

# Validasyon seviyesi

- 1- Bir metot **laboratuvarlar arası** bir çalışma ile geçerli kılınmış ise **verifikasyon (doğrulama)** yeterlidir.
- 2- Bir metot **laboratuvarlar arası** bir çalışma ile geçerli kılınmış ancak farklı yapıda bir örnek ile çalışılacaksa **doğruluk, kesinlik, tespit limiti ve tayin limiti verifikasyona (doğrulama) yeni matriks** de ilave edilerek teyit edilmelidir.
- 3- Bir metot **laboratuvarlar arası** bir çalışma ile değil laboratuvar içi çalışma ile valide edilmiş ise, **verifikasyon (doğrulama)** parametrelerine mümkün olduğu kadar **validasyon (geçerli kılma)** parametreleri de eklenmelidir.

- 4- Bir **metot bilimsel bir dergide yayınlanmış** ve belirli performans parametreleri incelenmiş ise, **verifikasyon** parametrelerine mümkün olduğu kadar **validasyon** parametreleri de eklenmelidir.
- 5- Bir **metot bilimsel bir dergide yayınlanmış** ancak **hiç bir performans parametresi incelenmemiş** ise **tam iç validasyon** yapılmalıdır.
- 6- Bir **metoda ait herhangi bir performans kriteri bulunmadığı** veya **laboratuvar içi geliştirilmiş** ise **tam iç validasyon** yapılmalıdır.

- **Metotların verifikasyonu (Doğrulama)** için
  - doğruluk,
  - kesinlik,
  - tayin ve
  - tespit limitlerinin
- laboratuvarda teyit edilmesi yeterlidir

## Geçerli Kılma

## Doğrulama



validasyon ve verifikasyon ayrımı

# Validasyon parametreleri

## • **1 Plan**

Validasyon/verifikasyon çalışmasına başlanmadan önce planlama yapılmalıdır. Plan

- **laboratuvarın imkanları,**
- **analitik yönden yapılabirliği ve**
- **müşteri talepleri**

gibi faktörleri gözönüne alınarak hazırlanmalıdır ve

# PLAN HAZIRLARKEN AŞAĞIDAKİ SORULARIN CEVAPLARI OLMALIDIR

- 1-Metodun kullanım amacı nedir ?
- 2- Kalitatif mi yoksa kantitatif sonuç mu gereklidir ?
- 3- Analit hangi kimyasal formda bulunuyor (serbest, bağlı, değişik kimyasal bileşikler)?
- 4- Analit bölgesel dağılmış mıdır ?
- 5- Metodun uygulandığı alan neresidir ?
- 6- Örnek yapısından veya başka analitlerden girişim olabilir mi ?
- 7- Örnek miktarı ne kadardır ve homojen bir yapıda mıdır ?

- 8- Örnekleme ve alt örnekleme yapılacak mıdır ?
- 9- Metot hangi aralıkta kullanılacak tespit limitine yakın mı yoksa daha yüksek bir seviyede mi?
- 10- Analit ile ilgili yasal limitler mevcut mudur ?
- 11- Gerçeklik nasıl sağlanacaktır ?
- 12- Sonuçlar başka laboratuvar sonuçları ile karşılaştırılacak mı ?
- 13- Gerekli çevresel koşullar nelerdir ?
- 14- Kaynak kısıtlaması var mıdır ? Finansal limitler nelerdir ?

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



- Ölçüm aralığı metodun uygulama aralığının belirlenmesi için yapılır.

Kalibrasyon eğrisinde ölçülen analitin miktarı (konsantrasyonu) ve dedektör yanıtının (response) doğru orantılı olarak görüldüğü aralıktır.

Metot geçerli kılma çalışmalarında analitin konsantrasyonları bu aralık dikkate alınarak planlanır.

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

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

- Sonuçlar grafiksel olarak verilir ve “linear regresyon formülü” ile “korelasyon katsayısı” belirtilir.
- Bu Őekilde alıŐma aralığının doğrusal olup olmadığı tespit edilir.
- Korelasyon katsayısı  $>0,99$  olmalıdır.
- Regresyon hesabı için Excel’de bulunan formüllerden yararlanılabilir.

- Eğer korelasyon linear (doğrusal) değil ise

ve

- problem analitik olarak çözümlenemiyorsa ilgili eğrideki parametreler, **en küçük kare metodu** kullanılarak belirlenmelidir.

- Doğrusallık korelasyon katsayısının hesaplanması yanında ANOVA Tablosunda F değeri ile karşılaştırılarak da değerlendirilmelidir.
- Yalın hata ( $s^2$ ) ve uyum eksikliği yani residüel standart sapma ( $s$ )
- aşağıdaki formüllerle hesaplanır.

Hesaplanan F değeri,  $F(1-\alpha) (N-2; NK-N)$  serbestlik derecesinde Tablodaki değer ile karşılaştırılır.

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

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

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

$y_i$ = Eğrinin formülünde “x” değerinin yerine konulduğu zaman elde edilen “y” değeri

(varsayılan “y” değeri)

a= ilgili konsantrasyondaki ilk paralel değeri

b= ilgili konsantrasyondaki ikinci paralel değeri

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

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

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

n= Kalibrasyon noktası

Kalibrasyon eğrisindeki tekrar sayısının 2 den fazla olması durumunda yalın hata

formülünde NK-N yerine 2n yazılarak hesaplama yapılmalıdır.

**F dağılımında elde edilen değer tablodaki değerden küçük ise eğri doğrusaldır.**

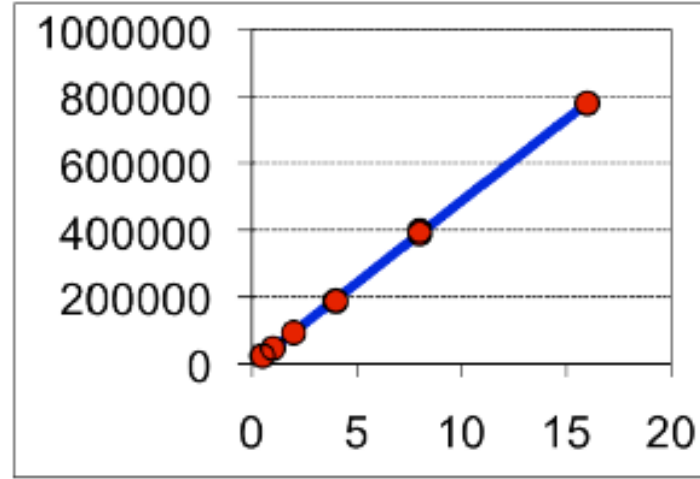
- Kalibrasyon eğrisinin **uzun süre** kullanılması gerektiğinde geçerliliğinin kontrol edilmesi gerekmektedir.
- Bu kontroller için ISO 7870, ve ISO 8258 de belirtilen **shewhart kontrol grafikleri** kullanılmaktadır.
- Bu kontrollerin yapılmasında kullanılan standartların kalibrasyon grafiğinin çiziminde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



- ***Kalibrasyon grafiđi için örnek alıřma:***
- Okratoksin A analizinde 0,5 ile 16 ng/g arasında değişen 6 noktada ve her birinde 2 tekrarlı standart solüsyonları hazırlanır. Elde edilen yanıt ile eğri çizilir ve Excel'de regresyon analizi yapılır.

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

**Tablo 2:** Kalibrasyon eğrisi değerleri



**Resim 1:** Kalibrasyon eğrisi

Regresyon istatistiđi	
Ölçüm sayısı	12
Standart hata ,s	2829,264472
Corr	0,999905001
R <sup>2</sup>	%0,999905
Düzeltilmiş R <sup>2</sup>	%0,999896

**Tablo 3:** Regresyon istatistiđi

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

**Tablo 4:** Kalibrasyon eğrisi kesme noktası ve eğim analizi

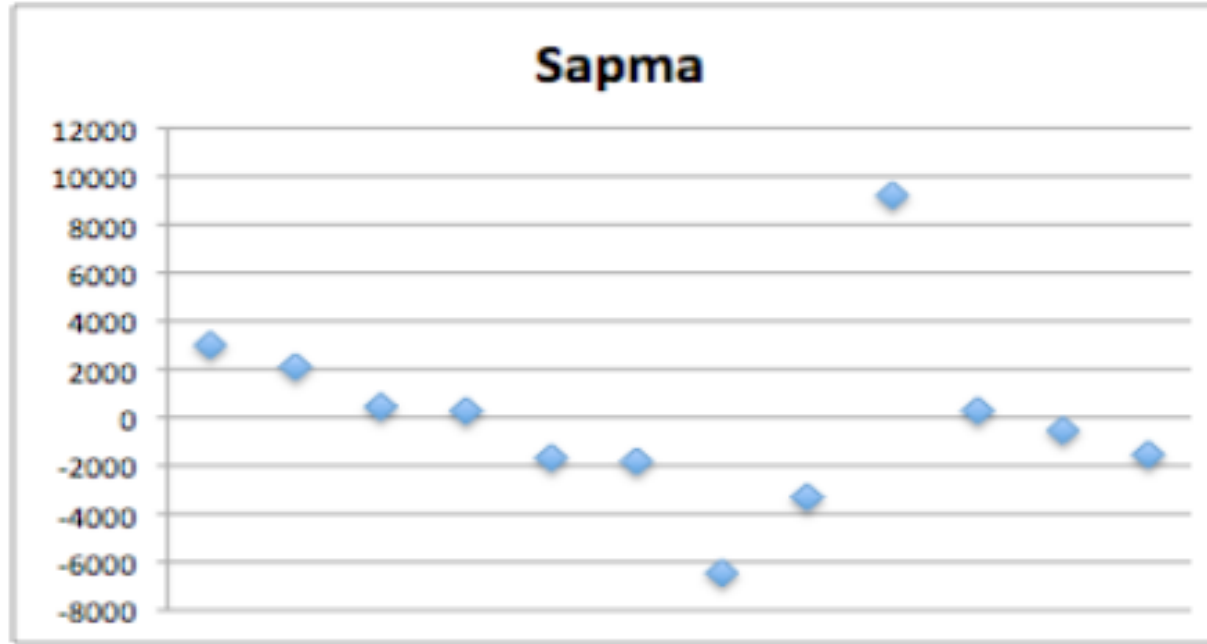
**Tablo 4:** Kalibrasyon eğrisi kesme noktası ve eğim analizi

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

**Tablo 5:** Residüel standart sapma hesabı (eşitlikte bölünen)

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

**Tablo 6:** Yalın hata hesabı (eşitlikte bölünen)



**Sekil 2:** Kalibrasyon eđrisini noktalarındaki sapma

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

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

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

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