

Adli Tıp Kurumu Trabzon Grup Başkanlığı Kimya İhtisas Dairesinin akreditasyon ve validasyon çalışmalarının değerlendirilmesi

Assessment of Accreditation and Validation Studies of Chemistry Specialization
Department of Trabzon group headship of forensic medicine institution

 Özgür Turna^{1*},
0009-0008-4418-5058


 Hüseyin Çetin Ketenci²,
0000-0002-0662-1479

 Hülya Ustaoglu¹,

 Fatih Çakıroğlu¹,
0009-0006-6130-2960

 Mukadder Dilek Erkan¹,
0009-0006-4345-0070

 Kübra Şahin¹,
0009-0006-0301-7926

 Şansan Bahçekapılı¹
0009-0003-2737-1063

ÖZET

Amaç: Akreditasyon kalite güvence aracı olduğundan, akreditasyonda kaliteli hizmeti sağlayabilmek için örgütsel inanç, eylem ve uyumu içeren üç temel aşama gereklidir. Bu üç temel aşama ışığında Trabzon Grup Başkanlığı Kimya İhtisas Dairesi olarak amacımız sunmuş olduğumuz hizmetin kalitesini ölçmek, çalışan, analiz ve kurum düzeyinde iyileştirmeler planlayıp uygulamak ve yeniden değerlendirme sürecini bir sistem dâhilinde sürekli hale getirmektir.

Yöntem: Trabzon Grup Başkanlığı Morg İhtisas Dairesi Otopsi Şubesinde alınan NaF'lı kan örneklerinde, kantitatif etanol ölçümleri HS/GC/FID (Head Space/Gaz Kromatografi/ Alev İyonlaşma Dedektörü) cihazında yapılmıştır. Kolon olarak, Elite-BAC1 Advantage (30mx0.32mmx1.8µm) ve Elite-BAC2 Advantage (30mx0.32mmx1.8µm) kapiler kolonları kullanılmıştır.

Bulgular: Metodun ilgili performans kriterlerine uygunluğunun saptanması için metod parametrelerinin belirlenip incelendiği geçerli kılma yani validasyon çalışmaları tamamlanmıştır. Metod validasyonu için incelenen performans kriterleri; doğruluk, kesinlik, tespit limiti, tayin limiti, doğrusalılık ve ölçüm aralığı, seçicilik, sağlamlık olup bu parametrelerin istenilen değerlerde olduğu görülmüştür. Ayrıca, metoda ait belirsizlik bütçesinde kalibrasyon eğrisinden, geri kazanımdan, doğruluktan, tekrarlanabilirlikten ve tekrar üretilebilirlikten gelen bileşenler hesaplanarak % 95 güven aralığında (k=2), etanolün yasal sınırı olan 50 (mg/dL) değerinin ölçüm belirsizliği ± 2 (mg/dL) olarak belirlenmiştir.

Sonuç: Laboratuvar akreditasyonu, laboratuvarların yeterliliğinin resmi olarak tanınmasını sağlayarak müşterilere güvenilir analiz ve raporlama hizmetlerini sunar. Kimya İhtisas Dairesi olarak birliktelik hizmeti yapmış olmamız ve laboratuvarlarımızın hizmet kalitesini artırma isteği bizi akredite olmaya iten etkenlerin başında gelmektedir. Bu amaçla çalışmalarımız kapsam genişlemesi yönünde devam etmekte olup kaliteden taviz vermeden devamlı olarak gelişmeyi hedeflemekteyiz. Bu çalışmada, Otopsi Şubesinde alınan kan örneklerinde HS/GC/FID ile kantitatif etanol analizi metodunun laboratuvarlarca güvenilir metod olduğu ve kullanılabilirliği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Akreditasyon, metod validasyonu, ölçüm belirsizliği, kalibrasyon, etanol

ABSTRACT

Objective: Three basic processes, which consist of organizational belief, consistency, and action, are required to ensure qualified employment since accreditation is a quality assurance tool. In light of these processes, our goal as the Chemistry Specialization Department of Trabzon Group Headship is to measure our service quality, apply improvements that are planned at the level of institution, employee analysis, and systematically provide permanence to the reassessment process.

Method: Quantitative ethanol measurements were carried out on NaF blood samples, which were supplied from the Autopsy Unit of the Morgue Specialization Department of Trabzon Group Headship using (Head Space/Gas Chromatography/Flame ionization detector) instrument. Elite-BAC1 Advantage (30mx0,32mmx1,8µm) and Elite-BAC2 Advantage (30mx0,32mmx1,8µm) capillary columns were used.

Results: Validation studies were completed for the determination of the compatibility of the method with performance criteria. It was observed that these criteria, namely accuracy, certainty, detection and determination limits, linearity and measurement range, selectivity, and robustness, were within the desired values. Moreover, the contribution of uncertainties from the calibration curve, recovery, accuracy, repeatability, and reproducibility were calculated, and the measurement uncertainty of 50(mg/dL), which is the legal limit of ethanol at a 95% confidence interval (k=2), was determined as ± 2 (mg/dL).

Conclusion: Laboratory accreditation offers requesters reliable analyses and reporting services by formally providing the proficiencies of the laboratories. As the Chemistry Specialization Department, our desire to increase service quality and expert services are the main factors that encourage us to accredit. For this purpose, our studies continue with the aim of expanding the scope, and we aim for improvement consistently without compromising quality. In this study, it is demonstrated that the ethanol analysis method by HS/GC/FID on blood samples obtained from an autopsy unit is reliable and applicable in laboratories.

Keywords: Accreditation, method validation, measurement uncertainty, calibration, ethanol

Cite as: Turna Ö, Ketenci HÇ, Ustaoglu H, Çakıroglu F, Erkan MD, Şahin K, Bahçekapılı Ş. Adli Tıp Kurumu Trabzon Grup Başkanlığı Kimya İhtisas Dairesinin akreditasyon ve validasyon çalışmalarının değerlendirilmesi. J For Med 2024;38(2):93-106

Received: 11.06.2024 • **Accepted:** 05.07.2024

Corresponding Author: Özgür TURNA, Adli Tıp Kurumu Trabzon Grup Başkanlığı Kimya İhtisas Dairesi, Yalınca Mah, İstiklal Cd, No:3A Ortahisar/ Trabzon, Türkiye

E-mail: turnaozgur@hotmail.com

¹Adli Tıp Kurumu Trabzon Grup Başkanlığı Kimya İhtisas Dairesi, Trabzon, Türkiye

²Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı, Rize, Türkiye



Turkish Journal of Forensic Medicine is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

GİRİŞ

Günümüz koşullarında bilgi, teknoloji ve iletişim alanında yaşanan büyük gelişmeler toplumları kıyasıya bir rekabete ve her geçen gün yeni gelişmelerin yaşandığı ekonomik bir yarış içerisine sürüklemektedir. Müşteriler artık daha bilinçli, daha bilgili hale gelmiş ve müşteri beklentileri en üst seviyeye ulaşmıştır. Bugünkü ekonomik sistem içinde kurum ya da kuruluşların varlığını sürdürebilmesi, müşteri ihtiyaç ve beklentilerini karşılayabilecek mal üretiminin veya hizmetin sağlanmasıyla gerçekleşebilecektir. Bu sebeple, kuruluşlarda, tasarım aşamasından başlayarak üretim, pazarlama ve satış sonrası hizmetlere kadar tüm aşamaları kapsayan ve sürekli iyileşmeyi hedefleyen Kalite Yönetim Sistemi'nin uygulanması şart olmuştur (1).

Değişim hızı artmış, özellikle teknoloji alanında yaşanan gelişmeler neticesinde kalitenin tek başına sunulması yeterli olmamaya başlamış, artan ürün çeşitliliği, bu ürünlerin işlevselliği ve akabinde; kullanım amacına uygunluk, performans, dayanıklılık, güvenilirlik gibi taleplerin uygulanmasına yönelik güvence arayışlarını ortaya çıkarmış, böylece akreditasyon kavramı ortaya çıkmıştır (2).

Akreditasyon, genellikle gönüllü kurum veya kuruluşların yapı ve süreçlerinin, önceden oluşturulmuş performans standartlarına uygunluğunun, bu amaçla eğitilmiş bağımsız dış denetçiler tarafından multidisipliner bir ekip aracılığıyla denetlenmesi neticesinde tüzel bir kişilik tarafından onaylanan resmi bir süreçtir.

Akredite olmak kurum açısından önem arz etmektedir. Çünkü akredite edilmiş bir kurum ürettiği ürünün ya da sağladığı hizmetin kalitesi açısından rakiplerine göre daha avantajlı konuma gelmektedir. Kuruma duyulan güvenin ve kurumun saygınlığının artması da akreditasyonla yakından ilgilidir. Bu sebeple akredite edilecek kurumların belirlenen standartları sağlamaları ve sürdürmeleri gerekmektedir (1).

Adli Tıp Kurumu adalete hizmet eder. Her vatandaş adalete sisteminin doğru çalıştığından emin olmak ister. Dolayısıyla, Adli Tıp Kurumları doğru sonuçlar üretmelidir ve bu sonuçların doğruluğunu ispatlamalı

ve gösterebilmelidir. Sunulan adalet hizmetlerinin değerlendirilmesi ancak akreditasyon programları gibi amaca yönelik belirlenen kriterler, göstergeler ve standartların, bağımsız değerlendiriciler aracılığıyla değerlendirilmesi ile mümkündür.

Geçerli kılma yani validasyon, metodun ilgili performans kriterlerine uygunluğunun saptanması için metod parametrelerinin belirlenip incelendiği bir geçerlilik çalışmasıdır. Metod geçerli kılınması, metod ilk defa uygulanmaya başlanmadan önce, daha önce geçerliliği belirlenmiş metotta değişiklik yapıldığında ya da başka bir laboratuvarında kullanımında, metodun farklı cihaz ve farklı kişi tarafından uygulanması durumunda yapılmaktadır (3).

Bu çalışmada amacımız, Otopsi Şubesinde alınan kan örneklerinde, HS/GC/FID yöntemiyle etanolün kantitatif analiz metodunun geçerli kılınması ve ölçüm belirsizliğinin hesaplanmasıdır. Ayrıca akreditasyonla birlikte çalışan tüm personelimizi, işini iyi yapmak için bilgilenme süreçlerine katmak, fikirlerine değer vermek sonuç olarak da tatminkarlık düzeyleri yükselttilerek kalite faaliyetlerine ilgiyi artırmaktır.

Laboratuvar standardizasyonu

alkol Laboratuvarımızda ISO/IEC 17025 standardına uygun olarak, test işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bu standart kapsamında tanımlanan sorumlulukları aşağıdaki tabloda iki ana başlık halinde incelemek mümkündür.

Tablo 1. Kalite Yönetim Sistemi İlkeleri

Yönetim Sistemi Gereklilikleri	Kaynak ve Proses Gereklilikleri
Organizasyon ve yönetim	Personel
Kalite sistemi	Yerleşim ve çevre koşulları
Sözleşmelerin gözden geçirilmesi	Metotların seçilmesi
Satın alma hizmetleri	Cihazlar
Şikâyetler	Ölçüm izlenebilirliği
Uygun olmayan testlerin kontrolü	Numune kabul, depolama ve taşıma
Düzeltilici ve önleyici faaliyet	Sonuçların kalitesinin temini
Kayıtların kontrolü	Sonuçların rapor edilmesi
İç tetkik	

Akreditasyon uygulama aşamaları

bir deney laboratuvarının hizmetine müşteri olurken bu laboratuvarın doğru ve güvenilir sonuçlar

elde ettiğinden emin olmak önemli olup aşağıda sayılan parametreler göz önünde bulundurularak laboratuvarlarımız geçerli kılma testleri ve akreditasyon için hazır hale getirilmiştir.

Akreditasyona başlangıç hazırlıklarının yapılması

Akreditasyonu hedeflenen konu belirlenerek kapsamı ortaya konulmuştur. Çalışma ekibi oluşturularak organizasyon şeması ile uygun çalışma ortamı ve şartları belirlenmiştir. Standart ve kaynakların temini ve çalışma planının oluşturulması bu aşamada gerçekleştirilmiştir.

Gerekli eğitimlerin verilmesi

ISO/IEC 17025 standardı ve proje aşamalarının tanıtılması ve ilgili personellerin bilgilendirilmesi maksadıyla "TS EN ISO 17025 deney ve kalibrasyon laboratuvarlarının yeterliliği için genel şartlar ve yetkinliği için genel gereklilikler temel eğitimleri ile ölçüm belirsizliği eğitimi" alınmıştır.

Doküman hazırlama

gerekli dokümantasyon için Kalite El Kitabı, Prosedürler, Talimatlar, Formlar, vb. hazırlanmıştır.

Sistemin uygulanması

ISO/IEC 17025 standart gereklerine uygunluk sağlanarak, belirlenen dokümantasyona göre uygulamalar hayata geçirilmiştir. Cihaz ve ekipmanların bakımı ve kalibrasyonu, metotların valide edilmesi, yerleşim ve çevre koşullarının iyileştirilmesi sağlanmıştır. Test laboratuvarları için ölçüm belirsizliğinin hesaplanması, kullanılan yazılımların geçerli kılınması, sistemin sürekliliğinin sağlanması vb. konular irdelenmiştir.

İç tetkiklerin yapılması

Sistemin kurulmasını takiben süreç ve prosedürlerin yeterli olarak dokümanite edilip edilmediği ve işlerliği, oluşturulan iç tetkik ekibi tarafından denetlendi ve sonrasında bulunan eksiklikler, yapılan tespitler, öneriler ve akreditasyon denetimine kadar yapılması gereken çalışmalar üst yönetime rapor halinde sunulmuştur.

Akreditasyon başvurusunun yapılması

Sistemin hazır olduğuna karar verildiği zaman, akreditasyon başvurusu ilgili akreditasyon kuruluşuna yapılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Kimyasallar ve çözeltiler

Çalışmalarda kullanılmak üzere Otopsi Şubesinde, NaF'lı tüplere alınan kan örnekleri, Kimya İhtisas Dairesine gönderildi. Pozitif kontrol örneği olarak Clinica Wb Volatiles Control Level II kullanıldı. Etil alkol (%99.9), n- propanol (%99.9) ve deiyonize su Merck firmasından temin edildi.

İç standart çözeltisinin hazırlanması

İç standart olarak n-propanol kullanıldı. 1000 mL'lik balon jojeye 800 µL n-propanol konuldu. Deiyonize su ile 1000 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan bu 63.36 mg/dL'lik stok çözelti buzdolabında +4 °C'de muhafaza edildi.

Kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması

Etanol çözeltisi kullanılarak, (7.90; 15.80; 31.61; 79.02; 158.04; 395.10 mg/dL) konsantrasyonları arasında kalibrasyon çözeltileri hazırlandı. Hacim olarak belirtilen miktarlara deiyonize su ile tamamlandı.

Negatif kontrol örneği hazırlanması

Flakona (1mL) n-propanol çözeltisi konuldu ve üzerine (0.2mL) deiyonize su örneği ilave edildi. Çalışma dizisinin başında analiz edildi.

Pozitif kontrol örneği hazırlanması

Pozitif kontrol örneği olarak sertifikalı standart kan örneği kullanıldı. Flakona (1mL) n-propanol çözeltisi konuldu. Daha sonra (0.2mL) pozitif kontrol kan örneği, flakona ilave edildi. Çalışma dizisinin başında negatif kontrol örneğinden hemen sonra ve dizinin sonunda analiz edildi.

Gerçek kan örneklerinin analize hazırlanması

Flakonlara (1mL) n-propanol çözeltisi konuldu. Daha sonra (0.2mL) kan örneği, flakona ilave edildi. Sırasıyla diğer kan örneklerine de aynı işlem uygulandı. Flakon bekletilmeden analiz edilmek üzere HS/GC/FID cihazına yerleştirildi.

Cihazlar ve aletler

Cihaz modeli, HS/GC Perkin Elmer Clarus 580 GC TMHS 110, yazılım Totalchrom Navigator ve Turbo Matrix'dir. Kolon olarak Elite BAC-1 Advantage (30m x 0.32mm) (max. 260 °C) ve Elite BAC-2 Advantage (30m x 0.32mm) (max. 260 °C) analitik kolonları kullanıldı.

Cihaz Parametreleri

Cihazda taşıyıcı gaz helyum, dedektör gazları hidrojen ve hava kullanıldı.

HS parametreleri: Fırın (vial) =70°C, İğne sıcaklığı =75°C, Isıtma süresi =15 dakika, Enjeksiyon süresi = 0.01 dakika, GC devir süresi = 11 dakika, Basınç uygulama süresi = 0.2 dakika.

GC parametreleri: Fırın sıcaklık programı: 40°C izotermal, Dedektör sıcaklığı (FID): 250°C, Hidrojen akış hızı: 45mL/ dakika, Hava akış hızı: 450mL/ dakika, Helyum basıncı: 30psi

Metot geçerli kılma parametreleri

Bu geçerli kılma çalışmasında etanolün miktar tayini için; doğruluk (gerçeklik), kesinlik, tespit limiti, tayin limiti, doğrusalılık (lineer çalışma aralığı), seçicilik ve sağlamlık parametreleri test edilmiştir.

Doğruluk

Ölçülen değer doğru ya da doğru kabul edilen değere yakınlığını gösterir. Gerçeklik (veya doğruluk) genellikle bias olarak ifade edilir (4). Bias (Hata), tekrarlanabilirlik veya tekrar üretilebilirlik koşulları altında yapılan ölçümlerin ortalaması ile sertifikalı referans materyalin sertifika değeri arasındaki farkın mutlak değeridir. Bağıl hata ise bu değer (mutlak hata) gerçek değere oranının yüzde olarak ifade edilmesidir ve gerçek değere ne kadar yaklaşıldığını oransal olarak gösteren bir hata çeşididir.

$$b = \bar{X} - X_{Ref} \quad \%b = (\bar{X} - X_{Ref}) / X_{Ref}$$

Bu formülde verilen b bias (mutlak hata), %b bağıl bias (bağıl hata), \bar{X} referans materyal ile yapılan analiz sonuçları ortalaması ve X_{Ref} referans değeri (referans materyalin sertifika değeri) ifade etmektedir (5). Doğruluk için kabul edilebilir kriter, nominal değerden $\pm \%15'$ den fazla sapmanın olmamasıdır (6).

Geri Kazanım

Geri kazanım çalışmaları da doğruluğu yansıtır. Özellikle yöntem karşılaştırması yapılmadığında daha değerlidir. Geri kazanım çalışmasında, bilinen üç farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek) analit, örneğe ilave edilerek (spike) örnek analiz edilir ve tespit edilen analit konsantrasyonu ile bilinen miktar (%100 geri kazanımı temsil eden) oranlanarak geri kazanım hesaplanır. Yüzde olarak ifade edilir.

$$\text{Geri Kazanım (\%)} = (C_1/C_2) \times 100$$

Bu formülde verilen C_1 kalibrasyon eğrisinden hesaplanan konsantrasyon değerini (mg/dL), C_2 ise bilinen konsantrasyon değerini (mg/dL) ifade etmektedir (4). Metot geçerli kılma çalışmaları kapsamında gerçekleştirilen geri kazanım çalışmalarında %70-120 aralığı esas alınmaktadır (7).

Kesinlik

Kesinlik, aynı şartlarda birden fazla ölçüm sonuçlarının birbirlerine yakınlığının ifadesidir. Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik bileşenlerini içeren kesinlik parametresi için yapılan ölçümlerin, standart sapma (S) ve bağıl standart sapma (RSD) veya % bağıl standart sapma değerleri hesaplanır. Literatüre bakıldığında ise genel olarak % RSD değeri için kabul edilebilir değerinin $\leq \%20$ olması beklenmektedir (8). Kesinlik, rasgele hatalardan etkilenir. İyi çalışma teknikleri ile küçültülebilir; ancak tamamen elimine edilemez (5).

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad \%RDS_r = \frac{s}{\bar{x}} * 100$$

Bu formülde verilen S standart sapma, X_i çalışmadaki her bir veriyi, \bar{X} verilerin aritmetik ortalamasını ifade etmektedir. Gerek ölçüm belirsizliğini iyileştirmek (düşürmek) gerekse tüm sonuçları dahil ederek daha gerçekçi sonuç verilmek istendiğinde aşağıdaki eşitlik kullanılarak farklı standart sapmalar bir araya getirilebilirler (havuzda toplanırlar) (9).

$$S' = \sqrt{\frac{(n-1)s_x^2 + (m-1)s_y^2}{m+n-2}}$$

Formülde verilen n ve m her bir veri serisindeki tekrar ölçüm sayısını, s: her bir veri serisine ait standart sapmayı göstermektedir.

Her bir seride elde edilen ortalama ve standart sapma değerleri kullanılarak her bir uzmanın farklı konsantrasyon seviyelerindeki kesinlik değerleri arasında fark olup olmadığı t-testi ile kontrol edilir. t testi ile karşılaştırma için aşağıdaki formül kullanılır.

$$T_{\text{hesaplanan}} = \frac{(\bar{x} - \bar{y})}{s' \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m}}}$$

%95 güven aralığında hesaplanan “hesaplanan t” değeri, “kritik t” değerine eşit veya küçük olursa metotlar arasında önemli fark olmadığını gösterir. Kesinlik hesabı, matrikse uygun kör veya düşük seviyede analit içeren materyal kullanılarak en az 6 tercihen 10 bağımsız çalışma ile elde edilmelidir (10).

Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik, bir metodun aynı laboratuvarında, aynı cihazla/metotla, aynı uygulama koşulları altında, aynı kişi tarafından kısa zaman aralığında, aynı veya benzer matrikslerde elde edilen ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının ölçüsüdür.

Tekrarlanabilirlik çalışması yapılırken onar ölçüm yapılmıştır ancak tekrarlanabilirlik kaynaklı belirsizlik hesabında bu on ölçümün altısı kullanılmıştır.

Tekrar Üretilirlik

Laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik, bir metodun aynı laboratuvarında aynı/farklı cihazlarla, farklı kişiler tarafından, geniş zaman aralığında, aynı veya eş değer matrikslerde yaptığı ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının ölçüsüdür.

Hem tekrarlanabilirlik hem de tekrar üretilebilirlik analit konsantrasyonuna bağlı olarak değiştiği için değişik konsantrasyonlarda (düşük, orta, yüksek gibi) tespit edilmelidir (10).

Tespit Limiti (LOD) ve Tayin Limiti (LOQ)

Tespit limiti (LOD), metodun laboratuvar koşullarında örnekteki varlığını tespit edebildiği ancak kesin miktarını ölçemediği en düşük analit konsantrasyonu; tayin limiti (LOQ) ise miktarsal olarak tespit edilebilen en düşük analit konsantrasyonu olarak tanımlanabilir (11).

Kabul edilebilir en düşük konsantrasyonda kirlenmiş kör örnek ile yapılan 10 analiz sonucu üzerinden LOD ve LOQ değerleri hesaplanır.

$$\text{Tespit Limiti (LOD)} = C_{\text{ort}} + 3 \times s$$

$$\text{Tayin Limiti (LOQ)} = C_{\text{ort}} + 10 \times s$$

C_{ort} : Kirlenmiş kör örnek analizlerinin ortalaması

s: Kirlenmiş kör örnek analizlerinin standart sapması

LOQ hesaplaması için kabul edilebilir kriter, \pm %20'den fazla sapmanın olmamasıdır (12).

Çalışma Aralığı

Ölçüm aralığı, metot geçerli kılma çalışmalarında analit konsantrasyonları dikkate alınarak, metodun uygulama aralığının belirlenmesi için yapılır. Kalibrasyon eğrisinde ölçülen analitin miktarı (konsantrasyonu) ve dedektör yanıtının (response) doğru orantılı olarak görüldüğü aralıktır (10).

Eğrinin oluşturulması, 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 3 olarak belirtilmiştir. 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 (10).

Seçicilik

Özgünlük, analiz yönteminin hedef analiti matrikste bulunabileceği düşünülen diğer bileşenler varlığında doğru ve özgün olarak tanıma ve ölçme yapabilmesidir. Yani diğer bileşenler (safsızlıklar, matriks bileşenleri ve bozulma ürünleri) varlığında hedef analite ait alıkonma zamanında sadece analite ait piklerin gözlenmesidir (3).

Kromatografik sistemlerde sonuçların güvenilirliği için iyi ayrılmış piklerin elde edilmesi ön koşuldur. Ayırma faktörü (Rs) aşağıdaki formül ile hesaplanabilir.

$$R_s = 2 \times \frac{(R_{t_2} - R_{t_1})}{w_1 + w_2}$$

Çözünürlük formülünde Rs ayırma gücünü, R_{t_1} ve R_{t_2} iki pike ait alıkonma zamanlarını, w_1 ve w_2 'de pik genişliklerini temsil etmektedir. Genellikle, hedef analite ait pik ile diğer bileşene ait en yakın pik arasındaki kabul edilen çözünürlük değeri $R_s \geq 2$ 'dir (13).

Sağlamlık (Dayanıklılık)

Sağlamlık, bir deney metodunun, sonucu etkileyen önemli parametreleri üzerinde yapılan küçük planlı değişikliklerin, sonuca etki düzeylerinin belirlenmesidir. Bu etkilerin istatistiksel olarak önemsiz olması metodun, ilgili parametreler için sağlam olduğunu gösterir (14).

Ölçüm Belirsizliği

Ölçüm belirsizliği Uluslararası Temel ve Genel Metroloji Terimleri Sözlüğü'nde "ölçülen büyüklüğe mantıklı bir şekilde atfedilebilecek bütün değerlerin dağılımını karakterize eden ve ölçüm sonucuyla ilişkili olan bir parametre" olarak tanımlanmıştır (15). Ölçüm sonucuna ait değerlerin dağılımı ve kalitesi hakkında bilgi vermektedir. Doğrulanmış yöntemlerle yapılan ölçüm belirsizliğinin tayini, iki farklı yöntemle elde edilmiş sonuçları karşılaştırmak, sonuçların güvenilirliğini sağlamak ve sonuçların yasal sınırlardaki ihtilaflarını azaltmak için önem arz etmektedir (16). Bu parametrenin hesaplanması için belirsizliğe sebep olabileceği düşünülen belirsizlik kaynaklarının belirlenmesi gerekmektedir.

Belirsizlik hesaplama yöntemleri ile tüm bileşenlerin ayrı ayrı katkıları hesaplanarak birleşik standart belirsizlik (u_c) ve birleşik standart belirsizlik k faktörü (kapsam faktörü) ile çarpılmasından genişletilmiş belirsizlik (U) belirlenir. Genelde %95'lik bir güven aralığı için $k=2$ kullanılır (17). Deney sonucuna (y) ait ölçüm belirsizliği, $y \pm U$ veya $y \pm \% U$ şeklinde ölçüm birimi ile birlikte ifade edilir.

BULGULAR

Gerçeklik (Doğruluk)

(144 mg/dL) sertifikalı standart etanol örneği kullanılarak iki farklı uzman tarafından yapılan analizler sonucu elde edilen veriler Tablo 2'de sunulmuştur.

Ortalama bağıl hatanın 0.0027 (% bağıl hata 0.27) olduğu görülmüştür.

Geri kazanım

Geri kazanım çalışmaları için üç farklı etanol konsantrasyonuna (14.4, 72 ve 144 mg/dL) sahip standart etanol çözeltilerinin, HS/GC/FID analizi sonrası, etanol içerikleri hesaplanmış ve

Tablo 2. Etanol Doğruluk Verileri (Gerçek Konsantrasyon 144 mg/dL)

No	Uzman 1 (mg/dL)	Uzman 2 (mg/dL)
1	142.78	144.09
2	145.49	141.92
3	145.62	140.76
4	145.05	145.96
5	144.34	145.50
6	143.52	143.89
7	144.60	144.89
8	143.19	145.48
9	145.67	146.99
10	142.81	145.16
Ortalama	144.31	144.47
Standart sapma	1.16	1.89
Hata (Bias)	0.31	0.47
Bağıl Hata	0.0021	0.0032
Ortalama Bağıl Hata	0.0027	
% Bağıl Hata	0.27	

başlangıçta dışarıdan eklenen etanol miktarları ile karşılaştırılmıştır. 2 uzman tarafından gerçekleştirilen ve Tablo 3-4'de gösterilen, etanolün üç farklı konsantrasyonuna ait metodun geri kazanım değerlerinin %100-101 aralığında çıktığı görülmüştür.

Tablo 3. 1. Uzmanın Etanol Geri Kazanım Verileri

No	Konsantrasyon			% Geri kazanım		
	14.4 mg/dL	72 mg/dL	144 mg/dL	14.4 mg/dL	72 mg/dL	144 mg/dL
1	14.83	73.90	142.78	103	103	99
2	15.00	72.46	145.49	104	101	101
3	14.64	72.39	145.62	102	101	101
4	14.74	72.68	145.05	102	101	101
5	14.63	73.25	144.34	102	102	100
6	14.58	72.19	143.52	101	100	100
7	14.25	73.15	144.60	99	102	100
8	14.37	72.09	143.19	100	100	99
9	14.06	72.44	145.67	98	101	101
10		72.77	142.81		101	99
Ortalama				101.16	101.02	100.21
Standart Sapma				0.020	0.008	0.008
s/\sqrt{n}				0.07	0.02	0.03
RSD (Bağıl Standart Sapma)				0.0002	0.0001	0.0001
%RSD				0.0202	0.0077	0.0080
RSD Pooled (Havuz Bağıl Standart Sapma)				0.0001		

Tablo 4. 2. Uzmanın Etanol Geri Kazanım Verileri

No	Konsantrasyon			% Geri kazanım		
	14.4 mg/dL	72 mg/dL	144 mg/dL	14.4 mg/dL	72 mg/dL	144 mg/dL
1	14.77	72.19	144.09	103	100	100
2	14.35	73.37	141.92	100	102	99
3	14.58	71.60	140.76	101	99	98
4	14.42	71.64	145.96	100	100	101
5	14.47	71.64	145.50	101	99	101
6	14.73	71.29	143.89	102	99	100
7	14.38	70.96	144.89	100	99	101
8	14.39	74.19	145.48	100	103	101
9	14.31	72.06	146.99	99	100	102
10	14.86	72.13	145.16	103	100	101
Ortalama				100.88	100.15	100.32
Standart Sapma				0.014	0.014	0.013
s/\sqrt{n}				0.04	0.04	0.04
RSD (Bağıl Standart Sapma)				0.0001	0.0001	0.0001
% RSD				0.0135	0.0136	0.0131
RSD Pooled (Havuz Bağıl Standart Sapma)				0.0001		

Kesinlik

Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik için seyreltilerek hazırlanan ve konsantrasyonları (14.4, 72 ve 144 mg/dL) olan standart etanol çözeltileri HS/GC/FID ile analiz edilerek tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik sonuçları elde edilmiştir.

Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik verileri aynı gün içinde, 3 farklı konsantrasyonda ve iki uzman tarafından elde edilmiştir. Sonuçlar aşağıdaki tablolarda verilmiştir.

Tablo 5. Düşük konsantrasyon etanol için tekrarlanabilirlik verileri

No	Uzman 1 (14.4 mg/dL)	Uzman 2 (14.4 mg/dL)
1	14.83	14.77
2	15.00	14.35
3	14.64	14.58
4	14.74	14.42
5	14.63	14.47
6	14.58	14.73
7	14.25	14.38
8	14.37	14.39
9	14.06	14.31
Ortalama	14.56	14.49
Standart Sapma	0.29	0.17
RSD	0.02	0.01
%RSD	2.02	1.15
Serbestlik Derecesi, m+n-2	16	
t kritik (tablodan)	2.10	
s'	0.24	
t bulunan	0.6702	
uygunluk kriteri	t bulunan < t kritik	
Sonuç	Anlamlı Bir Fark Yoktur	

Tablo 6. Orta konsantrasyon etanol için tekrarlanabilirlik verileri

No	Uzman 1 (72 mg/dL)	Uzman 2 (72 mg/dL)
1	73.9	72.19
2	72.46	73.37
3	72.39	71.60
4	72.68	71.64
5	73.25	71.64
6	72.19	71.29
7	73.15	70.96
8	72.09	74.19
9	72.44	72.06
10	72.77	72.13
Ortalama	72.73	72.11
Standart Sapma	0.56	0.98
RSD	0.007	0.014
%RSD	0.77	1.36
Serbestlik Derecesi, m+n-2	18	
t kritik (tablodan)	2.10	
s'	0.80	
t bulunan	1.7604	
uygunluk kriteri	t bulunan < t kritik	
Sonuç	Anlamlı Bir Fark Yoktur	

Tablo 7. Yüksek Konsantrasyon Etanol için Tekrarlanabilirlik Verileri

No	Uzman 1 (144 mg/dL)	Uzman 2 (144 mg/dL)
1	142.78	144.09
2	145.49	141.92
3	145.62	140.76
4	145.05	145.96
5	144.34	145.50
6	143.52	143.89
7	144.60	144.89
8	143.19	145.48
9	145.67	146.99
10	142.81	145.16
Ortalama	144.31	144.47
Standart Sapma	1.16	1.89
RSD	0,008	0,01
%RSD	0.80	1.31
Serbestlik Derecesi, m+n-2	18	
t kritik (tablodan)	2.10	
s'	1.57	
t bulunan	0.2271	
uygunluk kriteri	t bulunan < t kritik	
Sonuç	Anlamlı Bir Fark Yoktur	

Tekrar Üretilirlik

Tekrar üretilebilirlik verileri altı farklı gün içinde, üç farklı konsantrasyonda ve iki uzman tarafından elde edilmiştir. Sonuçlar aşağıdaki tablolarda verilmiştir.

Tablo 8. Düşük konsantrasyon etanol için tekrar üretilebilirlik verileri

No	Uzman 1 (14.4 mg/dL)	Uzman 2 (14.4 mg/dL)
1	14.77	14.55
2	14.10	13.82
3	13.85	14.75
4	14.57	14.78
5	14.42	14.67
6	14.33	14.38
Ortalama	14.34	14.49
Standart Sapma	0.33	0.36
%RSD	2.30	2.49
Serbestlik Derecesi, m+n-2	10	
t kritik (tablodan)	2.23	
s'	0.35	
t bulunan	0.7532	
uygunluk kriteri	t bulunan < t kritik	
Sonuç	Anlamlı Bir Fark Yoktur	

Tablo 9. Orta konsantrasyon etanol için tekrar üretilebilirlik verileri

No	Uzman 1 (72 mg/dL)	Uzman 2 (72 mg/dL)
1	73.31	73.04
2	71.45	72.97
3	71.53	72.15
4	72.26	72.53
5	72.23	72.40
6	72.72	72.10
Ortalama	72.25	72.53
Standart Sapma	0.71	0.40
%RSD	0.98	0.55
Serbestlik Derecesi, m+n-2	10	
t kritik (tablodan)	2.23	
s'	0.57	
t bulunan	0.8535	
uygunluk kriteri	t bulunan < t kritik	
Sonuç	Anlamlı Bir Fark Yoktur	

Tablo 10. Yüksek Konsantrasyon Etanol için Tekrar Üretilirlik Verileri

No	Uzman 1 (144 mg/dL)	Uzman 2 (144 mg/dL)
1	144.28	145.70
2	144.16	144.59
3	146.03	143.98
4	145.55	145.26
5	143.54	144.96
6	145.25	144.15
Ortalama	144.80	144.77
Standart Sapma	0.95	0.66
%RSD	0.66	0.45
Serbestlik Derecesi, m+n-2	10	
t kritik (tablodan)	2.23	
s'	0.82	
t bulunan	0.0638	
uygunluk kriteri	t bulunan < t kritik	
Sonuç	Anlamlı Bir Fark Yoktur	

Tespit Limiti (LOD) ve Tayin Limiti (LOQ)

Tespit ve tayin limiti hesaplanması için, kan numunesi içerisindeki konsantrasyonu (3.98 mg/dL) olacak şekilde numune hazırlanıp 10 bağımsız analiz yapılmıştır. Bu konsantrasyonda sinyal/gürültü oranının $S/N \geq 3$ olmasına dikkat edilmiştir. Etanol için ortalama ve standart sapma hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 11'de verilmiştir.

$$LOD = C_{Ott} + 3 \times s = 3.73 + 3 \times 0.13 = 4.12$$

$$LOQ = C_{Ott} + 10 \times s = 3.73 + 10 \times 0.13 = 5.03$$

Yapılan çalışmalarda $LOD \approx 4$ mg/dL, $LOQ \approx 5$ mg/dL olarak bulunmuştur.

Tablo 11. Etanol için tespit ve tayin sınırları

No	Sonuç (mg/dL)
1	3.91
2	3.76
3	3.98
4	3.69
5	3.67
6	3.64
7	3.75
8	3.78
9	3.54
10	3.64
Ortalama	3.73
Standart Sapma	0.13
%RSD	3.49
Hazırlanan konsantrasyon	3.98
LOD	4.12
LOQ	5.03

Lineer Çalışma Aralığı

Lineerlik (doğrusallık) çalışmasında, (144 mg/dL) etanol konsantrasyonunda kan ve su ile ayrı ayrı çalışılarak matriks etkisi incelenmiştir. Elde edilen veriler t-testi ile değerlendirildiğinde iki matriks arasında anlamlı fark olmadığı tespit edilmiştir. Bu nedenle kalibrasyon eğrisi su ile hazırlanmıştır.

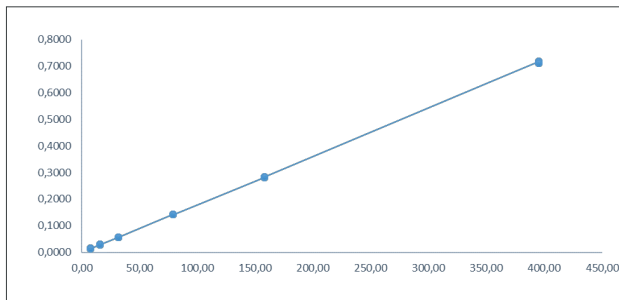
Tablo 12. Su ve Kan Matriks Etkisinin İncelenmesi

No	Su	Kan
1	147.98	148.86
2	144.43	149.32
3	146.27	147.59
4	145.97	142.04
5	141.32	143.62
6	140.96	146.23
Ortalama	144.49	146.28
Standart Sapma	2.83	2.92
Serbestlik Derecesi, m+n-2	10	
t kritik (tablodan)	2.23	
s'	2.88	
t bulunan	1.08	
Uygunluk kriteri	t bulunan < t kritik	
Sonuç	Uygundur	

Lineer aralık çalışmasında, altı farklı seviyede (7.90; 15.80; 31.61; 79.02; 158.04; 395.10 mg/dL konsantrasyonlarında) ve her bir konsantrasyon seviyesinde 3 tekrar yapılarak çalışılmıştır. Çalışmalarda konsantrasyonu (63.36 mg/dL) olan n-propanol, iç standart olarak kullanılmıştır. Elde edilen veriler aşağıdaki tablo 13 ve şekil 1'de verilmiştir.

Tablo 13. Etanol Linearite Verileri

Analit Etanol	Lineer Çalışma Aralığı (mg/dL)	Denklem	R ²
Cihaz	7.90 - 395.10	y = 0.1144x - 0.0004	0.999960



Şekil 1. Etanolün Kalibrasyon Eğrisi Grafiği

Seçicilik

Seçicilik çalışmasında 10 ve 400 mg/dL olmak üzere düşük ve yüksek konsantrasyonlarda etanol, metanol, aseton, n-bütanol, n-propanol, 2-propanol, formaldehit ve toluen standartları tekli ve mix standartlar olarak su ve kan matriksinde hazırlanarak çalışma yapılmıştır. Her bir bileşenin çıkış süreleri ve pik genişlikleri belirlendikten sonra bu bileşenler mix halinde tekrar cihaza verilerek ayırım olup olmadığı incelenmiştir. Su ve kan matriksinde yapılan çalışmalarda bileşenlerin alıkonma süreleri arasında fark olmadığından Tablo 14'de bileşenlerin sudaki alıkonma süreleri verilmiştir.

Tablo 14. Analitlerin Sudaki Alıkonma Zamanı ve Pik Genişliği

CLARUS 580			
Analit adı	Rt (A)	Rt (B)	W
Metanol	0.83	0.80	0,053
Etanol	1.03	0.95	0,073
İsopropil alkol	1.26	1.09	0,108
Formaldehit	1.43	2.86	0,067
Aseton	1.36	1.02	0,076
n-propanol	1.74	1.52	0,082
n-bütanol	3.57	2.99	0,135
Toluen	7.84	3.75	0,588

Analiz sonrası örneklerin HS/GC/FID sonuçları karşılaştırıldığında hedef analit olan etanole ait pik ile ona en yakın bileşen olan metanole ait pik için Rs değeri 3.2 bulunmuştur. Ayırım gücü hesaplamasında (A) kolonunun sonuçları değerlendirilmiştir.

$$R_s = 2 \times \frac{\text{etanolün alıkonma zamanı} - \text{metanolün alıkonma zamanı}}{\text{etanolün pik genişliği} + \text{metanolün pik genişliği}} = 2 \times \frac{(1.03 - 0.83)}{(0.053 + 0.073)} = 3.2$$

Sağlamlık

Sağlamlık çalışmalarında (144 mg/dL) konsantrasyonundaki standart etanol örneği kullanılarak sıcaklık ve sürenin etkisi incelenmiştir.

Sıcaklığın Etkisi

Çalışmalarda HS fırın sıcaklığı 70, 75, 80 °C olmak üzere 3 farklı sıcaklıkta çalışılmıştır. Sıcaklık değişiminin %RSD değerlerini önemli ölçüde değiştirmedeği görülmüştür. Sonuçlar tablo 15'te verilmiştir.

Tablo 15. HS Oven Sıcaklık Değişimi

		75 °C	70 °C	80 °C
Sıcaklık	1	142.92	143.50	144.96
	2	146.28	146.56	142.30
	3	145.44	144.67	143.47
	Ortalama	144.88	144.91	143.58
	Standart sapma	1.75	1.55	1.34
	%RSD	1.21	1.07	0.93
	70 °C- 75 °C arasında	Serbestlik derecesi, m+n-2	4	
t kritik (tablodan)		2.78		
s'		1.65		
t bulunan		0.02		
uygunluk kriteri		t bulunan < t kritik		
Sonuç		Anlamlı Bir Fark Yoktur		
70 °C- 80 °C arasında	Serbestlik derecesi, m+n-2	4		
	t kritik (tablodan)	2.78		
	s'	1.45		
	t bulunan	1.13		
	uygunluk kriteri	t bulunan < t kritik		
	Sonuç	Anlamlı Bir Fark Yoktur		

Sürenin Etkisi

10, 15 ve 20 dakika olmak üzere HS sıcaklığı 70 °C'de 3 farklı sürede çalışma yapılmıştır. Süre değişiminin %RSD değerlerini önemli ölçüde değiştirmediği görülmüştür. Sonuçlar tablo 16'da verilmiştir.

Tablo 16. HS Süre Değişimi

		10 dakika	15 dakika	20 dakika
Süre	1	148.02	146.43	146.37
	2	146.07	142.18	140.85
	3	150.47	144.64	142.54
	Ortalama	148.19	144.42	143.25
	Standart sapma	2.21	2.13	2.83
	%RSD	1.49	1.48	1.97
	10 - 15 dakika arasında	Serbestlik derecesi, m+n-2	4	
t kritik (tablodan)		2.78		
s'		2.17		
t bulunan		2.13		
uygunluk kriteri		t bulunan < t kritik		
Sonuç		Anlamlı Bir Fark Yoktur		
15 - 20 dakika arasında	Serbestlik derecesi, m+n-2	4		
	t kritik (tablodan)	2.78		
	s'	2.50		
	t bulunan	0.57		
	uygunluk kriteri	t bulunan < t kritik		
	Sonuç	Anlamlı Bir Fark Yoktur		

Ölçüm Belirsizliği

Laboratuvarında etanol miktar tayini için kullanılan HS/GC/FID yönteminin ölçüm belirsizliğini hesaplamak amacıyla beş belirsizlik bileşeni belirlenmiştir. Bu belirsizlik bileşenleri; doğruluk (bias), geri kazanım, kalibrasyon eğrisi (lineerlik), tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik kaynaklı belirsizliklerdir.

Doğruluktan gelen belirsizlik (bağlı hata), 0.0027 olup Tablo 2' de gösterilmiştir.

Çalışmalar iki uzman tarafından gerçekleştirildiğinden, analizler sonucunda geri kazanımdan gelen belirsizlik, RSD pooled (havuz bağlı standart sapma) formülü ile hesaplanmıştır. RSD pooled değerleri Tablo 3 ve 4' te gösterilmiştir. Geri kazanımdan gelen belirsizliğin 0.0001 olduğu görülmektedir.

Kalibrasyon Eğrisi Belirsizliği, kalibrasyon eğrisinin eğimi, standart sapması ve kalibrasyon eğrisinden elde edilen konsantrasyonlarla ilişkili olarak 0.00899 olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 17' de gösterilmiştir.

Tekrarlanabilirlikten gelen belirsizlik, üç farklı etanol konsantrasyonuna karşı metodun verdiği cevaba göre hesaplanan bağlı standart sapma değerlerine bağlıdır. İki farklı uzman tarafından yapılan ve Tablo 5-7' de gösterilen ölçüm sonuçlarından altısı seçilerek yapılan belirsizlik hesabı, Tablo 18'de gösterilmiştir.

Tekrarlanabilirlik çalışmaları sonucunda tekrarlanabilirlikten gelen belirsizlik, RSD pooled formülü ile hesaplanmıştır. Tekrarlanabilirlikten gelen belirsizliğin 0.0092 olduğu görülmektedir.

Tekrar üretilebilirlikten gelen belirsizlik, üç farklı etanol konsantrasyonuna karşı metodun verdiği cevaba göre hesaplanan bağlı standart sapma değerlerine bağlıdır. İki farklı uzman tarafından yapılan ve Tablo 8-10'da gösterilen ölçüm sonuçları kullanılarak yapılan belirsizlik hesabı, Tablo 19'da gösterilmiştir.

Tekrar üretilebilirlik çalışmaları sonucunda tekrar üretilebilirlikten gelen belirsizlik RSD pooled formülü ile hesaplanmıştır. Tekrar üretilebilirlikten gelen belirsizliğin 0.0155 olduğu görülmektedir.

Belirlenen her bir bileşenin, belirsizliğinin toplamı 0.02, genişletilmiş belirsizlik, $U = k \cdot u_c = 2 \cdot 0.02 = 0.04$ ve 1 mg/dL için ölçüm belirsizliğinin $\pm 0,04$ (%4) olduğu Tablo 20'de görülmektedir.

Tablo 17. 7,90-395,10 mg/dL Çalışma Aralığındaki Kalibrasyon Eğrisi Verileri ve Cihaz Kalibrasyonundan Gelen Belirsizlik

x/IS	y/IS	varsayılan Y	varsayılan X	x		
0.12	0.0148	9.13424E-07	0.133039594	7.90	Eğim (B1)	0.1144
0.12	0.0145	4.29984E-07	0.130416918	7.90		
0.12	0.0142	1.26545E-07	0.127794242	7.90		
0.25	0.0291	9.72674E-07	0.2580538	15.80	Kesim noktası	0.0004
0.25	0.0285	1.54814E-07	0.252808449	15.80		
0.25	0.0289	6.29585E-07	0.256305349	15.80	Serbestlik Derecesi (n-2)	16
0.50	0.0567	2.96864E-09	0.49933996	31.61		
0.50	0.0568	2.27631E-08	0.500214185	31.61	$S = \sqrt{\frac{\sum (y-y_i)^2}{n-2}}$	0.0016
0.50	0.0565	2.22384E-08	0.49759151	31.61		
1.25	0.1431	7.38247E-07	1.254670548	79.02	$S_{xx} = \sum_{i=1}^n (c_i - \bar{c})^2$	82.10748
1.25	0.1414	7.06923E-07	1.23980872	79.02		
1.25	0.1412	1.08324E-06	1.238060269	79.02	C _{ort}	1.808
2.49	0.2820	8.40753E-06	2.468969376	158.04	p	3
2.49	0.2833	2.55864E-06	2.480334304	158.04	n	18
2.49	0.2839	9.99148E-07	2.485579655	158.04	C _o	1.247
6.24	0.7176	2.22486E-05	6.277094425	395.10	$U(C_o) = \frac{S_y}{B_1} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(c_o - \bar{c})^2}{S_{xx}}}$	0.00899
6.24	0.7115	1.8932E-06	6.223766687	395.10		
6.24	0.7118	1.15764E-06	6.226389362	395.10		

Tablo 18. Tekrarlanabilirlik Kaynaklı ve 2 Uzman Tarafından 3 Farklı Etanol Konsantrasyonunda Hesaplanan Belirsizlik

No	Uzman 1			Uzman 2		
	Konsantrasyon (mg/dL)			Konsantrasyon (mg/dL)		
	14.4	72	144	14.4	72	144
1	14.06	72.09	144.60	14.31	72.19	144.09
2	14.37	72.46	145.49	14.35	72.06	141.92
3	14.64	72.39	145.62	14.58	73.37	145.48
4	14.25	72.68	145.05	14.42	71.64	145.16
5	14.63	72.44	144.34	14.47	71.64	144.89
6	14.58	72.19	143.52	14.39	72.13	143.89
Ortalama	14.42	72.38	144.77	14.42	72.17	144.24
Standart Sapma	0.2370	0.2103	0.7869	0.0981	0.6372	1.2909
RSD	0.0164	0.0029	0.0054	0.0068	0.0088	0.0090
%RSD	1.6438	0.2906	0.5435	0.6800	0.8829	0.8950
RSD Pooled	0.0092					

Tablo 19. Tekrar Üretilirlik Kaynaklı ve 2 Uzman Tarafından 3 Farklı Etanol Konsantrasyonunda Hesaplanan Belirsizlik

No	Uzman 1			Uzman 2		
	Konsantrasyon (mg/dL)			Konsantrasyon (mg/dL)		
	14.4	72	144	14.4	72	144
1	14.77	73.31	144.28	14.55	73.04	145.70
2	14.10	71.45	144.16	13.82	72.97	144.59
3	13.85	71.53	146.03	14.75	72.15	143.98
4	14.57	72.26	145.55	14.78	72.53	145.26
5	14.42	72.23	143.54	14.67	72.40	144.96
6	14.33	72.72	145.25	14.38	72.10	144.15
Ortalama	14.34	72.25	144.80	14.49	72.53	144.77
Standart Sapma	0.3305	0.7079	0.9538	0.3613	0.3983	0.6574
RSD	0.0230	0.0098	0.0066	0.0249	0.0055	0.0045
%RSD	2.3048	0.9798	0.6587	2.4930	0.5491	0.4541
RSD Pooled	0.0155					

Tablo 20. Belirsizlik Kaynaklarının Ölçüm Sonucuna Etkisi

Belirsizlik Kaynakları	Değer	Standart Belirsizlik	Referans Standart Belirsizlik
Geri Kazanım Belirsizliği	1.00	0.0001	0.0001
Kalibrasyon Eğrisi Belirsizliği	1.808	0.0090	0.0050
Doğruluk (BIAS)	1	0.0027	0.0027
Tekrar üretilebilirlik	1	0.0155	0.0155
Tekrarlanabilirlik	1	0.0092	0.0092
Toplam Belirsizlik			0.020
Genişletilmiş Belirsizlik			0.041
1 mg/dL için ölçüm belirsizliği			±0.041 (%4.1)
Ölçüm Sonucu			2.037
Ölçüm Belirsizliği			50±2

TARTIŞMA VE SONUÇ

Akreditasyonla ilgili ulusal ve uluslararası düzenlemeler, bu konuda bir mecburiyet getirmemektedir. Akreditasyon, tamamen gönüllülük esasına dayanmaktadır. Adli Tıp Kurumu çalışanları olarak yapmış olduğumuz analizler hayati önem taşımaktadır. Bu nedenle yapılan bilirkişilik hizmetinin kalite standartlarını yükseltmek ihtiyacı tarafımızca zorunlu olmuştur. Gönüllü olarak şubeli akreditasyon ile başlanılan kalite çalışmalarına, Kurum Başkanlığımızın önderliğinde kendimizi sürekli iyileştirerek devam etmekteyiz. Çünkü bilinmektedir ki rekabet gücünü arttırmanın temelinde sürekli gelişme yatar. Sürekli gelişmenin özelliği kalitenin ürün ve hizmetle sınırlı olmayıp sistemin bütününe kalitesi dolayısı ile tüm çalışanların kalitesi ile ilgili olduğudur.

Akreditasyonla birlikte çalışan personelin, bir konuda görevlendirilerek ya da fikirlerine başvurularak süreç içine katılımı sağlanmıştır. Böylelikle tüm personelin farkındalıkları artırılıp kalite faaliyetlerine olan ilgi yükseltilmiştir.

Laboratuvar akreditasyonu ise teknik yeterliliğin güvenilir bir göstergesi olarak hem ulusal hem de uluslararası yüksek saygınlığı ifade eder ve laboratuvar itibar kazandırır. Ayrıca laboratuvarların yeterliliğinin resmi olarak tanınmasını sağlayarak müşterilere güvenilir analiz ve raporlama hizmetlerini sunar. Bu amaçla otopsi şubesinden alınan kan örneklerinde HS/GC/FID ile kantitatif etanol analizinin akreditasyonu gerçekleştirilmiş olup çalışmalarımız kapsam genişlemesi yönünde devam etmekte ve kaliteden taviz vermeden devamlı olarak gelişme hedeflenmektedir.

Metot validasyon çalışmaları gereği doğruluk (gerçeklik), kesinlik, LOD ve LOQ, doğrusalılık, seçicilik ve sağlamlık parametreleri değerlendirilmiş ve bu parametrelerin standartlarca kabul edilebilir değerlere sahip olduğu belirlenmiştir.

Doğruluk parametresi, iki uzman tarafından onar analiz yapılarak değerlendirilmiştir. Ortalama bağıl hatanın 0,0027 (ortalama % bağıl hata 0,27) olduğu görülmüştür (Tablo 2). % Bağıl hatanın kabul edilebilir değer olan \pm %15'in çok altında olması ölçüm sonuçlarının yani yöntemin doğruluğunu göstermektedir. Ayrıca doğruluk (gerçeklik), üç farklı etanol konsantrasyonu için (14.4, 72 ve 144 mg/dL) metoda ait geri kazanım değerleri ile ifade edilmiş ve tüm konsantrasyonlar için ortalama geri kazanım değerleri %100-101 arasında bulunmuştur. Metot geçerli kılma çalışmaları kapsamında gerçekleştirilen geri kazanım çalışmalarında %70-120 aralığı esas alındığından elde edilen veriler uygundur (7).

Kesinlik, tekrarlı çalışmaların sonucuna göre yorumlanmış ve üç farklı etanol konsantrasyonu için (14.4, 72 ve 144 mg/dL) t tablo değerlerinin, t hesaplanan değerlerinden büyük olduğu görülmüştür. Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik çalışmalarında t tablo değerleri, t hesaplanan değerlerinden büyük olduğundan %95 güven seviyesinde iki uzmanın aynı gün içindeki çalışmaları ve farklı günlerdeki çalışmaları arasında kesinlik bakımından anlamlı bir fark olmadığı görülmektedir. Belirlenen üç farklı konsantrasyondaki tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik çalışmalarında, yapılan ölçümlerden hesaplanan %RSD değerlerinin kabul edilebilir en

yüksek limit olan %20 değerinden küçük olduğu görülmüştür. Bu verilere göre değerlendirme yapıldığında, gün içi ve günler arası sonuçlarının, kesinliğinin yüksek ve tekrarlanabilir olduğu sonucuna varılmıştır.

LOD ve LOQ parametrelerinden, LOD= 4 mg/dL ve LOQ= 5 mg/dL olarak hesaplanmıştır. LOQ'nun kabul edilebilir değer olan \pm %20 sınırları içinde olduğu görülmüştür (Tablo 11).

Kalibrasyon eğrisi, 7,9-395,10 mg/dL konsantrasyonları arasında doğrusallığa ve $R^2=0.99996$ değerine sahip olup, etanol konsantrasyonunun belirlenmesi için kullanılmıştır. Altı farklı seviyede ve her bir seviyede 3 tekrar yapılarak belirlenen çalışma aralığının doğrusal olduğu belirlenmiştir.

Seçicilik parametresi incelendiğinde, her bir bileşenin mix içerisinde farklı Rt gösterdiği gözlemlenmiştir. Tablo 14 incelendiğinde diğer numunelerin varlığında etanol ve n-propanole (iç standart) karşı herhangi bir girişim olmadığı görülmüştür. Etanole en yakın pik olan metanol ile R_s değeri 3.2 bulunduğu ve diğer bileşenlerle R_s değerleri incelendiğinde $R_s \geq 2$ olması kullanılan metodun, etanole seçici olduğunu göstermektedir.

Sağlamlık parametresi, üç farklı sıcaklık ve sürede incelenmiş olup sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. Bu önemsiz fark, metodun ilgili parametreler için sağlam olduğunu göstermektedir. Daha yüksek sıcaklıklarda etanol dışında su ve diğer bileşiklerin de belirli bir buhar basıncı olduğu için düşük sıcaklık olan 70 °C seçilmiştir. Süre olarak ise standart sapması daha düşük olduğu için 15 dakika tercih edilmiştir (Tablo 16).

Tüm ölçümler belirli bir hatadan etkilenir. Ölçüm belirsizliği, bize ölçüm sonuçlarının kalitesi yani ölçüm hatasının ne kadar büyük olabileceği hakkında bilgi verir. Bu nedenle ölçüm belirsizliği, raporlanan sonucun önemli bir parçasıdır. Bu amaçla metoda ait beş belirsizlik belirlenerek ölçüm sonucuna etkisi hesaplanmıştır. Bunlar; doğruluk, geri kazanım, kalibrasyon eğrisi, tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik kaynaklı belirsizliklerdir.

Tüm bu belirsizlik bileşenlerinin birleştirilmesi ve %95 güven aralığında kapsam faktörü $k=2$ ile genişletilmesinin ardından, kanda yapılan etanol analizleri ile sonuçların raporlandırılması, etanolün yasal sınırı olan 50 mg/dL (0,5 promil) değeri için, 50 ± 2 (%) şeklinde olmuştur.

Bu çalışmada, otopsi şubesinde alınan kan örneklerinde HS/GC/FID ile kantitatif etanol analizi metodu valide edilmiş olup laboratuvarlarca güvenilir metot olduğu ve kullanılabilirliği gösterilmiştir.

Bu çalışmanın bir bölümü, 19-22 Ekim 2023'te Antalya'da düzenlenen, Uluslararası katılımlı 18. Adli Tıp Günlerinde "Adli Tıp Kurumu Trabzon Grup Başkanlığı Kimya İhtisas Dairesinin Akreditasyon Ve Validasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi" başlığı ile poster bildiri olarak sunulmuştur.

Finans: Bu çalışma için hiç bir kurum veya kuruluştan finansal destek alınmamıştır.

Çıkar çatışması: Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

1. Karaca A, Özçiçek Y. Yükseköğretim kurumlarında kalite ve akreditasyon: Mühendislik eğitim programlarının değerlendirilmesi. Fırat Ün. Uluslararası İ.İ. B. Derg. 2019; 3(1), 114-49.
2. Eurocons, Akreditasyonun Uluslararası Boyutu. Erişim adresi: https://www.eurocons.com.tr/akreditasyon-bilgi_bankasi (Erişim tarihi: 10 Ocak 2024)
3. Bayraç C, Camızcı G. HPLC metodu ile patulin tayininde tek laboratuvar metot validasyon çalışması. NÖHÜ Müh. Bilim. Derg. 2020; 9(1): 285-96.
4. Yücel D. Pratik metot validasyonu ve verifikasyonu, Ankara, 2014.
5. Kimyasal ve Fiziksel Analizlerde Metot Validasyonu/ Verifikasyonu Rehberi. T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü, 2018.
6. Shah VP, Midha K, Dighe S. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies, J. Pharm Sci. 1992;81(3),309-12.
7. Pihlström T. (Coordinator) Method Validation and Quality Control Procedures For Pesticide Residues Analysis in Food and Feed, Sanco/12495, 2011.
8. Dimitrova RT, Stoykova II, Yankovska-Stefanova TT, Yaneva SA, and Stoyanchev TT. Development of analytical method for determination of organochlorine pesticides residues in meat by GC-ECD, Revue Méd. Vét. 2018; 169 (4-6): 77-86.
9. Arslan N. İstatistik Tekniklerle Veri Analizi Talimatı. T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, DSİ Laboratuvarları, 2020.
10. Yılmaz A. Kimyasal Analizlerde Metot Validasyonu ve Verifikasyonu (Turklab Rehber), Turklab-Kalibrasyon ve Deney Laboratuvarları Derneği, İstanbul 2013.

11. Açar ÇÖ, Kırış S, Diler F, Avcı A. Pestisit Analizleri İçin Metot Validasyonu ve Ölçüm Belirsizliği Hesaplanması Açıklamalı Uygulama Rehberi, T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı Kalıntı/Pestisit Birimi. Ankara 2013.
12. Committee for Medicinal Products for Human Use. Guideline on Bioanalytical Method Validation, European Medicines Agency, 2011: 44:1-23.
13. Paithankar HV. HPLC Method validation for pharmaceuticals: a Review. Int J Universal Pharm BioSci 2013; 4(2): 229-40.
14. Magnusson B, Örnemark U (eds.). Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, Available from www.eurachem.org: 2014.
15. Uluslararası Metroloji Sözlüğü Temel ve Genel Kavramlar İlgili Terimler, TÜBİTAK UME, JCGM, 2008.
16. Erol Öztürk, Y. (2023). Method Validation and Measurement Uncertainty for the Determination of Ethanol in Whole Blood. International Journal of Computational and Experimental Science and Engineering, 9(3), 253-57.
17. Magnusson B, Näykki T, Hovind H, Krysell M, Sahlin E. Handbook For Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories, Nordtest Report TR 537 (ed. 4) Available from www.nordtest.info. 2017.