۰)	۲/۹۳±(۰/۰۳۱)	۱۰۰/۰	۹۷/۶۶
۴	۱۸/۰	۰/۰۰	۱۸/۱۳±(۰/۳۳۷)	۰/۰۰±(۰/۰۰)	۱۰۰/۷۲	۱۰۰/۰
۵	۱۰/۰	۱۰/۰	۱۰/۰۳۸±(۰/۱۵۸)	۹/۶۸±(۰/۱۴۵)	۱۰۰/۳۸	۹۶/۸

*اعداد داخل پرانتز انحراف استاندارد حاصل ۳ بار اندازه‌گیری تکراری است

جدول ۳-۵۴: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت درروش RHPSAM

شماره مخلوط	متا- نیتروآنیلین (mg/L)	پارا- نیتروآنیلین (mg/L)	متا-نیتروآنیلین اندازه گیری شده (mg/L)	پارا-نیتروآنیلین اندازه گیری شده (mg/L)	درصد بازیابی متا-نیتروآنیلین	درصد بازیابی پارا-نیتروآنیلین
۱	۳۰/۰	۳/۰۰	۳۰/۴±(۰/۱۶۰)*	۲/۹۸±(۰/۱۷۳)*	۱۰۱/۲	۹۹/۳۳
۲	۴۵/۰	۶/۰۰	۴۳/۱±(۲/۵۲)	۶/۹۱±(۰/۱۹۳)	۹۵/۶۷	۱۱۵/۱۶
۳	۰/۰۰	۳/۰۰	۰/۰۰±(۰/۰۰)	۳/۳۵±(۰/۰۰۶)	۰/۰۰	۱۱۱/۶
۴	۱۸/۰	۰/۰۰	۱۷/۶±(۰/۵۱)	۰/۰۶۹±(۰/۰۰۹)	۹۷/۶۶	۰/۰۰
۵	۱۰/۰	۱۰/۰	۸/۶۱±(۰/۵۸۲)	۱۰/۱۱±(۰/۱۱۹)	۸۶/۱	۱۰۱/۱

*اعداد داخل پرانتز انحراف استاندارد حاصل ۳ بار اندازه‌گیری تکراری است

جدول ۳-۵۵: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت درروش HPSAM

شماره مخلوط	متا- نیتروآنیلین (mg/L)	پارا- نیتروآنیلین (mg/L)	متا-نیتروآنیلین اندازه گیری شده (mg/L)	پارا-نیتروآنیلین اندازه گیری شده (mg/L)	درصد بازیابی متا-نیتروآنیلین	درصد بازیابی پارا-نیتروآنیلین
۱	۳۰/۰	۳/۰۰	۳۱/۹۱±(۰/۳۸)*	۳/۱۲±(۰/۲۵۷)*	۱۰۶/۳۱	۱۰۳/۹
۲	۴۵/۰	۶/۰۰	۵۹/۵±(۹/۴)	۵/۵۱±(۰/۶۲)	۱۳۲/۳	۹۱/۸
۳	۰/۰۰	۳/۰۰	۰/۰۰±(۰/۰۰)	۳/۲۵±(۰/۰۲)	۱۰۰/۰	۱۰۸/۳
۴	۱۸/۰	۰/۰۰	۱۹/۱±(۰/۱۴)	۰/۰۴۴±(۰/۰۰۶)	۱۰۶/۰۱	تعریف نشده
۵	۱۰/۰	۱۰/۰	۴/۱۷±(۱/۰۴)	۱۰/۴±(۰/۲۱)	۴۱/۷	۱۰۴/۳

*اعداد داخل پرانتز انحراف استاندارد حاصل ۳ بار اندازه‌گیری تکراری است

۳-۶ کاربرد روش‌های CC و RD در آنالیز نمونه آب شهر شاهرود

برای تهیه نمونه حقیقی از آب شهر شاهرود به این صورت عمل شد که: ابتدا ۵/۰۰ میلی لیتر از آب شهر به یک بالن حجمی ۱۰/۰ میلی لیتری انتقال داده شد سپس از مخلوط‌های با نسبت‌های غلظتی مختلفی از متا و پارا-نیتروآنیلین به آن اضافه شد و با آب مقطر به حجم رسانده شد و طیف آن نسبت به شاهد (آب مقطر) ثبت و ذخیره گردید. سپس غلظت متا و پارا-نیتروآنیلین در هر مخلوط با روش CC و RD به دست آمد نتایج حاصل از

۵ بار تکرار برای کاربرد روش‌های ذکر شده به ترتیب در جدول‌های (۳-۵۶) و (۳-۵۷) آورده شده است. نتایج نشان دهنده این می باشد که غلظت متا و پارا-نیتروآنیلین با روش‌های بیان شده در نمونه آب شهری با دقت و صحت خوبی تعیین شده است.

جدول ۳-۵۶: نتایج حاصل از اندازه‌گیری متا و پارا-نیتروآنیلین در نمونه آب شهر شاهرود به روش CC

شماره مخلوط	متا-نیتروآنیلین اضافه شده (mg/L)	پارا-نیتروآنیلین اضافه شده (mg/L)	متا-نیتروآنیلین اندازه‌گیری شده (mg/L)	پارا-نیتروآنیلین اندازه‌گیری شده (mg/L)	درصد بازیابی متا-نیتروآنیلین	درصد بازیابی پارا-نیتروآنیلین
۱	۰/۰۰	۰/۰۰	<LOD	<LOD	-	-
۲	۱۰/۰	۲/۰۰	۱۰/۰ (±۰/۳)*	۲/۰۵ (±۰/۰۵)	۱۰۰/۰	۱۰۲/۵
۳	۲۰/۰	۲/۰۰	۲۰/۴ (±۰/۳)	۲/۰۲ (±۰/۰۶)	۱۰۱/۸	۱۰۱
۴	۱۰/۰	۵/۰۰	۹/۷ (±۰/۳)	۵/۲۱ (±۰/۲۱)	۹۷/۲	۹۷/۲
۵	۴۰/۰	۴/۰۰	۴۱/۱ (±۱/۰)	۵/۲۱ (±۰/۲۱)	۱۰۲/۷	۹۹/۰
۶	۲۵/۰	۶/۰۰	۲۵/۵ (±۰/۴)	۳/۹۶ (±۰/۰۶)	۱۰۱/۹	۱۰۱
۷	۱۵/۰	۷/۰۰	۱۴/۹ (±۰/۵)	۷/۰۶ (±۰/۰۹)	۹۹/۳۳	۱۰۰/۹

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

جدول ۳-۵۷: نتایج حاصل از اندازه‌گیری متا و پارا-نیتروآنیلین در نمونه آب شهر شاهرود با روش RD

شماره مخلوط	متا-نیتروآنیلین اضافه شده (mg/L)	پارا-نیتروآنیلین اضافه شده (mg/L)	متا-نیتروآنیلین اندازه‌گیری شده (mg/L)	پارا-نیتروآنیلین اندازه‌گیری شده (mg/L)	درصد بازیابی متا-نیتروآنیلین	درصد بازیابی پارا-نیتروآنیلین
۱	۰/۰۰	۰/۰۰	<LOD	<LOD	-	-
۲	۱۰/۰	۲/۰۰	۱۰/۳ (±۰/۳)*	۲/۰۱ (±۰/۰۷)*	۱۰۳/۰	۱۰۰/۵
۳	۲۰/۰	۲/۰۰	۲۰/۴ (±۰/۴)	۲/۰۱ (±۰/۰۲)	۱۰۲/۰	۱۰۰/۵
۴	۱۰/۰	۵/۰۰	۹/۸۰ (±۰/۴)	۵/۱۹ (±۰/۲۰)	۹۸/۰	۱۰۳/۸
۵	۴۰/۰	۴/۰۰	۴۰/۷ (±۰/۸)	۳/۹۶ (±۰/۰۶)	۱۰۱/۷	۹۹/۰
۶	۲۵/۰	۶/۰۰	۲۵/۴ (±۰/۴)	۶/۰۸ (±۰/۱)	۱۰۱/۶	۱۰۱/۳
۷	۱۵/۰	۷/۰۰	۱۵/۵ (±۰/۵)	۷/۱۲ (±۰/۰۹)	۱۰۳/۳	۱۰۱/۷۱

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

۷-۳ مطالعه مقایسه ای روش‌های اسپکتروفتومتری جدید برای تعیین مقدار همزمان گونه‌های با هم پوشانی طیفی شدید در مخلوط‌های دوتایی آنها

پارامترهای بهینه شده برای اندازه‌گیری غلظت ترکیبات در هر روش و برای هر ترکیب بر روی سری مخلوط‌های ارزیابی اعمال شد و نتایج حاصل برای ایزومرهای کتکول و رزورسینول (پیوست ۲ جدول الف) و ایزومرهای متا و پارا-نیتروآنیلین (پیوست ۲ جدول ب) آورده شده است. از مقایسه غلظت‌های به دست آمده برای مخلوط‌های سری ارزیابی کتکول و رزورسینول (جدول ۳-۵۸)) مشخص گردید که روش RD نسبت به سه روش دیگر غلظت‌ها را با خطای کمتر پیش‌بینی می‌کند در این مطالعه همچنین مشخص شد که روش RHPSAM نسبت به روش HPSAM غلظت‌ها را با خطای کمتری پیش‌بینی می‌کند. از مقایسه غلظت‌های به دست آمده برای مخلوط‌های سری ارزیابی پارا و متا-نیتروآنیلین (جدول ۳-۵۹)) مشخص گردید که روش CC نسبت به سه روش دیگر، غلظت‌ها را با خطای کمتری پیش‌بینی می‌کند. همچنین مشخص شد که در این مخلوط‌ها هم روش RHPSAM نسبت به روش HPSAM غلظت‌ها را با خطای کمتر پیش‌بینی می‌کند.

۸-۳ بررسی و بهینه سازی پارامترهای تجربی

باتوجه به بررسی‌های انجام شده، پارامترهای pH، نوع و حجم بافر و قدرت یونی تأثیری بر سیگنال تجزیه-ای گونه‌ها ندارد. بنابراین حساسیت مستقل از پارامترهای مذکور می‌باشد.

۹-۳ ارقام شایستگی روش‌ها

رابطه خطی بین سیگنال اندازه‌گیری شده و غلظت نشان می‌داد که، برای ترکیبات در مخلوط‌ها به روش‌های CC، RD، RHPSAM و HPSAM محدوده خطی برای دو ایزومر دی هیدروکسی بنزن (کتکول و رزورسینول) در محدوده ۲/۵۰-۲۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر می‌باشد و برای ایزومرهای نیتروآنیلین، متا و پارا به ترتیب، ۵/۰۰-۶۰/۰ و

۱۰/۰ - ۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر می باشد. نتایج حاصل از پیش بینی غلظت‌ها در سری تست برای ترکیبات کتکول و رزورسینول در جدول (۳-۵۸)، و همچنین برای ترکیبات متا و پارا-نیتروآنیلین در جدول (۳-۵۹) آورده شده است

نتایج جدول (۳-۵۸) برای مخلوط‌های سری تست نشان می‌دهد که غلظت‌های اندازه گیری شده برای کتکول و رزورسینول با روش RD، دارای خطای کمتری نسبت به سه روش دیگر است. زیرا این روش دارای دو مرحله در پیش بینی غلظت دارد و خطاهای محاسباتی در آن کمتر می باشد. برای مخلوط‌های سری ارزیابی هم، غلظت پیش‌بینی شده کتکول و رزورسینول با روش RD دارای خطای کمتری نسبت به سه روش دیگر بود. بعد از روش RD، روش CC، غلظت‌های کتکول و رزورسینول را هم در مخلوط‌های سری ارزیابی و هم در سری تست نسبت به دو روش دیگر با خطای کمتری پیش‌بینی می‌کند و همچنین روش RHPSAM نسبت به روش HPSAM خطای کمتری را دارا می باشد زیرا با تقسیم کردن طیف نرمال مقسوم علیه در روش RHPSAM یک مقدار ثابتی اضافه و یا کم می شود که اثر گونه مزاحم را حذف می کند.

نتایج جدول (۳-۵۹) برای مخلوط‌های سری تست نشان می‌دهد که غلظت‌های اندازه گیری شده متا و پارا-نیتروآنیلین، ابتدا با روش CC و سپس با روش RD با خطای کمتری پیش بینی شده است. در مخلوط‌های سری ارزیابی هم غلظت دو گونه با کمترین خطا با روش CC و سپس با روش RD پیش بینی شده است.

جدول ۳-۵۸: نتایج حاصل از به کار بردن روش‌های HPSAM و RHPSAM.RD.CC در شرایط بهینه برای اندازه گیری غلظت کتکول و رزورسینول در مخلوط های سری تست

روش HPSAM		روش RHPSAM		روش RD		روش CC		مخلوط		شماره محلول
RES	CAT	RES	CAT	RES	CAT	RES	CAT	RES	CAT	
۶/۴۴	۴/۷۴	۵/۵۸	۵/۰۶	۴/۹۸	۴/۸۸	۵/۱۰	۴/۸۳	۵/۰۰	۵/۰۰	۱
۵/۵۰	۵/۱۴	۴/۷۵	۵/۳۸	۴/۸۸	۵/۲۰	۴/۹۰	۵/۳۸			
۵/۸۰	۵/۴۹	۵/۲۹	۵/۴۶	۵/۰۷	۵/۱۸	۵/۱۹	۴/۸۸			
۱۶/۵	۵/۱۶	۱۵/۶	۵/۱۲	۱۴/۷	۵/۸۷	۱۵/۱	۵/۹۲	۱۵/۰	۶/۰۰	۲
۱۹/۱	۴/۷۹	۱۷/۸	۵/۲۹	۱۵/۳	۶/۰۵	۱۵/۷	۵/۹۹			
۱۶/۷	۵/۱۹	۱۵/۴	۵/۷۸	۱۴/۷	۶/۰۵	۱۵/۱	۶/۳۵			
۴/۶۶	۱۱/۶۴	۳/۲۶	۱۱/۶	۲/۹۴	۱۲/۲	۳/۰۸	۱۲/۰	۳/۰۰	۱۲/۰	۳
۴/۴۴	۱۱/۳۶	۳/۱۷	۱۱/۳	۲/۶۳	۱۲/۱	۲/۷۶	۱۲/۱			
۴/۶۶	۱۱/۲	۳/۳۱	۱۱/۳	۲/۶۳	۱۱/۹	۲/۷۵	۱۲/۳			
۱۳/۱	۰/۰۰	۱۲/۸	۰/۰۰	۱۱/۹	۰/۰۰	۱۲/۲	۰/۰۰	۱۲/۰	۰/۰۰	۴
۱۲/۸	۰/۰۰	۱۲/۴	۰/۰۰	۱۱/۸	۰/۰۰	۱۲/۱	۰/۰۰			
۱۳/۲	۰/۰۰	۱۲/۸	۰/۰۰	۱۱/۹	۰/۰۰	۱۲/۱	۰/۰۰			
۰/۰۰	۱۴/۴	۰/۰۰	۱۴/۵	۰/۰۰	۱۵/۱	۰/۰۰	۱۵/۳	۰/۰۰	۱۵/۰	۵
۰/۰۰	۱۴/۹	۰/۰۰	۱۴/۵	۰/۰۰	۱۵/۶	۰/۰۰	۱۵/۸			
۰/۰۰	۱۴/۷	۰/۰۰	۱۴/۷	۰/۰۰	۱۵/۵	۰/۰۰	۱۵/۶			
۲/۴۱	۰/۳۱۲	۰/۷۱۳	۰/۲۳۱	۰/۰۴۲	۰/۰۵۴	۰/۱۰۰	۰/۰۴۸	MSE		

۱- اعداد گزارش شده در جدول، غلظت بر حسب میلی گرم بر لیتر می باشد.

جدول ۳-۵۹: نتایج حاصل از به کارگیری روش‌های RHPSAM.RD.CC و HPSAM در شرایط بهینه برای اندازه گیری غلظت متا و پارا- نیتروآنیلین در مخلوط‌های سری تست

روش HPSAM		روش RHPSAM		روش RD		روش CC		مخلوط		شماره محلول
Para	Meta	Para	Meta	Para	Meta	Para	Meta	Para	Meta	
۳/۲۸	۳۲/۰	۳/۱۶	۳۰/۴	۳/۰۷	۳۱/۲	۲/۹۹	۳۱/۳	۳/۰۰	۳۰/۰	۱
۲/۸۲	۳۱/۵	۲/۸۱	۲۹/۷	۳/۰۰	۳۰/۱	۲/۹۳	۳۰/۸			
۳/۲۴	۳۲/۲	۲/۹۶	۳۰/۹	۳/۰۰	۳۰/۹	۲/۹۳	۳۱/۰			
۵/۹۰	۵۲/۴	۶/۶۹	۴۵/۹	۵/۹۹	۴۶/۷	۶/۰۸	۴۶/۵	۶/۰۰	۴۵/۰	۲
۵/۶۰	۵۴/۴	۷/۰۷	۴۱/۳	۵/۹۹	۴۵/۴	۶/۰۸	۴۵/۲			
۵/۶۲	۵۴/۲	۶/۹۷	۴۱/۹	۶/۱۳	۴۵/۶	۶/۲۲	۴۵/۵			
۳/۲۷	۰/۰۰	۳/۳۴	۰/۰۰	۲/۹۴	۰/۰۰	۳/۰۲	۰/۰۰	۳/۰۰	۰/۰۰	۳
۳/۲۷	۰/۰۰	۳/۳۶	۰/۰۰	۲/۹۴	۰/۰۰	۳/۰۲۵	۰/۰۰			
۳/۲۲	۰/۰۰	۳/۳۵	۰/۰۰	۲/۸۹	۰/۰۰	۲/۹۷	۰/۰۰			
۰/۰۴	۱۹/۰	۰/۰۷	۱۷/۲	۰/۰۰	۱۷/۸	۰/۰۰	۱۸/۲	۰/۰۰	۱۸/۰	۴
۰/۰۴	۱۹/۰	۰/۰۵۹	۱۷/۳	۰/۰۰	۱۸/۱	۰/۰۰	۱۸/۴			
۰/۰۵	۱۹/۶	۰/۰۶۹	۱۸/۲	۰/۰۰	۱۸/۵	۰/۰۰	۱۸/۸			
۰/۰۶	۲۰/۲۷	۰/۲۵	۲/۸۹	۲/۲۴	۰/۰۱۶	۰/۰۱۰	۱/۶۷	MSE		

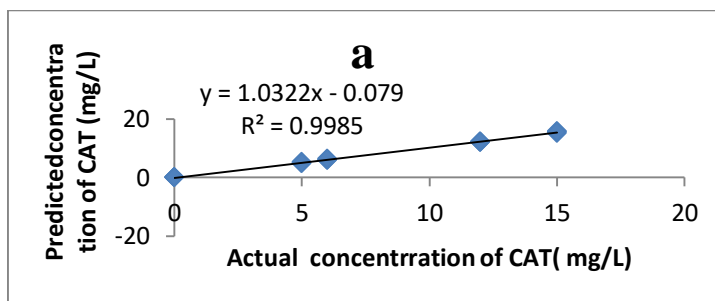
۱- اعداد گزارش شده در جدول، غلظت بر حسب میلی گرم بر لیتر می باشد.

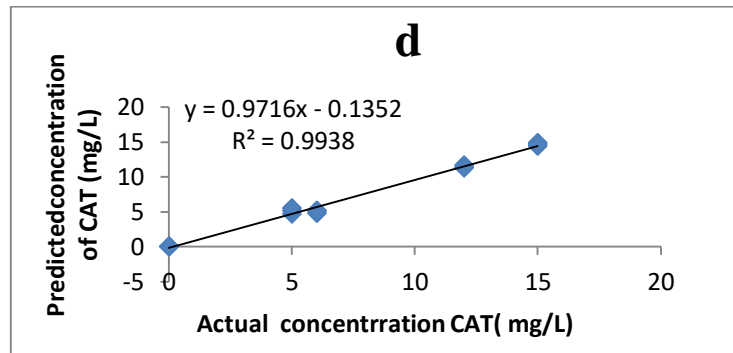
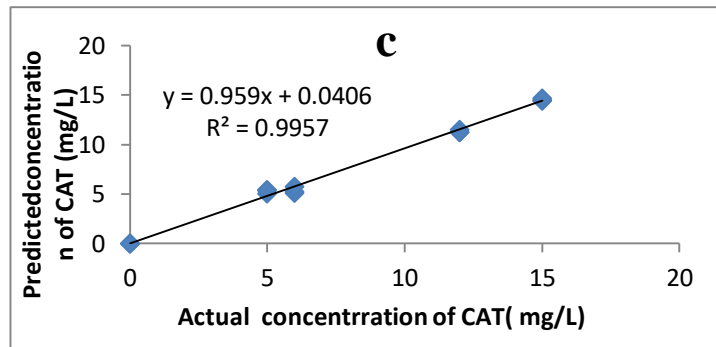
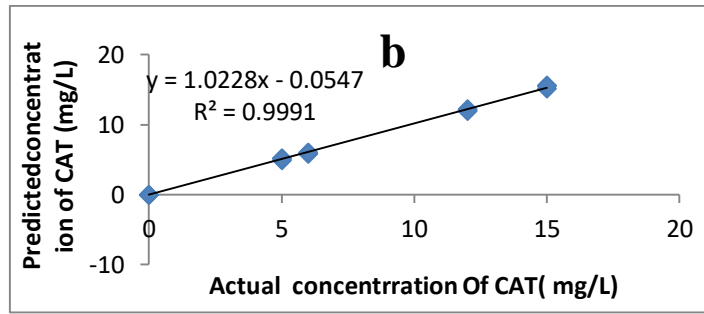
۳-۹-۱ ارزیابی آماری روش‌ها

برای روش‌های CC، RD، RHPSAM و HPSAM نمودار غلظت پیش‌بینی شده بر حسب غلظت واقعی

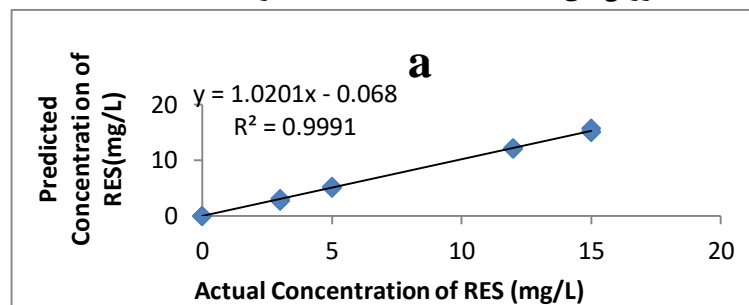
کتکول و رزورسینول به ترتیب شکل‌های (۳-۳۵) و (۳-۳۶) برای متا-نیتروآنیلین و پارا-نیتروآنیلین به ترتیب در

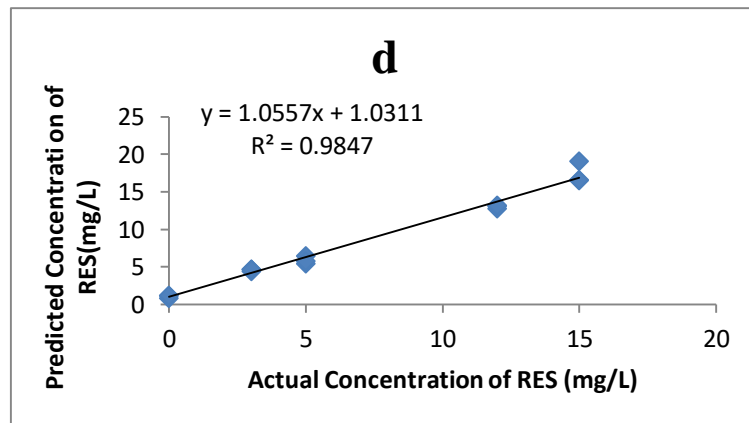
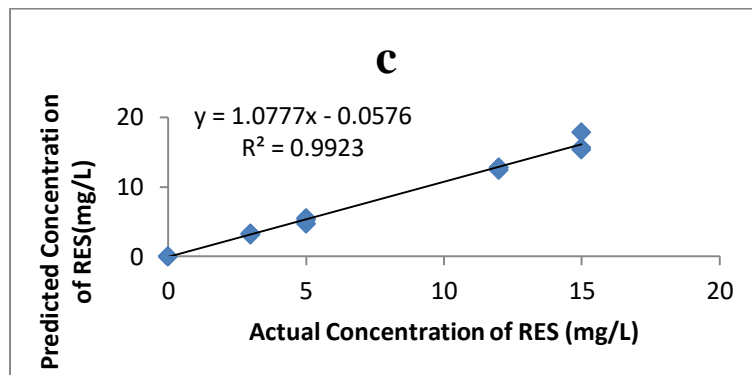
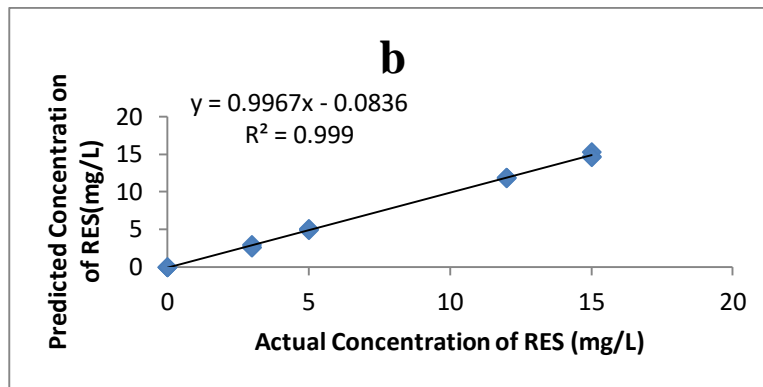
شکل‌های (۳-۳۷) و (۳-۳۸) آورده شده است.



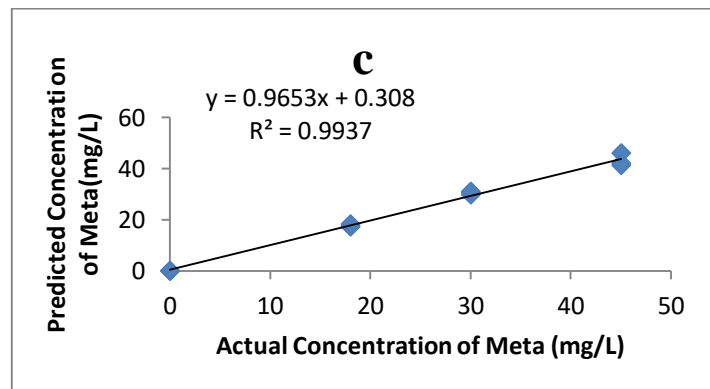
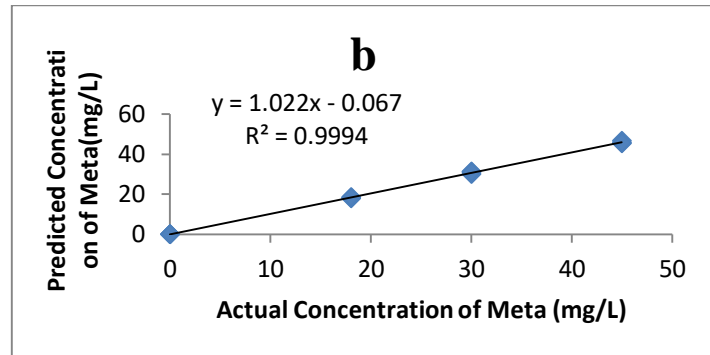
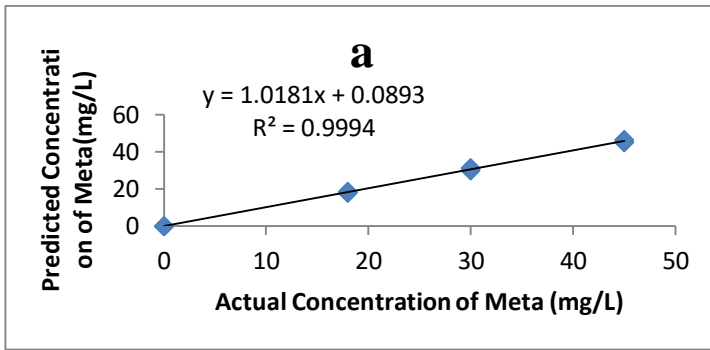


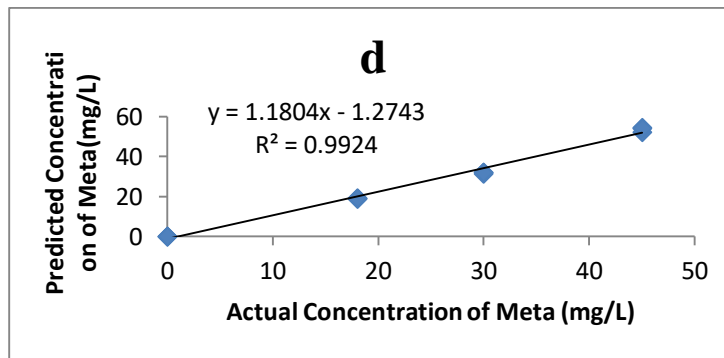
شکل ۳-۳: نمایش میزان هم‌بستگی غلظت پیش‌بینی شده و غلظت واقعی کتکول در مخلوط سری تست به ترتیب در روش‌های a: CC, b: RD, c: RHPSAM و d: HPSAM



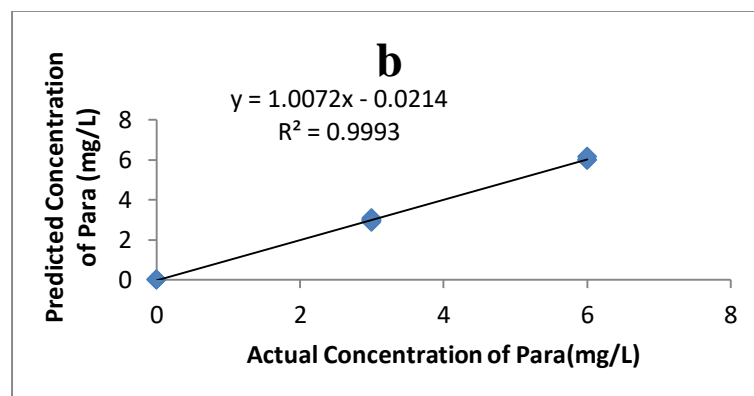
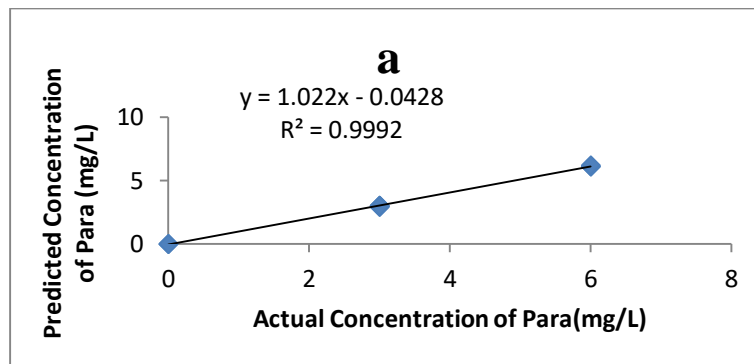


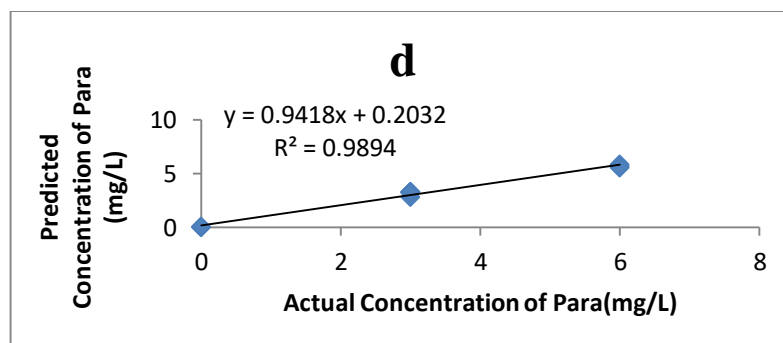
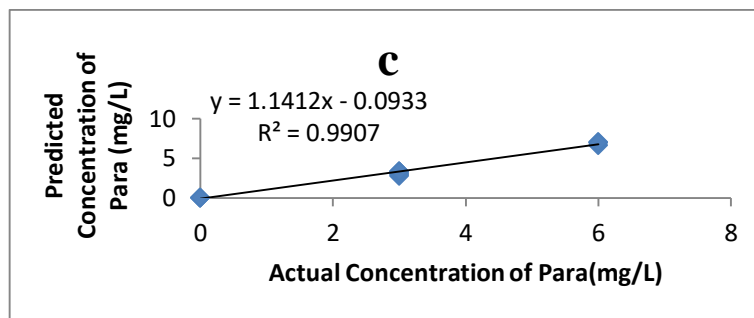
شکل ۳-۳۶: نمایش میزان همبستگی غلظت پیش‌بینی شده و غلظت واقعی رزورسینول در مخلوط سری تست به ترتیب در روش‌های a: CC، b: RD، c: RHPSAM و d: HPSAM





شکل ۳-۳۷: نمایش میزان همبستگی غلظت پیش‌بینی شده و غلظت واقعی متا-نیتروآنیلین در مخلوط سری تست به ترتیب در روش‌های a: CC، b: RD، c: RHPSAM و d: HPSAM





شکل ۳-۳۸: نمایش میزان همبستگی غلظت پیش‌بینی شده و غلظت واقعی پارا-نیتروآنیلین در مخلوط سری تست به ترتیب در روش‌های a: CC, b: RD, c: RHPSAM و d: HPSAM

با توجه به ضریب همبستگی مشاهده شده بین مقادیر پیش‌بینی شده و مقادیر واقعی نشان دهنده میزان نزدیکی غلظت پیش‌بینی به مقدار واقعی آن است و با توجه به نتایج به دست آمده برای روش CC و RD برای مخلوط‌های سری تست بنزن دی‌ال‌ها و ایزومرهای متا و پارا-نیتروآنیلین، این دو روش دارای صحت یکسانی هستند. مقایسه مقادیر همبستگی در روش‌های RHPSAM و HPSAM نشان می‌دهد که روش RHPSAM دارای توانایی بیشتری در پیش‌بینی غلظت مخلوط‌هایی با همپوشانی می‌باشد.

۲۔ بحث و نتیجہ گیری

۱-۴ جمع بندی

هدف اصلی این پروژه انتخاب روشی مناسب برای اندازه‌گیری گونه‌های با همپوشانی شدید طیفی بود که از چهار روش اعمال شده، بهترین روش‌ها RD و CC می‌باشد، زیرا این مراحل کمتری را در پیش بینی غلظت گونه‌ها دارند. علاوه بر مقایسه چهار روش هدف دیگری که پیگیری شد، انتخاب جفت طول موج در هر چهار روش می‌باشد. در روش HPSAM، معیارهایی برای انتخاب جفت طول موج وجود دارد، در این روش باید جفت طول موجی انتخاب شود که سیگنال تجزیه‌ای مربوط به گونه مزاحم در دو طول موج با هم برابر باشند ولی سیگنال تجزیه‌ای مربوط به آنالیت تا حد امکان با هم اختلاف داشته باشند.

در روش RHPSAM هم از نظر تئوری گزارش شده است که هر جفت طول موجی را می‌توان برای اندازه‌گیری به کاربرد. در این پایان نامه جفت طول موج‌های مختلفی به کار برده شد تا صحت این مطلب بررسی گردد. در دو روش CC و RD هم معیاری برای انتخاب طول موج گزارش نشده است. در این پایان نامه جفت طول موج‌های مختلفی انتخاب و مورد بررسی قرار گرفتند:

الف- جفت طول موج‌هایی که در آن‌ها جذب گونه مزاحم یکسان باشد و جذب گونه آنالیت متفاوت باشد.

ب- جفت طول موج‌هایی جذب گونه آنالیت ثابت و جذب گونه مزاحم متفاوت باشد.

با استفاده از پارامتر ΔA که نشان دهنده اختلاف جذب طیف مورد نظر در جفت طول موج‌ها، نشان داده شده است. با توجه به جدول (۱-۴) که پارامتر طول موج بهینه شده برای بنزن دی‌ال‌ها و ایزومرهای نیتروآنیلین در روش CC آورده شده است. برای انتخاب جفت طول موج‌ها، اختلاف جذب گونه مزاحم در دو طول موج کم باشد و همچنین اختلاف جذب آنالیت در این جفت طول موج‌ها بیشتر باشد، آن طول موج در پیش بینی غلظت آنالیت با روش CC موفق تر می‌باشد.

جدول ۱-۴: نتایج حاصل از بهینه سازی طول موج ها در پیش بینی غلظت ایزومرهای بنزن دی ال (کتکول- رزورسینول) ایزومر های پارا و متا نیتروآنیلین در روش CC

جفت طول موج های بهینه شده در روش cc				
پیش بینی غلظت کتکول (۲۲۹/۶-۲۷۵/۰)	پیش بینی غلظت رزورسینول (۲۲۷/۲-۲۷۸/۲)	پیش بینی غلظت متا- نیتروآنیلین (۳۴۱/۰-۴۰۹/۸)	پیش بینی غلظت پارا- نیتروآنیلین (۳۲۰/۰-۳۸۴/۲)	
۰/۰۷۸	۰/۰۰۱	-	-	$\Delta A(\text{CAT-10.0 mg/L})$
۰/۰۰۱	۰/۰۹۲	-	-	$\Delta A(\text{RES-10.0 mg/L})$
۴۵/۰	۵۱/۰	۶۸/۸	۶۴/۲	$\Delta\lambda(\text{nm})$
-	-	۰/۰۰	۰/۳	$\Delta A(\text{para-5.00 mg/L})$
-	-	۰/۰۵	۰/۰۰	$\Delta A(\text{meta-10.0 mg/L})$

برای روش RD با توجه به جدول (۲-۴) که پارامتر طول موج بهینه شده است در تعیین غلظت گونه های برای بنزن دی ال ها و نیتروآنیلین ها آورده شده است. برای پیش بینی غلظت نیتروآنیلین ها معیار روش CC صادق می باشد، ولی برای ایزومرهای کتکول و رزورسینول به معیار خاصی برای انتخاب جفت طول موج ها دست نیافتیم. همچنین برای روش RHPSAM با توجه به جدول (۳-۴) می توان نتیجه گرفت که هر چقدر فاصله بین طول موج ها بیشتر باشد و جذب گونه مزاحم در دو طول موج ثابت باشد آن طول موج با خطای کمتری غلظت را پیش بینی می کند.

جدول ۴-۲: نتایج حاصل از بهینه سازی طول موج ها در پیش بینی غلظت ایزومرهای بنزن دی ال (کتکول - رزورسینول) ایزومر های پارا و متا نیتروآنیلین در روش RD

جفت طول موج های بهینه شده در روش RD				
پیش بینی غلظت متا- نیتروآنیلین (۳۴۱/۰ - ۴۰۹/۸)	پیش بینی غلظت پارا- نیتروآنیلین (۳۲۰/۰ - ۳۸۴/۲)	پیش بینی غلظت رزورسینول (۲۲۷/۲ - ۲۷۸/۲)	پیش بینی غلظت کتکول (۲۲۷/۲ - ۲۷۸/۸)	
-	-	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰۶	$\Delta A(\text{CAT-10.0 mg/L})$
-	-	۰/۰۹۲	۰/۰۸۹	$\Delta A(\text{RES-10.0 mg/L})$
۶۴/۲	۶۸/۸	۵۱/۰	۵۱/۴	$\Delta\lambda(\text{nm})$
۰/۳	۰/۰۰	-	-	$\Delta A(\text{para-5.00 mg/L})$
۰/۰۰	۰/۰۵	-	-	$\Delta A(\text{meta-10.0 mg/L})$

جدول ۴-۳: نتایج حاصل از بهینه سازی طول موج ها در پیش بینی غلظت ایزومرهای بنزن دی ال (کتکول - رزورسینول) ایزومر های پارا و متا نیتروآنیلین در روش RHPSAM

طول موج های بهینه شده در روش RHPSAM		
پیش بینی غلظت پارا و متا- نیتروآنیلین (۳۴۱/۰ - ۴۰۹/۸)	پیش بینی غلظت کتکول و رزورسینول (۲۲۷/۴ - ۲۷۹/۴)	
-	۰/۰۰۵	$\Delta A(\text{CAT-10.0 mg/L})$
-	۰/۰۹۶	$\Delta A(\text{RES-10.0 mg/L})$
۶۸/۸	۵۲/۰	$\Delta\lambda(\text{nm})$
۰/۰۰	-	$\Delta A(\text{para-5.00 mg/L})$
۰/۰۵	-	$\Delta A(\text{meta-10.0 mg/L})$

۲-۴ مقایسه روش‌ها پیشنهادی با برخی از روش‌های موجود

با توجه به این که تعداد روش‌های اسپکتروفتومتری جدید رو به افزایش می‌باشد انتخاب روش مناسب برای گونه‌های با همپوشانی شدید طیفی از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد. روش‌های افزایش استاندارد نقطه اچ (HPSAM)، مرکز ثابت (CC) و افزایش استاندارد نقطه اچ (HPSAM) و روش اختلاف دامنه نسبی (RD) بر طیف‌های ترکیبات انتخاب شده، اعمال شد، و بهترین روش برای اندازه‌گیری همزمان گونه‌های با همپوشانی شدید طیفی، روش CC و RD می‌باشد که دارای دقت و صحت بالاتری نسبت به روش‌های ذکر شده می‌باشد. روش‌های CC و RD (روش‌های اسپکتروفتومتری)، روش‌های ساده و سریع، بدون نیاز به دستگاه و محاسبات پیچیده می‌باشد و همچنین نسبت به روش‌های الکتروشیمی و کروماتوگرافی، زمان و هزینه کمتری نیازمند است.

۳-۴ آینده نگری

می‌توان از روش‌های CC و RD برای تعیین مقدار گونه‌های که همپوشانی شدید طیفی دارند استفاده کرد. اندازه‌گیری همزمان ترکیبات فنول و رزورسینول در مخلوط‌های دو تایی آن‌ها با کمک روش‌های CC و RD تعیین مقدار کرد.

مراجع

- [1] Moustafa, H., & Fayez, Y. (2014). Spectrophotometric methods manipulating ratio spectra for simultaneous determination of binary mixtures with severe overlapping spectra: a comparative study. **Spectrochimica Acta Part A Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, **133**, 759-766.
- [2] Dockery, D. W., Pope, C. A., Xu, X., Spengler, J. D., Ware, J. H., Fay, M. E., & Speizer, F. E. (1993). An association between air pollution and mortality in six US cities. **New England journal of medicine**, **329(24)**, 1753-1759.
- [3] Erogul, S., Bas, S. Z., Ozmen, M., & Yildiz, S. (2015). A new electrochemical sensor based on Fe₃O₄ functionalized graphene oxide-gold nanoparticle composite film for simultaneous determination of catechol and hydroquinone. **Electrochimica Acta**, **186**, 302-313.
- [4] Velmurugan, M., Karikalan, N., Chen, S. M., Cheng, Y. H., & Karuppiah, C. (2017). Electrochemical preparation of activated graphene oxide for the simultaneous determination of hydroquinone and catechol. **Journal of colloid and interface science**, **500**, 54-62.
- [5] Ma, L., & Zhao, G. C. (2012). Simultaneous determination of hydroquinone, catechol and resorcinol at graphene doped carbon ionic liquid electrode. **International Journal of Electrochemistry**, **2012**.
- [6] Penner, N. A., & Nesterenko, P. N. (2000). Simultaneous determination of dihydroxybenzenes, aminophenols and phenylenediamines in hair dyes by high-performance liquid chromatography on hypercross-linked polystyrene. **Analyst**, **125(7)**, 1249-1254.
- [7] Pistonesi, M. F., Di Nezio, M. S., Centurión, M. E., Lista, A. G., Fragoso, W. D., Pontes, M. J. & Band, B. S. F. (2010). Simultaneous determination of hydroquinone, resorcinol, phenol, m-cresol and p-cresol in untreated air samples using spectrofluorimetry and a custom multiple linear regression-successive projection algorithm. **Talanta**, **83(2)**, 320-323.
- [8] Yang, Y. J., & Weikun, L. (2015). Simultaneous determination of catechol, hydroquinone, and resorcinol on CTAB functionalized graphene oxide/multiwalled carbon nanotube modified electrode. Fullerenes, **Nanotubes and Carbon Nanostructures**, **23(5)**, 410-417.
- [9] Mao, H., Liu, M., Cao, Z., Ji, C., Sun, Y., Liu, D. & Song, X. M. (2017). Poly (4-vinylphenylboronic acid) functionalized polypyrrole/graphene oxide nanosheets for simultaneous electrochemical determination of catechol and hydroquinone. **Applied Surface Science**, **420**, 594-605.
- [10] Chamjangali, M. A., Broumand, S., Bagherian, G., Goudarzi, N., & Momeni, A. H. (2018). Application of Allura Red in the construction a novel amperometric flow sensor for the automatic determination of hydroquinone and catechol using a two line flow injection manifold with a single sensor/double pulse amperometric detection. **Measurement Science and Technology**.
- [11] Moghaddam, M. R., Ghasemi, J. B., Norouzi, P., & Salehnia, F. (2019). Simultaneous determination of dihydroxybenzene isomers at nitrogen-doped graphene surface using fast Fourier

transform square wave voltammetry and multivariate calibration. **Microchemical Journal**, **145**, 596-605.

[12] Wang, N., Zheng, T., Jiang, J., & Wang, P. (2015). Cu (II)–Fe (II)–H₂O₂ oxidative removal of 3-nitroaniline in water under microwave irradiation. **Chemical Engineering Journal**, **260**, 386-392.

[13] Yang, B., Cheng, Z., Fan, M., Jia, J., Yuan, T., & Shen, Z. (2018). Supercritical water oxidation of 2-, 3-and 4-nitroaniline: A study on nitrogen transformation mechanism. **Chemosphere**, **205**, 426-432.

[14] Guo, X., Lv, J., Zhang, W., Wang, Q., He, P., & Fang, Y. (2006). Separation and determination of nitroaniline isomers by capillary zone electrophoresis with amperometric detection. **Talanta**, **69(1)**, 121-125.

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

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

[17] Wang, H., Jiang, H., Song, N., Liu, X., & Jia, Q. (2014). Application of cloud point methodology to the determination of nitroanilines in natural water. **Korean Journal of Chemical Engineering**, **31(12)**, 2261-2265.

[18] Lotfy, H. M., Tawakkol, S. M., Fahmy, N. M., & Shehata, M. A. (2015). A comparative study of novel spectrophotometric resolution techniques applied for pharmaceutical mixtures with partially or severely overlapped spectra. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, **136**, 937-952.

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

[20] 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.

[21] Eskandari, H. (2006). H-point standard addition method—First derivative spectrophotometry for simultaneous determination of palladium and cobalt. . **Spectrochimica Acta Part A Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, **63(2)**, 391-397.

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

[۲۳] صالحی، ف. (۱۳۹۴)، پایان نامه ارشد: "تعیین همزمان مقدار کتکول و هیدروکینون و تعیین همزمان مقدار رزورسینول و هیدروکینون در مخلوط هر کدام، با استفاده از روش های اسپکتروفوتومتری جدید"، دانشکده شیمی، دانشگاه صنعتی شاهرود.

[24] Lotfy, H. M. (2012). Determination of simvastatin and ezetimibe in combined tablet dosage

forms by constant center spectrophotometric method. **Int J Pharm Pharm Sci**, **4(4)**, 673-679.

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

[26] Bagherian, G., Arab Chamjangali, M., & Mohammadian, H. (2016). H-point Standard Addition Method (HPSAM) for Simultaneous Spectrophotometric Determination of Cu (II) and Pd (II) by 1-(2-thiazolylazo)-2-naphthol (TAN) in Micellar Media. **Analytical Chemistry Letters**, **6(2)**, 181-192.

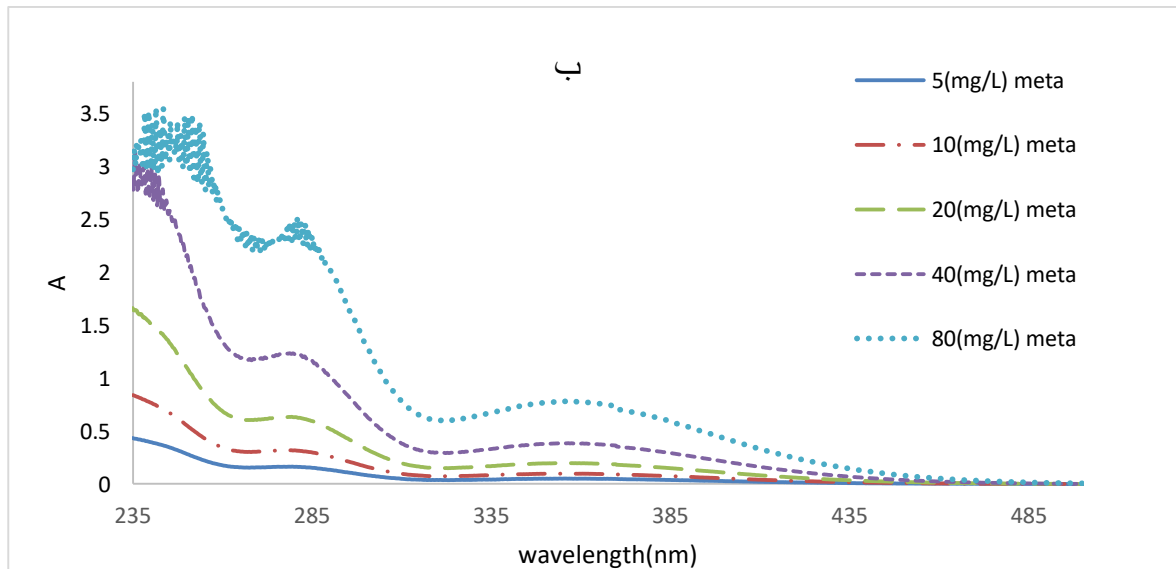
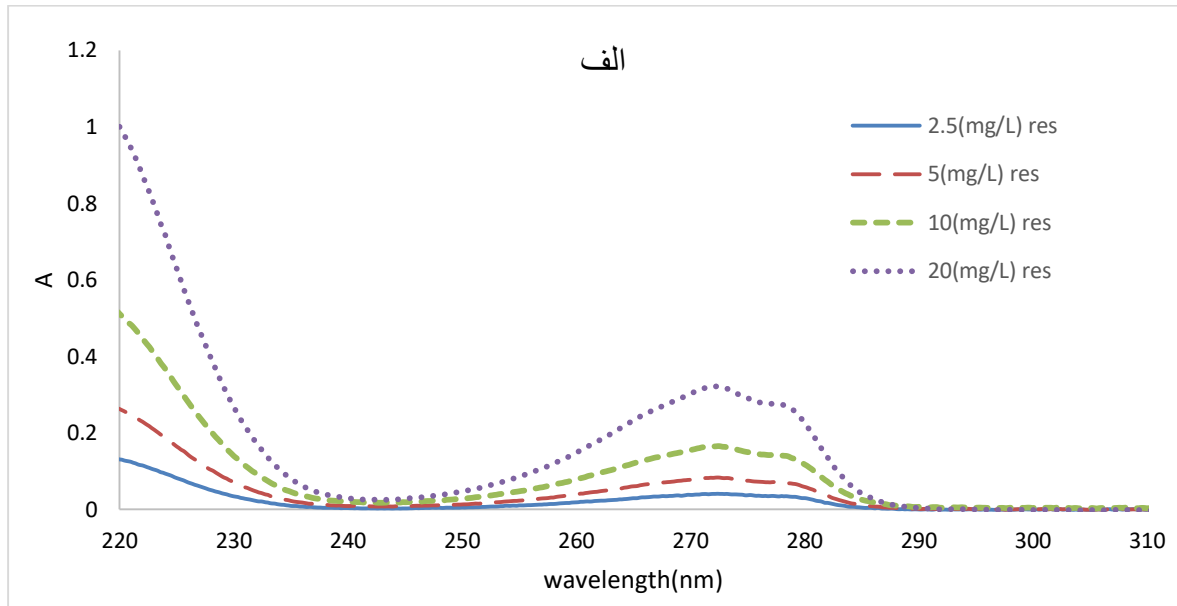
[27]:Reig, F. B., & Falcó, P. C. (1988). H-point standard additions method. **Part 1. Fundamentals and application to analytical spectroscopy. Analyst**, **113(7)**, 1011-1016

[28] Darwish, H. W., Hassan, S A., Salem, M. Y., & El-Zeany, B. A. (2013). Development and validation of H-point standard addition method applied for the analysis of binary mixture of amlodipine and atorvastatin. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, **4(2)**, P230-P243.

[۲۹] برزویی، ه، (۱۳۹۶)، پایان نامه ارشد: "تعیین مقدار همزمان ایزومرهای پونسیو ۴آر و آمارانس در مخلوط‌های دوتایی آنها، با استفاده از روشهای اسپکتروفتومتری جدید"، دانشکده شیمی، دانشگاه صنعتی شاهرود.

[۳۰] صبوری، ع، (۱۳۹۶)، پایان نامه ارشد: "کاربرد روشهای اسپتروفتومتری جدید در تعیین همزمان ایزومرهای نیتروآنیلین در مخلوط های دوتایی"، دانشکده شیمی، دانشگاه صنعتی شاهرود.

پوستا



جدول الف: نتایج حاصل از اندازه گیری غلظت ایزومرهای کتکول و رزورسینول در مخلوط‌های سری ارزیابی به روش های RD، RHP SAM و HPSAM در شرایط بهینه

روش HPSAM		روش RHP SAM		روش RD		روش CC		مخلوط		شماره محلول
RES	CAT	RES	CAT	RES	CAT	RES	CAT	RES	CAT	
۲/۴۴	۲/۶۰	۲/۵۰	۲/۵۳	۲/۲۶	۲/۴۹	۲/۷۲	۲/۶۵	۲/۵۰	۲/۵۰	۱
۲/۸۷	۲/۳۳	۲/۶۱	۲/۵۰	۲/۲۶	۲/۴۰	۲/۸۵	۲/۶۴			
۴/۶۶	۲/۷۸	۴/۹۲	۲/۳۸	۵/۰۵	۲/۵۷	۵/۰۶	۲/۶۰	۵/۰۰	۲/۵۰	۲
۴/۷۷	۲/۷۵	۵/۰۲	۲/۴۰	۴/۸۱	۲/۶۰	۵/۱۸	۲/۵۹			
۹/۷	۲/۹۰	۹/۹	۲/۲۹	۱۰/۱	۲/۴۷	۱۰/۶	۲/۳۴	۱۰/۰	۲/۵۰	۳
۹/۷	۲/۷۸	۱۰/۰	۲/۰۱	۱۰/۲	۲/۴۱	۱۰/۶	۲/۲۱			
۱۴/۵	۳/۲۲	۱۵/۴	۱/۹۶	۱۵/۵	۲/۶۳	۱۶/۰	۲/۰۹	۱۵/۰	۲/۵۰	۴
۱۶/۵	۰/۵۳	۱۵/۱	۱/۶۶	۱۵/۴	۲/۳۱	۱۶/۱	۲/۳۶			
۲/۵۵	۵/۳۱	۲/۵۱	۵/۳۴	۲/۵۹	۵/۰۴	۲/۷	۵/۱۲	۲/۵۰	۵/۰۰	۵
۲/۳۳	۵/۳۵	۲/۴۷	۵/۱۳	۲/۴۷	۵/۰۱	۲/۵۶	۵/۱۳			
۴/۶۶	۵/۶۷	۴/۹۶	۵/۲۶	۴/۷۹	۵/۰۳	۵/۱۵	۵/۲۱	۵/۰۰	۵/۰۰	۶
۵/۱۲	۴/۹۰	۴/۷۵	۵/۲۲	۴/۷۹	۵/۱۵	۴/۹۰	۵/۲۱			
۹/۳	۶/۰۵	۹/۵	۵/۵۵	۹/۸	۵/۰۸	۱۰/۱	۵/۲۳	۱۰/۰	۵/۰۰	۷
۱۰/۶	۴/۴۰	۹/۴	۵/۴۵	۹/۴	۴/۹۹	۱۰/۲	۵/۲۳			
۱۴/۱	۷/۵۱	۱۵/۱	۶/۱۸	۱۵/۱	۵/۲۴	۱۵/۵	۵/۱۱	۱۵/۰	۵/۰۰	۸
۱۶/۰	۴/۲۳	۱۴/۶	۵/۴۲	۱۴/۹	۴/۹۸	۱۵/۶	۵/۲۵			
۲/۴۴	۱۰/۵	۲/۵۵	۱۰/۳	۲/۳۰	۱۰/۳	۲/۴۹	۱۰/۶	۲/۵۰	۱۰/۰	۹
۲/۴۴	۱۰/۵	۲/۶۷	۱۰/۲	۲/۶۶	۱۰/۰	۲/۶۱	۹/۸			
۵/۵	۹/۷	۴/۸۷	۱۰/۳	۵/۰۹	۹/۷	۵/۴۵	۹/۹	۵/۰۰	۱۰/۰	۱۰
۴/۶۶	۱۰/۸	۵/۰	۱۰/۳	۴/۵۱	۱۰/۱	۵/۰۷	۱۰/۷			
۹/۲	۱۰/۶	۹/۰	۱۰/۸	۹/۲۶۳	۱۰/۲	۹/۸۶	۱۰/۶	۱۰/۰	۱۰/۰	۱۱
۹/۱	۱۱/۵	۹/۳	۱۱/۰	۹/۵	۱۰/۵	۹/۷	۱۰/۶			
۱۶/۰	۹/۵	۱۴/۹	۱۰/۶	۱۴/۶	۱۰/۱	۱۵/۵	۱۰/۳	۱۵/۰	۱۰/۰	۱۲
۱۶/۰	۱۰/۴	۱۴/۹	۱۱/۱	۱۴/۶	۱۰/۱	۱۵/۵	۱۰/۶			
۲/۸۷	۱۵/۳	۲/۹۶	۱۵/۰	۲/۲۶	۱۵/۱	۲/۲۹	۱۵/۷	۲/۵۰	۱۵/۰	۱۳
۳/۲۵	۱۵/۱	۳/۰۵	۱۵/۲	۲/۳۷	۱۴/۹	۲/۶۷	۱۵/۷			
۵/۵۰	۱۵/۵	۵/۷۴	۱۴/۹	۵/۰۴	۱۵/۱	۵/۱۱	۱۵/۴	۵/۰۰	۱۵/۰	۱۴
۶/۰	۱۵/۲	۵/۹۲	۱۵/۲	۴/۸۱	۱۴/۹	۵/۵۵	۱۵/۱			

روش HPSAM		روش RHPSAM		روش RD		روش CC		مخلوط		شماره
RES	CAT	RES	CAT	RES	CAT	RES	CAT	RES	CAT	محلول
۱۰/۵	۱۵/۶	۱۰/۸	۱۴/۹	۱۰/۰۳	۱۵/۳	۹/۹	۱۴/۵	۱۰/۰	۱۵/۰	۱۵
۱۲/۴	۱۴/۴	۱۱/۲	۱۵/۳	۹/۷۹	۱۵/۱	۱۰/۴	۱۵/۱			
۱۵/۶۲	۱۶/۷۷	۱۷/۵	۱۴/۴	۱۴/۷	۱۵/۵	۱۵/۱	۱۴/۹	۱۵/۰	۱۵/۰	۱۶
۱۸/۰	۱۵/۲	۱۷/۲	۱۵/۳	۱۴/۹	۱۵/۴	۱۵/۲	۱۵/۰			
۳/۰۰	۲۰/۸	۲/۷۳	۲۰/۶	۲/۵۶	۲۰/۴	۲/۴۶	۲۰/۰	۲/۵۰	۲۰/۰	۱۷
۲/۸۸	۲۰/۸	۲/۶۴	۲/۱۰	۲/۳۲	۲۰/۴	۲/۷۱	۲۰/۸			
۵/۷۵	۲۰/۶	۵/۲۴	۲۰/۶	۴/۷۶	۲۰/۲	۵/۱۷	۲۰/۲	۵/۰۰	۲۰/۰	۱۸
۵/۲۲	۲/۱۰	۵/۰۱	۲/۱۰	۵/۱۱	۲۰/۲	۵/۲۹	۲۰/۵			
۹/۹	۲/۱۷	۱۰/۴	۲۰/۸	۱۰/۲	۲۰/۴	۱۰/۵	۱۹/۸	۱۰/۰	۲۰/۰	۱۹
۱۱/۲	۲۰/۷۲	۱۰/۰	۲/۱۵	۱۰/۴	۲۰/۳	۱۰/۶	۱۹/۶			
۱۹/۰	۱۹/۲	۱۵/۰	۲۲/۸	۱۵/۷	۲۰/۴	۱۵/۹	۱۹/۶	۱۵/۰	۲۰/۰	۲۰
۱۶/۵	۲/۱۷	۱۵/۱	۲۳/۱	۱۵/۷	۲۰/۳	۱۶/۱	۱۹/۰			
۱۹/۰	۳/۴۷	۱۹/۱	۳/۳۹	۱۹/۸	۲/۸۵	۲۰/۹	۲/۷۶	۲۰/۰	۲/۵۰	۲۱
۲/۱۳	۰/۴۴	۱۸/۲	۳/۶۰	۲۰/۰	۲/۸۸	۲۰/۸	۲/۸۳			
۲/۱۴	۴/۳۰	۱۹/۵	۵/۸۴	۱۹/۹	۵/۴۶	۲۰/۸	۵/۹۱	۲۰/۰	۵/۰۰	۲۲
۲/۱۵	۴/۶۱	۲۰/۳	۵/۴۶	۲۰/۱	۵/۷۷	۲۰/۹	۵/۵۶			
۱۸/۴	۱۰/۷	۱۸/۹	۱/۱۳	۱۹/۲	۱/۱۱	۲۰/۲	۱/۱۰	۲۰/۰	۱۰/۰	۲۳
۲۳/۹	۸/۰	۲/۱۸	۹/۴	۱۹/۸	۱/۱۳	۲۰/۳	۱/۱۰			
۲۳/۸	۱۳/۱	۲/۱۴	۱۵/۰	۱۹/۳	۱۶/۳	۲۰/۲	۱۶/۱	۲۰/۰	۱۵/۰	۲۴
۱۸/۲	۱۸/۷	۲۰/۶	۱۵/۸	۱۹/۵	۱۶/۸	۱۹/۸	۱۶/۲			
۲۰/۰	۲۰/۶	۱۷/۳	۲۳/۱	۱۸/۹	۲/۱۴	۱۹/۳	۲۰/۴	۲۰/۰	۲۰/۰	۲۵
۱۸/۰	۲۲/۱	۱۶/۷	۲۳/۳	۱۸/۸	۲/۱۳	۱۹/۵	۲/۱۰			
۱/۸۹	۱/۲۸	۰/۹۴	۱/۱۴	۰/۱۶	۰/۳۰	۰/۲۵	۰/۲۷	MSE		
۰/۰۹	۰/۱۳	۰/۰۶	۰/۰۹	۰/۰۴	۰/۰۴	۰/۰۴	۰/۰۵	MRE		
۰/۲۲		۰/۱۵		۰/۰۸		۰/۰۹		MRE _{CAT} +MRE _{RES}		

۱- اعداد گزارش شده در جدول، غلظت بر حسب میلی گرم بر لیتر می باشد.

جدول ب نتایج حاصل از اندازه گیری غلظت ایزومرهای متا و پارا-نیتروآنیلین در مخلوط‌های سری ارزیابی به روش‌های

HPSAM و RHPSAM.RD.CC در شرایط بهینه

روش HPSAM		روش RHPSAM		روش RD		روش CC		مخلوط		شماره محلول
Para	Meta	Para	Meta	Para	Meta	Para	Meta	Para	Meta	
۱/۰۰	۵/۵۰	۱/۰۰	۵/۳	۰/۸۱	۴/۸۸	۰/۹۶	۵/۴۹	۱/۰۰	۵/۰۰	۱
۱/۰۵	۵/۵۰	۱/۰۱	۵/۷۶	۰/۹۲	۴/۸۸	۱/۰۱	۵/۷۱			
۱/۰۰	۱۱/۰	۱/۰۲	۱۰/۱	۰/۹۲	۹/۷	۱/۰۲	۱۰/۳	۱/۰۰	۱۰/۰	۲
۱/۰۴	۱۱/۰	۱/۰۰	۱۰/۹	۰/۹۶	۹/۷	۱/۰۵	۱۰/۷			
۱/۰۶	۴۳/۰	۰/۹۵	۴۱/۳	۰/۹۳	۴۰/۴	۱/۰۴	۴۱/۹	۱/۰۰	۴۰/۰	۳
۱/۱۲	۴۳/۰	۰/۹۷	۴۳/۱	۰/۹۰	۴۰/۳	۱/۰۰	۴۲/۸			
۱/۱۳	۶۳/۵	۰/۸۵	۶۰/۵	۰/۹۱	۵۹/۴	۱/۰۳	۶۲/۳	۱/۰۰	۶۰/۰	۴
۱/۲۶	۶۲/۶	۱/۱۳	۶/۲۱	۰/۹۵	۵۸/۹	۱/۰۶	۶۲/۵			
۲/۶۳	۳/۵۰	۲/۵۷	۴/۰۰	۲/۴۶	۴/۲۷	۲/۵۵	۵/۵۳	۲/۵۰	۵/۰۰	۵
۲/۶۶	۳/۵۰	۲/۵۸	۴/۱۶	۲/۴۷	۳/۸۳	۲/۵۷	۵/۳۱			
۲/۶۴	۹/۰	۲/۶۰	۸/۷	۲/۴۳	۹/۱	۲/۵۳	۱۰/۷	۲/۵۰	۱۰/۰	۶
۲/۷۰	۸/۵۰	۲/۵۹	۱۰/۸	۲/۴۳	۹/۳	۲/۵۳	۱۰/۵			
۲/۷۳	۴۱/۰	۲/۷۳	۳۷/۲	۲/۳۹	۴۰/۱	۲/۵۴	۴۱/۵	۲/۵۰	۴۰/۰	۷
۲/۸۰	۴۰/۲۵	۲/۷۳	۳۸/۴	۲/۳۳	۴۰/۵	۲/۴۹	۴۲/۶			
۲/۷۹	۶۳/۰	۲/۹۱	۵۷/۹	۲/۳۲	۶۲/۴	۲/۵۲	۶۳/۷	۲/۵۰	۶۰/۰	۸
۲/۹۳	۶۱/۰	۳/۰	۵۸/۰	۲/۲۹	۶۰/۶	۲/۴۸	۶۲/۹			
۵/۳۹	۳/۷۵	۵/۲۶	۴/۶۷	۵/۲۸	۴/۵۹	۵/۳۳	۵/۰۹	۵/۰۰	۵/۰۰	۹
۵/۳۷	۳/۷۵	۵/۲۸	۴/۶۴	۵/۲۵	۴/۳۶	۵/۳۰	۴/۶۵			
۵/۴۴	۹/۳	۵/۳	۹/۵	۵/۲۱	۹/۹	۵/۲۶	۱۰/۳	۵/۰۰	۱۰/۰	۱۰
۵/۴۲	۹/۲	۵/۳	۹/۵	۵/۳۰	۹/۷	۵/۳۵	۱۰/۲			
۵/۳۸	۴۰/۳	۵/۲۵	۳۹/۳	۵/۱۸	۳۶/۱	۵/۲۷	۳۸/۷	۵/۰۰	۴۰/۰	۱۱
۵/۳۲	۴۱/۳	۵/۳۵	۳۸/۵	۵/۲۱	۳۷/۴	۵/۳۰	۳۹/۱			
۵/۴۶	۶۲/۰	۵/۰۰	۶۵/۹	۵/۰۷	۵۷/۵	۵/۱۷	۶۰/۵	۵/۰۰	۶۰/۰	۱۲
۵/۳۹	۶۳/۵	۵/۷۲	۵۷/۷	۵/۰۵	۵۹/۰	۵/۱۵	۵۹/۲			
۱۰/۲	۳/۵۰	۹/۹	۵/۱۱	۱۰/۰	۵/۱۰	۹/۹	۴/۸۲	۱۰/۰	۵/۰۰	۱۳
۱۰/۲	۳/۲۵	۱۰/۰	۴/۶۰	۱۰/۲	۵/۷۹	۱۰/۰	۴/۱۹			
۱۰/۲	۸/۸	۹/۹	۱۰/۱	۱۰/۱	۱۰/۶	۱۰/۰	۹/۹۷	۱۰/۰	۱۰/۰	۱۴
۱۰/۱	۸/۵	۹/۹۰	۹/۸	۱۰/۰	۱۰/۶	۹/۹	۹/۷۳			
۱۰/۷	۳۱/۸	۱۰/۳	۳۶/۵	۹/۷	۳۷/۰	۹/۸	۳۸/۳	۱۰/۰	۴۰/۰	۱۵
۹/۹	۴۳/۵	۱۰/۴	۳۶/۴	۹/۶	۳۵/۹	۹/۷	۳۷/۶			

روش HPSAM		روش RHPSAM		روش RD		روش CC		مخلوط		شماره
Para	Meta	Para	Meta	Para	Meta	Para	Meta	Para	Meta	محلول
۱۰/۸	۵۰/۶	۱۰/۶	۵۱/۳	۹/۴	۵۶/۷	۹/۵	۵۷/۵	۱۰/۰	۶۰/۰	۱۶
۱۰/۸	۶۶/۲	۱۰/۸	۵۵/۵	۹/۳	۶۰/۰	۹/۴۲	۵۸/۱			
۰/۱۲	۹/۳	۰/۱	۶/۴۰	۰/۰۵	۲/۴۶	۰/۰۴	۲/۵۰	MSE		
۰/۰۷	۰/۱۲	۰/۰۶	۰/۰۷	۰/۰۵	۰/۰۷	۰/۰۳	۰/۰۵	MRE		
۰/۱۹		۰/۱۳		۰/۱۲		۰/۰۸		MRE _{Meta} +MRE _{Para}		

۱- اعداد گزارش شده در جدول بر حسب میلی گرم بر لیتر می باشد.

Abstract

In this thesis, four new spectrophotometric methods including the constant center (CC) method, ratio difference (RD) method, ratio H-point standard addition method (RHPSAM), and H-point standard addition method (HPSAM) were studied. The aim was to select the best method for determining the species with a severe spectral overlapping. In this work, two pairs of species with severe spectral overlapping were studied separately; catechol (CAT) and resorcinol (RES) were studied in one mixture and the para- and meta-nitroaniline isomers were studied in another one; their determination required separation. It was not possible to determine a species in a binary mixture by the simple spectrophotometric methods, and their separation was required. A comparative study of the results obtained showed that out of the four methods studied, the CC and RD methods had the least error in determining the concentration of the species with a high spectral overlapping. For both the CC and RD methods, the linear dynamic range for both CAT and RES was 2.5-20.0 mg/L; the detection limit for CAT was 0.582 and 0.292 mg/L, respectively, and for RES, it was 0.89 and 0.355 mg/L, respectively. For both the CC and RD methods, the linear dynamic range for meta-nitroaniline was obtained to be 5.00-60.0 mg/L; for para-nitroaniline, it was 1.00-10.0 mg/L. For the CC and RD methods, the detection limit for meta-nitroaniline was obtained to be 0.475 mg/L and 0.498 mg/L, respectively, and for para-nitroaniline, it was 0.047 mg/L and 0.048 mg/L, respectively.

Keywords: Constant center, ratio difference, ratio H-point standard addition method, H-point standard addition method.



Shahrood University of Technology

Faculty of Chemistry

**A comparative study of novel spectrophotometric methods for
simultaneous determination of species in their binary mixtures with
severely overlapping spectra**

Fatemeh Mosayebi

Supervisor:

Dr. Gh. Bagherian Dehaghi

Advisor:

Prof. M. Arab Chamjangali

September 2019