

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TERAMO

CL in BIOTECNOLOGIE

Anno Accademico 2022/2023

CHIMICA ANALITICA

Parametri di Validazione

Gli standard

La maggior parte delle analisi chimiche sono oggi condotte con metodi strumentali, attraverso un gran numero di tecniche analitiche, che in sintesi si possono riassumere nel seguente modo:

- spettroscopia molecolare ed atomica di assorbimento e di emissione di radiazioni elettromagnetiche a diverse lunghezze d'onda
- metodi elettrochimici (potenziometria, conduttimetria, elettrolisi, voltammetria)
- metodi cromatografici di separazione (gascromatografia, HPLC, cromatografia ionica)
- metodi di separazione massa/carica (spettrometria di massa e tecniche di massa accoppiata)

I metodi strumentali presentano diversi vantaggi rispetto alle tecniche tradizionali:

- maggiore sensibilità e minore limite di dosabilità
- maggiore velocità, possibilità di automazione
- acquisizione, elaborazione e gestione dei dati analitici mediante interfacciamento con PC

In qualsiasi metodo analitico è necessario preparare una o più soluzioni di riferimento, dette soluzione standard o semplicemente standard, contenenti l'analita a concentrazione nota e incertezza nota.

Gli **standard** possono essere:

- standard primari - PS (Primary Standard)
- materiali di riferimento - RM (Reference Material)
- materiali di riferimento certificati - CRM (Certified Reference Material)

I **materiali di riferimento RM** sono materiali o sostanze che possiedono determinati requisiti che li rendono idonei per la taratura di un apparecchio o la valutazione di un metodo di misura. I materiali di riferimento certificati CRM sono materiali in cui uno o più valori delle loro proprietà sono certificati da una procedura valida e accompagnati da un certificato che li qualifica. Sono prodotti da vari enti internazionali (ISO, UNICHIM, ecc.) e in genere riproducono la matrice di determinati campioni.

Tutti le sostanze che non hanno tutti i requisiti richiesti ma che vengono utilizzate nella pratica analitica, sono dette **standard secondari**. Ovviamente gli standard primari hanno le migliori caratteristiche metrologiche e sono accettati come riferimento senza confronto con altri campioni della stessa qualità, in quanto sono i PS a costituire il riferimento analitico.

Standard nelle analisi strumentali

Di solito per le analisi strumentali sono necessarie soluzioni standard molto diluite, che non possono essere preparate direttamente per pesata perché si dovrebbero pesare quantità molto piccole, vicine al limite di sensibilità della bilancia analitica, commettendo errori rilevanti.

Durante il processo analitico, in genere, si prepara inizialmente per pesata una soluzione di standard primario a concentrazione elevata, in modo da pesare quantità apprezzabili e quindi ridurre l'errore di pesata. Questa soluzione è detta soluzione standard concentrata (SSC), ovvero soluzione madre. Si procede in seguito a una o più diluizioni, prelevando accuratamente con una buretta precedentemente lavata e normalizzata volumi calcolati di SSC e portando a volume in matraccio tarato. In tal modo si ottiene la soluzione standard diluita (SSD). Infine, si preparano gli standard di lavoro (ST), cioè le soluzioni a diversa concentrazione che vengono utilizzate per costruire la retta di lavoro, prelevando accuratamente con una buretta volumi calcolati di SSD e portando a volume in altrettanti matracci tarati. In questo modo si possono preparare soluzioni standard molto diluite senza commettere errori apprezzabili durante la loro preparazione. Ovviamente l'intera procedura va eseguita con la massima precisione e accuratezza, perché costruire una retta di lavoro errata significa compromettere i risultati delle successive analisi.

La calibrazione

Dopo aver preparato il campione di laboratorio è finalmente possibile effettuare l'analisi vera e propria che, pertanto, può essere preceduta da numerose altre fasi del processo analitico; ad esempio la determinazione dell'indice di rifrazione di un olio di oliva è immediata, la determinazione della caffeina nel cioccolato richiede complesse estrazioni e separazioni preliminari. Dopo l'eventuale determinazione qualitativa, l'analisi del campione procede con la determinazione quantitativa dell'analita, che può essere effettuata in due diversi modi:

- 1. Metodi analitici assoluti:** la correlazione fra la grandezza misurata e la quantità di analita è univocamente determinata da leggi fisiche (esempio tecniche gravimetriche). A tale categoria appartengono anche le titolazioni, nelle quali la quantità di analita viene determinata sfruttando una reazione chimica con un reagente a concentrazione nota aggiunto fino all'equivalenza stechiometrica con l'analita presente nel campione.
- 2. Metodi analitici relativi:** richiedono la costruzione di una curva/retta di calibrazione, che descrive la relazione fra il segnale misurato e la concentrazione dell'analita. A questa categoria appartiene la maggior parte dei metodi analitici strumentali. La curva/retta di calibrazione si ricava attraverso la misura di standard chimici (campioni a concentrazione nota di analita) e permette di tradurre il segnale fornito dall'apparecchio di misura in un valore di concentrazione.

Il segnale misurato in un metodo strumentale può avere varia natura, e talvolta è possibile scegliere fra diverse possibilità: ad esempio in un'analisi cromatografica si possono utilizzare sia le altezze che le aree dei picchi cromatografici (la prima è soggetta ad errori dovuti alla variabilità del picco). Solitamente in un'analisi strumentale non si utilizza direttamente il segnale misurato, ma si corregge il segnale sottraendogli il segnale del "bianco", misurato in genere prima di tutti gli altri campioni, in modo da tenere conto di tutti i fattori (chimici, strumentali, ecc.) che influenzano la risposta in modo indipendente dalla concentrazione dell'analita, cioè dell'effetto della matrice. Il termine "bianco" è una italianizzazione del termine inglese "blank". Il bianco dovrebbe essere idealmente identico al campione in analisi, ma non contenere l'analita, ed essere misurato utilizzando esattamente la stessa procedura impiegata per i campioni. In pratica, in particolare per campioni complessi, non è possibile ottenere un vero e proprio bianco poiché non è possibile simulare esattamente la composizione del campione. In tal caso si usano spesso:

- **bianco del solvente**: contiene semplicemente lo stesso solvente nel quale è dissolto il campione;
- **bianco dei reagenti**: contiene il solvente più tutti i reagenti utilizzati nella preparazione del campione o necessari alla produzione del segnale che viene misurato.

La calibrazione o taratura consiste nella realizzazione sperimentale, mediante standard a concentrazione nota, della retta di taratura o calibrazione, che permetterà di tradurre il segnale prodotto dall'apparecchio di misura nel valore chimico cercato, di solito la concentrazione dell'analita. La costruzione della retta di lavoro può essere fatta con diversi metodi di calibrazione:

- calibrazione esterna o standard esterno SE;
- calibrazione interna o standard interno SI;
- aggiunte multiple.

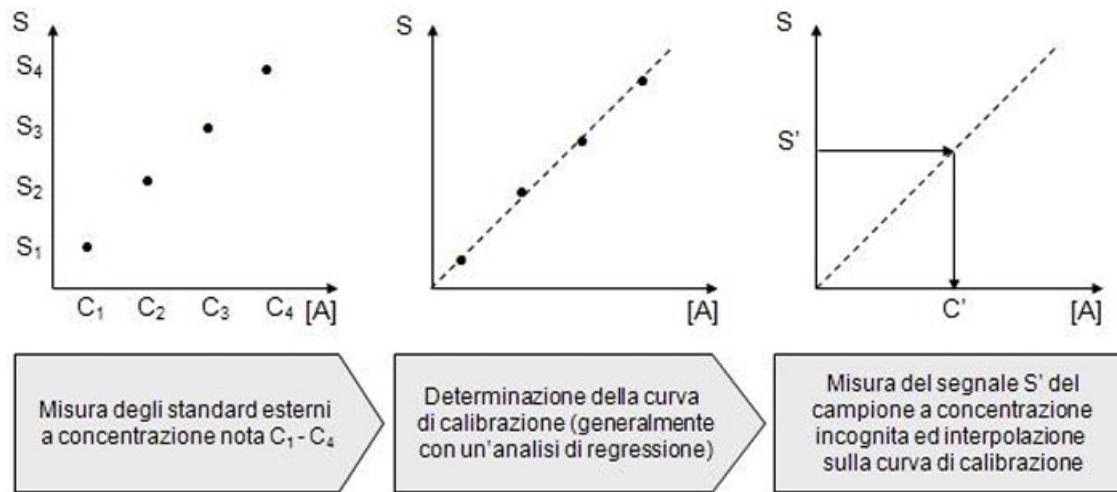
Nella **calibrazione con standard esterno (SE)** la retta di calibrazione (o di taratura o di lavoro) viene ricavata dall'analisi di una serie di standard esterni a concentrazione nota di analita preparati separatamente dal campione. La concentrazione dei campioni incogniti, trattati nello stesso modo degli standard esterni, viene poi determinata per interpolazione del segnale misurato sulla retta di calibrazione. La calibrazione con standard esterno è la procedura di calibrazione più comunemente usata se si ha a disposizione uno standard con caratteristiche adeguate (stabilità, purezza, ecc.) poiché ha le seguenti caratteristiche:

- semplice;
- rapida (una singola curva di calibrazione può essere utilizzata per tutte le analisi);
- richiede un piccolo numero di standard.

Nella costruzione della retta di lavoro occorre considerare i seguenti aspetti:

- preparare un minimo di 6 soluzioni, a concentrazioni non troppo diverse, oltre al bianco quando previsto, cercando di coprire tutto il campo di concentrazione indicato dalla metodica analitica, dal valore minimo del limite di quantificazione LOQ al valore massimo del limite di linearità
- calcolare l'equazione della retta di regressione (minimi quadrati) tramite la pendenza e l'intercetta. Calcolare inoltre il coefficiente di determinazione r^2 , che dovrebbe essere molto vicino ad 1 se il modello di regressione adottato è corretto
- se l'intercetta della retta è nettamente diversa da 0 occorre valutare se ciò è possibile, altrimenti rivedere la procedura analitica. In ogni caso non forzare il passaggio della retta per l'origine degli assi (0,0)
- prima di tracciare la retta scartare gli eventuali punti aberranti mediante opportuni test statistici (ad esempio residui). Tracciare in seguito la retta di taratura.
- i valori della pendenza della retta (sensibilità), del segnale del bianco e del segnale di un campione di controllo preparato per tale scopo (controllo qualità o QC), dovrebbero rimanere costanti. Il loro monitoraggio permette di verificare l'efficienza della procedura analitica, dell'apparecchio di misura, degli operatori e del laboratorio in generale
- la retta di lavoro può essere utilizzata fino all'esaurimento dei reattivi utilizzati per costruirla e per analizzare i campioni. Per sicurezza con nuovi reattivi è possibile verificare la correttezza della retta, senza costruirne una nuova, utilizzando solo 1 o 2 ulteriori standard

Questo metodo presuppone però che la risposta all'analita nello standard e nel campione sia identica: la forma chimica dell'analita negli standard deve essere identica a quella dell'analita presente nel campione e non si devono avere interferenze da parte della matrice del campione. Questa condizione può essere difficile da soddisfare, soprattutto per campioni a composizione complessa (leghe metalliche, materiali biologici, ecc.)



Calibrazione con standard interno (SI)

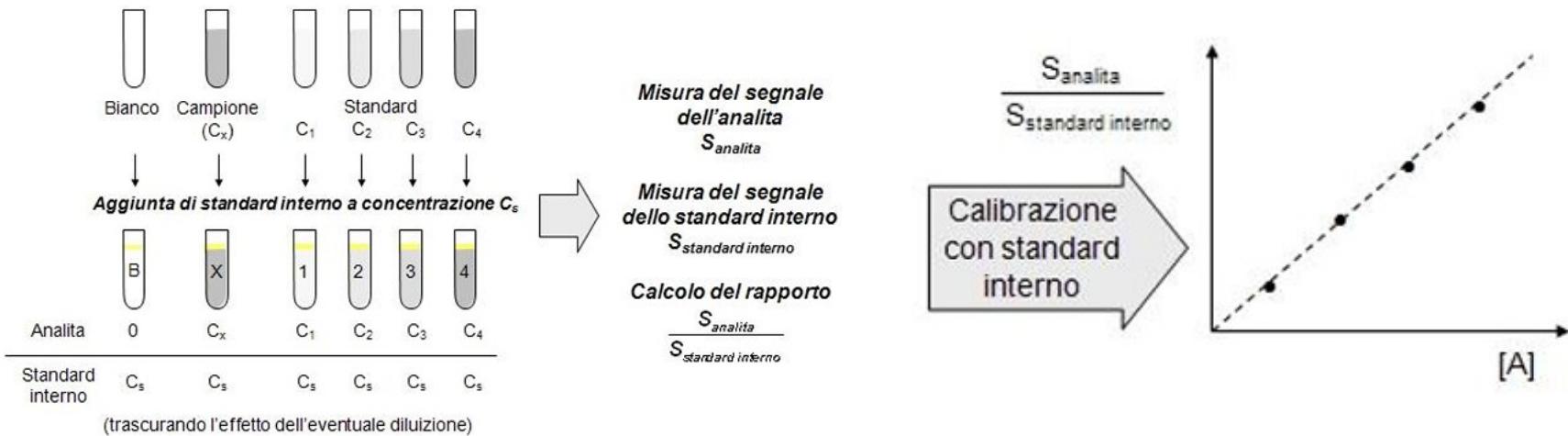
Vi sono casi in cui la matrice del campione non è facilmente riproducibile negli standard, sia perché incognita, sia perché troppo complessa. In altri casi non è possibile ottenere una adeguata riproducibilità delle misure, come nel caso dell'iniezione di standard e campione in un gascromatografo mediante una microsiringa; dato che si iniettano volumi dell'ordine dei microlitri, la riproducibilità dipende dall'efficienza della siringa e dall'abilità dell'operatore. Infine vi sono casi come l'assorbimento atomico e l'emissione atomica in cui la sorgente del segnale analitico, fiamma o plasma, è intrinsecamente instabile e variabile nel tempo. Per risolvere questi problemi si può ricorrere al metodo dello standard interno (SI).

Nella calibrazione con standard interno una quantità nota di una specie di riferimento (standard interno - SI) che può essere determinata separatamente dall'analita viene aggiunta alla stessa concentrazione prima dell'analisi agli standard, ai campioni ed al bianco. Quindi si effettuano 2 serie di misure: una che rilevi il segnale dell'analita, l'altra che rilevi il segnale dello SI.

Il segnale di risposta, utilizzato per la costruzione della curva di calibrazione, è il rapporto fra il segnale dell'analita e quello della specie di riferimento: in questo modo si eliminano i segnali provenienti dalla matrice. Lo SI deve avere le seguenti caratteristiche:

- deve essere sicuramente assente dal campione
- non deve reagire con l'analita o gli altri componenti del campione
- deve fornire un segnale ben distinto da tutti gli altri segnali

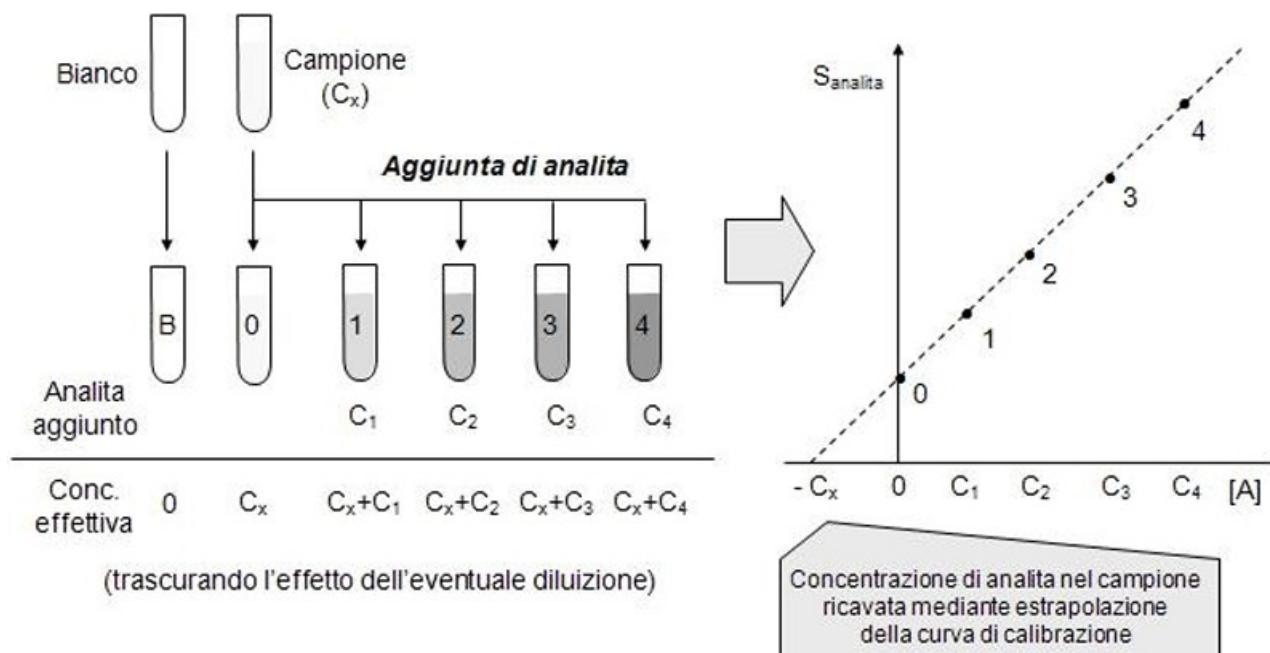
Il metodo della standard interno può compensare diversi tipi di errori a condizione che essi influenzino nello stesso modo sia l'analita che la specie di riferimento, in questo modo si può limitare fortemente l'effetto della matrice. Perché ciò avvenga, la specie di riferimento deve avere caratteristiche chimico-fisiche quanto più possibile simili a quelle dell'analita.



Dato che lo SI viene aggiunto alla stessa concentrazione a tutte le soluzioni misurate, eventuali instabilità del sistema di misura e interferenze della matrice influenzano allo stesso modo i due diversi segnali misurati e quindi il loro rapporto rimarrà costante, dando luogo alla consueta retta di calibrazione.

Quando vi sono molte interferenze e non è possibile eliminare l'effetto della matrice riproducendola negli standard, si può ricorrere al metodo delle aggiunte multiple. Questo metodo di calibrazione prevede le seguenti fasi:

- si produce la soluzione analitica, a concentrazione incognita, mediante trattamento opportuno del campione
- si produce una soluzione standard a concentrazione nota, che deve essere 10-100 volte più concentrata della soluzione analitica, partendo dall'analita puro più semplice acqua distillata
- si misura il segnale del campione a concentrazione aggiunta $C_0 = 0$ con l'opportuno strumento di misura.



Le prestazioni di un metodo analitico possono essere definite attraverso una serie di grandezze:

1. Accuratezza
2. Precisione
3. Sensibilità
4. Specificità/selettività
5. Limite di rilevabilità (LOD), limite di quantificazione (LOQ)
6. Intervallo dinamico di linearità
7. Robustezza (Robustness)
8. Solidità (Ruggedness)

La definizione esatta di questi parametri, anche in funzione delle differenti tecniche analitiche utilizzate, è stata stabilita da varie istituzioni (es. IUPAC) nell'ambito delle linee guida generali per la validazione di una metodica analitica. Esistono anche variabili più direttamente connesse all'applicazione pratica del metodo, quali ad esempio la definizione dei costi e dei tempi richiesti per l'analisi o lo studio della stabilità dei rettivi.

Accuratezza

L'accuratezza è definita come la concordanza del risultato ottenuto in un'analisi con il valore accettato come "vero" (valore di riferimento μ). L'accuratezza viene espressa dall'errore relativo (detto anche bias) o l'errore relativo %:

$$E_{Rel} = x_i - \mu$$

$$E_{Rel}\% = \frac{x_i - \mu}{\mu} \cdot 100$$

Precisione

La precisione esprime la riproducibilità dei risultati ottenuti da una serie di misure ripetute dello stesso campione. È definita in termini di errore assoluto casuale ($x_{ii} - \bar{x}$) dove \bar{x} è il valore medio della serie di dati ottenuta dalle misure. È evidente che un'analisi sarà accettabilmente precisa e accurata quanto più i valori di μ e di x sono vicini.

In modo operativo, la precisione viene usualmente espressa attraverso la deviazione standard σ o la deviazione standard stimata s . La precisione è collegata alla ripetitività: riproducibilità di una serie di analisi effettuate in un breve periodo di tempo (replicati o repliche).

$$RSD = \left| \frac{\sigma}{\mu} \right| \times 100\%$$

Le caratteristiche di **accuratezza e precisione** minime richieste per un metodo analitico variano con l'importanza relativa del componente da analizzare. Per componenti in tracce sono tollerate accuratezze e precisioni minori rispetto a quelle richieste per componenti presenti in grandi quantità.

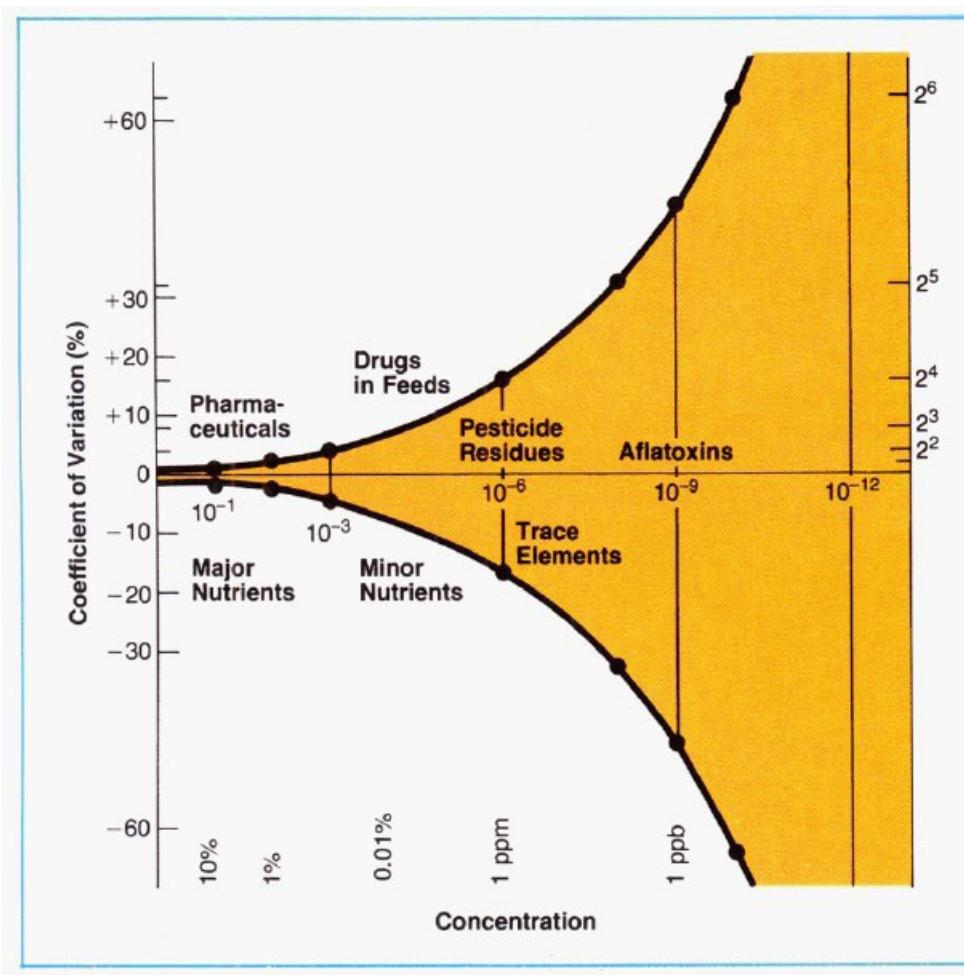


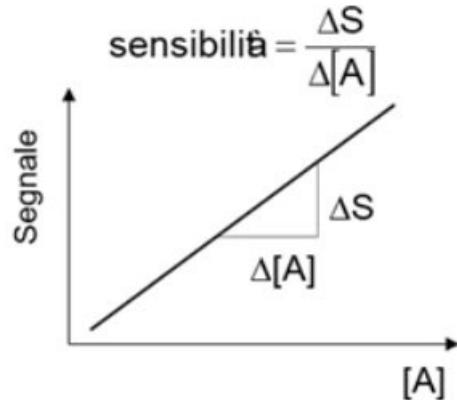
Figure 1. The general curve relating interlaboratory coefficients of variation (expressed as powers of two on the right) with concentration (expressed as powers of 10) along the horizontal center axis

Sensibilità

La sensibilità rappresenta una misura della capacità del metodo analitico di discriminare fra campioni con concentrazioni simili fra di loro.

La sensibilità della calibrazione è la pendenza della retta/curva di calibrazione ed esprime la variazione della risposta per unità di variazione della concentrazione dell'analita. In funzione della forma della curva di calibrazione, un metodo analitico può avere sensibilità della calibrazione costante oppure no all'interno dell'intervallo di concentrazioni nel quale esso è applicabile: è costante nel caso comune della retta.

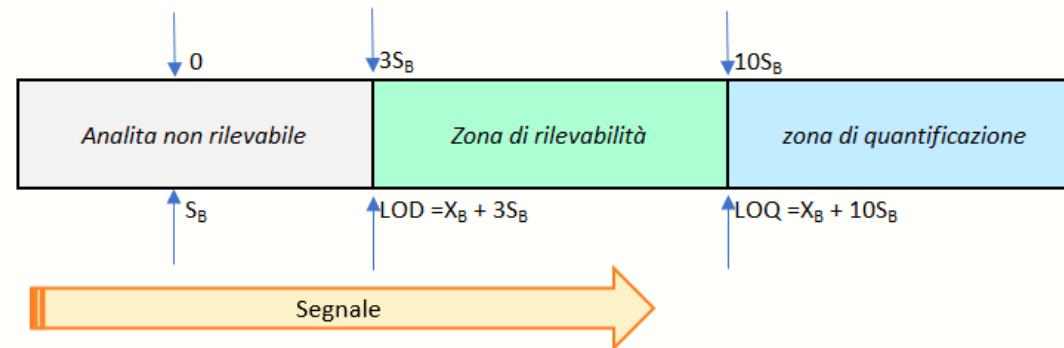
La minima differenza di concentrazione rilevabile dipende però sia dalla pendenza della curva di calibrazione che dalla precisione della determinazione. La sensibilità di un metodo è quindi definita mediante la sensibilità analitica, cioè il rapporto fra la sensibilità della calibrazione e la deviazione standard del segnale analitico misurato. Siccome quest'ultima solitamente dipende dall'entità del segnale (e quindi dalla concentrazione di analita) la sensibilità analitica è in genere funzione della concentrazione, anche per curve di calibrazione lineari.



Limite di rivelabilità e limite di quantificazione

Il limite di rivelabilità (LOD – Limit Of Detection) di un metodo analitico è definito come la minima massa o concentrazione di analita rivelabile ad un determinato livello di fiducia (ovvero che dà un segnale significativamente diverso dal bianco). In genere in corrispondenza del LOD la precisione del metodo analitico è relativamente bassa e non permette di ottenere dati quantitativi affidabili: il LOD viene quindi utilizzato a fini qualitativi, ad esempio come concentrazione limite CL per definire la presenza o l'assenza dell'analita.

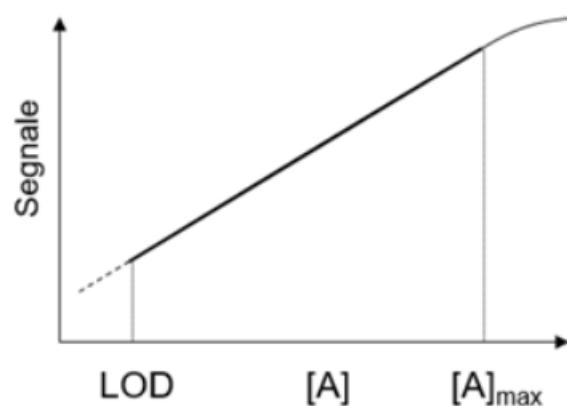
Per i metodi che ammettono una curva di calibrazione, il LOD viene definito come la concentrazione di analita che produce un segnale pari al segnale del bianco S_B più k volte la sua deviazione standard s_B :



Il valore di k dipende dal livello di fiducia prescelto; in genere si assume $k = 3$. A fini quantitativi si usa il limite di quantificazione (LOQ – Limit Of Quantification), definito come la concentrazione alla quale l'analita è determinabile con precisione ed accuratezza accettabili. Può essere espresso come il LOD, ma con valori di k più elevati (esempio $k = 10$). Ciò corrisponde al rapporto segnale/rumore S/N almeno pari a 10.

L'intervallo dinamico di linearità

L'intervallo dinamico di linearità rappresenta l'intervallo di concentrazioni dell'analita che può essere determinato con una curva di calibrazione lineare. Nelle tecniche analitiche vengono preferite le curve di calibrazione lineari, poiché possono essere trattate in modo semplice e la loro costruzione richiede un numero limitato di standards. L'intervallo dinamico di linearità è delimitato dal limite di rivelabilità LOD e dalla concentrazione alla quale diventano rilevanti le deviazioni dalla linearità $[A]_{\max}$ (dovute a comportamento non ideale del sistema o a limitazioni del rivelatore), diverso per ogni specie chimica. Ogni analita ha il suo intervallo di linearità. L'ampiezza dell'intervallo dinamico di linearità dipende anche dalla tecnica di rivelazione utilizzata. Se le variazioni della concentrazione dell'analita nei diversi campioni sono relativamente piccole non è comunque necessario un intervallo dinamico di linearità molto ampio.



Recupero

Il recupero indica la percentuale di analitiche riuscite a ritrovare nel campione dopo tutto il processo analitico: estrazione, purificazione, clean-up, derivatizzazione, iniezione, analisi.

In pratica risponde a questa domanda:

Se nel campione ci sono 100 ng di analita, quanti ne ritrovo dopo tutto il metodo?

Se ne ritrovi 80 ng → recupero = 80%

È importante perché: l'estrazione non è mai perfetta ed alcuni analiti si degradano; gli step come SPE, precipitazione, derivatizzazione possono far perdere parte dell'analita
Un recupero costante (anche se non pari al 100%) è accettabile:
ad esempio va benissimo un recupero del 70% se è stabile, riproducibile e lineare.

Come si valuta il recupero? Si confrontano tre condizioni:

Campione fortificato prima dell'estrazione

Campione fortificato dopo l'estrazione

Soluzione standard pura

Il rapporto tra 1 e 2 = recupero dell'estrazione.

Effetto matrice

L'effetto matrice è la variazione del segnale strumentale causata da componenti del campione diversi dall'analita.

Nelle tecniche come LC-MS/MS è molto importante perché: i composti della matrice possono sopprimere lo ione (ion suppression) oppure potenziare lo ione (ion enhancement) cambiando il segnale senza che cambi la concentrazione reale.

Due campioni con la stessa quantità di analita possono dare segnali diversi se la matrice è diversa.

Questo può portare a:

- sottostima o sovrastima,
- non linearità
- scarsa riproducibilità
- errori in fase di quantificazione

Come si valuta l'effetto matrice? Si confronta la risposta di:
uno standard in soluzione pura
uno standard aggiunto a un estratto di matrice

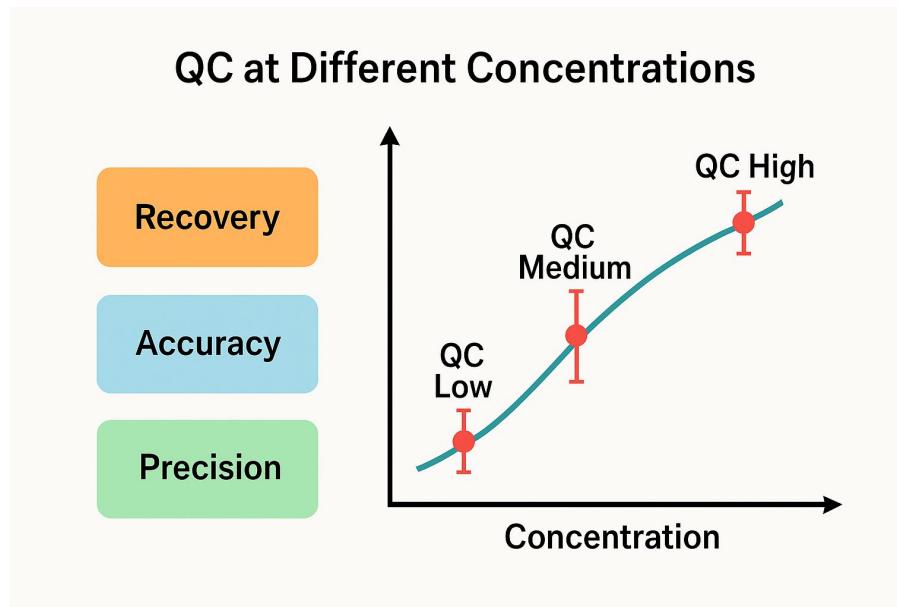
Il rapporto tra i due segnali = % effetto matrice
< 100% = soppressione di segnale
>100% = potenziamento di segnale

Quality Control nella validazione

Quando si valida un metodo analitico (LC-MS/MS, GC-MS, HPLC, ELISA...), non basta verificare una sola volta che “funziona”. Un metodo è valido solo se funziona in tutta la gamma di concentrazioni che ci interessa misurare. Per questo durante la validazione si preparano Quality Control (QC) a diversi livelli:

- QC basso (LQC)
- QC medio (MQC)
- QC alto (HQC)
- QC molto basso vicino al LOQ (LLQC)

Questi livelli permettono di valutare come il metodo si comporta dal limite inferiore fino al range più alto della curva analitica.



Recupero a diverse concentrazioni

Obiettivo: capire se il processo di estrazione funziona allo stesso modo a tutte le concentrazioni.

Le perdite durante l'estrazione potrebbero essere più pronunciate a basse concentrazioni (es. adsorbimento alle pareti, inefficienza dello SPE, volatilizzazione, stabilità).

A concentrazioni alte, invece, si potrebbe avere saturazione, effetto di co-estrazione o effetti non lineari.

Perché serve? Un recupero “alto solo ai livelli alti” è completamente inutile: il metodo non sarebbe affidabile ai livelli reali dei campioni biologici, che spesso sono bassi.

Il recupero deve essere costante e riproducibile in tutto il range.

Accuratezza a diverse concentrazioni

Obiettivo: verificare se il valore misurato è vicino al valore vero su tutto il range.

Ai livelli bassi, l'accuratezza può peggiorare a causa di:

- rumore strumentale
- Instabilità
- effetto matrice più marcato
- Interferenze

Ai livelli alti, l'accuratezza può peggiorare per:

- saturazione del detector
- deviazioni dalla linearità
- carry-over
- diluizioni non precise

Perché serve? Un metodo accurato solo “a metà curva” non ha valore: potrebbe sovrastimare o sottostimare pochi ng/mL oppure sbagliare nelle concentrazioni elevate.

L'accuratezza deve rimanere entro i limiti $\pm 15\%$ ($\pm 20\%$ al LOQ).

Precisione a diverse concentrazioni

Obiettivo: verificare quanto il metodo è riproducibile.

La precisione può peggiorare:

ai livelli bassi:

- rumore
- drift
- problemi di iniezione

ai livelli alti:

- instabilità
- Saturazione
- diluizioni imprecise

Si valuta sempre sia:

- intra-day (ripetibilità)
- inter-day (riproduciibilità)

Perché serve? Perché in laboratorio reale non analizzano sempre campioni allo stesso livello. Bisogna garantire che il metodo produca risultati stabili nel tempo, anche a concentrazioni molto alte o molto basse.

La precisione deve rispettare RSD% < 15% (20% al LOQ).

Perché un metodo analitico deve essere:

- stabile (non cambia livello per livello)
- robusto (non collassa ai limiti estremi)
- riproducibile (ripetibile da giorno a giorno)
- corretto su tutta la curva.

E il modo più semplice per verificarlo è appunto usare QC low–medium–high.

Una curva “perfetta” ma con QC che fallisce ai livelli bassi → metodo NON valido.
Un metodo stabile ai livelli bassi ma impreciso ai livelli alti → metodo NON valido.

Serve la consistenza in tutto il range.

Robustezza

La robustezza misura quanto il metodo è stabile se cambiano leggermente le condizioni operative. Non parliamo di errori grossolani, ma di piccole variazioni che possono capitare nella routine di laboratorio.

Domanda alla base della robustezza: Il mio metodo rimane affidabile anche se qualcosa cambia di poco?

Esempi di variazioni testate:

- temperatura della colonna \pm 2–5 °C
- variazione del pH di \pm 0.1
- piccoli cambi della fase mobile (es. 98/2 → 97/3)
- flusso modificato del \pm 0.1 mL/min
- diverso lotto di cartucce SPE o reagent
- lampada UV o sorgente MS con intensità leggermente diversa
- diverso operatore
- giorno differente

Se il metodo è robusto, i risultati rimangono entro limiti accettabili di accuratezza, precisione e tempi di ritenzione, nonostante queste piccole modifiche. Perché è importante la robustezza? Perché un metodo non deve funzionare solo “in condizioni perfette”. **Deve essere affidabile anche nella routine reale, dove le condizioni non sono identiche ogni giorno.**

Solidità

La solidità (a volte chiamata ruggedness) valuta quanto il metodo è stabile quando cambiano fattori più grandi, legati al contesto operativo.

Domanda alla base della solidità: Il mio metodo dà risultati simili anche se cambia chi lo usa, dove o come?

Esempi di variazioni testate:

- uso di strumentazione diversa, ma equivalente
- analisi in laboratori diversi
- uso di colonne di lotti diversi
- analisi fatte da operatori differenti
- reagenti o materiali di consumabili provenienti da marche o lotti differenti
- giorni molto distanti nel tempo
- condizioni ambientali differenti (umidità, temperatura del laboratorio)

La solidità verifica la riproducibilità su larga scala, ovvero se il metodo è affidabile anche: in altri laboratori da altri analisti, con materiali di lotti diversi, con piccoli cambiamenti infra-strutturali.

Perché è importante la solidità?

Perché un metodo valido non deve essere “fragile”: **se basta cambiare operatore o colonna per far crollare i risultati, non è un metodo solido.**

Enti per le linee guida bioanalitiche



EUROPEAN MEDICINES AGENCY
SCIENCE MEDICINES HEALTH

