

Karar Limiti–Tespit limiti

(Decision limit = Limit of detection-

LODxDL=

xLD),

Minimum tespit edilebilir değer

(Minimum Detectable Value- xMDV),

Tayin limiti (LOQ-Limit of

quantification-Limit of determination-

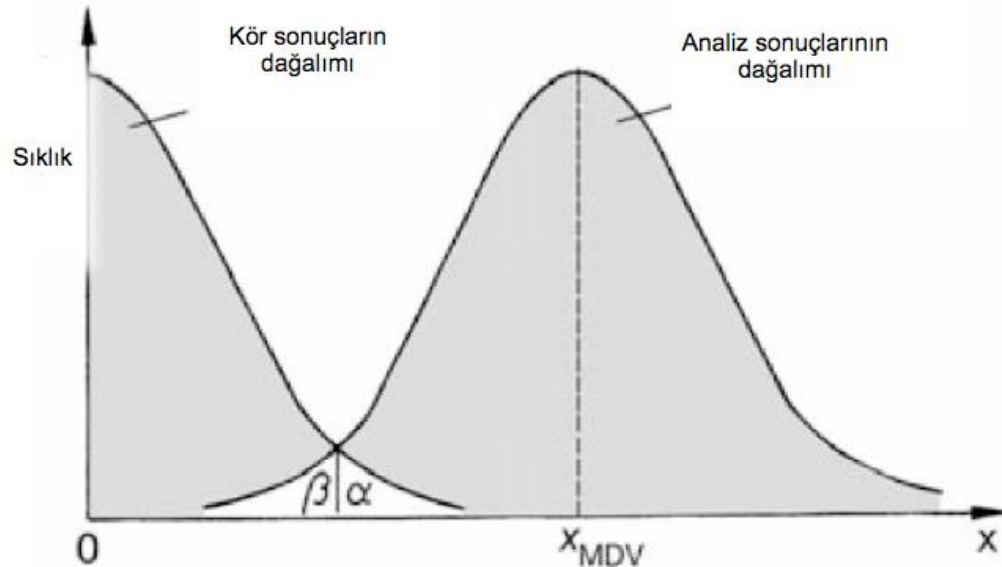
xLQ)

- Çok düşük konsantrasyonlarda çalışılması gerektiği durumlarda örneğin vermiş olduğu sinyalin, **kör numuneden ayrımının yapılması** ve uygun bir kesinlikle kantitatif sonuçların elde edilmesi gerekir.

- Analiz sonucunda elde edilen değer sıfırın üstünde olduğunda iki olasılık vardır;
- 1- Örnek aranan analiti içermiyor ve elde edilen sonuçlar körün dağılım aralığındadır.
- 2- Örnek aranan analiti içeriyor ve analiz tekrarları ortalamanın elde edilmesini sağlar.

- “1 No’lu durumda” yani örneğin gerçekten analiti içermediği durumda, yanlış pozitif karar
- verilebilir ve α - hata şekillenir.

- “2 No’lu durumda” analitik sonucun tespit edildiği halde örneğin gerçekte içermediği durumlarda yanlış negatif sonuç elde edilebilir ve β - hata şekillenir.



α - hata ve β - hata

- Bu durumda 3 farklı limit oluşur;
- - karar limiti – tespit limiti (decision limit- limit of detection) **xLD**
- - minimum tespit edilebilir değer (minimum detectable value) **xMDV,**
- - tayin limiti (limit of quantification, limit of determination) **xLQ**

- ISO/TS 13530, tespit limiti'ni (xLD);

kör ve sıfır dışında tespit edilebilen en küçük miktar ya da konsantrasyon olarak belirtmektedir.

- Tespit limitinin belirlenebilmesi için yaklaşımların bir çoğu
- benzer **kör matrikslerin** veya
- düşük seviyedeki materyallerin **sonuçlarının standart sapmaları** veya
- **metodun standart sapmasının (sxo) faktörle çarpımı** ile hesaplanması yönündedir.

- Bu şekilde tespit limiti 3 şekilde hesaplanabilmektedir.
- **1** - Kör örneklerin sonuçlarının standart sapmaları üzerinden,
- **2** - Metodun standart sapması üzerinden,
- **3** - Gürültü üzerinden,

1. YÖNTEM

- Kör örneklerin sonuçlarının standart sapmaları üzerinden formülle hesaplanır;
- **$xLD = 3 \times s_0 + x_{k\ddot{o}r}$**
- s_0 = kör örneklerin sonuçlarının standart sapmaları
- $x_{k\ddot{o}r}$ = kör örneklerin ortalaması
- Yukarıdaki eşitlik eğer analiz sonuçlarından **körün çıkarılması** temeline dayanıyorsa **$x_{k\ddot{o}r}$ eşitliğe konulmamalıdır.**
- Kesinlik hesabından yani s_0 matrikse uygun kör veya düşük seviyede analit içeren materyal kullanılarak en az 6 tercihen 10 bağımsız çalışma ile elde edilmelidir.
- Formülde yer alan 3 güven aralığı $\alpha=0,01$ karşılığıdır.

2. YÖNTEM

- Metodun standart sapması üzerinden hesaplamada **linear kalibrasyon eğrisinin değerleri** kullanılarak aşağıdaki formülle tespit limiti hesaplanır.
- **$xLD = 4 \times sXO$**
- $sXO = syb$
- $sy = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{N - 2}}$
- sXO = Proses veya metot standart sapması (kalibrasyondan)
- sy = Residüel standart sapma

- \hat{y}_i = Eğrinin formülünde “x” değerinin yerine konulduğu zaman elde edilen “y” değeri
- (varsayılan “y” değeri)
- b = kalibrasyon eğrisinin eğimi

3. YÖNTEM

- Tespit limiti hesabındaki üçüncü yöntem

sinyal/gürültü oranı üzerinden hesaplama olup, bunun için hazırlanan **en düşük** konsantrasyondaki '*spike* örneğinin'

"**Sinyal / Gürültü (S/N)**" oranı bulunur.

Kullanılan '*spike konsantrasyonu*' (Cspk) bu orana bölünerek 3 katı alınır.

- **$xLD = (C_{spk} / S/N) \times 3$**
- ISO/TS 13530'da tayin limitinin tespit limitinin 3 katı olarak hesaplanabileceği belirtilmiştir.
- Burada kullanılan "k faktörü" yani 3, %33 maksimum kabul edilebilir bağıl belirsizlik
- karşılığı olarak katsayıdır.

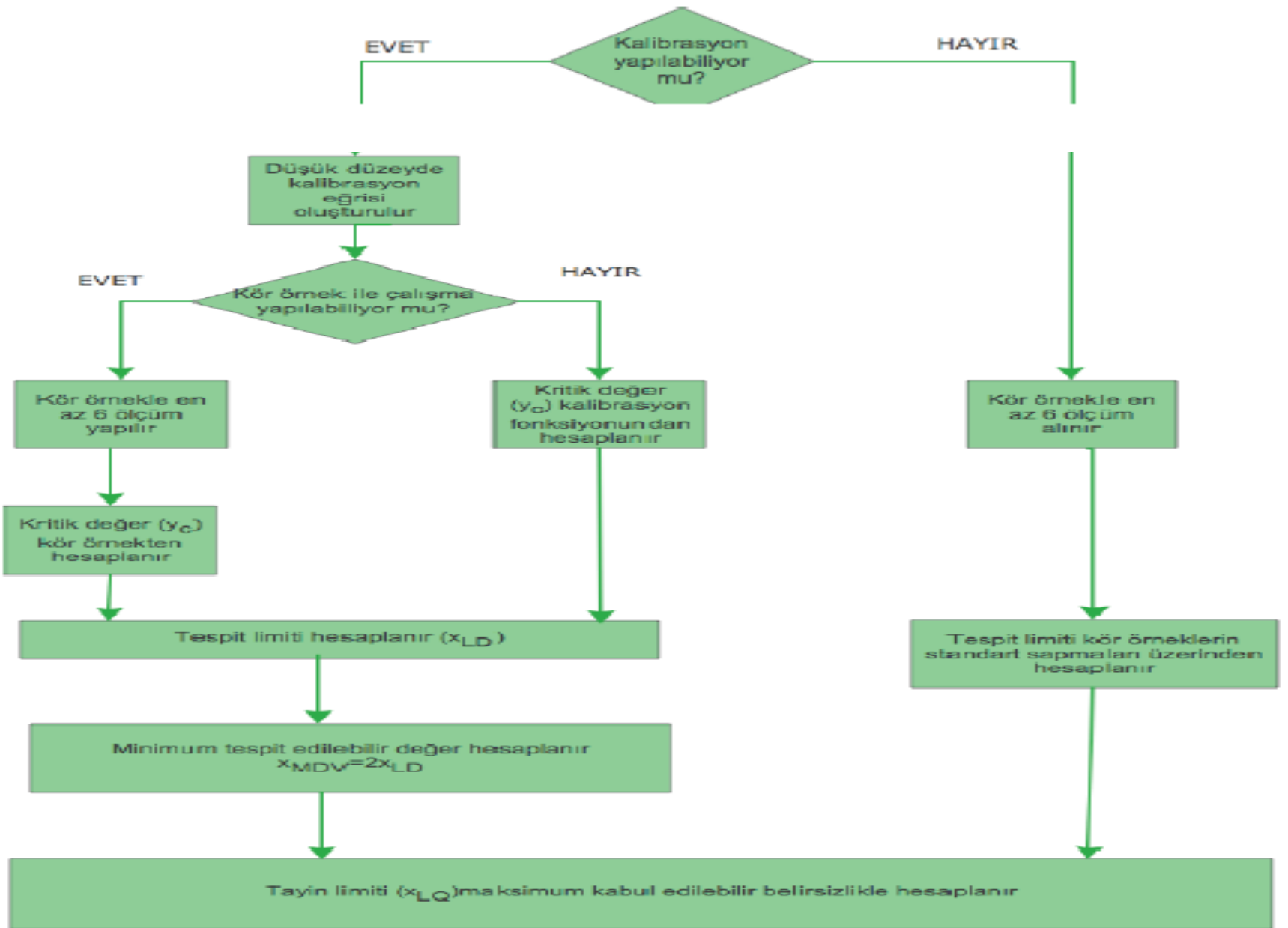
$$xLQ = k \times xLD$$

k= kabul edilebilir bağıl belirsizlik katsayısı

k= kabul edilebilir bağıl belirsizlik katsayısı

| Maksimum kabul edilebilir bağıl belirsizlik (%) | k- katsayısı |
|---|--------------|
| 5 | 20 |
| 10 | 10 |
| 15 | 6,7 |
| 20 | 5 |
| 25 | 4 |
| 33,3 | 3 |
| 50 | 2 |

Tablo 7: Maksimum kabul edilebilir bağıl belirsizlik ve k katsayısı



- Uygun temsili kalibrasyon standartlarının bulunmadığı durumlarda

xLD ve xMDV kör örneğin tekrarlarıyla hesaplanır.

Kullanılacak kör her bir tekrarda birbirinden bağımsız ve tüm analitik aşamaları içermelidir.

- **Karar limiti – tespit limiti (decision limit- limit of detection) x_{LD} ;**
- Karar limiti **α -hata**nı %5,
- **β -hata**nın %50 olduğu durumdur.
- **“1 No’lu durum” Kör örnekle;** yapılan hesaplamada karar limitinin hesaplanmasına öncelikle kritik değer hesabı ile başlanır.

- **“2 nolu durum”, Kalibrasyon eğrisi metodu,**

kritik değer ve y eksenini kestiği nokta formüllerle hesaplanır.

- **Minimum tespit edilebilir değer (minimum detectable value) x_{MDV}**

Örnek içinde aranan analitin varlığının tespit edilebildiği ancak **tekrarlanabilir** koşullarda net olarak hesaplanamadığı miktardır.

Karar limitinde olduğu gibi minimum tespit limitinde de değer seçilen önem derecesine ve **serbestlik derecesi** ile ilişkilidir.

- Önem dereceleri **α ve β 'nin eşit olduğu durumda ($\alpha=\beta$);**
- $t_{\alpha}=t_{\beta}=t$ olup, **$x_{MDV} = 2 \times x_{LD}$**

- **Tayin limiti;** aranan analitin maksimum bağıl kesinlik olmadan belirsizlikle analiz edilebilen minimum konsantrasyonudur.

- **Tespit ve tayin limitinin doğrulanması**
- Metot validasyonu çalışmalarında hesaplanan tespit limiti ve tayin limitinin mutlaka **doğrulanması** gerekir.

Çözüm: Bunun için kör örnek içine bu konsantrasyonlarda spike yapılır.

- Hem kör numune hem de zenginleştirilmiş kör numune, aynı örnek gibi laboratuvar içi tekrar üretebilirlik koşullarında çalışılır.
- Zenginleştirilmiş kör numunelerin ortalama yanıtı maksimum kör değerinden fazla ise tespit limiti doğrulanmış sayılır.

- **Örneğin:** Sularda arsenik çalışmasında tespit limiti 0,5 µg/L belirlenmiş olduğunu varsayarsak, bu seviyede yapacağımız “*spike*” sonucu yapılan üç tekrar ölçümünde alınan yanıtlar aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

| Konsantrasyon | Tekrar | | | Maksimum | Otalama |
|---|----------|----------|----------|-----------|-----------|
| | y_{i1} | y_{i2} | y_{i3} | y_{max} | y_{ort} |
| Kör | 0,001 | 19,23 | 15,14 | 19,23 | |
| Tespit limiti $\times LD=0,5 \mu g/L$ (spike) | 17,13 | 19,54 | 26,37 | | 21,01 |

Tablo 8: Örnek tespit limiti doğrulaması

Bu verilere göre zenginleştirilmiş örneklerin ortalama sonucu olan 21,01 kör örneğin maksimum değeri olan 19,23 den **fazla olduğu için tespit limiti doğrulanmış** olmaktadır.

Tayin limitinin doğrulanması için kriter tayin limitinin belirsizliğinin **$1/k$ ($k>1$)** dan küçük olmalıdır.

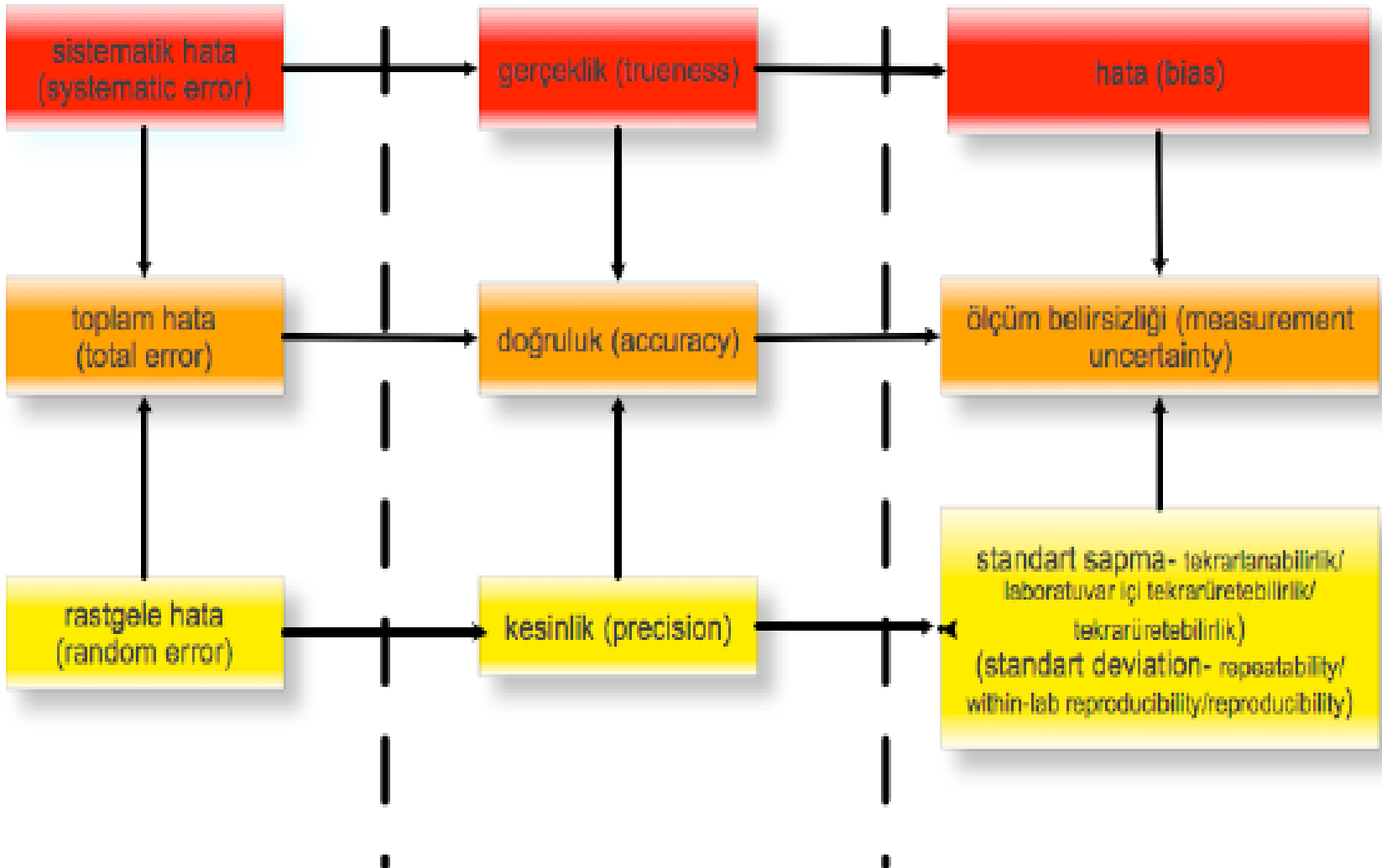
Bunun için yapılan “spike” çalışmasının en az 3 – 5 arası tekrar edilmesi gerekmektedir.

- **Doğruluk (accuracy)**
- Doğruluk parametresi iki ana bileşenden oluşur. Bunlar **gerçeklik ve kesinlik**'tir.
- Doğruluk elde edilen değer ile gerçek değer in yakınlığının ifadesidir.

HATA ÇEŞİTLERİ

PERFORMANS KARAKTERİSTİKLERİ

PERFORMANS KARAKTERİSTİKLERİNİN KANTİTATİF İFADESİ



Şekil 5: Hata çeşitleri ve performans karakteristikleri /kriterleri Menditto ve ark. (2007)

| Rastgele Hata | Sistemik Hata |
|--|---|
| Kesinliği etkiler (tekrarlanabilirlik ve tekrarüretebilirlik) | Sapmayı (bias) oluşturur. Rastgele hatanın düşük olduğu durumlarda gerçek değerden sapmayı gösterir |
| Tekrarların ortalamadan sapmasına neden olur | Tüm sonuçların çok yüksek veya çok düşük olmasına neden olur |
| Tekrar ölçümleri ile belirlenebilir | Tekrar ölçümleri ile belirlenemez |
| İyi çalışma teknikleri ile minimize edilebilir; ancak tamamen elimine edilemez | Standart metot ve materyaller ile düzeltilebilir |
| Çalışanlar ve ekipmanlardan kaynaklanır | Çalışanlar ve ekipmanlardan kaynaklanır |

Tablo 9: Rastgele ve sistemik hatanın karşılaştırılması

Gerçeklik (trueness)

- Gerçeklik için sistematik hata (bias) hesabı yapılır.
 - Sistematik hata bir ölçüm metodunun gerçek sonucu verebilme kabiliyetini belirtir.
 - Sistematik hatanın hesaplanabilmesi için doğru olduğu kabul edilen **referans yani gerçek değer** bilinmelidir.
 - Gerçek değer **sertifikalı referans materyallerden**,
 - 1) valide edilmiş metodun ölçümü sonucu veya
 - 2) yeterlilik testleri sonucunda elde edilebilir.
- Bu üç yöntemde de ortak nokta **gerçek değer**in bir çok laboratuvar da yapılmış ölçümlerin sonucunda elde edilmiş olmasıdır.

- Sistematik hatanın bir matriks ve bir seviyede hesaplanması; tüm çalışma aralığında metodun aynı hata ile çalıştığı anlamına gelmemektedir.
- **Çözüm:** Bunun için değişik seviyelerde ve/veya değişik matrikslerle çalışma yapılmalıdır.
- Eğer metot farklı analistler tarafından kullanılıyorsa her biri için ayrı çalışma yapılmalıdır.

- **Sertifikalı referans materyal kullanarak gerçekliğin tespiti**
- Sistematik hata aşağıdaki eşitlikle hesaplanır.
- **$Bias = x_{bulunan} - x_{CRM}$**
- $x_{bulunan}$ = Tekrarlanabilirlik veya tekrar üretebilirlik koşulları altında yapılan ölçümlerin ortalaması
- x_{CRM} = Sertifikalı referans materyalin sertifika değeri
- Sertifika değerine göre hesaplanan sistematik hatanın gerçek değerle arasında önemli bir farkını bulunup bulunmadığı **t – testi** yapılarak kontrol edilebilir.
- **$t = (x_{CRM} - x_{bulunan}) / ns$**

- **Z- skoru ile sistematik hata tespiti**
- **Referans metot kullanılarak gerçeğin tespiti**
- **Yeterlilik testi kullanılarak gerçeğin tespiti**

- **Diğer durumlarda gerçekliğin tespiti, geri kazanım çalışması**
- Gerçekliğin tespiti için sertifikalı referans materyal, referans metot ve yeterlilik testinin bulunmadığı durumlarda
- **Çözüm:** geri kazanım çalışması yapılır.
- Geri kazanım çalışmasının en büyük avantajı orijinal matrikste çalışma yapılabilmesidir. Çalışma için orijinal matriks yani validasyon çalışmasının yapıldığı matriks, aranan analit ile zenginleştirilir.
- Bunun yanında dezavantajı, orijinal örneklerde aranan analitlerin örnekle olan fiziksel ve kimyasal bağlarının çok güçlü olmasına rağmen, zenginleştirilen örneklerde dışardan katıldığı için bu şekilde bir bağ oluşmamasıdır. Bunun sonucunda geri kazanım çalışmasında her zaman daha başarılı sonuçlar elde edilebilir.

- Geri kazanım sonuçlarının aksi ilgili yasal mevzuat yada metot performans verilerinde belirtilmedikçe **%80 ile %110 arasında değişmesi** başarılı olarak kabul edilir.
- Sonuçlar konsantrayona bağlı olarak değişiklik göstereceğinden yasal limitlerin olduğu çalışmalarda **düşük konsantrasyonlarda da çalışma yapılmalıdır.**
- Eurachem rehberinde geri kazanım çalışması en az 6 tekrarla yapılması önerilmiştir. Çalışmaların ölçüm aralığına göre bir kaç konsantrasyonda yapılması gerekir.

Kesinlik (precision)

- Kesinlik ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının ifadesidir. Bağımsız analiz sonuçları arasındaki tutarlılığı gösterir. Kesinlik doğruluğun gerçeklik dışındaki diğer bir bileşeni olup rastgele hataların dağılımını gösterir.

- Kesinlik ölçümünü 4 faktör etkilemektedir. Bunlar;
 - **1) zaman** (kısa ve uzun zaman aralığı),
 - **2) kalibrasyon** (aynı ekipmanda dahi ölçümler arasında yeniden kalibrasyon yapılıp yapılmadığı),
 - **3) operatör** (aynı veya değişik operatörler) ve
 - **4) ekipman** (ölçümlerde aynı veya farklı ekipmanların kullanılıp kullanılmadığı) olup bunların değişkenliğine göre kesinlik de değişmektedir.
-
- Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik olarak iki genel kesinlik ölçümü bulunmaktadır.
 - Tekrarlanabilirlik, “r” harfi ile ifade edilmekte olup, tekrarlanabilirlik koşulları altında elde edilen kesinliktir. Tekrarlanabilirlik koşulları ISO 5725-1 ‘de aynı metot ile eşdeğer

Tekrarlanabilirlik, “**r**” harfi ile ifade edilmekte olup, tekrarlanabilirlik koşulları altında elde edilen kesinliktir.

- Tekrarlanabilirlik koşulları ISO 5725-1 ‘de aynı metot ile eşdeğer örneklerde aynı laboratuvarında, aynı ekipman ve aynı analist tarafından kısa zaman aralığında elde edilen bağımsız test sonuçları elde edilmesi olarak tanımlanmıştır.
- Koşulların yakınlığı nedeniyle beklenen **kesinlikte küçük** olmaktadır.

Tekrar üretilebilirlik yani uyarlık ise “**R**” harfi ile ifade edilmektedir ve tekrar üretilebilirlik koşulları altında elde edilen kesinliktir.

Tekrar üretilebilirlik koşulları standartta aynı metot ile eşdeğer örneklerde;

farklı laboratuvarda, **farklı ekipman** ve **farklı analist** tarafından uzun zaman aralığında elde edilen bağımsız test sonuçlarının elde edilmesi olarak tanımlanmıştır.

- **Sapan sonuçların değerlendirilmesi**
- **Grubb testi ve Cochran testi** sapan verilerin ayrılması için uygulanılması ISO 5725-2'de önerilmektedir.
- **Horwitz Oranı (HorRat)**

5.5. Spesifite (Specificity)

- **Spesifite** bir metodun aranan analiti diğer analitlerin bulunduğu örnek içinde ayırt edebilme yeteneğine denir.
- Spesifitenin belirlenebilmesi için **kör numune ve değişik numunelere aranan analit eklenerek girişim oluşturup oluşturmadığı incelenir.**
- Spesifite aynı zamanda **prensip olarak farklı bir metotla karşılıklı çalışılarak** belirlenebilir. Ancak analist aranan analitin başka bir kimyasal formda bulunup bulunmayacağı konusunda bilgi sahibi olmalıdır.

Metot sağlamlığı (Ruggedness)

- **Sağlamlık** (Robustness / Ruggedness), alışmaları laboratuvardan kaynaklanan bazı küçük sapmaların ve bunların analiz sonuçları üzerine etkisini inceler.
- Bu çalışmanın yapılabilmesi için ön-araştırma çalışmaları, analiz naşaması, temizleme ve analiz faktörlerini seçmek gerekir. Bu faktörler;
 - - rnek kompozisyonu,
 - - Üretim tarihi farklı kimyasallar,
 - - pH,
 - - Ekstraksiyon süresi,
 - - Sıcaklık,
 - - Basınç,
 - - Akış hızı,
 - - Uçuculuk,
 - - Kolon sıcaklığı v.b

- Faktörler tanımlandıktan sonra, her bir faktör üzerinde biraz değişiklikler uygulanır
- Sonuçları önemli ölçüde etkileyen faktörlerin metot protokolünde açık bir şekilde tanımlanması gerekmektedir.
- Metot parametrelerinde rutin işlem sırasında ufakdeğişikliklerin analiz sonucuna etkisi ne kadar az ise metot o kadar sağlamdır.