

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشکده شیمی

گروه شیمی تجزیه

پایان نامه کارشناسی ارشد

تعیین همزمان داروهای ونلافاکسین و سیتالوپرام و تعیین همزمان رنگ‌های

متیل ویولت و تولوئیدین‌بلو در مخلوط دوتایی هر یک به روش‌های جدید اسپکتروفتومتری

زهرا زاهدنیا

استاد راهنما:

دکتر قدمعلی باقریان‌دهقی

استاد مشاور:

دکتر ناصر گودرزی

بهمن ۱۳۹۴

تقدیم بہ

پدر و مادر عزیزم

و

خانوادہ مہربانم

شکر و قدردانی

پاس بی کران پروردگار یکتا را که هستی مان بخشید و به طریق علم و دانش رهنمونان شد و به بهنیشینی رحوان علم و دانش مفتخرمان نمود و خوشه چینی از علم و معرفت را در میان ساخت.

بد پر ز کوار و ماد مهربانم، آن دو فرشته ای که از خواسته هایمان گذشتند، سختی بار به جان خریدند و خود را سپر بلای مشکلات و ناملایمات کردند تا من به جایگاهی که اکنون در آن ایستاده ام برسم. ای پدر از تو هر چه می گویم باز هم کم می آورم خورشیدی شدی و از روشنائی است جان گرفتم و در ناامیدی تیریک می گویم که تو را دارم و دنیا بجه بزرگیش مثل تو را ندارد.

و تو ای مادر، ای شوق زیبایی نفس کشیدن ای روح مهربان، هستی ام تو رنگ شادی بایم شادی و محطه های ناخوشی را با تمام وجود از من دور کردی و عمری محنتی بار به جان خریدی تا اکنون توانستی طعم خوش پیروزی را به من بچشانی.

از استاد با کالات و شیانه؛ جناب آقای دکتر قدس علی باقریان و مینی که در کمال سعه صدر، با حسن خلق و فروتنی، از پیچ کجی در این عرصه بر من دریغ ننمودند و زحمت راهنمایی این رساله را بر عهده گرفتند؛ از استاد گرامی، جناب آقای دکتر ناصر کوردی کمال شکر و قدردانی را دارم که زحمت مشاوره این رساله را بر عهده داشتند و از اساتید فرزانه و دلسوز؛ جناب آقایان دکتر منصور عرب چم چغنی و خانم دکتر مصدرا الامور که زحمت داوری این رساله را متقبل شدند؛ کمال شکر و قدردانی را دارم. از تمام اساتیدی که در دوران تحصیل به نحوی افتخار نگارگری در محضرشان را داشتم کمال شکر را دارم، باشد که این خردترین، بخشی از زحمات آنان را پاس گوید.

از دوستان عزیزم خانم هارحینی، احمدی و دیگر دوستان عزیزم به دلیل حمایت های بی نظیری که از من کردند، لازم می بینم که از تک تک شاعران که خواهران و دوستان از من پشتیبانی کردید شکر کنم و دست یاران را به گرمی بفشارم. واقعا که دوستی را در حق من تمام کردید و بقدری نسبت به من لطف داشتید که جبران مهربانی های شما از بضاعتم من خارج است و برای همه این عزیزان آرزوی سلامتی و سعادت می نمایم.

تعهد نامه

- اینجانب زهرا زاهدنیا دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته شیمی تجزیه دانشکده شیمی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه تعیین همزمان داروهای ونلافاکسین و سیتالوپرام و تعیین همزمان رنگ های متیل و بولت و تولوئیدین بلو در مخلوط دوتایی هر یک به روش های جدید اسپکتروفتومتری تحت راهنمایی دکتر قدمعلی باقریان دهقی متعهد می شوم :
 - تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است .
 - در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است .
 - مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است .
 - کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « Shahrood University of Technology » به چاپ خواهد رسید .
 - حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
 - در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است .
 - در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است .
- تاریخ
- امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

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

چکیده کار اول

در این پایان نامه روش های اسپکتروفتومتری جدید، ساده و دقیق برای تعیین همزمان رنگ های متیل ویولت و تولوئیدین بلو ارائه شده است. روش پیشنهادی، شامل روش توسعه یافته ی تفاضل طیف نسبی (EXRSM) و روش اندازه گیری همزمان با کم کردن مقدار ثابت از طیف نسبی (SRSM) بود که با روش میانگین گیری مرکزی (MCM) مقایسه شد. همه فاکتورهای موثر بر حساسیت روش ها مورد بررسی و بهینه سازی قرار گرفتند. دامنه خطی متیل ویولت و تولوئیدین بلو در روش های جدید اسپکتروفتومتری EXRSM و SRSM به ترتیب $1/00-10/00$ و $1/00-15/00$ میکروگرم بر میلی لیتر و برای روش MCM به ترتیب $1/00-10/00$ و $3/00-15/00$ میکروگرم بر میلی لیتر می باشد. در روش های EXRSM، SRSM و MCM حد تشخیص برای متیل ویولت به ترتیب $0/0100$ ، $0/0240$ و $0/0560$ میکروگرم بر میلی لیتر و برای تولوئیدین بلو به ترتیب $0/0320$ ، $0/0300$ و $0/0281$ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد. همچنین اثر مزاحمت گونه های مختلف بر گزینش پذیری روش ها بررسی شد. روش های پیشنهادی برای اندازه گیری همزمان متیل ویولت و تولوئیدین بلو در نمونه های آب شهر شاهرود (ایران) به طور رضایت بخش بکار گرفته شد. نتایج بدست آمده نشان داد که روش های پیشنهادی دارای دقت و صحت خوبی برای اندازه گیری همزمان این رنگ ها در نمونه حقیقی می باشند.

چکیده کار دوم

در این پایان نامه روش های اسپکتروفتومتری جدید، ساده و دقیق برای تعیین همزمان داروهای ونلافاکسین و سیتالوپرام ارائه شده است. روش پیشنهادی، شامل روش توسعه یافته ی تفاضل طیف نسبی (EXRSM) و روش اندازه گیری همزمان با کم کردن مقدار ثابت از طیف نسبی (SRSM) بود که با روش میانگین گیری مرکزی (MCM) مقایسه شد. دامنه خطی ونلافاکسین و سیتالوپرام در روش های جدید اسپکتروفتومتری (EXRSM و SRSM) به ترتیب $1/60-20/00$ و $1/00-16/00$ میکروگرم بر میلی لیتر و برای روش MCM به ترتیب $2/00-20/00$ و $3/00-16/00$ می باشد. حد تشخیص در روش های EXRSM، SRSM و MCM برای ونلافاکسین به ترتیب $0/0171$ ، $0/1399$ و $0/0437$ میکروگرم بر میلی لیتر و برای سیتالوپرام به ترتیب $0/0101$ ، $0/0101$ و $0/0428$ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد. اثر مزاحمت مواد مختلف بر حساسیت روش ها مورد بررسی قرار گرفت. روش های پیشنهادی برای اندازه گیری همزمان ونلافاکسین و سیتالوپرام در نمونه های قرص آن ها به طور رضایت بخش به کار برده شد.

لغات کلیدی: متیل ویولت، تولوئیدین بلو، ونلافاکسین و سیتالوپرام، توسعه یافته ی تفاضل طیف نسبی گسترده، اندازه گیری همزمان با کم کردن مقدار ثابت از طیف نسبی، میانگین گیری مرکزی.

لیست مقالات مستخرج از این پایان نامه که در همایش ها ارائه شده است:

❖ هجدهمین کنگره شیمی ایران، دانشگاه سمنان، شهریور ماه ۱۳۹۴

Bagherian. Gh, Goudarzi. N, Zahednia. Z*," Application of novel spectrophotometric methods for simultaneous determination of citalopram and venlafaxine"

❖ پنجمین سمینار دوسالانه کمومتریکس ایران، دانشگاه تهران، آذرماه ۱۳۹۴

Bagherian. Gh, Goudarzi. N, Zahednia. Z*, "Simultaneous determination of Toluidine Blue and Methyl violet in their binary mixture by novel spectrophotometric methods"

فهرست مطالب

۱- فصل اول	۱
۱-۱- آلاینده های رنگی	۲
۱-۱-۱- متیل ویولت	۳
۱-۱-۲- تولوئیدین بلو	۳
۱-۱-۳- مروری بر کارهای انجام شده بر روی رنگ های متیل ویولت و تولوئیدین بلو	۴
۱-۲- داروهای ضد افسردگی	۵
۱-۲-۱- ونلافاکسین	۶
۱-۲-۲- سیتالوپرام	۷
۱-۲-۳- مروری بر کارهای انجام شده بر روی سیتالوپرام و ونلافاکسین	۸
۲- فصل دوم	۱۱
۲-۱- مقدمه ای بر اسپکتروفتومتری	۱۲
۲-۲- کالیبراسیون	۱۳
۲-۳- کالیبراسیون یک متغیره	۱۳
۲-۴- کالیبراسیون چند متغیره	۱۴
۲-۴-۱- روش توسعه یافته ی تفاضل طیف نسبی (EXRSM)	۱۵
۲-۴-۲- روش اندازه گیری همزمان با کم کردن مقدار ثابت از طیف نسبی (SRSM)	۱۷

۱۸	۲-۴-۳- روش میانگین گیری مرکزی از طیف نسبی (MCR)
۱۹	۲-۵- ارزیابی مدل
۲۳	۳- فصل سوم
۲۴	۳-۱- اندازه گیری همزمان متیل ویولت و تولوئیدین بلو با روشهای جدید اسپکتروفتومتری
۲۴	۳-۱-۱- مواد شیمیایی مورد استفاده
۲۴	۳-۱-۲- محلول های استفاده شده و طرز تهیه آنها
۲۵	۳-۱-۳- دستگاه ها و وسایل مورد استفاده
۲۶	۳-۱-۴- ثبت طیف جذبی
۲۹	۳-۱-۵- بررسی و بهینه سازی پارامترهای موثر بر سیستم
۲۹	۳-۱-۵-۱- بررسی اثر pH
۳۱	۳-۱-۵-۲- بررسی اثر نوع بافر
۳۲	۳-۱-۵-۳- بررسی اثر حجم بافر
۳۳	۳-۱-۵-۴- بررسی اثر قدرت یونی
۳۴	۳-۱-۶- شرایط بهینه
۳۵	۳-۱-۷- رسم منحنی کالیبراسیون
۳۷	۳-۱-۸- محلول سازی سری ارزیابی و تست
	۳-۱-۹- تعیین همزمان رنگهای متیل ویولت و تولوئیدین بلو در مخلوط دوتایی هر یک، به
۳۹	روش EXRSM
	۳-۱-۱۰- تعیین همزمان رنگ های متیل ویولت و تولوئیدین بلو در مخلوط دوتایی هر یک، به
۴۹	روش SRS
	۳-۱-۱۱- تعیین همزمان رنگ های متیل ویولت و تولوئیدین بلو در مخلوط دوتایی هر یک، به

روش MCM.....	۵۴
۳-۱-۱۲- بررسی اثر مزاحمت ها.....	۶۱
۳-۱-۱۳- حد تشخیص روش ها.....	۶۳
۳-۱-۱۴- دقت و صحت روش ها.....	۶۴
۳-۱-۱۵- کاربرد روش ها در آنالیز نمونه حقیقی.....	۶۴
۳-۲- اندازه گیری همزمان سیتالوپرام و ونلافاکسین با روش های جدید اسپکتروفتومتری....	۶۶
۳-۲-۱- مواد شیمیایی مورد استفاده.....	۶۶
۳-۲-۲- محلول های استفاده شده و طرز تهیه آنها.....	۶۶
۳-۲-۳- ثبت طیف جذبی.....	۶۷
4-2-3- بررسی و بهینه سازی پارامترهای موثر بر سیستم.....	۷۰
۳-۲-۴-۱- بررسی اثر pH.....	۷۱
۳-۲-۴-۲- بررسی اثر نوع بافر.....	۷۲
۳-۲-۴-۳- بررسی اثر حجم بافر.....	۷۳
۳-۲-۴-۴- بررسی اثر قدرت یونی.....	۷۴
۳-۲-۵- شرایط بهینه.....	۷۶
۳-۲-۶- رسم منحنی کالیبراسیون سیتالوپرام و ونلافاکسین به صورت جداگانه.....	۷۶
7-2-3- رسم منحنی کالیبراسیون سیتالوپرام و ونلافاکسین در حضور یکدیگر.....	۷۸
۳-۲-۸- محلول سازی سریهای تست و ارزیابی.....	۸۱
۳-۲-۹- تعیین همزمان سیتالوپرام و ونلافاکسین در مخلوط دوتایی هر یک به روش EXRSM	
.....	۸۲
۳-۲-۱۰- تعیین همزمان سیتالوپرام و ونلافاکسین در مخلوط دوتایی هر یک به روش SRSM	

۸۹	
۱۱-۲-۳	تعیین همزمان سیتالوپرام و ونلافاکسین در مخلوط دوتایی هر یک به روش MCM
۹۳	
۱۲-۲-۳	بررسی اثر مزاحمتها
۱۰۰	 حد تشخیص روشها
۱۰۱	 دقت و صحت روشها
۱۰۲	 کاربرد روش ها در آنالیز نمونه حقیقی
۱۰۵	 فصل چهارم
۱-۴	بهینه سازی متغیرهای تجربی در تعیین همزمان متیل ویولت و تولوئیدین بلو در مخلوط
۱۰۶	 دوتایی
۱۰۷	 ۱-۱-۴ کالیبراسیون
۱۰۷	 ۲-۱-۴ ارزیابی آماری روش ها
۱۰۹	 ۳-۱-۴ گزینش پذیری روش ها
۱۰۹	 ۴-۱-۴ کاربرد روش ها
۲-۴	بهینه سازی متغیرهای تجربی در تعیین همزمان سیتالوپرام و ونلافاکسین در مخلوط
۱۱۰	 دوتایی
۱۱۱	 ۱-۲-۴ کالیبراسیون
۱۱۱	 ۲-۲-۴ ارزیابی آماری روش ها
۱۱۴	 ۳-۲-۴ گزینش پذیری روش ها
۱۱۴	 ۴-۲-۴ کاربرد روش ها
۱۱۴	 ۵-۲-۴ مقایسه ی روش های پیشنهادی با برخی روش های موجود

فهرست جداول

جدول ۱-۳: مواد شیمیایی مورد استفاده	۲۴
جدول ۲-۳: نتایج حاصل از بررسی اثر pH با استفاده از بافر فسفاتی	۳۰
جدول ۳-۳: بررسی اثر نوع بافر بر جذب	۳۱
جدول ۴-۳: نتایج حاصل از بررسی حجم بافر	۳۳
جدول ۵-۳: نتایج حاصل از بررسی قدرت یونی	۳۴
جدول ۶-۳: تغییرات جذب بر حسب غلظت متیل ویولت و تولوئیدین بلو	۳۶
جدول ۷-۳: نتایج حاصل از کالیبراسیون به صورت جداگانه	۳۷
جدول ۸-۳: مخلوط های سری ارزیابی	۳۸
جدول ۹-۳: مخلوط های سری تست	۳۹
جدول ۱۰-۳: نتایج بهینه سازی غلظت تولوئیدین بلو به عنوان مقسوم علیه در سری ارزیابی به روش EXRSM	۴۲
جدول ۱۱-۳: نتایج بهینه سازی غلظت متیل ویولت به عنوان مقسوم علیه در سری ارزیابی	۴۶
جدول ۱۲-۳: نتایج غلظت های پیش بینی شده با روش EXRSM، در مخلوط های سری تست	۴۹
جدول ۱۳-۳: نتایج بهینه سازی غلظت تولوئیدین بلو به عنوان مقسوم علیه در سری ارزیابی با استفاده از روش SRSM	۵۲
جدول ۱۴-۳: نتایج غلظتهای پیش بینی شده با روش SRSM، در مخلوط های سری تست	۵۴
جدول ۱۵-۳: نتایج بهینه سازی محدوده میانگین گیری برای تولوئیدین بلو در سری کالیبراسیون و ارزیابی	۵۷

جدول ۳-۱۶: نتایج بهینه سازی محدوده میانگین گیری برای متیل ویولت در سری	۵۹
کالبراسیون و ارزیابی	
جدول ۳-۱۷: نتایج غلظت های پیش بینی شده با روش MCM، در مخلوط سری	۶۰
ارزیابی	
جدول ۳-۱۸: نتایج غلظت های پیش بینی شده با روش MCM، در مخلوط سری	۶۱
تست	
جدول ۳-۱۹: نتایج حاصل از بررسی اثر گونه های مزاحم در اندازه گیری محلول	
های متیل ویولت و تولوئیدین بلو به ترتیب با غلظتهای ۲/۵۰ و ۵/۰۰ میکروگرم بر میلی	
لیتر با استفاده از روشهای EXRSM، SRSM و MCM	۶۲
جدول ۳-۲۰: نتایج حاصل از بررسی حد تشخیص روش های EXRSM، SRSM و	
MCM در اندازه گیری همزمان محلول های متیل ویولت و تولوئیدین بلو	۶۳
جدول ۳-۲۱: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روشهای EXRSM، SRSM و	
MCM در اندازه گیری همزمان محلول های متیل ویولت و تولوئیدین بلو	۶۴
جدول ۳-۲۲: نتایج حاصل از اندازه گیری غلظت متیل ویولت و تولوئیدین بلو در	
نمونه های آب شهر با استفاده از هر یک از روش های EXRSM، SRSM و MCM	۶۵
جدول ۳-۲۳: مواد شیمیایی مورد استفاده	۶۶
جدول ۳-۲۴: نتایج حاصل از بررسی اثر pH	۷۲
جدول ۳-۲۵: نتایج حاصل از بررسی اثر حجم بافر	۷۴
جدول ۳-۲۶: نتایج حاصل از بررسی اثر قدرت یونی	۷۵
جدول ۳-۲۷: تغییرات میزان جذب بر حسب غلظت ونلافاکسین و سیتالوپرام	۷۷
جدول ۳-۲۸: نتایج حاصل از منحنی کالبراسیون ونلافاکسین و سیتالوپرام	۷۸
جدول ۳-۲۹: تغییرات میزان جذب بر حسب غلظت ونلافاکسین و سیتالوپرام در	
حضور یکدیگر	۸۰
جدول ۳-۳۰: نتایج حاصل از بررسی دامنه خطی سیتالوپرام در حضور ۴۰/۰۰	

میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین	۸۱
جدول ۳-۳۱: نتایج حاصل از بررسی دامنه خطی ونلافاکسین در حضور ۵۰/۰۰	
میکروگرم بر میلی لیتر سیتالوپرام	۸۱
جدول ۳-۳۲: مخلوط های ونلافاکسین و سیتالوپرام در سری ارزیابی	۸۲
جدول ۳-۳۳: مخلوط های ونلافاکسین و سیتالوپرام در سری تست	۸۲
جدول ۳-۳۴: نتایج بهینه سازی غلظت سیتالوپرام به عنوان مقسوم علیه در سری	
ارزیابی به روش EXRSM	۸۵
جدول ۳-۳۵: نتایج پیش بینی غلظت ونلافاکسین در سری ارزیابی به روش	
EXRSM	۸۵
جدول ۳-۳۶: نتایج بهینه سازی غلظت ونلافاکسین به عنوان مقسوم علیه در سری	
ارزیابی.	۸۸
جدول ۳-۳۷: نتایج پیش بینی غلظت سیتالوپرام در سری ارزیابی به روش	
EXRSM	۸۸
جدول ۳-۳۸: نتایج غلظتهای پیش بینی شده در مخلوط های سری تست، با روش	
EXRSM	۸۹
جدول ۳-۳۹: نتایج بهینه سازی غلظت سیتالوپرام به عنوان مقسوم علیه در سری	
ارزیابی با استفاده از روش SRSM	۹۱
جدول ۳-۴۰: نتایج پیش بینی غلظت ونلافاکسین و سیتالوپرام در سری ارزیابی با	
استفاده از روش SRSM	۹۲
جدول ۳-۴۱: نتایج غلظتهای پیش بینی شده در مخلوطهای سری تست با روش	
SRSM	۹۲
جدول ۳-۴۲: نتایج بهینه سازی محدوده MC برای محاسبه ونلافاکسین در سری	
کالیبراسیون و ارزیابی	۹۵
جدول ۳-۴۳: نتایج بهینه سازی محدوده MC برای سیتالوپرام در سری کالیبراسیون	

و ارزیابی	۹۸
جدول ۳-۴۴: نتایج غلظت‌های پیش بینی شده سیتالوپرام و ونلافاکسین در سری	
ارزیابی با روش MCM	۹۸
جدول ۳-۴۵: نتایج غلظت‌های پیش بینی شده سیتالوپرام و ونلافاکسین در سری	
تست با روش MCM، در مخلوط سری تست	۹۹
جدول ۳-۴۶: نتایج حاصل از بررسی اثر گونه‌های مزاحم در اندازه‌گیری محلول‌های	
سیتالوپرام و ونلافاکسین به ترتیب با غلظت‌های ۲/۵۰ و ۵/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر	۱۰۰
جدول ۳-۴۷: نتایج حاصل از بررسی حد تشخیص روش‌های EXRSM، SRSM و	
MCM در اندازه‌گیری همزمان محلول‌های سیتالوپرام و ونلافاکسین	۱۰۱
جدول ۳-۴۸: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش‌های EXRSM، SRSM و	
MCM در اندازه‌گیری همزمان محلول‌های سیتالوپرام و ونلافاکسین	۱۰۱
جدول ۳-۴۹: نتایج حاصل از اندازه‌گیری غلظت ونلافاکسین و سیتالوپرام در	
نمونه‌های قرص با استفاده از هر یک از روش‌های EXRSM، SRSM و MCM	۱۰۳
جدول ۴-۱: پارامترهای آماری محاسبه شده برای تولوئیدین بلو در روش‌های	
EXRSM، SRSM و MCM در مخلوط سری تست	۱۰۹
جدول ۴-۲: پارامترهای آماری محاسبه شده برای متیل ویولت در روش‌های	
EXRSM، SRSM و MCM در مخلوط سری تست	۱۰۹
جدول ۴-۳: پارامترهای آماری محاسبه شده برای سیتالوپرام در روش‌های	
EXRSM، SRSM و MCM در مخلوط سری تست	۱۱۳
جدول ۴-۴: پارامترهای آماری محاسبه شده برای ونلافاکسین در روش‌های	
EXRSM، SRSM و MCM در مخلوط سری تست	۱۱۳

فهرست اشکال

- شکل ۱-۳: ساختار متیل ویولت ۳
- شکل ۲-۳: ساختار تولوئیدین بلو ۴
- شکل ۳-۳: ساختار ونلافاکسین ۶
- شکل ۴-۳: ساختار سیتالوپرام ۷
- شکل ۱-۳: طیف جذبی متیل ویولت ۲۷
- شکل ۲-۳: طیف جذبی تولوئیدین بلو ۲۸
- شکل ۳-۳: طیف جذبی محلول های خالص و مخلوط متیل ویولت و تولوئیدین بلو ۲۸
- شکل ۴-۳: بررسی اثر pH با بافر فسفاتی ۳۰
- شکل ۵-۳: بررسی اثر نوع بافر بر جذب ۳۲
- شکل ۶-۳: بررسی اثر حجم بافر ۳۳
- شکل ۷-۳: بررسی اثر قدرت یونی ۳۴
- شکل ۸-۳: (a) منحنی کالیبراسیون تولوئیدین بلو (b) منحنی کالیبراسیون متیل ویولت ۳۷
- شکل ۹-۳: طیفهای جذبی حاصل از تقسیم مخلوطهای حاوی ۲/۵۰، ۵/۰۰، ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ۴۰
- شکل ۱۰-۳: طیفهای جذبی حاصل از تقسیم مخلوطهای حاوی (a) ۲/۵۰، (b) ۵/۰۰، (c) ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر متیل ویولت و ۵/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تولوئیدین بلو بر طیف مرتبه صفر ۲۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تولوئیدین بلو بعد از کسر مقدار ثابت ۴۱
- شکل ۱۱-۳: طیفهای جذبی مرتبه صفر غلظت های (a) ۲/۵۰، (b) ۵/۰۰، (c) ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر متیل ویولت، بعد از کسر مقدار ثابت از طیف نسبی و ضرب در طیف مرتبه صفر ۲۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تولوئیدین بلو ۴۱

شکل ۳-۱۲: طیف‌های جذبی حاصل از تقسیم مخلوط‌های حاوی (a) ۲/۵۰، (b) ۵/۰۰، (c) ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر متیل ویولت و ۵/۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تولوئیدین بلو بر طیف مرتبه صفر ۱۲/۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر متیل ویولت. ۴۴

شکل ۳-۱۳: بدست آوردن ثابت حاصل از تقسیم طیف خالص مرتبه صفر محاسباتی (a) ۲/۵۰، (b) ۵/۰۰، (c) ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر متیل ویولت بر طیف مرتبه صفر ۱۲/۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر متیل ویولت. ۴۵

شکل ۳-۱۴: طیف‌های جذبی حاصل از تقسیم مخلوط‌های حاوی (a) ۲/۵۰، (b) ۵/۰۰، (c) ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر متیل ویولت و ۵/۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تولوئیدین بلو بر طیف مرتبه صفر ۱۲/۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر متیل ویولت بعد از کسر مقدار ثابت از طیف نسبی. ۴۵

شکل ۳-۱۵: طیف‌های جذبی مرتبه صفر ۵/۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تولوئیدین بلو، بعد از کسر مقدار ثابت از طیف نسبی و ضرب در طیف مرتبه صفر ۱۲/۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر متیل ویولت. ۴۶

شکل ۳-۱۶: طیف‌های نسبی حاصل از تقسیم طیف مرتبه صفر (a) ۰/۵۰، (b) ۲/۵۰، (c) ۵/۰۰، (d) ۱۰/۰۰، (e) ۱۲/۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر متیل ویولت بر طیف مرتبه صفر ۲۰/۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تولوئیدین بلو. ۴۹

شکل ۳-۱۷: منحنی کالیبراسیون نسبی متیل ویولت حاصل از تقسیم طیف مرتبه صفر متیل ویولت با غلظتهای ۱۲/۵۰ - ۰/۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر طیف مرتبه صفر ۲۰/۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تولوئیدین بلو در طول موج ۵۱۸ نانومتر. ۵۰

شکل ۳-۱۸: طیف‌های جذبی حاصل از تقسیم مخلوط‌های حاوی (a) ۲/۵۰، (b) ۵/۰۰، (c) ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر متیل ویولت و ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تولوئیدین بلو بر طیف مرتبه صفر ۲۰/۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تولوئیدین بلو. ۵۰

شکل ۳-۱۹: کسر مقدار ثابت از طیف‌های جذبی حاصل از تقسیم مخلوط‌های حاوی (a) ۲/۵۰، (b) ۵/۰۰، (c) ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر متیل ویولت و ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تولوئیدین بلو بر طیف مرتبه صفر ۲۰/۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تولوئیدین بلو. ۵۱

شکل ۳-۲۰: طیف های جذبی مرتبه صفر ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تولوئیدین بلو ، بعد از ضرب مقدار ثابت در هر مخلوط (شکل ۳-۱۸) در طیف مرتبه صفر ۲۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تولوئیدین بلو (به عنوان مقسوم علیه)..... ۵۲

شکل ۳-۲۱: طیف های نسبی حاصل از تقسیم طیف های مرتبه صفر غلظت های (a) ۱/۰۰، (b) ۵/۰۰، (c) ۱۰/۰۰، (d) ۱۵/۰۰، (e) ۲۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تولوئیدین بلو بر ضریب جذب متیل ویولت..... ۵۵

شکل ۳-۲۲: طیف های نسبی حاصل از تقسیم طیف های مرتبه صفر غلظت های (a) ۱/۰۰، (b) ۵/۰۰، (c) ۱۰/۰۰، (d) ۱۵/۰۰، (e) ۲۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تولوئیدین بلو بر ضریب جذب متیل ویولت بعد از انجام MC در ناحیه ۶۵۰-۵۷۰ نانومتر..... ۵۵

شکل ۳-۲۳: منحنی کالیبراسیون نسبی در طول موج ماکزیمم ۶۵۰ نانومتر، حاصل تقسیم طیف مرتبه صفر غلظت های ۱/۰۰-۲۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تولوئیدین بلو بر ضریب جذب متیل ویولت بعد از انجام MC در ناحیه ۶۵۰-۵۷۰ نانومتر..... ۵۵

شکل ۳-۲۴: طیفهای نسبی حاصل از تقسیم، طیف مخلوط با غلظت های (a) ۱/۰۰، (b) ۵/۰۰، (c) ۱۰/۰۰، (d) ۱۵/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تولوئیدین بلو به همراه ۵/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر متیل ویولت بر ضریب جذب متیل ویولت..... ۵۶

شکل ۳-۲۵: طیف های نسبی حاصل از تقسیم، طیف مخلوط با غلظت های (a) ۱/۰۰، (b) ۵/۰۰، (c) ۱۰/۰۰، (d) ۱۵/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تولوئیدین بلو به همراه ۵/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر متیل ویولت بعد از انجام MC در ناحیه ۶۵۰-۵۷۰ نانومتر..... ۵۶

شکل ۳-۲۶: طیفهای نسبی حاصل از تقسیم طیف مرتبه صفر غلظت های (a) ۰/۵۰، (b) ۲/۵۰، (c) ۵/۰۰، (d) ۱۰/۰۰ (c) ۱۲/۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر متیل ویولت بر ضریب جذب تولوئیدین بلو..... ۵۷

شکل ۳-۲۷: طیف های نسبی حاصل از تقسیم طیف مرتبه صفر غلظت های (a) ۰/۵۰، (b) ۲/۵۰، (c) ۵/۰۰، (d) ۱۰/۰۰ (c) ۱۲/۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر متیل ویولت بر ضریب جذب تولوئیدین بلو و انجام MC در ناحیه ۶۵۰-۴۵۰ نانومتر..... ۵۸

شکل ۳-۲۸: منحنی کالبراسیون در طول موج ماکزیمم ۵۱۸ نانومتر ، حاصل تقسیم طیف های مرتبه صفر غلظت های ۰/۵۰-۱۲/۵۰ متیل ویولت بر ضریب جذب تولوئیدین بلو بعد از انجام MC در ناحیه ۴۵۰-۶۵۰ نانومتر. ۵۸

شکل ۳-۲۹: طیف های نسبی حاصل از تقسیم، طیف مخلوط با غلظت های (a) ۱/۰۰، (b) ۲/۵۰، (c) ۵/۰۰، (d) ۷/۵۰، (e) ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر متیل ویولت به همراه ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تولوئیدین بلو بر ضریب جذب تولوئیدین بلو. ۵۹

شکل ۳-۳۰: طیفهای نسبی حاصل از تقسیم، طیف مخلوط با غلظت های (a) ۱/۰۰، (b) ۲/۵۰، (c) ۵/۰۰، (d) ۷/۵۰، (e) ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر متیل ویولت به همراه ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تولوئیدین بلو بر ضریب جذب تولوئیدین بلو و انجام MC در ناحیه ۴۵۰-۶۳۰ نانومتر. ۶۰

شکل ۳-۳۱: طیف جذبی ونلافاکسین ۶۸

شکل ۳-۳۲: طیف جذبی سیتالوپرام ۶۹

شکل ۳-۳۳: طیف جذبی محلول های خالص و مخلوط ونلافاکسین و سیتالوپرام ۷۰

شکل ۳-۳۴: بررسی اثر pH ۷۲

شکل ۳-۳۵: بررسی اثر حجم بافر ۷۴

شکل ۳-۳۶: بررسی اثر قدرت یونی ۷۵

شکل ۳-۳۷: (a) منحنی کالبراسیون سیتالوپرام (b) منحنی کالبراسیون ونلافاکسین ۷۷

شکل ۳-۳۸: (a) منحنی کالبراسیون سیتالوپرام در حضور ۴۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین در بافر فسفات با pH= ۷/۰ (b) منحنی کالبراسیون ونلافاکسین در حضور ۵۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتالوپرام در بافر فسفات با pH= ۷/۰ ۸۰

شکل ۳-۳۹: طیف های جذبی مخلوط های حاوی (a) ۲/۰۰، (b) ۵/۰۰، (c) ۸/۰۰، (d) ۱۰/۰۰

میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین و ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتالوپرام. ۸۳

شکل ۳-۴۰: طیف های جذبی حاصل از تقسیم مخلوط های حاوی (a) ۲/۰۰، (b) ۵/۰۰،

(c) ۸/۰۰، (d) ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتالوپرام و ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین

بر طیف مرتبه صفر ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتالوپرام. ۸۳

شکل ۳-۴۱: کسر مقدار ثابت از طیفهای جذبی حاصل از تقسیم مخلوط های حاوی (a) ۲/۰۰، (b) ۵/۰۰، (c) ۸/۰۰، (d) ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتالوپرام و ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین بر طیف مرتبه صفر ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتالوپرام. ۸۴

شکل ۳-۴۲: طیف های جذبی خالص محاسباتی غلظت ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین، بعد از کسر مقدار ثابت از طیف های نسبی و ضرب در طیف مرتبه صفر ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتالوپرام. ۸۴

شکل ۳-۴۳: طیف های جذبی حاصل از تقسیم مخلوط های حاوی (a) ۲/۰۰، (b) ۵/۰۰، (c) ۸/۰۰، (d) ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتالوپرام و ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین بر طیف مرتبه صفر ۲۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین. ۸۶

شکل ۳-۴۴: بدست آوردن ثابت حاصل از تقسیم طیف خالص محاسباتی ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین بر طیف مرتبه صفر ۲۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین. ۸۷

شکل ۳-۴۵: کسر مقدار ثابت از طیف های جذبی حاصل از تقسیم مخلوط های حاوی (a) ۲/۰۰، (b) ۵/۰۰، (c) ۸/۰۰، (d) ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتالوپرام و ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین بر طیف مرتبه صفر ۲۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین. ۸۷

شکل ۳-۴۶: طیف های جذبی خالص محاسباتی (a) ۲/۰۰، (b) ۵/۰۰، (c) ۸/۰۰، (d) ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتالوپرام ، بعد از کسر مقدار ثابت از طیف های نسبی و ضرب در طیف مرتبه صفر ۲۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین. ۸۷

شکل ۳-۴۷: حاصل از تقسیم طیف مرتبه صفر (a) ۱/۰۰، (b) ۲/۰۰، (c) ۵/۰۰، (d) ۸/۰۰، (e) ۱۵/۰۰، (f) ۲۰/۰۰، (g) ۳۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین بر طیف مرتبه صفر ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتالوپرام. ۹۰

شکل ۳-۴۸: منحنی کالیبراسیون حاصل از تقسیم طیف مرتبه صفر ونلافاکسین با غلظتهای ۱/۰۰-۳۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بر طیف مرتبه صفر ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتالوپرام. ۹۰

شکل ۳-۴۹: طیف های جذبی خالص محاسباتی (a) ۲/۰۰، (b) ۵/۰۰، (c) ۸/۰۰، (d) ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتالوپرام، بعد از ضرب مقدار ثابت در طیف نسبی حاصل از تقسیم مخلوطها بر مقسوم علیه. ۹۱

شکل ۳-۵۰: طیف نسبی حاصل از تقسیم طیف مرتبه صفر غلظت های ۱/۰۰-۳۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین بر ضریب جذب سیتالوپرام. ۹۳

شکل ۳-۵۱: طیف های نسبی، حاصل از تقسیم طیف های مرتبه صفر غلظت های ۳۰/۰۰-۱/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین بر ضریب جذب سیتالوپرام بعد از انجام MC در ناحیه ۲۲۰-۲۳۵ نانومتر. ۹۳

شکل ۳-۵۲: منحنی کالیبراسیون در طول موج ماکزیمم ۲۲۱/۵ نانومتر، حاصل تقسیم طیف های مرتبه صفر غلظت های ۱/۰۰-۳۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین بر ضریب جذب سیتالوپرام بعد از انجام MC در ناحیه ۲۲۰-۲۳۵ نانومتر. ۹۴

شکل ۳-۵۳: طیفهای نسبی حاصل از تقسیم، طیف مخلوط حاوی (a) ۲/۰۰، (b) ۵/۰۰، (c) ۸/۰۰، (d) ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین و ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتالوپرام بر ضریب جذب سیتالوپرام. ۹۵

شکل ۳-۵۴: طیف های نسبی حاصل از تقسیم، طیف مخلوط حاوی (a) ۲/۰۰، (b) ۵/۰۰، (c) ۸/۰۰، (d) ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین و ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتالوپرام بر ضریب جذب سیتالوپرام، بعد از انجام MC در ناحیه ۲۲۰-۲۳۵ نانومتر. ۹۵

شکل ۳-۵۵: طیف نسبی حاصل از تقسیم طیف مرتبه صفر غلظت های ۱/۰۰-۳۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتالوپرام بر ضریب جذب ونلافاکسین. ۹۶

شکل ۳-۵۶: طیف های نسبی، حاصل از تقسیم طیف های مرتبه صفر غلظت های ۳۰/۰۰-۱/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتالوپرام بر ضریب جذب ونلافاکسین بعد از انجام MC در ناحیه ۲۴۰-۲۵۰ نانومتر. ۹۶

شکل ۳-۵۷: منحنی کالیبراسیون نسبی در طول موج ماکزیمم ۲۴۱/۵ نانومتر، حاصل تقسیم طیف های مرتبه صفر غلظتهای ۱/۰۰-۳۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتالوپرام بر ضریب جذب

ونلافاکسین بعد از انجام MC در ناحیه ۲۵۰-۲۴۰ نانومتر. ۹۷.....

شکل ۳-۵۸: طیف های نسبی حاصل از تقسیم، طیف مخلوط حاوی (a) ۲/۰۰، (b) ۵/۰۰،

(c) ۸/۰۰، (d) ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین و ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتالوپرام

بر ضریب جذب ونلافاکسین. ۹۷.....

شکل ۳-۵۹: طیف های نسبی حاصل از تقسیم، طیف مخلوط حاوی (a) ۲/۰۰، (b) ۵/۰۰،

(c) ۸/۰۰، (d) ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین و ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتالوپرام

بر ضریب جذب ونلافاکسین، بعد از انجام MC در ناحیه ۲۵۰-۲۴۰ نانومتر. ۹۸.....

شکل ۴-۱: نمایش میزان همبستگی غلظت های پیش بینی شده و غلظت های واقعی تولوئیدین

بلو با استفاده از سری تست، (a) در روش EXRSM، (b) در روش SRSM و (c) در روش MCM

۱۰۸.....

شکل ۴-۲: نمایش میزان همبستگی غلظت های پیش بینی شده و غلظت های واقعی متیل

ویولت در مخلوط سری تست، (a) در روش EXRSM، (b) در روش SRSM و (c) در روش MCM

۱۰۸.....

شکل ۴-۳: نمایش میزان همبستگی غلظت های پیش بینی شده و غلظت های واقعی سیتالوپرام

با استفاده از سری تست، (a) در روش EXRSM، (b) در روش SRSM و (c) در روش MCM ۱۱۲

شکل ۴-۴: نمایش میزان همبستگی غلظت های پیش بینی شده و غلظت های واقعی ونلافاکسین

با استفاده از سری تست، (a) در روش EXRSM، (b) در روش SRSM و (c) در روش MCM ۱۱۳

فصل اول

مقدمه

۱-۱- آلاینده‌های رنگی

رنگ‌ها دسته‌ای از ترکیبات آلی هستند که، به طور گسترده‌ای در زمینه‌های مختلف صنعتی مانند منسوجات، کاغذ، چاپ، لاستیک، پلاستیک، چرم، لوازم آرایشی، داروسازی و تولیدات مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۱، ۲]. رنگ‌های مورد استفاده در صنایع، یکی از منابع آلوده کننده محیط زیست می‌باشند، که برخی از این رنگ‌ها سمی بوده و حذف آن‌ها از محیط ضروری است. رنگ‌ها دارای ساختار پیچیده بوده و تخریب و تجزیه آن‌ها توسط روش‌های بیولوژیکی دشوار است. دسته‌ای از رنگ‌های مورد استفاده در صنایع به خصوص صنایع نساجی، رنگ‌های اسیدی و بازی می‌باشند. حدود دو درصد از رنگ‌های صنعتی وارد جریان آب می‌گردد، که مشکلات جدی آلودگی آب را در پی دارد [۳].

رنگ‌های تولوئیدین بلو^۱ و متیل ویولت^۲ به طور گسترده در نساجی، چرم، کاغذ و خمیر کاغذ استفاده می‌شوند [۱] و همچنین رنگ تولوئیدین بلو در چند حوزه از علم پزشکی و بیوتکنولوژی نیز کار برد وسیعی دارد [۴]. امروزه با توجه به اهمیت موضوع تصفیه پساب‌های صنعتی تحقیقات زیادی برای یافتن جاذب‌های مناسب هر رنگ برای حذف این آلاینده‌های زیست - محیطی انجام شده و آزمایش‌ها در این زمینه همچنان ادامه دارد.

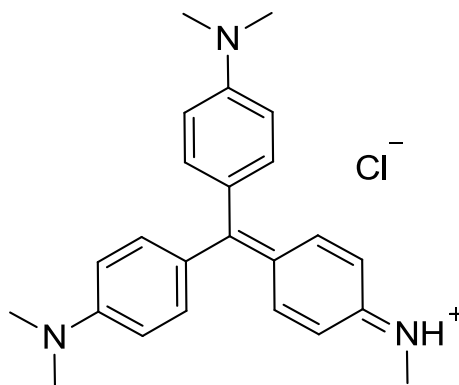
به منظور دانستن مقدار رنگ در محلول مورد بررسی قبل از حذف رنگ، در حین حذف رنگ و یا بعد از حذف رنگ، در اکثر روش‌های شیمیایی حداقل یک مرحله اندازه‌گیری رنگ مورد نظر ضروری می‌باشد. از آنجا که طیف جذبی مرئی-ماوراءبنفش دو رنگ متیل ویولت و تولوئیدین بلو در حضور یکدیگر با هم همپوشانی دارند، با روش‌های ساده اسپکتروسکوپی نمی‌توان آن‌ها را همزمان به صورت مستقیم اندازه‌گیری کرد. برای رفع این مشکل از روش‌های جدید اسپکتروفتومتری استفاده گردید.

1 -Toluidine Blue

2 -Methyl violet

۱-۱-۱- متیل ویولت

متیل ویولت (MV)، رنگ بازی تری فنیل متان^۱ و از کلرید^۲ بوده و کاربرد وسیعی در صنایع داشته و به مقدار زیاد به محیط زیست وارد می‌شود. ساختار متیل ویولت در شکل ۱-۱ آورده شده است [۱]. این رنگ در محدوده pH=۰/۱۳-۰/۵ از زرد به سبز و در محدوده pH=۲/۰-۳/۰ از سبز به آبی تغییر رنگ می‌دهد. حلالیت متیل ویولت در pH بالاتر از ۳/۰ بدون تغییر باقی می‌ماند [۵]. نوع کاتیونی با جرم مولکولی ۳۹۶/۹۶ گرم بر مول می‌باشد. این رنگ دارای نام شیمیایی N-(۴- بیس-۴- (دی متیل آمینو) فنیل) متیلن) ۲،۵- دی ان ۱- ایلیدن متان آمونیوم (۴-)



شکل ۱-۱: ساختار متیل ویولت

۲-۱-۱- تولوئیدین بلو

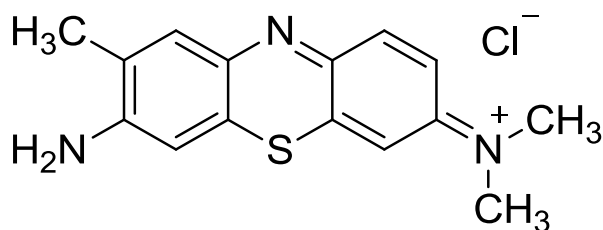
تولوئیدین بلو (TB)، رنگ کاتیونی تیازینی^۳ با جرم مولکولی ۳۰۵/۸ گرم بر مول می‌باشد. این رنگ دارای نام شیمیایی N-(۷- آمینو-۸- متیل- H۳- فنوتیازین ۳- ایلیدن)-N- متیل متان آمینیوم کلرید^۴ بوده و کاربرد وسیعی در صنایع داشته و به مقدار زیاد به محیط زیست وارد می‌شود [۲].

1-Triphenylmethane

2-N-(4-(bis(4-(dimethylamino)phenyl)methylene)cyclohexa-2,5-dien-1-ylidene)methanaminium chloride

3-Thiazin

4- N-(7-amino-8-methyl-3H-phenothiazin-3-ylidene)-N-methylmethanaminium chloride



شکل ۱-۲: ساختار تولوئیدین بلو

۱-۱-۳- مروری بر کارهای انجام شده بر روی رنگ‌های متیل ویولت و تولوئیدین بلو

در سال ۲۰۰۳ دوگان^۱ و همکارانش رنگ متیل ویولت را بر روی پرلیت^۲ جذب کردند. در این به بررسی سینتیک جذب و پارامترهای فعال بر جذب متیل ویولت بر روی پرلیت پرداخته شده و با استفاده از اسپکتروفوتومتری غلظت متیل ویولت را در طول موج ماکزیمم ۵۸۴ نانومتر اندازه‌گیری کردند [۵].

در سال ۲۰۰۷ آلپات^۳ و همکارانش رنگ تولوئیدین بلو را توسط جاذب ژئولیت حذف و با استفاده از اسپکتروفوتومتری غلظت آن را در طول موج ماکزیمم ۶۱۳ نانومتر اندازه‌گیری کردند [۴].

در سال ۲۰۰۹ رئوف^۴ و همکارانش رنگ تولوئیدین بلو را توسط گچ حذف و با استفاده از اسپکتروفوتومتری غلظت آن را اندازه‌گیری کردند [۳].

در سال ۲۰۱۰ هاشمیان رنگ متیل ویولت را توسط جذب روی بنتونیت در حضور نانو فریت مس حذف و با استفاده از اسپکتروفوتومتری غلظت آن را اندازه‌گیری کرد [۶].

در سال ۲۰۱۱ حجازی^۵ و همکارانش رنگ متیل ویولت را توسط پوست درخت انگور حذف و با استفاده از اسپکتروفوتومتری غلظت آن را در طول موج ماکزیمم ۶۲۵ نانومتر اندازه‌گیری کردند [۷].

در سال ۲۰۱۲ حمیدی ملایری و همکارانش رنگ تولوئیدین بلو را توسط جاذب نانو لوله‌های

1- Dogan

2- Perlite

3- Alpat

4- Rauf

5-Hejazifar

کربنی چند دیواره مغناطیسی حذف و با استفاده از اسپکتروفوتومتری در طول موج ۶۱۲ نانومتر غلظت آن را اندازه گیری کردند [۸].

در سال ۲۰۱۴ لافی^۱ و همکارانش رنگ تولوئیدین بلو و کریستال ویولت را توسط پسماند قهوه حذف و با استفاده از اسپکتروفوتومتری غلظت آن‌ها را به ترتیب در طول موج‌های ۶۲۳ و ۵۹۰ نانومتر اندازه‌گیری کردند [۲].

۱-۲- داروهای ضد افسردگی

امروزه، بیماری افسردگی یکی از بیماری‌های رایج در میان اقشار مختلف مردم است. در بیماری افسردگی واکنش‌ها غیر طبیعی بوده و انسان در برابر ناملایمات و شکست‌ها بیش از حد افسرده می‌شود. علل ابتلا به این بیماری وراثت، تغییرات شیمیایی مغز، از دست دادن والدین در کودکی، حوادث ناخوشایند زندگی، بیماری‌های جسمی مختلف و استفاده از بعضی داروها می‌باشد. بهترین راه درمان این بیماری تاکنون، دارو درمانی می‌باشد. داروهای ضد افسردگی در موارد اندکی می‌توانند باعث بروز عوارض جانبی ناخوشایندی شود که در برخی موارد تا پایان عمر با فرد باقی می‌ماند. در حالی که داروهای ضد افسردگی جدید دارای عوارض جانبی کمتری هستند، اما در موارد زیادی باعث مسمومیت جدی می‌شوند. در مواردی مصرف بیش از حد داروهای ضد افسردگی موجب مرگ افراد می‌شود، به همین خاطر مقدار مصرف آن در پزشکی قانونی مورد بررسی قرار می‌گیرد [۹].

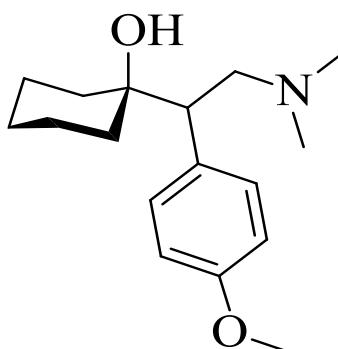
افسردگی باعث بی‌خوابی، بی‌اشتهایی، فقدان انرژی و از دست دادن علاقه و لذت از فعالیت‌های معمول می‌شود. این بیماری با «احساس افسردگی» و «بی‌ارزش بودن» شناخته می‌شود. البته این تغییر خلق به سمت خلق افسرده، براساس مقایسه وضعیت بیمار با حالت طبیعی عنوان می‌شود. در برخی موارد به ویژه در سالمندان اختلال افسردگی شدید یک بیماری جدی است، که با خطر وقوع مرگ و میر و حتی خودکشی در مبتلایان همراه است [۱۰]. علایم افسردگی در این بیماری باعث اختلال در عملکرد طبیعی فرد می‌شوند. هر چند که علت اصلی افسردگی مشخص نیست، محققان

1- Lafi

هنوز به بررسی تغییرات بیوشیمیایی مغز انسان در مبتلایان به این بیماری مشغول هستند. بر هم خوردن تعادل انتقال سروتونین، می‌تواند یکی از عوامل افسردگی باشد [۱۱].

۱-۲-۱- ونلافاکسین^۱

ونلافاکسین یک دارو ضد افسردگی با نام شیمیایی ۱-(۲-(دی متیل آمینو)-۱-(۴-متوکسی فنیل) اتیل) سیکلو هگزانول^۲ بوده و ساختار آن در شکل ۳-۱ آمده است. این دارو دارای نام‌های تجاری افکسور^۳، افکسور ایکس آر^۴، لانوکسین^۵، ویپاکس^۶ و ترویلور^۷ می‌باشد [۱۲] ونلافاکسین برای اولین بار در اوایل سال ۱۹۸۰ میلادی توسط محققان در یک شرکت داروسازی سنتز شد و برای درمان افسردگی در ایالات متحده در اوایل سال ۱۹۹۴ مورد استفاده قرار گرفت.



شکل ۳-۱: ساختار ونلافاکسین

ونلافاکسین در گروه داروهای مهارکننده بازجذب سروتونین-نوروپنی نفرین (SNRI)^۸ و به مقدار کمتری دوپامین می‌باشد، که بر مواد شیمیایی در مغز تاثیر گذاشته و موجب افسردگی و عدم تعادل می‌گردد [۱۰، ۱۳]. ساختار ونلافاکسین با مهارکننده‌های باز جذب انتخابی سروتونین (SSRI)^۹ متفاوت است. با این وجود از لحاظ دارویی با هم شباهت دارند [۱۴].

1- Venlafaxine

2-1-(2-(dimethylamino)-1-(4-methoxyphenyl)ethyl)cyclohexanol

3- Effexor

4- Effexor XR

5- Lanvexin

6- Viepax

7- Trevilor

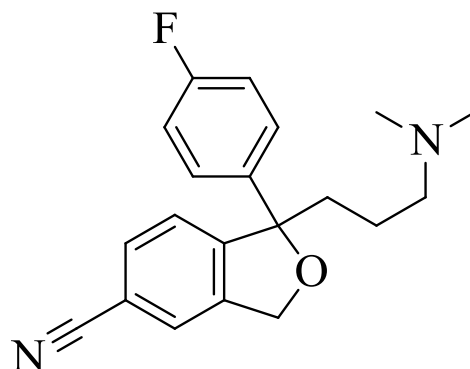
8- Serotonin – norepinephrine reuptake inhibitor

9- Selective serotonin reuptake inhibitor

این دارو در درمان اختلالات افسردگی اساسی، اضطراب، ترس از اجتماع، اختلال جبری، وسواس، اختلالات شخصیتی و ترس در بزرگسالان به کار می‌رود. این دارو گرچه ممکن است در درمان بیش فعالی کودکان مصرف شود (تحقیقات مختلف کارایی بهتر این دارو را نسبت به داروهای دیگر نشان داده) ولی به طور کلی در کودکان و افراد زیر ۲۴ سال و به ویژه زیر ۱۸ سال به علت افزایش احتمال میل به خودکشی و آسیب رساندن به خود توصیه نمی‌شود [۱۵].

۱-۲-۲- سیتالوپرام

یکی دیگر از داروهای ضد افسردگی سیتالوپرام می‌باشد و نام شیمیایی آن ۱-(۳-دی متیل آمینو) پروپیل-۱-(۴-فلوروفنیل)-۳،۱-دی هیدرو ایزو بنزوفوران-۵-کربونیتیل ۱ بوده و ساختار آن در شکل ۴-۱ آمده است. این دارو با نام‌های تجاری سلکسا^۲، سپرامیل^۳ و غیره شناخته می‌شود. سیتالوپرام در سال ۱۹۸۹ توسط شرکت دانمارکی لاندبک^۴ ساخته شد و با پایان مدت حق انحصاری تولید آن در سال ۲۰۰۳ کمپانی‌های دیگر داروسازی نیز ساخت آن را آغاز کرده اند [۱۶].



شکل ۴-۱: ساختار سیتالوپرام

سیتالوپرام از گروه مهار کننده بازجذب انتخابی سرتونین (SSRI) ها است، که برای درمان اختلالات رفتاری و گاه برای درمان اختلالات اضطرابی نیز تجویز می‌شود [۱۳]. همچنین از سیتالوپرام

1- 1-(3-(dimethylamino)propyl)-1-(4-fluorophenyl)-1,3-dihydroisobenzofuran-5-carbonitrile

2- Celexa

3- Cipramil

4-Landbk

برای درمان افسردگی، اختلال هراس و اضطراب اجتماعی استفاده می‌شود [۹]. مصرف همزمان سیتالوپرام با داروهای دیگر احتمال مرگ و میر را افزایش می‌دهد و در گزارش‌های پزشکی قانونی، حضور داروهای SSRI ها به تنهایی یا همراه با الکل بررسی می‌شوند [۱۱]. این دارو بیشتر در دوز درمانی ۲۰ تا ۶۰ میلی‌گرم در روز به خوبی تحمل می‌شود و عارضه چندان ندارد. با این حال مرگ ناشی از مصرف ۸۴۰ تا ۱۹۶۰ میلی‌گرم این دارو گزارش شده است [۱۷].

۱-۲-۳- مروری بر کارهای انجام شده بر روی سیتالوپرام و ونلافاکسین

تاکنون از روش‌های مختلفی مانند روش‌های الکتروشیمیایی [۱۸]، الکتروفورز لوله موئین-طیف سنجی زمان پرواز^۱ [۱۹]، کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی^۲ [۱۵]، کروماتوگرافی مایع-طیف سنج جرمی/طیف سنج جرمی^۳ [۲۰]، کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی^۴ [۱۵]، استخراج فاز جامد-کروماتوگرافی مایع-طیف سنج جرمی^۵ [۱۳]، HPLC با طیف سنج جرمی دوگانه^۶ [۱۷]، HPLC-فاز معکوس^۷ [۲۱]، HPLC- با انتخاب کننده طول موج فرابنفش و فلورسانس^۸ [۲۲] و HPLC [۱۳، ۲۳] برای اندازه‌گیری به صورت تک و یا مخلوط ونلافاکسین و سیتالوپرام استفاده شده است. همچنین از روش‌های اسپکتروفتومتری برای اندازه‌گیری سیتالوپرام و ونلافاکسین استفاده شده است که چکیده مربوط به روش‌های اسپکتروفتومتری در زیر آورده شده است.

در سال ۲۰۰۵ اسکینسکی^۹ و همکارانش با استفاده از روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۳۹ نانومتر مقدار سیتالوپرام را در نمونه‌های مجزای قرص اندازه‌گیری نمودند. منحنی کالیبراسیون در محدوده ۱۲/۰-۲/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر خطی بوده است. درصد بازیابی برای روش مذکور ۹۸-۹۵ درصد گزارش شده است [۱۸].

1- Electrophoresis-time of flight mass spectrometry

2- Gas chromatography-mass spectrometry

3- LC-MS/MS

4- Gas chromatography-mass spectrometry

5- Solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry

6- HPLC tandem mass spectrometry

7- RP-HPLC

8- High-performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection

9- Skibinski

در سال ۲۰۱۱ حسینی با استفاده از اسپکتروفوتومتری UV و HPLC مقدار ونلافاکسین و چهار شکل دارویی مرتبط با آن را در نمونه دارویی اندازه‌گیری کرد. منحنی کالیبراسیون در محدوده ۱۲۰/۰-۵۰/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر خطی و همچنین حد تشخیص و حد کمی به ترتیب ۱/۰۱ و ۰/۲۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است درصد انحراف استاندارد نسبی (RSD%) برای این روش ۰/۸۲۲ می‌باشد [۲۴].

در سال ۲۰۱۱ سومیا^۱ و همکارانش با استفاده از روش اسپکتروفوتومتری در طول موج ۲۲۲ نانومتر مقدار ونلافاکسین را در نمونه‌های دارویی آن اندازه‌گیری کردند. منحنی کالیبراسیون در محدوده ۲۶/۰-۲/۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر خطی و درصد انحراف استاندارد نسبی ۵۴۵۵/۰ گزارش شده است [۲۵].

در سال ۲۰۱۲ یونس^۲ و همکارانش با استفاده از HPLC - فاز معکوس ونلافاکسین و مودافینیل را در نمونه‌های مجزای قرص اندازه‌گیری نمودند. منحنی کالیبراسیون در محدوده ۵۰/۰-۱/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر خطی و همچنین انحراف استاندارد نسبی ونلافاکسین و مودافینیل به ترتیب ۰/۷۱ و ۰/۵۸ گزارش شده است [۲۱].

در سال ۲۰۱۲ داس^۳ و همکارانش با استفاده از روش اسپکتروفوتومتری در طول موج ۲۴۰ نانومتر مقدار سیتالوپرام را در نمونه‌های مجزای قرص اندازه‌گیری نمودند. منحنی کالیبراسیون در محدوده ۴/۰-۲/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر خطی و همچنین حد تشخیص و حد کمی این روش به ترتیب ۴۰/۵۹ و ۱۲۳/۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر بوده است. درصد بازیابی برای روش مذکور ۱۰۰/۷۸-۹۸/۵۳ درصد گزارش شده است [۲۶].

در سال ۲۰۱۴ واندر شیواجی^۴ و همکارانش با استفاده از روش اسپکتروفوتومتری در طول موج ۲۳۶ نانومتر مقدار ونلافاکسین را در نمونه قرص اندازه‌گیری کردند. منحنی کالیبراسیون در محدوده

1- Sowmya

2- Younus

3- Das

4- Wandre Shivaji

۱۶/۰-۱/۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر خطی و همچنین حد تشخیص ۰/۰۲۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است درصد انحراف استاندارد نسبی ۱/۴۷ بدست آمده است. درصد بازیابی برای روش مذکور ۹۸/۱۳-۱۰۱/۹۳ گزارش شده است [۲۷].

در سال ۲۰۱۴ انصاری و همکارانش با استفاده از اسپکتروفتومتری در ناحیه UV مقدار سیتالوپرام را در نمونه قرص اندازه‌گیری کردند. منحنی کالیبراسیون در محدوده ۱/۰۰-۲۵/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر خطی و همچنین حد تشخیص ۱/۰۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است [۲۸].

فصل دوم

تئوری

۲-۱- مقدمه ای بر اسپکتروفتومتری

اندازه‌گیری‌های جذبی در ناحیه ماوراء بنفش-مرئی برای تعیین کمی انواع زیادی از گونه‌های معدنی و آلی اهمیت پیدا کرده اند. گستره‌ی طول موجی ناحیه ماوراء بنفش و مرئی ۷۸۰-۱۹۰ نانومتر می‌باشد. طیف‌بینی جذب مولکولی بر اساس اندازه‌گیری عبور (T) یا جذب (A) محلول‌های موجود در سلول‌های شفاف استوار است. معمولاً غلظت (C) به‌طور خطی به جذب با معادله (۲-۱) ارتباط داده می‌شود [۲۹].

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon bc \quad (2-1)$$

P توان تابش خروجی، P_0 توان تابش ورودی، ϵ ضریب جذب مولی $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ، b طول مسیر تابش (سانتی متر)، T میزان عبور و A مقدار جذب در یک طول موج معین است.

مشکل اصلی 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 [۳۰]. چندین روش اسپکتروفتومتری برای رفع مشکل همپوشانی طیف‌ها تا کنون ارائه شده است، که روش‌های اسپکتروفتومتری یک متغیره و روش‌های اسپکتروفتومتری چند متغیره را شامل می‌شوند.

روش‌های اسپکتروفتومتری یک متغیره شامل روش اسپکتروفتومتری مشتق نسبی طیف‌ها^۱ [۳۱]، تکنیک اسپکتروفتومتری مشتقی^۲ [۳۲]، روش اسپکتروفتومتری تفاضل نسبی (RDSM)^۳ [۳۳-۳۹]، روش فاکتور جذب (AFM)^۴ [۳۶]، روش افزایش استاندارد نقطه اچ (H-point)^۵ [۴۰]، روش میانگین‌گیری مرکزی از طیف نسبی^۶ (MCR) [۳۹، ۴۱-۴۵]، روش تفاضل طیف نسبی گسترده^۷ (EXRSM) [۳۴-۳۶، ۴۶] و روش اندازه‌گیری همزمان با کم کردن مقدار ثابت از طیف

1 -Derivative Ratio Spectra Method

2 -Derivative Spectrophotometry Technique

3 -Ratio Difference Spectrophotometric Method

4 -Absorption Factor Method

5- H-point standard addition method

6 -Mean Centering of Ratio Spectra Method

7 -Extended Ratio Subtraction Method

نسبی^۱ (SRSM) [۳۵, ۳۶] است. در این پایان نامه از سه روش اسپکتروفتومتری EXRSM، SRSM و MCM برای اندازه‌گیری همزمان دو گونه در مخلوط دوتایی آن‌ها که با یکدیگر همپوشانی طیفی دارند، استفاده شده است.

۲-۲- کالیبراسیون

در شیمی تجزیه، کالیبراسیون به فرآیندی اطلاق می‌شود که در آن پاسخ (سیگنال) توسط یک رابطه ریاضی به خاصیتی از آنالیت که معمولاً غلظت است مرتبط می‌شود. هر فرآیند کالیبراسیون به دو مرحله مجزای کالیبراسیون (مدل‌سازی^۲) و پیش‌بینی^۳ تقسیم می‌شود. 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 و 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 می‌گردد. با اندازه‌گیری Y برای نمونه مجهول غلظت آنالیت در آن بر اساس مدل انتخابی تعیین می‌شود.

۲-۳- کالیبراسیون یک متغیره^۴

در کالیبراسیون یک متغیره، تنها یک متغیر مستقل و یک متغیر وابسته وجود دارد. قانون بیر بهترین نمونه از کالیبراسیون یک متغیره است و در اندازه‌گیری غلظت گونه‌ها به روش اسپکتروفتومتری جذب مولکولی مورد استفاده قرار می‌گیرد. طبق این قانون معادله (۲-۲) برقرار است.

$$y = b_0 + b_1x + e \quad (2-2)$$

ضرایب b_0 و b_1 را می‌توان از روش رگرسیون حداقل مربعات محاسبه نمود. به مدل فوق مدل

1 -Simultaneous Ratio Subtraction Method

2 -Modeling

3 -Predictin

4 -Univariate Calibration

کلاسیک^۱ گفته می‌شود و خطای کالیبراسیون (e) به خطا در اندازه‌گیری پاسخ نسبت داده می‌شود. مدل معکوس، مدل دیگری است که در آن فرض می‌شود، اندازه‌گیری دستگاهی دقیق بوده و خطای کالیبراسیون مربوط به خطا در تهیه محلول‌های استاندارد است و به صورت معادله (۳-۲) نشان داده می‌شود.

$$x = b_0 + b_1 y + e \quad (3-2)$$

روش‌های یک متغیره در صورتی استفاده می‌شوند که نمونه‌ها بسیار ساده و عاری از هر گونه مزاحمت باشند. بنابراین استفاده از کالیبراسیون یک متغیره نیازمند شناخت کافی از سیستم مورد آنالیز و همچنین انتخاب روش‌هایی با گزینش‌پذیری بالا است. کالیبراسیون یک متغیره را می‌توان برای روش‌هایی که به راحتی آنالیت را از مزاحمت جدا کنند (کروماتوگرافی)، روش‌های گزینش پذیرتر (روش‌های مختلف اسپکتروسکوپی اتمی)، یا روش‌هایی که سیگنال آنالیت را از سیگنال‌های دیگر جدا نماید (اسپکتروسکوپی مشتقی) و روش‌های مختلف الکتروشیمیایی، با موفقیت به کار برد [۴۷]. همان طور که در بخش (۱-۲) ذکر گردید EXRSM, SRSRSM و MCR از جمله روش‌های اسپکتروفتومتری یک متغیره هستند که نیازی به دستگاه‌های پیچیده و برنامه ریزی کامپیوتری ندارند. در این پایان نامه برای انجام این روش‌ها از نرم افزار Excel (2013) و Matlab (2009) استفاده شد. این روش‌ها دقت و صحت بالایی دارند و همچنین ساده هستند.

۲-۴- کالیبراسیون چند متغیره^۲

کالیبراسیون چند متغیره یک اصطلاح کلی است که به توسعه یک مدل کمی برای پیش‌گویی صحیح ویژگی‌های مورد نظر ($y_1, y_2, y_3, \dots, y_q$) با استفاده از متغیرهای پیش‌گویی کننده ($x_1, x_2, \dots, x_q$) اطلاق می‌شود. در صورت عدم وجود روش‌های گزینش‌پذیر، با استفاده از کالیبراسیون چند متغیره می‌توان یک گونه را در حضور گونه‌های مزاحم یا چند آنالیت را در حضور یکدیگر و بدون جداسازی آنالیز کرد [۴۴]. به بیان دیگر می‌توان گفت آمار چند متغیره، مجموعه‌ای از ابزار قدرتمند ریاضی است و زمانی که بیش از یک اندازه‌گیری برای تجزیه و تحلیل شیمیایی نمونه لازم

¹ -Classical Model

² Multivariate calibration

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

۲-۴-۱- روش توسعه یافته ی تفاضل طیف نسبی (EXRSM)

اولین بار بردیسی^۱ و همکارانش در سال ۲۰۰۸ برای اندازه‌گیری همزمان دو جز در یک مخلوط دوتایی از روش تفاضل طیف نسبی (RSM)^۲ استفاده کردند [۴۸]. سپس در سال ۲۰۱۲ لطفی^۳ و همکارانش با استفاده از مبانی روش RSM، روش EXRSM را ارائه نمودند [۳۴].

روش EXRSM از قانون بیر تبعیت می‌کند (معادله (۴-۲)) که در این روش مخلوط دو گونه حاوی X و Y (معادلات (۵-۲) و (۶-۲)) علاوه بر همپوشانی طیفی دو گونه، طیف یکی از گونه‌ها باید نسبت به گونه دیگر گسترده تر (یعنی در طول موج‌های بلندتری نسبت به گونه دیگر صفر شود) باشد. در این روش می‌توان غلظت هر دو گونه را در مخلوط محاسبه نمود. در روش EXRSM، محلول مخلوط حاوی گونه‌های X و Y (معادله (۷-۲)) می‌باشد، به طوری که Y گونه‌ای با طیف گسترده‌تر - باشد. در این روش ابتدا منحنی کالیبراسیون محلول‌های خالص X و Y در طول موج ماکزیمم هر یک رسم می‌شود و معادله منحنی کالیبراسیون آن‌ها بدست می‌آید.

$$A = abC \quad (۴-۲)$$

$$A_x = a_x b C_x \quad (۵-۲)$$

$$A_y = a_y b C_y \quad (۶-۲)$$

$$A_{x+y(Mix)} = A_x + A_y = a_x b C_x + a_y b C_y \quad (۷-۲)$$

برای بدست آوردن غلظت گونه X، از طیف مرتبه صفر (طیف خالص گونه) Y با یک غلظت معین به عنوان مقسوم علیه (Y') استفاده می‌شود. به این صورت که مطابق معادله (۸-۲) ابتدا طیف مخلوط بر Y' تقسیم می‌شود. مقدار ثابت در ناحیه‌ای که طیف Y نسبت به طیف X گسترده‌تر

1 Bardicy

2 Ratio Subtraction Method

3 Lotfy

است دیده می‌شود و مقدار آن را می‌توان با استفاده از قسمت مسطح و موازی با محور طول موج، به-

دست آورد که در واقع نسبت $\frac{C_y}{C'_y}$ است.

$$\frac{A_{Mix}}{a_y C'_y} = \frac{a_x C_x}{a_y C'_y} + \frac{a_y C_y}{a_y C'_y} = \frac{a_x C_x}{a_y C'_y} + \frac{C_y}{C'_y} \quad (۸-۲)$$

$$\frac{A_{Mix}}{a_y C'_y} = \frac{a_x C_x}{a_y C'_y} + Cte \quad (۹-۲)$$

پس از کسر مقدار ثابت مطابق رابطه (۲-۱۰) و ضرب طیف به دست آمده در طیف Y' ، طیف

مرتبه صفر X به دست می‌آید (رابطه (۲-۱۱)).

$$\frac{a_x C_x}{a_y C'_y} + Cte - Cte = \frac{a_x C_x}{a_y C'_y} \quad (۱۰-۲)$$

$$\frac{a_x C_x}{a_y C'_y} \times a_y C'_y = a_x C_x = A_x \quad (۱۱-۲)$$

غلظت گونه X از اندازه‌گیری جذب در طول موج ماکزیمم طیف‌های خالص مرتبه صفر به دست

آمده و جای‌گذاری مقدار آن در معادله رگرسیون حاصل از منحنی کالیبراسیون گونه X بدست می‌آید.

برای تعیین غلظت گونه Y ، از طیف مرتبه صفر گونه X با یک غلظت معین به عنوان مقسوم

علیه (X') استفاده می‌شود. از تقسیم طیف مرتبه صفر گونه X به دست آمده از مرحله قبل بر X' ،

مقدار ثابت $\frac{C_x}{C'_x}$ محاسبه می‌شود (معادله (۲-۱۲)). طبق معادله (۲-۱۳) طیف مخلوط نیز بر همان

طیف از X' تقسیم می‌شود و سپس مقدار ثابت محاسبه شده با استفاده از معادله (۲-۱۲) از طیف

نسبی حاصل کسر می‌گردد (معادله (۲-۱۴)).

$$\frac{a_x C_x}{a_x C'_x} = cte \quad (۱۲-۲)$$

$$\frac{A_{Mix}}{a_x C'_x} = \frac{a_x C_x}{a_x C'_x} + \frac{a_y C_y}{a_x C'_x} = \frac{a_y C_y}{a_x C'_x} + \frac{C_x}{C'_x} \quad (۱۳-۲)$$

$$\frac{a_y C_y}{a_x C'_x} + cte - cte = \frac{a_y C_y}{a_x C'_x} \quad (۱۴-۲)$$

با توجه به معادله (۲-۱۵) از ضرب طیف نسبی به دست آمده در همان طیف از X' ، طیف مرتبه

صفر Y به دست می آید. غلظت گونه Y از اندازه گیری جذب در طول موج ماکزیمم طیف های خالص مرتبه صفر به دست آمده از معادله (۲-۱۶) و جای گذاری مقدار آن در معادله رگرسیون حاصل از منحنی کالیبراسیون گونه Y به دست می آید [۳۶، ۴۶]. در روش EXRSM، برای رسیدن به بهترین صحت، غلظت مقسوم علیه باید بهینه شود.

$$\frac{a_y C_y}{a_x C'_x} \times a_x C'_x = a_y C_y = A_y \quad (2-15)$$

۲-۴-۲- روش اندازه گیری همزمان با کم کردن مقدار ثابت از طیف نسبی (SRSM)

اساس روش SRSM، روش تفاضل طیف نسبی (RSM) است [۳۴]. در این روش می توان غلظت هر دو گونه را در مخلوط دوجزئی محاسبه نمود. برای استفاده از روش SRSM در مخلوط دو-جزئی علاوه بر همپوشانی طیفی دو گونه، طیف یکی از گونه ها باید نسبت به گونه دیگر گسترده تر باشد. طیف مخلوط در این روش مربوط به گونه های X و Y می باشد و Y گونه ای با طیف گسترده تر است. برای بدست آوردن غلظت گونه X، از طیف مرتبه صفر گونه Y با یک غلظت معین به عنوان مقسوم علیه (Y') استفاده می شود. ابتدا طیف مرتبه صفر X با غلظت های مختلف بر Y' تقسیم می گردد و با استفاده از مقدار سیگنال تجزیه ای در طول موج ماکزیمم طیف های نسبی به دست آمده $(\frac{A_x}{A_y})$ منحنی کالیبراسون رسم می شود. سپس طیف مخلوط نیز بر Y' تقسیم می گردد (معادله ۲-۱۶). مقدار ثابت $(\frac{C_y}{C'_y})$ برای هر طیف نسبی از قسمت مسطح و موازی با محور طول موج در محدوده ای که طیف مرتبه صفر Y جذب دارد ولی طیف مرتبه صفر X جذب ندارد، به دست می آید. طبق معادله (۲-۱۷) مقدار ثابت از طیف نسبی متناظر با آن کم شده و در نتیجه $(\frac{A_x}{A'_y})$ از مخلوطها به دست می آید.

$$\frac{A_{Mix}}{a_y C'_y} = \frac{a_x C_x}{a_y C'_y} + \frac{a_y C_y}{a_y C'_y} = \frac{a_x C_x}{a_y C'_y} + \frac{C_y}{C'_y} \quad (2-16)$$

$$\frac{a_x C_x}{a_y C'_y} + C_{te} - C_{te} = \frac{a_x C_x}{a_y C'_y} = \frac{A_x}{A'_y} \quad (2-17)$$

مقدار جذب نسبی $(\frac{A_x}{A'_y})$ به دست آمده از هر مخلوط، در طول موج ماکزیممی که منحنی

کالیبراسیون نسبی در آن رسم شده است، خواننده و در معادله رگرسیون آن قرار داده می‌شود تا غلظت گونه X بدست آید. برای به‌دست آوردن غلظت گونه Y، مقدار ثابت به‌دست آمده برای هر مخلوط در Y، ضرب می‌گردد (معادله (۲-۱۲)) که طیف خالص مرتبه صفر Y به‌دست می‌آید.

$$cte \times a_y C'_y = \frac{a_y C_y}{a_y C'_y} \times a_y C'_y = a_y C_y = A_y \quad (2-18)$$

برای رسم منحنی کالیبراسیون Y، مقدار جذب در طول موج ماکزیمم جذب بر حسب غلظت محلول خالص Y رسم می‌شود. با اندازه‌گیری سیگنال تجزیه‌ای در طول موج ماکزیمم طیف خالص مرتبه صفر Y به دست آمده طبق معادله (۲-۱۸) و با استفاده از منحنی کالیبراسیون Y، غلظت Y در هر مخلوط محاسبه می‌گردد [۳۷]. روش دیگر برای محاسبه غلظت Y به این صورت است که، با تقسیم طیف محلول‌های استاندارد خالص Y به طیف غلظت معینی از Y (طیف مقسوم علیه، Y')، مقدار ثابت برای محلول استاندارد به‌دست می‌آید. منحنی کالیبراسیون با رسم مقدار ثابت بر حسب غلظت Y، به‌دست می‌آید. سپس با جای‌گذاری مقدار ثابت حاصل از هر مخلوط در منحنی کالیبراسیون مربوط (مقدار ثابت بر حسب غلظت Y) غلظت Y محاسبه می‌گردد. در روش SRSM نیز، برای رسیدن به بهترین صحت، غلظت مقسوم علیه باید بهینه شود.

۲-۴-۳- روش میانگین‌گیری مرکزی از طیف نسبی (MCR)

در سال ۲۰۰۴ افخمی و بهرام یک روش جدید و ساده برای تعیین همزمان مخلوط‌های دوتایی و سه‌تایی بدون مراحل جداسازی اولیه ارائه دادند. این روش بر اساس میانگین‌گیری مرکزی (MC) از طیف نسبی می‌باشد. در این روش از MC طیف نسبی به جای مشتق‌گیری از طیف نسبی استفاده می‌شود. با حذف مراحل مشتق، نسبت سیگنال به نویز افزایش می‌یابد [۴۱]. برخی خواص MC عبارتند از:

۱. MC عدد ثابت صفر است.
۲. یک رابطه داخلی بین مقدار MC و غلظت وجود دارد.
۳. برای حساسیت بیشتر محدوده MC در طول موج ماکزیمم یا مینیمم طیف نسبی آن

تعیین می‌شود.

۴. اگر برداری در یک اسکالر ضرب شود مقدار MC آن هم در آن اسکالر ضرب می‌شود.

یک مخلوط دوتایی حاوی X و Y را در نظر بگیرید. اگر هیچ برهم‌کنشی بین آن‌ها نباشد قانون

بیر-لامبرت به صورت معادله (۲۱-۲) برای آن‌ها نوشته می‌شود.

$$A_x = a_x C_x \quad (۱۹-۲)$$

$$A_y = a_y C_y \quad (۲۰-۲)$$

$$A_{Mix} = a_x C_x + a_y C_y \quad (۲۱-۲)$$

در رابطه‌ی (۲۱-۲)، A_{Mix} بردار جذب مخلوط، a_x و a_y بردار جذب مولی و C_x و C_y غلظت

گونه‌های X و Y می‌باشند. اگر این رابطه بر a_y تقسیم شود اولین طیف نسبی بدست می‌آید (معادله

(۲۲-۲))، که از MC کردن آن معادله (۲۳-۲) نتیجه می‌شود.

$$B = \frac{A_{Mix}}{a_y} = \frac{a_x C_x}{a_y} + C_y \quad (۲۲-۲)$$

$$MC(B) = MC \left[\frac{A_{Mix}}{a_y} \right] = MC \left[\frac{a_x C_x}{a_y} \right] \quad (۲۳-۲)$$

معادله (۲۳-۲) پایه‌ی ریاضی آنالیز ترکیب چند تایی برای تعیین غلظت هر ترکیب (در این

معادله X) را بدون دخالت ترکیب دیگر (Y) در سیستم دوتایی می‌دهد. این معادله نشان می‌دهد که

یک رابطه خطی بین مقدار $MC(B)$ و غلظت X در محلول استاندارد X یا در مخلوط دوتایی آن می-

تواند ایجاد شود. برای حساسیت بیشتر می‌توان مقدار $MC(B)$ را در طول موج ماکزیمم یا مینیمم

اندازه‌گیری کرد. منحنی کالیبراسیون Y نیز مشابه روش توضیح داده شده برای X به دست می‌آید.

[۴۱، ۴۲].

۲-۵- ارزیابی مدل

برای اطمینان از اینکه مدل به دست آمده، مدل مناسبی باشد که توانایی پیشگویی نمونه‌های

مختلفی از یک جمعیت را دارا باشد، باید مدل را ارزیابی کرد. این ارزیابی از طریق شاخص‌های کمی

صورت می‌گیرد که به وسیله آن‌ها صحت نتایج ارائه شده توسط مدل مورد سنجش قرار می‌گیرند.

برخی از این شاخص‌های کمی عبارتند از:

الف) ضریب همبستگی^۱: ساده‌ترین راه برای بررسی میزان همبستگی دو یا چند متغیر، محاسبه آماره‌ی ضریب همبستگی آن‌ها است. ضریب همبستگی دو متغیر X و Y با رابطه (۲۴-۲) تعریف می‌شود. مقدار این آماره بین ۱ تا -۱ متغیر است. مقدار بزرگ‌تر آن نشان دهنده‌ی این است که ارتباط خطی بیشتری میان متغیر وابسته و متغیرهای مستقل وجود دارد.

$$R = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \sum (y_i - \bar{y})^2}} \quad (24-2)$$

ب) ضریب تعیین^۲: به عنوان یک شاخص برای بیان دقت خط رگرسیون برآورد شده، به کار می‌رود و نشان‌دهنده‌ی نسبت تغییرات متغیر وابسته توضیح داده شده توسط متغیر مستقل است. به عنوان مثال R^2 برابر با ۰/۹ نشان می‌دهد که ۹۰/۰۰ درصد تغییرات در متغیر وابسته می‌تواند توسط متغیر مستقل توضیح داده شود. رابطه ریاضی مربوط به ضریب تعیین به صورت زیر می‌باشد:

$$R^2 = \frac{SSR}{SST} = 1 - \frac{SSE}{SST} \quad (25-2)$$

که SSR ^۳ طبق رابطه (۲۶-۲) بیانگر مجموع مربعات انحراف مقادیر پیش‌بینی شده‌ی متغیر وابسته از میانگین مقادیر آن می‌باشد. SST ^۴ طبق رابطه (۲۷-۲) نشانگر مجموع مربعات انحراف مقادیر واقعی متغیر وابسته از میانگین مقادیر آن است. SSE ^۵ نیز مبین مجموع مربعات انحراف مقادیر واقعی متغیر وابسته از مقادیر پیش‌بینی شده برای آن است.

در معادلات زیر (y_i) مقدار واقعی متغیر، $(\bar{y})$ میانگین متغیرها، $(\hat{y}_i)$ مقدار پیش‌بینی شده (تخمین زده شده) متغیر و (n) تعداد متغیرها می‌باشند.

$$SSR = \sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2 \quad (26-2)$$

$$SST = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 \quad (27-2)$$

1- Correlation coefficient

2- Determination coefficient

3- Sum Square Regression

4- Sum Square Total

5- Sum Square Error

$$SSE = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (28-2)$$

بنابراین با توجه به روابط فوق می‌توان نوشت:

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (29-2)$$

طبق رابطه (۲۹-۲) اگر تمام مشاهدات بر روی خط برازش شده قرار گرفته باشند، یعنی به ازای تمام نقاط $y_i = \hat{y}_i$ باشد، مقدار R^2 برابر یک می‌شود و هرگونه انحرافی از این حالت باعث می‌شود که مقدار R^2 از یک کوچکتر شود.

(ج) خطای مطلق میانگین^۱ (MAE)

$$MAE = \frac{\sum_{i=1}^n |y_i - \hat{y}_i|}{n} \quad (30-2)$$

(د) میانگین مربع خطاها^۲ (MSE)

$$MSE = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n} \quad (31-2)$$

(ه) میانگین خطای نسبی^۳ (MRE)

$$MRE = \frac{\sum_{i=1}^n \left| \frac{y_i - \hat{y}_i}{y_i} \right|}{n} \times 100 \quad (32-2)$$

1 - Mean Absolute Error

2 - Mean Square Error

3 - Mean Relative Error

فصل سوم

بخش تجربی

۳-۱- اندازه‌گیری همزمان متیل‌ویولت و تولوئیدین‌بلو با روش‌های جدید

اسپکتروفتومتری

مطابق آنچه که در فصل اول درباره اهمیت اندازه‌گیری همزمان رنگ‌های متیل‌ویولت و تولوئیدین‌بلو ذکر گردید و بر اساس مطالعات انجام شده، روش‌های SRSM, EXRSM و MCM برای اندازه‌گیری همزمان این دو رنگ در نمونه‌های حقیقی با آشکارسازی اسپکتروفتومتری طراحی و به کار گرفته شد. در این فصل نتایج تجربی حاصل از روش‌های به کار برده شده ارائه خواهد شد.

۳-۱-۱- مواد شیمیایی مورد استفاده

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

جدول ۳-۱: مواد شیمیایی مورد استفاده

نام ماده شیمیایی	فرمول	شرکت سازنده
متیل‌ویولت	$C_{25}H_{30}ClN_3$	مرک ^۱
تولوئیدین‌بلو	$C_{15}H_{16}ClN_3S$	مرک
سیتریک اسید منو هیدرات	$H_3C_6H_5O_7 \cdot H_2O$	مرک
دی سدیم هیدروژن فسفات	Na_2HPO_4	مرک
پتاسیم دی هیدروژن فسفات	KH_2PO_4	مرک
پتاسیم هیدروژن فتالات	$C_8H_5KO_4$	مرک
هیدروکلریدریک اسید	HCl	مرک
سدیم هیدروکسید	NaOH	مرک
اتانول	C_2H_5OH	مرک

۳-۱-۲- محلول‌های استفاده شده و طرز تهیه آن‌ها

➤ محلول‌های مادر ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر متیل‌ویولت یا تولوئیدین‌بلو، از حل کردن ۰/۱۰۰۰ گرم از هر کدام در ۵/۰۰ میلی‌لیتر اتانول و سپس به حجم رساندن با آب مقطر در یک بالن حجمی ۱۰۰ میلی‌لیتری تهیه شد. محلول‌های با غلظت کم‌تر روزانه از رقیق سازی این محلول‌ها تهیه گردید.

1- Merck

- محلول‌های بافر فسفاتی در $pH=4/8-8/0$ ، از اختلاط حجم‌های مناسبی از محلول‌های $0/0667$ مولار دی‌سدیم هیدروژن فسفات و $0/0667$ مولار پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات و تنظیم pH آن‌ها به کمک pH متر تهیه شدند [۴۹].
- برای تهیه محلول‌هایی با مقادیر $pH=2/0-4/0$ ، از محلول‌های فسفریک اسید $1/0$ مولار و پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات $0/0667$ مولار استفاده شد.
- برای تهیه محلول بافر سیتراتی با $pH=3/0$ ، ابتدا $2/1014$ گرم از سیتریک اسید منو-هیدرات به همراه $20/0$ میلی‌لیتر سود ($1/00$ مولار) به یک بالن حجمی 100 میلی-لیتری اضافه گردید و با آب مقطر تا خط نشانه به حجم رسانده و یکنواخت شد. سپس $40/0$ میلی‌لیتر از این محلول با $60/0$ میلی‌لیتر از هیدروکلریدریک اسید ($0/10$ مولار) مخلوط شد و pH محلول به کمک pH متر تا $pH=3/0$ تنظیم شد [۴۹].
- بافر فتالاتی با $pH=3/0$ ، از مخلوط کردن حجم‌های مناسبی از محلول پتاسیم هیدروژن-فتالات $0/20$ مولار و محلول هیدروکلریدریک اسید $0/10$ مولار و تنظیم pH محلول به کمک pH متر تهیه گردید [۴۹].

۳-۱-۳- دستگاه‌ها و وسایل مورد استفاده

- برای ثبت طیف‌های جذبی نوری محلول‌ها در ناحیه مرئی (ناحیه طول موجی $400-750$ نانومتر)، از دستگاه اسپکتروفتومتر دو پرتویی ریلی^۱ مدل UV-2601 مجهز به یک جفت سل کوارتز $1/00$ سانتی‌متری استفاده شد.
- اندازه‌گیری‌های pH به وسیله دستگاه pH متر دیجیتالی، ساخت شرکت متر اهم^۲ مدل 780 با دقت $0/001$ واحد pH مجهز به الکترود ترکیبی شیشه‌ای - کالومل ($3/0$ مولار پتاسیم کلرید) انجام گرفت.

1- UV-2601 Rayleigh

2-Metrohm

3-Sartorius

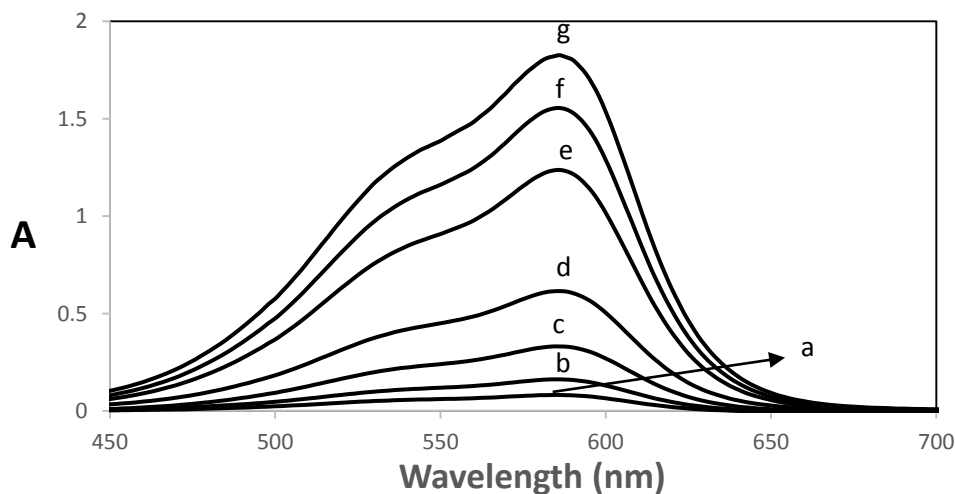
➤ جهت توزین مواد از ترازوی سارتریوس^۳ مدل A200S با دقت ۰/۱ میلی گرم استفاده شد.

۳-۱-۴- ثبت طیف جذبی

برای ثبت طیف‌های جذبی نمونه به طریق زیر عمل شد: برای تهیه محلول متیل‌ویولت با غلظت ۰/۱۰-۱۲/۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، به این ترتیب عمل شد، که حجم معینی از محلول ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر متیل‌ویولت، به همراه ۲/۰۰ میلی‌لیتر از محلول بافر سیتراتی با $\text{pH}=3/0$ به یک بالن حجمی ۱۰ میلی‌لیتری اضافه شد. پس از به حجم رساندن محلول با آب مقطر و یکنواخت کردن محلول حاصل، مقداری از آن به سل دستگاه منتقل شد. محلول شاهد همانند محلول نمونه تهیه شد با این تفاوت که به آن محلول متیل‌ویولت اضافه نشد. در نهایت طیف محلول متیل‌ویولت نسبت به محلول شاهد در گستره طول‌موجی ۴۵۰-۷۰۰ نانومتر ثبت گردید. برخی از این طیف‌ها در شکل ۳-۱ آمده است. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، ماکزیمم جذب مربوط به متیل‌ویولت در طول موج ۵۸۶ نانومتر مشاهده می‌شود. برای تهیه محلول تولوئیدین‌بلو نیز مراحل ذکر شده برای متیل‌ویولت انجام شد. با این تفاوت که محلول تولوئیدین‌بلو با غلظت‌های ۰/۴۰-۲۰/۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، با انتقال حجم معینی از محلول ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تولوئیدین‌بلو، به همراه ۲/۰۰ میلی‌لیتر از محلول بافر سیتراتی با $\text{pH}=3/0$ به یک بالن حجمی ۱۰ میلی‌لیتری و رقیق سازی با آب مقطر تهیه گردید. طیف‌های جذبی برای غلظت‌های مختلف تولوئیدین‌بلو در (شکل ۳-۲) نشان داده شده است. با توجه به شکل، ماکزیمم جذب مربوط به تولوئیدین‌بلو در طول موج ۶۱۲ نانومتر مشاهده می‌شود.

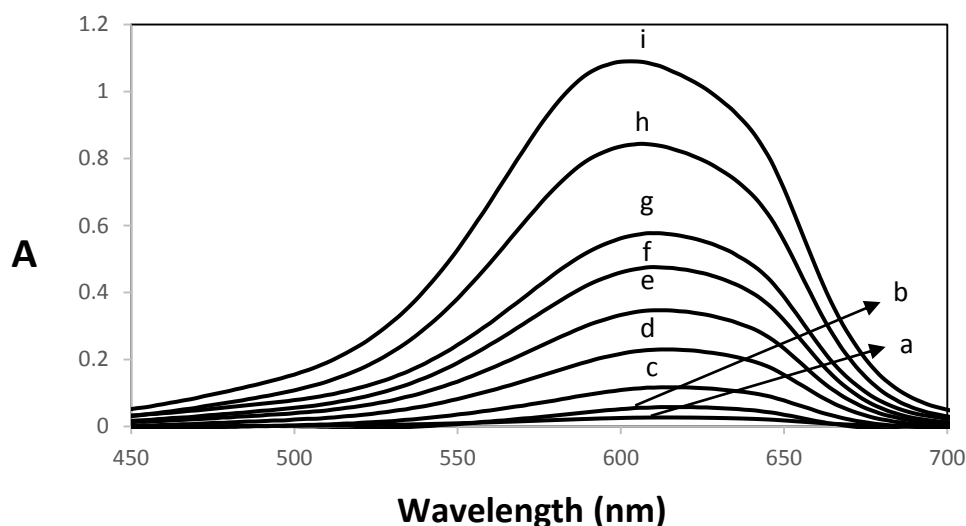
جزئیات طیفی محلول‌های متیل‌ویولت، تولوئیدین‌بلو و مخلوط حاوی این دو گونه برای مقایسه در شکل ۳-۳ آورده شده است. برای ثبت طیف جذبی محلول نمونه به این ترتیب عمل شد که به یک بالن حجمی ۱۰ میلی‌لیتری به ترتیب ۱/۰۰ میلی‌لیتر محلول تولوئیدین‌بلو با غلظت ۵۰/۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر یا ۱/۰۰ میلی‌لیتر متیل‌ویولت با غلظت ۲۵/۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۲/۰۰ میلی‌لیتر از محلول بافر سیتراتی با $\text{pH}=3/0$ اضافه و پس از به حجم رساندن با آب مقطر و یکنواخت کردن محلول حاصل، مقداری از محلول به سل دستگاه منتقل شد. محلول شاهد همانند

محلول نمونه تهیه گردید با این تفاوت که به آن محلول متیل ویولت یا تولوئیدین بلو اضافه نشد. برای ثبت طیف جذبی مخلوط به این ترتیب عمل شد که به یک بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری ۱/۰۰ میلی لیتر محلول تولوئیدین بلو با غلظت ۵۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و ۱/۰۰ میلی لیتر متیل ویولت با غلظت ۲۵/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و ۲/۰۰ میلی لیتر از محلول بافر سیتراتی با $\text{pH}=3/00$ اضافه و پس از به حجم رساندن با آب مقطر و یکنواخت کردن محلول حاصل، مقداری از محلول به سل دستگاه منتقل شد. محلول شاهد همانند محلول نمونه تهیه گردید با این تفاوت که به آن محلول متیل ویولت و تولوئیدین بلو اضافه نشد. طیف محلول ها نسبت به محلول شاهد در گستره طول موجی ۴۵۰-۷۰۰ نانومتر ثبت گردید (شکل ۳-۳). همان طور که در شکل ۳-۳ مشاهده می شود امکان اندازه گیری هر یک از این دو رنگ به صورت جداگانه در یک مخلوط به روش اسپکتروفتومتری معمولی مستقیم امکان پذیر نمی باشد. لذا برای اندازه گیری این دو گونه در مخلوط از روش های اسپکتروفتومتری جدید (SRSM و EXRSM) [۳۴] و روش MCM استفاده گردید.



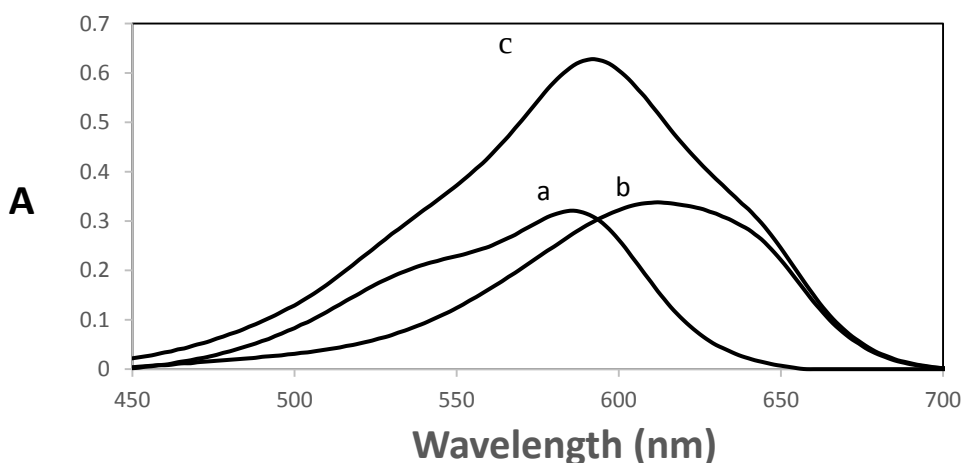
شکل ۳-۱: طیف جذبی متیل ویولت

شرایط: محلول متیل ویولت (a) ۰/۵۰، (b) ۱/۰۰، (c) ۲/۰۰، (d) ۴/۰۰، (e) ۸/۰۰، (f) ۱۰/۰۰، (g) ۱۲/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و ۲/۰۰ میلی لیتر محلول بافر سیتراتی با $\text{pH}=3/00$ در بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری.



شکل ۳-۲: طیف جذبی تولوئیدین بلو

شرایط: محلول تولوئیدین بلو (a) ۰/۴۰، (b) ۱/۰۰، (c) ۲/۰۰، (d) ۴/۰۰، (e) ۶/۰۰، (f) ۸/۰۰، (g) ۱۰/۰۰، (h) ۱۵/۰۰، (i) ۲۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و ۲/۰۰ میلی لیتر محلول بافر سیتراتی با $\text{pH}=3/00$ در بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری.



شکل ۳-۳: طیف جذبی محلول های خالص و مخلوط متیل ویولت و تولوئیدین بلو

شرایط: (a) طیف جذبی محلول ۲/۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر متیل ویولت، (b) طیف جذبی محلول ۵/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تولوئیدین بلو، (c) طیف جذبی محلول مخلوط ۲/۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر متیل ویولت و ۵/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تولوئیدین بلو در بافر سیتراتی با $\text{pH}=3/0$.

شکل های (۱-۳) و (۲-۳) نشان می دهد که پیک های جذبی در طول موج های ۵۸۶ و ۶۱۲

نانومتر به ترتیب با غلظت متیل ویولت و تولوئیدین بلو متناسب است؛ بنابراین در بهینه سازی متغیرهای تجربی موثر بر حساسیت روش و استخراج منحنی های کالیبراسیون برای هر یک از ترکیبات، از مقدار جذب محلول ها در طول موج های ذکر شده، به عنوان سیگنال تجزیه ای استفاده شد.

۳-۱-۵- بررسی و بهینه‌سازی پارامترهای مؤثر بر سیستم

به منظور فراهم نمودن بهترین حساسیت و گزینش پذیری و در نتیجه بهترین حد تشخیص، متغیرهای مؤثر بر میزان جذب متیل‌ویولت و تولوئیدین‌بلو در طول موج ماکزیمم هر یک مورد بررسی قرار گرفته و بهینه شدند. در بررسی متغیرها از روش بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان استفاده گردید. در این روش برای بهینه‌سازی یک متغیر، سایر متغیرها ثابت در نظر گرفته می‌شود و فقط پارامتری که باید بهینه شود تغییر می‌کند تا بیشترین میزان پاسخ به دست آید. پارامترهای بررسی شده عبارتند از:

۱. اثر pH

۲. نوع بافر

۳. حجم بافر

۴. قدرت یونی

۳-۱-۵-۱- بررسی اثر pH

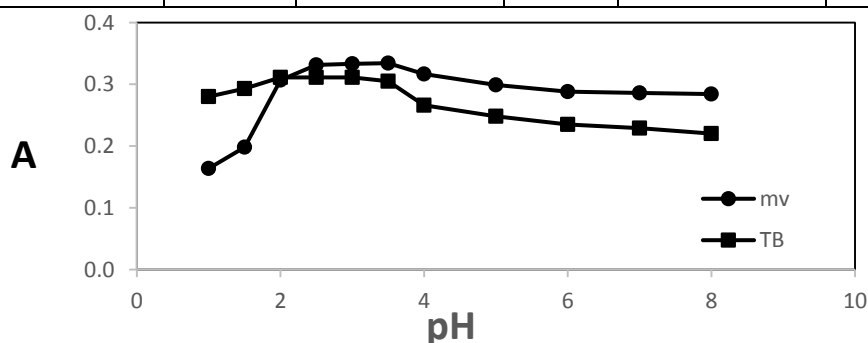
اثر pH بر جذب و طول موج ماکزیمم جذب متیل‌ویولت در دامنه ۱/۰ تا ۸/۰ pH واحد مورد بررسی قرار گرفت. در بررسی اثر pH، محلول‌های بافر با pH های ۲/۰ تا ۸/۰ مطابق بخش (۳-۱-۲) تهیه شد و برای pH های ۱/۰۰ و ۱/۵۰ از افزایش مقدار مناسبی از هیدروکلریدریک اسید (۱/۰۰ مولار) به بافر فسفاتی استفاده و pH محلول به کمک pH متر تنظیم شد.

این بررسی به صورت زیر انجام شد: ابتدا ۱/۰۰ میلی‌لیتر محلول ۲۵/۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر متیل‌ویولت به همراه ۱/۰۰ میلی‌لیتر محلول بافر در pH مورد نظر به بالن حجمی ۱۰ میلی‌لیتری منتقل و محلول با آب مقطر تا خط نشانه رقیق و یکنواخت گردید. سپس قسمتی از آن به سل دستگاه منتقل شد. محلول شاهد همانند محلول نمونه تهیه گردید با این تفاوت که به آن محلول متیل‌ویولت اضافه نشد. طیف محلول متیل‌ویولت نسبت به محلول شاهد در دامنه طول موج ۷۰۰-۴۵۰ نانومتر ثبت شد و سپس در هر pH برای هر محلول، طول موجی که بیشترین جذب را داشت

شناسایی و ثبت گردید. به همین صورت برای محلول تولوئیدین بلو عمل شد با این تفاوت که به جای محلول متیل ویولت، ۱/۰۰ میلی لیتر محلول ۵۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر محلول تولوئیدین بلو اضافه شد. نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۳-۲ و شکل ۳-۴ نشان می دهند که اختلاف طول موج متیل ویولت و تولوئیدین بلو در pH های کمتر از ۲/۰ کاهش یافته است که بیانگر افزایش همپوشانی طیف ها در این ناحیه از pH است. بنابراین اندازه گیری در pH های کمتر از ۲/۰ مناسب نمی باشد. همچنین مشخص گردید، میزان جذب برای متیل ویولت در pH های ۲/۵ تا ۳/۵ و تولوئیدین بلو در pH های ۲/۰ تا ۳/۵ بیشترین مقدار را دارد، به همین جهت $pH=3/0$ به عنوان pH بهینه انتخاب گردید.

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

اختلاف طول موج متیل ویولت و تولوئیدین بلو	تولوئیدین بلو		متیل ویولت		pH
	جذب	طول موج (نانومتر)	جذب	طول موج (نانومتر)	
۲/۰	۰/۲۸۰	۶۱۲/۰	۰/۱۶۴	۶۱۴/۰	۱/۰
۱۸/۰	۰/۲۹۳	۶۱۲/۰	۰/۱۹۸	۵۹۴/۰	۱/۵
۲۶/۰	۰/۳۱۱	۶۱۲/۰	۰/۳۰۷	۵۸۶/۰	۲/۰
۲۶/۰	۰/۳۱۱	۶۱۲/۰	۰/۳۳۱	۵۸۶/۰	۲/۵
۲۶/۰	۰/۳۱۱	۶۱۲/۰	۰/۳۳۳	۵۸۶/۰	۳/۰
۲۶/۰	۰/۳۰۵	۶۱۲/۰	۰/۳۳۴	۵۸۶/۰	۳/۵
۲۶/۰	۰/۲۶۶	۶۱۲/۰	۰/۲۱۷	۵۸۶/۰	۴/۰
۲۶/۰	۰/۲۴۸	۶۱۲/۰	۰/۲۹۹	۵۸۶/۰	۵/۰
۲۶/۰	۰/۲۳۵	۶۱۲/۰	۰/۲۸۸	۵۸۶/۰	۶/۰
۲۶/۰	۰/۲۲۹	۶۱۲/۰	۰/۲۸۶	۵۸۶/۰	۷/۰
۲۶/۰	۰/۲۲۰	۶۱۲/۰	۰/۲۸۴	۵۸۶/۰	۸/۰



شکل ۳-۴: بررسی اثر pH با بافر فسفاتی با استفاده از جذب در طول موج ماکزیمم هر pH شرایط: محلول های متیل ویولت (۲/۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر) یا تولوئیدین بلو (۵/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) در حضور ۱/۰۰ میلی لیتر بافر با pH های مختلف در بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری.

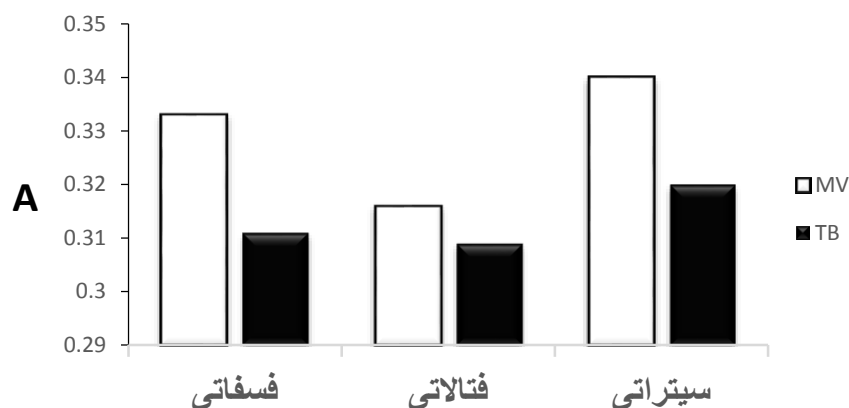
۳-۱-۵-۲- بررسی اثر نوع بافر

پس از بررسی اثر pH بر روی میزان جذب، برای دستیابی به حساسیت بیشتر، اثر نوع بافر بر جذب متیل ویولت توسط بافرهای فسفاتی، فتالاتی و سیتراتی با $\text{pH}=3/0$ مورد بررسی قرار گرفت. در این مرحله روش کار به شیوه زیر بود:

ابتدا ۱/۰ میلی لیتر از بافر مورد نظر با $\text{pH}=3/0$ و ۱/۰۰ میلی لیتر محلول ۲۵/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر متیل ویولت به بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری منتقل و محلول با آب مقطر تا خط نشانه رقیق و یکنواخت گردید. سپس قسمتی از آن به سل دستگاه منتقل شد. محلول شاهد همانند محلول نمونه تهیه شد با این تفاوت که به آن محلول متیل ویولت اضافه نشد. در نهایت طیف محلول متیل ویولت نسبت به محلول شاهد ثبت گردید و جذب در طول موج ماکزیمم آن اندازه گیری و ثبت شد. به همین صورت برای محلول تولوئیدین بلو عمل شد با این تفاوت که به جای محلول متیل ویولت، ۱/۰۰ میلی لیتر محلول ۵۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تولوئیدین بلو به بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری اضافه شد. نتایج حاصل از این بررسی (جدول ۳-۳ و شکل ۳-۵) نشان می دهند که با استفاده از بافر سیتراتی، بیشترین میزان جذب مشاهده می شود، لذا برای بررسی های بعدی بافر سیتراتی با $\text{pH}=3/0$ انتخاب گردید.

جدول ۳-۳: بررسی اثر نوع بافر بر جذب

نوع بافر	متیل ویولت (۵۸۶ نانومتر)	تولوئیدین بلو (۶۱۲ نانومتر)
سیتراتی	۰/۳۴۰	۰/۳۲۰
فتالاتی	۰/۳۱۶	۰/۳۰۹
فسفاتی	۰/۳۳۳	۰/۳۱۱



شکل ۳-۵: بررسی اثر نوع بافر بر جذب
شرایط: محلول متیل ویولت (۲/۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر) یا تولوئیدین بلو (۵/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) در حضور ۱/۰۰ میلی لیتر از بافر مورد نظر با $pH=3/00$ در بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری.

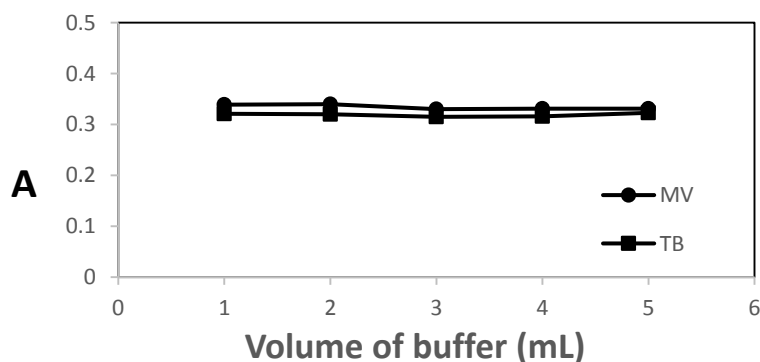
۳-۵-۱-۳- بررسی اثر حجم بافر

بعد از بررسی اثر نوع بافر بر روی میزان جذب، اثر حجم بافر سیتراتی با $pH=3/0$ در دامنه ۵/۰۰-۱/۰۰ میلی لیتر از بافر سیتراتی مورد بررسی قرار گرفت. این بررسی به صورت زیر انجام شد: ۱/۰۰ میلی لیتر محلول ۲۵/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر متیل ویولت به همراه حجم‌های مختلفی از بافر سیتراتی با $pH=3/0$ به بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری منتقل و با آب مقطر تا خط نشانه رقیق و یکنواخت گردید. سپس قسمتی از آن به سل دستگاه منتقل شد. محلول شاهد همانند محلول نمونه تهیه گردید با این تفاوت که به آن محلول متیل ویولت اضافه نشد. در نهایت طیف محلول متیل ویولت نسبت به محلول شاهد ثبت شد و جذب در طول موج ماکزیمم آن (۵۸۶ نانومتر) اندازه‌گیری و ثبت گردید. به همین صورت برای محلول تولوئیدین بلو عمل شد با این تفاوت که به جای محلول متیل ویولت، ۱/۰۰ میلی لیتر محلول ۵۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تولوئیدین بلو به بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری اضافه شد.

نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۳-۴ و شکل ۳-۶ نتایج نشان می‌دهند که میزان جذب رنگ‌ها در حجم‌های مختلف از بافر سیتراتی تقریباً ثابت است. برای اطمینان از کافی بودن ظرفیت بافری، حجم ۲/۰۰ میلی لیتر از بافر سیتراتی برای مطالعات و بررسی‌های بعدی انتخاب شد.

جدول ۳-۴: نتایج حاصل از بررسی حجم بافر

جذب		حجم بافر (میلی لیتر)
تولوئیدین بلو (۶۱۲ نانومتر)	متیل ویولت (۵۸۶ نانومتر)	
۰/۳۲۱	۰/۳۳۹	۱/۰۰
۰/۳۲۰	۰/۳۳۹	۲/۰۰
۰/۳۱۵	۰/۳۳۰	۳/۰۰
۰/۳۱۶	۰/۳۳۱	۴/۰۰
۰/۳۲۳	۰/۳۳۱	۵/۰۰



شکل ۳-۶: بررسی اثر حجم بافر

شرایط: محلول متیل ویولت (۲/۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر) یا تولوئیدین بلو (۵/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) در حضور حجم‌های مختلف از بافر سیتراتی pH=۳/۰ در بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری.

۳-۱-۵-۴- بررسی اثر قدرت یونی

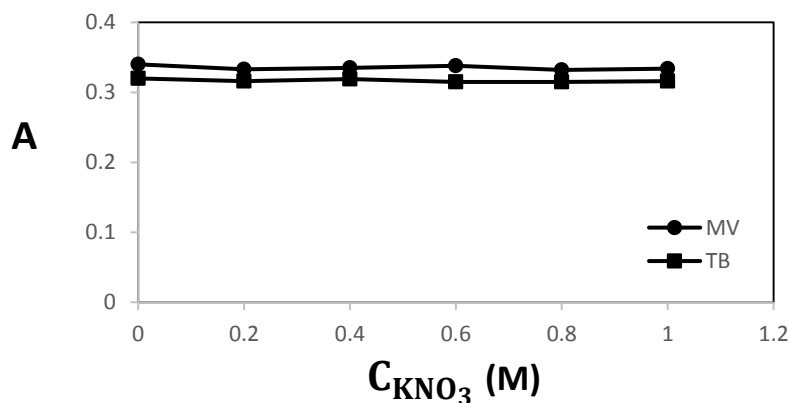
پارامتر دیگری که می‌تواند روی جذب محلول‌های مورد بررسی اثر بگذارد، قدرت یونی است. برای بررسی اثر قدرت یونی از محلول پتاسیم نیترات ۲/۰۰ مولار استفاده شد.

این بررسی به صورت زیر انجام گرفت: ۱/۰۰ میلی لیتر محلول ۲۵/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر متیل ویولت و ۲/۰۰ میلی لیتر بافر سیتراتی با pH=۳/۰ به همراه حجم‌های مختلفی از محلول پتاسیم نیترات ۲/۰۰ مولار به بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری منتقل و محلول با آب مقطر تا خط نشانه رقیق و یکنواخت گردید. سپس قسمتی از آن به سل دستگاه منتقل شد. در نهایت طیف محلول متیل ویولت نسبت به محلول شاهد ثبت گردید. به همین صورت برای محلول تولوئیدین بلو عمل شد با این تفاوت که به جای محلول متیل ویولت، ۱/۰۰ میلی لیتر محلول ۵۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تولوئیدین بلو به

بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری اضافه شد. برای محلول شاهد ۲/۰۰ میلی لیتر بافر سیتراتی با $\text{pH}=3/0$ به بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری اضافه گردید و محلول با آب مقطر تا خط نشانه رقیق و یکنواخت گردید. نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۳-۵ و شکل ۳-۷ نشان می دهند که در دامنه غلظتی ۰/۰۰ تا ۱/۰۰ مولار پتاسیم نیترات قدرت یونی تأثیری بر میزان جذب رنگ ها و حساسیت روش ندارد.

جدول ۳-۵: نتایج حاصل از بررسی قدرت یونی

جذب		غلظت
متیل ویولت (۵۸۶ نانومتر)	تولوئیدین بلو (۶۱۲ نانومتر)	پتاسیم نیترات (مولار)
۰/۳۴۰	۰/۳۲۰	۰/۰۰
۰/۳۳۳	۰/۳۱۶	۰/۲۰
۰/۳۳۵	۰/۳۱۹	۰/۴۰
۰/۳۳۸	۰/۳۱۵	۰/۶۰
۰/۳۳۲	۰/۳۱۵	۰/۸۰
۰/۳۳۴	۰/۳۱۶	۱/۰۰



شکل ۳-۷: بررسی اثر قدرت یونی

شرایط: محلول متیل ویولت ۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر یا تولوئیدین بلو ۵/۰ میکروگرم بر میلی لیتر، ۲/۰ میلی - لیتر بافر سیتراتی $\text{pH}=3/0$.

۳-۱-۶- شرایط بهینه

با توجه به نتایج تجربی حاصل در بررسی و بهینه سازی پارامترهای موثر بر میزان جذب متیل - ویولت و تولوئیدین بلو در طول موج های ماکزیمم مربوطه، شرایط بهینه با افزایش ۲/۰۰ میلی لیتر بافر سیتراتی با $\text{pH}=3/0$ حاصل شد.

۳-۱-۷- رسم منحنی کالیبراسیون

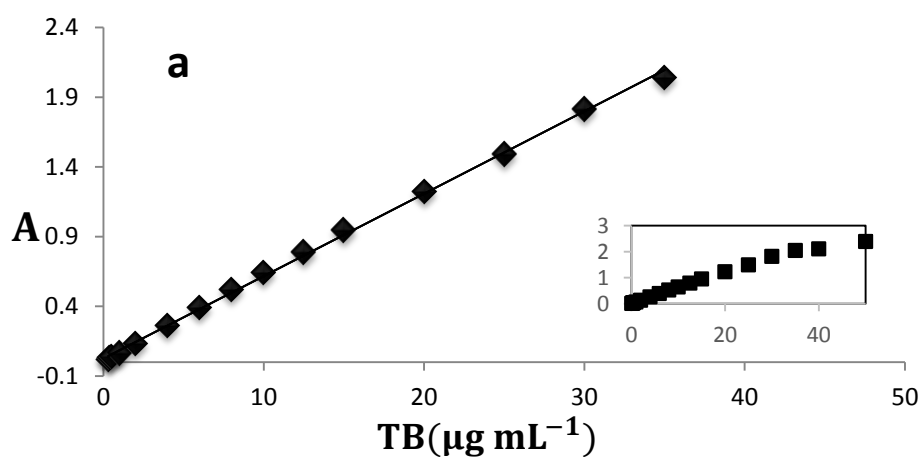
به منظور تعیین مقدار تولوئیدین بلو و متیل ویولت، منحنی کالیبراسیون به صورت جداگانه به دست آمد. منحنی کالیبراسیون متیل ویولت به صورت زیر به دست آمد.

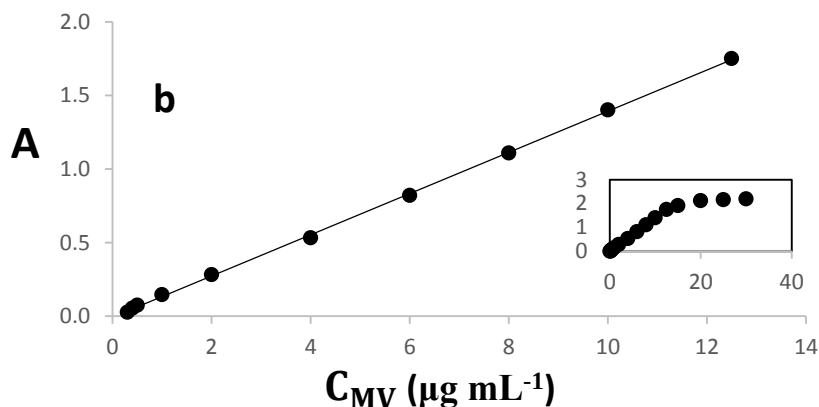
برای تهیه محلول متیل ویولت با غلظت‌های ۰/۱۰-۳۰/۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، به این ترتیب عمل شد که حجم معینی از محلول ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر متیل ویولت برداشته و به همراه ۲/۰۰ میلی‌لیتر از محلول بافر سیتراتی با $\text{pH}=3/0$ به یک بالن حجمی ۱۰ میلی‌لیتری اضافه شد. پس از به حجم رساندن محلول با آب مقطر و یکنواخت کردن محلول حاصل، مقداری از آن به سل دستگاه منتقل شد. محلول شاهد همانند محلول نمونه تهیه گردید، با این تفاوت که به آن محلول متیل ویولت اضافه نگردید. سپس قسمتی از محلول به سل دستگاه اسپکتروفتومتر منتقل شد و طیف هر محلول نسبت به شاهد در دامنه ۷۰۰-۴۵۰ نانومتر ثبت گردید. برای تهیه محلول تولوئیدین بلو نیز مراحل ذکر شده برای متیل ویولت انجام شد. با این تفاوت که محلول تولوئیدین بلو با غلظت‌های ۰/۱۰-۵۰/۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، از برداشتن حجم معینی از محلول ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تولوئیدین بلو، به همراه ۲/۰۰ میلی‌لیتر از محلول بافر سیتراتی با $\text{pH}=3/0$ به یک بالن حجمی ۱۰ میلی‌لیتری اضافه گردید. در ادامه میزان جذب در طول موج‌های ۵۸۶ و ۶۱۲ نانومتر به ترتیب برای متیل ویولت و تولوئیدین بلو اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل در جدول ۳-۶ آورده شده است.

در نهایت نمودار میزان جذب متیل ویولت نسبت به غلظت متیل ویولت و میزان جذب تولوئیدین بلو نسبت به غلظت تولوئیدین بلو، به عنوان منحنی کالیبراسیون رسم شد که این نمودارها در شکل ۳-۸ نشان داده شده است. سپس معادله بهترین خط برای منحنی درجه بندی از روش رگرسیون حداقل مربعات به دست آمد (جدول ۳-۷).

جدول ۳-۶: تغییرات جذب بر حسب غلظت متیل ویولت و تولوئیدین بلو

جذب		غلظت بر حسب (میکروگرم بر میلی لیتر)
متیل ویولت (۵۸۶ نانومتر)	تولوئیدین بلو (۶۱۲ نانومتر)	
۰/۰۰۱	۰/۰۰۹	۰/۱۰
۰/۰۰۸	۰/۰۱۸	۰/۲۰
۰/۰۲۶	۰/۰۲۰	۰/۳۰
۰/۰۵۳	۰/۰۳۰	۰/۴۰
۰/۰۷۴	۰/۰۳۹	۰/۵۰
۰/۱۴۶	۰/۰۶۵	۱/۰۰
۰/۲۸۱	۰/۱۳۲	۲/۰۰
۰/۵۳۲	۰/۲۵۶	۴/۰۰
۰/۸۲۰	۰/۳۹۲	۶/۰۰
۱/۱۰۸	۰/۵۲۴	۸/۰۰
۱/۴۰۱	۰/۶۴۳	۱۰/۰۰
۱/۷۵۰	۰/۷۹۰	۱۲/۵۰
۱/۹۱۴	۰/۹۴۷	۱۵/۰۰
۲/۱۲۲	۱/۲۲۵	۲۰/۰۰
۲/۱۶۲	۱/۴۵۳	۲۵/۰۰
۲/۱۹۸	۱/۷۱۵	۳۰/۰۰
-	۲/۰۴۲	۳۵/۰۰
-	۲/۱۰۳	۴۰/۰۰
-	۲/۳۸۹	۵۰/۰۰





شکل ۳-۸: (a) منحنی کالیبراسیون تولوئیدین بلو (b) منحنی کالیبراسیون متیل ویولت
تحت شرایط بهینه: (a) ۵۰/۰۰ - ۰/۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر از محلول استاندارد تولوئیدین بلو (b) ۳۰/۰۰ - ۰/۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر محلول استاندارد متیل ویولت، هر کدام در حضور ۲/۰۰ میلی لیتر از بافر سیتراتی با $\text{pH}=3$ در در بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری.

جدول ۳-۷: نتایج حاصل از کالیبراسیون به صورت جداگانه

ترکیب	جذب متیل ویولت (۵۸۶ نانومتر)	جذب تولوئیدین بلو (۶۱۲ نانومتر)
ناحیه خطی بر حسب (میکرو گرم بر میلی لیتر)	۰/۳۰ - ۱۲/۵۰	۰/۳۰ - ۳۵/۰۰
معادله رگرسیون	$A = 0.1399 C_{MV} - 0.0063$ (n=10)	$A = 0.0591 C_{TB} + 0.0259$ (n=15)
R^2	۰/۹۹۹۷	۰/۹۹۹۲

در جدول ۳-۷ نشانه‌های A ، R^2 ، C_{TB} و C_{MV} به ترتیب نشان دهنده سیگنال تجزیه‌ای مربوط به هر گونه (جذب محلول نمونه نسبت به محلول شاهد) در طول موج ماکزیمم به هر گونه، ضریب تعیین، غلظت تولوئیدین بلو و غلظت متیل ویولت بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر برای هر نمودار می‌باشند.

۳-۱-۸- محلول سازی سری ارزیابی و تست

برای اندازه‌گیری همزمان متیل ویولت و تولوئیدین بلو از روش‌های اسپکتروفتومتری جدید (EXRSM و SRSM) و روش MCM استفاده شد. به منظور بررسی صحت این روش‌ها، محلول‌های سری ارزیابی و محلول‌های سری تست، حاوی هر دو رنگ تهیه و طیف آن‌ها نسبت به محلول شاهد در دامنه ۴۵۰-۷۰۰ نانومتر ثبت و مورد بررسی قرار گرفت.

روش تهیه محلول‌های مختلف سری ارزیابی و تست به این صورت بود: به یک سری بالن حجمی ۱۰ میلی‌لیتری، ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر سیتراتی با $\text{pH} = ۳/۰$ منتقل و همچنین حجم‌های ۰/۰۰ تا ۴/۰۰ میلی‌لیتر از محلول ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تولوئیدین‌بلو و نیز حجم ۰/۰۰ تا ۲/۵۰ میلی‌لیتر از محلول ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر متیل ویولت افزوده و با آب مقطر به حجم رسانده شد. محلول شاهد نیز مثل محلول نمونه تهیه گردید با این تفاوت که به آن تولوئیدین‌بلو و متیل‌ویولت افزوده نشد. سپس طیف هر مخلوط نسبت به محلول شاهد در گستره ۷۰۰-۴۵۰ نانومتر ثبت و ذخیره گردید. غلظت مخلوط‌های ساخته شده در سری ارزیابی و تست به ترتیب در (جدول ۳-۸) و (جدول ۳-۹) آورده شده است.

جدول ۳-۸: مخلوط‌های سری ارزیابی

شماره مخلوط	متیل ویولت (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	تولوئیدین بلو (میکروگرم بر میلی‌لیتر)
۱	۰/۵۰	۱/۰۰
۲	۱/۰۰	۱/۰۰
۳	۲/۵۰	۱/۰۰
۴	۵/۰۰	۱/۰۰
۵	۷/۵۰	۱/۰۰
۶	۱۰/۰۰	۱/۰۰
۷	۱۲/۵۰	۱/۰۰
۸	۰/۵۰	۵/۰۰
۹	۱/۰۰	۵/۰۰
۱۰	۲/۵۰	۵/۰۰
۱۱	۵/۰۰	۵/۰۰
۱۲	۷/۵۰	۵/۰۰
۱۳	۱۰/۰۰	۵/۰۰
۱۴	۱۲/۵۰	۵/۰۰
۱۵	۰/۵۰	۱۰/۰۰
۱۶	۱/۰۰	۱۰/۰۰
۱۷	۲/۵۰	۱۰/۰۰
۱۸	۵/۰۰	۱۰/۰۰
۱۹	۷/۵۰	۱۰/۰۰
۲۰	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰
۲۱	۱۲/۵۰	۱۰/۰۰
۲۲	۰/۵۰	۱۵/۰۰

شماره مخلوط	متیل ویولت (میکروگرم بر میلی لیتر)	تولوئیدین بلو (میکروگرم بر میلی لیتر)
۲۳	۱/۰۰	۱۵/۰۰
۲۴	۲/۵۰	۱۵/۰۰
۲۵	۵/۰۰	۱۵/۰۰
۲۶	۷/۵۰	۱۵/۰۰
۲۷	۱۰/۰۰	۱۵/۰۰
۲۸	۱۲/۵۰	۱۵/۰۰
۲۹	۰/۵۰	۲۰/۰۰
۳۰	۱/۰۰	۲۰/۰۰
۳۱	۲/۵۰	۲۰/۰۰
۳۲	۵/۰۰	۲۰/۰۰
۳۳	۷/۵۰	۲۰/۰۰
۳۴	۱۰/۰۰	۲۰/۰۰
۳۵	۱۲/۵۰	۲۰/۰۰

جدول ۳-۹: مخلوط‌های سری تست

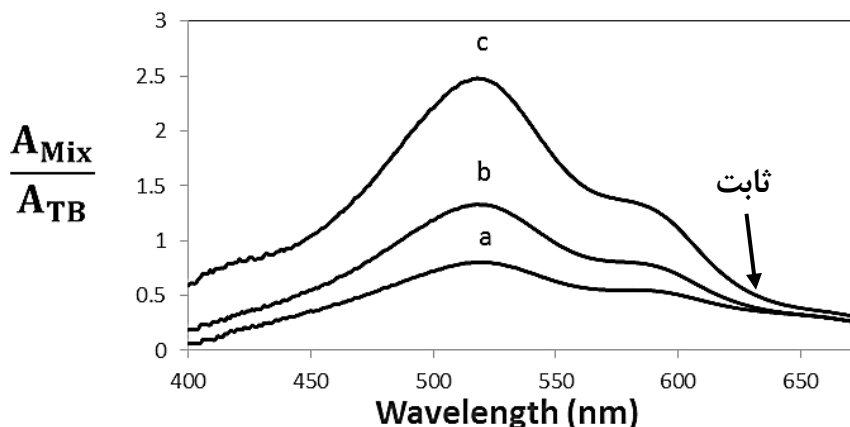
شماره مخلوط	متیل ویولت (میکروگرم بر میلی لیتر)	تولوئیدین بلو (میکروگرم بر میلی لیتر)
۱	۱/۰۰	۷/۵۰
۲	۲/۰۰	۳/۰۰
۳	۲/۰۰	۷/۵۰
۴	۳/۰۰	۱/۰۰
۵	۳/۰۰	۲/۰۰
۶	۴/۰۰	۱۰/۰۰
۷	۹/۰۰	۱۰/۰۰
۸	۱۰/۰۰	۲/۰۰

۳-۱-۹- تعیین همزمان رنگ‌های متیل ویولت و تولوئیدین بلو در مخلوط دوتایی هر

یک، به روش EXRSM

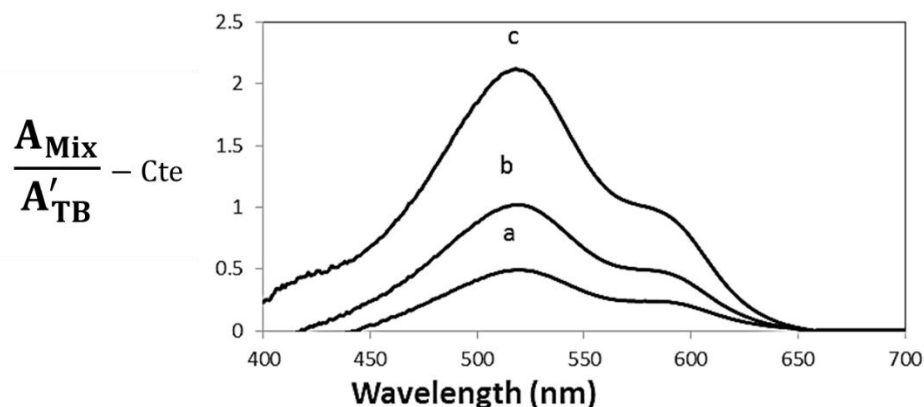
برای رسیدن به بهترین صحت در روش EXRSM باید غلظت تولوئیدین بلو به عنوان مقسوم علیه بهینه شود. برای این منظور غلظت TB به عنوان مقسوم علیه در دامنه ۵/۰۰ تا ۲۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تغییر داده شد. برای این کار محلول‌هایی با نسبت های مختلف متیل ویولت به تولوئیدین بلو به عنوان سری ارزیابی (جدول ۳-۱۰) و تست تهیه و طیف آن‌ها نسبت به محلول شاهد ثبت گردید. به عنوان مثال برای تعدادی از مخلوط های سری ارزیابی که در آن‌ها غلظت

تولوئیدین بلو ثابت و غلظت متیل ویولت متغیر است، مراحل روش EXRSM برای این مخلوط‌ها آورده شده است. ابتدا طیف هر مخلوط (حاوی متیل ویولت و تولوئیدین بلو) به طیف خالص محلول تولوئیدین بلو با غلظت معین (به عنوان مقسوم علیه) تقسیم گردید تا طیف نسبی به دست آید. در شکل‌های زیر غلظت معین TB به عنوان مقسوم علیه ۲۰/۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. مقدار ثابت (که در این مرحله وابسته به مقدار تولوئیدین بلو در هر مخلوط است) برای هر طیف نسبی در محدوده‌ای که طیف مرتبه ی صفر تولوئیدین بلو جذب داشته باشد ولی طیف مرتبه‌ی صفر متیل ویولت جذب نداشته باشد، بدست آورده شد (شکل ۳-۹) و مقدار ثابت از هر طیف نسبی کم شد (شکل ۳-۱۰). سپس هر طیف نسبی حاصل از کم کردن مقدار ثابت، در طیف محلول تولوئیدین بلو با غلظت معلوم که به عنوان مقسوم علیه به کار برده شد، ضرب گردید تا طیف‌های خالص مرتبه صفر متیل‌ویولت در هر مخلوط به دست آید (شکل ۳-۱۱). جذب هر محلول در طول موج ماکزیمم جذب متیل ویولت (۵۸۶ نانومتر) اندازه‌گیری و با استفاده از منحنی کالیبراسیون متیل ویولت (که از رسم جذب در طول موج ماکزیمم بر حسب غلظت متیل ویولت رسم شده بود) غلظت متیل ویولت در هر مخلوط به دست آمد.

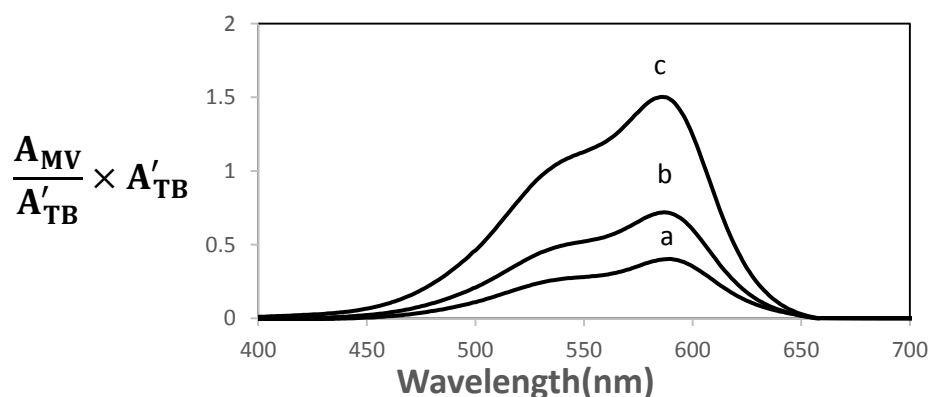


شکل ۳-۹: طیف‌های جذبی نسبی حاصل از تقسیم مخلوط‌های حاوی ۲/۵۰، ۵/۰۰، ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر متیل ویولت و ۵/۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تولوئیدین بلو بر طیف مرتبه صفر ۲۰/۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تولوئیدین بلو.

شرایط: (a) ۲/۵۰، (b) ۵/۰۰، (c) ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر متیل ویولت به همراه ۵/۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تولوئیدین بلو و ۲/۰۰ میلی‌لیتر محلول بافر سیتراتی با pH=۳/۰ در بالن حجمی ۱۰ میلی‌لیتری.



شکل ۳-۱۰: طیف‌های جذبی نسبی حاصل از تقسیم مخلوط‌های حاوی (a) ۲/۵۰، (b) ۵/۱۰۰، (c) ۱۰/۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر متیل ویولت و ۵/۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تولوئیدین بلو بر طیف مرتبه صفر ۲۰/۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تولوئیدین بلو بعد از کسر مقدار ثابت.



شکل ۳-۱۱: طیف‌های جذبی مرتبه صفر غلظت‌های (a) ۲/۵۰، (b) ۵/۱۰۰، (c) ۱۰/۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر متیل-ویولت، بعد از کسر مقدار ثابت از طیف نسبی و ضرب در طیف مرتبه صفر ۲۰/۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تولوئیدین بلو.

برای انتخاب غلظت تولوئیدین بلو به عنوان مقسوم علیه بهینه، ارزیابی مدل از طریق شاخص‌های کمی (MSE, MAE, MRE) در هر غلظت تولوئیدین بلو به عنوان مقسوم علیه انجام شد. نتایج در جدول ۳-۱۰ آورده شده است و نشان می‌دهد که مقدار خطای حاصل از غلظت ۲۰/۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تولوئیدین بلو به عنوان مقسوم علیه کمتر است. لذا غلظت ۲۰/۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به عنوان غلظت بهینه تولوئیدین بلو در مطالعات بعدی به کار برده شد.

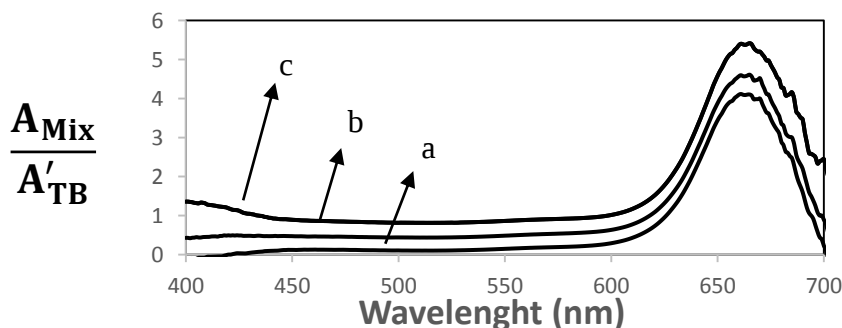
جدول ۳-۱۰: نتایج بهینه سازی غلظت تولوئیدین بلو به عنوان مقسوم علیه در سری ارزیابی به روش EXRSM

شماره مخلوط	غلظت‌های موجود (میکروگرم بر میلی‌لیتر)		غلظت تولوئیدین بلو به عنوان مقسوم علیه	غلظت متیل ویولت پیش بینی شده	درصد خطای نسبی	MAE (MSE) (MRE)
	متیل‌ویولت	تولوئیدین بلو				
۱	۱/۰۰	۱/۰۰	۵/۰۰	۰/۸۹	-۱۱/۰	۰/۳۱۴۶
۲	۲/۵۰	۱/۰۰	۵/۰۰	۲/۳۰	-۸/۰	(۰/۱۷۷۷)
۳	۵/۰۰	۱/۰۰	۵/۰۰	۴/۸۵	-۳/۰	(۶/۵۰)
۴	۷/۵۰	۱/۰۰	۵/۰۰	۷/۰۰	-۶/۷	
۵	۱۰/۰۰	۱/۰۰	۵/۰۰	۹/۹۰	-۱/۰	
۶	۱/۰۰	۵/۰۰	۵/۰۰	۰/۸۸	-۱۲/۰	
۷	۲/۵۰	۵/۰۰	۵/۰۰	۲/۵۹	۳/۶	
۸	۵/۰۰	۵/۰۰	۵/۰۰	۴/۹۰	-۲/۰	
۹	۷/۵۰	۵/۰۰	۵/۰۰	۷/۰۰	-۶/۷	
۱۰	۱۰/۰۰	۵/۰۰	۵/۰۰	۹/۰۷	-۹/۳	
۱۱	۱/۰۰	۱۰/۰۰	۵/۰۰	۱/۱۰	۱۰/۰	
۱۲	۲/۵۰	۱۰/۰۰	۵/۰۰	۲/۷۰	۸/۰	
۱۳	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۵/۰۰	۵/۱۵	۳/۰	
۱۴	۷/۵۰	۱۰/۰۰	۵/۰۰	۷/۰۹	-۵/۵	
۱۵	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۵/۰۰	۹/۱۴	-۸/۶	
۱۶	۱/۰۰	۱۵/۰۰	۵/۰۰	۰/۹۲	-۸/۰	
۱۷	۲/۵۰	۱۵/۰۰	۵/۰۰	۲/۴۲	-۳/۲	
۱۸	۵/۰۰	۱۵/۰۰	۵/۰۰	۴/۷۰	-۶/۰	
۱۹	۷/۵۰	۱۵/۰۰	۵/۰۰	۷/۱۰	-۵/۳	
۲۰	۱۰/۰۰	۱۵/۰۰	۵/۰۰	۹/۰۹	-۹/۱	
۱	۱/۰۰	۱/۰۰	۱۰/۰۰	۰/۹۰	-۹/۰	۰/۲۳۴۴
۲	۲/۵۰	۱/۰۰	۱۰/۰۰	۲/۳۹	-۴/۴	(۰/۱۰۳۸)
۳	۵/۰۰	۱/۰۰	۱۰/۰۰	۴/۸۷	-۲/۶	(۵/۷۶)
۴	۷/۵۰	۱/۰۰	۱۰/۰۰	۷/۱۰	-۵/۳۳	
۵	۱۰/۰۰	۱/۰۰	۱۰/۰۰	۹/۶۹	-۳/۳	
۶	۱/۰۰	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۰/۹۰	-۹/۰	
۷	۲/۵۰	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۲/۳۸	-۴/۸	
۸	۵/۰۰	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۵/۰۰	۰/۰	
۹	۷/۵۰	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۷/۲۳	۳/۶	
۱۰	۱۰/۰۰	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۹/۳۳	-۶/۷	
۱۱	۱/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۰/۹۷	-۳/۰	
۱۲	۲/۵۰	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۲/۳۸	-۴/۸	
۱۳	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۵/۱۲	۲/۴	
۱۴	۷/۵۰	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۷/۱۰	-۵/۳۳	

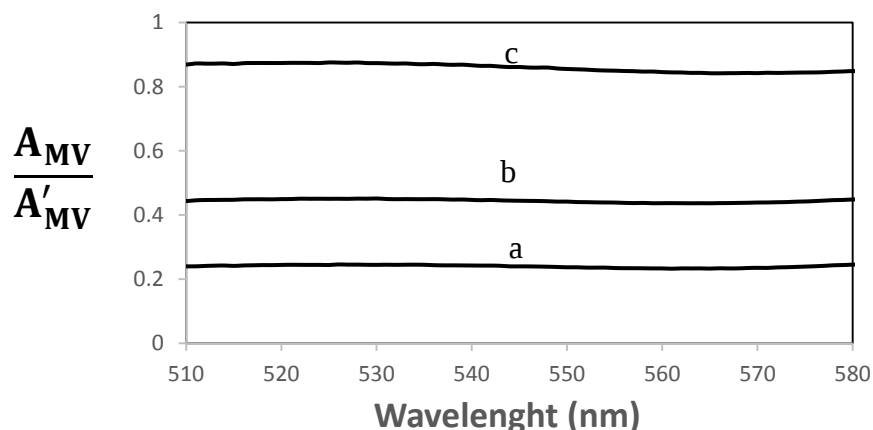
MAE (MSE) (MRE)	درصد خطای نسبی	غلطت متیل ویولت پیش بینی شده	غلطت تولوئیدین بلو به عنوان مقسوم علیه	غلطت های موجود (میکروگرم بر میلی لیتر)		شماره مخلوط
				تولوئیدین بلو	متیل ویولت	
	-۶/۰	۹/۴۰	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۵
	۶/۰	۹/۶۰	۱۰/۰۰	۱۵/۰۰	۱/۰۰	۱۶
	-۳/۶	۲/۴۱	۱۰/۰۰	۱۵/۰۰	۲/۵۰	۱۷
	-۵/۰	۴/۷۵	۱۰/۰۰	۱۵/۰۰	۵/۰۰	۱۸
	-۴/۷	۷/۱۵	۱۰/۰۰	۱۵/۰۰	۷/۵۰	۱۹
	-۹/۰	۹/۱۰	۱۰/۰۰	۱۵/۰۰	۱۰/۰۰	۲۰
۰/۲۳۸۵ (۰/۱۰۴۳) (۴/۹۸)	-۸/۰	۰/۹۲	۱۵/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱
	-۳/۶	۲/۴۱	۱۵/۰۰	۱/۰۰	۲/۵۰	۲
	-۲/۰	۴/۹۰	۱۵/۰۰	۱/۰۰	۵/۰۰	۳
	-۴/۰	۷/۱۴	۱۵/۰۰	۱/۰۰	۷/۵۰	۴
	-۳/۳	۹/۶۷	۱۵/۰۰	۱/۰۰	۱۰/۰۰	۵
	-۱۱/۰	۰/۸۹	۱۵/۰۰	۵/۰۰	۱/۰۰	۶
	-۴/۸	۲/۳۸	۱۵/۰۰	۵/۰۰	۲/۵۰	۷
	۰/۲	۵/۰۱	۱۵/۰۰	۵/۰۰	۵/۰۰	۸
	۲/۲	۷/۶۷	۱۵/۰۰	۵/۰۰	۷/۵۰	۹
	-۵/۷	۹/۴۳	۱۵/۰۰	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰
	-۱/۰	۰/۹۹	۱۵/۰۰	۱۰/۰۰	۱/۰۰	۱۱
	-۶/۸	۲/۳۳	۱۵/۰۰	۱۰/۰۰	۲/۵۰	۱۲
	۲/۲	۵/۱۱	۱۵/۰۰	۱۰/۰۰	۵/۰۰	۱۳
	-۵/۲	۷/۱۱	۱۵/۰۰	۱۰/۰۰	۷/۵۰	۱۴
	-۵/۷	۹/۴۳	۱۵/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۵
	۱۰/۰	۱/۱۰	۱۵/۰۰	۱۵/۰۰	۱/۰۰	۱۶
	-۴/۰	۲/۴۰	۱۵/۰۰	۱۵/۰۰	۲/۵۰	۱۷
	-۴/۰	۴/۸۰	۱۵/۰۰	۱۵/۰۰	۵/۰۰	۱۸
	-۳/۶	۷/۲۳	۱۵/۰۰	۱۵/۰۰	۷/۵۰	۱۹
	-۸/۹	۹/۱۱	۱۵/۰۰	۱۵/۰۰	۱۰/۰۰	۲۰
۰/۱۸۱۰ (۰/۵۵۵۵) (۳/۵۴)	-۵/۰	۰/۹۵	۲۰/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱
	-۳/۶	۲/۴۱	۲۰/۰۰	۱/۰۰	۲/۵۰	۲
	-۱/۰	۴/۹۵	۲۰/۰۰	۱/۰۰	۵/۰۰	۳
	-۰/۸	۷/۴۴	۲۰/۰۰	۱/۰۰	۷/۵۰	۴
	-۱/۶	۹/۸۴	۲۰/۰۰	۱/۰۰	۱۰/۰۰	۵
	-۶/۰	۰/۹۴	۲۰/۰۰	۵/۰۰	۱/۰۰	۶
	-۴/۴	۲/۳۹	۲۰/۰۰	۵/۰۰	۲/۵۰	۷
	۱/۰	۵/۰۵	۲۰/۰۰	۵/۰۰	۵/۰۰	۸
	۱/۳	۷/۵۵	۲۰/۰۰	۵/۰۰	۷/۵۰	۹
	-۲/۴	۹/۷۶	۲۰/۰۰	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰

MAE (MSE) (MRE)	درصد خطای نسبی	غلظت متیل ویولت پیش بینی شده	غلظت تولوئیدین بلو به عنوان مقسوم علیه	غلظت های موجود (میکروگرم بر میلی لیتر)		شماره مخلوط
				تولوئیدین بلو	متیل ویولت	
	۰/۰	۱/۰۰	۲۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱/۰۰	۱۱
	-۴/۴	۲/۳۹	۲۰/۰۰	۱۰/۰۰	۲/۵۰	۱۲
	۱/۰	۵/۰۵	۲۰/۰۰	۱۰/۰۰	۵/۰۰	۱۳
	۱/۳	۷/۵۵	۲۰/۰۰	۱۰/۰۰	۷/۵۰	۱۴
	-۲/۴	۹/۷۶	۲۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۵
	۰/۰	۱/۰	۲۰/۰۰	۱۵/۰۰	۱/۰۰	۱۶
	-۴/۸	۲/۳۸	۲۰/۰۰	۱۵/۰۰	۲/۵۰	۱۷
	-۲/۴	۴/۸۸	۲۰/۰۰	۱۵/۰۰	۵/۰۰	۱۸
	-۱/۵	۷/۳۹	۲۰/۰۰	۱۵/۰۰	۷/۵۰	۱۹
	-۳/۰	۹/۷	۲۰/۰۰	۱۵/۰۰	۱۰/۰۰	۲۰

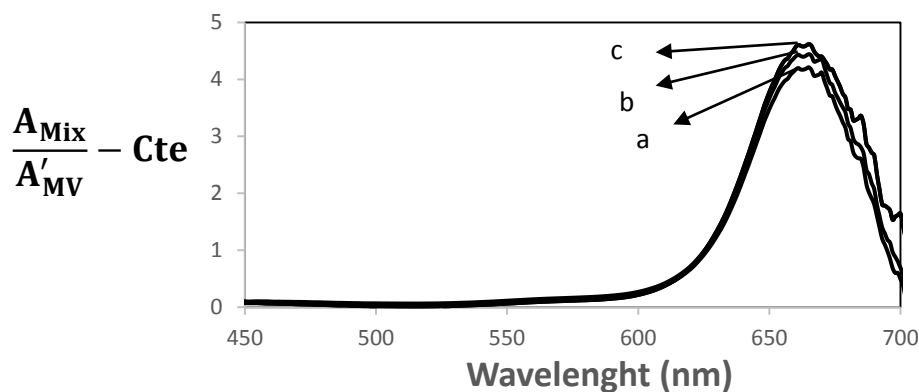
برای محاسبه غلظت تولوئیدین بلو از سری ارزیابی در جدول ۳-۱۱ استفاده گردید. به این صورت که طیف هر مخلوط (حاوی متیل ویولت و تولوئیدین بلو) به طیف متیل ویولت خالص استاندارد با غلظت های مختلف (۱۲/۵۰-۱/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به عنوان مقسوم علیه) تقسیم گردید تا طیف نسبی هر مخلوط به دست آید (شکل ۳-۱۲). مقدار ثابت برای هر مخلوط از طیف نسبی حاصل از تقسیم طیف خالص مرتبه صفر به دست آمده (محاسبه شده) متیل ویولت (شکل ۳-۱۱) بر طیف متیل ویولت خالص استاندارد با غلظت معین (به عنوان مقسوم علیه) بدست آمد (شکل ۳-۱۳). در مرحله بعد مقدار ثابت بدست آمده که خطوطی به موازات محور طول موج در محدوده ۵۱۰ تا ۵۸۰ نانومتر هستند، برای هر مخلوط از طیف نسبی مربوط به آن مخلوط کم شد (شکل ۳-۱۴).



شکل ۳-۱۲: طیف های جذبی حاصل از تقسیم مخلوط های حاوی (a) ۲/۵۰، (b) ۵/۰۰، (c) ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی-لیتر متیل ویولت و ۵/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تولوئیدین بلو بر طیف مرتبه صفر ۱۲/۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر متیل ویولت.

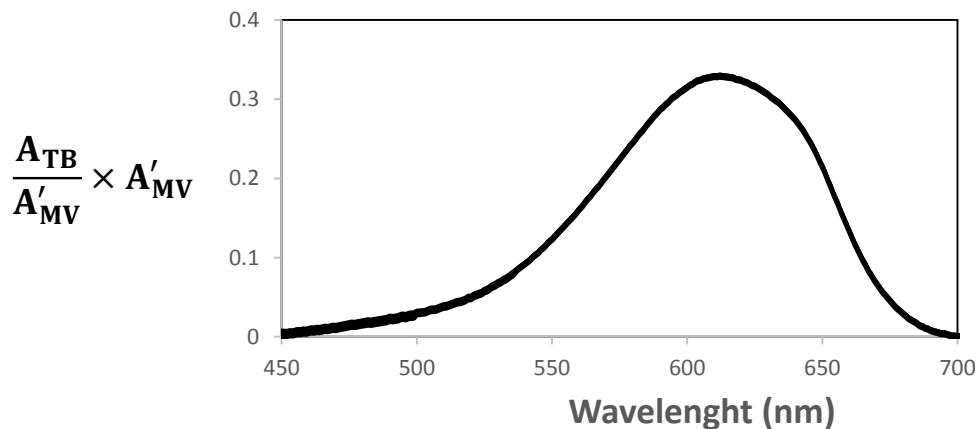


شکل ۳-۱۳: بدست آوردن ثابت حاصل از تقسیم طیف خالص مرتبه صفر محاسباتی (a) ۲/۵۰، (b) ۵/۰۰، (c) ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر متیل ویولت.



شکل ۳-۱۴: طیف‌های جذبی حاصل از تقسیم مخلوط‌های حاوی (a) ۲/۵۰، (b) ۵/۰۰، (c) ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر متیل‌ویولت و ۵/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تولوئیدین‌بلو بر طیف مرتبه صفر ۱۲/۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر متیل-ویولت بعد از کسر مقدار ثابت از طیف نسبی.

طیف نسبی حاصل از کم کردن مقدار ثابت (شکل ۳-۱۴)، در طیف محلول متیل ویولت با غلظت معلوم که به عنوان مقسوم علیه به کار برده شد، ضرب گردید تا طیف‌های خالص تولوئیدین بلو در هر مخلوط به دست آید (شکل ۳-۱۵). سپس جذب هر محلول در طول موج ماکزیمم جذب تولوئیدین بلو (۶۱۲ نانومتر) اندازه‌گیری و با استفاده از منحنی کالیبراسیون تولوئیدین بلو (که از رسم جذب در طول موج ماکزیمم جذب بر حسب غلظت تولوئیدین بلو رسم شده بود) غلظت تولوئیدین بلو در هر مخلوط به دست آمد. مراحل فوق با استفاده از غلظت‌های مختلف متیل ویولت به عنوان مقسوم علیه انجام شد و غلظت تولوئیدین بلو در هر مخلوط سری ارزیابی به دست آمد و نتایج آن در جدول ۳-۱۱ آورده شده است.



شکل ۳-۱۵: طیف‌های جذبی مرتبه صفر ۵/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تولوئیدین بلو ، بعد از کسر مقدار ثابت از طیف نسبی و ضرب در طیف مرتبه صفر ۱۲/۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر متیل ویولت.
جدول ۳-۱۱: نتایج بهینه سازی غلظت متیل ویولت به عنوان مقسوم علیه در سری ارزیابی

MAE (MSE) (MRE)	درصد خطای نسبی	غلظت تولوئیدین بلو پیش بینی شده	غلظت متیل ویولت به عنوان مقسوم علیه	غلظت‌های موجود (میکروگرم بر میلی‌لیتر)		شماره مخلوط
				تولوئیدین بلو	متیل ویولت	
۰/۵۴۸۰ (۰/۴۵۴۰) (۶/۷۹)	۴/۰	۱/۰۴	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱
	۴/۰	۱/۰۴	۱/۰۰	۱/۰۰	۲/۵۰	۲
	۵/۰	۱/۰۵	۱/۰۰	۱/۰۰	۵/۰۰	۳
	۵/۰	۱/۰۵	۱/۰۰	۱/۰۰	۷/۵۰	۴
	۶/۰	۱/۰۶	۱/۰۰	۱/۰۰	۱۰/۰۰	۵
	۵/۴	۵/۲۷	۱/۰۰	۵/۰۰	۱/۰۰	۶
	۵/۸	۵/۲۹	۱/۰۰	۵/۰۰	۲/۵۰	۷
	۶/۰	۵/۳۰	۱/۰۰	۵/۰۰	۵/۰۰	۸
	۷/۸	۵/۳۹	۱/۰۰	۵/۰۰	۷/۵۰	۹
	۸/۶	۵/۴۳	۱/۰۰	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰
	۵/۸	۱۰/۵۸	۱/۰۰	۱۰/۰۰	۱/۰۰	۱۱
	۶/۱	۱۰/۶۱	۱/۰۰	۱۰/۰۰	۲/۵۰	۱۲
	۷/۱	۱۰/۷۰	۱/۰۰	۱۰/۰۰	۵/۰۰	۱۳
	۸/۲	۱۰/۸۲	۱/۰۰	۱۰/۰۰	۷/۵۰	۱۴
	۹/۰	۱۰/۹۰	۱/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۵
	۶/۰	۱۵/۹۰	۱/۰۰	۱۵/۰۰	۱/۰۰	۱۶
	۶/۱	۱۵/۹۲	۱/۰۰	۱۵/۰۰	۲/۵۰	۱۷
	۶/۵	۱۵/۹۷	۱/۰۰	۱۵/۰۰	۵/۰۰	۱۸
	۷/۴	۱۶/۱۱	۱/۰۰	۱۵/۰۰	۷/۵۰	۱۹
	۸/۸	۱۶/۳۲	۱/۰۰	۱۵/۰۰	۱۰/۰۰	۲۰
۰/۴۶۶۰ (۰/۳۳۱۹) (۵/۳۹)	۳/۰	۱/۰۳	۵/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱
	۳/۰	۱/۰۳	۵/۰۰	۱/۰۰	۲/۵۰	۲
	۴/۱	۱/۰۴	۵/۰۰	۱/۰۰	۵/۰۰	۳

شماره مخلوط	غلظت های موجود (میکروگرم بر میلی لیتر)		غلظت متیل ویولت به عنوان مقسوم علیه	غلظت تولوئیدین بلو پیش بینی شده	درصد خطای نسبی	
	متیل ویولت	تولوئیدین بلو				
۴	۷/۵۰	۱/۰۰	۵/۰۰	۱/۰۴	۴/۱	
۵	۱۰/۰۰	۱/۰۰	۵/۰۰	۱/۰۵	۵/۱	
۶	۱/۰۰	۵/۰۰	۵/۰۰	۵/۲۲	۴/۴	
۷	۲/۵۰	۵/۰۰	۵/۰۰	۵/۲۳	۴/۶	
۸	۵/۰۰	۵/۰۰	۵/۰۰	۵/۲۴	۴/۹	
۹	۷/۵۰	۵/۰۰	۵/۰۰	۵/۳۴	۶/۷	
۱۰	۱۰/۰۰	۵/۰۰	۵/۰۰	۵/۳۸	۷/۵	
۱۱	۱/۰۰	۱۰/۰۰	۵/۰۰	۱۰/۴۸	۴/۸	
۱۲	۲/۵۰	۱۰/۰۰	۵/۰۰	۱۰/۵۱	۵/۱	
۱۳	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۵/۰۰	۱۰/۶۰	۶/۰	
۱۴	۷/۵۰	۱۰/۰۰	۵/۰۰	۱۰/۷۱	۷/۱	
۱۵	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۵/۰۰	۱۰/۷۹	۷/۹	
۱۶	۱/۰۰	۱۵/۰۰	۵/۰۰	۱۵/۷۴	۴/۹	
۱۷	۲/۵۰	۱۵/۰۰	۵/۰۰	۱۵/۷۶	۵/۱	
۱۸	۵/۰۰	۱۵/۰۰	۵/۰۰	۱۵/۸۱	۵/۴	
۱۹	۷/۵۰	۱۵/۰۰	۵/۰۰	۱۵/۹۶	۶/۴	
۲۰	۱۰/۰۰	۱۵/۰۰	۵/۰۰	۱۶/۱۶	۷/۷	
۱	۱/۰۰	۱/۰۰	۱۰/۰۰	۱/۰۲	۲/۱	۰/۳۵۴۱
۲	۲/۵۰	۱/۰۰	۱۰/۰۰	۱/۰۳	۳/۰	(۰/۲۱۰۶)
۳	۵/۰۰	۱/۰۰	۱۰/۰۰	۱/۰۳	۳/۰	(۳/۵۴)
۴	۷/۵۰	۱/۰۰	۱۰/۰۰	۱/۰۴	۴/۰	
۵	۱۰/۰۰	۱/۰۰	۱۰/۰۰	۱/۰۵	۵/۱	
۶	۱/۰۰	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۵/۱۹	۳/۸	
۷	۲/۵۰	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۵/۲۱	۴/۲	
۸	۵/۰۰	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۵/۲۸	۵/۶	
۹	۷/۵۰	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۵/۳۱	۶/۲	
۱۰	۱۰/۰۰	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۵/۳۲	۶/۴	
۱۱	۱/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰/۳۰	۳/۰	
۱۲	۲/۵۰	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰/۴۱	۴/۱	
۱۳	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰/۴۹	۴/۹	
۱۴	۷/۵۰	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰/۵۱	۵/۱	
۱۵	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰/۵۸	۵/۸	
۱۶	۱/۰۰	۱۵/۰۰	۱۰/۰۰	۱۵/۵۰	۳/۰	
۱۷	۲/۵۰	۱۵/۰۰	۱۰/۰۰	۱۵/۵۲	۳/۵	
۱۸	۵/۰۰	۱۵/۰۰	۱۰/۰۰	۱۵/۷۰	۴/۷	
۱۹	۷/۵۰	۱۵/۰۰	۱۰/۰۰	۱۵/۷۲	۴/۸	

MAE (MSE) (MRE)	درصد خطای نسبی	غلظت تولوئیدین بلو پیش بینی شده	غلظت متیل ویولت به عنوان مقسوم علیه	غلظت های موجود (میکروگرم بر میلی لیتر)		شماره مخلوط
				متیل ویولت	تولوئیدین بلو	
	۵/۳	۱۵/۸۰	۱۰/۰۰	۱۵/۰۰	۱۰/۰۰	۲۰
۰/۲۲۶۵ (۰/۰۸۷۰) (۲/۸۹)	۱/۰	۱/۰۱	۱۲/۵۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱
	۲/۰	۱/۰۲	۱۲/۵۰	۱/۰۰	۲/۵۰	۲
	۳/۰	۱/۰۳	۱۲/۵۰	۱/۰۰	۵/۰۰	۳
	۳/۰	۱/۰۳	۱۲/۵۰	۱/۰۰	۷/۵۰	۴
	۴/۰	۱/۰۴	۱۲/۵۰	۱/۰۰	۱۰/۰۰	۵
	۱/۶	۵/۰۸	۱۲/۵۰	۵/۰۰	۱/۰۰	۶
	۱/۸	۵/۰۹	۱۲/۵۰	۵/۰۰	۲/۵۰	۷
	۲/۴	۵/۱۲	۱۲/۵۰	۵/۰۰	۵/۰۰	۸
	۳/۸	۵/۱۹	۱۲/۵۰	۵/۰۰	۷/۵۰	۹
	۴/۶	۵/۲۳	۱۲/۵۰	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰
	۱/۸	۱۰/۱۸	۱۲/۵۰	۱۰/۰۰	۱/۰۰	۱۱
	۲/۱	۱۰/۲۱	۱۲/۵۰	۱۰/۰۰	۲/۵۰	۱۲
	۳/۰	۱۰/۳۰	۱۲/۵۰	۱۰/۰۰	۵/۰۰	۱۳
	۴/۱	۱۰/۴۱	۱۲/۵۰	۱۰/۰۰	۷/۵۰	۱۴
	۴/۹	۱۰/۴۹	۱۲/۵۰	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۵
	۲/۰	۱۵/۳۰	۱۲/۵۰	۱۵/۰۰	۱/۰۰	۱۶
	۲/۱	۱۵/۳۱	۱۲/۵۰	۱۵/۰۰	۲/۵۰	۱۷
	۲/۵	۱۵/۳۷	۱۲/۵۰	۱۵/۰۰	۵/۰۰	۱۸
	۳/۵	۱۵/۵۲	۱۲/۵۰	۱۵/۰۰	۷/۵۰	۱۹
	۴/۷	۱۵/۷۰	۱۲/۵۰	۱۵/۰۰	۱۰/۰۰	۲۰

نتایج به دست آمده نشان می دهد که مقدار خطای حاصل با استفاده از غلظت ۱۲/۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر متیل ویولت به عنوان مقسوم علیه، کمتر است. لذا غلظت ۱۲/۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر به عنوان غلظت بهینه متیل ویولت انتخاب شد. بعد از بهینه سازی غلظت مقسوم علیه برای متیل-ویولت و تولوئیدین بلو (با استفاده از مخلوط های سری ارزیابی)، از این شرایط بهینه برای تعیین غلظت متیل ویولت و تولوئیدین بلو در مخلوط های سری تست استفاده شد (جدول ۳-۱۲). نتایج به دست آمده نشان می دهد با صحت خوبی می توان غلظت های متیل ویولت و تولوئیدین بلو را در محلول های آن ها با روش EXRSM تعیین کرد.

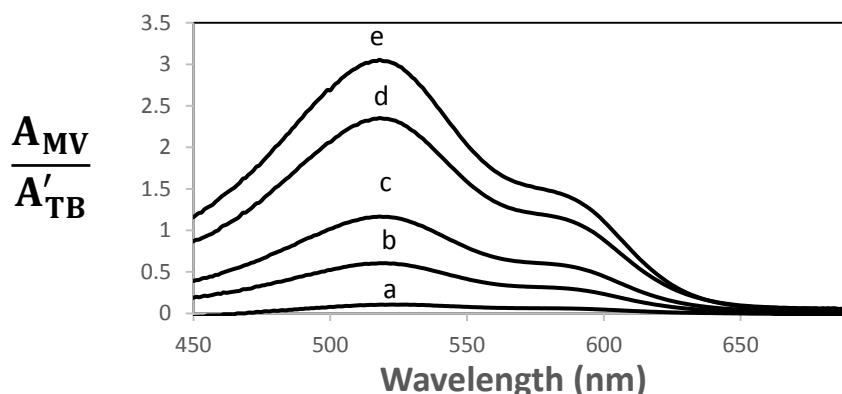
جدول ۳-۱۲: نتایج غلظت‌های پیش بینی شده با روش EXRSM، در مخلوط‌های سری تست

شماره مخلوط	غلظت‌های موجود (میکروگرم بر میلی‌لیتر)		غلظت پیش بینی شده (میکروگرم بر میلی‌لیتر)		درصد خطای نسبی		MAE (MSE) (MRE)	
	متیل ویولت	تولوئیدین بلو	متیل ویولت	تولوئیدین بلو	متیل ویولت	تولوئیدین بلو	متیل ویولت	تولوئیدین بلو
۱	۱/۰۰	۷/۵۰	۰/۹۷	۷/۶۲	-۳/۰	۱/۶	۰/۱۳۶۲	۰/۱۵۳۷
۲	۲/۰۰	۳/۰۰	۱/۹۶	۳/۰۷	-۲/۰	۲/۳	(۰/۰۳۵۶)	(۰/۰۴۳۸)
۳	۲/۰۰	۷/۵۰	۱/۹۵	۷/۶۳	-۲/۵	۱/۷	(۱/۱۵)	(۱/۰۹)
۴	۳/۰۰	۱/۰۰	۲/۹۳	۱/۰۲	-۲/۳	۲/۰		
۵	۳/۰۰	۲/۰۰	۲/۹۱	۲/۰۵	-۳/۰	۲/۵		
۶	۴/۰۰	۱۰/۰۰	۳/۸۹	۱۰/۲۹	-۲/۷	۲/۹		
۷	۹/۰۰	۱۰/۰۰	۸/۵۸	۱۰/۴۷	-۴/۷	۴/۷		
۸	۱۰/۰۰	۲/۰۰	۹/۹۷	۲/۰۸	-۲/۸	۴/۰		

۳-۱-۱۰- تعیین همزمان رنگ‌های متیل ویولت و تولوئیدین بلو در مخلوط دوتایی هر

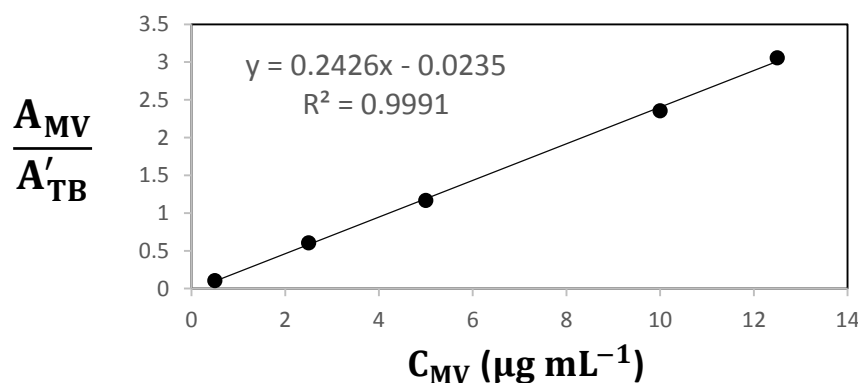
یک، به روش SRSM

روش دیگری که برای اندازه‌گیری همزمان تولوئیدین بلو و متیل ویولت به کار برده شد، روش SRSM بود که در این روش از مخلوط‌های سری ارزیابی و سری تست استفاده شد. نحوه اجرای روش SRSM، برای تعدادی از مخلوط‌های سری ارزیابی که در آن‌ها غلظت تولوئیدین بلو ثابت و غلظت متیل ویولت متغیر می‌باشد، آورده شده است. ابتدا طیف مرتبه صفر متیل‌ویولت با غلظت‌های ۱۲/۵۰ - ۰/۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر (گونه با طیف محدودتر) بر طیف مرتبه صفر تولوئیدین بلو با یک غلظت معین (گونه با طیف گسترده‌تر) به عنوان مقسوم علیه تقسیم شد (شکل ۳-۱۶).

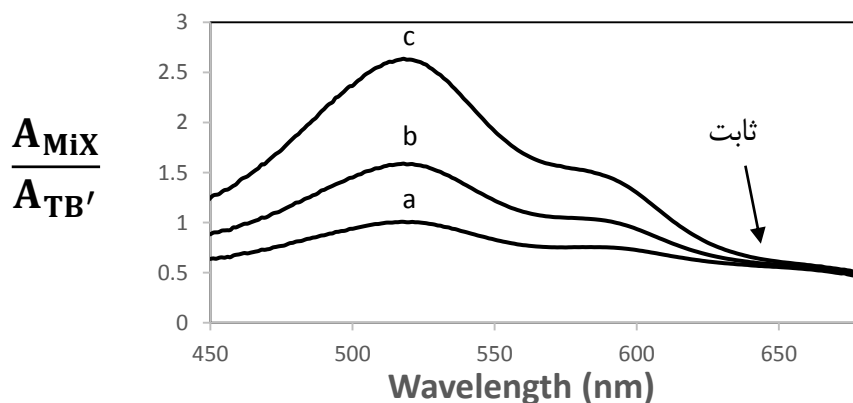


شکل ۳-۱۶: طیف‌های نسبی حاصل از تقسیم طیف مرتبه صفر (a) ۰/۵۰، (b) ۲/۵۰، (c) ۵/۰۰، (d) ۱۰/۰۰، (e) ۱۲/۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر متیل‌ویولت بر طیف مرتبه صفر ۲۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تولوئیدین بلو.

با استفاده از مقدار نسبی جذب در طول موج ماکزیمم طیف‌های نسبی بدست آمده (۵۱۸ نانومتر) منحنی کالیبراسیون نسبی بدست آمد (شکل ۳-۱۷). سپس طیف مخلوط‌های سری ارزیابی نیز بر طیف مرتبه صفر غلظت معینی از تولوئیدین بلو به عنوان مقسوم علیه تقسیم شد (شکل ۳-۱۸) و مقدار ثابت (که وابسته به مقدار تولوئیدین بلو در هر مخلوط است). برای هر طیف نسبی از قسمت مسطح و موازی با محور طول موج در محدوده‌ای که طیف مرتبه صفر تولوئیدین بلو جذب داشته باشد، ولی طیف مرتبه صفر متیل ویولت جذب نداشته باشد بدست آورده شد (شکل ۳-۱۸) و مقدار ثابت از هر طیف نسبی کم شد (شکل ۳-۱۹). برای بدست آوردن غلظت متیل ویولت در مخلوط، جذب در طول موج ۵۱۸ نانومتر در طیف‌های حاصل (شکل ۳-۱۹) اندازه‌گیری شد و در منحنی کالیبراسیون (شکل ۳-۱۷) قرار داده شد.

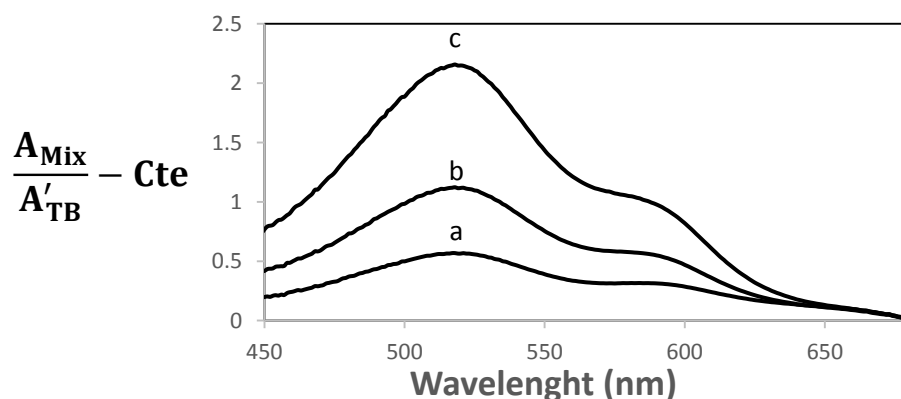


شکل ۳-۱۷: منحنی کالیبراسیون نسبی متیل ویولت حاصل از تقسیم طیف مرتبه صفر متیل ویولت با غلظت‌های ۱۲/۵۰ – ۰/۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر بر طیف مرتبه صفر ۲۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تولوئیدین بلو در طول موج ۵۱۸ نانومتر.

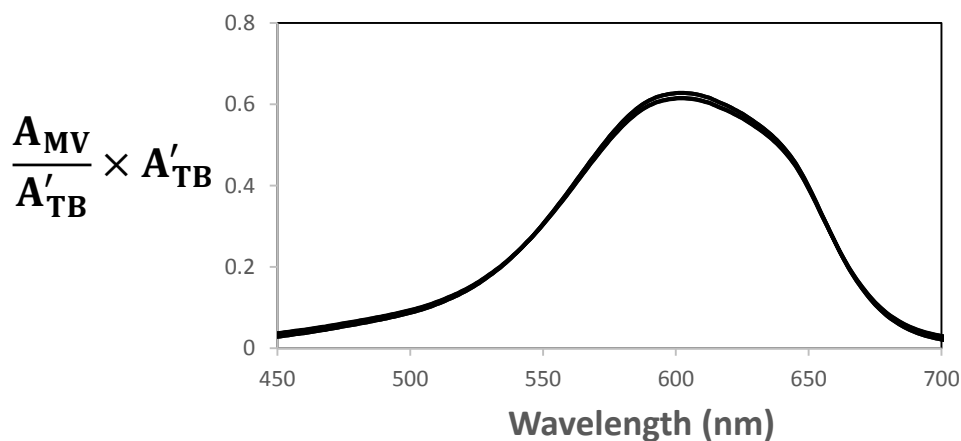


شکل ۳-۱۸: طیف‌های جذبی حاصل از تقسیم مخلوط‌های حاوی (a) ۲/۵۰، (b) ۵/۰۰، (c) ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر متیل ویولت و ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تولوئیدین بلو بر طیف مرتبه صفر ۲۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تولوئیدین بلو.

در مرحله بعدی مقدار ثابت بدست آمده برای هر مخلوط در غلظت تولوئیدین بلو (که به عنوان مقسوم علیه استفاده شده بود) ضرب گردید (شکل ۳-۲۰) که طیف مرتبه صفر و خالص مربوط به تولوئیدین بلو حاصل می‌شود. با اندازه‌گیری جذب در ۶۱۲ نانومتر طیف حاصل و با استفاده از منحنی کالیبراسیون تولوئیدین بلو (از رسم جذب محلول‌های تولوئیدین بلو در ۶۱۲ نانومتر بر حسب غلظت آن (شکل ۳-۸))، غلظت تولوئیدین بلو در هر مخلوط محاسبه گردید. برای رسیدن به بهترین صحت در روش SRSM، باید غلظت تولوئیدین بلو به عنوان مقسوم علیه بهینه شود که با توجه به نتایج در جدول ۳-۱۳ مقدار خطا مقسوم علیه با غلظت ۲۰/۰ میکروگرم بر میلی لیتر تولوئیدین بلو کمتر است و این غلظت به عنوان مقسوم علیه (با استفاده از مخلوط‌های سری ارزیابی)، بهینه انتخاب شد. از این شرایط بهینه برای تعیین غلظت متیل ویولت و تولوئیدین بلو در مخلوط‌های سری تست استفاده شد (جدول ۳-۱۴) که نتایج این جدول نشان می‌دهد غلظت‌های متیل ویولت و تولوئیدین بلو را می‌توان با صحت خوبی در مخلوط‌های آن‌ها به طور همزمان با روش SRSM تعیین کرد.



شکل ۳-۱۹: کسر مقدار ثابت از طیف‌های جذبی حاصل از تقسیم مخلوط‌های حاوی (a) ۲/۵۰، (b) ۵/۰۰، (c) ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر متیل ویولت و ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تولوئیدین بلو بر طیف مرتبه صفر ۲۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تولوئیدین بلو.



شکل ۳-۲۰: طیف‌های جذبی مرتبه صفر ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تولوئیدین بلو ، بعد از ضرب مقدار ثابت در هر مخلوط (شکل ۳-۱۸) در طیف مرتبه صفر ۲۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تولوئیدین بلو (به عنوان مقسوم علیه)

جدول ۳-۱۳: نتایج بهینه سازی غلظت تولوئیدین بلو به عنوان مقسوم علیه در سری ارزیابی با استفاده از روش SRS

شماره مخلوط	غلظت‌های موجود (میکروگرم بر میلی لیتر)		غلظت تولوئیدین-بلو به عنوان مقسوم علیه	غلظت‌های پیش بینی شده		درصد خطای نسبی		MAE (MSE) (MRE)	
	متیل ویولت	تولوئیدین بلو		متیل ویولت	تولوئیدین بلو	متیل ویولت	تولوئیدین بلو	متیل ویولت	تولوئیدین بلو
۱	۱/۰۰	۱/۰۰	۱۰/۰۰	۰/۹۶	۱/۰۳	-۴/۰	۲/۷	۰/۳۰۲۰	۰/۴۴۳۰
۲	۲/۵۰	۱/۰۰	۱۰/۰۰	۲/۳۹	۱/۰۵	-۴/۵	۴/۸	(۰/۱۴۲۴)	(۰/۳۱۲۳)
۳	۵/۰۰	۱/۰۰	۱۰/۰۰	۴/۷۹	۱/۰۶	-۴/۱	۵/۹	(۵/۶۷)	(۵/۵۵)
۴	۷/۵۰	۱/۰۰	۱۰/۰۰	۷/۲۰	۱/۰۷	-۴/۰	۶/۹		
۵	۱۰/۰۰	۱/۰۰	۱۰/۰۰	۹/۶۲	۱/۰۷	-۳/۸	۶/۹		
۶	۱/۰۰	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۰/۹۵	۵/۱۷	-۴/۹	۳/۴		
۷	۲/۵۰	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۲/۳۶	۵/۱۴	-۵/۷	۲/۷		
۸	۵/۰۰	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۴/۷۴	۵/۳۱	-۵/۱	۶/۳		
۹	۷/۵۰	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۷/۱۴	۵/۳۶	-۴/۸	۷/۱		
۱۰	۱۰/۰۰	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۹/۵۲	۵/۴۰	-۴/۸	۷/۹		
۱۱	۱/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۰/۹۵	۱۰/۳۵	-۴/۹	۳/۵		
۱۲	۲/۵۰	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۲/۳۵	۱۰/۴۹	-۶/۱	۴/۹		
۱۳	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۴/۶۹	۱۰/۵۱	-۶/۳	۵/۲		
۱۴	۷/۵۰	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۷/۰۷	۱۰/۵۴	-۵/۷	۵/۴		
۱۵	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۹/۳۷	۱۰/۵۶	-۶/۳	۵/۶		
۱۶	۱/۰۰	۱۵/۰۰	۱۰/۰۰	۰/۹۴	۱۵/۸۰	-۵/۹	۵/۳		
۱۷	۲/۵۰	۱۵/۰۰	۱۰/۰۰	۲/۳۱	۱۵/۸۸	-۷/۶	۵/۹		
۱۸	۵/۰۰	۱۵/۰۰	۱۰/۰۰	۴/۶۰	۱۵/۹۴	-۸/۰	۶/۳		
۱۹	۷/۵۰	۱۵/۰۰	۱۰/۰۰	۶/۹۷	۱۶/۰۴	-۷/۱	۶/۹		
۲۰	۱۰/۰۰	۱۵/۰۰	۱۰/۰۰	۹/۳۳	۱۶/۰۹	-۶/۷	۷/۳		

شماره مخلوط	غلظت های موجود (میکروگرم بر میلی لیتر)		غلظت تولوئیدین- بلو به عنوان مقسوم علیه	غلظت های پیش بینی شده		درصد خطای نسبی		MAE (MSE) (MRE)	
	تولوئیدین بلو	متیل ویولت		تولوئیدین بلو	متیل ویولت	تولوئیدین بلو	متیل ویولت	تولوئیدین بلو	متیل ویولت
۱	۱/۰۰	۱/۰۰	۱۵/۰۰	۰/۹۷	۱/۰۱	-۲/۹	۱/۳	۰/۲۵۳۵	۰/۳۲۲۵
۲	۲/۵۰	۱/۰۰	۱۵/۰۰	۲/۴۱	۱/۰۳	-۳/۶	۳/۳	(۰/۱۰۴۳)	(۰/۱۷۴۷)
۳	۵/۰۰	۱/۰۰	۱۵/۰۰	۴/۸۴	۱/۰۴	-۳/۲	۴/۴	(۴/۰۲)	(۴/۷۴)
۴	۷/۵۰	۱/۰۰	۱۵/۰۰	۷/۲۷	۱/۰۵	-۳/۱	۵/۴		
۵	۱۰/۰۰	۱/۰۰	۱۵/۰۰	۹/۷۲	۱/۰۵	-۲/۸	۵/۴		
۶	۱/۰۰	۵/۰۰	۱۵/۰۰	۰/۹۶	۵/۰۹	-۴/۰	۱/۹		
۷	۲/۵۰	۵/۰۰	۱۵/۰۰	۲/۳۸	۵/۰۶	-۴/۸	۱/۳		
۸	۵/۰۰	۵/۰۰	۱۵/۰۰	۴/۷۹	۵/۲۴	-۴/۲	۴/۸		
۹	۷/۵۰	۵/۰۰	۱۵/۰۰	۷/۲۱	۵/۲۸	-۳/۸	۵/۸		
۱۰	۱۰/۰۰	۵/۰۰	۱۵/۰۰	۹/۶۱	۵/۳۲	-۳/۹	۶/۴		
۱۱	۱/۰۰	۱۰/۰۰	۱۵/۰۰	۰/۹۶	۱۰/۲۰	-۴/۰	۲/۰		
۱۲	۲/۵۰	۱۰/۰۰	۱۵/۰۰	۲/۳۷	۱۰/۳۴	-۵/۱	۳/۴		
۱۳	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۱۵/۰۰	۴/۷۳	۱۰/۳۶	-۵/۳	۳/۶		
۱۴	۷/۵۰	۱۰/۰۰	۱۵/۰۰	۷/۱۴	۱۰/۳۸	-۴/۷	۳/۸		
۱۵	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۵/۰۰	۹/۴۷	۱۰/۴۰	-۵/۳	۴/۰		
۱۶	۱/۰۰	۱۵/۰۰	۱۵/۰۰	۰/۹۵	۱۵/۵۷	-۴/۹	۳/۸		
۱۷	۲/۵۰	۱۵/۰۰	۱۵/۰۰	۲/۳۳	۱۵/۶۵	-۶/۷	۴/۴		
۱۸	۵/۰۰	۱۵/۰۰	۱۵/۰۰	۴/۶۵	۱۵/۷۱	-۷/۱	۴/۷		
۱۹	۷/۵۰	۱۵/۰۰	۱۵/۰۰	۷/۰۴	۱۵/۸۱	-۶/۲	۵/۴		
۲۰	۱۰/۰۰	۱۵/۰۰	۱۵/۰۰	۹/۴۳	۱۵/۸۶	-۵/۷	۵/۷		
۱	۱/۰۰	۱/۰۰	۲۰/۰۰	۰/۹۹	۰/۹۹	-۱/۰	-۱/۰	۰/۱۵۳۵	۰/۱۵۱۵
۲	۲/۵۰	۱/۰۰	۲۰/۰۰	۲/۴۶	۱/۰۱	-۱/۶	۱/۰	(۰/۰۴۴۴)	(۰/۰۴۶۷)
۳	۵/۰۰	۱/۰۰	۲۰/۰۰	۴/۹۴	۱/۰۲	-۱/۲	۲/۰	(۱/۹۵۶)	(۲/۷۰)
۴	۷/۵۰	۱/۰۰	۲۰/۰۰	۷/۴۲	۱/۰۳	-۱/۱	۳/۰		
۵	۱۰/۰۰	۱/۰۰	۲۰/۰۰	۹/۹۲	۱/۰۳	-۰/۸	۳/۰		
۶	۱/۰۰	۵/۰۰	۲۰/۰۰	۰/۹۸	۴/۹۸	-۲/۰	-۰/۴		
۷	۲/۵۰	۵/۰۰	۲۰/۰۰	۲/۴۳	۴/۹۵	-۲/۸	-۱/۰		
۸	۵/۰۰	۵/۰۰	۲۰/۰۰	۴/۸۹	۵/۱۲	-۲/۲	۲/۴		
۹	۷/۵۰	۵/۰۰	۲۰/۰۰	۷/۳۶	۵/۱۶	-۱/۹	۳/۲		
۱۰	۱۰/۰۰	۵/۰۰	۲۰/۰۰	۹/۸۱	۵/۲۰	-۱/۹	۴/۰		
۱۱	۱/۰۰	۱۰/۰۰	۲۰/۰۰	۰/۹۸	۹/۹۷	-۲/۰	-۰/۳		
۱۲	۲/۵۰	۱۰/۰۰	۲۰/۰۰	۲/۴۲	۱۰/۱۱	-۳/۲	۱/۱		
۱۳	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۲۰/۰۰	۴/۸۳	۱۰/۱۳	-۳/۴	۱/۳		
۱۴	۷/۵۰	۱۰/۰۰	۲۰/۰۰	۷/۲۹	۱۰/۱۵	-۲/۸	۱/۵		

شماره مخلوط	غلظت‌های موجود (میکروگرم بر میلی لیتر)		غلظت تولوئیدین-بلو به عنوان مقسوم علیه	غلظت‌های پیش بینی شده		درصد خطای نسبی		MAE (MSE) (MRE)	
	متیل ویولت	تولوئیدین بلو		متیل ویولت	تولوئیدین بلو	متیل ویولت	تولوئیدین بلو	متیل ویولت	تولوئیدین بلو
۱۵	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۲۰/۰۰	۹/۷۶	۱۰/۱۷	-۲/۴	۱/۷		
۱۶	۱/۰۰	۱۵/۰۰	۲۰/۰۰	۰/۹۷	۱۵/۲۲	-۳/۰	۱/۵		
۱۷	۲/۵۰	۱۵/۰۰	۲۰/۰۰	۲/۳۸	۱۵/۳۰	-۴/۸	۲/۰		
۱۸	۵/۰۰	۱۵/۰۰	۲۰/۰۰	۴/۷۴	۱۵/۳۶	-۵/۲	۲/۴		
۱۹	۷/۵۰	۱۵/۰۰	۲۰/۰۰	۷/۲۸	۱۵/۴۵	-۲/۹	۳/۰		
۲۰	۱۰/۰۰	۱۵/۰۰	۲۰/۰۰	۹/۷۲	۱۵/۵۰	-۲/۸	۳/۳		

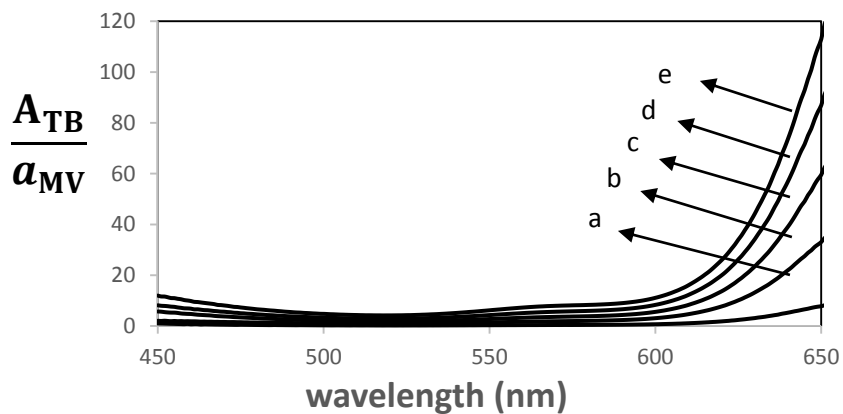
جدول ۳-۱۴: نتایج غلظت‌های پیش بینی شده با روش SRS، در مخلوط‌های سری تست

شماره مخلوط	غلظت‌های موجود (میکروگرم بر میلی لیتر)		غلظت‌های پیش بینی شده (میکروگرم بر میلی لیتر)	درصد خطای نسبی		MAE (MSE) (MRE)	
	متیل ویولت	تولوئیدین بلو		متیل ویولت	تولوئیدین بلو	متیل ویولت	تولوئیدین بلو
۱	۱/۰۰	۷/۵۰	۰/۹۸	۷/۴۷	-۲/۰	۰/۰۷۶۲	۰/۰۶۰۰
۲	۲/۰۰	۳/۰۰	۱/۹۷	۲/۹۸	-۱/۵	۰/۰۰۸۴	۰/۰۰۵۷
۳	۲/۰۰	۷/۵۰	۱/۹۶	۷/۴۶	-۲/۰	۰/۰۷۸	۰/۰۵۷
۴	۳/۰۰	۱/۰۰	۲/۹۵	۱/۰۲	-۱/۷		
۵	۳/۰۰	۲/۰۰	۲/۹۴	۲/۰۳	-۲/۰		
۶	۴/۰۰	۱۰/۰۰	۳/۸۶	۱۰/۱۲	-۳/۵		
۷	۹/۰۰	۱۰/۰۰	۸/۸۳	۱۰/۱۵	-۱/۹		
۸	۱۰/۰۰	۲/۰۰	۹/۹۰	۲/۰۷	-۱/۰		

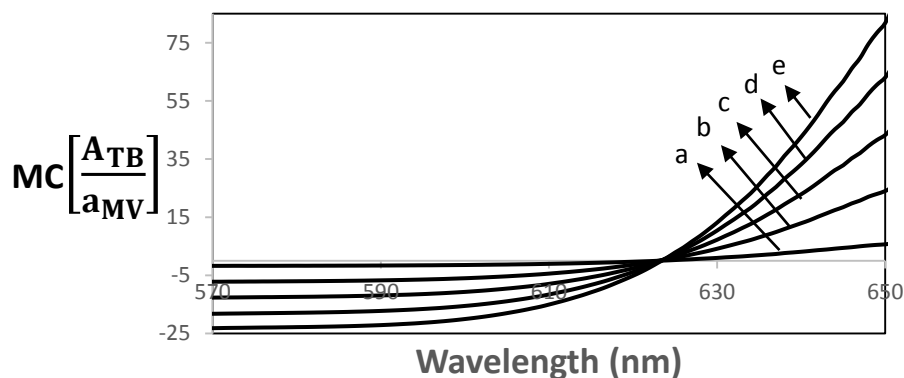
۳-۱-۱۱- تعیین همزمان رنگ‌های متیل ویولت و تولوئیدین بلو در مخلوط دوتایی هر

یک، به روش MCM

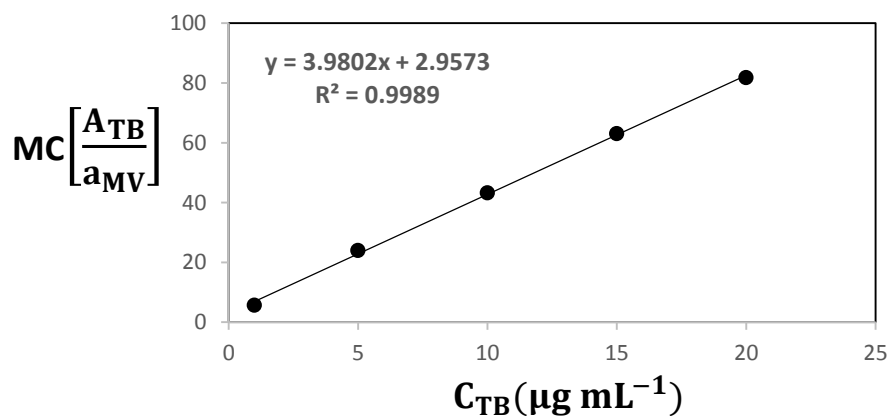
در اندازه‌گیری تولوئیدین بلو با استفاده از روش MCM، ابتدا طیف مرتبه صفر تولوئیدین بلو با غلظت‌های مختلف بر ضریب جذب متیل ویولت تقسیم شد (شکل ۳-۲۱). برای رسیدن به بهترین صحت در روش MCM، ناحیه ی طول موج میانگین‌گیری مرکزی (MC) بهینه شد. به این صورت که MC در محدوده‌های مختلف، در اطراف طول موج ماکزیمم طیف‌های نسبی حاصل (۶۵۰ نانومتر)، انجام شد (جدول ۳-۱۵). میانگین بدست آمده از هر طیف نسبی، از طیف متناظر آن کم شد (شکل ۳-۲۲) و با استفاده از مقادیر جذب در طول موج ۶۵۰ نانومتر (بیشترین حساسیت) منحنی کالیبراسیون رسم شد (شکل ۳-۲۳).



شکل ۳-۲۱: طیف‌های نسبی حاصل از تقسیم طیف‌های مرتبه صفر غلظت‌های (a) ۱/۰۰، (b) ۵/۰۰، (c) ۱۰/۰۰، (d) ۱۵/۰۰، (e) ۲۰/۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تولوئیدین بلو بر ضریب جذب متیل ویولت.

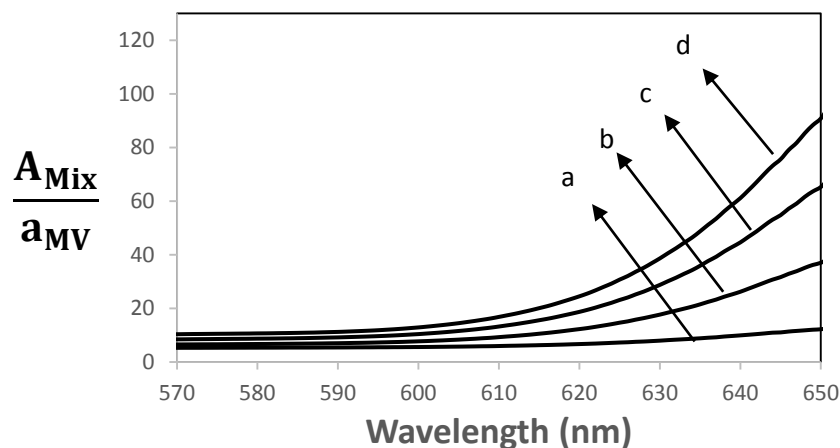


شکل ۳-۲۲: طیف‌های نسبی حاصل از تقسیم طیف‌های مرتبه صفر غلظت‌های (a) ۱/۰۰، (b) ۵/۰۰، (c) ۱۰/۰۰، (d) ۱۵/۰۰، (e) ۲۰/۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تولوئیدین بلو بر ضریب جذب متیل ویولت بعد از انجام MC در ناحیه ۶۵۰-۵۷۰ نانومتر.

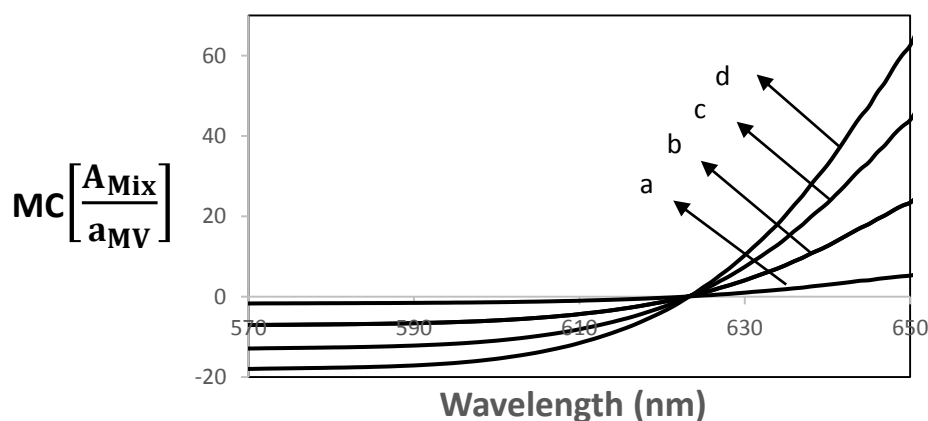


شکل ۳-۲۳: منحنی کالیبراسیون در طول موج ماکزیمم ۶۵۰ نانومتر، حاصل تقسیم طیف مرتبه صفر غلظت‌های ۱/۰۰-۲۰/۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تولوئیدین بلو بر ضریب جذب متیل ویولت بعد از انجام MC در ناحیه ۶۵۰-۵۷۰ نانومتر.

این مراحل بر روی طیف‌های سری ارزیابی نیز انجام شد و پس از MC طیف‌های مخلوط، جذب نسبی در طول موج ۶۵۰ نانومتر را در منحنی کالیبراسیون قرار داده شد و غلظت تولوئیدین بلو در هر مخلوط بدست آمد. با توجه به ارزیابی مدل از طریق شاخص‌های کمی (MSE, MAE, MRE) در سری ارزیابی و همچنین شیب و R^2 منحنی کالیبراسیون، ناحیه ۶۵۰-۵۷۰ نانومتر به عنوان ناحیه بهینه برای MC تولوئیدین بلو انتخاب شد (جدول ۳-۱۵).



شکل ۳-۲۴: طیف‌های نسبی حاصل از تقسیم، طیف مخلوط با غلظت‌های (a) ۱/۰۰، (b) ۵/۰۰، (c) ۱۰/۰۰، (d) ۱۵/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تولوئیدین بلو به همراه ۵/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر متیل ویولت بر ضریب جذب متیل ویولت.

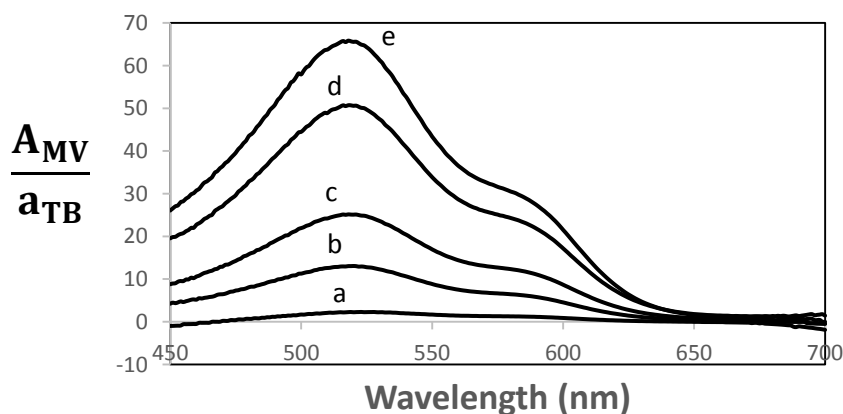


شکل ۳-۲۵: طیف‌های نسبی حاصل از تقسیم، طیف مخلوط با غلظت‌های (a) ۱/۰۰، (b) ۵/۰۰، (c) ۱۰/۰۰، (d) ۱۵/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تولوئیدین بلو به همراه ۵/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر متیل ویولت بر ضریب جذب متیل ویولت بعد از انجام MC در ناحیه ۶۵۰-۵۷۰ نانومتر.

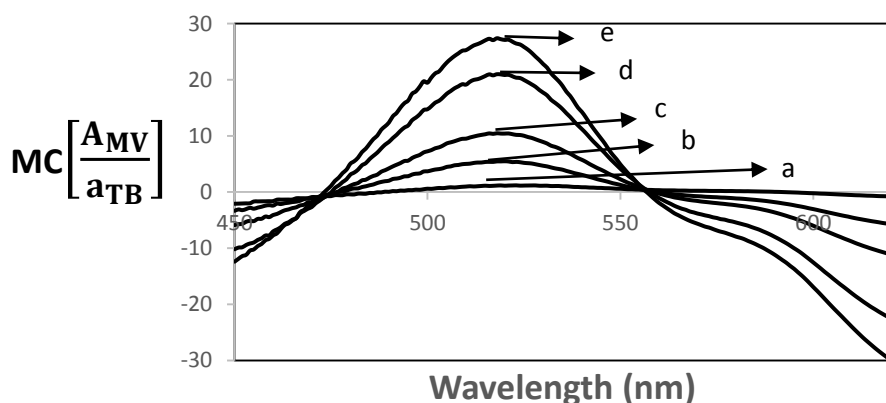
جدول ۳-۱۵: نتایج بهینه سازی محدوده میانگین گیری برای تولوئیدین بلو در سری کالیبراسیون و ارزیابی

MAE	MSE	MRE	Slope	R ²	دامنه طول موج (نانومتر)	طول موج ماکزیمم
۰/۴۶۴۹	۰/۲۴۸۴	۱۲/۸۱	۴/۰۱۰۰	۰/۹۹۸۹	۵۵۰-۶۵۰	۶۵۰
۰/۳۷۵۶	۰/۱۱۲۵	۱۱/۲۳	۴/۰۰۵۹	۰/۹۹۸۹	۵۶۰-۶۵۰	۶۵۰
۰/۲۷۳۳	۰/۱۰۲۱	۱۰/۱۱	۳/۹۸۰۲	۰/۹۹۸۹	۵۷۰-۶۵۰	۶۵۰
۰/۲۶۹۲	۰/۰۹۹۷	۹/۹۴	۳/۸۲۳۵	۰/۹۹۹۰	۵۸۰-۶۵۰	۶۵۰
۰/۲۶۳۴	۰/۰۹۶۱	۹/۷۳	۳/۶۱۸۷	۰/۹۹۹۰	۵۹۰-۶۵۰	۶۵۰
۰/۲۵۶۳	۰/۰۹۱۶	۹/۵۱	۳/۳۴۴۹	۰/۹۹۹۱	۶۰۰-۶۵۰	۶۵۰
۰/۲۴۷۷	۰/۰۸۶۵	۹/۲۶	۲/۹۷۵۵	۰/۹۹۹۲	۶۱۰-۶۵۰	۶۵۰
۰/۲۳۶۰	۰/۰۸۰۵	۸/۹۹	۲/۴۷۷۱	۰/۹۹۹۳	۶۲۰-۶۵۰	۶۵۰
۰/۲۱۹۳	۰/۰۷۹۹	۸/۹۸	۱/۸۱۲۲	۰/۹۹۹۴	۶۳۰-۶۵۰	۶۵۰
۰/۲۱۵۷	۰/۰۷۸۰	۸/۹۵	۰/۹۶۰۹	۰/۹۹۹۵	۶۴۰-۶۵۰	۶۵۰

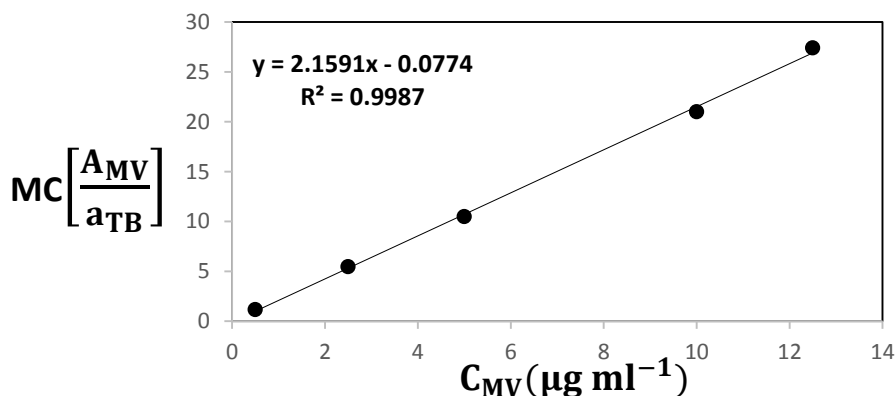
برای اندازه گیری غلظت متیل ویولت نیز طبق مراحل گفته شده عمل شد با این تفاوت که طیف مرتبه صفر غلظت های مختلف متیل ویولت بر ضریب جذب تولوئیدین بلو تقسیم گردید (شکل ۳-۲۶). برای رسیدن به بهترین صحت در روش MCM، ناحیه ی طول موج میانگین گیری مرکزی (MC) بهینه شد. به این صورت که MC در محدوده های مختلف، در اطراف طول موج ماکزیمم طیف-های نسبی حاصل (۵۱۸ نانومتر)، انجام شد (جدول ۳-۱۶). میانگین بدست آمده از هر طیف نسبی، از طیف متناظر آن کم شد (شکل ۳-۲۷) و با استفاده از مقادیر جذب در طول موج ۵۱۸ نانومتر (بیشترین حساسیت) منحنی کالیبراسیون رسم شد (شکل ۳-۲۸).



شکل ۳-۲۶: طیف های نسبی حاصل از تقسیم طیف مرتبه صفر غلظت های (a) ۰/۵۰، (b) ۰/۲۰، (c) ۰/۵۰، (d) ۱۰/۰۰ (e) ۱۲/۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر متیل ویولت بر ضریب جذب تولوئیدین بلو.

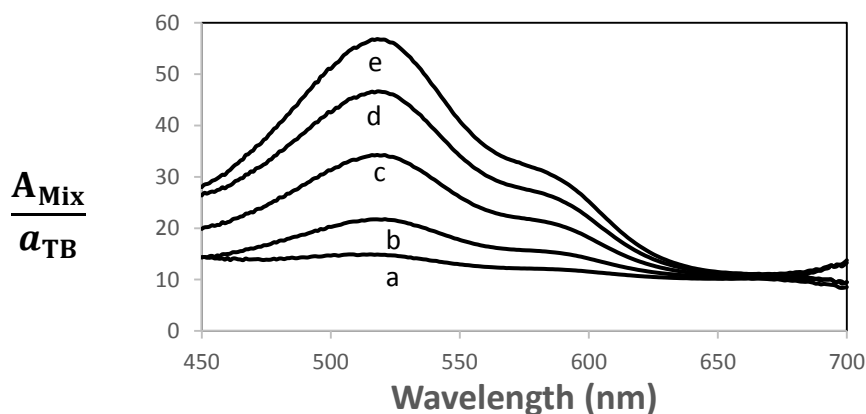


شکل ۲۷-۳: طیف‌های نسبی حاصل از تقسیم طیف مرتبه صفر غلظت های (a) ۰/۵۰، (b) ۲/۵۰، (c) ۵/۰۰، (d) ۱۰/۰۰ (c) ۱۲/۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر متیل ویولت بر ضریب جذب تولوئیدین بلو و انجام MC در ناحیه ۴۵۰-۶۵۰ نانومتر.



شکل ۲۸-۳: منحنی کالیبراسیون در طول موج ماکزیمم ۵۱۸ نانومتر، حاصل تقسیم طیف‌های مرتبه صفر غلظت های ۱۲/۵۰-۰/۵۰ متیل ویولت بر ضریب جذب تولوئیدین بلو بعد از انجام MC در ناحیه ۴۵۰-۶۵۰ نانومتر.

این مراحل بر روی طیف‌های سری ارزیابی نیز انجام شد و پس از MC طیف‌های مخلوط، جذب نسبی در طول موج ۵۱۸ نانومتر را در منحنی کالیبراسیون قرار داده شد و غلظت متیل ویولت در هر مخلوط بدست آمد. با توجه به ارزیابی مدل از طریق شاخص‌های کمی (MSE, MAE, MRE) در سری ارزیابی و همچنین شیب و R^2 منحنی کالیبراسیون نسبی، ناحیه ۴۵۰-۶۳۰ نانومتر به عنوان ناحیه بهینه برای MC متیل ویولت انتخاب شد (جدول ۳-۱۶). به عنوان مثال برای بخشی از مخلوط-های سری ارزیابی که در آن‌ها غلظت تولوئیدین بلو ثابت و متیل ویولت متغیر است، مراحل روش MCM آورده شده است.



شکل ۳-۲۹: طیف‌های نسبی حاصل از تقسیم، طیف مخلوط با غلظت‌های (a) ۱/۰۰، (b) ۲/۵۰، (c) ۵/۰۰، (d) ۷/۵۰، (e) ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر متیل ویولت به همراه ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تولوئیدین بلو بر ضریب جذب تولوئیدین بلو.

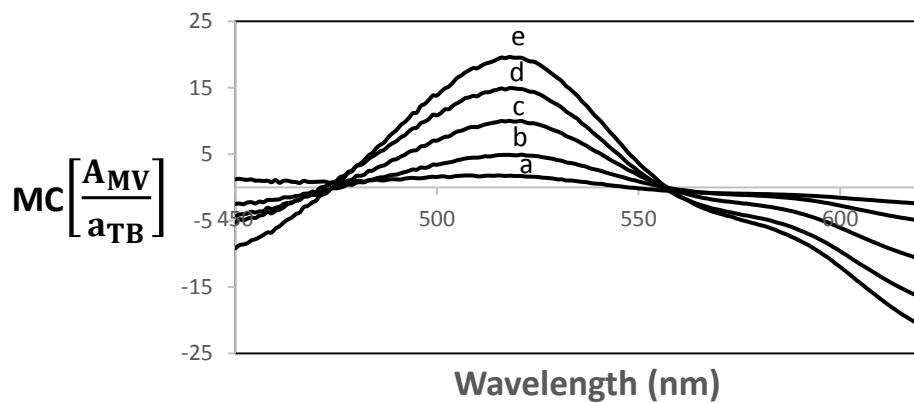
جدول ۳-۱۶: نتایج بهینه سازی محدوده میانگین گیری برای متیل ویولت در سری کالیبراسیون و ارزیابی

MAE	MSE	MRE	Slope	R ²	دامنه طول موج (نانومتر)	طول موج ماکزیمم
۰/۶۱۷۱	۰/۵۳۵۳	۲۳/۰۰	۱/۳۰۹۲	۰/۹۹۹۹	۴۵۰-۵۳۰	۵۱۸
۰/۵۷۴۳	۰/۴۶۳۵	۲۰/۷۱	۱/۲۲۴۳	۰/۹۹۹۸	۴۵۰-۵۴۰	۵۱۸
۰/۵۲۰۱	۰/۳۸۲۳	۱۷/۸۰	۱/۲۴۸۰	۰/۹۹۹۷	۴۵۰-۵۵۰	۵۱۸
۰/۴۶۶۴	۰/۳۱۲۴	۱۴/۸۷	۱/۳۲۵۳	۰/۹۹۹۶	۴۵۰-۵۶۰	۵۱۸
۰/۴۲۵۰	۰/۲۶۱۸	۱۲/۴۷	۱/۴۲۳۶	۰/۹۹۹۴	۴۵۰-۵۷۰	۵۱۸
۰/۳۹۰۲	۰/۲۲۶۴	۱۰/۵۰	۱/۵۲۳۴	۰/۹۹۹۲	۴۵۰-۵۸۰	۵۱۸
۰/۳۶۳۶	۰/۲۰۱۵	۹/۰۲	۱/۶۲۳۶	۰/۹۹۹۱	۴۵۰-۵۹۰	۵۱۸
۰/۳۴۵۲	۰/۱۸۶۱	۷/۹۵	۱/۷۳۴۵	۰/۹۹۹۰	۴۵۰-۶۰۰	۵۱۸
۰/۳۳۴۶	۰/۱۷۸۱	۷/۲۵	۱/۸۶۴۵	۰/۹۹۹۰	۴۵۰-۶۱۰	۵۱۸
۰/۳۲۹۱	۰/۱۷۵۳	۶/۷۳	۲/۰۰۹۵	۰/۹۹۸۹	۴۵۰-۶۲۰	۵۱۸
۰/۳۲۶۱	۰/۱۷۵۲	۶/۳۲	۲/۱۵۹۱	۰/۹۹۸۹	۴۵۰-۶۳۰	۵۱۸

با توجه به ناحیه بهینه MC برای تولوئیدین بلو و متیل ویولت به ترتیب در ۶۵۰-۵۷۰ و

۶۳۰-۴۵۰ نانومتر، نتایج غلظت های پیش بینی شده با روش MCM، در مخلوط سری ارزیابی و

تست به ترتیب در جدول ۳-۱۸ آورده شده است.



شکل ۳-۳: طیف‌های نسبی حاصل از تقسیم، طیف مخلوط با غلظت‌های (a) ۱/۰۰، (b) ۲/۵۰، (c) ۵/۰۰، (d) ۷/۵۰، (e) ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر متیل ویولت به همراه ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تولوئیدین بلو بر ضریب جذب تولوئیدین بلو و انجام MC در ناحیه ۴۵۰-۶۳۰ نانومتر.

جدول ۳-۱۷: نتایج غلظت‌های پیش‌بینی شده با روش MCM، در مخلوط سری ارزیابی

شماره مخلوط	غلظت‌های موجود (میکروگرم بر میلی‌لیتر)		غلظت پیش‌بینی شده (میکروگرم بر میلی‌لیتر)		درصد خطای نسبی		MAE (MSE) (MRE)	
	متیل ویولت	تولوئیدین بلو	متیل ویولت	تولوئیدین بلو	متیل ویولت	تولوئیدین بلو	متیل ویولت	تولوئیدین بلو
۱	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۲	۰/۸۵	۱/۵	-۱۴/۸	۰/۳۲۶۱	۰/۲۷۳۳
۲	۲/۵۰	۱/۰۰	۲/۴۰	۰/۵۷	-۴/۰	-۴۲/۵	(۰/۱۷۵۲)	(۰/۱۰۲۱)
۳	۵/۰۰	۱/۰۰	۴/۷۹	۰/۵۷	-۴/۲	-۴۲/۶	(۶/۳۲)	(۱۰/۱۱)
۴	۷/۵۰	۱/۰۰	۶/۷۴	۰/۸۴	-۱۰/۲	-۱۶/۱		
۵	۱۰/۰۰	۱/۰۰	۹/۳۴	۰/۷۲	-۶/۶	-۲۸/۳		
۶	۱/۰۰	۵/۰۰	۰/۸۶	۱۵/۱۸	-۱۴/۵	۳/۶		
۷	۲/۵۰	۵/۰۰	۲/۴۱	۵/۵۲	-۳/۶	۱۰/۴		
۸	۵/۰۰	۵/۰۰	۴/۶۵	۵/۱۴	-۷/۱	۲/۸		
۹	۷/۵۰	۵/۰۰	۶/۹۴	۵/۶۱	-۷/۵	۱۲/۳		
۱۰	۱۰/۰۰	۵/۰۰	۹/۳۳	۵/۵۵	-۶/۷	۱۱/۰		
۱۱	۱/۰۰	۱۰/۰۰	۰/۸۵	۱۰/۱۹	-۱۴/۶	۱/۹		
۱۲	۲/۵۰	۱۰/۰۰	۲/۳۰	۱۰/۲۸	-۷/۹	۲/۸		
۱۳	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۴/۶۸	۱۰/۳۰	-۶/۵	۳/۰		
۱۴	۷/۵۰	۱۰/۰۰	۶/۹۶	۱۰/۳۷	-۷/۲	۳/۷		
۱۵	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۹/۱۳	۱۰/۲۰	-۸/۷	۱/۰		
۱۶	۱/۰۰	۱۵/۰۰	۰/۹۹	۱۵/۱۳	-۱/۵	۰/۹		
۱۷	۲/۵۰	۱۵/۰۰	۲/۴۴	۱۵/۱۵	-۲/۴	۱/۰		
۱۸	۵/۰۰	۱۵/۰۰	۴/۷۷	۱۴/۹۶	-۴/۵	-۰/۳		
۱۹	۷/۵۰	۱۵/۰۰	۷/۰۳	۱۵/۰۰	-۶/۳	۰/۰		
۲۰	۱۰/۰۰	۱۵/۰۰	۹/۹۱	۱۵/۳۶	-۰/۹	۲/۴		

جدول ۳-۱۸: نتایج غلظت های پیش بینی شده با روش MCM، در مخلوط سری تست

شماره مخلوط	غلظت های موجود (میکروگرم بر میلی لیتر)		غلظت پیش بینی شده (میکروگرم بر میلی لیتر)		درصد خطای نسبی		MAE (MSE) (MRE)	
	متیل ویولت	تولوئیدین بلو	متیل ویولت	تولوئیدین بلو	متیل ویولت	تولوئیدین بلو	متیل ویولت	تولوئیدین بلو
۱	۱/۰۰	۷/۵۰	۰/۸۵	۷/۳۰	-۱۵/۰	-۲/۷	۰/۳۰۱۳	۰/۳۳۰۰
۲	۲/۰۰	۳/۰۰	۱/۹۴	۲/۷۰	-۳/۰	-۱۰/۰	(۰/۱۶۱۰)	(۰/۱۲۵۷)
۳	۲/۰۰	۷/۵۰	۱/۸۵	۷/۲۸	-۷/۵	-۲/۹	(۲/۸۹)	(۵/۶۹)
۴	۳/۰۰	۱/۰۰	۲/۸۷	۰/۵۸	-۴/۳	-۴۲/۰		
۵	۳/۰۰	۲/۰۰	۲/۸۶	۱/۵۳	-۴/۷	-۲۳/۵		
۶	۴/۰۰	۱۰/۰۰	۳/۷۱	۱۰/۲۹	-۷/۳	۲/۰		
۷	۹/۰۰	۱۰/۰۰	۸/۱۹	۱۰/۱۸	-۹/۰	۱/۸		
۸	۱۰/۰۰	۲/۰۰	۹/۳۲	۱/۴۴	-۶/۸	-۲۸/۰		

۳-۱-۱۲- بررسی اثر مزاحمت ها

برای بررسی قابلیت کاربرد روش های مذکور در اندازه گیری همزمان متیل ویولت و تولوئیدین بلو در نمونه های حقیقی، مزاحمت گونه های مختلف در اندازه گیری متیل ویولت و تولوئیدین بلو مورد بررسی قرار گرفت. نحوه کار به این صورت بود که، میزان جذب محلول ۲/۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر متیل ویولت یا ۵/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تولوئیدین بلو در غیاب گونه ی مزاحم در شرایط بهینه، برای شش مرتبه نسبت به شاهد اندازه گیری شد. سپس میانگین جذب و انحراف استاندارد آن، برای هر گونه با هر یک از روش های EXRSM، SRSM و MCM در شرایط بهینه شده (مطابق آنچه در تعیین همزمان متیل ویولت و تولوئیدین بلو در هر یک روش ها گفته شد) محاسبه گردید. محدوده ی اطمینان برای هر روش با توجه به رابطه ی $\bar{A} \pm 3S_A$ به دست آمد. $\bar{A}$ در این رابطه میانگین سیگنال تجزیه ای بدست آمده از هر روش برای هر کدام از گونه ها است و S_A نیز انحراف استاندارد سیگنال تجزیه ای بدست آمده برای هر کدام از گونه ها، در هر روش است. سپس در بررسی اثر مزاحمت احتمالی هر گونه، گونه ی مورد نظر با نسبت ۱۰۰۰ برابر وزنی - وزنی نسبت به متیل ویولت یا تولوئیدین بلو، به نمونه حاوی متیل ویولت یا تولوئیدین بلو اضافه گردید و مقدار لازم از این محلول به دستگاه اسپکتروفتومتر منتقل و طیف آن ثبت و ذخیره شد. سپس سیگنال تجزیه ای طیف های بدست آمده، در شرایط بهینه هر یک از روش های EXRSM، SRSM و MCM محاسبه شد. در صورتی که سیگنال تجزیه ای بدست آمده از هر کدام از روش ها در محدوده اطمینان مربوط به

خودش ($\bar{A} \pm 3S_A$) قرار گیرد، گونه‌ی مورد بررسی مزاحم در نظر گرفته نمی‌شود. در غیر این صورت نسبت وزنی گونه‌ی مزاحم به غلظت محلول‌های متیل ویولت و تولوئیدین بلو تا جایی کاهش داده می‌شود که سیگنال تجزیه ای در دامنه‌ی $\bar{A} \pm 3S_A$ قرار گیرد. نتایج در (جدول ۳-۱۹) آمده است.

جدول ۳-۱۹: نتایج حاصل از بررسی اثر گونه‌های مزاحم در اندازه‌گیری محلول‌های متیل ویولت و تولوئیدین بلو به ترتیب با غلظت‌های ۲/۵۰ و ۵/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر با استفاده از روش‌های EXRSM، SRS و MCM.

حد مجاز گونه‌ی مزاحم (وزنی/وزنی)	گونه‌های بررسی شده در اندازه‌گیری تولوئیدین بلو	گونه‌های بررسی شده در اندازه‌گیری متیل ویولت
۱۰۰۰	$Al^{3+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Hg^{2+}, Ba^{2+}, Co^{2+}, NH_4^+, K^+, Li^+, S_2O_3^{2-}, NO_3^-, SCN^-, HCO_3^-, ClO_3^-, F^-, EDTA, H_2SO_4$ اسید تارتاریک، تیو اوره	$Mg^{2+}, Mn^{2+}, Ba^{2+}, Co^{2+}, Fe^{2+}, Cu^{2+}, NH_4^+, K^+, S_2O_3^{2-}, NO_3^-, HCO_3^-, ClO_3^-, F^-, EDTA, H_2SO_4$ اسید تارتاریک، تیو اوره
۴۰۰	Fe^{2+}	Li^+, SCN^-
۲۰۰	Cu^{2+}, CN^-	$Al^{3+}, Fe^{3+}, Hg^{2+}, CN^-$
۶۰	Fe^{3+}	-
۱/۰۰	Ag^+	Ag^+

❖ کاتیون Ag^+ به دلیل حضور آنیون Cl^- در بافر سیتراتی تشکیل رسوب سفید رنگ $AgCl$ می‌دهد. به منظور رفع مزاحمت ناشی از حضور Ag^+ در محیط، ۱/۰۰ میلی لیتر محلول ۲۵/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر متیل ویولت و ۲/۰۰ میلی لیتر بافر سیتراتی با $pH=3/0$ به همراه ۲۵۰۰۰/۰ میکروگرم کاتیون Ag^+ به بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری منتقل و محلول با آب مقطر تا خط نشانه رقیق و یکنواخت گردید. سپس محلول حاصل به داخل لوله آزمایش منتقل و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ محلول فوقانی را از رسوب جدا کرده و قسمتی از آن به سل دستگاه منتقل شد و نسبت به شاهد طیف گرفته شد. برای رفع مزاحمت Ag^+ در تولوئیدین بلو به همین ترتیب عمل شد با این تفاوت که به جای متیل ویولت، ۵۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تولوئیدین بلو به همراه ۵۰۰۰۰/۰ میکروگرم کاتیون Ag^+ استفاده شد. به این ترتیب مزاحمت کاتیون Ag^+ تا ۱۰۰۰ برابر غلظت رنگ‌های مورد نظر بر طرف شد. لازم به ذکر است که می‌توان بافر سیتراتی با استفاده از سدیم سیترات و سیتریک اسید که حاوی یون کلرید نباشد نیز تهیه نمود.

❖ کاتیون Fe^{3+} به دلیل داشتن جذب اندک در طول موج ماکزیمم تولوئیدین بلو (۶۱۲ نانومتر) و تغییر رنگ محلول از رنگ آبی به رنگ سبز کم‌رنگ در اندازه‌گیری تولوئیدین-بلو ایجاد مزاحمت می‌کند که برای رفع آن از محلول EDTA استفاده شد. به این ترتیب که ۵۰/۰۰ میکروگرم تولوئیدین بلو، ۲/۰۰ میلی‌لیتر بافر سیتراتی با $pH=3/0$ به همراه ۲۰۰۰۰/۰ میکروگرم کاتیون Fe^{+3} و ۵۰۰۰۰/۰ میکروگرم EDTA به بالن حجمی ۱۰ میلی‌لیتری منتقل و محلول با آب مقطر تا خط نشانه رقیق و یکنواخت گردید. به این ترتیب مزاحمت کاتیون Fe^{+3} تا ۴۰۰ برابر غلظت تولوئیدین بلو بر طرف شد.

۳-۱-۱۳- حد تشخیص روش‌ها

به منظور بررسی حد تشخیص هر یک از روش‌ها، ده اندازه‌گیری تکراری برای شاهد انجام شد و طیف هر محلول در محدوده‌ی طول موجی ۴۵۰-۷۰۰ نانومتر ثبت گردید. سپس غلظت محلول‌های متیل‌ویولت و تولوئیدین بلو با هر یک از روش‌های EXRSM، SRSM و MCM به دست آمد. حد تشخیص هر یک از این روش‌ها به صورت جداگانه، از سه برابر انحراف استاندارد سیگنال شاهد بر شیب منحنی کالیبراسیون بدست آمده از هر روش محاسبه شد [۵۰]. با توجه به تعریف فوق، حد تشخیص تجربی روش‌ها برای رنگ‌ها در جدول ۳-۲۰ بیان شده است.

در روش دیگر حد تشخیص روش MCM از سه برابر انحراف استاندارد غلظت اندازه‌گیری شده هر گونه نیز قابل محاسبه است [۴۱، ۴۳] و مقدار آن برای تولوئیدین بلو و متیل‌ویولت به ترتیب ۰/۰۲۸ و ۰/۰۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد.

جدول ۳-۲۰: نتایج حاصل از بررسی حد تشخیص روش‌های EXRSM، SRSM و MCM در اندازه‌گیری همزمان محلول‌های متیل‌ویولت و تولوئیدین بلو.

حد تشخیص (میکروگرم بر میلی‌لیتر)		روش اندازه‌گیری
متیل‌ویولت	تولوئیدین بلو	
۰/۰۱۰	۰/۰۳۲	EXRSM
۰/۰۲۴	۰/۰۳۲	SRSM
۰/۰۵۶	۰/۰۲۸	MCM

۳-۱-۱۴- دقت و صحت روش‌ها

برای بررسی دقت و صحت هر یک از روش‌ها، محلول‌هایی با غلظت‌های متفاوت از متیل‌ویولت و تولوئیدین‌بلو در شرایط بهینه ساخته شد. برای هر یک از مخلوط‌ها شش بار اندازه‌گیری تکراری انجام گرفت و طیف هر محلول در محدوده‌ی طول موجی ۴۵۰-۷۰۰ نانومتر ثبت گردید؛ سپس غلظت متیل‌ویولت و تولوئیدین‌بلو با استفاده از هر یک از روش‌های EXRSM، SRSR و MCM محاسبه شد. نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت برای هر کدام از روش‌ها در جدول ۳-۲۱ آورده شده است.

جدول ۳-۲۱: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش‌های EXRSM، SRSR و MCM در اندازه‌گیری همزمان

محلول‌های متیل‌ویولت و تولوئیدین‌بلو

روش مورد استفاده	غلظت‌های موجود در مخلوط (میکروگرم بر میلی لیتر)		میانگین مقدار پیش بینی شده در مخلوط (میکروگرم بر میلی لیتر)		RSD% (n=6)		در صد بازیابی	
	تولوئیدین بلو	متیل ویولت	تولوئیدین بلو	متیل ویولت	تولوئیدین بلو	متیل ویولت	تولوئیدین بلو	متیل ویولت
MCM	۷/۵۰	۱/۰۰	۷/۸۵	۰/۸۸	۴/۴۶	۷/۰۴	۱۰۴/۶	۸۸/۰
	۱۵/۰۰	۱/۰۰	۱۵/۱۹	۰/۹۹	۱/۳۱۶۲	۱/۲۵	۱۰۱/۳	۹۹/۰
	۷/۵۰	۵/۰۰	۷/۷۱	۴/۶۶	۲/۷۹	۷/۳۶	۱۰۲/۸	۹۳/۲

دامنه خطی روش MCM در مخلوط‌های حاوی غلظت ۱/۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تولوئیدین‌بلو، خصوص در مخلوط‌های حاوی غلظت ۱/۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تولوئیدین‌بلو، بهتر است. آزمون t نتایج مربوط به مخلوط‌های حاوی غلظت ۱/۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تولوئیدین‌بلو و همچنین ۱/۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر متیل‌ویولت را رد می‌کند.

۳-۱-۱۵- کاربرد روش‌ها در آنالیز نمونه حقیقی

به منظور بررسی توانایی هر یک از روش‌های EXRSM، SRSR و MCM در اندازه‌گیری همزمان متیل‌ویولت و تولوئیدین‌بلو، مقادیر گونه‌ها ذکر شده در نمونه آب شهر مورد بررسی قرار گرفت. برای تهیه نمونه‌های حقیقی، از آب شهر شاهرود به عنوان بافت ثابت نمونه‌ها استفاده شد. روش کار به این صورت بود که به یک بالن حجمی ۱۰۰ میلی‌لیتری، ۵/۰۰ میلی لیتر از محلول ۵۰۰/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تولوئیدین‌بلو و به یک بالن‌های حجمی ۱۰۰ میلی‌لیتری دیگر، ۵/۰۰

میلی لیتر محلول ۵۰۰/۰ میکروگرم بر میلی لیتر متیل ویولت منتقل شد و هر بالن با آب شهر به حجم رسانده شد. از این محلول‌ها، مخلوط‌هایی با غلظت‌های مختلف، در بالن‌های حجمی ۱۰ میلی لیتری به همراه ۲/۰۰ میلی لیتر بافر سیتراتی $\text{pH} = ۳/۰$ تهیه شد. سپس طیف هر مخلوط نسبت به شاهد در دامنه ۴۵۰-۷۰۰ نانومتر ثبت و ذخیره گردید.

برای تهیه محلول شاهد، به یک بالن ۱۰ میلی لیتری ۲/۰۰ میلی لیتر بافر سیتراتی با $\text{pH} = ۳/۰$ اضافه گردید. سپس غلظت متیل ویولت و تولوئیدین بلو با استفاده از هر یک از روش‌های EXRSM، SRS و MCM محاسبه شد. نتایج حاصل از پنج مرتبه اندازه‌گیری تکراری برای هر یک از روش‌ها محاسبه و نتایج به دست آمده در جدول ۳-۲۲ آورده شده است. این نتایج نشان می‌دهد که روش‌های اسپکتروفتومتری جدید با صحت خوبی برای تعیین همزمان متیل ویولت و تولوئیدین بلو در نمونه‌های آب شهر قابل کاربرد است.

جدول ۳-۲۲: نتایج حاصل از اندازه‌گیری غلظت متیل ویولت و تولوئیدین بلو در نمونه‌های آب شهر با استفاده از هر یک از روش‌های EXRSM، SRS و MCM.

روش مورد استفاده	غلظت‌های موجود در مخلوط (میکروگرم بر میلی لیتر)		میانگین مقدار پیش بینی شده در مخلوط (میکروگرم بر میلی لیتر)		RSD% (n=5)		درصد بازیابی	
	تولوئیدین بلو	متیل ویولت	تولوئیدین بلو	متیل ویولت	تولوئیدین بلو	متیل ویولت	تولوئیدین بلو	متیل ویولت
EXRSM	۳/۰۰	۲/۰۰	۳/۰۸	۱/۹۵	۳/۲۵	۳/۰۸	۱۰۲/۷	۹۷/۵
	۱۰/۰۰	۴/۰۰	۱۰/۳۰	۳/۹۱	۳/۰۱	۲/۵۶	۱۰۳/۰	۹۷/۸
	۷/۵۰	۵/۰۰	۷/۷۰	۵/۱۱	۲/۷۳	۲/۴۰	۱۰۲/۷	۱۰۲/۲
	۱/۰۰	۱۰/۰۰	۱/۰۴	۹/۷۶	۶/۰۰	۳/۰۷	۱۰۴/۰	۹۷/۶
	۱۵/۰۰	۱/۰۰	۱۵/۲۰	۰/۹۷	۱/۳۳	۴/۱۲	۱۰۱/۳	۹۷/۰
SRS	۳/۰۰	۲/۰۰	۲/۹۷	۱/۹۸	۱/۳۵	۲/۰۲	۹۹/۰	۹۹/۰
	۱۰/۰۰	۴/۰۰	۱۰/۱۲	۳/۸۹	۱/۲۸	۳/۳۴	۱۰۱/۲	۹۷/۳
	۷/۵۰	۵/۰۰	۷/۵۰	۴/۹۱	۰/۱۳	۲/۰۴	۱۰۰/۰	۹۸/۲
	۱/۰۰	۱۰/۰۰	۱/۰۳	۹/۹۳	۵/۹۰	۰/۱۰	۱۰۳/۰	۹۹/۳
	۱۵/۰۰	۱/۰۰	۱۵/۲۸	۰/۹۸	۱/۹۰	۶/۱۰	۱۰۱/۹	۹۸/۰
MCM	۳/۰۰	۲/۰۰	۲/۷۹	۱/۹۴	۱۲/۵۰	۴/۱۰	۹۳/۰	۹۷/۰
	۱۰/۰۰	۴/۰۰	۱۰/۲۱	۳/۷۹	۲/۵۰	۶/۵۰	۱۰۲/۱	۹۴/۸
	۷/۵۰	۵/۰۰	۷/۷۳	۴/۶۸	۴/۱۰	۸/۹۰	۱۰۳/۱	۹۳/۶
	۱/۰۰	۱۰/۰۰	۰/۷۵	۹/۴۵	۳۳/۳۴	۶/۳۵	۷۵/۰	۹۴/۵
	۱۵/۰۰	۱/۰۰	۱۵/۲۱	۰/۹۸	۱/۵۸	۵/۱۰	۱۰۱/۴	۹۸/۰

۳-۲- اندازه‌گیری همزمان سیتالوپرام و ونلافاکسین با روش‌های جدید

اسپکتروفتومتری

مطابق آنچه که در فصل اول درباره اهمیت اندازه‌گیری همزمان سیتالوپرام و ونلافاکسین ذکر گردید و بر اساس مطالعات انجام شده، روش‌های EXRSM، SRS و MCM برای اندازه‌گیری همزمان این دو دارو در نمونه‌های حقیقی با آشکارسازی اسپکتروفتومتری طراحی و به کار گرفته شد. در این فصل نتایج تجربی حاصل از روش‌های به کار برده شده ارائه خواهد شد.

۳-۲-۱- مواد شیمیایی مورد استفاده

در تهیه تمام محلول‌ها از مواد شیمیایی با خلوص تجزیه‌ای استفاده شد. لیست مواد شیمیایی مورد استفاده به همراه شرکت سازنده آن‌ها در ادامه آورده شده است (جدول ۳-۲۳).

جدول ۳-۲۳: مواد شیمیایی مورد استفاده

نام ماده شیمیایی	فرمول	شرکت سازنده
ونلافاکسین	$C_{17}H_{27}NO_2$	شرکت دارو سازی نوین کاوش مامطیر (نو کام)
سیتالوپرام	$C_{20}H_{21}FN_2O$	شرکت دارو سازی نوین کاوش مامطیر (نو کام)
دی سدیم هیدروژن فسفات	Na_2HPO_4	مرک ^۱
پتاسیم دی هیدروژن فسفات	KH_2PO_4	مرک
هیدروکلریدریک اسید	HCl	مرک
سدیم هیدروکسید	NaOH	مرک
سیتریک اسید منوهیدرات	$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	مرک
پتاسیم هیدروژن فتالات	$C_8H_5KO_4$	مرک
متانول	CH_3OH	مرک

۳-۲-۲- محلول‌های استفاده شده و طرز تهیه آن‌ها

برای تهیه تمام محلول‌ها از آب مقطر استفاده گردید.

➤ محلول‌های مادر ۵۰۰/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ونلافاکسین و سیتالوپرام، روزانه با حل کردن ۰/۰۵۰۰ گرم از هر ماده در آب مقطر در یک بالن حجمی ۱۰۰ میلی‌لیتری

1- Merck

تهیه و داخل یخچال و فویل به منظور جلوگیری از تخریب دارو نگهداری شد. محلول- های با غلظت کم تر روزانه از رقیق سازی این محلول ها به صورت تهیه شد.

➤ محلول های بافر فسفاتی در $pH=4/8-8/0$ ، از اختلاط حجم های مناسبی از محلول های $0/0667$ مولار دی سدیم هیدروژن فسفات و $0/0667$ مولار پتاسیم دی هیدروژن فسفات و تنظیم pH آن ها به کمک pH متر تهیه شدند [۴۹]. برای تهیه محلول هایی با مقادیر $pH=1/0-4/0$ ، از محلول های فسفریک اسید $1/0$ مولار و پتاسیم دی هیدروژن فسفات $0/0667$ مولار و برای تهیه محلول هایی با $pH=9/0$ ، از محلول دی سدیم هیدروژن فسفات $0/0667$ مولار و محلول سود $0/10$ مولار استفاده شد.

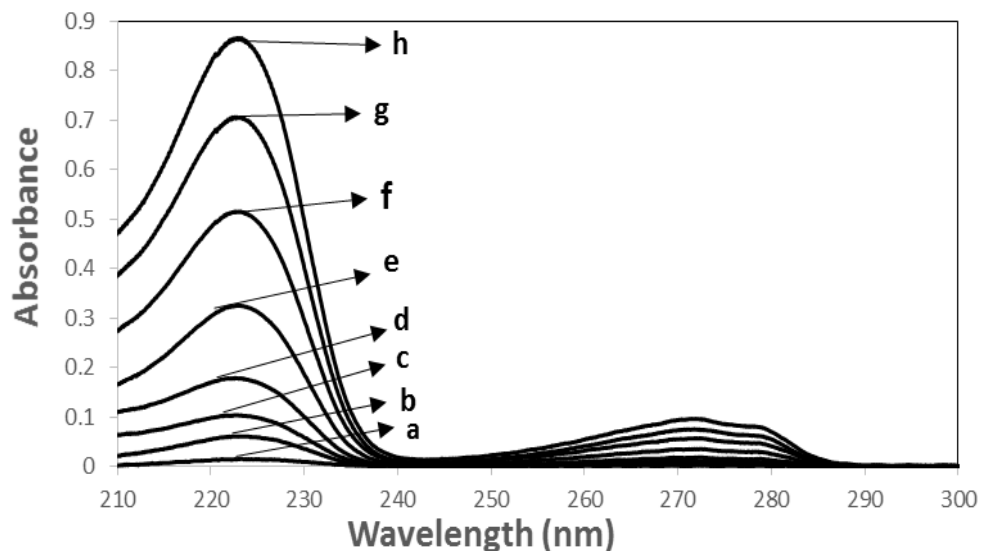
➤ برای تهیه بافر سیتراتی با $pH=7/0$ ، ابتدا $2/1014$ گرم از سیتریک اسید منوهیدرات به همراه $20/00$ میلی لیتر سود $1/0$ مولار در بالن حجمی 100 میلی لیتری اضافه شد و محلول با آب مقطر تا خط نشانه به حجم رسانده و یکنواخت گردید. سپس pH محلول فوق با استفاده از محلول سدیم هیدروکسید $1/00$ مولار و به کمک pH متر تنظیم شد [۴۹].

➤ بافر فتالاتی با $pH=7/0$ ، از اختلاط حجم های مناسبی از محلول های پتاسیم هیدروژن- فتالات $0/20$ مولار و سدیم هیدروکسید $1/00$ مولار و تنظیم pH آن به کمک pH متر تهیه گردید [۴۹].

۳-۲-۳- ثبت طیف جذبی

برای ثبت طیف های جذبی نمونه به طریق زیر عمل شد: برای تهیه محلول ونلافاکسین با غلظت $25/00-50/00$ میکروگرم بر میلی لیتر، به این ترتیب عمل شد، که حجم معینی از محلول 50 میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین به همراه $1/00$ میلی لیتر از محلول بافر فسفاتی با $pH=7/0$ اضافه گردید. پس از به حجم رساندن با آب مقطر و یکنواخت کردن محلول حاصل، مقداری از محلول به سل دستگاه منتقل شد. محلول شاهد همانند محلول نمونه تهیه گردید با این تفاوت که به آن محلول

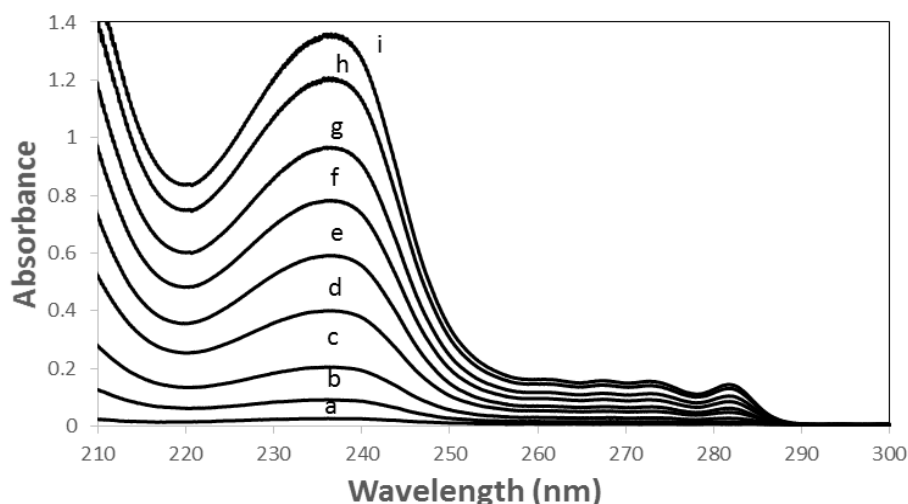
ونلافاکسین اضافه نشد. طیف محلول ونلافاکسین نسبت به محلول شاهد در گستره طول موجی ۳۰۰-۲۱۰ نانومتر ثبت گردید (شکل ۳-۳۱). همان طور که در شکل مشاهده می شود، ماکزیمم جذب مربوط به ونلافاکسین در طول موج ۲۲۲/۵ نانومتر دیده می شود.



شکل ۳-۳۱: طیف جذبی ونلافاکسین

شرایط: محلول ونلافاکسین (a) ۰/۵۰، (b) ۲/۰۰، (c) ۳/۰۰، (d) ۵/۰۰، (e) ۱۰/۰۰، (f) ۱۵/۰۰، (g) ۲۰/۰۰، (h) ۲۵/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و افزودن ۱/۰۰ میلی لیتر محلول بافر فسفاتی با $\text{pH} = 7.0$ در بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری.

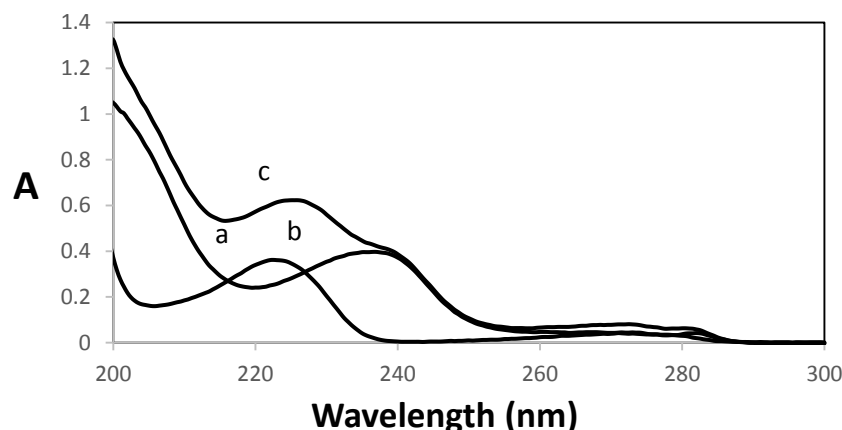
برای تهیه محلول سیتالوپرام با غلظت ۰/۵۰-۳۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر نیز روش بیان شده در مورد ونلافاکسین، انجام شد. با این تفاوت که، به جای ونلافاکسین محلول های ۰/۵۰-۳۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر محلول سیتالوپرام تهیه و طیف آن ها نسبت به شاهد ثبت گردید (شکل ۳-۳۲). با توجه به شکل، ماکزیمم جذب مربوط به سیتالوپرام در طول موج ۲۳۶ نانومتر مشاهده می شود.



شکل ۳-۳۲: طیف جذبی سیتالوپرام

شرایط: محلول سیتالوپرام (a) ۰/۵۰، (b) ۲/۰۰، (c) ۵/۰۰، (d) ۱۰/۰۰، (e) ۱۵/۰۰، (f) ۲۰/۰۰، (g) ۲۵/۰۰، (h) ۳۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و ۱/۰۰ میلی لیتر محلول بافر فسفاتی با $\text{pH}=7/0$ در بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری.

جزئیات طیفی محلول های سیتالوپرام، ونلافاکسین و مخلوط حاوی این دو گونه در شکل ۳-۳۳ آورده شده است. برای ثبت طیف جذبی محلول نمونه به این ترتیب عمل شد که به یک بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری به ترتیب ۱/۰۰ میلی لیتر محلول ونلافاکسین یا سیتالوپرام با غلظت ۱۰۰/۰ میکروگرم بر میلی لیتر و ۱/۰۰ میلی لیتر از محلول بافر فسفاتی با $\text{pH}=7/0$ اضافه و پس از به حجم رساندن با آب مقطر و یکنواخت کردن محلول حاصل، مقداری از محلول به سل دستگاه منتقل شد. محلول شاهد همانند محلول نمونه تهیه گردید با این تفاوت که به آن محلول ونلافاکسین یا سیتالوپرام اضافه نشد. برای ثبت طیف جذبی مخلوط به این ترتیب عمل شد که به یک بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری ۱/۰۰ میلی لیتر از محلول های ونلافاکسین و سیتالوپرام ۱۰۰/۰۰ میکروگرم بر میلی-لیتر و سپس ۱/۰۰ میلی لیتر از محلول بافر فسفاتی با $\text{pH}=7/0$ اضافه و پس از به حجم رساندن با آب مقطر و یکنواخت کردن محلول حاصل، مقداری از محلول به سل دستگاه منتقل شد. محلول شاهد همانند محلول نمونه تهیه گردید با این تفاوت که به آن محلول ونلافاکسین و سیتالوپرام اضافه نشد. طیف محلول ها نسبت به محلول شاهد در گستره طول موجی ۲۱۰-۳۰۰ نانومتر ثبت گردید (شکل ۳-۳۳).



شکل ۳-۳۳: طیف جذبی محلول های خالص و مخلوط ونلافاکسین و سیتالوپرام
شرایط: (a) طیف جذبی محلول ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین، (b) طیف جذبی محلول ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتالوپرام، (c) طیف جذبی محلول مخلوط ونلافاکسین و سیتالوپرام با غلظت ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از هر کدام در بافر فسفاتی با pH=۷/۰.

با توجه به شکل ۳-۳۱ و شکل ۳-۳۲ ماکزیمم جذب برای ونلافاکسین ۲۲۲/۵ نانومتر و برای سیتالوپرام ۲۳۶ نانومتر مشاهده شد. همان طور که در شکل ۳-۳۳ مشاهده می شود امکان اندازه گیری هر یک از این دو دارو به صورت جداگانه در یک مخلوط به روش اسپکتروفتومتری معمولی مستقیم امکان پذیر نمی باشد. لذا برای اندازه گیری این دو گونه در مخلوط از روش های اسپکتروفتومتری SRSM, EXRSM [۴۰] و MCM استفاده شده است. نتایج نشان داد که پیک های جذبی در طول موج های ۲۳۶ و ۲۲۲/۵ نانومتر به ترتیب با غلظت سیتالوپرام و ونلافاکسین متناسب است؛ بنابراین در بهینه سازی متغیرهای تجربی موثر بر حساسیت روش و استخراج منحنی های کالیبراسیون برای هر یک از ترکیبات، از مقدار جذب محلول ها در طول موج های ذکر شده، به عنوان سیگنال تجزیه ای استفاده شد.

۳-۲-۴- بررسی و بهینه سازی پارامترهای موثر بر سیستم

به منظور فراهم نمودن بهترین حساسیت و در نتیجه بهترین حد تشخیص، متغیرهای مؤثر بر میزان جذب ونلافاکسین و سیتالوپرام در طول موج ماکزیمم مورد بررسی قرار گرفته و بهینه شدند. در بررسی اثر متغیرها از روش بهینه سازی یک متغیر در یک زمان^۱ استفاده گردید که در این روش،

1- One-at-a-time

برای بهینه سازی یک متغیر، سایر متغیرها ثابت نگه داشته شده و متغیر مورد نظر تغییر می‌کند تا حداکثر پاسخ ایجاد شود. سایر متغیرها نیز به همین روش بهینه می‌شوند. بعد از انجام کلیه آزمایش‌ها، معمولاً مجموعه‌ای از نمودارها تهیه می‌شود که این نمودارها نحوه تأثیرپذیری متغیر پاسخ از تغییر ایجاد شده در یکی از متغیرها، زمانی که سایر متغیرها ثابت نگاه داشته شده‌اند را نشان می‌دهد. پارامترهای بررسی شده عبارتند از:

۱. اثر pH

۲. نوع بافر

۳. حجم بافر

۴. قدرت یونی

۳-۲-۴-۱- بررسی اثر pH

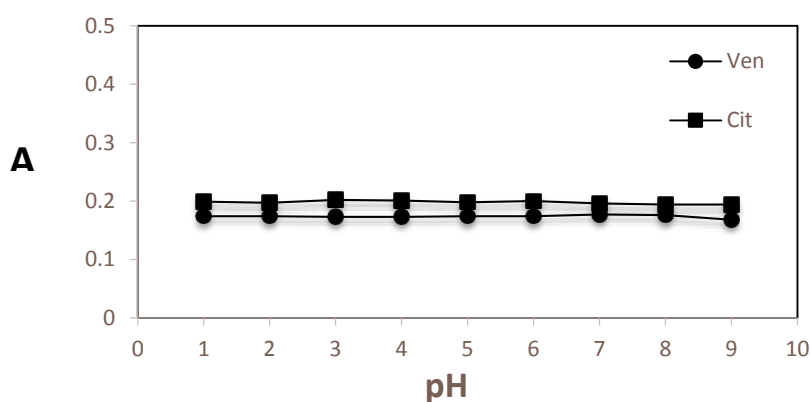
اثر pH محلول بر میزان جذب و طول موج ماکزیمم جذب سیتالوپرام در دامنه ۱/۰ تا ۹/۰ واحد pH مورد بررسی قرار گرفت. این بررسی به صورت زیر انجام شد: ابتدا ۱/۰۰ میلی‌لیتر محلول ۵۰/۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سیتالوپرام به همراه ۱/۰۰ میلی‌لیتر محلول بافر به بالن حجمی ۱۰ میلی‌لیتری منتقل و با آب مقطر تا خط نشانه رقیق و یکنواخت گردید و قسمتی از آن به سل دستگاه منتقل شد. محلول شاهد همانند محلول نمونه تهیه گردید. با این تفاوت که به آن محلول سیتالوپرام اضافه نشد. سپس طیف محلول سیتالوپرام نسبت به محلول شاهد گرفته شد و سپس در هر pH برای هر محلول، طول موجی که دارای بیشترین میزان جذب بود، شناسایی و ثبت گردید. برای محلول ونلافاکسین نیز به همین صورت عمل شد با این تفاوت که به جای محلول سیتالوپرام، ۱/۰۰ میلی‌لیتر محلول ۵۰/۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر محلول ونلافاکسین به بالن حجمی ۱۰/۰۰ میلی‌لیتری اضافه شد.

نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۳-۲۴ و شکل ۳-۳۴ نشان می‌دهند که میزان جذب برای ونلافاکسین و سیتالوپرام در دامنه ۹/۰-۱/۰ pH تقریباً ثابت بوده و مستقل از pH می‌باشد و

همچنین اختلاف طول موج ونلافاکسین و سیتالوپرام در pH های مختلف تقریباً ثابت است. لذا برای بررسی‌های بعدی $pH=7/0$ انتخاب شد.

جدول ۳-۲۴: نتایج حاصل از بررسی اثر pH

اختلاف طول موج ونلافاکسین و سیتالوپرام	سیتالوپرام		ونلافاکسین		pH
	جذب	طول موج (نانومتر)	جذب	طول موج (نانومتر)	
۱۳/۹	۰/۱۹۹	۲۳۶/۰	۰/۱۷۴	۲۲۲/۱	۱/۰
۱۳/۸	۰/۱۹۷	۲۳۶/۰	۰/۱۷۴	۲۲۲/۲	۲/۰
۱۳/۶	۰/۲۰۲	۲۳۶/۰	۰/۱۷۳	۲۲۲/۴	۳/۰
۱۳/۶	۰/۲۰۱	۲۳۶/۰	۰/۱۷۳	۲۲۲/۴	۴/۰
۱۳/۶	۰/۱۹۸	۲۳۶/۰	۰/۱۷۴	۲۲۲/۴	۵/۰
۱۳/۵	۰/۲۰۰	۲۳۶/۰	۰/۱۷۴	۲۲۲/۵	۶/۰
۱۳/۵	۰/۱۹۶	۲۳۶/۰	۰/۱۷۷	۲۲۲/۵	۷/۰
۱۳/۶	۰/۲۰۱	۲۳۶/۰	۰/۱۷۶	۲۲۲/۴	۸/۰
۱۳/۶	۰/۱۹۴	۲۳۶/۰	۰/۱۶۸	۲۲۲/۴	۹/۰



شکل ۳-۳۴: بررسی اثر pH در طول موج ماکزیمم هر pH

شرایط: محلول سیتالوپرام یا ونلافاکسین (۵/۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در حضور ۱/۰۰ میلی‌لیتر بافر با pH های مختلف در بالن حجمی ۱۰ میلی‌لیتری.

۳-۲-۴-۲- بررسی اثر نوع بافر

پس از بررسی اثر pH، با توجه به pH بهینه، برای دستیابی به حساسیت بیشتر، اثر نوع بافر بر میزان جذب سیتالوپرام توسط سه نوع بافر فسفات، فتالاتی و سیتراتی با $pH=7/0$ مورد بررسی قرار گرفت. در این مرحله روش کار به شیوه زیر بود:

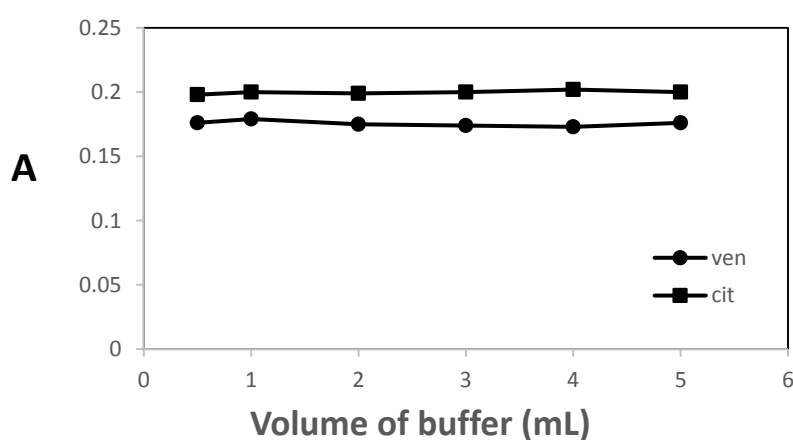
ابتدا ۱/۰۰ میلی لیتر از بافر مورد نظر با $\text{pH}=7/0$ و ۱/۰۰ میلی لیتر محلول ۵۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از سیتالوپرام به یک بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری اضافه گردید و پس از آن با افزودن آب مقطر به بالن حجمی، محلول ها تا خط نشانه رقیق و یکنواخت گردید. سپس قسمتی از آن به سل دستگاه منتقل شد و طیف محلول های مختلف سیتالوپرام نسبت به محلول شاهد ثبت گردید. برای محلول ونلافاکسین مراحل ذکر شده در بالا انجام شد، با این تفاوت که به جای محلول سیتالوپرام، ۱/۰۰ میلی لیتر محلول ۵۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر محلول ونلافاکسین به بالن حجمی ۱۰/۰۰ میلی لیتری اضافه گردید. مشاهدات نشان داد بافرهای فتالاتی و سیتراتی در ناحیه طول موجی ۳۰۰-۲۱۰ نانومتر به تنهایی دارای جذب بوده و ایجاد مزاحمت می کنند. لذا برای بررسی های بعدی، بافر فسفاتی با $\text{pH}=7/0$ برای تنظیم pH محلول ها انتخاب شد.

۳-۲-۳-۴-۳- بررسی اثر حجم بافر

پس از بررسی اثر نوع بافر، اثر حجم بافر فسفاتی با $\text{pH}=7/0$ در دامنه ۵۰/۰۰-۰/۵۰ میلی لیتر از بافر مورد بررسی قرار گرفت. این بررسی به این صورت انجام شد که: ۱/۰۰ میلی لیتر محلول ۵۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتالوپرام به همراه حجم های مختلفی از بافر فسفاتی با $\text{pH}=7/0$ به بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری منتقل شده و محلول ها با آب مقطر تا خط نشانه رقیق و یکنواخت گردید. سپس قسمتی از آن به سل دستگاه منتقل شد. محلول شاهد همانند محلول نمونه تهیه شد با این تفاوت که به آن محلول سیتالوپرام اضافه نشد. برای محلول ونلافاکسین مراحل ذکر شده در مورد سیتالوپرام انجام شد با این تفاوت که به جای محلول سیتالوپرام، ۱/۰۰ میلی لیتر محلول ۵۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر محلول ونلافاکسین به بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری اضافه گردید. پس از آن، طیف محلول های سیتالوپرام و ونلافاکسین نسبت به محلول شاهد ثبت گردید. میزان جذب محلول ها در طول موج های ۲۳۶ و ۲۲۲/۵ نانومتر به ترتیب برای سیتالوپرام و ونلافاکسین ثبت شد. نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۳-۲۵ و شکل ۳-۳۵ نشان می دهند که میزان جذب داروها در حجم های مختلف از بافر فسفاتی ثابت است. بنابراین در بررسی های بعدی برای اطمینان از کافی بودن ظرفیت بافری حجم ۱/۰۰ میلی لیتر از بافر فسفاتی برای مطالعات و بررسی های بعدی انتخاب شد.

جدول ۳-۲۵: نتایج حاصل از بررسی اثر حجم بافر

جذب		حجم بافر (میلی لیتر)
سیتالوپرام (۲۳۶ نانومتر)	ونلافاکسین (۲۲۲/۵ نانومتر)	
۰/۱۹۸	۰/۱۷۶	۰/۵۰
۰/۲۰۰	۰/۱۷۹	۱/۰۰
۰/۱۹۹	۰/۱۷۵	۲/۰۰
۰/۲۰۰	۰/۱۷۴	۳/۰۰
۰/۲۰۲	۰/۱۷۳	۴/۰۰
۰/۲۰۰	۰/۱۷۶	۵/۰۰



شکل ۳-۳۵: بررسی اثر حجم بافر

شرایط: محلول سیتالوپرام یا ونلافاکسین (۵/۰ میکروگرم بر میلی لیتر) در حضور حجم های مختلف از بافر فسفات با pH=۷/۰ در بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری.

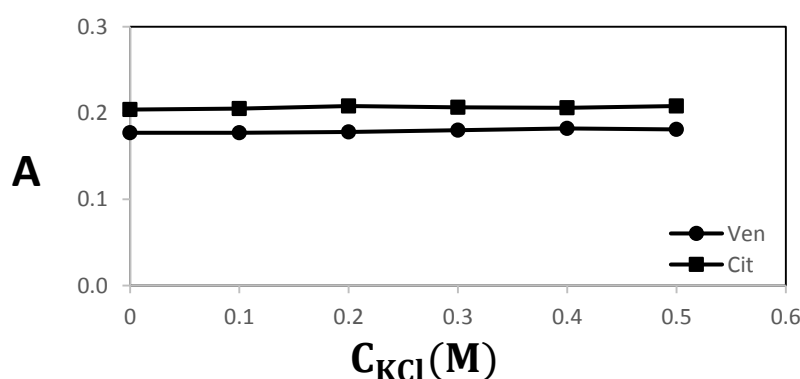
۳-۲-۴-۴- بررسی اثر قدرت یونی

پارامتر دیگری که می تواند بر روی میزان جذب محلول های مورد بررسی اثر بگذارد، اثر قدرت یونی است. برای بررسی اثر قدرت یونی از محلول پتاسیم کلرید ۱/۰۰ مولار استفاده شد. این بررسی به صورت زیر انجام شد: ابتدا ۱/۰۰ میلی لیتر محلول ۵۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتالوپرام، ۱/۰۰ میلی لیتر بافر فسفات با pH=۷/۰ به همراه حجم های مختلفی از محلول پتاسیم کلرید ۱/۰۰ مولار به بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری منتقل و محلول ها با آب مقطر تا خط نشانه رقیق و یکنواخت گردید. سپس قسمتی از آن به سل دستگاه منتقل شد و طیف محلول سیتالوپرام نسبت به محلول شاهد ثبت

گردید. برای محلول ونلافاکسین مراحل ذکر شده برای محلول سیتالوپرام انجام شد با این تفاوت که به جای محلول سیتالوپرام، ۱/۰۰ میلی لیتر محلول ۵۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر محلول ونلافاکسین به بالن حجمی ۱۰/۰۰ میلی لیتری اضافه شد. میزان جذب در طول موج های ۲۳۶ و ۲۲۲/۵ نانومتر به ترتیب برای محلول های سیتالوپرام و ونلافاکسین ثبت گردید. برای تهیه محلول شاهد ۱/۰۰ میلی لیتر بافر فسفاتی با pH=۷/۰ را به بالن حجمی ۱۰/۰۰ میلی لیتری منتقل و سپس با آب مقطر تا خط نشانه رقیق و یکنواخت شد. نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۳-۲۶ و شکل ۳-۳۶ نتایج نشان می دهند که در دامنه غلظتی ۰/۰۰ تا ۰/۵۰ مولار پتاسیم کلرید قدرت یونی تاثیری بر میزان جذب داروها و حساسیت روش ندارد.

جدول ۳-۲۶: نتایج حاصل از بررسی اثر قدرت یونی

جذب		غلظت پتاسیم کلرید (مولار)
سیتالوپرام (۲۳۶ نانومتر)	ونلافاکسین (۲۲۲/۵ نانومتر)	
۰/۱۹۸	۰/۱۷۷	۰/۰۰
۰/۲۰۰	۰/۱۷۷	۰/۱۰
۰/۲۰۴	۰/۱۷۸	۰/۲۰
۰/۲۰۵	۰/۱۸۰	۰/۳۰
۰/۲۰۶	۰/۱۸۲	۰/۴۰
۰/۲۰۷	۰/۱۸۱	۰/۵۰



شکل ۳-۳۶: بررسی اثر قدرت یونی

شرایط: محلول سیتالوپرام یا ونلافاکسین (۵۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر)، ۱/۰۰ میلی لیتر از بافر فسفاتی با pH=۷/۰ در بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری.

۳-۲-۵- شرایط بهینه

با توجه به نتایج تجربی حاصل در بررسی و بهینه سازی پارامترهای موثر بر میزان جذب محلول‌های سیتالوپرام و ونلافاکسین در طول موج‌های ماکزیمم مربوطه، شرایط بهینه با افزایش ۱/۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفاتی با $\text{pH}=7/0$ تنظیم شد.

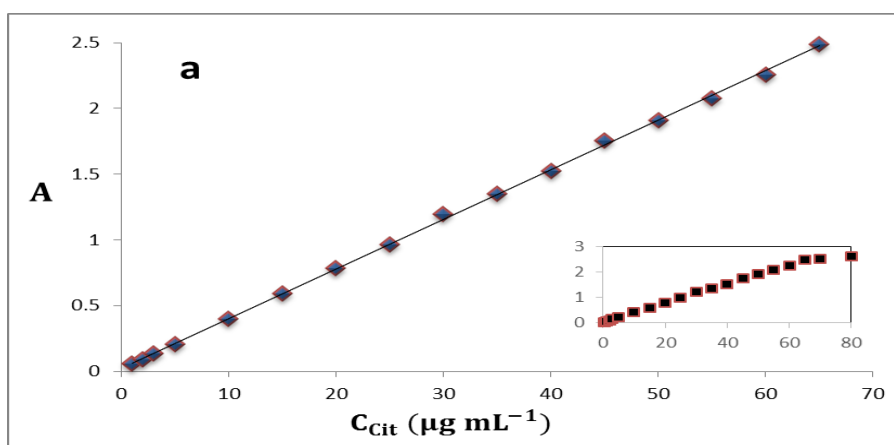
۳-۲-۶- رسم منحنی کالیبراسیون سیتالوپرام و ونلافاکسین به صورت جداگانه

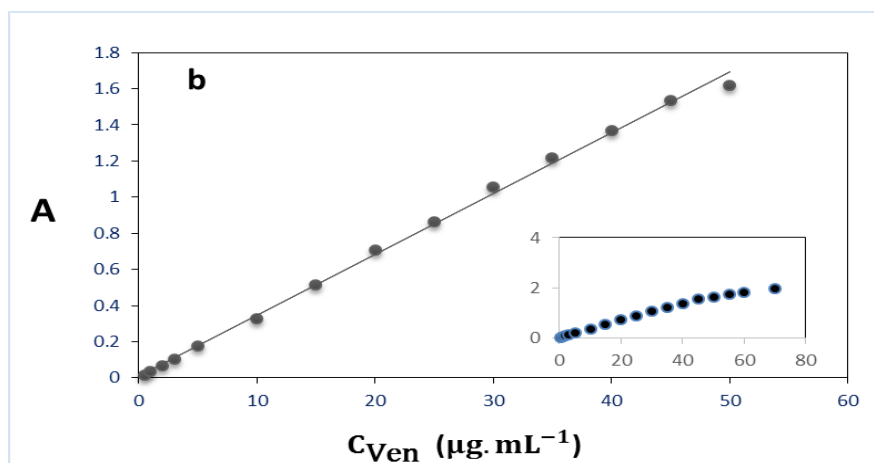
رسم منحنی کالیبراسیون سیتالوپرام به این صورت انجام شد: برای تهیه محلول سیتالوپرام با غلظت ۵۰/۰۰-۰/۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، به ترتیب زیر عمل شد، که حجم معینی از محلول ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سیتالوپرام، به همراه ۱/۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفاتی با $\text{pH}=7/0$ به یک بالن حجمی ۱۰ میلی‌لیتری اضافه شد. سپس بالن‌ها تا خط نشانه با آب مقطر به حجم رسانده و یکنواخت شدند. محلول شاهد همانند محلول نمونه تهیه شد با این تفاوت که به آن محلول سیتالوپرام اضافه نگردید. سپس قسمتی از محلول به سل دستگاه اسپکتروفتومتر منتقل شد و جذب محلول نسبت به شاهد ثبت گردید. برای محلول ونلافاکسین مراحل ذکر شده در بالا برای سیتالوپرام، انجام شد. با این تفاوت که محلول ونلافاکسین با غلظت‌های ۴۰/۰۰-۰/۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، از برداشتن حجم معینی محلول ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ونلافاکسین، به همراه ۱/۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفاتی با $\text{pH}=7/0$ به یک بالن حجمی ۱۰ میلی‌لیتری اضافه شد. میزان جذب در طول موج‌های ۲۳۶ و ۲۲۲/۵ نانومتر به ترتیب برای سیتالوپرام و ونلافاکسین ثبت شد. نتایج حاصل در جدول ۳-۲۷ آورده شده است.

در نهایت نمودار میزان جذب نسبت به غلظت سیتالوپرام و ونلافاکسین، به عنوان منحنی کالیبراسیون رسم شد که این نمودارها در ۳-۳۷ شکل نشان داده شده است. سپس معادله بهترین خط برای منحنی درجه بندی از روش رگرسیون حداقل مربعات استخراج شد و نتایج حاصل در جدول ۳-۲۸ آمده است.

جدول ۳-۲۷: تغییرات میزان جذب بر حسب غلظت ونلافاکسین و سیتالوپرام

جذب		غلظت (میکروگرم بر میلی لیتر)
سیتالوپرام (۲۳۶ نانومتر)	ونلافاکسین (۲۲۲/۵ نانومتر)	
۰/۰۲۶	۰/۰۱۴	۰/۵۰
۰/۰۵۶	۰/۰۳۶	۱/۰۰
۰/۰۹۱	۰/۰۶۵	۲/۰۰
۰/۱۳۷	۰/۱۰۳	۳/۰۰
۰/۲۰۲	۰/۱۷۷	۵/۰۰
۰/۴۰۰	۰/۳۲۸	۱۰/۰۰
۰/۵۹۱	۰/۵۱۵	۱۵/۰۰
۰/۷۸۳	۰/۷۰۵	۲۰/۰۰
۰/۹۶۲	۰/۸۶۶	۲۵/۰۰
۱/۱۹۳	۱/۰۵۶	۳۰/۰۰
۱/۳۴۸	۱/۲۱۸	۳۵/۰۰
۱/۵۲۴	۱/۳۷۱	۴۰/۰۰
۱/۷۵۳	۱/۵۳۳	۴۵/۰۰
۱/۹۱۰	۱/۶۲۰	۵۰/۰۰
۲/۰۷۹	۱/۷۵۰	۵۵/۰۰
۲/۲۵۶	۱/۸۲۳	۶۰/۰۰
۲/۴۸۸	–	۶۵/۰۰
۲/۵۲۰	۱/۹۷۲	۷۰/۰۰
۲/۶۱۲	–	۸۰/۰۰





شکل ۳-۳۷: (a) منحنی کالیبراسیون سیتالوپرام (b) منحنی کالیبراسیون ونلافاکسین
تحت شرایط بهینه: (a) ۸۰/۰۰ - ۰/۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر از محلول استاندارد سیتالوپرام (b) ۷۰/۰۰ - ۰/۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر از محلول استاندارد ونلافاکسین، هر کدام در حضور ۱/۰۰ میلی لیتر از بافر فسفاتی با pH=۷/۰ در بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری.

جدول ۳-۲۸: نتایج حاصل از منحنی کالیبراسیون ونلافاکسین و سیتالوپرام

ترکیب	ونلافاکسین	سیتالوپرام
ناحیه خطی بر حسب (میکرو گرم بر میلی لیتر)	۵۰/۰۰ - ۰/۵۰	۶۵/۰۰ - ۰/۵۰
معادله رگرسیون	$A = 0.0345 C_{Ven} - 0.0003$ (n=۱۴)	$A = 0.0377 C_{Cit} + 0.0241$ (n=۱۶)
R^2	۰/۹۹۸۰	۰/۹۹۹۶

در این روابط، نشانه‌های A ، R^2 ، C_{Ven} و C_{Cit} به ترتیب نشان دهنده سیگنال تجزیه ای مربوط به هر گونه (جذب محلول نمونه نسبت به محلول شاهد) در طول موج ماکزیمم مربوط به هر گونه، ضریب تعیین، غلظت ونلافاکسین و غلظت سیتالوپرام بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر برای هر نمودار می‌باشند.

۳-۲-۷- رسم منحنی کالیبراسیون سیتالوپرام و ونلافاکسین در حضور یکدیگر

با توجه به اینکه در طول موج ماکزیمم ونلافاکسین، سیتالوپرام دارای جذب می‌باشد، بنابراین ممکن است در حضور سیتالوپرام میزان خطی بودن در غلظت و جذب در غلظت‌های بالای ونلافاکسین از بین برود. بنابراین محدوده خطی غلظت ونلافاکسین در حضور سیتالوپرام بررسی گردید. روش کار در رسم منحنی کالیبراسیون ونلافاکسین و سیتالوپرام در حضور هم، همانند تعیین منحنی کالیبراسیون منفرد برای ونلافاکسین یا سیتالوپرام است، با این تفاوت که در این مرحله

ونلافاکسن و سیتالوپرام هر دو حضور دارند.

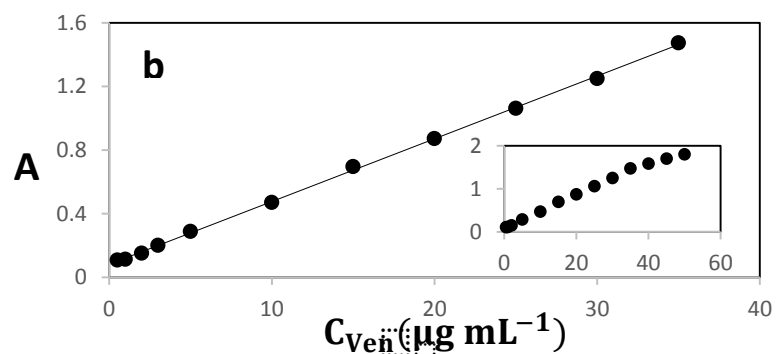
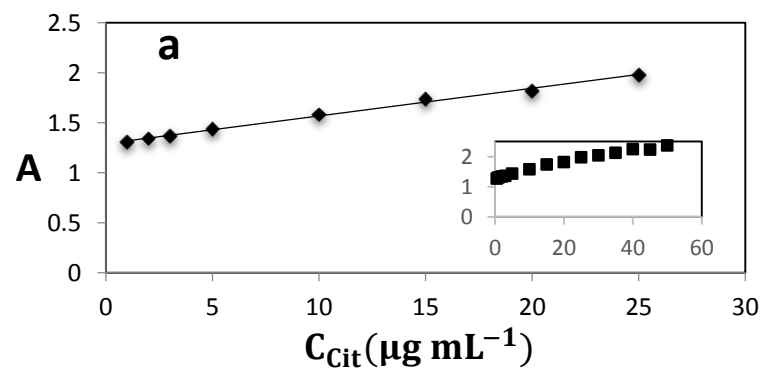
روش کار برای رسم منحنی کالیبراسیون ونلافاکسین در حضور سیتالوپرام به این صورت بود که، ابتدا خطی بودن رابطه میزان جذب بر حسب غلظت ونلافاکسین در حد بالای دامنه خطی سیتالوپرام ($50/00$ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بررسی شد. به این ترتیب که ابتدا به یک بالن حجمی 10 میلی‌لیتری، $1/00$ میلی‌لیتر بافر فسفاتی با $pH=7/0$ ، $2/00$ میلی‌لیتر محلول $250/0$ میکروگرم بر میلی‌لیتر از محلول سیتالوپرام و سپس حجم‌های لازم از محلول استاندارد ونلافاکسین اضافه گردید و تا خط نشانه با آب مقطر به حجم رسانده و یکنواخت شد. همچنین به دلیل اینکه در طول موج ماکزیمم سیتالوپرام، ونلافاکسین نیز دارای جذب می‌باشد، مراحل ذکر شده برای ونلافاکسین در مورد سیتالوپرام نیز انجام شد.

روش کار برای رسم منحنی کالیبراسیون سیتالوپرام در حضور ونلافاکسین به صورت زیر بود: به یک بالن حجمی 10 میلی‌لیتری، $1/00$ میلی‌لیتر بافر فسفاتی با $pH=7/0$ ، $2/00$ میلی‌لیتر محلول $200/0$ میکروگرم بر میلی‌لیتر ونلافاکسین و سپس حجم‌های لازم از محلول استاندارد سیتالوپرام اضافه گردید و محلول تا خط نشانه با آب مقطر به حجم رسانده و یکنواخت شد. محلول شاهد همانند محلول نمونه تهیه گردید با این تفاوت که به آن محلول سیتالوپرام و ونلافاکسین اضافه نگردید. سپس قسمتی از محلول به سل دستگاه اسپکتروفتومتر منتقل شد و جذب محلول نسبت به شاهد ثبت گردید. میزان جذب در طول موج‌های 236 و $222/5$ نانومتر به ترتیب برای سیتالوپرام و ونلافاکسین ثبت شد (جدول ۳-۲۹). در نهایت نمودار میزان جذب بر حسب غلظت سیتالوپرام در حد بالای ونلافاکسین و نمودار میزان جذب بر حسب غلظت ونلافاکسین در حد بالای سیتالوپرام رسم گردید (شکل ۳-۳۸). در این بررسی مشخص شد در دامنه غلظتی $25/00-1/00$ میکروگرم بر میلی‌لیتر از ونلافاکسین رابطه خطی بین مقادیر جذب با غلظت ونلافاکسین در حد بالای غلظت سیتالوپرام برقرار است. همچنین در دامنه غلظتی $35/00-0/50$ میکروگرم بر میلی‌لیتر سیتالوپرام، میان میزان جذب و غلظت سیتالوپرام در حد بالای ونلافاکسین رابطه خطی وجود دارد. منحنی کالیبراسیون در طول موج ماکزیمم ونلافاکسین ($222/5$ نانومتر) و سیتالوپرام (236 نانومتر) بدست آمد. نتایج در (جدول ۳-۳۰)

و (۳-۳۱) آورده شده است.

جدول ۳-۲۹: تغییرات میزان جذب بر حسب غلظت ونلافاکسین و سیتالوپرام در حضور یکدیگر

غلظت (میکروگرم بر میلی لیتر)	سیتالوپرام در حضور ۴۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین	ونلافاکسین در حضور ۵۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتالوپرام
۰/۵	۱/۲۷۱	۰/۱۰۸
۱/۰	۱/۳۱۱	۰/۱۱۳
۲/۰	۱/۳۴۲	۰/۱۵۱
۳/۰	۱/۳۶۵	۰/۲۰۰
۵/۰	۱/۴۳۸	۰/۲۸۸
۱۰/۰	۱/۵۸۳	۰/۴۷
۱۵/۰	۱/۷۳۸	۰/۶۹۵
۲۰/۰	۱/۸۲۰	۰/۸۷۲
۲۵/۰	۱/۹۸۰	۱/۰۶۲
۳۰/۰	۲/۰۴۳	۱/۲۴۹
۳۵/۰	۲/۱۲۹	۱/۴۷۳
۴۰/۰	۲/۲۴۹	۱/۵۸۶
۴۵/۰	۲/۲۳۵	۱/۷۰۰
۵۰/۰	۲/۳۷۵	۱/۸۰۰



شکل ۳-۳۸: (a) منحنی کالیبراسیون سیتالوپرام در حضور ۴۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین در بافر فسفات با pH= ۷/۰ (b) منحنی کالیبراسیون ونلافاکسین در حضور ۵۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتالوپرام در بافر فسفات با pH= ۷/۰

جدول ۳-۳۰: نتایج حاصل از بررسی دامنه خطی سیتالوپرام در حضور ۴۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین

ناحیه خطی بر حسب (میکرو گرم بر میلی لیتر)	۰/۵۰ - ۳۵/۰۰
معادله رگرسیون	$A = ۰/۰۳۹۵ C_{Cit} + ۰/۰۸۲$ (n=۸)
R^2	۰/۹۹۹۵

جدول ۳-۳۱: نتایج حاصل از بررسی دامنه خطی ونلافاکسین در حضور ۵۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتالوپرام

ناحیه خطی بر حسب (میکرو گرم بر میلی لیتر)	۱/۰۰ - ۲۵/۰۰
معادله رگرسیون	$A = ۰/۰۲۷۷ C_{Ven} + ۱/۲۹۲$ (n=۸)
R^2	۰/۹۹۵۲

نشانه‌های A ، R ، C_{Cit} و C_{Ven} به ترتیب نشان دهنده سیگنال تجزیه مربوط به هر گونه (جذب محلول نمونه نسبت به محلول شاهد) در طول موج ماکزیمم مربوط به هر گونه، مجذور ضریب تعیین، غلظت ونلافاکسین و غلظت سیتالوپرام بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر برای هر نمودار می‌باشند.

۳-۲-۸- محلول سازی سری‌های تست و ارزیابی

برای اندازه‌گیری همزمان سیتالوپرام و ونلافاکسین از روش‌های اسپکتروفتومتری جدید (EXRSM و SRSM) و MCM استفاده شد. به منظور بررسی صحت این روش‌ها، محلول‌های سری ارزیابی و تست حاوی هر دو رنگ تهیه و طیف آن‌ها نسبت به محلول شاهد در دامنه ۳۰۰-۲۱۰ نانومتر ثبت و مورد بررسی قرار گرفت.

روش تهیه محلول‌های مختلف سری ارزیابی و تست به این صورت بود: به یک سری بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری، ۱/۰۰ میلی لیتر بافر فسفاتی با $pH=۷/۰$ منتقل و همچنین حجم‌های ۰/۰۰ تا ۴/۰۰ میلی لیتر از محلول ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین و نیز حجم ۰/۰۰ تا ۴/۰۰ میلی لیتر از محلول ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتالوپرام افزوده و با آب مقطر به حجم رسانده شد. محلول شاهد نیز مثل محلول نمونه تهیه گردید با این تفاوت که به آن سیتالوپرام و ونلافاکسین افزوده نشد. سپس طیف هر مخلوط نسبت به محلول شاهد در گستره ۳۰۰-۲۱۰ نانومتر ثبت و ذخیره گردید. غلظت مخلوط‌های ساخته شده در سری ارزیابی و تست به ترتیب در جدول ۳-۳۲ و جدول ۳-۳۳ آورده شده است.

جدول ۳-۳۲: مخلوط‌های ونلافاکسین و سیتالوپرام در سری ارزیابی

شماره مخلوط	سیتالوپرام (میکروگرم بر میلی لیتر)	ونلافاکسین (میکروگرم بر میلی لیتر)
۱	۲۰/۰۰	۱/۰۰
۲	۲۰/۰۰	۳/۰۰
۳	۱۶/۰۰	۱۶/۰۰
۴	۱۰/۰۰	۲/۰۰
۵	۱۰/۰۰	۵/۰۰
۶	۱۰/۰۰	۸/۰۰
۷	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰
۸	۸/۰۰	۱۰/۰۰
۹	۷/۰۰	۱۴/۰۰
۱۰	۶/۰۰	۲/۰۰
۱۱	۵/۰۰	۱۰/۰۰
۱۲	۴/۰۰	۸/۰۰
۱۳	۴/۰۰	۲/۰۰
۱۴	۲/۰۰	۴/۰۰
۱۵	۲/۰۰	۶/۰۰
۱۶	۱/۶۰	۱۶/۰۰

جدول ۳-۳۳: مخلوط‌های ونلافاکسین و سیتالوپرام در سری تست

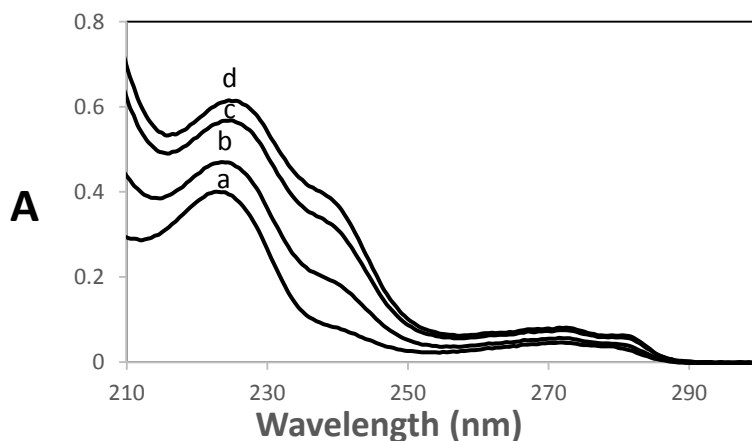
شماره مخلوط	سیتالوپرام (میکروگرم بر میلی لیتر)	ونلافاکسین (میکروگرم بر میلی لیتر)
۱	۲۰/۰۰	۱۰/۰۰
۲	۱۰/۰۰	۱۵/۰۰
۳	۱۰/۰۰	۱/۰۰
۴	۱۵/۰۰	۱۰/۰۰
۵	۸/۰۰	۸/۰۰
۶	۴/۰۰	۴/۰۰
۷	۲/۰۰	۱۰/۰۰
۸	۳/۰۰	۱۶/۰۰

۳-۲-۹- تعیین همزمان سیتالوپرام و ونلافاکسین در مخلوط دوتایی هر یک به روش

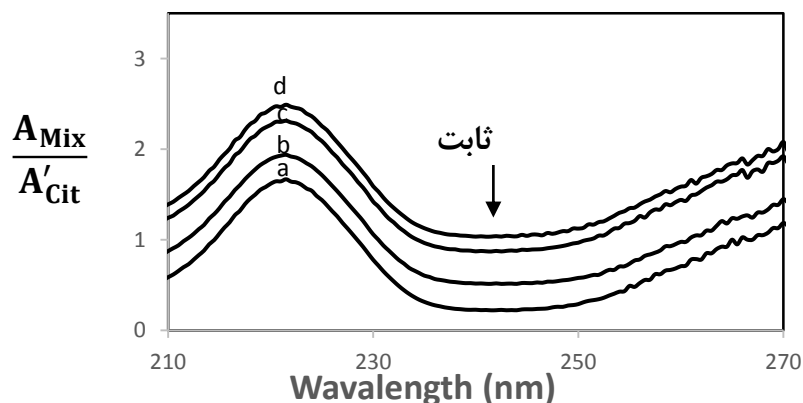
EXRSM

برای رسیدن به بهترین صحت در روش EXRSM باید غلظت سیتالوپرام به عنوان مقسوم علیه بهینه شود. برای این منظور، از محلول‌های سری ارزیابی برای بهینه سازی غلظت مقسوم علیه استفاده شد و با استفاده از مقسوم علیه بهینه غلظت هر یک از داروها در مخلوط‌های سری ارزیابی محاسبه

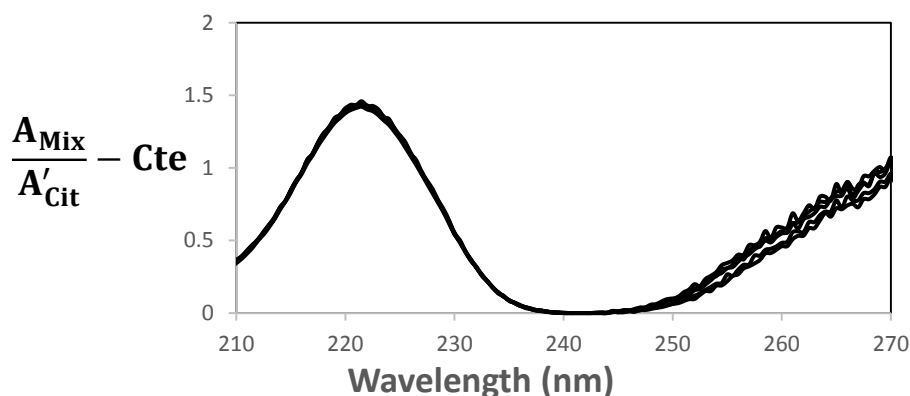
شد. به عنوان مثال برای تعدادی از مخلوط های سری ارزیابی که در آن ها غلظت سیتالوپرام ثابت و غلظت ونلافاکسین تغییر می کند (شکل ۳-۳۹)، مراحل روش EXRSM آورده شده است. طیف مرتبه صفر محلول های با غلظت مختلف سیتالوپرام به عنوان مقسوم علیه به کار برده شد. سپس طیف هر مخلوط (حاوی سیتالوپرام و ونلافاکسین) به طیف خالص محلول سیتالوپرام با غلظت معین تقسیم گردید تا طیف نسبی به دست آید. مقدار ثابت (که در این مرحله وابسته به مقدار سیتالوپرام در هر مخلوط است) برای هر طیف نسبی در محدوده ای که طیف مرتبه ی صفر سیتالوپرام جذب داشته باشد ولی طیف مرتبه ی صفر ونلافاکسین جذب نداشته باشد، بدست آورده شد (شکل ۳-۴۰) و مقدار ثابت از هر طیف نسبی کم شد (شکل ۳-۴۱).



شکل ۳-۳۹: طیف های جذبی مخلوط های حاوی (a) ۲/۰۰، (b) ۵/۰۰، (c) ۸/۰۰، (d) ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین و ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتالوپرام.

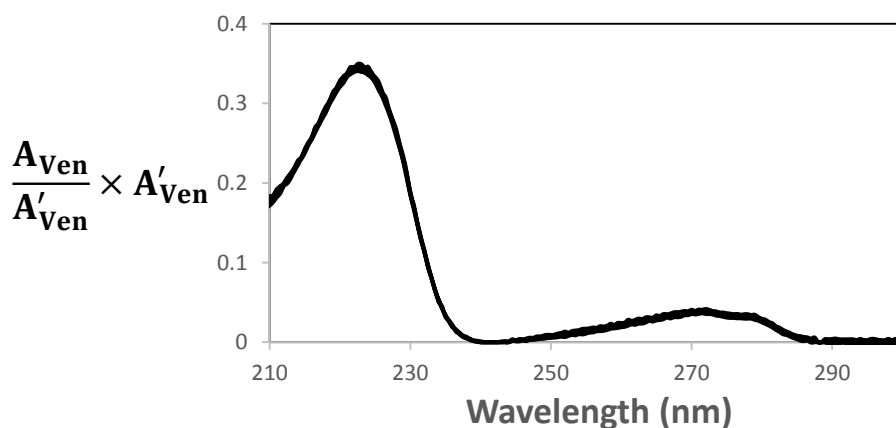


شکل ۳-۴۰: طیف های جذبی نسبی حاصل از تقسیم مخلوط های حاوی (a) ۲/۰۰، (b) ۵/۰۰، (c) ۸/۰۰، (d) ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتالوپرام و ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین بر طیف مرتبه صفر ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتالوپرام.



شکل ۳-۴۱: کسر مقدار ثابت از طیف‌های جذبی حاصل از تقسیم مخلوط‌های حاوی (a) ۲/۰۰، (b) ۵/۰۰، (c) ۸/۰۰، (d) ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتالوپرام و ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین بر طیف مرتبه صفر ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتالوپرام.

سپس طیف نسبی حاصل پس از کم کردن مقدار ثابت، در طیف محلول سیتالوپرام با غلظت معلوم که به عنوان مقسوم علیه به کار برده شد، ضرب گردید تا طیف‌های خالص ونلافاکسین در هر مخلوط به دست آید (شکل ۳-۴۲).



شکل ۳-۴۲: طیف‌های جذبی خالص محاسباتی غلظت ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین، بعد از کسر مقدار ثابت از طیف‌های نسبی و ضرب در طیف مرتبه صفر ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتالوپرام.

سپس جذب هر محلول در طول موج ماکزیمم جذب ونلافاکسین (۲۲۲/۵ نانومتر) اندازه‌گیری و در منحنی کالیبراسیون ونلافاکسین (که از رسم جذب در طول موج ماکزیمم جذب بر حسب غلظت ونلافاکسین رسم شده بود) قرار داده شد. در نتیجه غلظت ونلافاکسین در هر مخلوط با استفاده غلظت‌های مختلف سیتالوپرام (به عنوان مقسوم علیه) به دست آمد (جدول ۳-۳۴). نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که با استفاده از غلظت ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتالوپرام به عنوان مقسوم

علیه، مقدار خطای حاصل کمتر است و به عنوان مقسوم علیه بهینه در مطالعات بعدی به کار برده شد (جدول ۳-۳۵).

جدول ۳-۳۴: نتایج بهینه سازی غلظت سیتالوپرام به عنوان مقسوم علیه در سری ارزیابی به روش EXRSM.

غلظت سیتالوپرام به عنوان مقسوم علیه	MSE
۵/۰۰	۰/۰۰۸۶
۱۰/۰۰	۰/۰۰۸۵
۱۵/۰۰	۰/۰۰۹۱
۲۰/۰۰	۰/۰۱

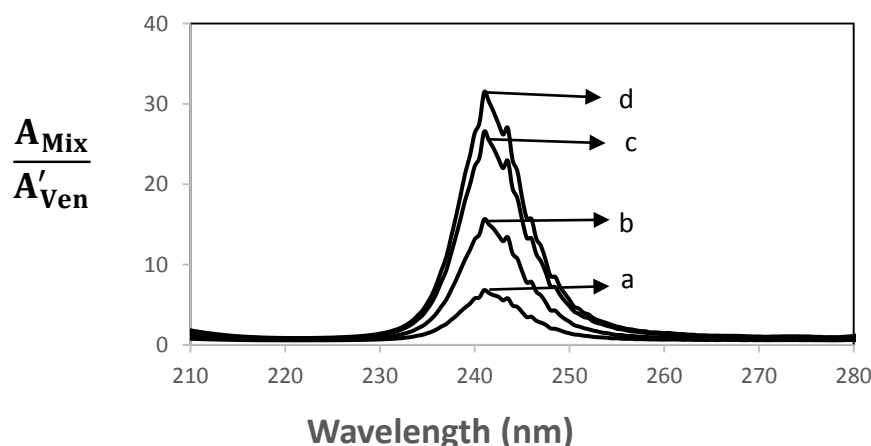
جدول ۳-۳۵: نتایج پیش بینی غلظت ونلافاکسین در سری ارزیابی به روش EXRSM.

شماره مخلوط	غلظت های موجود (میکروگرم بر میلی لیتر)		غلظت سیتالوپرام به عنوان مقسوم علیه	غلظت ونلافاکسین پیش بینی شده	درصد خطای نسبی	MAE (MSE) (MRE)
	ونلافاکسین	سیتالوپرام				
۱	۱/۰۰	۲۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱/۰۸	۸/۰	۰/۰۷۷۷
۲	۳/۰۰	۲۰/۰۰	۱۰/۰۰	۳/۱۵	۵/۰	(۰/۰۰۸۵)
۳	۱۶/۰۰	۱۶/۰۰	۱۰/۰۰	۱۶/۱۱	۰/۷	(۰/۷۱۵۰)
۴	۲/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۲/۱۰	۵/۰	
۵	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۵/۱۵	۳/۰	
۶	۸/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۸/۲۰	۲/۵	
۷	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰/۰۶	۰/۶	
۸	۱۰/۰۰	۸/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰/۰۴	۰/۴	
۹	۱۴/۰۰	۷/۰۰	۱۰/۰۰	۱۴/۰۱	۰/۱	
۱۰	۲/۰۰	۶/۰۰	۱۰/۰۰	۲/۰۷	۳/۵	
۱۱	۱۰/۰۰	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰/۰۵	۰/۵	
۱۲	۸/۰۰	۴/۰۰	۱۰/۰۰	۸/۰۳	۰/۴	
۱۳	۲/۰۰	۴/۰۰	۱۰/۰۰	۲/۰۸	۴/۰	
۱۴	۴/۰۰	۲/۰۰	۱۰/۰۰	۴/۰۱	۰/۳	
۱۵	۶/۰۰	۲/۰۰	۱۰/۰۰	۶/۰۱	۰/۲	
۱۶	۱۶/۰۰	۱/۶۰	۱۰/۰۰	۱۶/۰۴	۰/۳	

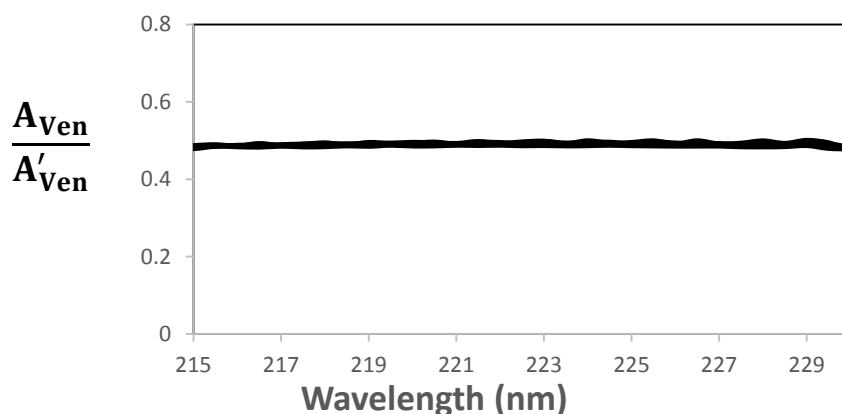
در روش EXRSM برای تعیین غلظت سیتالوپرام در مخلوط به این صورت انجام شد که، هم طیف محلول های خالص استاندارد سیتالوپرام و هم طیف های مرتبه صفر محاسباتی به دست آمده ونلافاکسین (در طی مراحل قبل) بر طیف محلول ونلافاکسین خالص با غلظت معین تقسیم گردیدند. از تقسیم طیف محلول های استاندارد سیتالوپرام بر طیف محلول ونلافاکسین خالص با غلظت معین،

طیف‌های نسبی شکل ۳-۴۳ به دست آمد. از تقسیم طیف‌های مرتبه صفر محاسباتی بدست آمده ونلافاکسین بر طیف محلول ونلافاکسین خالص، یک خط مستقیم به عنوان مقدار ثابت به دست آمد (شکل ۳-۴۴). سپس مقدار ثابت بدست آمده برای هر مخلوط از طیف نسبی مربوط به آن مخلوط کم شد (شکل ۳-۴۵). طیف نسبی حاصل پس از کم کردن مقدار ثابت، در طیف محلول ونلافاکسین با غلظت معلوم که به عنوان مقسوم علیه به کار برده شد، ضرب گردید تا طیف‌های سیتالوپرام مرتبه صفر محاسباتی در هر مخلوط به دست آید (شکل ۳-۴۶).

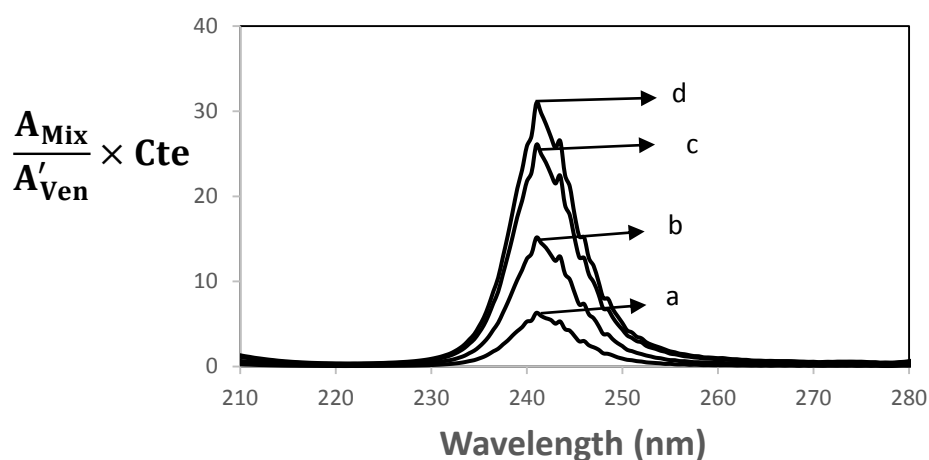
جذب هر محلول در طول موج ماکزیمم جذب سیتالوپرام (۲۳۶ نانومتر) اندازه‌گیری شد و در منحنی کالیبراسیون سیتالوپرام (که از رسم جذب در طول موج ماکزیمم جذب بر حسب غلظت سیتالوپرام رسم شده بود) قرار داده شد. در نتیجه غلظت سیتالوپرام در هر مخلوط با استفاده غلظت-های مختلف ونلافاکسین (به عنوان مقسوم علیه) به دست آمد (جدول ۳-۳۶). نتایج نشان می‌دهد که با استفاده از غلظت ۲۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین به عنوان مقسوم علیه، مقدار خطای حاصل کمتر است. لذا غلظت ۲۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به عنوان غلظت بهینه ونلافاکسین انتخاب شد (جدول ۳-۳۷).



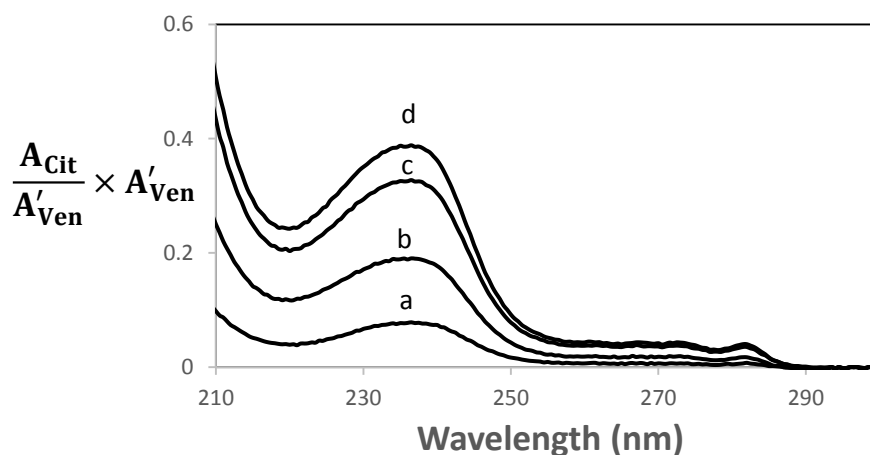
شکل ۳-۴۳: طیف‌های جذبی نسبی حاصل از تقسیم مخلوط‌های حاوی (a) ۲/۰۰، (b) ۵/۰۰، (c) ۸/۰۰، (d) ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتالوپرام و ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین بر طیف مرتبه صفر ۲۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین.



شکل ۳-۴۴: بدست آوردن ثابت حاصل از تقسیم طیف خالص محاسباتی ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین بر طیف مرتبه صفر ۲۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین.



شکل ۳-۴۵: کسر مقدار ثابت از طیف‌های جذبی حاصل از تقسیم مخلوط‌های حاوی (a) ۲/۰۰، (b) ۵/۰۰، (c) ۸/۰۰، (d) ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتالوپرام و ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین بر طیف مرتبه صفر ۲۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین.



شکل ۳-۴۶: طیف‌های جذبی خالص محاسباتی (a) ۲/۰۰، (b) ۵/۰۰، (c) ۸/۰۰، (d) ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتالوپرام، بعد از کسر مقدار ثابت از طیف‌های نسبی و ضرب در طیف مرتبه صفر ۲۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین.

جدول ۳-۳۶: نتایج بهینه سازی غلظت ونلافاکسین به عنوان مقسوم علیه در سری ارزیابی.

MSE	غلظت ونلافاکسین به عنوان مقسوم علیه
۰/۰۲۱۶	۵/۰۰
۰/۰۲۱۶	۱۰/۰۰
۰/۰۲۱۰	۱۵/۰۰
۰/۰۲۰۱	۲۰/۰۰
۰/۰۲۲۱	۳۰/۰۰

جدول ۳-۳۷: نتایج پیش بینی غلظت سیتالوپرام در سری ارزیابی به روش EXRSM.

MAE (MSE) (MRE)	درصد خطای نسبی	غلظت سیتالوپرام پیش بینی شده	غلظت ونلافاکسین به عنوان مقسوم علیه	غلظت های موجود (میکروگرم بر میلی لیتر)		شماره مخلوط
				ونلافاکسین	سیتالوپرام	
۰/۱۲۰۰ (۰/۰۲۰۱) (۱/۵۲۵۸)	۰/۴	۲۰/۰۷	۲۰/۰۰	۱/۰۰	۲۰/۰۰	۱
	-۰/۷	۱۹/۸۶	۲۰/۰۰	۳/۰۰	۲۰/۰۰	۲
	۰/۵	۱۶/۰۷	۲۰/۰۰	۱۶/۰۰	۱۶/۰۰	۳
	-۲/۷	۹/۷۳	۲۰/۰۰	۲/۰۰	۱۰/۰۰	۴
	-۲/۴	۹/۷۶	۲۰/۰۰	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۵
	-۱/۹	۹/۸۱	۲۰/۰۰	۸/۰۰	۱۰/۰۰	۶
	-۰/۹	۹/۹۱	۲۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۷
	۱/۳	۸/۱۰	۲۰/۰۰	۱۰/۰۰	۸/۰۰	۸
	۳/۴	۷/۲۴	۲۰/۰۰	۱۴/۰۰	۷/۰۰	۹
	-۲/۰	۵/۸۸	۲۰/۰۰	۲/۰۰	۶/۰۰	۱۰
	-۲/۲	۴/۸۹	۲۰/۰۰	۱۰/۰۰	۵/۰۰	۱۱
	۰/۰	۴/۰۰	۲۰/۰۰	۸/۰۰	۴/۰۰	۱۲
	-۲/۳	۳/۹۱	۲۰/۰۰	۲/۰۰	۴/۰۰	۱۳
	-۲/۰	۱/۹۶	۲۰/۰۰	۴/۰۰	۲/۰۰	۱۴
	۵/۵	۲/۱۱	۲۰/۰۰	۶/۰۰	۲/۰۰	۱۵
	۲/۵	۱/۶۴	۲۰/۰۰	۱۶/۰۰	۱/۶۰	۱۶

بعد از بهینه سازی غلظت مقسوم علیه برای سیتالوپرام و ونلافاکسین (با استفاده از مخلوط-

های سری کالبراسیون)، از این شرایط بهینه برای تعیین غلظت سیتالوپرام و ونلافاکسین در مخلوط-

های سری تست با روش EXRSM استفاده شد (جدول ۳-۳۸).

جدول ۳-۳۸: نتایج غلظت‌های پیش بینی شده در مخلوط‌های سری تست، با روش EXRSM.

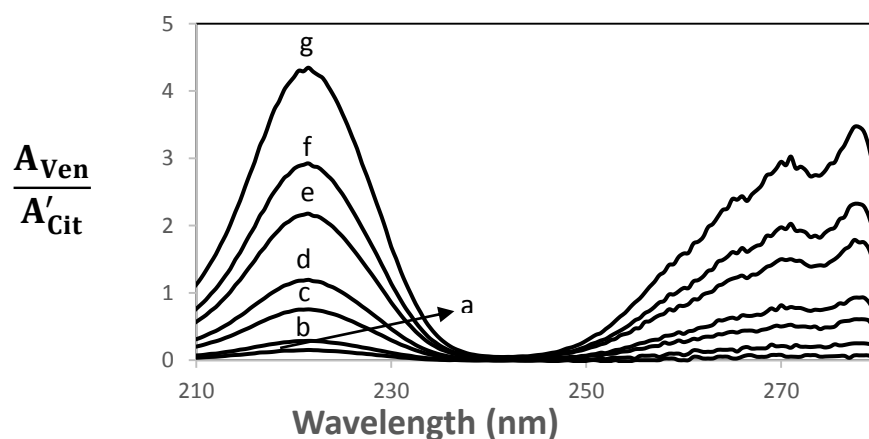
شماره مخلوط	غلظت‌های موجود (میکروگرم بر میلی‌لیتر)		غلظت پیش بینی شده (میکروگرم بر میلی‌لیتر)		درصد خطای نسبی		MAE (MSE) (MRE)	
	ونلافاکسین	سیتالوپرام	ونلافاکسین	سیتالوپرام	ونلافاکسین	سیتالوپرام	ونلافاکسین	سیتالوپرام
۱	۲۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۹/۸۷	۹/۹۱	-۰/۶۵	-۰/۹۰	۰/۱۶۶۲	۰/۰۸۱۳
۲	۱۰/۰۰	۱۵/۰۰	۹/۶۳	۱۴/۹۴	-۳/۷۰	-۰/۴۰	(۰/۰۳۶۲)	(۰/۰۱۰۹)
۳	۱۰/۰۰	۱/۰۰	۱۰/۰۳	۱/۰۳	۰/۳۰	۳/۲۰	(۱/۲۷۱۷)	(۰/۴۳۷۵)
۴	۱۵/۰۰	۱۰/۰۰	۱۴/۸۲	۹/۹۸	-۱/۲۰	-۰/۲۰		
۵	۸/۰۰	۸/۰۰	۸/۱۶	۸/۰۵	۲/۰۰	۰/۶۲		
۶	۴/۰۰	۴/۰۰	۳/۹۱	۴/۰۳	-۲/۲۵	۰/۷۵		
۷	۲/۰۰	۱۰/۰۰	۱/۹۰	۹/۸۵	-۵/۰۰	-۱/۵۰		
۸	۳/۰۰	۱۶/۰۰	۳/۱۴	۱۶/۱۸	۴/۶۷	۱/۱		

نتایج حاصل نشان می‌دهد که با روش EXRSM می‌توان غلظت‌های سیتالوپرام و ونلافاکسین را در مخلوط‌های آن‌ها با دقت و صحت خوبی تعیین کرد.

۳-۲-۱۰- تعیین همزمان سیتالوپرام و ونلافاکسین در مخلوط دوتایی هر یک به روش

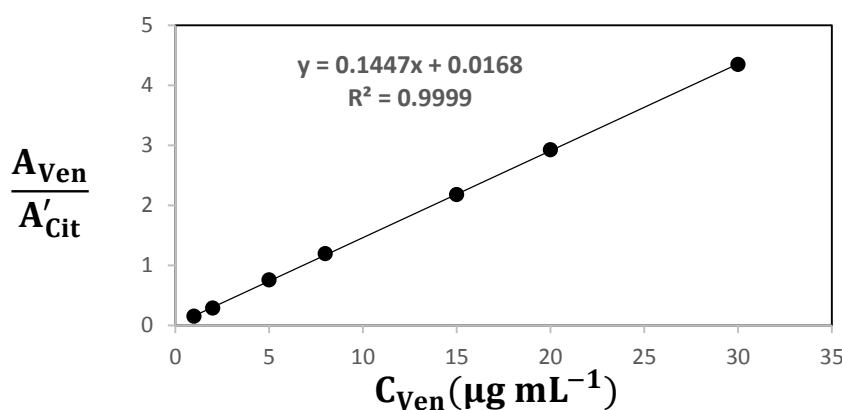
SRSR

روش دیگری که برای اندازه‌گیری همزمان سیتالوپرام و ونلافاکسین به‌کار برده شد، روش SRSR بود که در این روش نیز از مخلوط‌های سری ارزیابی جدول ۳-۳۲ و سری جدول ۳-۳۳ تست استفاده شد. به عنوان مثال برای تعدادی از مخلوط‌های سری کالیبراسیون که در آن‌ها غلظت ونلافاکسین ثابت و غلظت سیتالوپرام متغیر است (شکل ۳-۳۹)، مراحل روش SRSR آورده شده است. ابتدا طیف مرتبه صفر با غلظت‌های ۳۰/۰۰-۱/۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ونلافاکسین خالص (گونه با طیف محدودتر) بر طیف مرتبه صفر غلظت معینی از سیتالوپرام خالص (گونه با طیف گسترده‌تر) به عنوان مقسوم علیه تقسیم شد (شکل ۳-۴۷). با استفاده از مقدار نسبی جذب در طول موج ماکزیمم طیف‌های نسبی بدست آمده (۲۲۱/۵ نانومتر) منحنی کالیبراسیون بدست آمد (شکل ۳-۴۸).



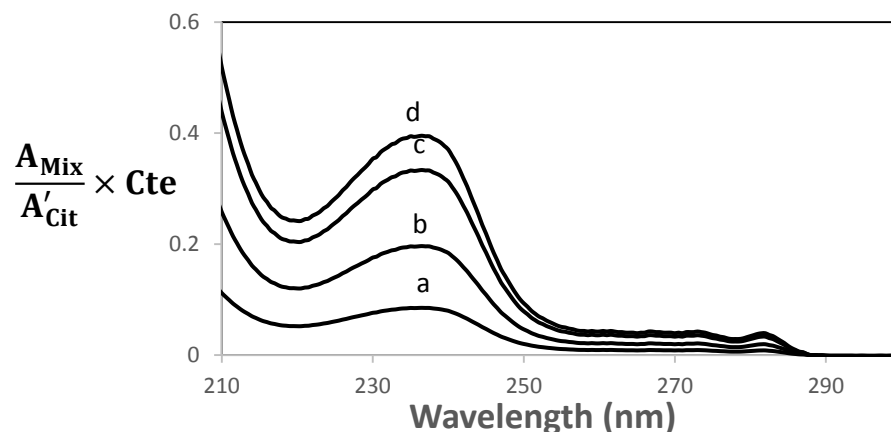
شکل ۳-۴۷: حاصل از تقسیم طیف مرتبه صفر (a) ۱/۰۰، (b) ۲/۰۰، (c) ۵/۰۰، (d) ۸/۰۰، (e) ۱۵/۰۰، (f) ۲۰/۰۰، (g) ۳۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین بر طیف مرتبه صفر ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتالوپرام.

سپس طیف مخلوط‌های سری ارزیابی نیز بر طیف مرتبه صفر غلظت معینی از سیتالوپرام خالص به عنوان مقسوم علیه تقسیم شد (شکل ۳-۴۰) و مقدار ثابت (که وابسته به مقدار سیتالوپرام در هر مخلوط است) برای هر طیف نسبی از قسمت مسطح و موازی با محور طول موج در محدوده‌ای که طیف مرتبه ی صفر سیتالوپرام جذب داشته باشد ولی طیف مرتبه‌ی صفر ونلافاکسین جذب نداشته باشد، بدست آورده شد و مقدار ثابت از هر طیف نسبی کم شد (شکل ۳-۴۱). با قرار دادن جذب طیف‌های حاصل در طول موج ۲۲۱/۵ نانومتر در منحنی کالیبراسیون (شکل ۳-۴۸)، غلظت ونلافاکسین در مخلوط محاسبه شد.



شکل ۳-۴۸: منحنی کالیبراسیون حاصل از تقسیم طیف مرتبه صفر ونلافاکسین با غلظت‌های ۱/۰۰-۳۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بر طیف مرتبه صفر ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتالوپرام.

در مرحله بعدی مقدار ثابت بدست آمده برای هر مخلوط در غلظت سیتالوپرام که به عنوان مقسوم علیه استفاده شده بود ضرب گردید (شکل ۳-۴۹). با اندازه‌گیری جذب در ۲۳۶ نانومتر طیف محاسباتی حاصل و قرار دادن آن در منحنی کالیبراسیون سیتالوپرام (جدول ۳-۲۸)، غلظت سیتالوپرام هر مخلوط محاسبه گردید. برای رسیدن به بهترین صحت در روش SRSM، باید غلظت سیتالوپرام به عنوان مقسوم علیه بهینه شود که برای انتخاب مقسوم علیه بهینه، غلظت‌های مختلف سیتالوپرام به عنوان مقسوم علیه انتخاب و مقدار (MSE) آن‌ها محاسبه شد (جدول ۳-۳۹). با توجه به نتایج غلظت ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتالوپرام به عنوان مقسوم علیه بهینه انتخاب و از آن برای پیش بینی غلظت ونلافاکسین و سیتالوپرام در سری ارزیابی استفاده شد (۳-۴۳).



شکل ۳-۴۹: طیف‌های جذبی خالص محاسباتی (a) ۲/۰۰، (b) ۵/۰۰، (c) ۸/۰۰، (d) ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتالوپرام، بعد از ضرب مقدار ثابت در طیف نسبی حاصل از تقسیم مخلوط‌ها بر مقسوم علیه.

جدول ۳-۳۹: نتایج بهینه سازی غلظت سیتالوپرام به عنوان مقسوم علیه در سری ارزیابی با استفاده از روش SRSM

MSE		غلظت سیتالوپرام به عنوان مقسوم علیه
ونلافاکسین	سیتالوپرام	
۰/۰۰۶۶	۰/۰۱۳۵	۵/۰۰
۰/۰۰۶۲	۰/۰۱۳۴	۱۰/۰۰
۰/۰۰۶۹	۰/۰۱۳۶	۱۵/۰۰
۰/۰۰۷۲	۰/۰۱۳۸	۲۰/۰۰
۰/۰۰۷۷	۰/۰۱۳۹	۳۰/۰۰

جدول ۳-۴: نتایج پیش بینی غلظت ونلافاکسین و سیتالوپرام در سری ارزیابی با استفاده از روش SRSM

شماره مخلوط	غلظت‌های موجود (میکروگرم بر میلی‌لیتر)		غلظت‌های پیش بینی شده		درصد خطای نسبی		MAE (MSE) (MRE)	
	ونلافاکسین	سیتالوپرام	ونلافاکسین	سیتالوپرام	ونلافاکسین	سیتالوپرام	ونلافاکسین	سیتالوپرام
۱	۲۰/۰۰	۱/۰۰	۲۰/۰۵	۱/۰۷	۰/۲۵	۷/۰۰	۰/۰۶۶۹	۰/۰۹۶۹
۲	۲۰/۰۰	۳/۰۰	۱۹/۹۱	۳/۱۲	-۰/۴۵	۴/۰۰	(۰/۰۰۶۲)	(۰/۰۱۳۴)
۳	۱۶/۰۰	۱۶/۰۰	۱۶/۰۷	۱۶/۰۹	۰/۴۴	۰/۵۶	(۱/۴۷۷۳)	(۱/۲۱۱۷)
۴	۱۰/۰۰	۲/۰۰	۹/۸۰	۲/۰۹	-۲/۰۰	۴/۵۰		
۵	۱۰/۰۰	۵/۰۰	۹/۷۵	۵/۱۳	-۲/۵۰	۲/۶۰		
۶	۱۰/۰۰	۸/۰۰	۹/۸۶	۸/۱۶	-۱/۴۰	۲/۰۰		
۷	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۹/۹۳	۹/۹۳	-۰/۷۰	-۰/۷۰		
۸	۸/۰۰	۱۰/۰۰	۸/۰۷	۹/۹۴	۰/۸۸	-۰/۶۰		
۹	۷/۰۰	۱۴/۰۰	۷/۱۸	۱۳/۹۹	۲/۵۷	-۰/۰۷		
۱۰	۶/۰۰	۲/۰۰	۵/۸۸	۲/۰۵	-۲/۰۰	۲/۵۰		
۱۱	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۴/۹۱	۹/۹۳	-۱/۸۰	-۰/۷۰		
۱۲	۴/۰۰	۸/۰۰	۴/۰۱	۸/۰۱	۰/۲۵	۰/۱۲		
۱۳	۴/۰۰	۲/۰۰	۳/۹۳	۲/۰۶	-۱/۷۵	۳/۰۰		
۱۴	۲/۰۰	۴/۰۰	۱/۹۵	۳/۹۸	-۲/۵۰	-۰/۵۰		
۱۵	۲/۰۰	۶/۰۰	۲/۰۷	۵/۹۵	۳/۵۰	-۰/۸۳		
۱۶	۱/۶۰	۱۶/۰۰	۱/۶۲	۱۶/۰۳	۱/۲۵	۰/۱۹		

بعد از بهینه سازی غلظت مقسوم علیه برای سیتالوپرام (با استفاده از مخلوط‌های سری ارزیابی)، از این شرایط بهینه برای تعیین غلظت سیتالوپرام و ونلافاکسین در مخلوط‌های سری تست استفاده شد (جدول ۳-۴).

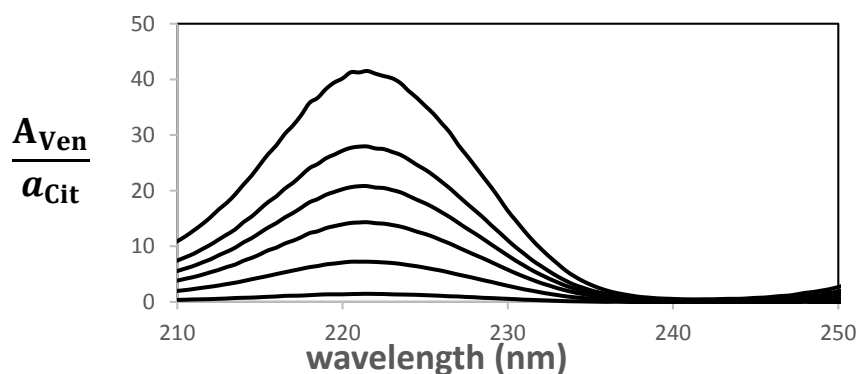
جدول ۳-۴: نتایج غلظت‌های پیش بینی شده در مخلوط‌های سری تست با روش SRSM

شماره مخلوط	غلظت‌های موجود (میکروگرم بر میلی‌لیتر)		غلظت پیش بینی شده (میکروگرم بر میلی‌لیتر)		درصد خطای نسبی		MAE (MSE) (MRE)	
	ونلافاکسین	سیتالوپرام	ونلافاکسین	سیتالوپرام	ونلافاکسین	سیتالوپرام	ونلافاکسین	سیتالوپرام
۱	۲۰/۰۰	۱۰/۰۰	۲۰/۰۶	۹/۹۰	۰/۳	-۱/۰	۰/۰۹۳۷	۰/۰۹۱۲
۲	۱۰/۰۰	۱۵/۰۰	۹/۸۳	۱۴/۹۲	-۱/۷	-۰/۵	(۰/۰۱۶)	(۰/۰۱۲)
۳	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰/۰۶	۱/۰۵	۰/۶	۵/۰	(۰/۱۳)	(۰/۱۳)
۴	۱۵/۰۰	۱۰/۰۰	۱۵	۹/۹۶	۰/۰	-۰/۴		
۵	۸/۰۰	۸/۰۰	۸/۱۲	۸/۰۵	۱/۵	۰/۶		
۶	۴/۰۰	۴/۰۰	۳/۹۹	۴/۰۳	-۰/۳	۰/۸		
۷	۲/۰۰	۱۰/۰۰	۲/۰۵	۹/۸۲	۲/۵	-۱/۸		
۸	۳/۰۰	۱۶/۰۰	۳/۲۸	۱۶/۲۰	۹/۳	۱/۳		

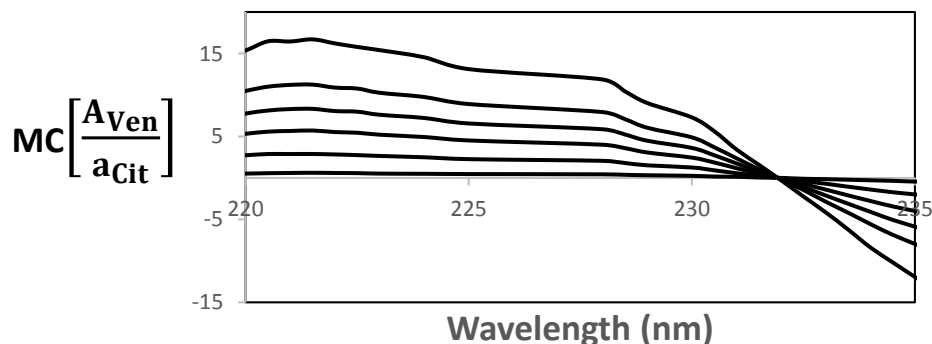
این نتایج نشان می‌دهد که با روش SRSR می‌توان غلظت‌های سیتالوپرام و ونلافاکسین در مخلوط‌های آن‌ها با دقت و صحت خوبی تعیین کرد.

تعیین همزمان سیتالوپرام و ونلافاکسین در مخلوط دوتایی هر یک به روش MCM

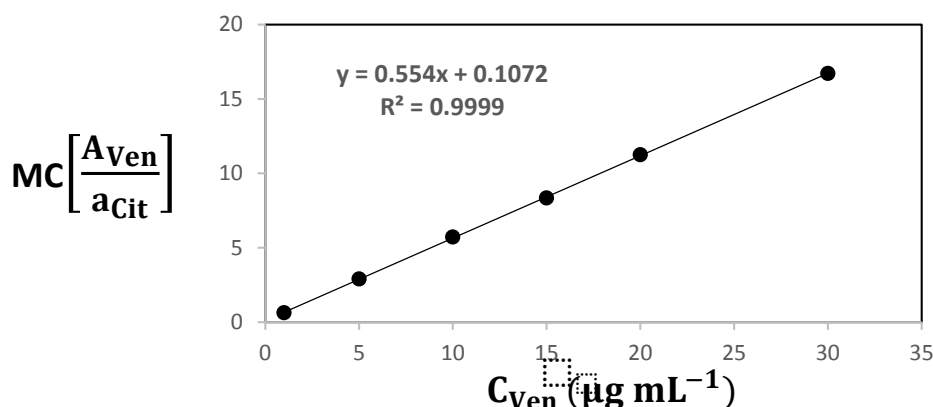
در اندازه‌گیری ونلافاکسین با استفاده از روش MCM، ابتدا طیف مرتبه صفر ونلافاکسین با غلظت‌های معین بر ضریب جذب سیتالوپرام تقسیم شد (شکل ۳-۵۰). برای رسیدن به بهترین صحت در روش MCM، ناحیه‌ی انجام MC بهینه شد. به این صورت که MC در محدوده‌های مختلف، در اطراف طول موج ماکزیمم طیف‌های نسبی حاصل (۲۲۱/۵ نانومتر)، انجام شد (جدول ۳-۴۲). میانگین بدست آمده از هر طیف نسبی، از طیف متناظر آن کم شد (شکل ۳-۵۱) و با استفاده از مقادیر جذب در طول موج ۲۲۱/۵ نانومتر (بیشترین حساسیت) منحنی کالیبراسیون نسبی رسم شد (شکل ۳-۵۲).



شکل ۳-۵۰: طیف نسبی حاصل از تقسیم طیف مرتبه صفر غلظت‌های ۱/۰۰-۳۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین بر ضریب جذب سیتالوپرام.

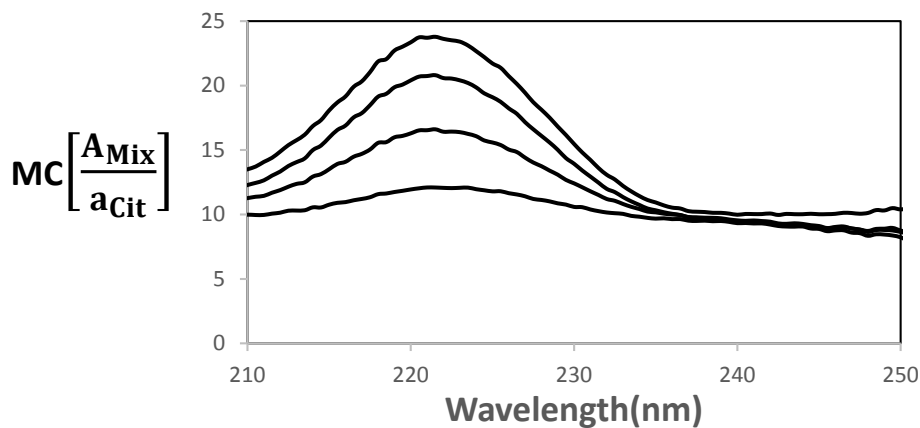


شکل ۳-۵۱: طیف‌های نسبی، حاصل از تقسیم طیف‌های مرتبه صفر غلظت‌های ۱/۰۰-۳۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین بر ضریب جذب سیتالوپرام بعد از انجام MC در ناحیه ۲۲۰-۲۳۵ نانومتر.

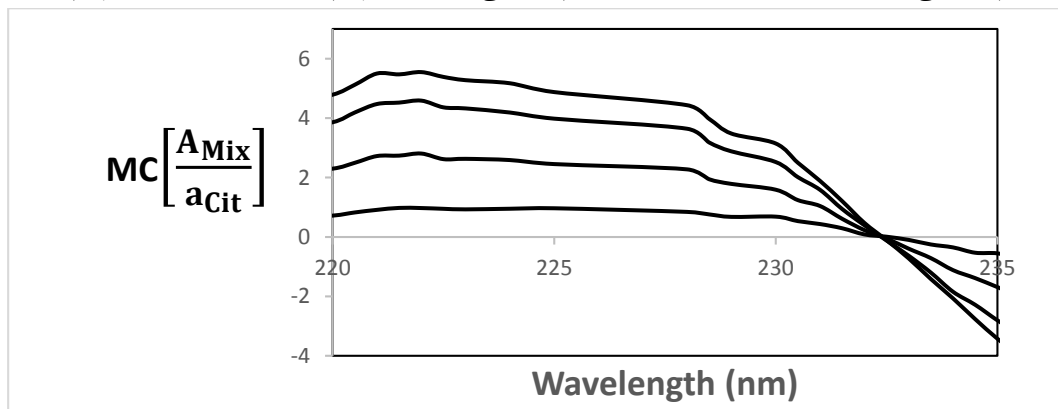


شکل ۳-۵: منحنی کالیبراسیون در طول موج ماکزیمم ۲۲۱/۵ نانومتر، حاصل تقسیم طیف‌های مرتبه صفر غلظت-های ۱/۰۰-۳۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین بر ضریب جذب سیتالوپرام بعد از انجام MC در ناحیه ۲۳۵-۲۲۰ نانومتر.

این مراحل بر روی طیف‌های سری ارزیابی نیز انجام شد و پس از MC طیف‌های مخلوط، جذب در طول موج ۲۲۱/۵ نانومتر را در منحنی کالیبراسیون نسبی قرار داده و غلظت ونلافاکسین در هر مخلوط بدست آمد. با توجه به ارزیابی مدل از طریق شاخص‌های کمی (MSE, MAE, MRE) در سری ارزیابی و همچنین شیب و R^2 منحنی کالیبراسیون، ناحیه ۲۳۵-۲۲۰ نانومتر به عنوان ناحیه بهینه برای MC ونلافاکسین انتخاب شد (جدول ۳-۴). به عنوان مثال برای تعدادی از مخلوط‌های سری ارزیابی که در آن‌ها غلظت سیتالوپرام ثابت و غلظت ونلافاکسین متغیر است (شکل ۳-۳۹)، مراحل انجام شده در سری ارزیابی آورده شده است. در شکل ۳-۵۳، طیف‌های نسبی حاصل از تقسیم طیف مخلوط‌ها بر ضریب جذب سیتالوپرام آورده شده است. شکل ۳-۵۴ طیف‌های نسبی پس از انجام MC در ناحیه ۲۳۵-۲۲۰ نانومتر را نشان می‌دهد. با اندازه‌گیری جذب نسبی در طول موج ۲۲۱/۵ نانومتر برای هر مخلوط و با استفاده منحنی کالیبراسیون مربوط شکل ۳-۵۲، غلظت ونلافاکسین در هر مخلوط بدست آمد.



شکل ۳-۵۳: طیف‌های نسبی حاصل از تقسیم، طیف مخلوط حاوی (a) ۲/۰۰، (b) ۵/۰۰، (c) ۸/۰۰، (d) ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین و ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتالوپرام بر ضریب جذب سیتالوپرام.



شکل ۳-۵۴: طیف‌های نسبی حاصل از تقسیم، طیف مخلوط حاوی (a) ۲/۰۰، (b) ۵/۰۰، (c) ۸/۰۰، (d) ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین و ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتالوپرام بر ضریب جذب سیتالوپرام، بعد از انجام MC در ناحیه ۲۲۰-۲۳۵ نانومتر.

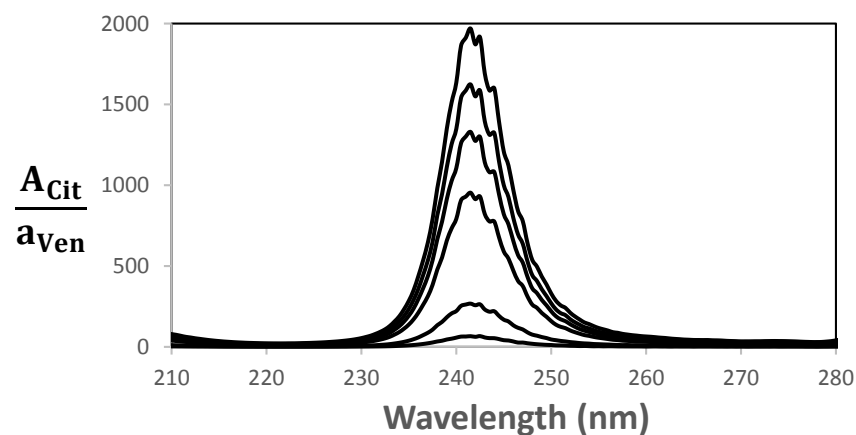
جدول ۳-۴۲: نتایج بهینه سازی محدوده MC برای محاسبه ونلافاکسین در سری کالیبراسیون و ارزیابی

MAE	MSE	MRE	Slope	R ²	دامنه طول موج (نانومتر)	طول موج ماکزیمم
۰/۲۹۴۴	۰/۱۹۳۴	۹/۶۳۴۶	۰/۰۹۳۸	۰/۹۹۹۹	۲۱۰-۲۳۵	۲۲۱/۵
۰/۲۹۸۴	۰/۱۵۶۵	۸/۶۱۳۳	۰/۴۹۱۸	۰/۹۹۹۹	۲۱۵-۲۳۵	۲۲۱/۵
۰/۳۰۷۱	۰/۱۳۵۳	۷/۹۴۸۹	۰/۵۵۴۰	۰/۹۹۹۹	۲۲۰-۲۳۵	۲۲۱/۵
۰/۳۰۸۷	۰/۲۵۹۵	۱۰/۷۸۳۶	۰/۴۲۵۶	۰/۹۹۹۹	۲۱۰-۲۳۰	۲۲۱/۵
۰/۳۲۶۲	۰/۱۹۸۶	۰/۵۰۴۱	۰/۲۹۲۰	۰/۹۹۹۹	۲۱۵-۲۳۰	۲۲۱/۵
۰/۳۴۱۳	۰/۱۶۷۰	۸/۷۰۲۶	۰/۲۸۸۶	۰/۹۹۹۹	۲۲۰-۲۳۰	۲۲۱/۵
۰/۳۴۳۷	۰/۳۹۵۸	۱۳/۰۶۰۱	۰/۳۹۰۰	۰/۹۹۹۹	۲۱۰-۲۲۵	۲۲۱/۵
۰/۳۴۳۷	۰/۳۹۵۸	۱۴/۵۸۲۵	۰/۱۷۵۹	۰/۹۹۹۹	۲۱۵-۲۲۵	۲۲۱/۵

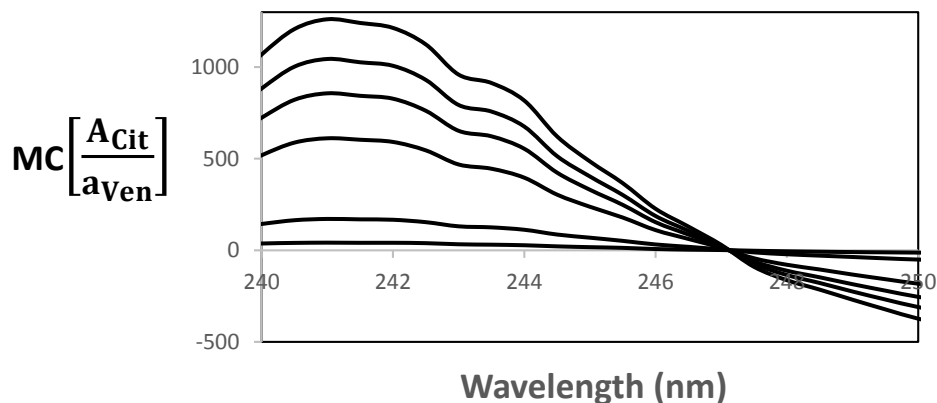
برای اندازه‌گیری غلظت سیتالوپرام نیز طبق مراحل گفته شده عمل شد با این تفاوت که طیف

مرتبه صفر محلول‌های استاندارد سیتالوپرام بر ضریب جذب ونلافاکسین تقسیم گردید (شکل ۳-۵۵)

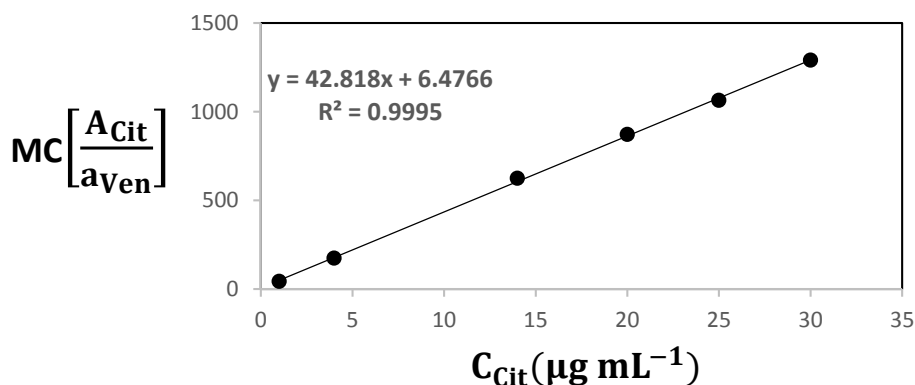
و MC در محدوده‌های مختلف، در اطراف طول موج ماکزیمم طیف‌های نسبی حاصل (۲۴۱/۵ نانومتر)، انجام شد (جدول ۳-۴۳). در شکل ۳-۵۶ طیف‌های نسبی حاصل پس از MC کردن محلول‌های استاندارد سیتالوپرام در ناحیه ۲۴۰-۲۵۰ نانومتر آورده شده است. سپس مقادیر جذب نسبی محلول‌های استاندارد از روی طیف‌های شکل ۳-۵۶ در طول موج ۲۴۱/۵ نانومتر اندازه‌گیری و بر حسب غلظت سیتالوپرام رسم شد. شکل ۳-۵۷ منحنی کالیبراسیون سیتالوپرام به روش MCM را نشان می‌دهد.



شکل ۳-۵۵: طیف نسبی حاصل از تقسیم طیف مرتبه صفر غلظت‌های ۱/۰۰-۳۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتالوپرام بر ضریب جذب ونلافاکسین.

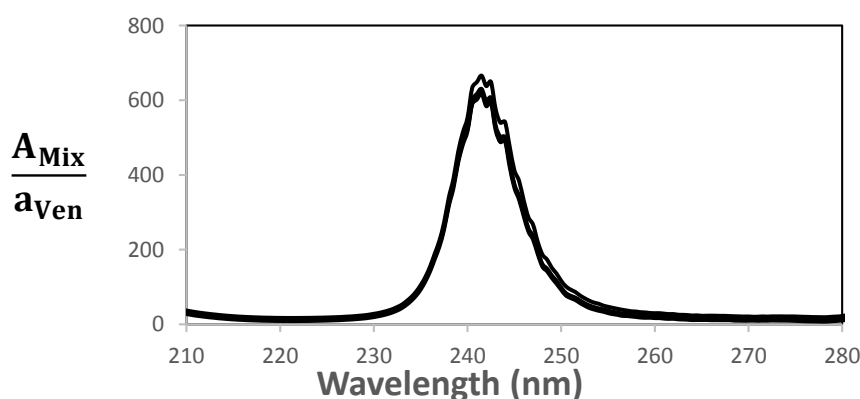


شکل ۳-۵۶: طیف‌های نسبی، حاصل از تقسیم طیف‌های مرتبه صفر غلظت‌های ۱/۰۰-۳۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتالوپرام بر ضریب جذب ونلافاکسین بعد از انجام MC در ناحیه ۲۴۰-۲۵۰ نانومتر.

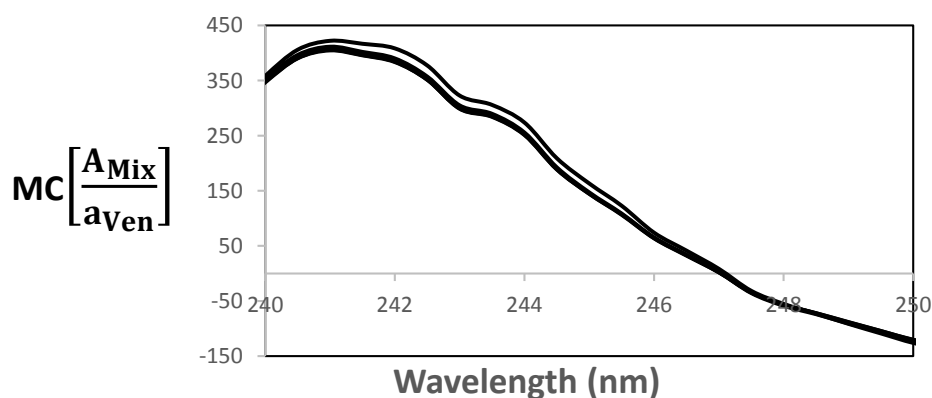


شکل ۳-۵۷: منحنی کالیبراسیون نسبی در طول موج ماکزیمم ۲۴۱/۵ نانومتر، حاصل تقسیم طیف‌های مرتبه صفر غلظت‌های ۱/۰۰-۳۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتالوپرام بر ضریب جذب ونلافاکسین بعد از انجام MC در ناحیه ۲۴۰-۲۵۰ نانومتر.

این مراحل بر روی طیف‌های سری ارزیابی نیز انجام شد و پس از MC طیف‌های مخلوط، جذب در طول موج ۲۴۱/۵ نانومتر را در منحنی کالیبراسیون نسبی قرار داده و غلظت سیتالوپرام در هر مخلوط بدست آمد. با توجه به ارزیابی مدل از طریق شاخص‌های کمی (MSE, MAE, MRE) در سری ارزیابی و همچنین شیب و R^2 منحنی کالیبراسیون نسبی، ناحیه ۲۴۰-۲۵۰ نانومتر به عنوان ناحیه بهینه برای MC سیتالوپرام انتخاب شد (جدول ۳-۴۳). به عنوان مثال برای تعدادی از مخلوط‌های سری ارزیابی که در آن‌ها غلظت سیتالوپرام ثابت و غلظت ونلافاکسین متغیر است (شکل ۳-۳۹)، مراحل انجام شده در سری ارزیابی آورده شده است. شکل ۳-۵۸ طیف‌های نسبی حاصل از تقسیم طیف مخلوط‌ها بر ضریب جذب ونلافاکسین را نشان می‌دهد. شکل ۳-۵۹ طیف‌های نسبی پس از MC کردن در ناحیه ۲۴۰-۲۵۰ نانومتر را نشان می‌دهد.



شکل ۳-۵۸: طیف‌های نسبی حاصل از تقسیم، طیف مخلوط حاوی (a) ۲/۰۰، (b) ۵/۰۰، (c) ۸/۰۰، (d) ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین و ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتالوپرام بر ضریب جذب ونلافاکسین.



شکل ۳-۵۹: طیف‌های نسبی حاصل از تقسیم، طیف مخلوط حاوی (a) ۲/۰۰، (b) ۵/۰۰، (c) ۸/۰۰، (d) ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین و ۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتالوپرام بر ضریب جذب ونلافاکسین، بعد از انجام MC در ناحیه ۲۴۰-۲۵۰ نانومتر

جدول ۳-۴۳: نتایج بهینه سازی محدوده MC برای سیتالوپرام در سری کالیبراسیون و ارزیابی

طول موج ماکزیمم	دامنه طول موج (نانومتر)	R ²	Slope	MRE	MSE	MAE
۲۴۱/۵	۲۳۰-۲۵۰	۰/۹۹۹۵	۳۷/۵۱۶۰	۴/۱۵۱۲	۰/۱۲۱۲	۰/۲۹۰۲
۲۴۱/۵	۲۳۵-۲۵۰	۰/۹۹۹۵	۲۹/۸۰۰۰	۳/۶۲۵۳	۰/۰۹۲۷	۰/۲۵۲۳
۲۴۱/۵	۲۴۰-۲۵۰	۰/۹۹۹۵	۴۲/۸۱۸۰	۳/۳۳۴۲	۰/۰۹۰۶	۰/۲۴۹۲
۲۴۱/۵	۲۳۰-۲۴۵	۰/۹۹۹۵	۳۵/۵۱۵۰	۴/۸۶۸۰	۰/۱۵۶۷	۰/۳۲۸۳
۲۴۱/۵	۲۳۵-۲۴۵	۰/۹۹۹۵	۲۳/۱۷۳۰	۴/۶۵۳۹	۰/۱۳۵۸	۰/۳۰۷۱
۲۴۱/۵	۲۴۰-۲۴۵	۰/۹۹۹۴	۹/۰۸۴۳	۲/۵۷۸۹	۰/۰۴۳۸	۰/۱۵۸۷
۲۴۱/۵	۲۳۰-۲۵۵	۰/۹۹۹۵	۴۱/۷۵۹۰	۳/۹۹۴۶	۰/۱۱۷۲	۰/۲۸۵۲
۲۴۱/۵	۲۳۵-۲۵۵	۰/۹۹۹۵	۳۶/۹۶۱۰	۳/۵۹۴۴	۰/۰۹۸۶	۰/۲۶۱۶

با توجه به ناحیه بهینه MC برای ونلافاکسین و سیتالوپرام به ترتیب در ۲۲۰-۲۳۵ و ۲۴۰-۲۵۰ نانومتر، نتایج غلظت‌های پیش‌بینی شده با روش MCM، در مخلوط سری ارزیابی و تست به ترتیب در جدول ۳-۴۴ و جدول ۳-۴۵ آورده شده است.

جدول ۳-۴۴: نتایج غلظت‌های پیش‌بینی شده سیتالوپرام و ونلافاکسین در سری ارزیابی با روش MCM.

شماره مخلوط	غلظت موجود (میکروگرم بر میلی لیتر)		غلظت پیش‌بینی شده		درصد خطای نسبی		MAE (MSE) (MRE)	
	ونلافاکسین	سیتالوپرام	ونلافاکسین	سیتالوپرام	ونلافاکسین	سیتالوپرام	ونلافاکسین	سیتالوپرام
۱	۲۰/۰۰	۱/۰۰	۲۰/۳۲	۱/۳۶	۱/۶۰	۳۶/۰۰	۰/۲۴۹۲	۰/۳۰۷۱
۲	۲۰/۰۰	۳/۰۰	۲۰/۰۶	۳/۵۷	۰/۲۸	۱۹/۰۰	(۰/۰۹۰۶)	(۰/۱۳۵۳)
۳	۱۶/۰۰	۱۶/۰۰	۱۵/۵۳	۱۵/۳۵	-۲/۹۵	-۴/۰۶	(۰/۳۳۴۲)	(۷/۹۴۸۹)
۴	۱۰/۰۰	۲/۰۰	۹/۶۹	۱/۷۶	-۳/۱۰	-۱۲/۰۰		
۵	۱۰/۰۰	۵/۰۰	۹/۶۱	۴/۸۷	-۳/۹۰	-۲/۵۳		

۶	۱۰/۰۰	۸/۰۰	۹/۴۸	۸/۰۹	-۵/۲۲	۱/۱۵		
شماره مخلوط	غلظت موجود (میکروگرم بر میلی لیتر)		غلظت پیش بینی شده		درصد خطای نسبی		MAE (MSE) (MRE)	
	ونلافاکسین	سیتالوپرام	ونلافاکسین	سیتالوپرام	ونلافاکسین	سیتالوپرام	ونلافاکسین	سیتالوپرام
۷	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۹/۹۱	۹/۸۳	-۰/۹۴	-۱/۷۴		
۸	۸/۰۰	۱۰/۰۰	۸/۲۶	۹/۷۳	۳/۲۱	-۲/۶۸		
۹	۷/۰۰	۱۴/۰۰	۷/۰۶	۱۳/۶۲	۰/۸۰	-۲/۷۰		
۱۰	۶/۰۰	۲/۰۰	۵/۷۱	۱/۸۵	-۴/۷۶	-۷/۵۰		
۱۱	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۴/۸۹	۹/۸۷	-۲/۲۰	-۱/۳۰		
۱۲	۴/۰۰	۸/۰۰	۴/۰۲	۷/۷۶	۰/۵۷	-۲/۹۷		
۱۳	۴/۰۰	۲/۰۰	۳/۶۸	۱/۸۰	-۸/۰۱	-۱۰/۰۰		
۱۴	۲/۰۰	۴/۰۰	۲/۰۱	۳/۹۴	۰/۳۷	-۱/۶۲		
۱۵	۲/۰۰	۶/۰۰	۱/۸۶	۶/۰۹	-۷/۰۰	۱/۵۲		
۱۶	۱/۶۰	۱۶/۰۰	۱/۶۸	۱۵/۸۷	۵/۰۰	-۰/۸۴		

جدول ۳-۴۵: نتایج غلظت‌های پیش بینی شده سیتالوپرام و ونلافاکسین در سری تست با روش MCM، در مخلوط

سری تست.

شماره مخلوط	غلظت موجود (میکروگرم بر میلی لیتر)		غلظت پیش بینی شده		درصد خطای نسبی		MAE (MSE) (MRE)	
	ونلافاکسین	سیتالوپرام	ونلافاکسین	سیتالوپرام	ونلافاکسین	سیتالوپرام	ونلافاکسین	سیتالوپرام
۱	۲۰/۰۰	۱۰/۰۰	۲۰/۲۵	۹/۷۲	۱/۲۷	-۲/۸۵	۰/۲۲۱۲	۰/۲۴۷۵
۲	۱۰/۰۰	۱۵/۰۰	۹/۳۶	۱۵/۱۷	-۶/۳۸	۱/۱۵	(۰/۰۸۲۸)	(۰/۰۷۶۶)
۳	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰/۲۹	۱/۴۸	۲/۸۸	۴۷/۵۴	(۱/۳۱۱۷)	(۳/۳۹۰۴)
۴	۱۵/۰۰	۱۰/۰۰	۱۴/۸۱	۹/۸۲	-۱/۲۹	-۱/۷۹		
۵	۸/۰۰	۸/۰۰	۸/۰۲	۷/۶۸	۰/۲۳	-۳/۹۸		
۶	۴/۰۰	۴/۰۰	۳/۹۶	۳/۶۶	-۰/۹۸	-۸/۴۱		
۷	۲/۰۰	۱۰/۰۰	۱/۸۹	۹/۹۳	-۵/۷۴	-۰/۷۴		
۸	۳/۰۰	۱۶/۰۰	۳/۲۳	۱۵/۸۶	۷/۶۲	-۰/۸۹		

نتایج جدول ۳-۴۴ و ۳-۴۵ نشان می‌دهد که درصد خطای نسبی برای غلظت‌های کم

ونلافاکسین بزرگ می‌باشد.

۳-۲-۱۱- بررسی اثر مزاحمت‌ها

برای بررسی قابلیت کاربرد روش‌های استفاده شده در اندازه‌گیری سیتالوپرام و ونلافاکسین در

نمونه‌های حقیقی (دارو)، مزاحمت گونه‌های مختلف از جمله پرکننده‌های قرص سیتالوپرام و

ونلافاکسین مورد بررسی قرار گرفت. نحوه کار به این صورت بود که، میزان جذب محلول ۵/۰۰

میکروگرم بر میلی‌لیتر سیتالوپرام یا ۵/۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ونلافاکسین در غیاب گونه‌ی مزاحم در شرایط بهینه، شش بار اندازه‌گیری شد. مراحل بعدی کار مانند بخش (۳-۲-۱۳) انجام شد، با این تفاوت که به جای متیل ویولت و تولوئیدین بلو از سیتالوپرام و ونلافاکسین استفاده شد. نتایج در (جدول ۳-۴۶) آمده است.

جدول ۳-۴۶: نتایج حاصل از بررسی اثر گونه‌های مزاحم در اندازه‌گیری محلول‌های سیتالوپرام و ونلافاکسین به ترتیب با غلظت‌های ۲/۵۰ و ۵/۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر.

حد مجاز گونه‌ی مزاحم (وزنی/وزنی)	سیتالوپرام	ونلافاکسین
۱۰۰۰	Ca ²⁺ , K ⁺ , Na ⁺ , EDTA, Ni ²⁺ , Cl ⁻ , SO ₄ ²⁻ اتیلن گلی کل	Ca ²⁺ , K ⁺ , Na ⁺ , EDTA, Ni ²⁺ , Cl ⁻ , SO ₄ ²⁻ اتیلن گلی کل
۴۰۰	گلوکز	گلوکز
۲۰۰	Al ³⁺ , F ⁻ , Co ²⁺	Al ³⁺ , F ⁻ ,
۱۰۰	-	Co ²⁺
۱/۰۰	پودر تالک, NO ₃ ⁻ , Ti ⁴⁺	پودر تالک, NO ₃ ⁻ , Ti ⁴⁺

پودر تالک و Ti⁴⁺ در قرص سیتالوپرام و ونلافاکسین به عنوان پرکننده استفاده می‌شوند که با اضافه شدن آن‌ها به محلول حاوی نمونه، آن را کدر می‌کردند. برای حذف مزاحمت آن‌ها، محلول از کاغذ صافی عبور داده شد، به این ترتیب مزاحمت آن‌ها تا ۱۰۰۰ برابر بر طرف شد. مزاحمت NO₃⁻، مزاحمت از نوع شاهد است و قابل برطرف کردن نیست.

۳-۲-۱۲- حد تشخیص روش‌ها

به منظور بررسی حد تشخیص هر یک از روش‌ها، ده اندازه‌گیری تکراری برای شاهد انجام شد و طیف هر محلول در محدوده‌ی طول موجی ۲۱۰-۳۰۰ نانومتر ثبت گردید. سپس غلظت محلول‌های سیتالوپرام و ونلافاکسین با هر یک از روش‌های EXRSM، SRSM و MCM به دست آمد. حد تشخیص هر یک از این روش‌ها به صورت جداگانه، از سه برابر انحراف استاندارد سیگنال شاهد به دست آمده از هر روش بر شیب منحنی کالیبراسیون بدست آمده از هر روش محاسبه شد [۵۰]. با توجه به تعریف فوق، حد تشخیص تجربی روش‌ها برای داروها در جدول ۳-۴۷ بیان شده است. در روش دیگر حد تشخیص روش MCM از سه برابر انحراف استاندارد غلظت اندازه‌گیری شده هر گونه نیز قابل

محاسبه است [۴۱،۴۳] و مقدار آن برای سیتالوپرام و ونلافاکسین به ترتیب ۰/۴۰۳۲ و ۰/۱۳۱۴ میکروگرم بر میلی لیتر بدست آمد.

جدول ۳-۴۷: نتایج حاصل از بررسی حد تشخیص روش های EXRSM، SRSM و MCM در اندازه گیری همزمان محلول های سیتالوپرام و ونلافاکسین.

روش اندازه گیری	حد تشخیص سیتالوپرام (میکروگرم بر میلی لیتر)	حد تشخیص ونلافاکسین (میکروگرم بر میلی لیتر)
EXRSM	۰/۱۰۱	۰/۱۷۱۴
SRSM	۰/۱۰۱	۰/۱۳۹۹
MCM	۰/۴۰۲۸	۰/۰۴۳۷

۳-۲-۱۳- دقت و صحت روش ها

برای بررسی دقت و صحت روش ها، غلظت هایی از محلول سیتالوپرام و ونلافاکسین در منحنی کالیبراسیون انتخاب شد و محلول های با غلظت های انتخاب شده ی سیتالوپرام و ونلافاکسین به صورت مخلوط دارویی در شرایط بهینه ی سایر اجزا ساخته شد. برای هر یک از مخلوط ها شش بار اندازه گیری تکراری انجام شد و طیف هر محلول در محدوده ی طول موجی ۲۱۰-۳۰۰ نانومتر ثبت گردید. سپس غلظت آن ها با استفاده از روش های EXRSM، SRSM و MCM محاسبه شد. مقادیر انحراف استاندارد نسبی در هر حالت محاسبه و نتایج به دست آمده در جدول ۳-۴۸ آورده شده است. آزمون t و مقادیر درصد های بازیابی برای روش های جدید نشان داد که این روش ها دارای خطای سیستماتیک نمی باشند. آزمون t برای غلظت ۳/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین نشان داد که روش MCM دارای خطای سیستماتیک می باشد.

جدول ۳-۴۸: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش های EXRSM، SRSM و MCM در اندازه گیری همزمان محلول های سیتالوپرام و ونلافاکسین.

روش پیشنهادی	غلظت موجود (میکروگرم بر میلی لیتر)		غلظت پیش بینی شده (میکروگرم بر میلی لیتر)		RSD% (n=6)		در صد بازیابی	
EXRSM	سیتالوپرام	ونلافاکسین	سیتالوپرام	ونلافاکسین	سیتالوپرام	ونلافاکسین	سیتالوپرام	ونلافاکسین
	۲۰/۰۰	۳/۰۰	۱۹/۸۶	۳/۱۵	۰/۷۵۵	۵/۰۷۹	۹۹/۳	۱۰۵/۰
	۱/۶۰	۱۶/۰۰	۱/۶۴	۱۶/۰۴	۲/۴۳۹	۰/۲۵۱	۱۰۲/۵	۱۰۰/۳
	۱۰/۰۰	۲/۰۰	۹/۷۳	۲/۱۰	۲/۵۶۹	۵/۵۰۵	۹۷/۳	۱۰۵/۰
	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۴/۸۹	۱۰/۰۵	۲/۶۵۸	۰/۶۹۶	۹۷/۸	۱۰۰/۵

۱۰۴/۰	۹۹/۵	۴/۱۶۶	۰/۵۰۲	۳/۱۲	۱۹/۹۱	۳/۰۰	۲۰/۰۰	SRSM
۱۰۰/۱	۱۰۱/۳	۰/۳۱۱	۲/۴۶۹	۱۶/۰۳	۱/۶۲	۱۶/۰۰	۱/۶۰	
۱۰۴/۵	۹۸/۰	۴/۷۸۸	۲/۵۵۱	۲/۰۹	۹/۸۰	۲/۰۰	۱۰/۰۰	
۹۹/۳	۹۸/۲	۰/۹۱۶	۲/۰۳۶	۹/۹۳	۴/۹۱	۱۰/۰۰	۵/۰۰	
۱۱۹/۰	۱۰۰/۳	۶/۲۴۶	۰/۴۴۸	۳/۵۷	۲۰/۰۶	*۳/۰۰	۲۰/۰۰	MCM
۹۹/۲	۱۰۵/۰	۰/۹۵۱	۵/۰۳۵۷	۱۵/۸۷	۱/۶۸	۱۶/۰۰	۱/۶۰	
۹۸/۷	۹۷/۸	۱/۴۱۸	۲/۶۵۸	۹/۸۷	۴/۸۹	۱۰/۰۰	۵/۰۰	

* آزمون t برای غلظت ۳/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین نشان داد که روش MCM دارای خطای سیستماتیک می باشد.

۳-۲-۱۴- کاربرد روش ها در آنالیز نمونه حقیقی

به منظور تست توانایی هر یک از روش های EXRSM، SRSM و MCM در اندازه گیری همزمان سیتالوپرام و ونلافاکسین، اندازه گیری مقادیر گونه های ذکر شده در نمونه قرص این دارو ها مورد بررسی قرار گرفت.

برای تهیه محلول سیتالوپرام از قرص، ابتدا سه عدد قرص ۲۰ میلی گرمی سیتالوپرام (شرکت سبحان دارو) وزن شد و پس از پودر کردن در هاون عقیق یک سوم آن را وزن کرده و به بالن ۱۰۰ میلی لیتری منتقل گردید. پودر سیتالوپرام با ۴۰/۰ میلی لیتر متانول حل شده و به مدت پانزده دقیقه در التراسونیک قرار داده شد. سپس محلول را دو مرتبه از کاغذ صافی عبور داده تا محلول صاف و شفاف بدست آمده شد با آب مقطر تا خط نشانه بالن به حجم رسانده شد. همچنین برای تهیه محلول ونلافاکسین از قرص، ابتدا سه عدد قرص ۳۷/۵ میلی گرمی ونلافاکسین (شرکت داروسازی فارابی) وزن شد و پس از پودر کردن در هاون عقیق یک سوم آن را وزن کرده و به بالن ۱۰۰ میلی لیتری منتقل گردید. پودر ونلافاکسین با ۴۰/۰ میلی لیتر متانول حل شده و به مدت پانزده دقیقه در التراسونیک قرار داده شد. سپس محلول را دو مرتبه از کاغذ صافی عبور داده تا محلول صاف و شفاف بدست آمده شد با آب مقطر تا خط نشانه بالن به حجم رسانده شد.

۵/۳۳ میلی لیتر از محلول ۳۷/۵ میکروگرم بر میلی لیتر قرص ونلافاکسین و ۱۰/۰۰ میلی لیتر از محلول ۲۰/۰ میکروگرم بر میلی لیتر قرص سیتالوپرام را به بالن حجمی ۱۰۰ میلی لیتری منتقل کرده و با آب به حجم رسانده شد. به این ترتیب مخلوط ۲۰/۰ میکروگرم بر میلی لیتر نسبت به

هرکدام از قرص‌ها تهیه شد. یک میلی لیتر از این مخلوط به همراه ۲/۰۰ میلی لیتر بافر فسفاتی $\text{pH}=7/0$ و ۳/۰۰-۰/۰۰ میلی لیتر از محلول استاندارد ۱۰/۰ میکروگرم بر میلی لیتر ونلافاکسین و سیتالوپرام به بالن حجمی ۱۰ میلی لیتر اضافه و با آب مقطر به حجم رسانده شد. سپس قسمتی از محلول به سل دستگاه اسپکتروفتومتر منتقل شد و طیف هر محلول نسبت به شاهد در دامنه ۳۰۰-۲۱۰ نانومتر ثبت گردید. برای تهیه محلول شاهد، به یک بالن ۱۰ میلی لیتری ۱/۰۰ میلی لیتر بافر فسفاتی با $\text{pH}=7/0$ و مقدار متناسب با نمونه تهیه شده از متانول اضافه گردید. سپس غلظت سیتالوپرام و ونلافاکسین با استفاده از هر یک از روش‌های EXRSM، SRSR و MCM محاسبه شد. نتایج حاصل از پنج مرتبه اندازه‌گیری تکراری برای هر یک از روش‌ها محاسبه و نتایج به دست آمده در جدول ۳-۲۲ آورده شده است.

جدول ۳-۴۹: نتایج حاصل از اندازه‌گیری غلظت ونلافاکسین و سیتالوپرام در نمونه‌های قرص با استفاده از هر یک از روش‌های EXRSM، SRSR و MCM.

روش مورد استفاده	غلظت های موجود در مخلوط (میکروگرم بر میلی لیتر)		میانگین مقدار پیش بینی شده در مخلوط (میکروگرم بر میلی لیتر)		درصد بازیابی	
	سیتالوپرام	ونلافاکسین	سیتالوپرام	ونلافاکسین	سیتالوپرام	ونلافاکسین
EXRSM	-	-	۱/۹۶	۲/۰۲	-	-
	۱/۰۰	۱/۰۰	۳/۰۳	۳/۰۴	۱۰۷/۰	۱۰۲/۰
	۲/۰۰	۲/۰۰	۳/۹۳	۴/۰۳	۹۸/۵	۱۰۰/۵
	۳/۰۰	۳/۰۰	۴/۹۴	۵/۰۶	۹۹/۳	۱۰۱/۳
روش مورد استفاده	غلظت های موجود در مخلوط (میکروگرم بر میلی لیتر)		میانگین مقدار پیش بینی شده در مخلوط (میکروگرم بر میلی لیتر)		درصد بازیابی	
	سیتالوپرام	ونلافاکسین	سیتالوپرام	ونلافاکسین	سیتالوپرام	ونلافاکسین
SRSR	-	-	۱/۹۹	۲/۰۲	-	-
	۱/۰۰	۱/۰۰	۳/۰۱	۳/۰۲	۱۰۲/۰	۱۰۰/۰
	۲/۰۰	۲/۰۰	۳/۹۶	۴/۰۲	۹۸/۵	۱۰۰/۰
	۳/۰۰	۳/۰۰	۴/۹۵	۵/۰۴	۹۸/۶	۱۰۰/۶
MCM	-	-	۱/۹۱	۱/۸۸	-	-
	۱/۰۰	۱/۰۰	۳/۰۳	۳/۰۴	۱۱۲/۰	۱۱۶/۰
	۲/۰۰	۲/۰۰	۳/۹۳	۳/۷۱	۱۰۱/۰	۹۱/۵
	۳/۰۰	۳/۰۰	۴/۸۴	۴/۹۲	۹۷/۷	۱۰۱/۳

به ترتیب مقادیر ۳۷/۹ و ۱۹/۶ میلی گرم در قرص ونلافاکسین و سیتالوپرام بدست آمد.

فصل چہارم

بحث و نتیجہ گیری

۴-۱- بهینه سازی متغیرهای تجربی در تعیین همزمان متیل ویولت و تولوئیدین-

بلو در مخلوط دوتایی

اثر pH در ناحیه ۸/۰-۱/۰ بر جذب و طول موج ماکزیمم جذب متیل ویولت و تولوئیدین بلو در ناحیه طول موجی ۷۰۰-۴۵۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این بررسی در جدول (۳-۲) و شکل (۳-۴) نشان می‌دهند که اختلاف طول موج متیل ویولت و تولوئیدین بلو در pH های کمتر از ۲/۰ کاهش یافته است که بیانگر افزایش همپوشانی طیف‌ها در این ناحیه از pH است. بنابراین اندازه‌گیری در pH های کمتر از ۲/۰ مناسب نمی‌باشد. هم‌چنین مشخص گردید، میزان جذب برای متیل ویولت در pH های ۲/۵ تا ۳/۵ و تولوئیدین بلو در pH های ۲/۰ تا ۳/۵ بیشترین مقدار را دارد، به همین جهت با در نظر گرفتن حساسیت و گزینش‌پذیری روش محلول بافری با $\text{pH}=3/0$ به عنوان pH بهینه انتخاب گردید.

اثر نوع بافر بر جذب متیل ویولت و تولوئیدین بلو توسط بافرهای فسفاتی، فتالاتی و سیتراتی با $\text{pH}=3/0$ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این بررسی در جدول (۳-۳) و شکل (۳-۵) نتایج نشان می‌دهند که با استفاده از بافر سیتراتی، بیشترین میزان جذب مشاهده می‌شود، لذا بافر سیتراتی با $\text{pH}=3/0$ به عنوان بافر بهینه انتخاب گردید.

اثر حجم بافر سیتراتی با $\text{pH}=3/0$ در دامنه ۵۰۰-۵۰ میلی‌لیتر از بافر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این بررسی در جدول (۳-۴) و شکل (۳-۶) نتایج نشان می‌دهند که میزان جذب رنگ‌ها در حجم‌های مختلف از بافر سیتراتی ثابت است. برای اطمینان از کافی بودن ظرفیت بافری، حجم ۲۰۰ میلی‌لیتر از بافر سیتراتی انتخاب شد.

اثر قدرت یونی بر حساسیت، در شرایط بهینه و با استفاده از پتاسیم نیترات در محدوده‌ی ۰/۰۰ تا ۱/۰۰ مولار مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این بررسی در جدول (۳-۵) و شکل (۳-۷) نشان می‌دهند که قدرت یونی تأثیری بر میزان جذب متیل ویولت و تولوئیدین بلو و حساسیت

روش ندارد.

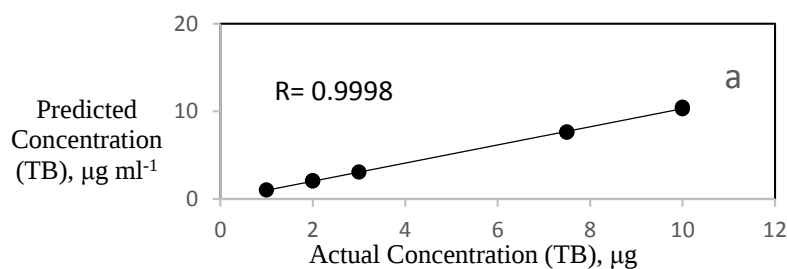
۴-۱-۱- کالیبراسیون

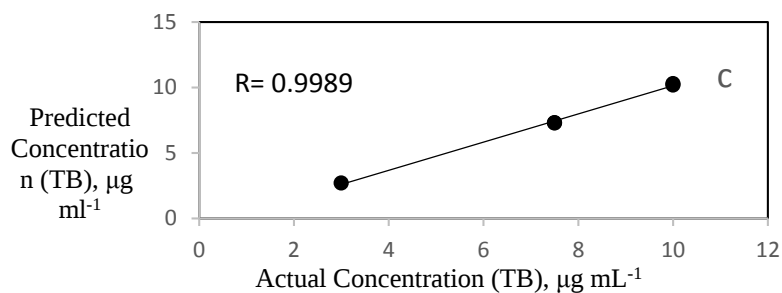
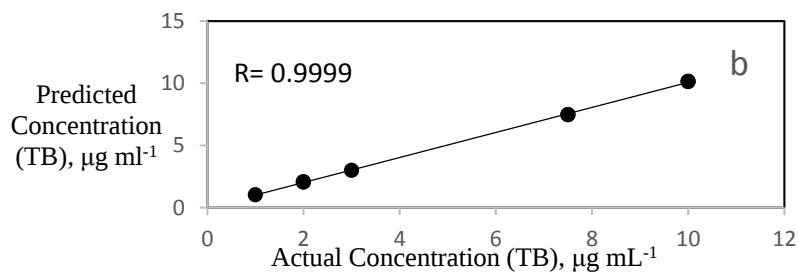
بررسی‌ها نشان داد که رابطه خطی بین سیگنال اندازه‌گیری شده و غلظت متیل ویولت و تولوئیدین بلو به ترتیب در محدوده‌ی غلظتی ۰/۳۰-۱۲/۵۰ و ۰/۳۰-۲۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر، وجود دارد. معادلات مربوطه و مقادیر ضریب همبستگی هر کدام از گونه‌ها در بخش (۳-۱-۷) آمده است.

دامنه خطی متیل ویولت و تولوئیدین بلو در روش‌های جدید اسپکتروفتومتری (EXRSM و SRSM) به ترتیب ۱/۰۰-۱۵/۰۰ و ۱/۰۰-۱۰/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر می‌باشد و برای روش MCM به ترتیب ۲/۰۰-۱۰/۰۰ و ۳/۰۰-۱۵/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر می‌باشد. بنابراین دامنه خطی روش MCM برای تولوئیدین بلو محدودتر از روش‌های جدید در اسپکتروفتومتری است.

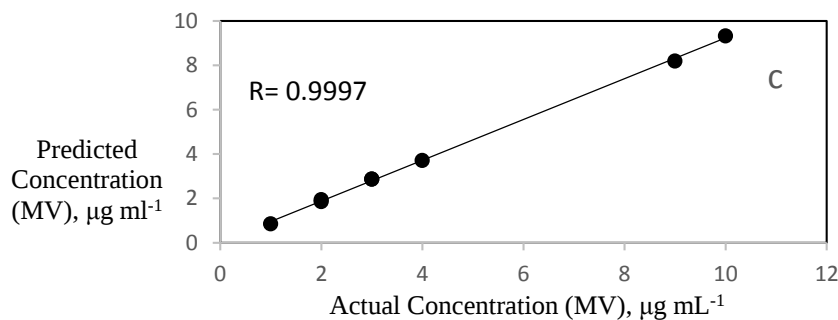
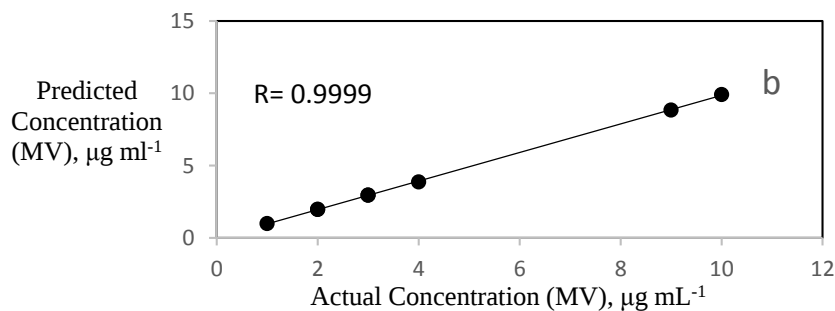
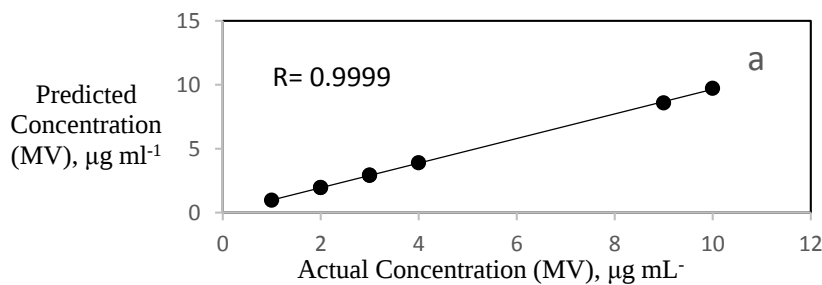
۴-۱-۲- ارزیابی آماری روش‌ها

برای روش‌های EXRSM، SRSM و MCM نمودار غلظت پیش‌بینی شده بر حسب غلظت واقعی برای تولوئیدین بلو و متیل ویولت به ترتیب در شکل ۴-۱ و شکل ۴-۲ آورده شده است. ضریب همبستگی مشاهده شده بین مقادیر پیش‌بینی شده و مقادیر واقعی نشان دهنده میزان نزدیکی غلظت پیش‌بینی شده توسط روش‌ها نسبت به مقدار واقعی آن است. همچنین برای ارزیابی و بررسی توانایی روش‌های مذکور در اندازه‌گیری همزمان تولوئیدین بلو و متیل ویولت مقادیر MAE، MSE، MRE و R به ترتیب در جدول ۴-۱ و جدول ۴-۲ آورده شده است.





شکل ۴-۱: نمایش میزان همبستگی غلظت‌های پیش‌بینی شده و غلظت‌های واقعی تولوئیدین بلو با استفاده از سری تست، (a) در روش EXRSM، (b) در روش SRSM و (c) در روش MCM



شکل ۴-۲: نمایش میزان همبستگی غلظت‌های پیش‌بینی شده و غلظت‌های واقعی متیل ویولت در مخلوط سری تست، (a) در روش EXRSM، (b) در روش SRSM و (c) در روش MCM

جدول ۴-۱: پارامترهای آماری محاسبه شده برای تولوئیدین بلو در روش‌های EXRSM، SRSM و MCM در مخلوط

سری تست

پارامتر آماری	EXRSM	SRSM	MCM
MAE	۰/۱۵۳۷	۰/۰۶۰۰	۰/۳۳۰۰
MSE	۰/۰۴۳۷	۰/۰۰۵۷	۰/۱۲۵۷
MRE	۱/۰۹	۰/۵۷	۵/۶۹
R	۰/۹۹۹۸	۰/۹۹۹۹	۰/۹۹۸۹
محدوده خطی روش	۱/۰۰-۱۵/۰۰	۱/۰۰-۱۵/۰۰	۳/۰۰-۱۵/۰۰

جدول ۴-۲: پارامترهای آماری محاسبه شده برای متیل ویولت در روش‌های EXRSM، SRSM و MCM در مخلوط

سری تست

پارامتر آماری	EXRSM	SRSM	MCM
MAE	۰/۱۳۶۲	۰/۰۷۶۲	۰/۳۰۱۳
MSE	۰/۰۳۵۶	۰/۰۰۸۴	۰/۱۶۱۰
MRE	۱/۱۵	۰/۷۸	۲/۸۹
R	۰/۹۹۹۹	۰/۹۹۹۹	۰/۹۹۹۷
محدوده خطی روش	۱/۰۰-۱۰/۰۰	۱/۰۰-۱۰/۰۰	۲/۰۰-۱۰/۰۰

نتایج حاصل از (جدول ۴-۱) نشان می‌دهد که خطای حاصل از پیش‌بینی غلظت تولوئیدین بلو با استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری جدید (EXRSM و SRSM) در مقایسه با روش MCM کمتر است.

۴-۱-۳- گزینش پذیری روش‌ها

نتایج نشان داده شده در جدول (۳-۱۹) بیان می‌کند که بیشتر کاتیون‌ها و آنیون‌ها در اندازه‌گیری همزمان متیل ویولت و تولوئیدین بلو با هر یک از روش‌های EXRSM، SRSM و MCM مزاحم نیستند و روش‌ها از انتخاب‌پذیری بالایی برخوردار هستند.

۴-۱-۴- کاربرد روش‌ها

کارایی روش‌های EXRSM، SRSM و MCM در اندازه‌گیری همزمان متیل ویولت و تولوئیدین بلو در نمونه آب شهر به عنوان نمونه حقیقی مورد بررسی قرار گرفت. مقادیر درصد بازیابی و RSD در روش‌های مذکور در جدول (۳-۲۲) آمده است، که به ترتیب نشان دهنده صحت و دقت خوب این روش‌ها در اندازه‌گیری متیل ویولت و تولوئیدین بلو در نمونه‌هایی با بافت نسبتاً پیچیده

است. مقادیر RSD و درصد بازیابی برای هر یک از روش‌های EXRSM، SRSM و MCM در اندازه‌گیری همزمان متیل ویولت و تولوئیدین بلو با استفاده از شش اندازه‌گیری تکراری در مخلوط-هایی حاوی غلظت‌های مختلفی از دو گونه در جدول (۳-۲۱) آورده شده است. با توجه به مقادیر درصد بازیابی، روش‌های EXRSM و SRSM نسبت به روش MCM به خصوص در مخلوط‌های حاوی ۱/۰ و ۲/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تولوئیدین بلو، بهتر است. آزمون F نشان داد که دقت روش‌های اسپکتروفتومتری جدید (EXRSM و SRSM) با روش MCM تفاوت معنا داری ندارد. مقادیر درصد‌های بازیابی و آزمون t صحت خوب روش‌های جدید را نشان می‌دهند. بنابراین می‌توان از این روش‌ها برای اندازه‌گیری همزمان متیل ویولت و تولوئیدین بلو، در مخلوط‌های دوتایی آن‌ها در نمونه‌های حقیقی با موفقیت به کار برد.

۴-۲- بهینه سازی متغیرهای تجربی در تعیین همزمان سیتالوپرام و

ونلافاکسین در مخلوط دوتایی

اثر pH در ناحیه ۹/۰-۱/۰ بر جذب و طول موج ماکزیمم جذب ونلافاکسین و سیتالوپرام در ناحیه طول موجی ۲۱۰-۳۰۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این بررسی در جدول (۳-۲۴) و شکل (۳-۳۴) نشان می‌دهند که میزان جذب برای ونلافاکسین و سیتالوپرام در این دامنه pH تقریباً ثابت بوده و همچنین اختلاف طول موج ونلافاکسین و سیتالوپرام در pH های مختلف تقریباً ثابت است. لذا $pH=7/0$ به عنوان pH بهینه انتخاب گردید.

اثر نوع بافر بر جذب ونلافاکسین و سیتالوپرام توسط بافرهای فسفاتی، فتالاتی و سیتراتی با $pH=7/0$ مورد بررسی قرار گرفت. مشاهدات نشان داد بافرهای فتالاتی و سیتراتی در ناحیه طول موجی ۲۱۰-۳۰۰ نانومتر به تنهایی دارای جذب بوده و ایجاد مزاحمت می‌کنند. لذا بافر فسفاتی با $pH=7/0$ برای تنظیم pH محلول‌ها انتخاب شد.

اثر حجم بافر فسفاتی با $pH=7/0$ در دامنه ۵/۰-۰/۵۰ میلی‌لیتر از بافر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این بررسی در جدول (۳-۲۵) و شکل (۳-۳۵) نشان می‌دهند که میزان جذب

داروها در حجم‌های مختلف از بافر فسفاتی ثابت است. برای اطمینان از کافی بودن ظرفیت بافری حجم ۱/۰۰ میلی‌لیتر از بافر فسفاتی انتخاب گردید.

اثر قدرت یونی با استفاده از محلول پتاسیم کلرید در دامنه غلظتی ۰/۰۰ تا ۰/۵۰ مولار مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این بررسی در جدول (۳-۲۶) و شکل (۳-۳۶) نتایج نشان می‌دهند که در دامنه غلظتی ۰/۰۰ تا ۰/۵۰ مولار پتاسیم کلرید قدرت یونی تاثیری بر میزان جذب داروها و حساسیت روش ندارد.

۴-۲-۱- کالبراسیون

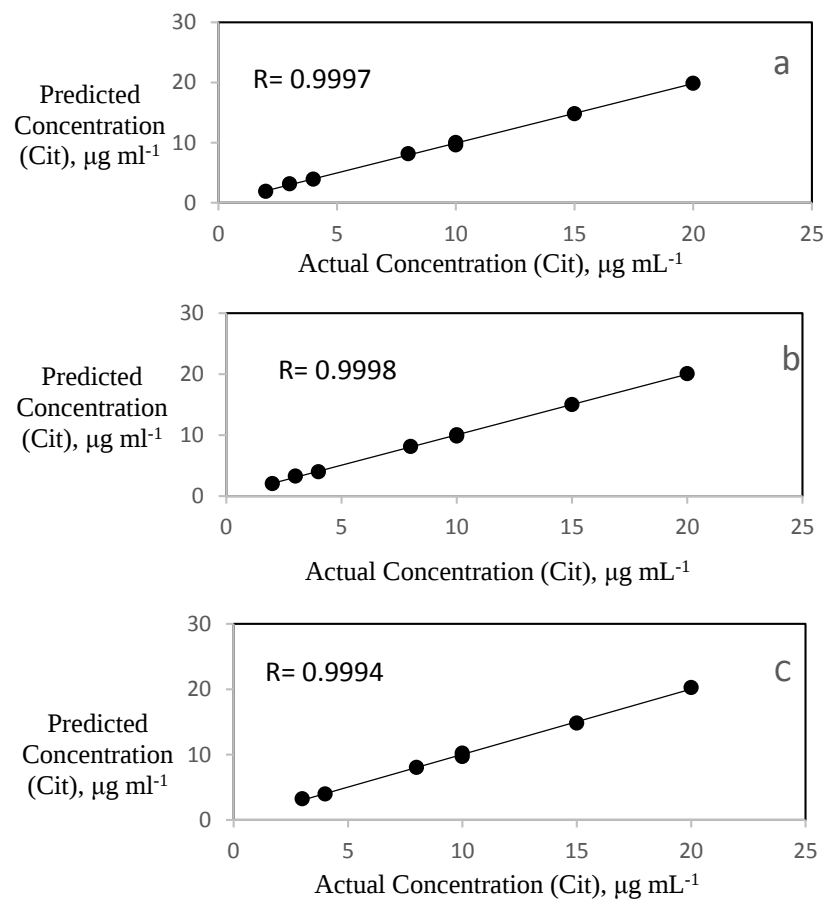
بررسی‌ها نشان داد که رابطه خطی بین سیگنال اندازه‌گیری شده و غلظت ونلافاکسین و سیتالوپرام به ترتیب در محدوده‌ی غلظتی ۰/۵۰-۴۰/۰۰ و ۰/۵۰-۵۰/۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، وجود دارد. معادلات مربوطه و مقادیر ضریب همبستگی هر کدام از گونه‌ها در بخش (۳-۲-۷) آمده است.

دامنه خطی ونلافاکسین و سیتالوپرام در روش‌های جدید اسپکتروفتومتری (EXRSM و SRSM) به ترتیب ۱/۶۰-۲۰/۰۰ و ۱/۰۰-۱۶/۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد و برای روش MCM به ترتیب ۲/۰۰-۲۰/۰۰ و ۳/۰۰-۱۶/۰۰ می‌باشد. بنابراین دامنه خطی روش MCM محدودتر از روش‌های جدید اسپکتروفتومتری است. مقادیر RSD و درصد بازیابی برای هر یک از روش‌های EXRSM، SRSM و MCM در اندازه‌گیری همزمان متیل ویولت و تولوئیدین بلو با استفاده از شش اندازه‌گیری تکراری در مخلوط‌هایی حاوی غلظت‌های مختلفی از دو گونه در جدول ۳-۴۸ آورده شده است. با توجه به مقادیر درصد بازیابی، روش‌های EXRSM و SRSM نسبت به روش MCM بهتر است. همچنین آزمون F نشان داد که دقت روش‌های اسپکتروفتومتری جدید (EXRSM و SRSM) با روش MCM تفاوت معنا داری ندارد.

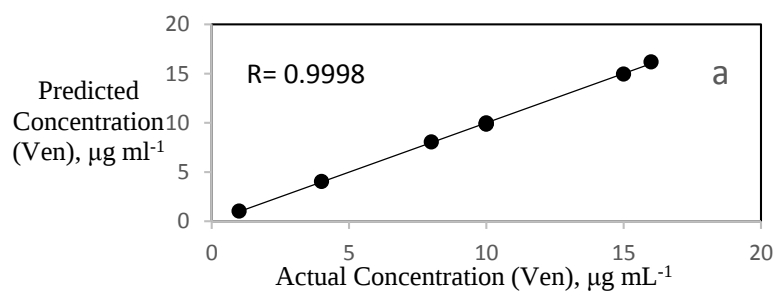
۴-۲-۲- ارزیابی آماری روش‌ها

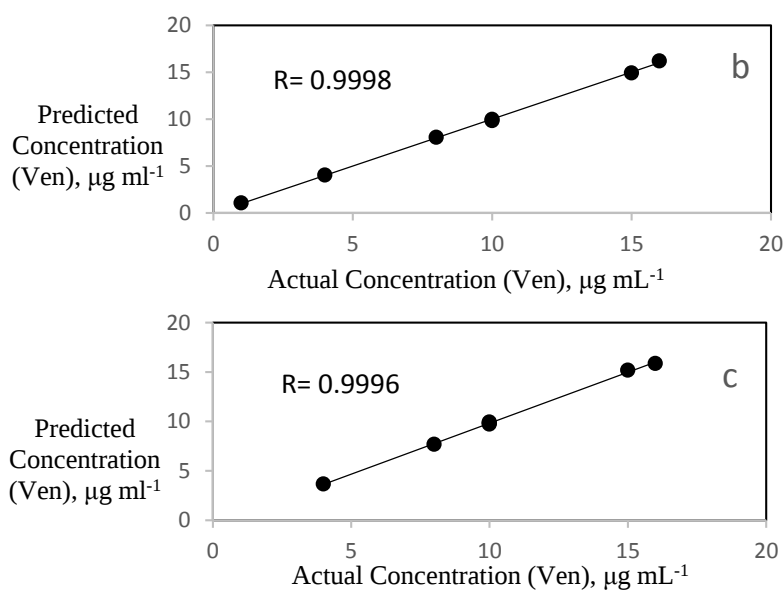
برای روش‌های EXRSM، SRSM و MCM نمودار غلظت پیش‌بینی شده بر حسب غلظت

واقعی برای ونلافاکسین و سیتالوپرام در شکل ۳-۴ و شکل ۴-۴ آورده شده است. ضریب همبستگی مشاهده شده بین مقادیر پیش بینی شده و مقادیر واقعی نشان دهنده میزان نزدیکی غلظت پیش بینی شده توسط روش‌ها نسبت به مقدار واقعی آن است. همچنین برای ارزیابی و بررسی توانایی روش‌های مذکور در اندازه‌گیری همزمان ونلافاکسین و سیتالوپرام مقادیر MAE، MSE، MRE و R به ترتیب در جدول (۳-۴) و جدول (۴-۴) آورده شده است.



شکل ۳-۴: نمایش میزان همبستگی غلظت‌های پیش‌بینی شده و غلظت‌های واقعی سیتالوپرام با استفاده از سری تست، (a) در روش EXRSM، (b) در روش SRSM و (c) در روش MCM





شکل ۴-۴: نمایش میزان همبستگی غلظت‌های پیش‌بینی شده و غلظت‌های واقعی ونلافاکسین با استفاده از سری تست، (a) در روش EXRSM، (b) در روش SRSM و (c) در روش MCM

جدول ۳-۴: پارامترهای آماری محاسبه شده برای سیتالوپرام در روش‌های EXRSM، SRSM و MCM در مخلوط

سری تست

پارامتر آماری	EXRSM	SRSM	MCM
MAE	۰/۱۶۶۲	۰/۰۹۳۷	۰/۲۲۱۲
MSE	۰/۰۳۶۲	۰/۰۱۶۴	۰/۰۸۲۸
MRE	۱/۲۷	۰/۱۳۴	۱/۳۱
R	۰/۹۹۹۷	۰/۹۹۹۸	۰/۹۹۹۴
محدوده خطی روش	۱/۰۰-۱۶/۰۰	۱/۰۰-۱۶/۰۰	۳/۰۰-۱۶/۰۰

جدول ۴-۴: پارامترهای آماری محاسبه شده برای ونلافاکسین در روش‌های EXRSM، SRSM و MCM در مخلوط

سری تست

پارامتر آماری	EXRSM	SRSM	MCM
MAE	۰/۰۸۱۳	۰/۰۹۱۲	۰/۲۴۷۵
MSE	۰/۰۱۰۹	۰/۰۱۲	۰/۰۷۶۶
MRE	۰/۴۴	۰/۱۳۴	۳/۳۹
R	۰/۹۹۹۸	۰/۹۹۹۸	۰/۹۹۹۶
محدوده خطی روش	۱/۶۰-۲۰/۰۰	۱/۶۰-۲۰/۰۰	۲/۰۰-۲۰/۰۰

نتایج جدول ۳-۴ نشان می‌دهد که خطای حاصل از پیش‌بینی غلظت سیتالوپرام با استفاده از

روش SRSM در مقایسه با روش‌های EXRSM و MCM کمتر است. همچنین نتایج جدول ۴-۴

نشان می‌دهد که خطای حاصل از پیش‌بینی غلظت ونلافاکسین با استفاده از روش‌های

اسپکتروفتومتری جدید (EXRSM و SRSM) در مقایسه با روش MCM کمتر است.

۴-۲-۳- گزینش پذیری روش‌ها

نتایج نشان داده شده در جدول ۳-۴۶ بیان می‌کند که بیشتر کاتیون‌ها و آنیون‌ها در اندازه گیری اندازه‌گیری همزمان سیتالوپرام و ونلافاکسین با هر یک از روش‌های EXRSM، SRS و MCM مزاحم نیستند و روش‌ها از انتخاب‌گری بالایی برخوردار هستند.

۴-۲-۴- کاربرد روش‌ها

کارایی روش‌های EXRSM، SRS و MCM در اندازه‌گیری همزمان سیتالوپرام و ونلافاکسین در نمونه قرص به عنوان نمونه حقیقی مورد بررسی قرار گرفت. مقادیر درصد بازیابی و RSD در روش‌های مذکور در جدول ۳-۴۹ آمده است، که به ترتیب نشان دهنده صحت و دقت خوب این روش‌ها در اندازه‌گیری سیتالوپرام و ونلافاکسین در نمونه‌های قرص است.

۴-۲-۵- مقایسه‌ی روش‌های پیشنهادی با برخی روش‌های موجود

در این کار روش‌های اسپکتروفتومتری جدید برای تعیین همزمان سیتالوپرام و ونلافاکسین در مخلوط‌های دوتایی آن‌ها مورد استفاده قرار گرفت. روش‌های پیشنهادی ساده، دقیق و صحیح هستند که نیازی به مراحل اولیه جداسازی، برنامه‌های کامپیوتری ویژه و دستگاه‌های پیچیده ندارند. بنابراین اجزا مخلوط دوتایی مذکور را می‌توان در آزمایشگاه‌های کنترل کیفی با دقت و صحت قابل مقایسه با سایر روش‌های اسپکتروفتومتری گزارش شده، اندازه‌گیری کرد.

روش‌های پیشنهادی در مقایسه با روش منبع [۲۴] و روش MCM در مقایسه با روش منبع [۳] حد تشخیص بهتری برای ونلافاکسین دارند. روش‌های پیشنهادی در مقایسه با روش منبع [۲۸] و همچنین روش‌های جدید (EXRSM و SRS) در مقایسه با روش منبع [۲۶] حد تشخیص بهتری برای سیتالوپرام دارند. روش‌های پیشنهادی در مقایسه با روش منبع [۱۸] و همچنین روش‌های جدید (EXRSM و SRS) در مقایسه با روش منبع [۲۶] درصد بازیابی بالاتری برای سیتالوپرام دارند. منحنی کالیبراسیون استفاده شده برای سیتالوپرام و ونلافاکسین در این پایان نامه نسبت به منبع [۳، ۱۸، ۲۶، ۲۸] در محدوده خطی وسیع‌تری خطی است.

آینده نگری

❖ در این پایان نامه دو روش اسپکتروفتومتری جدید EXRSM و SRSM برای اندازه‌گیری همزمان دو گونه در مخلوط دوتایی آن‌ها که با یکدیگر همپوشانی طیفی دارند، معرفی و مورد استفاده قرار گرفته شد. نتایج روش‌های مذکور نشان دهنده دقت و صحت قابل مقایسه آن با روش MCM بوده است. بنابراین پیشنهاد می‌شود روش‌های اسپکتروفتومتری جدید (EXRSM و SRSM) برای اندازه‌گیری همزمان سایر آنالیت‌هایی که طیف جذبی آن‌ها همپوشانی دارند می‌توان استفاده کرد.

- [۱] H. A. Alhassani, M. A. Rauf, and S. S. Ashraf, "Efficient microbial degradation of Toluidine Blue dye by *Brevibacillus* sp," *Dyes and pigments*, vol. 75, pp. 395-400, 2007.
- [۲] R. Lafi, A. ben Fradj, A. Hafiane, and B. H. Hameed, "Coffee waste as potential adsorbent for the removal of basic dyes from aqueous solution," *Korean Journal of Chemical Engineering*, vol. 31, pp. 2198-2206, 2014.
- [۳] M. A. Rauf, S. M. Qadri, S. Ashraf, and K. M. Al-Mansoori, "Adsorption studies of Toluidine Blue from aqueous solutions onto gypsum," *Chemical Engineering Journal*, vol. 150, pp. 90-95, 2009.
- [۴] S. K. Alpat, Ö. Özbayrak, Ş. Alpat, and H. Akçay, "The adsorption kinetics and removal of cationic dye, Toluidine Blue O, from aqueous solution with Turkish zeolite," *Journal of hazardous materials*, vol. 151, pp. 213-220, 2008.
- [۵] M. Doğan and M. Alkan, "Adsorption kinetics of methyl violet onto perlite," *Chemosphere*, vol. 50, pp. 517-528, 2003.
- [۶] س. هاشمیان, "حذف رنگ بنفش متیل توسط جذب روی بنتونیت در حضور نانو فریت مس."
- [۷] M. Hejazifar, S. Azizian, H. Sarikhani, Q. Li, and D. Zhao, "Microwave assisted preparation of efficient activated carbon from grapevine rhytidome for the removal of methyl violet from aqueous solution," *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, vol. 92, pp. 258-266, 2011.
- [۸] F. Hamidi Malayeri, M. R. Sohrabi, and H. Ghourchian, "Magnetic Multi-Walled Carbon Nanotube as an Adsorbent for Toluidine Blue O Removal from Aqueous Solution," *International Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, vol. 8, pp. 79-86, 2012.
- [۹] H. Juan, Z. Zhiling, and L. Huande, "Simultaneous determination of fluoxetine, citalopram, paroxetine, venlafaxine in plasma by high performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry (HPLC–MS/ESI)," *Journal of Chromatography B*, vol. 820, pp. 33-39, 2005.
- [۱۰] P. Allard, L. Gram, K. Timdahl, K. Behnke, M. Hanson, and J. Søgaaard, "Efficacy and tolerability of venlafaxine in geriatric outpatients with major depression: a double-blind, randomised 6-month comparative trial with citalopram," *International journal of geriatric psychiatry*, vol. 19, pp. 1123-1130, 2004.
- [۱۱] M. Kingbäck, "Genetic influence on enantiomeric drug disposition: Focus on venlafaxine and citalopram," 2011.
- [۱۲] K. Lavanya , P. Sunitha , A .Anil Kumar , and K. Venkata Ramana "New Simple UV spectrophotometric method for determination of venlafaxine hydrochloride in bulk and pharmaceutical dosage forms," *International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance*, vol. 14, pp. 1-3, 2013.
- [۱۳] A. de Castro, M. d. M. R. Fernandez, M. Laloup, N. Samyn, G. De Boeck, M. Wood, *et al.*, "High-throughput on-line solid-phase extraction–liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the simultaneous analysis of 14 antidepressants and their metabolites in plasma," *Journal of Chromatography A*, vol. 1160, pp. 3-12, 2007.
- [۱۴] O. Mastrogianni, G. Theodoridis, K. Spagou, D. Violante, T. Henriques, A. Pouliopoulos, *et al.*, "Determination of venlafaxine in post-mortem whole blood

- by HS-SPME and GC-NPD," *Forensic science international*, vol. 215, pp. 105-109, 2012.
- [١٥] I. Papoutsis, A. Khraiwesh, P. Nikolaou, C. Pistos, C. Spiliopoulou, and S. Athanaselis, "A fully validated method for the simultaneous determination of 11 antidepressant drugs in whole blood by gas chromatography–mass spectrometry," *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, vol. 70, pp. 557-562, 2012.
- [١٦] U. S. Food and A. Drug, "Celexa (citalopram hydrobromide): Drug safety communication-abnormal heart rhythms associated with higher doses," *Recuperado el*, vol. 18, 2011.
- [١٧] H. Kirchherr and W. N. Kühn-Velten, "Quantitative determination of forty-eight antidepressants and antipsychotics in human serum by HPLC tandem mass spectrometry: a multi-level, single-sample approach", *Journal of Chromatography B*, vol. 843, pp. 100-113, 2006.
- [١٨] H. P. A. Nouws, C. Delerue-Matos, and A. A. Barros, "Electrochemical determination of citalopram by adsorptive stripping voltammetry–determination in pharmaceutical products," *Analytical letters*, vol. 39, pp. 1907-1915, 2006.
- [١٩] Y. Sasajima, L. W. Lim, T. Takeuchi, K. Suenami, K. Sato, and Y. Takekoshi, "Simultaneous determination of antidepressants by non-aqueous capillary electrophoresis-time of flight mass spectrometry," *Journal of Chromatography A*, vol. 1217, pp. 7598-7604, 2010.
- [٢٠] A. De Castro, M. Concheiro, O. Quintela, A. Cruz, and M. López-Rivadulla, "LC–MS/MS method for the determination of nine antidepressants and some of their main metabolites in oral fluid and plasma: Study of correlation between venlafaxine concentrations in both matrices," *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, vol. 48, pp. 183-193, 2008.
- [٢١] M. Younus, M. F. Arif, M. P. Richards, and D. B. Kumar, "Determination of Venlafaxine and Modafinil in Individual Tablet Dosage Forms using Single RP-HPLC Method," *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, vol. 14, pp. 239-245, 2015.
- [٢٢] L. Kristoffersen, A. Bugge, E. Lundanes, and L. Slørdal, "Simultaneous determination of citalopram, fluoxetine, paroxetine and their metabolites in plasma and whole blood by high-performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection," *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, vol. 734, pp. 229-246, 1999.
- [٢٣] J. Kaur, K.K. Srinivasan, A. Joseph, A. Gupta, Y. Singh, K. S. Srinivas, *et al.*, "Development and validation of stability indicating method for the quantitative determination of venlafaxine hydrochloride in extended release formulation using high performance liquid chromatography," *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences*, vol. 2, p. 22, 2010.
- [٢٤] M. Hosseini, "Application of UV-spectrophotometry and HPLC for determination of venlafaxine and its four related substances in pharmaceutical dosage forms," *Turk J. Pharm. Sci*, vol. 8, 2011.
- [٢٥] C. Sowmya, Y. P. Reddy, M. K. Kumar, and M. S. Raja, "Development and validation of spectrophotometric method for the estimation of venlafaxine in bulk and formulations," *International Journal of Chemical Sciences*, vol. 9, pp. ٢٠١١, ٥٨-٥٢.

- [٢٦] R. S. Das, Y. K. Agrawal, and P. Prajapati, "Rapid chromatographic and spectrophotometric determination of citalopram in relevance to pharmaceutical analysis," *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, vol. 3, p. 177.٢٠١٢ ,
- [٢٧] P. Wandre Shivaji , C. Doijad Rajendra , S. Sankpal Pournima , and S. Sawant Tai "Difference specrophoomic esimaion of venlafaxine hydrochloridefrom able dosage form," *pharmac and pharmaceuical sciences*, vol. 3, pp. 1519-152, 2014.
- [٢٨] A .Raza and T. M. Ansari, "Spectrophotometric determination of citalopram hydrobromide in tablet dosage form using chloranil," *Pak J Pharm Sci*, vol. 27, pp. 255-60, 2014.
- [٢٩] Skoog D A., Holler F J., Crouch S R., "Principles of instrumental analysis", Sander College, New York. 1985.
- [٣٠] E. Dinç and F. Onur, "Application of a new spectrophotometric method for the analysis of a ternary mixture containing metamizol, paracetamol and caffeine in tablets," *Analytica chimica acta*, vol. 359, pp. 93-106, 1998.
- [٣١] A. Afkhami and M. Bahram, "Successive ratio-derivative spectra as a new spectrophotometric method for the analysis of ternary mixtures," *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 61, pp. 869-877, 2005.
- [٣٢] E. S. Elzanfaly, S. A. Hassan, M. Y. Salem, and B. A. El-Zeany, "Continuous Wavelet Transform, a powerful alternative to Derivative Spectrophotometry in analysis of binary and ternary mixtures: A comparative study," *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 151, pp. 945-955, 2015.
- [٣٣] Y. M. Fayez, "Simultaneous determination of some anti-hypertensive drugs in their binary mixture by novel spectrophotometric methods," *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 132, pp. 446-451, 2014.
- [٣٤] H. M. Lotfy and M. A.-M. Hagazy, "Comparative study of novel spectrophotometric methods manipulating ratio spectra: An application on pharmaceutical ternary mixture of omeprazole, tinidazole and clarithromycin," *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 96, pp. 259-270, 2012.
- [٣٥] H. M. Lotfy, M.A. Hegazy, M. R. Rezk, and Y. R. Omran, "Novel spectrophotometric methods for simultaneous determination of timolol and dorzolamide in their binary mixture," *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 126, pp. 197-207, 2014.
- [٣٦] H. M. Lotfy and M. A. M. Hegazy, "Simultaneous determination of some cholesterol-lowering drugs in their binary mixture by novel spectrophotometric methods," *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 113, pp. 107-114.٢٠١٣ .
- [٣٧] H. M. Lotfy, S. S. Saleh, N. Y. Hassan, and S. M. Elgizawy, "A Comparative Study of the Novel Ratio Difference Method versus Conventional Spectrophotometric Techniques for the Analysis of Binary Mixture with Overlapped Spectra," 2012.
- [٣٨] H.M. Mohamed, "A study of selective spectrophotometric methods for simultaneous determination of Itopride hydrochloride and Rabeprazole sodium

- binary mixture: Resolving sever overlapping spectra," *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 136, pp. 1308-1315, 2015.
- [۳۹] A. M. Mohsen, H. M. Lotfy, A. M. Badawey, H. Salem, and S. Z. Elkhateeb, "Application of three novel spectrophotometric methods manipulating ratio spectra for resolving a pharmaceutical mixture of chlorphenoxamine hydrochloride and caffeine," *Int J Pharm Pharm Sci*, vol. 5, pp. 478-87, 2013.
- [۴۰] P. Campíns-Falcó, F. Bosch-Reig, and J. Verdú-Andrés, "Evaluation and elimination of the "blank bias error" using the H-point standard addition method: Application to spectrophotometric determinations using absorbent blank," *Analytica chimica acta*, vol. 270, pp. 253-265, 1992.
- [۴۱] A. Afkhami and M. Bahram, "Mean centering of ratio kinetic profiles as a novel spectrophotometric method for the simultaneous kinetic analysis of binary mixtures," *Analytica chimica acta*, vol. 526, pp. 211-218, 2004.
- [۴۲] A. Afkhami and M. Bahram, "Mean centering of ratio spectra as a new spectrophotometric method for the analysis of binary and ternary mixtures," *Talanta*, vol. 66, pp. 712-72, 2005.
- [۴۳] A. Afkhami, T. Madrakian, and M. Bahram, "Simultaneous spectrophotometric determination of iodate and bromate in water samples by the method of mean centering of ratio kinetic profiles," *Journal of hazardous materials*, vol. 123, pp. 250-255, ۲۰۰۵.
- [۴۴] M. Bahram, "Mean centering of ratio spectra as a new method for determination of rate constants of consecutive reactions," *Analytica chimica acta*, vol. 603, pp. 13-19, 2007.
- [۴۵] M. Bahram, T. Madrakian, E. Bozorgzadeh, and A. Afkhami, "Micelle-mediated extraction for simultaneous spectrophotometric determination of aluminum and beryllium using mean centering of ratio spectra," *Talanta*, vol. 72, pp. 408-414, 2007.
- [۴۶] H. M. Lotfy, S. S. Saleh, N. Y. Hassan, and S. M. Elgizawy, "Univariate versus multivariate spectrophotometric methods for simultaneous determination of complex binary mixtures with overlapped spectra:a comparative study," *Analytical Chemistry Letters*, vol. 3, pp. 70-84, 2013.
- [۴۷] ک. ن. س., "اندازه گیری همزمان مس (II) و نیکل (II) به روش اسپکتروفتومتری با استفاده از کالیبراسیون چند متغیره PLS و اندازه گیری مقادیر کم مس (II) به روش اسپکترومتری جذب اتمی," پایان نامه ارشد, دانشکده شیمی, دانشگاه صنعتی شاهرود, ۱۳۸۶.
- [۴۸] M. G. El-Bardicy, H. M. Lotfy, M. A. El-Sayed, and M. F. El-Tarras, "Smart stability-indicating spectrophotometric methods for determination of binary mixtures without prior separation," *Journal of AOAC International*, vol. 91, pp. 299-310, 2008.
- [۴۹] j. Lurie, "Handbook of analytical chemistry. moscow", English translation, MIR Publishers Moscow, 1975.
- [۵۰] ج. د. رابینسون, "اسپکتروسکوپی جذب اتمی", پور رضا, ن, چاپ اول, دانشگاه شهید چمران اهواز. ص ۱۰-۹, ۱۳۷۱.

Abstract 1

In this thesis, two novel, simple, and accurate spectrophotometric methods are presented for the simultaneous determination of methyl violet and toluidine blue dyes. The spectrophotometric methods used including the extended ratio subtraction method (EXRMS) and the simultaneous ratio subtraction method (SRSM) were compared with mean centering of ratio spectral method (MCM). All the factors affecting the sensitivity of the methods were examined and optimized. The linear ranges for methyl violet and toluidine blue in the proposed spectrophotometric methods (SRSM and ERMS) were 1.00-10.00 and 1.00-15.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively, and for MCM, they were, respectively, 1.00-10.00 and 3.00-15.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$. For the EXRMS, SRSM, and MCM spectrophotometric methods, the limits of detection for methyl violet were found to be 0.010, 0.024, and 0.056 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively, and for toluidine blue, they were 0.032, 0.030, and 0.0281 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. The effect of interference of different materials on the selectivity of the methods was also examined. The proposed methods were also applied to the simultaneous determination of methyl violet and toluidine blue in the water samples taken from the city of Shahrood (Iran) with satisfactory results. The results obtained indicated that the proposed methods had good accuracies and precisions for the simultaneous determination of these dyes in the real samples.

Abstract 2

In this thesis, two novel, simple, and accurate spectrophotometric methods are presented for the simultaneous determination of the venlafaxine and citalopram drugs. The spectrophotometric methods used including the extended ratio subtraction method (EXRMS) and the simultaneous ratio subtraction method (SRSM) were compared with mean centering of ratio spectral method (MCM). All the factors affecting the sensitivity of the methods were examined and optimized. The linear ranges for venlafaxine and citalopram in the proposed spectrophotometric methods (SRSM and ERMS) were 1.60-20.00 and 1.00-16.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively, and for MCM, they were 2.00-20.00 and 3.00-16.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. For the EXRMS, SRSM, and MCM spectrophotometric methods, the limits of detection for venlafaxine were found to be 0.171, 0.1399, and 0.437 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively, and for citalopram, they were 0.0101, 0.0101, and 0.04028 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. The effect of the interference of different materials on the selectivity of the methods was also examined. The proposed methods used for the simultaneous determination of venlafaxine and citalopram were also applied to their tablet samples with satisfactory accuracy and correctness.

Keywords: Methyl violet, Toluidine blue, Venlafaxine, Citalopram, Extended ratio subtraction method, Simultaneous ratio subtraction method.



Shahrood University of Technology

**Simultaneous determination of Venlafaxine and
Citalopram drugs and that of Methyl violet and Toluidine
blue dyes in their binary mixtures by novel
spectrophotometric methods**

Zahra Zahednia

Supervisors:

Dr. Ghadam Ali Bagherian Dehaghi

Adviser:

Dr. Nasser Goudarzi

February 2016