TURKLAB Rehber 01

KİMYASAL ANALİZLERDE METOT VALİDASYONU VE VERİFİKASYONU

Doç. Dr. Aysun Yılmaz

TURKLAB- KALIBRASYON VE DENEY LABORATUVARLARI DERNEĞI

Büyükdere Cad. Gökfiliz İşhanı Kat:3 Biruni Laboratuvarı Mecidiyeköy / İSTANBUL
Tel: (0212) 217 41 41 Fax: (0212) 217 41 06
e-mail: info@turklab.org

Bu rehberin oluşturulmasında her türlü destek ve yardımlarından dolayı TURKLAB Yönetim Kurulu Başkanı Sayın Dr. Ömer Güzel'e ve Yönetim Kurulu Üyelerine teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

1. AMAÇ 5

2. KAPSAM 5

3. GEÇERLİ KILMA (VALİDASYON) VE DOĞRULAMA (VERİFİKASYON) 5

4. VALİDASYON SEVİYESİ 7

5. VALİDASYON PARAMETRELERİ 9

5.1. PLAN 9

5.2. KALİBRASYON EĞRİSİ, DOĞRUSALLIK (STANDARD CURVE, LINEARITY) VE ÖLÇÜM ARALIĞI (MEASUREMENT RANGE) 10

5.3. KARAR LİMİTİ–TESPİT LİMİTİ (DECISION LIMIT = LIMIT OF DETECTION- LOD- X_{DL}=X_{LD}), 14

MİNİMUM TESPİT EDİLEBİLİR DEĞER (MINIMUM DETECTABLE VALUE- X_{MDV}), 14

TAYİN LİMİTİ (LOQ-LIMIT OF QUANTIFICATION-LIMIT OF DETERMINATION-X_{LQ}) 14

5.4. DOĞRULUK (ACCURACY) 23

5.4.1. GERÇEKLİK (TRUENESS) 24

5.4.2. KESİNLİK (PRECISION) 27

5.5. SPESİFİTE (SPECIFICITY) 42

5.6. METOT SAĞLAMLIĞI (RUGGEDNESS) 42

5.7. METOT VALİDASYON VERİLERİNİN RAPORLANMASI 43

6. METOT VALİDASYONU VE DEĞİŞİKLİKLERİN ETKİSİ 43

7. KAYNAKLAR 45

8. EKLER 47

Tablolar

Tablo 1: AOAC rehberinde önerilen metot validasyonu parametreleri 6
Tablo 2: Kalibrasyon eğrisi değerleri 12
Tablo 3: Regresyon istatistiği 12
Tablo 4: Kalibrasyon eğrisi kesme noktası ve eğim analizi 12
Tablo 5: Residüel standart sapma hesabı (eşitlikte bölünen) 12
Tablo 6: Yalın hata hesabı (eşitlikte bölünen) 13
Tablo 7: Maksimum kabul edilebilir bağıl belirsizlik ve k katsayısı 16
Tablo 8: Örnek tespit limiti doğrulaması 21
Tablo 9: Rastgele ve sistematik hatanın karşılaştırılması 23
Tablo 10: Kömürde farklı laboratuvarlara ait kükürt analiz sonuçları 34
Tablo 11: Hücre ortalamaları sonuçları 35
Tablo 12: Standart sapma sonuçları 35
Tablo 13: Grubb test sonuçları 36
Tablo 14: Kömürde kükürt çalışması m, s_r, s_R değerleri 37
Tablo 15: Benzo(a)piren çalışma değerleri 38
Tablo 16: Ölçüm sayısına göre kritik aralık faktörü 41

Şekiller

Şekil 1: NMKL No 4 validasyon ve verifikasyon ayrımı 8
Şekil 2: Kalibrasyon eğrisini noktalarının sapması 13
Şekil 3: α- hata ve β- hata 14
Şekil 4: Tespit limiti, minimum tespit edilebilir değer ve tayin limiti akışı 17
Şekil 5: Hata çeşitleri ve performans karakteristikleri /kriterleri Menditto ve ark. (2007) 23

1. Amaç

Bu dokümanın amacı kimyasal ölçümlerde yapılan “metot geçerli kılma ve doğrulama” çalışmalarına değişik kaynakların yaklaşımları konusunda bilgi vermektir.
Doküman bir rehber niteliğinde hazırlanmış olup içinde bahsi geçen tüm kaynaklar hakkında detaylı veri içermemektedir, kullanıcılara konu ile ilgili yol göstermek, mümkün olduğunca basit bir akış sunmak ve kaynaklar hakkında bilgi vermek amaçlanmıştır. Doküman bu detayda dilimizde yayınlanmış ilk doküman olduğu için bundan sonraki revizyonları okuyuculardan elde edilecek geri beslemelerle daha zenginleşecektir. Bize konu ile ilgili yapacağınız tüm geri beslemeler için teşekkür ederiz.

2. Kapsam

Bu doküman kimyasal ölçümlerde “metot geçerli kılma ve doğrulama” parametrelerini kapsar. İçinde bazı bölümlerde geçse de mikrobiyolojik ve biyoteknolojik analizlerdeki çalışmaları kapsamamaktadır.

3. Geçerli kılma (validasyon) ve doğrulama (verifikasyon)

Geçerli kılma yani validasyon, metodun ilgili performans kriterlerine uygunluğunun saptanması için metot parametrelerinin belirlenip incelendiği bir geçerlilik çalışmasıdır. Tek bir laboratuvar (internal validasyon) veya pek çok laboratuvarın katıldığı laboratuvarlar arası çalışma ile gerçekleştirilebilir. **Kapsamlı geçerli kılma**, rutin kullanım öncesi metot performans kriterlerinden tümünün veya belirli bir kısmının incelenip, dökümante edilmesi anlamına gelirken; **tam iç geçerli kılma** metodun tüm performans kriterlerinin değerlendirilmesidir.
Doğrulama yani verifikasyon, laboratuvarlararası çalışmalarla performans kriterleri belirlenmiş olan bir metodun laboratuvar şartlarında teyididir.

Not: “Geçerli kılma” terimi yerine *validasyon*, “doğrulama” yerine *verifikasyon* daha sık kullanıldığı için dokümanda ilerleyen sayfalarda validasyon ve verifikasyon kelimelerinin kullanımı tercih edilmiştir.

AOAC “How to Meet ISO 17025 Requirements for Method Verification“ rehberinde kimyasal analizleri 6 kategoriye ayırmaktadır. Bu kategoriler;

Kategori 1: İdentifikasyonu doğrulayan metot, materyalin ne olduğunu veya hedef analitin tespitini sağlar.

Kategori 2: Düşük konsantrasyonlarda analitin miktarının belirler.

Kategori 3: Eğer analit spesifiye edilen düşük konsantrasyonun altında veya üstünde ise belirlenmesini sağlar (çoğunlukla limit test olarak adlandırılır). Spesifiye edilen konsantrasyon tayin limiti (LOQ) değerine yakın bir değerdir.

Kategori 4: Yüksek konsantrasyonlarda analiti belirler.

Kategori 5: Eğer analit spesifiye edilen yüksek konsantrasyonun altında veya üstünde ise belirlenmesini sağlar (çoğunlukla limit test olarak adlandırılır). Spesifiye edilen konsantrasyon tayin limiti (LOQ) değerinin oldukça üstünde bir değerdir.

Kategori 6: Kalitatif test.

Bu kategorilere göre önerilen validasyon parametreleri Tablo 1’de verilmiştir. Aynı şekilde Eurachem, NMKL vb. diğer bir çok kaynakta metot validasyonu için incelenmesi önerilen performans kriterleri, doğruluk, kesinlik, spesifite, tespit limiti, tayin limiti, sağlamlık, linearite ve ölçüm aralığı olmak üzere sekiz ana parametreden oluşmaktadır.

Performans karakteristiği	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
1- Doğruluk-Accuracy	H	E	H	E	E	H
2- Kesinlik-Precision	H	E	H	E	E	H
3- Spesifite-Specifity	E	E	E	E	E	E
4- Tespit limiti-Limit of detection (LOD)	H	E	E	E/H	H	H
5- Tayin limiti-Limit of quantification (LOQ)	H	E	H	E/H	H	H
6- Sağlamlık-Ruggedness	H	E	H	E	H	H
7- Linearite- Doğrusallık – Linearity- 8- Aralık -Range	H	E	H	E	H	H

1- İdentifikasyon
2- Analit düşük konsantrasyonda Kantitatif-2
3- Analit düşük konsantrasyonda Limit test 3
4- Analit yüksek konsantrasyonda Kantitatif 4
5- Analit yüksek konsantrasyonda Limit test 5
6- Kalitatif 6
H- Hayır
E- Evet

Tablo 1: AOAC rehberinde önerilen metot validasyonu parametreleri

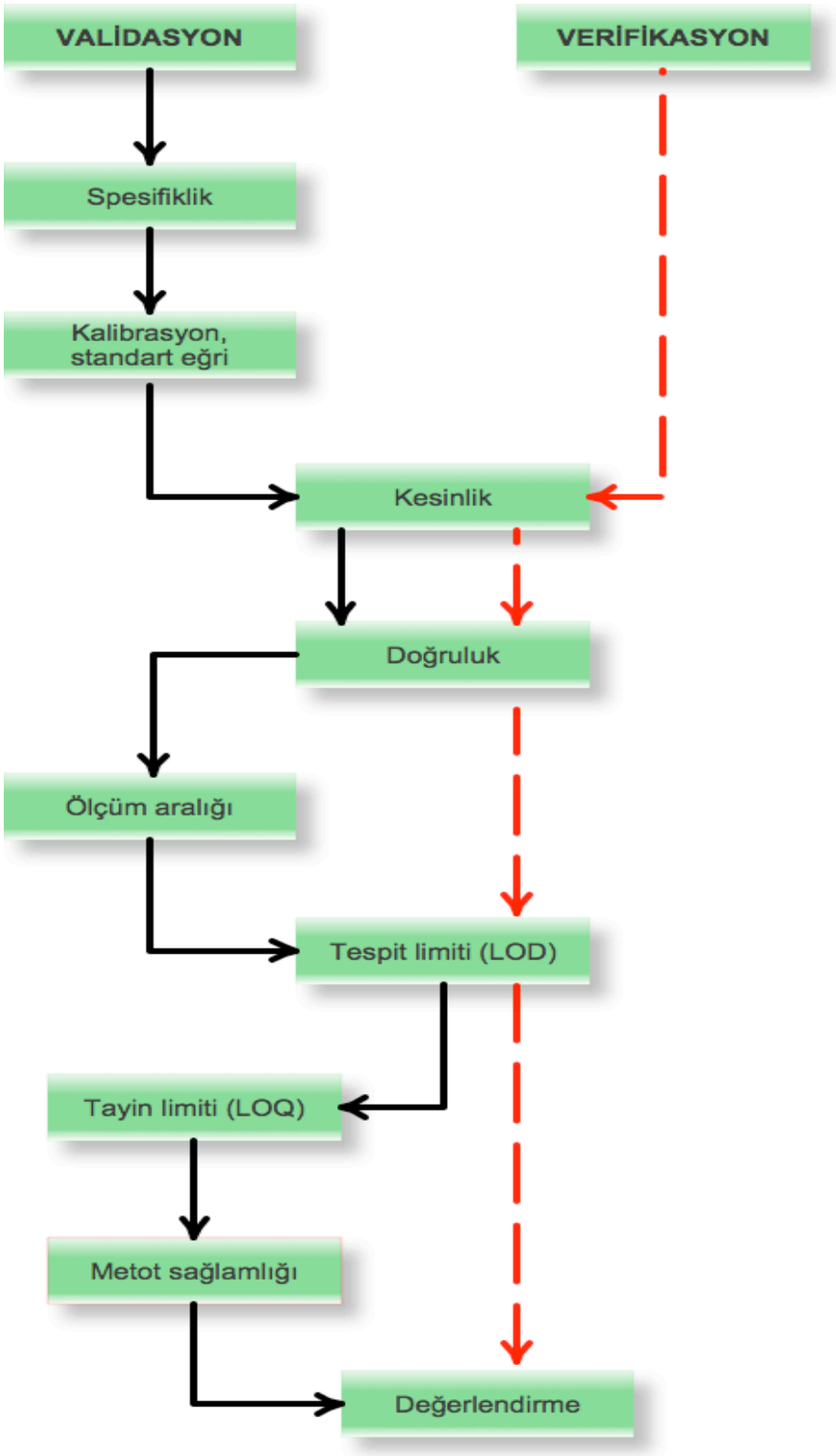
4. Validasyon seviyesi

Metotların validasyonu seviyesi belirlenmiş performans kriterlerine göre değişiklik gösterir.

1- Bir metot laboratuvarlar arası bir çalışma ile geçerli kılınmış ise verifikasyon yeterlidir.
2- Bir metot laboratuvarlar arası bir çalışma ile geçerli kılınmış ancak farklı yapıda bir örnek ile çalışılacaksa doğruluk, kesinlik, tespit limiti ve tayin limiti verifikasyona yeni matriks de ilave edilerek teyit edilmelidir.
3- Bir metot laboratuvarlar arası bir çalışma ile değil laboratuvar içi çalışma ile valide edilmiş ise, verifikasyon parametrelerine mümkün olduğu kadar validasyon parametreleri de eklenmelidir.
4- Bir metot bilimsel bir dergide yayınlanmış ve belirli performans parametreleri incelenmiş ise, verifikasyon parametrelerine mümkün olduğu kadar validasyon parametreleri de eklenmelidir.
5- Bir metot bilimsel bir dergide yayınlanmış ancak hiç bir performans parametresi incelenmemiş ise tam iç validasyon yapılmalıdır.
6- Bir metoda ait herhangi bir performans kriteri bulunmadığı veya laboratuvar içi geliştirilmiş ise tam iç validasyon yapılmalıdır.

Metotların verifikasyonu için doğruluk, kesinlik, tayin ve tespit limitlerinin laboratuvarda teyit edilmesi yeterlidir. NMKL No:4 rehberinde verifikasyon için tayin limiti ilave edilmemiş olsada AOAC'nin rehberinde yer almaktadır.

NMKL No:4; "Kimyasal analizlerde metotların validasyon prosedüründe" validasyon ve verifikasyon aşağıdaki gibi bir akış şeması ile ayrılmıştır.



Şekil 1: NMKL No:4; validasyon ve verifikasyon ayrımı

5. Validasyon parametreleri

5.1. Plan

Validasyon/verifikasyon çalışmasına başlanmadan önce planlama yapılmalıdır. Plan laboratuvarın imkanları, analitik yönden yapılabilirliği ve müşteri talepleri gibi faktörleri gözönüne alınarak hazırlanmalıdır ve aşağıdaki soruları cevaplayabilmelidir.

1- Metodun kullanım amacı nedir ?
2- Kalitatif mi yoksa kantitatif sonuç mu gereklidir ?
3- Analit hangi kimyasal formda bulunuyor (serbest, bağlı, değişik kimyasal bileşikler)?
4- Analit bölgesel dağılmış mıdır ?
5- Metodun uygulandığı alan neresidir ?
6- Örnek yapısından veya başka analitlerden girişim olabilir mi ?
7- Örnek miktarı ne kadardır ve homojen bir yapıda mıdır ?
8- Örnekleme ve alt örnekleme yapılacak mıdır ?
9- Metot hangi aralıkta kullanılacak tespit limitine yakın mı yoksa daha yüksek bir seviyede mi?
10-Analit ile ilgili yasal limitler mevcut mudur ?
11-Gerçeklik nasıl sağlanacaktır ?
12-Sonuçlar başka laboratuvar sonuçları ile karşılaştırılacak mı ?
13-Gerekli çevresel koşullar nelerdir ?
14- Kaynak kısıtlaması var mıdır ? Finansal limitler nelerdir ?

Validasyon/verifikasyon planı çalışmada değerlendirilecek parametreleri, zaman planlamasını ve detaylarını içermelidir.

5.2. Kalibrasyon eğrisi, doğrusallık (standard curve, linearity) ve ölçüm aralığı (measurement range)

Ölçüm aralığı metodun uygulama aralığının belirlenmesi için yapılır. Kalibrasyon eğrisinde ölçülen analitin miktarı (konsantrasyonu) ve dedektör yanıtının (response) doğru orantılı olarak görüldüğü aralıktır. Metot geçerli kılma çalışmalarında analitin konsantrasyonları bu aralık dikkate alınarak planlanır.

Standart eğri, metoda ve ürüne bağlı belirli sayıda ölçüm noktası ile belirlenir. Eğrinin oluşturulması, içinde miktarı bilinen referans örnekle veya kör örnek içine eklenmiş analitin bilinen konsantrasyonu ile yapılır. Her bir ölçüm noktasında en az iki ölçüm yapılır. Eurachem rehberinde en az 6 noktada, birde kör eklenerek ve her bir noktada tekrar sayısı 3 olarak, ISO 11095'de en az 3 farklı seviyede referans örnek ve tekrar sayısı ise en az 2 olarak belirtilmiştir.

Her bir nokta ana solüsyondan dilüsyonlar yapılması yerine bağımsız olarak hazırlanmalıdır. Kalibrasyon eğrisinin analiz edilen örnek yapısının farklılığına göre değişebileceği göz ardı edilmemelidir. Elde edilen yanıtla çizilen eğride üst ve alt sınırlar belirlenmelidir. Kalibrasyon eğrisinin en alt noktası uygulanan analiz metodunun tayin limiti olmalıdır.

Sonuçlar grafiksel olarak verilir ve "linear regresyon formülü" ile "korelasyon katsayısı" belirtilir. Bu şekilde çalışma aralığının doğrusal olup olmadığı tespit edilir. Korelasyon katsayısı >0,99 olmalıdır. Regresyon hesabı için Excel'de bulunan formüllerden yararlanılabilir.

Eğer korelasyon linear (doğrusal) değil ise ve problem analitik olarak çözümlenemiyorsa ilgili eğrideki parametreler, en küçük kare metodu kullanılarak belirlenmelidir.

Doğrusallık korelasyon katsayısının hesaplanması yanında ANOVA (Ek-1)Tablosunda F değeri ile karşılaştırılarak da değerlendirilmelidir. Yalın hata (s_2^2) ve uyum eksikliği yani

residüel standart sapma (s_1^2) aşağıdaki formüllerle hesaplanır. Hesaplanan F değeri, $F_{(1-\alpha)}$ (N-2; NK-N) serbestlik derecesinde Tablodaki değer ile karşılaştırılır.

$$s_1^2 = \frac{\sum (y - y_t)^2}{N - 2}$$

$$s_2^2 = \frac{\sum (a - b)^2}{NK - N}$$

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

y_t= Eğrinin formülünde "x" değerinin yerine konulduğu zaman elde edilen "y" değeri (varsayılan "y" değeri)

a= İlgili konsantrasyondaki ilk paralel değeri

b= İlgili konsantrasyondaki ikinci paralel değeri

N= toplam ölçüm sayısı (örneğin 6 noktada 2 paralel için değer 12'dir)

K= Her bir noktada tekrar sayısı (örneğin 2 paralel ise değer 2)

NK= NxK (örneğin 12 toplam sayı x 2 tekrar = 24).

n= Kalibrasyon noktası

Kalibrasyon eğrisindeki tekrar sayısının 2 den fazla olması durumunda yalın hata formülünde NK-N yerine 2n yazılarak hesaplama yapılmalıdır.

F dağılımında elde edilen değer tablodaki değerden küçük ise eğri doğrusaldır. F değeri tablosu ekler bölümünde verilmiştir.

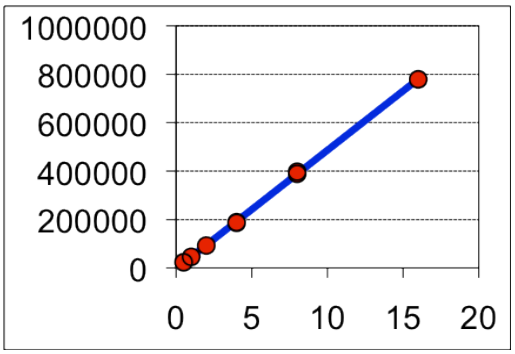
Kalibrasyon eğrisinin uzun süre kullanılması gerektiğinde geçerliliğinin kontrol edilmesi gerekmektedir. Bu kontroller için ISO 7870, ve ISO 8258 de belirtilen shewhart kontrol grafikleri kullanılmaktadır. Bu kontrollerin yapılmasında kullanılan standartların kalibrasyon grafiğinin çiziminde kullanılan standarttan farklı olmasına dikkat edilmelidir. Bu fark aynı üreticinin farklı bir lotu veya farklı bir üreticiye ait olabilir.

Kalibrasyon grafiği için örnek çalışma:

Okratoksin A analizinde 0,5 ile 16 ng/g arasında değişen 6 noktada ve her birinde 2 tekrarlı standart solüsyonları hazırlanır. Elde edilen yanıt ile eğri çizilir ve Excel'de regresyon analizi yapılır. .

X	Y
0,50	24369
0,50	23466
1,00	46280
1,00	46110
2,00	93100
2,00	92950
4,00	186200
4,00	189345
8,00	397624,5
8,00	388690
16,00	779380
16,00	778380

Tablo 2: Kalibrasyon eğrisi değerleri



Resim 1: Kalibrasyon eğrisi

Regresyon istatistiği	
Ölçüm sayısı	12
Standart hata ,s	2829,264472
Corr	0,999905001
R^2	%0,999905
Düzeltilmiş R^2	%0,999896

Tablo 3: Regresyon istatistiği

	Katsayı	Standart hata	t-değeri	P-değeri	%95 düşük	%95 yüksek
Kesme noktası	-3105,568408	1137,672336	-2,72975646	0,0212	-5640,46033	-570,6764864
Eğim	48939,06859	150,8538828	324,4137153	0,0000	48602,94519	49275,19198

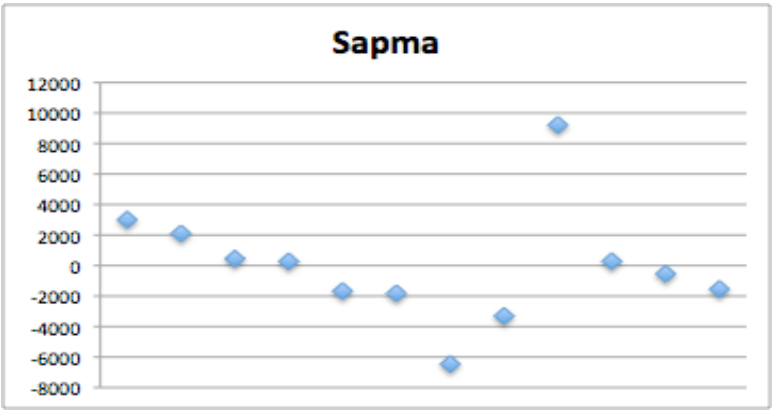
Tablo 4: Kalibrasyon eğrisi kesme noktası ve eğim analizi

X	Y	Varsayılan Y	Sapma $(y-y_t)$	Sapma kare $(y-y_t)^2$
0,5	24369	21363,96588	3005,034115	9030230,033
0,5	23466	21363,96588	2102,034115	4418547,421
1	46280	45833,50018	446,4998223	199362,0913
1	46110	45833,50018	276,4998223	76452,15174
2	93100	94772,56876	-1672,568763	2797486,268
2	92950	94772,56876	-1822,568763	3321756,897
4	186200	192650,7059	-6450,705935	41611607,05
4	189345	192650,7059	-3305,705935	10927691,73
8	397624,5	388406,9803	9217,519723	84962669,84
8	388690	388406,9803	283,0197228	80100,1635
16	779380	779919,529	-539,5289623	291091,5012
16	778380	779919,529	-1539,528962	2370149,426
			Toplam (Sapma kareleri toplamı)	160087144,6

Tablo 5: Residüel standart sapma hesabı (eşitlikte bölünen)

X	Y	a-b	$(a-b)^2$
0,5	24369	903	815409
0,5	23466		
1	46280	170	28900
1	46110		
2	93100	150	22500
2	92950		
4	186200	-3145	9891025
4	189345		
8	397624,5	8934,5	79825290,25
8	388690		
16	779380	1000	1000000
16	778380		
		Toplam	91583124,25

Tablo 6: Yalın hata hesabı (eşitlikte bölünen)



Şekil 2: Kalibrasyon eğrisini noktalarındaki sapma

$$s_1^2 = \frac{160087145}{12-2} = 16008714,5$$

$$s_2^2 = \frac{91583124,25}{(12 \times 2) - 12} = 7631927,02$$

$$F = \frac{16008714,5}{7631927,02} = 2,09$$

F kritik değeri p=0,05 için 10 ve 6 serbestlik derecesinde 4,06‘dır. 2,09 bu değerden küçük olduğu için eğri doğrusaldır.

5.3. Karar Limiti–Tespit limiti (Decision limit = Limit of detection- LOD- $x_{DL}=x_{LD}$), Minimum tespit edilebilir değer (Minimum Detectable Value- x_{MDV}), Tayin limiti (LOQ-Limit of quantification-Limit of determination-x_{LQ})

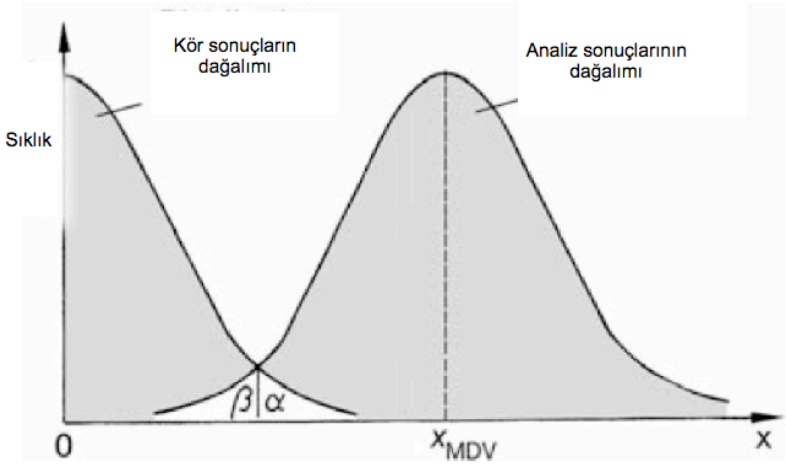
Çok düşük konsantrasyonlarda çalışılması gerektiği durumlarda örneğin vermiş olduğu sinyalin, kör numuneden ayrımının yapılması ve uygun bir kesinlikle kantitatif sonuçların elde edilmesi gerekir.

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.



Şekil 3: α- hata ve β- hata

Bu durumda 3 farklı limit oluşur;

- karar limiti – tespit limiti (decision limit- limit of detection) x_{LD}
- minimum tespit edilebilir değer (minimum detectable value) x_{MDV},
- tayin limiti (limit of quantification, limit of determination) x_{LQ}

ISO/TS 13530, tespit limiti'ni (x_{LD}) kör ve sıfır dışında tespit edilebilen en küçük miktar yada konsantrasyon olarak belirtmektedir. Bazı fiziksel parametreler örneğin pH, redoks potansiyeli gibi tespit limiti uygulanamaz, bu nedenle tespiti için çalışma yapılmamalıdır. Bu konuda ayrımı daha da netleştirmek için bir örnek içinde var yada yok diyebileceğimiz bir analit aranıyorsa buna tespit limiti uygulanabilir. Ancak, pH gibi ölçüldüğünde mutlak bir değer verilebilecek parametrelerde yani yokluğu bulunmayan parametrelerde tespit limiti bulunmamaktadır.

Tespit limitinin belirlenebilmesi için yaklaşımların bir çoğu benzer kör matrikslerin veya düşük seviyedeki materyallerin sonuçlarının standart sapmaları veya metodun standart sapmasının (s_{xo}) faktörle çarpımı ile hesaplanması yönündedir. Bu şekilde tespit limiti 3 şekilde hesaplanabilmektedir.

- Kör örneklerin sonuçlarının standart sapmaları üzerinden,
- Metodun standart sapması üzerinden,
- Gürültü üzerinden,

Kör örneklerin sonuçlarının standart sapmaları üzerinden aşağıdaki formülle hesaplanır;

$$x_{LD} = 3 \times s_0 + x_{kör}$$

s_0= kör örneklerin sonuçlarının standart sapmaları

$x_{kör}$= kör örneklerin ortalaması

Yukarıdaki eşitlik eğer analiz sonuçlarından körün çıkarılması temeline dayanıyorsa $x_{kör}$ 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 α=0,01 karşılığıdır.

Metodun standart sapması üzerinden hesaplamada linear kalibrasyon eğrisinin değerleri kullanılarak aşağıdaki formülle tespit limiti hesaplanır.

$$x_{LD} = 4 \times s_{xo}$$

$$s_{XO} = \frac{s_y}{b}$$

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{N-2}}$$

s_{XO} =Proses veya metot standart sapması (kalibrasyondan)

s_y =Residüel standart sapma = Madde 5.2 de verilen (s_1^2)

$\hat{y}_i$ = Eğrinin formülünde “x” değerinin yerine konulduğu zaman elde edilen ”y” değeri (varsayılan ”y” değeri)

b= kalibrasyon eğrisinin eğimi

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.

x_{LD} = (C spk / S/N) x 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.

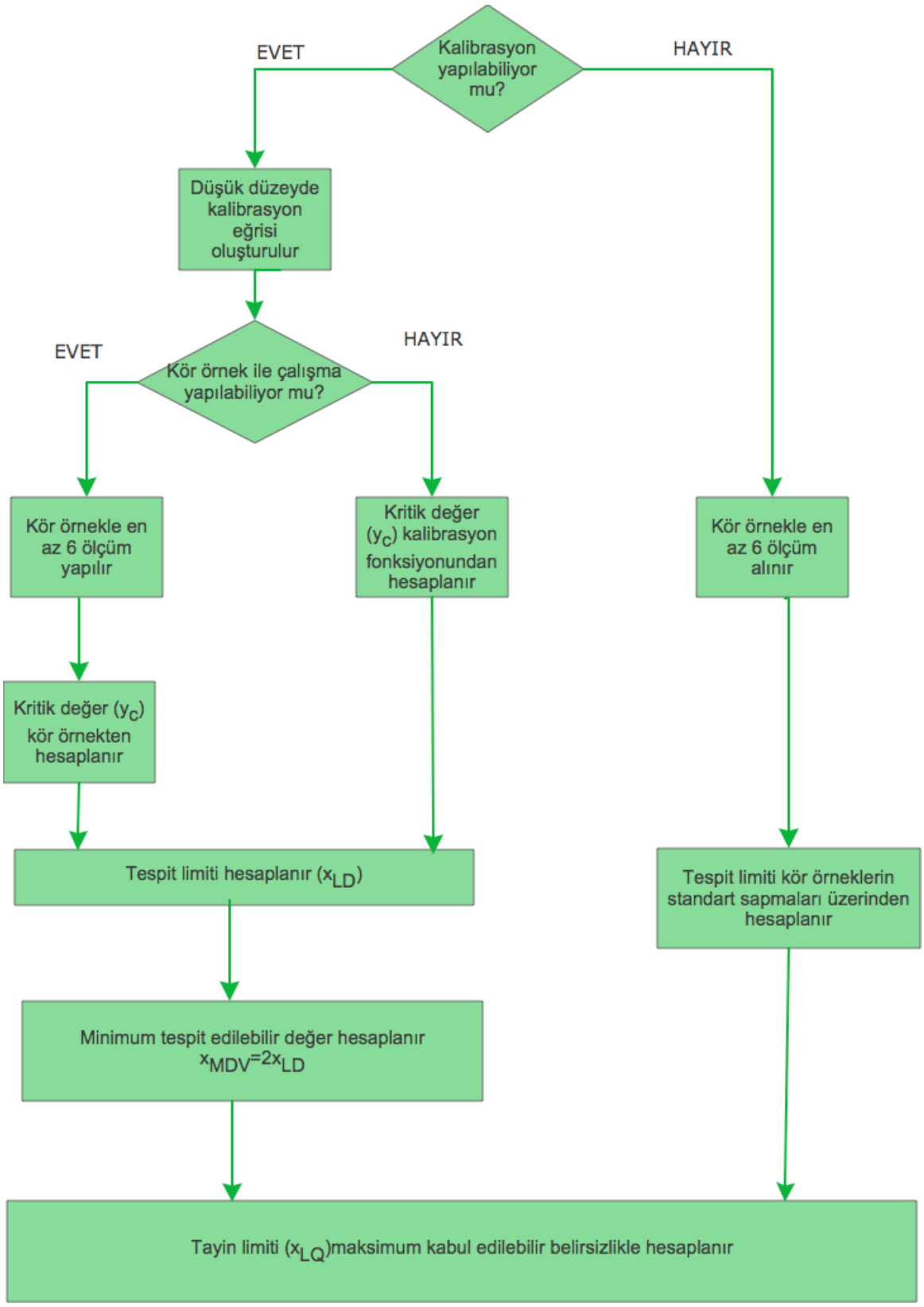
$$x_{LQ} = k \times x_{LD}$$

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

Tespit limiti, minimum tespit edilebilir değer ve tayin limitinin belirlenmesinde daha kesin bir hesaplama gerektiğinde daha karışık hesaplama yöntemleri ortaya çıkmaktadır. Bunlar DIN 32645, ISO 11843 serisi standartlarda detaylı olarak anlatılmıştır. Funk ve ark. (2007) bu standartların özet bir değerlendirmesini yapmış ve analitik prosesin kalibre edilip edilmemesine göre aşağıdaki diyagramda gösterildiği gibi karar verildiğini belirtmiştir. Bu standartlarda tarif edilen hesaplama şekilleri aşağıda formüllerle belirtilmiştir.



Şekil 4: Tespit limiti, minimum tespit edilebilir değer ve tayin limiti akışı

Uygun temsili kalibrasyon standartlarının bulunmadığı durumlarda x_{LD} ve x_{MDV} 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-hatanı %5, β-hatanın %50 olduğu durumdur.

"1 No'lu durum" Kör örnekle; yapılan hesaplamada karar limitinin hesaplanmasına öncelikle kritik değer hesabı ile başlanır.

$$\Delta\overline{y}_B = s_B \times t_{f,\alpha}\sqrt{\frac{1}{N_a} + \frac{1}{N_B}}$$

$$f = N_B - 1$$

$$y_c = \overline{y}_B + \Delta\overline{y}_B$$

$\overline{y}_B$ = Kör değerlerin ortalaması

s_B = Kör değerlerin standart sapması

N_a = Her bir örneğin analiz sayısı (tekli durumda Na=1, 3 tekrarda Na=3)

N_B = Körün birbirinden bağımsız tekrar sayısı en az 6 tekrar olmalı

Tespit limiti aşağıdaki eşitlikle hesaplanır.

$$x_{LD} = \frac{s_B}{b} \times t_{f,\alpha}\sqrt{\frac{1}{N_a} + \frac{1}{N_B}}$$

$$f = N_B - 1$$

b= kalibrasyon eğrisinin eğimi

$$b = \frac{\sum\left[(x_i - \overline{x}) \times (y_i - \overline{y})\right]}{\sum (x_i - \overline{x})^2}$$

"2 nolu durum", Kalibrasyon eğrisi metodu, kritik değer ve y eksenini kestiği nokta aşağıdaki formüllerle hesaplanır.

$$\Delta a = s_y \times t_{f,\alpha}\sqrt{\frac{1}{N_a} + \frac{1}{N_C} + \frac{\overline{x}^2}{Q_{xx}}}$$

$$f = N_C - 2$$

$$y_c = a + \Delta a$$

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{N-2}}$$

$$\hat{y}_i = a + bx_i$$

$$Q_{xx} = \sum x_i^2 - ((\sum x_i)^2 / N)$$

N_C =Kalibrasyon eğrisindeki konsantrasyon sayısı

s_y =Residüel standart sapma = Madde 5.2 de verilen (s_1^2)

Q_{xx} =Karelerin toplamı

$\hat{y}_i$ = Eğrinin formülünde "x" değerinin yerine konulduğu zaman elde edilen "y" değeri (varsayılan "y" değeri)

Tespit limiti aşağıdaki eşitlikle hesaplanır.

$$x_{LD} = \frac{s_y}{b} \times t_{f,\alpha}\sqrt{\frac{1}{N_a} + \frac{1}{N_C} + \frac{\overline{x}^2}{Q_{xx}}}$$

$$f = N_C - 2$$

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'nın eşit olduğu durumda (α=β);

$t_\alpha = t_\beta = t$ olup, $x_{MDV} = 2 \times x_{LD}$

x_{MDV}, kör değere ve kalibrasyon fonksiyonuna göre aşağıdaki eşitliklerle hesaplanır.

Kör değere göre;

$$x_{MDV} = x_{DL} + \frac{s_B}{b} \times t_{f,\beta} \sqrt{\frac{1}{N_a} + \frac{1}{N_B}}$$

$f = N_B - 1$

s_B = Kör değerlerin standart sapması

N_a = Her bir örneğin analiz sayısı (tekli durumda Na=1, 3 tekrarda Na=3)

N_B = Körün birbirinden bağımsız tekrar sayısı en az 6 tekrar olmalı

b= kalibrasyon eğrisinin eğimi

Kalibrasyon fonksiyonu kullanıldığı zaman;

$$x_{MDV} = x_{DL} + s_{XO} \times t_{f,\beta} \sqrt{\frac{1}{N_a} + \frac{1}{N_C} + \frac{\overline{x}^2}{Q_{XX}}}$$

$f = N_C - 2$

$$s_{XO} = \frac{s_y}{b}$$

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{N-2}}$$

$$Q_{xx} = \sum x_i^2 - ((\sum x_i)^2 / N)$$

s_{XO} =Proses standart sapması

N_C =Kalibrasyon eğrisindeki konsantrasyon sayısı

s_y =Residüel standart sapma = Madde 5.2 de verilen (s_1^2)

Q_{xx} =Karelerin toplamı

$\hat{y}_i$ = Eğrinin formülünde ”x” değerinin yerine konulduğu zaman elde edilen ”y” değeri (varsayılan ”y” değeri)

b= kalibrasyon eğrisinin eğimi

Tayin limiti; aranan analitin maksimum bağıl kesinlik olmadan belirsizlikle analiz edilebilen minimum konsantrasyonudur. Aşağıdaki formüle göre hesaplanır;

$$x_{LQ} = k \times s_{XO} \times t_{f=N_C-2,\alpha} \sqrt{\frac{1}{N_a} + \frac{1}{N_C} + \frac{(x_{LQ} - \bar{x})^2}{Q_{XX}}}$$

Tayin limiti hesaplanmasında daha kısa bir yöntem ise yukarıda da belirtildiği gibi hesaplanan tespit limitinin "k faktörü" ile çarpılması ile de elde edilir.

$$x_{LQ} = k \times x_{LD}$$

k= kabul edilebilir bağıl belirsizlik katsayısı

Tespit ve tayin limitinin doğrulanması

Metot validasyonu çalışmalarında hesaplanan tespit limiti ve tayin limitinin mutlaka doğrulanması gerekir. Bunun için kör örnek içine bu konsantrasyonlarda spike yapılır. Hem kör numune hemde zenginleştirilmiş kör numune, aynı örnek gibi laboratuvar içi tekrar üretebilirlik (within-laboratory) 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_{iort}
Kör	0,001	19,23	15,14	19,23	
Tespit limiti xLD=0,5 µg/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. Elde edilen tekrarlara ait standart sapmanın tekrar sayısına göre aşağıdaki formüle göre hesaplanmış değerlerden düşük veya en falza eşit olması gerekmektedir.

$$s = \frac{x_{LQ} \times \sqrt{n}}{3 \times t_{f;\alpha}}$$

s=spike örneklerin kabul edilecek maksimum standart sapması

n= spike örnek sayısı (3 ile 5 arası)

$t_{f;\alpha}$ =t dağılımı tablosunda f=n-1 ve α=0,05 (P=%95)

3= k değeri; %33 kabul edilebilir bağıl belirsizlik karşılığı olan katsayısı (1/k=1/0,33)

Bu durumda formüller aşağıdaki şekilde hesaplanabilir;

Üç tekrar çalışmasında n=3 $s = 0{,}134 x_{LQ}$ t= 4,303

Dört tekrar çalışmasında n=4 $s = 0{,}210 x_{LQ}$ t=3,128

Beş tekrar çalışmasında n=5 $s = 0{,}268 x_{LQ}$ t=2,776

Spike örneğin standart sapması yukarıdaki eşitlikle yapılan hesaba göre belirlenen standart sapmaya eşit yada küçük olmalıdır. Değer küçük ise tayin limiti doğrulanmış olur.

5.4. Doğruluk (accuracy)

Doğruluk parametresi iki ana bileşenden oluşur. Bunlar gerçeklik ve kesinliktir. Doğruluk elde edilen değer ile gerçek değerin yakınlığının ifadesidir.

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

Rastgele Hata	Sistematik 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 sistematik hatanın karşılaştırılması

5.4.1. 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, valide edilmiş metodun ölçümü sonucu veya yeterlilik testleri sonucunda elde edilebilir. Bu üç yöntemde de ortak nokta gerçek değerin bir çok laboratuvarda yapılmış ölçümlerin sonucunda elde edilmiş olmasıdır. Sistematik hatanın bir matriks ve bir seviyede hesaplanması tüm çalışma aralığında metodun aynı hata ile çalıştığı anlamına gelemektedir. 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.

$$Bias = \bar{x}_{bulunan} - x_{CRM}$$

$\bar{x}_{bulunan}$ = Tekrarlanabilirlik veya tekrarüretebilirlik 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.

$$t = \frac{(x_{CRM} - \bar{x}_{bulunan})\sqrt{n}}{s}$$

Örneğin: Sertifika değeri 33,9 µg/l olan bir elma suyu örneğinde patulin analizi 7 tekrar sonucu bulunan değerlerin ortalaması 31,1 µg/l , standart sapması 3,0 µg/l olsun.

$$t = \frac{(x_{CRM} - \bar{x}_{bulunan})\sqrt{n}}{s} = \frac{(33{,}9 - 31{,}1)\sqrt{7}}{3{,}0} = 2{,}41$$

t_{kritik} (p=0,05) de 6 serbestlik derecesi için 2,45'dir. Hesaplanan değer kritik değerden düşük olduğu için sertifika değeri ile arasında önemli bir fark bulunmamaktadır.

Z- skoru ile sistematik hata tespiti

Metodun sistematik hatası için z-skoru, sertifikalı referans materyalle Horwitz değeri kullanılarak aşağıdaki formülle hesaplanır.

$$z-score = \frac{(\overline{x}_{bulunan} - x_{CRM})}{u_{Horvalue}} = \frac{(\overline{x}_{bulunan} - x_{CRM})}{\left(\frac{x_{CRM}}{100} \times 2 \times (x_{CRM} \times f)^{-0,1505}\right)}$$

$f =$ % ise 0,01, mg/kg (ppm) ise $1x10^{-6}$, µg/kg (ppb) ise $1x10^{-9}$

HorRat değeri kullanılarak hesaplanan z-skorunun 2'nin altında bir değer olması beklenir.

Örneğin: Sertifikalı referans materyal olarak su örneği tekrarlanabilirlik koşullarında çalışılarak ortalaması 0,312 mg/kg bulunmuş olsun. Su örneğinin sertifika değeri 0,350 mg/kg olduğunda önemli düzeyde sistematik hatasının olup olmadığı incelendiğinde bulunan -0,6 değeri kabul kriteri olan +- 2 aralığında olduğu için metodun hatası kabul edilebilir sınırlar içerisindedir.

$$z-score = \frac{(0,312 - 0,350)}{\left(\frac{0,350}{100} \times 2 \times (0,350 \times 1x10^{-6})^{-0,1505}\right)} = -0,6$$ (başarılı, önemli bir hatası yok)

Referans metot kullanılarak gerçekliğin tespiti

Referans metot kullanılarak gerçekliğin tespitinde gerçek değerin elde edileceği metodun validasyon çalışmaları laboratuvarlar arası ortak çalışma ile yapılmış olmalıdır. Bu şekilde valide edilmiş referans metot ile gerçekliği hesaplanacak metot aynı analist tarafından aynı örnekler çalışılır. Eğer referans metot laboratuvarda uygulanmıyorsa tercihen konuda akredite başka bir laboratuvara örnek gönderilebilir. Elde edilen sonuçlar t- testi veya varyans analizi ile karşılaştırılır.

T – testi ile karşılaştırma için aşağıdaki formül kullanılır. Hesaplanan "t" değeri "kritik t" değerine eşit veya küçük olursa metotlar arasında önemli fark olmadığını gösterir.

$$t = \frac{(\overline{x}_1 - \overline{x}_2)}{s\sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)}$$

serbestlik derecesi $(n_1 + n_2 - 2)$

Örneğin: referans metodun ortalaması 15 tekrar sonunda: 3,4 standart sapması 0,26 olsun.

Valide edilen metodun ortalaması 15 tekrar sonunda; 3,9 standart sapması 0,33 olsun.

$$s^2 = \frac{(15-1)\times 0,33^2 + (15-1)\times 0,26^2}{(15+15-2)}$$

$$t = \frac{(3,9-3,4)}{0,297\sqrt{\frac{1}{15}+\frac{1}{15}}}$$

$$t = 4,609$$

p=0,005 için t_{28} kritik değer 2,048, hesaplanan değer ise 4,609 olduğu için yeni metot referansa göre uygun değildir.

Yeterlilik testi kullanılarak gerçekliğin tespiti

Metodun gerçekliği yeterlilik testlerine katılınarak da belirlenebilir. Eğer yeterlilik testi bulunmuyorsa bir kaç laboratuvarın katılımı ile laboratuvarlar arası karşılaştırmada (LAK) bu konuda bilgi sağlamaya yeterli olabilir.

Diğer durumlarda gerçekliğin tespiti, geri kazanım çalışması

Gerçekliğin tespiti için sertifikalı referans materyal, referans metot ve yeterlilik testinin bulunmadığı durumlarda 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, orjinal örneklerde aranan analitlerin örnekle olan fiziksel ve kimyasal bağlarının çok güçlü olmasına ragmen, 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.

Geri kazanım hesabı sertifikalı referans materyal kullanılarak veya herhangi bir laboratuvar örneği kullanılarak yapılabilir. Laboratuvar örneğinde aranan analitin bulunup bulunmadığı bilinmediğinden çalışmada orjinal örnek ve zenginleştirilmiş örnek beraber çalışılır.
Sertifikali referans materyal ile yapılan ölçümlerde kullanılan formül;

$$\%R = \frac{Q_B}{Q_{CRM}} \times 100$$

%R= % geri kazanım oranı

Q_B= Sertifikalı referans materyallerin çalışması sonucunda bulunan değer

Q_{CRM}= Sertifikalı referans madde değeri

Laboratuvar örneğinin zenginleştirilmesi ile yapılan geri kazanım çalışmasında aşağıdaki formül kullanılır;

$$\%R = \frac{Q_Z - Q_O}{Q_{ZK}} \times 100$$

%R= % geri kazanım oranı

Q_Z= Zenginleştirilmiş örnek sonucu

Q_{ZK}= Zenginleştirme konsantrasyonu

Q_O= Orjinal örnek sonucu

5.4.2. 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 zaman (kısa ve uzun zaman aralığı), kalibrasyon (aynı ekipmanda dahi ölçümler arasında yeniden kalibrasyon yapılıp yapılmadığı), operatör (aynı veya değişik operatörler) ve ekipman (ölçümlerde aynı veya farklı ekipmanların kullanılıp kullanılmadığı) olup bunların değişkenliğine göre kesinlik de değişmektedir. Tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirlik 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

örneklerde aynı laboratuvarda, 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.

Tekrarüretilebilirlik yani uyarlık ise “R” harfi ile ifade edilmektedir ve tekrarüretilebilirlik koşulları altında elde edilen kesinliktir. Tekrarüretilebilirlik 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.

Eurachem rehberinde tekrarüretilebilirlik, laboratuvarlar arası (inter-laboratory) tekrar üretilebilirlik ve laboratuvar içi (intra-laboratory) tekrarüretilebilirlik olarak ikiye ayrılmıştır.

Eurachem rehberinde kesinlik için 10 tekrardan bahsederken ISO 5725-3 standardında en az 15 tekrar öngörülmüştür.

Kesinlik kantitatif analizlerde standart sapma (s) ve relatif standart sapma (RSD= s/x x100) ile, kalitatif analizlerde ise “yanlış pozitif” ve “yanlış negatif” oranları ile ifade edilir. Standart sapma, hesaplandığı analiz sonuçlarında bir ondalık fazla olarak belirtilmelidir.

Hem tekrarlanabilirlik hemde tekrarüretilebilirlik analit konsantrayonuna bağlı olarak değiştiği için değişik konsantrasyonlarda (düşük, orta, yüksek gibi) tespit edilmelidir. Kesinliğin relatif standart sapma olarak ifadesi konstrasyondan bağımsız hale getireceği için kullanımda tercih edilmektedir.

NMKL No:4 prosedüründe kesinlik ifade şekillerinden biri de güven aralığı olarak belirtilmiştir.

$$\left(\overline{x} - c\frac{s}{\sqrt{n}}, \overline{x} + c\frac{s}{\sqrt{n}}\right)$$

Tekrarlanabilirlik standart sapması;

ISO 5725-2’ye göre;

Tekrarlanabilirlik varyansı;

$$s_{rj}^2 = \frac{\sum_{i=1}^{p}(n_{ij} - 1)s_{ij}^2}{\sum_{i=1}^{p}(n_{ij} - 1)}$$

Laboratuvar içi varyans;

$$s_{iJ} = \sqrt{\frac{1}{n_{ij} - 1} \sum_{k=1}^{n_{ij}} (y_{ijk} - \overline{y}_{ij})^2}$$

$$\overline{y}_{ij} = \frac{1}{n_{ij}} \sum_{k=1}^{n_{ij}} y_{ijk}$$

j=Seviyeyi belirtir

n_{ij}= J seviyesinde “i” laboratuvarındaki test sonucu sayısı

y_{ijk}=Test sonuçlarının herhangi biri (k=1,2,3,.....nij)

$\overline{y}_{ijk}$ = Test sonuçlarının ortalaması

Eurachem ve NMKL No:4’e göre;

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (x_i - \overline{x})^2}{n - 1}}$$

Tekrarüretilebilirlik standart sapması;

ISO 5725-2’ye göre;

$$s_{Rj}^2 = s_{rj}^2 + s_{Lj}^2$$

$$s_{Lj}^2 = \frac{s_{dj}^2 - s_{rj}^2}{\overline{\overline{n}}_j}$$

$$s_{dj}^2 = \frac{1}{p - 1} \sum_{i=1}^{p} n_{ij} (\overline{y}_{ij} - \overline{\overline{y}}_j)^2$$

$$\overline{\overline{n}}_j = \frac{1}{p - 1} \left[\sum_{i=1}^{p} n_{ij} - \frac{\sum_{i=1}^{p} n_{ij}^2}{\sum_{i=1}^{p} n_{ij}} \right]$$

Formüller karışık olduğu için aşağıdaki şekilde kolay hesaplama yöntemi kullanılabilir.

$$T_1 = \sum n_i \overline{y}_i$$

$$T_2 = \sum n_i (\overline{y}_i)^2$$

$$T_3 = \sum n_i$$

$$T_4 = \sum n_i^2$$

$$T_5 = \sum (n_i - 1) s_i^2$$

$$s_r^2 = \frac{T_5}{T_3 - p}$$

$$\hat{m} = \frac{T_1}{T_3}$$

$$s_L^2 = \left[\frac{T_2 T_3 - T_1^2}{T_3(p-1)} - s_r^2 \right] \left[\frac{T_3(p-1)}{T_3^2 - T_4} \right]$$

$$s_{Rj}^2 = s_{rj}^2 + s_{Lj}^2$$

n_i=Her gün içindeki tekrar sayısı

y_i=Test sonuçlarının günlük ortalaması

s_i= Günlük ölçümlerin standart sapması

s_L= Laboratuvarlar arası varyans

s_r= Tekrarlanabilirlik varyansı ve laboratuvar içi varyansların airtmetik ortalaması

s_R= Tekrarüretilebilirlik varyansı

p= gün sayısı

NMKL No:4'de tekrarüretilebilirlik hesabını ISO 5725-2 yanından iç kalite kontroldeki "R" grafiklerinin kullanımı ile de yapılabileceği belirtilmekte olup, standart sapma hesabından iki veri (x_i, y_i,) söz konusu olduğu için aşağıdaki formülün kullanılabileceği belirtilmiştir.

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

ISO 5725-3'de ara kesinlik (intermadiate precision) tanımı geçmektedir. Bu kesinliğe etki eden bileşenlerin (zaman, kalibrasyon, operator ve ekipman) değişkenliğine bağlı oluşmaktadır. Ara ölçümler tek bir laboratuvarda oluşabileceği gibi laboratuvarlar arası çalışmalarda da oluşabilmektedir.

Standart içinde basit yaklaşımla bilinen standart sapma hesabı yapılmakla birlikte, "t" grup ölçümün her biri için "n" sayıda tekrarla yapılması durumunda aşağıdaki formülle standart sapma hesabını önermektedir.

$$s_I = \sqrt{\frac{1}{t(n-1)} \sum_{J=1}^{t} \sum_{k=1}^{n} (y_{jk} - \overline{y}_j)^2}$$

t= Test örneği veya grup sayısı

Formül n=2 olması durumunda aşağıdaki şekilde daha basit olarak ifade edilebilmektedir.

$$s_I = \sqrt{\frac{1}{2t} \sum_{i=1}^{t} (y_{ij1} - y_{ij2})^2}$$

Aynı standartda laboratuvarlar arası çalışmalarda ara kesinlik hesabı içinde formüller belirtilmiştir.

Kalitatif analizlerde analiz sonucu “var/yok”, “tespit edildi/tespit edilmedi” gibi sonuçlar verilmektedir. Bu analizlerde kesinlik parametresi “yanlış pozitif” ve “yanlış negatif” olarak aşağıdaki formüllerle hesaplanır.

% yanlış pozitifler = yanlış pozitiflerin sayısı/bilinen negatiflerin toplamı ×100%

% yanlış negatifler = yanlış negatiflerin sayısı/bilinen pozitiflerin toplamı ×100%

Sapan sonuçların değerlendirilmesi

Grubb testi ve Cohran testi sapan verilerin ayrılması için uygulanılması ISO 5725-2’de önerilmektedir.

Cohran testi, en büyük varyans ile diğer varyanslar arasındaki farkın belirlenmesi için kullanılır. Testin kısıtlaması örneklerin normal dağılım gösterdiği varsayılır ve her bir örnek sayısı gruplarda eşit sayıdadır.

$$C = \frac{s_{mx}^2}{\sum_{t=1}^{p} s_t^2}$$

s_{max}^2= varyanslar içinde en büyük olan

s_t= diğer varyansların her biri

Elde edilen değer tablodaki değerle karşılaştırılır.

a- Değer kritik değerin %5'ine eşit veya bu değerden daha az ise, denenen madde doğru olarak kabul edilir.

b- Değer kritik değerin %5'inden büyük ve kendi kritik değerinin %1'inden küçük veya buna eşit ise, denenen madde uzakta kalan olarak adlandırılır ve tek bir yıldız işareti ile işaretlenir.

c- Değer kritik değerin %1'inden daha büyük ise, madde istatistiki açıdan değerlendirme dışı bırakılan olarak adlandırılır ve çift yıldız işareti ile işaretlenir.

Grubb testi, normal dağılımda sapan verilerin tespit edilmesi için kullanılır. Sapma şüpesi olan en yüksek (x_p) ve en düşük (x_l) değerler aşağıdaki formülde yerlerine konularak Grubb testi uygulanır.

$$G_p = \frac{(x_p - \overline{x})}{s}$$

$$G_1 = \frac{(\overline{x} - x_1)}{s}$$

$$\overline{x} = \frac{1}{p}\sum_{i=1}^{p} x_i$$

$$s = \sqrt{\frac{1}{p-1}\sum_{i=1}^{p}(x_i - \overline{x})^2}$$

Formüldeki değer Grubb test değerlendirme tablosundaki değer ile karşılaştırılır.

a- Sonuç kendi kritik değerinin %5'ine eşit veya bu değerden daha az ise, denenen madde doğru olarak kabul edilir.

b- Sonuç kendi kritik değerinin %5'inden büyük ve kendi kritik değerinin %1'inden küçük veya buna eşit ise, denenen madde uzakta kalan olarak adlandırılır ve tek bir yıldız işareti ile belirtilir.

c- Deney istatistiği kendi kritik değerinin %1'inden daha büyük ise, madde istatistiki açıdan değerlendirme dışı bırakılan olarak adlandırılır ve çift yıldız işareti ile belirtilir.

Test sonuçlarında iki en yüksek değer şüpheli ise aşağıdaki formüle göre Grubb testi uygulanır.

$$G = \frac{s_{p-1,p}^2}{s_0^2}$$

$$s_0^2 = \sum_{i=1}^{p} (x_i - \overline{x})^2$$

$$s_{p-1,p}^2 = \sum_{i=1}^{p-2} (x_i - \overline{x}_{p-1,p})^2$$

$$\overline{x}_{p-1,p} = \frac{1}{p-2} \sum_{i=1}^{p-2} x_i$$

Alternatif olarak test en küçük iki değerden şüpheleniliyorsa aşağıdaki formül kullanılır.

$$G = \frac{s_{1,2}^2}{s_0^2}$$

$$s_{1,2}^2 = \sum_{i=3}^{p} (x_i - \overline{x}_{1,2})^2$$

$$\overline{x}_{1,2} = \frac{1}{p-2} \sum_{i=3}^{p} x_i$$

Grubb ve Cohran testi tabloları EK -1 de verilmiştir.

Örnek 1- Birden fazla laboatuvarın katıldığı çalışma: ISO 5725-2'deki örnek aynen verilmiştir.

Kömürdeki kükürt içeriğinin belirlenmesi 8 laboratuvarda aynı metot ile çalışma yapılmış. Orjinal veriler aşağıdaki tabloda %m/m olarak belirtilmiştir.

Laboratuvar	Seviye			
	1	2	3	4
1	0,71	1,2	1,68	3,26
	0,71	1,18	1,7	3,26
	0,7	1,23	1,68	3,2
	0,71	1,21	1,69	3,24
2	0,69	1,22	1,64	3,2
	0,67	1,21	1,64	3,2
	0,68	1,22	1,65	3,2
3	0,66	1,28	1,61	3,37
	0,65	1,31	1,61	3,36
	0,69	1,3	1,62	3,38
4	0,67	1,23	1,68	3,16
	0,65	1,18	1,66	3,22
	0,66	1,2	1,66	3,23
5	0,7	1,31	1,64	3,2
	0,69	1,22	1,67	3,19
	0,66	1,22	1,6	3,18
	0,71	1,24	1,66	3,27
	0,69		1,68	3,24
6	0,73	1,39	1,7	3,27
	0,74	1,36	1,73	3,31
	0,73	1,37	1,73	3,29
7	0,71	1,2	1,69	3,27
	0,71	1,26	1,7	3,24
	0,69	1,26	1,68	3,23
8	0,7	1,24	1,67	3,25
	0,65	1,22	1,68	3,26
	0,68	1,3	1,67	3,26

Tablo 10: Kömürde farklı laboratuvarlara ait kükürt analiz sonuçları

Her bir laboratuvarın ortalamaları aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\overline{y}_{ij} = \frac{1}{n_{ij}} \sum_{k=1}^{n_{ij}} y_{ijk}$$

Hücre ortalamaları	1		2		3		4	
Laboratuvar	yiJ	niJ	yiJ	niJ	yiJ	niJ	yiJ	niJ
1	0,708	4	1,205	4	1,688	4	3,240	4
2	0,680	3	1,217	3	1,643	3	3,200	3
3	0,667	3	1,297	3	1,613	3	3,370	3
4	0,660	3	1,203	3	1,667	3	3,203	3
5	0,690	5	1,248	4	1,650	5	3,216	5
6	0,733	3	1,373	3	1,720	3	3,290	3
7	0,703	3	1,240	3	1,690	3	3,247	3
8	0,677	3	1,253	3	1,673	3	3,257	3

Tablo 11: Hücre ortalamaları sonuçları

Her bir laboratuvarın laboratuvar içi standart sapmaları aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$s_{iJ} = \sqrt{\frac{1}{n_{ij} - 1} \sum_{k=1}^{n_{ij}} (y_{ijk} - \overline{y}_{ij})^2}$$

Standart sapmalar	1		2		3		4	
Laboratuvar	iJ	niJ	iJ	niJ	iJ	niJ	iJ	niJ
1	0,005	4	0,021	4	0,010	4	0,028	4
2	0,010	3	0,006	3	0,006	3	0,000	3
3	0,021	3	0,015	3	0,006	3	0,010	3
4	0,010	3	0,025	3	0,012	3	0,038	3
5	0,019	5	0,043	4	0,032	5	0,038	5
6	0,006	3	0,015	3	0,017	3	0,020	3
7	0,012	3	0,035	3	0,010	3	0,021	3
8	0,025	3	0,042	3	0,006	3	0,006	3

Tablo 12: Standart sapma sonuçları

Sapan veriler için Cohran testi uygulanmıştır.

$$C = \frac{s_{mx}^2}{\sum_{t=1}^{p} s_t^2}$$

Cohran testinde tabloda n=3 ve p=8 de kritik değerler %5 için 0,516, %1 için ise 0,615'dir (Ek-5).

Seviye 1 için varyansların toplamı= 0,00182, en yüksek standart sapma 8 No'lu laboratuvara ait ve C= 0,347

Seviye 2 için varyansların toplamı 0,00636, en yüksek standart sapma 5 No'lu laboratuvara ait ve C=0,287

Seviye 3 için varyansların toplamı 0,00172, en yüksek standart sapma 5 No'lu laboratuvara ait ve C=0,598

Seviye 3 için varyansların toplamı 0,00463, en yüksek standart sapma 5 No'lu laboratuvara ait ve C=0,310

Veriler değerlendirildiğinde 3 nolu seviyede bir hücrenin verilerinin uzakta kaldığı ancak kural b'ye göre dışarıda bırakılmamaktadır.

Grubb testi her bir laboratuvarın ortalamaları alınarak aşağıdaki formüllerle uygulanır.

$$G_p = \frac{(x_p - \overline{x})}{s}$$

$$G_1 = \frac{(\overline{x} - x_1)}{s}$$

$$\overline{x} = \frac{1}{p}\sum_{i=1}^{p} x_i$$

$$s = \sqrt{\frac{1}{p-1}\sum_{i=1}^{p}(x_i - \overline{x})^2}$$

Seviye	Tekli en düşük	Tekli en yüksek	İkili en düşük	İkili en yüksek
1	1,24	1,80	0,539	0,298
2	0,91	2,09	0,699	0,108
3	1,67	1,58	0,378	0,459
4	0,94	2,09	0,679	0,132
Kritik değer (Ek-4'deki tablo)	2,126 ve 2,274		0,1101 ve 0,0563	

Tablo 13: Grubb test sonuçları

Tekrarlanabilirlik standart sapması seviye 1 için aşağıdaki formüle göre hesaplanır;

$$s_{rj}^2 = \frac{\sum_{i=1}^{p}(n_{ij}-1)s_{ij}^2}{\sum_{i=1}^{p}(n_{ij}-1)}$$

T_1=18,642

T_2=12,8837

T_3=27

T_4=95

T_5=0,004411

s_r^2=0,0002322

s_r= 0,01524

Tekrarüretilebilirlik standart sapması seviye 1 için aşağıdaki formüle göre hesaplanır;

$$s_{Rj}^2 = s_{rj}^2 + s_{Lj}^2$$

s_L^2=0,0004603

s_R^2=0,0006925

s_R=0,02632

Seviye	p	M	s_r	s_R
1	8	0,690	0,015	0,026
2	8	1,252	0,029	0,061
3	8	1,667	0,017	0,035
4	8	3,250	0,026	0,058

Tablo 14: Kömürde kükürt çalışması m, s_r, s_R değerleri

Örnek 2- Tek laboratuvar için örnek :

Benzo(a)piren analizi için metot validasyon çalışması planlanmıştır. Plana göre 6 gün süreyle her gün iki ölçüm olacak şekilde ölçüm yapılmıştır.

Benzo(a)piren (mg/kg)	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün	5. gün	6. gün
Tekrar 1	12,3	13	12,9	13,3	12,6	12,9
Tekrar 2	12,6	13,2	13,2	13,5	12,9	13,4

Tablo 15: Benzo(a)piren çalışma değerleri

Verilere Cochran testi uygulandığında C= 0,417 bulunmuştur. Kritik değerler tabloda %1 için 0,883, %5 için 0,781olarak verilmiştir. Buna göre değerler uygundur.

Verilere Grubb testi uygulandığında Gp=1,25, G1=1,60 olarak bulunmuştur. Taboda kritik değer %1 için 1,973, %5 için 1,887 olduğu için değerler uygundur.

$$T_1 = \sum n_i \overline{y}_i = 155,8$$

$$T_2 = \sum n_i (\overline{y}_i)^2 = 2023,92$$

$$T_3 = \sum n_i = 12$$

$$T_4 = \sum n_i^2 = 24$$

$$T_5 = \sum (n_i - 1) s_i^2 = 0,30$$

$$s_r^2 = \frac{T_5}{T_3 - p} = 0,050$$

$$\hat{m} = \frac{T_1}{T_3} = 12,98$$

$$s_L^2 = \left[\frac{T_2 T_3 - T_1^2}{T_3 (p-1)} - s_r^2 \right] \left[\frac{T_3 (p-1)}{T_3^2 - T_4} \right] = 0,087$$

$$s_R^2 = s_r^2 + s_L^2 = 0,137$$

$$s_r = 0,224$$

$$s_R = 0,370$$

$$RSDr = \%1,72$$

$$RSDR = \%2,85$$

Horwitz Oranı (HorRat)

Horwitz oranı (HorRat) veya değeri basit bir performans parametresi olup kimyasal metotların kesinliğinin kabul edilebilirliği konusunda bilgi verir. Her ne kadar laboratuvarlar arası relatif standart sapma (RSD_R) ile ilgili geliştirilmiş olsa da laboratuvar içi relatif standart sapma (RSD_r) içinde uygulanabilmektedir. HorRat değeri 2'den daha küçük olmalıdır.

- HorRat ≤ 0,5 ise metot tekrarüretilebilirliği çok düşüktür ve çalışmanın bağımsızlığında sorun vardır.
- 0,5 < HorRat ≤ 1,5 ise metot tekrarüretilebilirlik beklenen şekilde normaldir.
- HorRat > 1,5 ise metot tekrarüretebilirliği beklenenden daha yüksektir. Çalışmada gözden geçirme yapılması faydalı olacaktır.
- HorRat >2 ise metot tekrarüretebilirliğinde sorun vardır.

HorRat hesabı için aşağıdaki formüller kullanılır. Formülde yer alan "C" değeri konsantrasyon (mg/g, g/kg vb.) olup örneğin 100 g/100 g için 1, 1000 mg/kg için 0,001 ve 1 mg/kg için 0,000001 dir.

$$HorRat = \frac{RSD_{eldeedilen}}{RSD_{öngörülen}}$$

$$RSD_{öngörülen} = 2^{(1-0,5\,LogC)}$$

Doğruluk parametrelerinin pratikte kullanımı

Tekrarlanabilirlik Limiti; Tekrarlanabilirlik şartları altında elde edilen iki analiz sonucu arasında %95 olasılıklar olması beklenen maksimum farktır. Tekrarlanabilirlik limiti "r" ile ifade edilir ve tekrarlanabilirlik standart sapmasının 2,8 (1,96 X √2) ile çarpılmasından elde edilir.

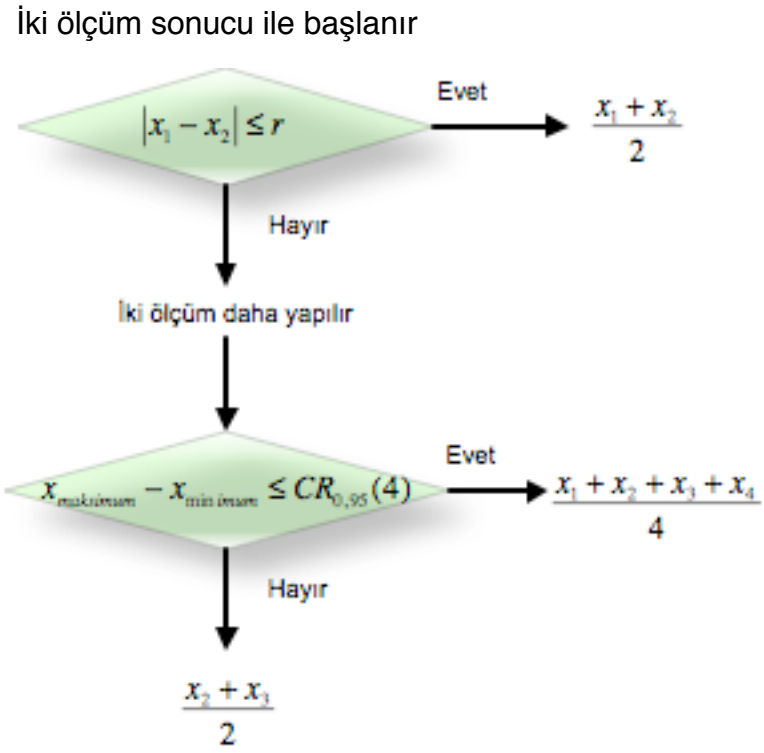
$r = 2.8 \times s_r$

Tekrarüretilebilirlik Limiti; Tekrarüretilebilirlik şartları altında elde edilen iki analiz sonucu arasında %95 olasılıklar olması beklenen maksimum farktır. Tekrarlanabilirlik limiti "R" ile ifade edilir ve tekrarüretilebilirlik standart sapmasının 2,8 ile çarpılmasından elde edilir.

İki test sonucu tekrarlanabilirlik koşulları altında elde edildiğinde iki sonuç arasındaki mutlak fark tekrarlanabilirlik limiti ile karşılaştırılır.

Test sonuçları pahalı olmayan bir yöntemle elde ediliyorsa;

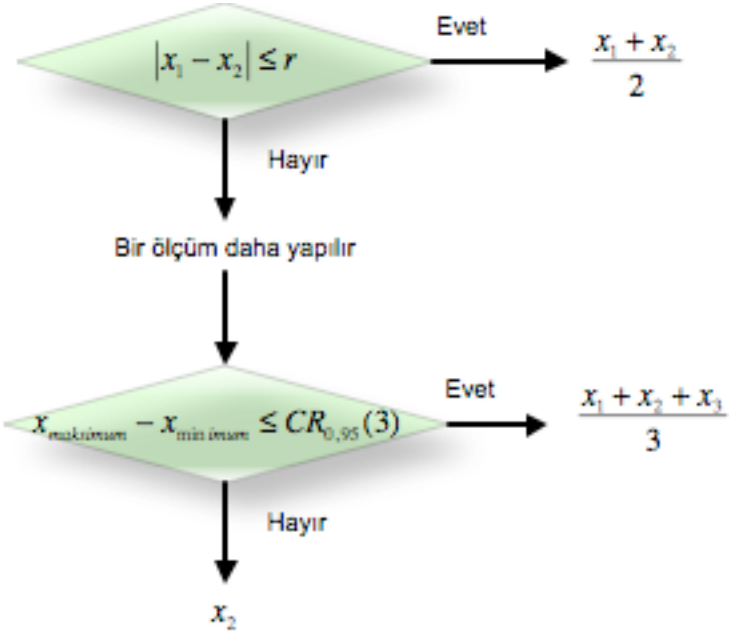
Eğer iki test sonucu farkı r'den fazla değilse bu iki sonucun aritmetik ortalaması alınır. Eğer fark r'den fazla ise laboratuvar iki çalışma daha yapar. En büyük değer ile en küçük değer arasındaki fark %95 olasılıkla kritik aralık faktörü (CR=f(n) ile tekrarlanabilirlik standart sapmanın çarpılması ile elde edilir. Eğer bu dört değerin maksimumu ile minimumu arasındaki fark olması gereken farka eşit veya küçükse bunların "*ortalamaları*" alınır, eğer büyükse dört değerin "*medyanı*" alınır.



Test sonuçları pahalı bir yöntemle elde ediliyorsa;

Eğer iki test sonucu farkı r'den fazla değilse bu iki sonucun aritmetik ortalaması alınır. Eğer fark r'den fazla ise laboratuvar bir çalışma daha yapar. En büyük değer ile en küçük değer arasındaki fark %95 olasılıkla kritik aralık faktörü, f(n) ile tekrarlanabilirlik standart sapmanın çarpılması ile elde edilir. Eğer bu üç değerin maksimumu ile minimumu arasındaki fark olması gereken farka eşit veya küçükse bunların "*ortalamaları*" alınır, eğer büyükse üç değerin "*medyanı*" alınır.

İki ölçüm sonucu ile başlanır



n	f(n)	n	f(n)
2	2,8	9	4,4
3	3,3	10	4,5
4	3,6	11	4,6
5	3,9	12	4,6
6	4,0	13	4,7
7	4,2	14	4,7
8	4,3	15	4,8

Tablo 16: Ölçüm sayısına göre kritik aralık faktörü

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.

5.6. Metot sağlamlığı (Ruggedness)

Sağlamlık (Robustness / Ruggedness), çalışmaları laboratuvardan kaynaklanan bazı küçük sapmaların ve bunların analiz sonuçları üzerine etkisini inceler. Bu çalışmanın yapılabilmesi için ön-araştırma çalışmaları, analiz önaşaması, temizleme ve analiz faktörlerini seçmek gerekir. Bu faktörler;

- Örnek 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 ufak değişikliklerin analiz sonucuna etkisi ne kadar az ise metot o kadar sağlamdır.

5.7. Metot validasyon verilerinin raporlanması

Metot validasyonu çalışmalarında elde edilen tüm sonuçlar değerlendirilerek uygun bir rapor formatı oluşturularak raporlanmalıdır. Validasyon raporları çalışılan metot, çalışan operatör, kullanılan ekipmanları, validasyon/verifikasyon tarihi ve değerlendirme sonuçlarını içerecek detayda olmalıdır.

Raporun eklerinde ham veriler, sonuçların istatistiksel hesapları ve yorumlar mutlaka verilmelidir. Validasyon raporları analiz yapan tüm operatörler tarafından okunmuş ve değerlendirilmiş olmalıdır. Yeni bir personelin çalışmalara katılması durumunda mutlaka önceki veriler konusunda bilgi sahibi olması sağlanmalıdır.

6. Metot validasyonu ve değişikliklerin etkisi

Metot çalışmaları sırasında günlük akış içerisinde değişiklikler oluşabilmektedir. Yeni personelin çalışmalara katılması, ekipman değişikliği, alan değişiklik vb. tüm bu durumlarda metot validasyonunun mevcut olan değerlere göre değişip değişmediği kontrol edilmelidir. NMKL No:4 rehberinde aşağıdaki şekilde bir gruplandırma yapılmış ve parametrelerin kontrol edilmesi önerilmiştir. Önerilen parametreler içinde kalın yazılı olanlar ayrıca yazar tarafından eklenen parametrelerdir NMKL prosedüründe yer almamaktadır.

a) Metotda modifikasyonlar: Metot minor veya daha ileri seviyede modifiye edililiyorsa tespit limiti, spesifite, gerçeklik ve kesinlik gözden geçirilmelidir.
b) Yeni bir matriks ile çalışıldığında: Metot yeni bir matriks ile çalışıldığında spesifite, gerçeklik, kesinlik ve **LOD, LOQ** tekrar edilmelidir.
c) Yeni bir kimyasal: Metodun yeni bir üreticiden alınan veya lotlar arasında büyük farklılıklar olması muhtemel yeni kimyasallarla analiz edilmesi gerektiğinde LOD ve sensitivite gözden geçirilmelidir.
d) Yeni bir enstrüman: Yeni bir enstrüman devreye alındığında ölçüm aralığı, linearite, **LOD**, LOQ ve kesinlik tekrar edilmelidir.
e) Yeni bir alan: Analiz yapılan alanda değişiklik olduğı zaman LOQ, linearite ve kesinlik kontrol edilmelidir.

f) Yeni bir analist: Metot yeni bir analistle çalışılacağı zaman, öncelikle personelin yetkinliğinden emin olunmalıdır. Bunun için LOQ, gerçeklik ve kesinlik çalışması yapılmalıdır.

g) Uzun süre kullanılmayan metotlar: Bir metot uzun süre kullanılmamışsa metodun valdiasyon verilerinin geçerliliği için LOQ, gerçeklik ve kesinlik yeniden gözden geçirilmelidir.

Sonuç;

Sonuç olarak metot validasyonu çalışması yeni başlayan analistler için her ne kadar karışık ve istatistiksel hesaplarla dolu gibi görünsede temelde uygulanan analiz metodunun tekrarları şeklinde çalışılmasından ibaret olduğu unutulmamalıdır. Çalışma esnasında rehberin başında bahsedilen validasyon parametreleri için deney deseninin oluşturulması ve bu desen doğrultusunda zaman planı yapılması uygulamayı kolaylaştıracaktır.

7. Kaynaklar

1. AOAC 2008: How to Meet ISO 17025 Requirements for Method Verification. www.aoac.org/alacc_guide_2008.pdf.
2. Eurachem Guide 1998: The fitness for purpose of analytical methods.
3. Funk W., Dammann V., Donnevert G. 2007. Quality Assurance in Analytical Chemistry. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.
4. Food Chemical Codex- Validation of food chemicals codex methods. FCC7, 1273-1287.
5. Horwitz W., Albert R. 2006. The Horwitz Ratio (HorRat): A Useful Index of Method Performance with Respect to Precision. Journal of AOAC, 89 (4):1095-1109.
6. ISO Guide 33:2000 Uses of certified reference materials.
7. ISO 5725-2:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results -- Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method.
8. ISO 5725-3:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results -- Part 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method.
9. ISO 5725-4:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results -- Part 4: Basic methods for the determination of the trueness of a standard measurement method.
10. ISO 5725-6:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results -- Part 6: Use in practice of accuracy values.
11. ISO 7870-1:2007 Control charts -- Part 1: General guidelines.
12. ISO 8258:1991 Shewhart control charts ISO 8258:1991/Cor 1:1993.
13. ISO 11095:1996 Linear calibration using referance materials.
14. ISO 11843-1:1997 Capability of detection -- Part 1: Terms and definitions.
15. ISO 11843-2:2000 Capability of detection -- Part 2: Methodology in the linear calibration case.
16. ISO 11843-3:2003 Capability of detection -- Part 3: Methodology for determination of the critical value for the response variable when no calibration data are used.
17. ISO 11843-4:2003 Capability of detection -- Part 4: Methodology for comparing the minimum detectable value with a given value.

18. ISO/TS 13530:2009 Water quality- Guidance on analytical qaulity control for chemical and physicochemical water analysis.
19. NMKL No:4 :2009 Validation of chemical analytical methods.
20. NMKL No:9: 2007 Evaluation of method bias using certified reference material.
21. Menditto A., Patriarca M., Magnusson B. 2007. Understanding the meaning of accuracy trueness and precision. Accred Qual Assur., 12:45-47.

8. EKLER

1- ANOVA hesabı

$$\overline{\overline{x}} = \left(\frac{n_1}{n_{toplam}}\right) \times \overline{x}_1 + \left(\frac{n_2}{n_{toplam}}\right) \times \overline{x}_2 + ... + \left(\frac{n_n}{n_{toplam}}\right) \times \overline{x}_n$$

$$SSF = n_1(\overline{x}_1 - \overline{\overline{x}})^2 + n_2(\overline{x}_2 - \overline{\overline{x}})^2 + ... + n_n(\overline{x}_n - \overline{\overline{x}})^2$$

$$SSE = \left[(n_1 - 1)s_1^2\right] + \left[(n_2 - 1)s_2^2\right] + ... + \left[(n_n - 1)s_n^2\right]$$

$$d_{f1} = p - 1$$

$$d_{f2} = n_{toplam} - p$$

$$MSB = SSF / d_{f2}$$

$$MSE = SSE / d_{f1}$$

$$F = MSB / MSE$$

n= Grupların örnek sayıları

$\overline{x}_1$ =Grupların ortalamaları

$\overline{\overline{x}}$ =Ağırlıklı ortalama

SSF= Gruplar arası hataların karelerinin toplamı

SSE= Grup içi hataların karesinin toplamı

d_f= Serbestlik derecesi (F tablosunda kullanılan, d_{f1} için F tablosunda dikey sütundaki, d_{f2} için yatay sütundaki değer alınır.)

p= grup sayısı

2- t - testi tablosu

		Çift yönlü		
f	**P= %90**	**P= %95**	**P= %99**	**P= %99.9**
1	6,314	12,706	63,657	636,619
2	2,920	4,303	9,925	31,598
3	2,353	3,182	5,841	12,924
4	2,132	2,776	4,604	8,610
5	2,015	2,571	4,032	6,869
6	1,943	2,447	3,707	5,959
7	1,895	2,365	3,499	5,408
8	1,860	2,306	3,355	5,041
9	1,833	2,262	3,250	4,781
10	1,812	2,228	3,169	4,587
11	1,796	2,201	3,106	4,437
12	1,782	2,179	3,055	4,318
13	1,771	2,160	3,016	4,221
14	1,761	2,145	2,977	4,140
15	1,753	2,131	2,947	4,073
16	1,746	2,120	2,921	4,015
17	1,740	2,110	2,898	3,965
18	1,734	2,101	2,878	3,922
19	1,729	2,093	2,861	3,883
20	1,725	2,086	2,845	3,850
21	1,721	2,080	2,831	3,819
22	1,717	2,074	2,819	3,792
23	1,714	2,069	2,807	3,767
24	1,711	2,064	2,797	3,745
25	1,708	2,060	2,787	3,725
26	1,706	2,056	2,779	3,707
27	1,703	2,052	2,771	3,690
28	1,701	2,048	2,763	3,674
29	1,699	2,045	2,756	3,659
30	1,697	2,042	2,750	3,646
∞	1,645	1,960	2,576	3,291
f	**P= %95**	**P= 97,5**	**P= 99,5**	**P= 99,95**
		Tek yönlü		

3- F- testi tablosu (%95)

f_2 \ f_1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15
1	161,4	199,5	215,7	224,6	230,2	234,0	236,8	238,9	240,5	241,9	243,9	245,9
2	18,51	19,00	19,16	19,25	19,30	19,33	19,35	19,37	19,38	19,40	19,41	19,43
3	10,13	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94	8,89	8,85	8,81	8,79	8,74	8,70
4	7,71	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	6,09	6,04	6,00	5,96	5,91	5,86
5	6,61	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,88	4,82	4,77	4,74	4,68	4,62
6	5,99	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	4,21	4,15	4,10	4,06	4,00	3,94
7	5,59	4,74	4,35	4,12	3,97	3,87	3,79	3,73	3,68	3,64	3,57	3,51
8	5,32	4,46	4,07	3,84	3,69	3,58	3,50	3,44	3,39	3,35	3,28	3,22
9	5,12	4,26	3,86	3,63	3,48	3,37	3,29	3,23	3,18	3,14	3,07	3,01
10	4,96	4,10	3,71	3,48	3,33	3,22	3,14	3,07	3,02	2,98	2,91	2,85
12	4,75	3,89	3,49	3,26	3,11	3,00	2,91	2,85	2,80	2,75	2,69	2,62
15	4,54	3,68	3,29	3,06	2,90	2,79	2,71	2,64	2,59	2,54	2,48	2,40

F testi tablosu (%99)

f_2 \ f_1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15
1	4052	5000,5	5403	5625	5764	5859	5928	5982	6022	6056	6106	6157
2	98,50	99,00	99,17	99,25	99,30	99,33	99,39	99,37	99,39	99,40	99,42	99,43
3	34,12	30,82	29,46	28,71	28,24	27,91	27,67	27,49	27,35	27,23	27,05	26,87
4	21,20	18,00	16,69	15,98	15,52	15,21	14,98	14,80	14,66	14,55	14,37	14,20
5	16,26	13,27	12,06	11,39	10,97	10,67	10,46	10,29	10,16	10,05	9,89	9,72
6	13,75	10,92	9,78	9,15	8,75	8,47	8,26	8,10	7,98	7,87	7,72	7,56
7	12,25	9,55	8,45	7,87	7,46	7,19	6,99	6,84	6,72	6,62	6,47	6,31
8	11,26	8,65	7,59	7,01	6,63	6,37	6,18	6,03	5,91	5,81	5,67	5,52
9	10,56	8,02	6,99	6,42	6,06	5,80	5,61	5,47	5,35	5,26	5,11	4,96
10	10,04	7,56	6,55	5,99	5,64	5,39	5,20	5,06	4,94	4,85	4,71	4,56
12	9,33	6,93	5,95	5,41	5,06	4,82	4,64	4,50	4,39	4,30	4,16	4,01
15	8,68	6,36	5,42	4,89	4,56	4,32	4,14	4,00	3,89	3,80	3,67	3,52

4- Grubb testi tablosu

P	Tekli en düşük veya tekli en yüksek		İkili en düşük veya ikili en yüksek	
	%1	%5	%1	%5
3	1,155	1,155	-	-
4	1,496	1,481	0,0000	0,0002
5	1,764	1,715	0,0018	0,0090
6	1,973	1,887	0,0116	0,0349
7	2,139	2,020	0,0308	0,0708
8	2,274	2,126	0,0563	0,1101
9	2,387	2,215	0,0851	0,1492
10	2,482	2,290	0,1150	0,1864
11	2,564	2,355	0,1448	0,2213
12	2,636	2,412	0,1738	0,2537
13	2,699	2,462	0,2016	0,2836
14	2,755	2,507	0,2280	0,3112
15	2,806	2,549	0,2530	0,3367
16	2,852	2,585	0,2767	0,3603
17	2,894	2,620	0,2990	0,3822
18	2,932	2,651	0,3200	0,4025
19	2,968	2,681	0,3398	0,4214
20	3,001	2,709	0,3585	0,4391
21	3,031	2,733	0,3761	0,4556
22	3,060	2,758	0,3927	0,4711
23	3,087	2,781	0,4085	0,4857
24	3,112	2,802	0,4234	0,4994
25	3,135	2,822	0,4376	0,5123
26	3,157	2,841	0,4510	0,5245
27	3,178	2,859	0,4638	0,5360
28	3,199	2,876	0,4759	0,5470
29	3,218	2,893	0,4875	0,5574
30	3,236	2,908	0,4985	0,5672
31	3,253	2,924	0,5091	0,5766
32	3,270	2,938	0,5192	0,5856
33	3,286	2,952	0,5288	0,5941
34	3,301	2,965	0,5381	0,6023
35	3,316	2,979	0,5469	0,6101
36	3,330	2,991	0,5554	0,6175
37	3,343	3,003	0,5636	0,6247
38	3,356	3,014	0,5714	0,6316
39	3,369	3,025	0,5789	0,6382
40	3,381	3,036	0,5862	0,6445

5- Cochran testi tablosu

p	n=2		n=3		n=4		n=5		n=6	
	%1	%5	%1	%5	%1	%5	%1	%5	%1	%5
2	-	-	0,995	0,975	0,979	0,939	0,959	0,906	0,937	0,877
3	0,993	0,967	0,942	0,871	0,883	0,798	0,834	0,746	0,973	0,707
4	0,968	0,906	0,864	0,768	0,781	0,684	0,721	0,629	0,676	0,590
5	0,928	0,841	0,788	0,684	0,696	0,598	0,633	0,544	0,588	0,506
6	0,883	0,781	0,722	0,616	0,626	0,532	0,564	0,480	0,520	0,445
7	0,838	0,727	0,664	0,561	0,568	0,480	0,508	0,431	0,466	0,397
8	0,794	0,680	0,615	0,516	0,521	0,438	0,463	0,391	0,423	0,360
9	0,754	0,638	0,573	0,478	0,481	0,403	0,425	0,358	0,387	0,329
10	0,718	0,602	0,536	0,445	0,447	0,373	0,393	0,331	0,357	0,303
11	0,684	0,570	0,504	0,417	0,418	0,348	0,366	0,308	0,332	0,281
12	0,653	0,541	0,475	0,392	0,392	0,326	0,343	0,288	0,310	0,262
13	0,624	0,515	0,450	0,371	0,369	0,307	0,322	0,271	0,291	0,243
14	0,599	0,492	0,427	0,352	0,349	0,291	0,304	0,255	0,274	0,232
15	0,575	0,471	0,407	0,335	0,332	0,276	0,288	0,242	0,259	0,220
16	0,553	0,452	0,388	0,319	0,316	0,262	0,274	0,230	0,246	0,208
17	0,532	0,434	0,372	0,305	0,301	0,250	0,261	0,219	0,234	0,198
18	0,514	0,418	0,356	0,293	0,288	0,240	0,249	0,209	0,223	0,189
19	0,496	0,403	0,343	0,281	0,276	0,230	0,238	0,200	0,214	0,181
20	0,480	0,389	0,330	0,270	0,265	0,220	0,229	0,192	0,205	0,174
21	0,465	0,377	0,318	0,261	0,255	0,212	0,220	0,185	0,197	0,167
22	0,450	0,365	0,307	0,252	0,246	0,204	0,212	0,178	0,189	0,160
23	0,437	0,354	0,297	0,243	0,238	0,197	0,204	0,172	0,182	0,155
24	0,425	0,343	0,287	0,235	0,230	0,191	0,197	0,166	0,176	0,149
25	0,413	0,334	0,278	0,228	0,222	0,185	0,190	0,160	0,170	0,144
26	0,402	0,325	0,270	0,221	0,215	0,179	0,184	0,155	0,164	0,140
27	0,391	0,316	0,262	0,215	0,209	0,173	0,179	0,150	0,159	0,135
28	0,382	0,308	0,255	0,209	0,202	0,168	0,173	0,146	0,154	0,131
29	0,372	0,300	0,248	0,203	0,196	0,164	0,168	0,142	0,150	0,127
30	0,363	0,293	0,241	0,198	0,191	0,159	0,164	0,138	0,145	0,124
p= laboratuvar sayısı , n= test sonucu sayısı										