

METOT GELİŞTİRME VE VALİDASYONU İÇİN BASİT KULLANIM KILAVUZU



Hamide Z. ŐENYUVA & John GILBERT

BÖLÜM I

GİRİŞ

1.1 AMAÇ VE KAPSAM

Bu kitapçığın amacı analitik metotları geliştirme, kullanma ve valide etme konularında basit ve kullanımı kolay bir kılavuz sağlamaktır. Bu kesin ve detaylı bir bilimsel inceleme olmamakla beraber, gerçek hayat koşullarında metot validasyonu ve metot uygulamaları konularında sıklıkla karşılaşılan soru ve sorunlara yanıt vermeyi amaçlamaktadır. Kavramların derinlemesine incelemeleri ve açıklamaların matematiksel temelleri için okuyucuların orjinal metinlere başvurmaları tavsiye olunur. Bu kitapçığın amacı metot geliştirme ve validasyonu konularındaki çok sayıda bilimsel yayının yerini almak olmayıp, uzman olmayan kişilerce de kolaylıkla anlaşılır bir formatta bilgiyi hızlı ve rahat ulaşılabılır kılmaktır.

1.2 GİRİŞ

1.2.1 ANALİTİK METOT SEÇİMİ

Birçok kişi kendi kullanımları veya bilim çevrelerinde kullanılması için analitik metotlar geliştirirler. Bir kişi ister kendisi metot geliştirsün, ister yayınlar arasından seçim yapsın metodun 'amaca uygunluğu' konusunda değerlendirme yapmak durumundadır. 'Amaca uygunluk' metodun asgari gereksinimleri yerine getirmeye uygun olup olmadığıdır. Bunu yapmanın en objektif yolu metodun özellikleri ile amaçlanan işlemin asgari gereksinimlerini karşılaştırmaktır. Örneğin; bir metodun 'amaca uygun' olması için, konu ile ilgili yasal bir limit mevcutsa, bu analizde kullanılan metodun gözlenebilirlik limitinin (LOD) bu yasal limitten düşük olması gerekir. Ancak, gözlenebilirlik limiti, metot seçiminde kritik bir rol oynamakla beraber önemli özelliklerinden sadece biridir. Diğer iki önemli özellik de metodun kesinliği ve doğruluğudur. Kesinlik analiz tekrarlarından elde edilen sonuçların birbirlerine yakınlıklarını, doğruluk ise metot ile elde edilen sonuçların 'gerçek değer'e ne kadar yakın olduğunu belirler.

Codex Alimentarius ve AB gibi uluslararası kuruluşlar yasal düzenlemelerde kullanılan metotların seçiminde, 'kriter bazlı' yaklaşımları uygulamaya koymuşlardır. Bunun anlamı; kontrol amacıyla yapılacak analizler-

de kullanılacak tek bir metod önermektense, kullanılacak metodun karşılaması gereken asgari kriterlerin belirlenmesidir. Bu, laboratuvara daha büyük esneklik tanımaktadır. Bu yaklaşımın uygulandığı durumlarda 'amaca uygunluk' seçilen metodun performans özelliklerinin yönetmelikte belirtilen (AB Direktiflerinde olduğu gibi) koşullardan iyi olmalıdır anlamı taşımaktadır.

1.2.2. METOT VALİDASYONUNA GİRİŞ

Metot validasyonu metod özelliklerini belirlemek için uygulanacak resmi prosedürdür. Buradaki 'resmi prosedür', IUPAC ve AOAC International gibi kuruluşların 'metot özellikleri'ni rapor ederken standart bir yol izlenmesi için getirdikleri kurallar bütünüdür. Aynı amaç için kullanılan iki farklı metodun 'metot özelliklerinin' kaynaklarından bağımsız olarak aynı olması gerekmektedir. Bu durum 'amaca uygunluk' kriterine dayanarak yapılacak metod seçimini basitleştirmektedir. Bazı 'metot özellikleri' bir laboratuvarında bir analist tarafından belirlenebilir, buna 'laboratuar içi' veya 'tek laboratuvar' validasyonu denir. Her ne kadar hassas bir şekilde 'laboratuar içi' validasyonu yapılmış metotlar yaygın bir uygulama alanı bulsa da, metodun farklı bir laboratuvarında, farklı bir analistin elinde de aynı sonucu verdiğini test etmekte yarar vardır. 'Laboratuvarlar arası validasyon'un, diğer adıyla kolaboratif çalışmanın, amacı metotların birden çok laboratuvarında test edilmesidir. Bu, metod performansının belirlenmesi için en ileri yoldur. Ancak, 'laboratuvarlar arası validasyon' yapmak çok yüksek maliyetli olabileceği gibi, çok da zaman alıcı bir uygulamadır.

BÖLÜM II

METOT GELİŞTİRME

Metot geliştirme, bir numunenin alınarak analitin numune ortamından ekstrakte edilmesi, daha sonra analitin, belirlemenin yapılabilmesi için, yeterli saflığa getirilip temizlenmesinde izlenmesi gereken adımların sistematik olarak belirlenmesidir. Analitik belirleme sadece bir kalıntı veya kirletenin hedef değerin üzerinde olup olmadığını rapor etmek olabileceği gibi, kantitatif bir ölçüm (miktar tayini) de olabilir. Numunenin ne dereceye kadar saflaştırılması gerektiğini, kullanılacak belirleme tekniğinin özgülüğü belirler. Bazı belirleme teknikleri (kütle spektrometresi gibi) çok özgül olup, analitle birlikte gelen diğer ekstraktar varlığında da analitin ölçümünü yapabilir. Diğer belirleme teknikleri ise (HPLC için UV dedektörleri veya GC için alev iyonlaşma dedektörleri gibi) özgüllükten yoksun olup numune temizliği için daha ideal şartlar gerektirirler.

Her metotta bazı adımlar kritik olabilir, en ufak sapma bile düşük geri kazanıma veya kötü özgülüğe yol açabilir. Sağlam bir metot bazı adımlarda olabilecek küçük sapmaların sonucu etkilemediği metotdur; sağlamlık testi (robustness) ise bu küçük sapmaların sonucu etkilemeyeceği limitlerin belirlenmesidir.

Öncelikle metodun kapsam ve amacının belirlenmesi gerekir. Kapsamın içerisinde, metodun uygulanacağı numune ortamının belirlenmesi vardır. Amaç ise kararın kalitatif bilgiye göre (belirli limitin üzerinde kabul veya red) veya ölçüm gerekliliğine (bir spesifikasyona göre test yapılması) göre belirlenir. Ölçüm gerektiren durumlarda istenen kesinlik derecesinin iyi incelenmesi veya yasak madde analizlerinde kabul edilebilir azami gözlenebilirlik limitinin bilinmesi gerekir.

BÖLÜM III

METOT VALİDASYONU

Validasyon basit anlatımıyla bir metodun performansını belirleyen özelliklerini ortaya çıkarmak ve aynı zamanda sınırları belirlemektir. Validasyon, metodun uygulanacağı analitin/lerin ve numune ortamının (metodun uygulama alanı olarak da adlandırılır) belirlenmesi; gözlenebilirlik sınırı (LOD), belirlenebilirlik sınırı(LOQ) ve metodun kullanılabilmesi için konsantrasyon aralığının (metot doğrusalığı) ölçümüdür. Validasyon aynı zamanda metodun doğruluğunu (geri kazanım olarak da adlandırılabilir) ve kesinliğini (tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik) de belirler. Bu maddeler aşağıda detaylı olarak açıklanmıştır.

Bir metodun özellikleri belirlendikten sonra (yani valide edildikten sonra), bu özelliklerin belirli bir amaç doğrultusunda metodun gereklilikleriyle, uyumunu ölçmek amacıyla, karşılaştırılması gerekir. Bir metodun 'amaca uygun' olabilmesi için özellikleri ve gereklilikleri arasında iyi bir uyum olması şarttır. Bir metodun 'amaca uygun' olabilmesi için asgari metod gerekliliklerini yerine getirmesi ancak çok da aşmaması gerekir. Bu nedenle, amaç sadece kabaca bir konsantrasyon tahmini yapmaksa, gereğinden daha hassas bir metod seçmenin yararı yoktur. Böyle bir durumda ölçüm yapmanın maliyeti çok yüksek olacağından, daha basit ve ucuz metotları seçmek gerekir. Çok hassas metotlar seçildiğinden metodun azami gereksinimleri karşılayacak ancak 'amaca uygun' olmayacaktır. 'Amaca uygunluk'un belirlenmesinde metodun özelliklerinin dışında göz önünde bulundurulması gereken 'analiz hızı' veya 'analiz maliyeti' gibi ön plana çıkacak başkaca kriterler de vardır.

Uygun bir metod seçimi laboratuvarın etkin çalışabilmesi için önemlidir. Metodun performansının rutin kalite güvence prosedürlerinin bir parçası olarak izlenmesi gerekir.

Standart bir metod (başka bir yerde önceden valide edilmiş bir metod) bir laboratuvarında uygulanmaya başlandığında eğer farklı bir numune ortamında kullanılacaksa yeniden validasyon gerekir. Analistin, en azından, metodun geçerliliğini metodu etkin olarak uygulayabildiğini ve performans özelliklerinin mesela özellikle LOD, LOQ ve tekrarlanabilirlik (r) en az orijinali kadar veya daha iyi olduğunu kanıtlayabilmelidir.

3.1 METOT VALİDASYONU ÇEŞİTLERİ

3.1.1 LABORATUVAR İÇİ VEYA TEK LABORATUVAR VALİDASYONU

Bir metodun performansının ne kadar iyi olduğunu belirlemenin ilk adımı laboratuvar içi validasyondur. Bu 'tek analist' tarafından 'tek laboratuvar'da' aynı ekipman ve enstrümanlar kullanılarak yapılır (IUPAC, 2002). Çoğunlukla metodun Laboratuvar içi validasyonunu yapacak kişi metodu geliştiren kişi olduğu için, metodun teknik detaylarını yakından tanıyacaktır. Bu nedenle, metodun tanımı iyi yapılmamış bile olsa, analist detayları çok iyi bileceğinden, bu durumun olumsuz bir sonucu olmayacaktır. Ancak, bu durumda analist kritik adımların neler olduğunu bilinç altında çok iyi bildiğinden, hataya yol açabilecek noktaları etkileyerek, metoda alışık olmayan tecrübesiz başka bir analiste göre çok daha iyi bir performans ortaya koyacaktır.

LOD ve LOQ bir tek laboratuvar' da belirlenerek, aynı ekipmana sahip başka bir laboratuvar' da benzer performans sergilenebileceği varsayılabilir, LOD ve LOQ'nun tek laboratuvar' da mı yoksa çok sayıda laboratuvar' da mı belirlendiğinin büyük bir farklılığa yol açmaması gerekir. Bir metodun kesinliği onun tekrarlanabilirliği (r) ve tekrar üretilebilirliği (R) esas alınarak belirlenir. Tekrarlanabilirlik (r) tek bir analistin aynı laboratuvar' da farklı günlerde aynı sonucu elde edebilmesi demektir ve tek laboratuvar validasyonu ile belirlenir. Tekrar üretilebilirlik sadece tam validasyon çalışmasından elde edilir.

3.1.2 EŞ/EMSAL LABORATUVAR TARAFINDAN DOĞRULANMIŞ METOT VALİDASYONU

Tek bir laboratuvar' da kullanılmış bir metodun başka bir analist ve ortamdaki performansını ölçmek her zaman iyi bir yaklaşımdır. Bir metodun ikinci veya üçüncü bir laboratuvar' da test edilmesine 'Eş/emsal tarafından doğrulanmış' denir. 'Eş/emsal tarafından doğrulanmış' validasyon, metodun ne kadar iyi tanımlandığının göstergesidir.

'Eş/emsal tarafından doğrulanmış' metod başka bir analist benim metodumu izleyerek benimle aynı sonuçta varabilir mi?' sorusunun yanıtıdır.

Bazen bir metod tanımının, başkalarınca ne kadar farklı yorumlanabildiğini görmek şaşırtıcıdır, eş/emsal laboratuvar tarafından doğrulanmış metod validasyonu en azından metod tanımını konusunda geri bildirim sağlar.

Eş/emsal tarafından doğrulanmış metod temelde tam metod validasyonuna giden yolun orta noktasıdır ve tam bir kolobratif çalışmanın yol açacağı iş yükü ve masraf olmaksızın iki veya üç laboratuvar' da metodun performansını ölçmektir. Eş/emsal tarafından doğrulanmış metod validasyonu, tam bir kolobratif çalışmadan elde edilecekler kadar gerçek değerler olmasa da, R değerleri konusunda bir ön fikir verebilir.

AOAC International, 'eş/emsal tarafından doğrulanmış' metotları tanımaktadır ve 'eş/emsal tarafından doğrulanmış' metotların nasıl yürütüleceği konusunda bir protokol yayınlamış ve buna uygun hazırlanan metotları resmi olarak 'eş/emsal tarafından doğrulanmış' kapsamına almaktadır.

3.1.3 LABORATUVARLAR ARASI VALİDASYON

Laboratuvarlar arası validasyon için en az 8 farklı laboratuvarın katılımı gerekir. Bu normal şartlarda sonuç bildirmeyecekler ve değerlendirme dışı bırakılacak sonuçlar dikkate alındığında 12 laboratuvarın katılımı anlamına gelir. Çalışmanın organizatörleri tarafından homojen oldukları kanıtlanmış ikişer kör numune

katılımcılara dağıtılır. Normal şartlarda geri kazanım çalışması için kullanılmak üzere boş numuneler ve en az 3 farklı konsantrasyonda ikişer adet numune katılımcılara gönderilir. Çoğunlukla, 'gerçek hayat' şartlarını göstermeleri ve analit ile numune ortamı arasındaki etkileşimden kaynaklanan ekstraksiyon problemlerini ortaya koymaları nedeniyle, doğal kontamine numuneler tercih edilir. Tam bir laboratuvarlar arası validasyon koordinasyonu pahalı, organizasyonu çoğunlukla bir yıla varan süreler alan uzun bir çalışmadır. Laboratuvarlar arası validasyonun nasıl yapılacağını, verilerin istatistiksel analizinin ne şekilde olacağını düzenleyen protokoller ISO, IUPAC ve AOAC International (IUPAC, 1995) tarafından yayınlanmıştır.

Bir metodun kesinliği, tekrarlanabilirlik (r) ve tekrarüretilebilirlik (R) terimleri cinsinden ifade edilir. Tekrarlanabilirlik (r) tek bir analistin aynı laboratuvarda farklı günlerde aynı sonucu elde edebilmesi ve hem tek laboratuvar validasyonundan hem de tam bir validasyon çalışmasından elde edilen kesinliktir. Tekrarüretilebilirlik (R), laboratuvarlar arası validasyondan elde edilen kesinliktir ve sadece tam bir validasyonla belirlenebilir.

Tekrarüretilebilirlik laboratuvarlarının arasındaki farklılıkları yansıtır şöyle ki, ekipmanlar arasındaki farklılıkların tümü sonuca yansiyarak ve bu nedenle R değeri, ki bir çok laboratuvardan elde edilen sonucun ortalaması olacaktır, hiçbir zaman tek bir laboratuvarda elde edilen r değeri kadar iyi olmayacaktır.

3.2 YENİDEN VALİDASYON

Benzer metotlardaki deneyimlerden yola çıkarak ve metod geliştirme süreci araştırılarak her bir metodun çalışma aralığı belirlenmelidir. Bu aralıklar metod validasyonunun sağlamlık sürecinde teyid edilmeli ve metod özelliklerinin bir parçası olmalıdır. Bu çalışma aralıklarının varlığı, metodun yeniden validasyonunun gerekip gerekmediği kararının verilmesini kolaylaştırır. Geliştirildikleri şartlar değiştiği takdirde analitik metotların yeniden validasyonu gerekir. Örneğin, mevcut özel gereksinimlere uyum sağlamak için modifiye edildiği veya cihaz değiştirildiği durumlarda (HPLC'den LC/MS'e geçmek gibi) metodun yeniden validasyonu gerekir. Yeniden validasyon metodun performans özelliklerinin korunduğunu kanıtlamak için yapılır. Yeniden validasyonun kapsamı yapılan değişikliklere göre belirlenir.

BÖLÜM IV

METOT PERFORMANS ÖZELLİKLERİ

Hedeflenen amaca uygun olabilmesi için, metodun belirli performans özelliklerini karşılaması gerekir. Dikkate alınması gereken tipik performans özellikleri: seçicilik (özgüllük), doğrusallık sınırları, doğruluk, kesinlik, gözlenebilirlik sınırı(LOD) ve ölçme sınırıdır(LOQ).

Metodun ne dereceye kadar valide edileceğini uygulama alanı belirler. Aşağıdaki özellikler farklı kategorilerdeki analitik test metodları için önerilmektedir.

Valide edilecek parametre	Tanım	Ana Bileşenler Kantitatif	İz Kalitatif	İz Kantitatif
Özgüllük	Evet	Evet	Evet	Evet
Doğrusallık	Hayır	Evet	Hayır	Evet
Doğruluk	Hayır	Evet	Hayır	Evet
Kesinlik	Hayır	Evet	Hayır	Evet
Aralık	Hayır	*	Hayır	Hayır
LOD	Hayır	Hayır	Evet	Hayır
LOQ	Hayır	Hayır	Hayır	Evet
Sağlamlık/Güçlülük	Evet	Evet	Hayır	Evet

*Testin yapısına bağlı olarak gerekebilir.

4.1 GÖZLENEBİLİRLİK SINIRI (LOD)

Herhangi bir analit için gözlenebilirlik limiti, analit sinyalinin geri plan gürültüden ayrılabilmesi için gereken en az analit miktarıdır. LOD belirlenmesinde esas alınan sinyal-gürültü oranı konusunda farklı görüşler vardır. Ancak, bir pikin LOD'de olabilmesi için sinyal değeri gürültünün 3 katı olması gerektiği konusunda

fikirbirliği mevcuttur. Bu 3:1 oranı her ne kadar varsayımsal bir değer olsa da yaygın olarak kullanılmaktadır.

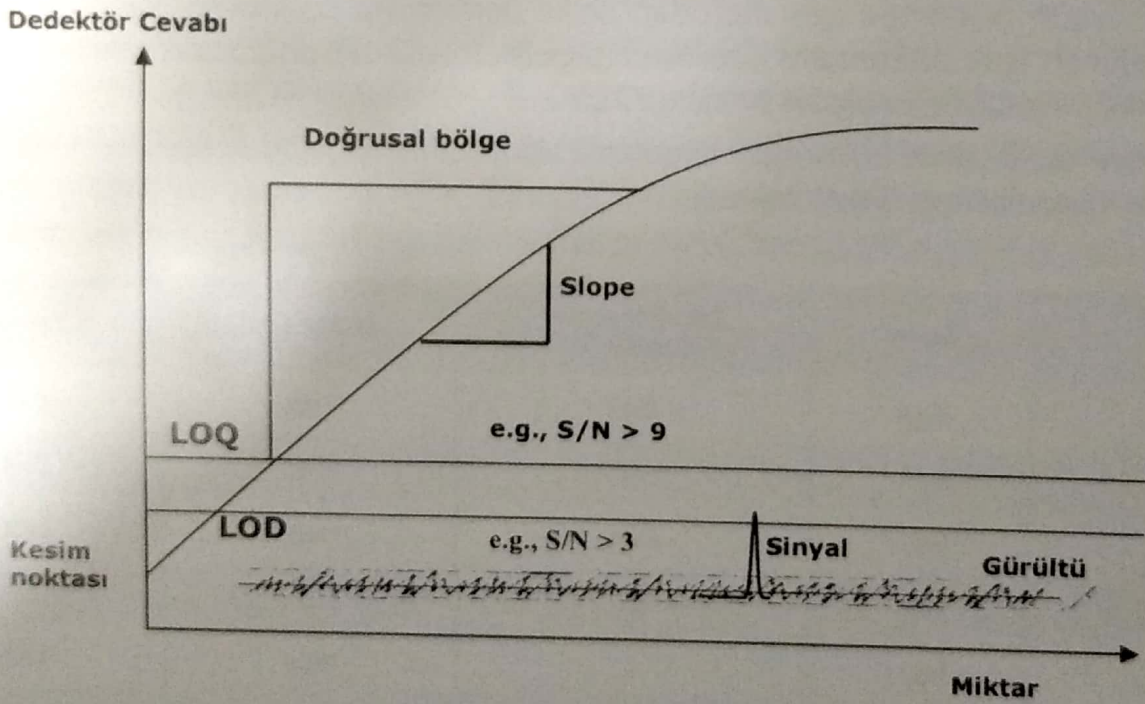
Pratik bir yaklaşımla LOD belirlenmesi için aşağıdaki adımları izlemek yerinde olur:

- Boş numuneleri analiz ederek en yksek hassasiyet seviyesindeki gürültü değerlerinin standart sapmasını hesaplayın. Elektronik gürültülerin (sivri pik) olduğu durumlarda bunların gürültü hesabına dahil edilmemeleri konusunda pragmatik bir yaklaşım gerekebilir.
- Gürültünün standart sapması 2 veya 3 ile çarpılarak LOD'nin sayısal değeri belirlenir.
- LOD'nin teyid edilmesi için belirlenen düzeyde bir standardın hazırlanarak analizi iyi bir yaklaşım olacaktır.

Bunun ardından LOD, kör numuneye LOD düzeyinde veya buna yakın düzeyde uygun sayıda katım yapılarak teyid edilmelidir.

4.2 BELİRLENEBİLİRLİK SINIRI (LOQ)

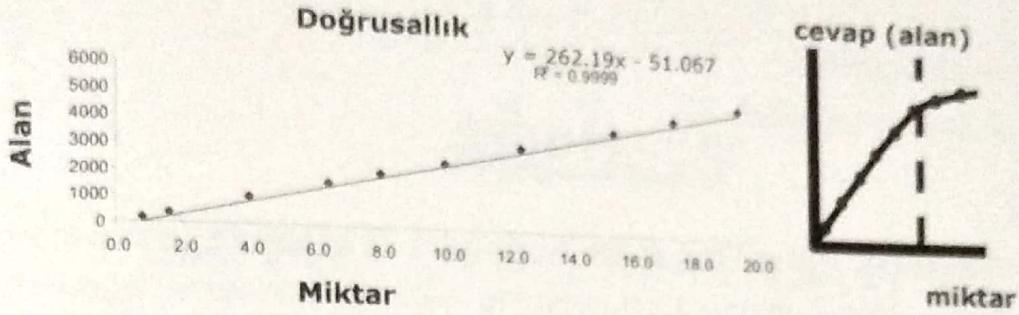
Bir analitin LOQ'su o analitin güvenilir bir şekilde doğru ölçümünün yapılabilmesi için gerekli en düşük miktardır. LOD'ye benzer bir şekilde genel kabul gören yaklaşım, LOQ'nun 9:1 sinyal-gürültü oranı veren en düşük dedektör cevabı olarak belirlenmesidir. Bu nedenle LOQ, LOD'nin 3 katı olarak kabul edilir.



Şekil 1. LOD&LOQ'nun grafik gösterimi

4.3 DOĞRUSALLIK

Bir analitik prosedürün doğrusallığı (belirli sınırlar içerisinde) ölçülen analitin konsantrasyonu (miktar) ile dedektör cevabının ne derece doğru orantılı olduğu ile belirlenir. Diğer bir deyişle, bir metodun doğrudan veya bir matematiksel formül üzerinden analit konsantrasyonuna oranla sonuç verebilirliğidir. En basit uygulanabilir regresyon eşitliği kullanılabilir.



Şekil 2. Düzeltme faktörü kullanılmış doğrusallık eğrisi

Kalibrasyon eğrisi oluşturulurken bazı faktörler dikkate alınmalıdır;

- Sıfırdan büyük 7 standarttan en az 5'i LOQ'dan büyük ve en yüksek konsantrasyon dahil olmak üzere, yukarıdaki kritere uymalıdır.
- Bir kalibrasyon eğrisi oluşturulurken kalibrasyon standartları hedeflenen ölçüm aralığını içine almalıdır.
- En az 0.95 düzeyinde bir düzeltme faktörü elde edilebilmelidir.

4.4 KESİNLİK

Bir analitik prosedürün kesinliği, önceden tanımlanmış şartlarda birden çok kez alt numuneleri alınan homojen bir numuneden yapılan ölçümlerin birbirleriyle uyumudur (dağılım oranı). Kesinlik, istatistiksel olarak yeterli sayıda (ör. ≥ 10) numuneden elde edilen ölçümlerin bağıl standart sapmalarının yüzdeleridir (%RSD).

Kesinlik normal olarak tekrarlanabilirlik (r) ve tekrar üretilebilirlik (R) olarak belirlenir.

• Tekrarlanabilirlik, r

Kısa bir zaman aralığında aynı uygulama şartları altındaki kesinliği ifade eder. Bu nedenle;

- Aynı analist
- Aynı ekipman
- Tekrar analizler arasında yakın zaman aralıkları
- Aynı kimyasallar

– Aynı laboratuvar, vs.

kullanılarak yapılan ölçümlerin kesinliğidir.

• **Tekrar üretilebilirlik, R**

Laboratuvarlar arası kesinliği ifade eder. Bu nedenle;

- Farklı analist
- Farklı laboratuvar
- Farklı ekipman
- Farklı kimyasal kaynağı (\neq üretici)

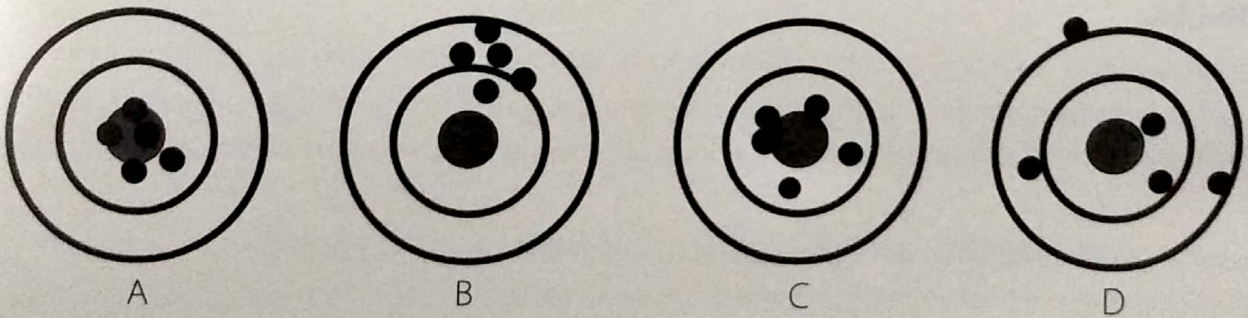
kullanılarak yapılan ölçümlerin kesinliğidir.

4.5 DOĞRULUK

Bir analitik metodun doğruluğu ölçülen değer (konsantrasyon) ile gerçek değer (bilinen değer) arasındaki farkın güven aralıkları olarak rapor edilir. Doğruluk genellikle, bilinen değer (gerçek değer) ile ölçülen değer (ortalama değer) arasındaki farkın güven aralıkları olarak rapor edilir. Ancak, bilinmelidir ki, katım yapılmış bir numune ile doğal kontamine numune aynı şey demek değildir. Doğruluğun ideal ölçümü elde edilen ölçüm ile sertifikalı referans materyalin (CRM) değerinin karşılaştırılması ile yapılır, ancak bu materyalleri bulabilmek çoğu kez mümkün olmaz.

Bir analitin geri kazanım oranı, o analitten numune ortamına eklenen miktarın ortaya çıkardığı dedektör cevabının saf orjinal standardın cevabına oranıdır. Geri kazanım bir analitik metodun ekstraksiyon verimliliğini ölçerken, belirli limitler içerisindeki sapmalar dikkate alınarak, numune saflaştırma sırasında ortaya çıkan kayıpları gösterir.

% geri kazanım $\frac{\text{ölçülen değer}}{\text{teorik değer}} \times 100$ olarak ifade edilir.



- A- Doğruluk iyi, kesinlik iyi
B- Doğruluk kötü, kesinlik iyi
C- Doğruluk iyi, kesinlik kötü
D- Doğruluk ve kesinlik kötü

Şekil 3. Şematik olarak doğruluk ve kesinliğin ilişkisi.

BÖLÜM V

METOT DÖKÜMATASYONU

Metotlar içerisinde validasyon verilerinde bulunmasının beklendiği, 'Standart Operasyon Prodesürü' (SOP) olarak dökümante edilmelidirler. SOP aşağıdaki bilgileri içermelidir;

- Metodun amacı ve kapsamı (uygulanabilirlik)
- Numune ortamının türü
- Metot parametreleri ile, numune hazırlanmasını da kapsayacak şekilde, deneyin nasıl gerçekleştirildiğinin detaylı açıklaması.
- Belirsizliği de içeren validasyon verisi.
- Materyallerin, reagentların, referans standartların ve kalite kontrol standartlarının ayrıntıları.
- Ekipman (ekipman listesi, fonksiyonları ve performans gereklilikleri)
- Sorumlu kişiler (metodu geliştiren ve ilk validasyonu yapan kişi)
- İstatistiksel prosedürler ve örnek hesaplamalar
- Tipik grafikler, ör. kromatogramlar, spektrumlar ve kalibrasyon eğrileri
- Metot kabuledilebilirlik performans limitleri ve sonuç ölçümü belirsizlikleri
- Özet ve sonuçlar

BÖLÜM VI

TANIMLAR VE TERMİNOLOJİ

Analit: Tanımlanması hedeflenen bileşen.

Kabuledilebilirlik kriteri: Sayısal limit, aralık ve analitik prosedür sonuçlarının kabuledilebilirlik ölçütlerini gösterir ölçüm sonuçları.

Analitik Kalite Güvence(AKG) Örnekleri: 'Kör numuneler', Katım için boş numuneler, kontrol numuneleri ve sertifikalı referans materyalleri gibi her bir numune partisinde tüm aşamaların tatmin edidici şekilde çalıştığını güvence altına almakta kullanılan numuneler.

Parti: Tek bir aşamada analiz edilen numune grubu. Numuneler çoğunlukla içlerinde, işlemlerin doğru yürüdüğünü kontrol amacıyla kullanılan, boş numunelerin ve katım yapılmış geri kazanım numunelerinin de (AKG numuneleri) bulunduğu partiler halinde analiz edilirler.

Kör Numune: Özellikleri ve içeriği numuneyi veren kişi tarafından bilinip, analist tarafından bilinmeyen numuneler. Kör numuneler çoğunlukla laboratuvar performansını kontrol etme amacıyla kullanılırlar. Örneğin yeterlilik testleri.

Doğruluk: Analitik sonuçtan beklenen ile kabul edilen referans değer arasındaki fark.

Kalibrasyon: Belirli şartlar altında, bir ölçüm cihazı tarafından belirlenen analitteki değerler (konsantrasyonlar) ile bunlara tekabül eden bilinen değerler (konsantrasyonlar) arasındaki ilişkinin esaslarını ortaya koyan operasyonlar bütünü.

Sertifikalı Referans Materyaller (CRM): Bir veya daha çok değeri teknik açıdan geçerli bir prosedür ile belirlenip, sertifikalandırma yetkisine sahip bir kuruluş tarafından verilen bir sertifika ve doküman ile beraber sunulan referans materyal.

Numune Ortamı: İlgilenilen analiti içeren gıda madesi, toprak, hava veya kan gibi bir materyal veya substrat.

Metot: Metot, belirli bir analiti analiz etmekte izlenecek yolu tanımlayan prosedür. Metot bir numune analizini yaparken düzenli olarak sıralanmış atılacak adımlardan oluşur.

Gürültü: Başkaca bir sinyalin olmadığı durumlarda dedektörden gelen en fazla ve en az cevaplar arasındaki fark.

Referans standart: Bir enstrümanı kalibre etmekte kullanılan madde. Referans standart mümkün olan en yüksek saflıkta olmalı veya en azından bilinen saflıkta olup izlenebilir olmalıdır.

Boş ajanlar: Ajanlar analitik yöntem sırasında kullanılan (ekstraksiyon veya seyreltme için kullanılanlar da dahil) ve ölçüm sinyaline etkileri olup olmadığı analiz edilen maddelerdir.

Boş numune: Bu numune, analiz edildiğinde, ortamda bulunabilecek araya giren bileşenler hakkında gerçekçi bir tahmin yapmaya yardımcı olacak şekilde, analit içermediği bilinen numunedir.

Özgüllük: Bulunması muhtemel diğer bileşenlerin varlığında, istenilen analiti açık bir şekilde gözlemleyebilme yeteneğidir. Genellikle bu durum safsızlıkları, parçalanma ürünlerini, ortam bileşenlerini vb içerir.

Seçicilik: Bu terim birden fazla analite karşı duyarlı metotlarda kullanılır. Bir analitik metot, girişim yapan başkaca bileşenlerin varlığı ve bilinen yan ürünlerin bulunduğu durumlarda da o analiti ayırt edebiliyorsa ona seçici denir.

Hassasiyet: Teşhis edilebilen veya ölçülebilen en az analit miktarı. Genellikle LOD veya LOQ olarak ifade edilir.

Katım: Bir analitik metodun performansını (LOD veya geri kazanım) teyid etme amacıyla bir boş numune veya numuneye az ve bilinen miktarda hedef analiti eklemek.

Stok çözelti: Kalibrasyon standartlarını hazırlama amacıyla bir prosedür çerçevesinde hazırlanan ve doğrulanmış analit(ler) veya ajan(lar).

Sinyal: Bir analitin dedektörde oluşturduğu tepki. (Genellikle pik şeklinde)

Sinyal-gürültü oranı (S/N): Dedektörün analite karşı cevabının ortalama geri plan cevabına (gürültü) oranı.

İç Standart: Bir analitik prosedürün başlangıcında kullanılan ve geri kazanım için iç bir ölçüm vermeye yarayan analit ile benzer özelliklere sahip belirli miktarda bileşen. Analite karşı dedektör tepkisinin iç standartta oranı geri kazanım kayıplarını düzeltme hesabında kullanılabilir.

Dış standart: Bir dizi standart çözelti analiz edilerek kalibrasyon eğrisi oluşturulur. Bu eğrinin doğrusal bölümü bilinmeyen numune miktarını ölçmekte kullanılır.

Sağlamlık/güçlülük: Bir analitik prosedürün Sağlamlık/güçlülüğü metod parametrelerinde yapılan küçük ancak belirgin sapmalardan etkilenmemeye derecesidir. Güçlülük normal kullanım sırasında analitik metodtaki kritik noktaların belirlenmesinde ölçüt olarak kullanılır. Metod geliştirilirken akış hızı, pH, sıcaklık, kolon partisi gibi sonucu etkileyen parametreler dökümanite edilir. Sonuç üzerinde etkisi olmayan sınırlar sağlamlık sınırı olarak adlandırılır.

Kalite güvence (QA): Belirli güven aralığında bir ürün veya hizmetin belirlenen kalite standartlarına uygun olmasını garanti eden entegre faaliyet sistemleridir.

Spike : standart eklenme

BÖLÜM VII

SIKÇA SORULAN SORULAR

Metot validasyonu nedir?

Belirli bir test için kullanılan analitik prosedürün kullanım amacına uygun olduğunu doğrulamak için kullanılan bir dizi metod karakteristiğini ortaya koymaya yarayan işlemler bütünüdür.

Validasyon veya tekrar validasyon neden (ve ne zaman) gereklidir?

- Rutin kullanıma sunulmadan önce
- ISO17025 akreditasyonu için
- Metodun valide edildiği şartlar değiştiğinde. Örneğin; farklı özelliklere sahip bir cihaz kullanılmaya başlandığında
- Metot değiştiğinde ve bu değişim metodun orjinal kapsamı dışına çıktığında metodun valide veya yeniden valide edilmesi gerekir.

Eğer bir metot laboratuvarlar arası valide edilmiş (geçerli kılınmış) ise ne yapmak gerekir?

İdeal şartlarda metot bu konuda uzman bir kişi tarafından analiste tanıtılır. Analist daha sonra metodu yakın gözetim altında, referans materyaller kullanarak ve geri kazanım gibi çalışmalar yaparak uygular. Analist metotta belirtilen performans düzeylerini yakaladığını gösterebilmek zorundadır. Bu durumda akreditasyon amacı için bir kişinin bu metodu 'valide ettiği' söylenebilir. Bu yöntem bir kişinin yeni bir metod için eğitiminde de geçerlidir.

Başka birinin valide ettiği metodu uyarlamak veya değiştirmek gerektiğinde metodun yeniden valide edilmesi gerekir. Yapılan değişikliklerin kapsamına bağlı olarak orjinal validasyon verileri geçerliliklerini yitirebilirler.

Yeterlilik testleri ve metot validasyonu arasındaki bağlantı nedir?

Bir analistin veya bir laboratuvarın belirli bir alandaki performansını belirlemede yeterlilik testleri ön plana çıkarlar. Bir yeterlilik testindeki tek ölçüt laboratuvarın doğruluğudur ki bu genelde laboratuvar doğruluğunun standart sapma hedef değerine bölünmesiyle elde edilen z-skoru olarak gösterilir. Bu bilgi tek başına amaca uygunluk ölçütü olmakta yetersiz kalabilir.

Metot validasyonu ve akreditasyon arasındaki ilişki nedir?

Metot validasyonu bir analitik metodun, doğru bir şekilde uygulandığı varsayıldığında, amaca uygun sonuçlar üreteceğine dair kanıtlar üreten sürece verilen addır. Bir metot başka bir yerde ne kadar iyi performans verirse versin, bir analist metodun kendi laboratuvarında da geçerli olduğunu kanıtlamak durumundadır. ISO/IEC 17025 akreditasyon standartlarında validasyon üzerinde büyük önemle durulmaktadır.

Metot validasyonu için Ölçüm Belirsizliği'ni hesaplamak zorunda mıyım?

Ölçüm belirsizliği bir analitik ölçüm yapılırken metodun kendinden kaynaklananlar da dahil olmak üzere tüm hata kaynaklarını hesaba katar. Her ne kadar ISO/IEC 17025 akreditasyonu için ölçüm belirsizliğini rapor etmek zorunlu olsa da, bu metot validasyonundan çıkartılamayabilir ve validasyon prosedürünün de zorunlu bir parçası değildir.

Laboratuvar içi metot validasyonu gerçekleştirmek kaç gün sürer?

Laboratuvar içi validasyon için gerekli süre konusunda tek bir yanıt olmayıp, bu metodun karmaşıklığı ve analistin deneyimi gibi çok sayıda öznel koşula göre değişim gösterir. İdeal şartlarda laboratuvar içi validasyon bir hafta içerisinde bitirilebilirse de, çözümü gereken problemlerin ortaya çıkabileceği varsayıldığında 2-3 hafta daha mantıklı bir tahmin olacaktır.

Eğer farklı performans karakterlerine sahip valide edilmiş bir metodla başka bir metodu değiştirmek istesem, bu kabul edilir mi?

AB ve Codex tarafında önerilen tek bir 'resmi metot' kavramı kriter yaklaşımıyla değiştirilmiştir. Bu yaklaşımın anlamı herhangi bir metodun minimum kriterleri karşılması durumunda resmi amaçla kullanılabilirliğidir. Genellikle belirli konsantrasyon aralıklarında RSDr, RSDR, LOD değerleri ve geri kazanım aralıkları resmi amaçla kullanılacak metotların kabul kriterleri olarak verilmiştir.

Metot validasyonu için herhangi bir AB düzenlemesi var mı?

AB kontrol laboratuvarlarının valide metot kullanmasını zorunlu kılar. Bu validasyon da IUPAC/AOAC/ISO gibi uluslararası kuruluşların ortak kabul ettiği laboratuvarlar arası çalışma parametrelerini belirleyen prosedürler (IUPAC, 1995) veya IUPAC/AOAC tarafından ortaya konmuş tek laboratuvar validasyonu kurallarına (IUPAC, 2002) göre yapılır.

Validasyon SOP'si nedir?

- Bir laboratuvarda;
- Hangi metodun validasyon gerektirdiğini
- Kimin validasyonu gerçekleştirmekten sorumlu olduğunu

- Farklı metotlar için ne kadar validasyon gerektiğini
- Validasyonun nasıl dökümanite edileceğini gösteren döküman ve yaklaşımlardır.

SOP'ye neden gerek vardır?

SOP bir metodun laboratuvarında nasıl uygulanacağını gösteren detaylı bir dökümandır. Operatörler ve projeler arasındaki uyumu sağlar. Detaylı bir SOP tüm analitik metotlar için planlamanız, uygulamanız, raporlamanız ve validasyon çalışmalarını onaylamanız için gereken her şeyi içerir.

Validasyon sonuçlarının ne kadar iyi olması gerekir? (validasyon Ölçütleri)

- Validasyona başlamadan önce kabul edilebilirlik kriterlerinizi belirleyin.
- Kabul edilebilirlik kriterleri diğer validasyon çalışmalarından elde edilen benzer metodların performansına dayanmalıdır. Onlarca yıllık kolaboratif çalışma verisi (Horwitz, 1982; Thompson, 2000) Horwitz trompet eğrisi denilen bir eğriye işlenmiştir. Bir validasyon çalışmasından HORRAT oranı çıkartılır ve eğer bu oran 2.0'dan küçükse (Horwitz eğrisindeki kabul edilebilirlik sınırı) çalışmanın performans karakterleri tatmin edici olarak kabul edilir.

Örnekler

- Doğrusallık-standart eğrileri, değeri ≥ 0.99 olan düzeltme faktörlerine sahip olacak ve y-eksenini kesim noktası hedef cevabın %2'sinden daha fazla bir sapma göstermeyecektir.
- Tekrarlanabilirliğin kesinliği-test sonuçları için elde edilen $RSD \leq \%2$ olacaktır.

REFERANSLAR

- Horwitz, W., (1982) Analytical Chemistry, 54, 67A-76A.
- IUPAC. 1995, Protocol for the design, conduct and interpretation of method performance studies. Pure and Applied Chemistry, 67, 331-343.
- IUPAC. 2002, harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. Pure and Applied Chemistry, 74, 835-855.
- Thompson, M., (2000), Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing. Analyst, 125, 385-386.
- Senyuva, H., & Gilbert, J., (2005), Immunoaffinity Column Clean-up with Liquid Chromatography using Post column Bromination for the Determination of Aflatoxins in Hazelnut Paste: Collaborative Study Journal of AOAC International, 88, 526-535.

EKLER

METOT VALİDASYONUNA BAŞLANGIÇ

1.0. ALTYAPI

İyi eğitilmiş ve yetenekli Laboratuvar personeline "iyi bilim" uygulayabilmeleri için gerekli alan sağlanmalı ve metot geliştirme ve iyileştirme konularında hareket serbestiliği tanınmalıdır. Ancak, "iyi bilim" tanımı- laması kişiye göre farklı anlamlar taşır ki, bu da geliştirilen metotların sağlamlığı konusunda büyük farklı- lıklara yol açar. Metot geliştirmeden sonraki adımın validasyon olması nedeniyle, validasyon protokolü, önerilen metodun deneysel tasarım ve işlerlik olarak güvenilir olmasında büyük rol oynar. Validasyona başlanmadan önce metodun karşılaması gereken bir takım kriterler bulunmaktadır.

Bu kriterler:

- Seçiciliğin daha önceden, metot geliştirme sırasında, kanıtlanmış veya ölçülmüş ve doküman- te edilmiş olması gerekmektedir.
- Metodun, validasyon için üzerinde zaman ve emek harcamayı mantıklı kılacak dereceye kadar gelişmiş ve optimize edilmiş olması gerekir. Aslında, sağlamlık araştırılması gereken ilk kriterdir.
- Metot validasyonu ile ilgili subjektifliğin ortadan kaldırılması için, veriler ortaya çıktığında istatistiksel geçerliliği olan bir yol izlenerek değerlendirilmeli ve karara varılmalıdır.

1.1. DURUM ÇALIŞMASI

Metot Başlığı: Sıvı Kromatografi ile İmmünoafinite Kolonu Temizlemesi ve Kolon Sonrası Bromlama Yön- temiyle Fındık Füresinde Aflatoksinlerin Belirlenmesi: Laboratuvar İçi ve Laboratuvarlararası validasyon

Analit: Aflatoksinler

Numune Ortamı: Fındık Füresi

Validasyon türü:

- Laboratuvar içi
- Laboratuvarlararası

1.2. METODUN TANIMI

Metodun prensibi Aflatoksinlerin fındıktan sulu metanol çözeltisi ile karıştırarak ekstrakte edilmesi ve katı maddelerden arındırılmış bir ekstrakt için filtre edilmesidir. Ekstrakt immünoafinite kolondan geçirilmesi ve kolonun yıkanmasını takiben Aflatoksinler kolondan saflaştırılmış bir halde metanol ile toplanır. Analizi ölçüm floresan dedektörü ve kolon sonrası türevlendirme kullanılarak ters faz HPLC ile yapılır.

1.3. METOT OPTİMİZASYONU

1.3.1. EKSTRAKSİYON ŞARTLARI

Başlangıçta, büyük ölçüde benzerlik gösteren yerfıstığı ezmesi ve antepfıstığı ezmesi ekstraksiyon çözücü olan metanol-su (8 + 2) ilave olarak hekzan kullandı. İlk bulgular, fındığın yerfıstığı ezmesine göre daha az yağ içermesinden dolayı, hekzan kullanımının bir yarar sağlamadığını gösterdi. Optimun ekstraksiyon (doğal kontamine numunelerde tekrar ekstraksiyonlarda en fazla pik alanını veren) metanol-su (6 + 4) ile elde edildi. Sonuç olarak bu çözelti oranı metod için kabul edildi.

1.3.2. TESBİT ŞARTLARI

'AOAC Final Action' Metodu yerfıstığı ezmesi, antepfıstığı ezmesi, kuru incir ve kırmızı biberde Aflatoksin için $\lambda = 360$ eksidasyon ve $\lambda = 420$ nm emisyon düzeyinde floresan dedektörü öngörmektedir. Tarayıcı floresan dedektörleri sıvı kromatografide her bir pik için ideal dalga boylarının kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Bu nedenle metotda G1'den hemen sonra değişmek üzere 362nm eksidasyon ve B1 ve B2 için 425nm ve G1 ve G2 için 455nm emisyon dalga boyu kullanılmıştır. Bu yaklaşım tek ve sabit dalga boyuna oranla G1 ve B1'de yaklaşık %30 büyüme sağlamıştır. Her ne kadar yürürlükteki AB kanunları bu tür bir ilerlemeyi gerektirmese de özellikle bebek mamalarında gelecekte yürürlüğe girmesi beklenen 0.1ng/g'lık yeni limit için dalga boyu değişiminin önemli avantajlar sunacağı beklenmektedir.

1.4. METODUN SAĞLAMLIĞI

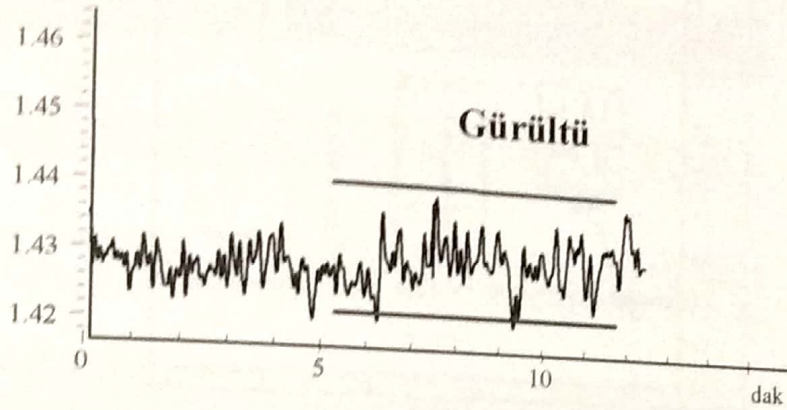
Sağlamlık metot optimizasyonu sırasında sıcaklık değişimi, pH, akış hızı ve çözücü kompozisyonu gibi faktörlerdeki küçük değişimlerin geri kazanım ve LOD üzerinde ne derece etkili olduğunun testidir. Bu faktörlerden bazıları seçilerek sağlamlığın göstergesi olarak laboratuvarında test edilmelidir.

2.0.LABORATUVAR İÇİ VALİDASYON

2.1. GÖZLENEBİLİRLİK LIMITİ (LOD)

LOD'nin belirlenmesine pratik yaklaşım:

1-Boş numunede Standart Sapmanın Hesaplanması



Şekil 1. Tipik bir aflatoksin kromotogramı. İmmünoafinite kolon temizliği uygulanmış boş bir fındık numunesi (<0.1 ng/g toplam aflatoksin)

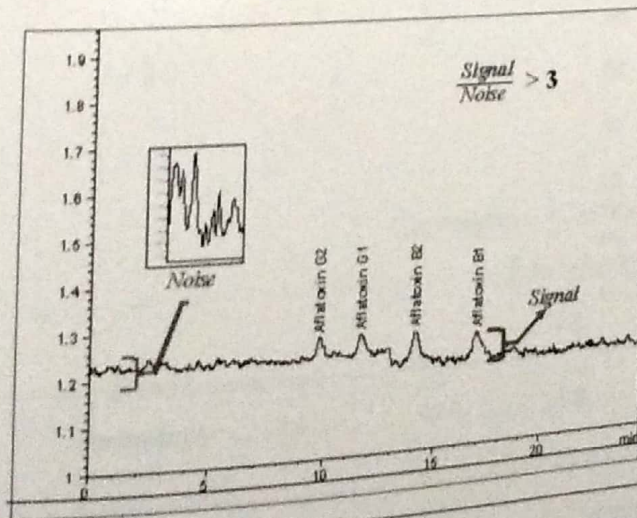
Boş numunenin 10 kez analizinden elde edilen gürültüden standart sapma hesaplandı. Gürültünün standart sapması 0.031'di.

$$LOD = SD \times 3$$

Bu nedenle LOD 0.09ng/g olarak bulundu. Bu daha sonra eklenmiş bir numune ekstraktı enjekte edilerek test edildi.

2- Eklenmiş Numunede Sinyal-Gürültü Oranının Hesaplanması

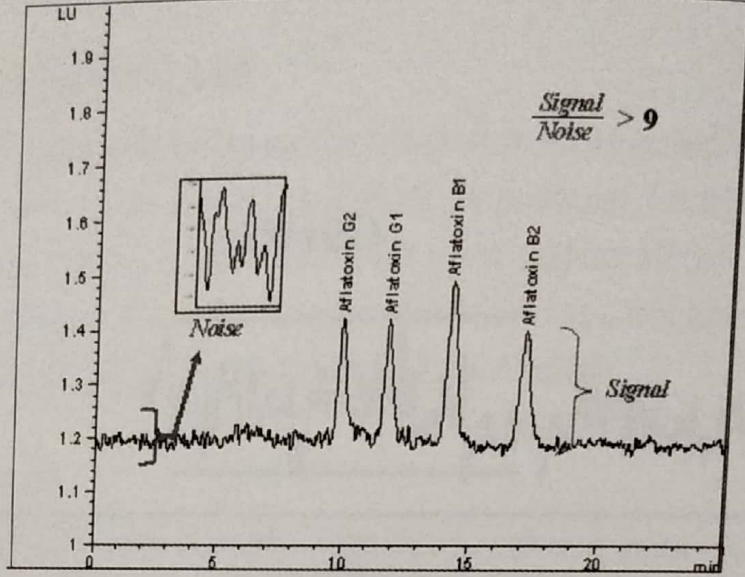
Bir fındık numunesi 0.1 ng/g aflatoksin B1 eklenerek sinyal-gürültü oranı ölçüldü. Şekil 2 sinyal-gürültü oranının 3 olduğu kirletilmiş fındık numunesinden elde edilen bir kromotogramı göstermektedir.



Şekil 2. Tipik bir aflatoksin kromotogramı. 0.1 ng/g aflatoksin B1 seviyesinde kirletilmiş fındık.

2.2 BELİRLENEBİLİRLİK SINIRI (LOQ)

LOQ 9:1 sinyal-gürültü oranı verecek dedektör tepkisidir. Gürültünün standart sapmasının 0.031 olduğu bilindiği için teorik olarak LOQ 0.27ng/g olarak belirlenir. Bu teorinin 0.27ng/g düzeyinde eklenecek numunenin analiziyle test edilmesinden elde edilen kromotogram Şekil 3'de dir ve sinyal-gürültü oranı 9'dur.

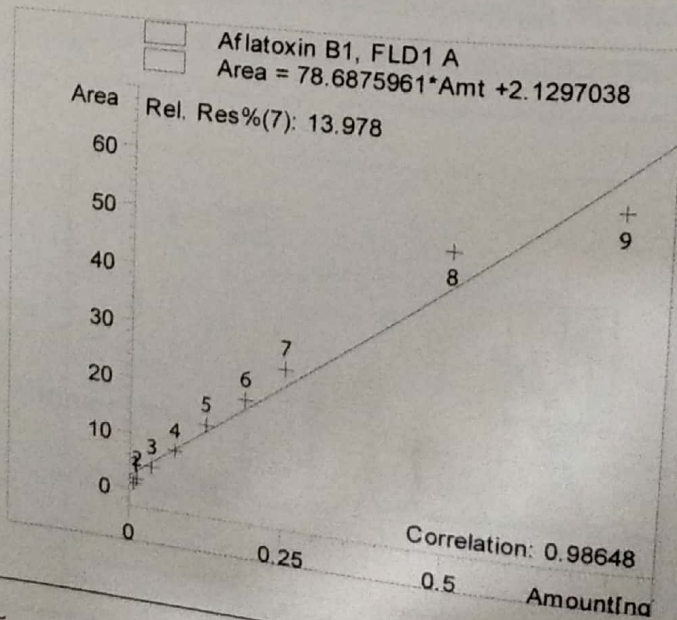


Şekil 3. Tipik aflatoksin kromotogramı. 0.27ng/g aflatoksin B1 ile kirletilmiş fındık.

2.3 DOĞRUSALLIK

Doğrusallık 7 farklı konsantrasyonda aflatoksin standart çözeltisi analiz edilerek belirlenmiştir. 7 konsantrasyonun her biri ikişer kez analiz edilmiştir. Buna karşılık gelen doğrusal regrasyon analiz eşitliği kullanılarak bir grafik oluşturulmuştur.

Aflatoksin B1 için kalibrasyon eğrisi ve denklemi aşağıda gösterilmiştir.



Şekil 4. Aflatoksin B1'in doğrusallığı

Grafiklerden doğrusallığın en az 5.0ng/ml konsantrasyona kadar sürdüğü anlaşılmıştır. Yukardaki eşitlikte belirtilen korelasyon katsayısı, metodun doğrusallığının çok iyi olduğunu göstermektedir.

Kalibrasyon Eğrisi

Kalibrasyon eğrisi oluşturulurken karşılanması gereken bazı faktörler vardır:

- En az yedi sıfırdan büyük standardın beşi yukarıdaki kritere uymalıdır. Buna LOQdaki ve en yüksek konsantrasyondaki standart da dahildir.
- Kalibrasyon eğrisi oluşturulurken kullanılan aralığın hedeflenen ölçüm aralığını kapsamaması gerekir.

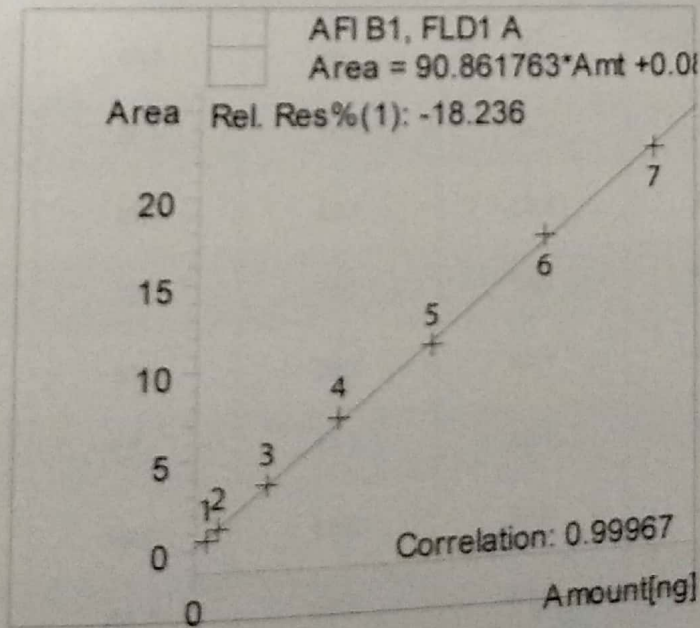
Seviye	Aflatoxin B1 Kons. (ng/ml)
1	0.075*
2	0.125*
3	0.375
4	0.750
5	1.250
6	1.875
7	2.500

Aflatoxin B1

$$Y = 90.86 \times \text{Amt} + 0.55$$

$$R^2 = 0.99967$$

* LOQ'dan küçük



2.4. KESİNLİK

Kesinlik istatistiksel olarak yeterli sayıda numuneden elde edilen bağıl standart sapmanın %si olarak ifade edilir (%RSD),

• Tekrarlanabilirlik, r

Tekrarlanabilirlik her biri;

- Boş solvent
- İki paralel boş matriks
- 10 düşük seviyede doğal kontamine numune
- 10 yüksek seviyede doğal kontamine numune
- Kalite kontrol numunesi

içeren üç parti fındık füresi numunesi kullanılarak ölçülen kesinliktir.

Tablo 1. Parti içi ve partiler arası kesinlik değerlerini gösterir.

Numune No.	Düşük Seviye			Yüksek Seviye		
	Parti-1	Parti-2	Parti-3	Parti-1	Parti-2	Parti-3
1	1,47	1,50	1,48	4,72	4,74	4,68
2	1,47	1,59	1,62	4,80	4,68	4,78
3	1,49	1,61	1,58	4,66	4,69	4,69
4	1,62	1,58	1,55	4,75	4,64	4,74
5	1,59	1,62	1,51	4,68	4,72	4,72
6	1,61	1,62	1,62	4,76	4,71	4,79
7	1,61	1,60	1,60	4,90	4,80	4,88
8	1,49	1,63	1,52	4,76	4,79	4,69
9	1,58	1,62	1,61	4,81	4,73	4,80
10	1,59	1,58	1,60	4,86	4,82	4,83
ortalama	1,55	1,60	1,57	4,77	4,73	4,76
s	0,06	0,04	0,05	0,08	0,06	0,04
%RSD	3.87	2.50	3.18	1.68	1.27	4.22

2.5 DOĞRULUK

Bir çok durumda ulaşılmaması çok zor olmasına rağmen, accuracy ölçmenin ideal yolu Sertifikalı Referans Materyel kullanmaktır. Bu nedenle validasyon çalışmasında yeterlilik testlerinden elde edilen test materyel kullanıldı (FAPAS T0454).

Tablo 2. Üç günlük bir periyotta her parti içerisinde analiz edilen kontrol numuneleri.

Numune No FAPAS 0454	Aflatoksin B1 ng/g bulunan	Toplam Aflatoksin ng/g bulunan
Parti 1 Düşük Düzey -1	2.91	8.04
Parti 2 Düşük Düzey -2	3.04	8.17
Parti 3 Düşük Düzey -3	3.07	8.00
Parti 1 Yüksek Düzey -1	2.88	8.11
Parti 2 Yüksek Düzey -2	3.18	7.97
Parti 3 Yüksek Düzey -3	3.01	8.01

Fapas T0454

Verilen değer :

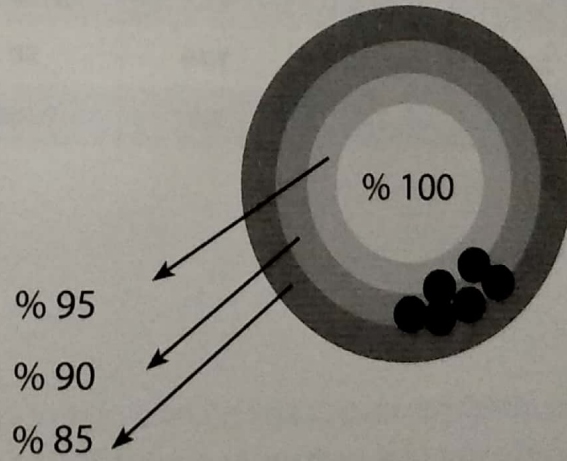
Aflatoksin B1 : 3.30

Toplam Aflatoksin : 8.92

Kabuledilir aralık

Aflatoksin B1 : 1.85- 4.75

Toplam Aflatoksin : 4.99- 12.84



2.6 GERİ KAZANIM

Her biri 1 ve 2.5ng/g Aflatoksin B1 düzeyinde on ilave edilmiş, iki boş ve bir üç fındık füresi partisi analiz edildi. Üç parti üç günlük bir dönemde analiz

Tablo 3. parti içi ve partiler arası geri kazanım değerlerini gösterir.

1 ng/g Aflatoksin B1 % Geri Kazanım				2.5 ng/g Aflatoksin B1 %	
Numune No.	Parti 1	Parti 2	Parti 3	Numune No.	Parti 1
1	86	89	87	1	88
2	86	88	84	2	87
3	87	86	89	3	88
4	89	89	88	4	86
5	89	83	86	5	90
6	88	85	85	6	88
7	86	88	89	7	84
8	81	84	86	8	85
9	86	86	89	9	91
10	89	85	88	10	89
Ortalama	86.7	86.3	87.1	Ortalama	87.6
SD	2.41	2.11	1.79	SD	2.13
%RSD	2.7	2.4	2.0	%RSD	2.4

SONUÇLAR

Laboratuvar İçi Metot Validasyonunun Performans Karakteristikleri

Tablo 4. Fındık fûresinde Aflatoksin B1 için, laboratuvar içi metod validasyonu datası

Konsantrasyon (ng/g)	Validation Recovery				
	Parti İçi		Tekrar adedi	Partiler Arası	
	Geri Kazanı (%)	RSD (%)		RSD (%)	Tekrar adedi
Aflatoksin B1					
1.0	86.7	2.4-2.7	10		
2.5	87.7	2.4-2.6	10	2.4	3
Total Aflatoksin				2.5	3
4.0	87.0	1.6-2.5	10		
10.0	87.6	2.4-2.6	10	1.9	3
				2.6	3

LOD: 0.10 ng/g (Aflatoksin B1)
LOQ: 0.15 ng/g (Aflatoksin B1)

Laboratuvarlar arası validasyon

- 14 farklı analist
- 14 farklı laboratuvar
- 14 farklı ekipman

• Tekrar üretilebilirlik, r

Aynı test mataryelinden bir analist tarafından mümkün olan en kısa zaman aralığında, aynı ekipman kullanılarak elde edilen iki analiz sonucu arasındaki mutlak farkların en fazla %5'i tekrarlanabilirlik limiti r'nin üzerine çıkacaktır.

Aflatoksin B1: $\bar{x} = 1.4$ ng/g

Toplam Aflatoksin: $\bar{x} = 4.2$ ng/g

Aflatoksin B1: $\bar{x} = 2.3$ ng/g

Toplam Aflatoksin: $\bar{x} = 7.1$ ng/g

Aflatoksin B1: $\bar{x} = 3.8$ ng/g

Toplam Aflatoksin: $\bar{x} = 12.1$ ng/g

r = 0.11 ng/g (doğal kontamine)

r = 0.31 ng/g (doğal kontamine)

r = 0.21 ng/g (doğal kontamine)

r = 0.69 ng/g (doğal kontamine)

r = 0.24 ng/g (doğal kontamine)

r = 0.80 ng/g (doğal kontamine)

• Tekrar üretilebilirlik, R

Aynı numuneden iki farklı laboratuvar tarafından rapor edilen sonuçlar arasındaki mutlak farkların en fazla %5'i tekrar üretilebilirlik limiti R'nin üzerinde olacaktır.

Aflatoksin B1:	$\bar{x} = 1.4$ ng/g	R = 0.28 ng/g (doğal kontamine)
Toplam Aflatoksin:	$\bar{x} = 4.2$ ng/g	R = 0.81 ng/g (doğal kontamine)
Aflatoksin B1:	$\bar{x} = 2.3$ ng/g	R = 0.51 ng/g (doğal kontamine)
Toplam Aflatoksin:	$\bar{x} = 7.1$ ng/g	R = 1.35 ng/g (doğal kontamine)
Aflatoksin B1:	$\bar{x} = 3.8$ ng/g	R = 0.78 ng/g (doğal kontamine)
Toplam Aflatoksin:	$\bar{x} = 12.1$ ng/g	R = 2.08 ng/g (doğal kontamine)

LABORATUVARLAR ARASI METOD VALİDASYONUNUN PERFORMANS KARAKTERİSTİKLERİ

Aşağıdaki variler TÜBİTAK-Ankara Test ve Analiz Laboratuvarı tarafından düzenlenmiş laboratuvarlar arası çalışmanın sonuçlarından derlenmiştir. Çalışmada doğal kontamine ve kirletilmiş (aflatoksin) fındık fidesi numuneleri kullanılmıştır(5).

Fındık	Aflatoksin B1					
	Boş	Spike 1 1 ng/g	Spike 2 2.5ng/g	n.c. Düşük Düzyey	n.c Orta Düzyey	n.c. Yüksek Düzyey
numuneler (n.c. doğal kontamine)						
Çalışmanın yılı	2004					
Laboratuvar sayısı	14					
Dışarıda bırakılan laboratuvarlardan sonraki sayı	14	13	13	13	13	13
Dışarıda bırakılan laboratuvar sayısı	0	1	1	1	1	1
Kabul edilir sonuç sayısı	28	26	26	26	26	26
Ortalama değer (ng/g)	0.01	0.89	2.15	1.4	2.3	3.8
Tekrarlanabilirlik standart sapması (s_p)(ng/g)	-	-	-	0.040	0.074	0.086
Tekrarlanabilirlik bağıl standart sapması (RSDr), %	-	-	-	2.9	3.2	2.2
Tekrarlanabilirlik r ($r = 2.8 \times s_p$)(ng/g)	-	-	-	0.11	0.21	0.24
Tekrar üretilebilirlik standart sapması (s_p)(ng/g)	-	-	-	0.10	0.18	0.28
Tekrar üretilebilirlik bağıl standart sapması (RSDR), %	-	-	-	7.4	7.8	7.3
Tekrar üretilebilirlik limiti R ($R = 2.8 \times s_p$)(ng/g)	-	-	-	0.28	0.51	0.78
Geri kazanım, %	-	89	86	-	-	-