

KALİBRASYON

Ref. Enstrümantal Analiz

Tüm analitik metotlar kantitatif analiz amacıyla kullanıldıklarında kalibrasyona gereksinim vardır. Kalibrasyon, bir enstrüman çıkışında ölçülen analitik sinyalin analitin konsantrasyonu ile olan ilişkisinin doğru olarak saptanması amacıyla yapılan bir işlemdir. Sinyalin (veya responsun) kalibrasyonu yapılmadan bir örnek için alınan verilerle konsantrasyon bağıntısı elde edilemez.

Bir kalibrasyon metodunun özgünlüğü kesinlik, doğruluk, bias, hassasiyet, algılama sınırları, seçicilik ve uygulanabilir konsantrasyon aralığına bağlıdır. Bu kavramlar aşağıda kısaca açıklanmıştır.

Kesinlik (Precision)

Metodun tekrar üretilebilirliğinin (reproducibility) bir ölçüsüdür; aynı şekilde elde edilen sonuçlar birbirlerine ne kadar yakın değerlerdedir? Rastgele (random) hatalar standart sapmayla izlenebilir; genellikle % relatif sapma değeriyle ifade edilir.

Analytik Metotların Kesinlik (Precision) Tanımları

Terim	Tanım
Mutlak standart sapma, s	$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N-1}}$
Relatif standart sapma, RSD	$RSD = \frac{s}{\bar{x}}$
Ortalamanın standart hatası, s_m	$s_m = \frac{s}{\sqrt{N}}$
Değişme katsayısı, CV	$CV = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 (\%)$
Değişme (variance)	s^2

x_i = i'nci ölçmenin sayısal değeri

\bar{x} (veya, $x_{ort.}$) = N ölçmenin ortalaması

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^N x_i}{N}$$

Doğruluk (Accuracy)

Ölçülen değer gerçek değere ne kadar yakındır? Normal olarak % relatif hata (mutlak hata olabilir) ile tanımlanır; örneğin, %1 hata, ölçülen konsantrasyonun gerçek analit konsantrasyonunun %1 sınırı içinde doğrudur.

Bias

Bir ölçmenin sistematik hatasının göstergesidir; enstrümantal, personel ve metot hatalarından kaynaklanır. Mutlak hata olarak ifade edilir. μ , tüm değerlerin ortalaması; x_i , gerçek değeri gösterir.

$$\text{bias} = \mu - x_i$$

Hassasiyet (Sensitivity)

Hassasiyet iki faktöre bağlıdır; kalibrasyon eğrisinin eğimi (eğimin dikliğiyle artar) ve ölçümlerin birbirine yakınlığı.

$S = m C + S_{\text{şahit}}$ S = ölçülen sinyal, C = analitin konsantrasyonu, $S_{\text{şahit}}$ = şahitin sinyali, m = kalibrasyon eğrisinin eğimi, S_i = analitik sinyal.

Kalibrasyon hassasiyeti = m

$$\text{Analitik hassasiyet} = \gamma = \frac{m}{S_i}$$

Avantajları: Amplifikasyon faktörlerine karşı hassas değildir ve birimlerden bağımsızdır. Dezavantajları: Sinyalin standart sapması konsantrasyonla değişir.

Seçicilik (Selectivity)

Uygulanan metodun örnek matrisindeki diğer maddelerden etkilenmemesini belirten bir derecedir. S = analitik sinyal, $S_{\text{şahit}}$ = şahitin sinyalini gösterdiğinde,

$$S = m_A C_A + m_B C_B + m_C C_C + S_{\text{şahit}}$$

C_A, C_B, C_C = A, B ve C konsantrasyonları; m_A, m_B, m_C = A, B ve C maddelerinin kalibrasyon eğrisi eğimindeki değerleridir.

$$k_{B,A} = \frac{m_B}{m_A} \quad k_{C,A} = \frac{m_C}{m_A}$$

$k_{B,A}$ = B için seçicilik faktörü (A'ya göre)

$k_{C,A}$ = C için seçicilik faktörü (A'ya göre)

$$S = m_A (C_A + k_{B,A} C_B + k_{C,A} C_C) + S_{\text{şahit}}$$

Seçicilik faktörleri 0 ile $\gg 1$ arasındadır; girişimler gözlenen sinyali azaltırsa negatif olabilir.

Algılama (Detection) Sınırları

Bilinen bir güvenilirlik seviyesinde saptanabilen minimum ağırlıktaki (veya konsantrasyondaki) analit miktarıdır.

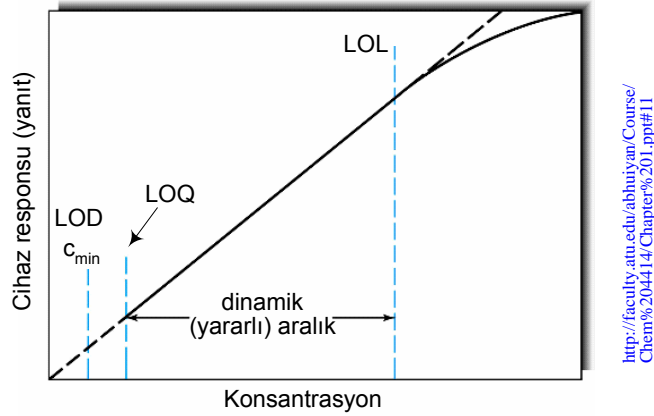
S_m = minimum ayırt edilebilen analitik sinyal,

$S_m = S_{\text{şahit}} + k s_{\text{şahit}} S_{\text{şahit}} = \text{şahit sinyali ortalaması, } k = \text{sabit } (\sim 3), s_{\text{şahit}} = \text{şahitin mutlak standart sapması.}$

$S_{\text{şahit}}$ ve $s_{\text{şahit}}$ değerlerinin bulunması için 20-30 ölçme gerekir.

$$\text{Algılama sınırı} = C_m = \frac{S_m - S_{\text{şahit}}}{m}$$

Uygulanabilir Konsantrasyon Aralığı



Bir kalibrasyon eğrisi grafiği; cihaz responsu-konsantrasyon değişimi

Teorik olarak absorbansın konsantrasyonla orantılı olması gerektiği halde çoğu zaman doğrusallıktan sapmalar olur. Bu nedenle kalibrasyon eğrilerine gereksinim vardır. Ayrıca, analizin yapıldığı zaman en az bir standardın absorbansı tekrar ölçülerek atomik buhar elde edilirken kontrol dışı kalan değişkenlerin neden olduğu hatalar saptanır. Böylece standardın orijinal kalibrasyon eğrisinden gösterileceği sapma, örnek için elde edilen sonuçların düzeltilmesinde kullanılır.

Dinamik Aralık: Eğrinin doğrusal olan kısmının kullanılması tercih edilir; bu bölümde analitik sinyal, analitin miktarıyla doğru orantılıdır. Dinamik aralığın üstündeki analit konsantrasyonlarında respons değerinde yükselme görülmez.

Algılama Sınırı (Limit of Detection, LOD): Makul bir kararlılıkla ölçülebilen en düşük içeriktir. Tipik olarak S/N (sinyal/gürültü)nün 3 katıdır; gürültünün standart sapmasına dayanır.

$$\text{LOD} = \frac{k S_{\text{şahit}}}{m (\text{eğrinin eğimi})} \quad (k = \sim 3)$$

Kantitatif Ölçme Sınırı (Limit of Quantitative Measurement, LOQ): Uygulanan test koşulları altında, kabul edilebilir hassasiyet (tekrarlanabilirlik) ve doğrulukla tayin edilebilen en düşük analit konsantrasyonudur. Tipik olarak S/N'nün 10 katıdır

$$\text{LOQ} = \frac{k S_{\text{şahit}}}{m (\text{eğrinin eğimi})} \quad (k = \sim 10)$$

Doğrusal Respons Sınırı (Limit of Linear Response, LOL): Bir enstrman dedektörünün doygunluk noktasıdır; bu noktadan sonra sinyalde doğrusal bir respons üretmez.

KALİBRASYON METOTLARI

En çok uygulanan bazı kalibrasyon yöntemleri:

- Kalibrasyon eğrisi metodu
- Standart ilavesi metodu
- İç standart metodu
- Alan normalizasyonu metodu

1. Kalibrasyon Eğrisi Metodu

Kalibrasyon eğrilerinin doğrusal (lineer) olması, yani cihaz responsuyla hemen hemen orantılı olması istenir. Kalibrasyon eğrisi kullanabilmek için analitin konsantrasyon aralığı tahmin edilebilmeli, örneğin matris koşulları değerlendirilmelidir.

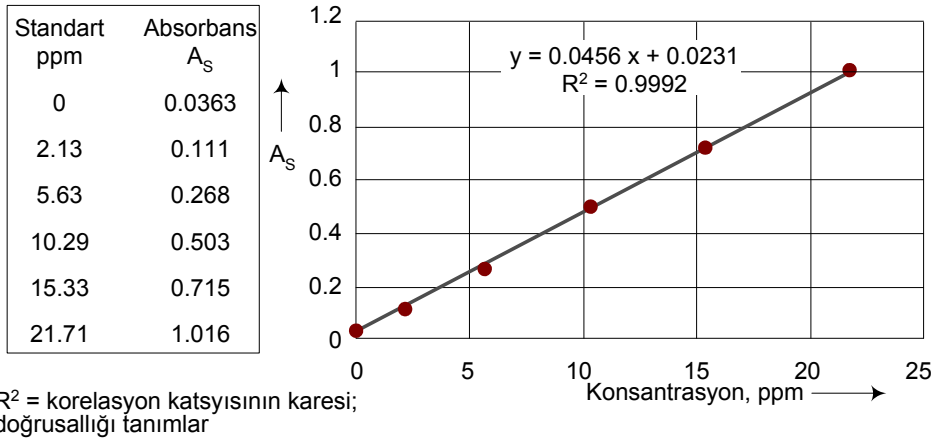
- Örneğin matris koşullarına benzer koşullarda bir takım standart hazırlanır; standartlar, tahmin edilen konsantrasyon aralığını kapsayacak seviyelerde olmalıdır.
- Analit içermeyen bir şahit hazırlanır.
- Standartlar ve şahit analiz cihazında ölçülür ve elde edilen değerlerle bir kalibrasyon grafiği çizilir.
- Bir kalibrasyon eğrisinin çizilebilmesi için, normal olarak, en az 3 standart ve bir şahit kullanılır.
- Örneğin (analit konsantrasyonu bilinmiyor) ölçümü yapılır; alınan respons kalibrasyon eğrisinin dinamik aralığı içindeyse, konsantrasyon hesaplanır.

ÖRNEK

Ultraviyole ve Görünür Spektrofotometrede Co^{+2} Tayini

Analiz edilecek örneğe (bilinmeyen) uygun analiz koşulları saptandıktan sonra bir seri standart çözelti kullanılarak kalibrasyon eğrisi hazırlanır. Standartlar, örneğin konsantrasyonuna yakın değerlerde olmalıdır.

- Kobalt iyonu (Co^{+2}) miktarının tayini için spektrumda çalışma dalga boyu saptanır; ~ 500 nm.
- Beş adet konsantrasyonu bilinen standart ve analit içermeyen bir şahit çözelti hazırlanır ve 520 nm'deki absorbans değerleri okunur.
- A_S değerlerine karşı konsantrasyonu gösteren kalibrasyon grafiği çizilir.



<http://www.nano.uoguelph.ca/rowntree/chem3440/LectureNotes/CHEM3440%20UV-Vis%20Spectroscopy%2020080903.pdf>

Grafik bir doğru şeklindedir. Örneğin absorbans değeri okunur.

$$A_x = 0.447 \text{ (beş okumanın ortalaması)}$$

Doğrunun eğimi (m), enstruman responsunun konsantrasyonla ilişkisini; y eksenini kestiği değer (b) ise, şahitin, veya enstrumanın analit bulunmadığı haldeki responsudur. Bu değer her ölçme sonucundan çıkarılması gerekir.

$$m = 0.0456$$

$$b = 0.0231$$

$$m = \frac{\sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{N}}{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N}} \quad b = \frac{\sum y_i}{N} - m \frac{\sum x_i}{N}$$

m ve b için standart sapma ne kadardır?

$$s_r = \sqrt{\frac{\sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{N} - \frac{(\sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{N})^2}{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N}}}{N - 2}}$$

$$s_m = s_r \sqrt{\frac{1}{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N}}}$$

$$s_b = s_r \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{N \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}}$$

Transfer fonksiyonu için kalibrasyon hassasiyeti (m) nedir? m kalibrasyon eğrisinin eğimidir: $m = 0.0456$

Analitik hassasiyet γ nedir? Bu değer konsantrasyonla değişir; dolayısıyla eğri üzerindeki her değer için γ hesaplanır.

	Kons.	$\gamma = m/S_i$
	2.13	5.0
	5.63	4.2
$\gamma = \frac{m}{S_i}$	10.29	4.4
	15.33	3.5
	21.71	3.2

Algılama sınırı (limit of detection, LOD) nedir?

$$\text{LOD} = \frac{3 S_{\text{şahit}}}{m} = \frac{3 \times 0.0037}{0.0456} = 0.24 \text{ ppm}$$

Kantitatif ölçme sınırı (limit of quantitative measurement, LOQ) nedir?

$$\text{LOQ} = \frac{10 S_{\text{şahit}}}{m} = \frac{10 \times 0.0037}{0.0456} = 0.81 \text{ ppm}$$

Örnekteki analit konsantrasyonunu (C_x) ne kadardır?

$$C_x = \frac{0.447 - b}{m} = \frac{0.447 - 0.0231}{0.0456} = 9.3 \text{ ppm}$$

Örneği ölçmenin standart sapması ne kadardır? (ölçme sayısı = 5)

$$s_x = \frac{s_r}{m} \sqrt{\frac{1}{M} + \frac{1}{N} + \frac{(C_x - y_{\text{ort}})^2}{m^2 \left[\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N} \right]}} = 0.16 \text{ ppm}$$

Bu ölçme için %95 güvenilirlik sınırı ne kadardır?

- Örnek için 5 ölçme yapılmıştır.
- 5 değer için %95 güvenilirlik sınırında, $t = 2.78$ (tablolardan)

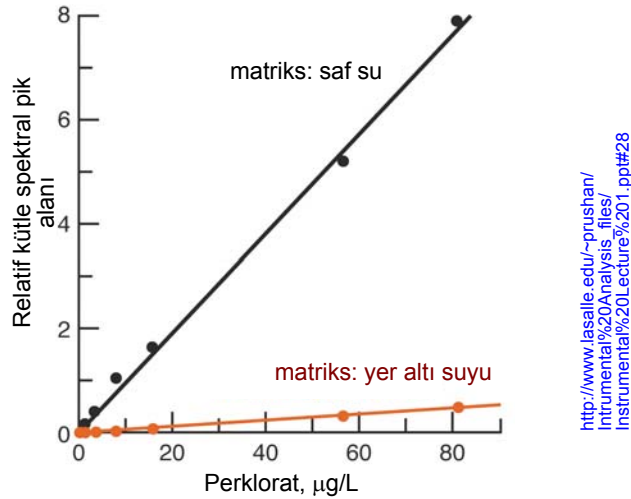
$$\frac{t s}{\sqrt{n}} = \frac{2.78 \times 0.16}{\sqrt{5}} = 0.20 \text{ ppm}$$

$C_x = 9.3 \pm 0.2 \text{ ppm}$, (95% güvenirlilikle)

2. Standart Katma Metodu

Standart katma yöntemi, çoğu zaman, örneğin içeriğinin bilinmediği veya kompleks bir karışım olduğu ve analit dışındaki diğer başka maddelerin (safsızlıklar) de sinyali etkilediği durumlarda uygulanan bir kalibrasyon işlemidir. Böyle hallerde matriks, örnek içinde bulunan analitten başka diğer her şeydir; responsu değiştiren bu tür etkilere 'matriks etkisi' denilir. Örnekte bulunan safsızlıklar analitle etkileşerek cihaz responsunu değiştirirler veya kendi başlarına özel cihaz responsları üretirler. Bu gibi durumlarda saf analit örneklerle göre hazırlanan bir kalibrasyon eğrisi yanlış sonuç verir.

Örneğin, aşağıdaki şekilde, kütle spektrometreyle yapılan, matriksin saf su ve yer altı suyu olması hallerinde perklorat kalibrasyon eğrilerinin ne kadar farklı oldukları açıkça görülmektedir.



Perkloratın farklı matriksler için kalibrasyon eğrileri

En ideal durum kalibrasyon standartlarının örnek matriksindeki hem analit hem de diğer maddelerin konsantrasyonlarına yakın miktarlarda bileşen içermesidir; böylece, örnekteki diğer maddelerin, ölçülen analit absorbansına etkisi en aza indirilmiş olur. Örneğin, renkli pek çok metal iyonu komplekslerinin absorbansı ortamda sülfat veya fosfat iyonlarının varlığında azalır; çünkü bu iyonlar metal iyonlarıyla

renksiz kompleksler oluştururlar. Böyle bir durumda elde edilen absorbans değeri gerçek değerinden düşük olur. Sülfat veya fosfatın matriks etkisi standartlara, bu iyonlardan örnekte buldukları miktara yakın miktarlarda ilavesiyle yenilir. Ancak, topraklar, mineraller, ve fabrika külleri gibi örneklerin analizinde, örneğe benzer bileşimde standartların hazırlanması olanaksız veya çok zordur. Bu gibi durumlarda matriks etkisini yok edebilmek için "standart ilavesi yöntemi" uygulanır.

Standart katma birkaç şekilde yapılabilir.

- Zaman kazanmak veya az miktarda örnekle çalışılması gerektiğinde standart ilavesi örneğin sadece iki versiyonu ile yapılabilir. Örneklerde birine V_S mL standart konulur, diğerine konulmaz. Her iki balon da seyreltilerek sabit hacme tamamlanır. Bu yöntem voltametik ve potansiyometrik ölçmelerde çok kullanılır.
- Fotometrik ve spektrofotometrik çalışmalarda en çok uygulanan yöntem ise, aynı miktardaki örneklere standart bir çözeltiden artan miktarlarda ilaveler yapılmasıdır. İlavelerden sonra çözelti sabit bir hacme tamamlanır ve absorbansları saptanır.

İki Ölçmeyle Yapılan Hesaplama Yöntemi

Örnekten volumetrik bir balona bir miktar (V_X) alınır ve gerekli maddeler (pH tampon, kompleks yapıcı, v.s. gibi) ilave edilir, seyreltilerek sabit hacme (V_T) tamamlanır. Buna (1) diyelim.

Diğer bir volumetrik balona aynı şekilde örnek ve gerekli maddeler konulur; ilave olarak 5.00 ml analit standart çözelti ilave edildikten sonra seyreltilerek sabit hacme (V_T) tamamlanır. Buna (2) diyelim.

- (1) ve (2)'nin sinyalleri ölçülür; A_1 ve A_2 .
- Sinyaller analit konsantrasyonu ile orantılıdır.
- k orantı sabitini, C_X örnekteki analit konsantrasyonunu gösterdiğine göre:

$$A_1 = k \frac{V_X}{V_T} C_X$$

$$A_2 = k \left[\frac{V_X}{V_T} C_X + \frac{V_S}{V_T} C_S \right]$$

Bu iki eşitlikten örnekteki analit konsantrasyonu hesaplanır.

$$\frac{A_2}{A_1} = \frac{k (V_X C_X + V_S C_S)}{V_T} \times \frac{V_T}{k V_X C_X} = 1 + \frac{V_S C_S}{V_X C_X}$$

$$\frac{V_S C_S}{V_X C_X} = \frac{A_2 - A_1}{A_1}$$

$$C_X = \frac{A_1 V_S C_S}{V_X (A_2 - A_1)}$$

ÖRNEK

Sodyum iyonu içeren serum numunesi, atomik emisyon analizinde 4.27 mV sinyal vermektedir. Bu örnekten 95.0 mL alınarak, 2.08 M NaCl çözeltisinden 5.00 mL ilave edilmiştir; hazırlanan bu standardın sinyali ise 7.98 mV olarak ölçülmüştür. Serumdaki sodyum iyonu konsantrasyonu ne kadardır? $[Na^+]$? M. Sinyaller analit konsantrasyonu ile orantılıdır.

Hazırlanan standart (100 mL) karışımdaki Na^+ konsantrasyonu, 95 mL serumdaki ve ilave edilen 5 mL 2.08 M çözeltideki Na^+ iyonları toplamına eşittir.

95.0 mL serumdaki $[Na^+]$:

$$[Na^+] \frac{95.0}{100.0} = 0.950 [Na^+] \text{ mol}$$

5 mL 2.08 M çözeltideki $[Na^+]$:

$$2.08 \frac{5.00}{100.0} = 0.104 \text{ mol}$$

100 mL standarttaki $[Na^+]$: $0.950 [Na^+] + 0.104 \text{ mol}$

Atomik emisyon analizinde okunan sinyaller:

Serum örneği için: A_1 : 4.27 mV

100 mL standart için. $A_2: 7.98 \text{ mV}$

Sinyal ve konsantrasyonlar orantılı olduğundan, aşağıdaki eşitlikle serumdaki Na^+ konsantrasyonu hesaplanır.

$$\frac{[\text{Na}^+]}{0.950 [\text{Na}^+] + 0.104} = \frac{4.27}{7.98} \quad [\text{Na}^+] = 0.113 \text{ M}$$

Çok Sayıda Ölçmeyle Yapılan Hesaplama Yöntemi

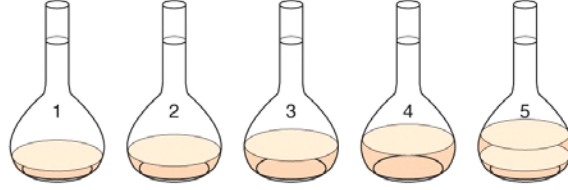
Çok sayıda ölçmeyle yapılan standart ilavesi kalibrasyon metoduyla daha hassas sonuçlar alınır

- Örnekten volumetrik bir balona bir miktar (V_x) alınır ve gerekli maddeler (pH tampon, kompleks yapıcı, v.s. gibi) ilave edilir, seyreltilerek sabit hacme (V_T) tamamlanır.
- Diğer bir seri volumetrik balona aynı şekilde örnek ve gerekli maddeler konular; ilave olarak sırasıyla 5.00, 10.00, 15.00, 20.00, 25.00 ml analit standart çözelti ilave edildikten sonra herbiri seyreltilerek sabit hacme (V_T) tamamlanır. Standardın konsantrasyonu 8.7 ppm'dir.
- Hazırlanan beş standardın ölçümü yapılır; her biri kendine özgü sinyal değeri verir (S_i).
- Sinyal değerleri, ilave edilen standardın hacimlerine karşı grafiğe alınır; grafik bir doğrudur.
- Elde edilen grafiğin eğimi ve y eksenini kestiği noktadaki sinyal değeri saptanır; bu değerler numunedeki analit miktarını hesaplamada kullanılır.
- Hazırlanan çözeltilerin her birindeki analit konsantrasyonu enstrümantal yöntemle ölçülür.

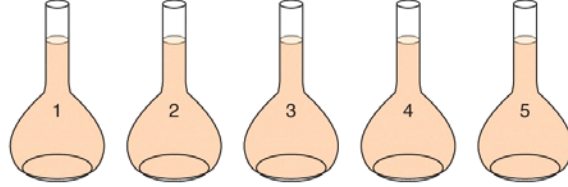
her bir balona 5 ml analit (bilinmeyen) konur



0, 5, 10, 15, 20 ml standart ilave edilir



her bir balon 50 ml işaretine kadar doldurulur ve çalkalanır



Enstrümanın responsu (A) analit konsantrasyonu ile orantılı ise aşağıdaki eşitlik yazılabilir.

$$A = \frac{k V_S C_S}{V_T} + \frac{k V_X C_X}{V_T}$$

V_X = örneğin hacmi, = 25 mL olduğu varsayalım

V_S = standardın hacmi = değişken (5, 10, 15, 20 mL, gibi)

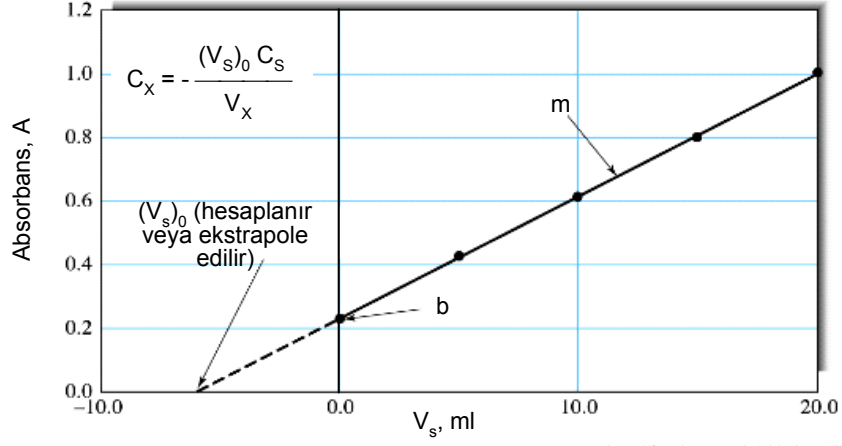
V_T = balonun toplam hacmi = 50 mL

C_S = standardın konsantrasyonu

C_X = alınan örnek içindeki analitin hacmi (burada 25 mL)

k = orantı sabiti

A'nın V_S 'nin fonksiyonu olarak çizilen grafiği düz bir doğrudur.



<http://faculty.atu.edu/abhuiyan/Course/Chem%204414/Chapter%201.ppt#11>

Elde edilen grafik kullanılarak örnekteki analit konsantrasyonunun (C_x) saptanması için iki yol izlenebilir.

C_x 'in Tayini İçin Birinci Yol:

Doğrumun eğimi m , y eksenin kestiği nokta b ile gösterildiğinde,

$$A = m V_s + b$$

$$\text{eğim, } m = \frac{k C_s}{V_T}$$

$$\text{kesim noktası, } b = \frac{k V_x C_x}{V_T}$$

$$\frac{b}{m} = \frac{k V_x C_x}{V_T} \times \frac{V_T}{k C_s}$$

$$C_x = \frac{b C_s}{m V_x}$$

C_X 'in Tayini İçin İkinci Yol:

C_X 'in tayini için başka bir yol da izlenebilir.

- Ölçme sonuçlarıyla çizilen doğru ekstrapole edilerek X eksenini kestiği nokta saptanır.
- $V_S = 0$ noktası \rightarrow enstrüman responsudur.
- Doğrunun X eksenini kestiği nokta \rightarrow ilave edilen analit miktarı bilinir (içsel).
- Veya bu noktada $A = 0$ olduğundan (enstrüman responsu yok) \rightarrow örnekte analit bulunmaz.

$A = 0$ olduğunda,

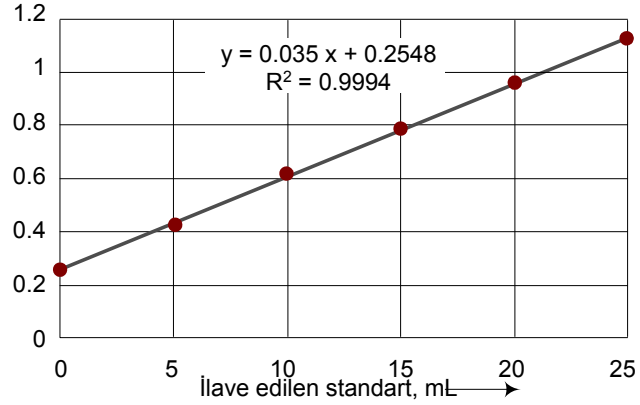
$$A = \frac{k(V_X C_X)}{V_T} + \frac{k(V_S C_S)}{V_T} = 0$$

$$C_X = -\frac{(V_S)_0 C_S}{V_X}$$

ÖRNEK

Çok sayıda ölçmeyle yapılan kalibrasyon işleminde bir örnek için aşağıdaki verilerin elde edildiği varsayalım. Örnekteki analit konsantrasyonu C_X ne kadardır?

İlave hacim mL	Sinyal (herhangi birim)
0.00	0.251
5.00	0.422
10.00	0.617
15.00	0.785
20.00	0.957
25.00	1.121



<http://www.nano.uoguelph.ca/rowntree/chem3440/LectureNotes/CHEM3440%20UV-Vis%20Spectroscopy%2020080903.pdf>

Yukarıdaki grafikten,

$$m = 0.035 \quad b = 0.2548 \text{ değerleri okunur.}$$

C_X 'in hesaplamayla bulunması için daha önce verilen,

$$C_X = \frac{b C_S}{m V_X}$$

eşitliği kullanılır.

$$C_X = \frac{b}{m V_X} C_S = \frac{0.2548}{0.035 \times 5.00} 8.7 = 12.7 \text{ ppm}$$

C_X = örnekteki analit konsantrasyonu

C_S = standarttaki analit konsantrasyonu

Eğim (m) ve kesişme noktası değerindeki (b) hata hesaplanabilir; böylece, elde edilen sonucun ne kadar sağlıklı olduğu görülür.

$$s_C = C_X \sqrt{\left(\frac{s_m}{m}\right)^2 + \left(\frac{s_b}{b}\right)^2} = C_X \sqrt{\left(\frac{0.00045}{0.03498}\right)^2 + \left(\frac{0.00018}{0.2548}\right)^2}$$

$$s_C = 12.7 \times 0.0129 = 0.16 \text{ ppm}$$

Bu ölçme için %95 güvenilirlik sınırı ne kadardır?

- Örnek için 5 ölçme yapılmıştır.
- 5 değer için %95 güvenilirlik sınırında, $t = 2.78$ (tablolardan)

$$\frac{t s}{\sqrt{n}} = \frac{2.78 \times 0.16}{\sqrt{5}} = 0.20 \text{ ppm}$$

- $C_X = 12.7 \pm 0.2 \text{ ppm}$, (95% güvenilirlikle)

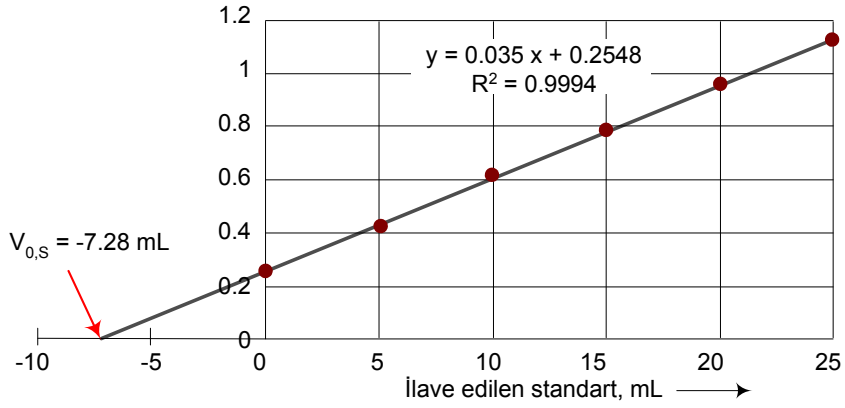
Standart ilavesi yönteminde yukarıda görüldüğü gibi hesaplamayla değil grafikteki değerlerde yapılan okumalar daha kolaydır.

Bir doğru şeklinde elde edilen grafikteki doğru ekstrapole edilerek x-eksenini kestiği, yani sinyalin sıfır olduğu nokta saptanır. Bu nokta, örnekteki (bilinmeyen) analit miktarıyla aynı miktarda analit içeren Standard çözeltinin hacmini tanımlar.

$$-V_{0,S} C_S = V_X C_X$$

$$C_X = \frac{-V_{0,S}}{V_X} C_S = \frac{-(-7.28)}{5.00} 8.7 \text{ ppm}$$

$$C_X = 12.7 \text{ ppm}$$



<http://www.nano.uoguelph.ca/rowntree/chem3440/LectureNotes/CHEM3440%20UV-Vis%20Spectroscopy%2020080903.pdf>

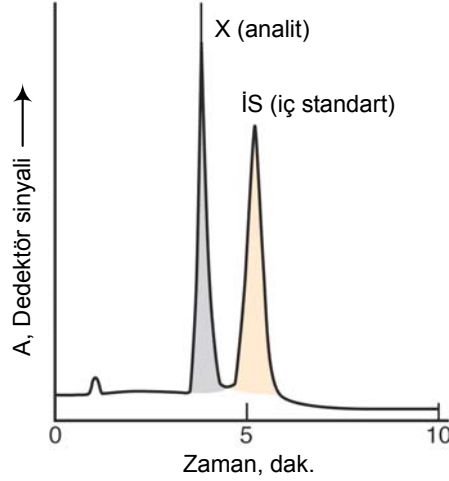
3. İç Standart Metodu

Bir iç standart, bilinmeyen örneğe ilave edilen ve analitten farklı olan, miktarı bilinen bir bileşiktir. İç standartlar çeşitli rastgele ve sistematik hataları dengeler.

- Bir iç standart, örnek, şahit ve kalibrasyon standartlarına aynı miktarda ilave edilen bir maddedir.
- Standartlardan alınan ölçme sonuçları, 'analit sinyali / iç standart sinyali' değerleri standartlardaki analit konsantrasyonlarına göre grafiğe alınır.
- Örnek için elde edilen 'analit sinyali / iç standart sinyali' oranından, kalibrasyon eğrisi kullanılarak analitin konsantrasyonu bulunur.

Analit sinyalinin iç standart sinyaline oranı analitik parametre olarak kullanılır. Yöntemin başarılı olabilmesi için iç standart sinyalinin örnekteki diğer maddelerin

piklerinden uzakta ($R_S > 1.25$), analit pikinin yakınında olması tercih edilir. Uygun bir iç standart kullanıldığında relatif hata %0.5-1 civarındadır.



http://www.lasalle.edu/~prushan/instrumental%20Analysis_files/instrumental%20Lecture%201.ppt#28

Respons faktörü, $R_{X/IS}$: Bilinen miktarlarda analit ve standart içeren bir karışım hazırlanır. Dedektör, genellikle, karışımdaki her bir madde için farklı responslar verir; böylece analit için bir respons faktörü saptanır.

$$R_{X/IS} = \frac{A_X / m_X}{A_{IS} / m_{IS}} \quad R = \frac{A_X / C_X}{A_{IS} / C_{IS}}$$

Hacim sabit olduğundan,

$$\frac{m_X}{m_{IS}} = \frac{C_X}{C_{IS}}$$

$$R_{X/IS} = \frac{A_X / C_X}{A_{IS} / C_{IS}}$$

A_X , A_{IS} analit ve iç standart için responslar

m_X , m_{IS} injekte edilen analit ve iç standardın kütleleri

C_X , C_{IS} injekte edilen analit ve iç standardın konsantrasyonları

ÖRNEK

iç standart yöntemi kromatografik analizlerde yaygın olarak uygulanan bir kalibrasyon yöntemidir.

Tek İnjesiyonla Hesaplama Yöntemi

Tek injesiyonla hesaplamada, örneğe bilinen miktarda bir iç standart ilave edilir. Analit için saptanan respons faktörden örnekteki analit miktarı hesaplanır.

Standartın analizi için X maddesinden ve İS (iç standart) maddesinden, 1 ng injekte edilir, ölçüm yapılır; standart için elde edilen değerler:

Solut	Alan	$R_{X/IS}$
X	22300	0.619
İS	36000	---

Respons faktör, $R_{X/IS}$,

$$R_{X/IS} = \frac{A_X / m_X}{A_{IS} / m_{IS}} = \frac{A_X / C_X}{A_{IS} / C_{IS}} = 0.619$$

V = sabit olduğundan,

$$\frac{m_X}{m_{IS}} = \frac{C_X}{C_{IS}}$$

Örneğin analizi için, örneğe 1.00 ppm iç standart ilave edilir ve ölçüm yapılır; elde edilen değerlerden analit miktarı (C_X) hesaplanır.

Solut	Alan	Konst.
X	9840	?
İS	26500	1.00

$$C_X = \frac{C_{IS}}{R_{X/IS}} = \frac{A_X}{A_{IS}}$$

$$C_X = \frac{1.00 \text{ ppm}}{0.619} = \frac{9840}{26500} = 0.60 \text{ ppm}$$

Kalibrasyon Eğrisiyle Hesaplama Yöntemi

İç standart miktarı sabit, analit miktarı değişken olan (farklı m_x/m_s değerlerinde) bir seri standart hazırlanır, her birinin kromatogramları alınır. Standartların kromatogramlarından hesaplanan A_x/A_s değerlerinin m_x/m_s değerlerine karşı grafiği çizilir; eğri, eğimi respons faktörü olan bir doğrudur. Örnekteki analitin miktarının bulunması için, örneğe, bilinen miktarda iç standart maddesi ilave edilir. Örnek + iç standart karışımının kromatogramından A_x/A_{IS} değeri bulunur ve kalibrasyon eğrisinden analit konsantrasyonu (C_x) hesaplanır.

Kalibrasyon eğrisinin çizilmesi için, aşağıdaki tabloda görüldüğü gibi, dört standart hazırlanmıştır;

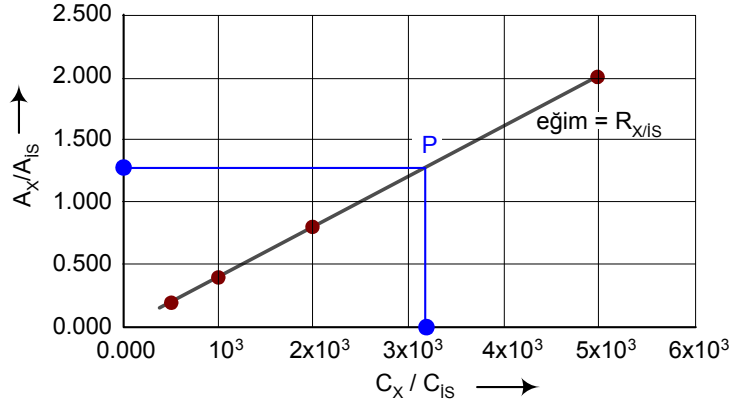
- Her standartta 5 00 mg/mL iç standart vardır.
- A_x/A_{IS} değerleri C_x/C_{IS} değerlerine karşı grafiğe alınır.
- Kalibrasyon eğrisi, eğimi respons faktörü olan bir doğrudur.

Örneğin analizi için örneğe bilinen miktarda iç standart (C_{IS}) ilave edilir ve hazırlanan karışım cihaza injekte edilir.

- A_x/A_{IS} değeri ölçülür.
- Kalibrasyon verilerinden C_x/C_{IS} değeri tayin edilir ve C_x hesaplanır.

$$C_x = C_{IS} \left(\frac{C_x}{C_{IS}} \right)$$

Standart	X maddesi mg/mL	İç standart, mg/mL	C_x/C_{IS}	A_x	A_{IX}	A_x/A_{IS}
1	2.50	5.00	0.500	120	600	0.200
2	5.00	5.00	1.000	241	601	0.401
3	10.00	5.00	2.000	480	600	0.800
4	25.00	5.00	5.000	1198	600	1.997



$$R_{x/Is} = \frac{A_x / A_{Is}}{C_x / C_{Is}}$$

$$P (A_x / A_{Is}, C_x / C_{Is})$$

<http://www.d.umn.edu/~dpoe/Chem5725/units/02ChromIIQA.ppt#10>

4. Alan Normalizasyonu Metodu

Örnek injeksiyonundaki düzensizliğin yarattığı hata alan normalizasyonu ile de giderilebilir. Bu yöntemde örnekteki tüm maddelerin kolondan çıkması gerekir. Kromatogramdaki tüm piklerin alanları hesaplanır ve her madde için bilinen dedektör algılama faktörü ile çarpılarak düzeltilir. Analitin konsantrasyonu, analit pikine ait alanın toplam pik alanlarına bölünmesiyle hesaplanır.

Örnekte bulunan her bir analit için bir standart hazırlanır ve kromatogramı alınır, relatif dedektör responsu hesaplanır.

$$\text{relatif respons} = \frac{\text{pik alanı}}{\text{injekte edilen miktar}}$$

Bir seri solut için relatif dedektör responslar normalize edilerek istenilen respons faktörlere dönüştürülebilir; örneğin, her bir değer en büyük değere bölünür.

$$\text{respons faktörü} = \frac{\text{relatif respons}}{\text{en büyük değer}}$$

Elde edilen alan değerleri (ham veriler), respons faktörlere bölünerek indirilmiş alanlar bulunur, bu değerler miktarla orantılıdır (%kütle, %hacim, %ağırlık, ...).

$$\text{indirilmiş alan} = \frac{\text{alan}}{\text{respons faktörü}}$$

Her bi bileşenin % değeri bulunur.

$$\text{ağırlık, \%} = \frac{\text{indirilmiş alan} \times 100}{\text{indirilmiş alanlar toplamı}}$$

ÖRNEK

Butil-alkoller karışımı bir örneğin kromatogramının alan ormalizasyon yöntemine göre incelenmesi. Detektör hassasiyeti düzeltme faktörleri bilinen miktarlarda saf alkoller kullanılarak ayrı deneylerde saptanmıştır.

RF (respons faktör) = normalize edilmemiş relatif resons/listedeki en büyük değer; bunlar, injekte edilen eşit miktarlardaki solutun, en büyük değer için 1'e normalize edilmesiyle bulunan alanlardır.

Standartlar için elde edilen veriler

Alkol	Ağırlık, g	Ağırlık, %	Pik alanı, cm ²	Relatif respons (Alan, %ağ.)	RF (respons faktör)
n-bütil	0.1731	24.61	3.023	0.1229	0.8496
i-bütil	0.1964	27.92	3.074	0.1101	0.7615
s-bütil	0.1514	21.52	3.112	0.1446	1.0000
t-bütil	0.1826	25.96	3.004	0.1157	
Toplam	0.7035	100.00	12.213	0.1446	

Örnekler için elde edilen veriler: Elde edilen alan değerleri (ham veri), respons faktörlere bölünerek indirilmiş alanlar bulunur, bu değerler %ağırlıkla orantılıdır.

$$\text{Ağırlık, \%} = \frac{\text{indirilmiş alan} \times 100}{\text{indirilmiş alanlar toplamı}}$$

Alkol	Alan	RF	Alan/RF	Ağırlık, %
n-bütil	1.731	0.8496	2.0374	18.18
i-bütil	3.753	0.7615	4.9287	43.98
s-bütil	2.845	1.0000	2.8450	25.39
t-bütil	1.117	0.8004	1.3956	12.45
Toplam			11.2067	100.00

ELEKTROT KALİBRASYONU

ÖRNEK

Cam pH Elektrodun Kalibrasyonu

Bir pH ölçmesinde dikkat edilmesi gereken hususlar:

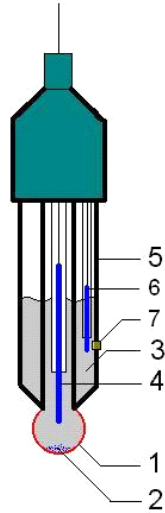
1. En az iki standart tampon seçilerek ölçülecek pH değerinin bu tamponların pH değerleri arasında bulunması gerekir:

- Örneğin pH değeri 5 dolayında ise, standartların pH'larının,
 - pH = 4 ve pH = 7 olması önerilir.

Örneğin pH değeri 3 dolayında ise, standartların pH'larının,

- pH = 2 ve pH = 4 olması önerilir.

2. Cam elektrodun responsu daima voltj veya mV olarak kaydedilir.



1. algılama kısmı; hazne özel bir camdan yapılmıştır
2. az miktarda AgCl (bazen konur)
3. iç çözelti (pH için 0.1 M HCl)
4. iç çözelti (genellikle AgCl elektrot veya kalomel elektrot)
5. elektrot bedeni (iletken olmayan cam veya plastik)
6. referans elektrot (genellikle AgCl elektrot veya kalomel elektrot)
7. örnek çözeltisiyle bağlantı (genellikle seramik veya kapiler asbest veya kuartz fiber)

[http://www.corrosioncenter.ohiou.edu/kinsella/690/Lecture%207%20Care%20and%20Maintenance%20of%20the%20Reference%20Electrode%20\(2\).ppt#27](http://www.corrosioncenter.ohiou.edu/kinsella/690/Lecture%207%20Care%20and%20Maintenance%20of%20the%20Reference%20Electrode%20(2).ppt#27)

Cam Elektrodun Responsu (Algılaması)

Elektrot kalibre edilirken pH değeri değil, cam elektrodun voltaj değeri ölçülür. Yeni bir elektrot, ortam koşullarında, 60 mV/pH dolayında bir respons verir.

- pH = 7 – 4 arasında elektrot potansiyeli $\approx +180$ mV kadar yükselir.
- pH = 7 – 10 arasında elektrot potansiyeli $\approx +180$ mV kadar düşer.

Elektrot yaşlandıkça kalibrasyon doğrusun eğimi azalır, respons zamanı da uzar; yani, elektrodun cevap vermesi yavaşlar. Reasponsun 60 mV'un önemli derecede altına düşmesi ve respons zamanının da çok yavaşlaması durumunda elektrot kullanılamaz hale gelmiş demektir.

Cam elektrodun responsunun yavaşlaması kalibrasyon doğrusunun eğiminin düşmesiyle de kendini gösterir. Yaşlanan elektrodta gözlenen bu durumun nedeni, zamanla elektrodun organik ve inorganik iyonlarla kirlenmesidir. Organik iyonlar membranda adsorblanır, Na⁺ ve K⁺ gibi inorganik iyonlar ise jel tabakasına girerler.

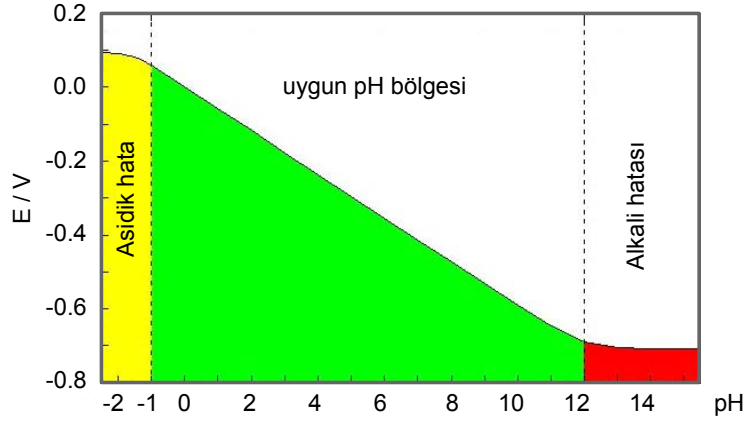
pH Ölçmelerinde Hatalar

1. Yanlış kalibrasyon: Ölçülen pH değeri standartlardan daha doğru olamaz (± 0.01 pH). Kalibrasyonda kullanılacak tamponun hatalı hazırlanması veya hazırlanmış tamponun bekleme nedeniyle bileşiminin değişmesi (organik kısımlar bakteriler tarafından etkilenecek tamponun zamanla kirlenmesine neden olur) pH ölçümünde hatalı sonuçlara yol açar.

2. Sodyum (alkali) hatası: Yüksek pH değerlerinde elektrodun Na⁺ iyonlarını algılamasından kaynaklanır; okunan pH değeri, gerçek değerden daha düşüktür. Herhangi bir cam elektrot pH > 9 'da alkali metal iyonlarına karşı kısmen duyar olmaya başlar.

3. Asit hatası: Çok düşük pH değerlerinde ortaya çıkar. pH < 0.5 'in altındaki değerlerde cam elektrotlarla elde edilen sonuçlar gerçek değerlerden bir miktar yüksektir.

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln (a_{H^+} + k_{H^+,Na^+} a_{Na^+})$$



[http://www.corrosioncenter.ohio.edu/kinsella/690/Lecture%207%20Care%20and%20Maintainance%20of%20the%20Reference%20Electrode%20\(2\).ppt#27](http://www.corrosioncenter.ohio.edu/kinsella/690/Lecture%207%20Care%20and%20Maintainance%20of%20the%20Reference%20Electrode%20(2).ppt#27)

Sodyum ve asit hataları

4. Sıcaklık değişikliğinin etkisi

pH metrede normal sıcaklık düzeltmesi sadece pH elektrodundan algılanan mV değerinde yapılır, fakat çözeltilerdeki sıcaklık değişiklikleri cihaz tarafından düzeltilemez. Çözeltide pH'ın sıcaklıkla değişimini düzeltebilmek için, çalışılan çözeltille bir pH-sıcaklık kalibrasyonu yapılır; deney sonuçları bu kalibrasyon değerlerine göre düzeltilir. Modern pH metrelerde, hazırlanan pH-kalibrasyon değerleri cihazın programına girilerek düzeltmenin cihaz tarafından yapılması sağlanabilmektedir.

Aşağıdaki tabloda bir pH-sıcaklık düzeltme kalibrasyon değerleri verilmiştir.

$^{\circ}\text{C}$	$\text{pK}_a \text{H}_2\text{O}$	Nötrall pH	$\text{NaOH}, 10^{-5} \text{ M}$
10	14.54	7.27	9.54
20	14.17	7.08	9.17
25	14.00	7.00	9.00
30	13.83	6.92	8.88
40	13.54	6.77	8.54
50	13.26	6.63	8.26
60	13.02	6.51	8.02

(Temas potansiyelindeki değişiklikler ve elektrot neminin kaybolması da elektrotlarda karşılaşılan diğer hata kaynaklarıdır.)

Fluorür İyon Seçici Elektrotlar

Fluorür katı-hal iyon seçici elektrodun iyon hassas kısmı, EuF_2 ile doplanmış bir LaF_3 kristalidir.

Elektrodun F^- iyonuna karşı responsu:

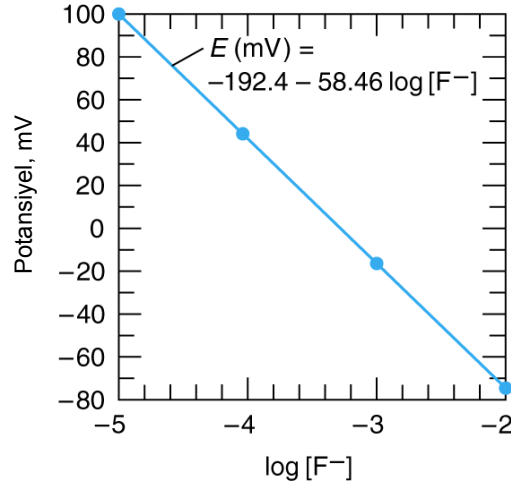
$$E = \text{sabit} - \beta (0.0591 \log [\text{F}^-]_{\text{dış}})$$

$$\text{sabit} = \log \frac{[\text{F}^-]_{\text{dış}}}{[\text{F}^-]_{\text{iç}}}$$

Kalibrasyon eğrisinin çizilmesi

Bir fluorür elektrodu standart çözeltilere daldırılarak aşağıdaki tabloda toplanan potansiyeller elde edilmiştir.

[F ⁻] M	log [F ⁻]	E, mV (SCE'a karşı)
1.00×10^{-5}	5.00	100.0
1.00×10^{-4}	4.00	41.4
1.00×10^{-3}	3.00	-17.0
1.00×10^{-2}	2.00	-75.4



ÖRNEK

- a. $[F^-] = 5 \times 10^{-5} \text{ M}$ olduğunda potansiyel nedir? $E = ?$
- b. Potansiyelin 0.0 V olması için $[F^-]$ ne kadar olmalıdır? $[F^-] = ?$

Çözüm:

$$E = \underbrace{\text{sabit}}_y - \underbrace{m}_{\text{eğim}} \times \underbrace{\log [F^-]}_x$$

- a. $E = -192.4 - 58.46 \log (5.00 \times 10^{-5})$
 $E = 59.0 \text{ mV}$
- b. $0.0 = -192.4 - 58.46 \log [F^-]$
 $[F^-] = 5.1 \times 10^{-4} \text{ M}$