

## ANALİTİK YÖNTEM GEÇERLİLİĞİNE GENEL BİR BAKIŞ AN OVERVIEW ON ANALYTICAL METHOD VALIDATION

Özlem SÖĞÜT ERTAŞ\*, Aycıl KAYALI\*

Ege University, Faculty of Pharmacy, Department of Analytical Chemistry, 35100

Bornova - İzmir, TURKEY

### ÖZET

*Geçerlilik; bir cihazın, yöntemin veya sistemin başarımının belirlenen koşullara uygun olduğunu göstermek için yapılan işlemlerin bütünü olarak tanımlanır. Yöntem başarım esasları, geçerliliği yapılacak yöntemin uygulama amacına ve kapsamına bağlı olarak belirlenir. Yöntem geçerlilik göstergeleri; kesinlik, doğruluk, tayin sınırı, ölçüm sınırı, seçicilik- özgüllük, doğrusallık ve ölçüm aralığı, duyarlılık ve sağlamlıktır. Yöntem geçerliliği; bir yöntemin laboratuvarında ilk kez uygulanması, bir analiz için yeni bir yöntem geliştirilmesi, kullanılmakta olan yöntemde değişiklik yapılması, geçerli edilmiş bir yöntem başka bir laboratuvarında kullanılması veya uygulayan kişi veya kullanılan cihazda değişiklik olması, kalite kontrol testlerine göre yöntemin başarımında zamanla bir değişme olması durumlarında yapılmalıdır.*

**Anahtar kelimeler:** Yöntem geçerliliği, göstergeler, analitik işlemler

### ABSTRACT

*Method validation is the process to confirm that the analytical procedure employed for a specific test is suitable for its intended use. The method's performance characteristics should be based on the intended use of the method. Parameters of method validations are precision, accuracy, limit of detection, limit of quantification, specificity, linearity and range, sensitivity and robustness. Methods need to be validated or revalidated before their introduction into routine use whenever the conditions change for which the method has been validated, e.g., instrument with different characteristics whenever the method is changed, and the change is outside the original scope of the method procedures.*

**Key words:** Method validation, parameters, analytical procedure

\* Doktora tez danışmanım Prof. Dr. Aycıl KAYALI 30. 11. 2003 tarihinde vefat etmiş olup bu derleme onun anısına yapılmıştır.

## GİRİŞ

Green'in tanımına göre geçerlilik, analitik yöntemin istenen amaca uygun olmasını sağlayan işlemlerdir (1). Diğer bir tanım olarak geçerlilik; herhangi bir yöntemde işlem, araç ve gereç, materyal, sistem ve faaliyetin beklenen sonuçları verdiğinin kanıtlanması işlemidir (2-6). Kendi kullanım amacı için uygun olan bir test için amaçlanmış, analitik işlemin doğruluğunu kanıtlayan bir süreçtir. Yani yöntem geçerliliği; her derecede aynı sonucu elde etmek için yapılan işlemlerdir. Geçerliliğin tanımlanmasında resmi kaynaklar arasında terminoloji farklılıkları bulunmaktadır. Geçerlilik çalışmalarının genel isimlendirilmesinde Uluslararası Standardizasyon Komitesi, ISO/IEC 17025 yöntem geçerliliği (7), Uluslararası Metroloji Sözlüğü (VIM) yöntem geçerliliği (8) ve İyi Laboratuvar Uygulamaları (GLP) standart çalışma yöntemi (SOP) (9) ifadelerini kullanır.

Endüstri ve denetleyici kurumların dikkatini çekmesiyle birlikte, yöntem geçerliliği yaygın olarak literatürlerde yer almaya başlamıştır. EN 45000 Standart Serilerinin Yorumlama Rehberi geçerlilik üzerine 20 bölüm ve dokuz geçerlilik göstergesini içerir (10). Uluslararası Harmonizasyon Konferansı (ICH), insanlarda kullanılan ilaçların kayıdındaki teknik ihtiyaçları karşılamak için, analitik işlemlerin geçerliliği üzerine ortak bir döküman geliştirmiştir. Bu döküman sekiz geçerlilik göstergesinin tanımını içerir (11-13).

Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Bürosu, (US EPA) yöntem gelişimi ve konservasyon kaynakları ve gerikazanım rolü (RCRA) için bir geçerlilik rehberi hazırlamıştır (14). Amerikan Resmi Analitik Kimyacılar Birliği (AOAC) (15), US EPA ve diğer bilimsel organizasyonlar, çoklu-laboratuvar çalışmalarıyla geçerli edilmiş yöntemler sağlamıştır (16). Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi (US FDA), yöntem geçerliliği için örnek analitik veriler içeren rehberler çıkarmıştır (17-20). Amerikan Farmakopesi (USP), bileşik değerlendirmesi üzerine yöntem geçerliliğini içeren özgül rehberler yayınlamıştır (21).

Biyolojik sınırlar için resmi bir rehber yoktur (22). İlaç sanayi, literatürlerde yayınlanan yöntemleri kullanır. İlaç ve kimya sanayinin temsilcileri ve çeşitli araştırmacılar analitik yöntem geçerliliği konusunda makaleler yayınlamışlardır (23-36). Hokanson (37, 38) bilgisayarlı geçerlilik ve tekrar geçerlilik yöntemleri geliştirmiştir. Green (1) ve Wegscheider (39), analitik geçerlilik üzerine çeşitli çalışmalar yapmışlar, yaygın olarak HPLC için yöntem geçerlilik yöntemleri geliştirmiştir (40-44).

Analitik işlemlerin geçerliliğinin amacı, bilimsel bütünlük ve uygunluğun sağlanması, gereken amaç için yeterli güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçların alınmasıdır (45). Geçerlilik çalışmaları belirlenmiş yöntemlere göre yürütülmelidir. Sonuçlar ve alınan kararlar

kaydedilmelidir. Yeni bir imalat formülü veya yeni bir çalışma yöntemi kullanıldığı zaman, bunun rutin işlemlerdeki uygunluğunun gösterilmesi zorunludur (2). Tanımlanmış işleyiş, belirlenmiş materyal ve araç ve gereç kullanılarak istenilen kalitede ürününün sürekli olarak üretilebileceği gösterilmelidir. Araç ve gereçlerin ve materyallerin değiştirilmesi de dahil olmak üzere, ürünün kalitesini veya üretiminin tekrarlanabilirliğini etkileyebilecek tüm üretim değişiklikleri geçerli edilmelidir (46). İşleyiş ve yöntemlerin, hedeflenen sonuçlara ulaşmada yeterlilikleri kanıtlanıncaya kadar düzenli aralıklarla tekrar validasyona tabi tutulmalıdır. Tekrar geçerlilik özellikle yöntemi değiştirdiğimiz zaman ve yeni göstergeler değerlerin dışında olduğu zaman önemlidir. Aynı zamanda; basit matriks değişikliklerinde, cihaz model ve marka değişikliklerinde tekrar geçerlilik yapılmalıdır (11-13,16, 27, 31).

## **VALIDASYON STRATEJİSİ**

Geçerlilik stratejisi dört bileşenden oluşur; ön geçerlilik, gerçek geçerlilik, gerçek çalışma ve istatistiksel analiz. Bir geçerlilik çalışmasının akışı Şekil 1 de verilmiştir (47).

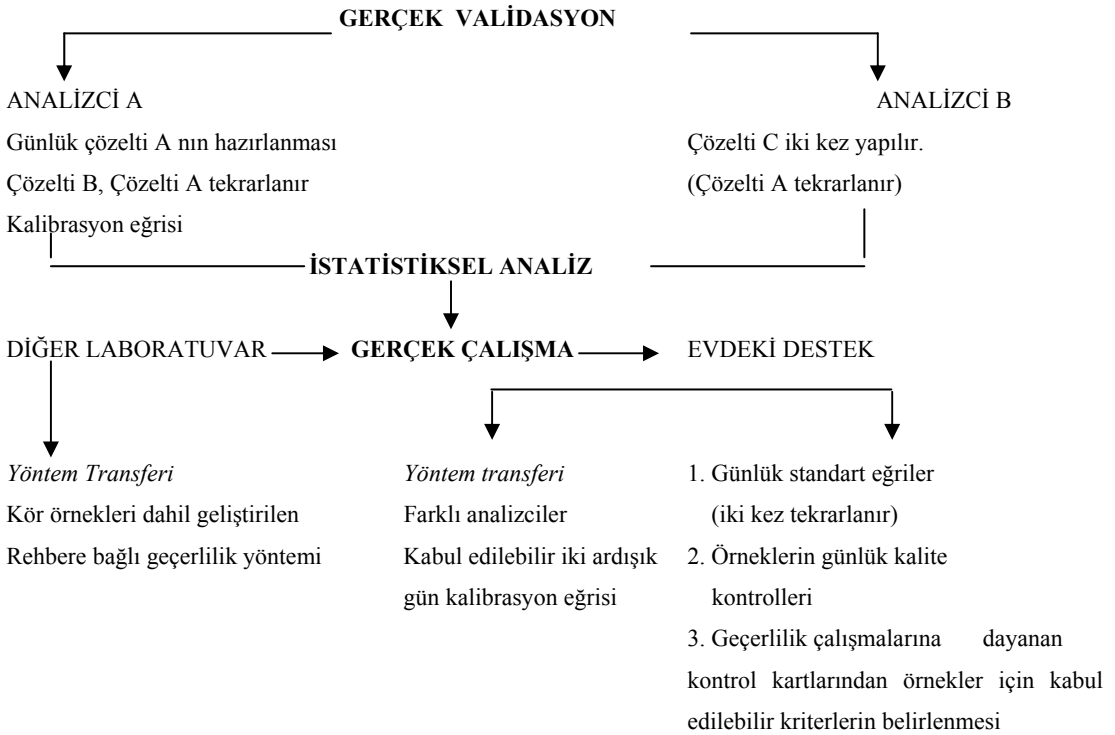
### **Ön Geçerlilik**

Ön geçerlilik, gerçek validasyonun başlamasından önce analizciye pratik deneyimini arttırma ve optimum koşulları sağlama şansını verir. İki başlık altında incelenir: Yöntem oturtuluş sırasındaki geçerlilik ve geçmişe ait geçerlilik.

Analitik yöntem geliştirme işleminde ilk basamak neyin, hangi doğrulukla ölçüleceğinin kurulmasıdır. Buna; yöntemin oturtuluş sırasındaki geçerlilik adı verilir. Daha sonra literatür araştırılır; en uygun kimyasal yöntem seçilir. Eğer yeni bir yöntem kullanılmaya karar verilirse yöntemin ön bilgileri tayin edildikten sonra, bazı basamaklarının tekrar edilebilirliğinin geliştirilmesi ve deneylerin sağlamlığının kontrol edilmesi gerekir (47, 48). Varolan sistemin, varolan başarımının yeniden incelenmesi ve değerlendirilmesi, geçmişe ait geçerlilik diye adlandırılır. Bu sistemler için geçerlilik; geçerlilik protokolünü, sistemin genel tarifini, donanım şemasını, programın listesini, yazılım ve donanımın o an ki konfigürasyonunu, yazılım ve donanım bileşenlerinin geçmiş konfigürasyonunu, kullanılan verilerin ve sistemin kullanım amacını, cihaz kullanım kılavuzunu ve operatör uygulama kayıtlarını içermelidir (9).

## ÖN VALİDASYON

1. Cihaz cevabının seçimi
2. Regresyon modelinin seçimi
3. Standart eğri sınırına yaklaşma
4. Ekstraksiyon yeteneğinin değerlendirilmesi



Şekil 1: Genel geçerlilik akış şeması (47)

## Gerçek Geçerlilik (Uygulama Aşamasındaki Geçerlilik)

Geçerlilik işleminin laboratuvar aşamasıdır. Ön geçerlilik aşamasındaki teorik düzenleme bu aşamaya hazırlık oluşturur. Daha önceden çalışılmış bir yöntem için, geçerlilik işleminin uygulama aşamasına geleceğe ait geçerlilik denir. Eğer referans bir laboratuvar geçerli edilmemiş alternatif bir analitik yöntemi kullanmaya niyet ederse yöntem geçerlilik rehberliğinde bu yöntemin güvenilir ve tekrar yapılabilir olduğunu göstermesi gerekir (1, 47). Uygulama aşamasındaki validasyonda, üç çeşit kontrol amaçlı geçerlilik yapılır; denetim geçerliliği, güvenlik geçerliliği ve tekrarlanır geçerlilik (47). Göstergelerde herhangi bir değişiklik olmasa da, yapılan çalışmanın arasına kontrol

edilmesi amacıyla denetim geçerliliği yapılır. Günlük başarımın, verilerin değerlendirilmesi bu aşamayı oluşturur. Bir analizci (A) herbir konsantrasyon düzeyi (Çözelti A) için üç deneme yapar. İkinci bir analizci (B) aynı işlemi (Çözelti C) tekrarlar. Çalışma sırasında denetim geçerliliği yapılmasına karşın herhangi bir şüphe duyulduğunda, yapılan validasyona güvenlik geçerliliği denir (Çözelti B). Geçerli edilen koşullarda herhangi bir değişiklik olduğunda, ise tekrar geçerlilik yapılmalıdır. Tekrar geçerlilik bütün geçerlilik işleminin tekrarı değildir. Eğer sistem iyi anlaşılıyorsa, tekrar geçerlilik sadece değişikliklerin geçerli edilmesidir. (9)

### **Son İstatiksel Analiz**

Kalibrasyon eğrisinin istatistiğinde; korelasyon yüzdesi, eğim, kesişim, konsantrasyonların ayarlanamaması, herbir konsantrasyon için standart sapma ve herbir konsantrasyon için bağıl standart sapma yer alır. Günlük standart eğriler örnek konsantrasyonun tanınmasını sağlar. Deneysel sonuçların kabul edilebilirliği için verilerin, yöntem geçerliliği sırasında güven sınırları içinde olması gereklidir (47- 51). Geçerlilik göstergeleri boyunca kabul edilebilir sınırlar, sisteme uygun testler ve kalite kontrol noktalarını tanımlar.

Geçerliliği yapılan bir çalışmada yapılan tüm işlemlerin yazılı olarak kanıtlanması gereklidir. Geçerlilik protokolü ve geçerlilik raporu çalışmanın en önemli kısımları arasındadır. Hazırlanma ve yürütme, geçerlilik protokolüne bağlı kalmalıdır; protokol tercihen basamak basamak, talimat şeklinde yazılmalıdır. Tamamlanmış yöntem geçerliliği için olası basamaklar Tablo 1 gösterilmiştir (52, 53).

İlk olarak yöntemin hedefi ve geçerlilik kriterleri tanımlanmalıdır. Yöntem başarım özellikleri yöntemin kullanım amacına dayanmalıdır ve ilk göstergeler deneyimli analizcilerin kararlarına göre seçilmelidir. Tatmin edici sonuçlar ancak iyi çalışan bir cihaz ile sağlanabilir. Bunun için; cihaz başarım göstergelerine ayrı bir önem vermek gerekir. Eğer geçerlilik deneyleri için resmi bir kaynak yoksa deneyimlere bağlı olarak, yöntemin kendi yapısına göre geçerlilik yöntemi geliştirilir ve uygun göstergeler seçilir (32, 52).

**Tablo 1:** Yöntem geçerliliğinin basamakları

- 
- Yöntemin uygulama şekli, amacının ve hedefinin tanımlanması
  - Başarım göstergeleri ve kabul edilen değerlerin tanımlanması
  - Geçerlilik deneylerinin tanımlanması
  - Cihazın uygun başarım özelliklerinin değiştirilmesi
  - Maddeler, standartlar ve belirteçlerin temini
-

- 
- Ön geçerlilik işlemlerinin yapılması
  - Yöntem göstergeleri ve kabul kriterlerinin ön deney sonucuna göre tekrar değerlendirilmesi
  - Tam dahili ve harici geçerlilik deneylerinin yapılması
  - Rutin çalışmalar için yöntemin çalışma esaslarının (SOP) geliştirilmesi
  - Tekrar geçerlilik kriterlerinin belirlenmesi
  - Kalite kontrol, sistem uygunluğu testleri ve uygulama döneminin belirlenmesi
  - Geçerlilik deneylerinin yazılması ve sonuçların geçerlilik raporuna yazılması
- 

## GEÇERLİLİK GÖSTERGELERİ

Bu göstergeler bir çok farklı araştırma grubu tarafından ve uluslararası komiteler tarafından tanımlanmış, literatürlerde ayrıntılı bir şekilde açıklanmıştır.

**Doğruluk:** Analitik yöntemin doğruluğu, yöntem ile elde edilen deneme sonuçlarının gerçek değere yakınlığıdır (12-17). Bir analitik yöntemin doğruluğu yöntem ve gerçek değer tarafından toplanan test sonuçlarına dayanır (1-12). Doğruluk için gerçek değer bir çok farklı yoldan elde edilebilir. Bu yollardan biri; yöntemin sonuçlarını, yerleşik yöntemlerden birinin sonuçları ile karşılaştırmaktır (48). İkinci yol ise; doğruluğun bilinen konsantrasyonlara sahip bir örneğin analiziyle kontrol edilmesidir. Doğruluk, analitin matriksten ayrılmasından ve analitik cihaza verilmesinden sonra elde edilecek cevap ile saf bir çözücü içinde çözünmeyen referans materyalin cevabının karşılaştırılmasına bağlıdır (56- 58). Çünkü bu doğruluk örneğin hazırlanışının etkisini ölçer. Elde edilen değer mümkün olduğunca doğruya yakın olmalıdır. Doğruluk konsantrasyon başına kör hariç en az beş tayin ile belirlenir. Kabul edilebilir kriter, doğruluk için nominal değerden  $\pm \% 15$  den fazla sapmanın olmamasıdır (2).

### Referans Standartlar

Bir referans standart, iyi niteliklere sahip, yüksek derecede saf bir bileşik olmalıdır. Uygun standart, kabul edilebilir bir çaba ile en yüksek saflığa sahip olabilen, kendi kimliğinden, gücünden, kalitesinden ve saflığından emin olunmasını sağlayacak nitelikte tanımlanabilen standarttır. VIM (8), bir veya birden fazla madde içeren ve tüm bileşenleri; kalibrasyonda, ölçüm yöntemin değerlendirilmesinde veya materyale değerlerin homojen olarak dağılmasında ve cihaz saptanmasında kullanılan maddeleri referans madde (RM), doğru birim ile eser miktarda belli bir yöntem ile belli bir güven aralığında belirsizliği tam olarak verilerek sertifikalandırılmış referans maddeleri, sertifikalı referans madde (CRM) olarak tanımlar (59).

**Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik:** Yöntemin kesinliği, herhangi bir değerin tekrarlanabilme kabiliyeti veya bireysel test sonuçlarının birbirine yakınlığının bir derecesidir (12-17, 27, 56-58). Yöntem kesinliği, standartların onayladığı bir dizi farklı ölçümün test sonuçlarına etkisidir. Kesinlik için kabul edilen kriter analizin tipine dayanır. Eczacılıkta, kalite kontrol analizi için bağıl standart sapma % 1 den daha iyi olan kesinlik kolaylıkla başarılabilirken, biyolojik örnek için % 15' den fazla ve diğer konsantrasyon seviyelerinde % 10 bağıl standart sapma ile kesinlik sağlanabilir. Çevresel ve besin örneklerinde kesinlik, daha çok örnek matrisine dayanır. Ayrıca kesinlik, analit konsantrasyonuna, analiz tekniğine bağlı olup bağıl standart sapma % 2 ve %20 den fazlaya kadar çeşitlilik gösterebilir (31- 33, 40, 47).

Ölçülmüş standart farklılığı üç kategoriye ayrılabilir; tekrarlanabilirlik, orta kesinlik ve tekraryapılabilirlik.

Tekrarlanabilirlik, aynı kişi tarafından aynı şartlarda kısa zaman zarfında sabit bir örneğin belli bir yöntem kullanılarak yapılan bir dizi işlemin, kesinliği olarak tanımlanır (60). Tekrarlanabilirlik, kesinliğin bir göstergesidir (61). Tekrarlanabilirlik bir laboratuvarında bir analite ve bir cihaz kullanılarak kısa bir zaman diliminde sağlanır. Üç farklı matrisde en azından 5 veya 6 tayin, 2 veya 3 farklı konsantrasyonda yapılmalı ve yakın standart farklılığı hesaplanmalıdır.

Orta kesinlik, ICH tarafından ölçü sürecindeki uzun süreli çeşitlilik diye tanımlanır (11-13). Uzun haftalar boyunca bir laboratuvarında bir yöntemin sonuçları ile karşılaştırılarak verilir.

ICH tarafından tanımlanan tekraryapılabilirlik laboratuvar arasındaki kesinlik değerini temsil eder. Objektif olan sonuç, yöntemin farklı laboratuvarlarda da aynı sonuçları vermesine bağlıdır. Bir analitik yöntemin tekraryapılabilirliği; farklı analizcilerin farklı laboratuvarlarda homojen karışımlardan elde edilen örnek analizlerine ve yöntemin özgüllük göstergeleri içinde olan, fakat yine de farklılık gösterebilen çevresel ve operasyonel durumların kullanılmasına bağlıdır (14). Tekraryapılabilirlik, farklı laboratuvarlar kullanıldığından önemlidir. Örneğin; odanın sıcaklığı ve nemindeki farklılıklar, farklı özelliklere sahip araç ve gereçler, farklı tecrübeye sahip analizciler, materyal ve kullanılan malzemenin durumundaki çeşitlilikler gibi (16-20).

**Tayin Sınırı ve Nicelme Sınırı:** Her ikisi de analitik başarımların göstergelerindedir. Tayin sınırı; analitin analitik bir işlemlerle tayin edilebilecek en düşük konsantrasyonudur (2, 21). Tayin sınırının belirlenmesi aletli ve aletsiz olmak üzere yöntemlere göre değişir. Aletli işlemlerde bilinen en düşük konsantrasyonda analit içeren örnek sonuçlarının kör sonuçlarıyla karşılaştırılmasıyla yani sinyal/gürültü oranı ile belirlenir. Genelde sinyal/gürültü oranı 2:1 veya 3:1 olarak kabul edilir (52,60). Tayin sınırının hesaplanmasında diğer bir yöntem, kör örneklerinin analizlenerek analitik

geri zemin cevabının ölçülmesi ve bu değer standard sapmasının 2 veya 3 gibi faktörle çarpılmasıdır (21).

Niceleme sınırı; analitik bir yöntemle analitin, uygun doğruluk ve kesinlikle tayin edilebilecek en düşük konsantrasyonudur (2,16). Analitin bilinen miktarlarla azaltılmasıyla hazırlanan örnekler ölçülür ve kabul edilebilir kesinlik ve doğruluğa sahip en düşük miktar tespit edilir. Niceleme sınırı genelde varyasyon katsayısı ile varyasyon katsayısının % 15-20 yi aşan konsantrasyonlarıyla ifade edilir. Pek çok durumda niceleme sınırı, tayin sınırının iki, üç katıdır (62). Niceleme sınırının tayini için deneysel işlemlerde genel yaklaşım, belli bir sayıda kör örneği analizlenerek analitik geri zemini ölçmek, bu değerlerin standart sapmasını 10 veya 20 gibi bir faktör ile çarpılmasıdır (10-12, 32, 58). Bu sınır, sınıra yakın yada sınırda hazırlanmış belli sayıda örnek analizi ile kontrol edilmelidir.

**Seçimlilik ve Duyarlılık:** Yöntemin seçimliliği; analiti örnekte varlığı tespit edilmiş analit ile girişim yapabilen diğer bileşenlerden farklı olarak ölçme yeteneğidir (1). Örnek matriksinde bulunması gereken bileşenlerin yanında analiz edilecek maddelerin doğru ve özgün belirlenebilmesi, analitik yöntemlerin seçimliliğini belirler (47).

Özgüllük ve seçimlilik aynı göstergeymiş gibi kabul edilip incelense de, tanımları Vessmann farklı şekilde yapmış ve bu terimlerin özellikle IUPAC/ WELAC ile ICH tarafından yapılan tanımları arasındaki farka değinmiştir (10-14). Özgüllük terimi genellikle tek analite cevap üreten bir yöntem için; seçimlilik terimi ise birbirinden ayrılabilen veya ayrılmayan kimyasal varlıklar için cevaplar üreten bir yöntem için kullanılır. Eğer bu cevap diğer tüm cevaplardan farklı ise yöntem seçici denir. Analite cevap veren oldukça az yöntem olduğu için seçimlilik terimini kullanmak daha uygundur. USP kriterlerine göre bir analitik yöntemin seçiciliği, ölçüm anında bir analitin varlığını doğru tayin etmektir (21).

Duyarlılık; test işleminin konsantrasyonundaki küçük değişimleri kaydetme kapasitesidir. Kalibrasyon eğrisinin eğimidir.

**Doğrusallık ve Sınırlar:** Bir analitik yöntemin doğrusallığı test sonuçlarından doğrudan elde edilerek ya da çok iyi tanımlanmış matematiksel derişimleri belli, belirli bir sırada verilen örnekler içinde analitin değişik konsantrasyondaki örneklerinden elde edilir. Doğrusallık % 80 - % 120 oranındaki konsantrasyon uzunluğuna sahip beş ya da beşten fazla standarttan üçten altıya kadar uygulama serisiyle sağlanır. Cevap doğrudan veya çok iyi tanımlanan matematiksel hesaplara dayanmalıdır. Eğer sıfır olmayan bir değer elde edilirse bu yöntemin doğrusallığı üzerinde bir etki olmadığını kanıtlar.



Bir analitik yöntemin sınırları; bir yöntemin doğruluğu, doğrusallığı ve kesinliği kullanılarak karşılaştırılmış en düşük en yüksek değerler arasındaki süreçtir. Sınırlar, normalde bir analitik yöntemden elde edilen test sonuçları olarak aynı üniteler içinde açıklanır (1-21, 55-58, 60).

**Sağlamlık:** Sağlamlık testleri operasyonel göstergelerin analiz sonuçları üzerindeki etkilerini ölçer. Çeşitli şartlar altında yöntemin analitik sonuçlarının kabul edilebilir doğruluk ve kesinliğini saptama kabiliyeti olarak da tanımlanabilir. Sağlamlık, yöntemin bir veya birden daha fazla göstergesi değiştirildiğinde tekrar validasyona ihtiyacı olup olmadığına karar verilmesini sağlar. ICH dökümanları; gelişme fazı sırasında, bir yöntemin sağlamlık gelişimini dikkate almayı tavsiye eder (11-13). Farklı oda sıcaklığı ve farklı laboratuvarlardaki nem, farklı tecrübeye sahip analizciler, farklı firmaların aletleri, farklı kaynaklardan belirteçler sağlamlığa etki eden faktörler arasındadır (60, 62,63).

### **Geçerlilik Göstergelerinin Belirlenmesi**

Geçerliliği yapılacak yöntem başarımlık göstergeleri, yöntemin uygulama amacına ve kapsamına bağlı olarak belirlenir. Örneğin; safsızlık analizi yapılacak bir yöntemde doğrusal ölçüm aralığının belirlenmesine gerek yoktur. Yöntem geçerliliğine başlamadan önce kullanılacak cihazın başarımlının standartla test edilmesi ve uygunluğunun saptanması gerekir. ICH ve USP ye göre, analizlere göre yöntem geçerliliği için tanımlanması gereken geçerlilik göstergeleri Tablo 2 (11-13) ve Tablo 3’de (21) verilmiştir.

Yöntem geçerliliği sırasında; göstergeler, kabul edilebilirlik değerleri ve sistem uygunluk veya kalite kontrol testleri ile tanımlanmalıdır. Sistem istatistiksel olarak açıklanmalı ve çalışmanın en az kontrol analizi ile bitirilmesi hedeflenmelidir.

Tüm yapılan geçerlilik çalışmaları, gerçek çalışma ve daha sonraki çalışmalar, laboratuvarlar arası karşılaştırmalar bilgilendirme amacıyla rapor halinde yazılmalıdır. Geçerlilik raporunun içermesi gereken bilgiler Tablo 4 de verilmiştir (10-21).

**Tablo 2:** ICH' e göre yöntem geçerlilik için gerekli göstergeler

Analitik başarımların göstergeleri	Teşhis	Saflık analizi		Deneme
		Miktar Tayini	Sınır Testleri	
Doğruluk	-	+	-	+
Keskinlik				
Tekrarlanabilirlik	-	+	-	+
Tekraryapılabilirlik	-	+	-	+
Özgüllük	+	+	+	+
Tayin sınırı	-	-	+	-
Niceleme sınırı	-	-	-	-
Doğrusallık	-	-	-	+
Aralık	-	-	-	+

**Tablo 3:** USP' ye göre yöntem geçerliliği için gerekli göstergeler

Analitik başarımların göstergeleri	Teşhis	Saflık analizi		Deneme
		Miktar Tayini	Sınır Testleri	
Doğruluk	+	+	*	*
Keskinlik	+	+	-	+
Özgüllük	+	+	+	*
Tayin sınırı	-	-	+	*
Niceleme sınırı	-	+	-	*
Doğrusallık	+	+	-	*
Aralık	+	+	*	*
Sağlamlık	+	+	+	+

\*Denemenin özelliğine göre gerekebilir.

**Tablo 4:** Geçerlilik raporunun içermesi gerekenler (32, 52, 55, 58, 60)

- 
- Yöntemin hedef ve amacı
  - Bileşen ve matris çeşitleri
  - Kimyasallar, belirteçler, referans standartlar ve kontrol örnek hazırlanması ile ilgili detaylı bilgi
  - Kullanılan kimyasallar ve standartların kalite kontrol işlemleri
  - Güvenlik önlemleri
-

- 
- Sağlamlık belirtecinde gösterilen kritik göstergeler
  - Kullanım detayları ile birlikte kullanılan cihazların listesi
  - Deneilerin yapılışına ait detaylı açıklama
  - İstatistiksel işlemler, kullanılan hesaplamaların gösterimi
  - Rutin yapılan kalite kontrol çalışmaları
  - Cihaz cevap şekillerinin verilmesi (kromotogram, spektrum, kalibrasyon eğrileri gibi)
  - Yöntemin kabul edilebilen en uygun sınırları (verileri)
  - Ölçüm sonuçlarında beklenen belirsizlik değerleri
  - Tekrar geçerlilik kriterleri
  - Geçerliliği geliştiren ve uygulayan kişi hakkında bilgi
  - Özet ve sonuç
- 

### **Başarılı Bir Geçerliliği Geciktiren Genel Problem Örnekleri (52-55)**

- 1- Kritik bir safsızlık içeren örnek için bozulma ürünü ya da gerekli ise iç standardın metoda uygunluğunun tayin edilmesindeki yetersizlik,
- 2- Bütün özelliklerin ya da uygun olmayan özelliklerin seçiminin yarattığı yetersizlik;
  - a. Doğrulanmamış ya da aşırı derecede geniş aralıklar
  - b. Deneme sınırları içinde değer taşımayan özellikler
- 3- Yeterli ayrıntı eksikliği ya da kabul edilemeyen yöntem reaktif ya da araç, gereç seçiminden kaynaklanan yetersizlik;
  - a) Yanlış körlerinin kullanımı.
  - b) Keyfi aritmetik düzeltmelerin kullanımı
  - c) Bileşenlerin geniş bir açıklaması olmaksızın ticari olarak uygun olmayan aletlerin kullanılması
  - d) Tek kaynaklı aletler ya da maddelerin kullanılması
  - e) Örnek hazırlamada ticari amaca uygun olmayan özel alet ve araç ve gereçlerin kullanımı
  - f) Örnek hazırlamada ticari amaca uygun olmayan iç standart ve diğer maddelerin kullanımı
- 4- Tam ya da açık kesin bilgiyi doğrulamadaki yetersizlik,
  - a) Örnek teşhisinde kromotogramlar ve spektrumlarındaki uyumsuzluk

- c) X ve Y eksenlerinin uygun adlandırılmasındaki yetersizlik
- 5- İyi nitelikli referans standartların sunulmasındaki başarısızlık

### SONUÇ

Yöntem geçerliliği, kimyasal ölçümlerde önemli bir konudur. Analiz yapan kimyacılar arasında, yöntem geçerliliğinin nasıl yapılacağına ve geçerli edilmiş yöntem uygulamasına dair yeterli bilinç oluşmamıştır. Güvenilir standart çalışma yöntemlerinin hazırlanmasında ve uygulanmasında geçerlilik zorunlu hale gelmiştir. Deneysel çalışmalara başlamadan önce geçerlilik çalışmasının planlanması ve değerlendirilmesi gereklidir. Tam bir geçerlilik çalışmasının çok fazla iş getirdiği kesindir, fakat bu yöntemin rutin olarak kullanılmaya başlanmasıyla kazanılacak zaman harcanan çabalara değecektir. Doğru kararlar ve daha fazla işten kaçınmak için, uygun analitik başarımların işlemlerinin kullanılması zorunludur.

### KAYNAKLAR

1. **Green, J.M.**, “A practical guide to analytical method validation”, *Anal.Chem. News & Features*, May 1, 305A/309A (1996)
2. **Shah, V.P., Midha, K., Dighe, S.** “Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies”, *J. Pharm Sci.*, 81(3), 309-312 (1992)
3. **Hajicostas, E.**, Validation of Analytical Methods, Springer-Verlag, Berlin (2003)
4. **Breaux, J., Jones, K., Boulos, D.** “Understanding and implementing efficient analytical methods development and validation”, *Pharm.Tech Anal. Chem& Testing* (2003). Available from <http://www.pharmtec.com>
5. **Hibbert D.B.** “Method validation of modern analytical techniques”, Analytical Insight UNSW (1998), Available from <http://www.chem.unsw.edu.au/research/groups/esc>
6. **Robouch, P., Bulska, E., Duta, S., Lauwaars, M., Leito, I. et al.** Train Mic European communities, Belgium (2003)
7. **ISO/IEC 17025** “General requirements for the competence of testing and calibration laboratories”, (1999).
8. **VIM**, International of Basic and General Terms in Metrology, ISO, (1993).
9. **Huber, L.** “Good laboratory practice for HPLC, CE and UV Visible Spectroscopy”, Hewlett Packard (1993)

10. EURACHEM Guidance Document No. 1/WELAC Guidance Document No. WGD 2: *Accreditation for chemical laboratories: Guidance on the interpretation of the EN 45000 series of standards and ISO/IEC Guide 25*, 1993.
11. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Text on *validation of analytical procedures*, ICH-Q2A, Geneva (1994)
12. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, *Validation of analytical procedures*, ICH-Q2A, Geneva (1995).
13. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, *Validation of analytical procedures: Methodology*, ICH-Q2B, Geneva (1996).
14. US EPA, Guidance for methods development and methods validation for the Resource Conservation and Recovery Act (RCRA) Program, Washington, (1995)
15. AOAC Peer Verified methods Program, Manual on policies and procedures, Arlington, VA, Nov (1993)
16. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), Method validation, August (2000), Available from <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>
17. US FDA, General principles of validation, Rockville, MD, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), May (1987).
18. US FDA, Guidelines for submitting samples and analytical data for method validation, Rockville, MD, Center for Drugs and Biologics Department of Health and Human Services , Feb. (1987)
19. US FDA Technical Review Guide: Validation of Chromatographic Methods, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Rockville, MD, (1993)
20. US FDA , Analytical procedures and Method Validation: Chemistry, manufacturing, and controls” Federal Notices, &5(169), 776-52, 777 (2000)

21. General Chapter <1225>, Validation of compendial methods, *United States Pharmacopeia XXIII*, National Formulary, XVIII, Rockville, MD, The United States Pharmacopeial Convention, Inc, 1710–1612 (1995)
22. **Ertas, O.S., Tezel, H.** “ A validated cold vapor-AAS method for determining mercury in human red blood cells” *J.Pharm. Biomed. Anal.*, 36(4), 893-897 (2004)
23. **M., Gazdag, M. and Mihalyfi, K.**, “Selection of HPLC methods in pharmaceutical analysis -III method validation”, *J.Chromatogr.* 464, 265-278 (1991)
24. **Kayali, A., Söğüt, Ö., and Tuncel, B.**, “Some considerations on analytical methods validations; bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies”, *Eur. J. Drug. Met. and Pharmacokinetics special issue*, 20(4), 271-274 (1995)
25. **Mestek, O., Kominkova, J., Koplík, R., Borkova, M., Suchanek, M.** “ Quantification of copper and zinc species fractions in legume seeds extracts by SEC/ICP-MS: validation and uncertainty estimation”, *Talanta*, 57(6), 1133-1142 (2002).
26. **Yang, Q., Hartmann, J., Smeyers-Verbeke, J., Massart, D.L.** “Method development and validation for the determination of mineral elements in food and botanical materials by capillary electrophoresis” *J. Chromatography A*, 717(1-2) 415-425 (1995).
27. **Marin, A., Lopez-Gonzalez, Barbas, C.** “ Development and validation of extraction for determination of zinc and arsenic species in soils using focused ultrasound: Application to heavy metal study in mud and soils”, *Anal. Chim. Acta*, 442(2) 305-318 (2001).
28. **Ermer, J., McMiller, J.H.** *Method Validation in Pharmaceutical Analysis: A Guide to Test Practice*, Hardcover, (2004).
29. **Morrison, J.M., White, P., McDougall, S. et al.** “Validation of highly sensitive ICP-MS method for the determination of platinum in biofluids: application to clinical pharmacokinetic studies with oxaliplatin” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 24(1), 1-10 (2000)
30. **Sawicki, W.**, “A validated method for the determination of verapamil and norverpamil in human plasma”, *J.Pharm.Biomedical.Analysis*; 25, 689-95 (2001).
31. **Grđinic, V., Vukovic, J.** “Prevalidation in pharmaceutical analysis, part 1, Fundamentals and critical discussion”, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 35, 489-512 (2004)
32. **Sarrío, R.V., Silvestri, L.J.**, “ Validation of analytical assays and test models for pharmaceutical laboratory”, *The Regulatory Forum*. Biosearch Inc.(1996), Available from <http://www.regulatory.com/forum/article>

33. **Hartmann, C., Smeyers-Verbeke, J., Massart D.L., McDowall, R.D.** "Validation of bioanalytical chromatographic methods" *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 17(2) 193-218 (1998).
34. **Abarca, A., Canfranc, E., Sierra, I., Marina, M.L.** "A validated flame AAS method for determining magnesium in a multivitamin pharmaceutical preparation", *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 25(5-6), 941-945 (2001).
35. **Gonzalo-Lumbreras, R., Izquierdo-Hornillos, R.** "Conventional and micellar liquid chromatography method development for danazol and validation in capsules" *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 32(3) 433-439 (2003)
36. **Gonzalo-Lumbreras, R., Izquierdo-Hornillos, R.** "Optimization and validation of conventional and micellar LC methods for the analysis of methyltestosterone in sugar-coated pills" *J. Pharm. Biomed. Anal.* 31(1), 201-208 (2003).
37. **Hokanson, G.C.** "A life cycle approach to the validation of analytical methods during pharmaceutical product development, part I: The initial validation process", *Pharm. Tech.*, Sept., 118-130 (1994)
38. **Hokanson, G.C.** "A life cycle approach to the validation of analytical methods during pharmaceutical product development, part II: Changes and the need for additional validation", *Pharm. Tech.*, Oct., 92-100 (1994).
39. **Wegscheider C.**, Validation of analytical methods, in "Accreditation and quality assurance in analytical chemistry", edited by H. Guenzler, Springer Verlag, Berlin (1996 )
40. **Renger, B., Jehle, H., Fischer, M. and Funk, M.** "Validation of analytical procedures in pharmaceutical analytical chemistry: HPTLC assay of theophylline in an effervescent tablet", *J. Planar Chrom.*, 8, 269-278 (1995).
41. **El-Saharty**, "Simultaneous high- performance liquid chromatographic assay of furosemide and propranolol HCl and its application in a pharmacokinetic study", *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 33, 699-709 (2003)
42. **Huber, L. and George, S.**, *Diode-array detection in high-performance liquid chromatography*, New York, Marcel Dekker, (1993)
43. **Huber, L.**, "Applications of diode-array detection in HPLC", Waldbronn, Germany, Agilent Technologies, (1989)
44. **Huber, L.** "Validation of computerized analytical systems, Part 3: Installation and operational qualification"; *LC-GC Magazine* 1996, 14(9), 806-812

45. **Chan, C.C., Lam, H., Lee, Y.C., Zhang X.M.** Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification, Wiley-Interscience (2004)
46. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics -The Fitness for Purpose of Analytical Methods EURACHEM Guide English Edition 1.0 – (1998).
47. **Lang, J.R., Bolton, S.**, “ A comprehensive method validation strategy for bioanalytical applications in the pharmaceutical industry- 1. Experimental considerations”, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 9(5), 357- 361 (1991).
48. **Pasteelnick, L.A.**, Drug and the Pharmaceutical Sciences, Luftus, B.T. and Nash, R.A. (eds), Marcel Dekker Inc. NewYork and Basel 23 (1994)
49. Eurochem Working Group on Uncertainty in Chemical Measurement Members of the Working Group, “Quantifying Uncertainty in Analytical Chemistry Measurements”, Eurochem. (1995).
50. **Pidgen, A.W.** “Statistical aspects of bioequivalence a review”, *Xenobiotica*, 22(7), 881-893 (1992).
51. **Püskülcü, H., İkiz, F.**, “İstatistiğe Giriş”, E.Ü. Mühendislik Fakültesi, Yayın No:1, Bornova, 35-39, 241 (1983).
52. Method validation, Available from <http://www.labcompliance.com>
53. **Akdağ, İ., Akçadağ, F.**, “Spektroskopik Metotların Validasyonu”, VIII Ulusal Spektrokimya Kongresi, (2002)
54. US FDA, “Draft Guidelines on Validation of Analytical Procedures: Methodology, Federal register, 61, 9316- 9319 (1996)
55. Validation of Analytical Methods Review and Strategy (LC/GC International February , 96-105 (1998)
56. **Rodriguez, L.C., Campana, A.M., Linares, C.J., Ceba, M.R.**, “Estimation of performance characteristics of an analytical method using the data set of the calibration experiment”, **Analytical Letters**, 26(6), 1243-1258 (1993).
57. The Fitness for Purpose of Analytical Methods A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics EURACHEM Guide



58. "Guidelines for the validation of analytical methods for active constituent, agricultural and veterinary chemical products", Australian Pesticides, Veterinary Medicines Authority, (2004). Available from <http://www.apvma.gov.au>.
59. **May, W.**, "Status of chemical measurements in the world-differences between chemical and physical metrology, UME-NIST Workshop, (2000).
60. **Ertas Sögüt Ö.** "Evaluation of the analytical validation parameters of Atomic Absorption Spectrometry, Ph. D. Thesis Ege University, Graduate School of Health Sciences, Analytical Chemistry Advisor: Prof. Dr. Aycıl Kayalı (1997)
61. **Gardner, J.A., Coleman, S., Farrow, S.G.**, "Why worry about your analytical methods?", *Analytical Proceedings*, 30, 183-185 (1993).
62. **Ludden, T.M.**, "Estimation of limit of quantitation", Bio-Internal, Munich, Germany (1994).
63. **Mulholland, M.** "Ruggedness testing in analytical chemistry", *Trac Trends Anal. Chem.*, 7(10), 383-389 (1988).
64. **Zeaiter, M., Roger, J.M., Bellon-Maurel, V., Rutledge, D.N.**, "Robustness of models developed by multivariate calibration. Part.1. The assesment of robutness", *Trends in Anal. Chem.*, 23(2), 157-171 (2004).

Received: 22.12.2004

Accepted: 17.05.2005