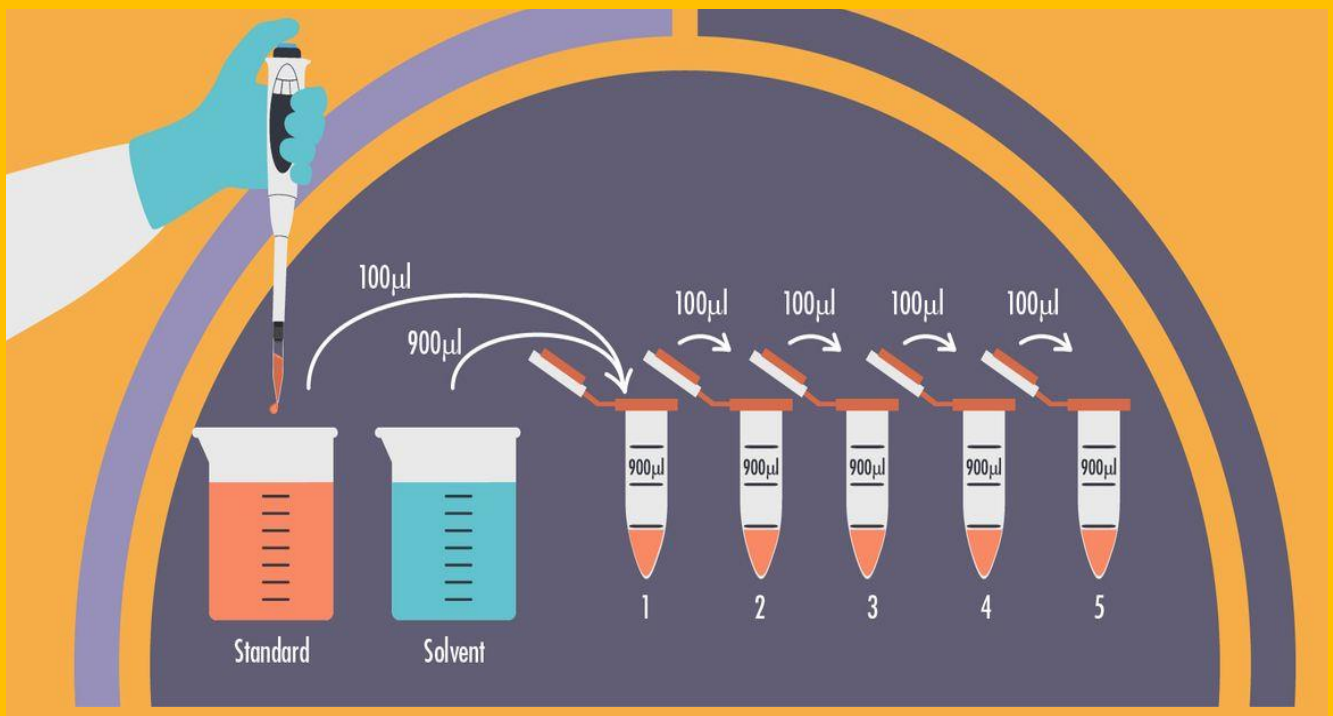
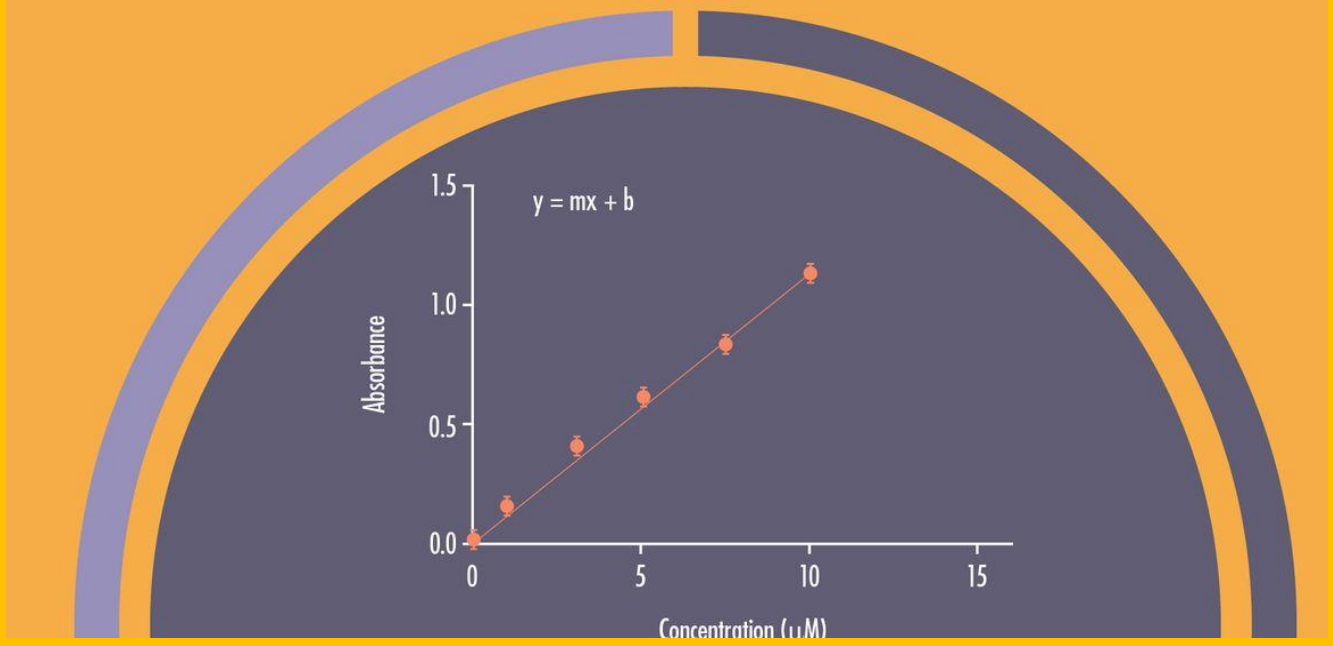
كيف نعمل منحنى معايرة





الأستاذ الدكتور ضياء فالح الفكيكي

• ما هو منحنى المعايرة؟What is a calibration curve?

غالبًا ما تستخدم منحنيات المعايرة في العديد من المجالات ، بما في ذلك الكيمياء التحليلية والكيمياء الحيوية. يتم استخدام منحنى المعايرة لتحديد تركيز عينة غير معروفة ، ولحساب حد الاكتشاف ، وحدود الكميات. يتم إنشاء المنحنى من الاستجابة الآلية لمجموعة من العينات القياسية في نطاق من التركيزات. يتم بعد ذلك ملاءمة البيانات مع وظيفة لتمكين التنبؤ بالتركيزات غير المعروفة.

• ما هو مقياس الطيف الضوئي المرئي فوق البنفسجي(UV-Vis) ؟

مقياس الطيف الضوئي UV-vis هو أداة تستخدم لقياس انتقال وامتصاص الضوء لتحديد تركيز المادة التحليلية في المحلول.

يتكون مقياس الطيف الضوئي بالأشعة المرئية وفوق البنفسجية من مصدر ضوء ومحدد الطول الموجي وكاشف وجهاز كمبيوتر. قد يكون مصدر الضوء مصباح زينون واحد أو مصباح تنجستن أو هالوجين ومصباح ديوتيريوم. يمكن اختيار الأطوال الموجية للضوء المطلوبة لاكتشاف المادة التحليلية باستخدام أحادي اللون أو مجموعة متنوعة من المرشحات المختلفة.

الهدف من التحليل النوعي هو الإجابة على سؤال "ماذا" في العينة؟
منحنى معايرة:HPLC

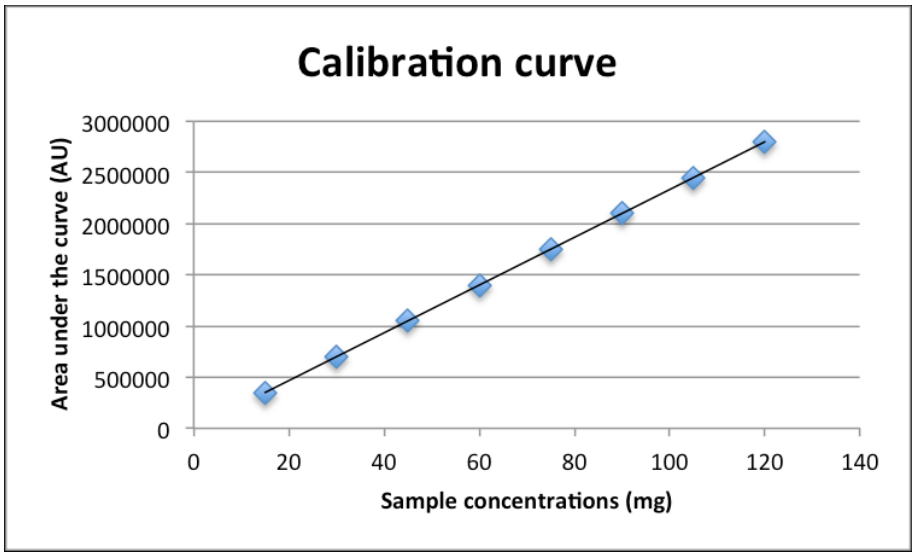
Calibration Curve

يشير الاختصار HPLC إلى كروماتوغرافيا سائلة عالية الأداء. "الكروماتوغرافيا" هي عملية فصل، و "كروماتوجرام" هو ناتج الفصل ، و "كروماتوجراف" هو الجهاز المستخدم لأداء كروماتوغرافيا.

من بين التقنيات المختلفة التي تم إنشاؤها للاستشراب، تعد الأعمدة والمضخات عالية الأداء لتزويد المذيبات بمعدل تدفق ثابت من بين أهم مكونات أجهزة الكروماتوغرافيا. نظرًا لأن التقنيات المرتبطة أصبحت أكثر تقدمًا ، تم اختصار النظام المعروف سابقًا باسم كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء إلى ."LC" كما نمت شعبية الكروماتوغرافيا السائلة فائقة الأداء (UHPLC) ، القادرة على التحليل عالي السرعة ، في السنوات الأخيرة.

يمكن استخدام HPLC فقط لفحص المواد المذابة في المذيبات. يفصل HPLC المواد المذابة في عينة سائلة ويسمح بإجراء فحص نوعي وكمي لمكونات العينة وتركيزاتها.

منحنى المعايرة مطلوب لتحديد تركيز المواد لتحليلية في العينة.



ا

يتم قياس العديد من التركيزات لتوليد خط خطي ، وهو منحنى المعايرة. تحتوي هذه التركيزات على تركيزات أقل وأكبر من التركيز المتوقع للمادة التحليلية في العينة الفعلية. عندما يكون تركيز المادة التحليلية في العينة الفعلية غير معروف ، فمن المعتاد إنشاء منحنى معايرة باستخدام ما لا يقل عن ثمانية تركيزات مختلفة للعينة.

نظرًا لأن التركيز المتوقع للتحليل في العينة الفعلية معروف ، يمكن تقليل عدد تركيزات العينة المطلوبة لمنحنى المعايرة.

كيفية تحضير منحنى معايرة:HPLC

تتطلب طرق HPLC المعايرة من أجل إنتاج نتائج كمية. تأتي معايرة HPLC في مجموعة متنوعة من الأشكال ، ولكل منها مزاياها وعيوبها. الهدف هو اختيار الأفضل وتجنب العديد من الأخطاء الصغيرة على طول الطريق ، حيث لا أحد يريد حلاً شبه مثالي.

الخطوة 1: ضع بعض الافتراضات الأولية والنوعية حول أنواع العوامل التي قد تكون موجودة في عينتك. لنتخيل أن السكريات ، الجلوكوز والجلاكتوز وهيدروكسي ميثيل فورفورال (HMF) موجودة في عينتك.

الخطوة 2:

قدم حلًا مرجعيًا يمثل جميع الأجزاء ، بشكل إجمالي وفرد. يمكن استخدام محلول مخزون 6 جم / لتر يجمع بين الجلوكوز والجالاكتوز و HMF لتوليد خمسة محاليل قياسية مختلفة عبر التخفيف التسلسلي. استخدم تركيزات 6 جم / لتر جلوكوز و 6 جم / لتر جالاكتوز و 6 جم / لتر HMF للمكونات المنفصلة. يكشف هذا الإجراء عن وقت الاستبقاء (الوقت اللازم لمغادرة العمود) لكل مكون في العينة

الخطوة 3

قم بتحليل جميع الحلول القياسية عن طريق الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) ، مع ملاحظة منطقة الذروة ووقت الاستبقاء

الخطوة 4:

قم بإنشاء منحنى المعايرة (الرسم البياني) ، وهو مخطط منطقة الذروة مقابل التركيز ، في برنامج Excel أو أي برنامج آخر مناسب. قم بإنشاء خط مستقيم يناسب بياناتك بشكل أفضل في الرسم البياني الخاص بك. تأكد من أن معامل التحديد أو الارتباط قريب جدًا من 1.

الخطوة الخامسة:

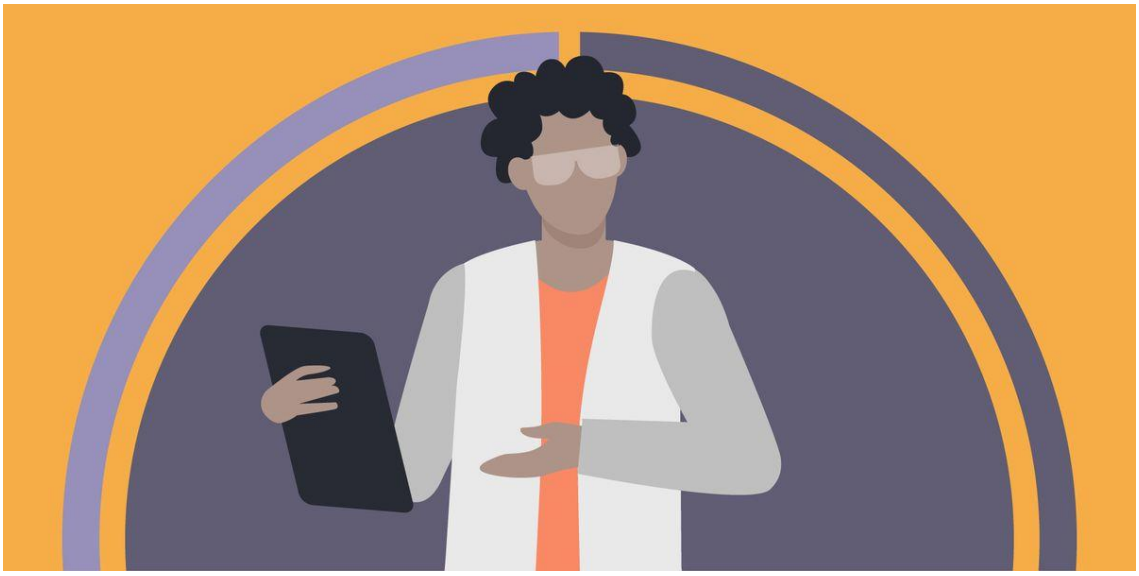
خمسة ، قم بتحليل عينتك باستخدام كروماتوغرافيا سائلة عالية الأداء (HPLC) ، مع ملاحظة منطقة الذروة ومدة الاستبقاء. يمكن بعد ذلك حساب تركيز كل مكون في عينتك باستخدام منحنى المعايرة الذي أنشأته في الخطوة 4.

Calibration curves

This guide will describe the process for preparing a calibration curve, also known as a standard curve.

What is a calibration curve?

Calibration curves are often used in many fields, including analytical chemistry and biochemistry. A calibration curve is used to determine the concentration of an unknown sample, to calculate the limit of detection, and the limit of quantitation. The curve is created from the instrumental response to a set of standard samples at a range of concentrations. The data are then fit with a function to enable the prediction of unknown concentrations.

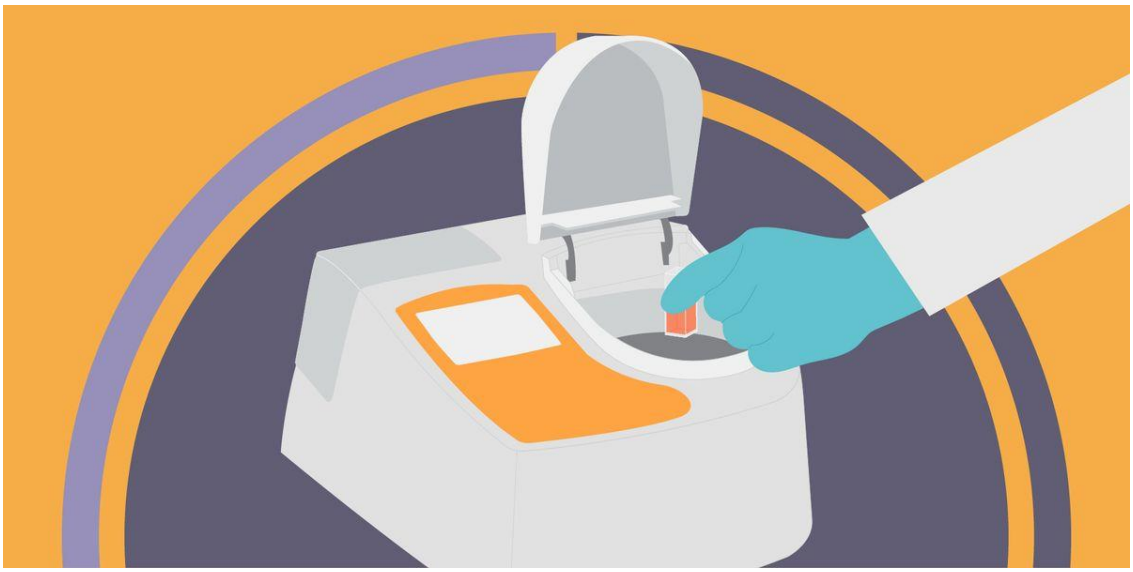


Lab Manager

What is an ultraviolet-visible (UV-Vis) spectrophotometer?

A UV-vis spectrophotometer is an instrument used to measure the transmission and absorption of light to determine the concentration of an analyte in solution.

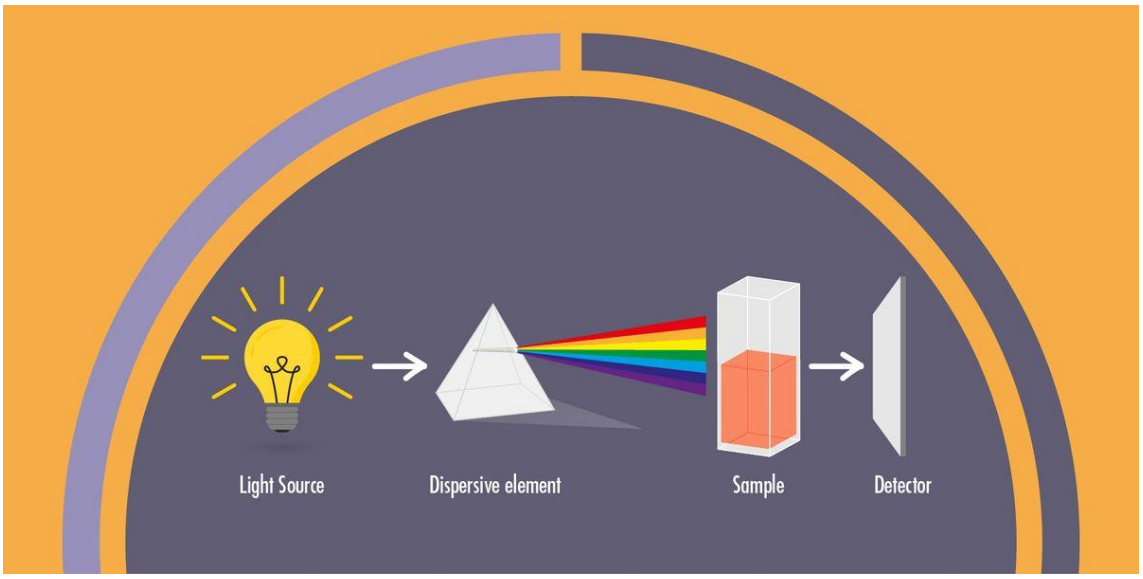
The UV-Vis spectrophotometer consists of a light source, a wavelength selector, a detector, and a computer. The light source may be a single xenon lamp, or a tungsten or halogen lamp and a deuterium lamp. The wavelengths of light required for analyte detection may be selected using a monochromator or a variety of different filters.



Lab Manager

How does a UV-Vis spectrophotometer work?

The UV-Vis light passes through the sample and reaches the detector. The transmittance is measured and used to calculate the absorbance. An absorption spectrum is obtained with absorbance plotted on the vertical y-axis and wavelength plotted on the horizontal x-axis.



Lab Manager

What you will need to make a calibration curve:

- Personal protective equipment (gloves, lab coat, eye protection, etc.)
- Standard solution
- Solvent

- Pipette and tips
- Volumetric flasks or microtubes
- UV-Vis spectrophotometer
- Cuvettes
- Computer

Lab Manager

Step 1: Make a concentrated stock solution

Prepare a concentrated stock solution of the standard by weighing the solute and transferring it to a volumetric flask with solvent.
See this step-by-step guide for making aqueous solutions.

Step 2: Make the standards for the calibration curve

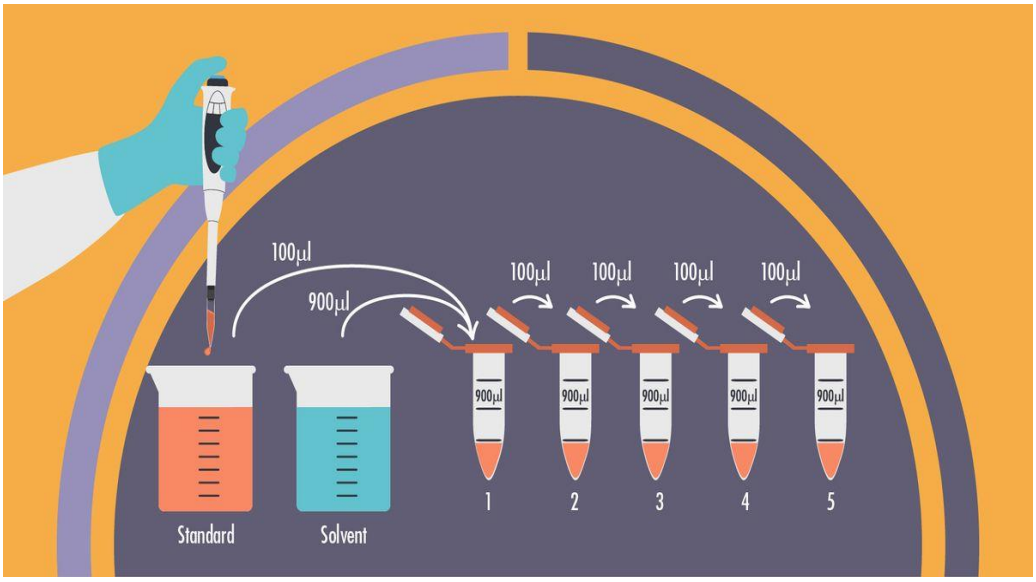
Perform a serial dilution

Label a series of volumetric flasks or microtubes. A minimum of five standards are recommended for a good calibration curve.

Pipette the required volume of standard into the first flask or microtube. Change the pipette tip, add the required volume of solvent to the same flask or microtube, then mix.

Repeat this process by pipetting from the previous solution to the new flask or microtube and adding solvent.

For more details, see the step-by-step guide to serial dilutions.

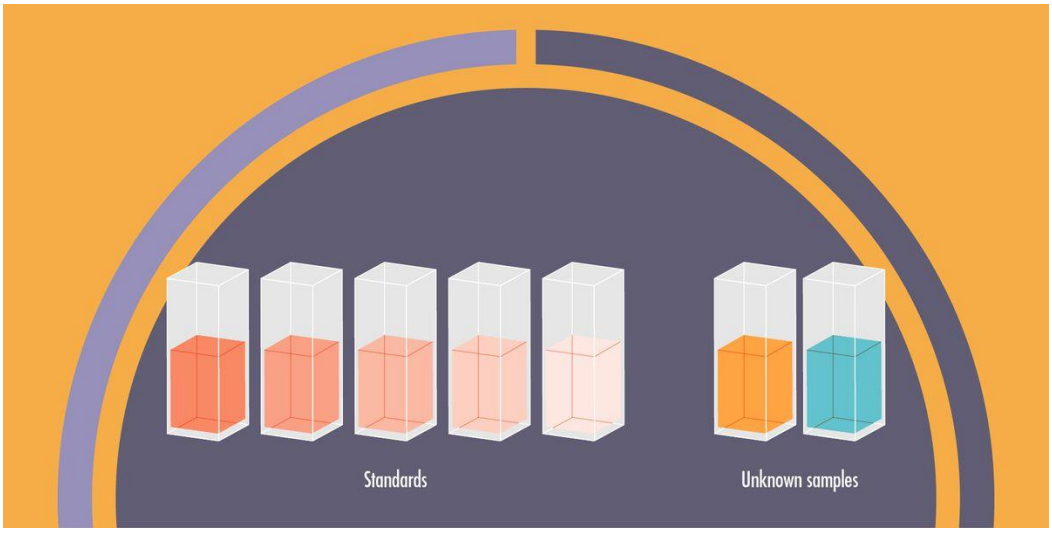


Lab Manager

Prepare the samples and unknowns

Transfer the standards to cuvettes.

Transfer the unknown samples to cuvettes. The unknown samples should have the same buffer and pH as the standards.

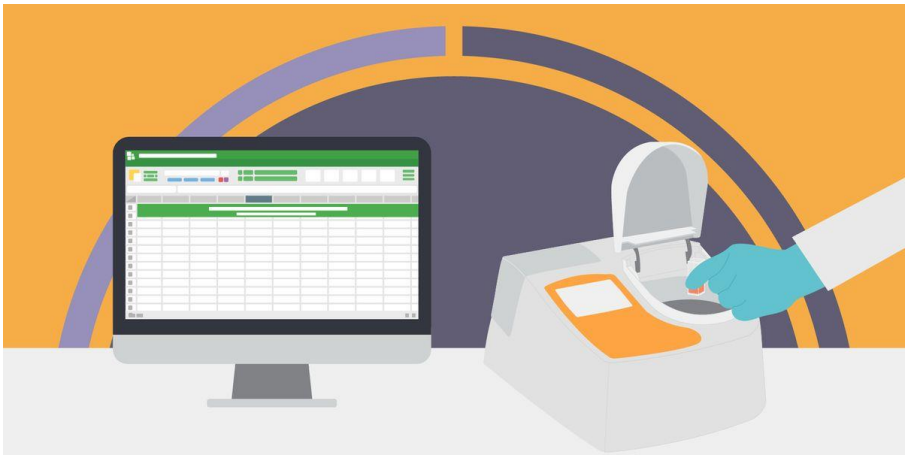


Lab Manager

Step 3: Run the standards and samples in the spectrophotometer

Place each standard in the UV-Vis spectrophotometer and obtain a reading. Obtain between three and five readings for each standard and record the data in a spreadsheet.

Repeat with the unknown samples.



Lab Manager

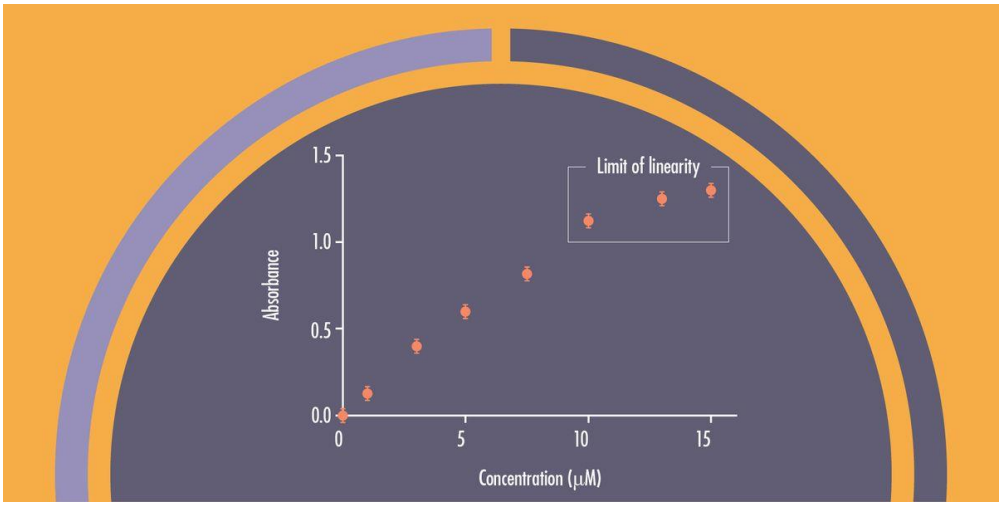
Step 4: Plot the data

Plot the data with absorbance on the y-axis and concentration on the x-axis.

If samples were measured in triplicate, use this data to determine the standard deviation and add error bars.

Step 5: Examine the calibration curve

Examine the plot. The calibration curve should look linear and have a section that is non-linear—this is the limit of linearity (LOL), a sign that instrumental detection is nearing saturation.



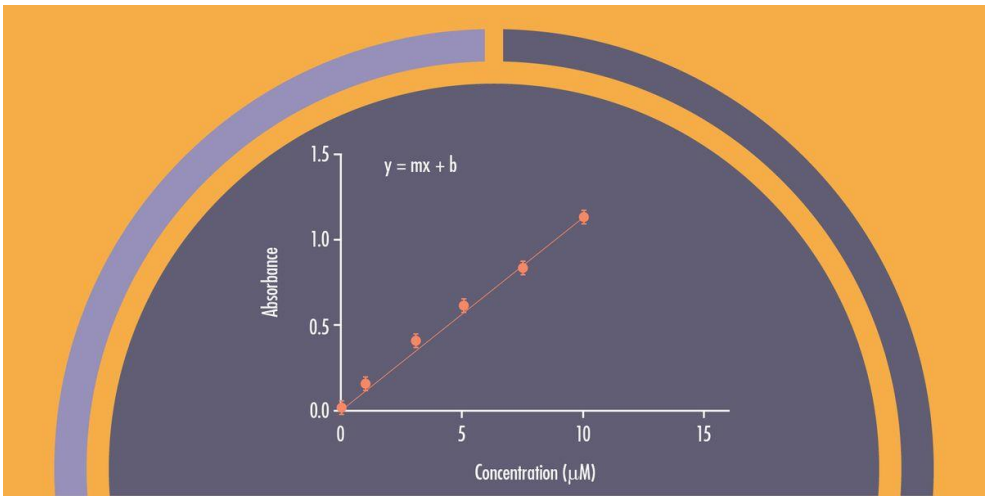
Fit the data to a linear regression

Use statistical software to fit the data to a linear regression.

The output is the following equation:

$y = mx + b$

Where m is slope (the units are absorbance/µm), and b is the y-intercept (the units are absorbance).



Obtain a coefficient of determination (R^2)

The coefficient of determination (R^2) quantifies goodness of fit—the square of the correlation coefficient between actual and predicted Y values. R^2 is typically a fraction between 0.0 and 1.0, with 1.0 being a perfect fit.

(Ph.D.) **Dhia F. Al-Fekaiki**

in Food Sciences - Biochemistry - Enzymology •

Expert in GC MS, HPLC, Akta PURE 25 (FPLC) •

Interesting: Food Analysis, Safety Food, Honey Analysis •

Department of Food Science -College of Agriculture - University of Basrah •

Iraq – Basra •

009647801022618 •

dhia.alfekaiki@uobasrah.edu.iq •

https://orcid.org/0000-0002-7510-5881 •

https://www.researchgate.net/profile/Dhia_Al-Fekaiki •

https://www.linkedin.com/in/prof-dr-dhia-al-fekaiki-60265186/ •

https://independent.academia.edu/Dhiaalfekaiki •

https://publons.com/researcher/1718509/dhia-al-fekaiki/ •

https://www.facebook.com/profile.php?id=100000822257891 •