

Proposte per l'armonizzazione delle stime di LOD/LOQ

Silvia Ciardullo, Marina Patriarca

LNR Metalli pesanti negli alimenti

Dipartimento di Sanità pubblica veterinaria e sicurezza alimentare

Istituto Superiore di Sanità



The Fitness for Purpose of Analytical Methods

A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics

Traduzione
in italiano
in stampa
2016

Second Edition 2014

Riferimenti

29.3.2007

IT

Gazzetta ufficiale dell'Unione europea

L 88/29

REGOLAMENTO (CE) N. 333/2007 DELLA COMMISSIONE

del 28 marzo 2007

relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di piombo, cadmio, mercurio, stagno inorganico, 3-MCPD e benzo(a)pirene nei prodotti alimentari

Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food

Inclusi i commenti degli LNR

2016

16.4.2016

IT

Gazzetta ufficiale dell'Unione europea

L 101/3

REGOLAMENTI

REGOLAMENTO (UE) 2016/582 DELLA COMMISSIONE

del 15 aprile 2016

che modifica il regolamento (CE) n. 333/2007 per quanto riguarda l'analisi di arsenico inorganico, piombo e idrocarburi policiclici aromatici e per alcuni criteri di prestazione relativi all'analisi



Traduzione in italiano in corso, 2017

Definizioni. Reg. 333/2007 e s.m.

Limite di rilevazione (LOD): la minima concentrazione misurata da cui è possibile dedurre con ragionevole certezza statistica la presenza dell'analita.

- numericamente pari al triplo della deviazione standard della media delle determinazioni in bianco ($n > 20$).

Limite di quantificazione (LOQ): il minimo tenore di analita misurabile con ragionevole certezza statistica.

- Se l'accuratezza e la precisione sono costanti in un intervallo di concentrazione prossimo al limite di rilevazione, il limite di quantificazione è numericamente pari al **decuplo** della deviazione standard della media delle determinazioni in **matrice bianca** ($n \geq 20$).

$$\text{LOQ} = \frac{10}{3} * \text{LOD} = 3,3 * \text{LOD}$$

Criticità

- Le stime del LOD e del LOQ per lo stesso metodo analitico risentono dell'effetto matrice
 - LOD e LOQ devono essere determinati per ogni matrice
 - Sforzo considerevole, in particolare per i metodi multi-analita/multi-matrice ($n > 20$)
- Considerevoli discrepanze osservate nei valori del LOD e LOQ fra laboratori
 - prestazione individuale del laboratorio / tecnica analitica
 - disegno sperimentale scelto

4 EURL Guidance document

Obiettivi:

- Armonizzare gli approcci per la stima del LOD e del LOQ
- Fornire indicazioni aggiuntive per la stima del LOQ e del LOD relativamente ai metodi analitici adottati per il controllo ufficiale degli alimenti nell'Unione Europea
 - determinazione di singole sostanze
 - contaminanti nei mangimi e negli alimenti

«Bianchi» - definizioni

- Bianco: Campione di prova in cui l'analita è assente.
- Pseudo bianco: Campione di prova in cui l'analita è presente (naturalmente o aggiunto) ad un basso livello di concentrazione
- Bianco reagente (Procedural blank): Campione per il quale viene eseguita la procedura analitica per tutti gli aspetti ad eccezione dell'aggiunta dell'oggetto di test (analita). Comprende tutti i reagenti e le sostanze chimiche.

Scelta dei campioni: criticità

- Disponibilità di campioni «bianchi»
- Utilizzo di «pseudo-bianchi»
 - omogeneità delle varianze per i segnali del bianco e dello pseudo-bianco
 - concentrazioni di analita simili al LOD
 - Non superiori a 5 volte LOD
- Soluzioni dell'analita / bianchi reagente: solo se si può dimostrare che la matrice non ha effetto sulla determinazione (LOD/LOQ strumentali)

Scelta dei campioni: criticità

- Rappresentativi delle proprietà chimico-fisiche delle diverse matrici da analizzare.
 - Matrici singole
 - Gruppi di matrici a composizione / effetti simili acqua, proteine, contenenti carboidrati o grasso, o prodotti alimentari)
 - Es. acquose, ad alto contenuto proteico, di carboidrati, di grassi
 - Più bianchi / pseudobianchi per matrice (o gruppo di matrici) entro lo scopo del metodo

Procedimento

- In accordo ai requisiti normativi
- Dipende dalla disponibilità di campioni bianchi
- Per elementi chimici, IPA e micotossine:
 - Analisi di bianchi (da preferire)
 - Approccio delle osservazioni appaiate
 - Approccio della taratura
- Esperimenti condotti in condizioni di ripetibilità
 - In caso di elevata variabilità in condizioni di ripetibilità intermedia.

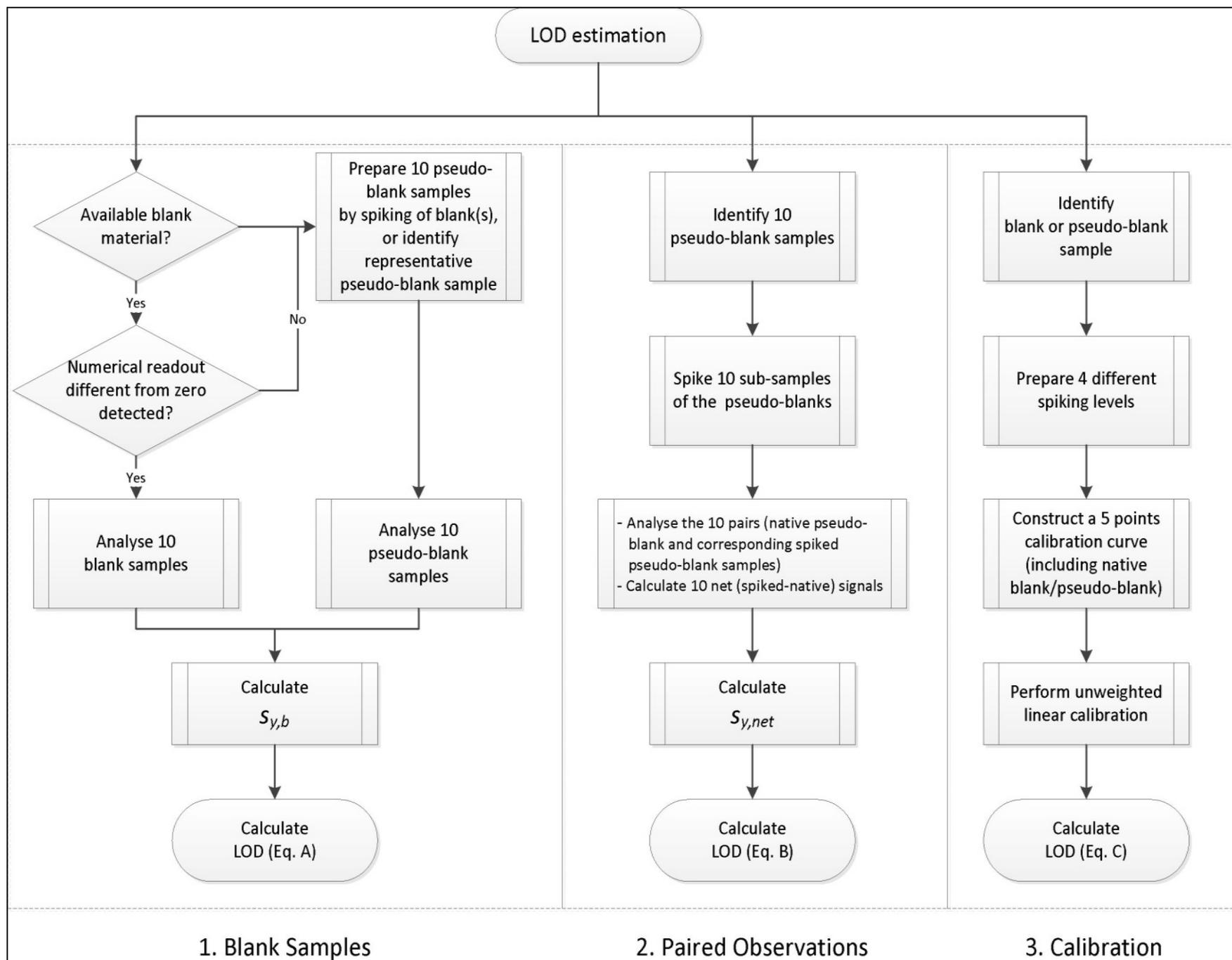
Approcci per la stima di LOD/LOQ nelle differenti aree

	S/N	Analisi di bianchi	Osservazioni appaiate	Bianco reagente	Taratura
Elementi chimici		X	X		X
Micotossine		X	X		X
IPA		X	X		X
PCDD/Fs, PCB	X			X	X

Assunti statistici

- Distribuzione normale della risposta analitica dei campioni bianchi e di taratura
- Omoscedascità nell'intervallo di taratura
- Le analisi ripetute di bianchi /di campioni taratura sono indipendenti
- Linearità della risposta intorno al LOQ;
- Livelli di probabilità per la decisione (falsi positivi / falsi negativi) di 0,05

spesso queste condizioni non possono essere interamente soddisfatte!



1. Analisi di bianchi

- Numero di prove:
 - 20? – giustificato nel caso di sostanze proibite
 - In pratica, vantaggi limitati rispetto a 10 prove
 - Contaminanti:
 - non si applica la tolleranza zero.
 - Nella maggior parte dei casi, tenori massimi significativamente maggiori del LOD e anche del LOQ.
 - Raccomandazione dei 4 EURLs: >10 prove
- Preparazioni indipendenti, ciascuna analizzata una sola volta
- Bianchi o pseudo bianchi
- Condizioni di ripetibilità
- Limiti:
 - Fornisce informazioni relative ad una singola matrice / gruppo di matrici per volta
 - raccomandato quando la variabilità della matrice non influenza significativamente la variabilità dei risultati di misurazione

1. Analisi di bianchi: calcoli

$$x_{LOD} = 3,9 * \frac{s_{y,b}}{b}$$

x_{LOD} : Limite di rivelabilità

$s_{y,b}$: Scarto tipo dei segnali di bianco / pseudo bianco

b : Pendenza della curva di taratura

Non si tiene conto dell'intercetta!

1. Analisi di bianchi: taratura

- Stesso modello che nel metodo di prova
- Livelli di concentrazione equidistanti.
- Livello di concentrazione massimo < 10 LOD

2. Osservazioni appaiate

- Quando non sono disponibili bianchi
- Consente di includere più matrici
- Riduce l'impegno necessario per la stima del LOD per metodi analitici con ampio scopo.
- Consente di tenere conto della «sottrazione del bianco»

2. Osservazioni appaiate

Fase 1:

- identificare 10 pseudo-bianchi
 - diversi tipi di matrici
 - contenuto di analita simile
- Dividere ciascun campione in due porzioni e addizionarne una con una piccola quantità di analita
- L'aggiunta è pari al LOD o < 5 LOD

Fase 2:

- Analisi degli pseudo bianchi e delle rispettive porzioni addizionate in condizioni di ripetibilità
- Ciascuna coppia può essere analizzata in una corsa differente, per una migliore stima della variabilità

2. Osservazioni appaiate: taratura

- Stesso modello che nel metodo di prova
- Livelli di concentrazione equidistanti.
- Livello di concentrazione massimo < 10 LOD

2. Osservazioni appaiate: calcoli

1. Determinare la differenza fra i segnali per le porzioni addizionata e nativa di ciascuno pseudo-bianco
2. Calcolare lo scarto tipo delle differenze.

$$x_{LOD} = 5,2 * \frac{s_{y,net}}{b}$$

x_{LOD} : Limite di rivelabilità

$s_{y,net}$: Scarto tipo delle differenze dei segnali di osservazioni appaiate

b : Pendenza della curva di taratura

Si applica solo al disegno sperimentale descritto

Non si tiene conto dell'intercetta!

3. Approccio della taratura

- ISO 11843-2:2000

- Per ciascuna matrice (o gruppo di matrici)
- Bianchi o pseudo-bianchi, addizionati
- Cinque livelli di concentrazione equidistanti, incluso il livello con aggiunta uguale a zero
- Livello massimo < 10 LOD
- Ciascun livello preparato ed analizzato in duplicato seguendo l'intera procedura analitica
- Limiti: Fornisce informazioni relative ad una singola matrice / gruppo di matrici per volta

3. Approccio della taratura - ISO 11843-2:2000

$$x_{LOD} = 3,8 * \frac{s_{y,x}}{b} * \sqrt{1,1 + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

x_{LOD} : Limite di rivelabilità

$s_{y,x}$: Scarto tipo dei residui

b : Pendenza della curva di taratura
(regressione lineare non pesata)

\bar{x} : Livello medio di taratura

x_i : Concentrazione di analita al livello di taratura i

Si applica solo al disegno sperimentale descritto, con determinazioni singole sul campione di prova

Non si tiene conto dell'intercetta!

Approccio

LOD

LOQ

- Bianchi, n=10

$$x_{LOD} = 3,9 * \frac{s_{y,b}}{b}$$

- Osservazioni Appaiate n=20

$$x_{LOD} = 5,2 * \frac{s_{y,net}}{b}$$

- Taratura n=10

$$x_{LOD} = 3,8 * \frac{s_{y,x}}{b} * \sqrt{1,1 + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

- Reg. CE 333/2007 e s.m.

3,3 * LOD



Conclusioni

- Nuove regole nel Reg. (UE) 582/2016, che modifica il Reg. (CE) 3337/2007
- Nuovi approcci, rispetto a quanto previsto dal Reg. (UE) 582/2016, proposti in un documento congiunto dai 4 EURL Metalli pesanti, Micotossine, IPA, Diossine e PCB
(<https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/guidance-document-estimation-lod-and-log-measurements-field-contaminants-feed-and-food>)
- Approcci comuni per i settori: Metalli pesanti, Micotossine, IPA – Illustrati nella presentazione.