

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Stima dell'incertezza di misura
nell'attività di controllo chimico
dei farmaci**

Andrea Rodomonte, Monica Bartolomei

Laboratorio di Chimica del Farmaco

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN

03/18

Istituto Superiore di Sanità

Stima dell'incertezza di misura nell'attività di controllo chimico dei farmaci.

Andrea Rodomonte, Monica Bartolomei

2003, 36 p. Rapporti ISTISAN 03/18

Un laboratorio di controllo chimico dei farmaci analizza, nella sua attività ufficiale, diverse tipologie di campioni, quali materie prime farmaceutiche, prodotti farmaceutici ed eccipienti. Un laboratorio ufficiale nell'ambito della propria politica della qualità deve dimostrare di conoscere e tenere sotto controllo tutti i contributi rilevanti dell'incertezza di misura di un determinato processo analitico. L'incertezza di misura è un requisito espresso nella norma ISO 17025 ed è argomento di alcune recenti linee guida redatte dal circuito internazionale dei Laboratori Ufficiali di Controllo dei Farmaci (*Official Medicines Control Laboratory*, OMCL). Questo documento ha lo scopo di fornire indicazioni sull'interpretazione e sull'applicazione della norma ISO 17025 e delle linee guida OMCL alle attività di un laboratorio ufficiale dei farmaci in campo chimico, tenendo conto sia delle attività che implicano la verifica della conformità con un limite specificato, sia delle attività diverse. Gli esempi riportati illustrano differenti aspetti della stima dell'incertezza di misura in attività sperimentali diverse da quelle che implicano la verifica della conformità di un medicinale a determinate specifiche.

Parole chiave: Incertezza di misura, Laboratorio ufficiale di controllo, Controllo di conformità, Mutuo riconoscimento dei dati, Valutazione risultati

Istituto Superiore di Sanità

Uncertainty estimation in pharmaceutical chemistry control activities.

Andrea Rodomonte, Monica Bartolomei

2003, 36 p. Rapporti ISTISAN 03/18 (in Italian)

An official pharmaceutical chemistry laboratory is required to analyse a different range of sample types including pharmaceutical substances, pharmaceutical products and excipients. The Official Medicines Control Laboratory (OMCL) is to demonstrate that it has adequate knowledge of the contributions of all the relevant aspects of the measurements process to the overall measurement uncertainty and that the laboratory has procedures in place to keep these aspects under control as part of its quality policy. Measurement uncertainty is mentioned in ISO 17025 and described in guidance documents of the network of OMCL. This document intends to give guidance for the interpretation and application of ISO 17025 and of OMCL guidelines and their pertinence to compliance testing and activities other than compliance testing performed in an official pharmaceutical chemistry laboratory. The examples illustrate different aspects of measurements uncertainty in analytical measurements referred to activities other than compliance testing.

Key words: Uncertainty in analytical measurements, Official Medicines Control Laboratory, Compliance testing, Mutual recognition of data, Evaluation of results

Si ringrazia Annalisa Montinaro per il prezioso lavoro di revisione.

Per informazioni su questo documento scrivere a: andrea.rodomonte@iss.it

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it/pubblicazioni.

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro* e *Sandra Salinetti*

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© 2003 Istituto Superiore di Sanità (Viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma)

INDICE

| | |
|--|----|
| Introduzione | 1 |
| Incertezza di misura nella norma ISO 17025 | 2 |
| Stima dell'incertezza di misura per i laboratori ufficiali di controllo chimico in campo farmaceutico | 3 |
| Controlli che implicano la verifica della conformità con un limite specificato | 3 |
| Approccio 1: materie prime..... | 4 |
| Approccio 2: materie prime..... | 7 |
| Approccio 3: prodotti finiti | 8 |
| Casi particolari di <i>compliance testing</i> | 10 |
| Schema riepilogativo del <i>compliance testing</i> | 11 |
| Considerazioni finali e approfondimenti..... | 13 |
| Controlli che non implicano la conformità con un limite specificato | 13 |
| Considerazioni finali sulla stima <i>a posteriori</i> dell'incertezza | 18 |
| Esempi di applicazione | 19 |
| Esempio 1 | 19 |
| Esempio 2 | 22 |
| Conclusioni | 31 |
| Bibliografia | 32 |
| Glossario | 35 |

INTRODUZIONE

Nell'ambito di un progetto globale di assicurazione della qualità, non si può prescindere dal prendere in seria considerazione la qualità del dato numerico risultante dall'esecuzione di un'indagine analitica. Se si riflette bene, infatti, sul significato di assicurazione della qualità nell'ambito di un laboratorio di controllo chimico, si può capire che questa ha come fine ultimo proprio quello di tutelare, attraverso l'attento esame di ogni stadio del processo analitico, la qualità del dato finale prodotto.

Un laboratorio che effettui il controllo chimico dei farmaci non può esimersi, pertanto, dall'eseguire un rigoroso trattamento statistico dei dati, al fine di fornire un'indicazione della loro qualità. La stima dell'attendibilità di un risultato di misura, infatti, è la *condicio sine qua non* il dato stesso possa essere fruito da tutti coloro che ne sono i destinatari. È per questo che il risultato di una misura effettuata assume significato solo se accompagnato da una stima dell'incertezza ad essa associata.

Questo documento raccoglie le indicazioni della norma ISO 17025 e delle linee guida del circuito internazionale dei Laboratori Ufficiali di Controllo dei Farmaci (*Official Medicines Control Laboratory*, OMCL), applicandole alle diverse attività del Laboratorio di Chimica del Farmaco dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS), unico laboratorio ufficiale di controllo chimico dei farmaci in Italia. Vengono quindi riportati esempi originali, ispirati ad alcune delle possibili attività del Laboratorio di Chimica del Farmaco. Fornisce inoltre una bibliografia completa relativa alla teoria di base sulla stima dell'incertezza di misura e sull'applicazione della stessa al dato analitico.

Infine è presente un glossario contenente la definizione esatta e una breve spiegazione di tutta la complessa terminologia statistica utilizzata nel testo.

INCERTEZZA DI MISURA NELLA NORMA ISO 17025

Secondo la definizione fornita dalla norma ISO 17025 (1) e riportata nel *Vocabolario internazionale dei termini fondamentali e generali in metrologia* (2):

l'incertezza di misura è un parametro associato al risultato di una misurazione, che caratterizza la dispersione dei valori ragionevolmente attribuibile al misurando.

Si tratta pertanto di una stima dell'intervallo di valori entro cui cade il valore vero (o più propriamente il valore di riferimento) di un misurando.

L'importanza di tale concetto non rimane tuttavia di valenza squisitamente legata alla teoria e alla ragionevolezza, ma trova fondamento regolatorio nella norma ISO 17025. Tale norma, sensibile alla problematica dello scambio internazionale dei dati scientifici, impone il concetto di incertezza di misura all'attenzione della collettività dei laboratori di taratura e controllo. Prescrive inoltre di applicare metodi e procedure per la sua stima e far uso di tecniche statistiche per l'analisi dei dati.

La norma, nei requisiti 5.4 e 5.10, statuisce in particolare quanto segue:

- a) "I rapporti di prova devono includere [...] una dichiarazione circa l'incertezza di misura stimata [...] quando ciò influisce sulla validità o sull'applicazione dei risultati di prova [...] o quando l'incertezza ha influenza sulla conformità con un limite specificato."
- b) "Il livello di rigore necessario in una stima dell'incertezza di misura dipende da fattori come l'esistenza di limiti stretti su cui sono basate le decisioni della conformità ad una specifica."
- c) "Una stima ragionevole deve essere basata sulla conoscenza del metodo e sullo scopo della misura e deve fare uso delle esperienze precedenti e delle validazioni dei dati."
- d) "In certi casi la natura dei metodi di prova può escludere un calcolo dell'incertezza di misura rigoroso e valido dal punto di vista metrologico e statistico."
- e) "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 i requisiti relativi alla stima dell'incertezza." (tra questi metodi rientrano, ad esempio, quelli pubblicati sulle monografie di farmacopea).

STIMA DELL'INCERTEZZA DI MISURA PER I LABORATORI UFFICIALI DI CONTROLLO CHIMICO IN CAMPO FARMACEUTICO

Il circuito internazionale dei laboratori ufficiali di controllo dei farmaci (OMCL) (3), ha intrapreso un cammino, ancora *in fieri*, per la stesura di linee guida atte al contempo a recepire le prescrizioni della ISO 17025, a renderle operative e ad armonizzarle all'interno della propria complessa realtà. Sulla base delle fondamentali indicazioni che la norma fornisce, gli OMCL stabiliscono di indirizzare la propria filosofia di gestione del concetto di incertezza di misura proponendo una distinzione fondamentale tra due tipi di attività:

- attività ufficiali di controllo della conformità con un limite specificato (che per brevità indicheremo d'ora in avanti con l'espressione *compliance testing*) (4).
- altre attività di controllo analitico che gli OMCL possono trovarsi ad affrontare, quali analisi su prodotti non soggetti a registrazione (integratori alimentari o prodotti erboristici), analisi di sostanze non autorizzate in prodotti cosmetici, o analisi relative ad alcuni sequestri dell'autorità giudiziaria.

Viene quindi suggerito di stimare ed applicare l'incertezza di misura in maniera profondamente diversa per ciascuno dei due casi, come verrà descritto nei paragrafi seguenti. Si ricorda che nel Glossario si potranno trovare le definizioni relative a tutti i termini statistici utilizzati.

Controlli che implicano la verifica della conformità con un limite specificato

La principale attività di un laboratorio ufficiale di controllo consiste nel verificare, per i prodotti farmaceutici, la rispondenza a determinate specifiche. In tale ambito si accerta che il contenuto dei principi farmacologicamente attivi in materie prime o in prodotti finiti, cada in un intervallo più o meno ampio attorno al valore teorico del 100%.

Per i *compliance testing*, dunque, l'incertezza verrà stimata secondo l'approccio che la guida Eurachem (5) e la ISO GUM (6) definiscono *overall (a priori* o "onnicomprensivo").

Secondo tale approccio la semplice precisione sperimentale dell'analisi, fornisce una stima globale dell'incertezza di misura associata all'analisi stessa. Questo a patto che:

- tutto il processo analitico venga portato a termine nell'ambito di un sistema di assicurazione della qualità perfettamente funzionante a regime, in cui siano tenute sotto stretto controllo la qualificazione del personale, le sostanze di riferimento utilizzate, le bilance e tutta l'attrezzatura di laboratorio, e gli strumenti seguano un programma di riqualificazione periodico (7-9);
- i metodi utilizzati siano metodi ufficiali come quelli di farmacopea (10) o siano stati validati per lo scopo al quale sono destinati (si pensi ad esempio ai metodi autorizzati al momento della registrazione o a quelli sviluppati autonomamente dagli OMCL) e i dati di validazione siano completi (11);
- venga svolto l'opportuno *System Suitability Check*, ogni qual volta il metodo lo richieda (12-13).

Se le suddette condizioni sono rispettate, l'incertezza di misura potrà essere complessivamente espressa attraverso il Coefficiente di Variazione percentuale CV%. In particolare, qualora l'analisi in corso implichi un controllo della conformità in cui il titolo dell'analita in esame debba cadere in un dato intervallo attorno al valore teorico del 100%, si dovrà seguire, per la stima dell'incertezza di misura e per la valutazione e presentazione dei risultati di analisi, uno degli approcci di seguito riportati; i primi due sono relativi a controlli su materie prime farmaceutiche, il terzo riguarda invece il dosaggio del principio attivo in un prodotto finito.

Approccio 1: materie prime

Secondo questo approccio:

1. Devono essere effettuate tre misure: la loro media aritmetica fornirà il risultato (va comunque riportato il numero di misure effettuate).
2. Per esprimere l'incertezza viene utilizzato il CV%.

Tali dati devono poi essere trattati secondo quanto di seguito riportato, per stabilire se il campione analizzato è conforme o meno alle specifiche richieste.

Se il CV% che si ottiene è più piccolo di quello indicato in Tabella 1 e la media delle tre misure cade all'interno del *content limit*, allora il campione sarà conforme alle specifiche indicate. Se una sola delle due condizioni non è soddisfatta, allora si eseguono 3 ulteriori determinazioni e si fornisce come risultato finale la media sui 6 valori ottenuti, a meno che il CV% delle prime tre misure non sia maggiore di quello massimo consentito riportato in Tabella 2, nel qual caso ulteriori determinazioni sono inutili. Se il valore medio delle 6 misure cade all'interno del *content limit* e il CV% sulle 6 misure è minore di quello massimo consentito riportato in Tabella 1, allora il campione sarà conforme alle specifiche indicate.

Il campione può essere scartato solo se la media non cade nel *content limit* e il valore del CV% rispetta i criteri esposti. Se la media dei valori ottenuti, infine, cade nel *content limit*, ma il CV% non rispetta i criteri stabiliti, allora si indagheranno le cause di tale scarsa ripetibilità e, qualora si evidenziassero errori nell'esecuzione del metodo di analisi, i risultati ottenuti verranno scartati, e l'intera procedura verrà ripetuta.

Tabella 1. Valore massimo consentito per il CV%

| A (%) ¹ | Numero di misure effettuate ² | | | | |
|--------------------|--|-------------------|------|------|------|
| | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 1,0 | 0,11 | 0,29 | 0,42 | 0,52 | 0,60 |
| 1,5 | 0,17 | 0,44 | 0,63 | 0,78 | 0,90 |
| 2,0 | 0,22 | 0,59 | 0,85 | 1,04 | 1,20 |
| 2,5 | 0,28 | 0,73 | 1,05 | 1,29 | 1,50 |
| ≥ 3,0 | 0,33 | 0,88 ³ | 1,26 | 1,55 | 1,80 |

1. A(%) = Limite superiore del *content limit* dell'analita in esame -100%.

2. Nelle colonne relative al numero di misure effettuate sono elencati i valori massimi consentiti per lo scarto tipo relativo percentuale o CV% (14).

3. Il valore originario riportato nel documento (14) è in realtà pari ad 1,88. Si tratta tuttavia di una svista, come si può evincere dalla tabella riportata da Daas e Miller (15) e come gli stessi OMCL hanno evidenziato nel rapporto relativo al meeting del 10 aprile 2002 (16).

Tabella 2. Valori di CV% oltre i quali ulteriori determinazioni sono inutili

| A (%) ¹ | Numero di misure effettuate ² | | | | |
|--------------------|--|------|------|------|------|
| | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 1,0 | 1,34 | 0,95 | 0,77 | 0,67 | 0,60 |
| 1,5 | 2,01 | 1,42 | 1,16 | 1,01 | 0,90 |
| 2,0 | 2,68 | 1,90 | 1,55 | 1,34 | 1,20 |
| 2,5 | 3,35 | 2,37 | 1,94 | 1,68 | 1,50 |
| ≥ 3,0 | 4,02 | 2,85 | 2,32 | 2,01 | 1,80 |

1. A(%) = Limite superiore del *content limit* dell'analita in esame -100%.
2. Nelle colonne relative al numero di misure effettuate sono elencati i valori massimi consentiti per lo scarto tipo relativo percentuale o CV% (14).

Il diagramma di flusso riportato in Figura 1 riassume la procedura fin qui esposta(14).

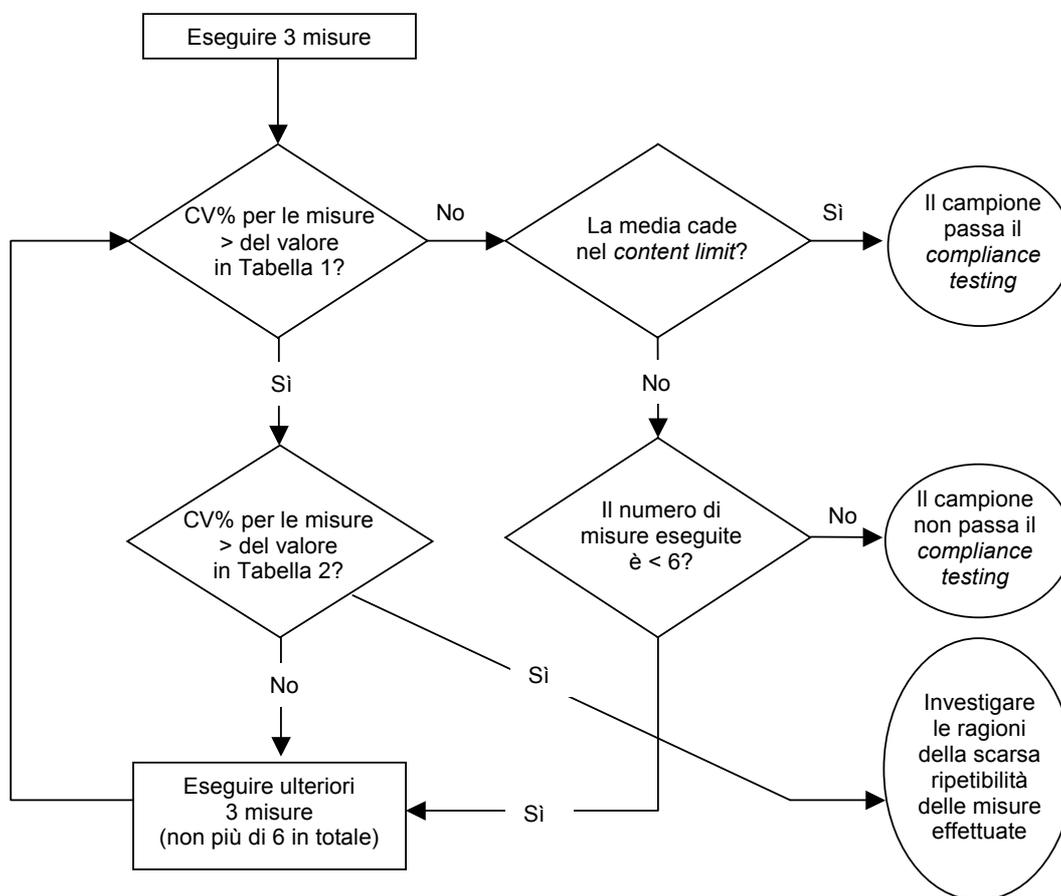


Figura 1. Diagramma di flusso dell'Approccio 1

Prendiamo in esame, per chiarificare il procedimento fin qui esposto, alcuni casi pratici:

1. In una titolazione potenziometrica per la determinazione del titolo di un principio attivo farmaceutico, la Farmacopea Europea ammette un contenuto in percentuale (*content limit*) compreso tra il 98,5% ed il 101,5%. Il valore del parametro A pertanto sarà dato da: $101,5\% - 100\% = 1,5\%$.

Si eseguono tre determinazioni, ottenendo un valore medio del titolo pari a 100,12%, uno scarto tipo sperimentale $s=0,23\%$, uno scarto tipo sperimentale della media $s^2=0,13\%$ e un CV%:

$$CV\% = \frac{s}{\bar{X}} \cdot 100\% = \frac{0,23\%}{100,1\%} \cdot 100\% = 0,23\%$$

Incrociando ora in Tabella 1 il valore di A (pari ad 1,5%) con il numero di misure effettuate (pari a 3), troveremo un valore di 0,44. Questo è il valore massimo consentito per il CV% dell'analisi. Essendo il CV% nel nostro caso pari a 0,23% e quindi minore di 0,44% e cadendo la media delle misure (pari a 100,12%) nel *content limit* (98,5%÷101,5%) ammesso dalla farmacopea, il campione passa il *compliance testing*.

Il risultato finale sarà dato dal valore medio ottenuto, e l'incertezza di misura sarà espressa dallo scarto tipo sperimentale della media s^2 , oppure dal CV%.

2. In una titolazione potenziometrica per la determinazione del titolo percentuale di una materia prima farmaceutica, la Farmacopea Europea ammette un contenuto compreso tra il 99% ed il 101% (*content limit*). Pertanto il valore del parametro A della Tabella 1 sarà pari a: $101\% - 100\% = 1\%$. Si eseguono tre determinazioni ottenendo un valore medio del titolo pari a 99,51%, uno scarto tipo sperimentale $s = 0,92\%$, uno scarto tipo della media $s^2=0,53\%$ ed un CV%:

$$CV\% = \frac{s}{\bar{X}} \cdot 100\% = \frac{0,92\%}{99,51\%} \cdot 100\% = 0,93\%$$

Incrociando in Tabella 1 il valore di A (pari ad 1%) con il numero di misure effettuate (pari a 3), troveremo un valore di 0,29. Questo è il valore massimo consentito per il CV% dell'analisi. In questo caso il CV% ottenuto pari a 0,93%, supera di gran lunga tale limite massimo di 0,29. Se ora incrociamo il valore di A con il numero di misure effettuate sulla Tabella 2 troveremo un valore pari a 0,95. Se il CV% della nostra analisi fosse maggiore anche di questo valore allora sarebbero inutili ulteriori determinazioni e si dovrebbero mettere in atto le procedure in vigore in laboratorio per indagare le ragioni della scarsa ripetibilità. Per fortuna in questo caso il CV%=0,93% è inferiore a 0,95. Ne consegue che devono essere effettuate tre ulteriori determinazioni. Eseguite queste tre nuove misure si ottiene un valore medio del titolo pari a 99,71% (la media è stata eseguita su tutte e sei le misure effettuate in totale), uno scarto tipo sperimentale $s=0,57\%$, uno scarto tipo della media $s^2=0,23\%$ ed un CV%=0,57% (tutti valori determinati sulle sei misure complessive). Se nuovamente incrociamo il valore di A con il numero di misure effettuate (stavolta $n=6$) sulla Tabella 1, troveremo un valore massimo consentito per il CV% pari a 0,60. Stavolta, essendo il CV% ottenuto pari a 0,57% e quindi minore di 0,60 e cadendo la media delle misure (pari a 99,7%) nel *content limit* ammesso dalla farmacopea (99%÷101%), il campione passa il *compliance testing*.

3. In un'analisi di una materia prima farmaceutica viene utilizzato un metodo HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*). Per il composto in esame la Farmacopea Europea ammette un contenuto percentuale (*content limit*) compreso tra 96% e 102%. Il parametro

A, pertanto, sarà: $102\% - 100\% = 2\%$. Si eseguono tre determinazioni con un valore medio finale del contenuto percentuale del principio attivo nella materia prima pari a 101,32%. Si ottengono inoltre uno scarto tipo sperimentale $s = 1,42\%$, uno scarto tipo della media $s' = 0,82\%$ e un CV%:

$$CV\% = \frac{s}{\bar{X}} \cdot 100\% = \frac{1,42\%}{101,32\%} \cdot 100\% = 1,40\%$$

Se incrociamo sulla Tabella 1 il valore di A (2%) con il numero di misure effettuate ($n=3$) otterremo un valore massimo per il CV% pari a 0,59. Il valore di 1,40% ottenuto per l'analisi in questione è di molto superiore allo 0,59 consentito, pur essendo inferiore al valore limite di 1,90 presente in Tabella 2: l'operatore eseguirà pertanto 3 nuove misure e calcolerà la media e tutti i parametri statistici di interesse sulle sei misure complessivamente effettuate. Si ottengono i seguenti risultati: un valore medio del contenuto del principio attivo pari a 101,21%, uno scarto tipo sperimentale pari a 1,33%, uno scarto tipo della media pari a 0,54% ed un CV% = 1,31%. Se incrociamo sulla Tabella 1 il valore di A (sempre 2%) con il numero di misure complessivamente effettuate ($n=6$) si ottiene un valore massimo per il CV% pari a 1,20. Il valore che abbiamo ottenuto per le nostre misure, pari a 1,33 è maggiore del 1,20 consentito. La procedura non consente di effettuare più di sei misure in totale, pertanto all'operatore non resta che indagare le ragioni della scarsa ripetibilità delle proprie analisi e mettere in atto le opportune azioni correttive. Fatto questo, tutta la procedura analitica verrà ripetuta.

Approccio 2: materie prime

Per seguire l'approccio 2:

1. Devono essere effettuate due misure: la loro media aritmetica fornirà il risultato (va comunque riportato il numero di misure effettuate).
2. Per esprimere l'incertezza viene utilizzato il CV%.

Se il CV% che si ottiene è più piccolo di quello indicato in Tabella 1 e la media delle due misure cade all'interno del *content limit*, allora il campione sarà conforme alle specifiche indicate. Se una sola delle due condizioni non è soddisfatta, si esegue un'ulteriore determinazione (a patto che il valore di CV% trovato sia minore di quello in Tabella 2, altrimenti ulteriori determinazioni saranno inutili).

Se il CV% calcolato sulle 3 misure effettuate è più piccolo di quello indicato in Tabella 1 ed il valore medio (anch'esso calcolato sulle tre misure) cade all'interno del *content limit*, allora il campione sarà conforme alle specifiche indicate. Se ancora una volta una sola delle due condizioni non è soddisfatta, si possono effettuare fino ad un massimo di 6 prove.

Il campione sarà ritenuto non conforme alle specifiche indicate quando il valore del CV% è minore di quello indicato in Tabella 1 e la media delle misure effettuate non cade all'interno del *content limit*. Se in un qualunque passaggio dell'intero processo il valore del CV% cade al di sopra del valore massimo consentito riportato in Tabella 2, non verranno eseguite ulteriori analisi, e si dovrà indagare sulle ragioni della scarsa ripetibilità del metodo in uso e, qualora si evidenziasse errori nell'esecuzione dell'analisi, i risultati ottenuti verranno scartati, e l'intera procedura esposta verrà ripetuta.

Quanto detto viene sintetizzato nella Figura 2 (14).

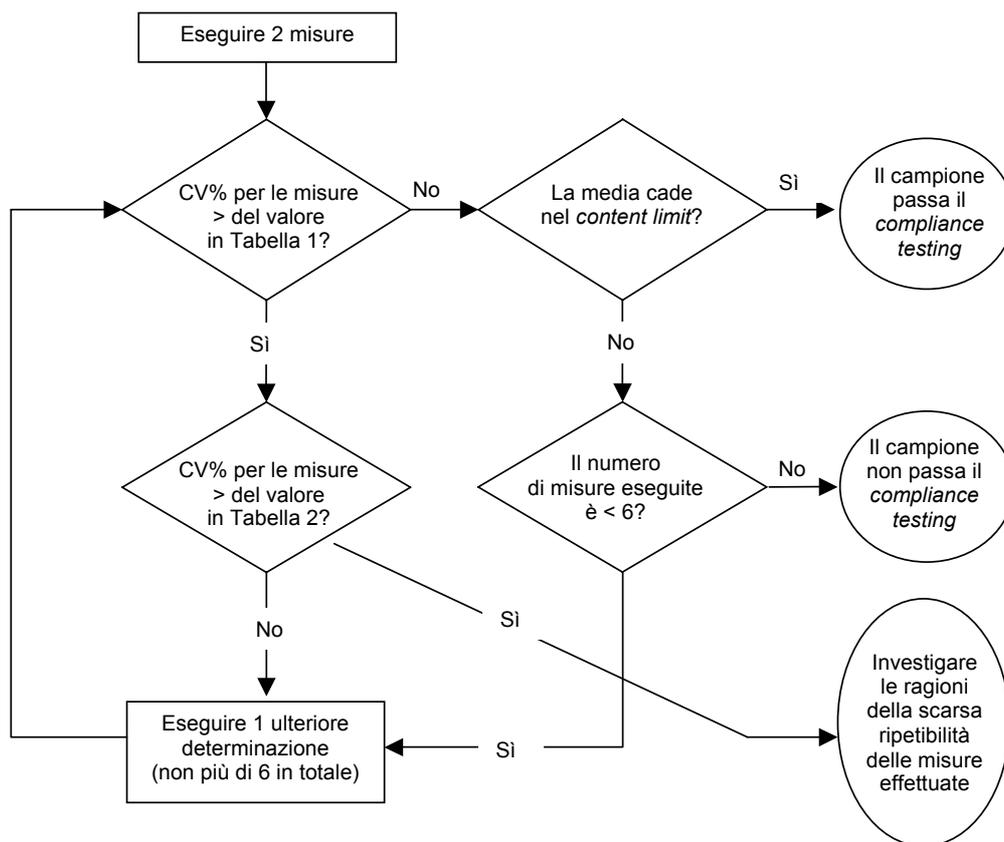


Figura 2. Diagramma di flusso dell'Approccio 2

Approccio 3: prodotti finiti

Secondo l'approccio 3:

1. Devono essere effettuate tre misure la cui media aritmetica fornirà il risultato d'analisi. Tale risultato andrà espresso come percentuale del contenuto dichiarato dalla ditta. Per esprimere l'incertezza verrà utilizzato il CV%, come visto per i casi precedenti.
2. Deve essere poi confrontata la precisione in condizioni di ripetibilità delle analisi effettuate, con quella presente nel dossier fornito dalla Ditta, ottenuta durante la convalida del metodo. Si calcoli pertanto lo scarto tipo e successivamente il valore della funzione statistica F^1 (17):

¹ Il test della F appartiene all'insieme dei *significance test* (o test di significatività), ovvero quelle procedure statistiche che permettono di stabilire se la differenza tra due valori misurati è da attribuirsi al caso o è da considerarsi effettivamente significativa. Il test della F permette, in generale, di stabilire se lo scarto tipo associato ad un insieme A di misure (nel nostro caso quelle effettuate dal laboratorio di controllo) è significativamente diverso da quello associato ad un insieme B di misure (nel nostro caso quelle effettuate dalla ditta nel processo di convalida del metodo). In pratica ci permette di stabilire se l'analisi effettuata è precisa almeno quanto quella della ditta. Per ulteriori approfondimenti sulla funzione F si si consulti il testo riportato alla nota bibliografica (17).

$$F_{sperimentale} = \frac{S_{controllo}^2}{S_{dossier}^2}$$

dove con $S_{controllo}$ ed $S_{dossier}$ si intendono rispettivamente lo scarto tipo ottenuto dal laboratorio di controllo e lo scarto tipo ottenuto dalla ditta durante il processo di convalida del metodo.

3. Si confronti poi il valore di $F_{sperimentale}$ così ottenuto, con quello dell' $F_{massimo}$ presente nella Tabella 3 riportata nella pagina seguente.

Tabella 3. Valori della funzione F al 95% di probabilità²

| v ₂ | v ₁ | |
|----------------|----------------|-----------|
| | 2 | 5 |
| 1 | F = 199.5 | F = 230.2 |
| 2 | 19.00 | 19.30 |
| 3 | 9.552 | 9.013 |
| 4 | 6.944 | 6.256 |
| 5 | 5.786 | 5.050 |
| 6 | 5.143 | 4.387 |
| 7 | 4.737 | 3.972 |
| 8 | 4.459 | 3.687 |
| 9 | 4.256 | 3.482 |
| 10 | 4.103 | 3.326 |
| 11 | 3.982 | 3.204 |
| 12 | 3.885 | 3.106 |
| 13 | 3.806 | 3.025 |
| 14 | 3.739 | 2.958 |
| 15 | 3.682 | 2.901 |
| 16 | 3.634 | 2.852 |
| 17 | 3.592 | 2.810 |
| 18 | 3.555 | 2.773 |
| 19 | 3.522 | 2.740 |
| 20 | 3.493 | 2.711 |

v₁ = numero di gradi di libertà associati allo scarto tipo $S_{controllo}$, ovvero numero di prove effettuate dall'analista -1.

v₂ = numero di gradi di libertà associati allo scarto tipo $S_{dossier}$, ovvero numero di prove effettuate dalla ditta durante la convalida del metodo -1.

- a) Se risulta $F_{sperimentale} > F_{massimo}$, si effettuino 3 ulteriori misure, si calcoli lo scarto tipo $S_{controllo}$ per le 6 misure complessivamente effettuate, il nuovo valore di $F_{sperimentale}$, e si consulti nuovamente la Tabella 3 (il risultato d'analisi verrà espresso dalla media aritmetica delle sei misure effettuate complessivamente).
- b) Se risulta ancora $F_{sperimentale} > F_{massimo}$ le analisi effettuate dal laboratorio di controllo non sono sufficientemente precise.

² Un intervallo di confidenza del 95% implica, in pratica, che c'è solo una possibilità su 20 di considerare erroneamente significativa una differenza tra gli scarti tipo $S_{controllo}$ ed $S_{dossier}$.

Si dovranno pertanto indagare le cause della scarsa ripetibilità e, qualora si evidenziassero errori nell'esecuzione del metodo di analisi, i risultati ottenuti verranno scartati e l'intera procedura esposta verrà ripetuta.

- c) Se $F_{sperimentale} < F_{massimo}$ le analisi effettuate dal laboratorio di controllo sono sufficientemente precise. Va a questo punto verificato che il risultato dell'analisi cada all'interno del *content limit* fornito dalla ditta. Se questo avviene il prodotto passa il *compliance test*, altrimenti proseguire al punto 4.
4. Se sono state effettuate sei misure in totale si passi al punto 5. Se si sono effettuate solo tre misure se ne effettuino altre tre, si calcoli lo scarto tipo $s_{controllo}$ delle 6 misure complessivamente effettuate e la funzione $F_{sperimentale}$ corrispondente:
- a) Se $F_{sperimentale} > F_{massimo}$ si ricade nel punto 3b.
5. a) Se $F_{sperimentale} < F_{massimo}$ e la media calcolata sulle sei misure cade all'interno del *content limit*, il prodotto finito in esame passa il *compliance testing*.
- b) Se $F_{sperimentale} < F_{massimo}$, ma la media calcolata sulle sei misure continua a non cadere all'interno del *content limit* si calcoli allora l'intervallo di confidenza associato all'analisi in corso come qui di seguito riportato:

$$\bar{X}_6 \pm \frac{K_{(90\%,\nu)} \cdot s_{dossier}}{\sqrt{6}}$$

Dove \bar{X}_6 è la media delle sei misure effettuate, $s_{dossier}$ lo scarto tipo ottenuto dalla ditta durante il processo di convalida del metodo e $K_{(90\%,\nu)}$ è il valore del fattore di copertura K al 90% di confidenza e per un numero di gradi di libertà ν pari al numero di analisi effettuate dalla ditta durante la convalida -1 (a proposito di K si veda il punto 5 e la Tabella 4 del paragrafo "Controlli che non implicano la conformità con un limite specificato" presente più avanti nel testo).

- c) Se l'intervallo di confidenza calcolato al punto 5b cade esternamente al *content limit* il prodotto finito in esame non passa il *compliance test*, ovvero è da ritenersi non conforme alle specifiche richieste.
- d) Se parte dell'intervallo di confidenza calcolato al punto 5b cade all'interno del *content limit* il prodotto finito in esame deve essere sottoposto ad ulteriori indagini.

Quanto detto viene sintetizzato nel diagramma di flusso riportato nella Figura 3.

Casi particolari di *compliance testing*

In tutti quei casi particolari, infine, in cui non si utilizza un metodo ufficiale, non si possiedono conoscenze complete sulle prestazioni del metodo ed in particolare i dati di validazione disponibili non coprono completamente quelle che possono essere le fonti di incertezza del metodo stesso, possono essere intraprese una delle seguenti due strade:

1. Integrare i dati di validazione come descritto nel paragrafo "Transfer of a method" del documento OMCL: "Validation of analytical procedures" (11).
2. Seguire l'approccio utilizzato per le attività diverse dai *compliance testing* di cui si parlerà più avanti nel testo.

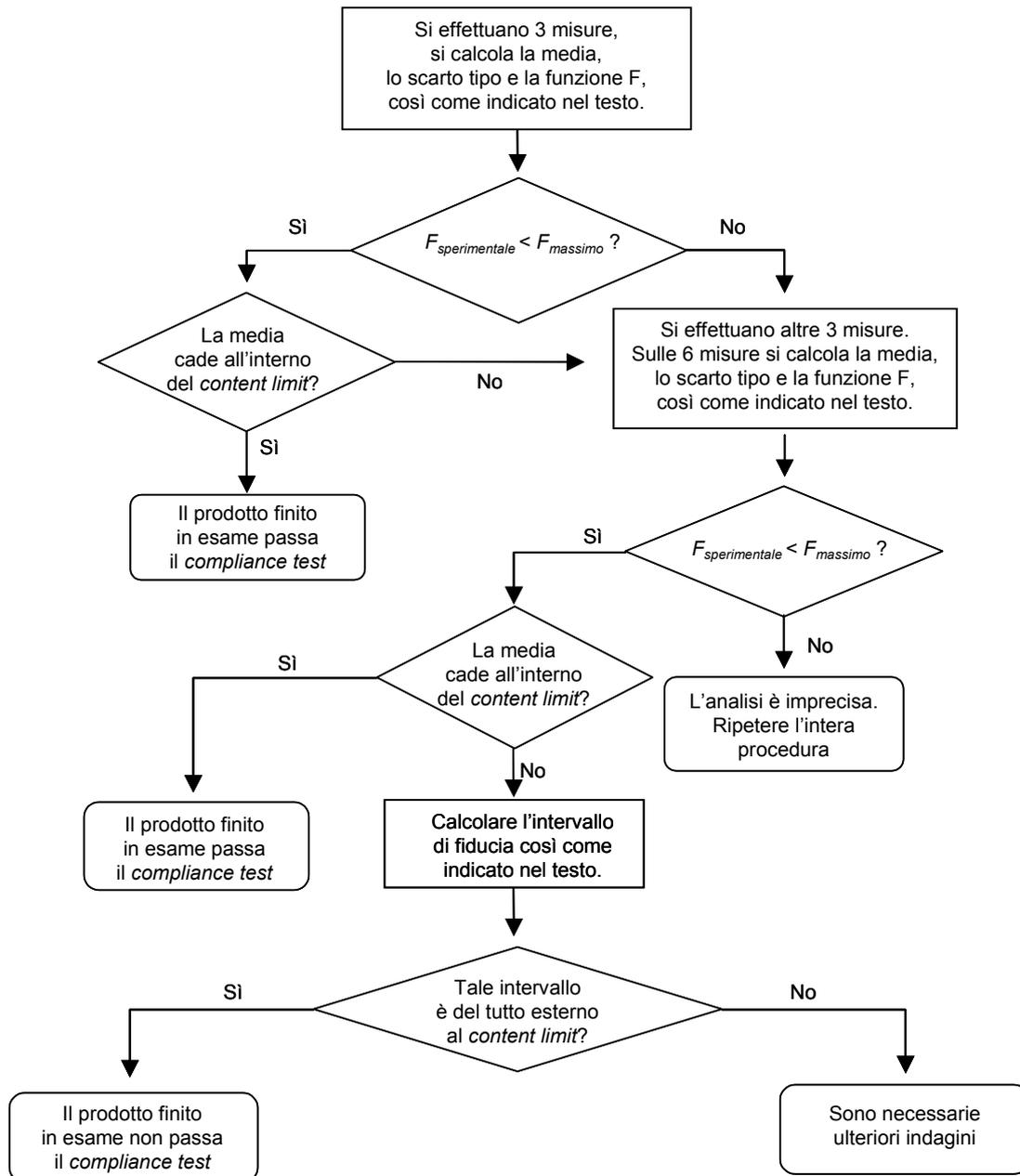


Figura 3. Diagramma di flusso dell'Approccio 3

Schema riepilogativo del *compliance testing*

La Figura 4 riporta lo schema riepilogativo completo dell'approccio con cui un laboratorio di controllo chimico dei farmaci valuta i risultati d'analisi e stima l'incertezza di misura nei *compliance testing* (4).

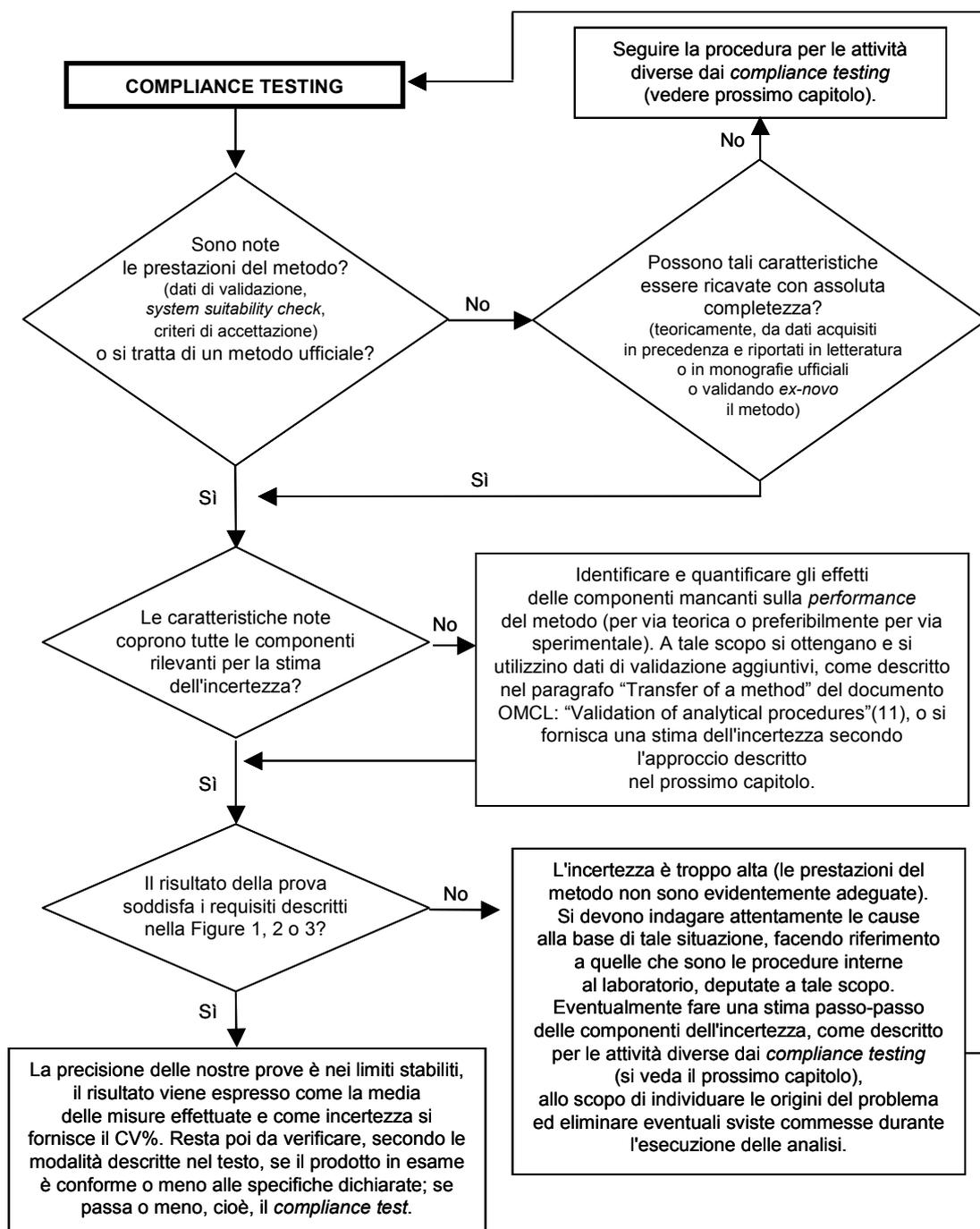


Figura 4. Schema riepilogativo delle attività che implicano la verifica della conformità con un limite specificato (*compliance testing*)

Considerazioni finali e approfondimenti

Si potrebbe obiettare che il coefficiente di variazione non è di per se un parametro sufficiente a fornire indicazioni sull'incertezza di una misura, sia perché non è uno stimatore imparziale dello scarto tipo relativo della popolazione, sia perché, per un numero piccolo di misure (meno di 20) l'incertezza su questo stesso parametro è molto elevata. Sarebbe più corretto quindi presentare l'incertezza come un intervallo di valori in cui con una data probabilità (in genere il 90% o il 95%) cade il valore di riferimento delle nostre misure. Ciò sarebbe opportuno tutelarsi da sottostime dell'incertezza fornendo un'incertezza estesa, utilizzando cioè un fattore di copertura preso dalla ben nota teoria di Student.

Nel caso però di stima *onnicomprensiva* dell'incertezza, essendo conosciute *a priori* e sotto controllo tutte le fonti di incertezza, essendo nota l'accuratezza del metodo (cioè sono conosciute, dai dati di validazione, sia l'esattezza che la precisione) ed essendo stato effettuato l'opportuno *System Suitability Check* (dove richiesto), ed essendo infine stabilite *a priori* sia il numero di misure effettuate, sia i limiti espressi in percentuale (*content limit*) in cui la nostra media deve cadere, fornire un'incertezza estesa piuttosto che il semplice CV% non aggiunge nessuna informazione al dato numerico. Non si ravvisano pertanto motivi per discostarsi dalle scelte del network OMCL.

Si ribadisce tuttavia, che tale scelta è giustificata solo per l'approccio *onnicomprensivo* alla stima dell'incertezza nel caso in cui i requisiti a) b) e c) del paragrafo "Controlli che implicano la verifica della conformità con un limite specificato" siano pienamente rispettati. In caso contrario l'approccio, come vedremo, sarà di tipo *a posteriori* o "passo-passo" e l'incertezza di misura sarà necessariamente espressa come un'incertezza estesa. Per un approfondimento della teoria alla base di tale dissertazione si veda ad esempio il documento UNI CEI ENV 13005:2000: "Guida all'espressione dell'incertezza di misura" (18).

Vale la pena, infine, sottolineare perché sia stato necessario proporre approcci distinti alla valutazione della conformità per le materie prime rispetto ai prodotti finiti. La motivazione risiede nel fatto che i criteri usati per determinare le specifiche entro le quali questi devono rientrare, sono diversi. Per le prime le varie farmacopee determinano tali specifiche (ovvero il valore da attribuire ad i *content limit*) a partire dalla stima dell'incertezza estesa (vedere più avanti nel testo il paragrafo "Controlli che non implicano la conformità con un limite specificato" al punto 5) calcolata dallo scarto tipo inter-laboratorio relativo a *Proficiency Testing Studies* organizzati dallo EDQM (*European Directorate for the Quality of Medicines*) (si consultino a questo proposito il Glossario e gli articoli 15, 19, 20). Per i prodotti finiti, invece, i criteri adottati dalle ditte per determinare i *content limit*, come evidenziato nel rapporto sul recente meeting del Working Group OMCL sull'incertezza di misura (16), nascono da considerazioni diverse, come la variabilità del contenuto da un lotto all'altro, la degradazione del prodotto durante la conservazione, la variabilità dei risultati tra un'analisi e l'altra e all'interno della stessa analisi (ovvero la precisione intermedia e la precisione in condizioni di ripetibilità).

Controlli che non implicano la conformità con un limite specificato

Per tutte le attività diverse dai *compliance testing* (21) come le analisi sui prodotti non soggetti a registrazione (integratori alimentari o prodotti erboristici) le analisi di sostanze non autorizzate in prodotti cosmetici (22) e le analisi relative ad alcuni sequestri dell'autorità

giudiziaria, o per tutte le attività per le quali, in generale, non è possibile rispettare anche una sola delle condizioni a), b) e c) del paragrafo “Controlli che implicano la verifica della conformità con un limite specificato”, il network OMCL suggerisce di utilizzare il secondo degli approcci descritto dalla guida Eurachem (5), dalla UNI CEI ENV 13005:2000 (18) e dalla ISO GUM 1993 (6): il cosiddetto approccio *step by step* (“passo-passo”) o *a posteriori*.

Pur rimandando per un approfondimento completo alle guide sopraccitate, è bene schematizzare qui con brevità, ma con completezza, i principi su cui tale approccio si basa, le modalità per una sua realizzazione pratica e le scelte più opportune per un laboratorio ufficiale di controllo dei farmaci in campo chimico:

- 1) Individuare con precisione il misurando e fornire una relazione matematica che lo lega a tutti i parametri da cui dipende. Se ad esempio il misurando è una concentrazione da esprimere in mg/ml, la relazione matematica in questione sarà semplicemente:

$$C = \frac{P}{V}$$

dove P è il peso della sostanza espresso in mg e V il volume della soluzione espresso in ml.

Il misurando può anche essere legato ad alcuni parametri in maniera implicita. Se ad esempio si conosce la precisione del metodo, anche se il misurando non dipende esplicitamente da questa, dovremo prenderla in considerazione comunque nel computo delle incertezze. Si vedano a questo proposito il punto 4 di questo paragrafo (regola 2) e gli esempi 1 e 2.

- 2) Identificare tutte le fonti di incertezza legate ai parametri del punto 1. Nel caso di

$C = \frac{P}{V}$, ad esempio, per il peso P le fonti di incertezza saranno la ripetibilità della pesata e la sensibilità e linearità della bilancia. Allo stesso modo ci saranno diverse fonti di incertezza per il volume V : la ripetibilità della misura del volume, la variazione del volume con la temperatura, e l'accuratezza del contenitore, fornita dal costruttore. Si veda a questo proposito l'esempio 2.

- 3) Misurare, dove possibile, o stimare per altra via, le incertezze relative alle fonti individuate al punto 2, ed esprimerle come scarto tipo. Si distinguono i seguenti due casi:

- a) Le incertezze in esame sono frutto di misurazioni. In questo caso andranno espresse come scarti tipo sperimentali della media. Eventuali dati di validazione del metodo, come la precisione (ripetibilità, riproducibilità, precisione intermedia) o lo scarto tipo dello scostamento sistematico ottenuto da prove di recupero³, devono essere inclusi nel computo delle incertezze tipo (o scarti tipo)⁴ da prendere in considerazione (per come procedere si veda la regola 2 esposta al punto 4 di questo paragrafo e gli esempi 1 e 2).

³ Si ponga attenzione al fatto che tali grandezze sono normalmente espresse come scarti tipo sperimentali o come coefficienti di variazione e devono quindi essere trasformati in scarti tipo sperimentali della media.

⁴ Si fa notare che nel testo i termini incertezza tipo e scarto tipo vengono usati indifferentemente; tuttavia una distinzione esiste: l'incertezza tipo è la singola componente di incertezza associata al singolo parametro da cui il misurando dipende esplicitamente o meno, mentre lo scarto tipo è lo stimatore statistico attraverso cui tali incertezze possono essere quantificate numericamente.

- b) Le incertezze in esame non sono frutto di misurazioni (incertezza sui valori di concentrazione di materiale certificato, sensibilità di una bilancia) (23), incertezza sulla lettura del volume di un matraccio, incertezza fornita dal costruttore per una lettura strumentale e ogni qual volta, in generale, si disponga, come incertezza, di un intervallo simmetrico delimitato da due estremi) vengono considerate nascenti da distribuzioni rettangolari (o in alcuni casi triangolari⁵) di probabilità, a meno che non diversamente indicato dal costruttore. Per ottenere da questi dati l'incertezza tipo si dovrà dividere l'intervallo fornito dal costruttore per la radice di tre, se si considera una distribuzione rettangolare, o per la radice di sei se si considera una distribuzione triangolare (5). Sia dato ad esempio un matraccio di classe A che riporta un'accuratezza sulla lettura del volume di 0,01 ml. L'incertezza tipo che dovremo prendere in considerazione nei nostri calcoli sarà uguale a:

$$u_i = \frac{a}{\sqrt{6}}, \text{ dove } a=0,01 \text{ ml.}$$

- 4) Combinare tutti gli scarti tipo individuati, attraverso le ben note regole della propagazione delle incertezze (24), così da ottenere l'incertezza composta. Esistono delle semplificazioni applicabili alla formula della propagazione delle incertezze che rendono i calcoli molto agevoli. Si tratta di tre regole che vale la pena ricordare qui brevemente:

- *Regola 1*

Quando nella funzione che lega il misurando ai parametri da cui dipende compaiono solo somme o differenze l'incertezza tipo composta è data da:

$$u_c(y) = \sqrt{u(a)^2 + u(b)^2 + \dots}$$

dove:

$y = (a + b + c + \dots)$ è una generica funzione somma dei parametri a, b, c ecc.,

$u_c(y)$ l'incertezza composta di y ,

$u(a), u(b)$ ecc., le incertezze sui parametri a, b , ecc. da cui y dipende.

- *Regola 2*

Quando nella funzione che lega il misurando ai parametri da cui dipende compaiono solo prodotti o quozienti, l'incertezza tipo composta è data da:

$$u_c(y) = y \cdot \sqrt{\left(\frac{u(a)}{a}\right)^2 + \left(\frac{u(b)}{b}\right)^2 + \dots + \left(\frac{u(p)}{p}\right)^2 + \left(\frac{u(q)}{q}\right)^2 + \dots}$$

dove:

$y = \frac{a \times b \times \dots}{p \times q \times \dots}$ è una generica funzione legata ai parametri a, b, p, q da prodotti o

quozienti,

$u_c(y)$ è l'incertezza composta di y ,

a, b, p, q ecc. i parametri da cui y dipende,

$u(a), u(b), u(p), u(q)$ ecc., le incertezze sui parametri a, b, p, q ecc. da cui y dipende.

⁵ Nel caso di misura di volumi, ad esempio, è più probabile che il valore della misurazione effettuata cada in prossimità del centro dell'intervallo fornito dal costruttore piuttosto che agli estremi, da cui la scelta di considerare una distribuzione triangolare.

Nel caso, ad esempio, di una concentrazione espressa come peso fratto volume:

$$C = \frac{P}{V}$$

(dove C è la concentrazione in questione, P il peso della sostanza e V il volume della soluzione),

avremo che:

$$u_c(C) = C \cdot \sqrt{\left(\frac{u(P)}{P}\right)^2 + \left(\frac{u(V)}{V}\right)^2}$$

Se poi è nota la precisione in condizioni di ripetibilità S_R , espressa come scarto tipo sperimentale, questa sarà inclusa come segue nel calcolo dell'incertezza composta:

$$u_c(C) = C \cdot \sqrt{\left(\frac{u(P)}{P}\right)^2 + \left(\frac{u(V)}{V}\right)^2 + \left(\frac{S_R}{C \cdot \sqrt{n}}\right)^2}$$

dove n è il numero di misure effettuate nell'analisi in corso (per ulteriori chiarimenti si faccia riferimento all'esempio 1).

- *Regola 3*

Quando infine nella funzione che lega il misurando ai parametri da cui dipende compaiono sia somme e differenze che prodotti e quozienti, si deve scomporre la funzione stessa in parti che contengano solo operazioni coperte dalla regola 1 combinando poi le incertezze che si ottengono utilizzando la regola 2. Ad esempio l'incertezza sull'espressione:

$$y = \frac{(a + b)}{(p + q)}$$

si calcolerà nel seguente modo:

$$u(a + b) = \sqrt{u(a)^2 + u(b)^2}$$

$$u(p + q) = \sqrt{u(p)^2 + u(q)^2}$$

$$u(y) = y \cdot \sqrt{\frac{u(a + b)^2}{a + b} + \frac{u(p + q)^2}{p + q}}$$

Per ulteriori informazioni è comunque possibile fare riferimento alla guida UNI CEI ENV 13005:2000 (16) ed alla guida Eurachem (5).

- 5) Moltiplicare l'incertezza composta ottenuta al punto 4 per un fattore di copertura K opportuno, così da ottenere un'incertezza estesa, con un intervallo di confidenza del 95%. Cioè

$$u_{estesa} = K \cdot u_{composta}$$

Il fattore k verrà scelto dalla Tabella 4 dopo aver calcolato il numero di gradi di libertà effettivi del nostro esperimento, dalla formula di Welch-Satterthwaite (18), (24), (25):

$$v_{effettivi} = \frac{u_{composta}^4}{\sum_{i=1}^N \frac{u_i^4}{v_i}}$$

(i valori frazionari si approssimano all'intero immediatamente inferiore)

dove u_i sono le singole incertezze tipo che abbiamo combinato al punto 4 e v_i sono i gradi di libertà associati a tali incertezze, mentre N è il numero totale di incertezze tipo considerate. Se le incertezze tipo in questione sono ottenute da una serie di n misurazioni allora i gradi di libertà v_i saranno uguali ad $n-1$, mentre se sono incertezze note *a priori* (dati riportati in certificati, valori di sensibilità strumentali ecc., vedi punto 3) allora i loro gradi di libertà saranno considerati infiniti. Se infine, tra le incertezze tipo sono stati inclusi i valori di precisione noti dai dati di validazione, per questi i gradi di libertà saranno uguali ad $n-1$, con n = numero di misure effettuate durante la validazione per ottenere la suddetta precisione.

Tale procedura per quanto complessa è l'unica in grado di assicurare la correttezza della stima del fattore di copertura. È prassi comune, tuttavia, per un intervallo di confidenza del 95% prendere il fattore di copertura K sempre uguale a 2. Tale prassi pur non essendo sempre corretta dal punto di vista prettamente statistico (il valore di $K=2$ è corretto solo se possiamo ritenere la distribuzione delle nostre misure normale, ma questo è vero solo se effettuiamo un numero elevato), può comunque essere utilizzata, a patto che nell'esprimere il risultato finale si specifichi chiaramente il valore di K considerato. Per approfondimenti si consulti la guida EA-4/02 (26).

Tabella 4. valori del fattore di copertura K per diversi gradi di libertà

| Numero di gradi di libertà v_i | Fattore di copertura K | |
|----------------------------------|---|----------------------------------|
| | Intervallo di confidenza del 90% ^a | Intervallo di confidenza del 95% |
| 1 | 6,31 | 12,71 |
| 2 | 2,92 | 4,30 |
| 3 | 2,35 | 3,18 |
| 4 | 2,13 | 2,78 |
| 5 | 2,02 | 2,57 |
| 6 | 1,94 | 2,45 |
| 7 | 1,89 | 2,36 |
| 8 | 1,86 | 2,31 |
| 9 | 1,83 | 2,26 |
| 10 | 1,81 | 2,23 |
| 20 | 1,72 | 2,09 |

a. Si riporta per completezza anche il valore di K per un intervallo di confidenza del 90%. Per una versione completa della tabella vedere la ISO GUM 1993: "Guide to the expression of uncertainty in measurement" (6).

6) Riportare infine il risultato come segue:

$$(Y \pm U) \text{ u.m.}$$

dove Y è il risultato finale della nostra analisi ed U l'incertezza estesa, il tutto espresso con le opportune unità di misura (u.m.).

Aggiungendo la frase:

L'incertezza estesa indicata è espressa attraverso un fattore di copertura $K=...$ che per una distribuzione con $v_{\text{effettivi}}$ gradi di libertà, corrisponde ad un livello di confidenza del 95% circa.

Oppure:

La distribuzione delle misure viene ritenuta normale, pertanto l'incertezza estesa indicata è espressa attraverso un fattore di copertura $K=2$ che corrisponde ad un livello di confidenza del 95% circa.

Considerazioni finali sulla stima *a posteriori* dell'incertezza

Se non si dispone di alcuna conoscenza pregressa sul metodo utilizzato, seguire strettamente i punti da 1) a 6) dello schema proposto rappresenta la strada più semplice ed immediata. In apparenza la procedura può sembrare piuttosto laboriosa nel suo insieme, ma in realtà consiste solo nell'individuare con attenzione le fonti di incertezza ed applicare alcuni algoritmi matematici.

In alternativa alla stima di ogni singolo contributo all'incertezza, si può pensare di aggiungere informazioni sul metodo utilizzato, provvedendo ad una sua validazione più o meno accurata. Cosicché tanto maggiori saranno le informazioni che si raccolgono da tale validazione, tanto più numerose saranno le fonti di incertezza che potremo considerare già note *a priori* (perché inglobate nei valori di ripetibilità ecc.), tanto meno laborioso sarà il processo di stima "passo-passo" dell'incertezza globale. Se ad esempio si deve stimare l'incertezza su una pesata, si sa che questa sarà data dalla combinazione dell'incertezza sulla linearità e sensibilità della bilancia e dalla ripetibilità della pesata stessa. Se però si conosce dalla validazione la ripetibilità globale del metodo, si potrà trascurare la stima della ripetibilità della pesata, potendola infatti considerare inclusa nella suddetta ripetibilità del metodo.

Sta al buon senso dell'operatore stabilire se spendere energie in:

- a) un'attenta stima "passo-passo" di ogni singola fonte di incertezza;
- b) nella preliminare raccolta di dati attraverso una validazione del metodo;
- c) attraverso una semplice integrazione della validazione, qualora già si disponga di alcuni dati (presi ad esempio da convalide presenti in letteratura o in monografie ufficiali) che non si ritengono però sufficienti a coprire tutte le fonti di incertezza per la specifica analisi che si sta effettuando.

Si noti comunque che, anche se i dati di validazione di cui si dispone vengono ritenuti assolutamente completi e pertanto sufficienti per un esauriente trattamento dell'incertezza, questa verrà preferibilmente espressa come incertezza estesa, (vedi punti 5 e 6) a partire dalla precisione in condizioni di riproducibilità; oppure, in mancanza di questa, dall'incertezza estesa ottenuta propagando la precisione in condizioni di ripetibilità (o meglio quella intermedia se disponibile) con l'incertezza sullo scostamento sistematico. Si veda a questo proposito il caso pratico trattato nell'esempio 1.

ESEMPI DI APPLICAZIONE

Vengono qui di seguito riportati alcuni esempi, allo scopo di chiarire i concetti proposti nel testo e fornire strumenti utili a calare nella realtà applicativa le regole fino ad ora descritte. Tali esempi sono ispirati ad alcune delle possibili esperienze del Laboratorio di Chimica del Farmaco dell'Istituto Superiore di Sanità. Altri esempi sono in atto di stesura, allo scopo di fornire, in un prossimo futuro, una casistica quanto più ampia possibile.

Esempio 1

Si prenda in esame il dosaggio di un principio attivo farmaceutico attraverso un metodo cromatografico (potrebbe ad esempio trattarsi del dosaggio di un cortisonico la cui presenza è stata eventualmente riscontrata all'interno di una preparazione cosmetica).

Il metodo utilizzato è quello normalmente in uso nel laboratorio ed è stato inoltre sottoposto a validazione. Si lavora, infine, sotto regime di assicurazione della qualità e tutta la strumentazione utilizzata per l'analisi è pertanto sotto stretto controllo, così come l'addestramento degli operatori.

Si eseguono tre prove ottenendo una concentrazione media di principio attivo pari a:

$$C = 0,1013 \text{ mg/ml}$$

Se si ritiene che la validazione copra tutte le possibili fonti di incertezza si potrà utilizzare, per esprimere l'incertezza composta, la precisione in condizioni di riproducibilità eventualmente ottenuta durante il processo di convalida del metodo:

$$S_r = 2\%$$

dove S_r è uno scarto tipo relativo percentuale (o CV%).

Ne consegue che:

$$\frac{u_{TOT}}{C} = S_r = 2\%$$

$$u_{TOT} = \frac{S_r}{100\%} \cdot C = \frac{2\%}{100\%} \cdot 0,1013 \text{ mg/ml} = 2,026 \cdot 10^{-3} \text{ mg/ml}$$

Come fattore di copertura si dovrebbe prendere il K risultante dalla Tabella 4 in base al numero di gradi di libertà stimabili attraverso la formula di Welch-Satterthwaite. Il calcolo a volte potrebbe però risultare laborioso, pertanto, se si ritiene che sia stato effettuato un numero sufficientemente grande di prove, si può considerare $K=2$ senza commettere approssimazioni rilevanti.

L'incertezza estesa sarà pertanto:

$$u_{estesa} = u_{TOT} \cdot K = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mg/ml}$$

E il risultato finale sarà presentato in questo modo:

$$C = (0,101 \pm 0,004) \text{ mg/ml}$$

La distribuzione delle misure viene ritenuta normale, pertanto l'incertezza estesa indicata è espressa attraverso un fattore di copertura $K=2$ che corrisponde ad un livello di confidenza del 95% circa.

Se invece, pur ritenendo che la validazione copra tutte le fonti di incertezza di rilievo, non si dispone di una stima della precisione in condizioni di riproducibilità, si procederà nel modo che segue:

- Si prenda in primo luogo in considerazione la precisione in condizione di ripetibilità stimata durante la convalida:

$$S_{\text{ripetibilità(convalida)}} = 0,8\%$$

Sarebbe scorretto considerare come ripetibilità lo scarto tipo relativo delle tre prove effettuate per l'analisi in corso. Tale ripetibilità, infatti, venendo da un numero di prove molto piccolo (solo tre), possiede a sua volta un'incertezza elevata. Si dovrà invece procedere ad una stima dell'incertezza sulla ripetibilità a partire proprio dalla precisione in condizioni di ripetibilità stimata durante la convalida, come qui di seguito indicato:

$$u_{\text{ripetibilità}} = \frac{S_{\text{ripetibilità(convalida)}}}{\sqrt{n_{\text{analisi_in_corso}}}} = \frac{0,8\%}{\sqrt{3}} = 0,46188\%$$

dove $n_{\text{analisi_in_corso}}$ è il numero di prove effettuate nell'analisi in corso: si rischierebbe una sottostima dell'incertezza, invece, qualora si considerasse come numero di misure n quello relativo alle misure effettuate durante la convalida.

- Si consideri poi l'esattezza della misura. Questa, durante il processo di convalida, può essere determinata dall'analisi di materiali certificati, oppure attraverso prove di recupero dell'analita puro aggiunto alla matrice da analizzare. In questo esempio si segue il secondo approccio e si ottiene su cinque prove un recupero medio pari a:

$$R_m \approx 0,98 \text{ (o } 98\% \text{ se si preferisce esprimerlo in percentuale).}$$

Tale grandezza rappresenta la media dei rapporti tra valore misurato e valore atteso:

$$R_m = \sum_{i=1}^{i=n} R_i \quad \text{dove } R_i = \frac{\text{valore misurato}}{\text{valore atteso}} \text{ per ogni misura } i_{\text{esima}}$$

A tale valore medio è ovviamente associato uno scarto tipo relativo STR che espresso in percentuale è pari a :

$$\text{STR} = 3\%$$

La stima dell'incertezza relativa all'esattezza viene effettuata combinando due contributi: il primo sarà quello relativo all'incertezza associata alla concentrazione della soluzione utilizzata per le prove di recupero ed il secondo sarà quello relativo alla loro ripetibilità.

Avremo pertanto:

$$\frac{u_{\text{recupero}}}{R_m} = \sqrt{\left(\frac{u(C_{\text{aggiunte}})}{C_{\text{aggiunte}}}\right)^2 + \left(\frac{\text{STR}}{\sqrt{n}}\right)^2} = \sqrt{0,5\%^2 + \left(\frac{3\%}{\sqrt{5}}\right)^2} = 1,43178\%$$

dove:

C_{aggiunte} è la concentrazione della soluzione utilizzata per le aggiunte ed $u(C_{\text{aggiunte}})$ è l'incertezza ad essa associata (si noti che qualora la determinazione dell'esattezza fosse effettuata attraverso l'analisi di materiale di riferimento certificato, tale termine andrebbe sostituito con l'incertezza relativa, presente nel certificato che accompagna il materiale stesso, associata al valore di concentrazione assegnato a tale materiale dal fornitore).

$\text{STR} = 3\%$ è lo scarto tipo relativo percentuale associato ad R_m già descritto in precedenza. $n = 5$ è il numero di prove di recupero effettuate durante il processo di convalida.

Si noti infine che, nonostante il calcolo dell'esattezza dimostri la presenza di uno scostamento sistematico pari a circa il 2% (essendo $R_m \approx 98\%$), questo non risulta statisticamente significativo:

$$\frac{|100\% - R_m|}{u_{recupero}} = 1,4 < K$$

dove K è il fattore di copertura per un livello di confidenza del 95%, mai più piccolo di 1,96.

La concentrazione di cortisone trovata non viene quindi corretta.

- Si calcoli l'incertezza composta combinando il contributo della ripetibilità e quello dell'esattezza:

$$\frac{u_{TOT}}{C} = \sqrt{(u_{ripetibilità})^2 + \left(\frac{u_{recupero}}{R_m}\right)^2} = \sqrt{0,46188\%^2 + 1,43178\%^2} = 1,5044\%$$

$$u_{TOT} = 1,5044\% \cdot C = \frac{1,5044}{100} \cdot 0,1013 \text{ mg / ml} = 1,5240 \cdot 10^{-3} \text{ mg / ml}$$

- Si determinino i gradi di libertà effettivi secondo la formula di Welch-Satterthwaite (si veda il paragrafo "Controlli che non implicano la conformità con un limite specificato" al punto 5):

$$v_{effettivi} = \frac{\left(\frac{u_{TOT}}{C}\right)^4}{\frac{(u_{ripetibilità})^4}{2} + \frac{\left(\frac{u_{recupero}}{R_m}\right)^4}{4}} \approx 4$$

dove i gradi di libertà associati alla ripetibilità sono forniti dal numero di misure effettuate nell'analisi in corso -1, mentre i gradi di libertà associati all'esattezza sono dati dal numero di prove di recupero effettuate durante la convalida -1.

Dalla Tabella 4 avremo $K = 2,78$.

- Si calcola l'incertezza estesa:

$$u_{estesa} = u_{TOT} \cdot K = 4,2 \cdot 10^{-3} \text{ mg / ml}$$

- Si presenta come segue il risultato dell'analisi:

$$C = (0,101 \pm 0,004) \text{ mg/ml}$$

L'incertezza estesa indicata è espressa attraverso un fattore di copertura $K=2,78$ che per una distribuzione con 4 gradi di libertà, corrisponde ad un livello di confidenza del 95% circa.

Esempio 2

Per il dosaggio del contenuto percentuale di acqua nell'antibiotico Cefaclor (materia prima) viene utilizzata la titolazione secondo Karl-Fisher. Il metodo ufficiale, presente nella Farmacopea Italiana, prevede l'utilizzo di piridina come reattivo titolante e prescrive, nel caso in cui si desideri utilizzare un reattivo diverso, di validare la metodica per ogni nuovo principio attivo da analizzare. Come alternativa l'operatore può decidere di non portare a termine la laboriosa convalida, ma di stimare l'incertezza secondo l'approccio *a posteriori*. Vediamo quindi in dettaglio come deve essere portata a termine tale stima.

Il titolatore dispone di una buretta da 10 ml e di un rivelatore coulombometrico del punto equivalente. Per la titolazione viene utilizzato un reattivo titolante che non contiene piridina, in grado di titolare circa 1mg di acqua per ml. Il titolo esatto di tale reattivo viene preventivamente determinato utilizzando uno standard di sodio tartrato, contenente il 15,66% di acqua.

L'operatore, inoltre, esegue un bianco, ovvero una titolazione del contenuto di acqua all'interno della cella dovuto alla naturale infiltrazione di umidità durante l'utilizzo dello strumento.

L'operatore esegue tre determinazioni, sia per il bianco, che per la standardizzazione del reattivo titolante, che per la titolazione del campione.

Schematizziamo brevemente i valori ottenuti durante le determinazioni e le formule utilizzate per ottenere il risultato finale come riportato in Tabella A e B e C.

Tabella A. Determinazioni effettuate sul bianco

| Prova | ml di titolante consumati | Media (ml) \bar{V}_{bianco} | Scarto tipo sperimentale (ml) u_{bianco} | Scarto tipo relativo $\frac{u_{\text{bianco}}}{\bar{V}_{\text{bianco}}}$ |
|-------|---------------------------|---|--|---|
| 1 | 0,160 | 0,15933 | 5,0332x10 ⁻³ | 3,1589x10 ⁻² |
| 2 | 0,164 | | | |
| 3 | 0,154 | | | |

Tabella B. Determinazione del Titolo esatto del reattivo titolante

| Prova | mg di tartrato pesati P_i^{tartrato} | ml di titolante consumati $V_i^{\text{titolante}}$ | Titolo del reattivo [vedi formula (a)] | Valore medio del Titolo $\overline{\text{Titolo}}$ | Scarto tipo relativo del Titolo $\frac{u_{\text{Titolo}}}{\overline{\text{Titolo}}}$ |
|-------|--|---|---|---|---|
| 1 | 19,5 | 3,078 | 1,0461 | 1,02773 | 2,2056x10 ⁻² |
| 2 | 12,6 | 2,066 | 1,0347 | | |
| 3 | 11,9 | 2,018 | 1,0024 | | |

$$(a) \text{Titolo} = \frac{P_i^{\text{tartrato}}}{V_i^{\text{titolante}} - \bar{V}_{\text{bianco}}} \times \frac{\% \text{ di H}_2\text{O nel tartrato}}{100\%}$$

Tabella C. Determinazione del contenuto d'acqua (%)

| Prova | mg di campione pesati $P_i^{campione}$ | ml di titolante consumati $V_i^{titolante}$ | Contenuto H ₂ O (%) [vedi formula (b)] | Valore medio del contenuto di H ₂ O (%) | Scarto tipo relativo |
|-------|---|--|--|--|-------------------------|
| 1 | 43,6 | 2,522 | 5,5702 | 5,5354 | 1,2205x10 ⁻² |
| 2 | 49,1 | 2,824 | 5,5784 | | |
| 3 | 47,4 | 2,676 | 5,4575 | | |

$$(b) \%H_2O = \frac{\Delta V_T}{P_i^{campione}} \cdot \overline{Titolo} \cdot 100\% \quad \text{con } \Delta V_T = (V_i^{titolante} - \overline{V}_{bianco})$$

Per la determinazione dell'incertezza sul contenuto d'acqua del campione analizzato si proceda nel seguente modo:

1. Si individuino tutte le fonti di incertezza.
Osservando la formula (b) si evince che i contributi all'incertezza saranno i seguenti: il contributo legato alla pesata del campione, il contributo legato al volume di reattivo titolante impiegato per titolare il campione e quello impiegato per il bianco, l'incertezza sul titolo esatto del reattivo titolante. Anche se non compare esplicitamente nell'espressione (a) ovviamente anche la ripetibilità dell'analisi andrà presa in considerazione, come detto al punto 1) del paragrafo "Controlli che non implicano la conformità con un limite specificato".
2. Si considerino una alla volta le fonti di incertezza individuate e se ne dia una stima sotto forma di scarti tipo.
 - a) Consideriamo per prima l'incertezza sul titolo esatto del reattivo titolante. Se si osserva l'espressione (a), risulta immediato che i contributi all'incertezza saranno i seguenti: il contributo legato alla pesata del campione, il contributo legato al volume di reattivo titolante impiegato per titolare lo standard (tartrato di sodio) e quello impiegato per il bianco, l'incertezza sul contenuto d'acqua dello standard ed infine (anche se non compare esplicitamente nell'espressione) la ripetibilità complessiva della standardizzazione. Si prendano in esame i singoli contributi:
 - *Peso*
In generale le fonti di incertezza su una pesata sono le seguenti: incertezza sulla funzione relativa alla taratura della scala della bilancia e ripetibilità della pesata. Se si è pesato facendo uso della tara (come accade nella grande maggioranza dei casi) entrambe le fonti andrebbero contate due volte (una volta per la sostanza pesata ed una volta per la tara). Il contributo della ripetibilità della pesata, tuttavia, nel nostro caso può essere considerato incluso nella ripetibilità globale della standardizzazione del reattivo titolante, espressa dallo scarto tipo relativo del titolo (Tabella B). Resta da considerare il solo contributo dovuto alla funzione relativa alla taratura della scala. Le due possibili fonti di incertezza legate a tale funzione sono la sensibilità e la linearità della risposta. Il contributo legato alla sensibilità è trascurabile, dal momento che la pesata viene effettuata per differenza (si pesa infatti con la tara) sullo stesso strumento ed in un intervallo di peso ristretto. Per quanto

riguarda la linearità il costruttore fornisce un valore di $\pm 0,2$ mg. Per convertire il contributo della linearità in un'incertezza tipo, considereremo una distribuzione rettangolare (se non diversamente indicato nel manuale del costruttore). Si avrà pertanto:

$$\frac{0,2mg}{\sqrt{3}} = 0,11547mg$$

Come detto tale contributo dovrà essere contato due volte, uno per la tara ed uno per la sostanza pesata:

$$u_{peso} = \sqrt{2 \cdot (0,11547)^2} = 0,16330mg$$

- *Contenuto di acqua nello standard*

Secondo quanto riportato sull'etichetta dello standard (tartrato di sodio) il contenuto d'acqua è uguale a $(15,66 \pm 0,05)\%$. Per trasformare l'intervallo fornito dalla ditta in un'incertezza tipo consideriamo una distribuzione di probabilità rettangolare (il contenuto d'acqua può cioè cadere in un qualunque punto all'interno dell'intervallo di $\pm 0,05\%$ con uguale probabilità. Si veda il paragrafo "Controlli che non implicano la conformità con un limite specificato"):

$$u_{contenutoH_2O} = \frac{0,05\%}{\sqrt{3}} = 2,8868 \cdot 10^{-2}\%$$

- *Volume impiegato per il bianco*

In generale la misura di un volume porta con se tre fonti di incertezza. L'incertezza legata alla ripetibilità dei volumi erogati dalla buretta, l'incertezza sulla taratura (espressa dall'accuratezza sulla lettura del volume) e l'incertezza dovuta alla differenza tra la temperatura alla quale vengono eseguite le analisi e quella alla quale la buretta è stata tarata dal costruttore. Per quanto riguarda l'incertezza legata alla ripetibilità questa, come già detto per la pesata, sarà considerata inclusa nella stima della ripetibilità globale della standardizzazione del reattivo titolante, espressa dallo scarto tipo relativo del titolo (Tabella B). Per quanto riguarda l'accuratezza questa è indicata dal costruttore come un intervallo di $\pm 0,02$ ml. Per quanto detto al punto 3) del paragrafo "Controlli che non implicano la conformità con un limite specificato" l'incertezza tipo sarà:

$$u_{buretta} = \frac{0,02ml}{\sqrt{6}} = 8,1650 \cdot 10^{-3} ml$$

Per quanto concerne infine l'incertezza dovuta alla temperatura, questa potrà essere stimata attraverso le seguenti considerazioni: la buretta è stata tarata dal costruttore ad una temperatura di 20 °C, mentre nel laboratorio questa va incontro ad oscillazioni di non più di 5 °C attorno a tale valore. Considerando poi che il coefficiente di espansione termica del reattivo titolante (fornito dalla ditta) è pari a $0,001$ °C⁻¹, che il volume medio erogato dalla buretta per le determinazioni del bianco è pari a $0,1593$ ml (Tabella A) e che la temperatura varia con una distribuzione di probabilità rettangolare, otterremo:

$$u_T = \frac{\bar{V}_{\text{bianco}} \cdot \Delta T \cdot C_{\text{esp. termica}}}{\sqrt{3}} = \frac{0,01593 \text{ ml} \cdot 5^\circ\text{C} \cdot 0,001^\circ\text{C}^{-1}}{\sqrt{3}} = 4,6000 \cdot 10^{-4} \text{ ml}$$

Combinando i due contributi:

$$u_{\text{volume}}^{\text{bianco}} = \sqrt{(u_{\text{buretta}})^2 + (u_T)^2} = 8,1780 \cdot 10^{-3} \text{ ml}$$

- *Volume di reattivo titolante impiegato per titolare lo standard*
Seguendo il medesimo ragionamento portato a termine per il volume impiegato per il bianco, si perviene al seguente risultato:

$$u_T = \frac{\bar{V}_{\text{titolante}} \cdot \Delta T \cdot C_{\text{esp. termica}}}{\sqrt{3}} = \frac{2,3873 \text{ ml} \cdot 5^\circ\text{C} \cdot 0,001^\circ\text{C}^{-1}}{\sqrt{3}} = 6,8916 \cdot 10^{-3} \text{ ml}$$

$$u_{\text{volume}}^{\text{titolante}} = \sqrt{(u_{\text{buretta}})^2 + (u_T)^2} = 0,010685 \text{ ml}$$

- *Ripetibilità complessiva della standardizzazione*
Tale termine andrà espresso dallo scarto tipo relativo del titolo (presente nella Tabella B) diviso per la radice del numero di misure effettuate, così da esprimerlo come scarto tipo relativo della media:⁶

$$u_{\text{ripetibilità}} = \frac{\left(\frac{u_{\text{titolo}}}{\text{Titolo}} \right)}{\sqrt{3}} = 1,2734 \cdot 10^{-2}$$

I cinque contributi così individuati e stimati devono quindi essere combinati per ottenere l'incertezza sul titolo del reattivo. Per far questo si seguiranno le indicazioni fornite al punto 4) del paragrafo "Controlli che non implicano la conformità con un limite specificato":

- si calcolano prima l'incertezza tipo e quella relativa sulla differenza tra i volumi di reattivo titolante consumati per il bianco e per la titolazione dello standard di tartrato [differenza che compare a denominatore nell'espressione (a)]:

$$u_{\text{volumi}} = \sqrt{(u_{\text{volume}}^{\text{bianco}})^2 + (u_{\text{volume}}^{\text{titolante}})^2} = 0,013455 \text{ ml}$$

$$\frac{u_{\text{volumi}}}{V_i^{\text{titolante}} - \bar{V}_{\text{bianco}}} = 6,039 \cdot 10^{-3} \text{ (e)}$$

⁶ Si ricorda in ogni caso, che sarebbe più corretto far uso di un valore di ripetibilità stimato su un numero più elevato possibile di misure. Con tre sole misure, ovviamente, l'incertezza sullo scarto tipo che si ottiene sarà elevata. Una soluzione potrebbe essere quella calcolare una volta per tutte la ripetibilità del metodo, facendo uso di adeguati standard ed effettuando almeno 15 misure, utilizzare poi questo valore per la stima dell'incertezza di tutte le future determinazioni, così come visto nell'esempio 1.

dove:
$$\overline{V_i^{titolante}} - \overline{V_{bianco}} = 2,2280 \text{ ml}$$

è la media della differenza tra i volumi di reattivo impiegati per titolare lo standard e il volume medio relativo al bianco (presente in Tabella A);

- l'incertezza relativa (c) si combina poi con tutte le altre per ottenere l'incertezza composta complessiva del titolo:

$$\frac{u_{TITOLO}}{Titolo} = \sqrt{\left(\frac{u_{contenutoH_2O}}{15,66\%}\right)^2 + \left(\frac{u_{peso}}{\overline{P}_{tartrato}}\right)^2 + \left(\frac{u_{volumi}}{\overline{V_i^{titolante}} - \overline{V_{bianco}}}\right)^2 + (u_{ripetibilità})^2}$$

$$\frac{u_{TITOLO}}{Titolo} = \sqrt{3,3981 \cdot 10^{-6} + 1,2397 \cdot 10^{-4} + 3,6470 \cdot 10^{-5} + 1,6216^{-4}}$$

$$\frac{u_{TITOLO}}{Titolo} = 0,018055$$

b) Si considerino ora tutti gli altri termini che compaiono nella formula (b):

- *Peso*

L'incertezza sul peso del campione si determina seguendo lo stesso schema adottato per la stima dell'incertezza sulla pesata dello standard nella determinazione del titolo esatto del reattivo:

$$u_{peso} = \sqrt{2 \times \left(\frac{0,2mg}{\sqrt{3}}\right)^2} = 0,16330mg$$

$$\frac{u_{peso}}{\overline{P}_{campione}} = 3,2747 \cdot 10^{-3}$$

dove $\overline{P}_{campione} = 49,87 \text{ mg}$ è la media dei $P_i^{campione}$ riportati in Tabella C.

- ΔV_T

È la differenza tra i volumi di reattivo impiegati per la titolazione del campione ed il volume medio di reattivo impiegato per il bianco:

$$\overline{V_i^{titolante}} - \overline{V_{bianco}}$$

Anche in questo caso si ricalcherà lo schema seguito per la stima dell'incertezza sul titolo esatto del reattivo:

- l'incertezza tipo sul volume di reattivo impiegato per il bianco è già stata determinata:

$$u_{volume}^{bianco} = \sqrt{(u_{burette})^2 + (u_T)^2} = 8,1780 \cdot 10^{-3} \text{ ml}$$

- l'incertezza tipo sul volume del reattivo impiegato per la titolazione del campione sarà data da:

$$u_T = \frac{\overline{V}_{titolante} \cdot \Delta T \cdot C_{esp.termica}}{\sqrt{3}} = \frac{2,6740ml \cdot 5^\circ C \cdot 0,001^\circ C^{-1}}{\sqrt{3}} = 7,7192 \cdot 10^{-3} \text{ ml}$$

$$u_{volume}^{titolante} = \sqrt{(u_{burette})^2 + (u_T)^2} = 0,011236ml$$

- l'incertezza tipo e quella relativa sulla differenza tra i volumi di reattivo titolante consumati per il bianco e per la titolazione del campione saranno infine:

$$u_{\text{volumi}} = \sqrt{(u_{\text{volume}}^{\text{bianco}})^2 + (u_{\text{volume}}^{\text{titolante}})^2} = 0,013897 \text{ ml}$$

$$\frac{u_{\Delta V_T}}{\Delta V_T} = 5,5264 \cdot 10^{-3}$$

dove $\overline{\Delta V_T} = 2,5147$ ml è la media della differenza tra i volumi di reattivo impiegati per titolare il campione e il volume medio relativo al bianco (presente in Tabella A).

- *Ripetibilità complessiva dell'analisi*⁷

Tale termine è espresso dalla scarto tipo relativo sulle tre determinazioni effettuate, presente nella Tabella C, diviso per la radice di tre (il numero di misure effettuate) così da esprimerlo come scarto tipo relativo della media:

$$u_{\text{ripetibilità}} = \frac{1,2205 \cdot 10^{-2}}{\sqrt{3}} = 7,0466 \cdot 10^{-3}$$

3. Si combinino tutte le incertezze tipo stimate al punto 2) per determinare l'incertezza composta sul contenuto percentuale di acqua nel campione:

$$\frac{u_{\%H_2O}}{\%H_2O} = \sqrt{(u_{\text{ripetibilità}})^2 + \left(\frac{u_{\Delta V_T}}{\Delta V_T}\right)^2 + \left(\frac{u_{\text{peso}}}{\overline{P}_{\text{campione}}}\right)^2 + \left(\frac{u_{\text{TITOLO}}}{\overline{\text{Titolo}}}\right)^2}$$

$$\frac{u_{\%H_2O}}{\%H_2O} = 0,020418$$

ed essendo $\overline{\%H_2O} = 5,5354\%$ avremo infine:

$$u_{\%H_2O} = 0,11302\%$$

4. Si determinino i gradi di libertà dell'analisi. L'operazione non è immediata, dal momento che sono state effettuate complessivamente nove analisi: tre per il bianco, tre per la determinazione del titolo del reattivo e tre per la determinazione del contenuto d'acqua nel campione. Si procederà pertanto con la stima preliminare dei gradi di libertà relativi alla determinazione del titolo esatto del reattivo:

$$v_{\text{Titolo}} = \frac{\left(\frac{u_{\text{TITOLO}}}{\overline{\text{Titolo}}}\right)^4}{\frac{(u_{\text{ripetibilità}})^4}{2} + \frac{\left(\frac{u_{\text{peso}}}{\overline{P}_{\text{tartrato}}}\right)^4}{2} + \frac{\left(\frac{u_{\text{volumi}}}{\overline{V_i^{\text{titolante}} - \overline{V}^{\text{bianco}}}}\right)^4}{2}}$$

⁷ Vedi nota 6.

$$v_{Titolo} = \frac{1,0626 \cdot 10^{-7}}{1,3147 \cdot 10^{-8} + 7,6843 \cdot 10^{-9} + 6,6503 \cdot 10^{-10}} \approx 4$$

e successivamente alla stima dei gradi di libertà associati all'analisi nel suo complesso:

$$v_{effettivi} = \frac{\left(\frac{u_{\%H_2O}}{\%H_2O} \right)^4}{\frac{(u_{ripetibilità})^4}{2} + \frac{\left(\frac{u_{peso}}{P_{campione}} \right)^4}{2} + \frac{\left(\frac{u_{\Delta V_T}}{\Delta V_T} \right)^4}{2} + \frac{\left(\frac{u_{TITOLO}}{Titolo} \right)^4}{v_{Titolo}}} \approx 6$$

5. Si determini il fattore di copertura in base ai gradi di libertà determinati. Dalla Tabella 4 il valore di K che si ottiene è:

$$K=2,45.$$

6. Si determini l'incertezza estesa e si fornisca il risultato finale dell'analisi:

$$u_{estesa} = u_{H_2O\%} \cdot K = 0,27690\%$$

Il contenuto d'acqua nel campione sarà:

$$\%H_2O = (5,5 \pm 0,3)\%$$

L'incertezza estesa indicata è espressa attraverso un fattore di copertura $K=2,45$ che per una distribuzione con 6 gradi di libertà effettivi, corrisponde ad un livello di confidenza del 95% circa.

La farmacopea, per il principio attivo in esame, impone un contenuto d'acqua variabile tra 3,5% e 6,3%. Il valore medio determinato cade all'interno di questo limite, e la stima dell'incertezza portata a termine, per quanto laboriosa, permette di affermare con ottimi margini di sicurezza che il contenuto d'acqua della materia prima in esame cade effettivamente entro il limite prescritto.

È possibile in ogni caso introdurre delle semplificazioni che non alterano in modo significativo il valore dell'incertezza ottenuto. È possibile, cioè, trascurare i contributi all'incertezza meno rilevanti.

Se si osserva la Figura 5, ad esempio, si può concludere che è possibile stimare l'incertezza sul titolo esatto del reattivo titolante a partire dai soli contributi legati alla pesata ed alla ripetibilità.

Se poi si osserva la Figura 6, si potrà avere un'idea immediata di quali sono i contributi trascurabili, così da stabilire l'opportunità di una stima dell'incertezza globale combinando i soli contributi che si ritengono rilevanti.

Si può fare lo stesso per la stima dei gradi di libertà attraverso la formula di Welch-Satterthwaite, ottenendo complessivamente una discreta semplificazione dei calcoli.

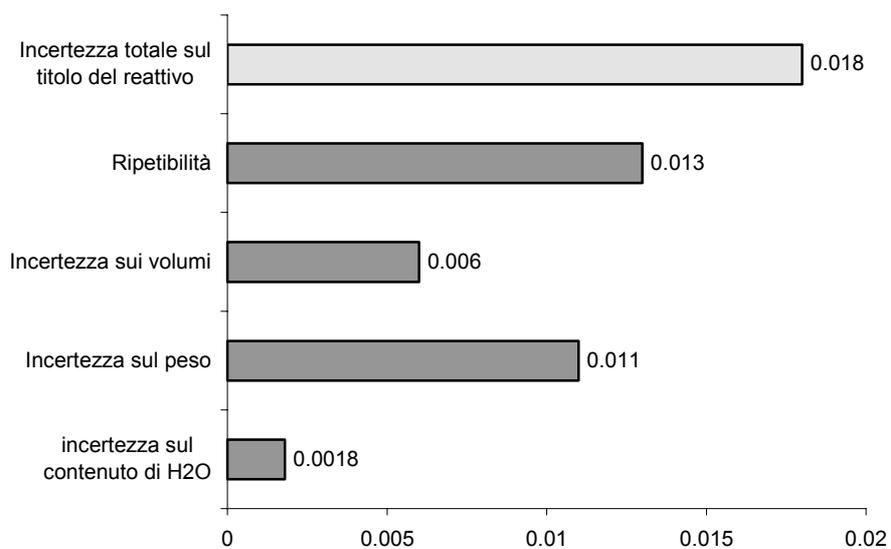


Figura 5. Contributi all'incertezza sul titolo esatto del reattivo titolante

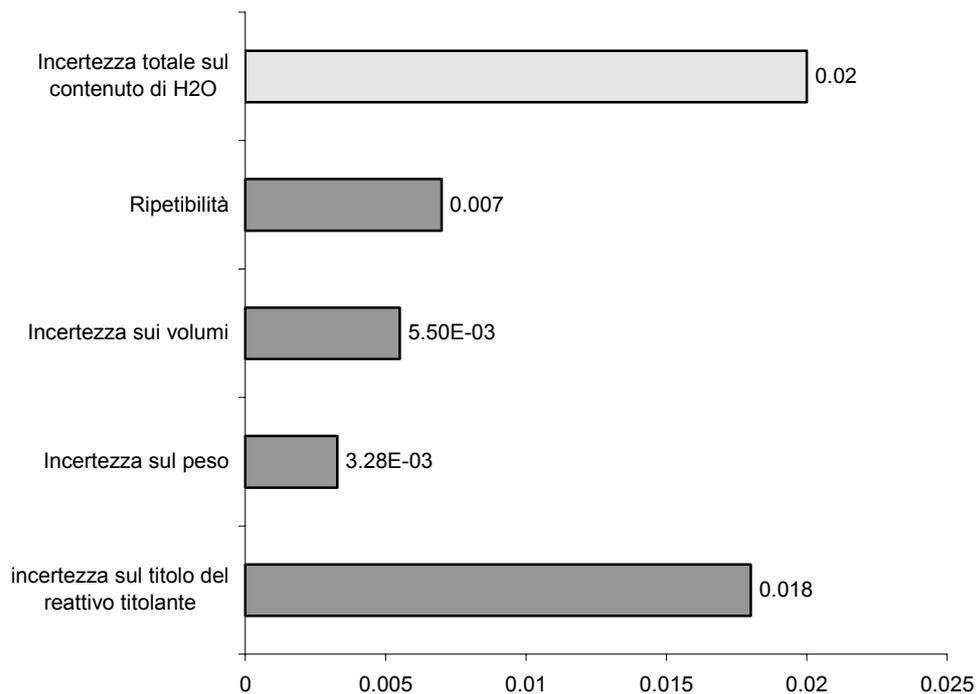


Figura 6. Contributi all'incertezza sul contenuto di H₂O nel campione

Un'ulteriore semplificazione, infine, potrà essere introdotta tralasciando del tutto i complessi calcoli per la determinazione del fattore di copertura a partire dai gradi di libertà, prendendo un valore di $K=2$. Ciò a patto, naturalmente, di specificare con chiarezza la scelta fatta al momento della presentazione dei risultati, così come indicato al punto 6) del paragrafo "Controlli che non implicano la conformità con un limite specificato".

CONCLUSIONI

Nel concludere questo breve compendio è opportuno porre l'accento su quanto segue: si potrebbe ritenere che l'approccio utilizzato per stimare l'incertezza nell'ambito di controlli che non implicano la conformità con un limite specificato (*compliance testing*) sia più rigoroso di quello usato per i *compliance testing* stessi. La scelta fatta, quindi, potrebbe risultare in apparenza paradossale. Si deve però riflettere sul fatto che i controlli implicanti la conformità con determinate specifiche, che rappresentano la quasi totalità delle attività dei laboratori ufficiali di controllo chimico dei farmaci, sfruttano metodi analitici largamente in uso, già abbondantemente sperimentati, spesso validati con completezza e che, quindi, affondano le proprie origini in un bagaglio di conoscenze tanto ampio ed esauriente da tutelare *a priori* l'operatore dal fornire un risultato di misura poco attendibile.

Assicurare una tale tutela è di primaria importanza: in quelle rare attività di controllo che non rispettino le condizioni sopra descritte (ed elencate in dettaglio al paragrafo "Controlli che implicano la verifica della conformità con un limite specificato (*compliance testing*)") pertanto, solo l'uso di procedure statistiche quanto più rigorose possibile, come quelle compendiate nel testo, renderà attendibili i risultati di misura.

BIBLIOGRAFIA

1. UNI ISO 17025. *Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura*. Milano. Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2000.
2. International Organization for Standardization ISO. *Vocabolario Internazionale dei termini fondamentali e generali in metrologia (VIM)*. Seconda edizione. Ginevra: ISO; 1993.
3. Cotta Ramusino M, Bartolomei M, Romanini L. *Network europeo dei laboratori ufficiali di controllo dei farmaci - il ruolo del Laboratorio di Chimica del Farmaco dell'Istituto Superiore di Sanità*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2002. (Rapporti ISTISAN 02/13).
4. Council of Europe - European Network of Official Medicines Control Laboratories. *OMCL Policy paper on the estimation and application of uncertainty in analytical measurement*. Strasbourg: OMCL; 2001 (PA/PH/OMCL (2001) 6, 6R). (Documento riservato).
5. Eurachem/Citac working group. *Quantifying uncertainty in analytical measurement*. (Second edition 2000). Disponibile all'indirizzo: <http://www.eurachem.ul.pt>; ultima consultazione 1/8/2003.
6. International Organization for Standardization GUM 1993. *Guide to the expression of uncertainty in measurement*. Geneva: ISO; 1993.
7. Council of Europe - European Network of Official Medicines Control Laboratories. *Qualification of equipment*. Strasbourg: OMCL; 1999 (PA/PH/OMCL (99) 43). (Documento riservato).
8. Bedson P, Sargent M. The development and application of guidance on equipment qualification of analytical instruments. *Accred Qual Assur* 1996;1:265-74.
9. Bedson P, Rudd D. The development and application of guidance on equipment qualification of analytical instruments: high performance liquid chromatography. *Accred Qual Assur* 1999;4:50-62.
10. Council of Europe. Monographs. Test and Assays. Limits. (Chapter 1.4). In: *European Pharmacopoeia*. 4th Edition. Strasbourg: Council of Europe; 2002.
11. Council of Europe - European Network of Official Medicines Control Laboratories. *Validation of analytical procedures*. Strasbourg: OMCL; 1999 (PA/PH/OMCL (99) 37, R). (Documento riservato).
12. Council of Europe. Chromatographic separation techniques. (Chapter 2.2.46). In: *European Pharmacopoeia*. 4th Edition. Strasbourg: Council of Europe; 2002.
13. Council of Europe - Group of Experts No. MG. *System Suitability Criterion for Repeatability*. Strasbourg; 2001 (PA/PH/Exp. MG/T (01) 1). (Documento riservato).
14. Council of Europe - European Network of Official Medicines Control Laboratories. *Evaluation and reporting of results*. Strasbourg: OMCL; 1999 (PA/PH/OMCL (99) 38, R). (Documento riservato). Tale documento è attualmente in fase di revisione: si veda a tale proposito il *Final report* del meeting di Strasburgo del 10 aprile 2002 (16).
15. Daas AGJ, Miller JH McB. Relationship between content limits, system suitability for precision and acceptance/rejection criteria for assays using chromatographic methods. *Pharmeuropa* 1999;11(4):571-7.
16. Council of Europe - European Network of Official Medicines Control Laboratories. *Measurement uncertainties working group*. Strasbourg: OMCL; 2002 (PA/PH/OMCL (2002) 42, R). (Documento riservato).
17. Miller JN, Miller JC. *Statistic for analytical chemistry*. (3rd edition). Chichester: Ellis Horwood; 1992.

18. UNI CEI ENV 13005:2000. *Guida all'espressione dell'incertezza di misura*. Milano; Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2000.
19. Daas AGJ, Miller JH McB. Content limit in European Pharmacopoeia (Part 1). *Pharmeuropa* 1997;9(1):148-56.
20. Daas AGJ, Miller JH McB. Content limit in European Pharmacopoeia (Part 2). *Pharmeuropa* 1998;10(1):137-46.
21. Council of Europe - European Network of Official Medicines Control Laboratories. *OMCL Policy paper on the estimation and application of uncertainty in analytical measurement*. Strasbourg: OMCL; 2001 (PA/PH/OMCL (2001) 7, 5R). (Documento riservato).
22. Italia. Legge 11 ottobre 1986, n. 713. Norme per l'attuazione delle direttive della comunità europea sulla produzione e la vendita dei cosmetici. *Gazzetta Ufficiale – Serie Generale* n. 253, 30 ottobre 1986.
23. Technical Guide for the elaboration of monographs. *Pharmeuropa* 1999, special issue: 7-9.
24. Welch BL. *J R Stat. Soc* 1938; 3 (Suppl.): 29-48.
25. Satterthwaite FE. Synthesis of variance. *Psychometrika* 1941;6, 309-316.
26. European Accreditation. *Expression of the uncertainty of measurement in calibration*. EA-4/92. Disponibile all'indirizzo: <http://www.european-accreditation.org>; ultima consultazione: 15/07/02.
27. Council of Europe - European Network of Official Medicines Control Laboratories. *Design of proficiency testing studies provided by the European directorate for the quality of medicines*. Strasbourg: OMCL; 2001 (PA/PH/OMCL (2001) 36). (Documento riservato).
28. UNI ISO 3534-1. *Statistica - Vocabolario e simboli. Probabilità e termini statistici generali*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2000.
29. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. *Note for guidance on validation of analytical methods: definition and terminology*. 1995 (CPMP/ICH/381/95). Disponibile all'indirizzo: <http://www.emea.eu.int>; ultima consultazione: 02/07/02.

GLOSSARIO

Accuratezza

“Grado di concordanza tra un risultato di prova ed il valore di riferimento accettato. Il termine accuratezza, applicato ad un insieme di risultati di prova, implica una combinazione delle componenti casuali e di uno scostamento sistematico” (28). L’accuratezza è da considerarsi un concetto qualitativo, la cui misura quantitativa è fornita dall’incertezza.

Coefficiente di Variazione (CV)

Conosciuto anche come Scarto Tipo Relativo **STR** (in inglese: *Relative Standard Deviation RSD*), è definito come:

$$CV = \frac{s}{\bar{X}} \text{ dove } s \text{ è lo scarto tipo sperimentale.}$$

Coefficiente di Variazione % (CV%)

Detto anche Scarto Tipo Relativo percentuale **STR%** (in inglese: *% Relative Standard Deviation RSD%*), è definito come:

$$CV\% = \frac{s}{\bar{X}} \cdot 100\% \text{ dove } s \text{ è lo scarto tipo sperimentale.}$$

Compliance testing

Attività di controllo eseguita utilizzando metodi analitici ufficiali o convalidati, avente lo scopo di verificare che il prodotto esaminato sia conforme a determinate specifiche (4).

Content limit

L’intervallo di valori espressi in percentuale entro il quale si ritiene, sulla base di un’opportuna trattazione statistica, che il risultato di un dosaggio analitico debba ragionevolmente cadere.

Criteri di accettazione

Limiti da applicarsi ai risultati ottenuti da un’analisi effettuata. Tali criteri sono stabiliti *a priori* e dipendono dalla procedura analitica in questione, dai limiti presenti nella monografia o nelle specifiche dei metodi autorizzati al momento della registrazione (4).

Esattezza

“Grado di concordanza tra il valore medio ottenuto a partire da un grande insieme di risultati di prova ed un valore di riferimento accettato.” (28). Anche l’esattezza come l’accuratezza è un concetto qualitativo. La sua misura è fornita dallo scostamento sistematico (o vizio).

Metodo ufficiale

Qualsiasi metodo descritto nella Farmacopea Europea o, in mancanza, nella farmacopea nazionale di uno stato membro, o nella Farmacopea Statunitense o Giapponese e qualsiasi metodo convalidato descritto nelle relazioni tecniche fornite dalla Ditta produttrice del prodotto in esame.

Precisione intermedia

Grado di concordanza tra risultati di prova ottenuti con lo stesso metodo su campioni identici, variando una sola delle seguenti condizioni: operatore, giorno in cui le analisi vengono eseguite, strumentazione, reagenti, laboratorio (29).

Ripetibilità (Precisione in condizioni di ripetibilità)

“Grado di concordanza tra risultati di prova indipendenti ottenuti in condizioni di ripetibilità.” (28).

Condizioni di ripetibilità

“Condizioni nelle quali tali risultati vengono ottenuti con lo stesso metodo su un identico materiale, nello stesso laboratorio, dallo stesso operatore, usando la stessa apparecchiatura e in intervallo di tempo brevi.” (28).

Riproducibilità (Precisione in condizioni di riproducibilità)

“Grado di concordanza tra risultati di prova indipendenti ottenuti in condizioni di riproducibilità.” (28).

Condizioni di riproducibilità

“Condizioni nelle quali tali risultati vengono ottenuti con lo stesso metodo su entità di prova identiche, in laboratori differenti, da operatori diversi e usando apparecchiature diverse.” (28).

Scarto tipo inter-laboratorio

Prendendo in esame un *proficiency testing study* portato a termine da un gran numero di laboratori, lo scarto tipo inter-laboratorio è così definito:

$$S = \sqrt{\frac{\sum (\bar{x}_i - \bar{\bar{x}})^2}{N - 1}}$$

dove \bar{x}_i sono i singoli valori medi ottenuti da ciascun laboratorio, $\bar{\bar{x}}$ è la media di tutti gli \bar{x}_i valori medi ed N il numero di laboratori presi in esame (19), (20), (27).

Scarto tipo sperimentale

$$s = \sqrt{\frac{1}{m - 1} \cdot \sum_{i=1}^m (X_i - \bar{X})^2}$$
 dove m è il numero di misure effettuate.

Scarto tipo sperimentale della media

$$s' = \sqrt{\frac{1}{m(m - 1)} \cdot \sum_{i=1}^m (X_i - \bar{X})^2}$$
 dove m è il numero di misure effettuate.

Scostamento sistematico (o vizio, o dall'inglese: *bias*)

“Differenza tra la speranza matematica dei risultati di prova ed un valore di riferimento accettato.” (28).

System Suitability Check

L'insieme delle prove analitiche da svolgersi prima di procedere all'analisi vera e propria, per stabilire se le prestazioni di una data procedura analitica sono adeguate (12), (13), (4).

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
deve essere preventivamente autorizzata.*

*Stampato da Ditta Grafiche Chicca & C. snc
Via di Villa Braschi 143, 00019 Tivoli (Roma)*

Roma, giugno 2003 (n. 2) 12° Suppl.