

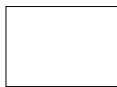
# **ASSICURAZIONE DI QUALITÀ E VALIDAZIONE DEI METODI ANALITICI**

Appunti tratti da

“ASSICURAZIONE DI QUALITÀ NEL  
LABORATORIO CHIMICO:  
VALIDAZIONE DEI METODI DI  
ANALISI”

di E. DESIMONI, B. BRUNETTI

Ed. CLUEB 2003



- ⇒ 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.

L'importanza della validazione dei metodi d'analisi è sancita dalla norma  
**UNI CEI EN ISO/IEC 17025.**

*(dalla 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. Il laboratorio deve registrare i risultati ottenuti, le procedure utilizzate per la validazione, così pure una dichiarazione circa l'idoneità del metodo per l'utilizzo previsto.

...

(dalla UNI CEI EN ISO/IEC 17025)

**Nota 1:** La validazione può comprendere procedure per il campionamento, la manipolazione e il trasporto.

**Nota 2:** Le tecniche utilizzate per la determinazione della prestazione di un metodo dovrebbero essere una, o una combinazione delle seguenti:

- taratura, utilizzando campioni o materiali di riferimento;
- confronto dei risultati ottenuti con altri metodi;
- confronti interlaboratorio;
- valutazione sistematica dei fattori che influenzano il risultato;
- stima dell'incertezza dei risultati sulla base della conoscenza scientifica dei principi teorici del metodo e dell'esperienza pratica.

**Nota 3:** Quando sono effettuati dei cambiamenti nei metodi non normalizzati validati, l'influenza di tali cambiamenti dovrebbe essere documentata, e se necessario, dovrebbe essere eseguita una nuova validazione.

(dalla 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.

**Nota 1:** *La validazione comprende la specifica dei requisiti, la determinazione delle caratteristiche dei metodi, un controllo che i requisiti possano essere soddisfatti utilizzando il metodo e una dichiarazione relativa alla validità.*

**Nota 2:** *In funzione dello sviluppo del metodo, dovrebbero essere eseguiti riesami regolari per verificare che le esigenze del cliente continuino ad essere soddisfatte. Qualsiasi variazione dei requisiti che richieda modifiche al piano di sviluppo dovrebbe essere approvata e autorizzata.*

**Nota 3:** *La validazione è sempre un bilancio fra i costi, i rischi e le possibilità tecniche. Vi sono molti casi in cui il campo e l'incertezza dei valori (per esempio l'accuratezza, i limiti di rilevazione, la selettività, la linearità, la ripetibilità e la riproducibilità, la robustezza e/o la sensibilità alle interferenze) possono essere solo forniti in modo semplificato a causa di mancanza di informazioni.*

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.

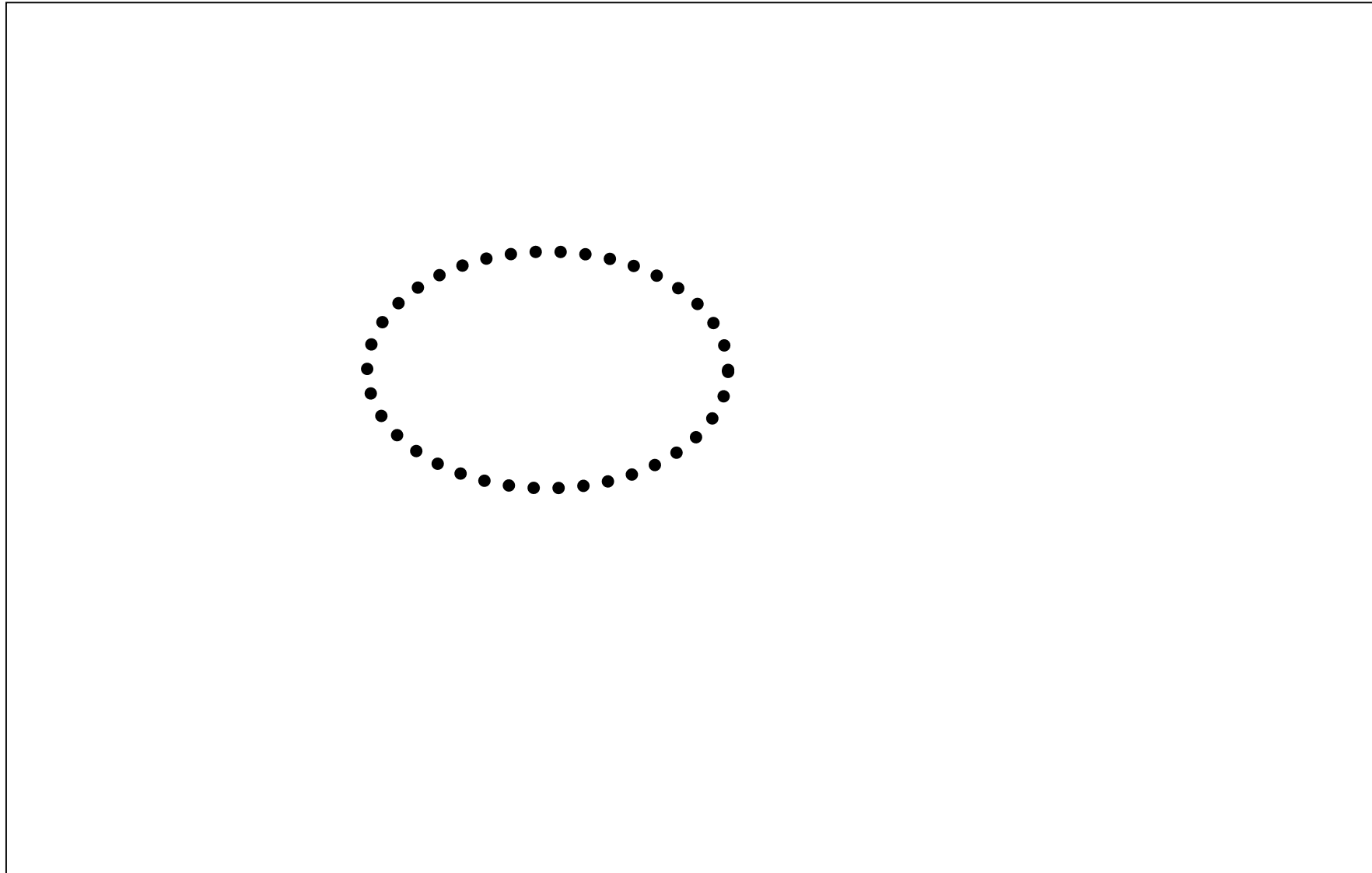
Il laboratorio deve considerare che la validazione di un nuovo metodo analitico riguarda l'intera procedura analitica totale:

- Definizione generale del problema (C)
- Definizione analitica del problema (C & A)
- Scelta di metodo, tecnica, procedura, protocollo (A)
- Campionamento (C? A?)
- (Pre)trattamento del campione (A)
- Analisi (A)
- Valutazione dei dati (A)
- Conclusioni (A)
- Presentazione dei risultati (C & A)

C: committente

A: chimico analitico

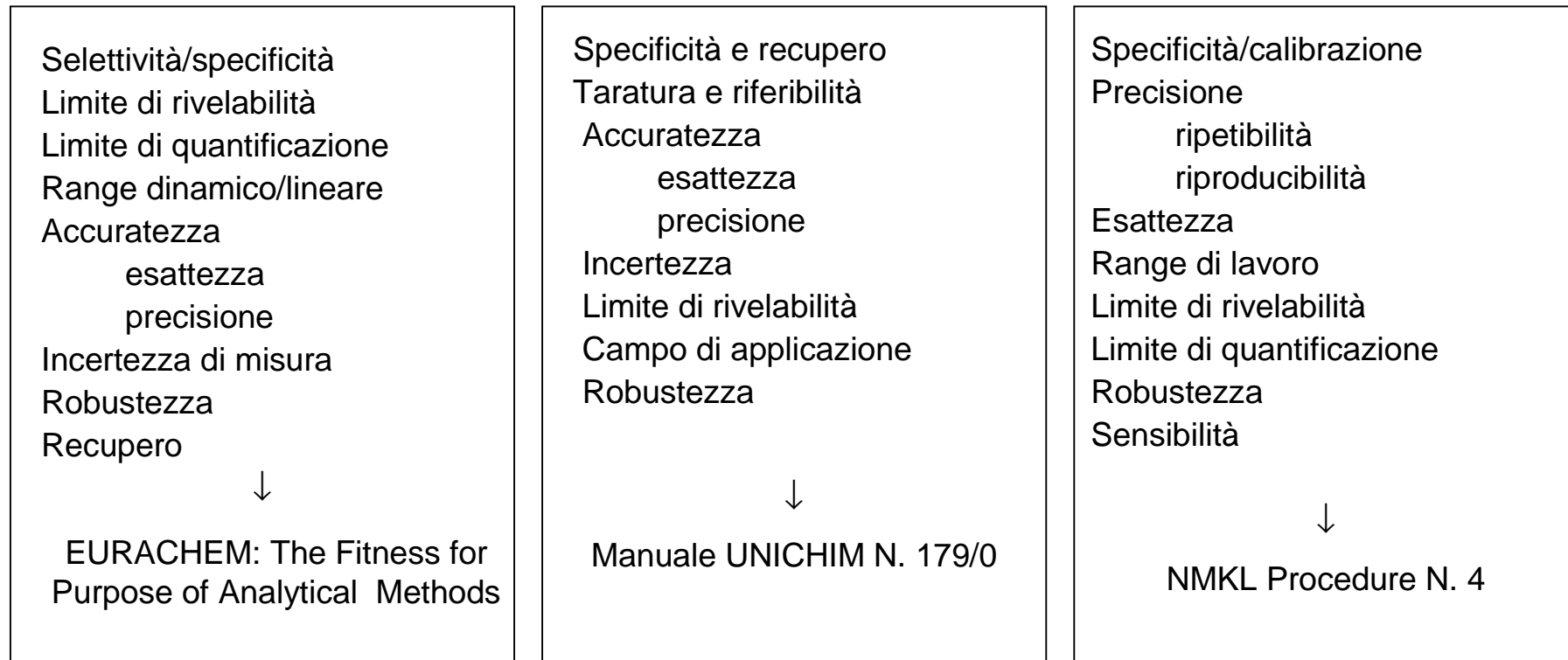
## Selezione, sviluppo e validazione del metodo analitico



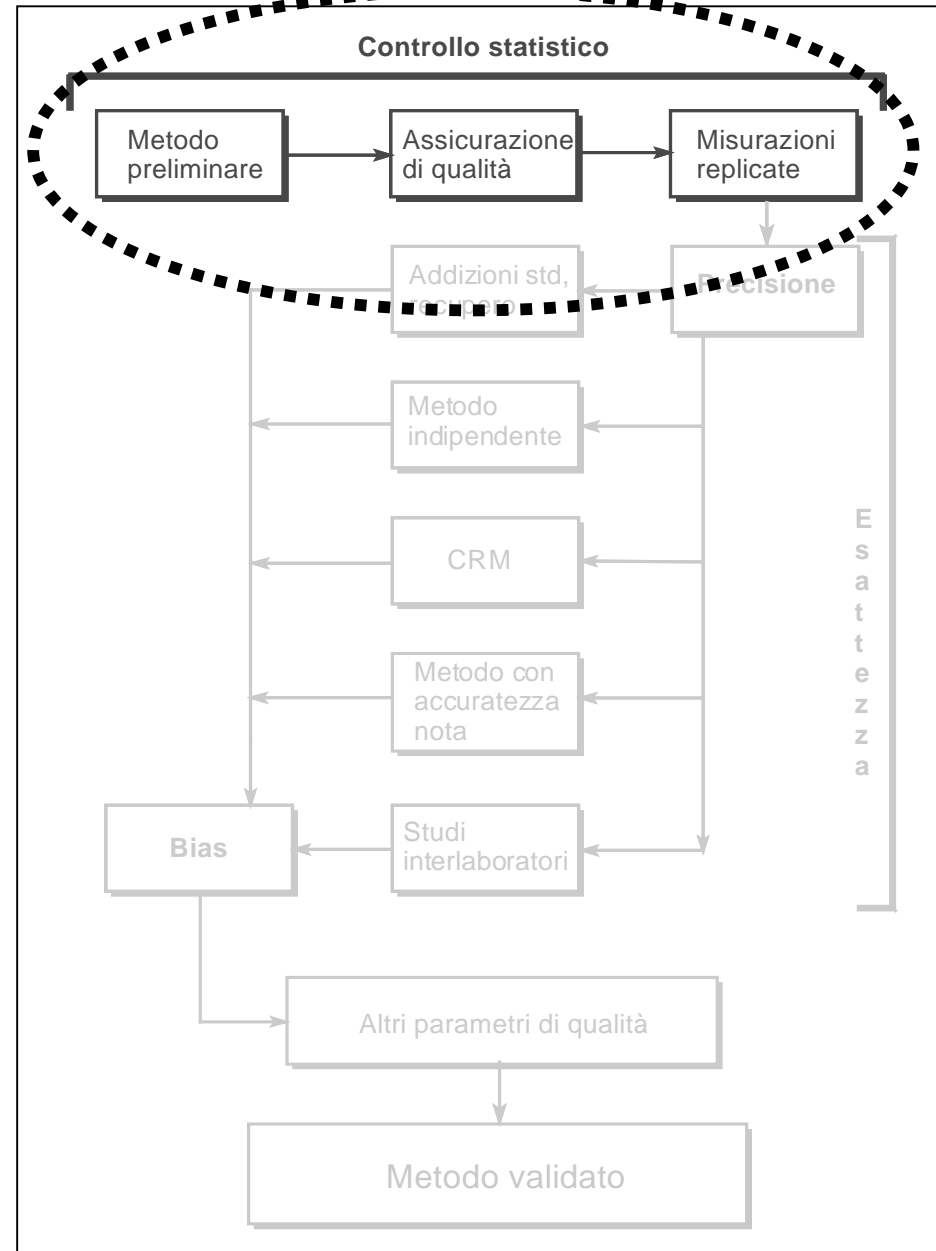
Punti focali nell'impostazione della validazione sono:

- La valutazione preliminare dei metodi presumibilmente adatti a risolvere il problema specifico in esame.
- La definizione quantitativa dei parametri di qualità da valutare.
- La scelta di un metodo.
- La valutazione del metodo selezionato alla luce dei valori prefissati dei parametri di qualità.
- La scelta di metodi alternativi qualora quello prescelto si dimostri non adatto.

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



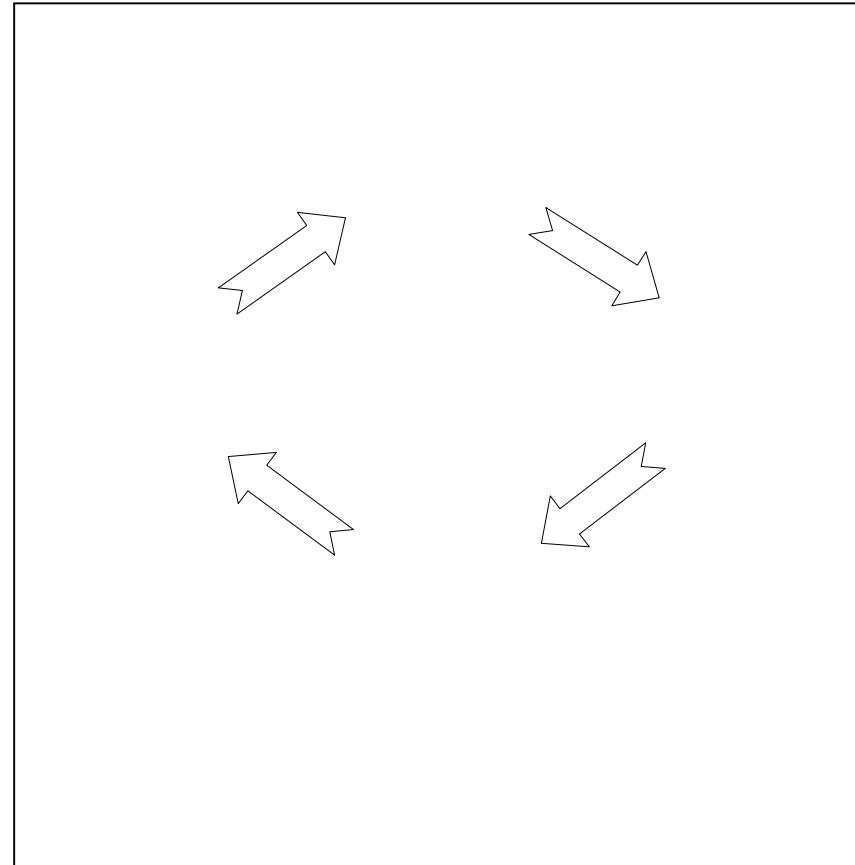
Lo schema a fianco evidenzia la necessità di pervenire allo stato di controllo statistico prima di procedere alla validazione del metodo.



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.



Le procedure di validazione dipendono dal tipo di analisi da eseguire.

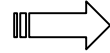
*Parametri di interesse nelle  
procedure di validazione  
di metodi di:*

	<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	-	✓

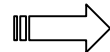
## Estensione della validazione:

### ***Si deve usare un metodo di analisi:***

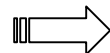
i parametri di qualità del quale sono stati valutati nell'ambito di una prova di confronto interlaboratorio (interlaboratory method performance study, collaborative trial).



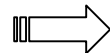
i parametri di qualità del quale sono stati valutati nell'ambito di una prova di confronto interlaboratorio ma su di una matrice differente.



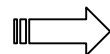
ben sperimentato (d'uso generalizzato) i parametri di qualità del quale non sono però stati valutati nell'ambito di una prova di confronto interlaboratorio.



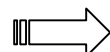
descritto in letteratura ma del quale sono stati valutati i principali parametri di qualità.



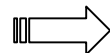
descritto in letteratura ma del quale non sono noti i parametri di qualità.



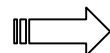
empirico.



messo a punto all'interno del LP&T.



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



### ***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.

eseguire una validazione completa.

eseguire una validazione completa.

eseguire una validazione completa.

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

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 (Standard Operating Procedure) 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

La SOP preliminare è il documento guida della validazione e deve contenere le necessarie informazioni sull'area d'applicabilità del metodo e sugli interferenti più noti, e le istruzioni da seguire lungo tutte le tappe della validazione.

***Procedura operativa standard per la determinazione del ... in campioni di ...***

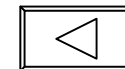
- Scopo (analita, matrice, concentrazione, tecnica, metodo, dimensione del campione, ecc.)
- Avvertimenti e precauzioni
- Definizioni
- Principio della misurazione (meglio se come flow-chart)
- Reagenti e materiali (inclusi tossicologia, purezza, conservazione, etichettatura, ecc.)
- Strumentazione (tipo e prestazioni minime tipiche, condizioni ambientali, ecc.)
- Campionamento e campioni
- Procedure per la valutazione dei parametri di qualità
- Formato dei risultati (inclusi arrotondamenti, incertezza, livello di fiducia)
- .....

Gli strumenti tecnici della validazione:

- bianco: può essere il bianco dei reagenti o il bianco del campione
- campioni reali: verifica delle interferenze tipiche del lavoro di routine
- materiali fortificati: utili per il Idr, il recupero, ecc.
- materiali contenenti l'analita nativo
- materiali caratterizzati indipendentemente
- materiali standard usati per calibrazioni
- materiali di riferimento (meglio se certificati)
- statistica

Schema esemplificativo 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**



## SELETTIVITÀ

La **selettività** è la capacità di un metodo analitico di non risentire della 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.

**ESEMPIO N. 1** - Determinazione del selenio nei foraggi mediante riduzione a  $\text{Se}^{2-}$ , acidificazione a  $\text{H}_2\text{Se}$  e determinazione mediante voltammetria di ridissoluzione catodica (CSV). Si sospetta che  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  possano interferire mediante formazione di seleniuri metallici insolubili.

Allo scopo di verificare tale interferenza, il selenio viene analizzato con il metodo in esame e mediante HG-AAS (sistema di campionamento mediante idruri volatili, lampada EDL) in un campione di foraggio contenente i vari interferenti a livello di ng/g. I risultati (ng/g), relativi all'analisi di aliquote indipendenti dello stesso mineralizzato, sono i seguenti:

**CSV:** 0,485; 0,491; 0,480

**HG-AAS:** 0,498; 0,494; 0,507

Verificare se la concentrazione di selenio ottenuta mediante CSV è significativamente inferiore a quella ottenuta mediante HG-AAS ( $P = 95\%$ ).

1) Verifica dell'omogeneità della varianza:

CSV:  $C_1=0,4853$  ng/g;  $s_1 = 5,51 \cdot 10^{-3}$  ng/g;  $v_1 = 2$

HG-AAS:  $C_2=0,4997$  ng/g;  $s_2 = 6,66 \cdot 10^{-3}$  ng/g;  $v_2 = 2$

2) Test-F (a 2 code):  $F_{\text{exp}} = (s_2/s_1)^2 = 1,4615$   $F_{(1-\alpha/2=0,95;2,2)} = 39,000$

Le varianze sono omogenee.

3) Deviazione standard cumulata:

$$s_{\text{pool}} = \sqrt{\frac{(3-1) \cdot (6,658 \cdot 10^{-3})^2 + (3-1) \cdot (5,508 \cdot 10^{-3})^2}{3+3-2}} = 6,110 \cdot 10^{-3}$$

4) Calcolo del valore sperimentale di t :

$$t_{\text{exp}} = \frac{|0,4853 - 0,4987|}{6,110 \cdot 10^{-3} \sqrt{\frac{1}{3} + \frac{1}{3}}} = 2,873$$

Dato che  $t_{\text{exp}}$  è maggiore di  $t_{(1-\alpha=0,95,v=4)} = 2,132$ , valore critico ad una coda per un numero di gradi di libertà uguale a  $(n_1+n_2-2) = 4$ , la concentrazione di selenio ottenuta mediante CSV è significativamente inferiore a quella ottenuta mediante HG-AAS: ad un livello di fiducia del 95% non si può escludere che il metodo CSV sia affetto da interferenze negative da parte di  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ .

**ESEMPIO N. 2** – Il problema è lo stesso dell'Esempio N. 1, ovvero la determinazione del selenio nei foraggi mediante riduzione a  $\text{Se}^{2-}$ , acidificazione a  $\text{H}_2\text{Se}$  e determinazione mediante voltammetria di ridissoluzione catodica (CSV). Allo scopo di verificare la possibile interferenza del piombo, il selenio viene analizzato con il metodo in esame e mediante HG-AAS negli stessi quattro campioni di foraggio contaminati da piombo. I risultati sono i seguenti:

**CSV:**

$$C_1 = 0,346$$

$$C_2 = 0,528$$

$$C_3 = 0,203$$

$$C_4 = 1,123$$

**HG-AAS:**

$$C_1 = 0,374$$

$$C_2 = 0,550$$

$$C_3 = 0,219$$

$$C_4 = 1,180$$

Verificare se il risultato ottenuto mediante CSV è significativamente diverso da quello HG-AAS ( $P = 95\%$ ).

1) Calcolo della media delle differenze e stima della deviazione standard ad esse relativa:

$$d_1 = 0.346 - 0.374 = -0.028$$

$$d_m = -0,0307 \text{ ng/g}$$

$$d_2 = 0.528 - 0.550 = -0.022$$

$$d_3 = 0.203 - 0.219 = -0.016$$

$$s_d = 0,0182 \text{ ng/g}$$

$$d_4 = 1.123 - 1,180 = -0.057$$

2) Test-t a coppie:

Il numero di gradi libertà è  
 $n-1 = 3$ .

$$t_{\text{exp}} = \left| \frac{-0.037 \cdot \sqrt{4}}{0,0182} \right| = 3,384$$

Dato che il valore calcolato di  $t_{\text{exp}}$  è maggiore di quello critico,  $t_{(1-\alpha/2=0,95, v=3)} = 3,182$ , la differenza tra i risultati ottenuti con i due metodi è significativa. Ad un livello di fiducia del 95% non si può escludere che il piombo presente nel campione interferisca nella misurazione.

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.

**ESEMPIO N. 3** - Determinazione dello ione solfuro mediante cromatografia ionica con rivelazione elettrochimica ad un elettrodo di carbone vetroso modificato chimicamente con palladio. Il limite di rivelabilità del metodo in esame è  $0,3 \mu\text{mol/L}$ , ma si sospettano interferenze da parte di numerosi analiti, in particolare da parte del glucosio.

Allo scopo di verificare l'ipotesi, aliquote indipendenti di un campione sono analizzate prima e dopo fortificazione con  $3,5 \text{ mmol/L}$  di glucosio.

Campione tal quale ( $\mu\text{mol/L}$ ): 23,4; 22,8; 23,3; 23,1

Campione fortificato ( $\mu\text{mol/L}$ ): 25,7; 23,3; 24,4; 23,6

Verificare la significatività dell'interferenza (2 code\*,  $P = 95\%$ ) mediante confronto dei risultati ottenuti analizzando i campioni tal-quali e dopo fortificazione.

\* Se le informazioni a disposizioni sono tali da ipotizzare interferenze solo positive (o solo negative) il test può esser eseguito ad una coda.

**In questo caso le misurazioni sono indipendenti.**

1) Verifica dell'omogeneità della varianza:

Tal quale:  $C_1=23,15 \mu\text{mol/L}$  ;  $s_1 = 0,2646 \mu\text{mol/L}$  ;  $v_1 = 3$

Fortificato:  $C_2=24,25 \mu\text{mol/L}$  ;  $s_2 = 1,0724 \mu\text{mol/L}$  ;  $v_2 = 3$

2) Test-F (a 2 code):  $F_{\text{exp}} = (s_2/s_1)^2 = 16,429$       $F_{(1-\alpha/2=0,95;3,3)} = 15,439$

Le varianze non sono omogenee.

3) Calcolo di  $t_{\text{exp}}$  :

$$t_{\text{exp}} = \frac{|23,15 - 24,25|}{\sqrt{\frac{(0,2646)^2}{4} + \frac{(1,0724)^2}{4}}} = 1,992$$

4) Calcolo dei  
gradi di libertà:

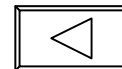
$$v = \frac{\left(\frac{(0,2646)^2}{4} + \frac{(1,0724)^2}{4}\right)^2}{\frac{\left(\frac{(0,2646)^2}{4}\right)^2}{5} + \frac{\left(\frac{(1,0724)^2}{4}\right)^2}{5}} - 2 = 3,6064 = 4$$



Dato che  $t_{\text{exp}} = 1,992$ , è minore di  $t_{(1-\alpha/2=0,95, v=4)} = 2,776$ , valore critico a due code per 4 gradi di libertà, al livello di fiducia prescelto si può escludere che la concentrazione del solfuro misurata in presenza di 3,5 mmol/L di glucosio sia significativamente differente da quella misurata in assenza dell'interferente.

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\*.

\* Si tenga presente che, durante il lavoro di routine, è necessario verificare che tutti i parametri di qualità valutati nel corso della validazione non subiscano variazioni significative. I metodi statistici utili per questo tipo di controlli sono presentati nel capitolo sulle carte di controllo.



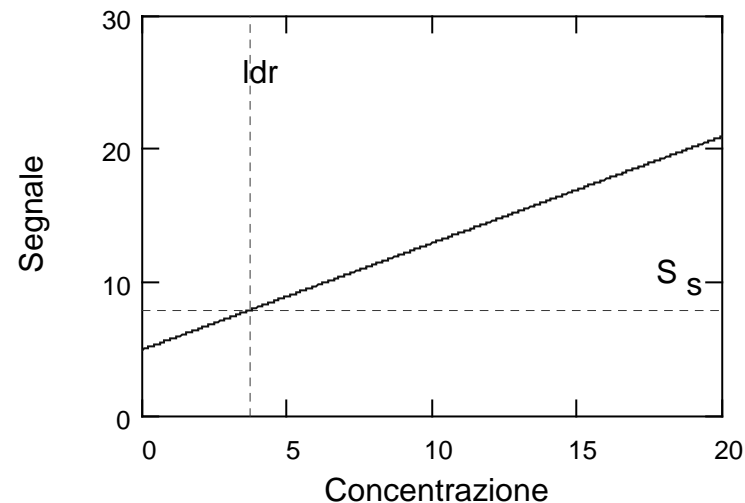
## LIMITE DI RIVELABILITÀ E DI QUANTIFICAZIONE

Il **limite di rivelabilità**, o minima quantità rivelabile, **ldr**, è la concentrazione di analita che produce un segnale significativamente diverso da quello del bianco, ovvero la concentrazione corrispondente al minimo segnale significativo, **S<sub>s</sub>**.

**S<sub>s</sub>** è un segnale *vicino* a quello del *bianco* (soluzione in cui l'analita è *virtualmente assente*) ma da esso *significativamente* differente, e quindi assegnabile all'analita sulla base di un criterio specifico.

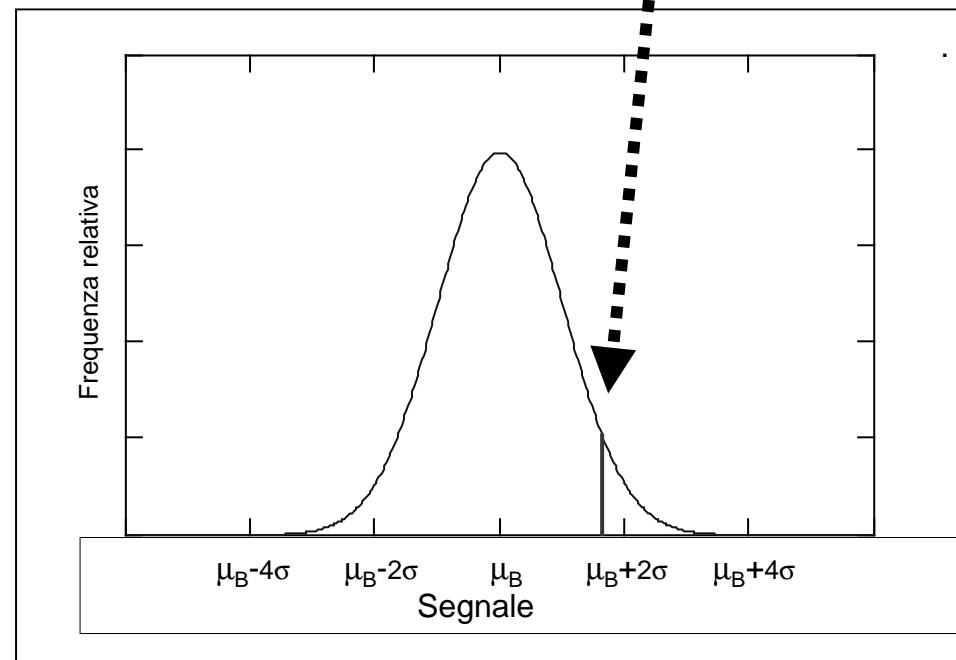
La definizione del ldr discende dal criterio usato per accertarsi che il segnale sia *significativamente* diverso da quello del bianco.

Il **ldr** espresso in unità di concentrazione si ricava da **S<sub>s</sub>** tramite la curva di calibrazione.



In teoria, per valutare il Idr è quindi necessario eseguire un numero adeguato di misurazioni replicate del bianco, in modo da stimare la distribuzione del segnale ad esso relativo (per ipotesi affetto da rumore Gaussiano). È quindi possibile individuare il minimo segnale significativo,  $S_s$ .

Avendo scelto come limite decisionale un segnale a nostro giudizio maggiore di quello medio del bianco



ammettiamo di poter individuare la presenza dell'analita ogni volta che il segnale del campione in esame risulta maggiore del segnale prescelto.

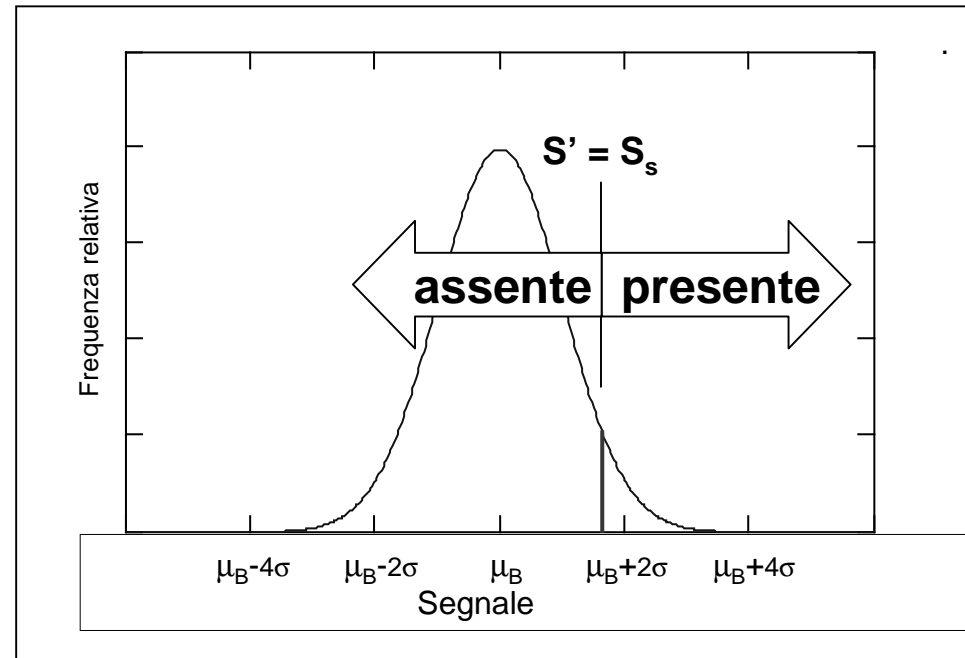
La valutazione del Idr richiede il confronto di segnali e quindi implica necessariamente la considerazione degli errori falsi positivi e falsi negativi.

Infatti, nel decidere se il segnale della soluzione in esame,  $S_x$ , è maggiore di quello del bianco,  $S_B$

- è possibile affermare la presenza dell'analita quando esso è assente: si commette allora un errore *falso positivo* (*errore di prima specie* o *di primo tipo*);
- è possibile affermare che l'analita è assente quando in effetti è presente: si commette allora un errore *falso negativo* (*errore di seconda specie* o *di secondo tipo*).

Un indicatore utile per decidere la **presenza/assenza** dell'analita è il segnale:

$$S' = \mu_B + k \cdot \sigma_B$$



Se  $S'$ , detto (segnale) **limite di decisione**, fosse scelto come minimo segnale significativo,  $S_s$ , e  $k$  fosse scelto uguale a  $1,645 \cdot \sigma_B$ , si correrebbe il rischio di decidere la presenza dell'analita quando invece esso è assente solo nel 5% dei casi. La probabilità,  $\alpha$ , di commettere un errore falso positivo sarebbe uguale al 5%. Spesso questo errore è considerato eccessivo.

Una prima definizione utile di  $l_{dr}$  deriva dalla scelta di  $k = 3$ . In questo caso la probabilità di commettere un errore falso positivo si riduce allo 0,135 %.

$$S_s = S' = \mu_B + 3 \cdot \sigma_B$$

Avendo così definito il minimo segnale significativo, si può risalire al limite di rivelabilità dal diagramma di calibrazione. Data la relazione funzionale tra segnale e concentrazione

$$S = b \cdot C + a$$

e se la pendenza,  $b$ , e l'intercetta,  $a$ , sono note con sufficiente accuratezza, il limite di rivelabilità, corrisponde al valore di  $C$  quando al posto di  $S$  viene sostituito il minimo segnale significativo

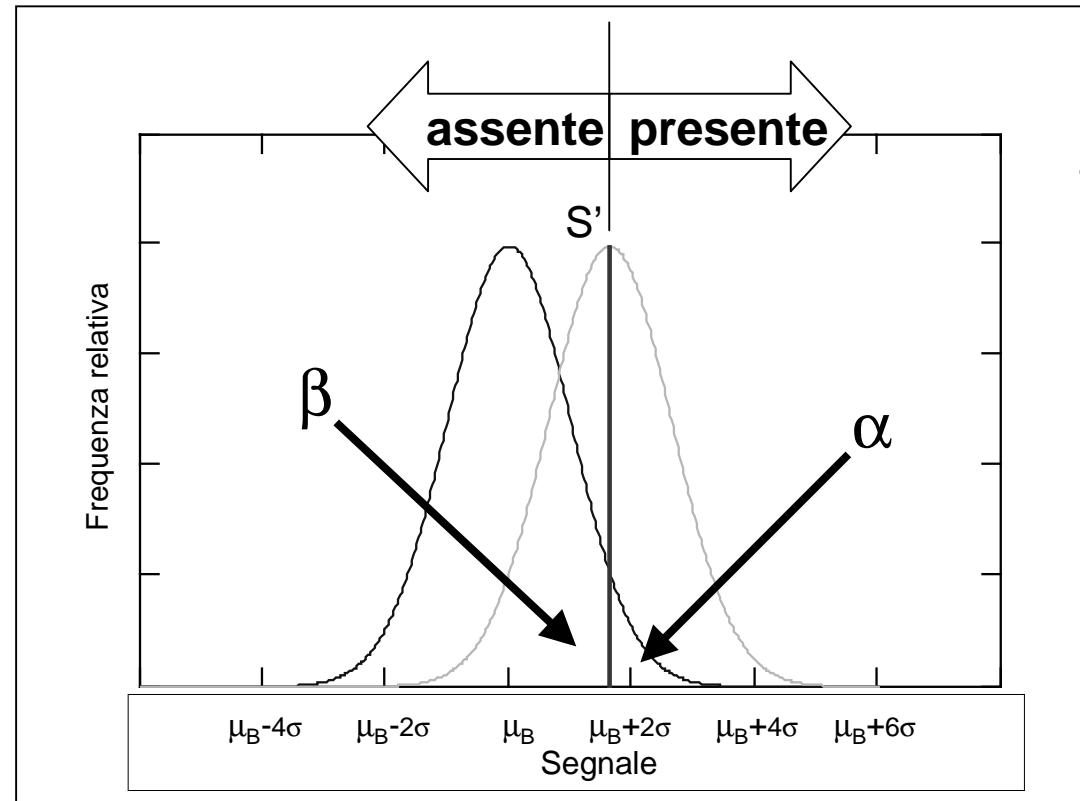
$$S_s = S' = \mu_B + 3 \cdot \sigma_B = b \cdot l_{dr} + a$$

Ammessò che l'intercetta,  $a$ , non sia significativamente diversa dal segnale medio del bianco,  $\mu_B$ , si ottiene quindi:

$$l_{dr} = \frac{3 \cdot \sigma_B}{b}$$

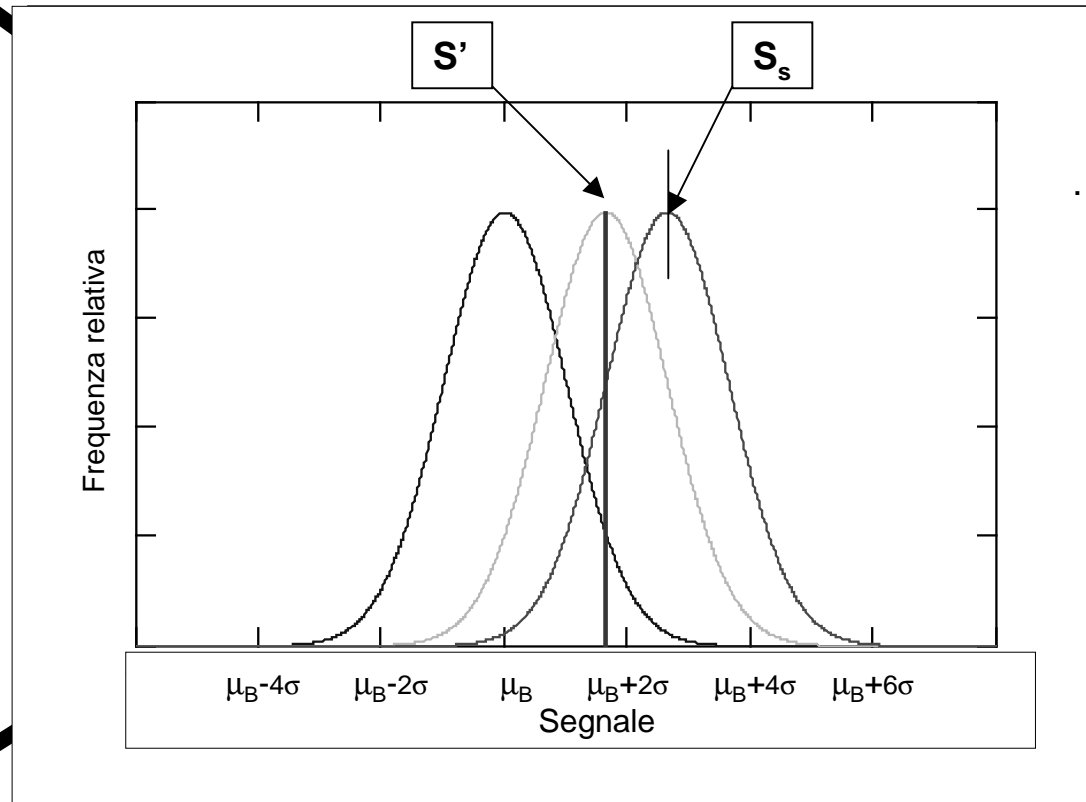
Questa definizione di Idr, forse la più usata, non è adeguata.

Infatti, nel caso di un campione contenente una concentrazione di analita tale da corrispondere proprio ad un segnale medio  $\mu_x = S'$  (Gaussiana verde), l'uso di  $S'$  come *indicatore decisionale* implicherebbe la probabilità  $\beta = 50\%$  di commettere un errore di seconda specie:



nel 50% dei casi (area sottesa alla Gaussiana verde, a sinistra del tratto rosso verticale) si potrebbe concludere che il campione non contenga l'analita.

Quindi, è necessario scegliere come concentrazione rappresentante il ldr una concentrazione alla quale corrisponde una distribuzione del segnale ancora più spostata a destra rispetto a quella verde considerata nella figura già vista in precedenza.



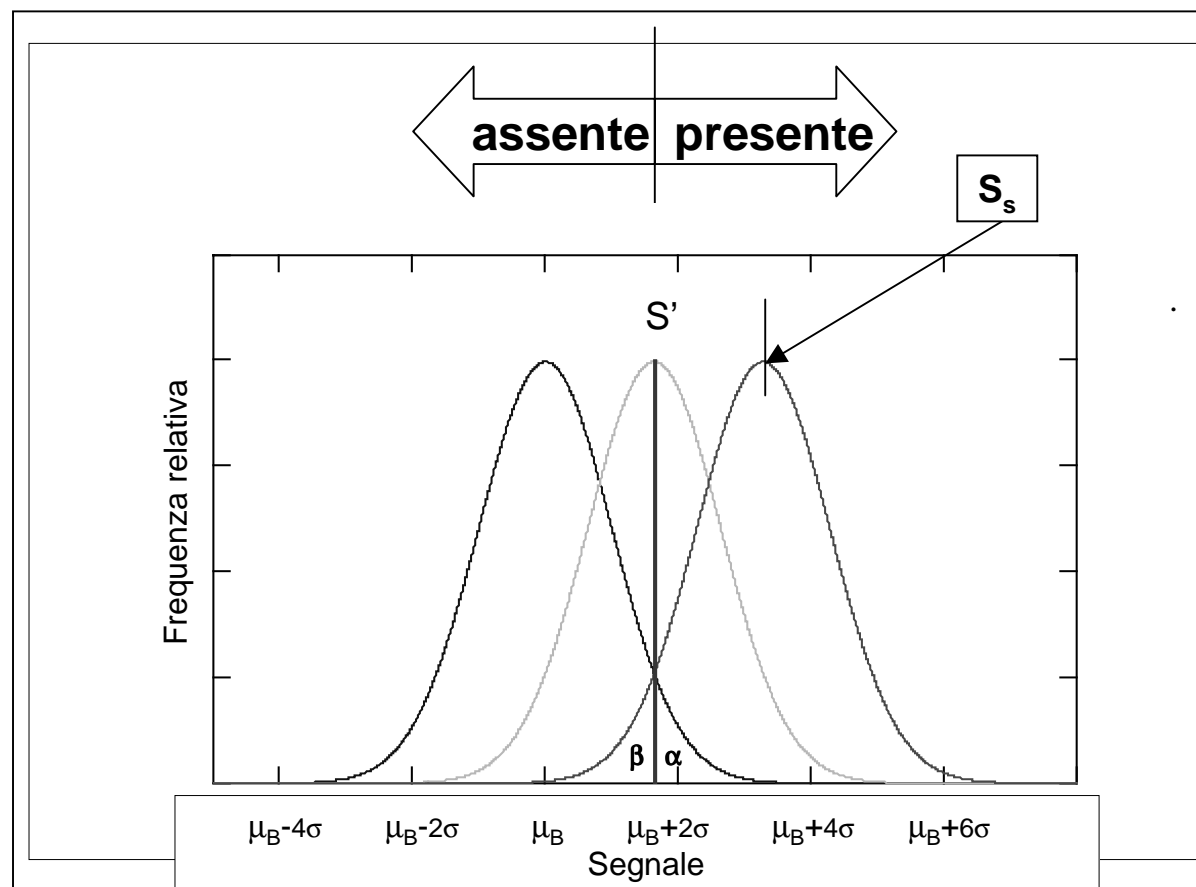
Se la deviazione standard del segnale non cambia nell'intervallo di concentrazione considerato

$$S_s = \mu_B + k \cdot \sigma_B + j \cdot \sigma_B = S' + j \cdot \sigma_B$$

Nel caso rappresentato nella figura a destra,  $k > j$ , quindi  $\beta > \alpha$ .

Se  $k$  è scelto uguale a  $j$ , ed il ldr è definito per  $\alpha = \beta = 0,05$ , si ottiene quindi

$$S_s = \mu_B + 2 \cdot k \cdot \sigma_B = \mu_B + 2 \cdot 1,645 \cdot \sigma_B = \mu_B + 3,29 \cdot \sigma_B = \mu_B + 3,3 \cdot \sigma_B$$



Avendo così ridefinito il minimo segnale significativo, si può risalire al limite di rivelabilità dal diagramma di calibrazione. Data la relazione funzionale tra segnale e concentrazione

$$S = b \cdot C + a$$

e sempre se **a** e **b** sono noti con sufficiente accuratezza, il limite di rivelabilità, corrisponde sempre al valore di C quando al posto di S viene sostituito il minimo segnale significativo

$$S_s = \mu_B + 3,3 \cdot \sigma_B = b \cdot l_{dr} + a$$

Nell'ipotesi che valgano le approssimazioni già usate in precedenza, otteniamo infine

$$l_{dr} = \frac{3,3 \cdot \sigma_B}{b}$$

Nel caso in cui pendenza e intercetta della retta di calibrazione siano affette da incertezza non trascurabile e/o il segnale medio del bianco non sia praticamente uguale all'intercetta, è possibile dimostrare\* che il ldr è più correttamente definito dalla seguente equazione

$$\text{ldr} = 2 \cdot k \cdot \frac{\sqrt{\sigma_B^2 + \sigma_a^2 + \frac{\sigma_b^2 \cdot (a - \mu_B)^2}{b^2}}}{b}$$

dove a e b sono pendenza ed intercetta della retta di calibrazione, e  $\sigma_a$  e  $\sigma_b$  le deviazioni standard corrispondenti.

Nel caso  $\mu_B$  sia praticamente uguale a zero, l'equazione può essere ridotta a

$$\text{ldr} = 2 \cdot k \cdot \frac{\sqrt{\sigma_B^2 + \sigma_a^2 + \frac{\sigma_b^2 \cdot a^2}{b^2}}}{b}$$

\* G.L. Long, J.D. Winefordner, *Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition*, Anal. Chem., 55 (1983) 713A

Se anche la deviazione standard sulla pendenza,  $\sigma_b$ , è molto piccola, l'equazione può essere ulteriormente ridotta a

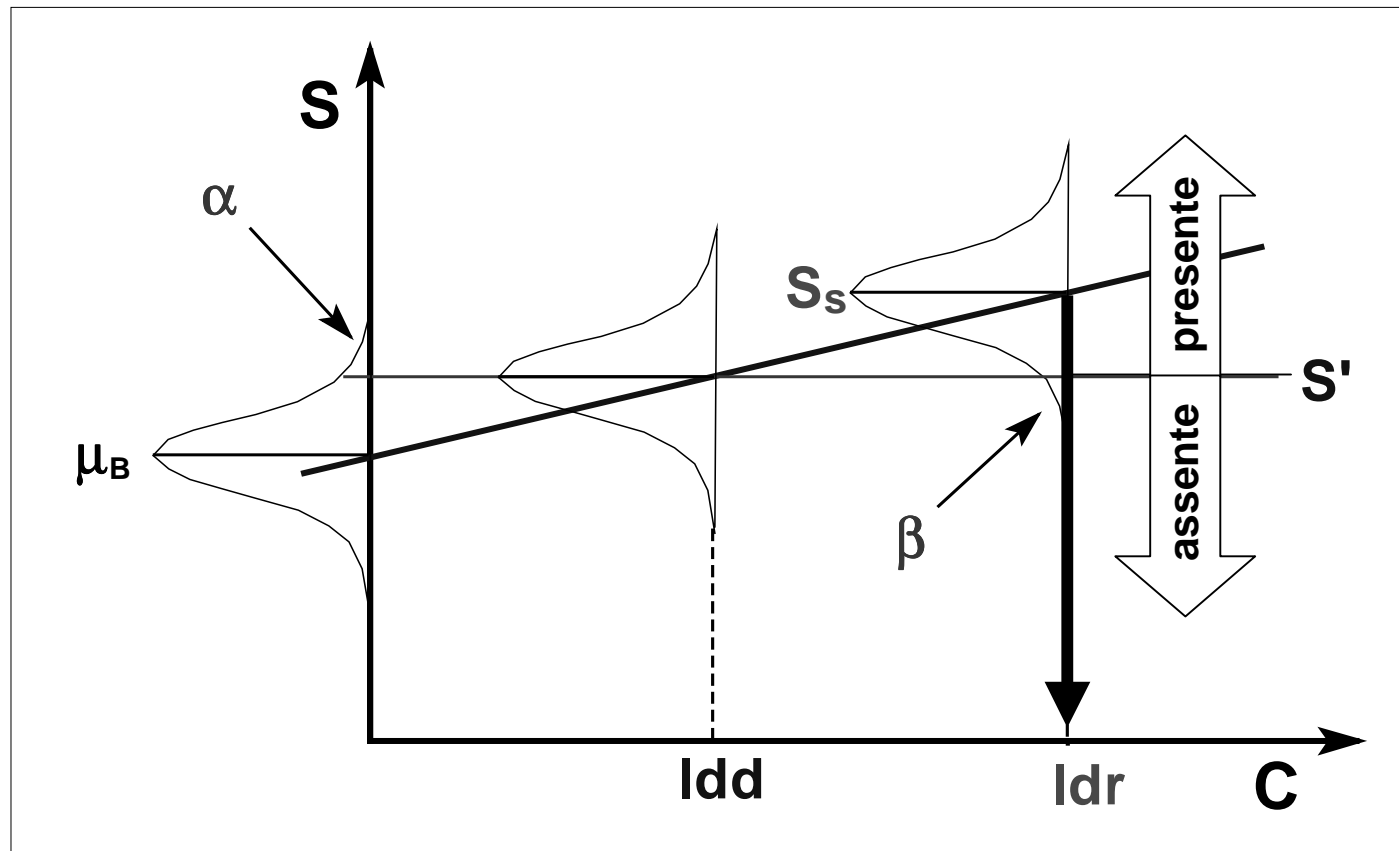
$$l_{dr} = 2 \cdot k \cdot \frac{\sqrt{\sigma_B^2 + \sigma_a^2}}{b}$$

e solo se anche la deviazione standard sull'intercetta,  $\sigma_a$ , è molto piccola si riottiene l'equazione proposta nella diapositiva 40

$$l_{dr} = \frac{2 \cdot k \cdot \sigma_B}{b} = \frac{3,3 \cdot \sigma_B}{b} \quad (\text{per } \alpha = \beta = 0,05)$$

È evidente, quindi, che il  $l_{dr}$  dovrebbe essere sempre definito usando l'equazione che più si adatta alle condizioni sperimentali reali.

La Figura sottostante illustra la relazione tra (segnale) limite di decisione,  $S'$ , e minimo segnale significativo,  $S_s$ , e le concentrazioni ad essi corrispondenti, (concentrazione) limite di decisione,  $I_{dd}$ , e limite di rivelabilità,  $I_{dr}$ .



Quindi la nuova definizione, nella quale il coefficiente moltiplicativo della deviazione standard del bianco è 3,3 invece di 3, è molto differente dalla precedente, che non tiene conto degli errori falsi negativi.

$$l_{dr} = \frac{3 \cdot \sigma_B}{b}$$

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

$$l_{dr} = \frac{3,3 \cdot \sigma_B}{b}$$

A questo  $l_{dr}$  competono  
 $\alpha = \beta = 5\%$

A parità del livello di fiducia prescelto, l'uso di  $(k+j) \cdot \sigma_B$  al posto di  $k \cdot \sigma_B$  implica un peggioramento (innalzamento) del  $l_{dr}$ , ma permette di controllare le probabilità  $\alpha$  e  $\beta$  di *entrambi* gli errori. Naturalmente, anche nel secondo modello è possibile scegliere  $k \neq 1,645$ . Per esempio, se si volesse limitare sia  $\alpha$  che  $\beta$  allo 0,135%, sarebbe necessario usare  $k = 6$ .

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

$$\text{ldq} = \frac{10 \cdot \sigma_B}{b} \quad \text{oppure} \quad \text{ldq} = \frac{20 \cdot \sigma_B}{b}$$

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.

Una prima procedura per la valutazione del Idr e del Idq è dettagliata qui di seguito.

**Procedura 1 (modello basato su  $\sigma_B$ ):**

- analizzare 10 campioni indipendenti di bianco o, alternativamente, 10 campioni indipendenti di bianco fortificato con la minima concentrazione accettabile (che produce un segnale misurabile ma diverso da zero, determinata in base a prove preliminari);
- valutare la deviazione standard dei campioni analizzati;
- se non è già stata valutata (vedere il Cap. 4: Range dinamico e lineare), stimare la pendenza della curva di calibrazione analizzando almeno sei soluzioni standard (randomizzare);
- calcolare il Idr e, se richiesto, il Idq.

**ESEMPIO N. 4** - Determinazione del limite di rivelabilità per la quantificazione del nitrito nelle acque mediante spettrofotometria VIS (metodo di Griess). Allo scopo viene misurata l'assorbanza a 534 nm di 10 campioni indipendenti del bianco.

I valori di assorbanza sono:

$A_1 = 0,005$ ;  $A_2 = 0,004$ ;  $A_3 = 0,006$ ;  $A_4 = 0,011$ ;  $A_5 = 0,008$ ;  
 $A_6 = 0,007$ ;  $A_7 = 0,013$ ;  $A_8 = 0,012$ ;  $A_9 = 0,005$ ;  $A_{10} = 0,007$ ;

Pendenza ed intercetta della retta di calibrazione, ottenuta mediante regressione ordinaria lineare ai minimi quadrati dei risultati dell'analisi di 11 soluzioni standard (intervallo di concentrazione:  $7,7 \cdot 10^{-7}$  M –  $5,8 \cdot 10^{-5}$  M), sono risultate uguali a  $4,7923 \cdot 10^4$  L/mol e 0,0625. Le corrispondenti deviazioni standard sono risultate uguali a 1634 L/mol e 0,0391, rispettivamente. Valutare ldr e ldq.

1) Calcolo dell'assorbanza media del bianco

$$\bar{A} = \frac{\sum_{i=1}^{10} A_i}{10} = 7,800 \cdot 10^{-3}$$

e della deviazione standard del bianco

$$s_B = \sigma_B = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{10} (A_i - \bar{A})^2}{9}} = 3,155 \cdot 10^{-3}$$

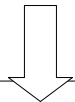
2) Calcolo di Idr (eq. 5 del testo a lato;  $\alpha = 5\%$ ;  $\beta = 5\%$ ):

$$I_{dr} = \frac{3,3 \cdot 3,155 \cdot 10^{-3}}{4,792 \cdot 10^4} = 2,17 \cdot 10^{-7} \text{ mol/L}$$

3) Calcolo di Idr (eq. 6 del testo a lato;  $\alpha = 5\%$ ,  $\beta = 5\%$ ):

$$I_{dr} = 2 \cdot \frac{1,645}{47923} \cdot \sqrt{(3,155 \cdot 10^{-3})^2 + 0,0391^2 + \frac{1634^2 \cdot (0,0625 - 7,80 \cdot 10^{-3})^2}{47923^2}} =$$

$$= 2,70 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$$



4) Calcolo di  $Idq$ :

$$Idq = \frac{10 \cdot \sigma_B}{b} = \frac{10 \cdot 3.155 \cdot 10^{-3}}{4.792 \cdot 10^4} = 6,58 \cdot 10^{-7} \text{ M}$$

Nell'esempio sopra presentato, la deviazione standard del bianco,  $s_B$ , stimata su 10 misurazioni, è stata considerata alla stregua della deviazione standard della popolazione del bianco,  $\sigma_B$ . Così pure è stato fatto per le deviazioni standard di pendenza e intercetta ( $\nu-2 = 9$ ).

La differenza tra i due  $Idr$

$$2,2 \cdot 10^{-7} \text{ M e } 2,7 \cdot 10^{-6} \text{ M}$$

deriva dal fatto che, in questo caso, pendenza e intercetta della retta di calibrazione erano affette da incertezza non trascurabile e che, inoltre, il segnale medio del bianco non è uguale all'intercetta.

Il  $Idr$  ed il  $Idq$  non dovrebbero essere espressi con più di due cifre significative.

È possibile stimare il limite di rivelabilità usando le informazioni tratte dall'analisi di regressione, quali  $s_{y/x}$  (deviazione standard residua della regressione) oppure  $s_a$  (deviazione standard dell'intercetta) al posto di  $\sigma_B$ .

**Procedura 2 (modello basato su  $s_{y/x}$  o  $s_a$ ):**

- ammesso che non sia già disponibile, ricavare la relazione funzionale segnale/concentrazione;
- usare la deviazione standard residua,  $s_{y/x}$ , (oppure la deviazione standard dell'intercetta,  $s_a$ ) e la pendenza della curva di calibrazione,  $b$ , per calcolare il ldr e, se richiesto, il ldq.

**ESEMPIO N. 5** - Calcolare il limite di rivelabilità per la determinazione del nitrito nelle acque mediante spettrofotometria VIS (metodo di Griess) sapendo che la deviazione standard residua,  $s_{y/x}$ , ottenuta nel corso della regressione ai minimi quadrati dei risultati dell'analisi di 11 soluzioni standard nell'intervallo di concentrazione  $7,7 \cdot 10^{-7} \text{ M} - 5,8 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ , è risultata uguale a 0,0965 e che la deviazione standard dell'intercetta,  $s_a$ , è risultata uguale a 0,0391.

La pendenza, come noto dall'Esempio 4, è risultata essere  $4,792 \cdot 10^4 \text{ L/mol}$ . Valutare ldr ( $\alpha = \beta = 5\%$ ) e ldq (per quest'ultimo, usare  $10\sigma$ ).

1) Calcolo di ldr mediante  $s_{y/x}$ :  
( $\alpha = 5\%$ ,  $\beta = 5\%$ )

2) Calcolo di ldr mediante  $s_a$ :  
( $\alpha = 5\%$ ,  $\beta = 5\%$ )

$$\text{ldr} = \frac{3,3 \cdot 0,0391}{4,792 \cdot 10^4} = 2,69 \cdot 10^{-6} \text{ mol / L}$$

3) Calcolo di  $ldq$  mediante  $s_{y/x}$ :  
( $\alpha = 5\%$ ,  $\beta = 5\%$ )

$$ldq = \frac{10 \cdot 0,0965}{4,792 \cdot 10^4} = 2,01 \cdot 10^{-5} \text{ mol / L}$$

4) Calcolo di  $ldq$  mediante  $s_a$ :  
( $\alpha = 5\%$ ,  $\beta = 5\%$ )

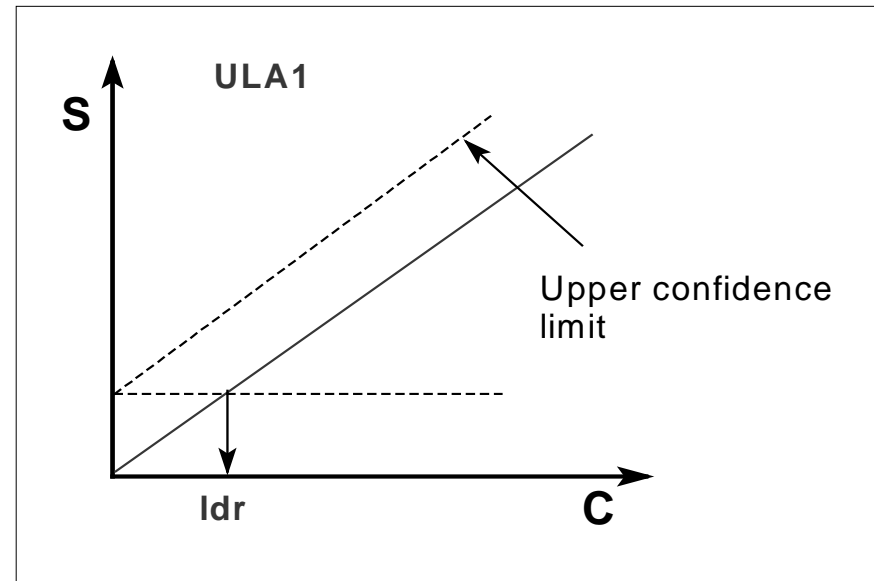
$$ldq = \frac{10 \cdot 0,0391}{4,792 \cdot 10^4} = 8,15 \cdot 10^{-6} \text{ mol / L}$$

Si noti che il limite di rivelabilità ottenuto usando  $s_{y/x}$ ,  $ldr = 6,6 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$ , è solo poco più alto di quello ottenuto usando il modello basato su  $s_B$ ,  $ldr = 2,7 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$  (DIAPOSITIVA 48), ma solo se si usa l'equazione 6 riportata nel testo a lato, in quanto in questo caso non sono possibili approssimazioni. Infatti usando l'equazione 5 del testo a lato si ottiene un  $ldr = 2,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol/L}$ , notevolmente inferiore e poco realistico.

Si nota invece un accordo sorprendente, almeno in questo caso, tra il valore ottenuto usando l'equazione 6,  $ldr = 2,7 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$ , e quello calcolato usando  $s_a$ ,  $ldr = 2,7 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ .

Nel modello ULA1 il  $l_{dr}$  è la concentrazione interpolata dal segnale corrispondente all'ordinata all'origine del limite di fiducia superiore della retta di regressione.

In questo modello, il  $l_{dq}$  è definito come  $3 \cdot l_{dr}$ .



### Procedura 3 (ULA1):

- eseguire la calibrazione (come indicato nel Capitolo 4)
- valutare il  $l_{dr}$  per

mezzo dell'equazione  $\longrightarrow$

$$l_{dr} = (t_{1-\alpha, \nu} \cdot s_{y/x}) \cdot \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{c}^2}{\sum_{i=1}^n (c_i - \bar{c})^2}}$$

**ESEMPIO N. 6** - Nel corso di uno studio di validazione (convalida), si desidera valutare il Idr ed il Idq. Allo scopo sono eseguite le misurazioni necessarie alla definizione della funzione di calibrazione (7 x 6 repliche) ed una serie di misurazioni replicate (8) del bianco. I dati (u.a.) sono riportati qui di seguito:

<b><i>Segnali del bianco</i></b>	<b><i>Concentrazione</i></b>	<b><i>Segnale medio</i></b>	<b><i>Deviazione standard</i></b>
14,6,	0,0	15,3	0,40
15,0	5,0	25,8	0,59
14,9	10,0	41,4	0,43
15,2	15,2	52,8	0,50
15,2	20,0	64,0	0,63
14,7	25,8	81,1	0,82
14,5	31,0	91,9	0,82
14,1			

Confrontare i Idr calcolabili in base ai diversi modelli.

La varianza risulta omogenea:

$$\left(\frac{0,82}{0,40}\right)^2 = 4,2025$$

$$F_{1-\frac{\alpha}{2}, 5, 5} = 7,146$$

Quindi si esegue la regressione lineare ordinaria ai minimi quadrati:

$$r = 0,9991$$

$$r^2 = 0,9981$$

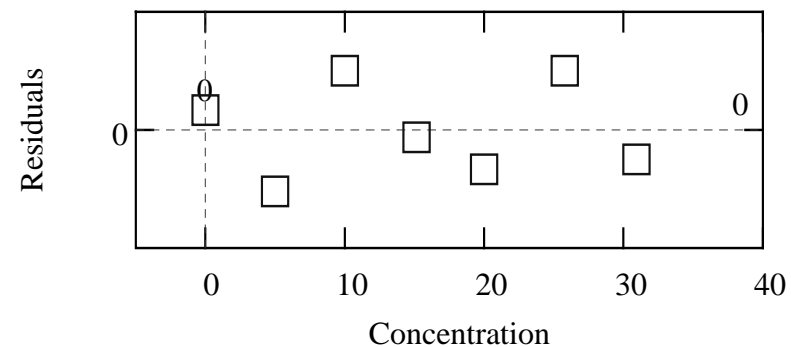
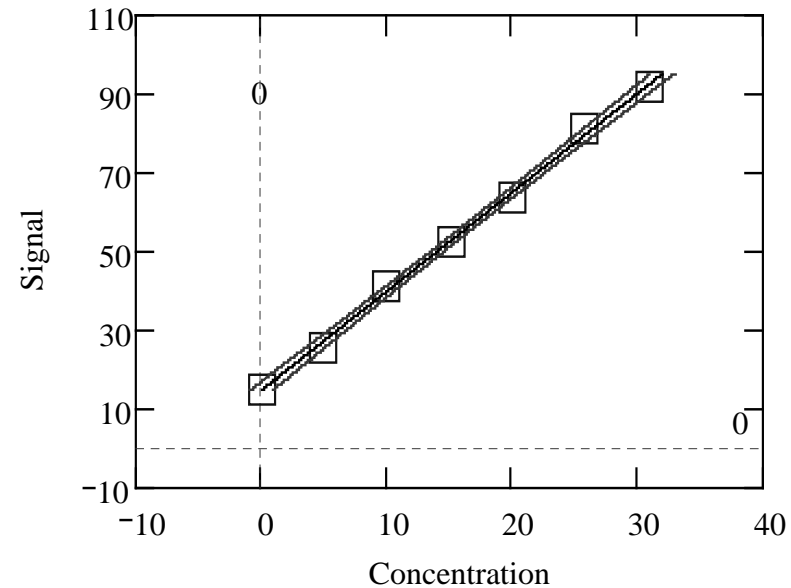
$$b = 2,5110$$

$$a = 14,8037$$

$$s_{y/x} = 1,3270$$

$$s_b = 0,0485$$

$$s_a = 0,8957$$



I ldr calcolabili in base ai diversi modelli sono elencati qui di seguito:

$$\text{ldr} = 3,3 \cdot \frac{\sqrt{\sigma_B^2 + \sigma_a^2 + \frac{\sigma_b^2 \cdot (a - \mu_B)^2}{b^2}}}{b} = 1,28$$

$$\text{ldr} = \frac{3,3 \cdot \sigma_a}{b} = 1,2$$

$$\text{ldr} = 3,3 \cdot \frac{\sqrt{\sigma_B^2 + \sigma_a^2 + \frac{\sigma_b^2 \cdot a^2}{b^2}}}{b} = 1,33$$

$$\text{ldr} = \frac{3,3 \cdot \sigma_{y/x}}{b} = 1,74$$

$$\text{ldr} = 3,3 \cdot \frac{\sqrt{\sigma_B^2 + \sigma_a^2}}{b} = 1,28$$

$$\text{ldr} = \frac{3,3 \cdot \sigma_B}{b} = 0,50$$

$$\text{ldr} = (t_{1-\alpha, \nu} \cdot s_{y/x}) \cdot \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{C}^2}{\sum_{i=1}^n (C_i - \bar{C})^2}} = 1,15$$

La stima del limite di rivelabilità e del limite di quantificazione permette di definire il formato più corretto per la presentazione dei risultati analitici.

Alcuni Autori raccomandano di scrivere il risultato sperimentale (misura) solo quando esso è maggiore del  $Idq$ . Se la concentrazione del campione in esame è  $C_x$ , e la concentrazione corrispondente al limite di decisione,  $S'$ , è  $Idd$ , allora il risultato sperimentale dovrebbe essere riportato come segue:

$C_x < Idd$	: <i>assente</i>
$Idd < C_x < Idr$	: <i>minore del Idr</i>
$Idr < C_x < Idq$	: <i>presente</i>
$Idq < C_x$	: <i>misura*</i>

Secondo altri, il risultato numerico dovrebbe essere riportato in ogni caso.

\*Si ricorda che, per definizione, una misura è Informazione, (risultato o dato sperimentale), costituita da un numero, un'incertezza ed un'unità di misura, assegnata a rappresentare un parametro in un determinato stato del sistema in esame

Nel caso sia necessario stimare il limite di rivelabilità di un metodo di analisi qualitativa è necessario usare una diversa procedura.

**Procedura 4 (modello qualitativo):**

- analizzare 10 volte un numero adeguato di bianchi fortificati a diversi livelli di concentrazione (*randomizzare!*);
- costruire la curva (o analizzare i) *risultati positivi vs. concentrazione*;
- individuare il livello di concentrazione al quale i risultati positivi sono il 100% (o, se richiesto diversamente, una percentuale minore).

**ESEMPIO N. 7** - Verifica del limite di rivelabilità per la determinazione qualitativa dei solfocianuri (saggio con  $\text{Fe}^{3+}$  in ambiente acido). Allo scopo sono preparati cinque bianchi fortificati con  $\text{CNS}^-$  a livelli di concentrazione compresi tra 2,5 mg/L e 12,5 mg/L. Dieci aliquote indipendenti di ciascun bianco fortificato sono analizzate al fine di determinare a vista la presenza della colorazione dovuta al prodotto di reazione. Valutare il Idr qualitativo.

I risultati positivi relativi ottenuti analizzando ciascun bianco fortificato sono riportati qui di seguito:

$C_{\text{CNS}^-}$ (mg/L)	=	2,5	5,0	7,5	10,5	12,5
$N_{\text{pos}}/N_{\text{neg}}$	=	1/10	2/10	5/10	10/10	10/10

I risultati indicano che il  $\text{Idr}_{\text{qual}}$  è  $C_{\text{CNS}^-} = 10,5 \text{ mg/L}$  (arrotondabile a 10 mg/L).

