

Deneysel İşlem

a. Kalibrasyon Eğrisi Çizilerek Konsantrasyon Belirlenmesi

- Stok standart çözelti (%100 mg'lık potasyum permanganat, KMnO_4) ve konsantrasyonları bilinmeyen KMnO_4 çözeltileri kullanılarak aşağıdaki tabloya göre tüpler hazırlanır:

Çözeltiler (mL)	Tüpler						
	Kör	St ₁	St ₂	St ₃	St ₄	Bilinmeyen 1 (N ₁)	Bilinmeyen 2 (N ₂)
Standart (% 100 mg KMnO_4)	-	2	4	6	8	-	-
Distile su	8	6	4	2	-	-	-
Bilinmeyen 1	-	-	-	-	-	8	-
Bilinmeyen 2	-	-	-	-	-	-	8

- Köre karşı her bir tüpün 410 nm'deki optik dansitesi (absorbans) okunur.
- Konsantrasyonlar apsiste optik dansiteler (absorbans) ordinatta olmak üzere standart tüplerin optik dansiteleri ve konsantrasyonlarının kesişim noktaları birleştirilerek standart eğri çizilir.
- Daha sonra bilinmeyen tüplerin optik dansitelerine karşılık gelen konsantrasyonlar bu eğriden bulunur.

b. Tek Standart Yardımı ile Konsantrasyon Belirlenmesi

- Stok standart çözeltiden (% 100 mg'lık KMnO_4) 2 mL alınıp üzerine 8 mL distile su ilave edilir (standart tüpü).
- Köre karşı bu standart tüpün ve bilinmeyen çözelti bulunan tüpün absorbanları 410 nm'de okunur. Numune konsantrasyonu aşağıdaki eşitlikten hesaplanır:

$$C_N (\% \text{mg}) = A_N \cdot C_{st} / A_{st}$$

Spektrofotometrik Ölçüm

A- Ölçümün Yapılışı

- Spektrofotometrik ölçüm yapmak için konsantrasyonu ölçülecek maddenin çözeltisi ile aynı maddenin konsantrasyonu bilinen standart çözeltisi **eşit şartlarda analiz edilir**. Bu amaçla üç basamaklı (I-III) bir işlem dizisi gerçekleştirilir.
 - I- Tüplerin hazırlanması
 - *Kör tüpü,*
 - *Standart tüpü*
 - *Numune tüpü*
 - II- Dalga boyu seçimi
 - III- Okuma

I- Tüplerin hazırlanması

Kör, standart ve numune olmak üzere üç deney tüpü hazırlanır.

- **Kör tüpü:** Spektrofotometrede okuma yapmadan önce absorbansı (A) sıfır veya % transmittansı (%T) 100'e ayarlamak veya aranan madde hariç, kuvvet, çözücü ve reaktif ile numunedeki diğer maddelerden kaynaklanan non-spesifik absorbsiyonların veya transmittansların tespit edilerek analiz ölçümüne etkilerini sıfırlamak için hazırlanan tüptür.

Kullanılan materyale göre üç tip kör söz konusudur.

- **a. Optik kör:** Su, kloroform, alkol gibi sıvıların kullanıldığı tüptür. Renksiz, berrak çözeltilerden ve kuvetten gelebilecek A veya T hatalarını ortadan kaldırmak için kullanılır.
- **b. Reaktif körü:** Bulanık veya renkli reaktifler kullanıldığında içinde reaktif olan tüp olup, reaktifin renginden ve kuvetten gelebilecek A veya T hatalarını ortadan kaldırmak için kullanılır.
- **c. Numune körü:** Renkli veya bulanık numunelerin kullanıldığı (bulanık veya lipemik serum gibi) çalışmalarda numunenin renginden ve kuvetten dolayı gelebilecek A veya T hatalarını ortadan kaldırmak için hazırlanan ve sadece numune bulunduran tüptür.

- Spektrofotometre optik köre karşı sıfıra ayarlanmışsa reaktif körünün absorbansı, standart ve numunenin absorbansından çıkarılır. Numune körünün absorbansı ise sadece numunenin absorbansından çıkarılarak hesaplama yapılır.
- **Standart tüpü:** İçerisinde aradığımız maddeden bilinen miktarda bulunan tüptür veya aranan maddenin (analitin) bilinen konsantrasyondaki çözeltisidir.
- **Numune tüpü:** Konsantrasyonunu araştırdığımız maddeyi içeren tüptür veya içindeki madde miktarını tayin etmek istediğimiz çözeltidir.

II- Dalga boyu seçimi

- Spektrofotometrik olarak ölçümü yapılacak olan maddeye ait önceden tespit edilmiş, **maksimum ışık absorbladığı** dalga boyu seçilir. Alet bu dalga boyuna ayarlanır.
- Okuma kuvetine kör tüpünden bir miktar aktarılarak okuma haznesine yerleştirilir. A, sıfır veya T, 100 olacak şekilde ayarlanır.

III- Okuma

- Sırasıyla standart ve numune tüplerinden okuma kuvvetlerine aktarılan çözeltilerin absorbands (A) veya transmittansları(T) okunarak kaydedilir.

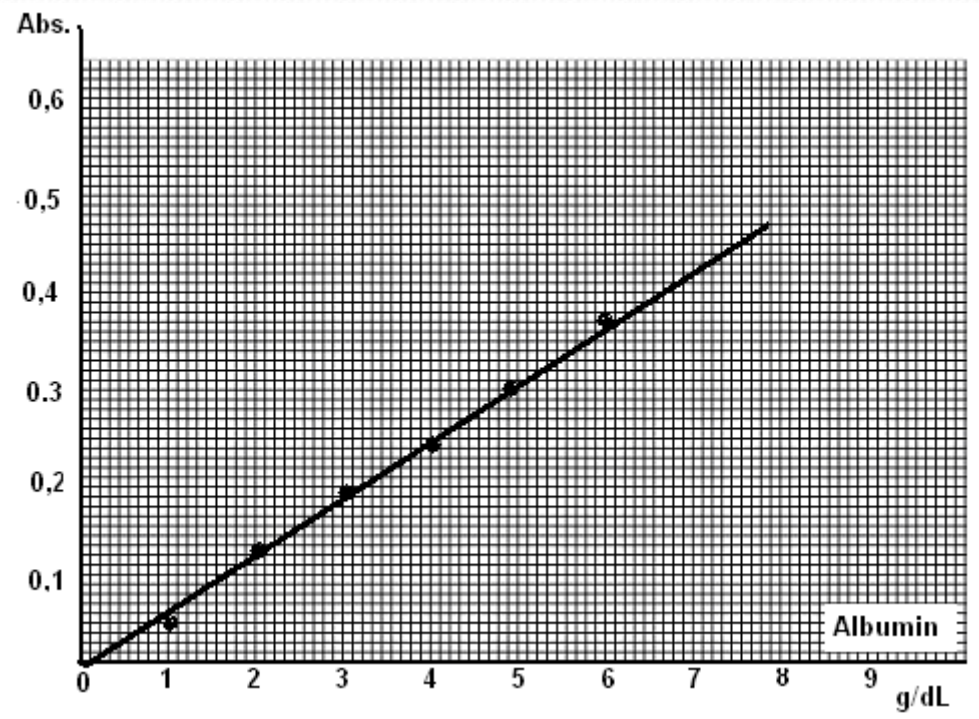
B- Sonuçların Değerlendirilmesi

Spektrofotometreden okunan A ve T'ler iki şekilde değerlendirilir:

- *i. Standart (Kalibrasyon) Eğri Yöntemi*
- *ii. Nokta Standart Yöntemi*

i. Standart (Kalibrasyon) Eğri Yöntemi

- Yüksek konsantrasyonda hazırlanmış olan bir çözeltiden (stok çözelti) bir seri seyreltme yaparak değişik konsantrasyonlarda standart tüpleri hazırlanır.
- Hazırlanan standart tüplerinin konsantrasyonları, numunelerin değerlendirilebileceği aralıkta olmalıdır. Bu standart tüpler köre karşı spektrofotometrik olarak ölçülür. Konsantrasyona karşı, A veya %T eğrisi çizilir. Bu eğriye **kalibrasyon (standart) eğrisi** denir.
- **Aynı şartlarda** çalışılan numune tüplerinden elde edilen A ve T değerleri, bu eğriden karşılık gelen konsantrasyonlar bulunarak değerlendirilir.



ii. Nokta Standart Yöntemi

Tek bir standart tüpü ve paralelinde hazırlanan bir veya daha fazla sayıda numune tüpünde reaksiyon tamamlandıktan sonra belirli dalga boyunda okumalar yapılır .

Standart ve numune tüplerinden elde edilen okumalar karşılaştırmalı değerlendirilir. Bu değerlendirme

$$A = a.b.c$$

eşitliğinden yararlanarak yapılır. Eşitlik standart ve numune için yazılacak olursa:

$$A_{st} = a.b.c_{st}$$

$$A_N = a.b.c_N$$

olur. a ve b standart ve numune için sabit olduğundan

$$A_{st}/A_N = C_{st} / C_N$$

yazılabilir.

Buradan numunenin konsantrasyonu

$$C_N = A_N \cdot C_{st} / A_{st}$$

olur. Burada,

- A_N = Numunenin absorbanı
- A_{st} = Standardın absorbanı
- C_N = Numunenin konsantrasyonu
- C_{st} = Standardın konsantrasyonu

Standart kullanılmayan durumlarda **absorbtivite katsayısından** faydalanılır. Absorbtivite katsayısı bir sabit olup absorbans veren maddeye spesifiktir (her madde için farklıdır, ayırt edici özelliktir)

$$A = a b c$$

Bu formülde A cihazla ölçülür, b ışık yolu olup küvetin genişliğidir (bu değer genellikle 1 cm'dir) ve a ölçülen maddeye özgü sabittir.

- Enzimatik reaksiyonlarda **kinetik okuma** yapılır. Burda enzimatik reaksiyon devam ederken belli bir zaman aralığında birden fazla absorbans ölçümü yapılır. Birim zamandaki absorbans değişiminden **enzim aktivitesi** hesaplanır.

- Enzim aktivitesi (IU\L) =
$$\frac{A_2 - A_1 (\Delta A)}{dk} \times \frac{10^6}{\epsilon \cdot b} \times \frac{\text{Toplam hacim}}{\text{Numune Hacmi}}$$

- $\Delta A/dk$: Dakikadaki absorbans değişimi
- 10^6 : Molü mikromole çevirme faktörü
- ϵ : Molar absorbtivite katsayısı
- b : Işık yolu (cm)

Bir dakikada bir mikromol (μmol) substratı ürüne dönüştüren veya 1 μmol ürün oluşturan enzim miktarına **internasyonal enzim ünitesi (IU)** denir. Enzim aktivitesi, U/L (veya mU/L) olarak ifade edilir.