



METODUN GEÇERLİ KILINMASI VE DOĞRULANMASI İÇİN BİLGİLENDİRME KILAVUZU

Bu kılavuz bilgilendirme amaçlıdır, bu bilgilerin kullanımından kaynaklanabilecek hatalardan ve yükümlülüklerden TÜRKAK sorumlu değildir.

Bu kılavuzun hazırlanmasında zaman ve enerjilerini ayırarak çok değerli katkılar sağlayan çalışma grubu ve koordinasyon grubu üyelerine TÜRKAİK olarak teşekkür ederiz.

ÇALIŞMA GRUBU*:

B. Taylan ÇORUH	Grup Lideri, TÜRKAİK Eğitmeni	taylan.coruh@gmail.com
Aysun YILMAZ	İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı	aysunyilmaz@icloud.com
Ayşegül DEMİRTAŞ	İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi	aysegul.demirtas@ibg.edu.tr
Kerim EKMEKÇİ	Tarım ve Orman Bakanlığı	kekmekci@hotmail.com
Kevser TOPAL	TÜBİTAK UME	kevser@boun.edu.tr
Murat TUNÇ	TÜBİTAK UME	tunc.murat@tubitak.gov.tr
Perihan YOLCI ÖMEROĞLU	Bursa Uludağ Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü	pyomeroglu@uludag.edu.tr

KOORDİNASYON GRUBU*:

Ayşe AYDEMİR	TÜRKAİK Akreditasyon Uzmanı
Ezgi TOK ÜNLÜ	TÜRKAİK Akreditasyon Uzmanı
Sevgi SARI	TÜRKAİK Akreditasyon Uzmanı
Tuğçe BİLGİÇ	TÜRKAİK Akreditasyon Uzmanı

*İsimler (grup lideri hariç) alfabetik sıra ile sunulmuştur.

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	2
1. ÖNSÖZ.....	4
2. KISALTMALAR VE SEMBOLLER.....	16
3. AMAÇ.....	18
4. KAPSAM.....	18
5. TANIMLAR.....	18
6. METODUN GEÇERLİ KILINMASI VE DOĞRULANMASI.....	19
6.1. Metot Seçimi.....	19
6.2. Metodun Geçerli Kılınması ve Doğrulanması Planı.....	20
6.2.1. Çalışma Tipinin Belirlenmesi (Geçerli Kılma veya Doğrulama).....	21
6.2.2. Performans Parametrelerinin Seçimi.....	24
6.2.3. Deneysel Tasarım ve Uygulanması.....	25
6.2.4. Hesaplamalar ve Raporlama.....	28
6.2.5. Metot Performans Parametrelerinin Kalite Kontrol Çalışmaları ile İzlenmesi.....	29
6.3. Nicel Metotlar için Performans Parametreleri.....	30
6.3.1. Seçicilik.....	30
6.3.2. Algılama Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ).....	31
6.3.3. Doğruluk.....	35
6.3.4. Çalışma/Ölçüm Aralığı.....	48
6.3.5. Sağlamlık (Dayanıklılık).....	53
6.4. Nitel Metotlar için Performans Parametreleri.....	59
6.4.1. Ön Test Çalışması.....	62
6.4.2. Oranlar, Algılama Sınırı, Güvenilmeyen Bölge ve Uyumlar.....	62
7. RUTİN ÇALIŞMALARDA OLASI DEĞİŞİKLİKLER.....	76

8. KULLANILAN TERİMLER.....	78
9. EKLER.....	80
Ek 1. Metoda Göre Seçilebilecek Performans Parametreleri	80
Ek 2- Deneysel Tasarımlar	83
Ek 3. Deneysel Verilerin İstatiksel Yöntemlerle Değerlendirilmesi.....	86
Ek 4. LOD, LOQ Hesaplanmasında Kullanılacak Alternatif Yöntemler	88
Ek 5. Hesaplanan LOD Değerinin Kontrolü için Örnek	97
Ek 6. Tekrarlanabilirlik ve Ara Kesinlik için Örnek	98
Ek 7. Kalibrasyon Grafiğinin Değerlendirilmesi için Yöntemler	100
10. KAYNAKÇA.....	107

1. ÖNSÖZ

Bilimsel ve teknolojik gelişmeleri günlük hayata yansıtmak, beraberinde birçok ölçümü getirmektedir. Tüm bu ölçümlerin amacı, hayat kalitesini artırmak için alınan kararlara temel oluşturmaktır.

Metroloji ölçümlerin kalitesi ile ilgilenen bilim dalıdır. Ülkemizde yasal, bilimsel ve endüstriyel metroloji ve uygunluk değerlendirme alanlarında Türk Akreditasyon Kurumu (TÜRKAK), Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu Ulusal Metroloji Enstitüsü (TÜBİTAK UME), Türk Standartları Enstitüsü (TSE), Kalibrasyon ve Deney Laboratuvarları Derneği (TÜRKLAB) gibi farklı kurum ve kuruluşlar birlikte hareket ederek bu alanda dünya ile ortak hareket edilmesi ve gelişmelerin ülke içine zincirler halinde yayılmasını sağlamaktadır.

Günlük hayatımıza yansıyan ölçümlerin kalitesinin önemi açıktır ve birçok standart belge ve mevzuata konu edilmiştir. TS EN ISO/IEC 17025:2017 “Deney ve Kalibrasyon Laboratuvarlarının Yetkinliği için Genel Gereklilikler” (1) standardı bu konuda laboratuvarlar için öngörülen gereklilikleri kapsamaktadır. Bu standardın 7.2 *Metotların Seçilmesi, Doğrulanması ve Geçerli Kılınması* maddesi kapsamında, kullanılan metotların uygun bir yolla geçerli kılınması veya doğrulanması laboratuvarlar tarafından sağlanması gereken bir akreditasyon şartıdır.

Bir ölçümün kalitesi, ilgili metodun geçerli kılınması/doğrulanması, ölçüm belirsizliğinin tahmini, izlenebilirliğin sağlanması ile ortaya konur ve kalite kontrol çalışmaları ile sürekliliği sağlanır.

Bu kılavuz, ölçümlerin kalitesinin sağlanması ve ispatlanması için yol gösterici ve tavsiye niteliğindedir. Açıklamalar ve öneriler mümkün olduğunca tüm deney alanlarını kapsayacak şekilde genellenmiştir. Ancak, uluslararası kabul görmüş ve tüm deney alanlarına uygulanabilir bir geçerli kılma veya doğrulama yönteminin ve ortak terminolojinin **olmadığı bilinmelidir**. Dolayısıyla her laboratuvar öncelikli olarak kendi çalışma alanı ve teknik disiplini göz önüne alarak **uygun geçerli kılma/doğrulama yöntemini belirlemelidir**. Geçerli kılma çalışmalarında bu kılavuzda belirtilen kavramlar ve yöntemler esas alınabilir. Şayet çalışılan deney alanı ile ilgili **yasal şartlar var ise tüm çalışmalarda bu şartlar göz önüne alınmalıdır**.

Bu durum; TS EN ISO/IEC 17025:2017’de şu şekilde ifade edilmiştir (1); “Laboratuvar

S4

standart olmayan yöntemleri, laboratuvar tarafından geliştirilmiş yöntemleri ve amaçlanan kapsamlarının dışında kullanılması düşünülen veya başka bir şekilde değiştirilen standart yöntemleri geçerli kılmalıdır. Geçerli kılma, söz konusu uygulamanın veya uygulama alanının ihtiyaçlarını karşılayacak kapsamda olmalıdır”.

Bu kılavuzda metotların geçerli kılınması ve doğrulama ile ilgili değişik sektörleri kapsayan bilgiler verilmiştir. **Türkçe hazırlanmış olan bu kılavuz zorunlu doküman değildir.**

İlk sürümü 2019 yılında yayımlanan bu rehber doküman, okuyuculardan gelen yazılı ve sözlü geri bildirimlerin rehber hazırlama kurulunca değerlendirilmesi sonucunda bazı teknik konuların daha anlaşılır kılınması, yeni yayınlanmış olan standartlara uyum sağlanması, nitel analiz bölümüne güncellenen bilgilerin ilave edilmesi ve farklı yorumlara yol açtığı düşünülen redaksiyonel düzeltmelerin yapılması amacı ile revize edilmiştir. İlk olarak 20 Mayıs 2019 tarihinde yayımlanan bu kılavuzun tüm hakları TÜRKAK'a aittir.

2. KISALTMALAR VE SEMBOLLER

ACC	Tekrarlanabilirlik uyumu (<i>Accordance</i>)
ACS	Amerikan Kimya Derneği (<i>American Chemical Society</i>)
ANOVA	Varyans Analizi (<i>Analysis of Variance</i>)
AOAC	Amerikan Resmi Analitik Kimyacılar Birliği (<i>Association of Official Analytical Chemists</i>)
ASTM	Amerikan Test ve Malzemeler Topluluğu (<i>American Society for Testing and Materials</i>)
<i>b</i>	Sapma (<i>bias</i>)
CC _α	Karar sınırı
CC _β	Algılama kapasitesi
CON	Ara kesinlik uyumu (<i>Concordance</i>)
CV	Değişim (Varyasyon) katsayısı (<i>Coefficient of variation</i>)
df	Serbestlik derecesi (<i>Degree of freedom</i>)
EN	Avrupa Normu (<i>European Norm</i>)
EPA	Çevre Koruma Dairesi (<i>Environmental Protection Agency</i>)
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (<i>U.S. Food and Drug Administration</i>)
FN	Yanlış negatif sonuç sayısı (<i>False negative</i>)
FNR	Yanlış negatif Oranı (<i>False negative ratio</i>)
FP	Yanlış pozitif sonuç sayısı (<i>False positive</i>)
FPR	Yanlış pozitif Oranı (<i>False positive ratio</i>)
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (<i>High performance liquid chromatography</i>)
DAD	Diyot dizisi algılayıcı
ICH	Beşeri İlaçların Uluslararası Uyum Konferansı (<i>The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>)
ID	İzotop seyreltme (<i>Isotope Dilution</i>)
LC-MS	Sıvı kromatografisi kütle spektrometresi (<i>Liquid Chromatography Mass Spectroscopy</i>)
IEC	Uluslararası Elektroteknik Komitesi (<i>International Electrotechnical Committee</i>)
ISO	Uluslararası Standartlar Kurumu (<i>International Standardization Organization</i>)
IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
LAK	Laboratuvarlar arası karşılaştırma (<i>Interlaboratory Comparison</i>)
LLOQ	Düşük tayin sınırı (<i>Lower limit of quantification</i>)
LOD	Algılama sınırı (<i>Limit of Detection</i>)
LOD ₅₀	Paralel ölçüm sonuçlarının %50 sinin pozitif/negatif olduğu değer
LOQ	Tayin sınırı (<i>Limit of Quantification</i>)

NATA	Ulusal Test Otoriteleri Birliği, Avusturalya (<i>The National Association of Testing Authorities, Australia</i>)
NIST	Amerikan Teknoloji ve Standartlar Ulusal Enstitüsü (National Institute of Standards and Technology)
NMKL	Gıda Analizleri alanında İskandinav Ülkeleri Birliği (<i>Nordic Committee on Food Analysis</i>)
RLR	Güvenilirlik oranı (<i>Relability ratio</i>)
RM	Referans Malzeme (<i>Reference Material</i>)
RSD	Bağıl Standart Sapma (<i>Relative Standart Deviation</i>)
SLR	Seçicilik Oranı (<i>Selectivity Ratio</i>)
SNR	Hassasiyet Oranı (<i>Sensitivity Ratio</i>)
SRM	Sertifikalı Referans Malzeme (<i>Certified reference material</i>)
TN	Doğru negatif sonuç sayısı (<i>True negative</i>)
TP	Doğru pozitif sonuç sayısı (<i>True positive</i>)
TSE	Türk Standartları Enstitüsü
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
TURKLAB	Kalibrasyon ve Deney Laboratuvarları Derneği
UME	Ulusal Metroloji Enstitüsü
UR	Güvenilmeyen bölge (<i>Unreliability Region</i>)
VIM	Uluslararası Metroloji Sözlüğü

3. AMAÇ

Bu kılavuzun amacı laboratuvarlar tarafından kullanılan metotların geçerli kılınması (validasyon) ve doğrulanması (verifikasyon) çalışmalarına yönelik temel teorik ve pratik bilgiler vermek, yol göstererek desteklemektir.

4. KAPSAM

Bu kılavuz, kimyasal, fiziksel, mekanik vb. deney alanlarında, nitel ve nicel metotların geçerli kılınması veya doğrulanması için genel bilgileri kapsamaktadır. Mikrobiyolojik, tıbbi ve duyu analizler, alana özel bazı uygulama ve tanımlar içermekte olup alana özel gereklilikler göz önüne alınarak bu kılavuzdan faydalanılabilir. Kılavuz kullanılan yazılımların geçerli kılınması ile ilgili faaliyetleri kapsamaz. Laboratuvarlar deney alanlarındaki genel uygulamaları ve bu kılavuzu dikkate alarak, metodun geçerli kılınması veya doğrulama çalışmalarında kullanacakları metod performans parametreleri, çalışma kapsamı gibi konulara karar vermelidir.

Ele alınan yöntemler TS EN ISO/IEC 17025:2017 (1) 7.2 maddesinde belirtilen “*a) sapmaların ve kesinlik derecelerinin referans standart ya da referans malzeme kullanılarak değerlendirilmesi veya kalibre edilmesi; b) sonuçları etkileyen unsurların sistematik olarak değerlendirilmesi; c) etüv sıcaklığı, verilen hacim gibi kontrol edilen değişkenlerin değişimiyle yöntemin sağlamlığının sınanması; d) sonuçların, geçerli kılınmış diğer yöntemlerle elde edilmiş sonuçlarla karşılaştırılmasını*” **kapsar**. Ancak, “*e) laboratuvarlar arası karşılaştırmaları; f) sonuçların ölçüm belirsizliğinin, yöntemin teorik ilkelerinin anlaşılmasına ve numune alma veya deney yönteminin uygulanmasına dair pratik tecrübenin anlaşılmasına dayanan değerlendirilmesini*” **kapsamaz**.

5. TANIMLAR

Bu kılavuzda kullanılan tanımlar genel olarak VIM JCGM 200:2008 Uluslararası Metroloji Sözlüğü'ne (2) dayanmaktadır. Ancak farklı deney alanlarında ve teknik kuruluşlarca farklı bir terminolojinin kullanılabileceği de göz önünde bulundurulmalıdır. Bu kılavuzda farklı bir terminolojinin kullanıldığı durumlarda kaynak belirtilmiştir. Bazı terimlerin tanımı kılavuzun ilgili bölümlerinde ve İngilizce karşılıkları ise kısaltmalar bölümünde veya terimin ilk geçtiği yerde verilmiştir.

6. METODUN GEÇERLİ KILINMASI VE DOĞRULANMASI

Analizler/deneyler bir değişkene değer atamak olarak tanımlanan ölçümleri (nicel– kantitatif) içerebildiği gibi, tanımlama, ayırt etme, sınıflandırma veya varlık/yokluk tespitini de (nitel– kalitatif) içerebilir. *Nicel analiz*, olaylar arasındaki ilişkileri tanımlamak için sayısal veriler kullanır. *Nitel analiz* ise sözcükleri veri olarak kullanır. Her iki durumda da genellikle istatistiksel analizlerle değerlendirilebilecek olan bol miktarda veri toplanması gerekir. Bu bakış açısıyla bu kılavuzda metotların geçerli kılınması ve doğrulanması nicel ve nitel olarak ayrı ayrı ele alınmıştır.

TS EN ISO/IEC 17025:2017 (1) **metotların geçerli kılınmasını** “belirlenen gerekliliklerin amaçlanan kullanım için yeterli olduğu durumda yapılan doğrulama” olarak ve **doğrulamayı** ise “belirli bir ögenin belirlenmiş gereklilikleri karşıladığına dair nesnel kanıt sağlanması” olarak tanımlamaktadır.

6.1. Metot Seçimi

TS EN ISO/IEC 17025:2017 (1) standardının 7.2.1.4 maddesi uyarınca laboratuvarlarda “Uluslararası, bölgesel veya ulusal standartlarda veya saygın bir teknik kuruluş tarafından veya ilgili bilimsel yayınlarda veya dergilerde yayınlanmış olan veya donanım üreticisi tarafından belirtilen metotların kullanılması tavsiye edilir. Laboratuvar, uygun ve mümkün olmadığı durumlar dışında (örneğin mevzuat gereği ya da müşteri beklentisi gibi durumlar) bir metodun en güncel ve geçerli sürümünün kullanılmasını sağlamalıdır. Laboratuvar tarafından geliştirilmiş veya değiştirilmiş metotlar da kullanılabilir”.

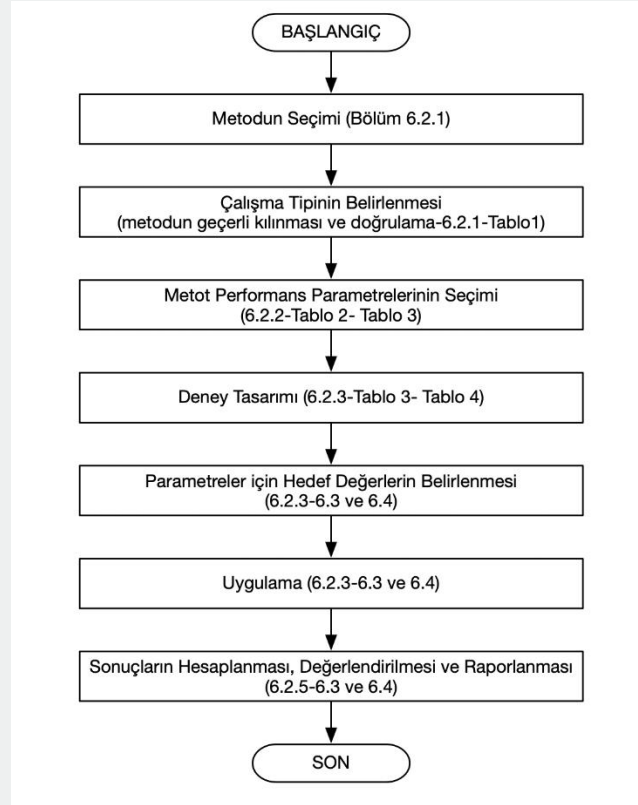
Laboratuvar, müşterilerinin beklentilerini karşılayan ve üzerinde karşılıklı uzlaştıkları deney metodunu seçer. Müşteri kullanılacak metodu belirtmediğinde, laboratuvar uygun bir metot seçmeli ve seçilen metot hakkında müşteriyi bilgilendirmelidir. Laboratuvarın varsa ve kullanımı uygunsa standart metotları tercih etmesi tavsiye edilir. Mümkün olduğunca geçerli kılma verileri laboratuvarlar arası ortak çalışma ile elde edilmiş metotlar tercih edilmelidir. Metot seçiminde ilgili mevzuat ve TÜRKAK dokümanlarında yer alan politikalar da dikkate alınmalıdır.

Metot seçiminde diğer laboratuvar çalışmalarında da olduğu gibi fiziksel imkânlar (örneğin, hazırlanan çözeltilerin saklanması uygun ortamlar), bütçe, fayda/bedel analizi, hedef

belirsizlik değeri, cihaz performans özellikleri gibi etkenler de değerlendirilmelidir. Örn, -80 °C’de saklama gerektiren bir metot seçildiğinde bu sıcaklıkta ortam sağlanabilmelidir.

6.2. Metodun Geçerli Kılınması ve Doğrulanması Planı

Rutin kullanıma almadan önce seçilen metodun amaca uygun olduğu ve gereken performansı gösterdiğini ispatlamak ve objektif kanıtlar sunmak amacı ile Şekil 1’de verilen süreç akışı doğrultusunda metot geçerli kılınır veya doğrulanır. Akış içerisinde ilgili bölüm numaraları verilmiştir.



Şekil 1. Metodun geçerli kılınması ve doğrulanması için süreç akışı.

Çalışma Tipinin Belirlenmesi (Geçerli Kılma veya Doğrulama)

Laboratuvarın ele aldığı metotlar uluslararası/bölgesel/ulusal standart metotlar, saygın bir teknik kuruluş tarafından yayımlanmış olan metotlar, bilimsel yayınlarda yayımlanmış olan metotlar, donanım üreticisi tarafından belirtilen metotlar veya ticari firmaların hazır kit içeren metotları olabilir. Eğer metotlar laboratuvarın ihtiyaç duyduğu geçerli kılma performans parametreleri hakkında yeterli bilgi **ıçermiyorsa** metotlar geçerli kılınır.

Seçilen metot kullanılmadan önce, raporlanan veriye göre geçerli kılma veya doğrulama işlemlerinden hangisine tabii tutulacağına Tablo 1'e göre karar verilebilir.

Metotların doğrulanması gerekliliği TS EN ISO/IEC 17025:2017'nin (1) 7.2.1.5 maddesinde *“Laboratuvar uygulamaya başlamadan önce, gereken performansın elde edilebildiğini güvence altına almak suretiyle, yöntemlerin düzgün bir şekilde çalışılabildiğini doğrulamalıdır. Eğer yayımlayan kuruluş tarafından yöntem güncellenirse, doğrulama gerekli ölçüde tekrarlanmalıdır”* ifadesi ile yer alır. Bu ifade laboratuvarında doğrulamanın gerçekleştirilmesi için bazı deneysel çalışmaların yapılması gerektiği anlamına gelmektedir. Buradaki iş yükü, laboratuvarında yeni geliştirilmiş bir metodun geçerli kılınmasına kıyasla kayda değer ölçüde azdır. Bununla birlikte laboratuvar koşullarında yapılacak doğrulama çalışması, geçerli kılınmış metodun yayınlanan metot performans parametrelerinin elde edilebildiğini kanıtlamaya yetecek kadar (istatistiksel olarak anlamlı) kapsamlı olmalıdır (Tablo 1– 1. ve 3. maddeler).

Bir standart hazırlama kuruluşu (EN, ISO, ASTM vb) veya bir teknik kuruluş (EPA, NMKL; AOAC vb) tarafından hazırlanmış standart metot, laboratuvarlar arası ortak çalışma yolu ile geçerli kılınmış, ilgili metot performans parametreleri yayımlanmış ve hiçbir değişikliğe maruz bırakılmadan kullanılıyorsa yeniden geçerli kılınması gerekmez. Metodun doğru bir şekilde uygulandığının güvence altına alınması yani *doğrulanması* (Tablo 1-1. madde) yeterlidir (3).

Benzer bir şekilde saygın bir teknik kuruluş tarafından veya ilgili bilimsel yayınlarda ve dergilerde yayımlanmış olan veya donanım üreticisi tarafından önerilen metotların kullanımını söz konusu olduğunda, metot performans parametreleri amaca uygun olarak yeterli derecede çalışılarak geçerli kılınmış, raporlanmış ve değişiklik yapılmaksızın laboratuvarında uygulanmış olması şartıyla sadece doğrulama yapılır. Laboratuvar yayınlanan performans parametrelerini amaca uygunluk yönünden değerlendirmeli ve söz konusu deneyin metot yapıcı tarafından

yeterli seviyede geçerli kılındığına dair objektif deliller bulmaya çalışmalıdır (Tablo 1-1.madde). Bulgular yeterli görüldüğü takdirde doğrulama, değilse geçerli kılma yapılır.

Standart test metodunun bir parçası olarak kit kullanılması gerektiğinde kullanılan kitin metot isterlerini karşılama koşulu ile sadece doğrulama yapılır. Standart bir deney metodunun bir parçası **olmayan** ve ticari olarak üretilmiş kitler kullanıldığında üretici firmanın önerdiği performans parametreleri ön incelemeye tabi tutulur, amaca uygun olması durumunda önerilen metoda aynen uyulur ve uygun şekilde doğrulama yapılarak kullanılır (Tablo 1- 3. madde). Uygun bir doğrulamanın nasıl yapılacağı bu rehberde ilgili metot parametresinin açıklandığı bölümde ele alınmıştır. Ancak, kit içeren metotların kullanımında yasal şartlar ve TÜRKAK'ın ilgili politikaları dikkate alınmalıdır.

Bir metot, belirli bir amaç doğrultusunda kullanılmak üzere performans özelliklerinin yeterli olduğunu göstermek gerektiğinde *geçerli kılınmalıdır*. TS EN ISO/IEC 17025:2017'nin (1) madde 7.2.2'e göre "*Laboratuvar standart olmayan metotları; laboratuvar tarafından geliştirilmiş metotları; amaçlanan kapsamı dışında kullanılan standart metotları; başka şekilde değiştirilmiş standart metotları geçerli kılmalıdır*".

Ampirik[†] standart metotlar için gereken performans parametrelerine dair istisnai durumlar Tablo 1'de (2. ve 4. maddeler ve dip not ii) açıklanmıştır.

Bazı durumlarda (standart metotlar dâhil) geçerli kılınmış metotlarda değişiklik yapma/modifikasyon gerekebilir. Bunun için laboratuvarın geçerli bir teknik neden ortaya koyması gerekir. Geçerli kılınmış metotlarda yapılan değişikliklerin ölçüm sonuçlarına etkisi **doğrulama** yapılarak incelenir. Doğrulama verileri geçerli kılma verileri ile uyumlu değilse yani, verilen metot performans parametre değerleri ile doğrulama çalışmalarında elde edilen değerler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ise **metot geçerli kılma çalışması** yapılır (Tablo 1- 6. madde, dip not iii). Ampirik karakterdeki metotlarda (mekanik ve fiziksel test vb.) sonuçlar metoda bağımlı olduğundan değişiklikten olabildiğince kaçınılmalıdır.

[†] Deney koşullarına bağlı olarak ölçülen değer değiştiği, izlenebilirliğin genellikle deney metodunca sağlandığı, bulunan sonuçların başka bir metot ile bulunan sonuçlarla direkt olarak karşılaştırılmadığı, metot sapmasının söz konusu olmadığı metotlara ampirik metot denir. Çekme, basma, uzama gibi mekanik; sertlik, vizkozite gibi fiziksel özellikleri ölçmeye yönelik testler; korozyon testleri, mikrobiyolojik analizler vb. ampirik metotlara örnek olarak gösterilebilir.

Tablo 1. Metot gruplarına göre doğrulama veya geçerli kılma karar tablosu.

1	Bir standart hazırlama kuruluşu (TS, EN, ISO, ASTM vb) veya bir teknik kuruluş (EPA, NMKL, AOAC vb) tarafından hazırlanmış standart metotlar, ilgili bilimsel yayınlarda yayımlanmış veya donanım üreticisi tarafından belirtilen metotlar kullanılıyorsa ve bu metotlar laboratuvarın ihtiyaç duyduğu geçerli kılma performans parametreleri hakkında yeterli bilgi ıçeriyorsa ⁱ	doğrulama yapılır.
2	1. maddede belirtilen metotlar ⁱ kullanılıyor, fakat bu metotlar laboratuvarın ihtiyaç duyduğu geçerli kılma performans parametreleri hakkında yeterli bilgi ıçermiyorsa ⁱⁱ	geçerli kılma yapılır.
3	Hazır kit içeren metotlar kullanılıyor ve metot laboratuvarın ihtiyaç duyduğu geçerli kılma performans parametreleri hakkında yeterli bilgi ıçeriyorsa	doğrulama yapılır.
4	Hazır kit içeren metotlar kullanılıyor ve metot laboratuvarın ihtiyaç duyduğu geçerli kılma performans parametreleri hakkında yeterli bilgi ıçermiyorsa	geçerli kılma yapılır.
5	Metot laboratuvar tarafından geliştirilmişse	geçerli kılma yapılır.
6	Geçerli kılınmış metotta yapılan değişikliklerin ölçüm sonuçlarına etkisi doğrulama yapılarak değerlendirilir. Doğrulama verileri, geçerli kılma verileri ile uyumlu değilse geçerli kılma çalışması yapılır.	

- ⁱ Laboratuvarlar söz konusu metodun yeterli seviyede geçerli kılındığını ispatlamakla yükümlüdür. İzlenebilirliğin metod üzerinden sağlanabildiği ampirik karakterdeki deney metotlarında metod sapması (bias) tanım olarak sıfırdır.
- ⁱⁱ Bu tür deneylerde referans bir değer olmayabilir. Bu nedenle bu tip metotlarda genelde gerçeklik parametresi ile ilgili bilgiler yer almaz. Fiziksel, elektriksel ve mekanik özellikleri ölçmeye yönelik hazırlanmış pek çok genel kullanımlı standart deney metodunda kesinlik verileri ya yer almaz ya da matris uyumsuzluğu nedeni ile verilerin kullanılabilirliği uygun olmayabilir (4) (5) (6) (7). Ampirik karakterdeki metotlarda gerçeklik ve kesinlik verilerinin olmaması veya numune uyumsuzluğu nedeni ile laboratuvarın ihtiyacına cevap vermemesi geçerli kılma çalışması gerektirmez. Bu gibi durumlarda, metod öngörülerine tam bir uyum sağlamak koşulu ile doğrulama yapılır. Tam uyumdan, kullanılan tüm cihazlar, sarf malzemeleri vb dâhil hiçbir değişiklik yapılmaksızın metod prosedürüne uygun olarak çalışmanın yürütülmesi anlaşılmalıdır. Eğer ampirik karakterdeki standart deney metodu kimyasal bir özelliği ölçüyor ise bu metod ampirik karakterde bile olsa gerçeklik ve kesinlik verilerinin olmadığı durumlarda metod geçerli kılınmalıdır.
- ⁱⁱⁱ Yapılan değişiklikler, kolon türü, özütleme çözücüsü, numune hazırlama veya analitik prosedürde miktar değişikliklerini içeriyorsa doğrulama verilerinin sonuçlarına göre geçerli kılma yapıp yapılmayacağına karar verilir. Yapılan değişiklik ölçüm tekniğine göre farklı fiziksel veya kimyasal özelliklerdeki matrisleri (kategori/ürün grubu) içeriyorsa geçerli kılma yapılır.

Performans Parametrelerinin Seçimi

Tüm performans parametrelerinin tanımı ve tespit yöntemi geçerli kılma ve doğrulama için aynıdır. Geçerli kılma/doğrulama seçimi yapıldıktan sonra yapılan çalışmanın amacına uygun performans parametrelerinin belirlenmesi Tablo 2 ve 3'e göre yapılabilir. Konu ile ilgili farklı örnekler Ek 1'de sunulmuştur.

Geçerli kılma ve doğrulama çalışmalarında hangi metot performans parametrelerinin çalışılması gerektiği çalışılan deney alanına bağlı olarak farklılık gösterebilir. Bazı alanlarda (örneğin mekanik özellikleri belirlemeye yönelik testler) sadece kesinlik ve mümkün olduğu durumlarda gerçeklik çalışması yeterli olurken, eser elementleri belirlemeye yönelik deneylerde tüm performans parametrelerinin çalışılması gerekebilir. Yapılacak çalışmaların kapsamı ve genişliği çalışma alanı ile ilgili genel kabul görmüş uygulamalar ve müşteri talepleri dikkate alınarak belirlenir.

Tablo 2. Nicel analizler için metot geçerli kılma/doğrulama performans parametreleri.

Parametreler		Geçerli Kılma	Doğrulama	
Seçicilik		Evet	Belki ⁱ	
Algılama Sınırı (LOD)		Evet	Belki ⁱ	
Tayin Sınırı (LOQ)		Evet	Belki ⁱ	
Doğruluk	Gerçeklik	Evet	Evet	
	Kesinlik ⁱⁱ	Tekrarlanabilirlik	Evet	Evet
		Ara kesinlik	Evet	Belki ⁱ
Çalışma Aralığı		Evet	Belki ⁱ	
Doğrusallık		Evet	Belki ⁱ	
Sağlamlık		Evet	Hayır	

ⁱ Metoda bağlı olarak gerekli olabilir. Laboratuvar isterse bu çalışmayı yapabilir.

ⁱⁱ Kılavuz tek laboratuvar da yapılan çalışmaları kapsadığı için tekrar üretilirlikten bahsedilmemiştir.

Tablo 3. Nitel analizler için metot geçerli kılma/doğrulama performans parametreleri.

Parametreler	Geçerli Kılma	Doğrulama
Ön test	Belki ⁱ	Hayır
Yanlış Pozitif Oranı	Evet	Belki ⁱ
Yanlış Negatif Oranı	Evet	Belki ⁱ
Hassasiyet Oranı	Evet	Belki ⁱ
Özgüllük Oranı	Evet	Belki ⁱ
Pozitif Olabilirlik Oranı	Belki ⁱ	Belki ⁱ
Negatif Olabilirlik Oranı	Belki ⁱ	Belki ⁱ
Güvenilirlik/Etkinlik/Doğruluk Oranı	Evet	Belki ⁱ
Güvenilmeyen Bölge	Evet	Hayır
Algılama Sınırı (LOD)	Evet	Evet
Tekrarlanabilirlik Uyum	Evet	Hayır
Ara Kesinlik Uyum	Evet	Hayır
Seçicilik	Evet	Hayır
Sağlamlık	Evet	Hayır

ⁱ Metoda bağlı olarak gerekli olabilir.

Deneysel Tasarım ve Uygulanması

Laboratuvar, kendi kullanım alanını dikkate alarak belirlediği metot performans parametrelerini elde edebildiğini kanıtlamaya yetecek (istatistiksel olarak değerlendirilebilecek) bir çalışma planı hazırlar. Plan metodun kapsadığı matrisler ve ölçüm aralıkları dikkate alınarak yapılmalıdır.

Bazı durumlarda ölçüm prensibine göre matrisler, kategorilere (örneğin süt ürünleri, siyah et, beyaz et, sebzeler, narenciye, sebzeler gibi veya süt ürünleri kategorisi peynir yoğurt gibi alt kategorilere) ayrılabilir ve çalışmalar her kategoriye temsil eden ürün veya ürünler seçilerek yapılabilir (8) (9). Geçerli kılma çalışmalarında metodun kapsamı genişse, bununla uyumlu olacak şekilde her bir kategoriye temsilen bir üründe ve sektöre bağlı olarak aksi belirtilmedikçe en az sayıda (tercihen beş) farklı kategoride çalışılır. Eğer metot kapsamı sınırlı sayıda kategoriye içeriyorsa ilgili kategorileri temsilen bir ürün ile geçerli kılma çalışması yürütülebilir.

Doğrulama çalışmaları, metodun kapsadığı matris ve ürün gruplarını kapsamalıdır. Ancak, deney metodunun çok fazla sayıda matris ve ürünü kapsadığı durumlarda (örneğin, plastiklerde çekme deneyi, gıda maddelerinde kimyasal analizler vb.) laboratuvar kendi çalışma alanını dikkate alarak belirlediği en zorlayıcı kategoriye temsil eden ürün üzerinde doğrulama

S25

çalışması yapabilir. En zorlayıcı ifadesi farklı deney alanlarında farklı anlamlar ifade edebilir. Bu sıfat bir matriksi, ürünü veya seviyeyi, kimi zaman geri kazanımı, kimi zaman kesinliği, kimi zaman LOD&LOQ seviyesini, kimi zaman bir ölçüm tekniğini, kimi zaman da mevzuatta verilen limiti niteleyebilir. Laboratuvar kendi deney alanını gözeterak en zorlayıcı olanı seçmelidir.

Ancak yapılan seçime göre, laboratuvarın çalıştığı diğer matrikslerde/seviyelerde metodu uygulama kabiliyetini iç ve dış kalite kontrol çalışmaları ile göstermesi beklenir. Doğrulama çalışma sonuçlarından ölçüm belirsizliği hesaplanacaksa ve mevzuat gereği bağlayıcı kriterler yoksa doğrulama çalışmalarının hangi matriks ve derişim seviyelerinde yapılacağını seçimi laboratuvarın sorumluluğundadır. Çalışmalar, mümkün olduğunca rutin analiz sonuçları üzerinde etkili olan tüm değişkenlerin (kişi, cihaz, mekân, sarf malzeme, zaman vb.) etki aralığını yansıtacak şekilde planlanmalıdır (Tablo 4).

Hem metodun geçerli kılınması hem de doğrulama için geçerli olan **performans parametreleri** 6.3 ve 6.4'de ele alınmıştır. Seçilen deneysel tasarıma göre performans parametreleri çalışılır ve sonuçlar kaydedilir. Tablo 4 ve Tablo 5, yasal bir şartın olmadığı ve/veya kendi deney alanı ile ilgili genel kabul görmüş metot geçerli kılma ve doğrulama yaklaşımının olmadığı durumlardaki olası yaklaşımları verir. Geçerli kılma ve doğrulama çalışmaları sırasında uygulanacak detaylı çalışma planı ve deneysel tasarımlar, metot performans parametrelerinin ele alındığı bölümlerde verilmiştir. Ayrıca kullanılabilir diğer deneysel tasarımlar hakkında bilgi Ek 2'de sunulmuştur. Geçerli kılma ve doğrulama çalışmaları sırasında kullanılacak olan malzemeler; farklı deney/derişim seviyelerindeki numuneler, boş numuneler, rutin test numuneleri, matriks uyumlu referans malzemeler ve reaktif boşları olabilir (3). Laboratuvarlar arası karşılaştırma (LAK) numunelerinin bu amaçla kullanılabilmesi için, raf ömrü veya ürünün açılması ile başlayan kullanım süresi boyunca kararlılığının (LAK sağlayıcısının beyanı veya literatür verisi ile) ispatlanmış olması gerekir (10). Metodun geçerli kılınması ve doğrulanmasına ait hedef değerler, metodun amaçlanan kullanımına uygun olarak mevzuat ya da müşteri beklentileri doğrultusunda bu aşamada belirlenir. Çalışmalar tamamlandıktan sonra elde edilen sonuçların nasıl değerlendirileceği her bir performans parametresine ait başlık altında sunulmuştur.

Tablo 4. Nicel analizler için deneysel tasarım önerileri.

Parametre	Geçerli Kılma		Doğrulama	
	Tekrar sayısı	Deney seviyesi	Tekrar sayısı	Deney seviyesi
Seçicilik ⁱ	≥6	≥1	≥6	≥1
Doğruluk ⁱⁱ				
Gerçeklik ⁱⁱⁱ	≥10	Çalışma aralığında ≥3 farklı seviye. Bu seviyelerden biri mümkünse matris uyumlu referans malzeme olmalıdır. Bulunmadığı durumlarda 3 seviyede analit ekleme yapılabilir ^{iv} .	≥10	≥1
Kesinlik ^v				
Tekrarlanabilirlik ^{viii}	≥6	çalışma aralığında ≥3 farklı seviye	≥6	≥1
Ara kesinlik	6 günde birer tekrar veya 5 farklı günde ikişer tekrar	çalışma aralığında ≥3 farklı seviye	6 günde birer tekrar veya 5 farklı günde ikişer tekrar	≥1
Çalışma aralığı				
Cihaz çalışma aralığı	1	≥6 (2-3 tekrar)	1	≥4(2 tekrar)
Metot çalışma aralığı				
Sağlamlık ^{vi}	(8-24) (2 tekrar)	1	-	-
LOD/LOQ ^{vii}				
LOD	≥10	1	≥10	1
LOQ				

ⁱ Girişim yapan maddelerin seviyeleri bilinmiyorsa, çalışmalar değişik seviyelerde mutlaka tekrarlanmalıdır.

ⁱⁱ Bu çalışma için seçilecek seviyeler çalışma aralığını kapsayacak şekilde düşük, orta ve yüksek seviyeleri içermelidir. Bir sınır değeri, yasal limit veya müşteri beklentisine uygunluk değerlendirmesi yapılacak ve karar kuralı uygulanacak ise söz konusu değeri mutlaka çalışılır.

ⁱⁱⁱ Test numunelerinde beklenen analit derişimine yakın derişim.

^{iv} Laboratuvar tek bir limit değere göre çalışma yaparak sonuç veriyorsa ve limit değerin altı veya üstü müşteri için önem arz etmiyorsa çalışmalar hedef seviyede yapılır.

^v Tekrarlanabilirlik çalışmaları geçerli kılma/doğrulama çalışmalarına katılan bütün personel için ayrı yapılmalıdır. Ara kesinlik çalışması farklı günlerde farklı personel tarafından yapılan en az 2 tekrarlı ölçümlerle elde edilmiş ise ayrı bir tekrarlanabilirlik çalışmasına gerek yoktur.

^{vi} Faktör sayısına göre değişmektedir. Her bir faktör için 2 ayrı çalışma.

^{vii} LOD ve LOQ için tavsiye edilen tekrar sayısı EURACHEM (3) (6.3.1.2- 1 madde) yaklaşımını temsil eder. Diğer yaklaşımlara ait tekrar sayıları kendi içinde değerlendirilmelidir.

^{viii} Tekrarlanabilirlik standart sapması birden fazla küçük veri setinin birleştirilmesi ile de tahmin edilebilir, örneğin; farklı günlerde iki tekrar

Tablo 5. Nitel analizler için deneysel tasarım önerileri.

Parametre		Geçerli Kılma		Doğrulama			
		Tekrar sayısı	Deney seviyesi	Tekrar sayısı	Deney seviyesi		
1	Ön test	10	5 + boş	10	-		
2	Yanlış Pozitif Oranı		5-10+ 1 boş		2 +1 boş		
3	Yanlış Negatif Oranı						
4	Hassasiyet Oranı						
5	Seçicilik Oranı						
6	Güvenilirlik/Etkinlik/Doğruluk Oranı						
7	Algılama Sınırı (LOD)					3-5	
8	Güvenilmeyen Bölge					-	
9	Tekrarlanabilirlik Uyum					-	
10	Ara Kesinlik Uyum					-	
11	Seçicilik					1+boş	-
12	Sağlamlık					2 Faktör için 2 seviye	-

Hesaplamalar ve Raporlama

Deneysel çalışmalardan elde edilen verilerin uygunluğunun kontrolü ve belirlenmiş hedef değerler ile karşılaştırılması amacıyla, uygun olduğunda istatistiksel teknikler kullanılmalıdır. Bu konuda kullanılacak istatistiksel teknikler ilgili parametre başlığı altında ve Ek 3’de verilmiştir (11) (12).

Metot geçerli kılma sonuç raporu, yeterli delilleri ve açıklamaları içerecek şekilde hazırlanır. Rapor; metodun tanımını, kapsamını, çeşidini (standart, kit, makaleye dayanan metot vs.), kullanılan cihaz, kimyasal ve çözeltilere ait bilgi ve varsa ilgili dokümanlara olan atıfları, çalışmanın kimler tarafından gerçekleştirildiğini, çalışma aralığını, deney tasarımını, kullanılan matrisler ve derişim seviyelerini, planlama ve çalışma sırasında yaşanan önemli gözlemleri, çalışılması planlanan ve çalışılan parametrelere ait sonuçları, istatistiki testleri, sonuçların hesaplanmasını, yorumunu ve yararlanılan kaynakları içerebilir (3). Ayrıca raporun sonuç bölümünde yapılan çalışmanın hedef parametrelerle kıyaslanması sonucu amaca uygunluğuna ait beyan sunulur. Raporlamada kullanılacak tüm verilerin gereken büyüklükte anlamlı rakamlar olarak sunulmasına dikkat edilmelidir. Raporda deney sonuçlarının nasıl verileceği (kaç anlamlı rakam, hangi ondalık seviyede) de ifade edilmelidir.

Kalitenin sürekliliğinin sağlanması amacıyla iç ve dış kalite kontrol planlamaları (kalite kontrol için derişim seviyeleri ve sıklığı v.b.) yapılabilir.

Doğrulama sonuç raporunda ise, yapılan çalışmaların daha dar kapsamlı olması sebebiyle geçerli kılma raporundaki kadar ayrıntılı bir rapor yazmaya gerek duyulmayabilir. Ancak, çalışılan parametrelere ait sonuçlar, istatistiki testler, sonuçlara ait hesaplamalar ve yorumları ve doğrulanan test metoduna uygun çalışıldığının objektif delilleri doğrulama raporunda yer almalıdır.

Metot Performans Parametrelerinin Kalite Kontrol Çalışmaları ile İzlenmesi

Metotlar, geçerli kılma/doğrulama çalışması sonrasında rutin kullanıma alınır, metodun kullanım süresi boyunca değişen şartlar ölçüm/deney sonuçlarında belirgin bir değişikliğe sebep olabilir. Metodun performansını olumsuz etkileme ihtimali olan bu değişimlerin izlenmesi için laboratuvarlarda kalite kontrol çalışmaları yapılmalıdır (13). Metodun geçerli kılınması veya doğrulanması sonrasında hangi performans parametrelerine ait ölçüm sonuçlarının (veya başka bir göstergenin) kalite kontrol çalışması ile takip edileceğine karar verilir. Karar verilirken değişme olasılığı yüksek performans parametrelerinin seçilmesi önemlidir. Bu çalışmalar sonunda metot performans parametrelerinde zamanla bir değişim tespit edilir ve metoda uygun çalışmadığı sonucuna varılırsa, düzeltici faaliyetlere başlanır. Gerekirse geçerli kılma/doğrulama çalışması yenilenir, performans parametresi revize edilir ve izleme yeniden başlatılır.

Kalite kontrol çalışmaları laboratuvarın kendi olanakları ile gerçekleştirdiği iç kalite kontrol ve/veya başka laboratuvarla ortak çalışmaların yapıldığı dış kalite kontrol şeklinde gerçekleştirilebilir. İç kalite kontrol çalışmalarının sıklığı risk esaslı düşünülerek deney bazında belirlenmelidir. Bu sıklık zamana bağlı olarak günlük, haftalık olarak seçilebileceği gibi numune sayısına (örneğin % 5 veya her 20 numunede 1) bağlı olarak da seçilebilir. Sıklıkla kullanılmayan metotlar gerekli ölçüde doğrulanmalıdır. Kalite kontrol çalışmalarının nasıl yürütüleceği çeşitli kaynaklarda daha detaylı ele alınmıştır (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19).

6.3. Nicel Metotlar için Performans Parametreleri

Seçicilik

Kimyasal analizlerde *seçicilik* IUPAC (20) tarafından “*bir metodun, standart karışım veya matrislerin içindeki belirli analitleri, onunla benzer özellik gösteren diğer maddelerin girişimleri olmaksızın tanımlayabilme derecesi*” olarak tanımlanır. Farmakopelerde ise (21) (22), “*numunede var olan ve analizi yapılacak maddeyle girişim yapabilecek diğer yardımcı (safsızlıklar, bozunma ürünleri) veya etken maddeler yanında analiz edilmek istenilen maddenin ölçülebilme kabiliyetidir*” tanımı ile verilmiştir.

Seçicilik ölçüm sonucunun sadece aranan analite ait olduğunun, söz konusu analite kimyasal ve fiziksel olarak benzeyen başka bir maddenin girişim yapıp yapmadığının, yapıyorsa girişim seviyesinin ortaya konmasıdır. Böyle bir çalışmada analitin numunede bulunduğu form ve metot ile ölçülebilecek olan formun eşleşmesi ve girişim yapan maddelerin tanımlanması gerekir. Girişim yapan maddelerin miktarının tespit edilemediği durumlarda, çalışmalar değişik deney seviyelerinde mutlaka tekrarlanmalıdır.

Seçicilik analiz tekniğine bağlı olarak değişebilir (9). Aletli analizlerde (örneğin ICP-OES) girişim yapan maddeler ve girişim seviyeleri kullanılan dalga boyu ile değiştiği gibi bir dalga boyunda girişim yapan bir element diğer bir dalga boyunda girişim yapmayabilir.

Seçicilik aynı numuneye farklı metotlar uygulanarak incelenebilir. Örneğin, HPLC DAD tekniği ile yapılan bir analizde girişim tespit edildiğinde, girişim yapan maddenin tanımlanması (nitel analiz) ve miktar tayini için seçiciliği daha iyi olan sıvı kromatografisi kütle spektrometrisi (LC-MS) tekniğine başvurulabilir. Çalışmada tekrar sayısı laboratuvar tarafından girişim yapan maddenin tanımlanmasına yetecek seviyede (6-7 tekrar) olmalıdır.

Metot doğrulamasında, matris değişikliği yapılmaması koşulu ile, istendiği takdirde seçicilik çalışması yapılmayabilir. Mekanik ve fiziksel testler, elektriksel ölçümlere dayalı testler, tahribatsız muayene testleri ve gürültü ölçümüne dayalı testler gibi bazı ölçüm yöntemleri için seçicilik parametresinin çalışılması gerekmez. Çünkü kullanılan cihaz sadece söz konusu büyüklüğü ölçer.

Metodun geçerli kılınması veya farklı matris kullanımında metodun doğrulanması aşamasında çalışılan seçicilik parametresinin uygunluğunun değerlendirilmesi gerekir. Girişim

yapan madde tespit edildikten sonra analit ekleme (*eklenen analit bu kez girişim yapan maddedir*) ile miktar tayini yapılır. Girişim yapan maddeler analiti içeren numuneye beklenen girişim düzeylerinde ve farklı derişimlerde eklenir. Girişim yapan madde eklenerek ve eklemeden hazırlanmış iki numune analiz/ölçüme tabi tutularak sonuçlar karşılaştırılır. Girişim yapan madde eklenerek ve eklemeden yapılan ölçümlerde elde edilen sonuçların ortalamaları (6-7 tekrarlı ölçüm sonucu) arasında anlamlı bir fark olup olmadığı *t-testi* ile değerlendirilir.

Algılama Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)

Düşük derişimlerde nicel analiz için kullanılan analitik metotların geliştirilmesi, geçerli kılınması ve raporlanan analiz sonuçlarının yorumlanmasında metodun aradığımız analitin varlığını ayırt edebildiği ve/veya güvenilir ölçüm yapabildiği en düşük derişimin bilinmesi gerekir.

Düşük derişimler söz konusu olduğunda farklı hesaplama teknikleri ve farklı terimler kullanılmaktadır. Sıklıkla karşılaşılan terimler; algılama sınırı (LOD - limit of detection), tayin sınırı (LOQ - limit of quantification), düşük tayin sınırı (LLOQ - lower limit of quantification), karar sınırı ($CC\alpha$ - decision limit), algılama kapasitesi ($CC\beta$ - detection capability), kritik değer (x_c - critical value) ve en düşük algılanabilir değerdir (x_d - minimum detectable value). Tablo 6'da kimyasal ölçümlerde bu parametrenin hesaplaması için en çok kullanılan uluslararası referanslardan bazıları ve bu referanslarda kullanılan terimler sunulmuştur. Bu kılavuzda, algılama sınırı (LOD - limit of detection), tayin sınırı (LOQ - limit of quantification) terimleri kullanılmıştır. Laboratuvar yasal şartları, metot öngörülerini, deney alanına has terimleri ve hesaplama tekniklerini kullanmalıdır.

Tablo 6. En çok kullanılan uluslararası referanslar ve sınır derişim ifade eden terimler.

Eurachem (3)	ISO 11843 (23)	IUPAC (24)	2002/657/EC (25)	FDA (26)	AOAC (27)	EURL (28)
-	x_c	-	$CC\alpha$	-	-	-
LOD	x_d	LOD	$CC\beta$	-	LOD	LOD
-	-	-	-	LLOQ	-	-
LOQ	-	LOQ	-	-	LOQ	LOQ

Bir metodun LOD/LOQ değerini belirlemek için kullanılan numuneler ölçüm prosedürüne uygun şekilde hazırlanır ve analiz edilir. Sonuçlar rutin analizlerin hesaplamalarında kullanılan model denklem kullanılarak hesaplanır. Ölçüm bir cihaz içeriyorsa, cihazın ve metodun

LOD/LOQ değerlerini birbirinden ayırmak gereklidir. Cihazın algılama ve tayin sınırı genellikle cihaza verilen bir numune veya standart analizi veya bir kromatogram elde edilmişse sinyal gürültü oranı ile elde edilebilir (3).

Bu kılavuzda, EURACHEM' de (3) belirtilen LOD ve LOQ hesaplama yöntemi önerilmiştir. Tablo 6'da sunulan diğer yöntemler tercih edildiğinde Ek 4'te verilen aşamalar takip edilmelidir. EURACHEM'e göre LOD ve LOQ tekrarlanabilirlik koşulları altında elde edilen boş numune ölçümlerinden hesaplanır. LOD ve LOQ değerlerinin zamana bağlı olarak önemli ölçüde değiştiği bazı durumlarda, LOD ve LOQ tahmini için ara kesinlik koşulları altında elde edilen boş numunelerin ölçüm sonuçları kullanılmalıdır. LOD ve LOQ hesaplanmasında kullanılan standart sapma (s'_0), ara kesinlik koşullarında elde edildiğinde, boş düzeltmesinin dikkate alınmasına gerek yoktur ($s'_0 = s_0$ alınır). s_0 sıfır veya sıfıra yakın derişimlerde, geçerli kılma veya doğrulama çalışması sırasında tercihen ara kesinlik koşulları altında yapılan m sayıda (tekrar sayısı 6-15 arası) tek sonuca ait standart sapmadır. s_0 **cihaz sinyallerinin değil** (varsa model denklemden) elde edilen derişimlerin standart sapmasıdır.

Böyle bir çalışma için (örneğin, atomik spektroskopi tekniğinde) düşük seviyede analit içeren numuneler kullanılabilir. Beklenen LOD değerine yakın analit derişimine sahip numuneler de kullanılabilir. Kromatografi gibi gürültü seviyesinin üstünde bir sinyali algılamaya dayanan teknikler için LOD değerine yakın analit derişimine sahip numuneler daha uygun olabilir.

LOD veya LOQ tespitinde ayrıca numune boşları tercih edilir (29). Numune boşları analit içermez fakat, tüm prosedür basamakları ve eklenen kimyasalları içerir. Fakat numune boşları ile yapılan ölçümler matriks etkisini yansıtmaz. Farklı matriksleri kapsayan metotlar için her matrikse ait standart sapma değerinin ayrı ayrı belirlenmesi önerilir.

Algılama sınırı ve tayin sınırı hesaplamaları Denklem 1 ve Denklem 2'de verilmiştir.

$$LOD = k \times s'_0 \quad \text{Denklem 1}$$

$$LOQ = k \times s'_0 \quad \text{Denklem 2}$$

Çarpım faktörü (k) olarak genellikle LOD için 3 ve LOQ için 6 veya 10 kullanılır.

Rutin analiz sonuçlarına boş düzeltmesi uygulanması ya da uygulanmamasına göre LOD ve LOQ hesaplamalarında kullanılacak olan standart sapma (s'_0) için iki farklı hesaplama (Denklem 3 ve Denklem 4) önerilmektedir. Metotta test numunelerine boş düzeltmesi

uygulanmıyorsa LOD ve LOQ hesabında kullanılacak standart sapma (s'_0) aşağıdaki (Denklem 3) gibi hesaplanır.

$$s'_0 = \frac{s_0}{\sqrt{n}} \quad \text{Denklem 3}$$

s_0	sıfır veya sıfıra yakın derişimlerde, geçerli kılma veya doğrulama çalışması sırasında tercihen ara kesinlik koşulları altında yapılan m sayıda (tekrar sayısı 6-15 arası) tek sonuca ait standart sapma
s'_0	LOD ve LOQ hesaplamak için kullanılan standart sapma
n	rutin analizlerde sonuçlar raporlanırken ortalaması alınan tekrarlı ölçüm sayısı

Metotta test numunelerine boş düzeltmesi **uygulanıyorsa** LOD ve LOQ hesabında kullanılacak standart sapma (s'_0) aşağıdaki (Denklem 4) gibi hesaplanır.

$$s'_0 = s_0 \times \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{n_b}} \quad \text{Denklem 4}$$

s_0	sıfır veya sıfıra yakın derişimlerde, geçerli kılma veya doğrulama çalışması sırasında tercihen ara kesinlik koşulları altında yapılan m sayıda (tekrar sayısı 6-15 arası) tek sonuç
s'_0	LOD ve LOQ hesaplamak için kullanılan standart sapma
n	rutin analizlerde sonuçlar raporlanırken ortalaması alınan tekrarlı ölçüm sayısı
n_b	boş düzeltmesinin hesaplanmasında ortalaması alınan gözlemlerin sayısı

Örneğin, ölçüm prosedürü rutin analizde test numunelerinin 3 kez ölçülmesi gerektiğini ve 2 adet boş numunenin ortalaması ile boş düzeltmesi yapılması gerektiğini belirtiyorsa; $n = 3$ ve $n_b = 2$ olacaktır.

LOD ve LOQ parametrelerinin değerlendirilmesi: Metodun geçerli kılınması veya doğrulanması aşamasında elde edilen LOD ve LOQ verilerinin uygunluğunun değerlendirilmesi gerekir. Çalışmalarda elde edilen (Tablo 6'da belirtilen yöntemlerden biri seçilerek hesaplanan) LOD ve LOQ değerleri, varsa ilgili mevzuatta verilen yasal şart ve/veya metotta belirtilen LOD ve LOQ değerlerine eşit veya daha küçük olmalıdır. LOD ve LOQ verilerinin bu dokümanlarda belirtilmediği veya tavsiye/örnek niteliğinde belirtildiği durumlarda laboratuvar tarafından müşterinin ihtiyacını karşılayacak LOD ve LOQ değerleri hedef olarak seçilebilir.

Bunun yanısıra, elde edilen LOD ve LOQ değerlerinin doğrulanması da aşağıda açıklandığı gibi ayrıca gerçekleştirilmelidir.

Hesaplanan LOD değerinin kontrolü: Boş numuneye, önceden tespit edilen LOD derişim seviyesinde analit eklenir. Boş numune ve analit eklenmiş numune tercihen ara kesinlik

koşullarında, tüm ölçüm prosedürü izlenerek analiz edilirler. Analit eklenmiş numunelere cihazın verdiği yanıtların ortalaması, boş numunelere cihazın verdiği en yüksek yanıtın büyük ise hesaplanan/önceden tespit edilen LOD değerinin doğruluğu kanıtlanmış olur. Hesaplanan LOD değerinin kontrolü ile ilgili örnek Ek 5'te verilmiştir.

Hesaplanan LOQ değerinin kontrolü: Hesaplanan LOQ değerinin kontrolü için; önceden hesaplanan LOQ seviyesinde analit içeren bir numune veya analit eklenmiş boş numune ara kesinlik koşulları altında tüm ölçüm prosedürü izlenerek analiz edilir. LOQ seviyesi için hedeflenen kesinlik ve gerçeklik değerleri varsa ve LOQ seviyesinde yapılan ölçümlerde elde edilen veriler hedef değerlerle uyumlu ise hesaplanan LOQ değerinin doğruluğu kanıtlanmış olur.

Diğer bir yöntemde ise hesaplanan LOQ seviyesinde analit içeren bir numune veya analit eklenmiş boş numune en az 3 tercihen 5 tekrarlı olarak tüm ölçüm prosedürü izlenerek analiz edilir. Bu çalışmadan elde edilen standart sapmanın Denklem 5'ten hesaplanan standart sapmadan küçük veya eşit olması değer doğrulandığını gösterir (19).

$$s = \frac{x_{LOQ} \cdot \sqrt{n}}{3 \cdot t_{df;\alpha}} \quad \text{Denklem 5}$$

x_{LOQ} ; geçerli kılma/doğrulama çalışması ile tespit edilen/hesaplanan LOQ seviyesi
 s ; analit eklenmiş numunelerin kabul edilecek maksimum standart sapması
 n ; analit eklenmiş numune sayısı (3 ile 5 arası)
 $t_{df;\alpha}$; t dağılımı tablosunda $df=n-1$ ve $\alpha=0,05$ değeri

Bu durumda deney sayılarına göre alınması gereken t değerleri aşağıda verilmiştir. Farklı n ve t değerleri için düzenlenmiş hesaplama yöntemi aşağıda verilmiştir. Diğer n sayıları için t değerleri tablolardan bulunmalıdır.

$n=3$	$t=4,303$	$s = 0,134 \cdot x_{LOQ}$	Denklem 6
$n=4$	$t=3,182$	$s = 0,210 \cdot x_{LOQ}$	Denklem 7
$n=5$	$t=2,776$	$s = 0,268 \cdot x_{LOQ}$	Denklem 8

Bununla birlikte, özellikle aletli analiz metotlarının doğası gereği zamanla cihazlarda gözlenen değişikliklerin LOD ve LOQ değerlerini değiştirebileceği dikkate alınmalıdır. Gerekirse kalite kontrol kapsamında LOD ve LOQ değerleri takip edilir. Ayrıca, laboratuvarlarda, sıklıkla metodun tayin sınırı seviyesinde analit içeren rutin numuneler analiz ediliyorsa, mevcut tayin sınırı değeri belirli aralıklarla kontrol edilmelidir.

Sadece cihaz ile ölçüm içeren deney alanlarında LOD ve LOQ kavramı olmaz. Bu tip ölçümlerde alt ölçüm sınırları cihaza bağlı bir özellik olup en küçük ölçüm değeri cihazların teknik kataloglarından öğrenilebilir. Benzer şekilde, mekanik ve fiziksel vb. özellikleri ölçmeye yönelik deneylerde ölçülen büyüklüğün yokluğu söz konusu olmadığından LOD kavramı da söz konusu değildir. Bu tip deneylerde *raporlama sınırı* ifadesi kullanılır.

Doğruluk

Ölçümlerin *doğruluğu* deney sonucu ile ölçülen büyüklüğün gerçek değeri arasındaki yakınlık derecesi olup *kesinlik* ve *gerçeklik* olarak isimlendirilen iki bileşenden oluşur. Laboratuvar geçerli kılma ve doğrulama çalışmalarında ölçüm doğruluğunu değerlendirmelidir. Ancak gerçeklik çalışması yapmanın mümkün olmadığı; örneğin RMnin olmaması, sadece kesinlik çalışmalarının yapılabildiği bazı deney alanları da söz konusu olabilir. Bu durumun zamanla değişebileceği göz önüne alınarak, gelişmeler takip edilmelidir.

Kesinlik

Kesinlik ölçüm sonuçlarının birbirlerine yakınlığının ölçüsüdür. Ölçüm sonuçlarının ortalama değer etrafındaki dağılımını gösterir. Çalışma koşullarına göre kesinlik; *tekrarlanabilirlik*, *ara kesinlik* ve *tekrarüretilebilirlik* olarak üç farklı şekilde ifade edilebilir. Laboratuvar içi metod geçerli kılma/doğrulama çalışmaları söz konusu olduğunda sadece tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik (laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik) değerlendirilir. Laboratuvarlar arası ortak çalışmalar ile elde edilebilen tekrarüretilebilirlik bu dokümanın kapsamı dışında olmakla birlikte aradaki farkları göstermek amacı ile Tablo 7'de verilmiştir.

Kesinlik, *standart sapma (s)*, *bağlı standart sapma (RSD)*, veya bağlı standart sapmanın diğer ifade şekli olan *değişim katsayısı (CV)*, veya *yüzde bağlı standart sapma, %RSD* cinsinden ifade edilebileceği gibi *tekrarlanabilirlik sınırı (r)* veya *ara kesinlik sınırı (R_i)* olarak da ifade edilebilir. Rastgele hataların göstergesi olan bu değer hiçbir zaman sıfır olamaz.

Tablo 7. Kesinlik ifade türleri.

Çalışma türü	Ölçüm koşulları					
	Numune	Analist	Cihaz, laboratuvar imkânları, ortam şartları	Zaman Aralığı	Kalibrasyon Eğrisi (uygunsa)	Laboratuvar
Tekrarlanabilirlik (r , s_r , RSD_r , % CV_r)	Aynı	Aynı	Aynı	Kısa	Aynı	Aynı
Ara kesinlik (R_i , s_i , RSD_i , % CV_i)	Aynı	Aynı/farklı	Aynı/farklı	Uzun	Farklı	Aynı
Tekrarüretilebilirlik* (R , s_R , RSD_R , % CV_R)	Aynı	Farklı	Farklı	Uzun	Farklı	Farklı

*Tekrarüretilebilirlik birden fazla laboratuvarın katılımıyla yapılan çalışmalar içindir.

Kesinlik çalışmaları planlanırken mümkün olduğunca rutin kullanımdaki tüm değişkenler (kişi, cihaz, mekân, sarf malzeme, zaman vb.) ve metodun ölçüm aralığı dikkate alınmalıdır. Ayrıca deney sonuçlarının ölçüm yönü ile değiştiği (anizotrop) malzemelerde (plastik ve kauçuk ürünler, ahşap, tekstil, kumaş, vb.) kesinlik verilerinin numune alma yönü ile değişebileceği göz ardı edilmemelidir.

Farklı matrislerin söz konusu olduğu geniş ölçüm aralığına sahip metotlarda kapsamlı bir kesinlik çalışması gerekir. Tercihen düşük, orta ve yüksek olmak üzere üç farklı deney seviyesinde kesinlik çalışması yapılır. Farklı matrisler söz konusu olduğunda her kategoriyi temsilen bir matris için farklı derişim seviyelerinde kesinlik çalışılır. Böylece her matris için farklı derişim/ölçüm seviyeleri ile kesinlik sonuçları arasındaki ilişki ortaya konulur. Doğrulama çalışmasında ise en zor kategoride bir matris seçilmesi yeterli olabilir.

Geçerli kılınan veya doğrulanan metot bir sınır değere karşı uygunluk değerlendirmesi amacı ile kullanılacaksa, diğer bir deyiş ile karar kuralı uygulanacak ise değerlendirmeye esas olacak bu değer kesinlik çalışmalarında mutlaka yer almalıdır. Çalışmada kullanılan numunelerin rutin numuneleri temsil eder nitelikte olması gerekir. Kesinlik çalışmalarında RM kullanma zorunluluğu yoktur. Rutin analiz numunelerine kıyasla daha homojen olmaları nedeni ile RMLerle yapılan çalışmaların rutin numunelere nazaran genellikle daha düşük kesinlik değerleri verdiği bilindiğinden ve yüksek maliyetleri nedeni ile kullanımını sınırlıdır. Ancak matris uyumunun tam olarak sağlandığı durumlarda (örneğin, petrol ve petrol türevleri) RM kullanılarak aynı anda hem gerçeklik hem de kesinlik çalışması yapılması iş yükünün azaltılması yönü ile uygun olabilir.

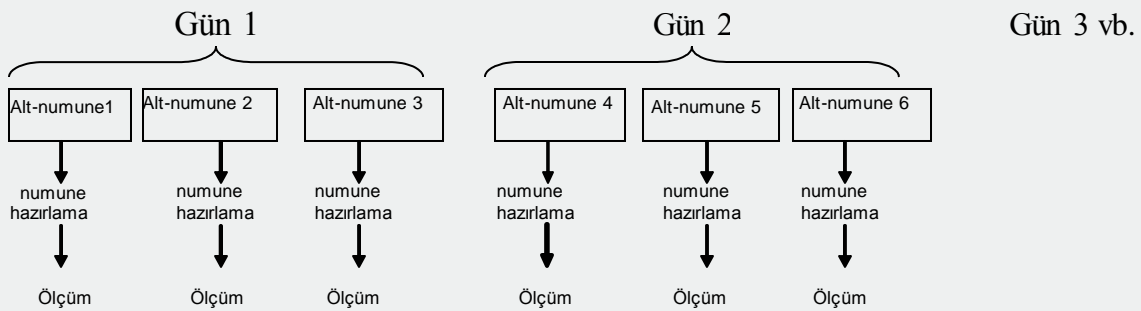
Tekrarlanabilirlik standart sapması tekrarlanabilirlik koşulları altında elde edilen deney sonuçlarının standart sapmasıdır (30). Tekrarlanabilirlik koşulları deney metodunun izin

verdiği kadar kısa zaman aralıklarında, aynı cihaz kullanılarak, aynı kişi tarafından, aynı laboratuvarında, özdeş numunelere aynı metodun uygulanmasını ifade eder.

Ara kesinlik standart sapması (s_i) ara kesinlik koşulları altında elde edilen deney sonuçlarının standart sapmasıdır. Ara kesinlik koşulları bağımsız deney sonuçlarının uzun zaman aralıkları içinde, aynı ve/veya farklı donanım kullanılarak, aynı ve/veya farklı kişiler tarafından, aynı laboratuvarında, özdeş numuneler ve aynı metotla elde edildiği koşullardır. Kısacası bir laboratuvarında karşılaşılabilecek tüm değişkenliklerin belirsizliğe yansıtılmasıdır. Ara kesinlik çalışmasında, özellikle aletli analiz tekniklerinde kalibrasyon standartları ve eğrisinin yeni olması önemli bir husustur.

Bağımsız deney sonuçlarının elde edilebilmesi için numunelere (varsa numune hazırlama işlemi de dâhil) tüm işlem basamakları uygulanmalıdır. Deney yapılacak malzemenin heterojenliği nedeni ile büyük kesinlik değerlerinin elde edilebileceği (yapı malzemeleri mekanik ve fiziksel testler gibi) düşünülüyorsa, tekrar sayısının yüksek tutulması tavsiye edilir. Kesinlik çalışması için farklı kaynaklarda farklı sayılar/serbestlik dereceleri verilmekle beraber deney/ölçüm sayısının en az 5 serbestlik derecesi verecek şekilde tasarlanması önerilir. Buna uygun olarak yapılacak deney tasarımı tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik koşullarında 6 günde birer tekrar veya 5 farklı günde ikişer tekrar olacak şekilde seçilebilir. Ayrıca standart sapmanın tek bir analitik partiden elde edilmesi yerine çalışmalar birkaç analitik partide/seride yapılmalı ve elde edilen kesinlik verileri uygun yöntemlerle (Denklem 13, Denklem 14 ve Denklem 15) birleştirilmelidir.

Tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik örnek çalışma planları Şekil 2’de sunulmuştur.



Şekil 2. Tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik çalışmaları için örnek çalışma planı.

Deney tasarımına göre standart sapma ve bağıl standart sapma hesabı aşağıdaki formüller kullanılarak yapılabilir.

n sayıda özdeş numune kullanılarak yapılan tekli ölçümler için;

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad \text{Denklem 9}$$

$$\% RSD = \frac{s}{\bar{X}} 100 \quad \text{Denklem 10}$$

ile hesaplanır. Burada, X_i , tekli ölçüm sonucunu, \bar{X} ise ölçümlerin ortalamasını ifade eder.

n sayıda özdeş numuneler kullanılarak yapılan iki tekrarlı ölçümler için;

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - y_i)^2}{2n}} \quad \text{Denklem 11}$$

$$\% RSD = \frac{s}{\bar{X}} 100 \quad \text{Denklem 12}$$

Aynı kategorideki farklı ürünler veya aynı ürünün farklı derişimleri ile n sayıda iki tekrarlı ölçümler yapıldığında;

$$RSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \left[\frac{2(x_i - y_i)}{(x_i + y_i)} \right]^2}{2n}} \quad \text{Denklem 13}$$

denklemleri kullanılır. Burada x_i ve y_i iki tekrarlı ölçümlerin sonuçlarını ifade eder.

Kesinlik standart sapması yukarıda anlatıldığı gibi basit tekrarlar içeren bir deneysel tasarım ile hesaplanabileceği gibi iç içe deney tasarımı (Ek 2) kullanılarak ANOVA ile de hesaplanabilir. Deney metodunun doğası gereği aynı gün içerisinde yeterli sayıda deney yapma imkânı yoksa kesinlik çalışmasında tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik standart sapmalarını aynı anda vermesi nedeni ile ANOVA en etkili istatistiksel değerlendirme yöntemidir. Doğrulama amaçlı çalışma sonuçlarının değerlendirilmesinde ANOVA kullanılacaksa çalışmaya katılacak personelin tecrübesi göz önüne alınarak yeterli sayıda çalışma yapılması sağlanır.

Buradaki deney tasarımının günlük olarak (en az 2 tekrar ile) en az 5 gün yapılması önerilir (3) (31). Ek 6'da örnek bir hesaplama verilmiştir.

Farklı seviyelerde, ürün kategorilerinde, analitik partilerde vb. farklı koşullarda elde edilen, n sayıdaki ölçümlerin standart sapmaları ve/veya bağıl standart sapmaları aşağıdaki formüller (ve

ANOVA testi öncesinde varyansların homojenliğinin uygun bir istatistiksel yaklaşımla, örneğin Cochran testi, ispatlanmak koşulu) ile birleştirilebilir.

$$s = \sqrt{\frac{df_1 S_1^2 + df_2 S_2^2 + \dots + df_k S_k^2}{df_1 + df_2 + \dots + df_k}} \quad \text{Denklem 14}$$

$$RSD = \sqrt{\frac{df_1 RSD_1^2 + df_2 RSD_2^2 + \dots + df RSD_k^2}{df_1 + df_2 + \dots + df_k}} \quad \text{Denklem 15}$$

Burada sırasıyla her bir veri setine ait df ; serbestlik derecesini, s ; standart sapmasını, ve RSD ; bağıl standart sapmasını ve k ise toplam veri seti sayısını ifade eder. Elde edilen birleştirilmiş standart sapmanın toplam serbestlik derecesi ise $(df_1 + df_2 + \dots + df_k)$ 'dir.

Tekrarlanabilirlik sınırının kullanımı: *Tekrarlanabilirlik sınırı*, tekrarlanabilirlik şartları altında elde edilen iki deney sonucu arasındaki mutlak farka eşit ya da daha küçük olan ve % 95 ihtimalle olması beklenen değer olarak tanımlanır (32). Bulunan veya verilen r değeri, geçerli kılma veya doğrulama çalışmalarında elde edilen tekrarlanabilirlik standart sapması ile hesaplanır ve rutin analizlerde iç kalite kontrol amacı ile, tekrarlı çalışmalarda ise kesinliğin değerlendirilmesi amacı ile kullanılır. Deney metodunda verilen r değerinin kullanılabilmesi için matris ve deney seviyesi uygun olmalıdır. Bu amaçla rutin analizlerde iki paralel ölçüm yapıldığında ölçüm sonuçları arasındaki mutlak fark, verilen r değerine eşit veya küçük olmalıdır. Aksi halde sonuçların raporlanabilmesi için izlenecek adımlar ISO 5725-6'ya uygun olarak değerlendirilebilir (31).

Kesinlik parametresinin değerlendirilmesi: Metodun geçerli kılınması veya doğrulanması aşamasında elde edilen kesinlik verilerinin değerlendirilmesi için aşağıda verilen yaklaşımlardan uygun olanı/olanları kullanılabilir.

- i. Bulunan değerler mevzuattaki değerlerle kıyaslandığında küçük, eşit veya istatistiksel olarak belirli bir olasılık için (genellikle 0,95) anlamlı derecede farklı olmamalıdır.
- ii. İlgili mevzuatta tekrarlanabilirlik ve/veya ara kesinlik standart sapma değerleri verilmemişse, doğrulama çalışmasında elde edilen tekrarlanabilirlik ve/veya ara kesinlik standart sapmaları, geçerli kılma çalışmasında elde edilen değerlerle kıyaslandığında küçük veya eşit olmalı veya istatistiksel olarak belirli bir olasılık için (genellikle 0,95) anlamlı ölçüde farklı olmamalıdır.

- iii. Ölçülen değerlerin, oran (% , ppm, ppb gibi) olarak ifade edildiği metotlarda geçerli kılma veya doğrulama çalışmalarında elde edilen tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik bağıl standart sapmaları (RSD_r ve RSD_R) Horwitz veya modifiye Horwitz eşitliğine göre değerlendirilebilir. Horwitz eşitliğinden elde edilen HORRAT değerinin (Denklem 17 ve Denklem 21) 0,5 ve 2 arasında olması beklenir, fakat değer aralığı bazı kaynaklarda 0,3 – 1,5 olarak raporlanmıştır (27). Bu değerlendirme biçimi (oranla ifade edilse dahi) ampirik metotları kapsamaz.

Ara kesinlik bağıl standart sapması değerlendirmesi formülü;

$$\% RSD_{RH} = 2^{(1-0,5 \log C)} \quad \text{Denklem 16}$$

$$HORRAT_R = RSD_r / RSD_{RH} \quad \text{Denklem 17}$$

C kütle fraksiyonu (Örneğin 10µg/g için (10/1000000µg/µg) =0.00001'dir).

RH Horwitz eşitliğinden hesaplanan bağıl ara kesinlik standart sapması

Tekrarlanabilirlik bağıl standart sapması değerlendirmesi formülü;

$$\% RSD_{rH} = \% RSD_{RH} \times 0,66 \quad \text{Denklem 18}$$

$$HORRAT_r = RSD_r / RSD_{rH} \quad \text{Denklem 19}$$

- iv. Tekrarlanabilirlik ve/veya ara kesinlik standart sapma değerleri yukarıdaki bahsedilen yöntemlerden hiçbiri ile elde edilemiyorsa,
- aynı numunede laboratuvar içinde elde edilen sonuçlar birbirleri ile; veya
 - aynı numune ve metotla başka laboratuvarlarda yapılan çalışmaların sonuçları birbirleri ile Ek 3'te verilen istatistiksel teknikler kullanılarak karşılaştırılabilir.

Gerçeklik

Gerçeklik, belirli sayıdaki analiz sonucunun ortalamasının gerçek değere yakınlık derecesinin ölçüsüdür (33). Bilimsel çalışmaların doğası gereği ölçümlerin çok azı gerçek değer doğrudan ölçülebilmesine olanak sağlar. Yapılan çalışmalarda kullanılan deney/test numunesinin tüm numuneleri temsil etmesindeki yetersizlik, kimyasal analizlerde matriks etkisi, ölçümün çevresel koşullara bağımlılığı, ölçümlerde kullanılan donanımdan kaynaklanan değişkenlikler ve tanımlanamayan faktörler ölçülen değere etki eder. Bu değişkenlikler ölçüm sonucunun belirsizliği olarak hesaplanıp raporlanır ve ölçüm sonuçlarının kalitesinin bir göstergesidir.

Gerçekliğin ölçütü bir referans değerden sapmadır. Referans değer bazen gerçek değerdir, bazen ise üzerinde uzlaşmış (konvansiyonel) değerdir. Gerçeklik çalışması ile toplam hatanın, sistematik hata bileşeni belirlenir. Sistematik hataları tanımlayan performans parametresi *gerçeklik*, ölçütü ise *sapma (bias)* veya *geri kazanımdır*.

Sapma, tek yönlüdür, pozitif veya negatif yönlü olabilir. Sapma *metodun/ölçümün sapması* olabileceği gibi, metodu uygulayan laboratuvarın metodu uygulayabilme yeteneğini yansıtmak üzere *laboratuvar sapması* da olabilir. Metot geçerli kılma ve doğrulama çalışmalarının tek bir laboratuvar tarafından yürütüldüğü durumlarda elde edilen sapma laboratuvar sapması ve metot sapmasının toplamıdır. Ampirik karakterdeki metotlarda metot sapması **olmaz**, sadece laboratuvar sapması olabilir (34).

Gerçekliğin tespiti dört şekilde yapılabilir:

- i. Matriks uyumlu referans malzemelerin analizi,
- ii. Referans değer ile karşılaştırma (örneğin referans metot, referans cihaz)
- iii. Analit eklenmiş malzemelerle (spike) yapılan çalışmalar,
- iv. Yeterlilik deney sonuçları (E_n , z veya *zeta* değeri ile).

Gerçeklik, matriks ve derişim seviyesine göre değişkenlik gösterebilir, bu nedenle incelenecek matriks sayısı ve deney seviyeleri çalışmaya uygun şekilde seçilip geçerli kılma/doğrulama planında belirtilir. Uygulanabilir olduğu durumlarda sapma tüm ürün kategorilerini ve çalışma aralığını kapsayacak şekilde çeşitli deney seviyelerinde (örneğin; düşük, orta, yüksek derişim) ve ürün kategorilerinde metodun tamamı uygulanarak tespit edilmelidir (bk. Deneysel Tasarım ve Uygulanması Bölüm 6.2.3). Çalışmalarda mümkünse çalışma aralığında en az bir seviyede matriks uyumlu referans malzeme ile iki seviyede analit ekleme veya matriks uyumlu RM olmadığı durumlarda üç seviyede analit ekleme yapılabilir. Bu seviyeler çalışma aralığı içinden seçilmelidir.

Gerçeklik çalışmasında yapılacak deney sayısı ile ilgili olarak çeşitli kaynaklarda değişik sayılar verilmektedir. Tekrar sayısının en az 10 olarak alınması tavsiye edilir. Ölçümler tekrarlanabilirlik koşulları altında yürütülebilir, ancak ara kesinlik koşulları altında yapılması tavsiye edilir. Rutin analizlerde yapılacak doğrulama çalışmalarında deneyi yapacak **tüm personel** gerçeklik çalışmalarına katılmalıdır.

Sistemik hataların belirlenmesinde mümkün olduğu durumlarda matris uyumlu RM ile çalışma tercih edilmelidir. Ancak matris uyumlu RM sayısının az olması bu tür çalışmaları kısıtlayabilir. Ampirik karakterdeki metotlar (mekanik ve fiziksel testler) için çoğu zaman matris uyumlu RM temini mümkün olmamaktadır. Bu tür metotlarda referans bir değer ile karşılaştırma da yapılamıyorsa, sapma, laboratuvarlar arası karşılaştırma ve yeterlilik testlerine katılarak belirlenebilir.

Referans değeri $C_{REF} \pm U_{REF}$ (k) olan bir matris uyumlu RM ile “n” adet ölçüm yapıldığında ve C_m ortalaması ve S_{REF} standart sapması ile sapma, bağıl sapma ve % bağıl sapma aşağıdaki formüller yardımı ile bulunur (35). Aynı formüller sapmanın referans metot ile değerlendirilmesinde de kullanılabilir. Bu durumda formüldeki sertifika değeri (C_{REF}) yerine referans metottan elde edilen değer kullanılır.

$$b = \Delta = C_m - C_{REF} \quad \text{Denklem 20}$$

$$u_b = \sqrt{\frac{S_{REF}^2}{n} + \left(\frac{u_{REF}}{k}\right)^2} \quad \text{Denklem 21}$$

$$b_{bağıl} = \frac{C_m - C_{REF}}{C_{REF}} \quad \text{Denklem 22}$$

$$\%b_{bağıl} = \frac{C_m - C_{REF}}{C_{REF}} \cdot 100 \quad \text{Denklem 23}$$

- C_M ; Yapılan ölçümlerin ortalaması
 C_{REF} ; Referans değer
 b ; Sapma
 u_b ; Sapmadan kaynaklanan standart belirsizlik
 k ; kapsam faktörü

Eğer referans malzeme/metot kullanımı ile gerçeklik, geri kazanım olarak ifade edilecekse aşağıdaki formüller yardımı ile bulunabilir.

$$R = \frac{C_m}{C_{REF}} \quad \text{Denklem 24}$$

$$\% R = \frac{C_m}{C_{REF}} \cdot 100 \quad \text{Denklem 25}$$

Matriks uyumlu referans malzemelerin olmadığı kimyasal analizlerde analit ekleme (spike) yolu ile sistemik hataların ölçülmesinin mümkün olup olmadığına bakılır. Bu durumda geri kazanım değeri aşağıdaki formüller yardımı ile bulunabilir.

$$R = \frac{C_{son} - C_{ilk}}{C_{eklenen}}$$

Denklem 26

$$\%R = \frac{C_{son} - C_{ilk}}{C_{eklenen}} \cdot 100$$

Denklem 27

Geri kazanım çalışmasında analit ekleme için kullanılacak standart çözeltilerin kalibrasyon eğrisinin çiziminde kullanılan ile **aynı olmaması** tercih edilir. Laboratuvar bir nedenle aynı malzemeyi kullanmak zorunda kalırsa, mümkün olduğunca standardın hazırlanışında farklılık yaratmalıdır (farklı günlerde hazırlama, farklı ana stok, farklı kişi tarafından hazırlama vb.).

Sapma ve geri kazanım ifadeleri birbirini 100'e tamamlar (% sapma = 100 - % geri kazanım). Laboratuvarlar çalışma alanlarına göre geri kazanım veya sapma ifadelerinden uygun olanı gerçekliği nicellendirmek için kullanabilirler.

Gerçeklik parametresinin değerlendirilmesi: Metodun geçerli kılınması veya metodun doğrulanması aşamasında gerçeklik çalışmaları (geri kazanım/sapma) yapılmış ise elde edilen verilerin uygunluğunun değerlendirilmesi gerekir. Bu amaçla aşağıda verilen uygulamalardan bir veya birkaçı uygulanarak değerlendirmeler yapılabilir.

i. Matris uyumlu referans malzemelerin kullanımı ile gerçeklik değerlendirmesi:

- a. Matris uyumlu referans malzemelerin analizi yapılarak elde edilen geri kazanım/sapma değeri, öncelikle ilgili mevzuatta veya metotta belirtilen geri kazanım/sapma değerine eşit veya daha iyi olmalıdır.
- b. Eğer geri kazanım/sapma değeri ilgili mevzuatta veya metotta yer almıyorsa, elde edilen geri kazanım/sapma değeri Tablo 8 veya bunun gibi sektörel kaynaklardan elde edilen veriler kullanılarak değerlendirilebilir. Tablo 8 analitik sonuçların oran olarak ifade edildiği (% , ppm, ppb v.b) metotlar için kullanılır. Bu tablo sonucu oranla ifade edilse dâhi ampirik metotlar için **kullanılmaz**.

Tablo 8. Geri kazanım/sapma değeri değerlendirme tablosu (27).

Analit Miktarı	Geri Kazanım (%)	Sapma (%)
% 100	98 - 102	(-2) - (+2)
% 10	98 - 102	(-2) - (+2)
% 1	97 - 103	(-3) - (+3)
% 0,1	95 - 105	(-5) - (+5)
100 ppm	90 - 107	(-10) - (+7)
10 ppm	80 - 110	(-20) - (+10)
1 ppm	80 - 110	(-20) - (+10)
100 ppb	80 - 110	(-20) - (+10)
10 ppb	60 - 115	(-40) - (+15)
1 ppb	40 - 120	(-60) - (+20)

- c. Matriks uyumlu referans malzeme kullanılarak yapılan gerçeklik çalışmalarında “a” ve “b” yöntemlerinin dışında bir yol takip edilmek istendiğinde veya yukardaki yöntemleri uygulama imkânı olmadığında önem testi ile (tercihen % 95 olasılık için) aşağıdaki yaklaşım kullanılarak değerlendirme yapılabilir.

$$|b| \leq ku_b \text{ veya } |\Delta| \leq ku_b \text{ ise sapma önemsiz (\% 95 için } k \approx 2)$$

$$|b| > ku_b \text{ veya } |\Delta| > ku_b \text{ ise sapma önemli (\% 95 için } k \approx 2)$$

ii. *Referans değer ile karşılaştırma yapılarak gerçeklik değerlendirmesi:*

- a. Referans değer ile karşılaştırma yapılarak elde edilen geri kazanım/sapma değeri, öncelikle ilgili mevzuatta veya metotta belirtilen geri kazanım/sapma değerine eşit veya daha iyi olmalıdır.
- b. Eğer geri kazanım/sapma değeri ilgili mevzuatta veya metotta yer almıyorsa, referans metottan elde edilen referans değer ile diğer metottan elde edilen değer *t* testi yapılarak karşılaştırılır. *t* değeri aşağıdaki gibi hesaplanır Belirli bir olasılık için (tercihen % 95 olasılık için) istatistiksel olarak anlamlı fark olmaması elde edilen geri kazanım/sapma değerinin önemsiz olduğu anlamına gelir.

$$t_{hesap} = \frac{|C_m - C_{REF}|}{s} \sqrt{n} = \frac{|b_{ort}|}{s} \sqrt{n} = \frac{|R_{ort} - 1|}{S_{GeriKazanım}} \sqrt{n}$$

s	: Deney sonuçlarının standart sapması
n	: Deney sayısı
R_{ort}	: Ortalama geri kazanım
$S_{Geri Kazanım}$: Geri kazanım sonuçlarının standart sapması
b_{ort}	: Sapma sonuçlarının ortalaması

Eğer $t_{hesap} \leq t_{tablo}$ ise istatistiksel açıdan anlamlı bir fark yoktur ve geri kazanım/sapma önemsizdir. Eğer $t_{hesap} > t_{tablo}$ ise istatistiksel açıdan anlamlı bir fark vardır ve geri kazanım/sapma önemlidir.

iii. *Analit eklenmiş malzemelerle (spike) yapılan gerçeklik değerlendirmesi*

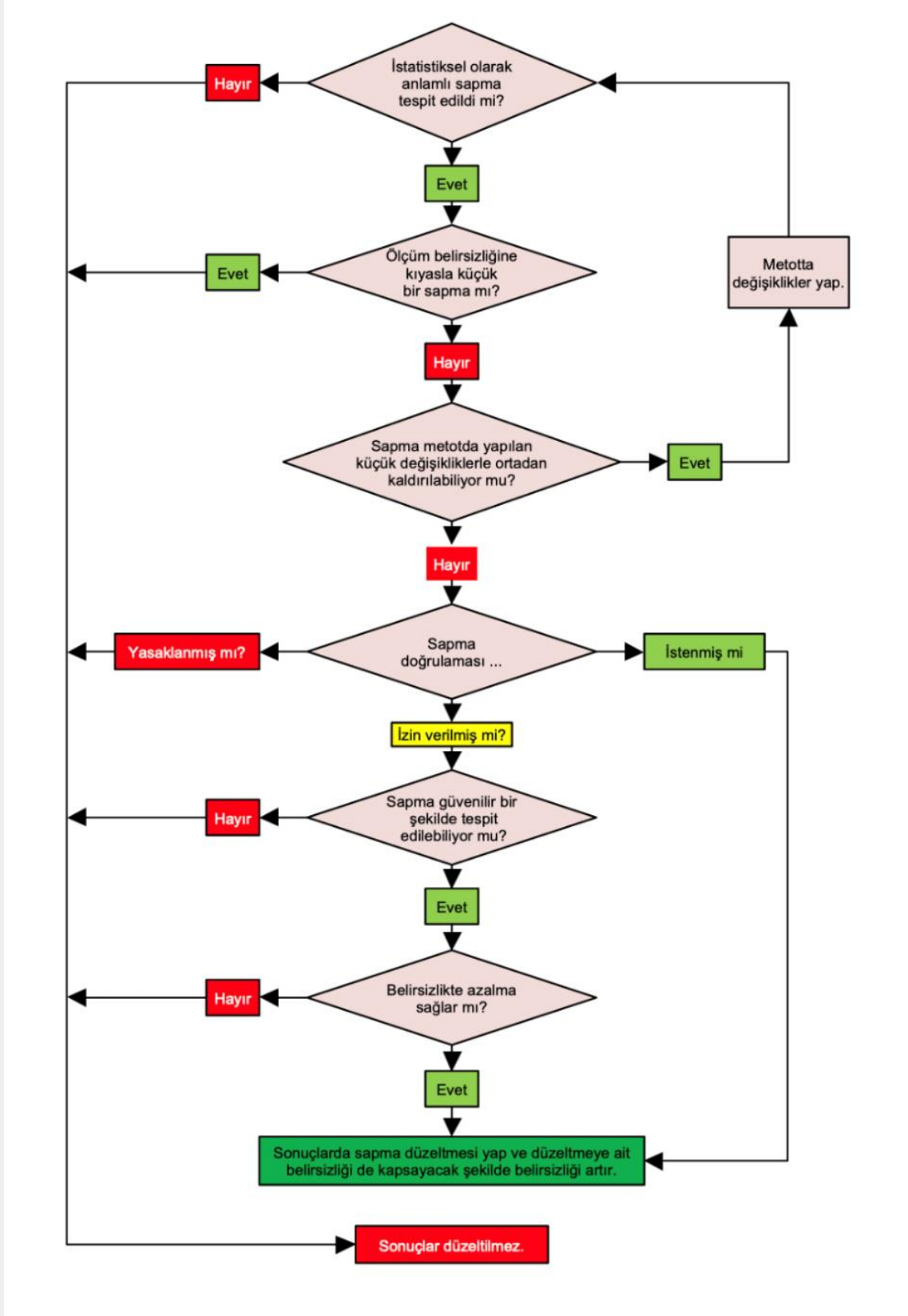
- Doğrulama çalışmalarında analit eklenmiş malzemelerle (spike) yapılan çalışmalardan elde edilen geri kazanım /sapma değeri mevzuatta ve/veya metotta belirtilen geri kazanım/sapma değeri ile karşılaştırılmalıdır. Bulunan değerler verilen geri kazanım veya sapma değerine eşit veya daha iyi olmalıdır
- Eğer geri kazanım değeri ilgili mevzuatta veya metotta yer almıyorsa, elde edilen geri kazanım değeri Tablo 8 veya bunun gibi sektörel kaynaklardan elde edilen veriler kullanılarak değerlendirilebilir.

iv. *Laboratuvarlar arası karşılaştırma/yeterlilik testlerine katılım yoluyla gerçeklik değerlendirmesi:*

Laboratuvarlar arası karşılaştırma/yeterlilik testlerine katılım yoluyla gerçeklik çalışması yapıldığında, “Z” skoru ile raporlanan karşılaştırma sonucunda laboratuvarın $|z| < 2$ arasında bir skor alması durumunda, o laboratuvara ait geri kazanım/sapmanın kabul edilebilir olduğunu gösterir.

Önemli bir sapma çıkması durumunda, metot gözden geçirilir ve sapmanın kaynağı tespit edilir. Bu durumda metot kullanılmaya devam edilecekse Şekil 3’te gösterilen karar akışına göre sonuçlarda ya düzeltme yapılır ya da sapma ölçüm belirsizliğine dâhil edilir (33). Mevzuat ya da standart test metodu izin veriyorsa düzeltme yapılır. Sapma düzeltilmesi her koşulda yapılmayabilir. Mevzuat izin veriyorsa istatistiksel önem testi yapılarak aşağıdaki akış şeması takip edilir.

Genellikle ampirik karakterdeki pek çok deney alanında (mekanik ve fiziksel özellikleri ölçmeye yönelik testler vb) RM üretilmemesi nedeni ile laboratuvar içinde gerçeklik çalışması yapılamamaktadır. Bu gibi durumlarda sistematik hataların ölçülmesinin en etkin yolu yeterlilik (laboratuvarlar arası karşılaştırma) testi çevrimlerine katılım ve/veya referans kabul edilecek bir laboratuvar (örneğin TÜBİTAK UME) veya akredite laboratuvarlar ile karşılaştırma yapılmasıdır. Yukarıdakilerden hiçbiri yapılamıyorsa bu metot için gerçeklik parametresi yerine kesinlik parametresi raporlanır.



Şekil 3. Sapma değerine göre sonuçların düzeltme karar akışı (36).

Çalışma/Ölçüm Aralığı

Çalışma aralığı metodun kabul edilebilir bir belirsizlikle sonuç sağladığı, diğer bir deyişle yöntemin kabul edilebilir bir gerçeklik ve kesinlik ile uygulandığı aralıktır.

Çalışma aralığının en düşük noktası LOQ ve en yüksek noktası *analitik hassasiyette* (kalibrasyon eğrisinin eğimi) önemli farklılıkların gözlemlendiği derişim seviyesidir. Hedeflenen derişim aralıkları da (alt ve üst sınırlar) çalışma aralığı olarak tanımlanabilir. Çalışma aralığına ait veriler genellikle metodun geliştirilmesi sırasında elde edilir.

Sonuçların bir ölçüm cihazı ile elde edildiği durumlarda çalışma aralığı yerine *ölçüm aralığı* kavramı daha uygun olabilir. Bu tip durumlarda ölçüm aralığı uygulanan metoda bağlı olmayıp kullanılan cihaza has bir özelliktir. Örneğin, kuvvet ölçümünde kullanılan yük hücrelerinde, elektriksel ölçümlerin yapıldığı multimetrelerde, gürültü ölçüm cihazlarında, viskozite ölçüm cihazlarında vb. hangi aralıkta ölçümün yapılabileceği cihazların kendisinden ya da bu cihazların teknik bilgi formlarından elde edilebilir.

Metot ve Cihaz Çalışma Aralığı

Çalışma aralığı, hem metot hem de cihaz için geçerli bir kavramdır. Bu durum genellikle deney numunelerine ön işlem (ayırıştırma, özütleme, seyreltme veya sonrası zenginleştirme vb.) uygulandığında karşımıza çıkar. Numunenin ön işlem görmeden doğrudan ölçüldüğü durumlarda cihaz ve metot çalışma aralığı aynıdır. Metodun ve cihazın, tanımlanan çalışma aralığında çalışıp çalışmadığı değerlendirilmelidir.

Metodun çalışma aralığı tespit edilirken numuneye ön işlemler dâhil tüm deney prosedürü ve hesaplamalar yansıtılır. Cihazın çalışma aralığı ise, ölçüm cihazına verilen, ön işleme tabi tutulmuş numuneler ile tespit edilir.

Ampirik metotların pek çoğunda (örneğin, mekanik, fiziksel, elektriksel testler) kullanılan ölçüm cihazının alt ve üst ölçüm sınırı çalışma aralığıdır. Cihazın kalibrasyonu bu çalışma aralığını kapsayacak şekilde yapılmış olmalıdır.

Cihazın çalışma aralığının belirlenmesi: Aletli analizlerde cihazın çalışma aralığındaki derişimlere karşı cihaz yanıtı arasındaki bağıntı tespit edilmelidir. Bu aşamada:

- a) cihaz kalibrasyon yöntemi (tek nokta kalibrasyonu[‡], çok noktalı kalibrasyon, bloklamalı (bracketing) kalibrasyon, standart ekleme) ve matematiksel modeli (doğrusal veya ağırlıklı regresyon gibi) tespit edilir, (14)
- b) belirlenen bağıntı doğrulanır,
- c) tüm ölçüm basamakları dikkate alınarak metot ve cihaz çalışma aralıklarının uyumu değerlendirilir.

Cihazın kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analizinde genellikle lineer regresyon tercih edilir. Lineer regresyonunda en önemli kabul, “x” (derişim) eksenindeki hataların “y” (cihazın yanıtı) ekseninde oluşan hatalara kıyasla küçük olduğunun varsayılmasıdır (37). Dolayısıyla kalibrasyon standart çözeltileri çok hassas ve dikkatli bir şekilde hazırlanmalı ve gerekirse tartım (gravimetrik numune hazırlama) yapılmalıdır (38) (39). Bu bağlamda, öncelikle izlenebilirliğin sağlanması amacı ile sertifikalandırılmış kalibrasyon (tek analit veya karışım) standartları (9) veya saflığı sertifikalandırılmış SRMler temin edilmelidir. Saflığı sertifikalandırılmış katı fazdaki SRMler uygun çözücülerde çözülerek istenilen derişim(ler)de stok çözeltiler hazırlanır. Çalışma amacına ve kapsamına bağlı olarak bu stok çözeltiden ara çalışma çözeltileri ve birden fazla analitin ölçümünün yapıldığı durumlarda ölçümü yapılan analitleri içeren çözelti karışımları hazırlanabilir. Ancak bu durumda uygulanacak ara işlemlerde (tartımlar, hacim ölçümleri gibi) izlenebilirlik sağlanmalıdır. Laboratuvarlar bir risk değerlendirmesi sonucu veya tercihen çözelti hazırlamak yerine belirli derişimlerde kullanıma hazır sertifikalı stok veya karışım standart çözeltilerini de almayı tercih edebilir. Laboratuvar çözeltilere ait detayları dokümanite eder ve standart çözeltinin kararlılığını etkilemeyecek saklama koşullarını tecrübelerle veya literatüre dayanarak veya deneysel çalışmalar yaparak belirler. Eski standartların kararlılığının istatistikî olarak hazırlanan yeni (taze) standarda karşı değerlendirilme yöntemi literatürde sunulmuştur (40). Standart test metodu kullanılması durumunda metotta çözeltilerle ilgili bu bilgiler yer alıyorsa metot öngörülerine aynen uyulur.

[‡] Tek noktalı kalibrasyon yapmak izotopça zenginleştirilmiş standartların kullanıldığı izotop seyreltme tekniği kullanıldığında veya doğrusallıktan emin olduğu durumlarda mümkündür.

Cihazın çalışma aralığının belirlenmesi ve amaca uygunluğunun değerlendirilmesi için, beklenen derişim aralığının en az % 10 azı ve fazlası derişimler ile incelenir. Çalışılacak deney seviyesi belirlenirken, yasal şartlar ve ilgili deney alanı için yayımlanan rehberler dikkate alınmalı ve ölçüm noktalarının sayısı olabildiğince arttırılmalıdır. Böyle bir rehberin olmadığı durumlarda bu aralıkta seçilecek ölçüm noktalarının sayısının boş dâhil en az 6 olması tavsiye edilir. Rutin metot uygulamalarında mevzuata veya test metoduna uygun olarak daha az sayıda ölçüm noktası seçilebilir. Derişimler “x” eksenine tercihen eşit aralıklarla olacak şekilde seçilmelidir. Her derişim seviyesindeki tekrar sayısının istatistiksel hesaplamaların güvenilirliği için en az 2 olması tavsiye edilir.

Laboratuvar kalibrasyon eğrisinin çiziminde kullanacağı dış kalibrasyon, standart ekleme vb. yöntemleri literatüre veya tecrübelerine dayanarak belirler. Bunlara ek olarak iç standart ekleme yöntemi hem dış kalibrasyonda hem de standart ekleme kalibrasyon yönteminde ölçüm aşamalarından veya cihazdan oluşabilecek hata oranlarını azaltmak için kullanılır. Bazı aletli analiz tekniklerinde, matriksden gelen bazı bileşenler analitin sinyalini artırma veya azaltma yönünde eğilim gösterebildiği için matriksle uyumlu kalibrasyon standart çözeltisi hazırlanması önerilir. Bu amaçla, içinde aranan analiti içermeyen boş numunelere tüm analitik prosedürün uygulaması sonrası elde edilen çözelti kalibrasyon standartlarının seyreltilmesinde kullanılır. Matriks etkisinin istatistiksel olarak önemli olup olmadığı t-testi ile ortaya konabilir (41).

Metodun çalışma aralığı belirlenmesi

Metodun çalışma aralığı belirlenirken;

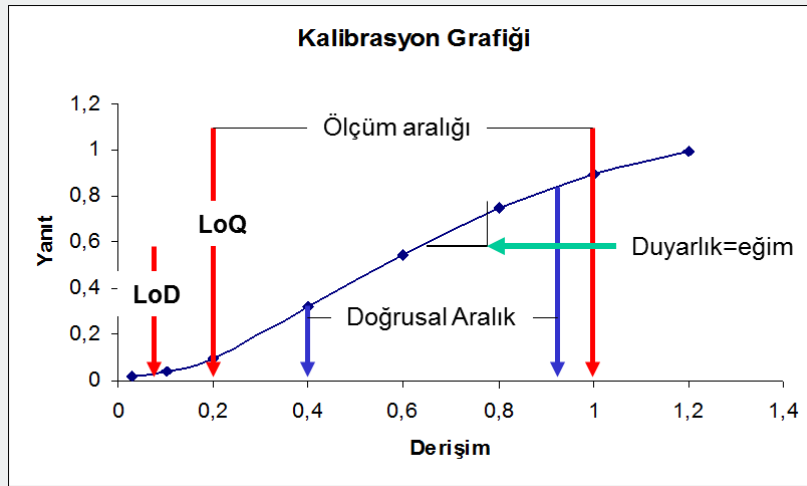
- a) Bilinen derişimde (farklı derişimlerde matriks uyumlu referans malzeme veya analit eklenmiş) numuneler ve boş numuneler temin edilmeli,
- b) Kullanılan numuneler tüm ölçüm metodu uygulanarak analiz edilmeli ve hesaplanmalı,
- c) Farklı derişimlerdeki numuneler tercihen hedeflenen çalışma aralığını kapsamalı,
- d) Cihaz, belirlenen kalibrasyon yöntemi uygulanarak kalibre edilmelidir.

Çalışma, hedef aralık boyunca eşit şekilde dağılmış 6-10 farklı derişimdeki RM veya analit eklenmiş numune ve boş numune en az 2 defa ölçülerek yapılır.

Metodun çalışma aralığı içindeki derişim seviyelerinde elde edilmiş kesinlik ve gerçeklik verileriyle, çalışma aralığı değerlendirilir. Gerçeklik ve kesinlik çalışmalarındaki veriler uygunsa ve ilgili aralığı kapsıyorsa ayrı bir çalışma istenmeyebilir (3).

Metot ve cihaz çalışma aralığının değerlendirilmesi

Görsel inceleme. Çalışma aralığının değerlendirilmesi için ilk aşamada, verilen derişimlere/seviyelere (x) karşılık ölçüm yanıtları/sonuçları (y) Şekil 4'teki gibi grafiğe aktarılır ve iki değişken arasındaki ilişkinin ilk değerlendirilmesi görsel olarak yapılır. Regresyon analizine dâhil edilemeyecek aykırı değerler görsel olarak incelenir. Eğer x ve y değerleri arasında lineer olmayan bir ilişki görülüyorsa istatistiksel olarak doğrusallık testlerinin yapılmasına gerek yoktur. Şekil 4'te, kalibrasyon standartlarının derişimine (x eksen) karşılık cihazın yanıtı (sinyali-y eksen) arasındaki bağıntı kalibrasyon grafiği olarak tanımlanır ve cihazın çalışma aralığına ait grafik örneği olarak verilmektedir. Test numunesinin *sahip olması beklenen derişimler* (farklı derişimlerde matris uyumlu referans malzemesi veya analit eklenmiş numuneler) (x eksen) ile ölçülen değerden hesaplanan derişim (y eksen) arasındaki bağıntı ile (kalibrasyon grafiği) metodun çalışma aralığı değerlendirilebilir. Ölçülen derişim, metotta belirtildiği gibi numuneye ölçüm yönteminin tümüyle uygulanması (numune hazırlık dâhil) ve kalibre edilmiş cihazın kullanılmasıyla elde edilen sonuçtur.



Şekil 4. Cihaz ve metodun çalışma aralığının belirlenmesi için çizilen kalibrasyon grafiği.

Uygun matematiksel modelin bulunması. İkinci aşamada ilişkinin türü yani derişime karşılık cihazın verdiği yanıt arasındaki en uygun matematiksel (örneğin basit doğrusal veya ağırlıklı regresyon, quadratik) model belirlenir. Doğrusal regresyon modeli yaygın olarak kullanılsa da,

y ekseninde yer alan cihaz sinyalinin standart sapması derişimle orantılı ise *ağırlıklı doğrusal regresyon modeli* kullanılır. Kalibrasyon eğrilerini oluşturan veriler arasında (x ile y) her zaman doğrusal bir ilişkinin olacağı düşünülmemeli ve bazı durumlarda 2. dereceden, quadratik veya başka bir bağıntının mümkün olabileceği göz ardı edilmemelidir.

Doğrusallık (Lineerlik) testleri. Üçüncü aşamada, bağıntının belirlenmesi için seçilen modelin regresyon istatistiği yapılır. Doğrusal bağıntı için artık grafiği çizilerek derişim ve yanıt arasındaki doğrusal ilişki onaylanmalıdır. Ölçüm sonucu ile model fonksiyondan elde edilen sonuçlar arasındaki fark olarak tanımlanan artıkların, sıfıra göre rastgele dağılımı doğrusallığı ortaya koymaktadır. Sistemik eğilimler doğrusallığın olmadığını gösterir. Kalibrasyon eğrisinden sapan bir değeri, ona yakın derişimleri değerlendirmeden ve teknik gerekçeler sunmadan hesaplama dışı bırakmak güvenli değildir. Kalibrasyon eğrisinin doğrusallığını değerlendirirken Mandel's uygunluk testi kullanılabilir (3) (11) (42)

Matematiksel modeller, analiste kalibrasyon için net ve güvenilir bir fonksiyonel ilişki bulmakta yardımcı olmalı ve analitik ekipmanın kabiliyetlerini sınırlamamalıdır. Regresyon türleri ve artık analizi ve ilgili grafik Ek 7'de detaylı olarak ele alınmıştır.

Değerlendirmenin objektif delillerle ispatlanması ve doğru raporlama için fonksiyona ait korelasyon katsayısı, y eksenindeki kesme noktası, regresyon denkleminin eğimi ve artık kareler toplamı sunulur (42) (14).

Cihazın çalışma aralığı ve uygun kalibrasyon fonksiyonu belirlendikten sonra (kullanılan ölçüm metodunun doğasına ve cihazın aynı derişimdeki ilgili analite karşı verdiği yanıtın zamanla değişimine bağlı olarak) günlük, haftalık veya belirli periyotlarla tekrarlanır. Bazı sektörel rehberlerde, çalışma aralığı doğrusal olarak ortaya konulduktan ve uygun regresyon fonksiyonu oluşturulduktan sonra rutin kullanımda belirli şartlar dahilinde tek noktalı kalibrasyon kullanılmasına izin verilmektedir (9).

Standart test metodu kullanıldığında metot yapıcı ilişkiyi doğrusal (lineer) olarak tanımlamış ise lineerlik doğrulaması yapmaya gerek yoktur. Ancak metotta verilmesi durumunda korelasyon katsayısına uygun çalışmalıdır.

Sağlamlık (Dayanıklılık)

Sağlamlık bir deney metodunun sonucu etkileyen önemli parametreleri üzerinde yapılan küçük planlı değişikliklerin sonuca etki düzeylerinin belirlenmesidir. Bu etkilerin istatistiksel olarak anlamlı olmaması metodun, ilgili parametreler için sağlam olduğunu gösterir (3) (43). Metodun geçerli kılınması çalışmalarında sağlamlık ve dayanıklılık çoğu zaman birbiri yerine geçen terimler olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu kılavuzda sadece sağlamlık terimi kullanılacaktır.

Değişkenler, çalışmalar esnasında ölçülen, kontrol edilen veya manipüle edilen faktörlerdir. Bir durumdan diğerine farklılık gösterirler. Değişkenler nitel ve nicel olarak tanımlanmanın yanında bu veri tiplerinin alt tanımlamaları olarak aşağıdaki şekilde de verilebilir. Değişken örnekleri Tablo 9’da verilmiştir.

Tablo 9. Değişkenlerin tanımlanmasına örnek.

Değişken türü	Örnek
Nitel - Nominal	Nitel sınıflandırmalarda kullanılırlar (renk gibi)
Nitel - Ordinal	Ölçmeye çalıştığımız büyüklüğün büyük/küçük veya kaliteli/kalitesiz olarak sınıflandırılmasını sağlar. Ne kadar kaliteli veya ne kadar büyük olduğu konusunda bilgi vermez.
Nicel - Aralık	Ölçülen değerlerin sıralanmasını ve değerler arasındaki farklılıkların karşılaştırılması ve ölçülmesini sağlar.
Nicel - Oran	Aralık değişkenlerin özelliklerine ek olarak, tanımlanabilen bir sıfır noktasına sahiptir, böylece “X Y’den 2 kat daha fazladır” gibi ifadeler de kullanılabilir.

Değişkenlerin etki düzeylerinin belirlenmesi amacı ile (sağlamlık) uygun bir deney tasarımı seçilmelidir. En iyi deney tasarımı, en az deneysel çaba ile en fazla anlamlı veri elde edilmesini sağlayan deney tasarımıdır. Sağlamlık çalışmalarında çeşitli yaklaşımlar mümkün olsa da en yaygın olarak kullanılanlar; basit deneysel tasarım (41), faktöriyel deneysel tasarımlardan Plackett-Burmann deneysel tasarımı (44) ve bir seri hiyerarşik etkileşimin ele alındığı iç içe deneysel tasarımıdır (45).

Basit deney tasarımında her seferinde bir parametre değiştirilirken diğer bağımsız parametreler sabit tutulur. Bu yöntem ile değiştirilen parametrenin deney sonuçlarına etkisi araştırılmaktadır (46). Etkenlerin tek tek incelenebildiği gibi birleşik etkileri de incelenebilir (47). Metod parametreleri arasında bir etkileşim söz konusu olduğu ve çok sayıda parametrenin eş zamanlı olarak değerlendirilmesi gerektiğinde *faktöriyel deneysel tasarım* önerilir, ancak kullanımı

istatistiksel bilgi ve tecrübe gerektirmektedir. Bu tür deneysel tasarımlarında K sayıda faktörün L sayıda değişkeni varsa L^K kadar deney yapılması gerekmektedir. Plackett-Burmann ve iç içe deneysel tasarımların dışında kullanılan deneysel tasarımları arasında Taguchi, Box-Behnken, Central composite, Latin hypercube vb. sayılabilir. Deneysel tasarım uygulamalarında ticari yazılımlar kullanılabilir. Bunlardan birkaçı; *Design-Expert*, *Fusion Pro*, *Minitab*, *Modde* vb. olarak gösterilebilir.

Çalışmanın yapılabilmesi için analiz öncesi araştırma yapmak ve metot üzerinde etkisi olan olası değişiklikleri belirlemek de faydalı olacaktır. Olası nicel ve nitel değişikliklere örnek olarak metot parametreleri (mekanik testlerde; çekme hızı, uzama oranı, aletli analizlerde; mobil faz bileşimi, kolon sıcaklığı, farklı kolon; farklı seri, üretici, özütleme süresi, özütleme çözücüsü, çözücülerin saflığı veya üreticisi, mobil faz akış hızı gibi) ve çevresel şartlar (laboratuvar sıcaklığı, nem gibi) verilebilir. Sağlamlık çalışmasının sonuçları aşağıda örnekleri verilen ifadeler gibi raporlanabilir.

- Numune (105 ± 2) °C’de kurutulur.
- Mekanik testlerde çekme hızı (105 ± 2) mm/min’dir.
- Mikrofonun yerden yüksekliği (70 ± 10) cm olmalıdır.
- Hazırlanan çözelti buzdolabında en fazla 2 hafta kararlıdır.
- Tampon çözeltinin pH’sı $5,5 \pm 0,1$ olmalıdır.

Çalışma sonucunda etkisi tespit edilen kritik deney parametrelerinin değişim aralığı (tolerans sınırları) geçerli kılma raporunda ve deney/ölçüm prosedüründe belirtilmelidir.

Metot geçerli kılma çalışmaları kapsamında sağlamlık testi genellikle aşağıdaki aşamaları içerir.

1. Test edilecek faktörlerin belirlenmesi

Sağlamlık testinde değerlendirilecek deney metodu, numune alma aşamasından sonucun elde edilmesine kadar tüm detayları ile incelenir ve faktörler (ölçüm sonucunu etkileyebilecek deney/ölçüm koşulları) tespit edilir. Bu çalışma yapılırken, metot geliştirme aşamasında edinilen tecrübelerden, benzer deneylere uygulanmış sağlamlık testi örneklerinden veya ulusal/uluslararası yayımlanmış bilimsel makalelerden yararlanılabilir. Faktörler nicel ve nitel

karakterde olabilir. Nitel faktöre örnek olarak farklı marka kromatografi kolonu kullanımını gösterilebilir. Nicel faktörlere bir örnek ise Tablo 10'da verilmiştir.

Test edilecek faktörler “*etkin faktörler*” olarak tanımlanır. Deney tasarımını istatistiksel olarak anlamlı hale getirmek için “*sanal faktörler*” belirlenir. Sanal faktörler gerçek bir faktör değildir. Bu sanal faktörler rastgele ölçüm hatalarını ortaya koymak için gerekmektedir. Plackett-Burman deney tasarımı için etkin faktörler, sanal faktörler ve deney sayıları ilişkisini Tablo 11 göstermektedir. Daha fazla sayıda faktör için sağlamlık çalışması yapmak veya daha güvenilir sonuçlar elde etmek amacıyla deney sayısı artırılabilir.

Tablo 10. Grafit fırınlı atomik absorpsiyon spektrometresi metodu ile yapılan bir deney için örnek bazı nicel faktörler.

Sembol	Faktör	Değişken 1	Değişken 2	Nominal Değer
		Yüksek Değer (+1)	Düşük Değer (-1)	
A	Enjeksiyon hacmi (µL)	30	10	20
B	Atomlaşma sıcaklığı (°C)	2700	2600	2650
C	Kütleme Süresi (s)	40	10	25
D	Kütleme Sıcaklığı (°C)	1100	700	900
E	Sanal faktör			
F	Sanal faktör			
G	Sanal faktör			

Tablo 11. Plackett-Burman deney tasarımı için etkin faktörler, sanal faktörler ve deney sayıları ilişkisi.

Etkin faktör sayısı	Sanal faktör sayısı	Plackett-Burman deney tasarımı	Deney dizi sayısı
3-4	4-3	7 faktör için	8
5-8	6-3	11 faktör için	12
9-12	6-3	15 faktör için	16
13-16	6-3	19 faktör için	20
17-20	6-3	23 faktör için	24

2. Tespit edilen faktörler için değişim aralığının belirlenmesi

Sağlamlık çalışmasında faktör seviyelerinin belirlenmesine geçilmeden önce metod optimizasyonu sırasında faktörlerin en uygun koşulları (nicel nominal değerler ve nitel şartlar) belirlenir. Çalışmanın kapsamı ve aralıkları belirlenirken söz konusu deney ve ölçüm

sonuçlarını etkileyen tüm nicel ve nitel faktörler dâhil edilmeli ve çalışma aralıkları belirlenirken laboratuvarında karşılaşılabilecek durumlar göz önüne alınmalıdır.

Nicel nominal değerler için değişim aralığı belirlenirken, genellikle nominal değerden eşit sapmalar göz önüne alınır. Uç değerler (değişken 1 ve 2) nominal değere göre simetrik olarak seçilir (Örneğin, etüv sıcaklığı nominal değeri 100 °C olması ve değişim aralığının 97-103 °C seçilmesi). Simetrik seçimin çalışmaya uygun olmadığı durumlarda, iki uç değer nominal değer üzerinde asimetrik olarak seçilebilir (örneğin, 25 °C'nin altında çalışmayan HPLC kolon fırınında nominal değer 30 °C olması halinde değişim aralığının 25-40 °C seçilmesi durumu). Ancak sapma yönlerinden herhangi birini kullanma imkânı yoksa nominal değer ve uygun olan uç değerden birisi değişken olarak seçilir (örneğin, 25 °C'nin altında çalışmayan HPLC kolon fırınında nominal değer 25 °C olması halinde değişim aralığının 25-40 °C seçilmesi durumu). Sanal faktörler için değişim aralıkları belirlenmez, sonuçlar (+1) veya (-1) olarak yer alır. Tablo 10'da seçilen bazı faktörler ve değişkenler gösterilmiştir. Yüksek değerler için genellikle (+1), düşük değerler için (-1) kullanımı tercih edilirken, nitel karakterli faktörlerde değişkenlerin (+1) veya (-1) olarak seçilmesinin bir önemi yoktur.

3. Deneysel tasarımın seçilmesi

Analitik metotların geçerli kılınmasında sağlamlık testi için en sık kullanılan deneysel tasarım Plackett-Burman deneysel tasarımıdır. Bu deneysel tasarımın özelliği $4n$ sayıda ölçüm yapılarak $4n-1$ sayıda faktörün incelenebilmesidir. Örneğin 7 faktörün sağlamlık açısından test edilmesi için 8 çalışma yapmak yeterlidir. Rastgele hatalardan kaynaklanan problemlerin en aza indirilmesi için yapılan 8 deney dizisi kendi içerisinde en az 2 tekrar ile uygulanmalıdır. Plackett-Burman deney tasarımında 8, 12, 16 ve 20 deney dizi sayısı için oluşturulacak tasarımın ilk satırındaki (1 numaralı deney dizi satırı) değişkenler Tablo 12'de verilmiştir. Diğer satırlar bir önceki satırın bir kaydırılması ile oluşturulur.

Tablo 12. Plackett-Burman deney tasarımında değişkenlerin durumu.

Deneysel dizi no	Deneysel tasarım ilk satırı
8	+++----
12	++-++++-+-
16	++++-+-++-+-
20	++-++-+-+--+-

Deneyisel tasarım, her bir faktörün yüksek (+1) ve düşük (-1) değerlerini eşit sayıda içermelidir. Ayrıca her bir faktörün yüksek ve düşük değerleri de eşit sayıda olmalıdır. Örneğin, 7 faktörlü (4 etkin, 3 sanal) 8 deneyli Plackett-Burman deneyel tasarımına ait örnek Tablo 13'de verilmiştir. Burada A faktörünün 4 adet (+1) ve 4 adet (-1) değeri bulunmaktadır. Aynı şekilde diğer faktörler de eşit sayıda (+1) ve (-1) değerlerini içermektedir. Örneğin, A faktörünün (+1) değerine karşılık (Deney no 1, 4, 6 ve 7) B faktörünün 2 adet (+1) değeri (Deney no 1 ve 7) ve 2 adet (-1) değeri (Deney no 4 ve 6) bulunmaktadır.

Tablo 13. Plackett-Burman deney tasarımı (7 faktör 8 deney için).

Deney Dizi No	Faktör Sembolleri						
	A	B	C	D	E	F	G
1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1
2	-1	+1	+1	+1	-1	+1	-1
3	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1
4	+1	-1	-1	+1	+1	+1	-1
5	-1	+1	-1	-1	+1	+1	+1
6	+1	-1	+1	-1	-1	+1	+1
7	+1	+1	-1	+1	-1	-1	+1
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

4. Ölçümlerin yapılması

Ölçümler tekrarlanabilirlik koşulları altında ve tüm işlem basamakları uygulanarak yapılır. Belirlenen faktör ve değişken kombinasyonlarının her biri için ölçüm en az 2 kez tekrarlanır. A, B, C ve D sembollerine ait faktörler; etkin faktörler, E, F ve G sembollerine ait faktörler; sanal faktörler olarak seçilirse, deneyler Tablo 14'de gösterildiği düzende yapılır. Etkin faktörlerin sayısı ve deneyel tasarımı, uygulamadan uygulamaya farklılık gösterebilir. Bu durumda örneğin, 1 numaralı deneyde atomik absorpsiyon spektrometresi cihazının enjeksiyon hacmi (A faktörü) 30 µL (+1), atomlaşma sıcaklığı (B faktörü) 2700 °C (+1), kütleme süresi (C faktörü) 40 s (+1), kütleme sıcaklığı (D faktörü) 700 °C (-1) olarak ayarlanarak en az 2 tekrarlı ölçüm yapılır. E, F ve G faktörleri sanal faktörler olduğu için sadece faktörlerin etki değerlerinin hesaplanmasında kullanılmaktadır. Geriye kalan deneyler de tamamlanarak toplamda 8 deney grubundan elde edilen veriler (cihaz sinyalleri, örn: absorpsiyon, gerilim farkı) kaydedilir.

Tablo 14. Plackett-Burman deney tasarımı (7 faktör 8 deney için) uygulanarak elde edilen ölçüm sonucu.

Deney Dizi No	Etkin faktörler				Sanal faktörler			Ölçüm Sonucu (y_i)
	A	B	C	D	E	F	G	
1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	y_1
2	-1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	y_2
3	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	y_3
4	+1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	y_4
5	-1	+1	-1	-1	+1	+1	+1	y_5
6	+1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	y_6
7	+1	+1	-1	+1	-1	-1	+1	y_7
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	y_8

5. Faktörlerin etkilerinin hesaplanması ve sağlamlık çalışmasının değerlendirilmesi

Sağlamlık testine tabi tutulan faktörlerin ölçüm sonucuna etkileri kullanılan deney tasarımına göre değişkenlik gösterebilir. En yaygın kullanımlardan biri E_x değerinin bulunmasıdır. E_x değeri E_{crit} değerinden büyükse faktör ölçüm sonucunu önemli derece etkilemektedir. Faktörlerin etkilerinin hesaplanması ve değerlendirilmesi konusunda bu kılavuzda verilenlerin dışında farklı hesaplama yöntemleri de vardır.

$$E_x = \frac{\sum y_{i(+1)} - \sum y_{i(-1)}}{N/2} \quad \text{Denklem 29}$$

$$(SE)_e = \left(\frac{\sum E_N^2}{n_N} \right)^{1/2} \quad \text{Denklem 30}$$

$$E_{crit} = t_{crit} \times (SE)_e \quad \text{Denklem 31}$$

E_x	Her bir faktöre ait etki değeri
E_{crit}	Kritik etki değeri
N	Deney sayısı (Tablodaki örnekte N=8)
E_N	Sanal faktörlerin etki değeri (E, F ve G faktörleri)
$\sum E_N^2 = E_E^2 + E_F^2 + E_G^2$	E, F ve G faktörleri için E_N
$(SE)_e$	Faktörün standart hatası
n_N	Sanal faktörlerin sayısı ($n_N=3$)
t_{crit}	İki uçlu t dağılımında % 95 olasılıkta ve belirli bir serbestlik derecesinde (Serbestlik derecesi n_N)

Faktörün standart hatasının $(SE)_e$ hesaplanmasında farklı yöntemler vardır. Bunlardan bir tanesi ara kesinlik koşulları altında nominal değerlerde yapılan tekrarlı ölçümlerinin standart sapmasının kullanılmasıdır. Aşağıdaki formül ile hesaplanır.

$$(SE)_e = \left(\frac{2s^2}{n} \right)^{1/2} \quad \text{Denklem 32}$$

n: tekrar sayısı
s: standart sapma

DeneySEL parametrelerden önemli düzeyde yüksek etkiye ($E_x > E_{crit}$) sahip faktörler belirlendikten sonra bu faktörlerle ilgili açıklama ve notlar deney prosedürüne eklenir. Sağlık çalışmaları sonuçları değerlendirilirken çok sayıda çıkarım yapılabilir. Test edilen faktörlerden istatistiksel olarak ve/veya deneyimler ışığında önemli derecede etkin olanlar belirlendikten sonra o faktör için değişim aralığı daraltılarak test tekrar edilir.

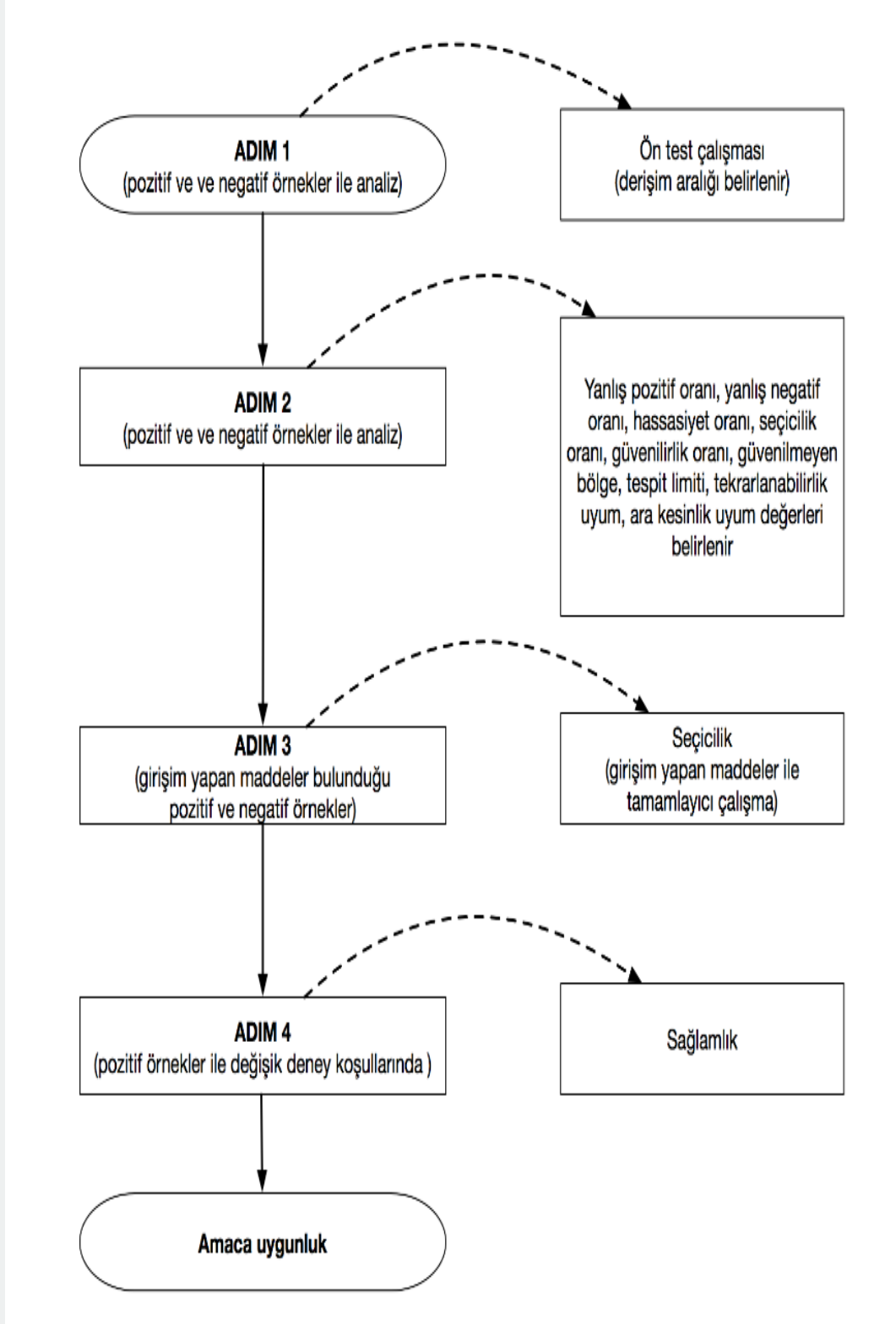
6.4. Nitel Metotlar için Performans Parametreleri

Nitel bir metot “bir maddeyi kimyasal, biyolojik veya fiziksel özelliklerine göre tanımlayan analitik metot” olarak tanımlanmıştır (25). Nitel metotlar, sonuçların pozitif (var) veya negatif (yok) yanıt veya var/yok olarak tanımlandığı; limit testler gibi belirli bir eşik değer ile büyüklüğün karşılaştırıldığı ve moleküler yapı veya cins tanımlanması hakkında bilgilerin verildiği metotlardır (48). Kimyasal analizlerde özellikle nicel metotların çok pahalı olduğu durumlarda tarama testleri olarak da kullanılabilir. Bu şekilde izin verilen limitler ile hızlı bir şekilde kıyaslama yapılarak analiz maliyetleri düşürülebilmektedir. Örneğin, doping testlerinde önce yasaklı maddeye “var/yok” bakılır, varsa miktarı tespit edilir. Aynı şekilde tarama amacıyla hayvansal ürünlerde antibiyotik kalıntılarına var/yok metotları ile bakıldıktan sonra pozitif ve şüpheli durumlarda miktar tespiti yapılabilir.

Nitel metotlarda metotların geçerli kılınması ile ilgili çeşitli araştırmacılar tarafından yazılmış yayınlar ve bazı rehberler içinde belirtilmiş performans kriterleri bulunmakla birlikte tüm deney alanları için kullanılacak tek bir rehberin varlığı söz konusu değildir (49). Bu metotların sonuçlarını yorumlamak için kullanılan istatistiksel yöntemler ve terimler, nicel metotlardan farklılık göstermektedir. Algılama/tayin sınırı ve seçicilik nicel metotlarla aynı anlamda kullanılmak ile birlikte sapma, kesinlik ve ölçüm belirsizliği gibi terimler nitel alanda kullanılmamaktadır (48).

Nitel analizlerde geçerli kılma, uygulanan deney tasarımına göre en az dört basamaktan oluşur (50). Her bir basamaktaki performans kriterleri aynı veri setinden elde edilen sonuçlar kullanılarak hesaplanır. Şekil 5’te gösterilen bu basamaklar sırası ile

1. **Değişim aralığının belirlenmesi için pozitif ve negatif numuneler kullanılarak yapılan ön test çalışması,**
2. Pozitif ve negatif numuneler kullanılarak;
 - i. Yanlış Pozitif Oranı (False Positive Rate - FPR),
 - ii. Yanlış Negatif Oranı (False Negative Rate-FNR),
 - iii. Hassasiyet Oranı (Sensitivity Rate – SNR veya SS),
 - iv. Özgüllük Oranı (Specificity Rate – SLR veya SP),
 - v. Pozitif Kestirim Değeri (Positive Predictive Value- PPV),
 - vi. Negatif Kestirim Değeri (Negative Predictive Value- PPV),
 - vii. Pozitif Olabilirlik Oranı (Likelihood Ratio of Positive Results- LR(+),
 - viii. Negatif Olabilirlik Oranı (Likelihood Ratio of Negative Results- LR(-),
 - ix. Güvenilirlik Oranı/Etkinlik (Reliability Rate-RLR),
 - x. Güvenilmeyen Bölge (Unreliability Region -UR),
 - xi. Algılama Sınırı (Limit of Detection-LOD),
 - xii. Tekrarlanabilirlik Uyum (Accordance -ACC),
 - xiii. Ara Kesinlik Uyum (Concordance - CON) değerlerinin belirlenmesi,
3. **Seçiciliğin** pozitif ve negatif numuneler kullanılarak potansiyel girişimler varlığında değerlendirilmesi,
4. **Sağlamlığın** pozitif numuneler ile değişik deney koşullarında incelenmesidir.

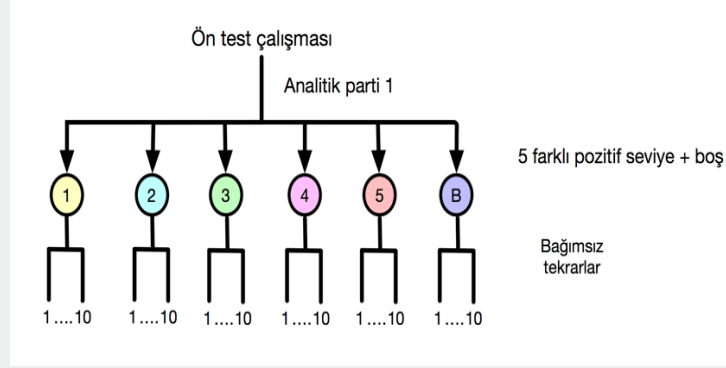


Şekil 5. Nitel analizlerde geçerli kılma basamakları (50).

Ön Test Çalışması

Ön test, bir sonraki aşamanın planlanabilmesi ve iyi bir dağılım elde edilen derişim aralığının belirlenmesi için yapılır (50).

Şekil 6'da gösterilen ön test çalışmasında, derişim aralığı boyunca eşit aralıklarla seçilmiş beş farklı seviyede olan pozitif numuneler ve bir negatif numune (boş) kullanılır. Derişimler belirlenirken mevzuatta belirtilen limitler ve ticari kitlerde üreticinin beyan ettiği LOD dikkate alınır. RM veya bulunmadığı durumda analit eklenmiş numune kullanılır. Tüm derişim seviyelerinde pozitif numuneler ve negatif numuneler, tekrarlanabilirlik koşulları altında 10 tekrarlı olarak analiz edilir (50). Yapılan çalışmada bağımsızlık koşulunun sağlanması için numuneler rastgele sırayla analiz edilmeli ve analistler numunelerin derişim seviyeleri hakkında bilgi sahibi olmamalıdır.



Şekil 6. Ön test çalışması deney tasarımı (50).

Oranlar, Algılama Sınırı, Güvenilmeyen Bölge ve Uyumlar

Oranlar (yanlış pozitif, yanlış negatif, hassasiyet, seçicilik, güvenilirlik)

Nitel analizlerde oranların belirlenmesinde çapraz tablolar, performans özellikleri eğrisi veya Bayes teoremi kullanılabilir (49). Çapraz tablo, farklı prensipteki analizler için uygulanabilir olduğundan kullanımı daha çok tercih edilmektedir (50). Bahsedilen performans kriterlerinin belirlenmesi için yaygın olarak Tablo 15'de gösterilen 2 X 2 çapraz tablolar (contingency table) kullanılır. Oranlar gerçek değer verdiği kabul edilen referans bir metot veya referans bir değer ile karşılaştırılarak hesaplanır. Böylelikle çapraz tablolar kullanılarak FPR, FNR, SNR, SLR, PPV, NPV, RLR, LR(+) ve LR(-) olmak üzere 9 performans hesaplanabilir (49).

Çapraz tablolar yaklaşımının temel özelliklerinden biri, nitel metotların performansı ile ilgili genel bir bakış açısı vermesidir. Fakat her bir numune için hata olasılığı hakkında bilgi vermez. Rutin numunelerin çapraz tabloyu oluşturmak için kullanılan numunelerle aynı istatistiksel davranışa sahip olduğu varsayılmaktadır. Bu nedenle tablonun oluşturulması için kullanılan numunelerin toplam sayısı çok önemlidir.

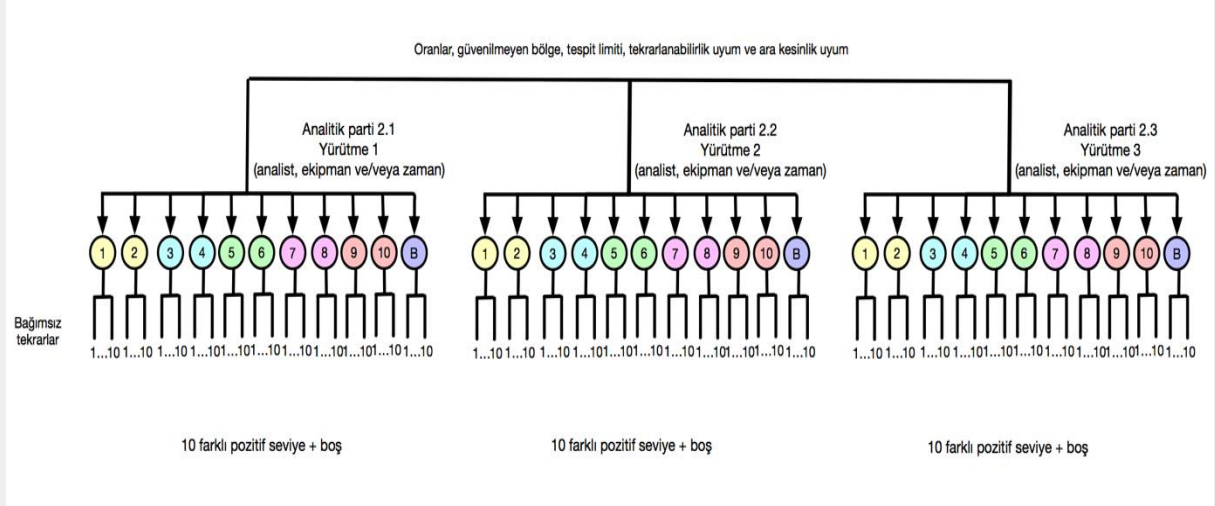
Tarama amaçlı kullanılan metotlar için geçerli kılma çalışmasında tüm numunelerin hem nicel yöntemler hem de onay (nitel veya nicel) yöntemleri kullanılarak analiz edilmesi gerektiğine dikkat edilmelidir (49).

Tablo 15. 2 X 2 çapraz tablo.

Gözlenen değer	Referans değer (Beklenen değer)		Toplam
	Pozitif	Negatif	
Pozitif	TP	FP	$n_{P,obs}$
Negatif	FN	TN	$n_{N,obs}$
Toplam	$n_{P,a}$	$n_{N,a}$	N

TN	doğru negatif sonuç sayısı
TP	doğru pozitif sonuç sayısı
FN	yanlış negatif sonuç sayısı
FP	yanlış pozitif sonuç sayısı
$n_{N,obs}$	gözlenen negatif sonuç sayısı toplamı
$n_{P,obs}$	gözlenen pozitif sonuç sayısı toplamı
$n_{N,a}$	gerçek negatif sonuç sayısı toplamı
$n_{P,a}$	gerçek pozitif sonuç sayısı toplamı

Çalışma için, her bir partide 5 ile 10 arasında farklı derişimde analit içeren pozitif numuneler ve negatif numuneler 10 tekrarlı olarak analiz edilirler. Bu şekilde 3 farklı partide çalışma gerçekleştirilir ($n \geq 30$). Bağımsız ölçümleri sağlamak için numuneler rastgele sıra ile hazırlanmalı ve analiz edilmelidir. Numuneler arasında mutlaka boş numunelerde bulunmalıdır. Hesaplamalar yapılırken tüm veriler kullanılabilceği gibi derişimlere göre ayrı da yapılabilir. ACC çalışmaları tekrarlanabilirlik koşullarını ve CON çalışmaları ara kesinlik koşullarını (değişik analitik partiler, değişik analistler, ekipmanlar ve kimyasallar vb.) sağlamalıdır (50).



Şekil 7. Oranlar, güvenilmeyen bölge, tespit limiti, tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik uyum çalışması deney tasarımı (50).

Yanlış pozitif oranı (FPR); Numune içinde aranan analit bulunmadığı halde pozitif sonuç elde edilme olasılığıdır. Bu oran, analitin bulunmadığının bilindiği veya referans bir metot ile negatif olduğu belirlenen numunelere geçerli kılınan metot uygulandığında elde edilen yanlış pozitif (FP) sonuç sayısının, yanlış sonuç pozitif sayısı (FP) ile doğru negatif sonuç sayısının (TN) toplamına eşit olan gerçek negatif sonuç sayısı toplamına ($n_{N,a}$) oranıdır. Yanlış pozitif oranı analitin bulunmadığı durumlar için söz konusu olduğundan derişimden bağımsızdır. Ancak değişik girişim yapan maddeler veya aynı maddenin değişik seviyelerdeki girişimleri farklı yanlış pozitif oranına neden olabileceğinden çalışma deseni oluşturulurken dikkate alınmalıdır (48).

$$FPR(\%) = \frac{FP}{FP+TN} \times 100 \quad \text{Denklem 33}$$

FPR	Yanlış pozitif oranı
FP	Yanlış pozitif sonuç sayısı
TN	Doğru negatif sonuç sayısı

Yanlış negatif oranı (FNR); Örnek içinde aranan analit bulunduğu halde negatif sonuç elde edilme olasılığıdır. Bu oran, analitin bulunduğu bilindiği veya referans bir metot ile pozitif olduğu belirlenen numunelerde geçerli kılınan metot uygulandığında elde edilen yanlış negatif (FN) sonuç sayısının, yanlış negatif sonuç sayısı (FN) ile doğru pozitif sonuç sayısı (TP) toplamına eşit olan gerçek pozitif sonuç sayısı toplamına ($n_{P,a}$) oranıdır. Yanlış negatif oranı ve onun tamamlayıcısı olan *hassasiyet oranı* analitin derişiminden etkilenmektedir (48).

$$FNR(\%) = \frac{FN}{FN + TP} \times 100$$

Denklem 34

FNR Yanlış negatif oranı
FN Yanlış negatif sonuç sayısı
TP Doğru pozitif sonuç sayısı

Özgüllük (Doğru negatif) oranı (SLR); Nitel testlerde analitin bulunmadığı numunelerde analiz sonucunda negatif sonuç alınma oranıdır (48). Bazı kaynaklarda bağıl spesiflik olarak da ifade edilebilir. Çapraz 2X2 olasılık tablosunda sadece negatif olduğu bilinen numuneler üzerinden hesaplandığı için, negatif vakalarla ilgili olasılık verir. Bu nedenle “şartlı olasılık” olarak değerlendirilmelidir. Burada şart negatif vakalardır. Yani incelen örneklerde ne kadar pozitif bulunduğu hassasiyet hesabını etkilemez. Bu oran, analitin bulunmadığı veya referans bir metot ile negatif olduğu belirlenen numunelerde geçerli kılınan metot uygulandığında elde edilen doğru negatif (TN) sonuç sayısının, (doğru negatif sonuç sayısı (TN) ile yanlış pozitif sonuç sayısı (FP) toplamına eşit olan) gerçek negatif sonuç sayısı toplamına ($n_{N,a}$) oranıdır (48) (51).

$$SLR = \frac{TN}{TN + FP} \times 100 = 100 - FPR$$

Denklem 35

Hassasiyet (Doğru pozitif) oranı (SNR); Nitel testlerde analitin bulunduğu numunelerde analiz sonucunda pozitif sonuç alınma oranıdır (48). Çapraz 2X2 olasılık tablosunda sadece pozitif olduğu bilinen numuneler üzerinden hesaplandığı için, pozitif vakalarla ilgili olasılık verisini verir. Bu nedenle “şartlı olasılık” olarak değerlendirilmelidir. Burada şart pozitif vakalardır. Yani incelen örneklerde ne kadar negatif bulunduğu hassasiyet hesabını etkilemez. Ancak analitin derişiminden etkilenir. Bu oran, analitin bulunmadığı veya referans bir metot ile negatif olduğu belirlenen numunelerde geçerli kılınan metot uygulandığında elde edilen doğru pozitif (TP) sonuç sayısının, (doğru pozitif sonuç sayısı (TP) ile yanlış negatif sonuç sayısı (FN) toplamına eşit olan) gerçek pozitif sonuç sayısı toplamına ($n_{P,a}$) oranıdır (48) (51) (52).

$$SNR = \frac{TP}{TP + FN} \times 100 = 100 - FNR$$

Denklem 36

Güvenilirlik (etkinlik/doğruluk) oranı (RLR); Doğru test sonuçlarının elde edilme oranıdır. Doğruluk, iki farklı yöntemle elde edilen yanıtın, tekrarlar ve gerçekleşen ile referans sonuç

arasındaki uygunluk derecesidir. Doğru negatif (TN) ve pozitif (TP) test sonuçları toplamının sayısına ($n=n_{p,a} + n_{n,a}=n_{p,obs} + n_{n,obs}$) oranı ile hesaplanmaktadır (51).

$$RLR = \frac{TP + TN}{TP + TN + FP + FN} \quad \text{Denklem 37}$$

Pozitif ve negatif kestirim değerleri

Nitel testlerdeki amaç aranan maddenin numunede bulunup bulunmadığının ortaya konulması olduğundan elde edilen sonucun doğruluğunun bilinmesi önemlidir. Bu nedenle pozitif kestirim değeri ve negatif kestirim değeri metodun başarısını tanımlamak için hesaplanana n parametrelerdir. Her iki parametrede özellikle tanısal yani hastalıkların tespitinde kullanılan metotların geçerli kılma/doğrulama çalışmalarında hesaplanır (53).

Pozitif kestirim değeri, test metodu ile gözlenen pozitif sonuçların güvenilirliğini ifade eder. Gerçek pozitif sonuçların analiz sonucunda elde edilen pozitiflere oranıdır. Bu hesap hassasiyetin aksine sadece pozitif sonuçları üzerinden hesaplanmaz. Bu nedenle pozitif örnek sayısındaki artış yüksek Pozitif Kestirim Değeri alınmasına neden olur. Aynı şekilde gerçek pozitif örneklerin sayısı azaldığında ve negatifler arttığında daha düşük Pozitif Kestirim Değeri elde edilir. Tanı testlerinde ölçüm metodu ile hasta kararı verildiğinde bireyin gerçekten hasta olma olasılığıdır. Negatif kestirim değeri ise ölçüm metodu ile hasta değil kararı verildiğinde bireyin gerçekten hasta olmama olasılığıdır.

Pozitif kestirim değeri (PPV); Gerçek pozitiflerin analiz sonucunda elde edilen tüm pozitiflere oranıdır (51).

$$PPV = \frac{TP}{TP + FP} \quad \text{Denklem 38}$$

Negatif kestirim değeri (NPV); Gerçek negatiflerin analiz sonucunda elde edilen tüm negatiflere oranıdır (51).

$$NPV = \frac{TN}{TN + FN} \quad \text{Denklem 39}$$

Olabilirlik oranı

Olabilirlik oranı, pozitif ve negatif olabilirlik oranı olarak nitel testlerin performansının belirlenmesi için hesaplanmaktadır. Pozitif olabilirlik oranı, pozitif bir test sonucu gördükten sonra numunenin gerçek pozitif olma olasılığını gösterir. Bu oran ne kadar yüksek olursa,

gerçek pozitifler o derecede iyi tespit edilebilmektedir. Negatif olabilirlik oranı, bir test sonucu negatif olduğunda bunun doğruluk oranını ifade eder. Bu oran ne kadar küçük olursa, gerçek negatifler o kadar iyi tespit edilebilmektedir. Pozitif ve negatif olabilirlik oranı aşağıdaki formüller ile hesaplanır.

$$LR+ = \frac{\text{Hassasiyet (SNR)}}{1 - \text{Özgüllük (SLR)}} \quad \text{Denklem 40}$$

$$LR- = \frac{1 - \text{Hassasiyet (SNR)}}{\text{Özgüllük (SLR)}} \quad \text{Denklem 41}$$

Uyum kontrolü

Elde edilen kategorik sonuçların birbirine uyumunun değerlendirilmesi için beklenen ve gözlenen sonuçlar arasındaki farkın kabul edilir olup olmadığının tespit edilmesi gerekir. Bu amaçla McNemar Ki-kare testi veya Cohen's Kappa Katsayı Testi kullanılabilir. NMKL No 20'de Kappa testinin değerlendirme için daha uygun olduğu belirtilmektedir (52).

McNemar Ki-kare testi: aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanır. Hesaplama sonucu elde edilen ki-kare (χ^2) değeri, %5 anlamlılık seviyesinde 3,84'den küçük bir değer ise beklenen ve elde edilen pozitif oranları arasında anlamlı bir fark yoktur. Büyük olduğu durumda ise %5 anlamlılık seviyesinde referans değer ile elde edilen değerler arasındaki fark vardır sonucuna varılır (52).

$$\chi^2 = \frac{(|FN - FP| - 1)^2}{FN + FP} \quad \text{Denklem 42}$$

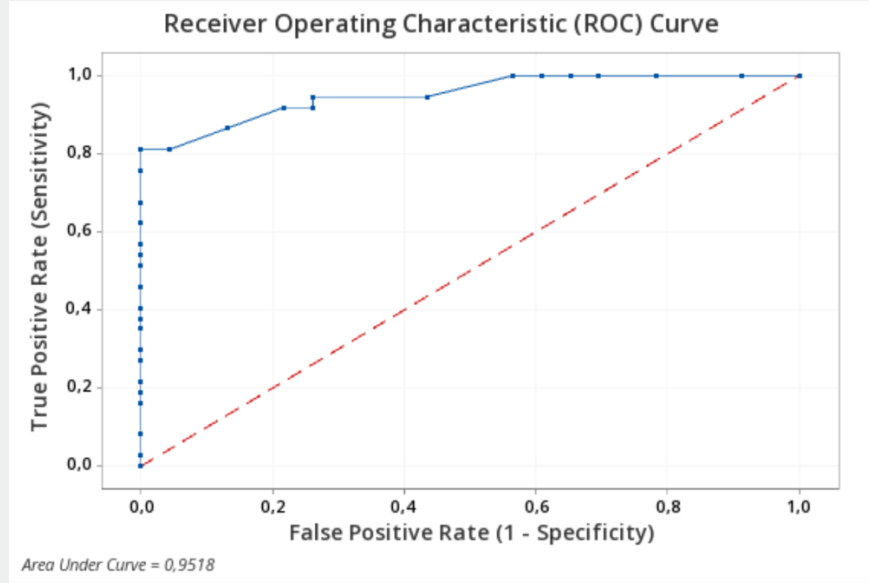
Youden İndeksi, Y; aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanır ve -1 ile +1 arasında değişir. Sıfır değerinin altında elde edilen Youden İndeks değeri testin başarılı olmadığını gösterir. Değer +1'e ne kadar yakınsa ya da iki metot karşılaştırılırken hangi metot +1'e daha yakınsa daha başarılı olarak değerlendirilir.

$$Y = \%SNR + \%SLR - 100 \quad \text{Denklem 43}$$

ROC eğrisi (Alıcı işlem karakteristiği eğrisi); tansal testlerinin performansının değerlendirilmesi için kullanılan yöntemlerden biridir. Eğri üzerinde hassasiyet, özgüllük, kesim sınırı (cut-off) gibi birçok parametre hesaplanabildiği için son yıllarda kullanımı giderek artmıştır. ROC eğrisi hassasiyet (doğru pozitif) değerinin yanlış pozitif (1-özgüllük) değerine karşı çizilmesi ile elde edilir (Şekil 8). Çizilen eğri üzerindeki her bir nokta farklı derişimlere karşılık gelen hassasiyet ve yanlış pozitif değerlerini gösterir. Eğri aynı zamanda birden fazla nitel metodun karşılaştırılması içinde kullanılabilir. Çizilen eğrinin altında kalan alan AUC (Area Under Curve) metodun performansı hakkında bilgi verir. AUC, 0.50 ile 1.00 arasında değerler alabilir ve 1'e ne kadar yakınsa tansal test o düzeyde daha iyi bir ayırım yapabilir anlamını taşımaktadır (53) (54). Buna göre testin ayırım gücü AUC değeri;

- 0.9-1.00 – mükemmel
- 0.8-0.9- iyi
- 0.7-0.8 – kabul edilebilir

olarak değerlendirilir. ROC eğrisi ve AUC değerinin hesaplaması karmaşık olduğu için 6.4.2.1 maddesinde belirtilen deney deseni kullanılarak istatistiksel programlardan (*SPSS, GrapPad, MedCalc* vb.) biri ile hesaplanabilir.



Şekil 8. Minitab programı ile çizilmiş ROC eğrisi.

Kappa testi: Cohen'nin Kappa katsayısı aşağıdaki formül ile hesaplanır ve elde edilen değer üzerinden uyum değerlendirilir. Hesaplama, gözlenen uzlaş (p₀) ile beklenen uzlaş sıklığı (p_e), değeri kullanılır (52)

$$RLR = p_0 = \frac{TP + TN}{TP + TN + FP + FN} \quad \text{Denklem 44}$$

$$p_e = \frac{(n_{P,a} \times n_{P,obs}) + (n_{N,a} \times n_{N,obs})}{(TN + FP + FN + TP)^2} \quad \text{Denklem 45}$$

$$\kappa = (p_0 - p_e) / (1 - p_e) \quad \text{Denklem 46}$$

p₀=RLR; gözlenen uzlaş, güvenilirlik
p_e; beklenen uzlaş

Elde edilen Kappa değeri aşağıdaki gibi değerlendirilir;

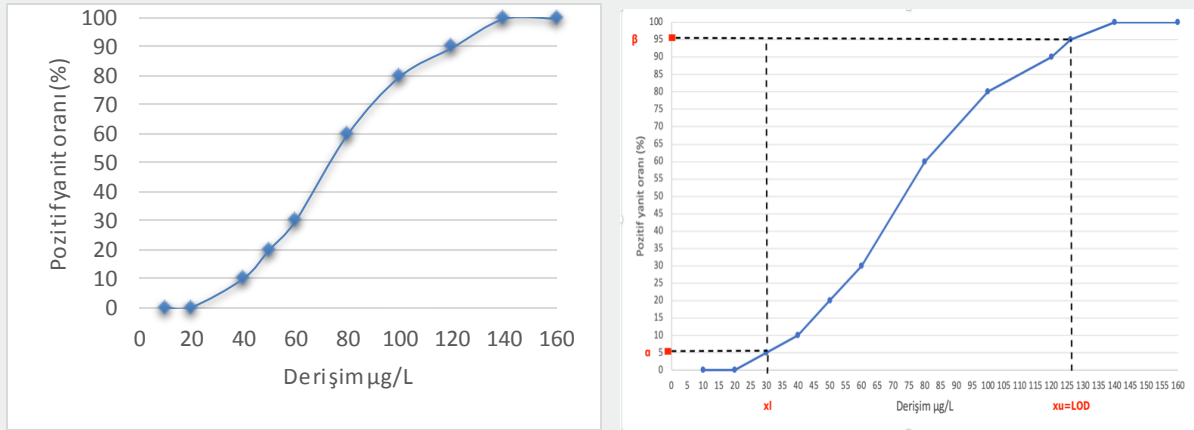
κ ≤ 0.20	Zayıf uyum
0.21 ≤ κ ≤ 0.40	Vasat uyum
0.41 ≤ κ ≤ 0.60	Orta uyum
0.61 ≤ κ ≤ 0.80	İyi uyum
κ > 0.80	Çok iyi uyum

Algılama Sınırı (LOD) ve Güvenilmeyen Bölge (UR)

Nitel analizler için *algılama sınırı*, numunedeki analitin güvenilir bir şekilde tespit edilebildiği en düşük miktar veya derişimdir. Nitel analizlerde algılama sınırı, boş numunelerin standart sapması kullanılarak hesaplanamaz. Algılama sınırı yanlış negatifin (β tipi hatanın) %5 olasılığa eş değer olduğu derişimdir (49).

Özellikle enstrümental yanıtın alındığı nitel yöntemlerde yaygın olarak kullanılmakta olan bir performans parametresi de **Kesim sınırı (cut-off)**'dır. Duyusal yanıtın alındığı nitel metotlarda, genellikle %5 hata olasılığı ile numunenin farklılaştığı derişim seviyesini ifade eder. İzin verilen maksimum limitin belirlendiği durumlarda ise kesim derişimi hassasiyet oranı ile ilişkili olup hassasiyet oranının %95 ve β tipi hataların %5'e denk geldiği derişim seviyesine karşılık gelir (49).

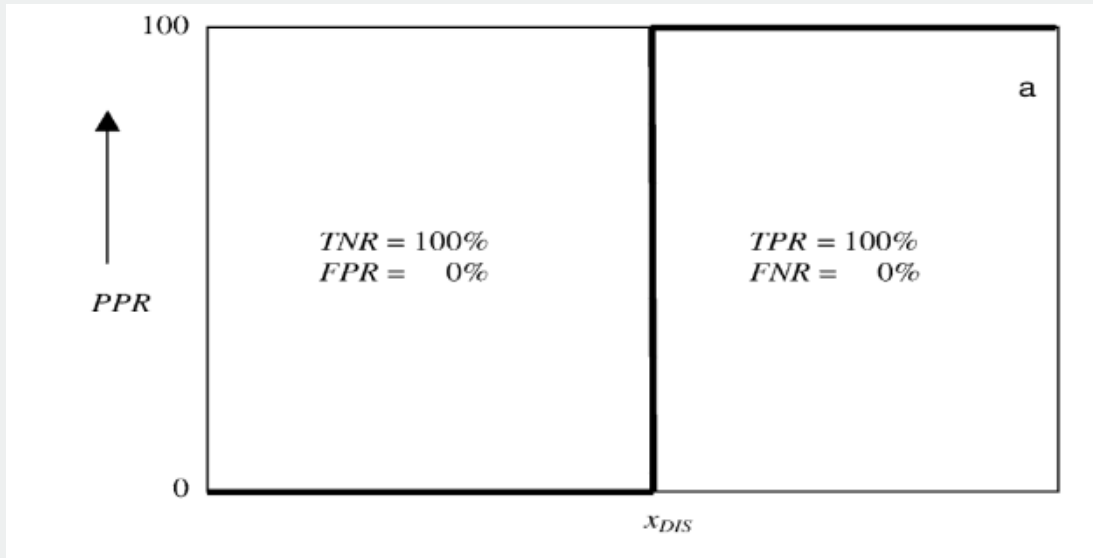
Algılama sınırının belirlenmesi için performans özellikleri eğrisi (PCC) Şekil 9'da gösterildiği gibi çizilir. Bu eğri sigmoidal bir eğri olup, her bir derişim seviyesindeki pozitif sonuç (yanıt) alma yüzdesi ile derişim seviyesi arasında oluşturulur ve nonlinear regresyon ile değerlendirilir. Bu eğri kullanılarak ayrıca güvenilmeyen bölge, yanlış pozitif, yanlış negatif, hassasiyet ve özgüllükte hesaplanabilir (49).



Şekil 9. Algılama sınırının belirlenmesi için performans özellikleri eğrisi (PCC)

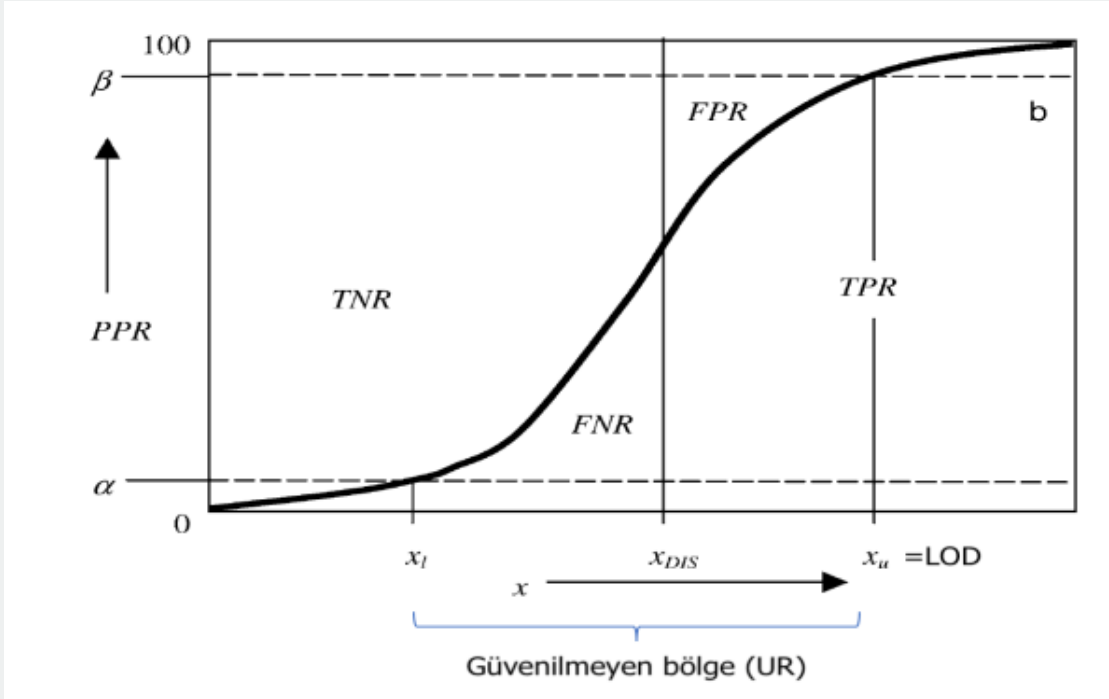
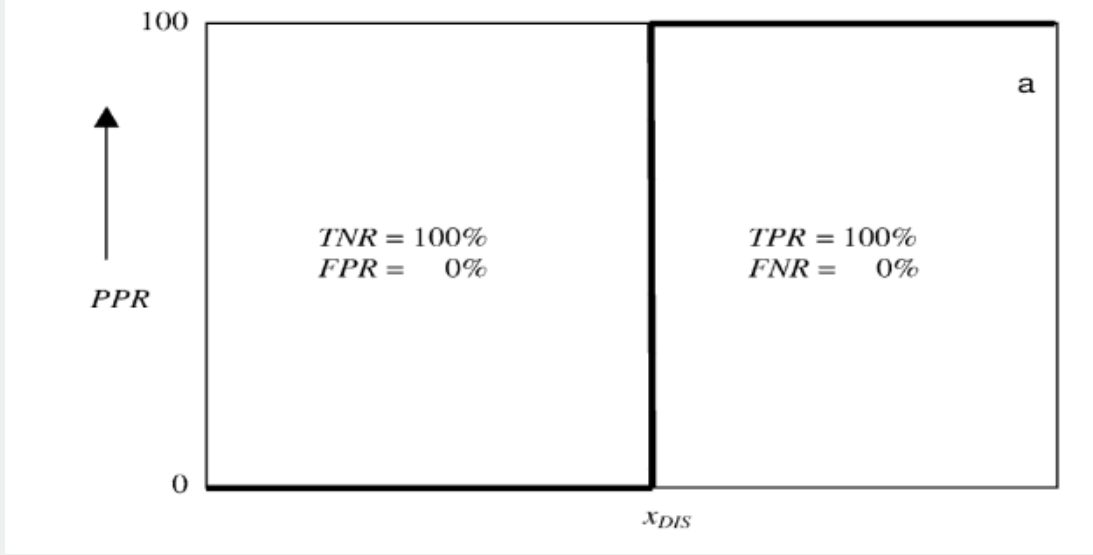
Tablo 16. Performans özellikleri eğrisi (PCC), derişim, tekrar sayısı, pozitif negatif yanıt ve pozitif sonuç (yanıt) alma yüzdesi.

Derişim C $\mu\text{g/L}$	N	Pozitif yanıt	Negatif yanıt	p(i)(%)
160	10	10	0	100
140	10	10	0	100
120	10	9	1	90
100	10	8	2	80
80	10	6	4	60
60	10	3	7	30
50	10	2	8	20
40	10	1	9	10
20	10	0	10	0
10	10	0	10	0



Şekil 10. Performans özellikleri eğrisinde ideal durum.

Performans özellikleri eğrisinde ideal durum TN ve TP oranının %100, FP, FN oranının %0 olduğu Şekil 10'da gösterilen durumdur. Ancak bu durum deneysel çalışmalarda bu şekilde elde edilmez, (50) Şekil 11'de gösterildiği gibidir.



Şekil 11. Performans özellikleri eğrisi: deneysel olarak elde edilen eğrinin şekli (51).

Nitel metotlarda kullanılan diğer bir algılama limiti, paralel ölçüm sonuçlarının %50'sinin pozitif ve negatif olduğu LOD_{50} değeridir. Sperman-Karber metodu LOD_{50} değeri belirlenmesi için önerilen hesaplama yöntemlerinden biri olup aşağıdaki formül kullanılarak LOD_{50} değeri elde edilebilir (52).

$$LOD_{50} = e^m$$

Denklem 47

$$m = \sum_{i=1}^{k-1} p(i) + ((p(i+1) - p(i))(x(i) + x(i+1)))/2 \quad \text{Denklem 48}$$

Bu formüle; k , derişim sayısı; $p(i)$, her bir derişimdeki, $i(i=1,2,3)$ pozitif oranı – her seviyedeki hassasiyet; x_i , derişimin (C) doğal logaritmasını ($\ln C_i$) ifade etmektedir.

Güvenilmeyen Bölge (UR)

Nicel analizde, belirsizlik, ölçümün belirli bir olasılıkla bulunabileceği aralık ile ilgili sayısal değerdir. Bununla birlikte nitel metotlarda var/yok şeklinde ikili yanıt bulunur. Bu yüzden belirsizlik, sayısal bir değer olarak değil, hata yapma olasılıkları bölgesi olarak ifade edilen *güvenilmeyen bölge* (UR) olarak adlandırılır. Bu bölge, nitel yöntemin yanlış cevap verebileceği üst ve alt derişim limiti ile tanımlanır ve x_u ile x_l arasındaki bölge olarak gösterilir (49).

Tekrarlanabilirlik Uyum ve Ara Kesinlik Uyum

Tekrarlanabilirlik uyum (ACC): Nitel analizlerde tekrarlanabilirlik koşullarını ve elde edilecek veriyi temsil etmektedir. Her bir partideki iki aynı test materyalinin aynı laboratuvarında tekrarlanabilirlik koşullarında analiz edilmesi durumunda ardışık olarak aynı sonucu alma oranıdır (50).

ACC aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplanır.

$$ACC = \frac{(r(r-1) + (n-r)(n-r-1))}{n(n-1)} \quad \text{Denklem 49}$$

n =her bir analitik partideki toplam sonuç
 r =her bir partideki pozitif sonuçların sayısı

Ara kesinlik uyum (CON): Nitel analizlerde ara kesinlik koşullarını ve elde edilecek veriyi temsil eder. Aynı test materyalinin değişik laboratuvarlarda (tekrarüretilebilirlik koşullarında ortak çalışma ile) veya aynı laboratuvarında (değişik parti kimyasallar ile ara kesinlik koşullarında çalışma) analiz edilmesi durumunda aynı sonucun sağlanabilme oranıdır. CON aynı laboratuvarında yapılan çalışmalarda her bir seviyedeki farklı ACC verilerinin ortalaması üzerinden hesaplanır (50). Aşağıda formüle deney tasarımı 3 partide incelendiği için bu üç partinin ortalaması belirtilmiştir.

$$CON = \frac{ACC_{1,parti} + ACC_{2,parti} + ACC_{3,parti}}{3}$$

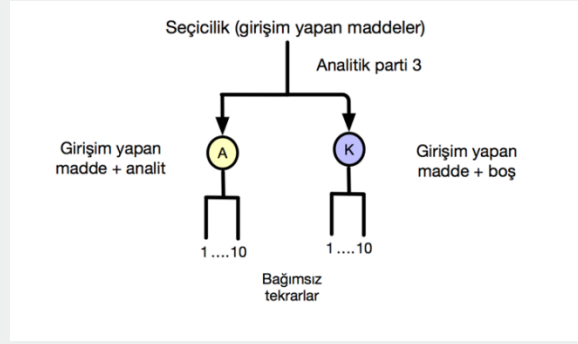
Tekrarlanabilirlik (ACC) ve ara kesinlik (CON), ölçüm sonucunun gerçek değere olan yakınlığı hakkında bilgi vermez. Ancak bu parametreler doğruluk yani güvenilirlik ile ilgili parametreler olduğu için; RLR değeri gibi metodun uygulanacağı tüm derişim aralığında 1'e yakın olması önerilir. Değerlerin 0,8'den büyük olması o derişimde metodun yeterli standardizasyonu sağladığını gösterir. ACC ve CON değerleri tekrar sayılarından etkilenmektedir ve analit derişimine bağı olarak boş numune ve pozitif numuneler için farklı değerler elde edilebilir (50) (51).

Seçiciliğin Potansiyel Girişimler Varlığında Değerlendirilmesi

Analitik metodun ölçüm prensibine uygun olarak belirlenmiş girişim yapan maddelerin etkileri, metodun geçeli kılma çalışmaları kapsamında değerlendirilmelidir (50).

Çalışma için seçilen girişim yapan maddelerin bulunduğu pozitif ve negatif numuneler en az 10 bağımsız tekrar ile analiz edilirler. Girişim yapan maddeler analitin tanımlanmasında değişikliğe neden olacak seviyede ve çalışılan matrikste normalde bulunacağı derişim seviyesinin üzerinde eklenmelidir (50). Çalışma için önce boş ve aranan analit ile zenginleştirilmiş numuneler 10 bağımsız tekrar çalışılabilecek şekilde hazırlanır. Analitlerin seviyesi daha önceden geçerli kılma çalışmasında belirlenmiş %100 güvenilirlik oranı (RLR) seviyesinde olacak şekilde düzenlenmelidir. Daha sonra hem boş ve hemde aranan analit bulunan numunelere girişim yapan madde eklenerek numuneler rastgele bir sıra ile tekrarlanabilirlik koşulları altında çalışılmalıdır.

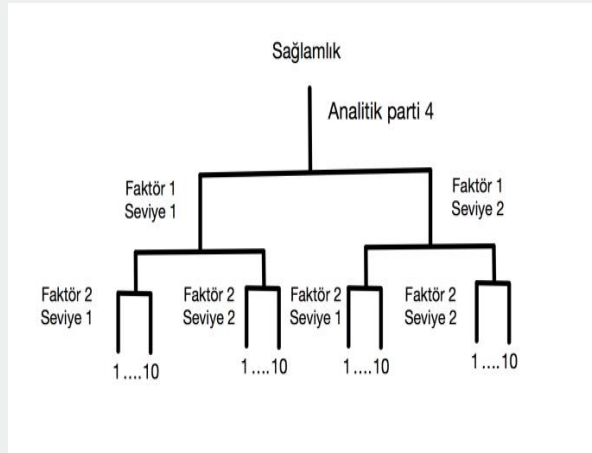
Girişimlerin etkisi RLR seviyesinde yanlış sonuç oranındaki değişiklikler ile belirlenebilir. Yapılan tekrar sayısına bağı olarak RLR değerinde maksimum %5 veya %10 değişkenlik kabul edilebilir (50). Seçicilik çalışması deney tasarımı Şekil 12'de gösterilmiştir.



Şekil 12. Seçicilik çalışması deney tasarımı (50).

Sağlamlığın İncelenmesi

Nitel metotlarda zorunlu olmamakla birlikte sağlamlık çalışması, deneysel koşullarda minör sapmaların etkisini değerlendirmek için kullanılır ve çalışmaların gerçekleştirilmesi için iki faktörlü ve iki seviyeli tam faktöriyel deney tasarımı kullanılması önerilir. Analiz edilecek numunelerdeki analitin derişimi %100 RLR sağlayan seviyede olmalıdır. Numuneler rastgele bir sıra ile tekrarlanabilirlik koşulları altında analiz edilmelidir. Sonuçların değerlendirilmesinde yapılan tekrar sayısına bağlı olarak RLR değerinde maksimum %5 veya %10 değişkenlik kabul edilebilir (50). Sağlamlık çalışması deney tasarımı Şekil 13'de gösterilmiştir.



Şekil 13. Sağlamlık çalışması deney tasarımı (50).

7. RUTİN ÇALIŞMALARDA OLASI DEĞİŞİKLİKLER

Laboratuvarlarda yeni bir personelin çalışmalara katılması, deney sonucu üzerinde etkin olan kimyasal /sarf malzeme değişikliklerinin risk oluşturabileceğinin (örneğin immunaafinite kolon değişikliği, lizat değişikliği) düşünülmesi, yeni bir cihazın devreye alınması veya cihazın yerinin değiştirilmesi söz konusu olabilir. Böyle durumlarda bu değişikliklerin verilmiş veya belirlenmiş metot performans parametreleri üzerinde önemli bir değişikliğe neden olmadığı gösterilmelidir.

Yeni personel

Laboratuvara yeni bir personel katıldığında sadece bu personele nicel analizler için Tablo 4’de, nitel analizler için Tablo 5’de yer verilen çalışmalar yaptırılır. Nicel analizler söz konusu olduğunda bu çalışmalar en azından gerçeklik ve kesinlik çalışmalarını içermelidir. Yapılan çalışmalar sonunda yeni personelden elde edilen sonuçların mevcut ölçüm belirsizliği üzerinde önemli bir değişikliğe neden olduğu saptanır ise ölçüm belirsizliği bu yeni veriler ışığında gözden geçirilmelidir. Gerekirse metodun geçerli kılınması/doğrulanması sırasında elde edilen belirsizliğe katkısı olan parametreler tekrar incelenir.

Yeni donanım

Geçerli kılınmış bir metotta özellikleri tanımlanmış olan yeni bir cihaz temin edildiğinde bu yeni donanımın deney/ölçüm metodu öngörülerini yani tanımlanmış olan özellikleri karşılaması yeterlidir. Bu kapsamda yapılacak çalışmalar yetkinliği ispatlanmış herhangi bir personel tarafından yapılabilir. Tüm personelin bu çalışmalarda yer almasına gerek yoktur. Eser miktar analizleri söz konusu ise yeni donanım devreye alınmadan önce; nicel metotlarda LOD ve LOQ parametreleri ve nitel metotlarda LOD parametresi çalışılır. Çalışmalar Tablo 4 ve Tablo 5 doğrulama sütunlarında belirtildiği gibi yürütülür.

Yapılan çalışmalar sonunda yeni donanımdan elde edilen sonuçların mevcut ölçüm belirsizliği üzerinde önemli bir değişikliğe neden olduğu saptanır ise ölçüm belirsizliği bu yeni veriler ışığında gözden geçirilir ve gerekirse metodun geçerli kılınması/doğrulanması sırasında elde edilen belirsizliğe katkısı olan parametreler tekrar incelenir.

Yeni kimyasal

Genellikle deney metodunda tanımlanmış olan kimyasal maddelerdeki değişikliklerin (örneğin farklı firmadan temin) metod performans parametrelerinde önemli bir değişikliğe neden olması beklenmez. Ancak, mikotoksin analizlerinde olduğu gibi bazı deney alanlarında ön aşamada kullanılan immunoaffinite kolonları farklı markalarda farklı geri kazanımlar elde edilmesine neden olabilir. Bu durumlarda yeni kimyasal madde Tablo 4 ve Tablo 5’de yer alan doğrulama sütunlarına uygun olarak etki ettiği parametre yönünden değerlendirilir.

Yeni alana taşınma

Laboratuvar çalışmalarını aynı personel ve donanım ile yürüteceği yeni bir alana taşıdığında bu alan çevre koşullarının metod üzerine etkisinin incelenmesi için yeni alanda ilgili metod için belirlenmiş performans kontrolü yapılır. Elde edilen değerler limitler içindeyse ek bir çalışma yapılmaz. Yer değiştirme işlemlerinde cihazın performansı laboratuvar tarafından yeterince ortaya konulmadığı durumlarda cihaz teknik servisinin görüşü ve gerekirse desteği alınabilir.

8. KULLANILAN TERİMLER

Terim (ikincil öneri)*	İngilizce karşılığı
Alıcı İşlem Karakteristiği Eğrisi	Receiver Operating Characteristic Plot
Ara kesinlik Uyum	Concordance
Artık Grafiği	Residual Plot
Ampirik Metot	Empirical Method
Analit eklenmiş	Spike
Aykırı Değer	Outlier
Bağlı	Relative
Birleşik Standart Sapma	Pooled (Combined) Standard Deviation
Bloklama	Bracketing
Boş numune	Blank sample
Cihaz	Instrument
Dayanıklılık	Ruggedness
Deneysel Tasarım	Experimental Design
Doğrulama	Verification
Doğrusal Aralık	Linear Range
Doğrusallık	Linearity
Duyarlılık (Hassasiyet)	Sensitivity
Eser	Trace
Genişletilmiş Belirsizlik	Expanded Uncertainty
Girişim Yapan	Interferent
Boş	Blank
Güven Aralığı	Confidence Interval
Güven Düzeyi	Confidence Level
Güvenilirlik Oranı	Reliability Rate
Güvenilmeyen Bölge	Unreliability Region
Hata	Error
Homojenlik	Homogeneity
İç içe (Yuvalanmış) deney tasarımı	Nested experimental design
İki Yanlı	Two Sided
İstatistiksel önem testi	Statistical significance test
İşletme İçi Metot (Kurum İçi Metot)	In House Method
Kaba Hata	Gross Error
Kabul Sınırı	Acceptability Limit
Kalıntı	Residue
Kalibrasyon Eğrisi	Calibration Curve
Kalite Control	Quality Control
Kalite Kontrol Kartı	QC Charts
Kapsam Faktörü	Coverage Factor
Kesim Derişimi	Cut-Off Concentration
Rehber	Guide
Kirletilmiş	Contaminated
Kör numune	Blind sample
Laboratuvarlar Arası Karşılaştırma	Interlaboratory Comparison

Matriks	Matrix
Metrolojik İzlenebilirlik	Metrological Traceability
Negatif kestirim değeri	Negative Predictive Value
Negatif olabilirlik oranı	Likelihood ratio of negative results
Nicel	Quantitative
Nitel	Qualitative
Numune	Sample
Numune Alma	Sampling
Ölçü (Ölçüt)	Measure
Ölçülen (Ölçülen Büyüklük)	Measurand
Önem Testi (Anlamlılık Testi)	Significance Test
Özdeş Numune	Identical Sample
Özgüllük	Specificity
Özütleme	Extraction
Pozitif kestirim değeri	Positive predictive value
Pozitif olabilirlik oranı	Likelihood ratio of positive results
Prosedür (Doküman Anlamında)	Procedure
Rutin	Routine
Sağlamlık	Robustness
Sapma	Bias
Seçicilik	Selectivity
Sertifikalandırılmış Değer	Certified Value
Tayin Sınırı	Limit Of Quantification
Elleçleme	Handling
Tek Etken ANOVA	One Factor ANOVA
Tekrar	Replicate
Tekrarüretilebilirlik	Reproducibility
Tekrarlanabilirlik	Repeatability
Tekrarlanabilirlik Uyumu	Accordance
Ara Kesinlik Uyumu	Concordance
Tespit Olasılığı	Probability Of Detection (POD)
Teyit Etmek	Confirm
Üzerinde uzlaşımış değer (konvansiyonel)	Conventional Value
Yanlış Negatif Test Sonucu	False Negative Test Result
Yanlış Pozitif	False Positive
Yanlış Pozitif Test Sonucu	False Positive Test Result
Yasal Metroloji	Legal Metrology
Yeterlilik	Proficiency
Yetkinlik	Competence
Yığından Numune Alma	Bulk Sampling
Metot	Method
Yüksek Dağılım	Over-Dispersion
Zenginleştirilmiş	Fortified Sample
β -Beklenen Tolerans Aralığı	β -Expectation Tolerance Interval

*TSEN ISO/IEC 17025:2017 ve Uluslararası Metroloji Sözlüğü içerisinde yer alan tanımlara yer verilmemiştir.

9. EKLER

Ek 1. Metoda Göre Seçilebilecek Performans Parametreleri

Tablo 17. NATA Rehberine göre geçerli kılınacak metodun grubuna göre seçilebilecek performans parametreleri (43).

Parametreler	Geçerli Kılma		Doğrulama	
	Nicel Analiz	Nitel Analiz	Nicel Analiz	Nitel Analiz
LOD* ve LOQ*	Evet	Hayır	Evet	Hayır
Duyarlılık	Evet	Evet	Evet	Evet
Seçicilik	Evet	Evet	Evet	Evet
Doğrusallık	Evet	Hayır	Evet	Hayır
Çalışma Aralığı	Evet	Hayır	Evet	Hayır
Matriks Etkisi	Evet	Evet	Evet	Evet
Gerçeklik	Evet	Evet	Evet	Evet
Kesinlik	Evet	Evet	Evet	Evet
Sağlamlık	Evet	Evet	Evet	Hayır
Ölçüm belirsizliği	Evet	Hayır	Evet	Hayır

* Analit miktarı sıfıra yakın derişimlerde yapılacak ölçümlerde kullanılan yöntemler için gereklidir.

Tablo 18. AOAC Rehberine göre geçerli kılınacak metodun grubuna göre seçilebilecek performans parametreleri (55).

Parametreler	Tanımlama testleri	Nicel metotlar (Düşük derişim)	Limit testi (Düşük derişim)	Nicel metotlar (Yüksek derişim)	Limit testi (Yüksek derişim)	Nitel
Doğruluk	Hayır	Evet	Hayır	Evet	Evet	Hayır
Kesinlik	Hayır	Evet	Hayır	Evet	Evet	Hayır
Özgüllük	Evet	Evet	Evet	Evet	Evet	Evet
LOD	Hayır	Evet	Evet	Evet/Hayır	Hayır	Hayır
LOQ	Hayır	Evet	Hayır	Evet/Hayır	Hayır	Hayır
Sağlamlık	Hayır	Evet	Hayır	Evet	Hayır	Hayır
Doğrusallık/ Çalışma aralığı	Hayır	Evet	Hayır	Evet	Hayır	Hayır

Tablo 19. Huber (2007)'e göre geçerli kılınacak metodun grubuna göre seçilebilecek performans parametreleri (56).

Parametreler	Nitel Analiz (Önemli Bileşenler)	Nicel Analiz (Önemli ve Eser Bileşenler)	Nitel Analiz (Eser Bileşenler)	Nicel Analiz (Eser Bileşenler)
LOD	Hayır	Hayır	Evet	Hayır
LOQ	Hayır	Evet	Hayır	Evet
Doğrusallık	Evet	Evet	Hayır	Evet
Çalışma aralığı	Evet	Evet	Hayır	Hayır
Kesinlik	Evet	Evet	Hayır	Evet
Doğruluk	Evet	Evet	Hayır	Evet
Özgüllük	Evet	Evet	Evet	Evet
Sağlamlık	Evet	Evet	Hayır	Evet

Tablo 20. Ellison'a (12) göre geçerli kılınacak metodun grubuna göre seçilebilecek performans parametreleri.

Parametreler	Nitel	Nicel Analiz (Önemli Bileşenler) ^a	Nicel Analiz (Eser bileşenler) ^b	Fiziksel özellikler
Seçicilik/Özgüllük	Evet	Evet	Evet	Evet
Kesinlik	Hayır	Evet	Evet	Evet
Sapma	Hayır	Evet	Evet	Evet
LOD	Evet	Hayır	Evet	Hayır
LOQ	Hayır	Hayır	Evet	Hayır
Doğrusallık/Çalışma aralığı	Hayır	Evet	Evet	Evet
Sağlamlık	Evet	Evet	Evet	Evet

a Temel bileşenler; analit derişiminin kütle olarak %1 ile %100 aralığında olduğu veya var/yok tespitinin sorun olmadığı

b Eser analizler; analit derişiminin 100 mg kg⁻¹ den düşük olduğu veya tespit yeteneğinin önemli olduğu

Tablo 21. US Farmokope'sine göre geçerli kılınacak metodun grubuna göre seçilebilecek performans parametreleri (57)

Parametreler	Kategori I	Kategori II		Kategori III	Kategori IV
		Nicel	Limit testler		
Doğruluk	Evet	Evet	Belki ⁱ	Belki ⁱ	Hayır
Kesinlik	Evet	Evet	Hayır	Evet	Hayır
Özgüllük	Evet	Evet	Evet	Belki ⁱ	Evet
LOD	Hayır	Hayır	Evet	Belki ⁱ	Hayır
LOQ	Hayır	Evet	Hayır	Belki ⁱ	Hayır
Doğrusallık	Evet	Evet	Hayır	Belki ⁱ	Hayır
Sağlamlık	Evet	Evet	Belki ⁱ	Belki ⁱ	Hayır

ⁱ Testin niteliğine bağlı olarak gerekli olabilir

Kategori I: Bitmiş farmasötik ürünlerde baskın ilaç maddelerinin ana bileşenlerinin veya aktif bileşenlerin (koruyucular dahil) miktar tayini için analitik prosedürler

Kategori II: Bitmiş farmasötik ürünlerdeki baskın ilaç maddeleri veya bozunma bileşiklerindeki safsızlıkların belirlenmesi için analitik prosedürler. Bu prosedürler nicel analizleri ve limit testleri içerir.

Kategori III: Performans özelliklerinin belirlenmesi için analitik prosedürler (örn., çözünme, ilaç salımı ve diğerleri)

Kategori IV: Tanımlama testleri

Ek 2- Deneysel Tasarımlar

1. Basit Tekrarlar

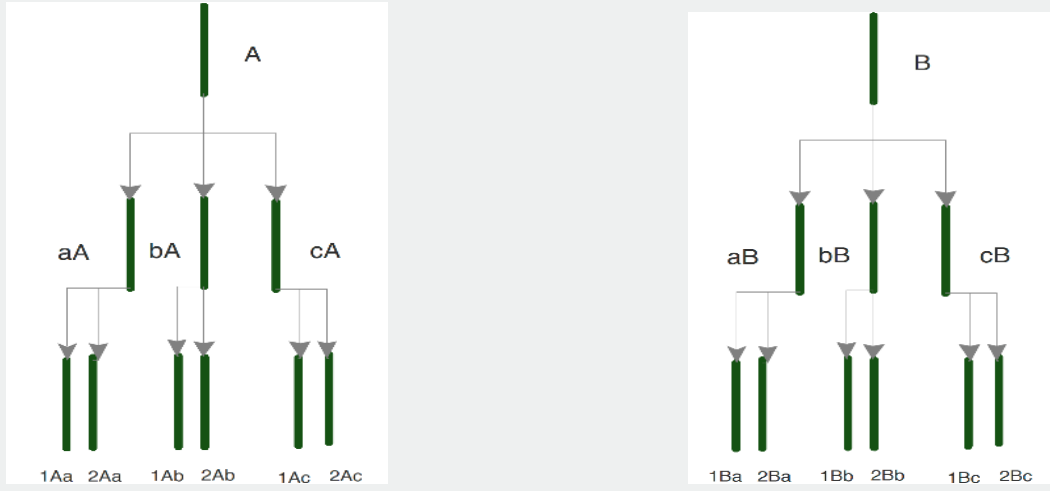
Tek bir test materyalinde yapılan bir seri gözlem çalışmasıdır. Kesinliğin tespiti için kullanılabilen gibi referans değer bilindiği durumlarda sapma tespiti için de kullanılabilir. Basit tekrarlar gereken tekrar sayısı kadar tekrarlanabilirlik veya ara kesinlik koşullarında ölçümlerle gerçekleştirilir. Kesinlik verisini değerlendirmek için standart sapma kullanılır. Referans değer ile farklılığın ortaya konulması gerektiği durumlarda t-testi gibi temel istatistiksel testleri kullanılabilir (12).

2. İççe (Yuvalanmış - Nested) Deneysel Tasarım

ISO 3534-3 standardı 3.2.21 maddesinde (30) iççe deneysel tasarım, faktörler arasında hiyerarşik bir ilişkiyi sağlayan ve en az iki faktör içeren deney tasarımı olarak verilmiştir. Faktörler, deney sonucunu etkileyebilecek miktar ya da koşulları tanımlamaktadır. Örneğin, analistin etkisini belirlerken analist bir faktör olarak deney tasarımında değerlendirilir. Faktörler nitel veya nicel olabilir.

Genel olarak Şekil 15'te gösterilen iç içe (yuvalanmış) deneysel tasarım varyans bileşenlerinin değerlendirilmesinde kullanılır. Bu nedenle geçerli kılma çalışmalarında kesinliğin tespitinde, laboratuvar numunesinin homojenliğinin kontrolünde ve numune alma çalışmalarında sıklıkla uygulanır. Laboratuvar numunesinin homojenliğini istatistiksel olarak ispatlamak için homojen laboratuvar numunesinden alınan bir dizi numune ile bu numuneden ve tekrar analizleri için alınan alt numuneler ile hiyerarşik iççe bir desen oluşturulur.

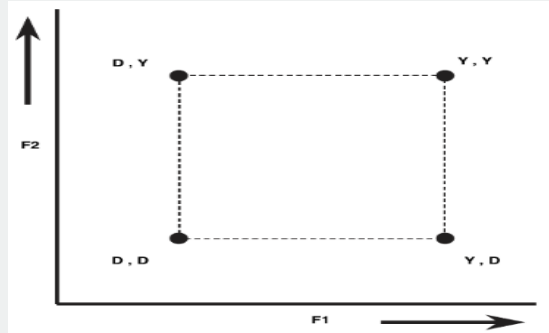
Dengeli bir iççe deney tasarımında aynı seviyedeki gruplardan eşit sayıda gözlem yapılması planlanır. İççe deneysel tasarım tek veya iki etkenli ANOVA ile incelenir (12).



Şekil 14. İç içe (yuvalanmış) deney tasarımı.

3. Faktöriyel Desenler

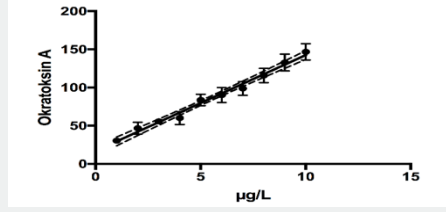
Faktöriyel deney desenlerinde (Şekil 16) bir faktörün tüm ya da bazı seviyeleri (nf) başka bir faktörün iki veya daha fazla seviyesi (mf) ile birleştirilir. Kombinasyonları oluşturan faktörler çaprazlanmış olarak ifade edilir ve $nf \times mf$ sayıdadır. Eğer olası tüm seviyelerin kombinasyonları deney tasarımı içinde bulunuyorsa buna **tam faktöriyel tasarım** denir. Örneğin 3 ayrı faktörün 2 seviyesi için $2^3=8$ test/deney yapılır. Sonuçlar iki etkenli veya yüksek sıra değişken ANOVA ile değerlendirilir (12).



Şekil 15. Faktöriyel deney tasarımı.

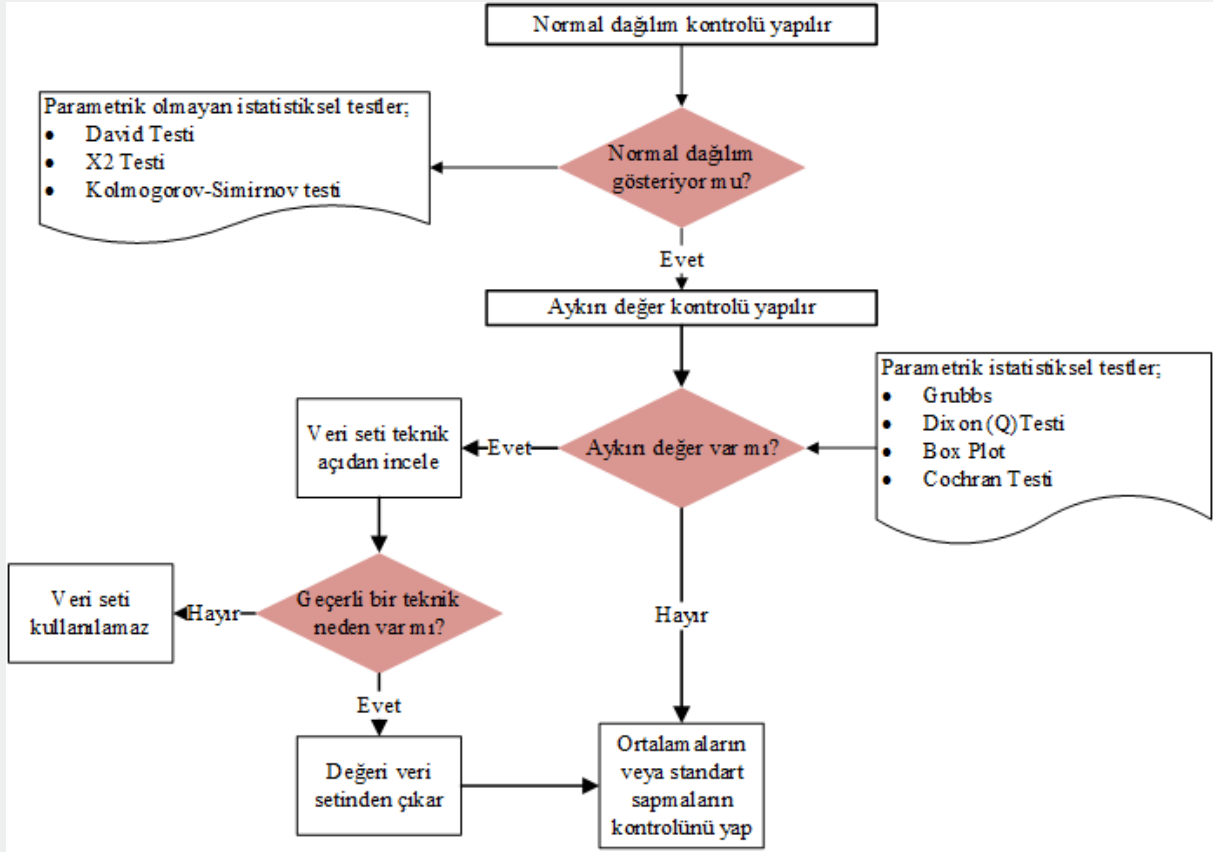
4. Doğrusal Kalibrasyon Deseni

Kalibrasyon ve doğrusallık testi için kullanılan bir deney tasarımıdır. Şekil 16’de gösterilen doğrusal kalibrasyon deney tasarımı belirli bir test materyalinde farklı seviyelerde tekrarlar halinde ölçümler içerir. İstatistiksel olarak lineer regresyon testi yapılır (12).

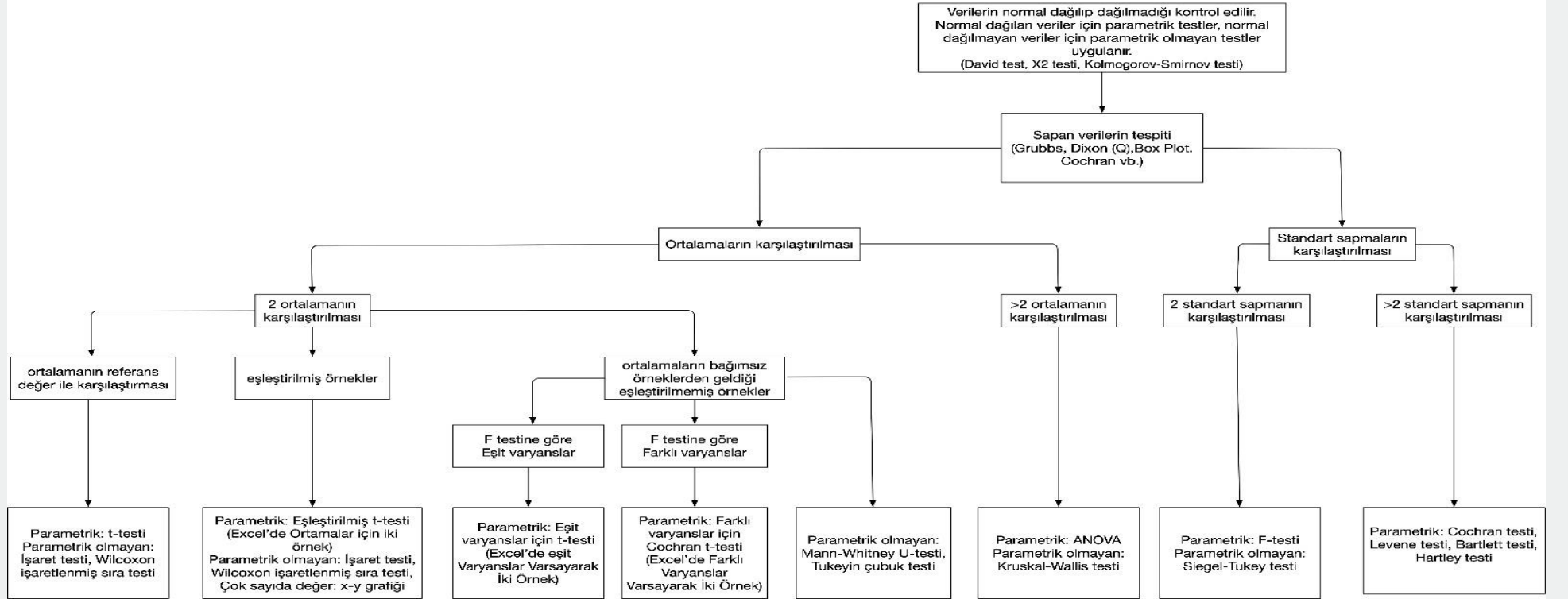


Şekil 16. Doğrusal kalibrasyon deney tasarımı.

Ek 3. Deneysel Verilerin İstatiksel Yöntemlerle Değerlendirilmesi



Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi



METODUN GEÇERLİ KILINMASI VE DOĞRULANMASI İÇİN BİLGİLENDİRME KILAVUZU

TÜRK AKREDİTASYON KURUMU

2019

Ek 4. LOD, LOQ Hesaplanmasında Kullanılacak Alternatif Yöntemler

1. ISO 11843 (23) standardında belirtilen yöntem

ISO 11843, kritik değerler (x_c – critical values) ve en düşük algılanabilir değerler (x_d – minimum detectable values) olmak üzere iki istatistiksel sınır değeri önermektedir.

$$x_c = t_{0,95}(df) \frac{\hat{\sigma}}{b} \sqrt{\frac{1}{K} + \frac{1}{I \cdot J} + \frac{\bar{x}^2}{s_{xx}}} \quad \text{Denklem 51}$$

$$s_{xx} = J \sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2 \quad \text{Denklem 52}$$

$$\hat{\sigma}^2 = \frac{1}{I \cdot J - 2} \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J (\hat{y}_{ij} - \hat{a} - \hat{b}x_i)^2 \quad \text{Denklem 53}$$

$$x_d = 2x_c \quad \text{Denklem 54}$$

df: serbestlik derecesi ($df = (I \cdot J) - 2$)

$\hat{\sigma}$: kalibrasyon eğrisinin aitlik standart sapması (excel kullanılarak regresyon işlevi ile hesaplanabilir)

b : kalibrasyon grafiğinin eğimi

K : metod tekrarı

L : Cihaz tekrarı

I : kalibrasyon eğrisindeki nokta sayısı (sıfır da dâhil)

J : *Derişimi* aynı kalibrasyon standartlarının sayısı veya ölçüm tekrar sayısı

\bar{x} : kalibrasyon standartlarının derişimlerinin ortalaması (sıfır da dahil)

s_{xx} : kalibrasyon standartlarının derişimlerinin ortalamadan farklarının karelerinin toplamı

Örneğin, 100 farklı kişiye ait (kişi başı bir numune bulunan) kan numunelerinin analizi için bu yaklaşıma ait değişkenler Tablo 22'de sunulmuştur.

Tablo 22. 100 farklı kişiye ait kan numunelerine ait analizde değişkenler.

	Senaryo	I	J	K	L
1	Sıfır dâhil 6 farklı derişimde kalibrasyon standardından 3'er adet olmak üzere 18 adet çözeltili hazırlanmıştır. Bu 18 adet standart çözeltilinin her biri 1 kere ölçülmüştür.	6	3		
2	Sıfır dahil 6 farklı derişimde kalibrasyon standardından 1'er adet çözeltili hazırlanmıştır. Bu 6 adet standart çözeltilinin her biri 3 kere ölçülmüştür.	6	3		
3	Sıfır dahil 6 farklı derişimde kalibrasyon standardından 1'er adet hazırlanmıştır. Bu 6 adet standart çözeltilinin her biri 1 kere ölçülmüştür.	6	1		
4	Her bir kişiye ait olan bir kan numunesinden 2'şer adet alt örnek hazırlanmıştır. Bu alt örnekler (toplam 200 adet numune) 1 kere ölçülmüştür.			2	
5	Her bir kişiye ait olan bir kan numunesinden 1'er adet alt örnek hazırlanmıştır. Bu alt örnekler (toplam 100 adet numune) 2 kere ölçülmüştür.				2

2. IUPAC teknik raporunda (24) belirtilen yöntem

IUPAC teknik raporunda (24), LOD ve LOQ tahmini için önerilen yöntemler aşağıda sunulmuştur.

2.1 Üst limit yaklaşımı yöntemi 1

$$LOD = \left\{ t(df, \alpha) \frac{s_y}{q_1} \right\} \left(\frac{1 + \frac{1}{n} + \bar{c}^2}{\sum_{i=0}^{n_s} (c_i - \bar{c})^2} \right)^{1/2} \quad \text{Denklem 55}$$

$$s_y^2 = \sum_{i=1}^{n_s} \frac{(y_i - \hat{y}_i)^2}{(n-2)} \quad \text{Denklem 56}$$

$$LOQ = 3xLOD \quad \text{Denklem 57}$$

2.2 Üst limit yaklaşımı yöntemi 2

$$LOD = t(df, \alpha) \frac{s_y}{q_1} \quad \text{Denklem 58}$$

$$LOQ = 3xLOD \quad \text{Denklem 59}$$

2.3 Standart yaklaşım 1

$$LOD = \frac{S_b}{q_1} \quad \text{Denklem 60}$$

s_b , boş numune ölçümlerinin standart sapmasıdır. Burada kalibrasyon eğrisinin kesme noktası, boş numune ölçümüne ait sinyallerin ortalamasına eşittir, tüm kalibrasyon noktaları kalibrasyon grafiğinin tam üzerindedir, Boş numune ölçümlerinin ortalaması tüm popülasyonu temsil ettiği kabul edilmiştir.

2.4 Standart yaklaşım 2

$$LOD = 3x \left(1 + \frac{1}{n_b}\right)^{1/2} x \frac{S_b}{q_1} \quad \text{Denklem 61}$$

n_b , boş numune ölçümlerinin sayısıdır. Bu sayede standart yaklaşım 1 için sunulan kabullerden sonuncusu (iii) dikkate alınmamış ve böylece gerçekçi bir yaklaşım yapılmış olur.

Yukarıdaki denklemlerde kullanılan kısaltmalar aşağıda verilmiştir:

df: serbestlik derecesi [$df = n - 2$]

α : güven (olasılık) seviyesi

s_y : kalibrasyon eğrisinin artık standart sapması

q_1 : kalibrasyon eğrisinin eğimi

n : kalibrasyon eğrisindeki (sıfır noktası da dâhil) tüm noktaların (tekrarlı ölçümler de dâhil) sayısı

\bar{c} : kalibrasyon standartlarının derişimlerinin ortalaması (Sıfır noktası da dâhil)

n_s : kalibrasyon eğrisindeki noktaların sayısı (sıfır noktası hariç)

c_i : kalibrasyon eğrisindeki i noktasına ait derişim

n_b , boş numune ölçümlerinin sayısı

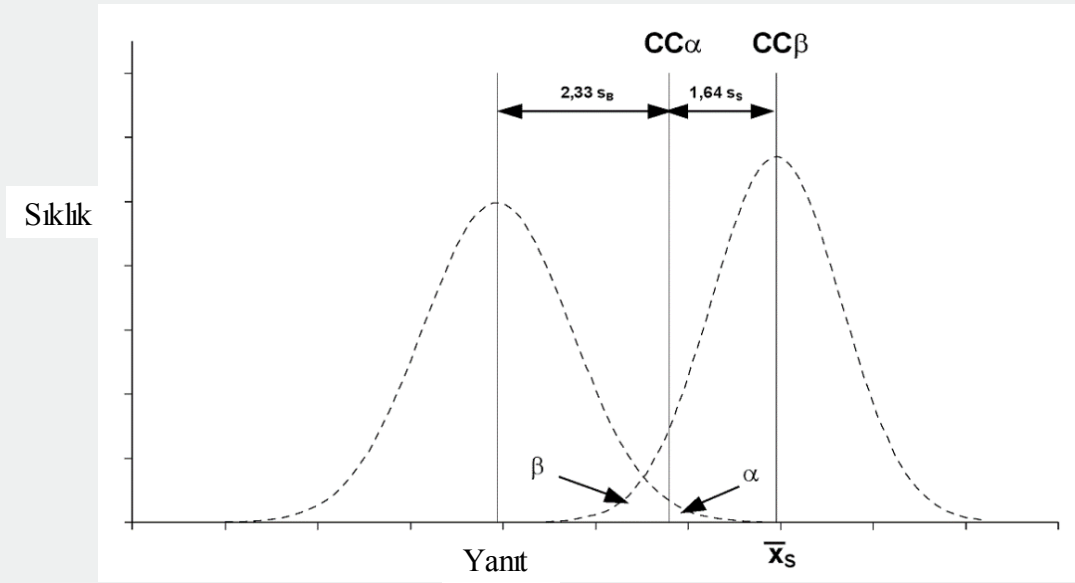
s_b , boş numune ölçümlerinin standart sapması

3. EC 2002/657 (25) no'lu Avrupa Birliği Direktifinde Belirtilen Yöntem

2002/657/EC nolu Avrupa Birliği direktifinde (25), karar sınırı (CC_α) ve algılama kapasitesi (CC_β) olmak üzere iki kavram tanımlanır. Alfa (α) hata, gerçekte mevzuata **uygun olan** numune için uygunsuz karar verme olasılığı (yanlış uygunsuzluk/yanlış pozitif karar), beta (β) hata ise gerçekte mevzuata **uygun olmayan** numune için uygun karar verme olasılığıdır (yanlış uygunluk/yanlış negatif karar). Karar sınırı (CC_α), α hata olasılığı ile bir numuneye uygunsuz (izin verilen limitin üzerinde) kararı verilecek sınırdır. Algılama kapasitesi (CC_β) ise, β hata olasılığı ile bir numunedeki analitin tespiti/tanımlanması/miktar tayini yapılabilecek sınırdır.

S90

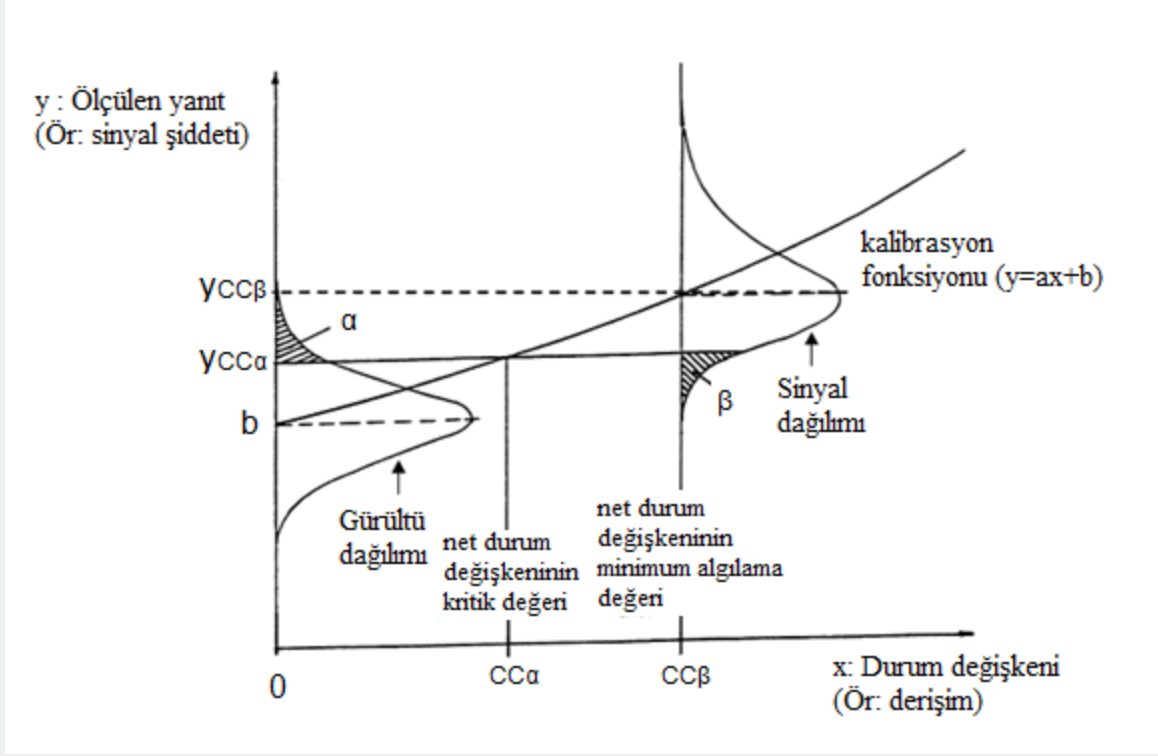
İzin verilen yasal değeri olmayan (yasaklı) analitler için CC_{β} , metodun $1 - \beta$ olasılıkla (kirlenmiş) numunedeki analit miktarının doğru tespit edildiği sınırdır. Sadece izin verilen yasal değeri **olmayan** analitler için CC_{β} , LOD seviyesine denk gelir. Böyle durumlarda Şekil 18’de gösterildiği gibi istatistiksel olarak α , β değerleri sırasıyla % 99 ve % 95 güven aralığına isabet eder. Dolayısıyla aşağıda açıklanan hesaplama yöntemleri yasal limitleri tespit edilmiş analitlerin CC_{α} , CC_{β} hesaplamalarında kullanılamaz. Yasal mevzuatta limiti olan analitlerin CC_{α} ve CC_{β} hesaplama detayları için ilgili mevzuat ve literatürde detaylar (58) verilmiştir (9) (25) (58) (59).



Şekil 17. İzin verilen limit değeri olmayan analit için karar sınırı ve algılama kapasitesi (25).

3.1 Hesaplama yöntemi 1

Bu yöntem, CC_{α} ve CC_{β} 'nin ISO 11843 (23) standardında belirtilen kalibrasyon eğrisi hesaplamalarına dayanmaktadır. Şekil 17 bu standarda göre CC_{α} ve CC_{β} tanımını görsel olarak ortaya koymaktadır (58).



Şekil 18. ISO 11843 (23)'e göre CC_{α} ve CC_{β} 'nin tanımlanması.

Bu yöntem ile CC_{α} hesaplamak için; boş numunelere metodun gerektirdiği en düşük metot performans seviyesi ve üstünde eşit aralıklarla seçilmiş farklı deney seviyelerinde analit eklenir ve numuneler ara kesinlik şartları altında tüm ölçüm prosedürü uygulanarak analiz edilir (23). Eklenen derişime karşı yanıt grafiği çizilir. Elde edilen kalibrasyon eğrisinin “kesim noktası ile kesim noktasının ara kesinlik koşullarındaki standart sapmasının 2,33 katının toplamına” karşılık gelen derişim, CC_{α} olarak tanımlanır ($\alpha=0,01$, Denklem 62). Kesim noktası ile kesim noktasının ara kesinlik koşullarındaki standart sapmasının 2,33 katı, kalibrasyon eğrisinin kesim noktasının üst güven limitini- $y_{CC_{\alpha}}$ belirtmektedir. Ayrıca 2,33 katsayısı % 99 güven aralığı için z değeridir.

CC_{β} hesaplamak için, boş numunelere metodun gerektirdiği en düşük metot performans seviyesi ve altında eşit aralıklarla seçilmiş farklı deney seviyelerinde analit eklenir ve tüm ölçüm prosedürü uygulanarak analiz edilirler. Eklenen derişime karşı yanıt grafiği çizilir. CC_{α} seviyesinde ölçülen ortalama derişimin ara kesinlik şartları altında elde edilen standart sapmasının 1,64 katı ile CC_{α} 'nın toplamına karşılık gelen derişim CC_{β} olarak ifade edilir ($\beta=\% 5$). Burada 1,64 katsayısı % 95 güven aralığındaki z değeridir. Her iki parametrenin hesaplaması için belirtilen en düşük metot performans seviyesi, analitin en düşük tespit edilebilecek ve

tanımlanabilecek derişim seviyesidir. Genellikle CC_{β} seviyesinin bu anlamda kullanılması önerilmektedir (9).

CC_{α} ve CC_{β} hesaplanmasında kullanılacak deneysel tasarımları ve buna bağılı hesaplamaların yapabileceğı kullanıma hazır MS Office Excel tabanında çalışabilen programlar mevcuttur (58) (59). Tablo 23'de verilen deney tasarımı bu amaçla kullanılabilir. Bu deneysel tasarım geçerli kılma için gerekli diğere parametrelerin (ara kesinlik, gerçeklik) elde edilmesi içinde kullanılacağından deneme sayıları CC_{α} ve CC_{β} hesaplanması için ihtiyaç duyulandan daha fazladır. Sadece bu iki parametrenin hesaplanması gerektiğı durumlarda kirletilmiş numuneler 6 yerine 3 tekrarlı olarak çalışılabilir.

Boş numuneler ve kirletilmiş (analit eklenmiş) numuneler **Tablo 23**'de belirtilen plan dâhilinde ara kesinlik koşulları altında tüm ölçüm prosedürü gerçekleştirilerek analiz edilir ve ilgili analit tanımlanır. Sonrasında, eklenen analit derişimi (*x eksen*) ile bu derişimler için elde edilen sinyal (*y eksen*) ile kalibrasyon grafiğı çizilir. Çizilen grafiğın fonksiyonu ($y=a + bx$) olarak elde edilir. Bu yaklaşım doğrusal kalibrasyon eğrisi öngörüsüne dayandığı için kalibrasyon grafiğının doğrusallık testi Ek 6'da açıklandığı gibi test edilmelidir.

Tablo 23. CC_{α} ve CC_{β} hesaplanmasında kullanılacak örnek deney tasarımı.

Tekrar sayısı (n)	Deney 1 (1. Gün), Deney 2 (2.Gün), Deney 3 (3. Gün)
6	Boş numune
6	0,5 x EDMPS* seviyesinde kirletilmiş boş numune x 3 gün
6	1 x EDMPS* seviyesinde kirletilmiş boş numune x 3 gün
6	1,5 x EDMPS* seviyesinde kirletilmiş boş numune x 3 gün
6	2 x EDMPS* seviyesinde kirletilmiş boş numune x 3 gün
Toplam	60 deneme

*EDMPS: Tahmini en düşük metot performans seviyesi

Elde edilen kalibrasyon grafiğine bağılı olarak aşağıdaki hesaplamalar CC_{α} için gerçekleştirilir.

$$y_{CC_{\alpha}} = a + 2,33.S_a \quad \text{Denklem 62}$$

$$y=a + b x \quad \text{Denklem 63}$$

$$y_{CC_{\alpha}}=a + b.CC_{\alpha} \quad \text{Denklem 64}$$

$$CC_{\alpha} = \frac{y-a}{b} = \frac{y_{CC_{\alpha}}-a}{b} = \frac{a+2,33.S_a-a}{b} \quad \text{Denklem 65}$$

$$CC_{\alpha} = \frac{2,33 \cdot S_a}{b} \quad \text{Denklem 66}$$

Burada b kalibrasyon eğrisinin eğimi, a kalibrasyon eğrisinin kesim noktası, y ölçüm sonucu/cihaz yanıtı, x derişim ve S_a ise kalibrasyon eğrisi kesişim noktasının standart sapmasıdır. Kalibrasyon eğrisinin kesme noktasının standart sapması aşağıdaki formüllerle hesaplanabilir (11).

$$S_a = \frac{s_{y/x}}{(\sum_i (x_i - \bar{x}_i)^2)^{1/2}} \quad \text{Denklem 67}$$

Burada x_i , kalibrasyon eğrisinin çizilmesi için kullanılan derişimleri; \bar{x} ortalama derişimi; $s_{y/x}$ artıkların standart sapmasıdır, Denklem 68 ile aşağıdaki gibi hesaplanır;

$$s_{y/x} = \left\{ \frac{\sum_i (y_i - \bar{y}_i)^2}{n - 2} \right\}^{1/2} \quad \text{Denklem 68}$$

Burada \hat{y}_i x_i derişimi için kalibrasyon model denkleminde hesaplanan değerini; y_i belirli bir x_i derişimine karşı ölçüm sonucu elde edilen değerdir; n kalibrasyondaki nokta sayısıdır.

CC_β ise aşağıdaki gibi aynı kalibrasyon eğrisinden hesaplanır;

$$y_{CC\beta} = a + 2,33 \cdot S_a + 1,64 \cdot S_{CC\alpha} \quad \text{Denklem 69}$$

$$y = a + b x \quad \text{Denklem 70}$$

$$y_{CC\beta} = a + b \cdot CC_\alpha \quad \text{Denklem 71}$$

$$CC_\beta = \frac{y_{CC\beta} - a}{b} = \frac{a + 2,33 \cdot S_a + 1,64 \cdot S_{CC\alpha} - a}{b} \quad \text{Denklem 72}$$

$$CC_\alpha = \frac{2,33 \cdot S_a + 1,64 \cdot S_{CC\alpha}}{b} \quad \text{Denklem 73}$$

Burada $S_{CC\alpha}$, CC_α derişim seviyesinde ara kesinlik koşullarında elde edilen standart sapmadır.

Bu değer S_a 'ya eşdeğer olduğu varsayıldığında Denklem 73 aşağıdaki forma dönüşür;

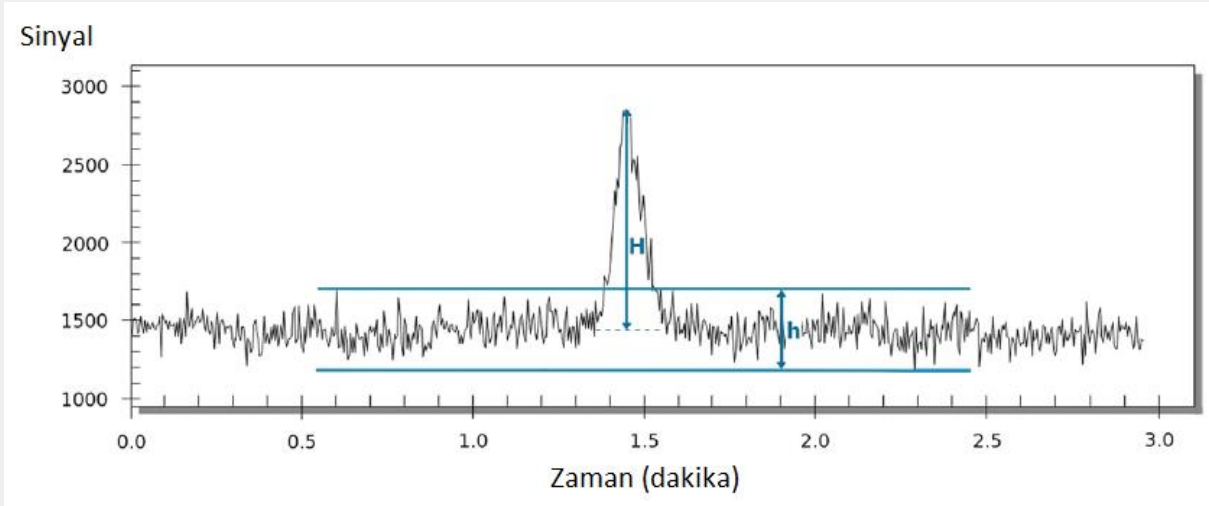
$$CC_\alpha = \frac{2,33 \cdot S_a + 1,64 \cdot S_a}{b} \quad \text{Denklem 74}$$

CC_α ve CC_β değerleri her 3 deney için ayrı ayrı hesaplanıp ortalaması alınır.

3.2 Hesaplama yöntemi 2

En az 20 adet boş numunenin (matriksi temsil eden) analizi ve sinyal/gürültü oranının Şekil 19'da gösterildiği gibi 3 katına karşılık gelen derişim CC_α derişimidir.

$$CC_\alpha = 3x \frac{\text{Sinyal}}{\text{Gürültü}} \quad \text{Denklem 75}$$



Şekil 19. CC_α hesaplamasında sinyal/gürültü oranını ortaya koyan kromatogram.

Laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik (ara kesinlik) şartları altında en az 20 adet boş numunenin (CC_α derişiminde analit içeren ve matriksi temsil eden) analiz edilmesi sonucunda ortaya çıkan derişimlerin standart sapmasının (S_{bos}) 1,64 katı ile bu derişimlerin ortalamasının toplamı CC_β derişimidir.

$$CC_\beta = CC_\alpha + 1,64xS_{bos} \quad \text{Denklem 76}$$

3.3 Ölçüm belirsizliğine dayanan hesaplama yöntemi

Şekil 19 göre CC_α değerleri aşağıdaki gibi ifade edilebilir;

$$CC_\alpha = \bar{X}_a + 2,33xS_a \quad \text{Denklem 77}$$

Burada \bar{X}_a boş numunelerin ortalamasını, S_a boş numunelerin ara kesinlik koşulları altında analiz edilmesiyle elde edilen standart sapmasını, S_s ise tahmini CC_β seviyesinde analit eklenmiş boş numunelerin ara kesinlik koşullarında analiz edilmesiyle elde edilen standart sapmasını ifade eder.

$$CC_{\beta} = \bar{X}_a + 2,33xS_a + 1,64 xS_s$$

Denklem 78

CC_{α} ve CC_{β} değerlerinin hesaplanmasında EC 2002/657 no'lu direktifin (25) taslak halindeki sürümünde ölçüm belirsizliği ile ilişkili bir hesaplama yöntemi aşağıdaki gibi öngörülmektedir. Burada ölçüm sisteminin kalibre edebileceği en düşük kalibrasyon seviyesinde (LCL) yapılan çalışmalara ait ölçüm belirsizliği (U) ile CC_{α} aşağıdaki gibi hesaplanabilir. CC_{β} hesaplanırken ölçüm belirsizliği hedef/beklenen CC_{β} seviyesinde hesaplanarak denkleme dâhil edilir

$$CC_{\alpha} = LCL + k_{(tek\ kuyruklu,\%99)} xU$$

Denklem 79

CC_{β} hesaplanırken ölçüm belirsizliği hedef/beklenen CC_{β} seviyesinde hesaplanarak Denklem 80'e dahil edilir;

$$CC_{\beta} = LCL + k_{(tek\ kuyruklu,\%95)} xU$$

Denklem 80

4. FDA (26)'nın Biyoanalitik Metot Geçerli Kılma Rehberinde belirtilen yöntem

FDA'nın Biyoanalitik Metot Geçerli Kılma rehberinde (26) tanımladığı düşük tayin sınırı (LLOQ – lower limit of quantification) boş numunelerden elde edilen sinyalin en az 5 katına karşılık gelen derişim olarak ifade etmekte ve bu derişimdeki test numunesi ölçümlerinin kesinlik değerini $\leq \% 20$ ve doğruluk değerini $\% 80 - 120$ olarak belirlemektedir.

$$LLOQ = 5xC_{boş}$$

Denklem 81

5. AOAC (27)Standart Metodun Performans Gereklilikleri Rehberinde Belirtilen Yöntem

AOAC Standart Metodun Performans Gereklilikleri Rehberi (27), Ek F bölümünde algılama sınırını (LOD – limit of detection), boş numunelerin tekrarlı ölçümlerinden elde edilen derişimlerin ortalaması ile standart sapmalarının 3 katının toplamına karşılık gelen derişim olarak tanımlamıştır.

$$LOD = C_{boş} + 3xS_{boş}$$

Denklem 82

$$LOQ = C_{boş} + 10xS_{boş}$$

Denklem 83

Ek 5. Hesaplanan LOD Değerinin Kontrolü için Örnek

Sularda arsenik çalışmasında algılama sınırının 5 ng/L olarak hesaplanmış olduğunu varsayarsak, bu seviyede analit eklenmiş numune ile yapılan üç tekrar ölçümünden alınan yanıtlar Tablo 24 'te verilmiştir.

Tablo 24. Hesaplanan LOD değerinin kontrolü çalışmasına ait ölçüm sonuçları.

Derişim	Tekrarlara ait cihaz yanıtı			Maksimum	Ortalama
	y_{i1}	y_{i2}	y_{i3}		
Boş	0,001	16,513	14,552	16,513	
Algılama sınırı $x_{LOD} = 5ng/l$	16,312	14,731	22,412		17,818

Bu verilere göre analit eklenmiş numunelere cihazdan alınan ortalama sonuc olan 17,818; boş numuneye cihazın verdiği maksimum yanıt olan 16,513'den fazla olduğu için hesaplanan algılama sınırının uygunluğu kanıtlanmış olmaktadır.

Ek 6. Tekrarlanabilirlik ve Ara Kesinlik için Örnek

Tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik çalışmalarında farklı günlerde elde edilen tekrarlı ölçüm sonuçlarının ANOVA ile değerlendirilmesi aşağıdaki örnek tablolar ile açıklanmıştır.

Tablo 25'te örnek bir deney tasarımı ile elde edilen ölçüm sonuçları yer almaktadır. Bu tabloda yer alan ölçüm sonuçları *MS Office Excel* veya başka ticari istatistiksel paket program kullanılarak tek etken ANOVA analizi incelenebilir. ANOVA analizi sonucunda Tablo 26'da sunulan hesaplama formülleri ile Tablo 27'deki sonuçlar elde edilir.

Tablo 25. Örnek bir deney tasarımı ve elde edilen ölçüm sonuçları.

Tekrar No	n_{Ca} (mmol)				
	Gün 1	Gün 2	Gün 3	Gün 4	Gün 5
1	10,3	9,5	11,1	9,6	10,2
2	9,8	8,6	11,5	11,3	10,8
3	11,4	8,9	11,3	8,2	9,7

Tablo 26. Tek etken ANOVA hesaplama formülleri.

Varyans Kaynağı	Karelerin Toplamı (SS)	Serbestlik derecesi (df)	Karelerin Ortalaması (MS)	F	P	Fölçütü
Gruplar arasında	SS_b	$p-1$	$MS_b = SS_b / (p-1)$			
Gruplar içinde	SS_w	$N-p$	$MS_w = SS_w / (N-p)$			
Toplam						

Tablo 27. ANOVA[§] sonucunda tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik verilerinin değerlendirilmesinde kullanılacak sonuçlar.

Varyans Kaynağı	Karelerin Toplamı (SS)	Serbestlik Derecesi (df)	Karelerin Ortalaması (MS)	F	P	Fölçütü
Gruplar arasında	8,930667	4	2,232667	3,07	0,068278	3,48
Gruplar içinde	7,266667	10	0,726667			
Toplam	16,19733	14				

Tablo 27' deki sonuçlar ışığında tekrarlanabilirlik standart sapması (S_r) Denklem 84 ile hesaplanır;

$$S_r = \sqrt{MS_w} = \sqrt{0,726667} = 0,85 \text{ mmol} \quad \text{Denklem 84}$$

Gruplar Arası standart sapması (S_b) ise Denklem 85 ile hesaplanır

$$S_b = \sqrt{(MS_b - MS_w)/n} = \sqrt{\frac{2,232667 - 0,726667}{3}} = 0,71 \text{ mmol} \quad \text{Denklem 85}$$

Burada n gün içi ölçüm tekrarıdır. Ara kesinlik standart sapması (S_i) Denklem 86 ile hesaplanır.

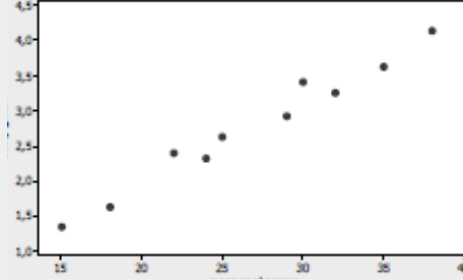
$$S_i = \sqrt{S_r^2 + S_b^2} = \sqrt{0,85^2 + 0,71^2} = 1,11 \text{ mmol} \quad \text{Denklem 86}$$

Denklem 85 ile S_b hesaplanırken MS_b MS_w den küçük çıkarsa tekrarlanabilirlik standart sapması (S_r) ve ara kesinlik standart sapmaları (S_i) birbirine eşit olur.

§ ANOVA bir laboratuarda uygulandığında deney metodunun tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik standart sapmalarının belirlenmesinde ve ayrıca 2 den fazla ölçüm dizisinin aritmetik ortalamaların karşılaştırılmasında kullanılabilir. Yukarıda verilen örnek deney metodunun kesinlik verilerini (tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik) bulmaya amaçlanmaktadır. Bu nedenle aritmetik ortalamaların karşılaştırılmasında uygunluk değerlendirme kriteri olan $F \leq F_{ölçütü}$ çıkması hali bu çalışmalarda aranmaz.

Ek 7. Kalibrasyon Grafiğinin Değerlendirilmesi için Yöntemler

Kalibrasyon grafiği, yatay eksen x (değişim), dikey eksen y ölçüm sonuçları (yanıtlar) olmak üzere, (x,y) ikili örnek verilerinin Şekil 20’de gösterildiği gibi işaretlendiği bir grafikdir. Bu grafikte her bir (x,y) ikilisi tek bir noktadır.



Şekil 20. Ölçüm sonuçlarının dağılım grafiği (Saçılma diyagramı).

x ve y ekseninde yer alan veriler arasındaki matematiksel ilişki basit doğrusal ve ağırlıklı doğrusal regresyon modeli ile açıklanabilir. Doğrusal olarak açıklanamayan durumlarda ikinci dereceden denklemlerle model kurulabilir. Bu modeller aşağıda açıklanmıştır.

1. Doğrusal regresyon modeli

a. Basit doğrusal regresyon modeli

Ölçülen değerler (y_i) ve buna karşılık gelen değişimler (x_i) arasında doğrusal bir korelasyon varsayımı yapan bir modeldir. Bu model, sonuçların normal dağılımını ve çalışma aralığındaki varyansların homojenliğini gerektirir. Aksi durum modelin uygulanabilirliğini sınırlar.

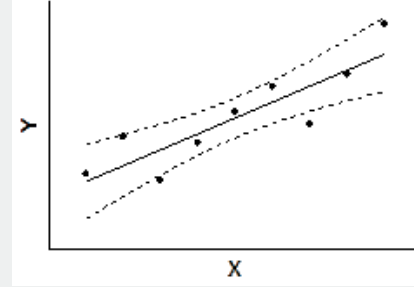
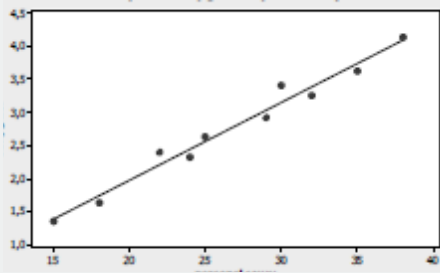
Çoğunlukla çalışma aralığındaki fonksiyonunun doğrusallığı metodun geçerli kılınması çalışmaları sırasında kontrol edilmelidir. Doğrusal modelin denklemi aşağıdaki şekilde tanımlanır:

$$y = a + bx \quad \text{Denklem 87}$$

$$\varepsilon_i = y_i - \hat{y}_i \quad \text{Denklem 88}$$

x: değişim
y_i: ölçüm sonucu /yanıtı
ŷ_i: x değişimine karşılık kalibrasyon fonksiyonundan elde edilen
a: kesme noktası
b: eğim
ε: ölçülen değer ile beklenen değer arasındaki fark (artık)

$\varepsilon; y$ 'deki değişimin, regresyon modeli ($+bx$) ile açıklanamayan kısmını gösterir, verilerin rastgele değişimlerini gösteren artık değeridir. Artıklar, bir regresyon modelinin belirlenmesinden sonra açıklanamayan (veya artık) değişimi temsil etmektedir. Genellikle iki değişkenden biri diğerine bağımlıdır ve bağımlı değişken y eksenine çizilir. Bu nedenle, y eksenindeki sapmaları en aza indirecek doğru en iyi doğrudur. Bu sapmaların bazıları negatif bazıları pozitif yönde olacağı için hesaplamalarda sapmaların kareleri en aza indirilir. Bu *en küçük kareler yöntemi* olarak isimlendirilir ve **Şekil 21**'de gösterilmiştir. Bazı durumlarda doğrusal olmayan ilişki logaritmik ifadelerle doğrusal hale dönüştürülebilir.



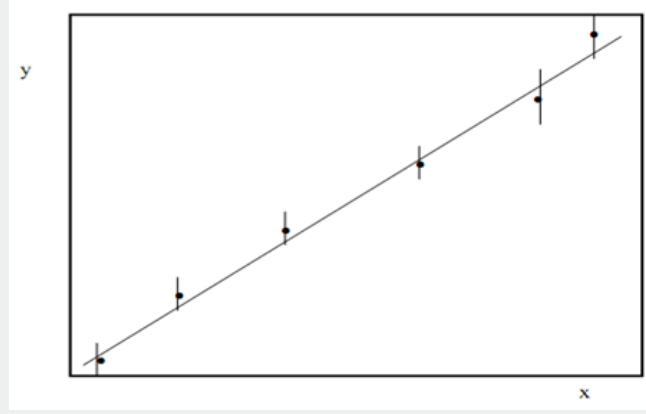
Şekil 21. En küçük kareler yöntemi.

Ağırlıklı regresyon

Basit lineer regresyonda, y eksenindeki hataların eksen boyunca her noktada yani değişimde eşit olduğu varsayılır. Ancak, hataların y eksenini boyunca artan değişimle arttığı durumlarda Şekil 22' de gösterilen ağırlıklı regresyon kullanılmalıdır. Kalibrasyon eğrisinde her nokta aynı ağırlığa sahip olmadığından her bir noktanın ağırlığı (Denklem 89) kalibrasyon eğrisinin fonksiyonunun hesaplanmasına (eğim ve kesişim noktaları) ve diğer hesaplamalara dâhil edilmelidir (11).

$$w_i = \frac{s_i^{-2}}{\sum_i s_i^{-2} / n} \quad \sum w_i = n \quad \text{Denklem 89}$$

Burada s_i ve w_i her bir (x_i, y_i) , veri setine ait standart sapma ve ağırlığı ifade etmektedir. Ağırlık ile ilgili hesaplamalara ait detaylar için ilgili literatüre başvurulabilir (11).



Şekil 22. Ağırlıklı lineer regresyonda hata çubukları (11).

Bir lineer regresyon grafiğinin basit veya ağırlıklı olup olmadığına tüm aralıktaki varyansların homojenlik (eş değişkenliği, en düşük seviyedeki varyans, en üst seviyedeki varyans ile karşılaştırılabilir) testine tabi tutulması ile karar verilir.

Homojenlik, gerekli doğrusal aralığın en düşük ve en yüksek seviyelerinde tekrarlanan ölçümlerin sonuçlarının/yanıtlarının ($n=6-10$) standart sapmasını hesaplayarak doğrulanabilir. Yapılacak değerlendirmede iki olasılık vardır. Bu iki olasılığı değerlendirmek için Hartley F-oranı testi uygulanır. En düşük ve en yüksek kalibrasyon seviyelerinin standart sapmalarının oranından hesaplanır (Burada elde edilen F değeri ANOVA ile elde edilen F değeri ile karıştırılmamalıdır). Elde edilen oran 1'e yakınsa varyansların homojenliği kanıtlanmış olur. Ancak sayı 1'den çok farklı ise Hartley'in F max tablo değeri bulunur. Tablo değeri için (P genellikle % 95) ve serbestlik derecesi ($n_{\text{enküçük}}-1, n_{\text{enbüyük}}-1$) alınmalıdır.

$$F_{\text{hesaplanan}} = \frac{s_{\text{büyük}}^2}{s_{\text{küçük}}^2} \quad \text{Denklem 90}$$

Burada: s^2 düşük ve yüksek kalibrasyon seviyelerindeki tekrarların varyanslarıdır.

- Eğer $F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}}$ ise, varyanslar istatistikî olarak önemli ölçüde farklı değildir; ağırlıklandırma gerekli değildir.
- $F_{\text{hesaplanan}} > F_{\text{tablo}}$ ise, standart sapma önemli ölçüde farklıdır; ağırlıklandırma gereklidir.

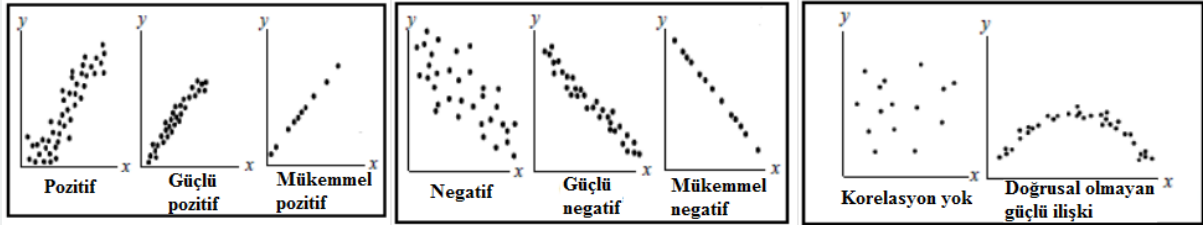
Bu durumda, çalışma aralığı, varyanslar arasındaki fark önemsiz olana kadar küçültülmelidir (42) veya kalibrasyon eğrisinin aralığı daha dar kalibrasyon aralıklarına bölünebilir (örneğin 0 ve 1000 kalibrasyon aralığı için 0-10, 10-100 ve 100-1000 gibi) (60). Diğer yandan,

ağırlıklandırma gerekli görülürse fakat aralık azaltılmıyorsa veya bölünemiyorsa, derişim değerleri farklı ağırlık faktörleri kullanılarak hesaplanmalıdır.

Regresyon İstatistiği

Korelasyon katsayısı: Doğrusal modelin ana parametrelerinden biri de korelasyon katsayısıdır (r). Korelasyon, iki değişkenin ne derece ilişkilili olduğunu sayısal ifade eder. Korelasyon katsayısı iki değişken arasındaki ilişkinin var olup olmadığını ve ilişkinin yönünün artan veya azalan yönde olduğunu ortaya koyar. r değeri (-1 ile +1) arasında değişir. (0 ile -1) arasındaki r değeri iki değişken arasında azalan bir yönde, (0 ile +1) arasındaki r değeri ise artan bir yönde ilişki olduğu anlamına gelmektedir. Korelasyon en uygun eğrinin bulunmasını sağlayamaz ancak en iyi ilişkinin en yüksek korelasyon katsayısına sahip olması beklenir. Çeşitli korelasyon ilişkileri **Şekil 23**'de gösterilmiştir. Korelasyon katsayısı veri seti içindeki bağıntının bir ölçüsü olup bir doğrusallık testi olmadığı unutulmamalıdır (60).

Görsel değerlendirme sonrası doğrusal olmadığına karar verilen kalibrasyon grafiklerinde bile yüksek r değerleri elde edilebilmektedir. Hesaplamanın yeterli sayıdaki veriyle yapılması çok önemlidir. Korelasyon katsayısının “bir” olması doğrusallığın kanıtı olmayacağı gibi, “sıfır” korelasyon katsayısı, x ve y 'nin tamamen ilgisiz olduğu anlamına gelmez –aralarında doğrusal ilişki olmadığı anlamına gelir (60).

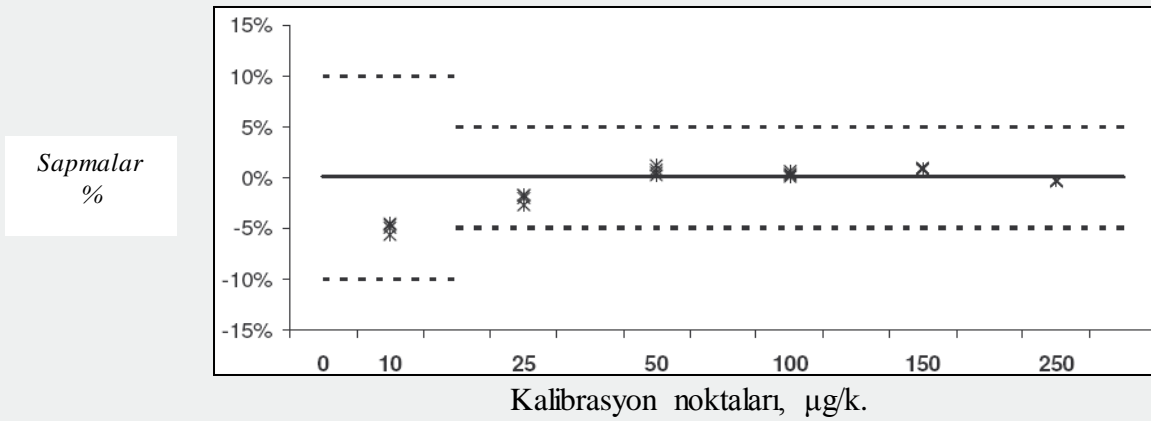


Şekil 23. Korelasyon ilişkileri.

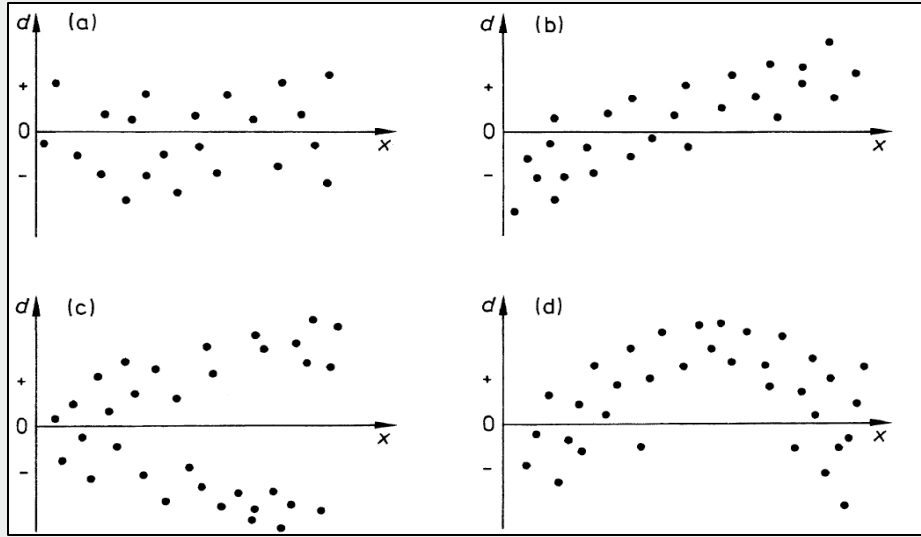
DeneySEL verilerin doğrusal ilişkiye uygunluğu korelasyon katsayısından (r) çok determinasyon katsayısı (R^2) ile ölçülebilir. R^2 değeri açıklanan varyasyonun toplam varyasyona oranı olarak hesaplandığından 1'e ne kadar yakınsa, ortaya konulan doğrusal model denkleminde elde edilen y değeri ile deneysel/ölçüm sonucunda elde edilen y değeri arasında yakın ilişki olduğunu dolayısıyla ortaya konulan doğrusal modelin veri setini çok iyi açıkladığı anlamına gelmektedir.

Artıkların Analizi: Regresyon analizinde artıklar; ölçüm sonucu ile model fonksiyondan elde edilen sonuçlar arasındaki fark olarak tanımlanır. İki değişkenin arasındaki ilişkinin ortaya konulması için oluşturulan basit saçılım grafiğinde lineer bir ilişki olup olmadığı her zaman anlaşılabilir. Dolayısıyla lineer ilişkinin ortaya konulması için her zaman artıkların grafiksel olarak incelenmesi önerilmektedir.

Şekil 24’da artık grafiği örnekleri verilmiştir. Bu grafikte derişime karşılık yüzde artıklar arasındaki ilişki belirtilmiştir. Sektörel rehberlerde maksimum yüzde sapma için hedef değerler belirtilmektedir. Kalibrasyon eğrisinin doğrusal modelinin kabul edilebilirliği için her bir kalibrasyon noktasındaki yüzde sapma değerinin, bu hedef değerden küçük olması beklenmektedir (9). Şekil 25’de ise farklı durumları açıklayan artık grafikleri mevcuttur. Buna göre (a) oluşturulan grafik en ideal bir görünümüdür. Çünkü artıklar sıfırın etrafında rastgele dağılmaktadır; (b)’de lineer bir eğilim olup, muhtemelen yanlış bir fonksiyon seçilmiş veya hesaplamalarda hata yapılmıştır. (c)’de varyansların derişim ile orantılı olarak arttığı veya homojen olmadığı düşünülebilir (lineer olmayan regresyonlarda varyanslar homojen kabul edilir veya aralık varyansların homojen olduğu parçalara ayrılır, (d) yanlış regresyon fonksiyonu seçiminin sonucudur. Sistematik eğilimler, doğrusallığın olmadığını veya seviye ile birlikte varyansın değiştiğini gösterir. Eğer varyans (ya da standart sapma) derişimle orantılı ise basit doğrusal regresyonu kullanmak yerine ağırlıklı regresyon hesaplamasının kullanılması uygun olacaktır.



Şekil 24. Derişime karşı sapmaların çizimi.



Şekil 25. Artık grafiği örnekleri.

Özellikle kromatografik analizlerde kalibrasyon eğrisinin uyumu bağlı artıkların standart sapmasının hesaplanması ile ifade edilir ve hedef parametreler de bu değer üstünden verilir (61).

$$s_{rr} = \sqrt{\frac{\sum (Y_{rel,i} - \bar{Y}_{rel})^2}{nk - 2}} \quad \text{Denklem 91}$$

Burada bağlı artıklar $Y_{rel,i} = \Delta y_i / \hat{y}_i$ (artıklar/ x_i derişimi için kalibrasyon model denkleminde hesaplanan \hat{y}_i değeri); artıklar ise $\Delta y_i = y_i - \hat{y}_i$; y_i burada belirli bir x_i derişimine karşı ölçüm sonucu elde edilen değerdir; n kalibrasyondaki nokta sayısıdır; k ise her bir noktanın ne kadar tekrarlar ölçüm yapıldığı sayıdır; serbestlik derecesi ise $(nk-2)$ 'dir.

2. Doğrusal olmayan ikinci dereceden fonksiyonlarının modeli

Bu model, doğrusal modelin yeterliliği kanıtlanamadığı durumda, önemli bir doğrusal olmayan ilişki bulunduğundan sonra düşünülmalıdır. Bu model de, doğrusal modelde olduğu gibi sonuçların normal dağılımını ve çalışma aralığındaki varyansların homojenliğini gerektirir.

Doğrusal modelin yeterliliği ispat edilemiyorsa, **doğrusal olmayan ikinci dereceden fonksiyon modeli** uygulanır (14). Bu durumda, verilerin grafik gösterimi bir parabol olacaktır.

Doğrusal olmayan modelin denklemleri aşağıdaki şekilde tanımlanır:

$$y = a + bx + cx^2$$

Denklem 92

b ve c katsayıları birlikte eğrinin simetri eksenini kontrol eder ve aynı zamanda köşenin x eksenini koordinatıdır.

x: değişim

y: ölçüm sonucu/yanıt değeri

a: sabit bir terim olup eğrinin yüksekliği veya y eksenini kesme noktası

b: doğrusallık katsayısı

c: ikinci derece katsayı; eğrinin y ekseninde karşılık gelen eğimi

10. KAYNAKÇA

1. *ISO/IEC 17025 Deney ve Kalibrasyon Laboratuvarlarının Yeterliliği için Genel Gereklilikler 2017.*
2. VIM 3 JCGM 200 Uluslararası Metroloji Sözlüğü - Temel ve Genel Kavramlar, İlgili Terimler. 3 2008.
3. Magnusson, B. ve Örnemark, U. *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2nd ed. 2014). ISBN 978-91-87461-59-0. Available from <http://www.eurachem.org>.*
4. *ISO 13934-1 Textiles — Tensile properties of fabrics — Part 1: Determination of maximum force and elongation at maximum force using the strip method.* 2013.
5. *BS EN ISO 527-1 Plastics - Determination of tensile properties - Part 1: General principles - British Standard (1996).*
6. *ISO 6892-2 Metallic materials -- Tensile testing -- Part 2: Method of test at elevated temperature.* 2018.
7. *ISO 37 Rubber, vulcanized or thermoplastic — Determination of tensile stress-strain properties.* 2017.
8. EA 4/18 Guidance on the level and frequency of proficiency testing participation 2021.
9. *SANTE 11813 - Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for Pesticide Residues Analysis in Food & Feed.* 2017.
10. *ISO Guide 80 Guidance for the in-house preparation of quality control materials (QCMs).* 2014.
11. Miller, J. N. ve Miller, J. C. *Statistics and chemometrics for analytical chemistry, 6th Edition.* 2010.
12. Ellison, S.L.R., Barwick, V.J. ve Farrant, T.J.D. *Practical Statistics for the Analytical Scientist : A Bench Guide.* 2. LGC : RSC, 2009.
13. Hovind, H., ve diğerleri. *Nordtest Report TR 569 Internal Quality Control Handbook for Chemical Laboratories.* Taastrup : NORDTEST, 2018.

14. *ISO 8466-2 Water quality -- Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics -- Part 2: Calibration strategy for non-linear second-order calibration functions.* 2001.
15. *ISO 7870-1 Control charts — Part 1: General guidelines.* 2019.
16. *NMKL No 3 Control charts and control materials in internal quality control in food chemical laboratories.* 2016. NMKL Procedures No. 3.
17. *ISO 13528 Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison.* 2015.
18. *Yeterlilik Deneyleri ve Laboratuvarlar Arası Karşılaştırma Programları Prosedürü.* basım yeri bilinmiyor : TÜRKAK, 2016. P704.
19. *Water quality -- Guidance on analytical quality control for chemical and physicochemical water analysis.* 2009. ISO/TS 13530.
20. McNaught, A. D., Wilkinson, A. IUPAC Recommendations. 2 *Compend. Chem. Terminol.* 2nd ed. The Gold Book : IUPAC, 2014.
21. *Türk Farmakopesi .* 2017.
22. European Pharmacopoeia. 9, 2017.
23. *ISO 11843, Capability of detection – Part 2: Methodology in the linear calibration case.* 2007.
24. Mocak, J., ve diğerleri. *IUPAC, A statistical overview of standard (IUPAC and ACS) and new procedures for determining the limits of detection and quantification: application to voltammetric and stripping techniques.* basım yeri bilinmiyor : IUPAC ACS, 2009.
25. European Commission. Commission Decision 2002/657/EC implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performances of analytical methods and the interpretation of results. Off. J. Eur. Communities (2002). doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
26. FDA. *Biopharmaceutics-2001. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation.* 2001.
27. AOAC. *Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements.* 2016.

28. Wenzl, T., Haedrich, J., Schaechtele, A., Robouch, P. & Stroka, J. *Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food*. 2016. EUR 28099.
29. Cantwell, H. (ed.),. *Blanks in Method Validation - Supplement to Eurachem Guide The Fitness for Purpose of Analytical Methods*. 2019.
30. *ISO 3534-3 Statistics -- Vocabulary and symbols -- Part 3: Design of experiments*. 2013.
31. *ISO 5725-6 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 6: Use in practice of accuracy values*. 1994.
32. TS ISO 3534-1: İstatistik - Terimler, tarifler ve semboller - bölüm 1: Olasılık ve genel istatistik terimleri:2011.
33. *ISO 5725-1 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 1: General principles and definitions*. 1994.
34. *NMKL procedure, No. 25 Recovery information in analytical measurement*. 2012.
35. Linsinger, T. ERM Application Note 1 Comparison of a measurement result with the certified value. Geel : IRMM, 2010.
36. *EURACHEM Leaflet Treatment of an Observed Bias*. 2017.
37. Konieczka P, Namieć-Snik J. Estimating uncertainty in analytical procedures based on chromatographic techniques. (6):. *J Chrom A*. 2010, Cilt 1217, s. 882.
38. Ellison, S. L. R. ve Williams, A. (Eds). *Eurachem/CITAC guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, Third edition, (2012) ISBN 978-0-948926-30-3. Available from www.eurachem.org*.
39. *Preparation of Calibration Curves: A Guide to Best Practice*, LGC, 2003.
40. Ambrus, A., ve diğerleri. Testing the Accuracy of Analytical Standard Solutions Used for Quantitative Determination of Pesticide Residues. *Journal of AOAC International*. 2017, Cilt 100, 4, s. 1058-1061.
41. Soboleva, E., Rathor, N., Mageto, A., Ambrus, A. Estimation of significance of matrix-induced chromatographic effects. *Principles of Method Validation*. 2000, s. 138.

42. ISO 8466-1 Water quality -- Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics -- Part 1: Linear calibration function. 2021.
43. NATA. *Validation and verification of quantitative and qualitative test methods*. 2018.
44. *The Design of Optimal Multifactorial Experiments*. Burman, R.L. Plackett and J.P. basım yeri bilinmiyor : Biometrika,, Biometrika.
45. S.L.R. Ellison, V.J. Barwick, T.J. Duguid Farrant *Practical Statistics for the Analytical Scientist: A Bench Guide: Edition 2 ISBN: 978-0-85404-131-2 Published by The Royal Society of Chemistry, LGC Limited 2009*.
46. Gökçe, B. ve Taşgetiren, S. Kalite için deney tasarımı. *Makine Teknolojileri Elektronik Dergisi*. 2009, Cilt 6, 1, s. 71-83.
47. Breyfogle, F.W. *Implementing Six Sigma: Smarter Solutions Using Statistical Methods*. 2003.
48. Ellison, S. L. R. and Fearn, T. Characterising the performance of qualitative analytical methods: Statistics and terminology. *Trends in Anal. Chem.* 2005, Vol. 24, pp. 468-476.
49. *Validation of qualitative analytical methods*. Trullois, E, Ruisanchez, I and Rius, F X. 2004, Vol. 23, pp. 137-145.
50. Gondim, C.S., ve diğerleri. An appropriate and systematized procedure for validating qualitative methods: Its application in the detection of sulfonamide residues in raw milk. *Anal. Chim. Acta*. 2014, Cilt 830, s. 11-12.
51. Anderson, M. R. *Analytical Chemistry: Theoretical and Metrological Fundamentals*. Newyork : Springer, 2006.
52. NMKL No 20. *Evaluation of results from qualitative methods*.
53. Ellison, S.L.R ve Bettencourt da Silva, R. *Eurachem/CITAC Guide: Assessment of performance and uncertainty in qualitative chemical analysis*. 2021.
54. Mandrekar, JN. Receiver operating characteristic curve in diagnostic test assessment. *J Thorac Oncol*. Cilt 5, 9, s. 1315-6.

55. How to Met ISO 17025 Requirements for Method Verification. *AOAC International*. MD, USA : AOAC, 2007.
56. Huber, L. *Validation and Quantification in Analytical Laboratories*. Florida : Second Edition CRC Press, 2007.
57. The United States pharmacopeia. National formulary. *United States Pharmacopeial Convention*. 2017, Cilt 1.
58. Antignac, J.P., Le Bizec, B. Monteau, F., Andre. F. Validation of analytical methods based on mass spectrometric detection according to the “2002/657/EC” European decision: guideline and application. *Analytica Chimica Acta*. 48, 2003.
59. Uhlig, S., Gowik, P. ve Radeck, W. Performance of a matrix-comprehensive in-house validation study by means of an especially designed software. *Analytica Chimica Acta*. 2003.
60. *TrainMiC, Training in Metrology in Chemistry*. Robouch P, Bulska E, Duta S, Lauwaars M, Leito I, Majcen N, Norgaard J, Suchanek M, Vassileva E, Taylor P. 2003. EUR 20841.
61. Perihan Yolci Omeroglu, Arpad Ambrus, Dilek Boyacioglu. Uncertainty of Pesticide Residue Concentration Determined from Ordinary and Weighted Linear Regression Curve. *Food Additives and Contamimants: Part A*. 2018, Cilt 35 , 7, s. 1324.