

C-Reaktif Protein  
UME CRM 1008

Dr. Merve ÖZTUĞ KILINÇ

Dr. Evren SABAN

Doç. Dr. Müslüm AKGÖZ

Dr. Alper İŞLEYEN

Dr. Tuğba DIŞPINAR GEZER

Dr. Seda Damla ÇAKMAR

Meltem AŞICIOĞLU KÜÇÜK

Hümeysra KARADORUK

Gökhan AKTAŞ

20.02.2024

Tarih



Doç. Dr. Mustafa ÇETİNTAŞ

Enstitü Müdürü V.

## İÇİNDEKİLER

İçindekiler .....	2
Kısaltmalar.....	3
Özet .....	4
Giriş .....	5
Katılımcılar.....	6
Malzeme İşleme.....	6
Homojenlik.....	7
Kararlılık .....	8
Karakterizasyon .....	11
Özellik Değerlerinin ve Belirsizliklerinin Atanması .....	12
Bilgilendirme Amaçlı Değer .....	13
İzlenebilirlik .....	13
Kullanım Talimatı .....	13
Kaynaklar.....	14
Revizyon Tarihçesi .....	16
Ekler .....	16
Ek 1. Homojenlik Çalışması Grafiği .....	16
Ek 2. Kısa Dönem Kararlılık Çalışması Grafikleri.....	17
Ek 3. Uzun Dönem Kararlılık Çalışması Grafikleri .....	18
Ek 4. Kullanım Kararlılığı Çalışması Grafiği.....	19
Ek 5. Ölçüm Yönteminin Detayları .....	20

### KISALTMALAR

CCQM	Madde Miktarı Danışma Komitesi: Kimya ve Biyolojide Metroloji
CRP	C-Reaktif Protein
GUM	Ölçüm Belirsizliğinin Hesaplanması Kılavuzu
ID	İzotop Seyreltme
ID-LC/MS-AAA	İzotop Seyreltme Sıvı Kromatografi/ Kütle Spektrometrisi Kullanılarak Amino Asit Analizi
IFCC	Uluslararası Klinik Kimya ve Laboratuvar Tıbbi Federasyonu
JCTLM	Laboratuvar Tıbbında İzlenebilirlik Ortak Komitesi
LC-HRMS	Sıvı Kromatografisi Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektrometrisi
LTS	Uzun Dönem Kararlılık ( <i>Long-Term Stability</i> )
$MS_{between}$	Gruplar arası kareler ortalaması
$MS_{within}$	Gruplar içi kareler ortalaması
$n$	Ünite içi tekrar sayısı
NIMJ	Japonya Ulusal Metroloji Enstitüsü
NIST	Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Standartlar ve Teknolojiler Enstitüsü
PCF	Propil kloroformat
RMP	Referans ölçüm prosedürü
PRS	Primer Referans Standart
RSD	Bağıl standart sapma
$s$	Standart sapma
$s_{bb}$	Üniteler arası standart sapma
SEC-UV-HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile boyut dışlama kromatografisi/ultraviyole tespiti
SI	Uluslararası Birimler Sistemi
SRM	Sertifikalı Referans Malzeme
STS	Kısa Dönem Kararlılık ( <i>Short-Term Stability</i> )
$s_{wb}$	Ünite içi standart sapma
$u_{bb}$	Üniteler arası heterojenlikten kaynaklanan standart belirsizlik
$u_{bb}^*$	Metot tekrarlanabilirliği tarafından gizlenebilen üniteler arası heterojenlikten kaynaklanan standart belirsizlik
$u_{char}$	Karakterizasyon standart belirsizliği
$u_{char,rel}$	Karakterizasyon bağıl standart belirsizliği
$u_{lts}$	Uzun dönem kararlılığa bağlı standart belirsizlik
$u_{lts,rel}$	Uzun dönem kararlılığa bağlı bağıl standart belirsizlik
$u_{sts}$	Kısa dönem kararlılığa bağlı standart belirsizlik
$u_{sts,rel}$	Kısa dönem kararlılığa bağlı bağıl standart belirsizlik
$v_{MS_{within}}$	$MS_{within}$ serbestlik derecesi
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

Sayfa 4 / 21	<b>TÜBİTAK ULUSAL METROLOJİ ENSTİTÜSÜ</b>	<b>UME CRM 1008</b>
--------------	---	-------------------------

## ÖZET

Bu sertifikalı referans malzeme (SRM), insan serumundaki C-reaktif protein (CRP) tayini için cihaz ve prosedürleri kalibre etmek amacıyla tasarlanmıştır. Ayrıca kalibratörlerin ve kontrol malzemelerinin değer atamasında da kullanılabilir. UME CRM 1008'in bir birimi, yaklaşık olarak 1 mL'lik bir rekombinant CRP çözeltisi içeren 1 vialden oluşur. Referans malzeme üretim süreci homojenlik, kısa dönem kararlılık, uzun dönem kararlılık ve karakterizasyon aşamalarından oluşmaktadır. UME CRM 1008 sertifikalandırma çalışmaları TS EN ISO 17034 standardı ve TSE ISO Guide 35 rehber dokümanının gerekliliklerine uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda gerçekleştirilen kimyasal ölçümlerde TS EN ISO/IEC 17025 gereklilikleri yerine getirilmiştir. Sertifika değerlerine ait belirsizlikler, JCGM 100 (GUM) ölçüm belirsizliği rehberine uygun olarak hesaplanmıştır. Bu referans malzeme üretim projesinin tüm aşamalarının planlanması, gerçekleştirilen faaliyetlerin koordinasyonu, deneylerin gerçekleştirilmesi ve elde edilen tüm verilerin değerlendirilmesi TÜBİTAK UME uzmanları tarafından enstitü altyapısı kullanılarak yapılmıştır.

CRP'nin monomerik molalitesi için sertifika değeri, izotop seyreltme sıvı kromatografi/yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrisi (ID-LC/HRMS) kullanılarak amino asit analizi yoluyla belirlenmiştir ve CRP için mevcut olan iki sertifikalı referans malzeme kullanılarak doğrulanmıştır. Ölçülen büyüklük, her bir amino asidin belirlenen miktarını ve CRP için bilinen amino asit dizisini kullanarak hesaplanan CRP'nin toplam molalitesidir. Metrolojik izlenebilirlik, molalite için SI türetilmiş birimlere dayanır ve  $\mu\text{mol/kg}$  olarak ifade edilir.

Sertifika değeri, yüksek saflıkta amino asit standartlarıyla kalibre edilmiş referans ölçüm prosedürü kullanılarak belirlenmiştir.

## GİRİŞ

C-reaktif protein (CRP), inflamatuvar yanıtlar için bir biyobelirteç olarak yaygın şekilde kullanılan önemli bir insan serum proteinidir [1]. İltihap, yaralanma veya enfeksiyona yanıt olarak, en az 100 kat artarak önemli bir biyobelirteç olarak görev yapar [2]. Ayrıca, CRP, bir akut faz proteini olarak normal insan serumunda tipik olarak 1 mg/L'nin altında çok düşük derişimlerde bulunur [2]. CRP'nin anormal seviyeleri kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıklarla ilişkilendirilmiştir [3,4]. CRP'nin ölçümü, ölçüm yöntemlerindeki standardizasyon eksikliği ve kullanılan reaktiflerin çeşitliliği nedeniyle ölçüm sonuçlarında önemli sapmaların olmasına neden olan zorluklar sunmaktadır [5]. Laboratuvar Tıbbında İzlenebilirlik İçin Ortak Komite (JCTLM) [6], şu anda ikincil sertifikalı referans malzemesi (SRM) ERM DA-474/IFCC'yi listelemektedir. Bu SRM, tıbbi laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılan son kullanıcı ölçüm prosedürleri ile CRP ölçümünde metrolojik izlenebilirliği kurmanın temelini oluşturur. ERM-DA-470'in atanan değeri, CRP için uluslararası standart olan WHO 85/506'ya dayalı olarak belirlenmiştir ve bu bilgiler sertifikasyon raporunda açıklanmıştır. Ancak, WHO 85/506'ya dayalı çözeltilerle hazırlanan birincil kalibratörlerin klinik örnekleri tam olarak temsil edip etmediği belirsizliğini korumaktadır [7]. En yaygın kabul edilen CRP ölçüm testleri bile IFCC CRP ikincil referans malzemesi ERM-DA474/IFCC kullanıldığında önemli sapmalar göstermektedir [8]. Ayrıca, CRP ölçümleri için klinik test prosedürleri, kullanılan cihaza ve prosedüre büyük ölçüde bağımlıdır, bu da metrolojik prosedürlerdeki standardizasyon eksikliğine katkıda bulunmaktadır [9]. Bu sorunları ele almak ve tanı doğruluğunu artırmak için CRP ölçümleri için bir referans ölçüm sistemi kurmak önemlidir. C-reaktif protein (CRP) ölçümleri için metrolojik izlenebilirliği sağlama çabaları kapsamında, "Laboratuvar Tıbbında İzlenebilirlik İçin Ortak Komite Çalıştayı" katılımcıları tarafından bir uzlaşma özeti son zamanlarda yayınlanmıştır [7]. Tartışma, mevcut CRP immünoloji testlerinin metrolojik izlenebilirlik çerçevesinin, klinik örnek sonuçları ile uyumlu olduğunu ve bu şekilde klinik gereksinimleri karşıladığını belirtmiştir [7,10]. Metroloji açısından istenen, birincil saf madde referans malzemesi ve bir referans ölçüm prosedürü (RMP) içeren bir kalibrasyon hiyerarşisi oluşturmaktır. Bu tür bir sistem, ölçüm sonuçlarının standartlaştırılmasını sağlar ve *in vitro* teşhisler için izlenebilirlik sağlar. Birincil referans malzemeleri, CIPM Danışma Komitesi: Kimya ve Biyolojide Metroloji (CC-QM) tarafından tanımlanan ölçüm prosedürüne göre birincil referans yöntemi doğrulamak ve kalibre etmek için kullanılan tek bileşenli veya karışık bileşenli olabilmektedir. Öte yandan, ikincil referans malzemeleri, CRP ölçüm yöntemlerinin geliştirilmesi sırasında serum tabanlı protein standartlarının kalibrasyonunu doğrulamak ve ulusal metroloji enstitüleri veya klinik tanı laboratuvarları için kontrol malzemesi sağlamak amacıyla kullanılmaktadır. Şu anda, Japonya Ulusal Metroloji Enstitüsü (NIMJ) tarafından üretilen CRM 6201-b ve Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Standartlar ve Teknoloji Enstitüsü (NIST) tarafından üretilen SRM 2924 gibi CRP birincil referans malzemeleri bulunmaktadır [11,12]. JCTLM, veri tabanında yeni bir aday SRM veya RMP önerirken, mevcut bir SRM veya RMP'ye karşı denkleğin derecesini doğrulamayı zorunlu kılar [13,14]. Ancak, CRP için hedeflenen ölçüm için belgelenmiş saf birincil SRM veya RMP eksikliği bulunmaktadır.

Bu çalışmada, TÜBİTAK Ulusal Metroloji Enstitüsü (TÜBİTAK UME) tarafından sertifikalı birincil referans malzemesi olarak CRP geliştirilmiştir [15]. Çalışmanın amacı, klinik ölçümlere izlenebilirlik kurulması, tutarlı ve güvenilir sonuçları sağlama konusunda katkı sağlamaktır. Çalışmada iki ölçüm yöntemi kullanılmıştır: izotop seyreltme sıvı kromatografi/ yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrisi (ID-LC/HRMS) kullanılarak amino asit analizi (ID-LC/MS-AAA) ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile boyut dışlama kromatografisi/ ultraviyole tespiti (SEC-UV-HPLC). ID-LC/MS-AAA, protein miktarını belirleme konusunda tercih edilen bir teknik olup, SI ile uyumlu izlenebilir sonuçlar

sağlamaktadır [16, 17]. Amino asit analizi için kritik bir adım olan hidroliz süreci optimize edilmiş ve elde edilen örneklerin saflığı ve verimliliği nedeniyle buhar fazlı hidroliz yöntemi tercih edilmiştir. ID-LC/MS-AAA yöntemi karakterizasyon çalışması ve değer atama için kullanılırken, SEC-HPLC kararlılık değerlendirmesi ve homojenlik analizi için gerçekleştirilmiştir. ANOVA dahil istatistiksel analizler yapılmış ve deneysel süreç için belirsizlik katkıları belirlenerek belirsizlik bütçesi oluşturulmuştur [16]. Sertifikalı molalite, yüksek saflıkta amino asit standartlarıyla kalibre edilmiş yüksek seviye referans ölçüm prosedürleri kullanılarak belirlenmiştir. UME CRM 1008 sertifikalandırma çalışmaları TS EN ISO 17034 standardı [18] ve TSE ISO Guide 35 [19] rehber dokümanının gerekliliklerine uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda gerçekleştirilen kimyasal ölçümlerde TS EN ISO/IEC 17025 [20] gereklilikleri yerine getirilmiştir. Sertifika değerlerine ait belirsizlikler, JCGM 100 [21] ölçüm belirsizliği rehberine (GUM) uygun olarak hesaplanmıştır.

## KATILIMCILAR

Sertifikalı referans malzeme üretimi için malzeme işleme, homojenlik, kararlılık ve karakterizasyon çalışmaları ile projenin diğer faaliyetlerinde yer alan kuruluşa ait bilgiler Tablo 1’de verilmektedir.

**Tablo 1.** Üretim ve Sertifikalandırma Süreçlerine Katılım Sağlayan Kuruluş

<b>İş Tanımı</b>	<b>Laboratuvar/Kurum</b>
Malzeme İşleme	
Homojenlik Çalışması	
Kararlılık Çalışmaları	TÜBİTAK Ulusal Metroloji Enstitüsü (UME) Gebze - Kocaeli, Türkiye
Karakterizasyon Çalışması	
Proje Yönetimi ve Veri Değerlendirme	

## MALZEME İŞLEME

### Malzeme Temini ve Hazırlama

Rekombinant insan CRP’si, içinde 20 mM Tris (pH 7,5), 140 mM sodyum klorür, 2 mM kalsiyum klorür ve %0,05 (w/v) sodyum azit içeren bir tampon çözelti bulunan 1,25 L’lik bir şişe içinde OYC Europe’dan satın alındı. Rekombinant CRP, Tanaka ve arkadaşları tarafından açıklandığı gibi Escherichia coli’de üretildi ve 6-aminohexanoik aside bağlanarak saflaştırıldı [22]. 1250 mL’lik rekombinant CRP, 1 mL’lik alikotlara bölündü. Bu alikotlar, sırayla numunelerin sıralandığı şekilde 1250 adet önceden etiketlenmiş 2 mL’lik polipropilen SRM viallerine yerleştirildi. Malzeme +4 °C’de hazırlandıktan sonra -80 °C’de saklandı.

## HOMOJENLİK

Üniteler arası homojenlik çalışması, CRP'nin tüm ünitelerde belirlenen değerler içerisinde olduğunu değerlendirmek amaçlı yapılmıştır. UME CRM 1008 üretiminde homojenlik çalışması için 12 ünite tabakalı rastgele numune seçimi programına (TRaNS) göre belirlenmiştir. Böylelikle, seçilen örneklerin toplam numune sayısını temsil etmesi garanti altına alınmıştır. Homojenlik analizleri her bir üniteden üç alt örneğin ölçümü ile tekrarlanabilirlik koşulları altında gerçekleştirilmiştir. Homojenlik analizi için geçerli kılınmış SEC-UV-HPLC yöntemi kullanılmıştır. Gerçekleştirilen ölçümlerde dolum ve analiz sırası kaynaklı olası eğilimlerin tespit edilebilmesi için ölçümler rastgele sıralamayla yapılmıştır.

Analizler sonucunda elde edilen molalite değerlerinin istatistiksel değerlendirmesi tek-etken varyans analizi (ANOVA) kullanılarak yapılmıştır. ANOVA ile istatistiksel değerlendirmenin yapılması öncesinde veri dağılımları incelenmiştir. Bu amaçla, ünite içi ve üniteler arası elde edilen sonuçlar histogramlar kullanarak tek tepeli dağılım için kontrol edilmiştir. Buna ek olarak, elde edilen verilerin Shapiro-Wilk testi uygulanarak da normal dağılım gösterdiği görülmüştür. Bu istatistiksel testler, TÜBİTAK UME tarafından geliştirilen Microsoft Excel® ile oluşturulan ve geçerli kılınmış şablonlar kullanılarak yapılmıştır.

Ölçüm sonuçları, aykırı değer olup olmadığı ve analitik ölçüm ve/veya dolum sıralamasına bağlı olarak herhangi bir eğilim olup olmaması açısından istatistiksel olarak değerlendirilmiştir ve sonuçlar Tablo 2'de verilmiştir.

Dolum sıralamasına bağlı ya da analiz sıralamasına bağlı bir eğilim tespit edilmemiştir. Tek yönlü ve çift yönlü Grubb's testleri uygulandığında aykırı değere rastlanmamıştır.

**Tablo 2.** Homojenlik Testi Sonuçlarının İstatistiksel Değerlendirmesi

Parametre	Sıralamaya bağlı eğilim var mı?		Aykırı değer var mı?		Dağılım?
	Ölçüm Kaynaklı	Dolum Kaynaklı	Tüm Veri	Ünite Ortalamaları	Normal / Tek Tepeli
CRP	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Evet / Evet

ANOVA kullanarak ünite içi ( $s_{wb}$ ) ve üniteler arası ( $s_{bb}$ ) standart sapmanın hesaplanmasında sırasıyla aşağıdaki verilen Eşitlik 1 ve Eşitlik 2 uygulanmaktadır:

$$s_{wb} = \sqrt{MS_{within}} \quad (1)$$

$MS_{within}$  : Ünite içi varyansın karelerinin ortalaması,

$s_{wb}$  : Alt örnekler tüm üniteyi temsil ettiği sürece metodun standart sapmasına eşdeğer.

$$s_{bb} = \sqrt{\frac{MS_{between} - MS_{within}}{n}} \quad (2)$$

$MS_{between}$  : Üniteler arası varyansın karelerinin ortalaması,

$n$  : Ünite başına tekrar sayısı.

Metot tekrarlanabilirliğinin malzemenin homojenliğini tespit edebilecek derecede iyi olmadığı durumlardan veya ölçüm esnasında rastgele meydana gelmiş olabilecek dalgalanmalardan dolayı  $MS_{between}$   $MS_{within}$ 'den küçük olarak bulunabilmektedir. Bu durumlarda  $s_{bb}$  hesaplanamayacağından, metot tekrarlanabilirliğini de kapsayan en yüksek heterojenlik belirsizliği olarak  $u_{bb}^*$  Eşitlik 3 kullanılarak hesaplanmaktadır.

$$u_{bb}^* = \frac{s_{wb}}{\sqrt{n}} \sqrt[4]{\frac{2}{v_{MS_{within}}}} \quad (3)$$

$v_{MS_{within}}$ :  $MS_{within}$  değerinin serbestlik derecesi.

Homojenlik çalışmasından elde edilen sonuçlar Tablo **Error! Reference source not found.3**'te verilmiştir. ANOVA uygulanarak gerçekleştirilen hesaplamalarda  $s_{bb}$  veya  $u_{bb}^*$  için bulunan değerlerden büyük olan değer homojenlik belirsizlik bileşeni  $u_{bb}$  olarak alınmıştır.

**Tablo 3.** Homojenlik Çalışmasının Sonuçları

Parametre	$s_{wb,rel}$ (%)	$s_{bb,rel}$ (%)	$u_{bb,rel}^*$ (%)	$u_{bb,rel}$ (%)
CRP	0,85	1,1	0,24	1,1

Homojenlik testlerinde elde edilen verilere ait grafik Ek 1'de sunulmuştur.

## KARARLILIK

Kararlılık çalışmaları, sertifikalı referans malzemenin kullanıcıya gönderilmesi sırasında meydana gelebilecek çevresel şartlar (kısa dönem kararlılık) ve depolama şartlarının (uzun dönem kararlılık) laboratuvar ortamında benzer koşullar oluşturulması ile gerçekleştirmiştir. Kısa dönem kararlılık testi için seçilen 18 ünite ve uzun dönem kararlılık testi için seçilen 22 ünite, TRaNS yazılımı kullanılarak, rastgele tabakalı örnek seçimi prensibiyle belirlenmiştir. Kararlılık testi ölçümlerinde geçerli kılınmış SEC-UV-HPLC yöntemi kullanılmıştır.

Kısa dönem kararlılık çalışmaları için test edilecek sıcaklıklar +4 °C ve -20 °C, süreler ise 1, 2, 3 ve 4 hafta olarak belirlenmiştir. Her iki sıcaklıkta da test edilecek her bir zaman aralığı için 2 ünite o sıcaklıktaki test kabinine konmuştur. Kararlılık testinde referans nokta için 2 ünite ayrılmış olup, bu üniteler doğrudan referans sıcaklığı olan -80 °C'ye yerleştirilmiştir. Her bir test süresinin sonunda her iki sıcaklık ortamından ikişer ünite referans sıcaklığa transfer edilmiştir. Dört haftalık test süresi tamamlandığında referans sıcaklığa transfer edilen bütün üniteler, referans olarak kullanılacak ünitelerle birlikte eşzamanlı (*isochronous*) olarak analiz edilmiştir.

Uzun dönem kararlılık çalışmaları için test edilecek sıcaklıklar +4 °C ve -20 °C, süreler ise 1, 3, 6, 9 ve 12 ay olarak belirlenmiştir. Her iki sıcaklıkta da test edilecek her bir zaman aralığı için 2 ünite o sıcaklıktaki test kabinine konmuştur. Kararlılık testinde referans nokta için 2 ünite ayrılmış olup, bu üniteler doğrudan referans sıcaklığı olan -80 °C'ye yerleştirilmiştir. Her bir test süresinin sonunda her iki sıcaklık ortamından ikişer ünite referans sıcaklığa transfer edilmiştir. 12 aylık test süresi tamamlandığında referans sıcaklığa transfer edilen bütün üniteler, referans olarak kullanılacak ünitelerle birlikte eşzamanlı (*isochronous*) olarak analiz edilmiştir.



Her iki kararlılık testi için ölçümler, dolum veya test süresine bağlı olası eğilimlerle analitik sıralamaya bağlı eğilimlerin ayırt edilebilmesi için, test süresi ve dolum sırası rastgele sıralanacak şekilde oluşturulan analitik ölçüm dizisi ile analiz edilmiştir. Elde edilen verilerin istatistiksel hesaplamaları TÜBİTAK UME uzmanlarınca hazırlanan Microsoft Excel® ile oluşturulan ve geçerli kılınmış şablonlar kullanılarak yapılmıştır.

### Kısa Dönem Kararlılık Çalışması Sonuçları

Kısa dönem kararlılık çalışmasındaki eşzamanlı gerçekleştirilen ölçüm sonuçları öncelikle zaman noktalarına göre gruplandırılmış ve her bir zaman noktası için değerlendirme yapılmıştır. Bu değerlendirmeler her iki sıcaklık için ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir.

Her bir süre için elde edilen ölçüm değerleri, o sıcaklık grubundaki diğer değerlerle uyumluluklarının belirlenmesi için Grubb's testi uygulanarak %95 ve %99 güvenilirlik seviyesinde aykırı değerler açısından incelenmiştir. CRP için +4 °C testinde 509 numaralı ünitenin ( $t = 3$  hafta) birinci paralel ölçümünde ve -20 °C testinde 113 numaralı ünitenin ( $t = 2$  hafta) ikinci paralel ölçümünde aykırı değere rastlanmıştır. Aykırı değerler yalnızca birer paralel ölçümde görüldüğü için değerlendirmeye dâhil edilmemiştir.

Kısa dönem kararlılık verilerinin değerlendirilmesinde her bir zaman noktası için hesaplanan değerlerin zamana karşı grafiği çizilmiş ve zamana karşı derişim değerlerinde herhangi anlamlı bir değişim olup olmadığının belirlenmesi için değişkenler arasındaki ilişki incelenmiştir (*regression analysis*). CRP için doğrusal grafikler çizilmiş ve bu eğimlerin %95 güvenilirlik seviyesinde ( $\alpha = 0,05$ ) sıfırdan anlamlı derecede farklı olup olmadığı  $t$ -test (çift kuyruklu  $t_{crit}$  değeri) ile test edilmiştir. Kısa dönem kararlılık test sonuçları Tablo 4'te ve grafik Ek 2'de verilmiştir.

Kısa dönem kararlılığa ilişkin olarak belirsizlik hesaplamaları bu eğime ait belirsizlik ve maruz bırakılabilecek en uzun süre göz önüne alınarak Eşitlik 4 kullanılarak hesaplanmıştır [23].

$$u_{sts,rel} = \frac{RSD}{\sqrt{\sum(t_i - \bar{t})^2}} \times t \quad (4)$$

$RSD$  : Regresyon eğrisi üzerindeki noktaların bağıl standart sapması,

$t_i$  : Her bir paralel için zaman noktası,

$\bar{t}$  : Bütün zaman noktalarının ortalaması,

$t$  : Transfer için öngörülen maksimum süre: 2 hafta.

**Tablo 4.** Kısa Dönem Kararlılık Testleri Sonuçları ve 2 Hafta Süre için Belirsizlik Değerleri

Parametre	%95 Güvenilirlik seviyesinde aykırı değer sayısı		%95 Güvenilirlik seviyesinde eğim sıfırdan farklı mı?		$u_{sts,rel}$ (%) 2 hafta	
	+4 °C	-20 °C	+4 °C	-20 °C	+4 °C	-20 °C
CRP	1	1	Evet	Hayır	0,29*	0,14

\* Eğim %95 güvenilirlik seviyesinde anlamlı bulunmuş ve  $u_{sts}$  bozunma dikkate alınarak hesaplanmıştır;  
( $u_{sts} = \text{Regresyon Eğrisinin Eğimi} / \sqrt{3}$ )

Sayfa 10 / 21	<b>TÜBİTAK</b> <b>ULUSAL METROLOJİ ENSTİTÜSÜ</b>	<b>UME CRM</b> <b>1008</b>
---------------	---	-------------------------------

Yapılan değerlendirme sonucunda, üretilen referans malzemede sertifikalandırılacak olan parametrenin 2 hafta süre -20 °C'de kararlı olduğu görülmüştür. Bu çalışmanın sonucunda örneklerin sıcaklığın -20 °C'yi ve sürenin 2 haftayı geçmemesi koşulu ile son kullanıcıya -20 °C veya altında bir sıcaklıkta ulaştırılabileceği sonucuna varılmıştır. Sertifikada verilen belirsizlik -20 °C transfer sıcaklığı ve 2 hafta transfer süresi dikkate alınarak hesaplanmış belirsizliği içermektedir.

### Uzun Dönem Kararlılık Çalışması Sonuçları

Üretilen SRM'lerin raf ömrü, uzun dönem kararlılık çalışmaları sonuçlarına göre belirlenmektedir. Her bir zaman noktasında tekrarlı ölçüm sonuçlarına ait grafikler Ek 3'te verilmiştir. Her bir zaman noktasındaki hata çizgileri her iki ünite için elde edilen ikişer sonucun standart sapması olarak hesaplanmıştır.

Elde edilen veriler içerisinde, tek ve çift yönlü Grubb's testi uygulanarak %95 ve %99 güvenilirlik seviyelerinde aykırı değerler olup olmadığına dair inceleme sonucunda her iki test sıcaklığında da aykırı değere rastlanmamıştır.

Uzun dönem kararlılık, toplam belirsizlik bütçesine katkı sağlayan dört parametreden biridir. Sertifikalı referans malzemenin uzun dönem kararlılıktan kaynaklanan belirsizlik değeri Eşitlik 5 kullanılarak hesaplanmıştır [23].

$$u_{lts,rel} = \frac{RSD}{\sqrt{\sum(t_i - \bar{t})^2}} \times t \quad (5)$$

*RSD* : Regresyon eğrisi üzerindeki noktaların bağıl standart sapması,

$t_i$  : Her bir paralel için zaman noktası,

$\bar{t}$  : Bütün zaman noktalarının ortalaması,

$t$  : İlgili sıcaklıkta muhafaza için belirlenen raf ömrü: 12 ay.

Bu şekilde hesaplanan sonuçlar Tablo 5'de, grafikler ise Ek 3'te verilmiştir. Uzun dönem kararlılıktan kaynaklanan belirsizliğin toplam belirsizliğe katkısı için raf ömrü 12 ay olarak belirlenmiştir. Belirlenen raf ömrünün sonrasındaki kararlılığı güvence altına almak için sertifikalandırma sonrası izleme (SSI) sonuçlarına dayanarak belli dönemlerde tekrar değerlendirmeler yapılacaktır.

**Tablo 5.** Uzun Dönem Kararlılık Testi Sonuçları ve 12 Ay Süre için Belirsizlik Değerleri

Parametre	%95 Güvenilirlik seviyesinde aykırı değer sayısı		%95 Güvenilirlik seviyesinde eğim sıfırdan farklı mı?		$u_{lts,rel}$ (%) 2 hafta	
	+4 °C	-20 °C	+4 °C	-20 °C	+4 °C	-20 °C
CRP	0	0	Evet	Evet	0,97*	0,37*

\* Eğim %95 güvenilirlik seviyesinde anlamlı bulunmuş ve  $u_{lts}$  bozunma dikkate alınarak hesaplanmıştır

( $u_{lts} = \text{Regresyon Eğrisinin Eğimi} / \sqrt{3}$ )

Sayfa 11 / 21	<b>TÜBİTAK</b> <b>ULUSAL METROLOJİ ENSTİTÜSÜ</b>	<b>UME CRM</b> <b>1008</b>
---------------	---	-------------------------------

### Kullanım Kararlılığı Çalışması Sonuçları (Dondur/Çöz Döngüsü)

UME CRM 1008 için, uzun ve kısa dönem kararlılık çalışmalarının yanı sıra, kullanım kararlılığı çalışması da gerçekleştirilmiştir. Kullanım kararlılığı çalışmaları, 0, 1, 2, 3 ve 4 dondur/çöz döngüsü şeklinde yapılmıştır. Her bir döngü için, kullanım kararlılığı testi ölçümleri 2 ünite kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her bir ünite, 4 saatlik dondur/çöz işlemine tabi tutularak toplamda 4 döngü tamamlanmıştır.

Dondur/çöz döngüleri tamamlandıktan sonra, tüm numuneler eşzamanlı (*isochronous*) olarak analiz edilmiştir. Her bir döngü için tekrarlı ölçüm sonuçlarına ait grafikler Ek 4'te sunulmuştur. Her bir zaman noktasındaki hata çizgileri, her iki ünite için elde edilen ikişer sonucun standart sapması olarak hesaplanmıştır. Analiz sonucunda, 20 ölçüm sonucunun bağıl standart sapması (RSD) %0,50 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca analiz sonuçları, homojenlik çalışmaları kapsamında elde edilen analiz sonuçları ile karşılaştırılmış ve bu veriler F testine tabi tutulmuştur. Sonuç olarak iki ölçüm seti arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Bu sonuçlar, malzemenin dört dondur/çöz döngüsüne maruz kaldığında kararlı olduğunu göstermektedir.

### KARAKTERİZASYON

TS EN ISO 17034 [18] standardına göre karakterizasyon çalışması farklı şekillerde yapılabilmektedir. Bu tasarımlardan biri, tek bir laboratuvarında referans metot kullanarak yapılan karakterizasyon çalışmasıdır. Bu üretim sürecinde CRP'nin monomerik molalitesi için sertifikalı değer, izotop seyreltme sıvı kromatografi/Yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi (ID-LC/HRMS) kullanılarak amino asit analizi yoluyla belirlenmiştir. Ölçüm yöntemi ile ilgili detaylar Ek 5'te verilmiştir.

Karakterizasyon çalışması, TRaNS programı kullanılarak rastgele seçilen 10 ünite üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda, 1. ve 2. günlerde 5'er numune alınarak her bir numune üzerinde 3 paralel ölçüm yapılmıştır. Ayrıca, 3. günde ise 10 ünitenin tamamında 4. paralel ölçüm gerçekleştirilmiştir. Ölçümler geçerli kılınmış metot kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada metodun doğrulanması amacıyla NIST SRM 2924 ve NIMJ CRM 6201-c çözeltileri kullanılmıştır. Tablo 6, bu referans malzemeler üzerinde gerçekleştirilen ölçümlerin özet istatistiklerini sunmaktadır. Bu karşılaştırmanın sonuçları, UME CRM 1008'in karakterizasyon ölçüm yöntemi ile aynı ölçüm yöntemi kullanılarak elde edilen molalite değerlerinin referans malzemelerin sertifika değerleri ile uyumlu olduğunu göstermektedir.

**Tablo 6.** Metot Doğrulanması için Kullanılan Standartlar ve ölçüm istatistikleri

SRM	Sertifika Değeri <sup>a</sup>		Ölçülen Değer (n = 6) Özet İstatistikler <sup>b</sup>			
	Değer	U <sub>95</sub>	Değer	SD	u <sub>c</sub> <sup>c</sup>	U <sub>95</sub> <sup>d</sup>
NIMJ 6201-c	40,2	1,7	39,8	0,6	0,9	1,9
NIST SRM 2924	20,6	1,2	20,4	0,4	0,5	1,0

<sup>a</sup> Sertifika değeri ve SRM Sertifikalarında listelenen %95 güven aralığı belirsizliği

<sup>b</sup> Ölçülen değer ve %95 güven aralığı belirsizliği. Tayinler, izotop seyreltme amino asit analizi kullanılarak gerçekleştirilmiştir

<sup>c</sup> Standart ölçüm belirsizliği

<sup>d</sup> %95 güven aralığı için genişletilmiş belirsizlik (k=2)

Belirsizlik hesaplamaları amino asit analizi için “Guide to the Expression of Uncertainty in Measurements (GUM)” [24] ve “EURACHEM/CITAC Guide Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement” [25] dokümanlarına uygun olarak yapılmıştır.

## ÖZELLİK DEĞERLERİNİN VE BELİRSİZLİKLERİNİN ATANMASI

Sertifikalandırılan özellik değerinin ve buna ait belirsizliğin atanması, karakterizasyon çalışmasında elde edilen veriler ve beraberindeki belirsizlik değerlerine ek olarak homojenlik ve kararlılık testlerinden elde edilen verilerden hesaplanan belirsizliklerin katkıları da değerlendirilerek gerçekleştirilmiştir.

Özellik değerine ait belirsizlik değerinin hesaplanmasında karakterizasyon, homojenlik, kısa dönem ve uzun dönem kararlılık belirsizliklerinin katkıları Eşitlik 6’da verildiği şekilde birleştirilmiştir.

$$u_{CRM} = \sqrt{u_{char}^2 + u_{bb}^2 + u_{sts}^2 + u_{lts}^2} \quad (6)$$

Burada  $u_{CRM}$  özellik değerine ait bileşik standart belirsizliği ifade etmektedir. Bu değer, Eşitlik 7’de gösterildiği şekilde  $k$  kapsam faktörü ile çarpılarak sertifika değerine ait genişletilmiş belirsizliğe dönüştürülür.

$$U_{CRM} = k \times u_{CRM} \quad (7)$$

Sertifika değeri ile birlikte verilen belirsizlik değeri %95 güvenilirlik seviyesine karşılık gelen kapsam faktörü  $k = 2$  ile çarpılarak genişletilmiş belirsizliktir. Sertifika değeri ve üzerindeki belirsizlik Tablo 7’de verilmiştir. Homojenlik, kısa dönem ve uzun dönem kararlılık ve değer atamadan gelen belirsizlik katkılarının bağıl ve birleşik sonuçları Tablo 8’de gösterilmiştir.

**Tablo 7.** Sertifika Değeri ve Belirsizliği

Parametre	Sertifika Değeri ( $\mu\text{mol/kg}$ )	$U_{CRM}$ ( $k = 2$ ) ( $\mu\text{mol/kg}$ )	Bağıl $U_{CRM}$ ( $k = 2$ ) (%)
CRP	43,2	2,2	5,1

**Tablo 8.** Belirsizlik Bileşenlerinin Toplam Belirsizliğe Katkısı

Parametre	$u_{char}$ (%)	$u_{bb}$ (%)	$u_{lts}$ (%)	$u_{sts}$ (%)
CRP	2,3	1,1	0,37	0,14

Sayfa 13 / 21	<b>TÜBİTAK ULUSAL METROLOJİ ENSTİTÜSÜ</b>	<b>UME CRM 1008</b>
---------------	---	-------------------------

## BİLGİLENDİRME AMAÇLI DEĞER

Kütle derişimi değeri (w/v) sertifikalandırılan molalite ve belirsizlik değerlerinden malzemenin 25 °C'de ölçülmüş yoğunluk değeri (1,0047 g/cm<sup>3</sup>) ve kütle spektrometrisi ile elde edilen ortalama molekül ağırlığı değeri (23028,2 g/mol) kullanılarak hesaplanmıştır. Hesaplanan değerler Tablo 9'da verilmektedir.

**Tablo 9.** Bilgilendirme Amaçlı Verilen Kütle Derişimi Değeri

Parametre	Kütle Derişimi	Belirsizlik	Birim
CRP	0,999	0,051	g/L

## İZLENEBİLİRLİK

Sertifikalı referans malzemenin izlenebilirliği NIMJ tarafından saflığı belirlenen ve sertifikalandırılan primer referans standartlar kullanılarak sağlanmıştır. Sertifikalandırma çalışmalarında izlenebilirlik amacıyla kullanılan primer referans standartlar Tablo 10'da verilmiştir.

**Tablo 10.** Sertifikalandırma Çalışmalarında İzlenebilirlik Kaynağı Olarak Kullanılan Primer Referans Standartlar

Parametre	Adı	Saflık ± Belirsizlik ( $k=2$ ) (%)	İzlenebilirlik
Prolin	NIMJ 6016-a	99,9 ± 0,2	SI
Valin	NIMJ 6015-a	99,8 ± 0,2	SI
Lösin	NIMJ 6012-a	99,9 ± 0,2	SI
Fenilalanin	NIMJ 6014-a	99,9 ± 0,2	SI
Alanin	NIMJ 6011-a	99,9 ± 0,2	SI

## KULLANIM TALİMATI

### Kullanım Amacı

Bu SRM, CRP tayini ölçüm prosedürleri ve cihazları için kalibrasyon standardı olarak kullanılma amacıyla üretilmiştir. Bu SRM diğer kalibrasyon standartları ve kalite kontrol malzemelerine değer atanması amacıyla da kullanılabilir. Malzeme ayrıca amino asit analizinde analitik yöntemlerin kesinliğini kontrol etmek ve geçerliliğini doğrulamak için de kullanılabilir. Malzeme, insan serumundaki CRP'nin miktarının belirlenmesi veya değer ataması için immünolojik testlerde kullanıldığında, uyumluluk (commutability) doğrulanmalıdır.

### Saklama Koşulları

Malzeme, açılmamış vialı içerisinde -20 °C veya daha düşük sıcaklıkta kuru ve ışıksız bir ortamda saklanmalıdır. TÜBİTAK UME, malzeme ile ilgili bildirdiği saklama koşulları ve kullanım talimatına uyulmaması nedeniyle malzemede meydana gelebilecek değişikliklerden sorumlu tutulamaz.

**Güvenlik Uyarıları**

Malzeme rekombinant insan CRP proteini sulu çözeltisidir. Bu malzeme tehlikeli madde olarak sınıflandırılmamaktadır. Malzeme sadece *in vitro* kullanım için uygundur, yalnızca laboratuvar kullanımı için üretilmiştir. Malzemenin saklanması ve kullanımı sırasında genel laboratuvar önlemleri uygulanmalıdır. Malzemenin mevcut olan güvenlik kurallarına göre kullanımı ve imhası tavsiye edilir.

**Malzemenin Kullanılması**

Analiz edilecek SRM numunesi, dondurucudan çıkarılmalı ve tamamen çözülene kadar oda sıcaklığında ( $20 \pm 3$ ) °C bekletilmelidir. Malzeme çözüldükten sonra nazıkçe karıştırılabilir ve ardından çözeltinin vial kapağı ve duvarlarından vial tabanına alınması için kısa süreli (1000 g, 1 dakika) bir santrifüj işlemi yapılabilir. Çözülmüş malzeme, bir haftaya kadar +4 °C'de saklanabilir. Dört dondur/çöz döngüsünün malzemenin molalite ve kütle derişimi değerleri üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı belirlenmiştir. Malzeme, açılmamış vial içinde sıcaklığın -20 °C ve nakliye süresinin 2 haftayı geçmemesi koşuluyla taşınabilir.

**Minimum Örnek Alım Miktarı**

Sertifikalandırma çalışmalarında her bir ölçüm için **en az 10 µL** örnek kullanılmıştır. Minimum örnek alım miktarı, son kullanıcı tarafından ölçüm yeteneğine göre, hazırlayacağı çalışma çözeltisinin belirsizliğine etkisi de göz önünde bulundurularak belirlenmelidir.

**KAYNAKLAR**

- [1] I. Kushner, C-Reactive Protein and Atherosclerosis, Science (80-. ). 297 (2002) 520–521. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.297.5581.520>
- [2] M.B. Pepys, G.M. Hirschfield, C-reactive protein: a critical update, J. Clin. Invest. 111 (2003) 1805–1812. <https://doi.org/10.1172/JCI200318921>
- [3] D.R. Schultz, P.I. Arnold, Properties of four acute phase proteins: C-reactive protein, serum amyloid a protein,  $\alpha$ 1-acid glycoprotein, and fibrinogen, Semin. Arthritis Rheum. 20 (1990) 129–147. [https://doi.org/10.1016/0049-0172\(90\)90055-K](https://doi.org/10.1016/0049-0172(90)90055-K)
- [4] N. Rifai, P.M. Ridker, High-Sensitivity C-Reactive Protein: A Novel and Promising Marker of Coronary Heart Disease, Clin. Chem. 47 (2001) 403–411. <https://academic.oup.com/clinchem/article/47/3/403/5639279>
- [5] J. Liu, W. Zhu, H. Sun, D. Song, P. Xiao, B. Xu, H. Li, Development of a primary reference material of natural C-reactive protein: verification of its natural pentameric structure and certification by two isotope dilution mass spectrometry, Anal. Methods. 13 (2021) 626–635. <https://doi.org/10.1039/D0AY02289F>
- [6] JCTLM Database: higher-order reference materials, methods and services. <https://www.jctlmdb.org/#/app/home>
- [7] W.G. Miller, M. Panteghini, R. Wielgosz, Implementing metrological traceability of C-reactive protein measurements: Consensus summary from the Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine Workshop, Clin. Chem. Lab. Med. 61 (2023) 1558–1560. <https://doi.org/10.1515/cclm-2023-0498>
- [8] C. Wu, S. Zhang, W. Liu, J. Zeng, T. Zhao, Y. Yue, R. Zhang, H. Ma, Q. Wang, Application of Commutable ERM-DA474/IFCC for Harmonization of C-reactive Protein Measurement Using Five Analytical Assays, Clin. Lab. 63 (2017) 1883–1888. <https://doi.org/10.7754/CLIN.LAB.2017.170626>
- [9] D. Thompson, M.B. Pepys, S.P. Wood, The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969212699800239>

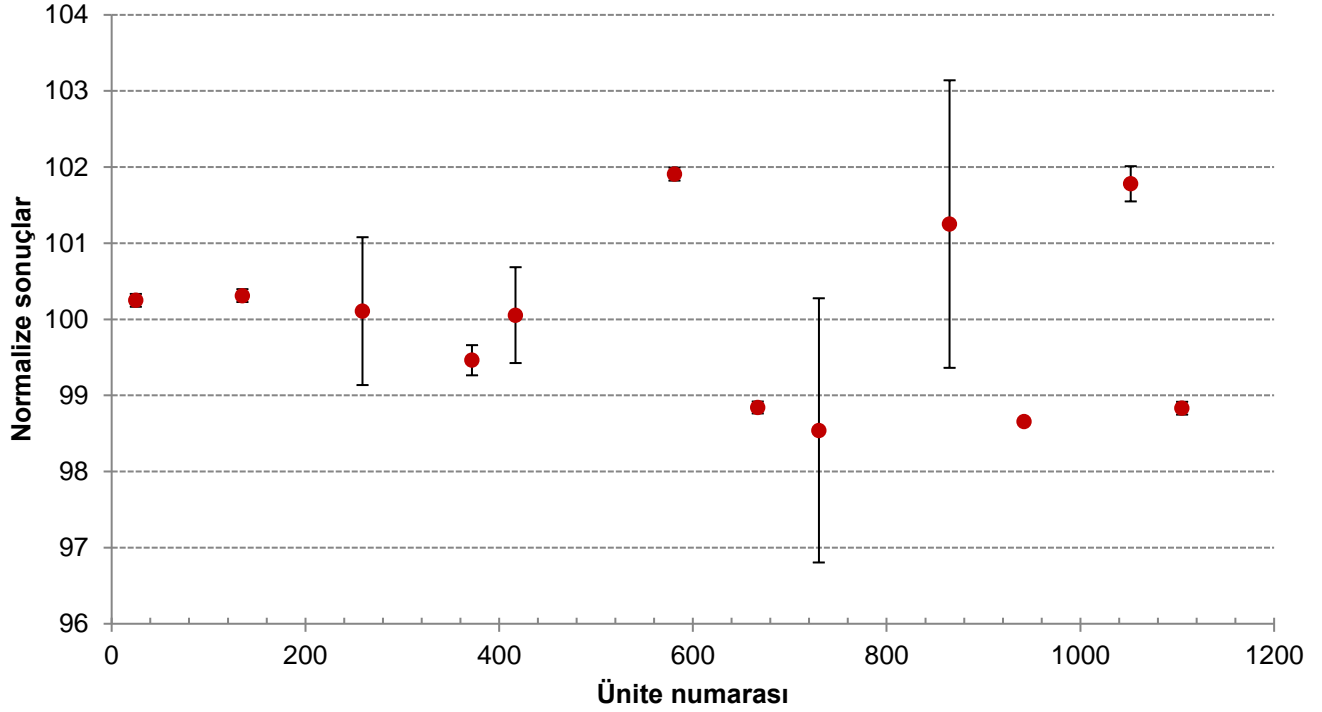
- [10] F. Borrillo, M. Panteghini, Current performance of C-reactive protein determination and derivation of quality specifications for its measurement uncertainty, *Clin. Chem. Lab. Med.* 61 (2023) 1552–1557. <https://doi.org/10.1515/cclm-2023-0069>
- [11] T. Kinumi, M. Goto, S. Eyama, M. Kato, T. Kasama, A. Takatsu, Development of SI-traceable C-peptide certified reference material NMIJ CRM 6901-a using isotope-dilution mass spectrometry-based amino acid analyses, (2012). <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6097-1>
- [12] S.J.Choquette. Tarlov Michael J., Certificate of Analysis Standard Reference Material ® 2924 C-Reactive Protein Solution, 2017. <https://tsapps.nist.gov/srmext/certificates/2924.pdf>
- [13] Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine. Policy JCTLM-DBWG-P-04A 20230201, Demonstrating the extent-of-equivalence between multiple certified reference materials (CRMs) for the same measurand, (2023) 1–12. <https://www.bipm.org/en/committees/jc/jctlm/wg/jctlm-dbwg/publications>
- [14] Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine. Policy JCTLM-DBWG-P-04B 20230201., Demonstrating the extent-of-equivalence between multiple reference measurement methods/procedures (RMM/Ps) for the same measurand, (2023) 1–7. <https://www.bipm.org/en/committees/jc/jctlm/wg/jctlm-dbwg/publications>
- [15] M. Oztug, E. Saban, M. Asicioglu, A. Isleyen, M. Akgoz, Development of UME CRM 1008: certified reference material for C-reactive protein, *Accredit. Qual. Assur.* (2024). <https://doi.org/10.1007/s00769-023-01563-w>
- [16] R.D. Josephs, G. Martos, M. Li, L. Wu, J.E. Melanson, M. Quaglia, P.J. Beltrão, D. Prevoo-Franzsen, A. Boeuf, V. Delatour, M. Öztug, A. Henrion, J.-S. Jeong, S.-R. Park, Establishment of measurement traceability for peptide and protein quantification through rigorous purity assessment-a review, *Metrologia.* 56 (2019) 1–30. <https://doi.org/10.1088/1681-7575/ab27e5>
- [17] R.D. Josephs, N. Stoppacher, S. Westwood, R.I. Wielgosz, M. Li, M. Quaglia, J. Melanson, G. Martos, D. Prevoo, L. Wu, S. Scapin, M.Ö. Senal, L. Wong, J.-S. Jeong, K. Wai, Y. Chan, C.G. Arsene, S.-R. Park, Concept paper on SI value assignment of purity -Model for the classification of peptide/protein purity determinations, *J. Chem. Metrol.* 11 (2017) 1–8. <https://doi.org/10.25135/jcm.1.17.02.030>
- [18] ISO 17034:2016 - General requirements for the competence of reference material producers
- [19] ISO Guide 35: 2017 - Reference materials-Guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability
- [20] ISO/IEC 17025:2017 - General requirements for the competence of testing and calibration laboratories
- [21] JCGM 200: 2012, International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM) 3rd edition. [https://www.bipm.org/documents/20126/2071204/JCGM\\_200\\_2012.pdf/f0e1ad45-d337-bbeb-53a6-15fe649d0ff1](https://www.bipm.org/documents/20126/2071204/JCGM_200_2012.pdf/f0e1ad45-d337-bbeb-53a6-15fe649d0ff1)
- [22] T. Tanaka, T. Horio, Y. Matuo, Secretory production of recombinant human C-reactive protein in *Escherichia coli*, capable of binding with phosphorylcholine, and its characterization, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 295 (2002) 163–166. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00622-8](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00622-8)
- [23] T.P.J. Linsinger, J. Pauwels, A.M.H. Van Der Veen, H. Schimmel, A. Lamberty, T.P.J. Linsinger, J. Pauwels, H. Schimmel, A. Lamberty, A.M.H. Van Der Veen, Homogeneity and stability of reference materials, *Accred Qual Assur.* 6 (2001) 20–25. <https://doi.org/10.1007/s007690000261>
- [24] JCGM 100:2008, Evaluation of measurement data-Guide to the expression of uncertainty in measurement. [https://www.bipm.org/documents/20126/2071204/JCGM\\_100\\_2008\\_E.pdf/cb0ef43f-baa5-11cf-3f85-4dcd86f77bd6](https://www.bipm.org/documents/20126/2071204/JCGM_100_2008_E.pdf/cb0ef43f-baa5-11cf-3f85-4dcd86f77bd6)
- [25] EURACHEM/CITAC Guide CG 4, Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, QUAM:2012.P1, Third Edition

## REVİZYON TARİHÇESİ

Tarih	Açıklama
20.02.2024	İlk yayın.

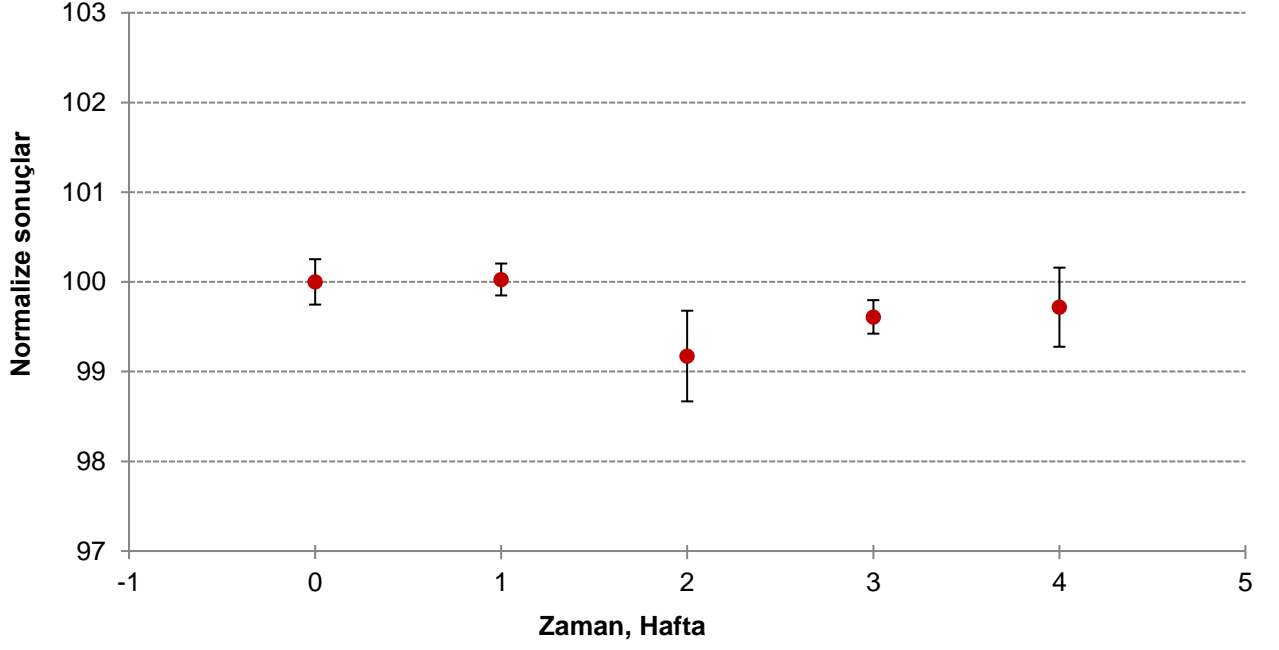
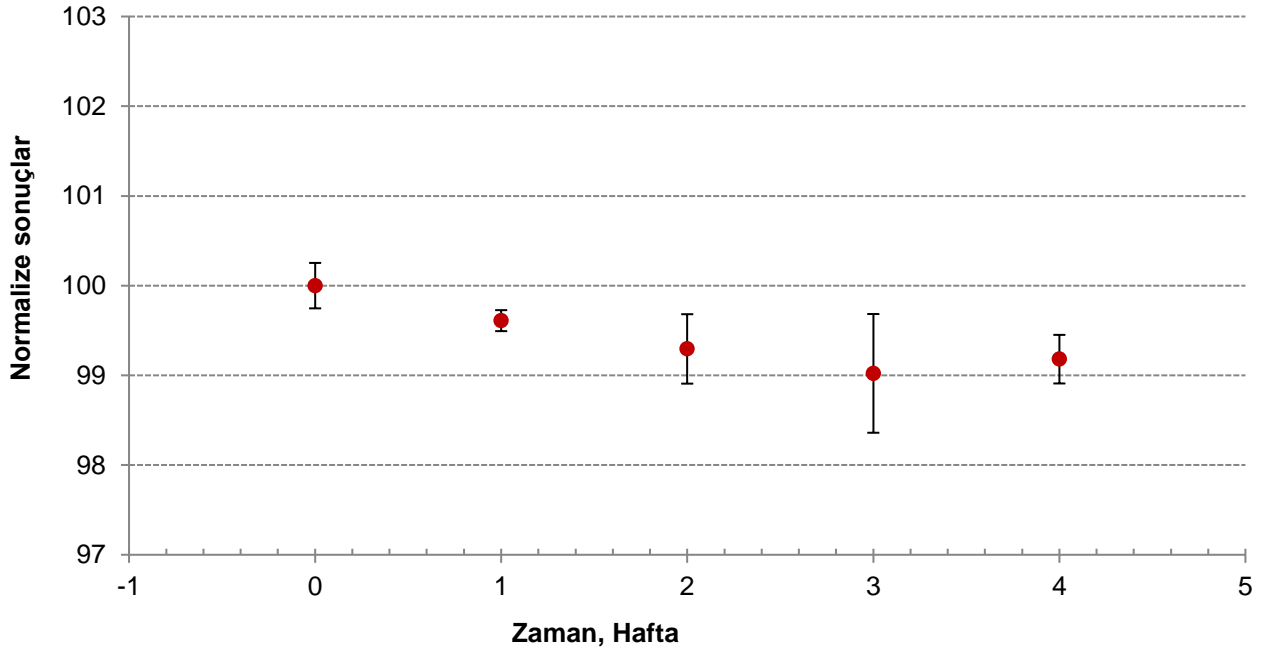
## EKLER

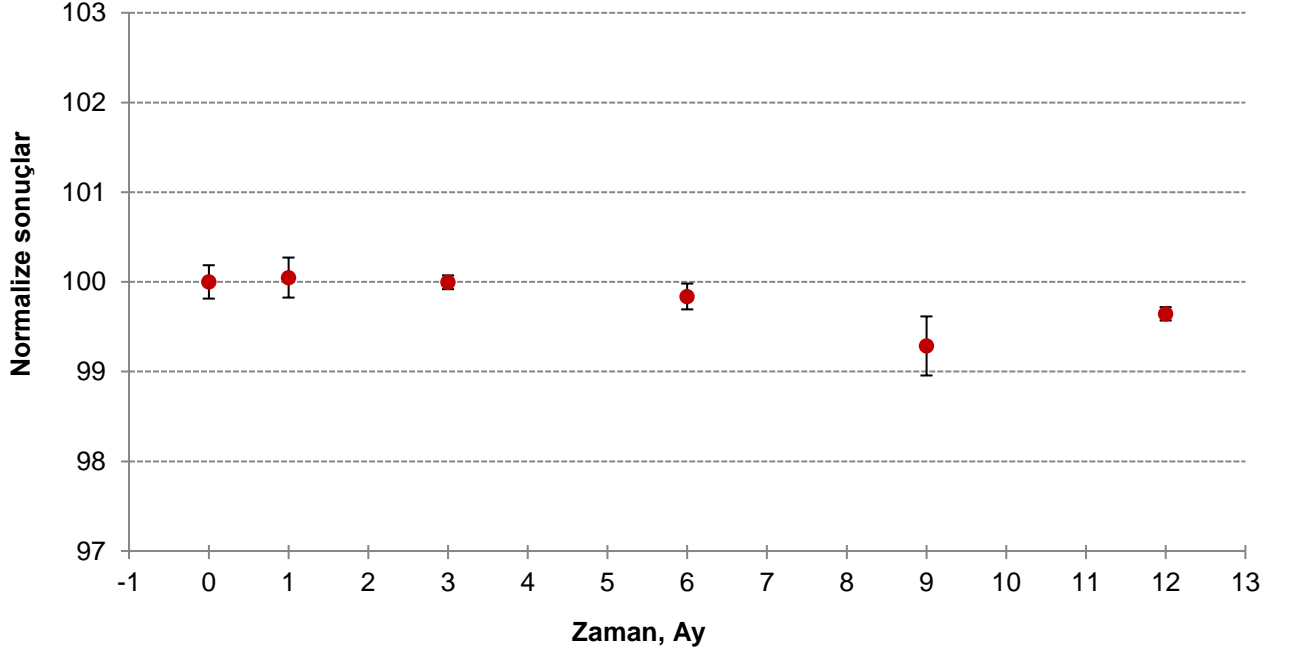
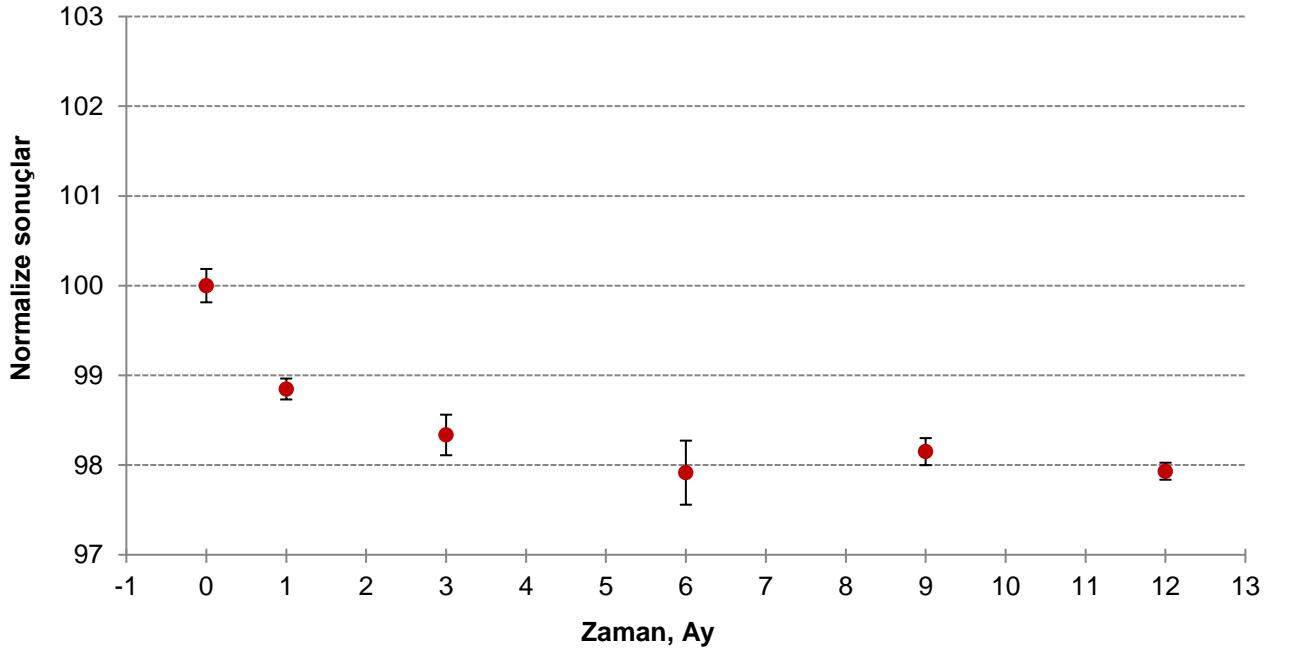
### Ek 1. Homojenlik Çalışması Grafiği

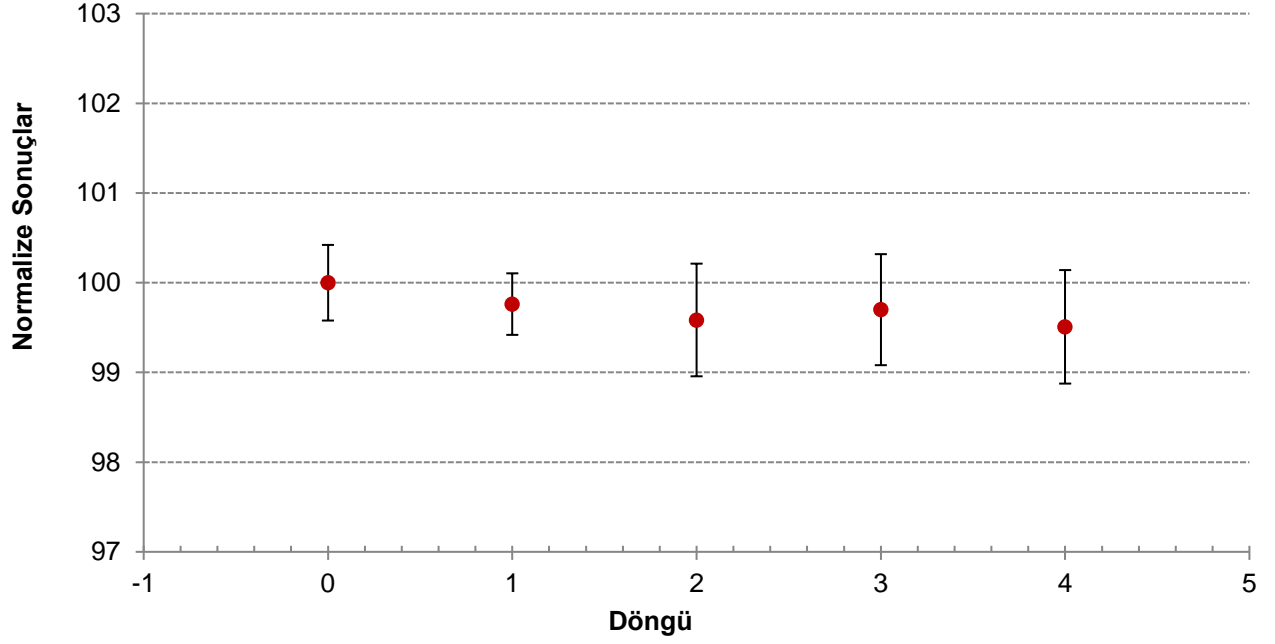


Şekil A1.1. CRP homojenlik grafiği



**Ek 2. Kısa Dönem Kararlılık Çalışması Grafikleri****Şekil A2.1.** CRP için kısa dönem kararlılık grafiği, -20 °C**Şekil A2.2.** CRP için kısa dönem kararlılık grafiği, +4 °C

**Ek 3. Uzun Dönem Kararlılık Çalışması Grafikleri****Şekil A3.1. CRP için uzun dönem kararlılık grafiği, -20 °C****Şekil A3.2. CRP için uzun dönem kararlılık grafiği, +4 °C**

**Ek 4. Kullanım Kararlılığı Çalışması Grafiği****Şekil A4.1.** CRP dondur/çöz döngüleri için kararlılık grafiği

## Ek 5. Ölçüm Yönteminin Detayları

### Karakterizasyon Ölçüm Metodunun Kısa Açıklaması

Peptit safsızlık tayini için, 0,1 mol/L HCl çözeltisinde 20 µmol/L CRP çözeltisi gravimetrik olarak hazırlanır. Herbiri 1,25 mol/L, 2,5 mol/L, 5 mol/L, 10 mol/L, 20 mol/L ve 40 µmol/L C-Reaktif Protein eş değerinde Prolin, Valin, Fenilalanin, Lösin ve Alanin amino asitlerini içeren standart kalibrasyon çözeltileri hazırlanır. 20 µmol/L peptit eşdeğerinde izotoplu Prolin, Valin, Fenilalanin, Lösin ve Alanin aminoasitlerinden izotoplu standart çözelti hazırlanır. İzotoplu standart çözeltinin örnek ve kalibrasyon çözeltileri ile karıştırılması ile sırasıyla örnek ve standart bileşimler gravimetrik olarak hazırlanır. Örnek ve standart bileşimleri cam hidroliz tüplerine aktarılır, gaz fazı hidroliz cihazında (ELDEX) vakum altında uçurulur. Kurutulmuş örnekler %1 fenol içeren 6 mol/L “constant-boiling HCl™” ile 130 °C’de 24 saat hidroliz edilir. Hidroliz sonrası örnekler, 200 µL 100 mM HCl ile çözülür ve propyl kloroformat (PCF) ile türevlendirilir. Hazırlanan çalışma standartları, Dionex Ultimate 3000 UPLC ve Orbitrap Q-Exactive HF-X HR-MS kullanılarak analiz edilir. Analiz sonrası her bir analite ait derişimler cihazın yazılımına girilerek dış kalibrasyon grafiği oluşturulur. Peptit örneklerindeki (Leu, ILeu, Pro, Val, Gly ve Ala) kütle kesirleri, çalışma standart çözeltileri ile oluşturulan kalibrasyon grafikleri kullanılarak hesaplanır. Hesaplama peptit örnekleri için gravimetrik olarak hesaplanmış olan seyreltme faktörü değerleri de cihazın yazılımına veri olarak girilir. Cihaza ait yazılım kullanılarak peptit molekülündeki molalite değerleri hesaplanır.

### LC-MS Analizi

Hazırlanan çalışma standartları, Dionex Ultimate 3000 UPLC ve Thermo Q-Exactive HF-X Orbitrap cihazlarından oluşan LC-HR-MS sistemi ile analiz edilmiştir. Deneyler, Phenomenex EZ:faast 4µ AAA kolonu (250 mm × 2 mm i.d) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Mobil faz olarak 10 mmol/L amonyum format içeren 50:50 metanol:H<sub>2</sub>O ve 10 mmol/L amonyum format içeren metanol kullanılmıştır. LC gradyan programı Tablo A5.1’te verilmiştir. Kolon sıcaklığı 30 °C ve enjeksiyon hacmi 10 µL olarak ayarlanmıştır. Kütle spektrometresi analizi, PCF türetilmesini takiben Full MS modunda gerçekleştirilmiştir. Amino asitler için MS parametreleri Tablo A5.2’de sunulmaktadır.

**Tablo A5.1.** Aminoasit Analizi için LC Gradyan Programı

Zaman (dakika:saniye)	Mobil Faz % A	Mobil Faz % B	Akış Hızı (µL/min)
0:00	65	35	250
12:00	45	55	250
12:10	0	100	250
17:00	0	100	250
17:10	65	35	250
22:00	65	35	250

**Tablo A5.2. MS (Mass Spectrometer) Parametreleri**

<b>Tarama</b>	Full MS
<b>Tarama Başlangıç</b>	100 m/z
<b>Tarama Bitiş</b>	500 m/z
<b>Polarite</b>	Positive
<b>AGC Hedef</b>	3E6
<b>Maks. Enjeksiyon Süresi</b>	200 ms
<b>Sheath Gaz Akış</b>	45
<b>Sweep Gaz Akış</b>	2
<b>Sprey Gerilim</b>	3,50 kV
<b>Kapiller Derecesi</b>	250 °C
<b>Aux Gaz Sıcaklık</b>	300 °C