

## ROBUSTEZZA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- la stima della ripetibilità del metodo, come deviazione standard stimata da N analisi replicate di un campione rappresentativo in un intervallo temporale ristretto;
- il calcolo del valore sperimentale 
$$t_i = \frac{\sqrt{n} \cdot |V_i|}{\sqrt{2} \cdot s}$$

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

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

**ESEMPIO N. 25** – I fattori che più probabilmente possono influire sui risultati della determinazione del nitrito nelle acque mediante spettrofotometria VIS (metodo di Griess) sono il pH della soluzione (a), il tempo di conservazione del campione (b), la temperatura di lavoro (c), la lunghezza d'onda (d), il tempo atteso perché la reazione vada a completamento (e). Avendo identificato solo cinque fattori, per poter applicare il metodo di Youden si decide di considerare due fattori aggiuntivi fittizi, (f) e (g) (vedere testo a lato).

Le condizioni operative standard (livelli standard) sono le seguenti:

$a = 1,5$ ;  $b = 20^{\circ}\text{C}$ ;  $c = 20'$ ;  $d = 534 \text{ nm}$ ;  $e = 30'$ ;  $f = -$ ;  $g = -$ ;

Le variazioni di livello dei fattori sono le seguenti:

$a_+ = 2,0$ ;  $b_+ = 25^{\circ}\text{C}$ ;  $c_+ = 25'$ ;  $d_+ = 536 \text{ nm}$ ;  $e_+ = 10'$ ;  $f_+ = -$ ;  $g_+ = -$ ;

$a_- = 1,0$ ;  $b_- = 15^{\circ}\text{C}$ ;  $c_- = 15'$ ;  $d_- = 532 \text{ nm}$ ;  $e_- = 40'$ ;  $f_- = -$ ;  $g_- = -$ .

La deviazione standard della ripetibilità in condizioni standard, a concentrazioni dell'ordine di  $2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ , è risultata 0,015 ( $v = 9$ ; unità di assorbanza).

I risultati delle 8 prove (unità di assorbanza) sono i seguenti:

$r_1 = 0,995$ ;  $r_2 = 0,981$ ;  $r_3 = 0,989$ ;  $r_4 = 0,976$  ;

$r_5 = 0,954$ ;  $r_6 = 0,964$ ;  $r_7 = 0,950$ ;  $r_8 = 0,965$  ;

Valutare i fattori più influenti ( $P = 95\%$ ).

I risultati suggeriscono che i due fattori più influenti sono i fattori a ed e (pH e tempo di reazione).

Per valutare in modo più affidabile l'influenza dei fattori sul risultato, si possono eseguire gli opportuni test di significatività.

$V_a :=$	$\left  \frac{r_1 + r_2 + r_3 + r_4}{4} - \frac{r_5 + r_6 + r_7 + r_8}{4} \right $	$V_a = 2.70 \cdot 10^{-2}$
$V_b :=$	$\left  \frac{r_1 + r_2 + r_5 + r_6}{4} - \frac{r_3 + r_4 + r_7 + r_8}{4} \right $	$V_b = 3.50 \cdot 10^{-3}$
$V_c :=$	$\left  \frac{r_1 + r_3 + r_5 + r_7}{4} - \frac{r_2 + r_4 + r_6 + r_8}{4} \right $	$V_c = 5.00 \cdot 10^{-4}$
$V_d :=$	$\left  \frac{r_1 + r_2 + r_7 + r_8}{4} - \frac{r_3 + r_4 + r_5 + r_6}{4} \right $	$V_d = 2.00 \cdot 10^{-3}$
$V_e :=$	$\left  \frac{r_1 + r_3 + r_6 + r_8}{4} - \frac{r_2 + r_4 + r_5 + r_7}{4} \right $	$V_e = 1.30 \cdot 10^{-2}$
$V_f :=$	$\left  \frac{r_1 + r_4 + r_5 + r_8}{4} - \frac{r_2 + r_3 + r_6 + r_7}{4} \right $	$V_f = 1.50 \cdot 10^{-3}$
$V_g :=$	$\left  \frac{r_1 + r_4 + r_6 + r_7}{4} - \frac{r_2 + r_3 + r_5 + r_8}{4} \right $	$V_g = 1.00 \cdot 10^{-3}$

I test forniscono i risultati a lato. Le differenze  $V_a$  e  $V_e$  risultano maggiori del valore critico,  $t_{1-\alpha/2,9} = 2,26$ .

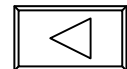
$$\frac{(\sqrt{4} \cdot V_a)}{\sqrt{2 \cdot 2.42 \cdot 10^{-3}}} = 15.78 \quad \frac{(\sqrt{4} \cdot V_e)}{\sqrt{2 \cdot 2.42 \cdot 10^{-3}}} = 7.60 \quad \frac{(\sqrt{4} \cdot V_b)}{\sqrt{2 \cdot 2.42 \cdot 10^{-3}}} = 2.05$$

$$\frac{(\sqrt{4} \cdot V_f)}{\sqrt{2 \cdot 2.42 \cdot 10^{-3}}} = 0.88 \quad \frac{(\sqrt{4} \cdot V_c)}{\sqrt{2 \cdot 2.42 \cdot 10^{-3}}} = 0.29 \quad \frac{(\sqrt{4} \cdot V_g)}{\sqrt{2 \cdot 2.42 \cdot 10^{-3}}} = 0.58$$

$$\frac{(\sqrt{4} \cdot V_d)}{\sqrt{2 \cdot 2.42 \cdot 10^{-3}}} = 1.17$$

Pertanto le prestazioni del metodo in esame sono significativamente influenzate da variazioni di pH e di tempo di reazione dell'ordine di quelle arbitrariamente apportate.

Ovviamente, non sono riscontrate variazioni delle prestazioni associabili ai due fattori fittizi (g ed f). La rivalutazione della robustezza dopo aver ridotto le variazioni di livello dei due fattori a ed e, permetterà di definire le massime variazioni di livello ammissibili.



## RECUPERO

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

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

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

La dipendenza dei valori accettabili del recupero da matrice, procedura analitica e concentrazione dell'analita, è sottolineata anche nel documento EC SANCO/3030/99 - rev. 4 - 11/07/00 \*.

<b>% Principio Attivo</b>	<b>Recupero medio(%)</b>	<b>% Impurezze</b>	<b>Recupero medio (%)</b>
> 10	98 - 102	> 1	90 - 110
1-10	97 - 103	0,1 - 1	80 - 120
< 1	95 - 105	< 0,1	75 - 125
0,01 – 0,1	90 - 110		
< 0,01	80 - 120		

*\* Technical material and preparations: Guidance for generating and reporting methods of analysis in support of pre- and post-registration data requirements for Annex II (Part A, Section 4) and Annex III (part A, Section 5) of Directive 91/414.*

La Direttiva 91/414/CEE è relativa all'immissione in commercio di prodotti fitosanitari.

Il recupero può essere valutato:

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

Le procedure B e C possono essere eseguite fortificando individualmente più aliquote del campione ( $B_1$  e  $C_1$ ) o analizzando più aliquote prelevate da un campione massivo fortificato ( $B_2$  e  $C_2$ ).

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

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

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

**Procedura A:**

- analizzare N (possibilmente almeno 10) aliquote prelevate da un CRM (matrice e livello di concentrazione,  $C_{CRM}$ , il più possibile simili a quelli dei campioni reali), se possibile in condizioni di ripetibilità;
- calcolare il recupero medio,  $R_m$ , o il recupero medio percentuale,  $R_m\%$ , per mezzo dell'equazione

$$R_m = \frac{\bar{C}_{oss}}{C_{CRM}} \quad \text{oppure} \quad R_m\% = \frac{\bar{C}_{oss}}{C_{CRM}} \cdot 100$$

- calcolare l'incertezza del recupero,  $u(R_m)$ , per mezzo dell'equazione

$$u(R_m) = R_m \cdot \sqrt{\left(\frac{s_{oss}^2}{N \cdot (\bar{C}_{oss})^2}\right) + \left(\frac{u(C_{CRM})}{C_{CRM}}\right)^2}$$

$\bar{C}_{oss}$  : media dei risultati delle N aliquote di CRM;  $s_{oss}$  : deviazione standard dei risultati relativi al CRM;  $u(C_{CRM})$  : incertezza standard di  $C_{CRM}$ .

**ESEMPIO N. 26** – Si desidera valutare il recupero di un metodo di analisi del mercurio in campioni di capelli mediante AAS. Allo scopo sono eseguite sei analisi replicate di un materiale di riferimento certificato (BCR CRM397, elementi in tracce in capelli umani) contenente la concentrazione di mercurio  $C_{\text{Hg}} = 12.3 \text{ mg/kg}$ .

Il risultato è  $C_{\text{Hg}} = 10.21 \pm 0,44 \text{ mg/kg}$  ( $\alpha = 0.05$ ;  $\nu = 5$ ).

Il recupero percentuale risulta uguale a:

$$R_m = \frac{10,21}{12,3} = 0,83$$

$$R_m \% = \frac{10,21}{12,3} \cdot 100 = 83,0\%$$

A questi livelli di concentrazione il risultato è accettabile. Infatti l'AOAC ammette un recupero del 80-110%.

**Procedura B<sub>1</sub>:**

- eseguire N (possibilmente almeno 10) analisi replicate di aliquote del bianco dopo averle fortificate singolarmente con la stessa quantità,  $m_{\text{spk}}$ , di analita (nell'intervallo di concentrazione di interesse);
- calcolare il recupero medio,  $R_m$ , per mezzo dell'equazione

$$R_m = \frac{\overline{m}_{\text{oss}}}{m_{\text{spk}}}$$

- calcolare l'incertezza del recupero,  $u(R_m)$ , per mezzo dell'equazione

$$u(R_m) = R_m \cdot \sqrt{\left(\frac{s_{\text{oss}}^2}{N \cdot (\overline{m}_{\text{oss}})^2}\right) + \left(\frac{u(m_{\text{spk}})}{m_{\text{spk}}}\right)^2}$$

$\overline{m}_{\text{oss}}$  : quantità media recuperata dalle N aliquote;  $s_{\text{oss}}$  : deviazione standard delle quantità recuperate;  
 $u(m_{\text{spk}})$  : incertezza della quantità di analita aggiunto nella fortificazione.

### Procedura B<sub>2</sub>:

- analizzare N (possibilmente almeno 10) aliquote prelevate da un campione massivo di bianco fortificato con la concentrazione C<sub>spk</sub> di analita (nell'intervallo di concentrazione di interesse);
- calcolare il recupero medio, R<sub>m</sub>, per mezzo dell'equazione

$$R_m = \frac{\bar{C}_{oss}}{C_{spk}}$$

- calcolare l'incertezza del recupero, u(R<sub>m</sub>), per mezzo dell'equazione

$$u(R_m) = R_m \cdot \sqrt{\left(\frac{s_{oss}^2}{N \cdot (\bar{C}_{oss})^2}\right) + \left(\frac{u(C_{spk})}{C_{spk}}\right)^2}$$

$\bar{C}_{oss}$  : media dei risultati delle analisi delle diverse aliquote;

$s_{oss}$  : deviazione standard dei risultati delle analisi replicate;

$u(C_{spk})$  : incertezza della quantità di analita aggiunto nella fortificazione.

**Procedura C<sub>1</sub>:**

- analizzare N (possibilmente almeno 10) aliquote del campione reale massivo fortificate individualmente con la concentrazione C<sub>spk(i)</sub> di analita;
- calcolare i recuperi, R<sub>i</sub>, per mezzo dell'equazione

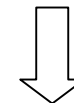
$$R_{(i)} = \frac{C_{\text{oss}(i)} - C_{\text{nativo}}}{C_{\text{spk}(i)}}$$

- calcolare il recupero medio per mezzo dell'equazione

$$R_m = \frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N R_{(i)}$$

C<sub>oss(i)</sub> : risultato ottenuto analizzando l'aliquota i<sup>esima</sup>;

C<sub>spk(i)</sub> : fortificazione dell'aliquota i<sup>esima</sup>.



**Procedura  $C_1$  (continua):**

- calcolare l'incertezza del recupero mediante la formula

$$u(R_m) = \sum_{i=1}^N \left[ \frac{1}{N} \cdot \frac{1}{C_{\text{spk}(i)}} \cdot u(C_{\text{oss}(i)}) \right]^2 + \left[ \frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N \frac{1}{C_{\text{spk}(i)}} \right]^2 \cdot u(C_{\text{nativo}})^2 +$$

$$+ \sum_{i=1}^N \left[ \frac{1}{N} \cdot \frac{(C_{\text{oss}(i)} - C_{\text{nativo}})}{C_{\text{spk}(i)}^2} \cdot u(C_{\text{spk}(i)}) \right]^2$$

che può essere semplificata a

$$u(R_m) = \frac{1}{C_{\text{spk}}} \cdot \sqrt{\frac{\overline{u(C_{\text{oss}(i)})}^2}{N} + u(C_{\text{nativo}})^2}$$

se  $u(C_{\text{spk}(i)}) \ll u(C_{\text{oss}(i)})$  e di  $u(C_{\text{nativo}})$ , se la deviazione standard delle  $C_{\text{spk}(i)} \ll$  della media dei valori di  $C_{\text{spk}(i)}$  e se le stime di  $u(C_{\text{oss}(i)})$  sono dello stesso ordine di grandezza.

$u(C_{\text{spk}(i)})$ ,  $u(C_{\text{nativo}})$ ,  $u(C_{\text{oss}(i)})$ : incertezze standard di  $C_{\text{spk}(i)}$ ,  $C_{\text{nativo}}$  e, rispettivamente,  $C_{\text{oss}(i)}$ .

**Procedura C<sub>2</sub>:**

- analizzare N (possibilmente almeno 10) aliquote del campione reale massivo dopo fortificazione con la concentrazione C<sub>spk</sub> di analita;
- calcolare il recupero medio, R<sub>m</sub>, per mezzo dell'equazione

$$R_m = \frac{\bar{C}_{\text{oss}} - \bar{C}_{\text{nativo}}}{C_{\text{spk}}}$$

- calcolare l'incertezza del recupero, u(R<sub>m</sub>), per mezzo dell'equazione

$$u(R_m) = R_m \cdot \sqrt{\frac{\frac{s_{\text{oss}}^2}{N} + s_{\text{nativo}}^2}{(\bar{C}_{\text{oss}} - \bar{C}_{\text{nativo}})^2} + \left(\frac{u(C_{\text{spk}})}{C_{\text{spk}}}\right)^2}$$

$\bar{C}_{\text{oss}}$  : media delle analisi delle diverse aliquote;

$s_{\text{oss}}$  : deviazione standard dei risultati (C<sub>oss<sub>i</sub></sub>) delle analisi replicate

$\bar{C}_{\text{nativo}}$  : concentrazione media di analita nativo;

$s_{\text{nativo}}$  : deviazione standard della media dell'analita nativo;

$u(C_{\text{spk}})$  : incertezza standard della quantità di analita aggiunto nella fortificazione.

**ESEMPIO N. 27** – Si desidera valutare il recupero di un metodo di analisi del piombo in campioni di vino rosè mediante voltammetria di ridissoluzione anodica con impulsi differenziali (DPASV). Allo scopo, sono analizzate 10 aliquote di un campione commerciale fortificato con  $C_{\text{spk}} = 3,2$  ng/g di piombo (tempo di equilibratura\*: 24 h). I risultati sono i seguenti:

\* Vedere testo a lato

C(ng/g): 13,37; 14,11; 14,82; 12,43; 13,72, 14,90; 13,77; 13,71; 12,66; 15,33.

Stimare il recupero medio e la sua incertezza sapendo che  $C_{\text{nativo}} = 10,6 \pm 0,5$  ng/g ( $\alpha$ : 0,05;  $\nu$ : 9) e che  $u(C_{\text{spk}})_{k=2} = 0,2$  ng/g.

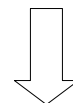
Media e deviazione standard delle 10 analisi sono, rispettivamente:

$$\bar{C}_{\text{oss}} = 13,882 \text{ ng/g}$$

$$s_{\text{oss}} = 0,943 \text{ ng/g}$$

Il recupero risulta uguale a:

$$R_m = \frac{(13.882 - 10.6)}{3.2} = 1,026$$



L'incertezza standard dell'analita nativo è:

$$t_{1-\frac{\alpha}{2},9} = 2,262 \quad s_{\text{nativo}} = \frac{0,5 \cdot \sqrt{10}}{2,262} = 0,699 \text{ ng/g}$$

L'incertezza standard del recupero medio è uguale a:

$$u(R_m) = \sqrt{\frac{0,943^2}{10} + 0,699^2} + \left(\frac{0,1}{3,2}\right)^2 = 0,237$$

L'incertezza del recupero è spesso una componente importante dell'incertezza standard combinata.

**Procedura D:**

- analizzare almeno 5 volte un campione reale tipico con il metodo in esame e con un metodo standard di cui è nota l'incertezza di misura,  $u(C_{\text{std}})$ ;
- calcolare il recupero medio,  $R_m$ , per mezzo dell'equazione

$$R_m = \frac{\overline{C}_{\text{metodo}}}{C_{\text{std}}}$$

- calcolare l'incertezza del recupero,  $u(R_m)$ , per mezzo dell'equazione

$$u(R_m) = R_m \cdot \sqrt{\frac{s_{\text{metodo}}^2}{N \cdot \overline{C}_{\text{metodo}}^2} + \left(\frac{u(C_{\text{std}})}{C_{\text{std}}}\right)^2}$$

I simboli hanno il loro significato abituale.

Per valutare se il recupero è significativamente differente dal 100% (o da 1) è possibile ricorrere ad un test-t. Allo scopo, il valore sperimentale ottenuto per mezzo dell'equazione

$$t = \frac{|1 - R_m|}{u(R_m)}$$

deve essere confrontato con il valore critico di t (a due code) per l'appropriato livello di fiducia e gli appropriati gradi di libertà ( ). Se t risulta inferiore a  $t_{1-\alpha/2, v}$ , allora  $R_m$  non è significativamente diverso da 1 (o dal 100%).

Se, al contrario, t risulta maggiore di  $t_{1-\alpha/2, v}$ , e quindi  $R_m$  è significativamente diverso da 1 (o dal 100%), e se il risultato dell'analisi è corretto per il recupero

$$C_{\text{corr}} = C_{\text{calc}} \cdot \frac{100}{R_m \%} = \frac{C_{\text{calc}}}{R_m}$$

allora l'incertezza composta del risultato corretto diventa

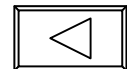
$$u(C)_{\text{corr}} = C_{\text{corr}} \cdot \sqrt{\left(\frac{u(C)}{C}\right)^2 + \left(\frac{u(R_m)}{R_m}\right)^2}$$

**ESEMPIO N. 28** – Si desidera valutare l'incertezza di misurazione, corretta per il recupero, di un metodo per la determinazione degli ormoni nell'urina bovina. L'incertezza standard composta del metodo, a livelli di concentrazione dell'ordine di 12,8 µg/L, è stata stimata uguale a  $\pm 3,2$  µg/L. Allo scopo, il recupero viene stimato mediante analisi in doppio delle urine di 6 animali diversi per razza, provenienza, sesso ed età dopo opportuna fortificazione. Il recupero medio e la sua deviazione standard sono risultati uguali rispettivamente a 71% e 23%. Valutare l'incertezza composta corretta.

L'incertezza corretta risulta uguale a

$$u(y)_{\text{corr}} = 12,8 \cdot \sqrt{\left(\frac{3,2}{12,8}\right)^2 + \left(\frac{23}{71}\right)^2} = 5,238$$

La considerazione del recupero porta ad un aumento di circa il 60% dell'incertezza composta del risultato (e di quella estesa).



## CARTE DI CONTROLLO

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

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

Nel laboratorio di prova e taratura, il monitoraggio della stabilità di una procedura analitica può essere eseguito mediante l'uso di uno strumento semplice ma estremamente potente, ovvero delle **carte di controllo**.

La costruzione delle carte di controllo richiede la disponibilità di un materiale di controllo (CM). I CM possono essere materiali di riferimento certificati (situazione ottimale ma spesso non realizzabile), materiali preparati allo scopo dal laboratorio, bianchi o, in determinati casi, campioni reali, e devono essere disponibili in quantità sufficiente a permettere il prelievo e l'analisi di numerosi campioni di controllo (CS). La composizione complessiva ed il livello di concentrazione dell'analita nel materiale di controllo devono riflettere adeguatamente la natura chimica dei campioni reali da analizzare.

Nel caso più semplice, i parametri utili alla definizione dei limiti di attenzione e di azione sono ricavati analizzando un numero adeguato di volte (almeno 15 – 20 volte) lo stesso campione di controllo.

La carta viene quindi posta in uso. Allo scopo, i campioni di controllo devono essere inseriti in ordine casuale, all'interno dei campioni di ogni corsa (analitica).

L'analisi del campione di controllo può essere eseguita in giorni diversi, o da operatori diversi, in modo da permettere la considerazione di eventuali derive temporali o della diversa manualità degli operatori.

**CORSA N. 1**

campione 1<sub>1</sub>  
 campione 2<sub>1</sub>  
 ...  
 CS  
 ...  
 campione N<sub>1</sub>

**CORSA N. 2**

CS  
 campione 1<sub>2</sub>  
 campione 2<sub>2</sub>  
 ...  
 campione N<sub>2</sub>

**CORSA N. 3**

campione 1<sub>3</sub>  
 ...  
 CS  
 ...  
 campione N<sub>3</sub>

A seconda delle necessità imposte dall'utilizzazione dei risultati delle misurazioni, si può decidere di eseguire, per esempio

- più di due analisi in doppio del CM per corsa
- un'analisi in doppio del CM per corsa
- un'analisi singola del CM per corsa

Il risultato delle analisi dei CS deve essere immediatamente riportato sulla carta di controllo, e la sua accettabilità deve essere valutata in base ad opportune regole di controllo.

Se il risultato dell'analisi del CS non può essere accettato, tutti i risultati relativi ai campioni reali analizzati nell'ambito della stessa corsa devono essere considerati potenzialmente errati e quindi rifiutati. Questi campioni devono essere rianalizzati dopo aver identificato le cause che hanno determinato il rifiuto del risultato del CS, ovvero dopo aver riportato il sistema analitico sotto controllo statistico.

Dopo aver eseguito 10 – 15 corse, conviene ricalcolare parametri e limiti di controllo aggiungendo i nuovi risultati relativi al CS a quelli ottenuti nel corso della preparazione della carta. La nuova carta potrà essere quindi usata nelle analisi di routine.

Le carte di controllo più note sono le *carte di Shewhart*. La più semplice è quella per risultati singoli. Per costruirla, è necessario eseguire un numero adeguato di analisi del campione di controllo ( $N \geq 20$ ), calcolare il valore medio,  $\mu$ , il *range mobile medio* e la deviazione standard,  $\sigma$ .

Avendo eseguito le  $N$  misurazioni del CM si applicano le equazioni

$$\mu = \frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N x_i \quad \bar{R}_M = \frac{1}{(N-1)} \cdot \sum_{j=2}^N |x_j - x_{j-1}| \quad \sigma = \frac{\bar{R}_M}{d_2}$$

dove  $d_2$  è il fattore di correzione per il quale deve essere diviso il range mobile medio per ottenere  $\sigma$ .

I valori di  $1/d_2$  sono tabulati in funzione del numero di analisi replicate del CM eseguite in ogni corsa,  $n$ , usate per valutare il range:

<b>n</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>10</b>
<b>1/d<sub>2</sub></b>	<b>0,8862</b>	<b>0,5907</b>	<b>0,4857</b>	<b>0,4299</b>	<b>0,3249</b>

L'uso del valore di  $\sigma$  ottenuto dal range mobile al posto di quello calcolabile tradizionalmente (mediante la nota formula per il calcolo della deviazione standard) è giustificato dal fatto che in tal modo si minimizza ogni possibile deriva temporale.

**ESEMPIO N. 29** – Stimare i parametri di controllo,  $\mu$  e  $\sigma$ , per la costruzione di una carta di Shewhart per risultati singoli. Allo scopo un campione di controllo viene analizzato 25 volte (N). I risultati (u.a.) sono i seguenti:

$x_1: 25,15; x_2: 25,01; x_3: 24,92; x_4: 25,37; x_5: 25,00; x_6: 25,01; x_7: 24,94;$   
 $x_8: 25,31; x_9: 24,94; x_{10}: 24,94; x_{11}: 25,11; x_{12}: 25,28; x_{13}: 25,00; x_{14}: 24,87$   
 $x_{15}: 25,05; x_{16}: 24,98; x_{17}: 25,06; x_{18}: 24,80; x_{19}: 25,32; x_{20}: 25,17; x_{21}: 24,72;$   
 $x_{22}: 24,93; x_{23}: 25,02; x_{24}: 25,12; x_{25}: 25,13.$

Il range mobile medio ( $n = 2$ ) risulta uguale a  $\bar{R}_M = \frac{1}{24} \cdot \sum_{j=2}^{25} |x_j - x_{j-1}| = 0,197 \text{ u.a.}$

La deviazione standard risulta quindi uguale a  $\sigma = \bar{R}_M \cdot 0,8862 = 0,175 \text{ u.a.}$

Quella calcolata tradizionalmente sarebbe  $s = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{N-1}} = 0,161 \text{ u.a.}$

Sulla base dei parametri di controllo così stimati, è possibile disegnare la carta di controllo. Allo scopo sono riportati in grafico il valore medio e due coppie di linee a:

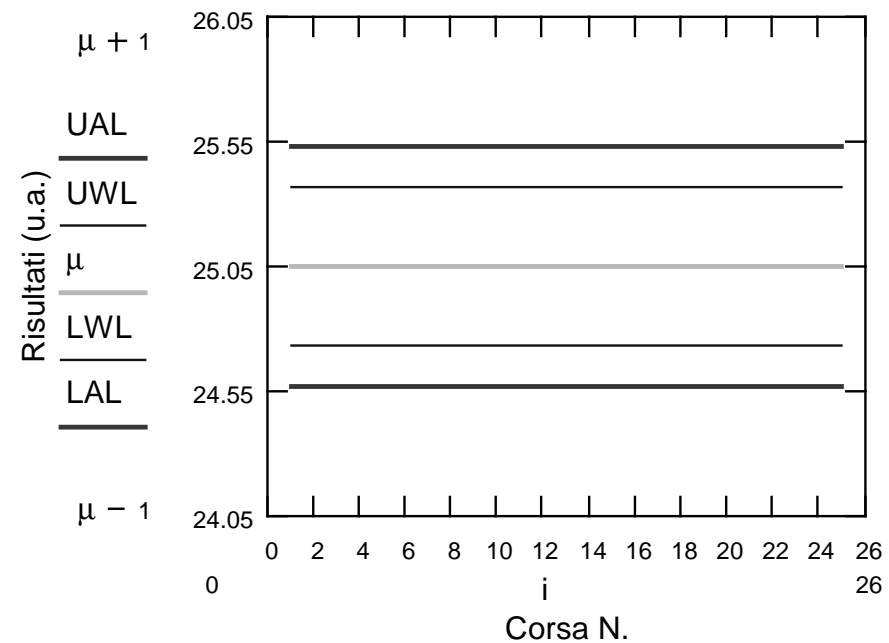
$\mu+2\sigma$ : linea superiore di attenzione (UWL, upper warning line)

$\mu-2\sigma$  : linea inferiore di attenzione (LWL, lower warning line)

$\mu+3\sigma$ : linea superiore di azione (UAL, upper action line)

$\mu-3\sigma$  : linea inferiore di azione (LAL, lower action line)

Il grafico risultante è il seguente:



## Regole di Westgard

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

*Infatti, esistono solo 5 probabilità su 100 che un valore misurato per un campione di controllo, analizzato durante una corsa analitica, esca dall'intervallo  $\mu \pm 2s$ .*

$1_{3s}$  : la serie viene rifiutata quando una misura di controllo cade fuori dell'intervallo  $\mu \pm 3s$ .

*Infatti, esistono solo 0,3 probabilità su 100 che un valore misurato per un campione di controllo, analizzato durante una corsa analitica, esca dall'intervallo  $\mu \pm 3s$ .*

J.O. Westgard, P.L. Barry, *Cost-effective quality control: managing the quality and productivity of analytical processes*, AACC Press, Washington, DC (1986)

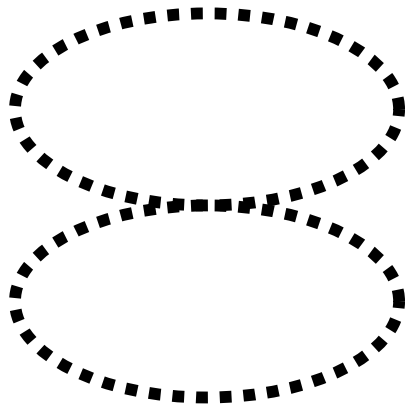
Esistono altre regole di Westgard:

**2<sub>2s</sub>** : la serie viene rifiutata quando due misure di controllo successive cadono fuori dell'intervallo  $\mu \pm 2s$ ;

**R<sub>4s</sub>** : la serie viene rifiutata quando la differenza tra due misure di controllo successive supera il valore di  $4s$ ;

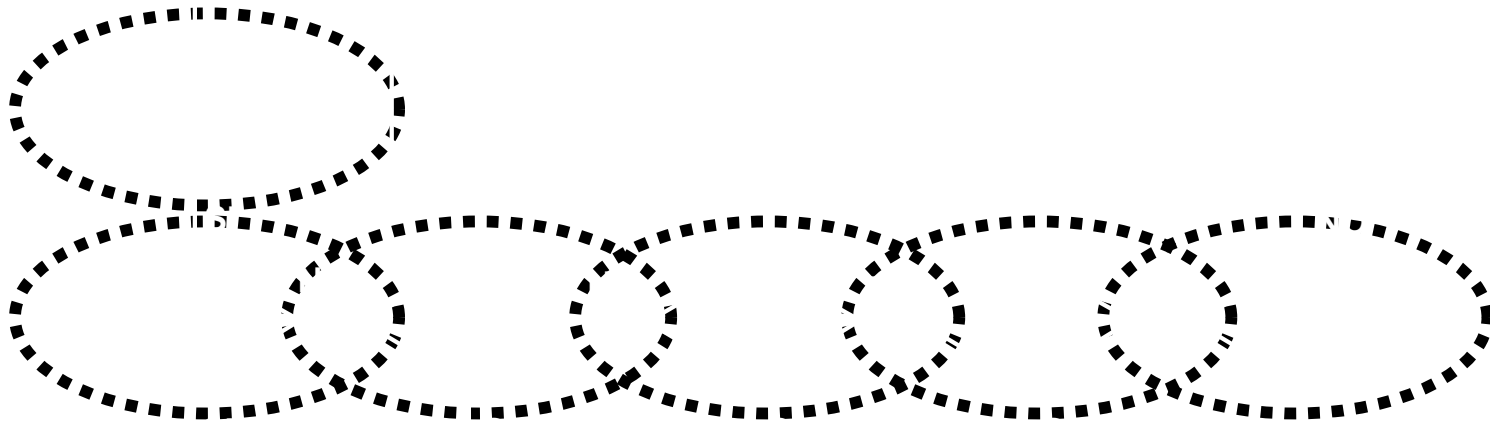
**4<sub>1s</sub>** : la serie viene rifiutata quando quattro misure di controllo successive cadono fuori dello stesso limite,  $+1s$  o  $-1s$ ;

**10x<sub>m</sub>** : la serie viene rifiutata quando dieci misure di controllo successive cadono dalla stessa parte del valore medio.



Schema decisionale adottato nel caso si scelga di applicare solo le prime due regole di Westgard ( $1_{2s}$  e  $1_{3s}$ ).

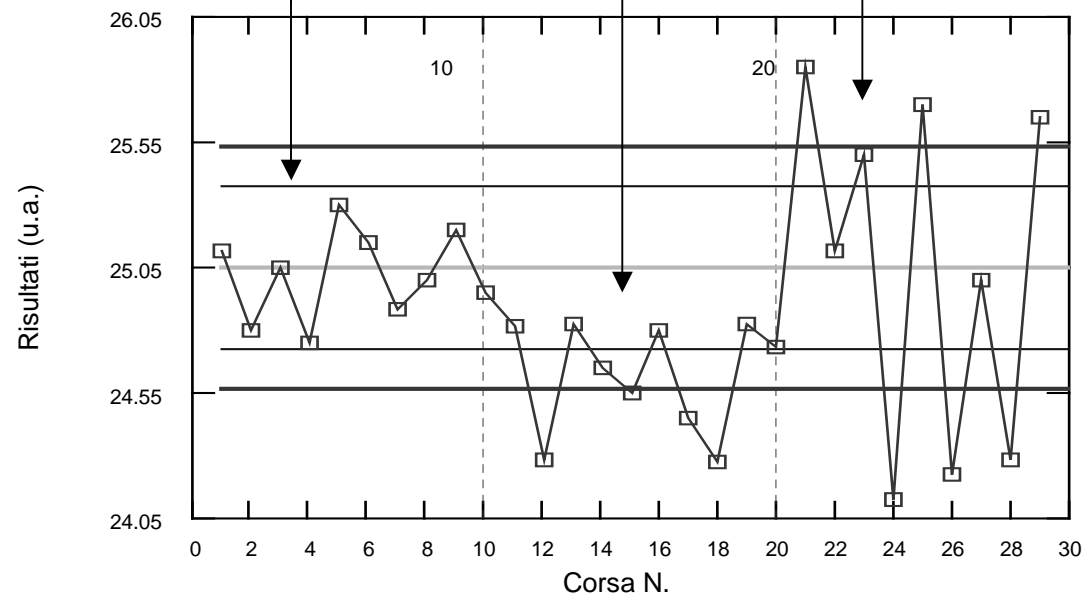
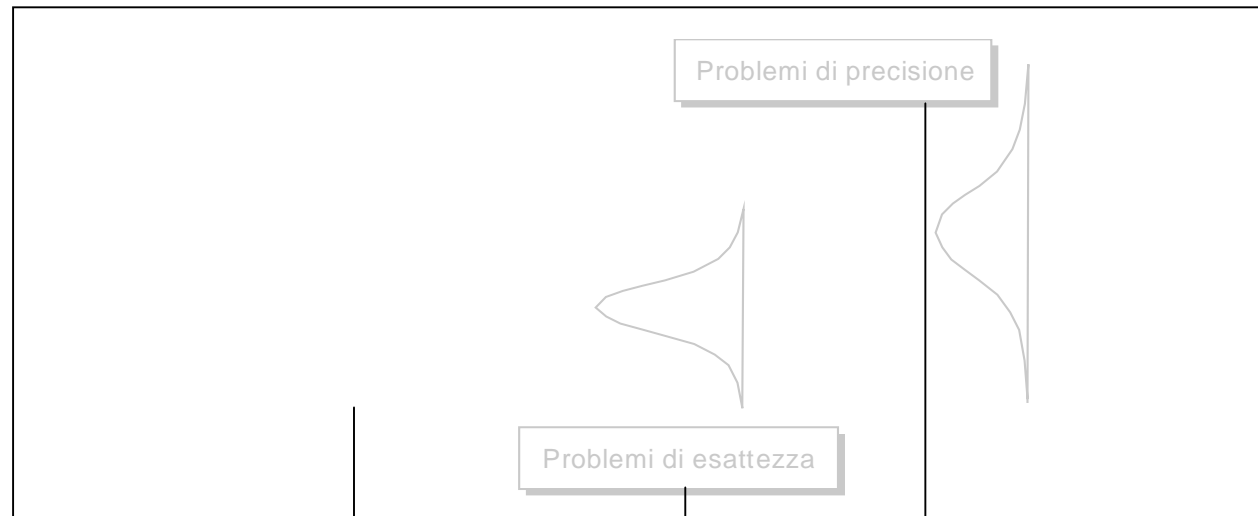
Qualora si scelga di applicarle tutte, lo schema decisionale è invece questo.



## Carta di Shewhart per risultati singoli

In linea di principio, la carta di Shewhart per risultati singoli permette di evidenziare sia problemi di precisione che di bias, come evidenziato nella carta di Shewhart costruita con i seguenti risultati:

25,11; 24,80; 25,05;  
24,75; 25,30; 25,15;  
24,88; 25,00; 25,20;  
24,95; 24,81; 24,28;  
24,82; 24,65; 24,55;  
24,80; 24,45; 24,27;  
24,82; 24,73; 25,85;  
25,11; 25,50; 24,12;  
25,70; 24,22; 25,00;  
24,28; 25,65.



Se possibile, è meglio costruire la carta di Shewhart delle medie. In tal caso la media  $\mu$  usata nel caso della carta per risultati singoli deve essere sostituita dalla grande media

$$\bar{\mu} = \frac{1}{k} \cdot \sum_{i=1}^k \bar{x}_i$$

(in cui  $k$  è il numero di analisi del CM eseguite per stimare ogni media).

Per quanto riguarda la deviazione standard, esistono diverse possibilità:

- nel caso di misurazioni duplicate del CM è possibile stimare  $\sigma$  tramite il range mobile medio (come nel caso della carta per misurazioni singole);
- dopo aver eseguito numerose misurazioni sul CM,  $\sigma$  può essere stimata come deviazione standard raggruppata;
- più frequentemente viene suggerito di applicare il principio di additività della varianza e quindi di valutare  $\sigma$  mediante la formula

ovvero come media delle deviazioni standard stimate dalle misure ottenute entro ciascuna corsa.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^k s_j^2}{k}}$$

La carta di controllo viene poi tracciata riportando in grafico la grande media e due coppie di linee:

$$\bar{\mu} + 2 \frac{\sigma}{\sqrt{k}} \quad \text{linea superiore di attenzione (UWL, upper warning line)}$$

$$\bar{\mu} - 2 \frac{\sigma}{\sqrt{k}} \quad \text{linea inferiore di attenzione (LWL, lower warning line)}$$

$$\bar{\mu} + 3 \frac{\sigma}{\sqrt{k}} \quad \text{linea superiore di azione (UAL, upper action line)}$$

$$\bar{\mu} - 3 \frac{\sigma}{\sqrt{k}} \quad \text{linea inferiore di azione (LAL, lower action line)}$$

Come già sottolineato, i limiti di controllo stabiliti nella fase iniziale del lavoro possono essere rivisti al termine del periodo iniziale di valutazione. Qualora il controllo statistico debba rispondere a criteri stringenti, conviene cancellare le medie che cadono al di fuori delle linee di azione e ridisegnare la carta di controllo usando i valori di  $\mu$  e  $\sigma$  corretti.

**ESEMPIO N. 30** – Stimare i parametri di controllo,  $\mu$  e  $\sigma$ , per la costruzione di una carta di Shewhart delle medie. Allo scopo un campione di controllo viene analizzato 20 volte in doppio. I risultati medi (mg/L) delle 20 misurazioni in doppio sono i seguenti (tra parentesi le deviazioni standard corrispondenti):

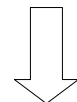
$x_1$ : 51,3 (1,5);  $x_2$ : 50,1 (1,7);  $x_3$ : 49,2 (1,3);  $x_4$ : 53,9 (1,5);  $x_5$ : 50,0 (2,1);  
 $x_6$ : 50,1 (1,4);  $x_7$ : 49,4 (1,5);  $x_8$ : 53,8 (1,7);  $x_9$ : 49,4 (2,2);  $x_{10}$ : 49,4 (1,3);  
 $x_{11}$ : 51,1 (1,5);  $x_{12}$ : 52,8 (2,5);  $x_{13}$ : 50,0 (2,2);  $x_{14}$ : 48,7 (1,8);  $x_{15}$ : 50,5 (1,8);  
 $x_{16}$ : 49,8 (1,7);  $x_{17}$ : 50,6 (2,5);  $x_{18}$ : 47,0 (1,6);  $x_{19}$ : 53,2 (1,9);  $x_{20}$ : 51,7 (1,5).

La grande media è uguale a

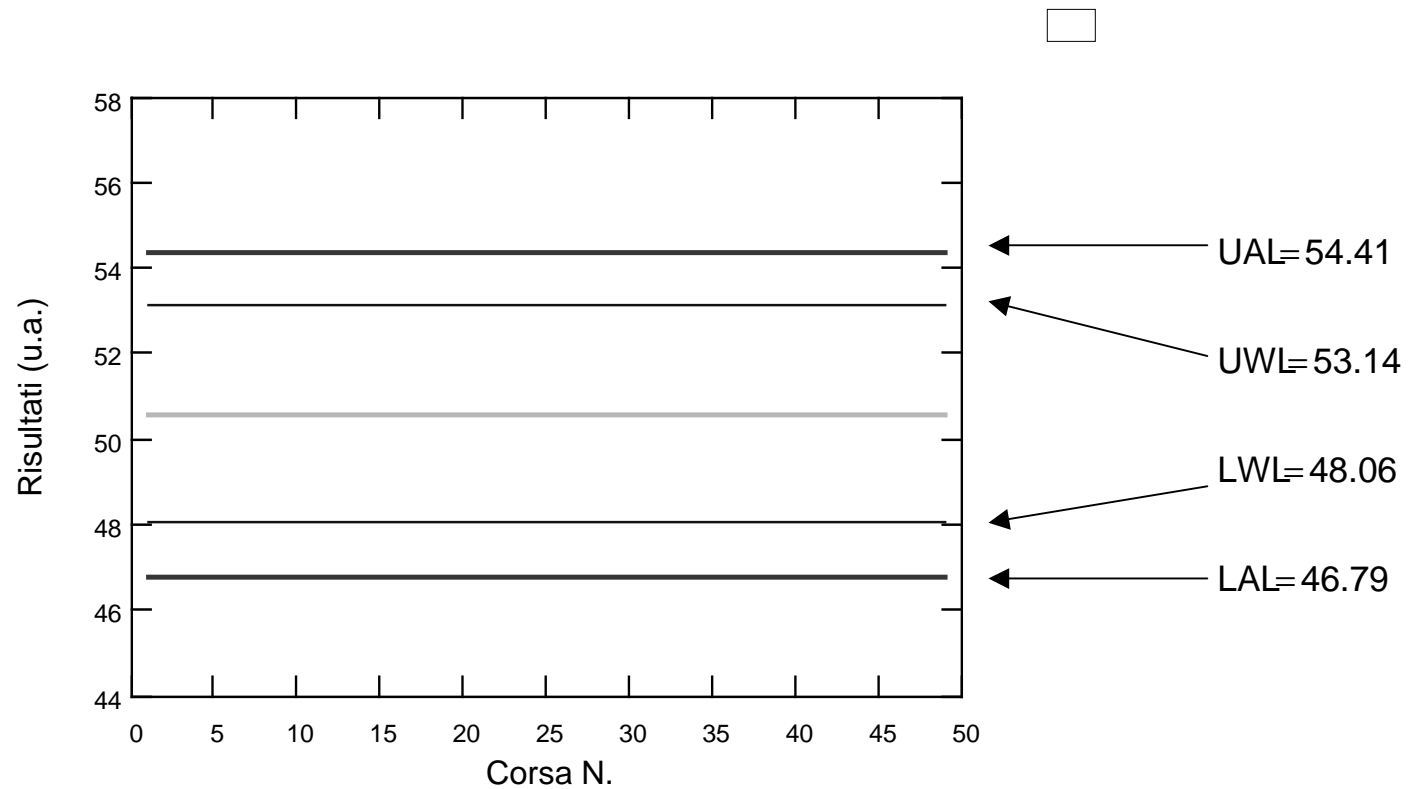
$$\bar{\mu} = \frac{1}{20} \cdot \sum_{j=1}^{20} \mu_j = 50,60 \text{ mg/L}$$

La deviazione standard, stimata come radice quadrata della varianza media, risulta uguale a

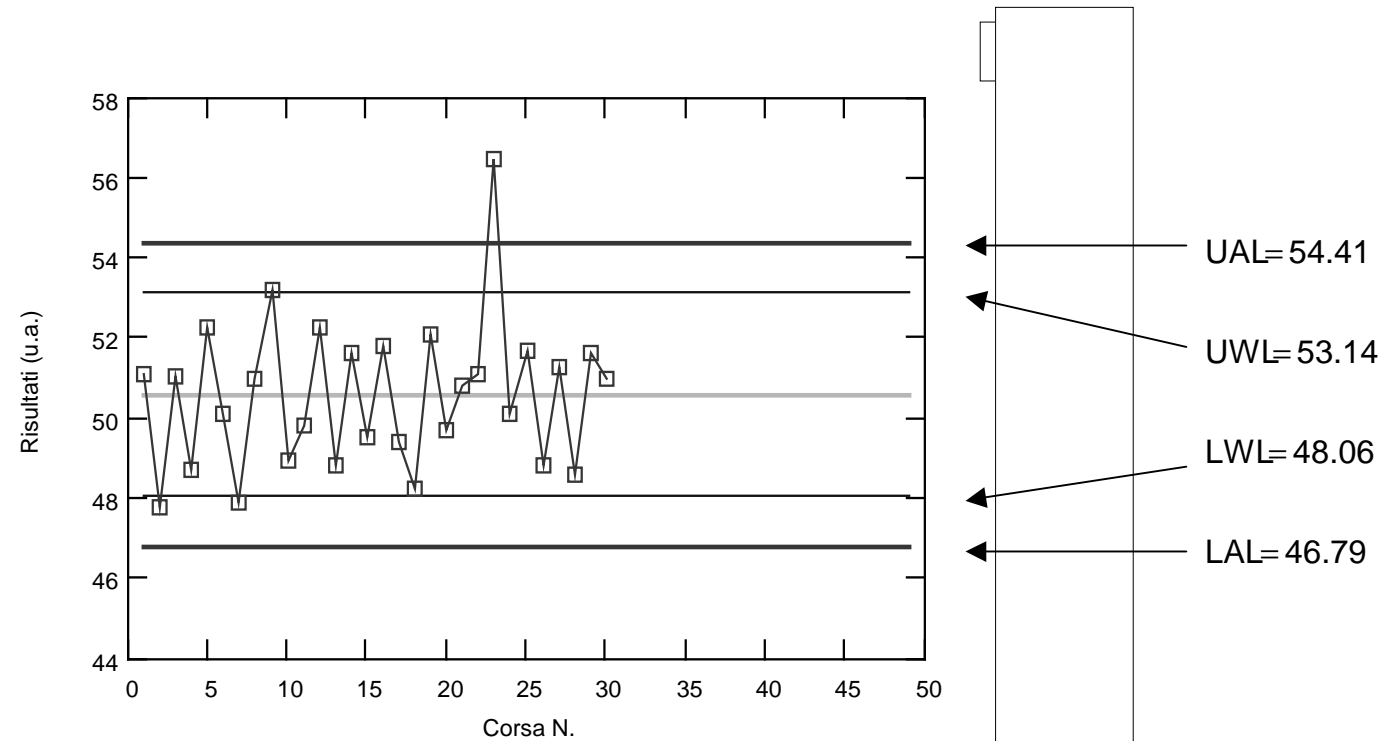
$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum s_i^2}{20}} = 1,796 \text{ mg/L}$$



La carta di Shewhart delle medie è riportata qui di seguito:



La carta viene quindi usata nelle analisi di routine.



Il risultato della 23<sup>a</sup> corsa è rifiutato. Dopo aver rimediato all'errore, il sistema ritorna in condizioni di controllo statistico.

La carta-R o carta del range serve a mantenere sotto controllo la precisione. Per le applicazioni normali del laboratorio analitico, il range viene generalmente stimato come valore medio delle differenze assolute,  $R_i$ , tra i risultati di un numero adeguato di misurazioni replicate.

Allo scopo, dopo aver eseguito **N** gruppi di **n** misurazioni replicate (**n**  $\geq$  **2** in ogni gruppo) su campioni reali simili a quelli da analizzare, si valuta il range medio degli **N** range,  $R_i$  (differenza tra risultato maggiore e risultato minore delle **n** repliche eseguite in ciascun gruppo di misurazioni). Il range medio viene usato come linea centrale della carta.

$$\bar{R} = \frac{\sum_{i=1}^N R_i}{N}$$

Si calcolano poi i limiti di attenzione e di azione:

$$LWL = D_{LW} \cdot \bar{R}$$

$$LAL = D_{LA} \cdot \bar{R}$$

$$UWL = D_{UW} \cdot \bar{R}$$

$$UAL = D_{UA} \cdot \bar{R}$$

I valori utili dei fattori D per misurazioni in doppio\* sono evidenziati sotto. La combinazione **95% - 99,7%** è quella preferita in quanto corrisponde a quella usata nella carta di Shewhart ( $\pm 2s$  -  $\pm 3s$ ).

### Fattori moltiplicativi del range medio per la costruzione di carte-R

n	P=95%		P=99%		P=99,7%	
	$D_{LW}$	$D_{UW}$	$D_{LA}$	$D_{UA}$	$D_{LA}$	$D_{UA}$
<b>2</b>	<b>0.039</b>	<b>2.809</b>	0.008	3.518	<b>0</b>	<b>3.267</b>
3	0.179	2.176	0.080	2.614	0	2.575
4	0.289	1.935	0.166	2.280	0	2.282
5	0.365	1.804	0.239	2.100	0	2.115
6	0.421	1.721	0.296	1.986	0	2.004
7	0.462	1.662	0.341	1.906	0.076	1.924
8	0.495	1.617	0.378	1.846	0.136	1.864
9	0.522	1.583	0.408	1.798	0.184	1.816
10	0.544	1.555	0.434	1.760	0.223	1.777

\* La scelta di  $n = 2$  è quella più frequente in quanto è la meno onerosa.

Preparata la carta-R si passa alle operazioni su campioni reali.

All'inizio di ogni corsa, si dichiara campione di controllo uno dei campioni reali da analizzare, e lo si analizza  $n$  volte all'inizio ed alla fine della serie di  $m$  analisi di campioni reali. I range del campione di controllo sono riportati sulla carta.

$$CS_{1a.1} \dots CS_{1a.n} - S_{1.1} - S_{1.2} - S_{1.3} \dots S_{1.m} - CS_{1b.1} \dots CS_{1b.n}$$

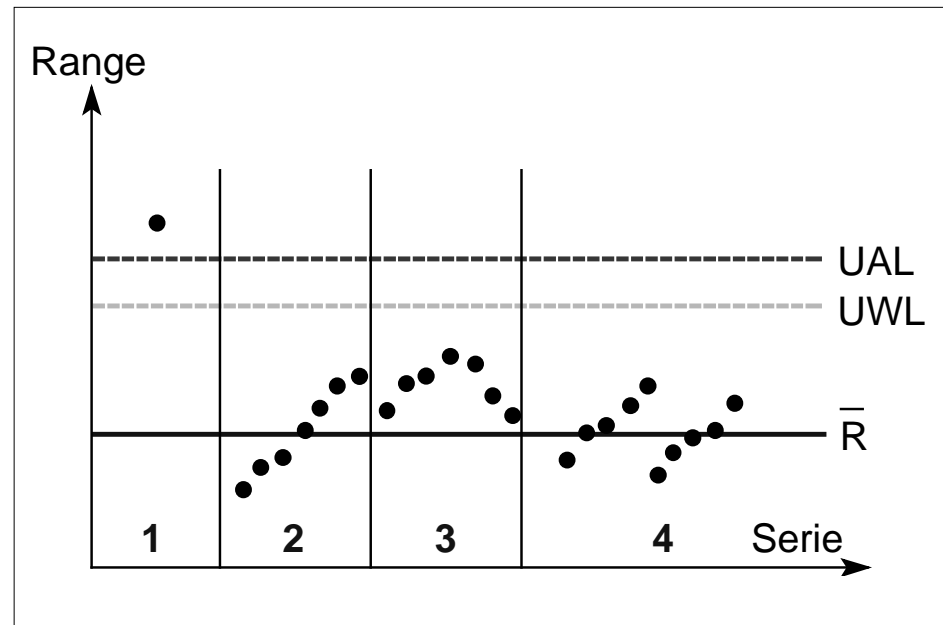
Nel caso limite, il campione di controllo viene misurato all'inizio ed alla fine della corsa. La sequenza di analisi è quindi:

$$\begin{array}{c}
 CS_{1.1} - S_{1.1} - S_{1.2} - S_{1.3} \dots S_{1.m} - CS_{1.2} \\
 \downarrow \\
 CS_{2.1} - S_{2.1} - S_{2.2} - S_{2.3} \dots S_{2.m} - CS_{2.2} \\
 \downarrow \\
 \dots\dots\dots
 \end{array}$$

I range valutati dalle prove eseguite all'inizio ed alla fine della corsa sono riportati sulla carta-R.

Il sistema è fuori controllo se:

- $R_i$  giace sopra UAL (1)
- $R_i$  giace sotto LAL (se  $LAL > 0$ )
- 7 valori consecutivi di R mostrano un trend positivo o negativo (2)
- 7 valori consecutivi giacciono sopra il range medio (3)



Il caso 4 è quello originato, per es., da invecchiamento dei reagenti o da interventi di manutenzione periodica: non indica situazioni fuori controllo!

Per costruire la carta-D, il campione di controllo (simile ai campioni in esame) deve essere analizzato  $n \geq 2$  volte nel corso di ogni gruppo di analisi sui campioni reali. Le differenze tra l'ultimo ed il primo dei risultati delle analisi replicate relative al CM, eseguite in ogni gruppo di misurazioni, dovrebbero essere distribuite casualmente attorno allo zero. Nel caso di derive temporali, l'ultimo risultato sarà sempre maggiore (o sempre minore) del primo: i punti corrispondenti alle differenze calcolate analizzando i CM saranno localizzati prevalentemente sopra o sotto la linea di zero.

I limiti di controllo possono essere calcolati

- dalla deviazione standard delle differenze

limiti di attenzione:

limiti di azione:

$$\pm 2 \cdot s_d$$

$$\pm 3 \cdot s_d$$

$$s_d = \sqrt{\frac{\sum_i (d_i - \bar{d})^2}{N_{\text{gruppi}} - 1}}$$

- dal range medio:

limiti di attenzione:

limiti di azione:

$$\pm 1,77 \cdot \bar{R} \quad (\Leftrightarrow 2s)$$

$$\pm 2,65 \cdot \bar{R} \quad (\Leftrightarrow 3s)$$

La carta delle differenze richiede l'uso di materiali di controllo stabili! Nel caso siano usati campioni reali come CM, è essenziale verificare l'assenza di variazioni fisiche, chimiche o biologiche tra le  $n$  analisi di controllo successive.

**ESEMPIO N. 31** – Nel corso dell’applicazione di un metodo FIA-PIF (Photoinduced Fluorescence detection) alla determinazione di pesticidi aromatici, si desidera verificare il mantenimento dello stato di controllo statistico.

Il range medio, valutato mediante elaborazione dei risultati di 20 analisi in doppio di un campione contenente 3,8 mg/L di diflubenzuron (scelto come CM) è risultato uguale a 0,20 mg/L.

I limiti di controllo utili per le due carte (P:95% e P: 99,7%) sono quindi uguali a:

<b>carta-R</b>	$UWL_R = 0.5618$	$LWL_R = 0.0078$
	$UAL_R = 0.6534$	$LAL_R = 0.0000$
<b>carta-D</b>	$UWL_D = 0.3540$	$LWL_D = -0.3540$
	$UAL_D = 0.5300$	$LAL_D = -0.5300$

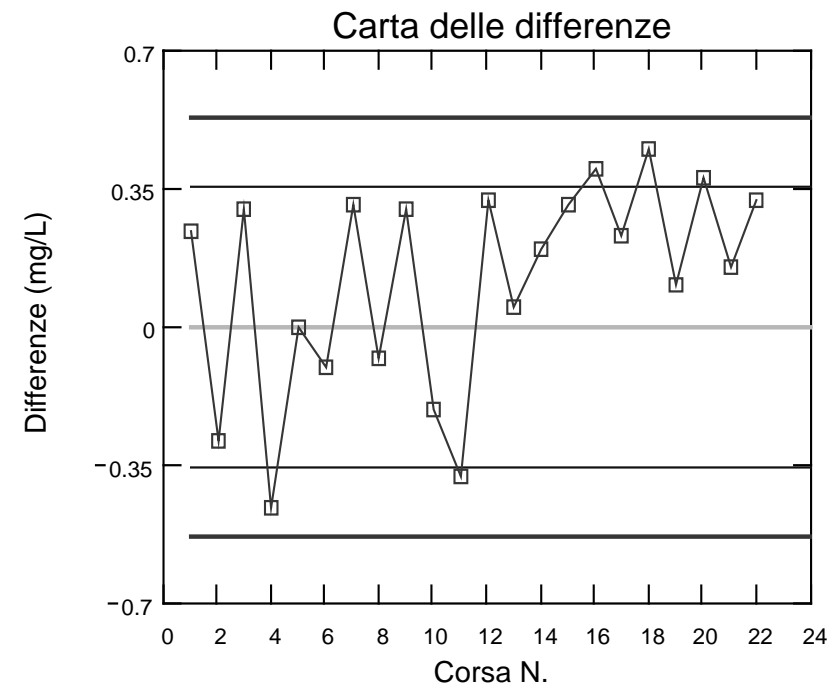
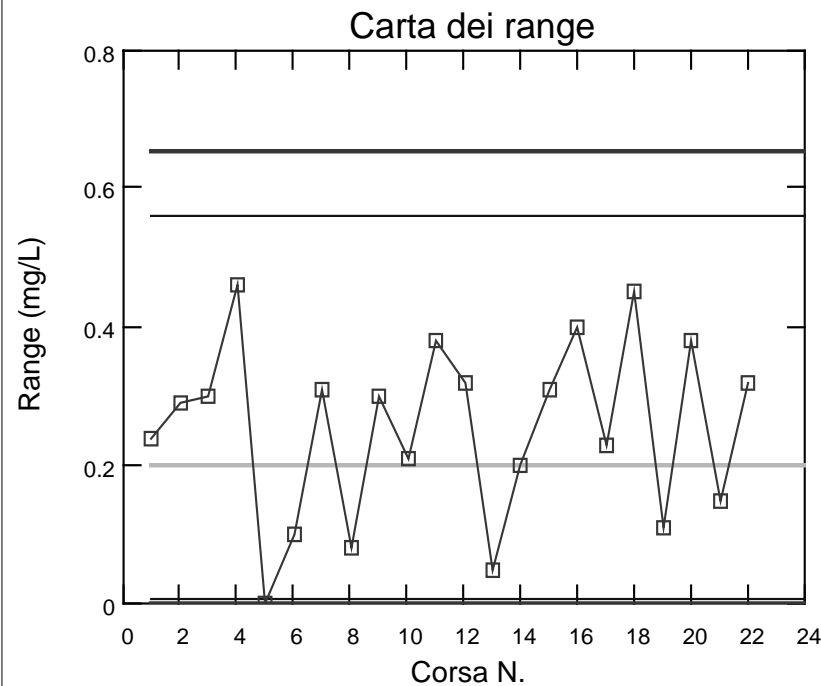
Durante il lavoro di routine, lo stesso campione reale usato come CM è analizzato in doppio, all’inizio ( $R1_i$ ) ed alla fine ( $R2_i$ ) di ogni corsa analitica; i risultati relativi alle 22 corse analitiche eseguite nelle prime due settimane di lavoro sono riportati qui a lato: →

Costruire la carta dei range e quella delle differenze.

$R1_i :=$	$R2_i :=$
3.71	3.95
3.90	3.61
4.50	4.80
3.82	3.36
3.90	3.90
4.30	4.20
3.25	3.56
4.03	3.95
4.00	4.30
4.23	4.02
3.78	3.40
3.43	3.75
3.71	3.76
4.30	4.50
4.31	4.62
3.80	4.20
4.18	4.41
3.62	4.07
3.26	3.37
3.81	4.19
3.50	3.65
3.80	4.12

La carta-R, riportata a sinistra, non evidenzia variazioni temporali della precisione: il range oscilla all'interno dell'intervallo di attenzione.

La carta-D, riportata a destra, permette invece di rilevare una deriva positiva dei risultati a partire all'incirca dalla corsa N. 13 o N. 14: da questo punto in poi tutte le differenze sono positive.



Il test di tendenza di Neumann permette di verificare eventuali derive temporali dei risultati (per esempio dovute al deterioramento del MC durante la sua conservazione o all'invecchiamento di un detector).

Il test richiede la disponibilità di un numero adeguato ( $N > 10$ ) di misure successive del campione di controllo. Per eseguire il test deve essere calcolato il valore di  $R_{\text{exp}}$

$$R_{\text{exp}} = \frac{\sum_{i=1}^{N-1} (x_{i+1} - x_i)^2}{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N-1}} = \frac{\sum_{i=1}^{N-1} (x_{i+1} - x_i)^2}{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$$

In sostanza,  $R_{\text{exp}}$  è il rapporto tra la media quadratica delle  $N-1$  differenze successive tra le  $N$  misure e la varianza delle misure stesse. Se  $R_{\text{exp}}$  è minore o uguale al valore critico tabulato per il numero di osservazioni e per un dato livello di significatività,  $R(N, \alpha)$ , si evidenzia una deriva temporale dei risultati.

**ESEMPIO N. 32** – Usando il test di tendenza di Neumann, verificare se le misure eseguite su di un CM, riportate a lato, sono caratterizzate da una deriva temporale sistemica ( $\alpha = 0,01$ ).

Il valore sperimentale di R è:

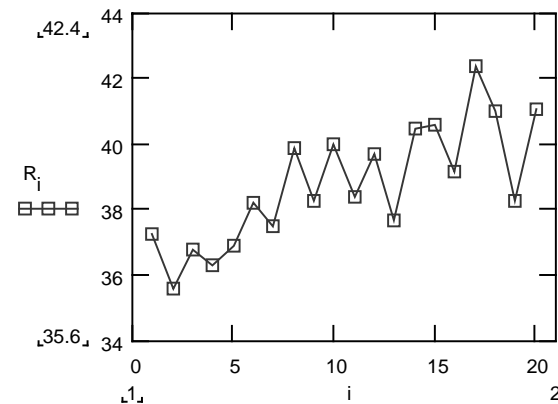
Il valore critico è

$R_{20;0,01} = 1,0406$  (vedere la corrispondente Tavola statistica).

Esiste una probabilità del 99% che le misure siano affette da deriva temporale.

D'altra parte, il risultato risulta evidente anche dall'analisi grafica.

$$R_{\text{exp}} = \frac{\sum_{i=1}^{19} (R_{i+1} - R_i)^2}{\sum_{i=1}^{20} (R_i - \bar{R})^2} = 1,0097$$



R<sub>i</sub> :=

37.3
35.6
36.8
36.3
36.9
38.2
37.5
39.9
38.3
40.0
38.4
39.7
37.7
40.5
40.6
39.2
42.4
41.0
38.3
41.1
39.6