

## ESATTEZZA

L'**esattezza** è la vicinanza d'accordo tra il valore medio ottenuto da una serie numerosa di risultati e 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.

**ESEMPIO N. 18** – Si desidera valutare l'esattezza di un nuovo metodo di analisi elettrochimica del cobalto nelle ceneri di inceneritori comunali. Allo scopo, un operatore analizza ripetutamente il materiale di riferimento certificato CRM176 (cenere di inceneritore cittadino contenente la concentrazione di analita  $C_{Co} = 30,9$  mg/kg). I risultati delle 11 analisi sono i seguenti :

$C_{Co}$  (mg/kg) : 28,9; 29,8; 29,9; 30,6; 28,5; 31,2; 32,1; 30,6; 30,9; 31,7; 30,0

Il risultato del bianco non è significativamente diverso da zero. Valutare l'esattezza del risultato fornito dal nuovo metodo ( $P = 95\%$ ).

Calcolo del valore medio e stima della deviazione standard:

$$C_{mCo} = 30,382 \text{ mg/kg}$$

$$s = 1,103 \text{ mg/kg}$$

$$t_{1-\alpha/2,10} = 2,228$$

Intervallo di fiducia:

$$t_{1-\alpha/2,10} \cdot \frac{s}{\sqrt{11}} = 0,741$$

Risultato:  $C_{exp} = 30,38 \pm 0,74$  mg/kg ( $\alpha = 0,05$ ;  $\nu = 10$ )

L'intervallo di fiducia comprende il valore certificato, 30,9 mg/kg, e quindi non si ha evidenza di bias nei limiti del livello di fiducia prescelto.

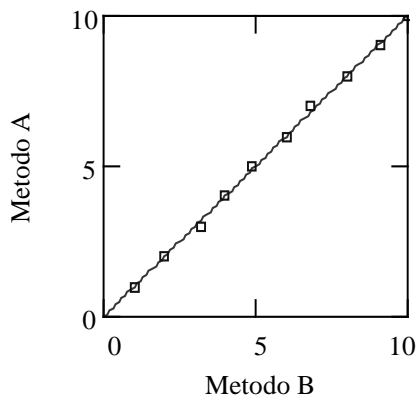
Alternativamente, l'esattezza può essere valutata mediante confronto dei risultati ottenuti mediante analisi di una serie di campioni (standard o reali) con il metodo da validare e con un metodo di riferimento indipendente.

**Procedura A:**

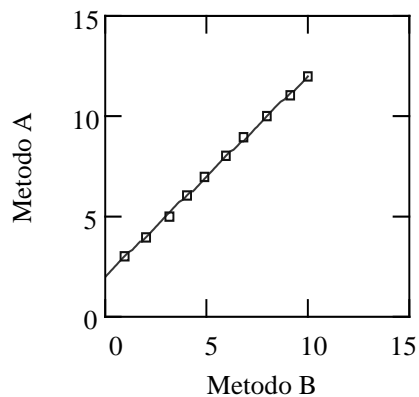
eseguire 10 analisi replicate del bianco e del campione in esame, o di un materiale di riferimento, con il metodo da validare e con un metodo di riferimento indipendente e confrontare i risultati mediante test per il confronto di due medie sperimentali;

**Procedura B:**

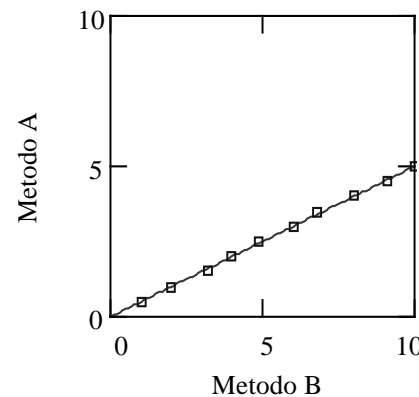
riportare in grafico i risultati ottenuti analizzando una serie di campioni a diversa concentrazione con il metodo da validare e con quello di riferimento (usare la formulazione per relazioni funzionali di tipo FII): i vari casi possibili sono riportati nella prossima diapositiva.



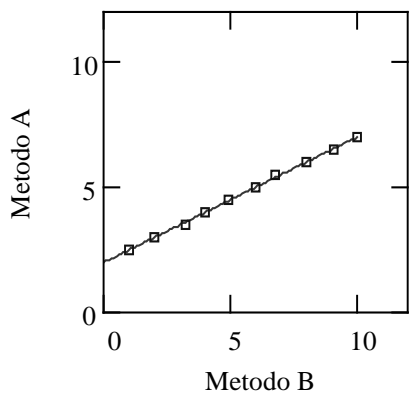
**Teorico**



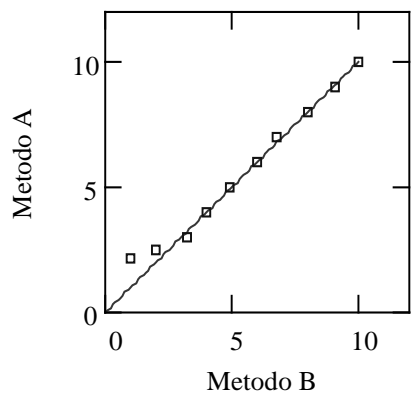
**Errore sistematico  
costante positivo**



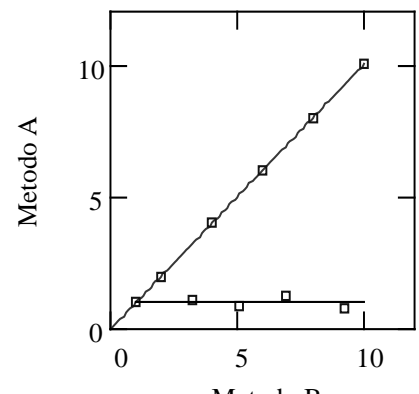
**Errore sistematico  
proporzionale negativo**



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



**Deviazione dalla linearità**



**Problemi di speciazione**

Procedura B

L'esempio sottostante è relativo alla procedura B; si riportano in grafico i risultati ottenuti analizzando una serie di campioni a diversa concentrazione con il metodo da validare (sulle ordinate) e con quello di riferimento (sulle ascisse).

**ESEMPIO N. 19** – Nel corso dello sviluppo di un nuovo metodo di analisi HPLC della caffeina nel caffè solubile, una serie di campioni contenenti diverse concentrazioni di caffeina viene analizzata (in ordine randomizzato) con il metodo in via di sviluppo e con un metodo standard spettrofotometrico (BS5752: Part 3: 1988 (ISO 4052)).

I risultati (%) sono i seguenti:

HPLC:                    2,0; 3,3; 3,2; 3,0; 4,8; 5,4; 6,0; 5,4; 7,7; 9,0;

ISO 4052:                2,1; 3,0; 3,5; 4,1; 4,6; 5,8; 6,2; 6,5; 7,3; 7,5;

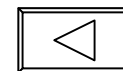
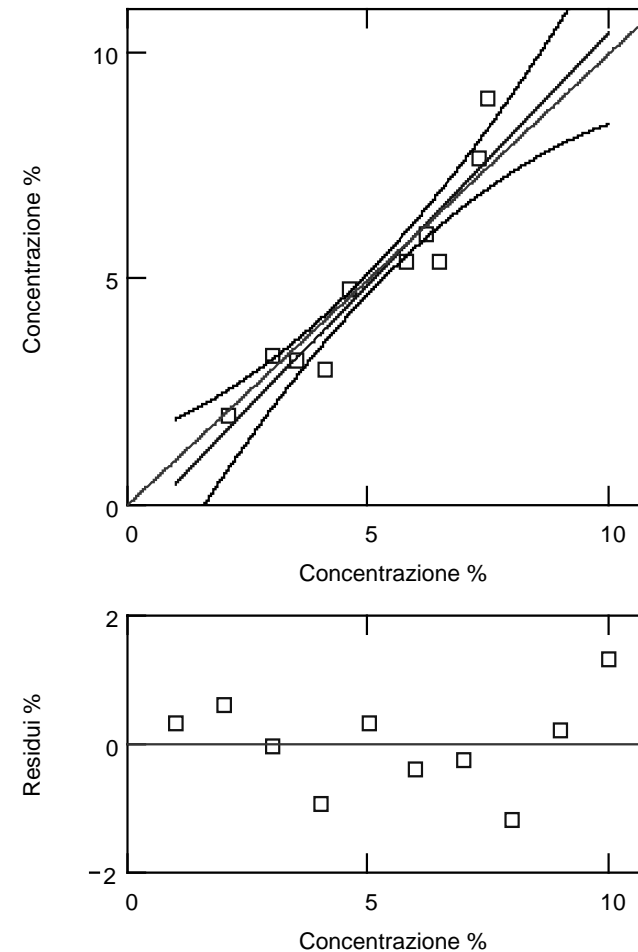
Valutare l'esattezza ( $P = 95\%$ ).

L'ispezione del risultato della regressione FII\* indica chiaramente che la retta di regressione ottenuta, è caratterizzata da un'intercetta non significativamente diversa da zero ( $b_0 = -0.6 \pm 1.7$ ) e da una pendenza non significativamente diversa da uno, ( $b_1 = 1,11 \pm 0.32$ ).

L'analisi del diagramma dei residui non evidenzia deviazioni dalla linearità.

Il risultato sembra indicare l'assenza di errori sistematici non trascurabili.

\* Il test è descritto nell'Appendice 4 del testo a lato.



## 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  $t_{1-\alpha/2,\infty} = 1,96 \approx 2$ ;  $\sigma_r$  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:

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

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  $t_{1-\alpha/2,\infty} = 1,96 \approx 2$ ;  $\sigma_R$  è la deviazione standard della riproducibilità.

**ESEMPIO N. 20** – Nel corso della procedura di validazione del metodo gascromatografico di analisi del Dibenzepin nelle urine, si desidera valutare il limite di ripetibilità. Allo scopo sono state analizzate tre soluzioni standard contenenti il farmaco a diverse concentrazioni. Ogni soluzione è stata analizzata 10 volte. Dai risultati è stato possibile stimare le deviazioni standard corrispondenti:

C (ng/g) :            350;        3500;        9800;

$\sigma_r$  (ng/g) :        43;            313;        805;

Valutare i limiti di ripetibilità alle tre concentrazioni.

È facile verificare che

$$r_{350} = 2 \cdot \sqrt{2} \cdot 43 = 121.6$$

$$r_{3500} = 2 \cdot \sqrt{2} \cdot 313 = 885.3$$

$$r_{9800} = 2 \cdot \sqrt{2} \cdot 805 = 2277$$

Si supponga ora di eseguire due analisi di un campione contenente circa 3500 ng/g di Dibenzepin in condizioni di ripetibilità.

Se la differenza tra i risultati (ng/g) delle due misurazioni è maggiore di 885,3 ng/g, si può concludere che si è verificato un peggioramento della precisione (nei limiti del livello di fiducia prescelto, ovvero il 95%).

Alternativamente, dal valore di  $r$  l'operatore può decidere se la differenza tra i risultati dell'analisi di due diversi campioni è significativa.

**ESEMPIO N. 21** – Nel corso della procedura di validazione del metodo gascromatografico di analisi del Dibenzepin nelle urine, si desidera valutare anche il limite di riproducibilità. Allo scopo sono state analizzate le stesse tre soluzioni standard contenenti il farmaco a diverse concentrazioni ma da diversi analisti, in giorni diversi ed in diversi laboratori. Dai risultati delle dieci repliche eseguite su ciascun campione è stato possibile stimare le deviazioni standard corrispondenti:

C (ng/g) :            350;        3500;        9800;

$\sigma_r$  (ng/g) :        63;            390;            885;

Valutare i limiti di riproducibilità alle tre concentrazioni.

Il calcolo permette di ottenere i seguenti risultati

$$R_{350} = 2 \cdot \sqrt{2} \cdot 63 = 178,2$$

$$R_{3500} = 2 \cdot \sqrt{2} \cdot 390 = 1103$$

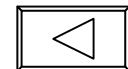
$$R_{9800} = 2 \cdot \sqrt{2} \cdot 885 = 2503$$

Si supponga ora di eseguire due analisi di un campione contenente circa 350 ng/g di Dibenzepin in condizioni di riproducibilità.

Se la differenza tra i due risultati è maggiore di 178 ng/g, si può concludere che si è verificato un peggioramento della precisione (nei limiti del livello di fiducia prescelto, ovvero il 95%).

Il peggioramento della precisione delle misure eseguite in condizioni di riproducibilità rispetto a quelle ottenute in condizioni di ripetibilità è risultato alquanto contenuto. Si confrontino i valori di R con quelli di r precedentemente ottenuti (Esempio n. 20):

$$r_{350} = 121.6 \quad r_{3500} = 885.3 \quad r_{9800} = 2277$$



## INCERTEZZA DI MISURAZIONE

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

\* Sebbene *Uncertainty of measurement* debba essere correttamente tradotto in *Incertezza di misurazione*, è frequente l'uso di *Incertezza di misura*.

L'importanza dell'incertezza di misurazione è stata pienamente recepita dalla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025.

*(dalla UNI CEI EN ISO/IEC 17025)*

#### **5.4.6 Stima dell'incertezza di misura**

**5.4.6.1** Un laboratorio di taratura, o un laboratorio di prova che esegue le proprie tarature, deve avere e deve applicare una procedura per stimare l'incertezza di misura per tutte le tarature e tipi di taratura.

**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 dell'incertezza di misura rigoroso e valido dal punto di vista metrologico e statistico. In questi casi il laboratorio deve almeno tentare di identificare tutte le componenti dell'incertezza e fare una stima ragionevole, e deve garantire 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 misura e deve far uso, per esempio, delle esperienze precedenti e della validazione dei dati.

*(dalla UNI CEI EN ISO/IEC 17025)*

**Nota 1**

Il livello di rigore necessario in una stima dell'incertezza di misura dipende da fattori come:

- i requisiti del metodo di prova;
- i requisiti del cliente;
- l'esistenza di limiti stretti su cui sono basate le decisioni della conformità ad una specifica.

**Nota 2**

In quei casi in cui un metodo di prova ben conosciuto specifica i limiti delle maggiori sorgenti di incertezza e specifica la forma di presentazione dei risultati calcolati, si ritiene che il laboratorio abbia soddisfatto questo punto, seguendo i metodi di prova e le istruzioni per la presentazione dei risultati (vedere 5.10).

*(dalla UNI CEI EN ISO/IEC 17025)*

**5.4.6.3** Quando si stima l'incertezza di misura, devono essere prese in considerazione, utilizzando appropriati metodi di analisi, tutte le componenti dell'incertezza che sono di rilievo in una data situazione.

**Nota 1**

Le fonti che contribuiscono all'incertezza di misura includono, in modo non esaustivo, i campioni di riferimento e i materiali di riferimento utilizzati, i metodi e le apparecchiature utilizzate, le condizioni ambientali e le condizioni degli oggetti da provare o da tarare, e l'operatore.

**Nota 2**

Il comportamento previsto a lungo termine dell'oggetto sottoposto a prova e/o taratura non è, di regola, preso in considerazione quando si stima l'incertezza di misura.

**Nota 3**

Per ulteriori informazioni vedere ISO 5725 e la Guida all'espressione dell'incertezza di misura (vedere bibliografia).

*(dalla UNI CEI EN ISO/IEC 17025)*

### **5.10.3** Rapporti di prova

**5.10.3.1** In aggiunta a quanto indicato in 5.10.2, i rapporti di prova devono includere, se necessario per l'interpretazione dei risultati, quanto segue:

...

c) quando applicabile, una dichiarazione circa l'incertezza di misura stimata; informazioni circa l'incertezza sono necessarie nel rapporto di prova quando ciò influisce sulla validità o sull'applicazione dei risultati di prova, quando le istruzioni del cliente lo richiedono, o quando l'incertezza ha influenza sulla conformità con un limite specificato;

...

Dai primi anni '80 sono stati proposti numerosi modelli per la stima dell'incertezza di misurazione.

Un primo modello, proposto da Wernimont [1], prevedeva la valutazione dell'UOM per mezzo delle stime di precisione eseguite in prove di confronto interlaboratorio (*method-performance inter-laboratory studies*).

Successivamente, ISO ha proposto un modello completamente differente, noto come bottom-up (o error-budget, o component-by-component), basato sui principi di propagazione degli errori. Le linee guida del modello sono descritte nella *Guide to the expression of uncertainty in measurement* [2], (nota come GUM).

Il modello bottom-up è stato poi adottato da EURACHEM [3].

1. G.T. Wernimont, *Use of statistics to develop and evaluate analytical methods*, AOAC, Arlington, VA, (1985)
2. ISO, *Guide to the expression of uncertainty in measurement*, Geneva (1993)
3. EURACHEM, *Quantifying uncertainty in analytical measurement*, 1st Ed. (1995)

In seguito alle perplessità avanzate da numerosi operatori, l'*Analytical Methods Committee* (AMC) della *Royal Society of Chemistry* (RSC) ha proposto un modello [4], noto come top-down, basato su quello di Wernimont.

Due anni dopo NMKL (*Nordisk Metodik Komité for Levnedsmidler*), giudicando il modello bottom-up più adatto a misurazioni fisiche che a misurazioni chimiche, ha sviluppato un modello alternativo più semplice e, allo stesso tempo, utile alla stima dell'incertezza complessiva connessa con l'intera procedura analitica totale [5].

Almeno in linea di principio, la norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 ha adottato il modello bottom-up, riferendosi esplicitamente alla GUM nelle sue linee guida.

4. Analytical Methods Committee, *Uncertainty of Measurement: Implications of Its Use in Analytical Science*, *Analyst*, 129 (1995) 2303
5. NMKL Procedure N. 5, *Estimation and expression of measurement uncertainty in chemical analysis*, NMKL (1997)

Successivamente, la seconda edizione della Guida EURACHEM [6] e la IUPAC [7] hanno proposto, per la stima dell'incertezza di misurazione, di usare anche i dati acquisiti nel corso di studi di validazione (modello bottom-up integrato).

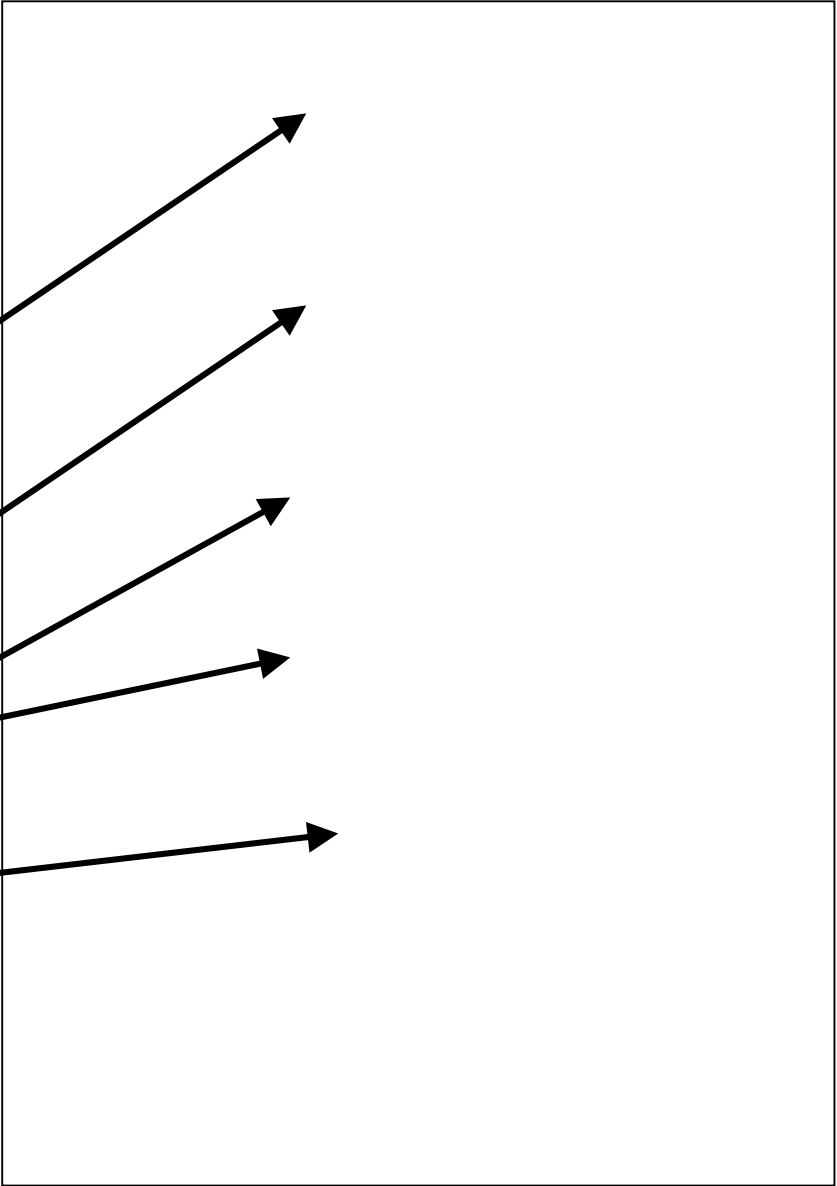
Infine, Barwick ed Ellison [8] hanno predisposto un *protocollo* per utilizzare i risultati degli studi di validazione nella stima dell'incertezza di misura. In pratica l'approccio, sempre del tipo bottom-up integrato, descrive come i dati ottenuti nei test di robustezza permettano di valutare opportunamente tutte le sorgenti d'incertezza non considerate dagli studi di esattezza e precisione.

6. EURACHEM, *Quantifying uncertainty in analytical measurement*, 2nd Ed. (2000)
7. Report on the *FAO, IAEA, AOAC Int., IUPAC International Workshop on Principles and Practices of Method Validation*, Budapest (1999)
8. V.J. Barwick, S.R.L. Ellison, VAM Project 3.2.1 *Development and Harmonisation of Measurement Uncertainty Principles. Part d. Protocol for uncertainty evaluation from validation data. Version 5.1* (2000)

***L'attuale coesistenza di diversi modelli per la valutazione dell'incertezza di misurazione, e l'aumento dei costi e tempi di analisi derivante dalla loro applicazione, hanno trasformato la stima dell'incertezza di misurazione in uno dei maggiori problemi affrontati dai laboratori che vogliono introdurre un sistema di controllo qualità, o che hanno come obiettivo l'accreditamento dei loro metodi di analisi.***

## MODELLO BOTTOM-UP (EURACHEM)

Il modello bottom-up, schematizzato in Figura, richiede:

- la definizione del misurando
  - l'identificazione delle sorgenti d'incertezza
  - la quantificazione delle incertezze d'ingresso
  - il calcolo dell'incertezza composta
- 

L'obiettivo di una misurazione è la determinazione del valore della grandezza da misurare,  $Y$ , detta misurando. Il misurando è espresso in funzione di grandezze d'ingresso,  $X_1, X_2$ , ecc.:

$$Y = f(X_1, X_2, \dots, X_n)$$

L'equazione rappresenta il modello di misurazione. In realtà, il processo di misurazione permette di ottenere solo una stima,  $y$ , del misurando mediante sostituzione nell'eq. 1 delle stime (delle grandezze) di ingresso,  $x_i$ :

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_n)$$

- Definizione incompleta del misurando
- Campionamento (?)
- Estrazione/preconcentrazione incompleta
- Effetti di matrice ed interferenze
- Contaminazioni
- Conoscenza o controllo inadeguato delle condizioni ambientali che influenzano il risultato
- Bias personali nella lettura degli strumenti
- Incertezza di masse e volumi
- Incertezze legate alla risoluzione e sensibilità strumentali
- Incertezza del valore assegnato a CRM
- Incertezza del valore di costanti e parametri usati nell'algoritmo di riduzione dei dati
- Approssimazioni e assunzioni implicite del metodo analitico
- Errori casuali
- Algoritmi inadeguati di software commerciali

Ad ognuna delle stime d'ingresso deve essere associata una incertezza tipo d'ingresso.

Le incertezze tipo d'ingresso sono definite di categoria **A**, se possono essere stimate come deviazioni standard di parametri valutati mediante analisi statistica di risultati sperimentali (deviazione standard di una media, della pendenza di un diagramma di calibrazione, ecc.).

Le incertezze tipo d'ingresso sono definite di categoria **B** se derivano da informazioni relative alla strumentazione o ai materiali di riferimento (tolleranze della vetreria, incertezza del valore certificato di un materiale di riferimento, precisione di un termometro, ecc.).

Stima delle incertezze standard dalle incertezze d'ingresso di categoria B:

Nessuna informazione sulla distribuzione:

$$s_b = \frac{(a_2 - a_1)}{2 \cdot \sqrt{3}}$$

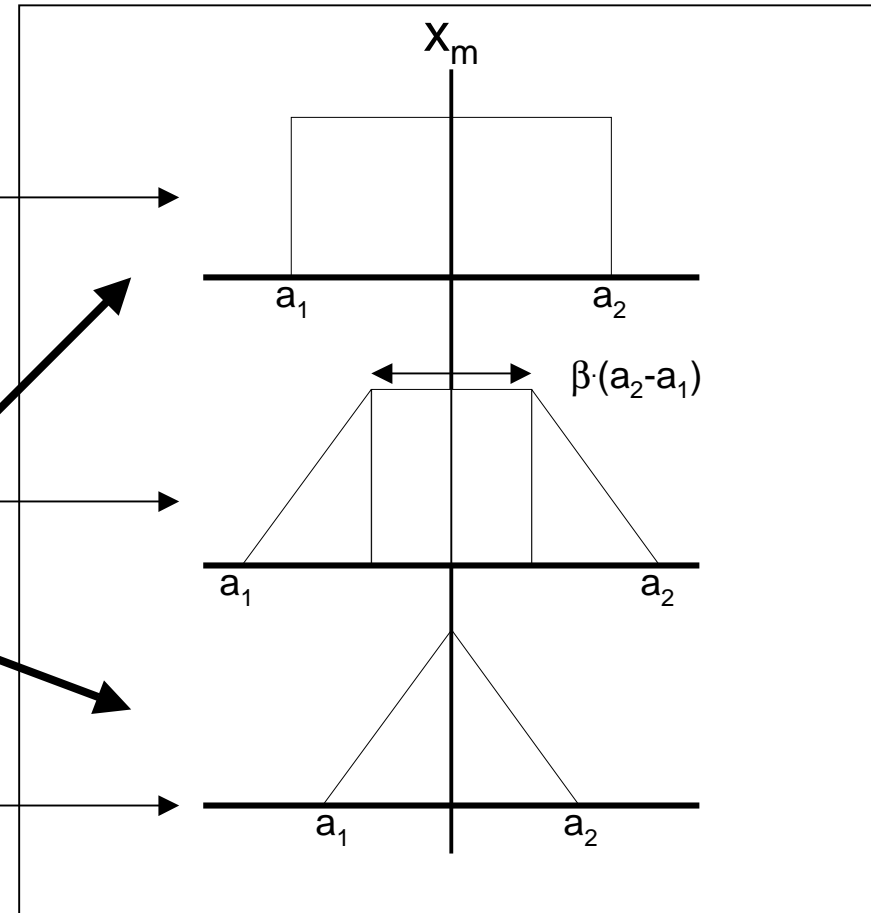
I valori agli estremi sono meno probabili di quelli centrali:

$$s_b = \frac{(a_2 - a_1)}{2 \cdot \sqrt{6}} \cdot \sqrt{1 + \beta^2} \quad (0 \leq \beta \leq 1)$$

Per una distribuzione triangolare:

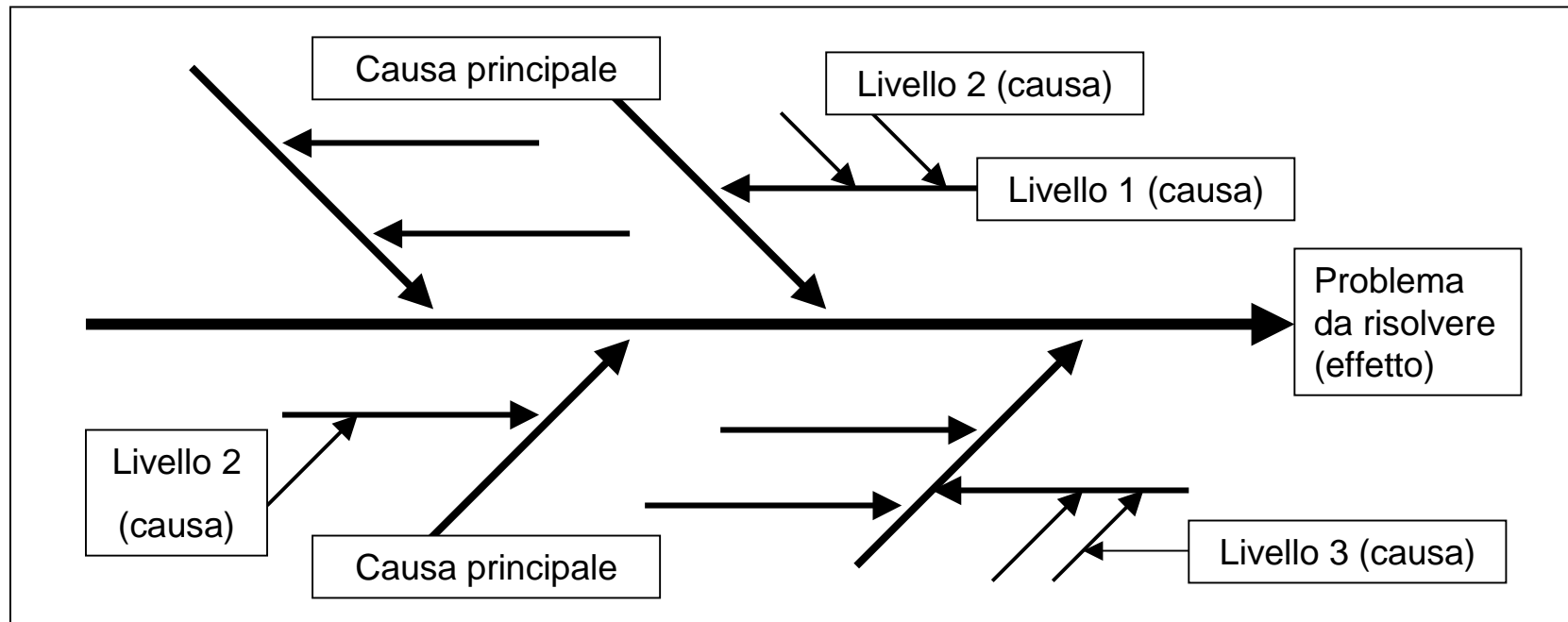
$$s_b = \frac{(a_2 - a_1)}{2 \cdot \sqrt{6}}$$

$a_1 \neq a_2$  oppure  $a_1 = a_2$

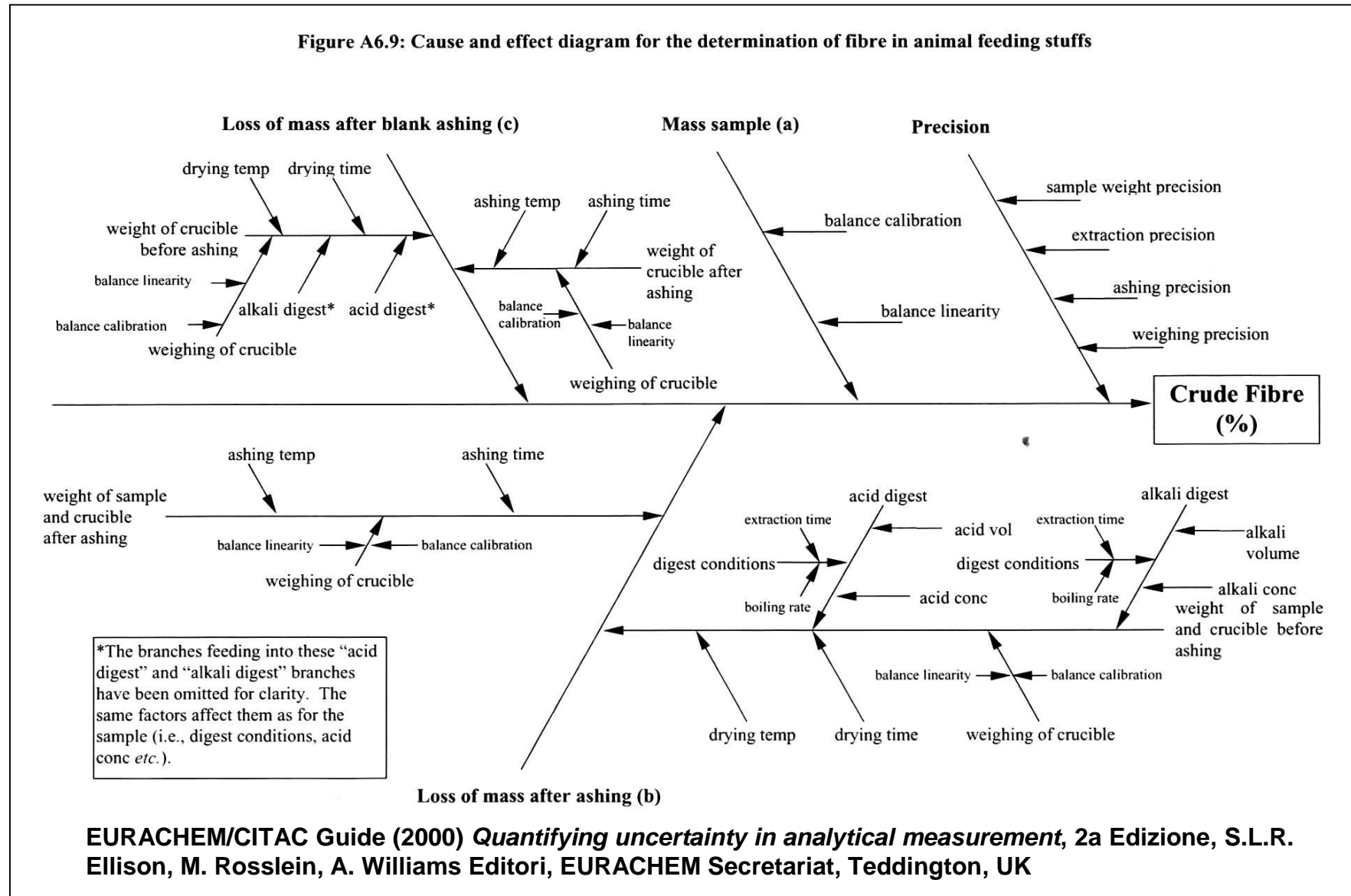


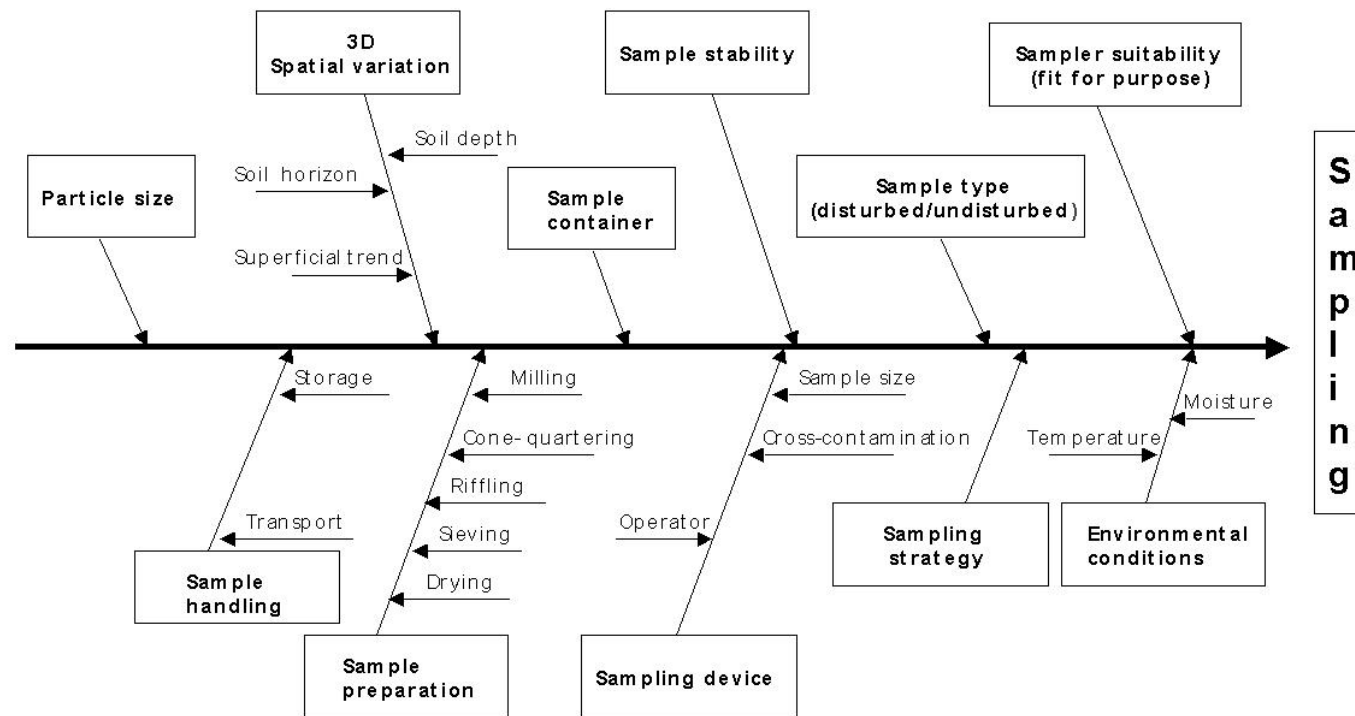
Le incertezze di categoria B hanno infiniti gradi di libertà.

Fondamentale, ai fini della correttezza della stima dell'incertezza tipo composta, è il bilancio delle incertezze, definito mediante l'analisi causa-effetto e visualizzato per mezzo dei diagrammi a spina di pesce (diagrammi di Ishikawa). Scopo principale del diagramma, in metrologia chimica, è l'identificazione di tutte le sorgenti d'incertezza.



Il diagramma di Ishikawa può risultare molto complesso.





**P. de Zorzi , M. Belli , S. Barbizzi , S. Menegon , A. Deluisa, *A practical approach to assessment of sampling uncertainty*, Accred. Qual, Assur., 7 (2002) 182**

Avendo individuato tutte le incertezze d'ingresso, si può calcolare l'incertezza tipo composta,  $u(y)$ . Per il principio di propagazione degli errori casuali,  $u(y)$  può essere calcolata combinando tutte le sorgenti d'incertezza espresse come incertezze standard:

$$u(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^n \left( \frac{\partial y}{\partial x_i} \cdot u(x_i) \right)^2 + 2 \cdot \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n \left( \frac{\partial y}{\partial x_i} \cdot \frac{\partial y}{\partial x_j} \cdot \text{cov}(x_{ij}) \right)}$$

dove  $x_i$  ( $i = 1 \dots n$ ) sono le grandezze d'ingresso (che determinano il risultato analitico),  $u(x_i)$  è l'incertezza del parametro  $i^{\text{esimo}}$  espressa come deviazione standard e  $\text{cov}(x_{ij})$  è la covarianza tra  $x_i$  e  $x_{j \neq i}$ .

Quando tutte le grandezze d'ingresso sono indipendenti e tra loro non correlate,  $cov(x_{ij})$  è uguale a zero e l'incertezza tipo composta di un misurando può essere calcolata da:

$$u(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^n \left( \frac{\partial y}{\partial x_i} \cdot u(x_i) \right)^2}$$

Esempi:

$$y = a \pm b \Rightarrow u(y) = \sqrt{u(x_1)^2 + u(x_2)^2}$$

$$y = a \cdot b^{\pm 1} \Rightarrow \frac{u(y)}{y} = \sqrt{\left( \frac{u(x_1)}{x_1} \right)^2 + \left( \frac{u(x_2)}{x_2} \right)^2}$$

## CAMPIONAMENTO

La considerazione del contributo del campionamento nella stima dell'incertezza composta è alquanto controversa.

Secondo alcuni ricercatori, l'incertezza del campionamento dovrebbe essere considerata solo se il campionamento è parte della metodo in esame.

Secondo altri\*, senza il contributo dell'incertezza del campionamento (spesso la componente più importante) la stima dell'incertezza di misurazione è priva di significato.

\* J.L. Love, *Chemical metrology, chemistry and the uncertainty of chemical measurements*, *Accred. Qual. Assur.*, 7 (2002) 95

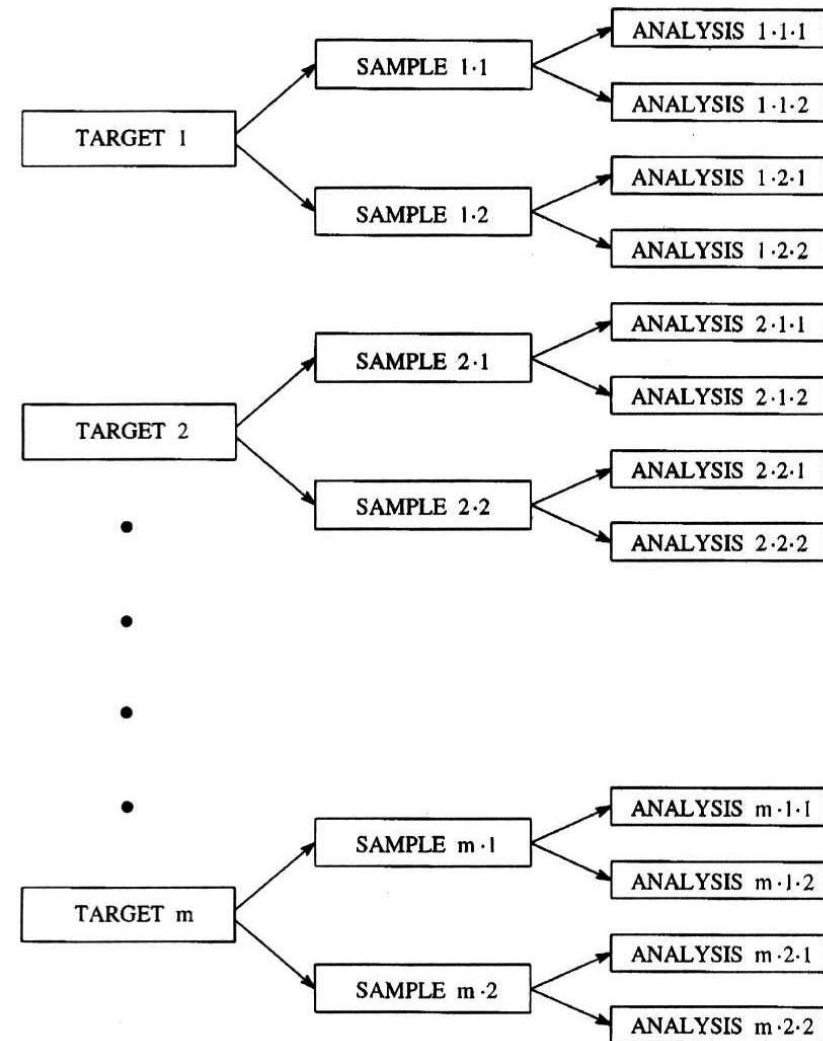
## INCERTEZZA DEL CAMPIONAMENTO

La stima dell'incerteza legata al campionamento,  $u_s$ , può essere eseguita mediante un opportuno disegno sperimentale.

Un esempio di disegno adatto allo scopo\* è presentato in Figura.

Target indica la massa di materiale che deve essere rappresentata dal campione (sample) di laboratorio.

In questo disegno,  $m$  targets simili in composizione sono campionati in duplicato ed ogni campione è analizzato in duplicato.

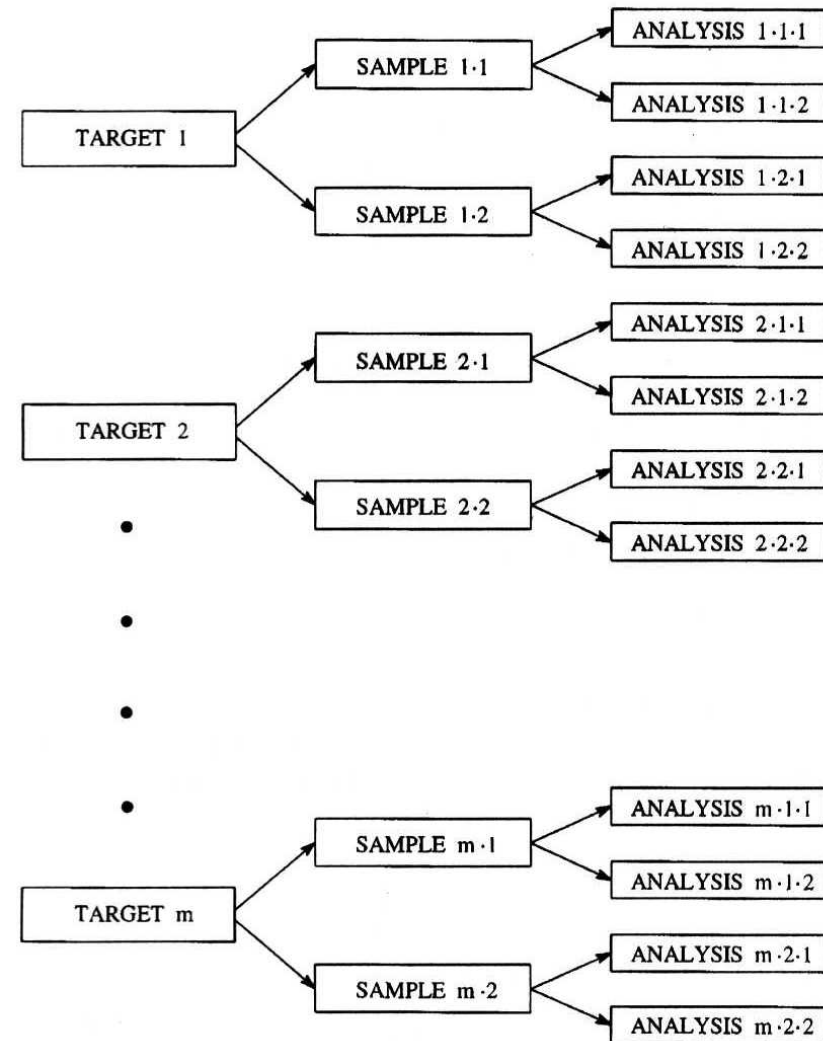


\* M. Thompson, *Uncertainty of sampling in chemical analysis*, *Accred. Qual. Assur.*, 3 (1998) 117

La varianza del campionamento,  $\sigma_s^2$ , è calcolata come segue\*:

$$\sigma_s^2 = \frac{MSB - MSW}{n} \quad (\Rightarrow u_s^2)$$

dove MSB e MSW sono la media dei quadrati delle differenze (mean square) inter-campioni (MSB) e, rispettivamente, intra-campioni (MSW) mentre n è scelto uguale a 2 perché le misurazioni sono state eseguite in doppio.



Il calcolo può essere eseguito mediante ANOVA. Analizzando i seguenti dati

	1.1	1.2	2.1	2.2	3.1	3.2	4.1	4.2
Analisi 1	255.3	234.1	228.1	225.2	198.9	300.3	305.2	245.8
Analisi 2	248.7	241.3	229.4	217.1	195.9	291.1	310.9	233.7

si

$$MSB := \frac{\sum_i \left[ \sum_j (x_{m_j} - \bar{X}_m)^2 \right]}{jj - 1}$$

$$MSW := \frac{\sum_j \sum_i (x_{j,i} - x_{m_j})^2}{jj \cdot (ii - 1)}$$

Source	DF	SS	MS	F	P
Col_0	2	252.0000	4.6669	3.3000	
Col_1	2	237.7000	3.6000	3.6000	
Residual	8	217.6200	27.2025		
Total	15	19661.1375			

$$\sigma_s^2 = \frac{2777.6454 - 27.2025}{2} = 1375.2214$$

$$\sigma_s = 37.0848 \quad \text{RSD} \approx 15\%$$

jj = 8  
li = 2

One-Way ANOVA Results

---

Source	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	7	19443.5175	2777.6454	102.1099	3.444E-007
Within Groups	8	217.6200	27.2025		
Total	15	19661.1375			

Nell'ipotesi che si voglia comprendere l'incertezza del campionamento,  $u(C_s)$  ( $= \sigma_s$ ) l'incertezza composta diventa:

$$u(y)_{\text{corr}} = y \cdot \sqrt{\left(\frac{u(y)}{y}\right)^2 + \left(\frac{u(C_s)}{C_s}\right)^2}$$

dove  $u(C_s)$  è la concentrazione media dell'analita nei campioni analizzati per valutare l'incertezza del campionamento.

Si tenga presente che l'incertezza del campionamento può essere la componente dominante nel bilancio delle incertezze.

Moltiplicando l'incertezza tipo composta,  $u(y)$  (o  $u(y)_{\text{corr}}$ ), per un opportuno fattore di copertura,  $k$ , si ottiene l'incertezza estesa,  $U(y)$ :

$$U(y) = k \cdot u(y)$$

Il fattore di copertura permette di associare un livello di fiducia all'incertezza estesa, e corrisponde alla variabile normale standardizzata,  $z$ : valori di  $k$  uguali a 1,96 (più spesso arrotondato a 2) e, rispettivamente, 2,58 (più spesso arrotondato a 2,6), indicano la selezione del livello di fiducia del 95% e, rispettivamente, del 99%.

Nel campo delle misurazioni chimiche, a meno di particolari esigenze, si suggerisce l'uso di  $k = 2$ .

È importante osservare che questa scelta presuppone la conoscenza di valori molto affidabili delle incertezze tipo d'ingresso, tali da permettere l'assegnazione di un numero di gradi di libertà molto alto ( $\rightarrow \infty$ ) all'incertezza composta,  $u(y)$ .

In caso contrario, è necessario usare il fattore di copertura corretto,  $t_{(1-\alpha/2),v}$ , valido per il numero effettivo di gradi di libertà di  $u(y)$ .

Il numero effettivo di gradi di libertà può essere ottenuto combinando i gradi di libertà,  $v_i$ , delle singole componenti  $u(x_i)$  mediante l'approssimazione di Welch-Satterthwaite:

$$v_u = \frac{\left[ \sum_i (u(x_i))^2 \right]^2}{\sum_i \left[ \frac{(u(x_i))^4}{v_i} \right]}$$

Dato che i gradi di libertà delle incertezze tipo d'ingresso di categoria B sono infiniti, i corrispondenti contributi nel denominatore dell'approssimazione di Welch-Satterthwaite sono nulli.

L'esempio di calcolo dell'incertezza riportato nelle prossime diapositive, sebbene inerente ad un caso relativamente semplice, permette di descrivere dettagliatamente la procedura *bottom-up* (EURACHEM) di valutazione dell'incertezza di misurazione.

In particolare, esso permette di introdurre l'analisi causa-effetto per mezzo dei diagrammi di Ishikawa.

**ESEMPIO N. 22** – Nel corso della procedura di validazione del metodo spettrofotometrico VIS di analisi del nitrito nelle acque, ed in mancanza di materiali di riferimento certificati, si decide di preparare una soluzione standard di nitrito (da usare come materiale standard interno) dissolvendo 0,2470 g di nitrito di sodio puro per analisi (99,9%) in 250 mL di acqua bidistillata. Dato che la soluzione deve essere usata nel corso delle misurazioni dell'esattezza, è necessario stimare l'incertezza della concentrazione di nitrito.

La concentrazione di nitrito è calcolata per mezzo dell'equazione:

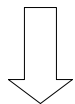
$$C_{\text{NO}_2^-} = \frac{(m_f - m_0) \cdot P}{\text{MW} \cdot V} = \frac{0,2470 \cdot 99,9}{68,995308 \cdot 0,250 \cdot 100} = 0,014305$$

dove  $m_f$  (g), è la massa di nitrito più la massa della navicella di polipropilene usata per la sua pesata,  $m_0$  (g), è la massa della navicella MW (g/mole), è il peso molecolare del nitrito di sodio dedotto dalla Tavola dei pesi atomici standard IUPAC del 1989, V (L), è il volume di soluzione e infine P (%), è la purezza del nitrito di sodio utilizzato per la preparazione della soluzione standard.

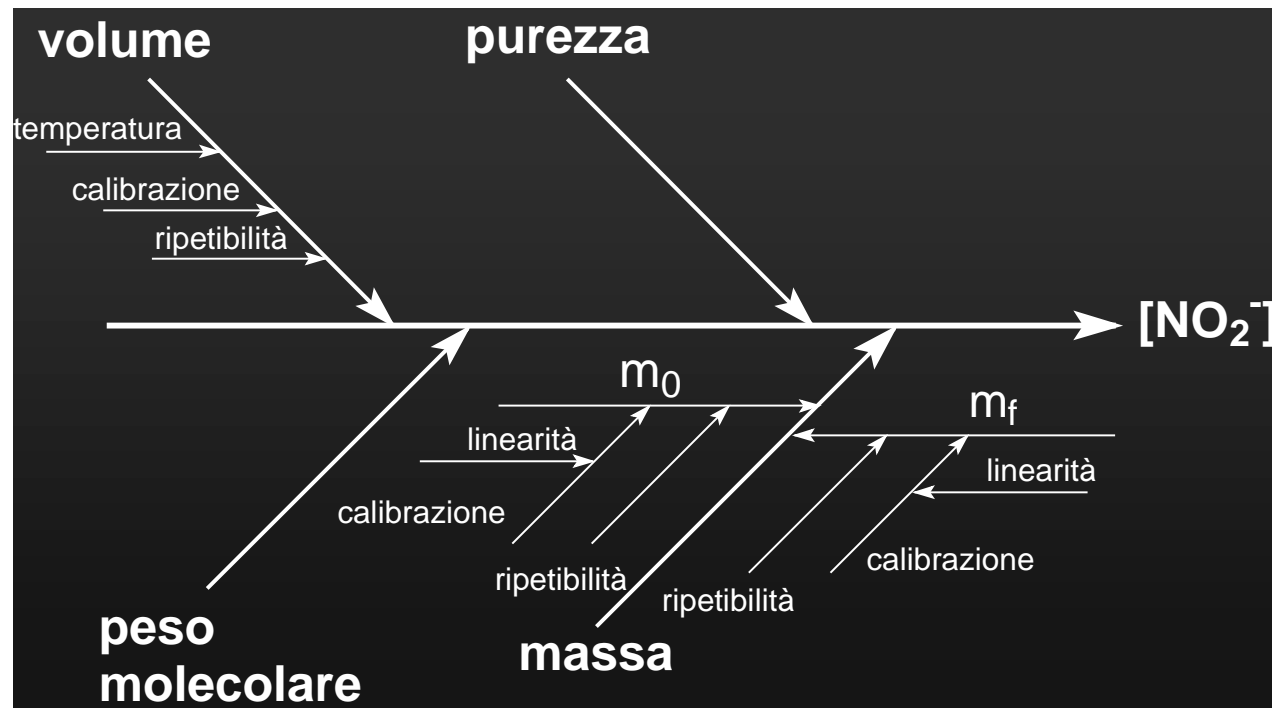
L'equazione permette di impostare i calcoli da eseguire per valutare anche l'incertezza del valore calcolato della molarità. La procedura, benché sia apparentemente semplice, richiede l'analisi delle diverse fonti di incertezza che contribuiscono all'incertezza del risultato finale.

Diagramma causa-effetto relativo alla determinazione dell'incertezza della soluzione standard di nitrito.

$$C_{\text{NO}_2^-} = \frac{(m_f - m_0) \cdot P}{MW \cdot V}$$



L'incertezza legata alla **sensibilità** della bilancia è trascurabile (la massa di nitrito viene determinata per differenza, utilizzando la stessa bilancia in un range ristretto di peso e in un breve intervallo di tempo), quindi il modello può essere semplificato.



Le incertezze standard relative coinvolte sono:

*Volume* :  $u(V)$

- calibrazione,  $u(V_c)$
- ripetibilità,  $u(V_r)$
- temperatura,  $u(V_t)$

$$\begin{aligned} \frac{u(V)}{V} &= \sqrt{\left(\frac{u(V_c)}{V}\right)^2 + \left(\frac{u(V_r)}{V}\right)^2 + \left(\frac{u(V_t)}{V}\right)^2} = \\ &= \sqrt{\left(\frac{0,3}{\sqrt{6} \cdot 250}\right)^2 + \left(\frac{0,118}{250}\right)^2 + \left(\frac{0,525}{\sqrt{3} \cdot 250}\right)^2} = 1,390 \cdot 10^{-3} \end{aligned}$$

*Purezza* :  $u(P)$

$$\frac{u(P)}{P} = \frac{0,001}{\sqrt{3} \cdot 0,999} = 5,779 \cdot 10^{-4}$$

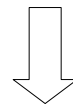
*Peso molecolare* :  $u(MW)$

- ossigeno,  $u(AW_O)$
- sodio,  $u(AW_{Na})$
- azoto,  $u(AW_N)$

$$\begin{aligned} \frac{u(MW)}{MW} &= \sqrt{2 \cdot \left(\frac{u(AW_O)}{AW_O}\right)^2 + \left(\frac{u(AW_{Na})}{AW_{Na}}\right)^2 + \left(\frac{u(AW_N)}{AW_N}\right)^2} = \\ &= \sqrt{2 \cdot \left(\frac{3 \cdot 10^{-4}}{\sqrt{3} \cdot 15,9994}\right)^2 + \left(\frac{6 \cdot 10^{-6}}{\sqrt{3} \cdot 22,989768}\right)^2 + \left(\frac{7 \cdot 10^{-5}}{\sqrt{3} \cdot 14,00674}\right)^2} = 1,558 \cdot 10^{-5} \end{aligned}$$

*Massa*  $[(\text{navicella} + \text{nitrito}) - (\text{navicella})]$ :  $u(M)$

- ripetibilità,  $u(M_r)$
- calibrazione (linearità):  $u(M_c)$



$$\begin{aligned} \frac{u(M)}{M} &= \sqrt{\left(\frac{u(M_r)}{M}\right)^2 + 2 \cdot \left(\frac{u(M_c)}{M}\right)^2} = \\ &= \sqrt{\left(\frac{3,628 \cdot 10^{-4}}{0,2470}\right)^2 + 2 \cdot \left(\frac{0,0001}{\sqrt{3} \cdot 0,2470}\right)^2} = 1,506 \cdot 10^{-3} \end{aligned}$$

È possibile ora calcolare l'incertezza tipo composta relativa della molarità:

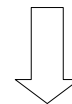
$$\frac{u(c_{\text{NO}_2^-})}{c_{\text{NO}_2^-}} = \sqrt{\left(\frac{u(P)}{P}\right)^2 + \left(\frac{u(M)}{M}\right)^2 + \left(\frac{u(V)}{V}\right)^2 + \left(\frac{u(MW)}{MW}\right)^2} =$$

$$= \sqrt{(5,779 \cdot 10^{-4})^2 + (1,506 \cdot 10^{-3})^2 + (1,390 \cdot 10^{-3})^2 + (1,558 \cdot 10^{-5})^2} = 2,129 \cdot 10^{-3}$$

e l'incertezza standard combinata assoluta:

$$u(c_{\text{NO}_2^-}) = 2.129 \cdot 10^{-3} \cdot 0,014305 = 3,046 \cdot 10^{-5} \text{ M}$$

Per scegliere il fattore di copertura corretto,  $t_{(1-\alpha/2),v}$ , si decide di combinare i gradi di libertà,  $v_i$ , delle singole componenti  $u(x_i)$  mediante l'approssimazione di Welch-Satterthwaite.



I gradi di libertà delle incertezze componenti delle cause principali (massa, volume, peso molecolare e purezza) sono :

$$v_M = \frac{\left[ \left( \frac{3,628 \cdot 10^{-4}}{0,2470} \right)^2 + 2 \cdot \left( \frac{0,0001}{\sqrt{3} \cdot 0,2470} \right)^2 \right]^2}{\left( \frac{3,628 \cdot 10^{-4}}{0,2470} \right)^4} = 9,935$$

$$v_P = \frac{\left( \frac{0,001}{\sqrt{3} \cdot 0,999} \right)^4}{0} = \infty$$

$$v_V = \frac{\left[ \left( \frac{0,118}{250} \right)^2 + \left( \frac{0,3}{\sqrt{6} \cdot 250} \right)^2 + \left( \frac{0,525}{\sqrt{3} \cdot 250} \right)^2 \right]^2}{\left( \frac{0,118}{250} \right)^4} = 677,394$$

$$v_{MW} = \frac{\left[ 2 \cdot \left( \frac{0,0003}{\sqrt{3} \cdot 15,9994} \right)^2 + \left( \frac{0,000006}{\sqrt{3} \cdot 22,989768} \right)^2 + \left( \frac{0,00007}{\sqrt{3} \cdot 14,00674} \right)^2 \right]^2}{2 \cdot 0 + 0 + 0} = \infty$$



Combinando i gradi di libertà delle incertezze componenti delle cause principali si ottiene infine:

$$v_{\text{tot}} = \frac{[u(M)^2 + u(V)^2 + u(MW)^2 + u(P)^2]^2}{\frac{u(M)^4}{v_M} + \frac{u(V)^4}{v_V} + \frac{u(MW)^4}{v_{MW}} + \frac{u(P)^4}{v_P}} = 39,536$$

Nell'equazione sopra, in pratica, anche  $v_V \approx 677$ , può essere considerato uguale a infinito.

Considerato il risultato finale,  $v_{\text{tot}} \approx 40$ , si può concludere che l'approssimazione di Welch-Satterthwaite, nel caso dell'esempio trattato, non porta a correzioni significative del fattore di copertura suggerito. Quindi, per un livello di fiducia del 95% è possibile usare  $k = 2$ , e la concentrazione della soluzione standard di nitrito risulta esprimibile come segue:

$$\begin{aligned} C_{\text{NO}_2^-} &= C_{\text{NO}_2^-} \pm 2 \cdot u(c_{\text{NO}_2^-}) = \\ &= 0,014305 \pm 2 \cdot 0,000034 = \\ &= 0,014305 \pm 0,000061 \text{ M (P = 95\%)} \end{aligned}$$

Il modello bottom-up è oggetto di numerose critiche, inerenti prevalentemente la sua applicabilità reale. Alcune tra le più qualificate, sono riportate nel recente lavoro

*R.G. Visser*

***Measurement uncertainty: Opinions of the Government, The Accreditation Council and the Candidate accredited laboratory***

*Accred. Qual. Assur., 7 (2002) 124*

inerente i risultati del lavoro di quattro gruppi di studio incaricati da EURACHEM (nel meeting generale del 2000) di valutare problemi e soluzioni della stima dell'incertezza di misurazione dei metodi chimico-analitici.

*Da R.G. Visser, Accred. Qual. Assur., 7 (2002) 124*

Conclusioni del gruppo di lavoro sugli alimenti (coordinato da R. Herber – *Coronel Institute of the Analytical Medical Center of Amsterdam*), incaricato di studiare la determinazione del deossinivalenolo nel grano mediante GC-FID, dei pesticidi nel latte mediante GC-ECD, della sostanza grassa nella polvere di latte mediante gravimetria e della conta batterica totale aerobica nel latte mediante tecniche microbiologiche.

*Le incertezze stimate erano in ogni caso inferiori a quelle stimate dalla riproducibilità.*

...

*L'incertezza poteva essere stimata più affidabilmente per mezzo di studi del recupero.*

...

*I problemi principali derivavano dalla variabilità delle matrici, dalle interferenze, dalle derive strumentali, dalle disomogeneità e dall'instabilità dei campioni.*

...

*La conclusione del gruppo di lavoro è stata che tutte le incertezze stimate avevano solo validità limitata.*

*Da R.G. Visser, Accred. Qual. Assur., 7 (2002) 124*

Conclusioni del gruppo farmacologico di lavoro (coordinato da G. Overvliet, *Laboratory for the Quality Control of Medicines of RIVM, Bilthoven*), incaricato di studiare la misurazione del pH in accordo con *European Pharmacopoeia*, la determinazione HPLC del del tartrato di alimemazina\* negli sciroppi, la purezza dell'immunoglobulina in accordo a *European Pharmacopoeia*, l'acqua mediante KF, ed altro.

*Le incertezze stimate dai dati di validazione potevano essere usate con successo solo nel caso in cui lo studio di validazione avesse portato alla valutazione di tutte le incertezze componenti e, comunque, le incertezze stimate avrebbero dovuto essere verificate nell'ambito di studi interlaboratori.*

\* Antistaminico

Da R.G. Visser, *Accred. Qual. Assur.*, 7 (2002) 124

Conclusioni del gruppo ambientale di lavoro incaricato di valutare le incertezze inerenti la determinazione dei metalli nei suoli mediante mineralizzazione acida e ICP (coordinato da J. Vuik, *Royal Haskoning*, Rotterdam).

*Nel caso del rame, il gruppo aveva tentato di usare il modello bottom-up classico, usando la GUM e la EURACHEM Guide.*

...

*Non era stato possibile quantificare tutte e 43 le sorgenti di errore, né quantificare le correzioni ad esse inerenti.*

...

*Ulteriori studi su campioni reali avevano dimostrato, al variare dei campioni analizzati, variazioni dell'incertezza di misurazione dello stesso metallo comprese tra il 5% ed il 90%.*

...

*Il gruppo ha concluso che il modello bottom-up classico non porta a stime utili.*

Da R.G. Visser, *Accred. Qual. Assur.*, 7 (2002) 124

Conclusioni del gruppo petrolchimico di lavoro (coordinato da R.G. Visser, *Institute of Interlaboratory Studies*, Dordrecht), incaricato di valutare l'importanza della stima dell'incertezza per l'industria petrolifera.

*Il gruppo ha concluso che tale stima era molto poco importante.*

...

*Gli standard per l'uso dell'incertezza (quali ASTM 3244, IP367 e ISO4259) sono usati molto raramente.*

...

*In caso di dispute, l'esecuzione di un'analisi di revisione avrebbe comunque permesso la risoluzione del caso senza la necessità di approfondire la comprensione della statistica inerente la dichiarazione dell'incertezza.*

Da R.G. Visser, *Accred. Qual. Assur.*, 7 (2002) 124

*Riassumendo i risultati presentati nelle relazioni dei quattro gruppi di lavoro, si può concludere che non è probabile che l'approccio classico bottom-up rappresenti per i chimici analitici uno strumento utile alla stima dell'incertezza.*

...

*Tutti i gruppi hanno convenuto che i dati disponibili da studi di validazione (da metodi standard, studi interlaboratori o studi intralaboratorio) permettono stime ragionevoli dell'incertezza di misurazione (con l'eccezione di casi particolari di disomogeneità del campione).*

In un recente lavoro\* è stato ribadito quanto segue:

*The first edition of the EURACHEM Guide for 'Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement' insisted very much on the component-by-component approach and, in this way, has caused unnecessary confusion.*

*The second edition follows closely a document prepared by IUPAC, AOAC, FAO and IAEA and stresses to a much larger extent that «Measurement uncertainty must be integrated with its existing quality assurance measurements, with these measures themselves providing much of the information required to evaluate the measurement uncertainty». In its draft version, it goes on to say that «It attempts to correct the impression gained within the Analytical Community that it is only the so-called component-by-component approach that is acceptable ... ».*

*The final version refers to the ISO guide 17025, which also allows one the use of approaches for the uncertainty evaluation other than the component-by-component approach.*

*The second edition of the EURACHEM guide is a very useful document - much more so than the first one. It is, however, somewhat unfortunate that the examples cited give much more room to the component-by-component approach than to those based on method validation data.*

\* E. Hund, D.L. Massart, J. Smeyers-Verbeke, *Operational definitions of uncertainty*, TRAC., 20 (2001) 394

## MODELLO TOP-DOWN SEMPLIFICATO

Uno dei modelli alternativi, noto come modello *top-down*, è stato proposto dall'Analytical Methods Committee della Royal Society of Chemistry\*.

Il modello *top-down* considera il laboratorio da un più alto livello, come membro di una popolazione di laboratori. Allora gli errori *casuali* e *sistematici* all'interno del laboratorio, visti da questo livello, diventano errori casuali tra i vari laboratori (randomizzazione degli errori sistematici) e come tali possono essere valutati usando tecniche statistiche abbastanza semplici.

\* Analytical Methods Committee, *Uncertainty of measurement: Implications of its use in Analytical Science*, Analyst, 120 (1995) 2303

Quando un campione omogeneo è analizzato da N laboratori mediante una certa procedura, il risultato ottenuto da ciascun laboratorio può essere espresso come segue:

$$x = \mu + \delta_{\text{metodo}} + \delta_{\text{lab}} + \delta_{\text{co}} + \varepsilon$$

dove  $x$  è il risultato ottenuto,  $\mu$  il valore vero,  $\delta_{\text{metodo}}$  l'errore sistematico del metodo,  $\delta_{\text{lab}}$  l'errore sistematico laboratorio,  $\delta_{\text{co}}$  l'errore sistematico della corsa (run) ossia derivante dalle condizioni operative (giorno, operatore, ecc.) ed  $\varepsilon$  l'errore casuale. Normalmente  $\mu$  non è noto.

Nel modello top-down,  $\mu$  è sostituito dal valore vero convenzionale,  $x_m$ , ovvero dalla media delle medie ottenute dagli N laboratori coinvolti nello studio.

Inoltre, il bias del laboratorio e quello della corsa diventano variabili casuali alle quali può essere associata una varianza. L'unico errore sistematico rimasto è il bias del metodo.

Poiché l'incertezza deve comprendere tutti i fattori che influenzano il risultato analitico (sia gli errori casuali che sistematici) si ha

$$u(x) = t_{1-\frac{\alpha}{2}, \nu_{\text{eff}}} \cdot \sqrt{\sigma_{\varepsilon}^2 + \sigma_{\text{co}}^2 + \sigma_{\text{lab}}^2 + u_{\text{metodo}}^2}$$

dove il valore indicato di t (a 2 code) è calcolato, preferibilmente\*, mediante l'approssimazione di Welch-Satterthwaite e gli altri simboli hanno un ovvio significato.

\* In caso contrario si usi il solito  $k = 2$  ( $\alpha = 0,05$ ) o  $k = 2.6$  ( $\alpha = 0,01$ )

Tutte le varianze nell'equazione precedente, salvo quella legata all'incertezza del metodo, possono essere stimate dai risultati della prova interlaboratori.

L'incertezza del metodo,  $u_{\text{metodo}}$ , deve tener conto dell'incertezza del valore certificato del CRM. Infatti, dato che il bias del metodo, visto da questo livello superiore, è il solo errore sistematico, si ha

$$\delta_{\text{metodo}} = \bar{X}_m - X_{\text{CRM}}$$

e

$$u_{\text{metodo}} = \sqrt{\frac{s_{\text{metodo}}^2}{N} + s_{\text{CRM}}^2}$$

dove  $N$  è il numero di laboratori partecipanti alla prova e  $(s_{\text{metodo}}^2/N)$  rappresenta la varianza della media dei risultati ottenuti dagli  $N$  laboratori (la varianza della grande media).

Secondo un noto esperto del settore\*

*...The primary advantage of this methodology is that it is based on estimates from actual laboratory measurements, not from expert guesstimates and budget allowances.*

Tuttavia, anche il modello top-down è stato oggetto di critiche. Infatti, considerata la varietà dei problemi analitici possibili, non è sempre facile reperire un numero adeguato di laboratori interessati a partecipare ad un opportuno studio interlaboratorio.

Inoltre, l'incertezza stimata non include i contributi del campionamento, dei possibili pretrattamenti di omogeneizzazione dei campioni e delle differenze tra la composizione della matrice usata per lo studio interlaboratori e quella dei campioni usati nelle misurazioni reali.

W. Horwitz, R. Albert, *The Concept of Uncertainty as Applied to Chemical Measurements*, Analyst, 122 (1997) 615

## MODELLO NMKL

Secondo il Nordic Committee on Food Analysis\* (NMKL) il modello bottom-up è più adatto a misurazioni fisiche che a misurazioni chimiche. NMKL ha quindi sviluppato procedure alternative che hanno trovato particolare applicazione nel campo delle analisi chimiche degli alimenti.

Confrontato con il modello *bottom-up*, quello NMKL è molto più semplice, e nello stesso tempo fornisce una vista d'insieme dell'incertezza dell'intero processo analitico.

L'approccio è basato su dati sperimentali generati all'interno del laboratorio. Non vengono utilizzati dati relativi alla precisione interlaboratori raccolti per mezzo di studi collaborativi. In questo modo l'incertezza di misurazione stimata è applicabile solo agli errori casuali dello stesso laboratorio.

\* NMKL: Nordisk Metodik Komité for Levnedsmidler: organizzazione nordeuropea di analisti alimentari, microbiologi, chimici e analisti sensoriali avente come obiettivo fondamentale la selezione, la validazione, l'approvazione e la pubblicazione di metodi di analisi degli alimenti.

Le procedure proposte sono applicabili ai campioni dal momento in cui arrivano al laboratorio: non sono considerati i possibili contributi all'incertezza dovuti al campionamento.

Si presuppone inoltre che siano assenti errori sistematici. In caso contrario i risultati devono essere corretti adeguatamente.

Viene suggerito inoltre di stimare il recupero, anche se viene sottolineata la necessità di interpretare con cautela (in modo conservativo) i risultati.

La procedura è differente nel caso si disponga di campioni reali o materiali di riferimento stabili o meno nel tempo (Procedura A e, rispettivamente, B).

Nel caso di materiali non stabili (Procedura B), si raccomanda di eseguire il controllo di qualità interno mediante verifica del mantenimento delle condizioni di controllo statistico (per mezzo di opportune carte di controllo).

**Procedura A** (condizioni di precisione intermedia – *riproducibilità interna*):

- eseguire 10 analisi replicate su un campione reale, o materiale di riferimento certificato, o materiale di riferimento interno, in tempi diversi; se necessario ripetere a diversi livelli di concentrazione (basso, medio e alto). Se le misurazioni sono relative alla verifica di un limite legale o composizionale, ripetere ad un livello di concentrazione simile al valore limite; se necessario ripetere su diverse matrici)

- calcolare  $s_R$  e  $RSD_R$

$$s_R = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$RSD_R = \frac{s_R}{\bar{X}}$$

(i simboli hanno il loro significato usuale)

- stimare l'incertezza come segue

$$U = k \cdot RSD_R \cdot C_x$$

Come sempre, l'uso di  $k = 2$  associa all'incertezza il livello di fiducia del 95%.

**ESEMPIO N. 23** – Nel corso dello sviluppo di un metodo HPLC per la determinazione del colesterolo totale nel siero di sangue umano si desidera stimare l'incertezza di misurazione. Allo scopo viene acquisito il materiale di riferimento SRM1951a (Level II), contenente 7,1554 mmol/L di colesterolo in siero umano. Il materiale viene analizzato ripetutamente nello stesso laboratorio, su un arco di due settimane, da due diversi analisti utilizzando due strumenti diversi. I risultati ottenuti (mmol/L) sono i seguenti:

Analista 1:           7,0015; 7,2117; 6,6903; 7,4848; 6,7900;

Analista 2:           7,5005; 7,3000; 7,6990; 6,9511; 7,3303.

Stimare l'incertezza di misurazione applicabile a campioni reali contenenti 5,8900 e 8,0507 mmol/L (P = 95%).

Il valore medio, la deviazione standard e la deviazione standard relativa della riproducibilità interna, calcolati utilizzando i dieci risultati, risultano uguali a

$$C_{\text{medio}} = 7,1959 \text{ mmol/L}$$

$$s = 0,3294 \text{ mmol/L}$$

$$\text{RSD}_R = 0,04578$$

L'incertezza di misurazione alle due concentrazioni risulta pertanto uguale a :

$$\text{UOM}_{5,8900} = 0,04578 \cdot 5,8900 \cdot 2 = 0,5393 \text{ mmol/L}$$

$$\text{pertanto } C = 5,89 \pm 0,54 \text{ mmol/L}$$

$$\text{UOM}_{8,0507} = 0,04578 \cdot 8,050 \cdot 2 = 0,7371 \text{ mmol/L}$$

$$\text{pertanto } C = 8,05 \pm 0,74 \text{ mmol/L}$$

Si noti che nelle condizioni reali di lavoro del laboratorio, i risultati devono essere arrotondati alla seconda cifra decimale (seconda cifra significativa dell'incertezza).

**Procedura B** (condizioni di ripetibilità):

- eseguire 10 analisi in doppio ( $a_i$  e  $b_i$ ) su campioni reali contenenti approssimativamente la stessa concentrazione di analita (se necessario, eseguirle in tempi diversi e/o usando diversi analisti); se necessario, ripetere a diversi livelli di concentrazione - basso, medio e alto; se le misurazioni sono relative alla verifica di un limite legale o composizionale, ripetere ad un livello di concentrazione simile al valore limite; se necessario ripetere su diverse matrici;

- calcolare  $RSD_R$ :

$$RSD_R = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \left( \frac{a_i - b_i}{\bar{x}_i} \right)^2}{2 \cdot n}}$$

- stimare l'incertezza alla concentrazione  $C_x$  come segue

$$U = k \cdot RSD_R \cdot C_x$$

Come sempre, l'uso di  $k = 2$  associa all'incertezza il livello di fiducia del 95%.

**ESEMPIO N. 24** – Valutare l'UOM dai risultati delle seguenti misurazioni dei carboidrati totali (mg/100g, prevalentemente lattosio) eseguite in doppio su campioni di formaggio Lancashire ( $P = 95\%$ ).

<i>Determinazione N.</i>	<i>Data</i>	<i>a</i>	<i>b</i>
1	04.05.01	100,0	105,1
2	05.05.01	87,9	93,2
3	06.05.01	99,5	104,2
4	08.05.01	101,3	103,5
5	09.05.01	102,1	103,8
6	10.05.01	94,6	95,9
7	11.05.01	106,1	100,3
8	12.05.01	98,9	87,3
9	13.05.01	102,2	104,3
10	16.05.01	98,7	102,8

La deviazione standard relativa delle riproducibilità risulta uguale a:

$$\text{RSD}_R = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N \frac{(a_i - b_i)^2}{\bar{x}_i^2}}{2 \cdot 10}} = 0,03854$$

Pertanto, se la concentrazione misurata di un campione è  $C_x = 95.20$  mg/100g, il risultato risulta affetto dall'incertezza  $U = 2 \cdot \text{RSD}_R \cdot C_x$ , ovvero

$$U = 7,3374 \text{ mg/100g}$$

e deve essere scritto come segue:

$$C = 95,2 \pm 7,3 \text{ mg/100g (P = 95\%)}$$

Se invece  $C_x = 105,36$  mg/100g, allora l'incertezza è  $U = 8,1205$  mg/100g ed il risultato è:

$$C = 105,4 \pm 8,1 \text{ mg/100g (P = 95\%)}$$

## EQUAZIONE DI HORWITZ

Una valutazione approssimata dell'incertezza di misurazione, così come determinata dall'attuale livello tecnologico delle misurazioni analitiche, è fornita dall'equazione di Horwitz.

$$RSD_i = 2^{(1-0.5 \cdot \log(C_i))}$$

L'equazione, ricavata analizzando circa 10.000 set di risultati relativi a misurazioni interlaboratorio (US-FDA), permette di stimare la RSD percentuale assegnabile ad un risultato analitico sulla base della sola concentrazione (a prescindere dal tipo di analita, matrice e strumentazione).

Il valore di RSD% ricavato dall'equazione di Horwitz è indicativo, e può essere corretto. Nel caso di misurazioni eseguite all'interno del laboratorio (in condizioni di ripetibilità) il risultato può essere ridotto al 65%, mentre nei test di confronto dei risultati ottenuti tra diversi laboratori (in condizioni di riproducibilità) esso può essere raddoppiato.

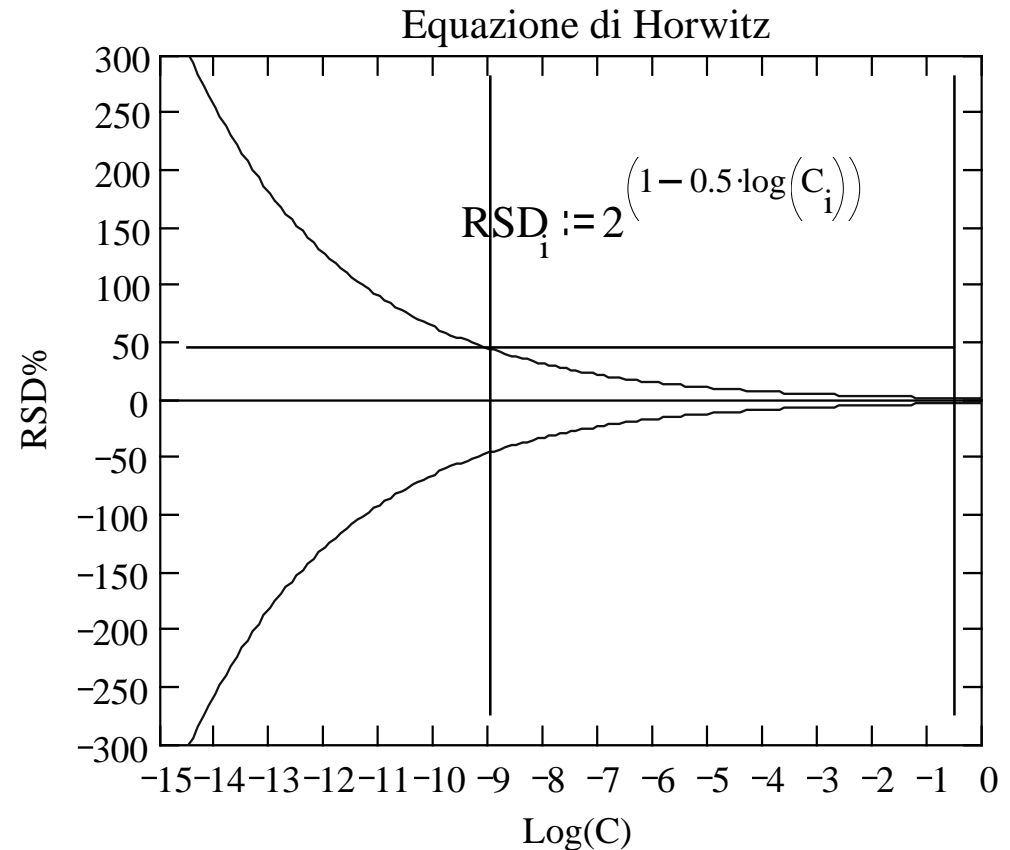
L'equazione di Horwitz permette di verificare l'attendibilità dell'eventuale UOM stimata per altra via.

Se  $C = 0.5$ , ovvero  $C = 50\%$ ,  
si ottiene  $RSD_{th} = 2,2\%$ .

Se invece  $C = 10^{-9}$ , ovvero  $C$   
è a livello di ppb, si ottiene  
 $RSD_{th} = 45\%$ .

Se  $C = 10^{-9}$  ma le analisi  
sono eseguite in condizioni di  
ripetibilità,  $RSD_{th}$  può essere  
ridotta di circa un terzo (da  
45% a 29–30%).

In condizioni di riproducibilità,  
 $RSD_{th}$  può essere  
aumentata fino a  
raddoppiare (da 45% a  
90%).



A livello di 100mg/100g ovvero  $C = 10^{-3}$  (caso dei carboidrati dell'Esempio N. 24), l'equazione di Horwitz permette di stimare una RSD uguale al 5,7%. Dato che i risultati sono intralaboratorio, questo valore può essere ridotto fino al 60%, diventando uguale al 3,4%.

Il risultato dell'Esempio 24

$$RSD = \frac{7,3 \cdot 100}{2 \cdot 95,2} = 3,8\%$$

è in buon accordo con il valore prevedibile.

Ovviamente, la stima più affidabile dell'incertezza di misurazione può essere ottenuta confrontando i risultati sperimentali con quelli ottenuti mediante uno o più dei modelli esistenti (il modello top-down, come già sottolineato, è il più applicato, anche se il lavoro necessario è più difficile da organizzare).

L'incertezza di misurazione è essenziale per confrontare i risultati tra di loro o con valori fissati da specifiche o norme.

Ad esempio, si vuole verificare se la concentrazione di un certo analita in un materiale è conforme al valore limite massimo stabilito da una certa norma: **VLA = 2,0 mg/kg**.

Il risultato dell'analisi è:  **$C_{\text{analita}} = 1,803472 \text{ mg/kg}$** .


Il materiale è conforme?

**LA RISPOSTA DIPENDE DALL'INCERTEZZA DI MISURAZIONE!**

Se  $U(C) = \pm 0,10 \text{ mg/kg}$  ( $\alpha = 0,05$ ;  $\nu = 3$ )

$C_{\text{max}} = 1,90 \text{ mg/kg}$   **CONFORME**

Se  $U(C) = \pm 0,33 \text{ mg/kg}$  ( $\alpha = 0,05$ ;  $\nu = 3$ )

$C_{\text{max}} = 2,13 \text{ mg/kg}$   **POTENZIALMENTE  
NON CONFORME**

Un esempio di considerazione dell'UOM nella valutazione della conformità a limiti legali viene dall'Inghilterra, dove il risultato della misurazione della concentrazione dell'alcol nel sangue delle persone accusate di guida in stato di ubriachezza è normalmente presentato al Tribunale come prova.

Il limite legale del tasso alcolico nel sangue, superato il quale l'imputato è dichiarato colpevole, è 80 mg/100mL.

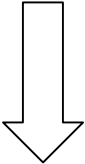
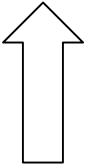
Il Laboratory of Government Chemist\* ha determinato l'incertezza associabile alla misurazione:  $U = 2 \text{ mg/100 mL}$ . Quindi un valore di 81 mg/mL, apparentemente superiore al limite legale, potrebbe rappresentare un valore reale compreso tra 79 mg/100mL e 83 mg/100mL.

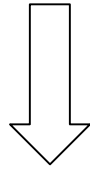
In realtà, nel caso di contestazioni di guida in stato di ebbrezza, per convenzione generalmente adottata in UK, l'analista sottrae 6 mg/100 mL (non 2 mg/100 mL) dal valore determinato al fine di considerare opportunamente l'effetto dell'UOM.

\* R. Treble, *Analytical measurement and the Law*, VAM Bulletin N. 20, Spring 1999, p. 3

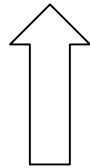
L'incertezza di misurazione è essenziale anche al fine di decidere il numero di cifre significative di un risultato. Infatti, questo deve essere arrotondato alla prima o seconda cifra significativa dell'incertezza.

La prima cifra significativa dell'incertezza corrisponde alla prima cifra incerta della media.

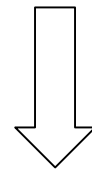

$$\begin{array}{r} \mathbf{34,0967182736} \\ \pm \\ \mathbf{0,2703660271} \end{array} = \mathbf{34,1 \pm 0,3 \text{ u.m. ...}}$$




$$\begin{array}{r}
 \mathbf{5044,06712736} \\
 \pm \\
 \mathbf{20,77036601}
 \end{array}
 = \mathbf{5044 \pm 21 \text{ u.m.} \dots}$$



La seconda cifra significativa dell'incertezza corrisponde alla seconda cifra incerta della media.



$$\begin{array}{r}
 \mathbf{0,02273006} \\
 \pm \\
 \mathbf{3,27136002}
 \end{array}
 = \mathbf{0,0 \pm 3,3 \text{ u.m.} \dots}$$

