

Araştırma Makalesi / Research Paper

Çift Kabuklu Yumuşakçalarda Domoik Asit Miktarının Belirlenmesinde Referans Metot Olan HPLC Yönteminin Validasyonu

Uğur Günşen¹, Ali Özcan², Mehmet Karaca²

¹ Balıkesir Üniversitesi, Bandırma Meslek Yüksekokulu, Gıda Teknolojisi Programı, Bandırma, Balıkesir
² Gıda Kontrol ve Merkez Araştırma Enstitüsü, Hayvansal Ürünler Bölüm Başkanlığı, 16036, Hürriyet, Bursa
E-posta: ugur_gunsen@hotmail.com

ÖZET

Bu çalışmada, çift kabuklu yumuşakçalarda domoik asit (DA) miktarının belirlenmesinde kullanılan ve Avrupa Birliği tarafından referans metot olarak kabul edilen HPLC yönteminin TS EN ISO/IEC 17025 Laboratuvar Akreditasyon Standardı kapsamında belirlenen metot performans kriterlerine göre geçerli kılınması amaçlanmıştır. Doğrusallık R², tayin limiti (LoD) veya ölçüm limiti (LoQ) değerleri sırasıyla 0.9999, 0.0837 µg/mL ve 0.279 µg/mL olarak belirlenmiştir. Tekrarlanabilirlik % RSD'si 2.613, tekrar üretilebilirlik % RSD'si ise 5.16 olarak hesaplanmıştır. Domoik asit analizi geri kazanım oranının, tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik çalışmalarından elde edilen veriler kullanılarak %71.3-%94.5 arasında değişmiştir. Gerçeklik % hata olarak %17.88, doğruluk oranı ise %82.12 olarak hesaplanmıştır. Çalışmada, alıkonma zamanı 6.816 – 6.974 dakika arasında değişmiştir.

Anahtar Kelimeler: Çift kabuklu yumuşakça, Domoik asit, Metot validasyonu

The Study of Method Validation of Reference Method by HPLC for Determining the Level of Domoic Acid (DA), Amnesic Shellfish Poisoning (ASP) in Shellfish

ABSTRACT

In this study, it was aimed to validate the HPLC reference method accepted by European Union, which is used for the determination of the domoic acid content of shellfish, in relation with the method performance criteria under the scope of the TS EN ISO/IEC 17025 Standard of Laboratory Accreditation. Linearity R², LoD and LoQ were determined as 0.9999, 0.0837 µg/mL and 0.279 µg/mL, respectively. RSD% of repeatability and RSD% of reproducibility were calculated as 2.613 and 5.16. The rate of recovery was found as 71.3-94.5% when values of repeatability and reproducibility studies were taken into account. Trueness, as a false%, was 17.88%, and the rate of trueness was 82.12%. Retention time fell into 6.816 – 6.974 min.

Key Words: Shellfish, Domoic acid, Method validation

GİRİŞ

Gıdaların kalitesi ulusal ve uluslar arası düzeyde standartlar ve tüketici talepleri ile tanımlanmaktadır. Bu nedenle birçok ürün tüketiciye sunulmadan önce spesifikasyonlarının belirlenmesi ve standartlara uygunluğunun tespiti için test edilmesi gerekmektedir. Üretici ve tüketici açısından laboratuvar kararlarındaki yanlışlığı, ürünün gereksiz reddedilmesi ya da ürünün uygunsuzluğu durumunun doğru saptanamaması sonucunda tüketicinin sağlık veya ekonomik yönlere zarar görmesi söz konusu olabilmektedir. Bir test kuruluşunun yaptığı testlerin güvenilirliğinin sağlanabilmesi için bu kuruluşların belirlenen uluslar

arası kriterlere göre çalışıyor olduğunun belgelenmesi gerekmektedir [1].

4457 Sayılı Türk Akreditasyon Kurumu Kuruluş ve Görevleri Hakkında Kanun'a [2] göre akreditasyon; "kurum tarafından laboratuvarların, muayene ve belgelendirme kuruluşlarının ulusal ve uluslar arası kabul görmüş teknik kriterlere göre değerlendirilmesi, yeterliliğinin onaylanması ve düzenli aralıklarla denetlenmesidir" şeklinde tanımlanmaktadır. Türkiye'de akreditasyona esas standart "TS EN ISO/IEC 17025 / Aralık 2005 Deney ve Kalibrasyon Laboratuvarlarının Yeterliliği İçin Genel Şartlar" standardıdır.

EUROCHEM'de araç, gereç ve materyallerin değiştirilmesi de dahil olmak üzere, ürünün kalitesini veya üretiminin tekrarlanabilirliğini etkileyebilecek tüm üretim değişikliklerinin validasyonu (geçerli kılınması) gerektiği belirtilmektedir [3]. TS EN ISO/IEC 17025'e göre geçerli kılma, özel amaçlı bir kullanım için gerekli şartların yerine getirildiğinin inceleme sonucunda teyit edilmesi ve objektif bir delilin elde edilmesi şeklinde tanımlanmıştır [4]. Analitik işlemlerin geçerliliğinin amacı, bilimsel bütünlük ve uygunluğun sağlanması, gereken amaç için yeterli güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçların alınmasıdır [5].

Bir analitik laboratuvardaki geçerlilik çalışmaları, ekipman, analitik metot, analitik sistem ve analitik data için yapılır. Ekipman geçerliliği, enstrümanın doğru performansta olmasının kontrolüdür. Analitik enstrümanlar yüksek kalitede ve güvenilir sonuçlar alınmasında çok önemli bir role sahiptir. Enstrümanın mekanik kısımlarının yanı sıra bilgisayar yazılımında geçerliliğinin sağlanması şarttır. Analitik metodun geçerliliği ise metodun sonuçlarının kullanımını ile ilgili spesifikasyonları karşılama performansının belirlenmesidir. Metot geçerliliği için en çok kullanılan parametreler, seçicilik, doğrusal aralık, doğruluk, tayin limiti, teşhis limiti ve kesinliktir [1].

Deniz ürünleri tüketimine bağlı zehirlenmeler virüs (Hepatitis A, Norwalk virus, Poliovirus), bakteri (*Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio hollisae*), parazit (*Anisakis simplex*, *Pseudoterranova decipiens*, *Eustrongylides excisus*, *Diphyllobothrium latum*) ve toksinlerden kaynaklanmaktadır [6]. Dinoflagellata adı verilen tek hücreli, mikroskopik alglerin ürettiği başlıca toksinler; saksitoksin, yessotoksin, brevetoksin, domoik asit ve pektenotoksindir. Bu toksinler suyun rengini kırmızı ve kahverengiye çevirirler. Bu olaya "kırmızı akıntı (red tide)" adı verilir. Bu sularda yaşayan ve filtrasyon ile beslenen midye, deniz tarağı ve istiridye gibi canlılar alglerdeki toksini bünyelerine almakta ve bu deniz ürünlerini tüketen insanlarda zehirlenme tablosunun gelişmesine neden olmaktadır [7].

Amnezik Kabuklu Su Ürünü Zehirlenmesi (ASP), ilk kez 1987'de Kanada'nın doğu sahilinde Prens Edward Adası'nda mavi midye (*Mytilus edulis*) zehirlenmesini takiben 100 akut zehirlenme vakasına ve birkaç insanın ölmesine sebep olan çok ciddi bir olay meydana geldikten sonra fark edilmiştir [8]. ASP'den sorumlu asıl toksin domoik asittir. DA, *Pseudo-nitzshia* türüne ait çok sayıda mikroalg tarafından üretilen bir kainoid aminoasittir ve etkisini glutamat reseptörlerine bağlanarak gösterir [9, 10]. DA'nın Avrupa Birliği Direktifi

97/61/EEC'ye göre insanlar için kabul edilebilir düzeyi 20 µg/g'dır [11]. Domoik asit zehirlenmesinin insandaki semptomları, DA ile kontamine deniz ürünlerinin tüketilmesinden 24 saat sonra bulantı, kusma, baş ağrısı, ishal ve karın krampları şeklinde gastrointestinal semptomların gelişmesidir. Bunu takip eden 48 saat içinde ise hafıza kaybı, yönünü şaşırma gibi sinirsel semptomlar görülmekte olup ciddi olgularda felç, koma ve ölüm takip eder [12]. Tanımlanmış herhangi bir tedavisi bulunmamaktadır [13].

Tüketici sağlığı ve gıda güvenliğinin giderek önem kazandığı günümüzde, gıda analizleri yapan laboratuvarların kalite sistemini kurarak uygulamaya geçirmeleri ve sürekliliğinin sağlanması bir zorunluluk olarak karşımıza çıkmaktadır. Türkiye'de hizmet kalitesine önem veren laboratuvarlar, uluslar arası yeterlilik programlarına katılmakla birlikte, konu ile ilgili olarak ulusal düzeyde yapılan çalışmalar sınırlı sayıdadır. Bu çalışmada, ülkemiz açısından önemli bir ihracat potansiyeline sahip olan su ürünlerinin içinde yer alan çift kabuklu yumuşakçalarda DA miktarının belirlenmesinde kullanılan ve Avrupa Birliği tarafından referans olarak kabul edilen HPLC yönteminin TS EN ISO/IEC 17025 Laboratuvar Akreditasyon Standardı kapsamında metod performans kriterlerine göre geçerli kılınması amaçlandı.

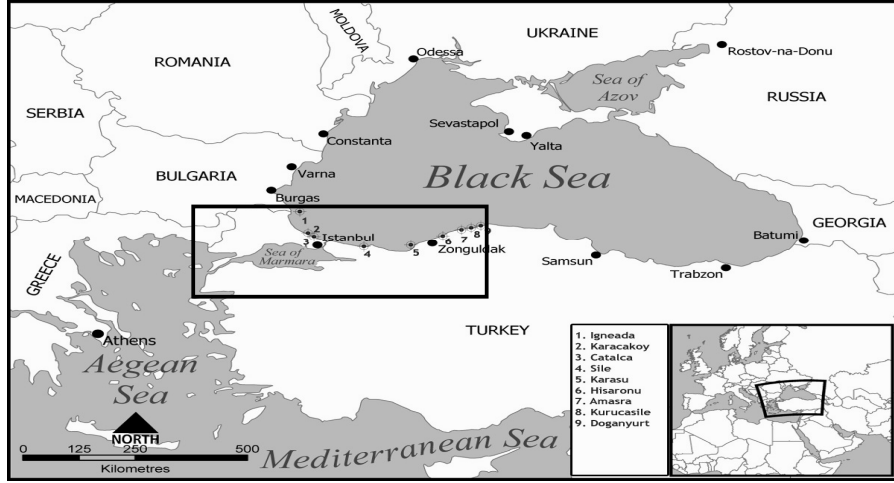
MATERYAL ve METOT

Materyal

Çalışmada, Karadeniz sahil şeridinde yer alan ve Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı tarafından periyodik olarak izlenen istasyonlarından (Şekil 1) elde edilen ve DA içermediği belirlenen canlı kum midyeleri materyal olarak kullanılmıştır.

Metot

Canlı kum midyelerinde DA varlığının belirlenmesinde, Avrupa Birliği tarafından referans metod olarak kabul edilen ve AOAC'de bildirilen yöntem kullanılmıştır [14]. Metodun prensibi, olması muhtemel toksinin 0.1 N hidroklorik asit (HCl) ile 5 dakika kaynatılarak homojenize edilen çift kabuklu yumuşakça dokusundan ekstrakte edilmesi, karışımın soğutulduktan sonra santrifüj edilerek süpernatantın filtre edilmesini takiben 242 nm dalga boyunda diyot array dedektörlü (DAD) Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile analiz edilmesi ve toksin düzeyinin konsantrasyonları bilinen standartlarla karşılaştırılarak hesaplanması esasına dayanmaktadır.



Şekil 1. Batı Karadeniz Bölgesi'ndeki midye avlanma istasyonları

Bu metot, en az 0.5 ppm düzeyinde DA içeren çift kabuklu yumuşakça (canlı kum midyesi, istiridye, kara midyesi ve dondurulmuş kabuklu) etlerinde yapılan analiz yöntemini kapsamaktadır. Ülkemizde, Su Ürünleri Yönetmeliği'ne [15] göre çift kabuklu yumuşakçalarda DA'nın tolerans değeri 20 µg/g'dır.

Örneklerin Analize Hazırlanması: Canlı kum midyelerinin dış kısımları temiz su ile iyice yıkanarak adduktor (açma-kapama) kaslar kesildi. Midye iç kısımları da kum ve diğer yabancı maddelerin uzaklaştırılması amacıyla temiz su ile iyice yıkanarak açma-kapama kasları ve eksendeki doku bağlantıları uzaklaştırıldı ve midye eti kabuktan çıkarılmıştır. Yaklaşık 150 g et, 10 numaralı elekte toplanarak 5 dak süzülür ve 3-6 mm delikleri olan blender ile homojenize edilmiştir.

Ekstraksiyon: Homojenize örnekten darası alınmış temiz bir behere 50 g tartılmış ve 50 mL 0.1 N HCl ilave edilerek cam bağıtle iyice karıştırılmıştır. Karışım ısıtarak kısık ateşte 5 dak süre ile kaynatıldı ve oda sıcaklığına kadar 10 dak soğumaya bırakılmıştır. Karışım, dereceli bir mezürde distile su ile 100 mL'ye tamamlanarak tekrar behere alınmış ve karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Santrifüj tüplerine bir miktar alınarak 5 dak süre ile 3000 devir/dakikada santrifüj edildi. Berrak sıvıdan 1-2 mL alınarak 5 mL'lik tek kullanımlık plastik şırıngaya takılmış yine tek kullanımlık filtreden geçirilmiş ve LC belirlemesi için bir vialde toplanmıştır.

HPLC Analizi:

Çalışma şartları: Dalga boyu: 242 nm, kolon sıcaklığı: 40°C, mobil faz akış oranı: 1.0 mL/dk ve enjeksiyon hacmi: 20µL. Öncelikle, cihazın otomatik örnekleme ünitesi yardımı ile 0.45 ile 45 µg/mL oranlarındaki DA kalibrasyon standartları enjekte edilmiştir. İyi bir doğruluk ve sıfır çizgisi kesişmesi elde edildiğinden tek nokta kalibrasyonu (örneğin 0.9 µg/mL) rutin olarak kullanılabilmiştir. Takiben örnek ekstraktları en az ikişer kez enjekte edilerek her örnek için ortalama pik alanları hesaplanmıştır. Farklı örneklerin enjeksiyonları arasında

kontaminasyonu önlemek için enjektör lupunun yıkanmasına dikkat edilmiştir. DA kalibrasyon standardı her iki saatte bir kez, her 8 saatte ise iki kez tekrar enjekte edilmiştir. Hesaplamalarda bir grup örnekten önce ve hemen sonrasında verilen standartların pik alanlarının ortalaması alınmıştır.

Sonuç ve Hesaplama: Sonuçlar aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$DA (\mu\text{g} / \text{mL}) = (R / R') \times (W' / W)$$

R: Örneğin ortalama pik yükseklikleri veya alanları

R': Standartın ortalama pik yükseklikleri veya alanları

W: Enjekte edilen örneğin mg ağırlığı

W': Standartın mg ağırlığı

Metot Validasyon Parametreleri

Doğrusallık

Domoik asit standardının (Sigma D6152, 055K1212) sekiz farklı konsantrasyonu (0.09 – 0.45 – 0.90 – 2.25 – 4.50 – 9.00 – 22.50 – 45.00 µg/mL) hazırlanmış ve her bir standart ikişer tekrar ve her bir tekrar ikişer defa okutulularak ardışık olmayan üç farklı günde konsantrasyona karşı alan grafiği elde edilerek doğrusallık test edilmiştir.

Tayin Limiti (LoD) ve Ölçüm Limiti (LoQ)

Domoik asit yönünden negatif midye örneğine azalan konsantrasyonda standart ilave edilerek ölçümler yapılmış ve kromatografi cihazının sürekli olarak aynı sonuçları verdiği en düşük konsantrasyon tayin ve ölçüm limiti hesaplamalarında kullanılmıştır. Bunun için ardışık olmayan dört farklı günde iki farklı tekrar hazırlanarak her bir tekrardan ikişer defa okuma yapılmıştır. Çalışma sonunda elde edilen verilerin ortalama ve standart sapmaları belirlendi ve standart sapmanın üç katı LoD, on katı ise LoQ olarak hesaplanmıştır.

Tekrarlanabilirlik ve Tekrar Üretilirlik

Beş analist tarafından DA yönünden negatif midye örneğine son konsantrasyon 0.90 µg/mL olacak şekilde standart çözelti ilave edilerek ardışık olmayan dört farklı günde ikişer tekrar hazırlanarak her bir tekrardan ikişer defa okuma yapılmıştır. Çalışmanın 1. gününde her analist iki yerine dörder tekrar hazırlayarak birinci gün verilerinden tekrarlanabilirlik, dört farklı günün verilerinden ise tekrar üretilebilirlik test edilmiştir. Elde edilen verilerin ortalamaları ve standart sapmaları hesaplanarak istatistiksel değerlendirmeleri yapılmıştır.

Geri Kazanım

Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik çalışmalarında elde edilen veriler kullanılarak

$$\% R = (K_{\text{ölçüm sonucu}} / K_{\text{ilave standardın teorik değeri}}) \times 100$$

formülü ile hesaplanmıştır.

Doğruluk

Doğruluğun bileşenleri olan tekrarlanabilirlik ve gerçekliğin hesaplanmasında, tekrarlanabilirlik–tekrar üretilebilirlik çalışmasında elde edilen veriler kullanılmıştır. Gerçeklik, % hata olarak ifade edildi ve

$$\% \text{ Hata} = [(K_{\text{ölçüm sonucu ortalaması}} - K_{\text{ilave standardın teorik değeri}}) / K_{\text{ilave standardın teorik değeri}}] \times 100$$

formülü yardımı ile hesaplanmıştır.

Sistem Parametreleri

Kromatografi cihazı kullanılarak yapılan analizlerde alıkonma zamanı ve pik alanından yararlanılarak analit miktarının hesaplanmasına gidilir. Bu sebeple cihazın tekrarlanabilirliği, alıkonma zamanı ve pik alanı tekrarlanabilirliği ile doğrulanır. Bunun için tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik çalışmasında elde edilen veriler kullanılarak alıkonma zamanı ve pik alanının tekrarlanabilirliği test edilmiştir.

Kalite Kontrol

Kalite kontrol, iç ve dış kalite kontrolleri ile yapılmıştır. İç kalite kontrolünde, son konsantrasyonda 0.90 µg/mL DA standardı ilave edilmiş midye dokusu kullanılarak kalite kontrol grafikleri hazırlanmıştır. Bu temel çalışma sonrasında her 15 günde bir ve laboratuvarında resmi kontrol amaçlı örnek çalışıldığı günlerde yine aynı konsantrasyonda standart okutulmuş grafik değerlendirilmiştir. Kalite kontrolde, uyarı limiti $\pm 2S$, önlem limiti ise $\pm 3S$ olarak kullanılmıştır. Ayrıca yine 15 günde bir ölçüm limiti ve geri kazanım oranı kontrol edilmiştir. Dış kalite kontrolünde ise, laboratuvarlar arası ring testlerine katılarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Herhangi bir kantitatif metot için metodun uygulanabileceği analit konsantrasyonlarından oluşan çalışma aralığının belirlenmesi gereklidir. Bir analitik yöntemin çalışma aralığı yöntemin doğruluğu, doğrusalığı ve kesinliği kullanılarak kararlaştırılmış en düşük ve en yüksek değerler arasındaki süreçtir [16, 3]. Metot valide edilirken, geçerlilik deneyleri (tekrarlanabilirlik ve geri kazanım testleri) bu aralık göz önünde bulundurularak planlanır [17].

Bir analitik yöntemin doğrusalığı ya analiz sonuçlarından doğrudan elde edilir ya da matematiksel olarak belli konsantrasyonlarda analit içeren ve belirli bir sırada verilen örneklerin analizinden elde edilir. Kalibrasyon eğrisi, ölçülen konsantrasyonun %80 ile 120 oranındaki konsantrasyon aralığında, beş ya da beşten fazla standarttan üçten altıya kadar değişen uygulama serisiyle oluşturulur [18, 3].

Çalışmada, ardışık olmayan üç farklı günde, sekiz farklı konsantrasyonda hazırlanan DA standartlarından elde edilen alan sonuçları Tablo 1'de görülmektedir. Yapılan varyans analizleri, enjeksiyon ve tekrarlar arasında önemli bir fark olmadığını ($p>0.05$) gösterdiğinden tekrarların ortalamaları alınarak günler arasında istatistiksel önem bulunup bulunmadığı incelenmiştir (Tablo 2).

Tablo 1. Farklı konsantrasyonlardaki DA standartları ile enjeksiyon ve tekrar ölçümlerinin yer aldığı doğrusallık değerleri

Günler	Konsantrasyon (µg/mL)	Tekrar	Alan		ortalama	
			Enj. 1	Enj. 2		
1	0.09	1	8.70	10.40	9.55	
		2	8.60	9.20	8.90	
	0.45	1	41.40	42.00	41.70	
		2	41.50	41.90	41.70	
	0.90	1	85.30	86.00	85.65	
		2	85.20	85.90	85.55	
	2.25	1	210.90	208.80	209.85	
		2	211.00	208.90	209.95	
	4.50	1	420.50	421.40	420.95	
		2	420.10	421.10	420.60	
	9.00	1	882.50	872.30	877.40	
		2	883.20	873.10	878.15	
	22.50	1	2170.40	2139.10	2154.75	
		2	2171.90	2142.00	2156.95	
	45.00	1	4378.40	4273.70	4326.05	
		2	4379.80	4277.60	4328.70	
	2	0.09	1	14.10	7.40	10.75
			2	9.00	7.90	8.45
0.45		1	42.30	40.70	41.50	
		2	42.30	40.70	41.50	
0.90		1	87.70	84.60	86.15	
		2	87.40	84.30	85.85	
2.25		1	213.40	207.30	210.35	
		2	212.40	207.20	209.80	
4.50		1	426.50	418.80	422.65	
		2	427.10	419.20	423.15	
9.00		1	885.50	859.10	872.30	
		2	885.50	860.50	873.00	
22.50		1	2181.20	2113.00	2147.10	
		2	2181.40	2113.50	2147.45	
45.00		1	4358.10	4294.70	4326.40	
		2	4361.00	4295.20	4328.10	
3		0.09	1	8.30	8.40	8.35
			2	8.20	8.80	8.50
	0.45	1	43.20	42.80	43.00	
		2	42.60	42.80	42.70	
	0.90	1	87.90	89.70	88.80	
		2	87.90	89.40	88.65	
	2.25	1	221.90	227.90	224.90	
		2	221.70	227.90	224.80	
	4.50	1	434.80	434.20	434.50	
		2	434.80	434.20	434.50	
	9.00	1	884.70	899.60	892.15	
		2	884.10	902.70	893.40	
	22.50	1	2299.80	2330.80	2315.30	
		2	2296.20	2328.00	2312.10	
	45.00	1	4368.60	4415.20	4391.90	
		2	4368.10	4410.00	4389.05	

Tablo 2. Tekrar ortalamaları ve günlere göre DA doğrusallık değerleri

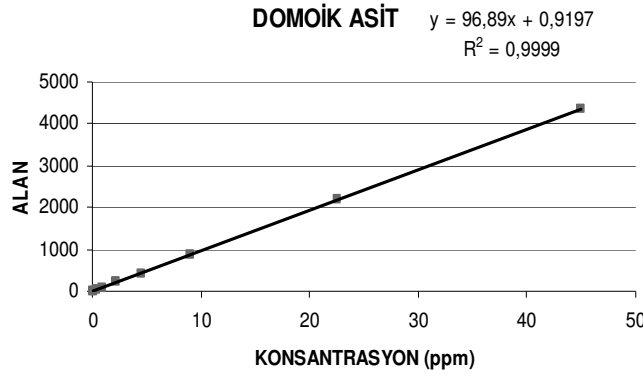
Konsantrasyon (µg/ml)	Alan			
	1. Gün	2. Gün	3. Gün	Ortalama
0.09	9.23	9.60	8.43	9.08
0.45	41.70	41.50	42.85	42.03
0.90	85.60	86.00	88.73	86.78
2.25	209.90	210.08	224.85	214.94
4.50	420.78	422.90	434.50	426.06
9.00	877.78	872.65	892.78	881.07
22.50	2155.85	2147.28	2313.70	2205.61
45.00	4327.38	4327.25	4390.48	4348.37

Ardışık olmayan üç farklı günde yapılan DA doğrusallık çalışmalarında, günler arasında istatistiksel bir önem bulunmadığı ($p>0.05$) belirlendi ve günlere ait ortalama

değerler alınarak konsantrasyona karşı alan grafiği çizildi. Elde edilen doğrudan R^2 değerinin 0.999 olduğu hesaplandı (Tablo 3, Şekil 2).

Tablo 3. DA doğrusallık çalışmasında günlere ait ortalamalar alınarak elde edilen konsantrasyona karşı alan değerleri

Konsantrasyon (µg/mL)	Alan
0	0
0.09	9.083
0.45	42.017
0.90	86.775
2.25	214.942
4.50	426.058
9.00	881.067
22.50	2205.608
45.00	4348.367



Şekil 2. DA doğrusallık çalışmasında farklı konsantrasyonlara karşı alan grafiği

Böylelikle çift kabuklu yumuşakça örneklerindeki DA varlığının belirlenmesinde bu metodun kullanılması sırasında, Su Ürünleri Yönetmeliği'nde [15] bildirilen 20 mg/kg'lık yasal üst limitin iki katından fazla miktarının belirlenmesinde metodun lineer olduğu kanıtlanmıştır.

Tayin limiti, analitik bir işlem ile analitin örnekte tayin edilebilecek fakat kesin olarak miktarı belirlenemeyen en düşük konsantrasyonudur. Örneğin sinyal olarak okunabildiği en düşük derişimdir [19, 3]. Tayin limiti kullanılan yöntemle göre değişmek üzere aletli ya da aletsiz olarak yapılır. Aletli işlemlerde bilinen en düşük konsantrasyonda analiz edilen bileşeni içeren örnek sonuçları, kör sonuçları ile karşılaştırılarak sinyal/gürültü oranı belirlenir. Tayin limiti, genellikle sinyal/gürültü oranının 3 katı olarak kabul edilir [20, 21].

Ölçüm limiti, analitik bir yöntem kullanılarak analitin uygun doğruluk ve kesinlikle ölçülebilen en düşük konsantrasyonudur [16]. Çoğu durumda ölçüm limiti, tayin limitinin iki, üç katıdır [22]. Ölçüm limitinin belirlenmesinde genel yaklaşım, kör örnek okumalarının standart sapmasının 5, 6 veya 10 katının alınmasıdır [3, 18]. Kromatografik metotlarda LoD ve LoQ belirleme için azalan konsantrasyonda örnek hazırlanarak elde edilen kromatogramın pik yüksekliği ve gürültü ölçülerek S/N oranı hesaplanır. LoD için S/N oranını üç katı alınarak, LoQ için S/N oranının 10 katı alınarak hesaplanır [23].

Tablo 4'te tayin limiti ve ölçüm limitinin belirlenmesi için yapılan analizler ve elde edilen sonuçlar görülmektedir. DA bakımından negatif midye örneğine 0.45 µg/mL düzeyinde DA standardı spike edilerek ardışık olmayan

dört farklı günde yapılan tekrar enjeksiyonları sonucunda ortalama 0.4125 ± 0.0279 µg/mL değeri elde edilmiştir. Buna göre, standart sapmanın üç katı olarak hesaplanan LoD değeri 0.0837 µg/mL, standart sapmanın on katı alınarak hesaplanan LoQ değeri ise 0.279 µg/mL olarak belirlenmiştir (Tablo 4).

Tablo 4. Domoik asit tayin limiti ve ölçüm limiti analizleri (DA eklenen = 0.45 µg/mL)

Günler	Tekrar	Enj. 1	Enj. 2
1	1	0.44	0.45
	2	0.43	0.45
2	1	0.47	0.41
	2	0.41	0.40
3	1	0.42	0.39
	2	0.39	0.39
4	1	0.38	0.40
	2	0.38	0.39

Ortalama = 0.4125 Genel SD = 0.0279

Tekrarlanabilirlik, bir metodun aynı laboratuvarında, aynı kişi tarafından, aynı kimyasallar ve ölçüm cihazı kullanılarak kısa zaman aralığında uygulanması ile elde edilen ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının ölçüsüdür. Tekrar üretilebilirlik ise, bir metodun farklı laboratuvarında, farklı kişi tarafından, farklı kimyasallar ve cihaz kullanılarak, farklı günlerde uygulanması ile elde edilen ölçüm sonuçlarının biri birine yakınlığının ölçüsüdür [24, 3]. Tekrarlanabilirlik kesinliğin bir göstergesidir [25]. Tekrarlanabilirlik deneyleri metodun ölçüm aralığına, aynı laboratuvarında kaç kişi ve kaç

cihazda yapılacağına bağlı olarak ölçüm aralığında en az üç farklı konsantrasyonda yapılmalıdır. Eğer analiz tek bir limit değere göre yapılıyorsa o zaman tek konsantrasyonda yapılabilir. Tekrarlanabilirlik aynı gün içerisinde yapılan analiz sonuçlarının, her konsantrasyon için standart sapma veya rölatif standart sapma olarak hesaplanır. Ara tekrarlanabilirlik ise aynı kişinin farklı günlerde yaptığı analiz sonuçlarının standart sapması veya rölatif standart sapmasıdır [17]. Bu araştırmada beş analist tarafından ardışık olmayan dört farklı günde yapılan çalışmada elde edilen birinci gün verilerinden tekrarlanabilirlik % RSD'si 2.613, dört farklı günün verilerinden tekrar üretilebilirlik % RSD'si ise 5.16 olarak belirlenmiştir (Tablo 5). Tekrar üretilebilirlik çalışmasının varyans analizi sonuçları, analistler ve günler arasında istatistiksel olarak önem bulunduğunu göstermiştir ($p < 0.05$).

Analitik metotlar, analit ya da ilgili maddelerin tümünü her zaman ölçemez. Analitler, örneklerde çeşitli formlarda bulunabilmektedir. Böylelikle bir metot, analitin sadece belirli bir formunu tayin etmek için üretilmiş olabilir. Bununla birlikte, mevcut analitlerin tümünün belirlenmesinde yer alan bir hata, metodun doğasında bulunan bir problemi de yansıtabilmektedir. Her iki durumda da, valide edilen metodun mevcut analitlerin tümünü belirlemede yeterli olup olmadığını kanıtlanması gerekmektedir [3].

Geri kazanım testi için analiz edilen madde ile aynı veya benzer matrikste sertifikalı referans madde analiz edilerek bulunan sonuçtan geri kazanım oranı hesaplanır. Sertifikalı referans madde mevcut değilse gerçek örnek üzerine standart eklenerek geri kazanım oranı hesaplanabilir. Geri kazanım testleri, metodun

ölçüm kapsamındaki matrisler ve ölçüm aralığında farklı konsantrasyonlarda yapılmalıdır [26, 17]. Tablo 5'te bildirilen tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik çalışmalarından elde edilen veriler kullanılarak DA analizi geri kazanım oranının %71.3 – 94.5 arasında değiştiği belirlenmiştir (Tablo 6).

Analitik bir yöntemin doğruluğu, bir metodun ölçüm sonuçlarının gerçek değere ve bu ölçümlerin birbirine yakınlığını ifade etmek için kullanılır [3]. Metot validasyonu, sonuçlar üzerine etkili olan sistematik ve rastgele hatalar nedeniyle doğruluğun tam olarak hesaplanmasına yardımcı olur. Bu yüzden doğruluk normalde iki komponent olarak çalışılır. Bunlar gerçeklik ve kesinliktir. Bir metodun sistematik hatası, doğruluğun gerçeklik bileşenini, rastgele hatası ise tekrarlanabilirlik bileşenini oluşturur.

Kesinlik, sonuçların standart sapmasının diğer bir sonucun standart sapmasına ne kadar yaklaştığını ifade eder. En çok bilinen iki kesinlik ölçümü, tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirliktir [3, 17]. Doğruluk için kabul edilebilir kriter, nominal değerden \pm %15'ten fazla sapmanın olmamasıdır [19].

Çalışmada, tekrarlanabilirlik ve gerçekliğin hesaplanmasında, tekrarlanabilirlik–tekrar üretilebilirlik çalışmasında (Tablo 5) elde edilen veriler kullanıldı. Gerçeklik, % hata olarak ifade edildi ve hata oranı %17.88 olarak, doğruluk oranı ise %82.12 olarak belirlendi (Tablo 7). Düzeltme Faktörü (DF), gerçek değerlerin bulunan ortalama değere bölünmesi ile 1.22, Düzeltilmiş Değer (DD) ise bulunan değerlerin DF ile çarpılması ile 1.8 olarak hesaplandı.

Tablo 5. Domoik asit tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik çalışması (DA eklenen = 0.9 µg/mL)

Paralel	Günler	1. Analist	2. Analist	3. Analist	4. Analist	5. Analist	Ort.	SD	RSD	RSD ²	n-1
1	Gün 1	1,51	1,62	1,53	1,43	1,46	1,51	0,0731437	0,0484	0,002346388	4
2		1,56	1,47	1,55	1,47	1,41	1,49	0,0626099	0,042	0,001760956	4
1	Gün 2	1,47	1,69	1,44	1,55	1,58	1,55	0,0986408	0,0638	0,004070932	4
2		1,43	1,69	1,42	1,45	1,54	1,51	0,1132696	0,0752	0,005656877	4
1	Gün 3	1,43	1,44	1,41	1,43	1,41	1,42	0,0134164	0,0094	8,87672E-05	4
2		1,41	1,41	1,32	1,38	1,52	1,41	0,0725948	0,0516	0,002658308	4
1	Gün4	1,41	1,56	1,35	1,5	1,44	1,45	0,0810555	0,0558	0,003116249	4
2		1,50	1,59	1,4	1,49	1,46	1,49	0,0690652	0,0464	0,002154331	4
Ortalama		1,465	1,56	1,43	1,46	1,48					
SD		0,05	0,11	0,08	0,05	0,06					
RSD		0,04	0,07	0,06	0,04	0,04					
n-1		23	23	23	23	23					
RSD²		0,0014	0,0049	0,0031	0,0013	0,0018					
Toplam : 0,021852808										32	
RSD_{pool} : 0,02613236											
(Kısa dönem tekrarlanabilirlik)											

RSD_{pool} 0.0516

HPLC yöntemi ile analizlerde alıkonma zamanı ve pik alanından yararlanılarak analit miktarını hesaplamaya gidilir. Böylelikle cihazın tekrarlanabilirliği, alıkonma zamanı (RT) ve pik alanı tekrarlanabilirliği ile doğrulanır.

Bu amaçla tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik çalışmasında (Tablo 5) elde edilen veriler kullanılarak alıkonma zamanı ve pik alanının tekrarlanabilirliği test edilmiştir.

Tablo 6. DA geri kazanım oranı değerleri

GÜN	Analist	Tekrar	Gerçek değer µg/mL	Enj.1	Enj.2	Ort	% R ₁	% R ₂	%R _{ort}
1	1	1	1,8	1,4646	1,5646	1,51	81,4	86,9	84,1
		2	1,8	1,5768	1,5442	1,56	87,6	85,8	86,7
	2	1	1,8	1,7013	1,5422	1,62	94,5	85,7	90,1
		2	1,8	1,4871	1,4483	1,47	82,6	80,5	81,5
	3	1	1,8	1,5279	1,5238	1,53	84,9	84,7	84,8
		2	1,8	1,5585	1,5320	1,55	86,6	85,1	85,8
	4	1	1,8	1,5156	1,3361	1,43	84,2	74,2	79,2
		2	1,8	1,3871	1,5626	1,47	77,1	86,8	81,9
	5	1	1,8	1,4667	1,4585	1,46	81,5	81,0	81,3
		2	1,8	1,2831	1,5279	1,41	71,3	84,9	78,1
2	1	1	1,8	1,4623	1,4813	1,47	81,2	82,3	81,8
		2	1,8	1,4391	1,4201	1,43	80,0	78,9	79,4
	2	1	1,8	1,6375	1,7409	1,69	91,0	96,7	93,8
		2	1,8	1,6966	1,6797	1,69	94,3	93,3	93,8
	3	1	1,8	1,4243	1,4539	1,44	79,1	80,8	80,0
		2	1,8	1,3779	1,4581	1,42	76,6	81,0	78,8
	4	1	1,8	1,4876	1,6100	1,55	82,6	89,4	86,0
		2	1,8	1,4644	1,4412	1,45	81,4	80,1	80,7
	5	1	1,8	1,5742	1,5784	1,58	87,5	87,7	87,6
		2	1,8	1,5657	1,5109	1,54	87,0	83,9	85,5
3	1	1	1,8	1,4038	1,4495	1,43	78,0	80,5	79,3
		2	1,8	1,4454	1,3767	1,41	80,3	76,5	78,4
	2	1	1,8	1,4266	1,4474	1,44	79,3	80,4	79,8
		2	1,8	1,3684	1,4578	1,41	76,0	81,0	78,5
	3	1	1,8	1,3663	1,4578	1,41	75,9	81,0	78,4
		2	1,8	1,3227	1,3247	1,32	73,5	73,6	73,5
	4	1	1,8	1,4121	1,4558	1,43	78,5	80,9	79,7
		2	1,8	1,3622	1,3954	1,38	75,7	77,5	76,6
	5	1	1,8	1,3996	1,4287	1,41	77,8	79,4	78,6
		2	1,8	1,5181	1,5181	1,52	84,3	84,3	84,3
4	1	1	1,8	1,3717	1,4514	1,41	76,2	80,6	78,4
		2	1,8	1,5189	1,4920	1,51	84,4	82,9	83,6
	2	1	1,8	1,5475	1,5802	1,56	86,0	87,8	86,9
		2	1,8	1,5802	1,5904	1,59	87,8	88,4	88,1
	3	1	1,8	1,3410	1,3676	1,35	74,5	76,0	75,2
		2	1,8	1,4228	1,3737	1,40	79,0	76,3	77,7
	4	1	1,8	1,4902	1,5005	1,50	82,8	83,4	83,1
		2	1,8	1,4943	1,4800	1,49	83,0	82,2	82,6
	5	1	1,8	1,4269	1,4555	1,44	79,3	80,9	80,1
		2	1,8	1,4718	1,4514	1,46	81,8	80,6	81,2

Çalışmada, alıkonma zamanının 6.816 – 6.974 dak arasında değiştiği (Tablo 8) ve günler ve tekrarlar arasında istatistiksel olarak önemli fark olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). Bu sapmanın örneklerdeki DA varlığının tespit edilmesi sırasında, standart okuması

yapıldığı için alıkonma zamanı açısından önemli olmayacağı kanısına varılmıştır. Alan tekrarlanabilirliği açısından ise günler ve tekrarlar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı belirlenmiştir ($p > 0.05$).

Tablo 7. Domoik asit metot validasyonu doğruluk verileri

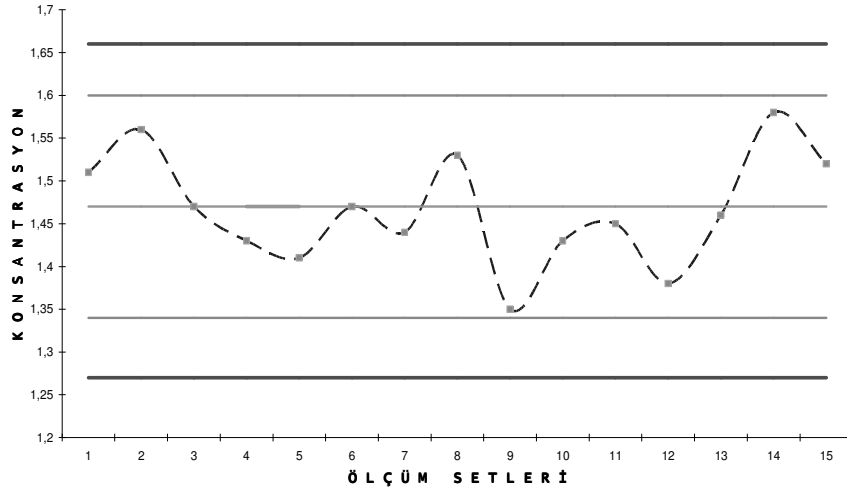
Günler	Analist	Tekrar	Gerçek değer µg/mL	Enj.1	Enj.2	Ort	% R ₁	% R ₂	% R _{ort}	% E (100 - % R _{ort})	
1	1	1	1,8	1,4646	1,5646	1,51	81,4	86,9	84,1	15,9	
		2	1,8	1,5768	1,5442	1,56	87,6	85,8	86,7	13,3	
	2	1	1,8	1,7013	1,5422	1,62	94,5	85,7	90,1	9,9	
		2	1,8	1,4871	1,4483	1,47	82,6	80,5	81,5	18,5	
	3	1	1,8	1,5279	1,5238	1,53	84,9	84,7	84,8	15,2	
		2	1,8	1,5585	1,5320	1,55	86,6	85,1	85,8	14,2	
	4	1	1,8	1,5156	1,3361	1,43	84,2	74,2	79,2	20,8	
		2	1,8	1,3871	1,5626	1,47	77,1	86,8	81,9	18,1	
	5	1	1,8	1,4667	1,4585	1,46	81,5	81,0	81,3	18,7	
		2	1,8	1,2831	1,5279	1,41	71,3	84,9	78,1	21,9	
2	1	1	1,8	1,4623	1,4813	1,47	81,2	82,3	81,8	18,2	
		2	1,8	1,4391	1,4201	1,43	80,0	78,9	79,4	20,6	
	2	1	1,8	1,6375	1,7409	1,69	91,0	96,7	93,8	6,2	
		2	1,8	1,6966	1,6797	1,69	94,3	93,3	93,8	6,2	
	3	1	1,8	1,4243	1,4539	1,44	79,1	80,8	80,0	20,1	
		2	1,8	1,3779	1,4581	1,42	76,6	81,0	78,8	21,2	
	4	1	1,8	1,4876	1,6100	1,55	82,6	89,4	86,0	14,0	
		2	1,8	1,4644	1,4412	1,45	81,4	80,1	80,7	19,3	
	5	1	1,8	1,5742	1,5784	1,58	87,5	87,7	87,6	12,4	
		2	1,8	1,5657	1,5109	1,54	87,0	83,9	85,5	14,5	
3	1	1	1,8	1,4038	1,4495	1,43	78,0	80,5	79,3	20,7	
		2	1,8	1,4454	1,3767	1,41	80,3	76,5	78,4	21,6	
	2	1	1,8	1,4266	1,4474	1,44	79,3	80,4	79,8	20,2	
		2	1,8	1,3684	1,4578	1,41	76,0	81,0	78,5	21,5	
	3	1	1,8	1,3663	1,4578	1,41	75,9	81,0	78,4	21,6	
		2	1,8	1,3227	1,3247	1,32	73,5	73,6	73,5	26,5	
	4	1	1,8	1,4121	1,4558	1,43	78,5	80,9	79,7	20,3	
		2	1,8	1,3622	1,3954	1,38	75,7	77,5	76,6	23,4	
	5	1	1,8	1,3996	1,4287	1,41	77,8	79,4	78,6	21,4	
		2	1,8	1,5181	1,5181	1,52	84,3	84,3	84,3	15,7	
4	1	1	1,8	1,3717	1,4514	1,41	76,2	80,6	78,4	21,6	
		2	1,8	1,5189	1,4902	1,50	84,4	82,8	83,6	16,4	
	2	1	1,8	1,5475	1,5802	1,56	86,0	87,8	86,9	13,1	
		2	1,8	1,5802	1,5904	1,59	87,8	88,4	88,1	11,9	
	3	1	1,8	1,3410	1,3676	1,35	74,5	76,0	75,2	24,8	
		2	1,8	1,4228	1,3737	1,40	79,0	76,3	77,7	22,3	
	4	1	1,8	1,4902	1,5005	1,50	82,8	83,4	83,1	16,9	
		2	1,8	1,4943	1,4800	1,49	83,0	82,2	82,6	17,4	
	5	1	1,8	1,4269	1,4555	1,44	79,3	80,9	80,1	19,9	
		2	1,8	1,4718	1,4514	1,46	81,8	80,6	81,2	18,8	
ORTALAMA			1,8	1,4697	1,4867	1,478	81,7	82,6	82,1	17,88	
									SD =	0,083	
										RSD =	0,056
									4,584	Doğruluk	
								0,0558		% 82,12	

Metot validasyonu, valide edilen metodun rutin kullanım koşullarındaki performansını ve bu performansın gerçekleşme koşullarını ve sınırlarını belirler. Metodun rutin kullanım sırasında kontrol altında tutulabilmesi için belirli bir kalite kontrol işleminin uygulanması gerekir. Uygun kontrol aracı olarak bilinen bileşimdeki kontrol örneği (kör örnek, kalibrasyon standardı, eklenen örnek, paralel analiz) belirli aralıklarla normal örnek gibi analiz edilir ve bulunan sonuç grafiksel olarak kaydedilir. Kontrol limiti olarak uyarı limiti $\pm 2s$, önlem limiti için ise $\pm 3s$ olarak kullanılır [17].

Çalışmada, kalite kontrol (QC) grafiğinin (Şekil 3) ilk kez oluşturulmasında tekrarlanabilirlik çalışmasından elde edilen sonuçlardan yararlanılmış ve üst önlem limiti (ÜÖL) 1.65, üst uyarı limiti (ÜÜL) 1.59, orta çizgi 1.47, alt uyarı limiti (AUL) 1.35 ve alt önlem limiti (AÖL) 1.29 olarak hesaplanmıştır (Tablo 9 ve Tablo 10). Takiben her onbeş günde bir yapılan eklemeli örnek analizlerinden elde edilen sonuçların alt ve üst önlem limitleri içerisinde kaldığı belirlenmiştir.

Tablo 8. Domoik asit sistem parametreleri (alıkonma zamanı ve alan tekrarlanabilirliği) çalışması

RT (dakika) (Domoik asit 1.8 µg/mL)	Günler			Alan tekrarla. (Domoik asit 1.8 µg/mL)	Günler		
	1	2	3		1	2	3
Tekrar 1	6.962	6.932	6.840	Tekrar 1	71.9	74.6	67.3
	6.974	6.933	6.841		71.5	74.8	68.7
Tekrar 2	6.966	6.930	6.841	Tekrar 2	62.9	74.2	73.0
	6.960	6.899	6.837		74.9	71.6	73.0
Tekrar 3	6.955	6.863	6.828	Tekrar 3	71.8	69.3	67.5
	6.952	6.872	6.830		76.7	70.2	69.7
Tekrar 4	6.953	6.865	6.824	Tekrar 4	77.3	68.2	69.5
	6.951	6.861	6.822		75.7	67.3	66.2
Tekrar 5	6.945	6.856	6.819	Tekrar 5	74.9	67.5	65.7
	6.942	6.858	6.816		74.7	68.9	70.1
Genel Ortalama =			6.8909	Genel Ortalama =			70.987
Genel SD =			0.0561	Genel SD =			3.622
Genel % RSD =			0.8148	Genel % RSD =			5.103
Alıkonma zamanı (RT)			6.816 – 6.974				



Şekil 3. Domoik asit ilk kalite kontrol (QC) grafiği

Tablo 9. Tekrarlanabilirlik çalışmasından elde edilen ve DA ilk kalite kontrol (QC) grafiği çiziminde kullanılan DA değerleri (eklenen DA 0.90 µg/mL)

Günler	Paralel	1. Analist	2. Analist	3. Analist	4. Analist	5. Analist
1	1	1.51	1.62	1.53	1.43	1.46
	2	1.56	1.47	1.55	1.47	1.41
2	1	1.47	1.69	1.44	1.55	1.58
	2	1.43	1.69	1.42	1.45	1.54
3	1	1.43	1.44	1.41	1.43	1.41
	2	1.41	1.41	1.32	1.38	1.52
4	1	1.41	1.56	1.35	1.50	1.44
	2	1.50	1.59	1.40	1.49	1.46
Ortalama		1.47	1.56	1.43	1.46	1.48
SD		0.05	0.11	0.08	0.05	0.06
RSD		0.04	0.07	0.06	0.04	0.04
n-1		23	23	23	23	23
RSD ²		0.0014	0.0049	0.0031	0.0013	0.0018
RSD _{pool}		0.0516				

Tablo 10. Domoik asit ilk kalite kontrol grafiği üst ve alt önlem limitleri ile üst ve alt uyarı limitleri

Ölçüm seti	Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	DA standart konsantrasyonu : 1.8 $\mu\text{g/mL}$		
	X_1	X_{ort}	$X_1 - X_{\text{ort(ort)}}$	$[X_1 - X_{\text{ort(ort)}}]^2$
Set 1	1.51	1.51	0.04	0.00
Set 2	1.56	1.56	0.09	0.01
Set 3	1.47	1.47	0.00	0.00
Set 4	1.43	1.43	-0.04	0.00
Set 5	1.41	1.41	-0.06	0.00
Set 6	1.47	1.47	0.00	0.00
Set 7	1.44	1.44	-0.03	0.00
Set 8	1.53	1.53	0.06	0.00
Set 9	1.35	1.35	-0.12	0.01
Set 10	1.43	1.43	-0.04	0.00
Set 11	1.45	1.45	-0.02	0.00
Set 12	1.38	1.38	-0.09	0.01
Set 13	1.46	1.46	-0.01	0.00
Set 14	1.58	1.58	0.11	0.01
Set 15	1.52	1.52	0.05	0.00
Ort	1.47	1.47	Toplam = 0.06	
Ortalamaların ortalaması ($X_{\text{ort(ort)}} = 1.47$)				
$n = 1, n_{\text{total}} = 15$ $s = \sqrt{\sum (X - X_{\text{ort(ort)}})^2 / n - 1} = 0.06$				
$S = s / \sqrt{n}$ (ortalamanın standart sapması) = 0.06				
Üst Önlem Limiti (ÜÖL)		$X_{\text{ort(ort)}} + 3S =$		1.65
Üst Uyarı Limiti (ÜUL)		$X_{\text{ort}} + 2S =$		1.59
Orta çizgi		$X_{\text{ort(ort)}} =$		1.47
Alt Uyarı Limiti (AUL)		$X_{\text{ort(ort)}} - 2S =$		1.35
Alt Önlem Limiti (AÖL)		$X_{\text{ort(ort)}} - 3S =$		1.29

SONUÇ

Bu çalışmada doğruluk R^2 , tayin limiti (LoD) veya ölçüm limiti (LoQ) değerleri sırasıyla 0.9999, 0.0837 $\mu\text{g/mL}$ ve 0.279 $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlenmiştir. Tekrarlanabilirlik % RSD'si 2.613, tekrar üretilebilirlik % RSD'si ise 5.16 olarak hesaplanmıştır. Domoik asit analizi geri kazanım oranının, tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik çalışmalarından elde edilen veriler kullanılarak %71.3-%94.5 arasında değişmiştir. Gerçeklik % hata olarak %17.88, doğruluk oranı ise %82.12 olarak hesaplanmıştır. Çalışmada, alıkonma zamanı 6.816 – 6.974 dakika arasında değişmiştir.

Validasyonu yapılmış bir metodun uygulanması sırasında, metodun belli kalite kontrol testleri uygulanarak önceden belirlenen performans kriterleri dahilinde belirlenen limitler içerisinde kalıp kalmadığı izlenmelidir. Bu izleme sırasında metod, belirlenen limitler dışına çıktığında, metodun tekrar validasyonunun yapılması gerekmektedir. Buna göre, validasyon çalışmalarında belirlenen ölçüm limitleri aşıldığında, iç kalite kontrol testleri sırasında elde edilen değerler uyarı ($\pm 2S$) ve önlem ($\pm 3S$) limitlerini aştığında, geri kazanım oranı belirlenen aralığın dışına çıktığında, ring testleri sonuçlarında kabul edilemez değerler elde edildiğinde sistem gözden geçirilerek metod tekrar valide edilmelidir.

KAYNAKLAR

[1] Demirel, S., Özay, G., 2001. Gıda laboratuvarları ve akreditasyon süreci. *IV. Ulusal Ölçümbilim Kongresi*, Ekim 25-26, 2001, Eskişehir, Türkiye, 41-44s.

- [2] Anonim, 1999. Türk Akreditasyon Kurumu Kuruluş ve Görevleri Hakkında Kanun. Kanun No. 4457, Kabul Tarihi 27.10.1999.
- [3] EUROCHEM, 1998. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics English Edition 1.0.
- [4] TS EN ISO/IEC 17025, 2005. Türk Standartı TS EN ISO/IEC 17025, ICS 03.120.20. Deney ve Kalibrasyon Laboratuvarlarının Yeterliliği İçin Genel Şartlar. Türk Standartları Enstitüsü. Necatibey Caddesi No.112. Bakanlıklar, Ankara.
- [5] Chan, C.C., Lam, H., Lee, Y.C., Zhang, X.M., 2004. Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification, Wiley-Interscience.
- [6] Anonim, 2008. Seafood safety. <http://seafood.ucdavis.edu/Pubs/safety1.htm>.
- [7] Özel, İ., 2003. Planktonoloji I. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları No:145, İzmir.
- [8] Richardson, K., 1997. Advances In Marine Ecology. Vol. 31, Londra, 301-385s.
- [9] Kaniou-Grigoriadou, I., Mouratidou, T., Katikou, P., 2005. Investigation on the presence of domoic acid in Grek shellfish. *Harmful Algae* 4: 717-723.
- [10] Council of the European Communities, 1997. Council Directive 97/61/EEC of 20 October 1997 that modifies the Annex of Directive 91/492/EEC that lays down the health conditions for the production and the placing on the market of live bivalve molluscs. *Off J Eur Communities* L295: 35-36.
- [11] Todd, E.C.D. (1993). Domoic acid and amnesic shellfish poisoning – A review. *J Food Protec* 56(1): 69-83.

- [12] Grimmelt, B., Nijjar, M.S., Brown, J., MacNair, N., Wagner, S., Johnson, G.R., Ahmend, J.F., 1990. Relationship between domoic acid levels in the blue mussel (*Mytilus edulis*) and toxicity in mice. *Toxicol* 28: 501-508.
- [13] Özhan, E., Alparslan, N., 2002. *Türkiye'nin Kıyı ve Deniz Alanları 4. Ulusal Konferansı*, İzmir, Türkiye, Bildiriler Kitabı, 1. cilt, 15-19s.
- [14] Quilliam, M.A., Xie, M., Hardstaff, W.R., 1995. A rapid extraction and cleanup procedure for the liquid chromatographic determination of domoic acid in unsalted seafood. *J.AOAC Int.* 78 (2): 543-554.
- [15] Resmi Gazete, 2008. Su Ürünleri Yönetmeliği. (Değişik RG-21/9/2008-27004) Ek-7. Çift Kabuklu Yumuşakçalarda Kimyasal, Toksikolojik ve Mikrobiyolojik Kabul Edilebilir Üst Sınır Değerler. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Ankara.
- [16] FDA, 2000. Analytical procedures and method validation: Chemistry, manufacturing, and controls. *Federal Notices* 5(169): 776-777.
- [17] Akdağ, İ., 2003. Metot Validasyonu Strateji Planı Seminer Notları. TÜBİTAK UME Ulusal Metroloji Enstitüsü, Kocaeli.
- [18] APVMA, 2004. Guidelines for the validation of analytical methods for active constituent, agricultural and veterinary chemical products. Australian Pesticides, Veterinary Medicines Authority. Available from <http://www.apvma.gov.au>.
- [19] Shah, V.P., Midha, K., Dighe, S., 1992. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. *J. Pharm Sci.* 81(3): 309-312.
- [20] Ertaş Söğüt, Ö., 1997. Evaluation of the analytical validation parameters of atomic absorption spectrometry. Ph. D. Thesis Ege University, Graduate School of Health Sciences, Analytical Chemistry.
- [21] Hajicostas, E., 2003. Validation of Analytical Methods, Springer-Verlag, Berlin.
- [22] Ludden, T.M., 1994. Estimation of Limit of Quantitation. Bio-Internal, Munich, Germany.
- [23] FDA, 1993. Technical Review Guide: Validation of Chromatographic Methods, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Rockville, MD.
- [24] EAL-P11, 1997. European Cooperation for Accreditation of Laboratories Validation of Test Methods. General Principles and Concepts. Edition 1.
- [25] Gardner, J.A., Coleman, S., Farrow, S.G., 1993. Why worry about your analytical methods? *Analytical Proceedings* 30: 183-185.
- [26] Huber, L., 2003. Good Laboratory Practice and Current Good Manufacturing Practice. Agilent Technologies. Deutschland GmbH, Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany.
-
-