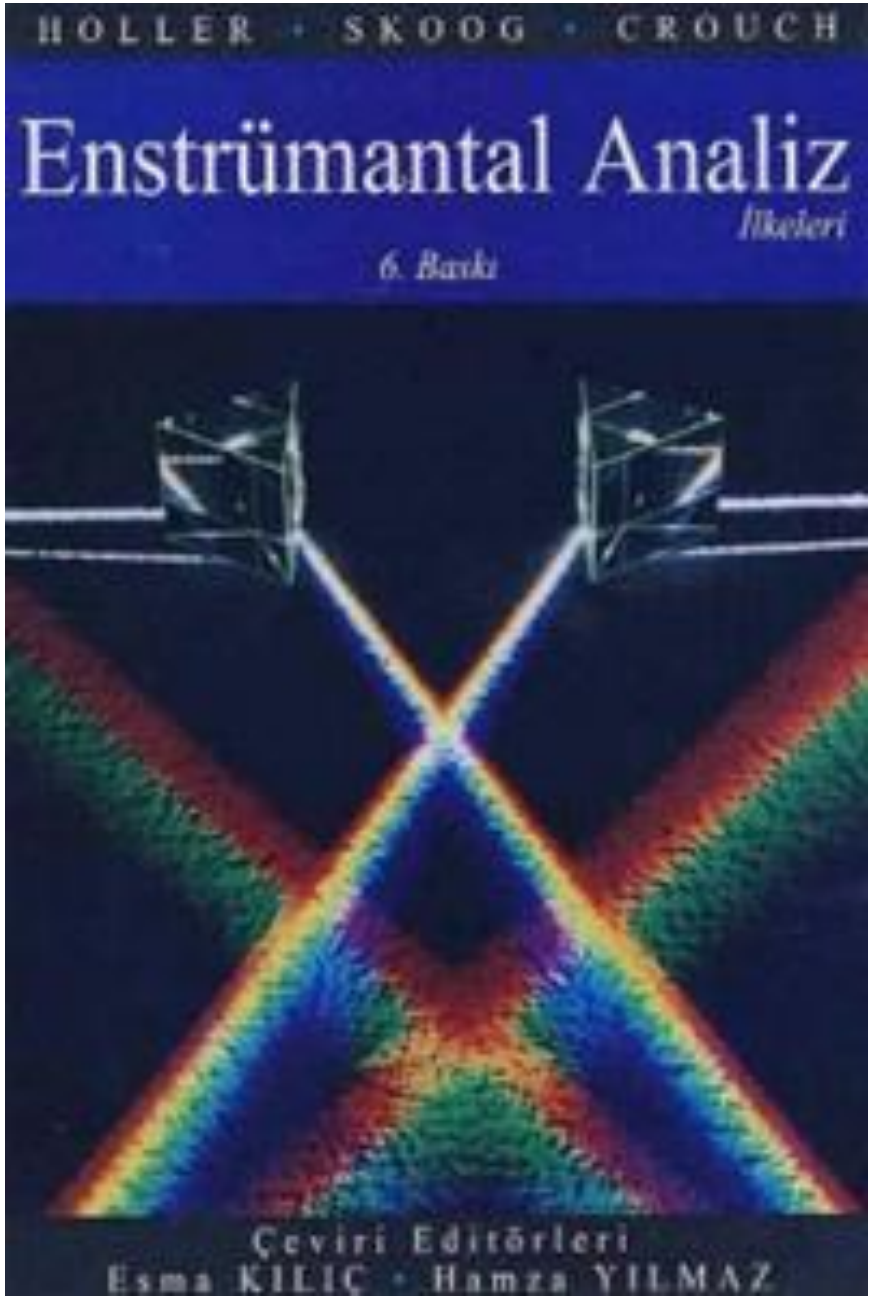
ALETLİ (ENSTRÜMENTAL) ANALİZ

1-GENEL KAVRAMLAR

Hazırlayanlar :

Prof.Dr. Hüseyin ÇELİKKAN


HOLLER · SKOOG · CROUCH
Enstrümantal Analiz
İlkeleri
6. Baskı
Çeviri Editörleri
Esma KILIÇ · Hamza YILMAZ

GİRİŞ

Analitik kimya, maddelerin kimyasal bileşimlerini ve bileşenlerin miktarlarının belirlenmesi için yöntem ve alet geliştirilmesini amaçlar.

Nitel Analiz; Maddenin yapısı hakkında , atomik, iyonik, moleküler özellikleri hakkında ve fonksiyonel gruplar hakkında bilgi verir.

Nicel analiz; madde içindeki herhangi bir bileşenin miktarını belirler.

- Kimyasal Analiz
- 1-Numune alma, 2. Yöntem Seçimi, 3-Ayırma 4- Ölçme, 5-Değerlendirme basamaklarından oluşur.

Analitik yöntemler **klasik** veya **aletli yöntemler** olarak sınıflandırılabilir.

Klasik (yaş) yöntemler

Gravimetrik ve volumetrik analiz yöntemlerini içerir.

Kimyasal maddeler, terazi, kalibre edilmiş cam malzeme, ısıtıcı gibi basit laboratuvar malzemelerinin kullanıldığı ve genelde analitin (tayin edilecek madde) daha fazla bulunduğu numunelerin analizinin yapıldığı yöntemlerdir.

Aletli Analiz Yöntemleri

Genel laboratuvar cihazlarının yanı sıra, çeşitli analitik cihazların kullanıldığı yöntemlerdir.

Analitik cihazların ölçtüğü büyüklükler;

- Maddeye ait fiziksel bir özelliği veya,
- Maddenin uyarılması sonucunda verdiği yanıtın fiziksel bir büyüklüğüdür.

Maddenin Ölçülen Fiziksel Büyüklükleri

Kütle ve maddenin kütlesindeki değişim, maddenin fiziksel halleri (erime, kaynama), viskozite, refraktivite, akım ve potansiyel ölçümleri (elektrokimyasal özellikler), ışık ve ışıma (spektroskopi, polarimetre).

Kimyasal Analizde Kullanılan Temel Değişkenler

Ölçüm türü	Analiz türünün dayandığı temel
Gravimetrik	Saf analitin veya onun stokiyometrik bir bileşiğinin
Volumetrik	Analitle reaksiyona giren standart bir reaktifin hacmi
Spektrometrik	Analit tarafından yayımlanan veya absorplanan elektromanyetik ışımanın büyüklüğü
Elektrokimyasal	Analit çözeltisinin elektriksel özellikleri
Radyokimyasal	Analitin yayımladığı nükleer ışımanın büyüklüğü
Kütle spektrometrik	Analitten ayrılan moleküler parçaların bolluğu
Kromatografik	Ayrılma sonrası farklı analitlerin fizikokimyasal özellikleri
Termal	Isıtılan veya soğutulan örneğin fizikokimyasal özellikleri

Elektrokimyasal Yöntemler
Voltametri
Polarografi
Potansiyometri vs.

Kromatografik Yöntemler*
Gaz Kromatografisi
Sıvı Kromatografisi
İyon Kromatografisi vs.

İnstrumental Teknikler

Termal Analiz Yöntemleri
TGA, DTA

Spektroskopik Teknikler
UV-GB Spektroskopisi
İnfrared Spektroskopisi (FT-IR)
NMR Spektroskopisi
Raman Spektroskopisi
XPS ve XRD vs.

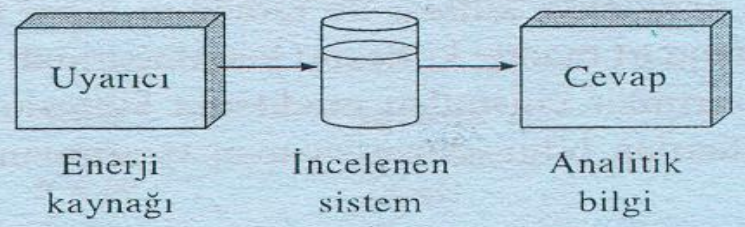
Diğerleri
Kütle Spektroskopisi
Nötron aktivasyon spekt.
vs.

* Aynı zamanda bir ayırma yöntemidir.

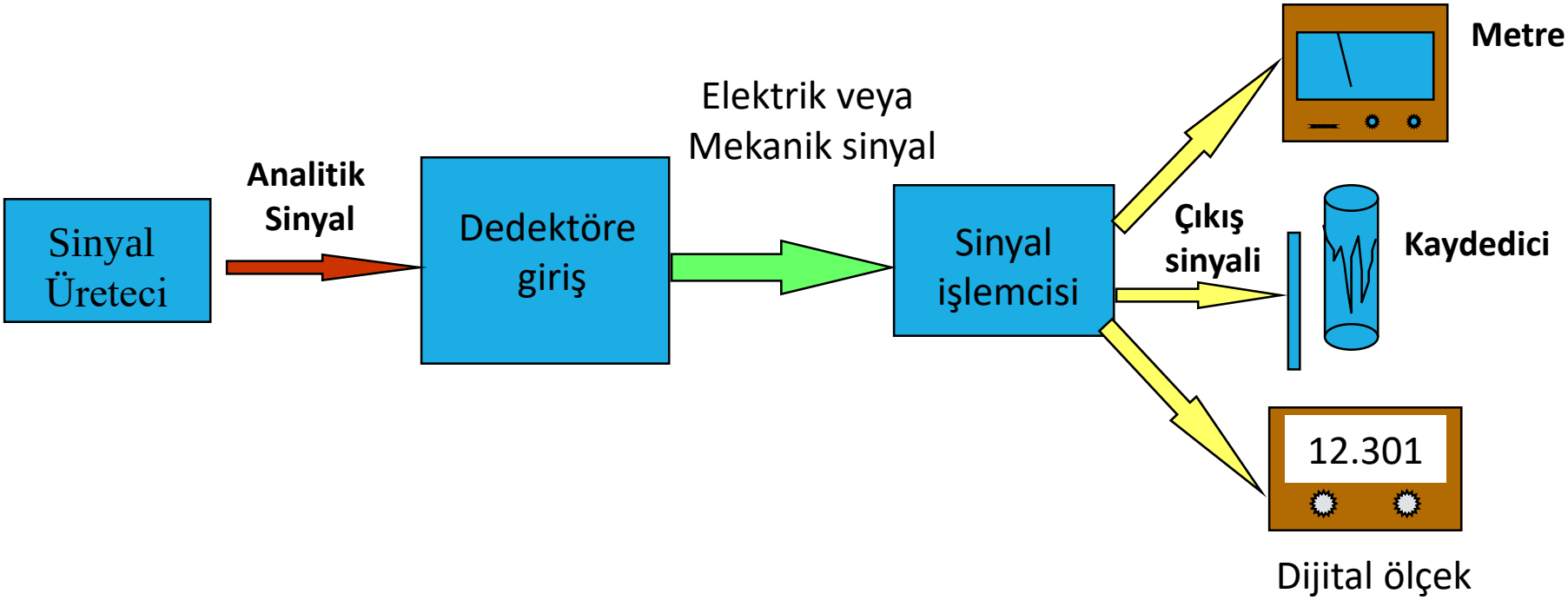
ALETLİ ANALİZ YÖNTEMLERİ

Ölçülen Özellik	Aletli Analiz Yöntemi
Işın Absorpsiyonu	Spektrofotometri (X-ışını, UV, GB, IR), NMR, ESR, Fotoakustik spektroskopisi
Işın Emisyonu	Emisyon spektroskopisi (X-ışınları, UV, GB, elektron, Auger,) Floresans, Fosforesans ve Lüminesans Spektroskopisi
Işın Saçılması	Türbidimetri, Nefolometri, Raman Spektroskopisi
Işın Kırılması	Refraktometri, interferometri
Işın Difraksiyonu	X-ışınları ve elektron difraksiyon yöntemleri
Işın rotasyonu	Polarimetri, dairesel dikroizm
Elektrik potansiyeli	Potansiyometri, Kronopotansiyometri
Elektrik yükü	Kulometri
Elektrik akımı	Amperometri, Polarografi
Elektriksel direnç	Kondüktometri (İletkenlik Ölçümü)
Kütle	Gravimetri
Kütle/yük	Kütle spektroskopisi
Tepkime Hızı	Kinetik yöntemler
Termal Özellikler	Termal gravimetri, DTA, Termal İletkenlik
Radyoaktivite	Nötron Aktivasyon Analiz, İzotop seyreltme yöntemleri

ALETLİ ANALİZ ÖLÇÜM SÜRECİ



Şekil 1-1 Bir enstrumantal ölçüm sürecini gösteren blok diyagram.



KONSANTRASYON TÜRLERİ

moles of solute per dm^3	$mol\ dm^{-3}$, M
equivalents of solute per dm^3	normal, N
milli-equivalents of solute per dm^3	$meq\ dm^{-3}$
grams of solute per dm^3	$g\ dm^{-3}$
parts per million	ppm (γ)
milligrams of component per kg	$mg\ kg^{-1}$
milligrams of solute per dm^3	$mg\ dm^{-3}$
parts per billion	ppb
nanograms of component per kg	$ng\ kg^{-1}$
nanograms of solute per dm^3	$ng\ dm^{-3}$
parts per trillion	ppt
picograms of component per kg	$pg\ kg^{-1}$

KONSANTRASYON TÜRLERİ-2

picograms of solute per dm^3	$pg\ dm^{-3}$
parts per hundred	% (w/w, w/v, v/v)
millimoles of solute per 100 cm^3	mM%
grams of solute per 100 cm^3	g%
milligrams of solute per 100 cm^3	mg%
micrograms of solute per 100 cm^3	µg%
nanograms of solute per 100 cm^3	ng%

micrograms of solute per cm^3 micrograms per gram	$\mu g\ cm^{-3}$ $\mu g\ g^{-1}$	≡ ppm
nanograms of solute per cm^3 nanograms per gram	$ng\ cm^{-3}$ $ng\ g^{-1}$	≡ ppb
picograms of solute per cm^3 picograms per gram	$pg\ cm^{-3}$ $pg\ g^{-1}$	≡ ppt

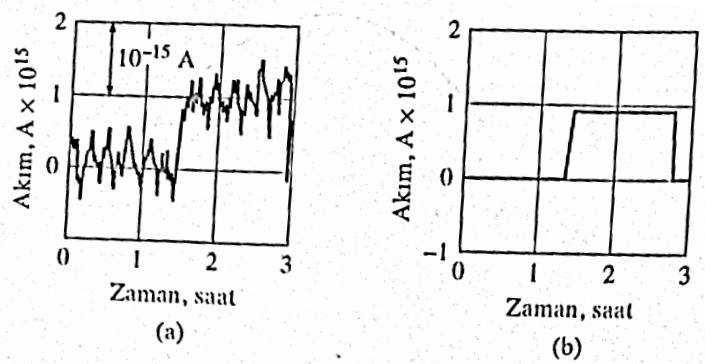
NUMUNEDEKİ ANALİTİN KONSANTRASYONU VERİLİRKEN NASIL TERCİH YAPILIR?

Analit / Numune Oranı	Analit / Numune Miktarı	Kullanılabilecek Konsantrasyon Birimi
Yüksek miktar	> % 10	
Düşük miktar	% 0,01 - 10	
Eser (trace) Miktar	1-100 ppm (% 0,0001 – 0,01)	ppm , mg/kg , mg/L
Ultra Eser (ultra trace) miktar	< 1 ppm	ppb, ppt (µg/kg , ng/kg)

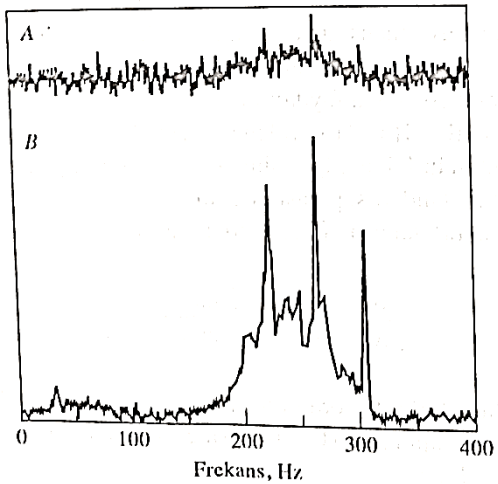
SİNYAL VE GÜRÜLTÜ

Her analitik ölçüm 2 bileşenden meydana gelir:

1) Sinyal (S)
2) Gürültü (N)
   i. Temel gürültü,
   ii. Temel olmayan gürültü, kaynakları.



Şekil 5-1 Bir akım ölçümünde gürültünün etkisi: (a) 0,9 × 10^{-15} A'lik bir doğru akımın deneysel şerit kaydı, (b) dalgalanmaların ortalaması *(T. Coor, J. Chem. Educ., 1968, 45, A594.)*

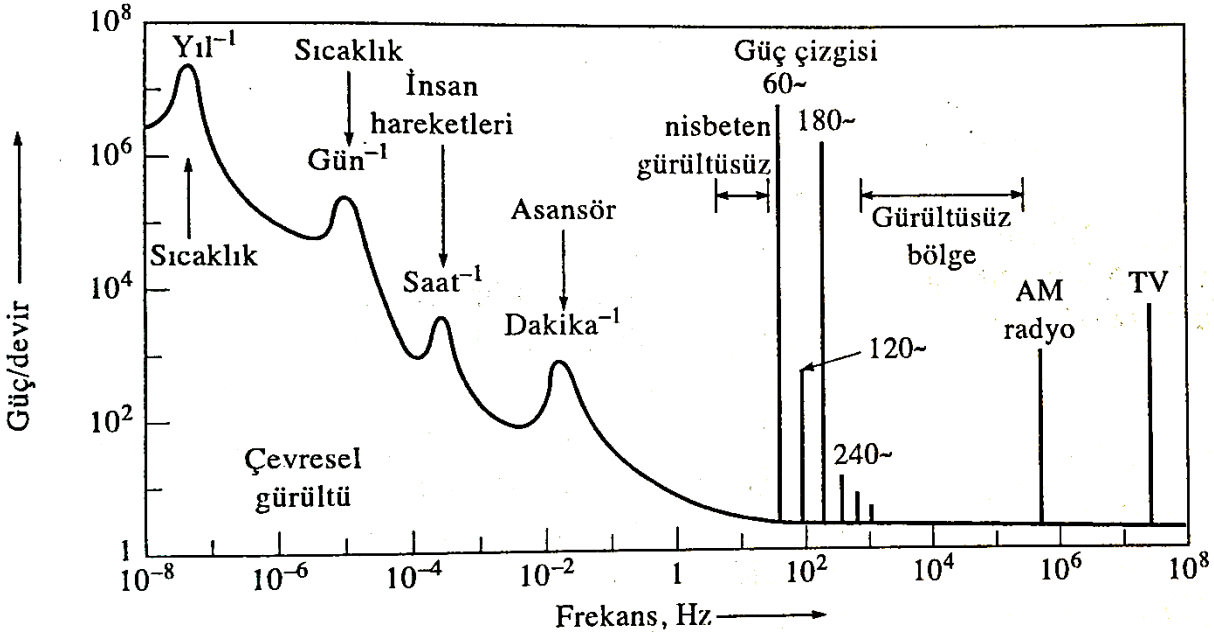


Şekil 5-2 Progesterone'nin NMR spektrumuna sinyal/gürültü oranının etkisi: *A*, *S/N* = 4,3; *B*, *S/N* = 43 *(R.R. Ernst and W.A. Anderson, Rev. Sci. Inst., 1966, 37, 101.)*

ALETLİ ANALİZDE GÜRÜLTÜ KAYNAKLARI

Kimyasal analizde gürültü 2 tür kaynaktan gelir:

1) Kimyasal gürültü
2) Aletsel gürültü
   i. Kimyasal gürültü,
   ii. Aletsel gürültü,
   iii. Kesikli gürültü,
   iv. Çevresel gürültü.



Şekil 5-3 Bir üniversite laboratuvarında bazı çevresel gürültü kaynakları. Gürültünün frekansa bağımlı olduğuna ve çeşitli girişimlerin iç içe girdiği frekans bölgelerinin olduğuna dikkat ediniz *(T. Coor,* J. Chem. Educ., *1968,* 45, *A540.)*

ANALİZ İŞLEMİNDE SIKÇA KULLANILAN TERİMLER VE ANLAMLARI

Tayin (Analiz) :
Bulunan miktarın yaklaşık % 10 undan daha yüksek bir hassasiyetle bir analitin kantitatif (nicel) ölçümüdür.

Yaklaşık miktarın belirlenmesi (estimation):
Bir örnekteki (numune) analitin miktarının yarı-kantitatif olarak ölçülmesidir. Yani, bulunan miktarın % 10 undan daha kötü bir hassasiyetle yapılan ölçümdür.

Girişim(Interference) :
Bir analitik prosedürdeki analitin durumunu etkileyen veya gizleyen etkidir. Girişim etkisi, numunenin kendisinden kaynaklandığı gibi prosedür esnasında eklenen kirleticilerden (contaminant) veya reaktifin kendisinden ya da ölçüm için kullanılan cihazdan kaynaklanabilir.

Maskeleme :
Örnekte bulunan veya prosedür esnasında eklenen ve girişim yapıcı özelliğe sahip türlerin, girişim etkisini önlemek için kullanılan reaktife verilen addır.

ANALİZ İŞLEMİNDE SIKÇA KULLANILAN TERİMLER VE ANLAMLARI-2

Metod:
Belirli bir analiz için hazırlanan talimatların tamamıdır.

Prosedür:
Bir analizde bulunan uygulama basamaklarından meydana gelen bir talimattır.

Reaktif:
Analitik bir prosedürle ilgili belirli bir reaksiyonu gerçekleştirmek için kullanılan kimyasaldır.

Numune (Örnek):
Analizi amaçlanan bir madde veya maddenin bir kısmıdır.

Standart:
1) Analitle bilinen bir stokiyometride ve kantitafik olarak reaksiyone giren saf bir madde veya bir reaktif.
2) Cihazı kalibre etmede veya reaktif çözeltisini standartlaştırmada kullanılan ve içerdiği madde miktarı hassas biçimde bilinen bir madde veya saf analit.

ANALİTİK YÖNTEM SEÇİMİ

Analitik yöntem Seçimi için aşağıdaki sorulara cevap verilmelidir :

1) Doğruluk ne olmalıdır?
2) Ne kadar numune mevcuttur?
3) Numunedeki analit derişimi hangi aralıktadır?
4) Numunedeki hangi maddeler girişim yapabilir?,
5) Numune ortamının fiziksel ve kimyasal özellikleri nelerdir?
6) Kaç numune analiz edilecektir?

Ayrıca, **hız**, **kolaylık**, numune başına **maliyet** de seçimde etkilidir.

Analitik Yöntem Seçimi İçin Sayısal Ölçütler

Performans Özelliği	Sayısal Ölçüt
1. Kesinlik	Mutlak standart sapma, bağıl standart sapma, varyasyon katsayısı, varyans
2. (Sapma) Bias	Mutlak sistematik hata, bağıl sistematik hata
3. Duyarlık	Kalibrasyon duyarlığı, analitik duyarlık
4. Gözlenebilme sınırı(LOD)	Tanık standart sapmasının üç katı + tanık
5. Derişim aralığı	Kantitatif derişim sınırından (LOQ) doğrusallık derişim sınır aralığına (LOL)
6. Seçicilik	Seçicilik katsayısı

Kesinlik

Aynı yoldan elde edilen deney sonuçları arasındaki uyumu gösterir.

Kesinlik, rasgele (veya belirsiz) hataların bir ölçüsüdür.

Terimler	Tanım*
Mutlak standart sapma, s	$s = \sqrt{\dfrac{\sum_{i=1}^{N}(x_i - \bar{x})^2}{N-1}}$
Bağıl standart sapma (RSD)	$\text{RSD} = \dfrac{s}{\bar{x}}$
Ortalamanın standart sapması, s_m	$s_m = s/\sqrt{N}$
Varyasyon katsayısı, CV	$\text{CV} = \dfrac{s}{x} \times 100\%$
Varyans	s^2

*x_i = *i'inci* ölçümünün sayısal değeri.

$\bar{x}$ = N ölçümün ortalaması = $\dfrac{\sum_{i=1}^{N} x_i}{N}$

Sapma (Bias)

Ölçüm ortalaması ile doğru kabul edilen değer arası fark.

$$Sapma = \overline{X} - \mu$$

(Bazı kaynaklarda $\mu - \overline{X}$ verilse de ilk yazılan daha doğru bir yaklaşımdır)

Duyarlık

Bir cihazın ve yöntemin duyarlığı, belirli bir analitik derişimdeki küçük farkları ayırt edebilme kabiliyetinin ölçüsüdür.

Duyarlığı, i) Kalibrasyon grefiğinin eğimi, ii) Ölçümün kesinliği, belirlemektedir.

İki yöntemin kesinliği arasında bir fark olmadığı durumda, doğrudan eğime bakmak yeterlidir. (Eğimler arasında fark yoksa, kesinliğe bakmak gerekir)

$$S = m.C + S_{bl}$$

Burada, S ölçülen sinyal, m eğim, C analitin derişim, ve S_{bl} ise kesim noktasıdır.

Yukarıdaki ifadede kesinliğin bulanmadığı dikkate alınmalıdır.

LOD: Gözlenebilme sınırı (Limit of dedection)

Zemin gürültüsünden farklı olarak tespit edilen fakat miktarı analitik olarak belirlenemeyen en küçük analit derişimidir.

LOQ: Tayin sınırı (Limit of quantification)

Uygun doğruluk ve kesinlikle miktarı saptanabilen en küçük derişimdir.

S: Sinyal (Absorbans veya emisyon şiddeti)

$S_{LOD} = S_b + k\sigma_b$

$S_{LOD} = S_b + 3\sigma_b$ (%95 olasılıkla gözlenebilir sinyal)

S_b = Boş çözeltinin (tanık ya da kör) sinyali

σ_b = Boş çözeltinin (tanık) standart sapması

Yandaki kalibrasyon grafiği için;

$S = mC + S_b$ (C= derişim, m= eğim)

Buradan,

$S_{LOD} = m\,C_{LOD} + S_b$ aynı zamanda $S_{LOD} = S_b + 3\sigma_b$

$S_{LOD} = m\,C_{LOD} + S_b = S_b + 3\sigma_b$

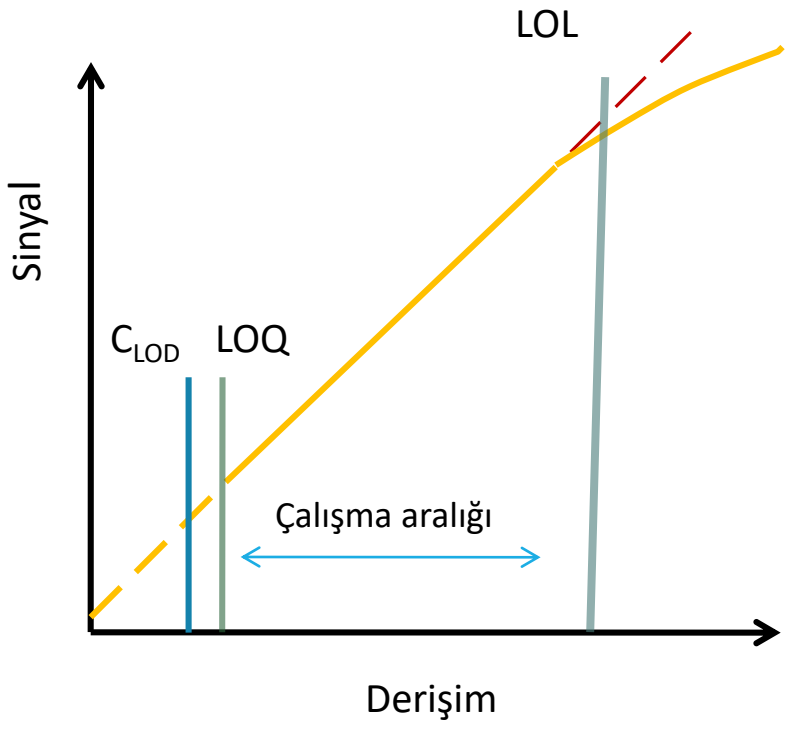
$m\,C_{LOD} + S_b = S_b + 3\sigma_b$

Dolayısıyla; $m\,C_{LOD} = 3\sigma_b$

$C_{LOD} = 3\sigma_b / m$

Aynı şekilde Tayin sınırı k=10 için

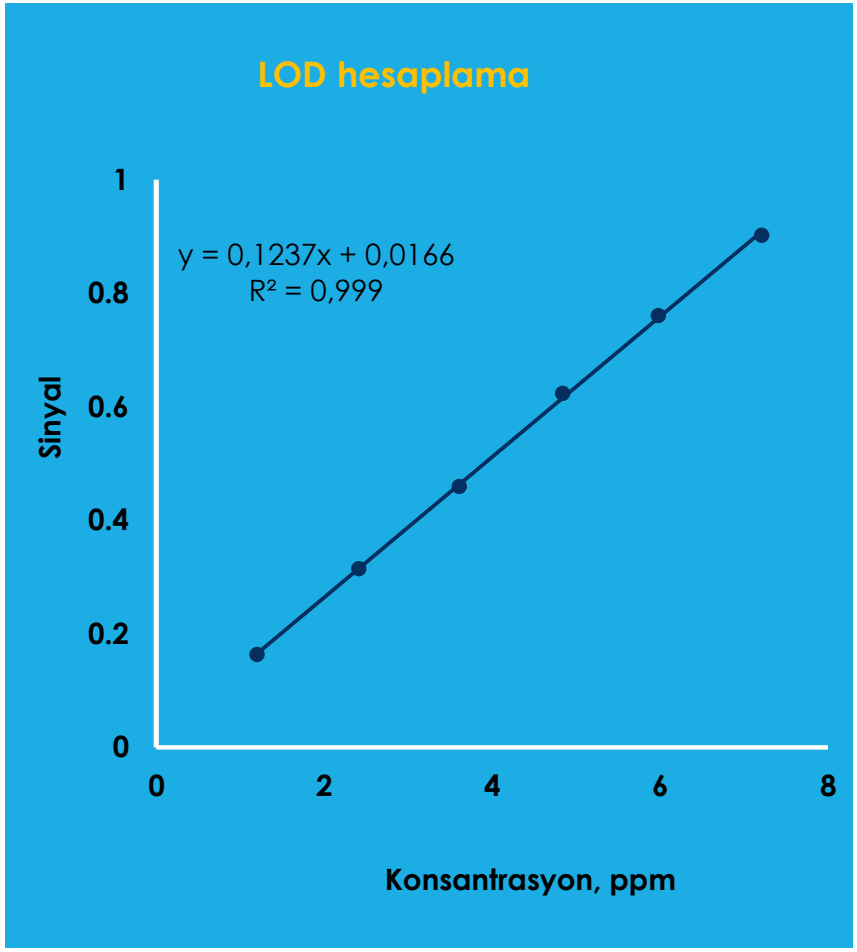
$C_{LOQ} = 10\,\sigma_b / m$



LOD HESAPLAMA ÖRNEĞİ

Analit kons (ppm)	Abs
1,2	0,1634
2,41	0,3145
3,61	0,4594
4,84	0,6233
5,98	0,7601
7,21	0,9019

Tanık okumalar	**X**
	0,0161
	0,0150
	0,0165
	0,0168
	0,0174
	0,0162
	0,0149
	0,0159
	0,0169
	0,0171



Blank okumalar	X	X-Xort	(X-Xort)2
	0.0161	-0.000180	3.24E-08
	0.015	-0.001280	1.6384E-06
	0.0165	0.000220	4.84E-08
	0.0168	0.000520	2.704E-07
	0.0174	0.001120	1.2544E-06
	0.0162	-0.000080	6.4E-09
	0.0149	-0.001380	1.9044E-06
	0.0159	-0.000380	1.444E-07
	0.0169	0.000620	3.844E-07
	0.0171	0.000820	6.724E-07
Toplam:	0.1628		0.000006356
Ortalama:	0.01628		
s:	0.00084		
LOD:	0.020381	ppm	
LOQ:	0.067936	ppm	

$$s = \sqrt{\frac{(x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

LOD: 0.152151

LOQ: 0.199707

Seçicilik (Selectivity):

Beklenen fiziksel/kimyasal girişimler/engelleyiciler (interferences) varlığında söz konusu analitin doğru şekilde ölçülmesi yeteneğidir. Girişime neden olabilecek ve matrikste bulunan maddeler standart üzerine eklenerek girişime neden olup olmadığı kontrol edilir. Referans madde geçerliliği belirlenen metotla analiz edilerek bulunan sonuçlar sertifika değeri ile karşılaştırılır.

Çalışma aralığı (Working range):

Kalibrasyon eğrisinde tayin edilebilen en düşük derişimden, doğrusallıktan sapma gösterdiği derişime kadar olan derişim aralığını kapsar.

YÖNTEMİN GEÇERLİLİĞİ (VALİDASYONU)

Validasyon genel anlamıyla **geçerliğinin doğrulanmasına** karşılık gelmektedir. Kimyasal bir prosesin veya bir analiz sürecinde uygulanan metodun validasyonunun yapılmış olması gerekir.

Bu bakımdan analitik kimyada, validasyon dendiğinde akla metodun validasyonu gelmelidir.

Validasyonu yapılmış bir metot için "**analiz işleminde, prosedüre bağlı kalmak şartıyla güvenle kullanılabileceği**" anlamı çıkarılabilir.

Geçerlilik, (Validasyon) metodun veya ölçüm prosedürünün belirlenen amaçlara uygunluğunun objektif olarak test edilerek yazılı delillerle kanıtlanmasıdır. Bir metodun performansını belirlemek için yapılan bir takım değişkenlere göre test ve ölçme işlemleridir. Çeşitli alanlarda pek çok karar, yapılan ölçümlerin sonucuna dayanılarak verilir. Doğru karar verebilmek için analitik ölçüm sonucunun doğru ve güvenilir (tekrarlanabilir) olması gerekir.

Bir metotla yapılan ölçümün sonuçları laboratuvar koşulları, cihaz, kullanılan kimyasallar, deneyi yapanın deneyimi gibi faktörlere bağlıdır. Bu nedenle metodun ölçüm sonucuna etki eden parametreleri tek tek ölçerek ölçüm sonucuna etkileri belirlenmeli ve ölçülmelidir.

VALİDASYONA NE ZAMAN İHTİYAÇ DUYULUR?

Standart bir metot bir laboratuvarda ilk defa uygulanacağı zaman,

bir analiz için yeni metot geliştirildiği zaman,

kullanılan metotta değişiklik yapıldığında,

geçerliliği belirlenmiş bir metot başka bir laboratuvarda kullanılacağı zaman,

veya farklı bir kişi veya farklı bir cihazla kullanılacağı zaman.

İki metodu karşılaştırmak için, kalite kontrol testleri sonunda metodun performansında zamanla bir değişme olduğu anlaşıldığında metot geçerliliği (validasyonu) yapılır. Uluslar arası kabul edilen çeşitli geçerlilik (validasyon) kriterleri mevcuttur. ISO/IEC, ICH, US EPA, US FDA, USP, cGMP gibi kurumlar tarafından belirlenmiş kriterler kullanılmaktadır.

VALİDASYONLA İLGİLİ DETAYLI BİLGİLER İÇİN KAYNAKLAR

ISO/IEC 17025: General Requirements for the competence of testing and calibration laboratories, 2nd edition, May 2005.

International vocabulary of basic and general terms in metrology (VIM) (BIPM, IEC, IFCC, ISO, IUPAC, IUPAP, OIML, 2nd ed., 1993).

ISO/IEC 17025: General Requirements for the competence of testing and calibration laboratories, 2nd edition, May 2005.

Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 1st edition, Eurachem, Dec. 1998.

GEÇERLİLİK (VALİDASYON) PARAMETRELERİ:

Performans karakteristikleri için öncelikle aşağıdaki temel geçerlilik (validasyon) parametrelerinin belirlenmesi gerekir. Yönteme spesifik farklı parametrelerin de değerlendirilmesi gerekiyorsa onlar da eklenmelidir:

Doğruluk (Accuracy) ve Gerikazanım (recovery)

Tekrarlanabilirlik (Repeatibility) ve uyarlık (reproducibility)

Özgünlük (Specifity)

Seçicilik (Selectivity)

Doğrusallık (Linearity)

Gözlenebilme sınırı (LOD; Limit of Detection)

Tayin sınırı (LOQ; Limit of Quantification)

Çalışma Aralığı

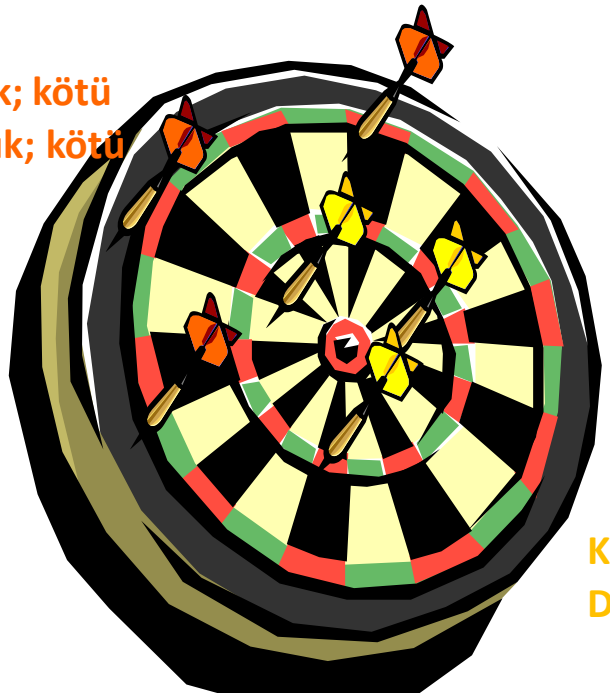
Tutarlılık (Ruggedness)

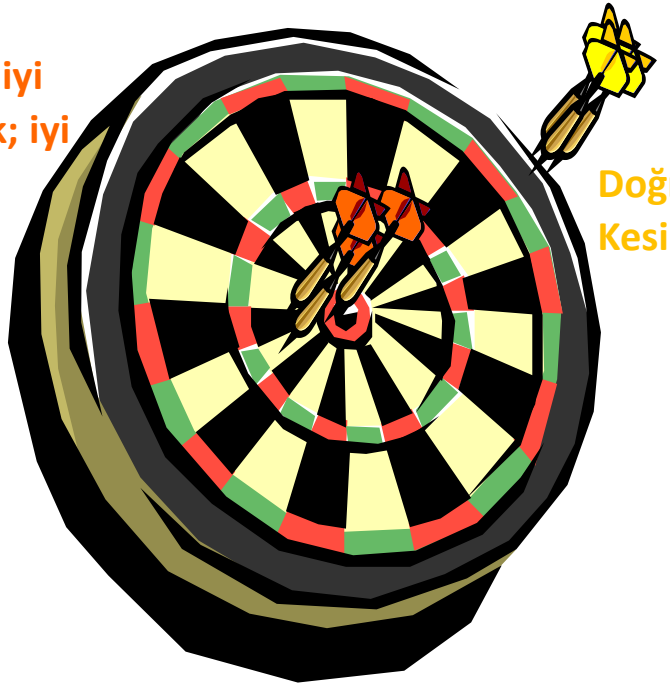
Sağlamlık (Robustness)

TEKRARLANABİLİRLİK (KESİNLİK) & DOĞRULUK

Kesinlik: Ölçüm sonuçlarının birbirlerine yakınlığını (tekrarlanabilirliği) gösterir. Standart sapma, Varyans veya varyasyon katsayısı ile verilir. Tekrarlanabilirlik: Aynı laboratuvar, aynı araştırmacı, aynı cihaz ile *5-6 paralel tayin 3 farklı ortamda, 2-3 farklı derişimle yapılır.*

Doğruluk: Ölçülen değerin doğru ya da doğru kabul edilen değere yakınlığını gösterir, Mutlak hata ya da bağıl hata ile verilir. Uluslar arası bağımsız laboratuvarlar tarafından tayin edilmiş değerleri doğru değer olarak kabul edilen Standart Referans Maddelerin tayininden elde dilen sonuç ile aynı maddenin kullanılan yöntemle elde edilen sonuçları karşılaştırılır.





Geri Kazanım (recovery):

Numune ortamı içindeki analitin tayini ile elde edilen miktarın, saf analitin çözeltisine göre yüzde ne kadar doğrulukta tayin edildiği bilgisini verir. Bu amaçla, en az 3 tane alt, orta ve üst miktarlarda bilinen derişimdeki standart çözeltiler, içinde analit bulunan matrikse eklenir. Sonra, tayin işlemindeki tüm basamaklar yürütülür ve tayin sonucunda bulunan, eklenen miktarla karşılaştırılarak sonuç % hata ile verilir.

Tekrar üretilebilirlik (reproducibility) :

Ölçüm sonuçlarının, farklı kişi, farklı cihaz, farklı laboratuvarda tekrarlanmasıdır.

Farklı şartlardaki KESİNLİĞİ irdeler.

Özgünlük (Spesifity):

Analitik yöntemin sadece amaçlanan bileşen veya bileşenleri tayin edebilme yeteneğidir, sayısal değeri yoktur.

Tutarlılık (Ruggedness):

Aynı örneklerin farklı analizci, alet, seri numarasındaki reaktif, gün, sıcaklıktaki yenilenebilirliğidir. Laboratuvardan laboratuvara, analizciden analizciye, uygun çevresel ve operasyonel şartlar altında test sonuçlarının uyarlığını ölçer.

Sağlamlık (Robustness):

Sağlamlık daha çok metot geliştirme safhasında ve işleme bağlı olarak değerlendirilebilir. Metodun küçük değişmelerle etkilenmeden kalabilme kabiliyetine sağlamlık denir.

YÖNTEMİN KALİBRASYONU

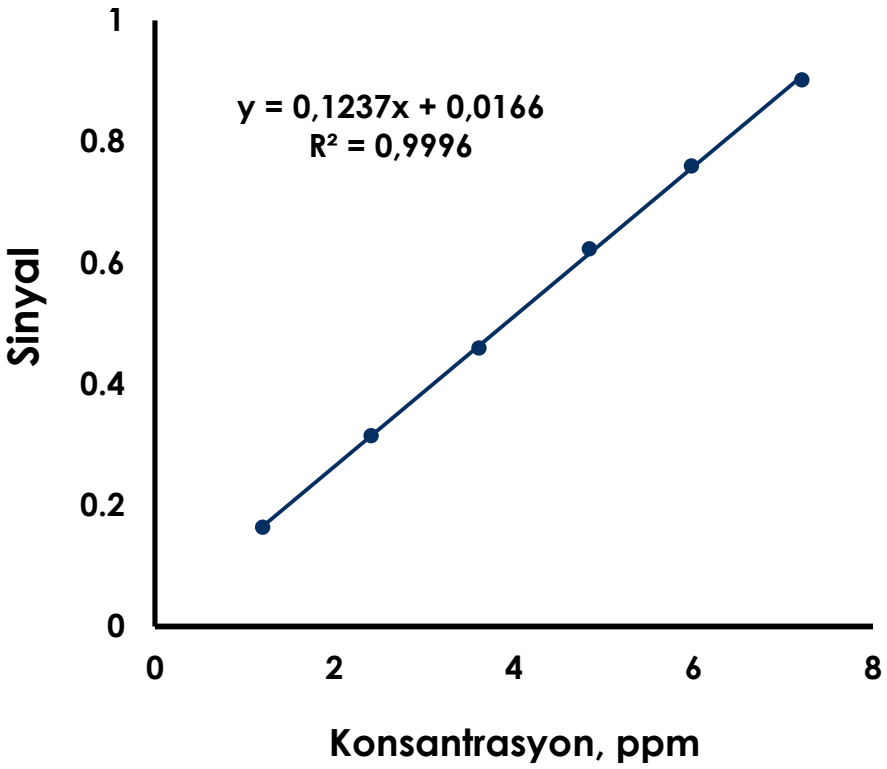
Gravimetri ve kulometri hariç bütün Analitik yöntemler için kalibrasyon gerekir. Yöntemin kalibrasyonu ölçülen analitik sinyal ile analit derişimi arasındaki ilişkinin belirlenmesidir. En çok kullanılan üç yöntem:

1) Kalibrasyon Grafiği yöntemi
2) Standart ekleme yöntemi
3) İç standart ekleme yöntemi dir.

1) Kalibrasyon Grafiği yöntemi (Dış kalibrasyon yöntemi olarak da adlandırılır)

Analit derişimi kesin olarak bilinen birkaç standart çözelti cihaza verilerek sinyal ölçülür. Analit derişimine karşı sinyal grafiğe geçirilir. Kalibrasyon grafiğinin başarısı standart çözelti ortamının, analit çözeltisinin ortamına benzemesine bağlıdır. Ortam hatasını gidermek için ya da azaltmak için girişim yapan maddenin veya analitin ortamdan ayrılması gerekir.

Kalibrasyon Grafiği yöntemi



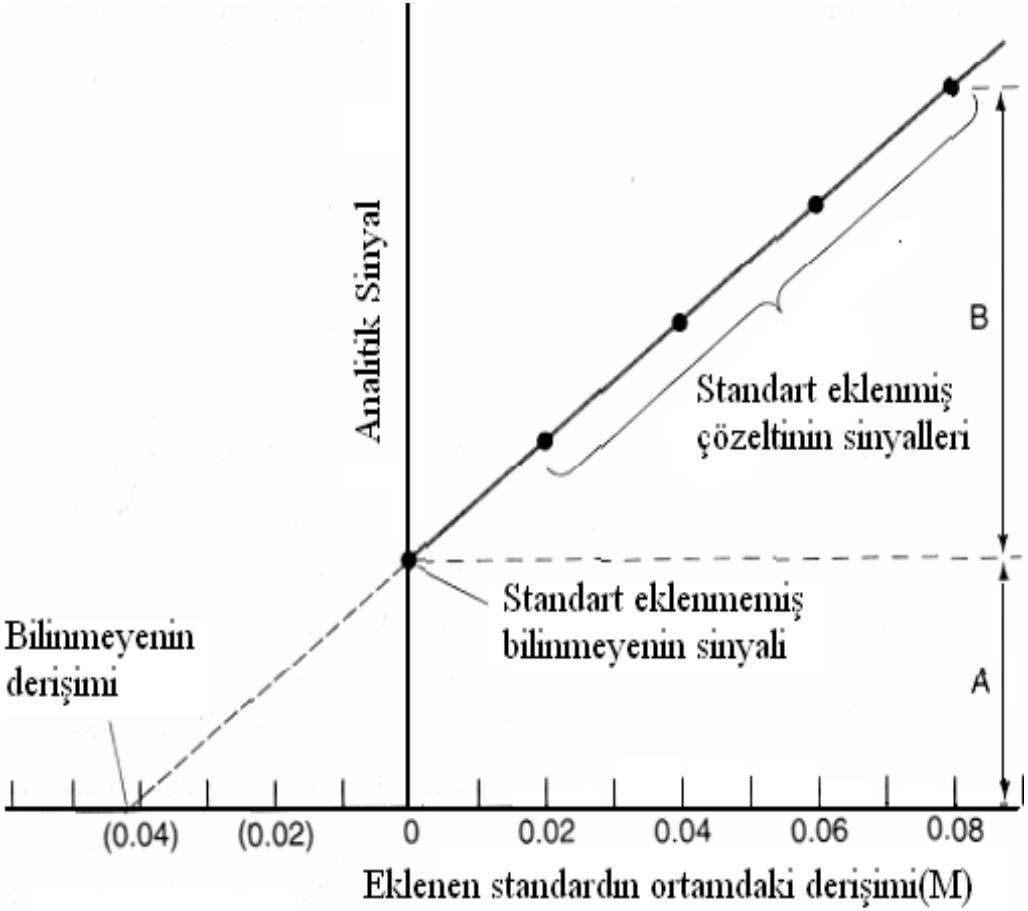
Örnek:
Bilinmeyen derişime karşılık 0,521 sinyal şiddetine karşılık derişimi doğru denkleminden buluruz.

0,521 = 0,1237 X+ 0,0166

X = 4,08 ppm analit

2- Standart Ekleme Yöntemi

Aynı miktarda alınan numunelere, artan derişimlerde standart çözelti ilave edilir. İlk numune çözeltisine ilave yapılmaz. Bu çözeltilerin cihazla sinyalleri ölçülür. Numune çözeltisi hepsinde bulunduğundan ortam yaklaşık olarak aynıdır. Doğrunun X eksenini kesim noktasından numunedeki analit derişimi bulunur veya hesaplanır. Ortam etkisinin olduğu (girişim) karmaşık numunelerin analizinde Standart Ekleme Yöntemi kullanılır.



$$(V_s)^o * C_s = V_x * C_x$$

$A_T = A_{numune} + A_{standart}$ (Standart ekleme grafiğinde A_T toplam absorbans; numune ve standardın absorbansları toplamıdır. Aynı madde olduğundan b ve ε aynıdır.)

$A_T = \varepsilon b C_{numune} + \varepsilon b C_{standart}$

$A_T = 0$ için - $\varepsilon b C_{numune} = \varepsilon b C_{standart}$ - $C_{numune} = C_{standart}$

Girişim etkisi (interferans): Analitik bir işlemde analiti gizleyen veya etkileyen etkidir.

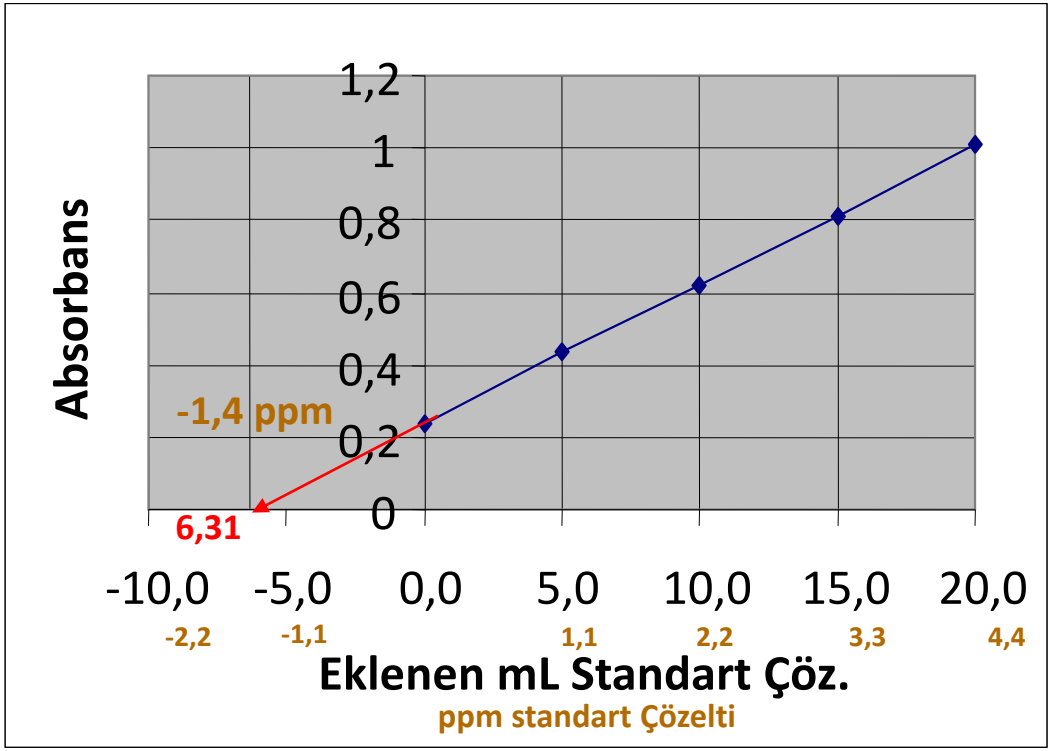
Örnek:

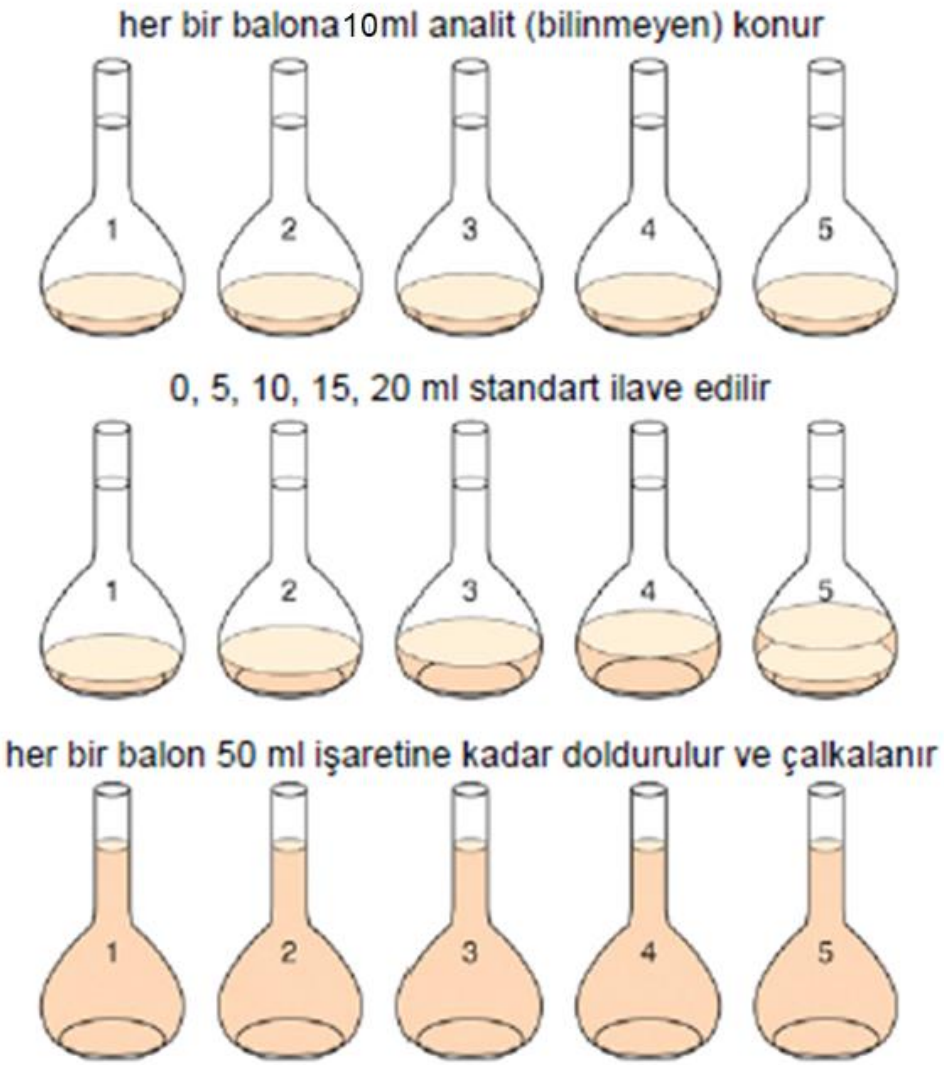
Doğal su numunesinden Fe^{+3} tayini için alınan 10 ar mL lik kısımlar 5 adet 50 mL lik ölçülü balona konmuştur.

11 ppm Fe^{+3} içeren çözeltiden sırasıyla 0,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 ml bu balonlara ilave edilmiştir. Sonra her balona SCN^{-} ilave edilerek kırmızı renkli $Fe(SCN)^{+2}$ kompleksi oluşturulmuştur.

Bütün balonlar 50 ml'ye tamamlanmıştır.

Çözeltilerin absorbansı kolorimetrede sırasıyla 0,240; 0,437; 0,621; 0,809; 1,009 olarak ölçülmüştür. Su numunesindeki Fe^{+3} derişimi nedir ?





Eklenen standart çözeltinin derişimi hesaplanarak sinyale karşı grafiğe geçirilerek de bilinmeyen grafikten bulunabilir.

5x11/50=1,1 ppm

10x11/50= 2,2 ppm

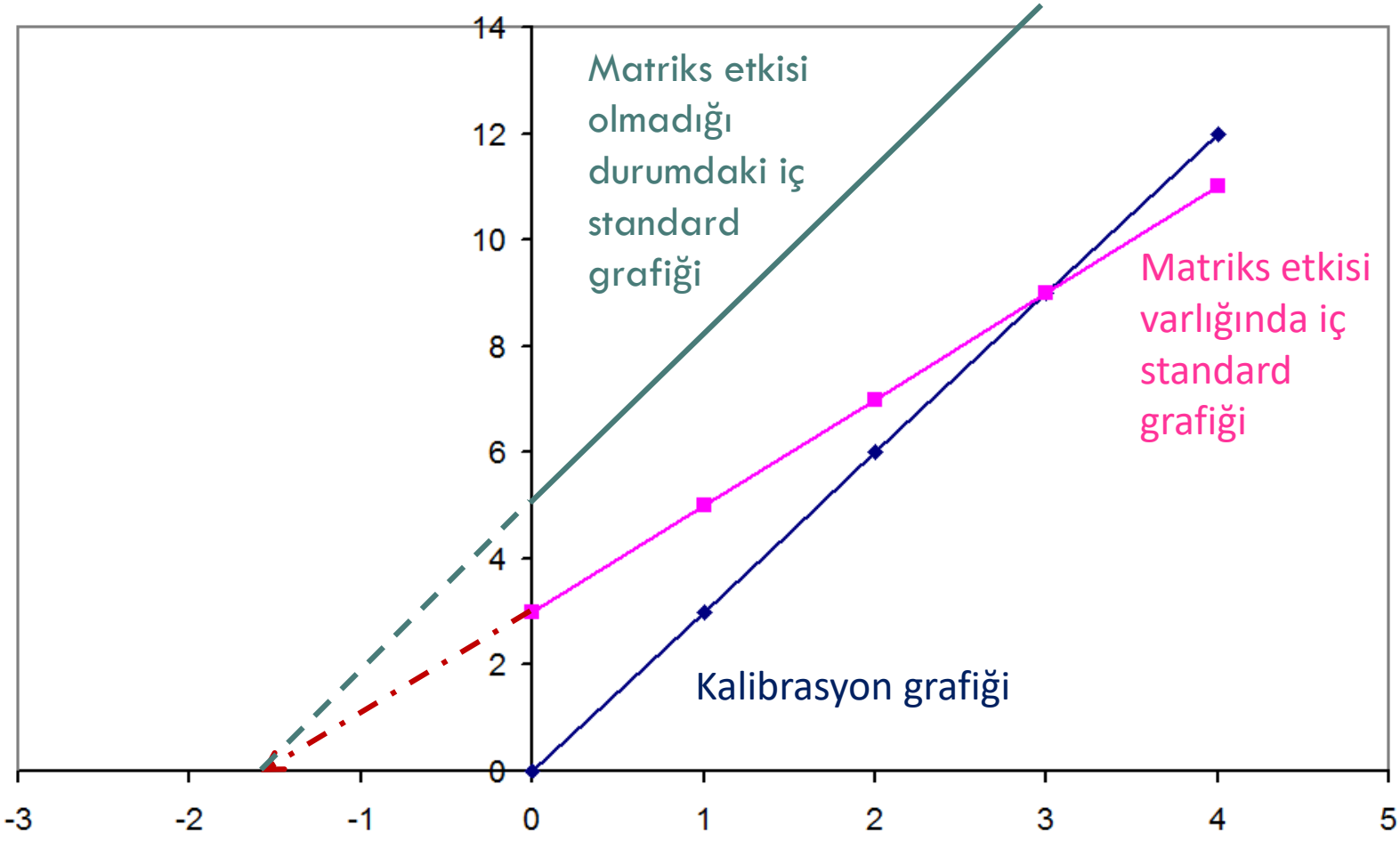
15x11/50=3,3 ppm

20x11/50= 4,4 ppm

Bilinmeyen 1,4 ppm (grafikten)

1,4 x 50/10 = 7,0 ppm

Örnek 2: Girişime sebep olan türlerin varlığında (matriks etkisi) kalibrasyon grafiklerinin durumu



3- İç Standart Ekleme Yöntemi

İç standart, bir analiz işleminde numuneye, tanık çözeltisine ve kalibrasyon standartlarına belirli miktarda eklenen maddedir.

İç standart metodunda, kalibrasyon grafiği analit sinyalinin iç standart sinyaline oranı olarak grafiğe geçirilir. Yatay eksen yine analitin bilinen derişimini gösterir. Bu oran kullanılarak analit derişimi belirlenir.

İç standart uygun biçimde seçilmişse, <u>sistematik hatalar</u> giderilebilir. İç standart olarak seçilen madde, numunede bulunmadığı bilinen maddelerden seçilmelidir. <u>Analit ile aynı yerde sinyal vermemelidir</u>. <u>Ancak kimyasal özellikleriyle analite benzemelidir.</u>

Örneğin, kanda sodyum ve potasyum tayinlerinde lityum iyi bir iç standarttır. Çünkü kimyasal davranışı sodyum ve potasyuma benzemekle beraber kanda bulunmaz.

İÇ STANDART KALİBRASYONUYLA HESAPLAMA YÖNTEMİ

- İç standart miktarı sabit, analit miktarı değişken olan (farklı mX/mS değerlerinde) bir seri standart hazırlanır.
- Her birinin kromatogramları alınır.
- Standartların kromatogramlardan hesaplanan A_X/A_S değerlerinin m_X/m_S değerlerine karşı grafiği çizilir.
- Eğrinin eğimi respons faktörü olarak kabul edilir.
- 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.

2) KALİBRASYON EĞRİSİYLE İS HESAPLAMA YÖNTEMİ ÖRNEK

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

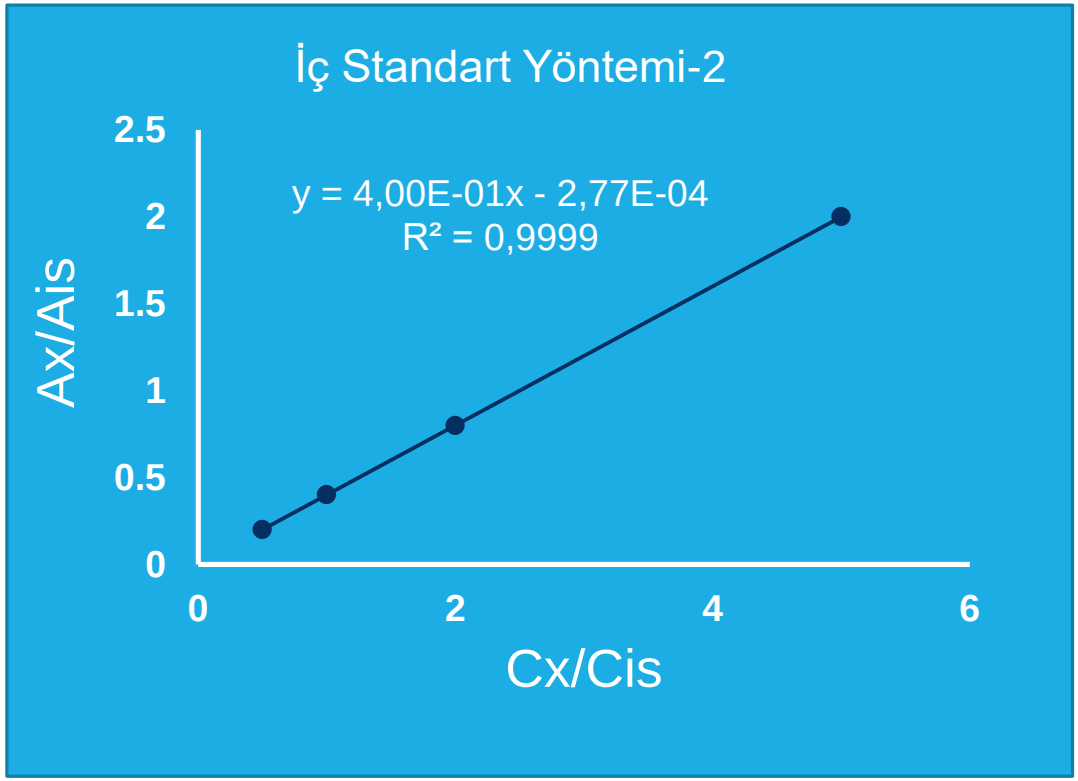
- Her standartta 5,00 mg/mL iç standart vardır.
- A_X/A_{IS} değerleri, C_X/C_{IS} değerlerine karşı grafiğe alınır.
- Kalibrasyon eğrisi, eğimi respons faktörü olan bir doğrudur.
- Örneğin analizi için örneğe bilinen miktarda iç standart (C_{IS}) ilave edilir ve hazırla-nan karışım cihaza injekte edilir.
- A_X/A_{IS} değeri ölçülür.
- Kalibrasyon verilerinden C_X/C_{IS} değeri tayin edilir ve C_X hesaplanır.

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

A_x , A_{is} analit ve iç standart için responslar
C_x , C_{is} injekte edilen analit ve iç standardın konsantrasyonları

2) KALİBRASYON EĞRİSİYLE HESAPLAMA YÖNTEMİ ÖRNEK

Standart	X, mg/mL	İS, mg/mL	Cx/Cis	Ax	Ais	Ax/Ais
1	2,50	5,00	0.500	120	600	0,200
2	5,00	5,00	1,00	241	601	0,401
3	10,0	5,00	2,00	480	602	0,797
4	25,0	5,00	5,00	1198	599	2,00



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

$$C_x = C_{is} \times 1/R_{x/is} \times A_x/A_{is}$$

$$C_{x,gerçek} = C_x \times \text{Seyrelme faktörü}$$

A_x , A_{is} analit ve iç standart için responslar

C_x , C_{is} injekte edilen analit ve iç standardın konsantrasyonları

İÇ STANDART KALİBRASYON EĞRİSİYLE HESAPLAMA YÖNTEMİ ÖRNEK

Etanol e karşılık olarak propanol İS için cevap faktörü (**$R_{x/is}$**) 0,400 olarak bulunmuştur.

Bilinmeyen bir miktarda propanol içeren 10,0 mL lik örneğe 10,0 mL 4,00 ppm etanol İS eklenerek çözelti hacmi 25,0 mL ye tamamlanmıştır. Bu çözeltiden alınan kromatogramlardan pik alanları propanol için 2520 ve etanol (İS) için ise 1481 olarak bulunmuştur.

Propanol derişimini bulunuz.

$$C_X = C_{is} \times 1/R_{x/is} \times A_X/A_{is}$$

$$C_{X,gerçek} = C_X \times \text{Seyrelme faktörü}$$

$$C_{is} = 4{,}00 \times 10{,}0 / 25{,}0 = 1{,}60 \text{ ppm}$$

$$C_X = 1{,}60 \text{ ppm} \times 1 / 0{,}400 \times 2520/1481 = 6{,}81 \text{ ppm propanol}$$

$$C_{X,gerçek} = 3{,}17 \times 25/10 = 17{,}0 \text{ ppm propanol}$$