Calibrazione e validazione dei metodi analitici

Chimica Analitica — CdL in Biotecnologie, 2° anno
Università degli Studi di Teramo · A.A. 2026/2027
Prof. Federico Fanti

LEZIONE 7 ICH · EMA · FDA



Prerequisiti e obiettivi della lezione

Già noti dalla lezione di statistica

- Errori sistematici e casuali (VIM)
- Esattezza, precisione, accuratezza (ISO 5725)
- Regressione lineare ai minimi quadrati
- Analisi dei residui

Obiettivi di oggi

- Classificare gli standard e comprenderne la tracciabilità metrologica
- Costruire e valutare una curva di calibrazione
- Scegliere il metodo di calibrazione più adatto
- Applicare i parametri di validazione secondo ICH M10, Q2(R2) e Q14



BLOCCO A

Standard e calibrazione

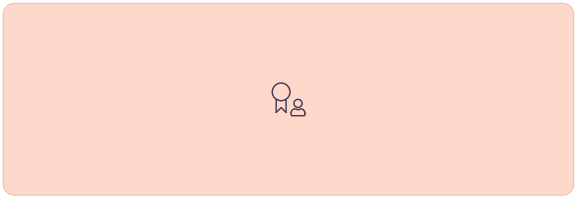
Dalla preparazione degli standard alla costruzione della curva di lavoro: fondamenti metrologici e procedure operative.

Gerarchia degli standard analitici



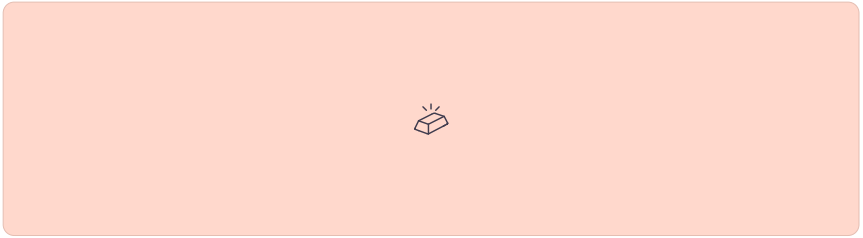
Standard Secondari

Sostanze non conformi a tutti i requisiti PS, calibrate per confronto con PS o CRM.



RM / CRM

Materiali di riferimento (RM) e certificati (CRM): valori certificati con incertezza, prodotti da NIST, JRC, LGC, BAM, accreditati ISO 17034.



Standard Primari (PS)

Massima qualità metrologica: purezza ≥99,9%, stabilità, non igroscopicità, stechiometria nota. Riferimento assoluto senza confronto.



Requisiti degli standard primari

Purezza

≥ 99,9% con certificazione analitica documentata.

Stabilità

Stabile nel tempo e nelle condizioni di conservazione standard.

Non igroscopicità

Non assorbe umidità, garantendo la massa pesata corretta.

Stechiometria nota

Formula molecolare definita, peso molecolare esatto e verificabile.

Materiali di riferimento certificati (CRM)

Definizione

I CRM sono materiali in cui uno o più valori delle proprietà sono certificati da una procedura valida, accompagnati da un certificato che li qualifica. Riproducono la matrice dei campioni reali.

Tracciabilità metrologica

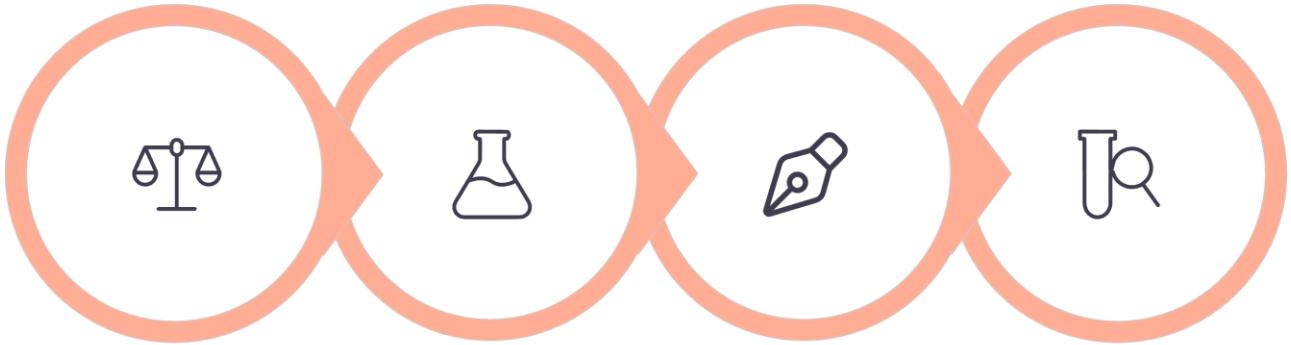
La catena di tracciabilità collega ogni misura al SI attraverso confronti documentati con incertezza dichiarata a ogni livello.

Principali enti produttori

- **NIST** — National Institute of Standards and Technology (USA)
- **JRC** — Joint Research Centre (UE)
- **LGC** — Laboratory of the Government Chemist (UK)
- **BAM** — Bundesanstalt für Materialforschung (DE)

Accreditamento secondo **ISO 17034** per i produttori di materiali di riferimento.

Preparazione degli standard: dal PS agli standard di lavoro



Ogni passaggio richiede pipette e matracci tarati. L'errore si propaga nelle diluizioni seriali: la precisione della pipettatura è critica quanto la pesata iniziale.

Metodi assoluti vs metodi relativi

Metodi assoluti

La relazione tra grandezza misurata e quantità di analita è data da leggi fisiche o dalla stechiometria (gravimetria, titolazioni). Non serve una curva di calibrazione, ma nelle titolazioni il titolante va standardizzato con uno standard primario.

Metodi relativi

Richiedono la costruzione di una curva di calibrazione che descrive la relazione segnale–concentrazione. Appartiene a questa categoria la **maggior parte dei metodi strumentali**: spettroscopia, cromatografia, spettrometria di massa.

Il bianco analitico: tipologie e funzione

Bianco del solvente

Contiene solo il solvente in cui è disciolto il campione. Corregge il fondo strumentale del solvente.

Bianco dei reagenti

Solvente + tutti i reagenti usati nella preparazione. Corregge le interferenze additive dei reagenti.

Bianco di matrice / procedurale

Matrice priva di analita, trattata con la stessa procedura del campione. Approssimazione migliore del vero bianco.

La sottrazione del bianco corregge le **interferenze additive** e il fondo strumentale, ma **non** l'effetto matrice moltiplicativo, che richiede altri approcci (standard interno, aggiunte multiple).

Scelta del segnale: area vs altezza del picco

Area del picco

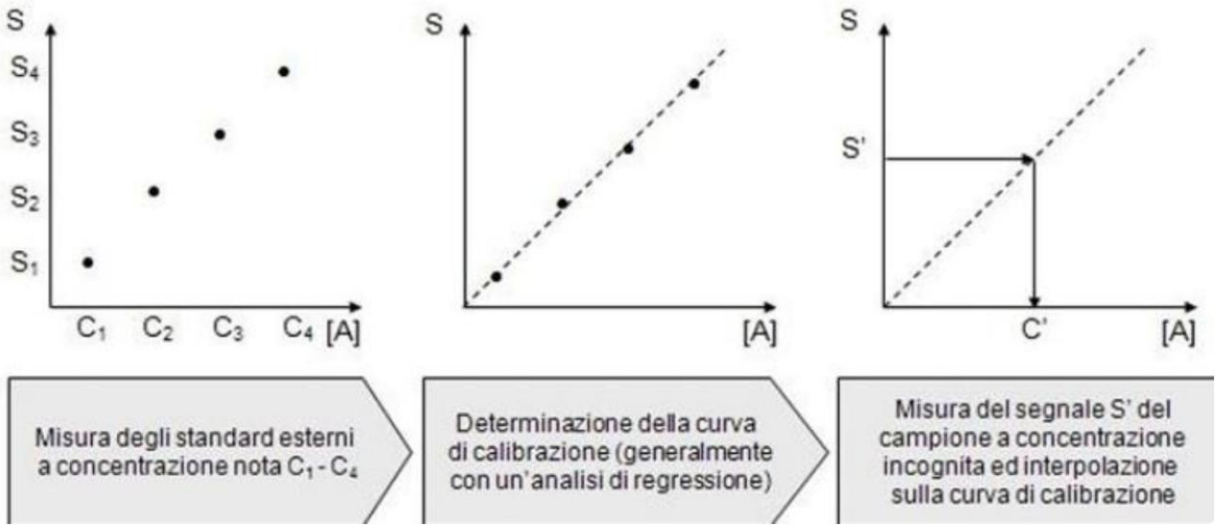
Preferita nella pratica corrente. Meno sensibile a variazioni della forma del picco (allargamento, asimmetria). Raccoglie l'intera risposta dell'analita.

Altezza del picco

Più semplice da misurare manualmente. Soggetta a errori dovuti alla variabilità della forma del picco (larghezza, tailing). Accettabile solo se la forma è costante e riproducibile.

In analisi cromatografica e in LC-MS/MS, l'**area del picco** è lo standard de facto per la quantificazione, salvo indicazione contraria della metodica.

Calibrazione con standard esterno (SE)



Procedura

Standard a concentrazione nota preparati separatamente; campioni trattati allo stesso modo; concentrazione incognita per interpolazione.

Vantaggi

Semplice, rapida; una singola curva per tutte le analisi; numero ridotto di standard.

Presupposto critico

La risposta all'analita deve essere **identica** nello standard e nel campione: stessa forma chimica, assenza di interferenze di matrice.

Costruzione della curva di calibrazione: requisiti operativi

1 Almeno 6 livelli di concentrazione

Distribuiti dal LLOQ all'ULOQ, più bianco e zero, coprendo l'intero range analitico.

2 Regressione ai minimi quadrati

Calcolo di pendenza, intercetta e coefficiente di determinazione r^2. L'intercetta non va forzata a zero.

3 Valutazione tramite residui e retrocalcolo

Concentrazioni retrocalcolate entro ±15% (±20% al LLOQ); almeno il 75% dei calibranti conformi. Il solo r^2 non è sufficiente.

4 Nuova curva per ogni sequenza analitica

Monitorare pendenza, segnale del bianco e QC per verificare l'efficienza nel tempo.

Perché r^2 non basta: l'analisi dei residui

Il problema

Un valore di r^2 prossimo a 1 può mascherare deviazioni sistematiche dalla linearità, specialmente agli estremi del range. Due modelli diversi possono avere lo stesso r^2 ma residui molto diversi.

La soluzione

Analizzare il **grafico dei residui**: i residui devono essere distribuiti casualmente attorno allo zero, senza pattern sistematici. Verificare le **concentrazioni retrocalcolate** per ogni calibrante.

Criteri di accettabilità (ICH M10)

- Retrocalcolo entro **±15%** dal valore nominale
- Entro **±20%** al LLOQ
- Almeno **75%** dei calibranti conformi
- Almeno **6 calibranti** su 8 (se si usano 8 livelli)

Calibrazione con standard interno (SI)

Quando si usa

Quando la matrice non è riproducibile negli standard, quando la riproducibilità dell'iniezione è critica (microsiringa in GC), o quando la sorgente del segnale è intrinsecamente instabile (fiamma, plasma ICP).

Principio

Una quantità nota di specie di riferimento (SI) viene aggiunta **il prima possibile nel processo** a standard, QC e campioni alla stessa concentrazione (non al bianco). Il segnale di risposta è il **rapporto** $S_{analita}/S_{SI}$.

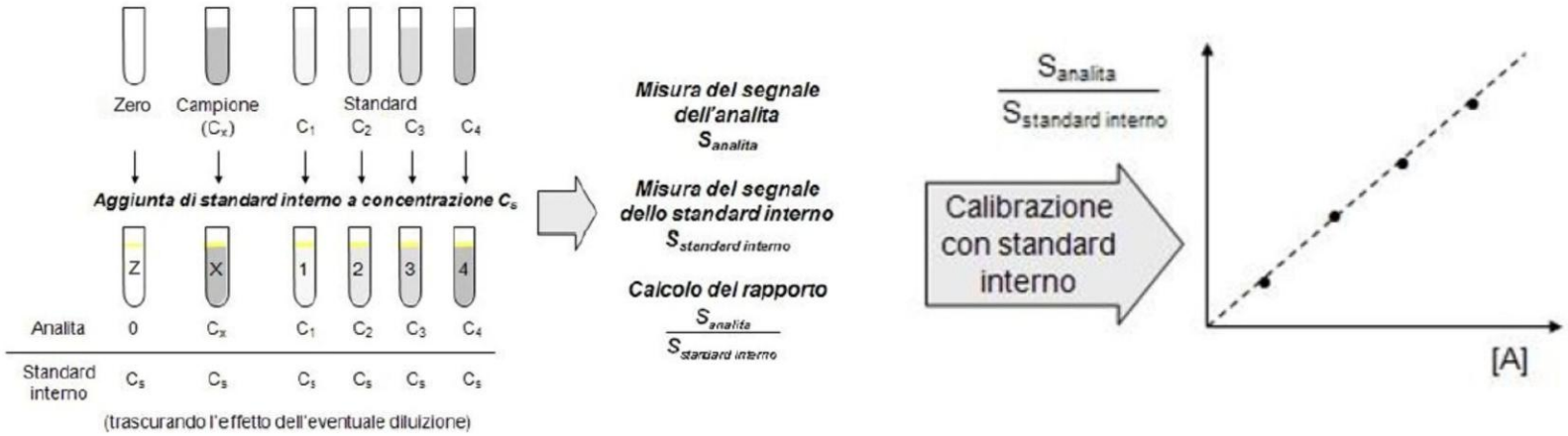
Requisiti dello SI

- Assente nel campione reale
- Non reattivo con analita o matrice
- Segnale ben distinto da tutti gli altri
- Caratteristiche chimico-fisiche simili all'analita

Scelta ottimale in LC-MS/MS

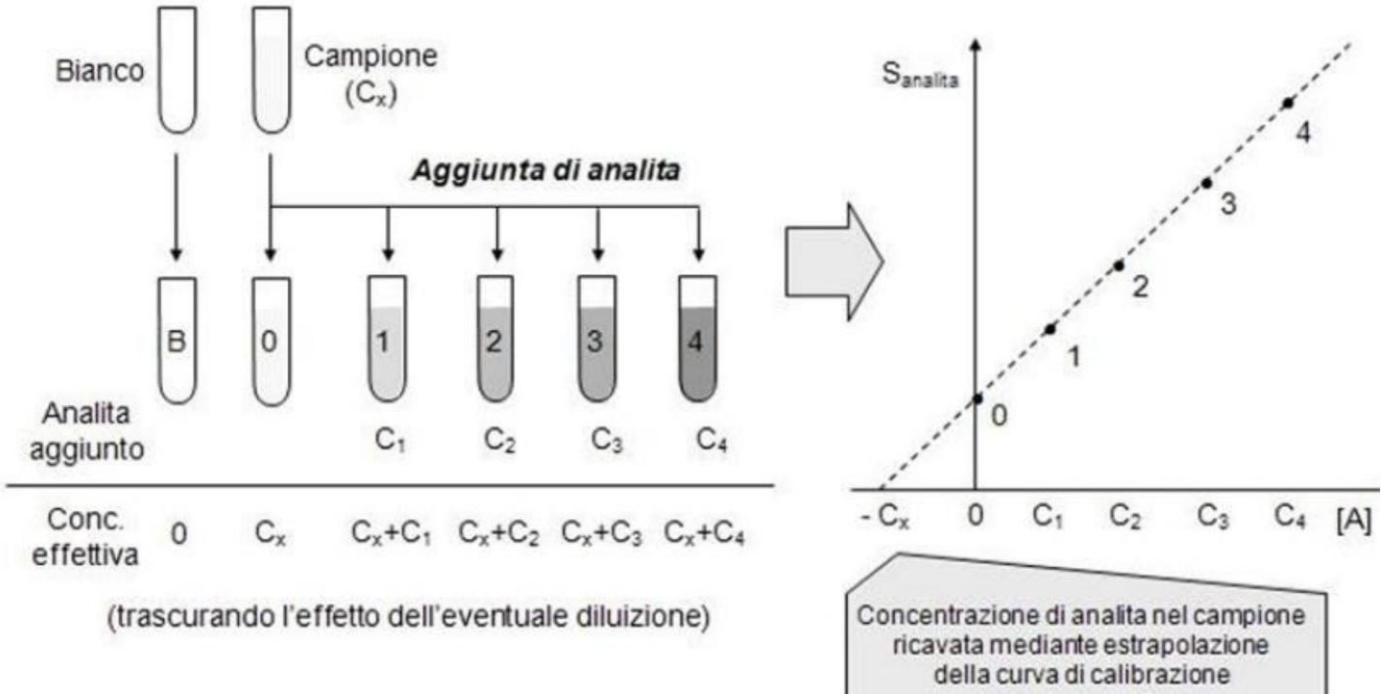
Standard interno isotopicamente marcato (**SIL-IS**): distinguibile per m/z, comportamento cromatografico identico all'analita.

Schema operativo: calibrazione con standard interno



Lo SI viene aggiunto alla stessa concentrazione C_s a tutte le soluzioni tranne il bianco. Eventuali instabilità strumentali e interferenze di matrice influenzano allo stesso modo i due segnali, mantenendo costante il loro rapporto e producendo una retta di calibrazione del rapporto dei segnali in funzione della concentrazione.

Metodo delle aggiunte multiple



Procedura

Aliquote del campione a concentrazione incognita C_x vengono arricchite con quantità crescenti di analita puro. La curva è estrapolata all'asse x: $C_x = b_0/b_1$.

Requisiti

Linearità nel range di aggiunta; correzione del bianco prima dell'estrapolazione.

Limiti

Non corregge interferenze additive costanti; richiede una curva separata per ogni campione: metodo lento e costoso.

BLOCCO B

Validazione dei metodi analitici

Parametri, criteri di accettabilità e quadro normativo: ICH M10, Q2(R2), Q14, Eurachem, SANTE e Reg. (UE) 2021/808.



Perché validare un metodo analitico?

Definizione

La validazione è il processo che dimostra, con prove sperimentali documentate, che un metodo è adatto allo scopo per cui viene utilizzato (*fit for purpose*).

Quadro normativo di riferimento

- **ICH M10** (2022) — Bioanalisi; adottata da EMA e FDA
- **ICH Q2(R2)** e **Q14** (2023) — Metodi analitici farmaceutici
- **Guida Eurachem** — Laboratori chimici generali
- **SANTE/11312/2021** — Residui di pesticidi negli alimenti
- **Reg. (UE) 2021/808** — Residui di farmaci veterinari

Panoramica dei parametri di validazione

- **Selettività / Specificità**
- **Curva e intervallo**
- **LOD / LOQ**
- **Esattezza (Trueness)**
- **Precisione**
- **Recupero**
- **Effetto matrice**
- **Stabilità**

A questi si aggiungono: **carry-over**, **integrità della diluizione**, **robustezza** e **solidità**.

Selettività e specificità

Definizione

La **selettività** è la capacità del metodo di misurare l'analita in presenza di altri componenti della matrice (endogeni, metaboliti, farmaci co-somministrati) senza interferenze significative.

Il termine **specificità** indica la selettività assoluta (risposta solo all'analita); nella pratica i due termini sono spesso usati come sinonimi.

Valutazione sperimentale

Analisi del bianco di matrice da **almeno 6 lotti** di matrice biologica (es. plasma umano da donatori diversi). Il segnale nel bianco alla posizione di ritenzione dell'analita deve essere:

- < 20% della risposta al LLOQ per l'analita
- < 5% della risposta dello standard interno

Sensibilità: calibrazione vs analitica

Sensibilità di calibrazione

È la **pendenza** della retta di calibrazione:

$$\text{sensibilità} = \frac{\Delta S}{\Delta [A]}$$

Esprime la variazione del segnale per unità di variazione della concentrazione. Costante per curve lineari.

Sensibilità analitica

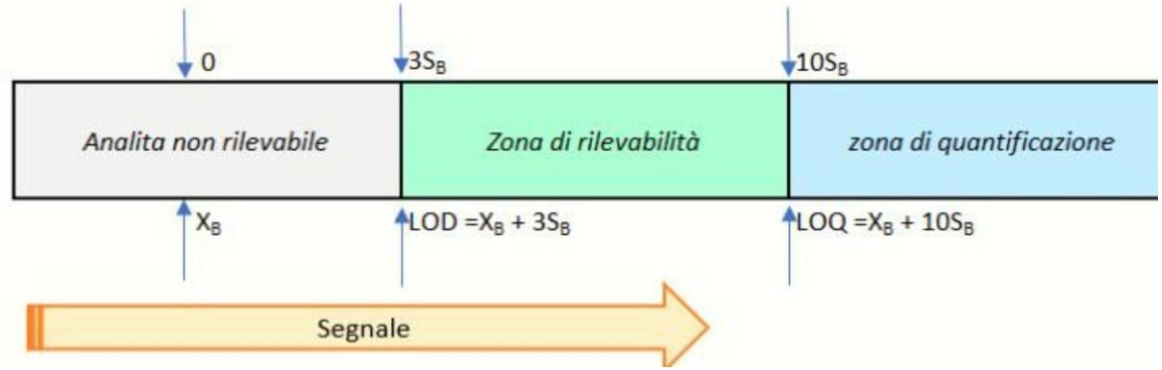
Rapporto tra sensibilità di calibrazione e deviazione standard del segnale analitico:

$$\gamma = \frac{b_1}{s_S}$$

Dipende dalla concentrazione anche per curve lineari, poiché s_S varia con il segnale.

⚠ Attenzione: il termine "sensibilità" è spesso usato impropriamente per indicare il LOD. Sono grandezze distinte.

LOD e LOQ: definizioni e formule



LOD — Limite di rivelabilità

$$\mathrm{LOD} = \frac{3 \cdot s_B}{b_1}$$

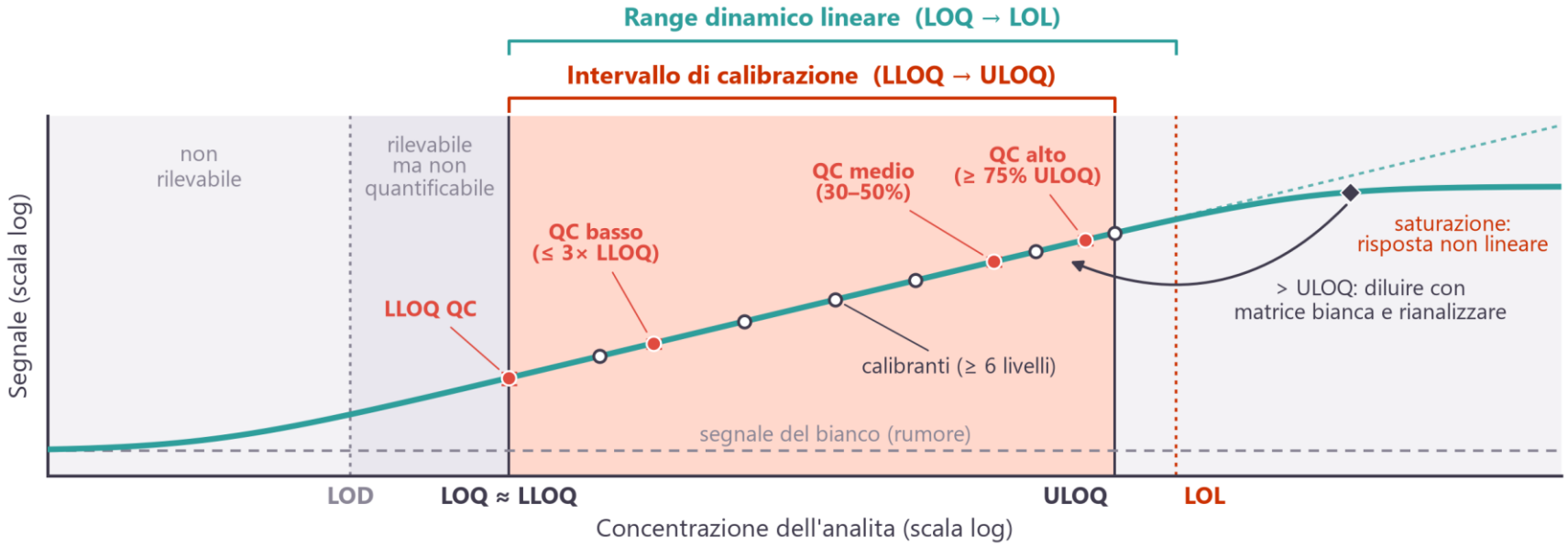
Concentrazione minima rilevabile con livello di fiducia definito (k=3). Uso qualitativo: presenza/assenza dell'analita.

LOQ — Limite di quantificazione

$$\mathrm{LOQ} = \frac{10 \cdot s_B}{b_1}$$

Concentrazione minima determinabile con precisione e accuratezza accettabili (S/N ≥ 10). In bioanalisi (ICH M10): esattezza ±20% e CV ≤ 20%.

Range dinamico lineare e intervallo di calibrazione



Range dinamico lineare

Intervallo in cui il segnale è proporzionale alla concentrazione: va dal **LOQ** al **LOL** (limite di linearità). Oltre il LOL il rivelatore si satura e la risposta si appiattisce. Dipende da analita e rivelatore; la linearità permette la regressione ai minimi quadrati con pochi standard.

Intervallo di calibrazione (ICH M10)

Va dal **LLOQ** (standard più basso, mai sotto il LOQ) all'**ULOQ** (standard più alto) e deve stare dentro il range lineare. Si costruisce con almeno 6 livelli, più bianco e zero.

I QC coprono tutto l'intervallo:
LLOQ · basso (≤ 3× LLOQ)
medio (30–50%) · alto (≥ 75% ULOQ)

Campioni fuori intervallo

Sopra l'ULOQ il campione si diluisce con matrice bianca e si rianalizza: la diluizione deve essere validata (integrità della diluizione). **Sotto il LLOQ** il risultato si riporta come «< LLOQ»: non si estrapola mai oltre la curva di calibrazione.

Esattezza (Trueness) e accuratezza

Esattezza — Bias

$$E = x_i - \mu$$

$$E_{rel}\% = \frac{x_i - \mu}{\mu} \times 100$$

Concordanza del risultato con il valore di riferimento μ. Espressa anche come % del valore nominale.

Accuratezza = Esattezza + Precisione

Secondo ISO 5725 e VIM, l'**accuratezza** è il termine ombrello che comprende sia l'esattezza (assenza di bias sistematico) sia la precisione (assenza di errore casuale). Un risultato può essere preciso ma non esatto, o viceversa.

Criteri ICH M10

Bias entro **±15%** dal valore nominale; entro **±20%** al LLOQ.

Precisione: ripetibilità, intermedia e riproducibilità

Ripetibilità (intra-day)

Stessa procedura, stesso operatore, stesso strumento, stesso giorno. CV% ≤ 15% (≤ 20% al LLOQ).

Precisione intermedia (inter-day)

Variazioni di giorno, operatore e strumento all'interno dello stesso laboratorio. Misura la variabilità del metodo nella routine del laboratorio.

Riproducibilità (inter-laboratorio)

Confronto tra laboratori diversi. Base per la standardizzazione e il riconoscimento normativo del metodo.

$$\text{RSD\%} = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

La curva di Horwitz: precisione attesa vs concentrazione

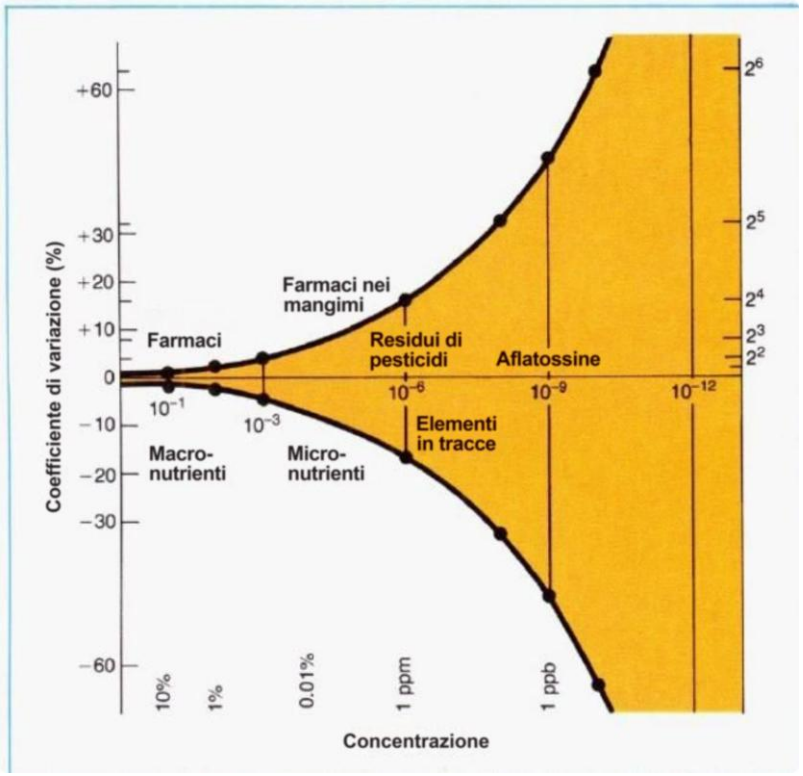
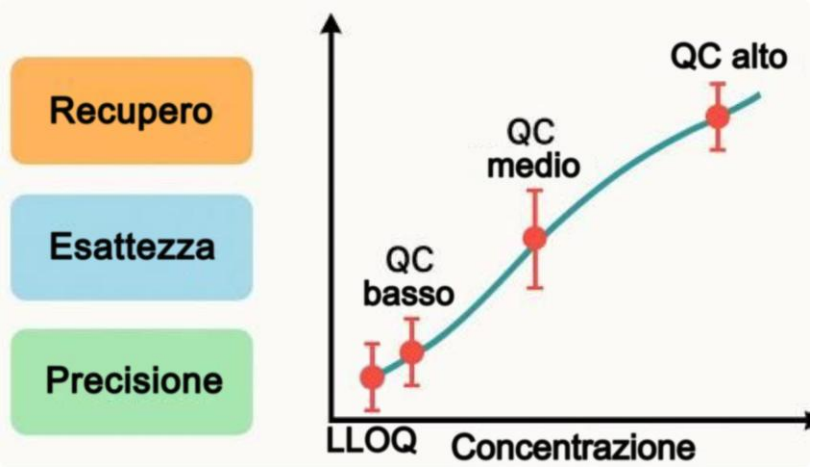


Figura 1. La curva di Horwitz mostra la relazione tra coefficiente di variazione interlaboratorio e concentrazione su scala logaritmica. All'aumentare della diluizione, la precisione attesa peggiora in modo prevedibile secondo la legge: $\mathbf{CV\% \approx 2^{(1-0{,}5 \log C)}}$. Questo giustifica i criteri più permissivi (±20%, CV ≤ 20%) al LLOQ.

Quality Control (QC): livelli e criteri ICH M10



LLOQ QC

Al limite inferiore di quantificazione. Criteri: ±20%, CV ≤ 20%.

QC Low (LQC)

≤ 3× LLOQ. Criteri: ±15%, CV ≤ 15%.

QC Medium (MQC)

30–50% del range. Criteri: ±15%, CV ≤ 15%.

QC High (HQC)

≥ 75% dell'ULOQ. Criteri: ±15%, CV ≤ 15%.

Cause di peggioramento ai livelli bassi e alti

Livelli bassi (vicino al LLOQ)

- Rumore strumentale elevato rispetto al segnale
- Drift della linea di base
- Effetto matrice più marcato
- Interferenze co-eluenti
- Instabilità dell'analita a basse concentrazioni

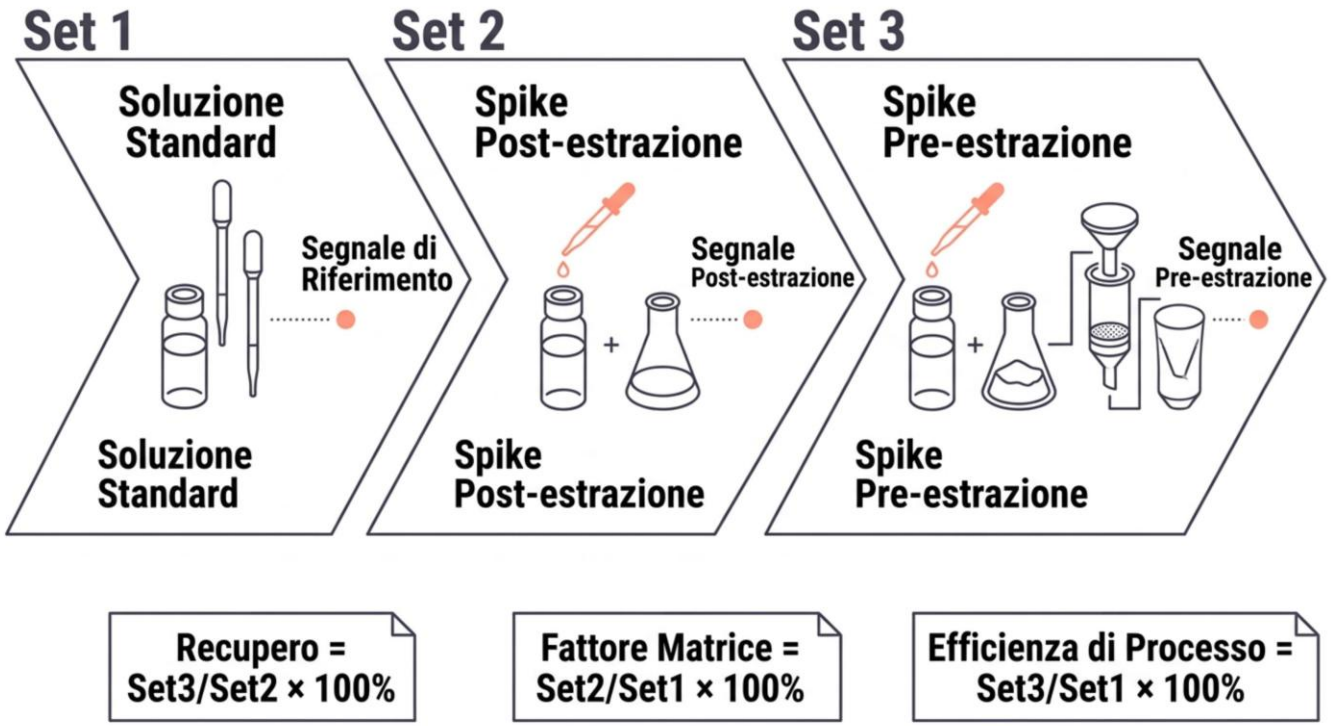
Livelli alti (vicino all'ULOQ)

- Saturazione del detector
- Deviazioni dalla linearità
- Diluizioni imprecise
- Co-estrazione di interferenti
- **Carry-over**: residui di campioni alti contaminano i campioni bassi successivi

Il carry-over da campioni ad alta concentrazione è una delle cause più insidiose di errore ai livelli bassi: va valutato iniettando un bianco dopo il campione più concentrato.

Recupero, effetto matrice ed efficienza di processo

Schema di Matuszewski: tre set sperimentali per distinguere le diverse fonti di perdita e variazione del segnale.



Formule: recupero, effetto matrice, efficienza di processo

Recupero (RE)

$$RE\% = \frac{\text{Set 3}}{\text{Set 2}} \times 100$$

Percentuale di analita ritrovata dopo l'intero processo estrattivo. Deve essere costante e riproducibile a tutti i livelli QC, anche se inferiore al 100%.

Matrix Factor (MF)

$$MF\% = \frac{\text{Set 2}}{\text{Set 1}} \times 100$$

MF < 100%: soppressione (ion suppression). MF > 100%: potenziamento (ion enhancement). Il **MF normalizzato sullo SI** deriva da EMA 2011; ICH M10 usa QC in ≥ 6 lotti (±15%, CV ≤ 15%).

Efficienza di processo (PE)

$$PE\% = \frac{\text{Set 3}}{\text{Set 1}} \times 100$$

Effetto matrice: ion suppression e ion enhancement

Meccanismo in LC-MS/MS

I componenti della matrice co-eluiti con l'analita competono per la ionizzazione nella sorgente ESI o APCI. Il risultato è una variazione del segnale indipendente dalla concentrazione reale dell'analita.

- **Ion suppression**: MF < 100%, sottostima
- **Ion enhancement**: MF > 100%, sovrastima

Valutazione e mitigazione

- MF normalizzato sullo SI (preferibilmente SIL-IS)
- QC bassi e alti in ≥ 6 lotti: ±15%, CV ≤ 15% (ICH M10)
- Tecnica dell'**infusione post-colonna**: flusso costante di analita in post-colonna per mappare le zone di soppressione lungo il cromatogramma
- Ottimizzazione della pulizia del campione (SPE, PPT, LLE)

Recupero a diverse concentrazioni

Obiettivo

Verificare che il processo estrattivo funzioni in modo equivalente a tutti i livelli QC (LQC, MQC, HQC).

Cause di variazione ai livelli bassi

- Adsorbimento alle pareti dei contenitori
- Inefficienza dello SPE a basse concentrazioni
- Volatilizzazione durante l'evaporazione
- Instabilità dell'analita

Cause di variazione ai livelli alti

- Saturazione della fase stazionaria SPE
- Co-estrazione di interferenti
- Effetti non lineari

Un recupero elevato solo ai livelli alti è inaccettabile. **Il recupero deve essere costante e riproducibile in tutto il range**, anche se inferiore al 100%.

Esattezza a diverse concentrazioni

Ai livelli bassi

L'esattezza può peggiorare per: rumore strumentale, instabilità della linea di base, effetto matrice più marcato, interferenze co-eluenti. Il bias tende ad aumentare avvicinandosi al LLOQ.

Ai livelli alti

L'esattezza può peggiorare per: saturazione del detector, deviazioni dalla linearità, carry-over, diluizioni imprecise. Il bias può essere positivo o negativo.

Criterio di accettabilità

L'esattezza deve rimanere entro **±15%** dal valore nominale (±20% al LLOQ) a tutti i livelli QC. Un metodo accurato solo "a metà curva" non è valido.

Precisione a diverse concentrazioni

Valutazione

La precisione si valuta sempre sia come **ripetibilità intra-day** (stesso giorno, stesso operatore) sia come **precisione intermedia inter-day** (giorni diversi, operatori diversi). Si esprime come CV%.

Criterio

CV% ≤ **15%** a tutti i livelli (≤ **20%** al LLOQ).

Cause di peggioramento ai livelli bassi

- Rumore e drift strumentale
- Variabilità dell'iniezione
- Instabilità dell'analita

Cause di peggioramento ai livelli alti

- Saturazione del detector
- Diluizioni imprecise
- Instabilità della fase mobile

Coerenza su tutto il range: il principio fondamentale

Stabile

I parametri non cambiano significativamente da un livello di concentrazione all'altro.

Affidabile agli estremi

Le prestazioni restano accettabili anche agli estremi del range (LLOQ e ULOQ).

Costante nel tempo

I risultati restano concordi tra giorni e operatori diversi (precisione intermedia).

Corretto su tutta la curva

Una curva "perfetta" con QC che fallisce ai livelli bassi → metodo NON valido.



Stabilità: panoramica delle condizioni da valutare

Soluzioni stock

Stabilità delle soluzioni madre a temperatura ambiente e a −20°C/−80°C per periodi prolungati.

Bench-top (breve termine)

Stabilità del campione preparato sul banco di lavoro per il tempo necessario all'analisi (tipicamente 4–24 h).

Cicli gelo-disgelo

Almeno 3 cicli di congelamento/scongelamento per valutare la degradazione dell'analita.

Lungo termine

Stabilità nelle condizioni di conservazione previste per la durata dello studio (settimane/mesi).

Robustezza: stabilità nelle piccole variazioni operative

Definizione

La robustezza misura la capacità del metodo di rimanere affidabile in presenza di **piccole variazioni** delle condizioni operative, tipiche della routine di laboratorio.

Domanda chiave: *Il metodo rimane affidabile anche se qualcosa cambia di poco?*

Esempi di variazioni testate

- Temperatura della colonna ±2–5 °C
- Variazione del pH ±0,1
- Composizione fase mobile (es. 98/2 → 97/3)
- Flusso ±0,1 mL/min
- Volume o tempo di estrazione leggermente diversi
- Intensità sorgente MS o lampada UV leggermente diversa
- Tempo di agitazione o di centrifugazione

Un metodo robusto mantiene accuratezza, precisione e tempi di ritenzione entro limiti accettabili nonostante queste piccole modifiche. **Deve funzionare nella routine reale, non solo in condizioni ideali.**

Solidità (Ruggedness): stabilità nei cambiamenti di contesto

Definizione

La solidità valuta la riproducibilità del metodo quando cambiano **fattori di contesto più ampi**: laboratorio, strumentazione, operatore, materiali di consumo.

Domanda chiave: *Il metodo dà risultati simili anche se cambia chi lo usa, dove o come?*

Esempi di variazioni testate

- Strumentazione diversa ma equivalente
- Laboratori diversi (studi inter-laboratorio)
- Colonne di lotti diversi
- Operatori con diversa esperienza
- Reagenti e consumabili di marche o lotti diversi
- Giorni molto distanti nel tempo
- Condizioni ambientali diverse (umidità, temperatura)

⚠ Se basta cambiare operatore o colonna per far crollare i risultati, il metodo **non è solido** e non può essere trasferito ad altri laboratori.

Carry-over e integrità della diluizione

Carry-over

Residuo di analita proveniente da un campione precedente che contamina il campione successivo. Si valuta iniettando un bianco di matrice dopo il campione più concentrato (ULOQ). Il segnale nel bianco deve essere < 20% della risposta al LLOQ.

Integrità della diluizione

Verifica che i campioni con concentrazione superiore all'ULOQ possano essere diluiti con matrice bianca senza perdita di accuratezza o precisione. Si testa con campioni diluiti 2×, 5×, 10× rispetto all'ULOQ. Criteri: ±15%, CV ≤ 15%.

Enti di riferimento per le linee guida bioanalitiche



Ruoli e documenti chiave

- **FDA** — Bioanalytical Method Validation (2018); superata da ICH M10 per i metodi nel suo ambito
- **EMA** — Guideline on Bioanalytical Method Validation (2011), sostituita da ICH M10 dal 2023
- **ICH M10** (2022) — Harmonised guideline on bioanalytical method validation, adottata da FDA ed EMA
- **ICH Q2(R2) / Q14** (2023) — Metodi analitici farmaceutici e sviluppo analitico

ICH M10 (2022): struttura e ambito

1

Ambito

Validazione di metodi bioanalitici per la quantificazione di analiti in matrici biologiche (plasma, siero, urina, tessuti) nell'ambito di studi farmacocinetici e tossicocinetici.

2

Parametri richiesti

Selettività, curva di calibrazione, LLOQ, esattezza, precisione, recupero, effetto matrice, stabilità, carry-over, integrità della diluizione.

3

Novità rispetto alle linee guida precedenti

Armonizzazione FDA/EMA; SIL-IS raccomandato se possibile; effetto matrice con QC in ≥ 6 lotti; criteri per metodi ligand-binding (LBA) e cromatografici (LC-MS).

ICH Q2(R2) e Q14 (2023): metodi farmaceutici

ICH Q2(R2)

Revisione della storica linea guida sulla validazione dei metodi analitici per prodotti farmaceutici. Aggiorna i criteri per specificità, linearità, range, accuratezza, precisione, LOD, LOQ e robustezza. Si raccorda all'**Analytical Target Profile (ATP)**, introdotto da ICH Q14.

ICH Q14

Nuova linea guida sullo **sviluppo analitico**: approccio basato sulla comprensione del metodo (Analytical Quality by Design, AQbD). Complementare a Q2(R2): mentre Q2(R2) definisce cosa validare, Q14 definisce come sviluppare il metodo in modo razionale e documentato.

Linee guida per il settore alimentare e veterinario

SANTE/11312/2021

Documento guida per la validazione di metodi analitici per residui di pesticidi in alimenti e mangimi. Definisce criteri di recupero (70–120%), CV% (≤20%), LOQ e selettività per metodi multi-residuo.

Reg. (UE) 2021/808

Regolamento sui metodi analitici per il controllo ufficiale dei residui di farmaci veterinari negli alimenti di origine animale. Sostituisce la Decisione 2002/657/CE. Aggiorna i criteri per CCα e CCβ, già definiti in quella decisione.

Guida Eurachem

"The Fitness for Purpose of Analytical Methods": linea guida generale per laboratori chimici, applicabile a qualsiasi settore. Tratta la validazione; per l'incertezza: guida Eurachem/CITAC QUAM.

Confronto tra i metodi di calibrazione

Caratteristica	Standard esterno	Standard interno	Aggiunte multiple
Semplicità	Alta	Media	Bassa
Correzione effetto matrice	No	Parziale (SIL-IS: ottimale)	Sì (moltiplicativo)
Correzione variabilità iniezione	No	Sì	No
Numero di standard per campione	Basso	Medio	Alto (1 curva/campione)
Applicazione tipica	Matrici semplici	LC-MS/MS, GC-MS	Matrici complesse irriproducibili



Metodi strumentali: vantaggi rispetto alle tecniche tradizionali

Maggiore sensibilità

Limiti di dosabilità molto inferiori rispetto alle tecniche gravimetriche e volumetriche classiche.

Automazione

Possibilità di analisi in serie con sistemi automatizzati, riducendo l'errore umano e aumentando la produttività.

Gestione dei dati

Acquisizione, elaborazione e archiviazione dei dati analitici mediante interfacciamento con PC e software dedicati.

Principali tecniche strumentali: panoramica

Spettroscopia

Molecolare e atomica, assorbimento ed emissione: UV-Vis, IR, AAS, ICP-OES, fluorescenza.

Metodi elettrochimici

Potenziometria, conduttimetria, elettrolisi, voltammetria. Basati sulla misura di potenziale, corrente o conduttanza.

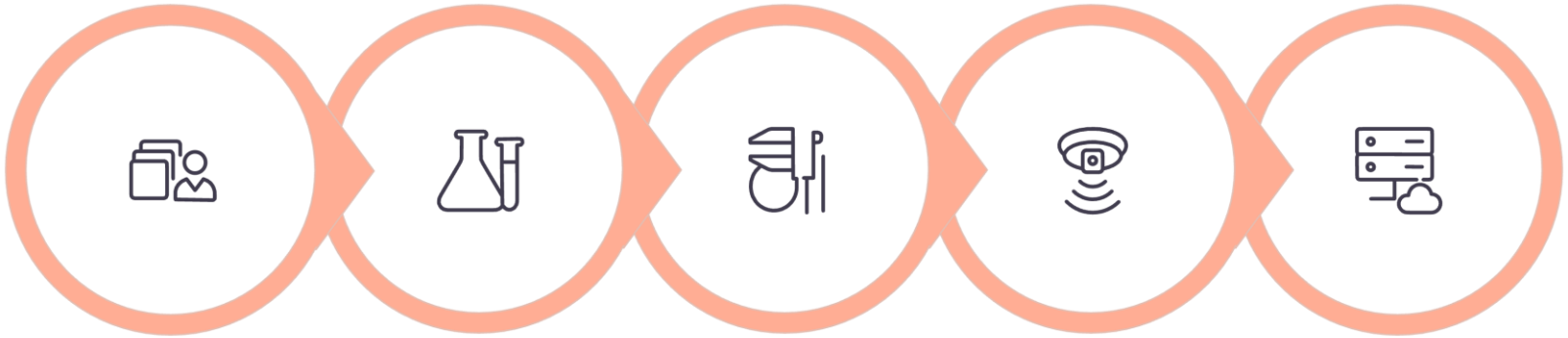
Cromatografia

GC, HPLC, cromatografia ionica. Separazione seguita da rivelazione spettroscopica o elettrochimica.

Spettrometria di massa

MS e tecniche accoppiate (LC-MS/MS, GC-MS): separazione per rapporto massa/carica, alta specificità e sensibilità.

Il processo analitico: dalla preparazione del campione all'analisi



Campionamento | **Standard e bianco** | **Calibrazione** | **Analisi** | **Elaborazione**

Ogni fase introduce potenziali fonti di errore. La validazione del metodo deve coprire l'intero processo, non solo la fase strumentale.

Propagazione dell'errore nelle diluizioni seriali

Principio

In una serie di diluizioni, gli errori si propagano e si accumulano. L'incertezza della soluzione di lavoro finale dipende dall'incertezza di ogni singolo passaggio di diluizione.

$$\frac{u_c(c)}{c} = \sqrt{\left(\frac{u_1}{x_1}\right)^2 + \left(\frac{u_2}{x_2}\right)^2 + \ldots + \left(\frac{u_n}{x_n}\right)^2}$$

Implicazioni pratiche

- Minimizzare il numero di diluizioni seriali
- Usare pipette tarate e calibrate con incertezza nota
- Preferire matracci tarati di classe A
- Documentare ogni passaggio con la relativa incertezza
- La soluzione madre deve essere preparata per pesata diretta con errore minimo

Monitoraggio della curva di calibrazione nel tempo

Nuova sequenza

Costruire una nuova curva di calibrazione per ogni sequenza analitica.

1

Verifica con 1–2 standard

Con nuovi reattivi, verificare la curva esistente con 1–2 standard aggiuntivi prima di costruirne una nuova.

2

Monitoraggio pendenza

La pendenza (sensibilità) deve rimanere costante nel tempo. Variazioni indicano problemi strumentali o di reattivi.

3

Monitoraggio QC

I QC a diversi livelli confermano l'efficienza della procedura, dello strumento e degli operatori.

4

Intercetta della retta di calibrazione: interpretazione

Significato dell'intercetta

L'intercetta rappresenta il segnale del bianco (fondo strumentale + interferenze additive). Un'intercetta significativamente diversa da zero può indicare:

- Contaminazione del bianco
- Interferenze additive non corrette
- Effetto matrice non compensato
- Problema strumentale (deriva della linea di base)

Regola operativa

Se l'intercetta è nettamente diversa da zero, occorre valutare se ciò è fisicamente giustificabile. In caso contrario, rivedere la procedura analitica.

⚠ Non forzare mai il passaggio della retta per l'origine (0,0): si introduce un errore sistematico artificiale che compromette la quantificazione.

Punti aberranti nella curva di calibrazione

1 Identificazione

Dopo la regressione, esaminare i residui standardizzati; i test di Grubbs e Dixon valgono per le repliche di uno stesso livello.

2 Esclusione motivata

Un punto aberrante può essere escluso solo se vi è una giustificazione documentata (errore di preparazione, problema strumentale). L'esclusione arbitraria è inaccettabile.

3 Verifica del criterio 75%

Dopo l'esclusione, almeno il 75% dei calibranti deve essere conforme ai criteri di retrocalcolo (±15%, ±20% al LLOQ).

Standard interno marcato con isotopi stabili (SIL-IS) in LC-MS/MS

Perché è la scelta ottimale

Il SIL-IS (es. analita deuterato, ^{13}C- o ^{15}N-marcato) ha comportamento cromatografico identico all'analita ma è distinguibile per m/z. Compensa:

- Perdite durante l'estrazione
- Variabilità dell'iniezione
- Effetto matrice (ion suppression/enhancement)
- Instabilità della sorgente MS

Requisiti pratici

- Aggiunto il prima possibile nel processo (idealmente prima dell'estrazione)
- Concentrazione costante in tutti i campioni e standard
- Assenza di cross-talk tra canale analita e canale SIL-IS
- Purezza isotopica certificata (≥ 98%)

Limitazione

Costo elevato; non sempre disponibile per tutti gli analiti.

Riepilogo: parametri di validazione e criteri ICH M10

Parametro	Criterio generale	Criterio al LLOQ
Esattezza (bias%)	±15%	±20%
Precisione (CV%)	≤15%	≤20%
Calibranti conformi	≥75% del totale	—
Selettività (bianco)	<20% risposta LLOQ	—
Effetto matrice (QC basso e alto)	±15%, CV ≤15% in ≥6 lotti	—
Carry-over (bianco post-ULOQ)	<20% risposta LLOQ	—

Validazione completa, parziale e cross-validazione

Validazione completa

Richiesta per un metodo nuovo o significativamente modificato. Comprende tutti i parametri: selettività, curva, LLOQ, esattezza, precisione, recupero, effetto matrice, stabilità, carry-over, integrità della diluizione, robustezza.

Validazione parziale

Per modifiche minori a un metodo già validato (es. cambio di matrice, nuovo range, nuovo strumento equivalente). Si valutano solo i parametri potenzialmente influenzati dalla modifica.

Cross-validazione

Confronto tra due metodi validati sugli stessi campioni (es. trasferimento tra laboratori). ICH M10 non fissa criteri: il bias si valuta statisticamente (es. Bland-Altman, Deming).

Documentazione e tracciabilità nella validazione

Piano di validazione (VP)

Documento redatto prima degli esperimenti che descrive: obiettivi, parametri da valutare, criteri di accettabilità, disegno sperimentale, responsabilità e tempistiche.

Rapporto di validazione (VR)

Documento conclusivo che riporta tutti i dati sperimentali, i calcoli statistici, il confronto con i criteri di accettabilità e la conclusione sulla validità del metodo. Deve essere firmato e archiviato secondo le norme GLP/GMP.

In ambito regolatorio (studi GLP, dossier registrativi), il piano e il rapporto di validazione sono documenti ispezionabili. La tracciabilità di ogni dato è obbligatoria.

Errori comuni nella costruzione della curva di calibrazione

Forzare la retta per l'origine

Introduce un bias sistematico. L'intercetta deve essere stimata liberamente dalla regressione.

Usare solo r^2 come criterio

Il coefficiente di determinazione non rileva deviazioni sistematiche. Analizzare sempre i residui e le concentrazioni retrocalcolate.

Escludere punti senza giustificazione

Escludere calibranti conformi senza motivo invalida la curva. Ogni esclusione va documentata.

Riutilizzare la curva con nuovi reattivi senza verifica

Con nuovi lotti di reattivi, verificare sempre la curva con almeno 1–2 standard aggiuntivi.

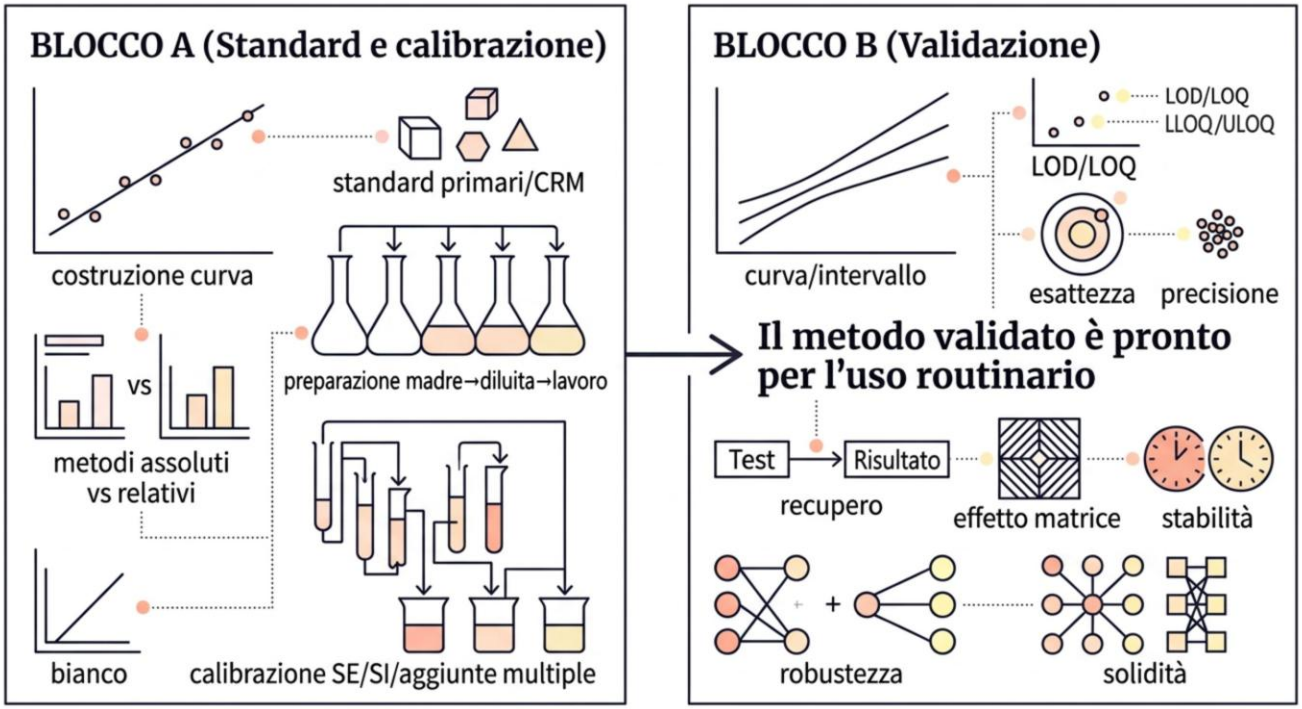
Esempio pratico: sequenza analitica in LC-MS/MS



Bianco matrice **Campione zero** **Calibranti** **QC triplicati** **Campioni**

L'ordine di iniezione è standardizzato per minimizzare il carry-over e garantire la stabilità della curva durante tutta la sequenza. I QC di fine sequenza verificano la stabilità strumentale nel tempo.

Sintesi: dalla calibrazione alla validazione



Messaggi chiave

La tracciabilità metrologica è fondamentale

Ogni standard deve essere collegato al SI attraverso una catena documentata di confronti con incertezza dichiarata.

r^2 non è sufficiente

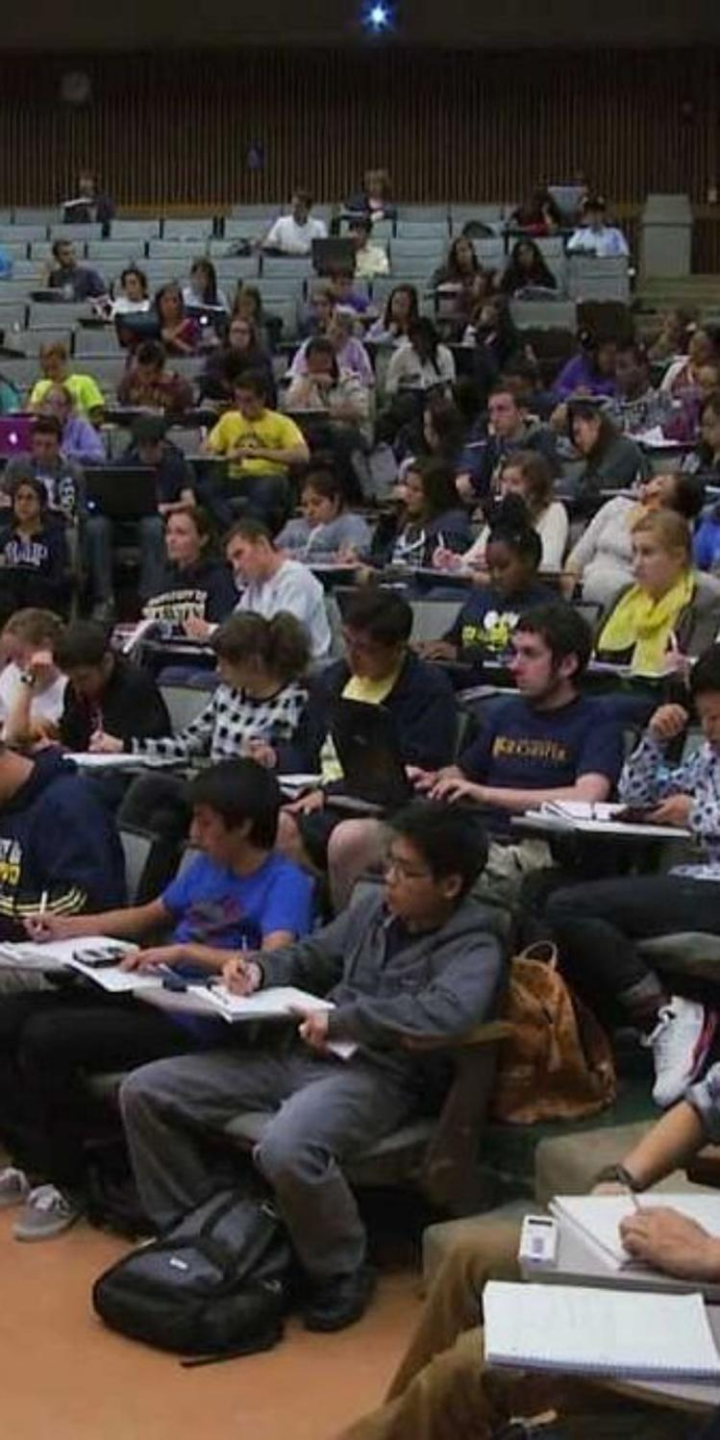
La curva di calibrazione si valuta con residui e concentrazioni retrocalcolate, non solo con il coefficiente di determinazione.

La coerenza su tutto il range è obbligatoria

Un metodo valido deve rispettare i criteri di esattezza, precisione e recupero dal LLOQ all'ULOQ, non solo a metà curva.

Il SIL-IS è la scelta ottimale in LC-MS/MS

Compensa simultaneamente perdite estrattive, variabilità di iniezione ed effetto matrice.



Riferimenti normativi e letture consigliate

Linee guida

- ICH M10 — Bioanalytical Method Validation (2022)
- ICH Q2(R2) / Q14 — Analytical Procedures (2023)
- Eurachem — The Fitness for Purpose of Analytical Methods (3ª ed., 2025)
- SANTE/11312/2021 v2 (2024) — Pesticide residues
- Reg. (UE) 2021/808 — Veterinary drug residues

Testi di riferimento

- Skoog, Holler, Crouch — *Principles of Instrumental Analysis*, 7ª ed.
- Harvey — *Modern Analytical Chemistry*
- Matuszewski et al. — *Anal. Chem.* 2003, 75, 3019–3030
- ISO 5725 — Accuracy of measurement methods