کاربرد روش‌های اسپکتروفتومتری جدید درتعیین همزمان آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید در مخلوط‌های دوتایی

قدمعلی باقریان*، راضیه رهداری، منصور عرب چم جنگلی و مطهره سادات اشرفی

دانشکده شیمی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود

(تاریخ دریافت: 1399/5/21 تاریخ پذیرش: 1400/9/24)

این مقاله مربوط به کاربرد روش‌های اسپکتروفتومتری جدید و مقرون به صرفه همچون روش توسعه یافته تفاضل نسبی (EXRSM) و روش اختلاف نسبی (RD) برای تعیین همزمان آسکوربیک اسید (ویتامین C) و استیل‌سالیسیلیک اسید (آسپرین) در مخلوطهای دوتایی، بدون استفاده از روشهای فیزیکی جداسازی می‌باشد. فاکتورهای موثر بر حساسیت روش‌ها مورد بررسی و بهینه‌سازی قرار گرفتند. تحت شرایط بهینه، دامنه خطی آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید در هر دو روش، به‌ترتیب 2/00-30/00 و 10/00-30/00 میلی‌گرم بر لیتر به دست آمد. حد تشخیص در روش‌های EXRSM وRD برای آسکوربیک اسید به‌ترتیب 0/435 و 0/115 میلی‌گرم بر لیتر و برای استیل‌سالیسیلیک اسید به‌ترتیب 1/44، 0/363 میلی‌گرم بر لیتر به‌دست آمد. روش EXRSM برای اندازه‌گیری همزمان آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید در نمونه آب شهر و نمونه قرص سنتزی و روش RD در نمونه قرص سنتزی با دقت و صحت رضایت‌بخشی به‌کار برده شدند.

کلید واژه: آسکوربیک اسید، استیل‌سالیسیلیک اسید، روش توسعه یافته تفاضل نسبی (EXRSM)، روش اختلاف نسبی (RD)

مقدمه

آسکوربیک اسید (AA) که به نام ویتامین C شناخته می‌شود، مقاومت ارگانیسمی بدن را در برابر میکروارگانیسم ها با تشکیل پادتن افزایش می‌دهد [1و2]. استیل‌سالیسیلیک اسید (ASA) که با نام آسپرین شناخته می‌شود، برای بهبود سردرد و تب استفاده می‌شود [3]. امروزه شرکت‌های داروسازی مختلف، ترکیبی از آسکوربیک اسید و استیل-سالیسیلیک اسید در فرمولاسیون دارویی خود به کار می‌گیرند تا از یک طرف برای تسکین درد، تب از جمله تب همراه با سرماخوردگی، آنفلوآنزا مناسب باشد و از طرف دیگر باعث افزایش مقاومت بدن در برابر عفونت‌ها، استرس و مسمومیت‌ها شود [1]. ولی باید توجه داشت که مصرف بیش از حد این ترکیبات باعث سرگیجه، تعریق، تهوع، اسهال و سایر اختلالات دستگاه گوارش می‌شود [6-4]. به منظور کنترل دوز این داروها، یک روش حساس و دقیق برای آنالیز همزمان این ترکیبات لازم است.

بررسی مقالات نشان می‌دهد که تکنیک‌های تجزیه‌ای مختلفی [7-4]، برای تعیین همزمان این ترکیبات استفاده شده‌اند. در مقایسه با سایر روشهای تجزیه‌ای، روشهای اسپکتروفتومتری ترجیح داده می‌شوند. زیرا روشهای ذکر شده دارای مزایای مهمی از جمله دقت بالا، سرعت بالا، قیمت پایین، کارکرد ساده، می باشند [8 و9]. با این حال، همپوشانی شدید طیف های گونه‌های مورد مطالعه، کاربرد روشهای متداول اسپکتروفتومتری را محدود می‌کنند. برای برطرف کردن این مشکل، در سالهای اخیر روش های جدید اسپکتروفتومتری متعددی مانند روش توسعه یافته تفاضل نسبی (EXRSM) و روش اختلاف نسبی (RD) توسط محققان ارائه شده است [10و11]. در تحقیق حاضر، تلاش شده است که کارایی روشهای ذکر شده را در تعیین همزمان آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید در مخلوط دوتایی مورد بررسی قرار گیرد.

ایمیل نویسنده مسئول: bagherian48@yahoo.com

تئوری

روش اختلاف نسبی (RD)

اگر مخلوطی شامل دوگونه X و Y باشد که طیف جذبی این دوگونه دارای همپوشانی باشند، برای تعیین غلظت گونه X با این روش به این صورت عمل می‌شود که ابتدا طیف هر مخلوط بر غلظت مناسبی از Y (Y') به عنوان مقسوم‌علیه تقسیم می‌شود (معادله 1). در این رابطه، C_Xو ε_X به ترتیب بیانگر غلظت و ضریب جذب مولی گونه X و C_Y و ε_Y به ترتیب، غلظت و ضریب جذب مولی گونه Y و b طول سل دستگاه اسپکتروفتومتر می‌باشد که مقدار آن 1 سانتی متر در نظر گرفته می‌شود.

$$\frac{b\varepsilon_X c_X + b\varepsilon_Y c_Y}{b\varepsilon_Y c'_Y} = \frac{b\varepsilon_X c_X}{b\varepsilon_Y c'_Y} + \frac{b\varepsilon_Y c_Y}{b\varepsilon_Y c'_Y} = \frac{\varepsilon_X c_X}{\varepsilon_Y c'_Y} + \frac{c_Y}{c'_Y} = \frac{\varepsilon_X c_X}{\varepsilon_Y c'_Y} + cons\tan t \quad (1)$$

همانطور که در معادله (1) مشاهده می شود، پس از تقسیم طیف مخلوط بر طیف مقسوم‌علیه (Y')، طیف حاصل دارای مقدار ثابتی متناسب با غلظت Y ($\frac{c_Y}{c'_Y} = cons\tan t$) در مخلوط می‌باشد. برای حذف این مقدار ثابت که ناشی از اثر مزاحمت گونه Y است، در طیف های نسبی حاصل شده، بزرگی جذب نسبی P_1 و P_2 به ترتیب در طول‌موج های λ_1 و λ_2 (طول موج هایی که میزان جذب گونه مزاحم (Y) در این دو طول‌موج یکسان باشد ولی میزان جذب ترکیب مورد نظر (X) متفاوت باشد) اندازه گیری و اختلاف آنها (ΔP_{Mix}) محاسبه می‌گردد (معادله 2):

$$\Delta P_{Mix} = P_1 - P_2 = \left\{\left(\frac{\varepsilon_X c_X}{\varepsilon_Y c'_Y}\right)_1 + cons\tan t\right\} - \left\{\left(\frac{\varepsilon_X c_X}{\varepsilon_Y c'_Y}\right)_2 + cons\tan t\right\} = \left(\frac{\varepsilon_X c_X}{\varepsilon_Y c'_Y}\right)_1 - \left(\frac{\varepsilon_X c_X}{\varepsilon_Y c'_Y}\right)_2 \quad (2)$$

با قرار دادن ΔP_{Mix} حاصل از هر مخلوط در معادله کالیبراسیون مربوطه، غلظت گونه X به‌دست می‌آید. برای به دست آوردن معادله کالیبراسیون گونه X با روش RD به این صورت عمل می‌شود که طیف محلول‌های استاندارد خالص گونه X با غلظت‌های متفاوت بر طیف

غلظتی از گونه Y که به عنوان مقسوم علیه انتخاب شده بود ('Y)، تقسیم می‌گردد. در طیف‌های نسبی به دست آمده، بزرگی دامنه ها یا جذب نسبی P_1و P_2 به ترتیب در طول‌موج‌های انتخاب شده λ_1 و λ_2 اندازه‌گیری می‌شود. از ترسیم اختلاف دامنه‌ها (ΔP) برحسب غلظت متناظرگونه X، معادله کالیبراسیون مورد نظر به دست می‌آید. (معادله 3)

$$\Delta p = P_1 - P_2 = slope\ c_X + \text{int}\ ercept \qquad (3)$$

برای به دست آوردن غلظت گونه Y تمامی مراحل همانند مراحل تعیین غلظت گونه X است. با این تفاوت که این بار طیف مخلوط‌های X و Y بر غلظت مناسبی از گونه X به عنوان مقسوم‌علیه تقسیم می‌گردند و طول-موج‌های مناسبی که میزان جذب گونه (Y) در این طول‌موج ها متفاوت ولی میزان جذب گونهX یکسان باشد، باید انتخاب گردد. [11و12].

روش توسعه یافته تفاضل نسبی (EXRSM)

برای مخلوطی حاوی دو گونه Y+X که همپوشانی طیفی دارند و با این فرض که طیف مرتبه صفر Y نسبت به طیف مرتبه صفر X گسترده‌تر است (یعنی در طول موج‌های بلندتری جذب آن صفر می‌شود)، می‌توان با استفاده از روش EXRSM، غلظت هر دو گونه را به دست آورد. برای تعیین غلظت گونه X ، طیف مخلوط حاوی Y و X بر طیف غلظت مناسبی از گونه Y به عنوان مقسوم‌علیه ('Y) تقسیم می‌گردد (معادله 1). همانگونه که در این رابطه مشاهده می‌شود، طیف نسبی حاصل دارای مقدار ثابتی است که بیانگر $\frac{c_Y}{c'_Y}$ است و به صورت خط مستقیم به موازات محور طول موج قرار دارد (مقدار ثابت در همان ناحیه‌ای از طول موج دیده می‌شود که طیف گونه Y نسبت به X گسترده‌تر است). این مقدار ثابت از طیف نسبی مخلوط کم می‌شود (رابطه 4) و سپس طیف نسبی به دست آمده در طیف 'Y (مقسوم علیه) ضرب می‌گردد، تا طیف مرتبه صفر گونه X در مخلوط حاوی X+Y حاصل گردد (رابطه 5). با اندازه‌گیری جذب در طول موج ماکزیمم جذب گونه X از روی طیف مرتبه صفر به دست آمده و قرار دادن جذب آن در معادله رگرسیون حاصل از منحنی کالیبراسیون X، غلظت گونه X تعیین می‌شود.

$$\frac{\varepsilon_X c_X}{\varepsilon_Y c'_Y} + cons\tan t - cons\tan t = \frac{\varepsilon_X c_X}{\varepsilon_Y c'_Y} \qquad (4)$$

$$\frac{\varepsilon_X c_X}{\varepsilon_Y c'_Y} \times b\varepsilon_Y c_Y = b\varepsilon_X c_X \qquad (5)$$

برای تعیین غلظت گونه Y، طیف مخلوط حاوی X و Y بر طیف گونه X با غلظت مناسب که به عنوان مقسوم علیه انتخاب شده ('x)، تقسیم می‌شود (معادله 6):

$$\frac{b\varepsilon_X c_X}{b\varepsilon_X c'_X} + \frac{b\varepsilon_Y c_Y}{b\varepsilon_X c'_X} = \frac{c_X}{c'_X} + \frac{\varepsilon_Y c_Y}{\varepsilon_X c'_X} = cons\tan t + \frac{\varepsilon_Y c_Y}{\varepsilon_X c'_X} \qquad (6)$$

همچنین طیف مرتبه صفر به دست آمده برای گونه X با روش EXRSM (رابطه 5) بر طیف گونه X که به عنوان مقسوم علیه انتخاب شده بود، تقسیم می‌گردد تا مقدار ثابت X (عبارت $\frac{c_X}{c'_X} = cons\tan t = \frac{\varepsilon_X c_X}{\varepsilon_X c'_X}$) در هر مخلوط به دست آید. حال مقدار ثابت به دست آمده برای هر مخلوط از طیف نسبی مخلوط مربوط (معادله (6)) کسر می‌شود تا رابطه (7) به دست آید.

$$\frac{\varepsilon_Y c_Y}{\varepsilon_X c'_X} + cons\tan t - cons\tan t = \frac{\varepsilon_Y c_Y}{\varepsilon_X c'_X} \qquad (7)$$

اکنون از ضرب طیف نسبی به دست آمده در طیف مقسوم علیه ('X)، طیف مرتبه صفر گونه Y به دست می‌آید (رابطه 8).

$$\frac{\varepsilon_Y c_Y}{\varepsilon_X c'_X} \times b\varepsilon_X c_X = b\varepsilon_Y c_Y \qquad (8)$$

حال با استفاده از منحنی رگرسیون (ترسیم مقادیر جذب گونه Y در λ_{max} برحسب غلظت متناظر آن)، غلظت Y محاسبه می‌شود [10و11].

بخش تجربی

مواد شیمیایی و محلول‌های مورد استفاده

مواد شیمیایی شامل اسکوربیک اسید، استیل سالیسیلیک اسید، سیتریک اسید مونوهیدرات، پتاسیم دی هیدروژن فسفات، دی سدیم هیدروژن فسفات، پتاسیم هیدروژن فتالات، فسفریک اسید، سدیم هیدروکسید و هیدروکلریک اسید از شرکت مرک تهیه شد.محلول استوک استیل‌سالیسیلیک اسید با غلظت $500/0\ mg\ l^{-1}$ از انحلال 0/0500 گرم از استیل‌سالیسیلیک اسید خالص در10/00 میلی‌لیتر از HCl یک مولار و رقیق سازی آن با آب مقطر در حجم 100/0 میلی‌لیتر تهیه گردید. محلول استوک $500/0\ mg\ l^{-1}$ آسکوربیک‌اسید هم از انحلال 0/0500 گرم آسکوربیک اسید خالص در آب مقطر در بالن حجمی 100/0 میلی‌لیتری تهیه گردید. محلول‌های استاندارد، با رقیق‌سازی روزانه از محلول های استوک در غلظت‌های متفاوت ساخته شدند. برای تهیه محلول‌های بافر فسفاتی با محدوده pH = 5/0-9/0 حجم‌های معین از محلول‌های دی‌سدیم-هیدروژن‌فسفات و پتاسیم‌دی‌هیدروژن‌فسفات استفاده شد و سپس pH آن‌ها با pH متر تنظیم گردید [13]. برای تهیه محلول بافر فسفاتی با pH = 2/0-4/0 از محلول‌های فسفریک‌اسید و پتاسیم دی‌هیدروژن‌فسفات استفاده شد. برای تهیه بافر سیتراتی با pH =2/5، 0/4101 گرم از سیتریک اسید منوهیدارت به همراه 20/00 میلی‌لیتر سود 0/10 مولار به یک بالن حجمی 100/0 میلی‌لیتری منتقل و با آب مقطر تا خط نشانه به حجم رسانده شد. سپس 40/0 میلی‌لیتر از این محلول با 60/0 میلی‌لیتر از هیدروکلریک‌اسید 0/10 مولار مخلوط و pH محلول به کمک pH متر تا pH =2/5 تنظیم شد [14].

دستگاه‌ها و وسایل مورد استفاده

برای ثبت طیف‌های جذبی و اندازه گیری جذب گونه‌های مورد نظر در ناحیه مرئی-فرابنفش، دستگاه اسپکتروفتومتر دو پرتوی ریلی مدل

Uv-2601 مجهز به یک جفت سل کوارتز یک سانتی‌متری، برای اندازه گیری pH از یک دستگاه pH-متر متراهم مدل 744 مجهز به یک الکترود غشا شیشه کالومل و جهت توزین مواد از ترازوی سارتریوس مدل *A200S* با دقت 0/1 میلی‌گرم استفاده شد.

منحنی های کالیبراسیون منفرد

برای استخراج منحنی کالیبراسیون منفرد برای هر کدام از ترکیبات، به یک سری بالن حجمی 10/0 میلی‌لیتری، 2/00 میلی‌لیتر بافر سیتراتی با pH = 2/5، 20/0 تا 300/0 میکروگرم آسکوربیک اسید (AA) یا 100/0 تا 1000/0 میکروگرم استیل‌سالیسیلیک اسید (ASA) اضافه و به حجم رسانده شد. سپس مقداری از آن به سل دستگاه منتقل و جذب هر محلول در طول‌موج ماکزیمم هر گونه (243 و 275 نانومتر به ترتیب برای آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید) نسبت به شاهد اندازه گیری و ثبت گردید. با ترسیم جذب در مقابل غلظت‌های مربوطه در λ_{max} = 243 نانومتر برای AA و λ_{max} = 275 نانومتر برای ASA، منحنی‌های کالیبراسیون بدست آمد. معادلات رگرسیون مربوطه از روش رگرسیون حداقل مربعات، استخراج شد (معادلات 9 و 10):

$$A = 0/052C_{AA} - 0/007 \quad R^2 = 0/9998 \qquad (9)$$

$$A = 0/0065\ C_{ASA} - 0/008 \quad R^2 = 0/9997 \qquad (10)$$

که A سیگنال تجزیه‌ای مربوط به هر گونه در طول‌موج ماکزیمم آن گونه، C_{AA} و C_{ASA} به ترتیب غلظت آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید بر حسب میلی‌گرم برلیتر است.

منحنی کالیبراسیون برای روش اختلاف نسبی (RD)

برای به‌دست آوردن معادله کالیبراسیون استیل‌سالیسیلیک اسید در روش RD، طیف‌های محلول‌های استاندارد خالص استیل‌سالیسیلیک اسید (طیفهایی که در بخش (3-3) به دست آمده بود) بر طیف خالص محلول 20/00 میلی‌گرم برلیتر آسکوربیک اسید (گونه مزاحم) به عنوان مقسوم‌علیه تقسیم گردید و بزرگی جذب نسبی در طول‌موج های 255 و 225 نانومتر اندازه‌گیری شد. از رسم اختلاف بزرگی دو دامنه در طول‌موج‌های ذکر شده($\Delta P = P_{225} - P_{255}$) بر حسب غلظت متناظر استیل‌سالیسیلیک اسید، نمودار کالیبراسیون برای تعیین غلظت استیل‌سالیسیلیک اسید در روش RD به دست آمد. معادله خط رگرسیون به صورت زیر می باشد.

$$\Delta P = 0/0666\ C_{ASA} + 0/0186,\ R^2 = 1/00 \qquad (11)$$

برای به‌دست آوردن معادله کالیبراسیون آسکوربیک اسید در روش RD، طیف‌های محلول‌های استاندارد خالص آسکوربیک اسید بر طیف محلول استیل‌سالیسیلیک اسید (20/00میلی‌گرم بر لیتر) تقسیم گردید. در مرحله بعد بزرگی جذب نسبی (P_1 و P_2) به ترتیب در طول‌موج 255 و 286/2 نانومتر اندازه گیری و از هم کسر گردید. از رسم اختلاف بزرگی دو دامنه در طول‌موج‌های 255 و286/2 نانومتر ($\Delta P = P_{258} - P_{286.2}$) بر حسب غلظت متناظر آسکوربیک اسید، نمودار خطی با معادله رگرسیون زیر به دست آمد.

$$\Delta P = 0/363\ C_{AA} - 0/1573,\ R^2 = 0/999 \qquad (12)$$

فرایند تهیه نمونه حقیقی

نمونه قرص حاوی آسپرین و ویتامین C با نام قرص Asprin plus C در شرکت دارویی بایر تولید می‌شود. در این بررسی قرص سنتزی بر اساس ترکیب درصد این دو دارو در نمونه قرص Asprin plus C ساخت شرکت داروئی بایر (400 میلی‌گرم استیل-سالیسیلیک اسید و 240 میلی‌گرم آسکوربیک اسید) تهیه گردید. برای تهیه محلول قرص آسپرین، چهار عدد قرص تجاری (100 میلی‌گرمی) با دقت وزن و کاملا پودر گردید. 1/4 پودر پس از انحلال در10/00 میلی لیتر HCl یک مولار و 50 میلی‌لیتر آب مقطر، صاف گردید و محلول زیر صافی به طور کمی به بالن حجمی 100/00 میلی لیتری انتقال داده شد و با آب مقطر به حجم رسانده شد.

برای تهیه محلول قرص آسکوربیک اسید، چهار عدد قرص ویتامین C (250 میلی‌گرم) با دقت وزن و کاملا پودر گردید. و 1/4 وزن قرص‌ها در50 میلی لیتر آب مقطر حل گردید. پس از انحلال کامل، محلول صاف گردید و محلول زیر صافی به‌طور کمی یک بالن حجمی 100/00 میلی‌لیتری انتقال داده شد و به حجم رسانده شد. برای تهیه محلول‌های مخلوط سنتزی دو دارو، 10/00 میلی‌لیتر از محلول قرص آسپرین و 2/00 میلی لیتر از محلول ویتامین C در یک بالن حجمی 100/00 میلی لیتری با آب مقطر به حجم رسانده شد و 1/00 میلی‌لیتر از این مخلوط ساخته شده به همراه 2/00 میلی لیتر بافر سیتراتی با pH = 2/5 به بالن حجمی 10/00 میلی‌لیتری انتقال داده و با آب مقطر به حجم رسانده و یکنواخت شد. سپس طیف آن نسبت به محلول شاهد در محدوده 320-200 نانومتر ثبت و ذخیره گردید. سپس غلظت آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید در مخلوطهای تهیه شده، با استفاده از روش افزایش استاندارد تعیین گردید.

بحث و نتیجه گیری

همپوشانی طیفی شدید (شکل (1))، مانع از تعیین صحیح آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید در مخلوط دو تایی آنها با روش اسپکتروفتومتری مستقیم می‌شود. برای رفع این مشکل، روش‌های نوین اسپکتروفتومتری همچون روش EXRSM و RD به کار گرفته شد.

بررسی و بهینه‌سازی پارامترهای موثر بر سیستم

به منظور فراهم نمودن بهترین حساسیت و گزینش‌پذیری و در نتیجه بهترین حد تشخیص، متغیرهای موثر بر میزان جذب گونه‌ها، به روش بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان، بهینه شدند. متغیرهای مورد بررسی عبارتند از pH، نوع بافر، حجم بافر و قدرت یونی.

نتایج بهینه سازی pH نشان داد که اختلاف طول موج ماکزیمم جذب آسکوربیک اسید (243 نانومتر) و استیل‌سالیسیلیک اسید (275 نانومتر) در pH های 1/00 تا 3/00 ثابت و برابر 32 نانومتر است. در گستره pH برابر 4/0 تا 8/0 اختلاف طول موج ماکزیمم جذب دو گونه (با تغییر طول موج ماکزیمم جذب آسکوربیک اسید از 243 به 263 نانومتر) به 12

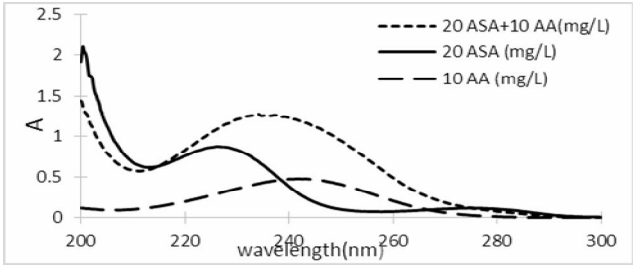
کاهش می‌یابد که بیانگر افزایش همپوشانی طیف‌ها در این ناحیه از pH است. به همین جهت pH = 2/5 به عنوان pH بهینه انتخاب گردید. بررسی‌ها نشان داد که نوع بافر تاثیر چندانی بر سیگنال جذب ندارند ولی به‌منظور کاهش مزاحمت‌های احتمالی و افزایش گزینش‌پذیری، بافر سیتراتی برای بررسی‌های بعدی انتخاب گردید. حجم بافر و قدرت یونی نیز اثری بر میزان جذب نداشتند.

کاربرد روش RD در تعیین آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید در مخلوطهای دوتایی

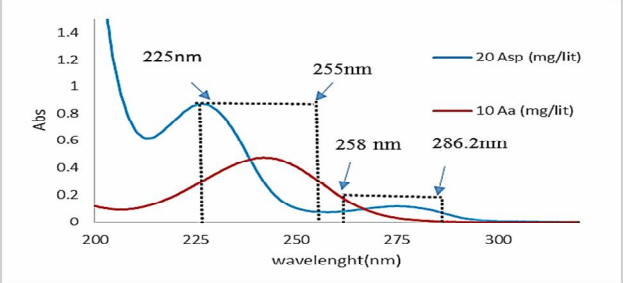
برای تعیین غلظت استیل‌سالیسیلیک اسید در هر مخلوط، طیف هر مخلوط بر طیف خالص آسکوربیک اسید با غلظت 20/00 میلی‌گرم بر لیتر به عنوان مقسوم‌علیه تقسیم شد و بزرگی دامنه جذب نسبی P_1 و P_2 به ترتیب در طول‌موج 255 و 225 نانومتر در هر مخلوط اندازه‌گیری شد. زیرا طبق شکل (2) در این طول موجها، جذب استیل‌سالیسیلیک اسید (گونه مورد نظر) متفاوت از هم می‌باشد ولی جذب آسکوربیک اسید (گونه مزاحم) در این دو طول موج با هم برابر است و در واقع شرط لازم برای روش RD برقرار است. با محاسبه اختلاف بزرگی دامنه‌ها ($\Delta P_{Mix} = P_2 - P_1$) در هر مخلوط و قرار دادن در معادله کالیبراسیون استیل سالیسیلیک اسید (رابطه 11)، غلظت استیل‌سالیسیلیک اسید در هر مخلوط به‌دست آمد.

برای تعیین غلظت آسکوربیک اسید در مخلوطهای دوتایی، طیف هر مخلوط بر طیف خالص استیل‌سالیسیلیک اسید با غلظت 20/00 میلی‌گرم بر لیتر (به عنوان مقسوم‌علیه) تقسیم شد. بزرگی جذب نسبی P_1 و P_2 به‌ترتیب در طول موج 258 و 286/2 نانومتر (جفت طول موجی که جذب آسکوربیک اسید، متفاوت از هم می‌باشد ولی جذب استیل‌سالیسیلیک اسید (گونه مزاحم) با هم برابر است شکل (2)) در هر مخلوط اندازه‌گیری شده و از هم کم گردید. با این کار مقدار ثابت ناشی از اثر مزاحمت استیل سالیسیلیک اسید حذف گردید.سپس اختلاف بزرگی دامنه‌ها (ΔP_{Mix}) در معادله کالیبراسیون آسکوربیک اسید حاصل از روش RD (رابطه 12) قرار داده شد و غلظت آسکوربیک اسید در هر مخلوط محاسبه گردید. شکل (3) طیف‌های نسبی حاصل از تقسیم طیف محلول های استاندارد آسکوربیک اسید بر طیف محلول 20/00 میلی‌گرم برلیتر استیل‌سالیسیلیک اسید به عنوان مقسوم‌علیه را نشان می دهد. از داده های حاصل از این شکل برای رسم منحنی کالیبراسیون آسکوربیک اسید در روش RD استفاده شد.

برای رسیدن به بهترین صحت در روش RD باید غلظت آسکوربیک



شکل 1. طیف مرتبه صفر آسکوربیک اسید (AA) و استیل سالیسیلیک اسید (ASA) در مخلوط تک جزئی و دو جزئی در pH =2/5.



شکل 2. طیف جذبی10/00میلی‌گرم بر لیتر آسکوربیک اسید(قرمز)، طیف جذبی 20/00 میلی‌گرم بر لیتر استیل‌سالیسیلیک اسید (آبی) در بافر سیتراتی با pH = 2/5.

اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید به عنوان مقسوم‌علیه، بهینه شود. به این منظور غلظت آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید به عنوان مقسوم علیه در محدوده 10/00، 20/00 و 30/00 میلی‌گرم بر لیتر تغییر داده شد و به ترتیب غلظت استیل سالیسیلیک اسید و آسکوربیک اسید در مخلوطهای مختلف (جدول 1) با استفاده از روش RD محاسبه گردید. حداقل شدن میانگین مربع خطا (MSE) (معادله 13) و میانگین خطای نسبی (MRE) (معادله 14) به عنوان معیار بهینه سازی در نظر گرفته شد:

$$MSE = \sum_{i=1}^{N} (C_i - \hat{C}_i)^2 / n \qquad (13)$$

$$MRE = \frac{\sum_{i=1}^{N} \left| \frac{C_i - \hat{C}_i}{C_i} \right|}{N} \times 100 \qquad (14)$$

در روابط فوق C_i غلظت واقعی گونه مورد نظر در مخلوط i ام، $\hat{C}_i$ غلظت پیش‌بینی شده گونه مورد نظر در مخلوط i ام بوسیله روش RD و N تعداد مخلوطهای مورد مطالعه است [15]. نتایج حاصل از بهینه‌سازی غلظت مقسوم‌علیه‌ها (جدول 2) بیانگر آن است که استفاده از غلظت 20/00 میلی‌گرم بر لیتر آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید بهترین نتایج (کمترین خطا) را در پیش بینی‌غلظت گونه‌ها دارد. بنابراین طیف غلظت 20/00 میلی‌گرم بر لیتر آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید به عنوان مقسوم‌علیه بهینه روش RD انتخاب و در مطالعات بعدی به کار گرفته شد.

کاربرد روش EXRSM در تعیین غلظت آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید

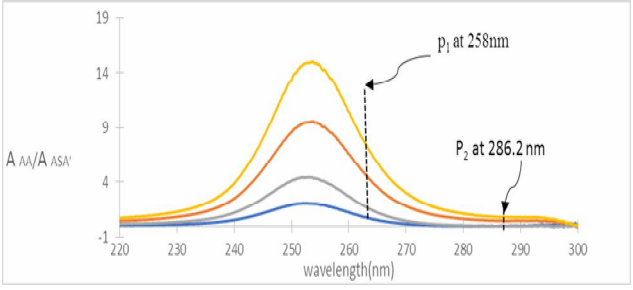
برای تعیین غلظت آسکوربیک اسید در مخلوطهای دوتایی (5/00، 10/00، 20/00، 30/00 میلی گرم بر لیتر آسکوربیک اسید و 10 میلی گرم بر لیتر استیل‌سالیسیلیک اسید)، طیف هر مخلوط بر طیف خالص20/00 میلی‌گرم بر لیتر از استیل‌سالیسیلیک اسید (گونه‌ای که جذب آن در طول‌موج‌های بالاتر صفر می‌شود) به عنوان مقسوم علیه تقسیم شد. طیف‌های نسبی حاصل در طول موج‌های بلندتر از 282 نانومتر دارای یک مقدار ثابت است (شکل 4). این مقدار ثابت از طیف‌های نسبی کسر

گردید و طیف های نسبی حاصل در طیف مقسوم‌علیه (20/0 میلی‌گرم بر لیتر استیل‌سالیسیلیک) ضرب گردید که در این حالت طیف‌های خالص آسکوربیک اسید موجود در هر مخلوط به‌دست آمد (شکل 5). با اندازه‌گیری مقادیر جذب در طول‌موج ماکزیمم طیف‌های خالص به دست آمده و با استفاده از منحنی کالیبراسیون مربوطه (رابطه 9)، غلظت آسکوربیک اسید در هر مخلوط به‌دست آمد.

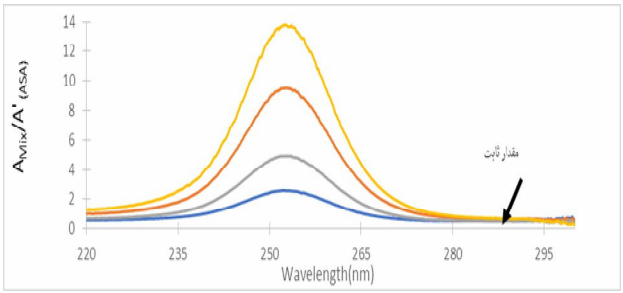
برای به‌دست آوردن غلظت استیل‌سالیسیلیک اسید در مخلوط‌های مورد مطالعه، طیف‌های هر مخلوط بر طیف مقسوم‌علیه (20/00 میلی‌گرم بر لیتر آسکوربیک اسید)، تقسیم گردید. این طیفها در دامنه 245-260 نانومتر دارای مقادیر ثابتی هستند (شکل (6)). برای حذف این مقادیر ثابت، طیف‌های خالص محلول‌های آسکوربیک اسید به‌دست آمده با این روش (طیف‌های شکل 5) به طیف مقسوم علیه (20/00 میلی‌گرم بر لیتر آسکوربیک اسید) تقسیم شد. مطابق شکل 7، طیف‌های نسبی هر مخلوط در دامنه 245-260 نانومتر دارای مقادیر ثابتی متناسب با غلظت

جدول 1. ترکیب غلظتی محلول‌های سری ارزیابی

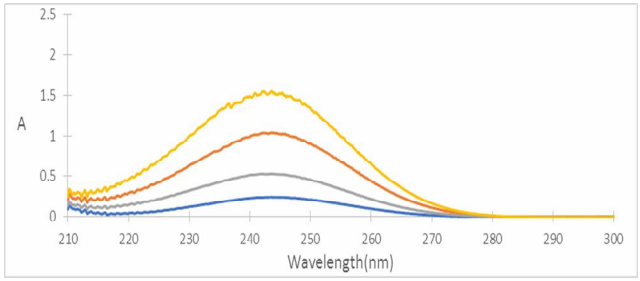
محلول	غلظت AA ($mg\ l^{-1}$)	غلظت ASA ($mg\ l^{-1}$)	محلول	غلظت AA ($mg\ l^{-1}$)	غلظت ASA ($mg\ l^{-1}$)
1	3/00	10/00	13	10/00	10/00
2	3/00	15/00	14	10/00	15/00
3	3/00	20/00	15	10/00	20/00
4	3/00	30/00	16	10/00	30/00
5	5/00	10/00	17	20/00	10/00
6	5/00	15/00	18	20/00	15/00
7	5/00	20/00	19	20/00	20/00
8	5/00	30/00	20	20/00	30/00
9	7/00	10/00	21	30/00	10/00
10	7/00	15/00	22	30/00	15/00
11	7/00	20/00	23	30/00	20/00
12	7/00	30/00	24	30/00	30/00



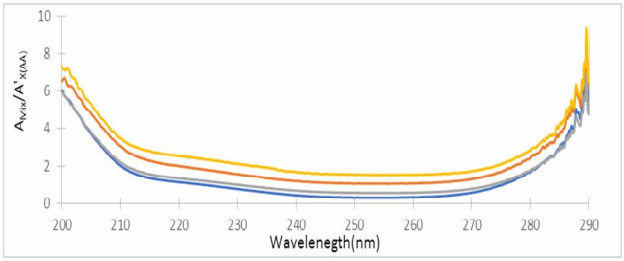
شکل 3. طیف‌های نسبی حاصل از تقسیم طیف محلول های 5/00، 10/00، 20/00، 30/00 میلی گرم برلیتر آسکوربیک اسید بر طیف محلول 20/00 میلی‌گرم برلیتر استیل‌سالیسیلیک اسید به عنوان مقسوم‌علیه.



شکل 4. طیف‌های نسبی حاصل از تقسیم طیف محلول های 5/00، 10/00، 20/00، 30/00 میلی گرم بر لیتر آسکوربیک اسید و 10/00 میلی‌گرم برلیتر استیل‌سالیسیلیک اسید بر طیف محلول 20/00 میلی‌گرم بر لیتر استیل سالیسیلیک اسید به عنوان مقسوم‌علیه.

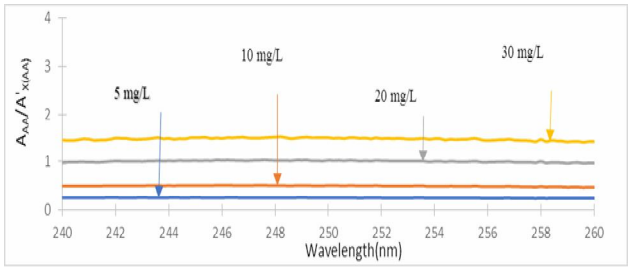


شکل 5. طیف‌های جذبی مرتبه صفر بدست آمده غلظت‌های 5/00، 10/00، 20/00، 30/00 میلی گرم برلیتر آسکوربیک اسید از مخلوط های شکل (4)، پس از تقسیم کردن بر طیف محلول 20/00 میلی‌گرم بر لیتر استیل‌سالیسیلیک اسید و کم کردن مقدار ثابت و ضرب کردن در طیف محلول 20/00 میلی‌گرم برلیتر استیل‌سالیسیلیک اسید.

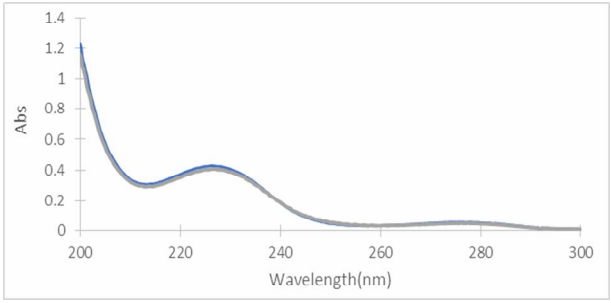


شکل 6. طیف‌های نسبی حاصل از تقسیم مخلوطهای حاوی 5/00، 10/00، 20/00، 30/00 میلی گرم برلیتر آسکوربیک اسید و 10/00 میلی‌گرم برلیتر استیل‌سالیسیلیک اسید بر طیف 20/00 میلی‌گرم برلیتر آسکوربیک اسید(به عنوان مقسوم علیه).

آسکوربیک اسید می‌باشد. سپس مقدار ثابت حاصل از هر طیف نسبی آسکوربیک اسید خالص (شکل 6) از طیف نسبی مخلوط متناظر آن کسر گردید. در مرحله بعد طیف‌های نسبی به دست آمده در طیف مقسوم‌علیه (20/00 میلی‌گرم بر لیتر آسکوربیک اسید) ضرب گردید تا طیف‌های



شکل 7. طیف‌های نسبی حاصل از تقسیم طیف‌های 5/00، 10/00، 20/00، 30/00 میلی‌گرم برلیتر آسکوربیک اسیدبدست آمده (شکل 5) بر طیف 20/00 میلی‌گرم برلیترآسکوربیک اسید (به عنوان مقسوم علیه).



شکل 8. طیف‌های جذبی مرتبه صفر استیل‌سالیسیلیک‌اسید (10/00 میلی‌گرم) به دست آمده با روش EXRSM.

خالص استیل‌سالیسیلیک اسید در هر مخلوط به‌دست آید (شکل 8). با استفاده از طیف‌های خالص مرتبه صفر به‌دست آمده و جای گذاری مقادیر جذب مربوط به طول موج ماکزیمم جذب استیل‌سالیسیلیک اسید در منحنی کالیبراسیون (رابطه 10)، غلظت این گونه در هر مخلوط به‌دست آمد.

به منظور رسیدن به بهترین صحت در روش EXRSM باید غلظت استیل‌سالیسیلیک اسید و آسکوربیک اسید به عنوان مقسوم علیه بهینه شود. برای این منظور در مرحله اول غلظت استیل‌سالیسیلیک اسید به عنوان مقسوم علیه در دامنه 10/00 تا 30/00 میلی‌گرم بر لیتر تغییر داده شد و روش EXRSM بر روی مخلوطهای مختلفی (24 مخلوط با غلظت ها و نسبت غلظت های مختلف) بررسی گردید و میانگین مربع خطا (MSE) و میانگین خطای نسبی (MRE) غلظت آسکوربیک اسید برای این مخلوطها محاسبه شد که طبق نتایج بدست آمده در جدول 2، مشاهده می‌شود که استفاده از غلظت 20/00 میلی‌گرم بر لیتر استیل‌سالیسیلیک اسید به عنوان مقسوم علیه در مرحله اول روش EXRSM، خطای کمتری را در نتایج گزارش شده از این روش نشان می‌دهد. بنابراین طیف مربوط به این غلظت، به عنوان مقسوم علیه بهینه انتخاب گردید.

در مرحله دوم غلظت آسکوربیک اسید به عنوان مقسوم علیه در دامنه 10/00 تا 30/00 میلی‌گرم بر لیتر تغییر داده شد و روش EXRSM بر روی همان مخلوطهای قبلی انجام شد و میانگین مربع خطا (MSE) و میانگین خطای نسبی (MRE) غلظت استیل‌سالیسیلیک اسید برای این مخلوطها محاسبه شد که طبق نتایج بدست آمده در جدول 3، مشاهده می‌شود که استفاده از غلظت 20/00 میلی‌گرم بر لیتر آسکوربیک اسید به عنوان مقسوم علیه در مرحله دوم روش EXRSM ، خطای کمتری را در

جدول 2. نتایج حاصل از بهینه سازی غلظت آسکوربیک اسید (AA) و استیل سالیسیلیک اسید (ASA) به عنوان مقسوم‌علیه به ترتیب در پیش بینی غلظت استیل‌سالیسیلیک اسید و آسکوربیک اسید به روش RD

غلظت AA به‌عنوان مقسوم علیه ($mg\ l^{-1}$)	خطا در پیش‌بینی غلظت ASA		غلظت ASA به‌عنوان مقسوم علیه ($mg\ l^{-1}$)	خطا در پیش‌بینی غلظت AA	
	MSE	MRE		MSE	MRE
10/0	1/32	4/27	10/0	0/450	5/70
20/0	0/083	1/28	20/0	0/132	2/93
30/0	1/17	3/53	30/0	0/370	3/83

جدول 3. نتایج حاصل از بهینه سازی غلظت استیل‌سالیسیلیک اسید و آسکوربیک اسید به عنوان مقسوم علیه به ترتیب در پیش‌بینی غلظت آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید در روش EXRSM

غلظت ASA به‌عنوان مقسوم علیه ($mg\ l^{-1}$)	خطا در پیش‌بینی غلظت AA		غلظت AA به‌عنوان مقسوم علیه ($mg\ l^{-1}$)	خطا در پیش‌بینی غلظت ASA	
	MSE	MRE		MSE	MRE
10/0	6/34	22/35	10/0	1/34	1/01
15/0	1/20	9/61	15/0	0/934	0/695
20/0	0/02	1/42	20/0	0/127	0/144
30/0	6/35	21/58	30/0	0/619	0/765

نتایج گزارش شده از این روش نشان می‌دهد. بنابراین طیف مربوط به این غلظت، به عنوان مقسوم علیه بهینه انتخاب گردید.

دقت، صحت و حد تشخیص روش‌های RD و EXRSM

جهت بررسی حد تشخیص روش‌ها، 10 اندازه‌گیری تکراری برای محلول شاهد انجام شد. از تقسیم سه برابر انحراف استاندارد سیگنال شاهد بر شیب منحنی کالیبراسیون (مربوط به هر روش) [16]، حد تشخیص مربوط به گونه‌ها به دست آمد (جدول 4).

برای بررسی دقت و صحت روش‌ها، مخلوط‌هایی از آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید با نسبت غلظتی متفاوت (جدول 4) 5 بار با روش‌های پیشنهاد شده، آنالیز شدند. مقادیر بازیابی ها و انحراف استانداردها، بیانگر صحت و دقت روش‌ها می‌باشد.

کاربرد روش‌های RD و EXRSM در آنالیز نمونه قرص سنتزی و نمونه آب شهر شاهرود

روش‌های اسپکتروسکوپی پیشنهادی برای تعیین آسکوربیک اسید و روشهای پیشنهادی برای تعیین این آنالیت‌ها در فرمولاسیون ترکیبی را تأیید می کند.

سنتزی به کار گرفته شد. درصدهای بازیابی (جدول 5)، مناسب بودن استیل سالیسیلیک اسید به روش افزایش استاندارد در فرمولاسیون قرص همچنین کارایی روش‌های پیشنهادی در آنالیز مخلوط‌های شامل آنالیت‌های مورد مطالعه در نمونه‌های آب شهر شاهرود، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج 5 اندازه‌گیری تکرار (جدول 6) مؤید این است که می‌توان غلظت آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید را به طور همزمان به روش EXRSM در نمونه‌های آب شهر با دقت و صحت خوبی تعیین کرد.

با پنج بار تکرار روش استاندارد تیتراسیون یدومتری [17]، در هر قرص ویتامین C 6/0 ± 244/5 میلی گرم آسکوربیک اسید بدست آمد. همچنین پنج بار تکرار روش تیتراسیون اسیدباز [18]، 0/8 ± 99/1 میلی گرم استیل سالیسیلیک اسید به ازای هرقرص آسپیرین بدست آمد.

نتیجه گیری

در تحقیق حاضر دو روش اسپکتروفتومتری جدید برای آنالیز همزمان آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید در مخلوطهای دوتایی به کار گرفته شد. در مقایسه با دیگر روشهای تجزیه‌ای، در این روشها بدون نیاز به برنامه‌های کامپیوتری پیچیده و دستگاههای قیمت، تنها با

جدول 4. پارامترهای تجزیه ای و نتایج ارزیابی تعیین آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید با روشهای پیشنهادی

پارامتر	EXRSM		RD	
	AA	ASA	AA	ASA
دامنه خط ($mg\ l^{-1}$)	30-2	30-10	30-2	30-10
حد تشخیص	0/115	0/36	0/43	1/44
صحت و دقت*	EXRSM		RD	
غلظت اضافه شده AA ($mg\ l^{-1}$)	غلظت اضافه شده ASA ($mg\ l^{-1}$)	غلظت اندازه گیری شده AA ($mg\ l^{-1}$)	غلظت اندازه گیری شده ASA ($mg\ l^{-1}$)	غلظت اندازه گیری شده AA ($mg\ l^{-1}$)	غلظت اندازه گیری شده ASA ($mg\ l^{-1}$)
10/00	15/00	9/95 ± (0/1)*	14/91 ± (0/2)	10/10 ± (0/2)	14/70 ± (0/4)
5/00	15/00	4/84 ± (0/3)	15/40 ± (0/6)	4/63 ± (0/3)	14/88 ± (0/5)
20/00	25/00	19/79 ± (0/4)	25/04 ± (0/1)	19/89 ± (0/2)	25/12 ± (0/4)
30/00	30/00	29/81 ± (0/4)	30/03 ± (0/2)	29/76 ± (0/6)	30/20 ± (0/2)

*اعداد داخل پرانتز انحراف استاندارد حاصل از 5 بار اندازه گیری تکراری است.

جدول 5. نتایج اندازه گیری آسکوربیک اسید (AA) و استیل سالیسیلیک اسید (ASA) در نمونه قرص سنتزی به روش های RD و EXRSM

مقدار اضافه شده ($mg\ l^{-1}$)		مقدار اندازه گیری شده ($mg\ l^{-1}$) به روش RD		درصد بازیابی روش RD		مقدار اندازه گیری شده ($mg\ l^{-1}$) به روش EXRSM		درصد بازیابی روش EXRSM	
AA	ASA	AA	ASA	AA	ASA	AA	ASA	AA	ASA
0/00	0/00	5/04 ± (0/1)*	9/96 ± (0/5)*	-	-	4/91 ± (0/3)*	10/10 ± (0/2)	-	-
5/00	0/00	9/88 ± (0/2)	10/33 ± (0/4)	96/8	-	9/83 ± (0/3)	10/30 ± (0/4)	98/4	-
10/00	0/00	14/96 ±(0/2)	10/22 ± (0/2)	99/2	-	14/90 ± (0/2)	10/10 ± (0/5)	99/9	-
0/00	5/00	5/01 ± (0/1)	15/22 ± (0/6)	-	105/2	5/01 ± (0/1)	15/20 ± (0/2)	-	102/0
0/00	10/00	5/05 ± (0/1)	20/56 ± (0/4)	-	106/0	5/00 ± (0/1)	20/26 ± (0/3)	-	101/6
15/00	0/00	20/32± (0/4)	9/93 ± (0/3)	101/9	-	20/12 ± (0/4)	19/66 ± (0/5)	101/4	-
0/00	15/00	4/95 ± (0/1)	24/83± (0/4)	-	99/1	5/04 ± (0/2)	24/84 ± (0/3)	-	98/3

*اعداد داخل پرانتز انحراف استاندارد حاصل از 5 بار اندازه گیری تکراری است.

جدول 6. نتایج اندازه گیری آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید در آب شهر شاهرود به روش EXRSM

شماره مخلوط	مقدار افزوده شده ($mg\ l^{-1}$)		مقدار اندازه گیری شده ($mg\ l^{-1}$)		درصد بازیابی ($mg\ l^{-1}$)	
	AA	ASA	AA	ASA	AA	ASA
1	0/00	0/00	کمتر از LOD روش	کمتر از LOD روش	-	-
2	6/00	15/00	6/43 ± (0/5)*	14/92 ± (0/3)*	107/1	99/4
3	6/00	20/00	5/79 ± (0/2)	20/09 ± (0/3)	96/5	100/4
4	20/00	10/00	20/19 ± (0/2)	9/28 ± (0/6)	100/9	92/8
5	3/00	13/00	3/07 ± (0/5)	13/02 ± (0/2)	102/3	100/1
6	3/00	10/00	2/94 ± (0/1)	9/77 ± (0/4)	98/0	97/7
7	15/00	15/00	14/87 ± (0/3)	15/02 ± (0/5)	99/1	100/1

*اعداد داخل پرانتز انحراف استاندارد حاصل از 5 بار اندازه گیری تکراری است.

استفاده از روابط ریاضی ساده می‌توان غلظت گونه‌ها را در مخلوطهای پیچیده به دست آورد. روش های اسپکتروفتومتری که در این کار ارائه شده اند، نیاز به حداقل آماده سازی نمونه دارند و از حلال‌هایی استفاده می‌کنند که برای محیط زیست خطرناک نیست. نتایج رضایت بخش به دست آمده در بررسی دامنه خطی، دقت و صحت روش، کاربردهای تجزیه ای روشهای پیشنهادی، دلالت بر این دارد که روش‌های پیشنهادی می‌توانند به عنوان روش‌های جایگزین روش‌های پیشرفته (مانند کروماتوگرافی و الکتروشیمی) برای آنالیز همزمان دو گونه مورد مطالعه، به کار گرفته شود.

دامنه خطی آسکوربیک اسید و استیل‌سالیسیلیک اسید در هر دو روش، به ترتیب 2/00-30/00 و 10/00-30/00 میلی‌گرم بر لیتر به دست آمد. حد تشخیص روش RD برای آسکوربیک اسید و استیل-سالیسیلیک اسید کمتر از حد تشخیص روش EXRSM برای هر دو گونه مذکور است. روشRD ساده تر از روش EXRSM است.

حد تشخیص‌های روش‌های پی‌شنهادی برای آسکوربیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید قابل مقایسه یا کمتر از روش‌های گزارش شده در مراجع [19و21] می‌باشند. همچنین دامنه خطی روش‌های پی‌شنهادی برای آسکوربیک اسید نسبت به روش‌های مرجع [21] بهتر می‌باشد. هر چند حد تشخیص‌های روش‌های پی‌شنهادی بیشتر از روش *UPLC-MS/MS* [20] می‌باشد اما روش‌های پی‌شنهادی در مقایسه با روش مذکور ساده تر و کم هزینه تر هستند.

سپاسگزاري

نویسندگان به خاطر حمایت های مالی این کار از شورای پژوهشی دانشگاه صنعتی شاهرود تشکر می کنند.

مراجع

1) M.M. Sena, J.C.B. Fernandes, R.J. Poppi, L.T. Kubota, Anal. Chim. Acta 409 (2000) 159.
2) S. Bungau, D.M. Tit, C. Iovan, L.U.C. Copolovici, R. Boscencu, G. Cioca, D. Copolovici, D. Rev Chim. Bucharest 68 (2017) 2495.
3) S.M. Wabaidur, Z.A. Alothman, M.R. Khan, Spectrochim. Acta A 108 (2013) 20.
4) A. Puangjan, S. Chaiyasith, S. Wichitpanya, S. Daengduang, S. Puttota, J. Electroanal. Chem. 782 (2016) 192.
5) D.E. Bayraktepe, Z. Yazan, Electro. Anal. (2020).
6) M.R. Khan, Z.A. Alothman, M. Naushad, A. Ghfar, S. Wabaidur, J. Liq. Chromatogr. R. T. 35 (2012) 2454.
7) C. Cofan, C. Radovan, Sens. J. 8 (2008) 3952.
8) M.H. Lotfy, D.A. Ahmed, M.K.A. Rahman, S.A.F. Weshahy, Heliyon. 5 (2019) e01669.
9) M. Bahram, T. Madrakian, E. Bozorgzadeh, A. Afkhami, Talanta 72 (2007) 408.
10) H.M. Lotfy, M.A.M. Hagazy, Spectrochim. Acta A 96 (2012) 259.
11) H.M. Lotfy, S.S. Saleh, Int. J. Pharm. Pharm. Sci. 8 (2016) 40.
12) M.M. Fouad, Indo Am. J. Pharm. Res. 5 (2015) 2470.
13) G.B. Golubitskii, E.V. Budko, E.M. Basova, A.V. Kostarnoi,V.M. Ivanov, J. Anal. Chem. 62 (2007) 742.
14) J. lurie, Handbook of Analytical Chemistry. Moscow, English Translation, MIR Publishers Moscow, 1975.
15) M. Ashrafi, M.A. Chamjangali, G. Bagherian, N. Goudarzi, Spectrochim. Acta A 171 (2017) 268.
16) G. Bagherian, M.A. Chamjangali, H.S. Evari, M. Ashrafi, J. Anal. Sci. Technol. 10 (2019) 3.
17) D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler, Fundamentals of analytical chemistry, Fifth ed., New York, Saunders

College Publishing, 1988.
18) G.D. Christian, P.K. Dasgupta, K.A. Schug, Analytical Chemistry, 7th ed., New Jersey, John Wiley, 2014.
19) N. Nasirizadeh, Z. Shekari, M. Tabatabaee, M. Ghaani, J. Brazil. Chem. Soc. 26 (2015) 713.
20) S.M. Wabaidur, Z.A. Alothman, M.R. Khan, Spectrochim. Acta A 108 (2013) 20.
21) E. Dinç, D. Baleanu, J. Brazil. Chem. Soc. 19 (2008) 434.