

La validazione dei metodi di analisi: una garanzia per la qualità dei risultati analitici

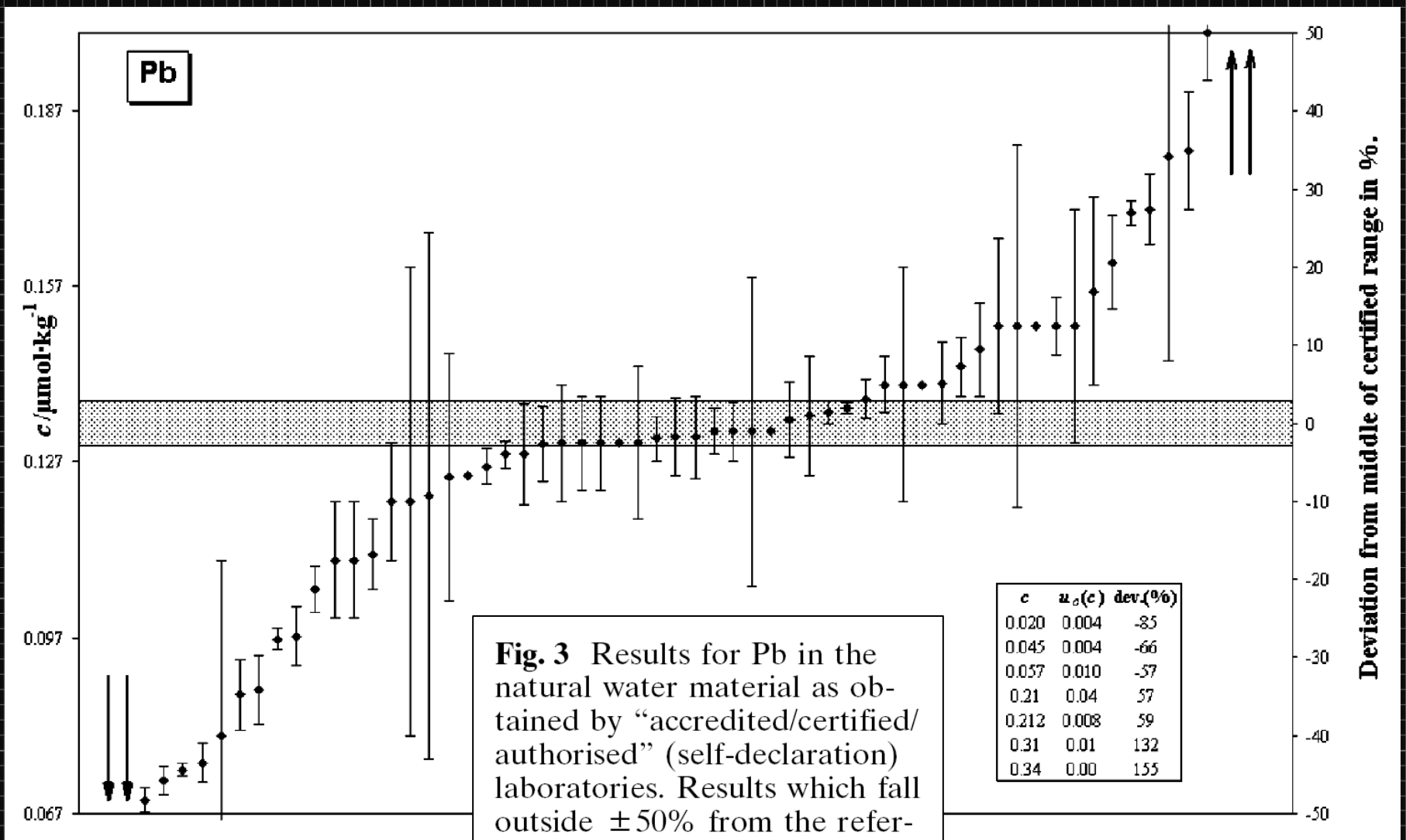
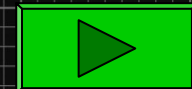


Fig. 3 Results for Pb in the natural water material as obtained by “accredited/certified/authorised” (self-declaration) laboratories. Results which fall outside $\pm 50\%$ from the reference value are found in the text box(es)

INTRODUZIONE

- ➔ Ogni analisi chimica è richiesta per risolvere un problema.
- ➔ **Tecnica, metodo, procedura** ed **eventualmente protocollo** di analisi devono essere scelti in base alle necessità del committente (tempo necessario, qualità del risultato, costo).
- ➔ La validazione permette di verificare se quanto scelto e messo a punto dal laboratorio è effettivamente adatto all'utilizzazione prevista ed a soddisfare le esigenze del committente.



Scopi della validazione di un metodo di analisi chimica sono:



provare l'**adeguatezza** della procedura in esame;



documentare la **competenza dell'operatore** a condurre il lavoro (per mezzo della verifica dei parametri di qualità ottenuti mediante adeguate procedure);



fornire dati sufficienti alla definizione dei **limiti di controllo** utili alla verifica del **rispetto dei parametri di qualità** durante il lavoro giornaliero.

Dalla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:

...

5.4.5 Validazione dei metodi

5.4.5.1 La validazione è la conferma attraverso esame e l'apporto di evidenza oggettiva che i **requisiti** particolari per l'utilizzazione prevista **siano soddisfatti**.

5.4.5.2 Il laboratorio deve **validare** i metodi non normalizzati, i metodi sviluppati/progettati dal laboratorio, i metodi normalizzati utilizzati al di fuori del proprio scopo e campo di applicazione prefissato, come pure estensioni e modifiche di metodi normalizzati **per confermare che i metodi siano adatti all'utilizzazione prevista**. La validazione deve essere estesa in modo da soddisfare le esigenze di una data applicazione o di un campo di applicazione.

...

Dalla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:

...

5.4.5.3 Il campo e l'accuratezza dei valori ottenibili da metodi validati (per esempio l'**incertezza** dei risultati, i **limiti di rilevazione**, la **selettività** del metodo, la **linearità**, la **ripetibilità** e/o la **riproducibilità**, la **robustezza** nei confronti di influenze esterne e/o la **sensibilità** incrociata nei confronti di interferenze provenienti dalla matrice del campione/oggetto da provare), così come valutati per l'utilizzo previsto, devono **corrispondere alle esigenze del cliente**.

...

Esempi di situazioni sperimentali richiedenti la validazione:

- ➔ un nuovo metodo analitico è sviluppato per scopi particolari;
- ➔ un metodo analitico in uso deve essere aggiornato, migliorato o esteso ad un nuovo problema analitico;
- ➔ il controllo di qualità evidenzia variazioni nel tempo delle prestazioni del metodo in uso;
- ➔ un metodo analitico in uso deve essere usato in un laboratorio diverso, da un operatore diverso, con una strumentazione diversa;
- ➔ è necessario dimostrare l'equivalenza del metodo analitico in esame con un metodo standard.

Ogni laboratorio deve assicurarsi che il metodo analitico, scelto in funzione delle esigenze del committente, sia validato.

La scelta di metodi analitici validati da organizzazioni internazionali autorizzate, quali l'AOAC International, richiede comunque una **verifica** della effettiva capacità del laboratorio di applicare il metodo in oggetto:

- la strumentazione, i materiali ed i reagenti disponibili sono di qualità adeguata?
- il personale assegnato alle misurazioni è sufficientemente addestrato e competente?
- i parametri di qualità valutati all'interno del laboratorio sono compatibili con quelli specificati?

Nel caso si debba validare un metodo analitico *ex novo*, la via preferibile, anche se spesso non praticabile, è la partecipazione a **prove interlaboratori**.

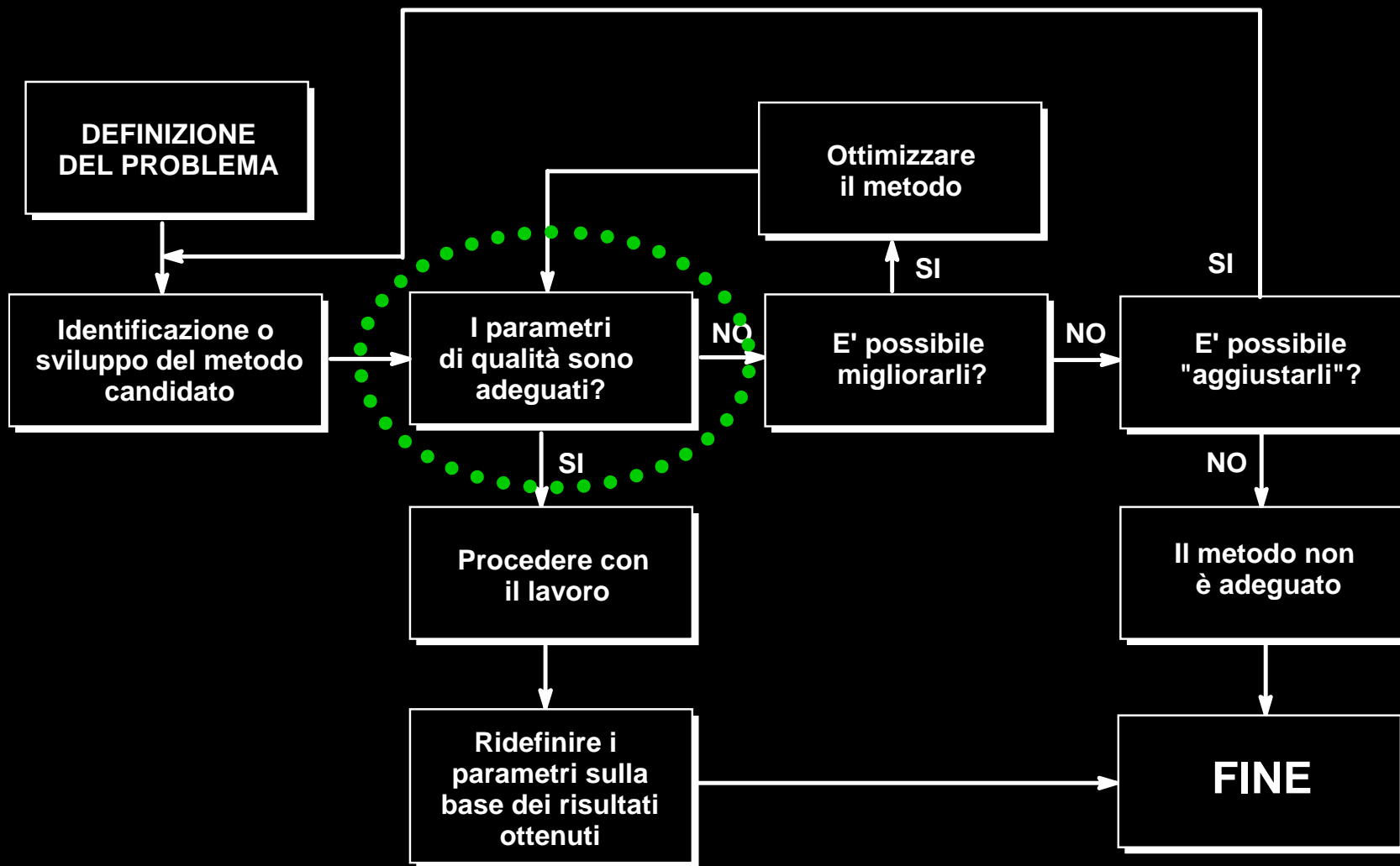
Il laboratorio che non può partecipare a prove interlaboratori, deve valutare con attenzione:

- se è in grado di eseguire in proprio la validazione e, in caso affermativo, come;
- se il metodo analitico così validato potrà essere riconosciuto come tale da altri laboratori;
- fino a che punto il metodo analitico validato all'interno del laboratorio potrà essere accettato nell'ambito di prove di conformità a limiti legali o norme composizionali.

Il laboratorio deve considerare che la validazione di un nuovo metodo analitico riguarda l'intera procedura analitica totale:

- Definizione generale del problema (committente - analista)
- Definizione analitica del problema (committente? - analista)
- Campionamento (committente? – analista?)
- Trasporto del campione (committente? – analista?)
- Conservazione del campione (analista)
- Trattamento del campione (analista)
- Analisi (analista)
- Valutazione dei risultati (analista)
- Conclusioni e stesura della relazione (analista)

Selezione, sviluppo e validazione del metodo analitico



La validazione implica la valutazione dei **parametri di qualità** del metodo analitico messo a punto o aggiornato o adottato dal laboratorio.

- **Selettività**
- **Limite di rivelabilità**
- **Limite di quantificazione**
- **Range dinamico/lineare**
- **Esattezza**
- **Incertezza di misura**
- **Recupero**
- **Robustezza**

In generale, le procedure di validazione dipendono dal tipo di analisi da eseguire.

Parametri di interesse nelle procedure di validazione di metodi di:

	<i>analisi qualitativa</i>	<i>analisi quantitativa</i>
■ Accuratezza (esattezza e precisione)	-	✓
■ Range dinamico e lineare	-	✓
■ Selettività/specificità	✓	✓
■ Limite di rivelabilità	✓	✓
■ Limite di quantificazione	-	✓
■ Robustezza	✓	✓
■ Recupero	-	✓

Estensione della validazione:

Si deve usare un metodo di analisi:

i parametri di qualità del quale sono stati valutati nell'ambito di una prova di confronto interlaboratorio.



i parametri di qualità del quale sono stati valutati in una prova di confronto interlaboratorio ma su di una matrice differente.



d'uso generalizzato i parametri di qualità del quale non sono però stati valutati nell'ambito di una prova di confronto interlaboratorio.



descritto in letteratura ma del quale sono stati valutati i principali parametri di qualità.



Il LP&T dovrebbe:

verificare se riesce a rispettare almeno i seguenti parametri di qualità: precisione, esattezza e linearità.

verificare se riesce a rispettare almeno i seguenti parametri di qualità: precisione, esattezza e limite di rivelabilità.

verificare se riesce a rispettare almeno i seguenti parametri di qualità: precisione, esattezza, linearità ed eventualmente limite di rivelabilità.

verificare almeno precisione, esattezza, linearità, limite di rivelabilità e robustezza.

Estensione della validazione:

Si deve usare un metodo di analisi:

Il LP&T dovrebbe:

descritto in letteratura ma del quale non sono noti i parametri di qualità.



eseguire una validazione completa.

empirico*.



eseguire una validazione completa.

messo a punto all'interno del LP&T.



eseguire una validazione completa.

precedentemente validato ma in condizioni sperimentali differenti (nuovo analista, nuova strumentazione) o dopo un lungo periodo di inattività o a distanza di tempo dall'ultima volta che il metodo è stato applicato.

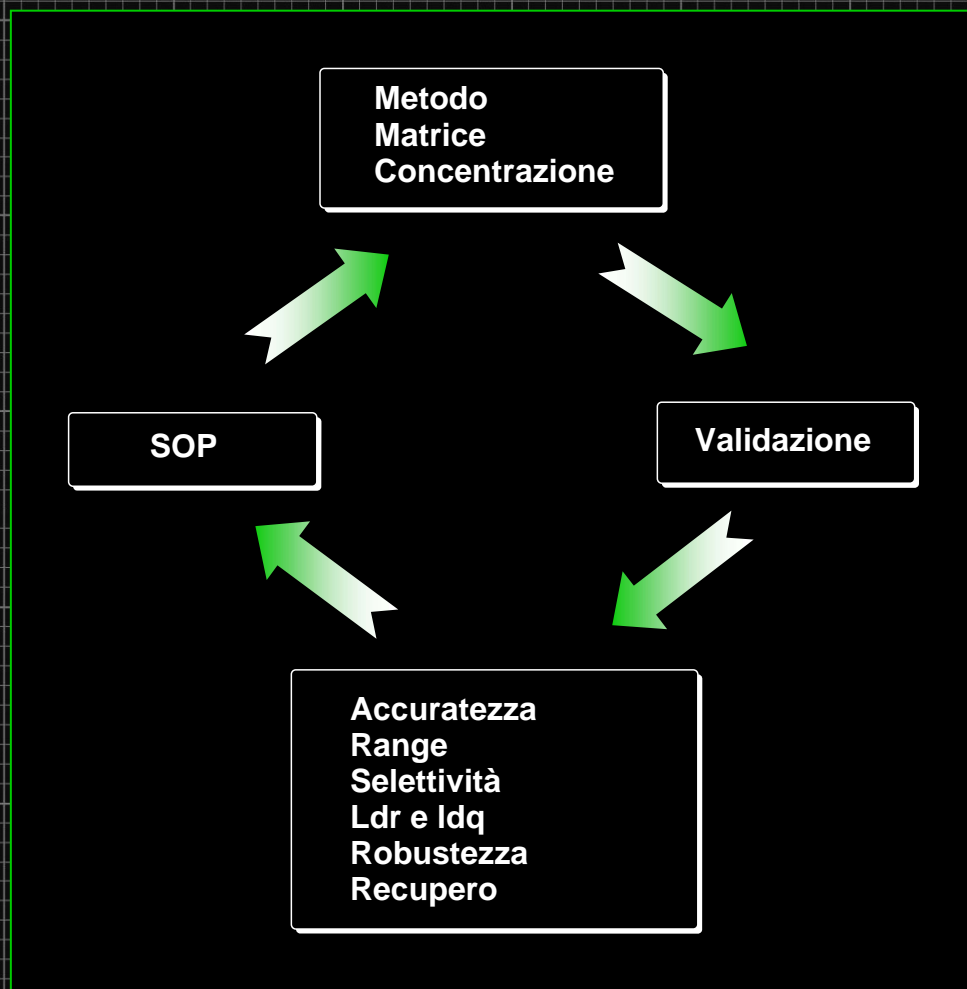


rivalutare tutti i parametri di qualità potenzialmente a rischio di peggioramento, (al minimo range lineare, esattezza, precisione, limite di rivelabilità).

Dato che misurazioni discordanti sono possibili quando l'analisi è ripetuta:

- *in un laboratorio diverso*
- *da un operatore diverso*
- *in un diverso intervallo di concentrazione*
- *con una strumentazione diversa*
- *sullo stesso analita ma in un'altra matrice*

la validazione è un **processo continuo**: ogni modificazione del sistema analitico rende necessaria una nuova fase di validazione.



In generale, la validazione implica:

- la stesura di una SOP per guidare operativamente la validazione
- la definizione di scopi e applicazioni del metodo
- la definizione dei parametri di qualità da valutare
- la definizione degli esperimenti da eseguire
- la verifica delle specifiche degli strumenti a disposizione
- la descrizione della qualità necessaria di standard e reagenti
- l'esecuzione di esperimenti di pre-validazione
- la revisione, se necessaria, dei parametri di qualità e dei criteri di accettazione dei risultati
- l'esecuzione di tutti gli esperimenti necessari (intra-laboratorio ed eventualmente inter-laboratori)
- la stesura di una SOP per guidare il lavoro di routine
- la definizione dei criteri di rivalidazione
- la definizione del tipo e frequenza delle prove di verifica dell'idoneità qualitativa del sistema analitico
- la stesura del rapporto di validazione

Schema tipo di SOP di validazione.

- **Revisioni e modificazioni** (autorizzate dal responsabile)
- **Titolo**
- **Scopo** (tipo e specie di analita, matrice, range, tecnica, dimensione del campione)
- **Avvertimenti e precauzioni**
- **Definizioni** (di ogni termine di uso non comune)
- **Principio** (meglio se come flow-chart)
- **Reagenti e materiali** (inclusi tossicologia, purezza, conservazione, etichettatura, ecc)
- **Strumentazione** (tipo e prestazioni minime tipiche, condizioni ambientali, ecc.)
- **Campionamento**
- **Conservazione dei campioni**
- **Pretrattamenti dei campioni**
- **Calibrazione**
- **Controllo di qualità** (parametri del metodo, tipo e frequenza dei controlli)
- **Criteri di rigetto**
- **Procedura** (inclusi i punti dove viene eseguito il CQ)
- **Calcoli**
- **Espressione dei risultati** (inclusi arrotondamenti, incertezza, livello di fiducia)
- **Operatore**
- **Riferimenti normativi** (utili come background teorico del metodo)
- **Firma del responsabile del servizio**

Valutazione dei parametri di qualità

Selettività

La **selettività** è la capacità di una tecnica analitica di rispondere prevalentemente alla presenza di un analita, e solo in minor parte alla presenza d'interferenti o d'altri componenti diversi dall'analita in esame.

Essa può essere valutata analizzando campioni reali e, se possibile, materiali di riferimento (aventi una composizione il più possibile simile a quella dei campioni reali) con il metodo in esame e con un altro metodo indipendente.

Procedura:

analizzare almeno una volta campioni e materiali di riferimento mediante il metodo in esame e mediante un metodo basato su di un principio fisico indipendente: confrontando i risultati, valutare la capacità del metodo in esame di identificare l'analita e la sua abilità nel determinarlo in presenza di interferenti.

Questo tipo di confronto deve essere eseguito con tecniche di regressione idonee per **relazioni funzionali FII**.

ESEMPIO:

Un metodo in uso per l'analisi del contenuto di acidi organici in preparati chimici, basato sull'estrazione e successiva pesata (metodo A), ritenuto troppo costoso, è confrontato con un metodo volumetrico, più economico (metodo B).

In teoria i due metodi misurano quantità differenti anche se correlate.

Approfondimenti:

E. Desimoni, B. Brunetti, *L'elaborazione dei dati nel laboratorio di analisi chimiche*, CLUEB, Bologna, I (2010)

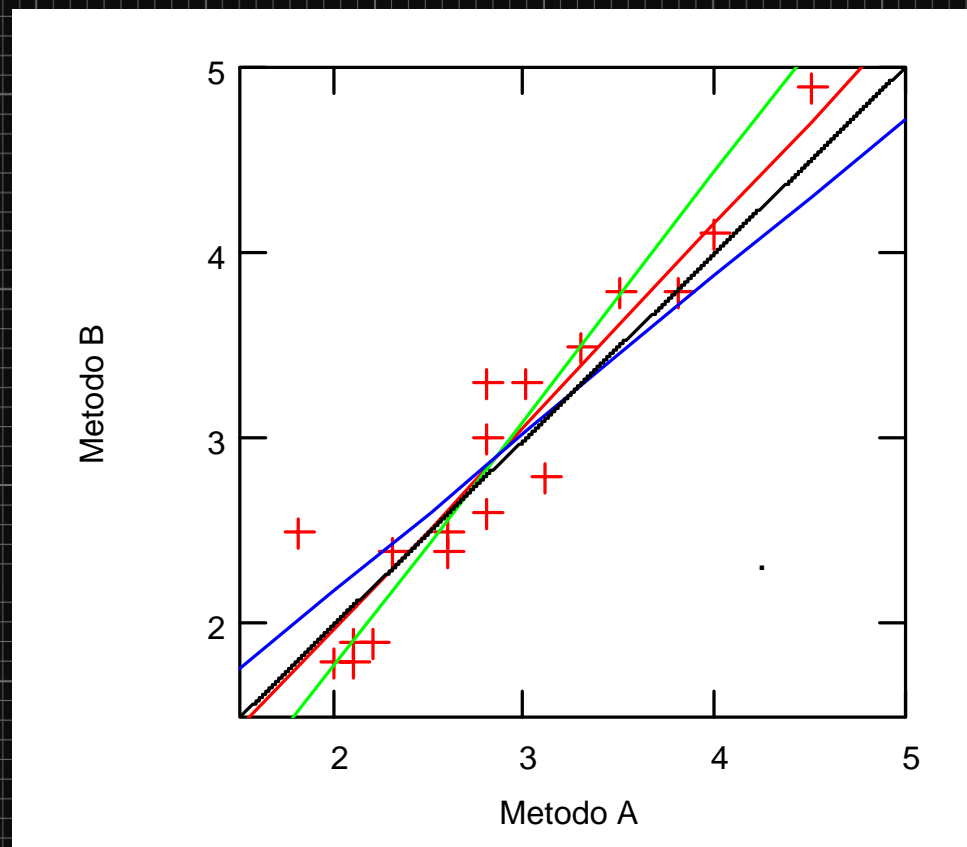


Figura 5.15. La retta nera indica il risultato teorico. La retta rossa è quella stimata e le rette blu e verde indicano l'intervallo di confidenza: **ottimo accordo**.

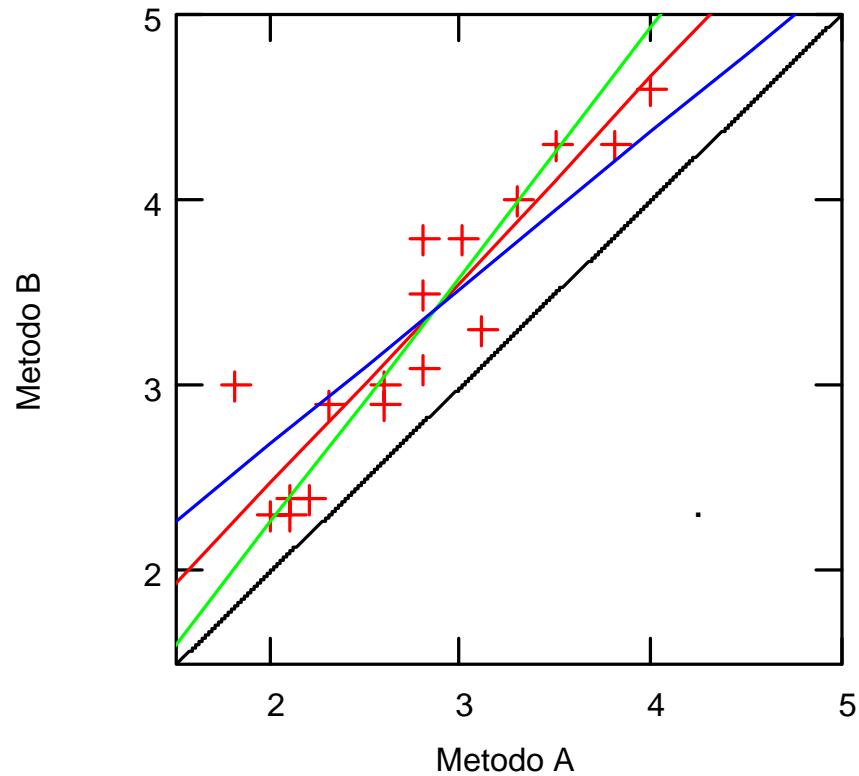


Figura 5.15. La retta nera indica il risultato teorico. La retta rossa è quella stimata e le rette blu e verde indicano l'intervallo di confidenza: **errore sistematico costante positivo**.

Alternativamente, la selettività può essere valutata analizzando, con lo stesso metodo di analisi, campioni reali prima e dopo fortificazione con i sospetti interferenti.

Procedura:

analizzare almeno una volta campioni reali prima e dopo fortificazione con i sospetti interferenti (possibilmente a diversi livelli di concentrazione): valutare se gli interferenti portano a risultati significativamente differenti.

L'accettabilità del risultato stimato deve essere valutata in base a criteri prefissati. Il criterio più facilmente adottabile è implicitamente legato al livello di fiducia scelto per eseguire i test statistici.

È evidente che la scelta di un livello di fiducia pari al 95% implica l'accettazione del rischio di stime incorrette una volta su venti.

Limite di rivelabilità e di quantificazione

Il **limite di rivelabilità**, o minima quantità rivelabile, I_{dr} , è la concentrazione di analita che produce un segnale significativamente diverso da quello del bianco, ovvero la concentrazione corrispondente al minimo segnale significativo, S_s .

Il I_{dr} espresso in unità di concentrazione si ricava da S_s tramite la curva di calibrazione.

Gli approcci per la stima del I_{dr} sono numerosi. Il valore del I_{dr} dipende dall'approccio adottato per stimarlo e dalle condizioni sperimentali usate. Gli approcci più noti sono quelli:

- basati sulla stima della deviazione standard del segnale del bianco
- di Hubaux e Vos
- ISO 11843-1,2

Approcci basati sulla stima della deviazione standard del segnale del bianco:

$$ldr = \frac{z_{1-\alpha} \cdot \sigma_B}{b}, \quad ldr = \frac{2 \cdot t_{1-\alpha, v} \cdot s_B}{b}, \quad \dots\dots$$

$$ldr = \frac{3 \cdot \sigma_B}{b}$$

A questo ldr compete
 $\alpha = 0,135\%$ (ma $\beta = 50\%$).
oppure
 $\alpha = 6,68\%$ e $\beta = 6,68\%$.

L'uso di σ_B dovrebbe essere limitato al caso di campioni di numerosità elevata (> 20?).

$$ldr = \frac{3,3 \cdot \sigma_B}{b}$$

A questo ldr competono
 $\alpha = \beta = 5\%$

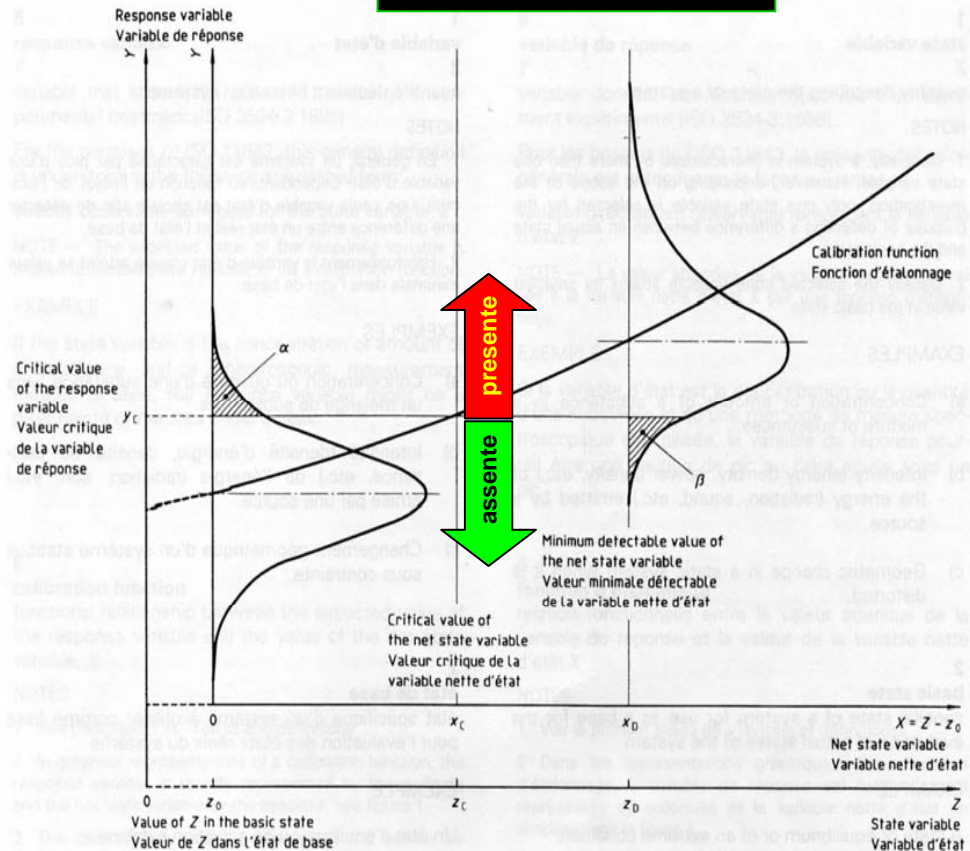


Gli approcci più recenti/accettati (come per esempio quello ISO 11843-2) implicano il controllo degli errori di I e II tipo.

L'approccio di Hubaux e Vos e quello ISO 11843-1,2 si basano sull'uso dei parametri della retta di calibrazione: →

Lo standard ISO presenta anche il caso di sistemi **eteroschedastici**.

Il limite di rivelabilità ottenuto sperimentalmente dipende dall'approccio adottato.



- | | | | |
|----------|--|----------|--|
| Z | State variable | Z | Variable d'état |
| z_0 | Value of the state variable in the basic state | z_0 | Valeur de la variable d'état dans l'état de base |
| X | Net state variable, $X = Z - z_0$ | X | Variable nette d'état, $X = Z - z_0$ |
| x_c | Critical value of the net state variable | x_c | Valeur critique de la variable nette d'état |
| x_D | Minimum detectable value of the net state variable | x_D | Valeur minimale détectable de la variable nette d'état |
| Y | Response variable | Y | Variable de réponse |
| y_c | Critical value of the response variable | y_c | Valeur critique de la variable de réponse |
| α | Probability of an error of the first kind | α | Probabilité d'une erreur de 1 ^{ère} espèce |
| β | Probability of an error of the second kind for $X = x_D$ | β | Probabilité d'une erreur de 2 ^{ème} espèce pour $X = x_D$ |

Il limite di rivelabilità, qualunque sia l'approccio adottato, è solo una stima puntuale del vero Idr.

Ogni ripetizione della sequenza di misurazioni porta a stime presumibilmente più o meno differenti.

Adottando l'approccio ISO 11843-2, nel caso particolare di un sistema analitico eteroschedastico è stato dimostrato che, a seconda del numero di calibrazioni considerate per la stima del Idr, la deviazione standard relativa della distribuzione delle stime variava tra 8% e 86%.*

Il vero limite di rivelabilità non viene mai ottenuto, in quanto molto probabilmente il valore stimato appartiene ad una distribuzione ignota, probabilmente scodata e comunque non-normale.

Riportare un limite di rivelabilità senza dettagliare le condizioni sperimentali usate e l'approccio adottato significa annullare totalmente il valore della stima.

Una decisione *binaria* (analita **presente/assente**) basata sul confronto del segnale della soluzione in esame con il minimo segnale significativo, non è adeguata nel caso si voglia effettuare un'analisi quantitativa. In questo caso è logico supporre che *la deviazione standard debba essere solo una piccola frazione del segnale*.

Un'analisi può essere definita *quantitativa* solo se il segnale è 10 o 20 volte maggiore della deviazione standard del bianco. Ne deriva che il **limite di quantificazione**, ldq (talvolta chiamato limite di determinazione) è definito come segue

$$ldq = m \cdot lod \quad m = \text{const} \quad \text{Es. } loq = \frac{10 \cdot \sigma_B}{b} \quad loq = \frac{20 \cdot \sigma_B}{b}$$

Mentre il limite di rivelabilità riguarda la capacità di affermare la presenza o l'assenza dell'analita, il limite di quantificazione riguarda la capacità di eseguire una misurazione quantitativa.

Range dinamico/lineare

Il **range** è l'intervallo di concentrazione esplorato nel corso delle misurazioni.

Il **range dinamico** è l'intervallo di concentrazione nel quale il segnale varia con la concentrazione: i limiti inferiore e superiore del range dinamico corrispondono, rispettivamente, al limite di rivelabilità ed alla più alta concentrazione alla quale un incremento di concentrazione produce ancora un incremento di segnale.

Il **range (dinamico) lineare** esprime l'intervallo di concentrazione nel quale il segnale varia linearmente con la concentrazione.

La costruzione del diagramma di calibrazione implica l'adozione di un metodo di regressione. Quello più generalmente adottato è il metodo di regressione lineare ordinaria dei minimi quadrati (OLLSR).

Condizioni necessarie per poter eseguire una OLLSR:

- la relazione funzionale segnale/concentrazione deve essere del tipo FI: gli errori sperimentali associati alla variabile indipendente (concentrazione, quantità) **devono** essere trascurabili rispetto a quelli associati alla variabile dipendente (segnale);
- gli errori associati alla variabile dipendente **devono** essere distribuiti normalmente;
- il sistema analitico **deve** essere omoschedastico, ovvero la precisione non deve cambiare significativamente al variare della concentrazione;
- il segnale **deve** essere funzione lineare della concentrazione.

È consigliabile inoltre verificare la presenza di dati anomali (outliers).

NOTA

Pur consigliata, l'eliminazione degli outliers **non è obbligatoria**.

La loro identificazione si basa sull'ipotesi, da verificare volta per volta, che i risultati ottenuti **siano distribuiti normalmente** e che quindi sia possibile l'uso dei test parametrici.

Purtroppo la distribuzione dei dati sperimentali spesso **non è normale**. Talvolta può essere scodata, bimodale, etc.

Provvedimenti:

- se la relazione funzionale è di tipo FII (entrambe le variabili, dipendente ed indipendente, sono affette da errore sperimentale) si deve ricorrere a metodi specifici di regressione.
- se gli errori associati alla variabile dipendente non sono distribuiti normalmente si deve ricorrere a metodi di regressione più robusti (per es. LMS: Least median of squares);
- se il sistema è eteroschedastico (la precisione varia significativamente con la concentrazione) è necessario ricorrere a trasformazioni dei dati, o a metodi di regressione pesata;
- se il segnale non è funzione lineare della concentrazione, si deve ridurre l'intervallo di concentrazione esplorato oppure, dopo aver suddiviso l'intervallo in sub-intervalli, si deve eseguire una regressione lineare in ciascuno dei sub-intervalli, oppure ancora si deve ricorrere a metodi di regressione non lineare.

I test statistici a disposizione sono numerosi. Per esempio:

Test per normalità:

- test di Shapiro-Wilk
- test del chi-quadro

Test per omoschedasticità:

- analisi grafica dei residui della regressione
- test- F alla concentrazione minima e massima
- test di Bartlett (per dati di diversa numerosità)
- test di Cochran (per dati di uguale numerosità)

Test per linearità:

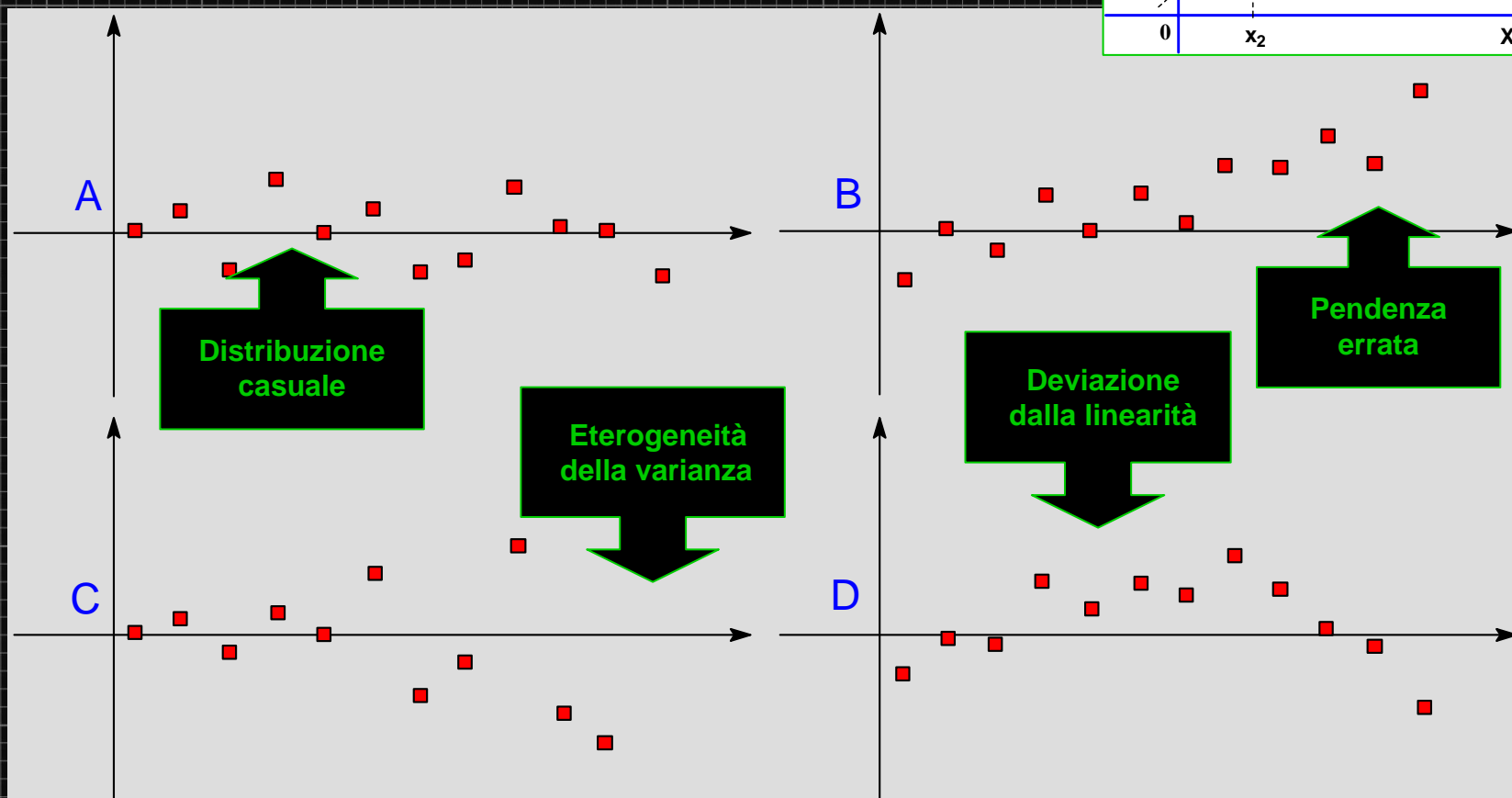
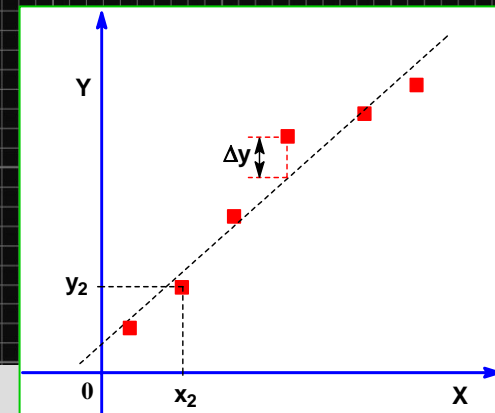
- analisi grafica dei residui della regressione
- test- F su $s_{y/x}$ della regressione quadratica e lineare (test di Mandel)
- *lack-of-fit test*

Test per outliers:

- test- F su $s_{y/x}$ prima e dopo eliminazione del dato sospetto

Analisi dei residui della regressione:

L'analisi è più significativa se sono eseguite misurazioni replicate dei campioni usati per costruire il diagramma di calibrazione.



Un'analisi di regressione completa, da condurre mediante misurazioni replicate di ciascun campione standard, consiste di due fasi.

Procedura:

Fase A

- analizzare una volta il bianco più almeno 6 materiali di riferimento o bianchi fortificati a diversa concentrazione;
- riportare il segnale in funzione della concentrazione e identificare approssimativamente il range lineare e gli estremi del range dinamico;

Fase B

- analizzare (tre volte) almeno 6 materiali di riferimento o bianchi fortificati a diversa concentrazione entro il range lineare (*randomizzare!*);
- calcolare i coefficienti di regressione più appropriati (coefficiente di correlazione e di determinazione, pendenza, intercetta e relativi intervalli di fiducia);
- verificare possibili outliers, linearità e omoschedasticità.

Esattezza

L'**esattezza** è la bontà dell'accordo tra il valore medio ottenuto da una serie adeguatamente numerosa di risultati ed il valore di riferimento accettato.

L'esattezza può essere valutata mediante analisi di uno o più materiali di riferimento certificati (CRM). Questi devono avere una composizione il più possibile simile a quella dei campioni reali in esame.

Procedura:

- eseguire 10 analisi replicate del bianco e di un materiale di riferimento con il metodo da validare;
- se necessario, sottrarre il valore medio del bianco dal valore medio del materiale di riferimento;
- confrontare il risultato ottenuto con quello vero o assunto come tale.

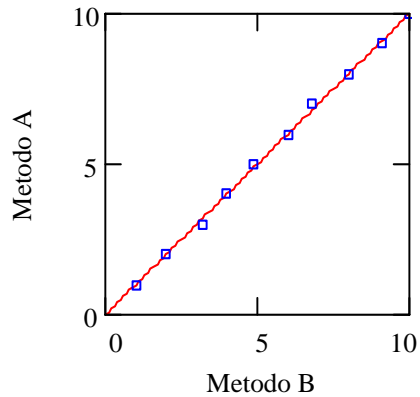
Alternativamente, l'esattezza può essere valutata mediante confronto dei risultati ottenuti mediante analisi di una serie di campioni (standard o reali) con il metodo da validare e con un metodo di riferimento indipendente.

Procedura A:

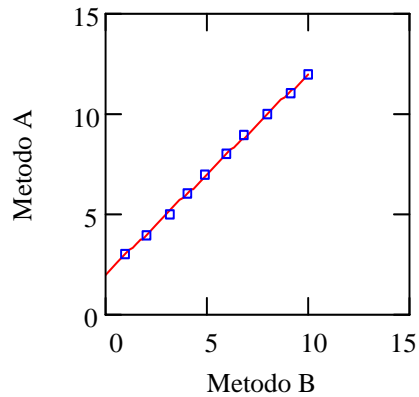
eseguire 10 analisi replicate del bianco e del campione in esame, o di un materiale di riferimento, con il metodo da validare e con un metodo di riferimento indipendente e confrontare i risultati mediante test per il confronto di due medie sperimentali;

Procedura B:

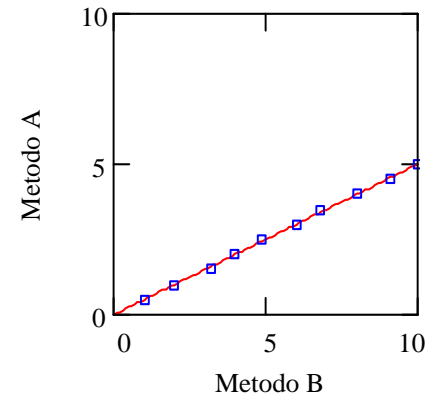
riportare in grafico i risultati ottenuti analizzando una serie di campioni a diversa concentrazione con il metodo da validare e con quello di riferimento (usare la formulazione per relazioni funzionali di tipo **FII**): i vari casi possibili sono riportati nella prossima diapositiva.



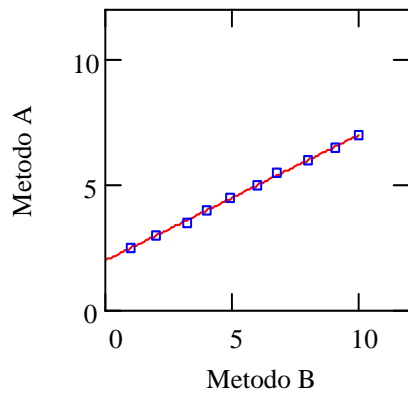
Teorico



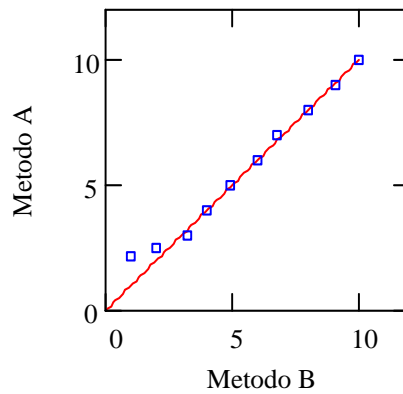
**Errore sistematico
costante positivo**



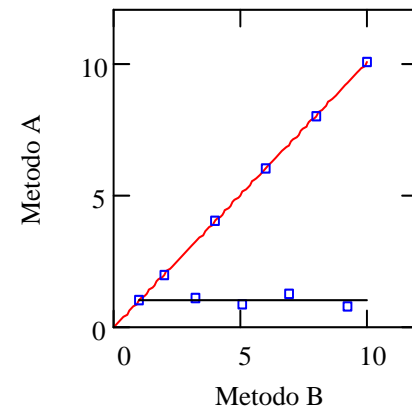
**Errore sistematico
proporzionale negativo**



**Errore sistematico
costante positivo più
errore sistematico
proporzionale negativo**



Deviazione dalla linearità



Problemi di speciazione

Procedura B

Precisione

La **precisione** è la bontà dell'accordo tra i risultati di misurazioni successive dello stesso misurando, ovvero la misura della vicinanza reciproca delle misure all'interno di un set di misurazioni su di uno stesso campione.

Ripetibilità e riproducibilità sono due tipi di precisione.

La **ripetibilità** è la bontà dell'accordo tra i risultati di misurazioni successive dello stesso misurando condotte nelle stesse condizioni di misurazione. Il **limite di ripetibilità, r** , è il valore massimo, prevedibile ad un certo livello di fiducia, della differenza assoluta tra due risultati ottenuti in condizioni di ripetibilità: se nelle normali condizioni di lavoro la differenza tra due risultati è maggiore di r , i risultati sono sospetti.

La **riproducibilità** è la bontà dell'accordo tra i risultati di misurazioni successive dello stesso misurando condotte in condizioni di misurazione non omogenee. Il **limite di riproducibilità, R** , è il valore massimo, prevedibile ad un certo livello di fiducia, della differenza assoluta tra due risultati ottenuti in condizioni di riproducibilità: se nelle normali condizioni di lavoro la differenza tra due risultati è maggiore di R , i risultati sono sospetti.

Procedura per la valutazione della ripetibilità:

- analizzare 10 (N) standard, o materiali di riferimento o bianchi fortificati indipendenti a diversi livelli di concentrazione entro il range dinamico (*stesso operatore, strumento, laboratorio; tempo limitato*);
- determinare la deviazione standard e calcolare il limite di ripetibilità:

$$r = t_{1-\frac{\alpha}{2},v} \cdot \sqrt{2} \cdot \sigma_r$$

dove $t_{1-\alpha/2,v}$ è la t di Student (2 code) per il livello di fiducia desiderato e $v = (N-1)$ gradi di libertà. In pratica, si accetta come possibile l'uso di $v = \infty$ e quindi, per $1-\alpha = 0,95$, si usa $t_{1-\alpha/2,\infty} = 1,96 \approx 2$; σ_r è la deviazione standard della ripetibilità.

Procedura per la valutazione della riproducibilità:

- analizzare 10 (N) standard, o materiali di riferimento o bianchi fortificati indipendenti a diversi livelli di concentrazione entro il range dinamico (*diverso operatore, strumento e laboratorio; tempo esteso*);
- determinare la deviazione standard e calcolare il limite di riproducibilità:

$$R = t_{1-\frac{\alpha}{2}, \nu} \cdot \sqrt{2} \cdot \sigma_R$$

dove $t_{1-\alpha/2, \nu}$ è la t di Student (2 code) per il livello di fiducia desiderato e $\nu = (N-1)$ gradi di libertà. In pratica, si accetta come possibile l'uso di $\nu = \infty$ e quindi, per $1-\alpha = 0,95$, si usa $t_{1-\alpha/2, \infty} = 1,96 \approx 2$; σ_R è la deviazione standard della riproducibilità.

Incertezza di misurazione

La norma ISO 25, *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement* (ISO, Geneva, 1993), definisce l'**incertezza di misurazione** come

un parametro, associato al risultato di una misurazione, che caratterizza la dispersione dei valori che possono essere ragionevolmente attribuiti al misurando qualora siano state considerate tutte le sorgenti d'errore.

Il risultato di una misurazione rappresenta la migliore stima del valore del misurando e l'incertezza, valutata considerando tutte le sorgenti d'errore, quantifica la qualità del risultato.

Una misura non completata dalla sua incertezza non può essere confrontata né con altre misure né con valori di riferimento o con limiti legali o composizionali.

(dalla UNI CEI EN ISO/IEC 17025: 2005)

5.4.6 Stima dell'incertezza di misura

.....

5.4.6.2 I laboratori di prova **devono avere e devono applicare procedure per stimare l'incertezza delle misure**. In certi casi la natura dei metodi di prova può escludere il calcolo rigoroso dell'incertezza di misura, valido dal punto di vista metrologico e statistico. In questi casi **il laboratorio deve almeno tentare di identificare tutte le componenti dell'incertezza** e fornire una stima **ragionevole**, e deve assicurare che l'espressione del risultato non fornisca un'impressione errata dell'incertezza. Una stima ragionevole deve essere basata sulla conoscenza del metodo e sullo scopo della misurazione e deve far uso, per esempio, delle esperienze precedenti e della validazione dei dati.

È evidente che affinché il risultato sia effettivamente utile, e non generi confusione, l'incertezza deve essere stimata ed espressa in maniera **standardizzata**.

I modelli attualmente più diffusi sono:

- modello **bottom-up**, proposto da ISO e adottato poi da Eurachem
- modello **top-down**, proposto dall'Analytical Methods Committee della Royal Society of Chemistry
- modello proposto da **NMKL** *



MODELLO BOTTOM-UP

Le linee guida originali sono descritte nella **Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM)**. Il modello è basato sui principi di propagazione degli errori e perciò sembra differire dalla metodologia utilizzata comunemente in chimica analitica, basata sulla valutazione di ripetibilità e riproducibilità.

- Non risulta di facile applicazione nei procedimenti di analisi chimica: alcune sorgenti di variazione anche importanti possono sfuggire all'indagine dell'analista o essere di difficile quantificazione.
- Per applicare il modello è necessario migliorare la valutazione dell'incertezza ottenuta con il valore della ripetibilità **aggiungendovi** l'effetto della variazione di alcune grandezze che si è in grado di documentare con sicurezza. Esiste il rischio, nel compiere questa operazione, di "duplicare" ossia contare due volte lo stesso contributo.
- A tale scopo, si devono esaminare le diverse fasi che costituiscono il processo di analisi, individuando per ciascuna di esse il contributo all'incertezza già controllato con la ripetibilità e quello non controllato.

Attualmente, con incertezza di misurazione si intende l'incertezza espansa, U (*modello bottom-up*), ottenuta moltiplicando l'incertezza combinata, u , per un opportuno fattore di copertura, k .

$$U = k \cdot u$$

Il fattore di copertura permette di associare un livello di confidenza all'intervallo $\pm U$.

L'argomento è trattato al necessario grado d'approfondimento nel prossimo seminario a cura del Dott. Fabrizio Apruzzese

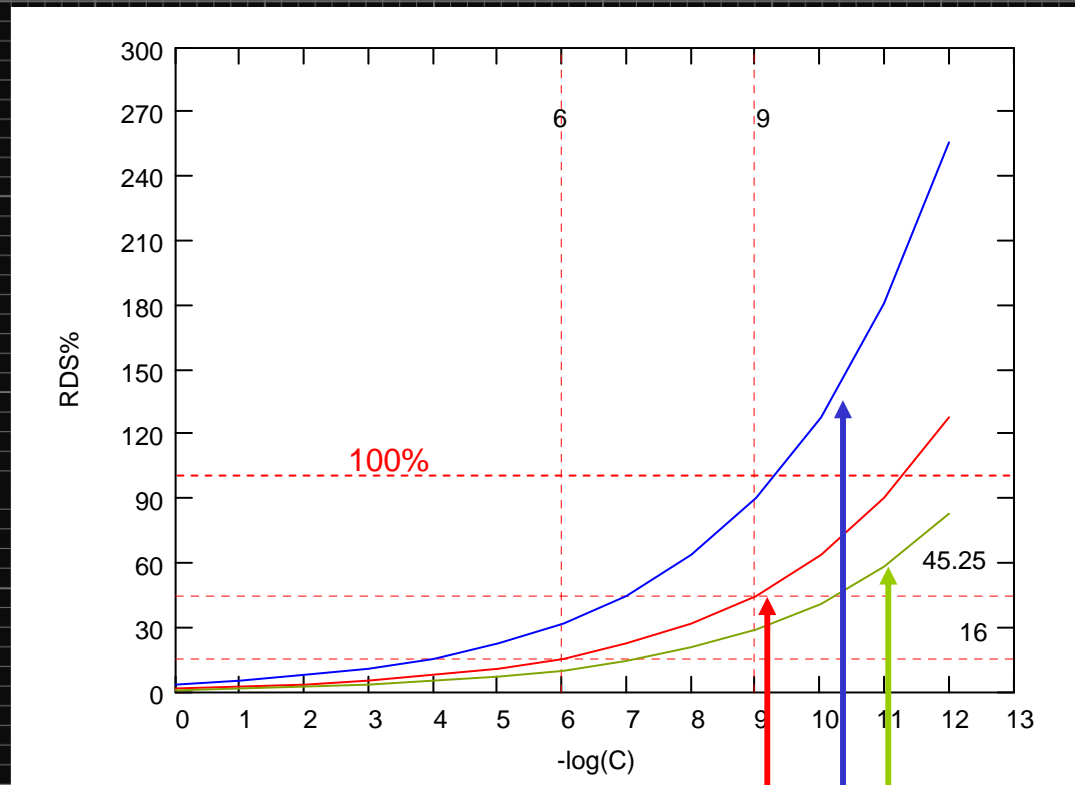
Equazione di Horwitz

L'equazione permette di stimare *a priori* l'incertezza di una misura prescindere da analita, metodo e matrice.

Il valore stimato può essere usato come valore presumibile dell'incertezza sperimentale (vedere curva **rossa**).

C	RSD% =
0	1.0
1	0.1
2	0.0
3	$1.0 \cdot 10^{-3}$
4	$1.0 \cdot 10^{-4}$
5	$1.0 \cdot 10^{-5}$
6	$1.0 \cdot 10^{-6}$
7	$1.0 \cdot 10^{-7}$
8	$1.0 \cdot 10^{-8}$
9	$1.0 \cdot 10^{-9}$
10	$1.0 \cdot 10^{-10}$
11	$1.0 \cdot 10^{-11}$
12	$1.0 \cdot 10^{-12}$

C	RSD% =
0	2.00
1	2.83
2	4.00
3	5.66
4	8.00
5	11.31
6	16.00
7	22.63
8	32.00
9	45.25
10	64.00
11	90.51
12	128.00



$$RSD \% = 2^{(1-0,5 \cdot \log(C))}$$

$$RSD \%_{interlab} = 2 \cdot RSD \%$$

$$RSD \%_{intra lab} = 0,65 \cdot RSD \%$$

Recupero

Il **recupero** è la frazione di analita, presente o aggiunto alla porzione di materiale in prova, estratto e oggetto di misurazione.

In teoria, un recupero diverso dal 100% indica la presenza di errori sistematici. In pratica, il recupero dipende dalla concentrazione di analita. In base a quanto specificato dal manuale AOAC per il *Peer Verified Methods program*, al diminuire della concentrazione di analita è ragionevole ottenere recuperi sempre più diversi dal 100%, come indicato qui sotto.

Analita%	Frazione	Concentrazione	Recupero medio (%)
100	1	100 %	98-102
≥10	10 ⁻¹	10 %	98-102
≥1	10 ⁻²	1 %	97-103
≥0,1	10 ⁻³	0,1 %	95-105
0,01	10 ⁻⁴	100 mg/kg	90-107
0,001	10 ⁻⁵	10 mg/kg	80-110
0,0001	10 ⁻⁶	1 mg/kg	80-110
0,00001	10 ⁻⁷	100 µg/kg	80-110
0,000001	10 ⁻⁸	10 µg/kg	60-115
0,0000001	10 ⁻⁹	1 µg/kg	40-120

Il recupero può essere valutato:

- mediante analisi di un materiale di riferimento certificato (procedura A);
- mediante fortificazione di un bianco (procedura B);
- mediante fortificazione di una matrice contenente l'analita (procedura C);
- mediante confronto dei risultati ottenuti con un metodo standard (procedura D).

Le procedure B e C possono essere eseguite fortificando individualmente più aliquote del campione o analizzando più aliquote prelevate da un campione massivo fortificato.

La procedura C deve essere seguita quando non esiste un bianco in cui l'analita è effettivamente assente.

L'incertezza del recupero deve essere considerata insieme alle altre incertezze d'ingresso.

Il calcolo del recupero e della relativa incertezza dipende dal metodo adottato.

Robustezza

La **robustezza** è la misura della capacità di una procedura analitica di non essere alterata da piccole (deliberate) variazioni dei fattori (delle variabili) che possono prevedibilmente influenzarne i risultati.

Conviene focalizzare l'attenzione sui fattori più critici, ordinandoli in base alla loro influenza sulle prestazioni del metodo, e stabilire procedure di controllo di qualità per mantenerli sotto controllo.

La procedura per valutare la robustezza implica il confronto sistematico degli effetti delle variazioni dei fattori d'influenza sul risultato dell'analisi.

Nel caso di un numero limitato di fattori (al massimo tre) si può valutare la robustezza confrontando i risultati medi ottenuti prima e dopo una loro variazione arbitraria.

I livelli di fattore da esaminare derivano dalle specifiche del metodo in esame, dettagliate nella SOP di validazione. È evidente che le prestazioni di un metodo validato non devono essere influenzate da variazioni di livello dei fattori comprese nei limiti specificati nella SOP di validazione (per esempio, $\text{pH} = 4,7 (\pm 0,1)$).

Nel caso di un numero maggiore di variabili d'influenza si può usare il metodo di **Youden**. Questi ha dimostrato che sono sufficienti 8 misurazioni per valutare l'effetto delle variazioni imposte deliberatamente a 7 fattori d'influenza. Il metodo implica la scelta, per ciascun fattore, di due livelli, più alto e, rispettivamente, più basso del valore standard di ciascuno dei fattori critici.

Indicando con a_+ , b_+ , c_+ , d_+ , e_+ , f_+ , g_+ i livelli alti e con a_- , b_- , c_- , d_- , e_- , f_- , g_- i livelli bassi, è possibile progettare 8 misurazioni, una per ogni combinazione, C_p , di fattori. Queste combinazioni sono presentate nello schema sottostante:

C_p	Fattori							Risultati
	a	b	c	d	e	f	g	
1	+	+	+	+	+	+	+	r_1
2	+	+	-	+	-	-	-	r_2
3	+	-	+	-	+	-	-	r_3
4	+	-	-	-	-	+	+	r_4
5	-	+	+	-	-	+	-	r_5
6	-	+	-	-	+	-	+	r_6
7	-	-	+	+	-	-	+	r_7
8	-	-	-	+	+	+	-	r_8

L'analisi dei risultati ottenuti permette di identificare i livelli critici dei fattori.

Usando gli otto risultati, è possibile calcolare l'effetto prodotto dalle variazioni imposte a ciascun fattore come differenza, in valore assoluto, fra la media dei 4 risultati delle prove eseguite mantenendo questo fattore al livello alto e la media dei 4 risultati delle prove eseguite mantenendo lo stesso fattore al livello basso (V_a, V_b, \dots).

$$\begin{array}{l}
 V_a := \left| \frac{r_1 + r_2 + r_3 + r_4}{4} - \frac{r_5 + r_6 + r_7 + r_8}{4} \right| \\
 V_b := \left| \frac{r_1 + r_2 + r_5 + r_6}{4} - \frac{r_3 + r_4 + r_7 + r_8}{4} \right| \\
 V_c := \left| \frac{r_1 + r_3 + r_5 + r_7}{4} - \frac{r_2 + r_4 + r_6 + r_8}{4} \right| \\
 V_d := \left| \frac{r_1 + r_2 + r_7 + r_8}{4} - \frac{r_3 + r_4 + r_5 + r_6}{4} \right| \\
 V_e := \left| \frac{r_1 + r_3 + r_6 + r_8}{4} - \frac{r_2 + r_4 + r_5 + r_7}{4} \right| \\
 V_f := \left| \frac{r_1 + r_4 + r_5 + r_8}{4} - \frac{r_2 + r_3 + r_6 + r_7}{4} \right| \\
 V_g := \left| \frac{r_1 + r_4 + r_6 + r_7}{4} - \frac{r_2 + r_3 + r_5 + r_8}{4} \right|
 \end{array}$$

L'esame dei valori assoluti di ciascuna prova permette di verificare la robustezza del metodo verso i fattori esplorati. Se le variazioni di un fattore influenzano il risultato dell'analisi più di quelle di altri fattori, allora la differenza ad esso relativa risulterà maggiore delle altre.

Per valutare se questa differenza più elevata delle altre ha un effetto significativo sul risultato, si può eseguire un test di significatività. Questo implica:

- la stima della ripetibilità del metodo, come deviazione standard stimata da N analisi replicate di un campione rappresentativo in un intervallo temporale ristretto;
- il calcolo del valore sperimentale

$$t_i = \frac{\sqrt{n} \cdot |V_i|}{\sqrt{2} \cdot s}$$

dove V_i è la differenza relativa al fattore i^{esimo} , n è il numero di esperimenti condotti ad ogni livello per ogni parametro (4 nel caso del disegno di Youden), ed s è la stima della precisione del metodo calcolata al punto 1;

- il confronto del valore ottenuto con quello critico a 2 code per il livello di fiducia prescelto e $N-1$ gradi di libertà: se il valore ottenuto è maggiore di quello critico, la differenza i^{esima} è significativamente diversa da zero: la variazione del fattore ha avuto un effetto significativo sulle prestazioni del metodo.

Considerazioni finali

Quando il metodo validato è usato per condurre il lavoro di routine, è necessario assicurarsi che i parametri di qualità stimati in precedenza valgano anche per i campioni reali, e che non peggiorino nel tempo.

Allo scopo è necessario mantenere il sistema analitico sotto **controllo statistico**, ovvero assicurarsi che il sistema analitico sia caratterizzato da fluttuazioni solo casuali attorno ad un valore di riferimento e che queste fluttuazioni (quantificate, per esempio, in funzione di una deviazione standard) rimangano costanti.

Nel laboratorio di prova e taratura, i migliori strumenti per il monitoraggio della stabilità di una procedura analitica sono le **carte di controllo**.

Le carte di controllo sono rappresentazioni grafiche che permettono di valutare se il processo in esame è nello stato di controllo statistico. Mediante il loro uso l'operatore del laboratorio chimico può decidere l'accettabilità dei risultati analitici ottenuti in ogni corsa analitica

Esistono diversi tipi di carte di controllo. Le più comuni sono la **carta-x** e la **carta delle medie**, la **carta del range**, la **carta delle differenze**, la **carta cusum** e la **carta-j**.

Le carte x e sono note anche come **carte di Shewhart**.

In generale, la costruzione di una carta di controllo richiede la disponibilità di uno o più **Materiali di Controllo, MC**.

Questi possono essere bianchi, campioni reali o reali fortificati, campioni sintetici, campioni standard o materiali di riferimento. In generale, la composizione complessiva ed il livello di concentrazione dell'analita nel materiale di controllo usato per costruire una carta di controllo devono riflettere adeguatamente la natura chimica dei campioni reali da analizzare.

Nel caso più semplice, la carta di controllo viene preparata analizzando un numero adeguato di volte lo stesso materiale di controllo. Il numero minimo necessario di misure va da $n = 20$ a $n = 50$.

Ovviamente si deve scegliere un valore di n che permetta il miglior compromesso tra costi e tempi di analisi e affidabilità della carta.

La **media**, μ , e la **deviazione standard**, σ , della concentrazione ottenuta analizzando il MC sono usate per predisporre la carta di controllo tracciandovi opportuni **limiti di attenzione** e **limiti di azione**.

I MC sono poi inseriti, in ordine casuale, tra i campioni da analizzare in ogni corsa, e analizzati insieme ai campioni stessi.

CORSA N. 1

campione 1₁
campione 2₁
...
CS
...
campione N₁

CORSA N. 2

CS
campione 1₂
campione 2₂
...
campione N₂

CORSA N. 3

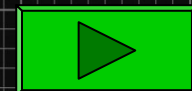
campione 1₃
...
CS
...
campione N₃

Il risultato delle analisi dei MC deve essere immediatamente riportato sulla carta di controllo, e la sua accettabilità deve essere valutata in base ad opportune regole di controllo (per es. le regole di **Westgard**).

Se il risultato dell'analisi del MC **non può essere accettato**, tutti i risultati relativi ai campioni reali analizzati nell'ambito della stessa corsa devono essere considerati **potenzialmente errati**, e quindi **rifiutati**.

Questi campioni devono essere analizzati nuovamente dopo aver identificato ed eliminato le cause che hanno determinato il rifiuto del risultato del MC, e quindi dopo aver riportato il sistema analitico nello stato di controllo statistico.

Dopo aver eseguito 10 - 20 corse sui materiali in esame, conviene ricalcolare parametri e limiti di controllo considerando i nuovi risultati relativi al MC insieme a quelli ottenuti nel corso della preparazione della carta.



ALCUNI RIFERIMENTI UTILI

1. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, 1st Internet Version, (1998), EURACHEM Secretariat, Teddington, UK
→ <http://www.eurachem.org/>
2. *ISO/IEC Guide 98-3:2008. Uncertainty in Measurement – Part 3: Guide to the expression of uncertainty in measurement*, ISO, Geneva, CH, (1993)
3. J.C. Miller, J.N. Miller, *Statistics and chemometrics fo Analytical Chemistry*, 5th Edn., Pearson Education Ltd, Harlow, UK (2005)
4. W. Funk, V. Damman, G. Donnevert, *Quality Assurance in Analytical Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, D (2007)
5. D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, S.N. Deming, Y. Michotte, L. Kaufman, *Chemometrics: a textbook*, 1st Edition, Elsevier, (1988)
6. *Quantifying uncertainty in analytical measurement*, 2^a Edizione, S.L.R. Ellison, M. Rosslein, A. Williams Editori, 2nd edition, (2000), EURACHEM Secretariat, Teddington, UK
→ <http://www.eurachem.org/>
7. R.L. Anderson, *Practical Statistics for Analytical Chemists*, Van Nostrand Reinhold, New York, USA (1987)
8. E. Desimoni, B. Brunetti, *Assicurazione di qualità nel laboratorio chimico. Validazione dei metodi di analisi*, CLUEB, Bologna, I (2003) (221 diapositive e 92 pp)
9. E. Desimoni, B. Brunetti, *L'elaborazione dei dati nel laboratorio di analisi chimiche*, CLUEB, Bologna, I (2010) (248 pp).

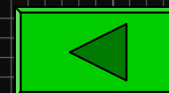
FINE

Tecnica analitica/Analytical technique: insieme dei principi teorici e degli accorgimenti sperimentali che permettono di utilizzare un fenomeno scientifico fondamentale al fine di ottenere informazioni sulla composizione di un certo campione.

Metodo analitico/Analytical method: applicazione di una tecnica analitica per risolvere un problema analitico specifico.

Procedura/Procedure: Insieme delle istruzioni di base necessarie per utilizzare un metodo analitico. I metodi standard sono in realtà procedure standardizzate: nell'ipotesi che l'utilizzatore disponga di una cultura specifica nel campo in cui deve operare, la procedura si limita a stabilire la successione degli stadi operativi principali.

Protocollo/Protocol: insieme delle istruzioni e direttive dettagliate da seguire rigidamente affinché il risultato possa essere accettato per fini particolari. È il caso delle analisi da eseguire nell'ambito di controversie legali, o della verifica della rispondenza d'un certo campione ai parametri di qualità fissati dalla legislazione vigente.



Regole di Westgard:

1_{2s}: regola di attenzione che implica un attento esame dei dati quando una misura di controllo cade fuori dell'intervallo $\pm 2s$.

1_{3s}: regola di azione che impone il rifiuto della serie quando una misura di controllo cade fuori dell'intervallo $\pm 3s$.

2_{2s}: regola di azione che impone il rifiuto della serie quando due misure di controllo successive cadono al di fuori dello stesso limite, $-2s$ oppure $+2s$;

R_{4s}: regola di azione che impone il rifiuto della serie quando la differenza tra due misure di controllo successive supera il valore di $4s$;

4_{1s}: regola di azione che impone il rifiuto della serie quando quattro misure di controllo successive cadono fuori dello stesso limite, $-1s$ oppure $+1s$;

10x_m: regola di azione che impone il rifiuto della serie quando dieci misure di controllo successive cadono dalla stessa parte del valore medio

