

KVALIMETRIE

Miloslav Suchánek

16. Statistické metody v metrologii a analytické chemii

Řešené příklady na CD-ROM v Excelu

Eurachem



ZAOSTŘENO
NA ANALYTICKOU CHEMII
V EVROPĚ

Kvalimetrie 16 je zatím poslední z řady příruček KVALIMETRIE, vydávaných odborným sdružením EURACHEM-ČR. Příručka obsahuje přehled statistických metod, které se využívají v chemických laboratořích, a je doplněna příloženým CD se šablonami a řešenými příklady různých statistických postupů s využitím programu MS-Excel. Autor věří, že příručka dojde širokého uplatnění v chemických i klinických laboratořích.

Příručka Kvalimetrie 16 vznikla v rámci projektů PRM VIII/18/09 Úřadu pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví a INGO LA 09014 MŠMT.

Autor děkuje především Ing. Davidu Mildemu, Ph.D. za revizi výpočetní části příručky a RNDr. Pavlu Kořínkovi, Ph.D. za technické práce při přípravě CD.

Miloslav Suchánek

Miloslav Suchánek: Statistické metody v metrologii a analytické chemii. Řešené příklady v Excelu na CD-ROM

Editor Miloslav Suchánek

K tisku připravil Ivan Koruna

© Miloslav Suchánek 2009

© EURACHEM-ČR 2009

Vydal EURACHEM-ČR, Technická 5, Praha 6. IČ 48550400
www.eurachem.cz

ISBN 80-86322-04-1

OBSAH

Úvod	5
1 Základní statistické parametry a testy hypotéz	7
1.1 Základní soubor a typy statistických rozdělení	7
1.1.1 Základní pojmy	7
1.1.2 Náhodné veličiny	8
1.1.3 Základní typy rozdělení	10
1.2 Statistika opakovaných měření, náhodný výběr	12
1.3 Nejistota výsledku	14
1.4 Nejistoty elementárních operací v chemické a biologické laboratoři	17
1.4.1 Volumetrické operace	17
1.4.2 Vážení	17
1.4.3 Nejistota hodnoty měřeného signálu	17
1.4.4 Titrační stanovení	18
1.5 Vyhodnocování nejistot postupy „zdola nahoru“ a „shora dolů“	18
1.6 Testy hypotéz	19
1.6.1 Statistika opakovaných pokusů	20
1.6.2 Testování hypotéz s použitím nejistoty výsledku	21
1.7 Příklady ke kapitole 1	22
2 Optimalizace měřicích postupů v chemii a biologických vědách	23
2.1 Plánování experimentů	23
2.2 Experimentální optimalizace	28
2.3 Příklady ke kapitole 2	31
3 Hodnocení závislosti mezi proměnnými	33
3.1 Lineární regrese	33
3.2 Vážená lineární regrese	37
3.3 Lineární regrese s nejistotami v obou proměnných (bivariátní, bilineární regrese)	38
3.4 Nelineární regrese v biologických měřicích postupech	40
3.5 Další experimentální plány v kalibraci	42
3.5.1 Metoda přídávku standardu (SAM)	42
3.5.2 Metoda „bracketing“	44
3.6 Příklady ke kapitole 3	45
4 Validace měřicích postupů	47
4.1 Terminologie	47
4.2 Experimentální plán pro validaci	48
4.3 Selektivita (interference)	48
4.4 Rozsah měření, linearita	49
4.5 Opakovatelnost	50
4.6 Reprodukovatelnost	50
4.7 Výtěžnost	50
4.8 Mez detekce, mez stanovitelnosti	51
4.9 Robustnost měřicího postupu	53
4.10 Příklady ke kapitole 4	54

5	Statistické metody při přípravě a používání referenčních materiálů	55
5.1	Statistické principy certifikace	55
5.1.1	Stanovení nejistoty homogenity	55
5.1.2	Stanovení nejistoty stability	57
5.2	Použití certifikovaných referenčních materiálů	58
5.3	Příklady ke kapitole 5	58
6	Mezilaboratorní porovnání	59
6.1	Norma ISO 13528	59
6.2	Harmonizovaný protokol IUPAC	61
6.3	Kvalitativní zkoušky	61
7	Kontingenční tabulky	63
7.1	Příklady ke kapitole 7	66
8	Vícerozměrné metody	67
8.1	Kovarianční matice a testy hypotéz	67
8.2	Boxův test	69
8.3	Ověření úplné nezávislosti zkoumaných proměnných	69
8.4	Lineární diskriminační analýza	70
8.5	Lineární diskriminační analýza pro více skupin ($k > 2$)	72
8.6	Příklady ke kapitole 8	73
9	Používání referenčních materiálů při řízení kvality (ISO Guide 80)	75
9.1	Homogenita	75
9.2	Dlouhodobá stabilita	76
9.3	Použití QCM při tvorbě regulačních diagramů	77
10	Literatura	79
11	Seznam zkratk	81

Úvod

V příručce Kvalimetrie 16 jsme se pokusili podat přehled statistických a chemometrických postupů, které mohou být využity při zpracování a interpretaci experimentálních dat. Pracovníci laboratoří, pracující v oborech přírodních věd, používají často při zpracování experimentálních dat dnes běžně dostupné programové vybavení – tabulkový procesor MS-Excel. Přílohou této příručky je CD-ROM, který obsahuje jednak řešené příklady, jednak šablony (templáty) pro řešení jednotlivých statistických postupů. Excelové sešity jsou otevřené, tedy nezamčené, a mohou být využity při řešení obdobných problémů. Pro validaci zmíněných sešitů na jiných počítačích jsou přiloženy výsledky příkladů v souborech formátu MS-Word.

Uživatelům příručky doporučujeme, aby příliš nezasahovali do struktury sešitů, zvláště v případech, kdy je použito makro. Doporučujeme pouze jednoduché úpravy, např. rozšíření počtu vstupních údajů nebo zaokrouhlení výstupních dat.

Používání excelových sešitů vyžaduje pouze základní znalosti Excelu. V případě jakékoliv pochybnosti nebo nefunkčnosti některého z přiložených sešitů kontaktujte autora této příručky na emailových adresách miloslav.suchanek@vscht.cz nebo sekretariat@eurachem.cz.

Výčet statistických a chemometrických postupů není samozřejmě úplný. Soustředili jsme se pouze na ty, které jsou jednoduché a které se dají zvládnout v prostředí Excelu. V příkladech je použita verze Microsoft® Excel 2000.

1 Základní statistické parametry a testy hypotéz

1.1 Základní soubor a typy statistických rozdělení

1.1.1 Základní pojmy

Při hodnocení analytických metod a výsledků nebo při formulaci fyzikálně-chemických modelů popisujících vztahy mezi proměnnými veličinami, z nichž se většina získává experimentálně, využíváme matematicko-statistické metody.

Matematicko-statistické metody jsou vhodným nástrojem zkoumání systému v případech, kdy je nutno učinit objektivní závěr o celku složeném z velkého množství jednotek, přičemž z nějakých důvodů je možno prozkoumat jen malou, vybranou část tohoto celku.

Hromadné jevy jsou takové, které se vyskytují za určitých podmínek opakovaně ve velkém počtu a lze je přitom pozorovat nebo získávat experimentem. Speciálním případem hromadného jevu je *náhodný jev*. Ten za daných podmínek může a nemusí nastat, jeho výskyt závisí pak na náhodě. Číselná veličina, která mění svou hodnotu působením náhodných jevů, se nazývá *náhodná veličina*. Zjistitelná hodnota náhodné veličiny musí být jednoznačně určena, tzn. musí v konkrétně sledovaném případě nabýt jediné hodnoty. Náhodnost jevu znamená nemožnost předpovědět s jistotou, zda při určitém experimentu kdykoli v budoucnu jev nastane či nenastane. Je tomu tak proto, že neznáme všechny příčiny výskytu náhodného jevu, kterých je mnoho a které jsou samy o sobě nepostižitelné a nekontrolovatelné. Náhodnou veličinu charakterizují pravděpodobnosti, s níž se vyskytují její hodnoty v předem zvolených mezích.

Distribuční funkce náhodné veličiny ξ je funkcí reálné proměnné x a její hodnota v daném bodě x_0 je pravděpodobnost, že ξ nabude hodnoty menší nebo rovné x_0 :

$$F(x_0) = P\{\xi \leq x_0\} \text{ pro } x = x_0 \quad (1.1)$$

Všechny hodnoty, kterých může náhodná veličina nabýt, tvoří spolu s distribuční funkcí její *rozdělení pravděpodobností*.

Základní soubor je množina hodnot náhodné veličiny s daným rozdělením pravděpodobností, z níž se vybírají pozorované hodnoty této veličiny. Základní soubor obsahuje hodnoty náhodné veličiny skutečně pozorované a teoreticky možné. Teoreticky proto, že nemáme technické, časové nebo jiné možnosti pozorování uskutečnit, ale víme, jak bychom každé jednotlivé pozorování mohli uskutečnit. Vlastnosti základního souboru poznáváme jen do určité míry prostřednictvím *náhodného výběru*. Příkladem základního souboru mohou být např. výsledky všech možných analýz stejného vzorku (nekonečně velký soubor), všechny možné koncentrace H_2SO_4 , které můžeme obdržet od výrobce (nekonečný), dodávka 5 vagónů železné rudy (konečný) apod. Náhodný výběr je potom např. pět analýz stejného vzorku, deset různých koncentrací H_2SO_4 , pět vzorků po 1 kg odebraných náhodně z každého vagónu atd.

1.1.2 Náhodné veličiny

Jak bylo uvedeno výše, náhodná veličina je charakterizována distribuční funkcí a rozdělením pravděpodobností. Probereme si některé vlastnosti distribučních funkcí.

Distribuční funkce má tyto vlastnosti:

1. Hodnoty distribuční funkce leží mezi 0 a 1, tedy

$$0 \leq F(x) \leq 1 . \quad (1.2)$$

2. Distribuční funkce je neklesající:

$$F(x_2) > F(x_1) \quad \text{pro všechna } x_2 > x_1 . \quad (1.3)$$

3. Distribuční funkce je spojitá zleva.

4. Každá distribuční funkce splňuje podmínky

$$F(-\infty) = 0 \quad \text{a} \quad F(\infty) = 1 . \quad (1.4)$$

Jestliže možné hodnoty náhodné veličiny patří do intervalu $(a ; b)$, potom analogicky platí

$$F(a) = 0 \quad \text{a} \quad F(b) = 1 . \quad (1.5)$$

Z definice distribuční funkce a z vlastností distribuční funkce plynou některé další důležité vztahy:

$$P(x_1 \leq \xi \leq x_2) = F(x_2) - F(x_1) \quad (1.6)$$

pro spojitou náhodnou veličinu, a

$$P(x_1 < \xi < x_2) = F(x_2) - F(x_1) \quad (1.7)$$

pro diskrétní náhodnou veličinu.

Dále platí vztah

$$P(\xi > x) = 1 - F(x) . \quad (1.8)$$

Pomocí distribuční funkce může být určen zákon rozdělení jak diskrétní, tak spojitě náhodné veličiny.

Zákon rozdělení diskrétní náhodné veličiny ξ lze kromě tohoto způsobu popsat také množinou hodnot x a odpovídajících pravděpodobností $P(\xi = x)$, které budeme označovat $p(x)$ a nazveme pravděpodobnostní nebo frekvenční funkcí. Tyto pravděpodobnosti splňují vztahy

$$\sum_x p(x) = 1 \quad (1.9)$$

$$P(x_1 < \xi < x_2) = \sum_{x_1}^{x_2} p(x) . \quad (1.10)$$

Pravděpodobnosti $p(x)$ a jejich rozdělení lze vyjádřit trojím způsobem: matematickou funkcí, tabulkou hodnot a grafem.

Zákon rozdělení spojitě náhodné veličiny ξ vyjádříme, kromě distribuční funkcí, pomocí tzv. hustoty pravděpodobnosti (frekvenční funkce), pro niž platí

$$F(x) = \int_{-\infty}^x f(z) dz . \quad (1.11)$$

Kvantily jsou body, rozdělující obor hodnot náhodné veličiny v určitém pravděpodobnostním poměru. 100P% kvantil, x_p , je hodnota, která současně splňuje nerovnosti

$$P(\xi \leq x_p) \leq P$$

$$P(\xi \geq x_p) \geq 1 - P .$$

V případě spojité veličiny platí

$$F(x_p) = P . \quad (1.12)$$

Tak například 50% kvantil znamená, že 50 % všech možných hodnot náhodné veličiny ξ leží pod hodnotou tohoto kvantilu, $x_{0,5}$. Tento kvantil se nazývá *medián*.

Zákon rozdělení podává o náhodné veličině obraz sice úplný, ale často dost nepřehledný. Proto shrnujeme informaci o náhodné veličině do jednoho nebo několika čísel, která veličinu dobře charakterizují. Tato čísla nazýváme *charakteristikami*. Z velkého množství charakteristik se budeme zabývat pouze dvěma: charakteristikou polohy a charakteristikou variability.

Základní charakteristikou polohy je *střední (očekávaná) hodnota*, $E(\xi)$ nebo μ . Základní charakteristikou variability je *rozptyl*, $D(\xi)$, nebo σ^2 . Jeho odmocninu nazýváme *směrodatnou odchylkou*, σ .

Důležitou charakteristikou dvou náhodných veličin, např. ξ a η , je *kovariance* $C(\xi, \eta)$:

$$C(\xi, \eta) = E\{[\xi - E(\xi)][\eta - E(\eta)]\} . \quad (1.13)$$

Koeficient korelace, ρ , je definován vztahem:

$$\rho(\xi, \eta) = C(\xi, \eta) / [\rho(\xi) \cdot \rho(\eta)] . \quad (1.14)$$

který charakterizuje těsnost vztahu mezi dvěma veličinami. Koeficient korelace může nabývat hodnot z intervalu $\langle -1 ; 1 \rangle$. Je-li koeficient korelace nulový, potom se náhodné veličiny ξ a η nazývají nekorelované.

Věty o střední hodnotě a rozptylu (platí pro nezávislé náhodné veličiny):

1. $E(k) = k$ $D(k) = 0$ (k je konstanta)
2. $E(k\xi) = kE(\xi)$ $D(k\xi) = k^2 \cdot D(\xi)$
3. $E(\xi \pm \eta) = E(\xi) \pm E(\eta)$ $D(\xi \pm \eta) = D(\xi) + D(\eta)$ (1.15)
4. $E(\xi\eta) = E(\xi) \cdot E(\eta)$
5. $D(\xi) = E(\xi^2) - [E(\xi)]^2$

Důležitou veličinou je *normovaná náhodná veličina*, ζ , která má nulovou střední hodnotu a jednotkový rozptyl:

$$\zeta = [\xi - E(\xi)] / D(\xi) . \quad (1.16)$$

Příklad

Diferenční metoda vážení spočívá ve dvou postupných váženích, jednak váženky se vzorkem, jednak váženky se zbytkem. Obě hmotnosti můžeme považovat za nezávislé náhodné veličiny ξ_1 a ξ_2 . Zjistěte střední hodnotu a rozptyl rozdílu obou hmotností.

$$E(\xi_1 - \xi_2) = E(\xi_1) - E(\xi_2)$$

$$D(\xi_1 - \xi_2) = D(\xi_1) + D(\xi_2),$$

je-li $D(\xi_1) = D(\xi_2) = \sigma^2$, potom $D(\xi_1 - \xi_2) = 2\sigma^2$.

1.1.3 Základní typy rozdělení

Nejdůležitějším a v teorii měření nejběžnějším rozdělením pravděpodobností spojité náhodné veličiny je tzv. *normální (Gaussovo) rozdělení*. Tímto rozdělením se dají aproximovat i některá rozdělení spojité i diskrétní. Toto rozdělení je použitelné vždy, když je kolísání hodnot náhodné veličiny způsobeno součtem velkého počtu nepatrných a vzájemně nezávislých vlivů. Tak např. při chemické analýze vzorku ovlivňuje výsledek kolísající kvalita chemikálií, různá vlhkost vzduchu, teplota, tlak, stabilita přístrojů, momentální schopnosti pracovníka, kolísání napětí v síti.

Normální rozdělení

je charakterizováno dvěma parametry: *střední (očekávanou) hodnotou* μ a *rozptylem* σ^2 . Značí se $N(\mu, \sigma^2)$. Normální rozdělení je symetrické kolem střední hodnoty.

Distribuční funkce normálního rozdělení, stejně jako hustota pravděpodobnosti, jsou tabelovány pro hodnoty normované náhodné veličiny z . Pro výpočet hodnot z této normované náhodné veličiny z hodnot x nenormované veličiny platí

$$z = (x - \mu) / \sigma . \quad (1.17)$$

Normované rozdělení budeme značit $N(0,1)$. Tabelovány jsou hodnoty $F(z)$ a $f(z)$ pro nezáporné z . Platí

$$F(-z) = 1 - F(z) \quad \text{a} \quad f(-z) = f(z) . \quad (1.18)$$

Uvažujme nyní pravděpodobnost, že normovaná náhodná veličina, normálně rozdělená, bude uvnitř intervalu symetrického kolem nuly. Tuto pravděpodobnost můžeme např. vyjádřit vztahem

$$P(|z| \leq z_\alpha) = 1 - \alpha ,$$

což je ekvivalentní vztahu

$$P(|z| > z_\alpha) = \alpha .$$

Hodnotu z_α nazýváme 100 α % kritickou hodnotou.

Příklad

Vypočítejte kritickou hodnotu z_α pro $\alpha = 0,05$.

Podle předchozích vztahů můžeme psát:

$$P(-z_\alpha \leq z \leq z_\alpha) = F(z_\alpha) - F(-z_\alpha) = 2 F(z_\alpha) - 1 = 1 - \alpha ,$$

tedy

$$F(z_\alpha) = 1 - (\alpha/2) .$$

Podle zavedené definice kvantilu je $z_\alpha = z_P$ 100 P % kvantilem pro

$$P = 1 - (\alpha/2) .$$

Pro $\alpha = 0,05$ je $F(z_\alpha) = 0,975$ a z tabulek zjistíme $z_\alpha = 1,96$, což je 97,5% kvantil.

Příklad

Kontrolujeme kvalitu při výrobě kaprolaktamu. Přitom požadujeme, aby bod tuhnutí, Θ , byl v mezích 67,2 °C až 69,9 °C. Z dlouhodobého pozorování je známo, že střední hodnota bodu tuhnutí suroviny, odeberáme-li vzorek z jednoho pytle, je 67,7 °C se směrodatnou odchylkou 0,3 °C. Stanovte podíl pytlů, které leží mimo požadované meze.

Předpokládejme, že náhodná veličina (normálně rozdělená) bod tuhnutí, Θ , suroviny v jednom pytli má rozdělení $N(67,7; 0,09)$. Naším úkolem je vypočítat pravděpodobnosti

$$P(\Theta < 67,2) \text{ a } P(\Theta > 69,9)$$

Vytvoříme normovanou veličinu ζ , jejíž hodnoty požadovaného intervalu vypočteme podle

$$z_1 = (69,9 - 67,7) / 0,3 = 7,33 \quad F(7,33) = 1$$

$$z_2 = (67,2 - 67,7) / 0,3 = -1,67 \quad F(-1,67) = 1 - F(1,67) = 0,047$$

Požadované pravděpodobnosti:

$$P(\Theta < 67,2) = 0,047$$

$$P(\Theta > 69,9) = 1 - F(7,33) = 0$$

Odpověď na požadovanou otázku je: 4,7 % pytlů bude mít nižší bod tuhnutí než 67,2 °C a žádný pytel vyšší bod tuhnutí než 69,9 °C.

Příklad

Náhodná veličina ξ má rozdělení $N(\mu, \sigma^2)$. Vypočítejte s jakou pravděpodobností se hodnoty této náhodné veličiny budou vyskytovat v intervalu $\mu \pm \sigma$.

Hodnoty normované náhodné veličiny, ζ , vypočteme takto:

$$z = (\mu \pm \sigma - \mu) / \sigma = \pm 1$$

$$F(1) = 0,841$$

$$F(-1) = 1 - F(1) = 0,159$$

$$P = 0,841 - 0,159 = 0,682 \text{ t.j. } 68,2 \%$$

Rozdělení χ^2

je charakterizováno počtem stupňů volnosti, v . Střední hodnota tohoto rozdělení je v , rozptyl je $2v$. Tabelovány jsou kvantily, $\chi_p^2(v)$, pro které platí

$$P[\chi^2(v) < \chi_p^2(v)] = P. \quad (1.19)$$

Tak např. kvantil $\chi_{1-\alpha/2}^2(6)$ pro $\alpha = 0,05$ [$\chi_{0,975}^2(6)$] má hodnotu 14,4.

Rozdělení t (Studentovo rozdělení)

je rovněž charakterizováno počtem stupňů volnosti v . Je to symetrické rozdělení a pro vyšší v ($v > 30$) se blíží normálnímu rozdělení. V praxi ho používáme tam, kde neznáme rozptyl σ^2 náhodné veličiny a nahrazujeme ho odhadem rozptylu s^2 (viz dále). V tabulkách jsou uvedeny kvantily t pro zvolené P tak, aby platil vztah

$$P[t(v) < t_p] = P. \quad (1.20)$$

F-rozdělení (Snedecorovo rozdělení)

Toto rozdělení budeme používat při analýze rozptylu.

Mějme dvě nezávislé náhodné veličiny ξ_1 a ξ_2 o rozděleních $\chi^2(v_1)$ a $\chi^2(v_2)$. Náhodná veličina

$$\phi = (\xi_1/v_1)/(\xi_2/v_2) \quad (1.21)$$

má F rozdělení o v_1 a v_2 stupních volnosti. V tabulkách nalezneme kvantily F, pro které platí

$$P[F < F_P(v_1, v_2)] = P. \quad (1.22)$$

Poissonovo rozdělení

Pro rozdělení nespojitě náhodné veličiny si uveďme Poissonovo rozdělení.

Poissonovo rozdělení je limitním případem binomického rozdělení, když se počet pokusů n blíží nekonečnu, pravděpodobnost $p(x)$ se blíží k nule a parametr $\lambda = n \cdot p(x) = \text{konst.}$ Parametr λ je parametrem charakterizujícím daný typ rozdělení $Po(\lambda)$. Pro určité hodnoty λ je Poissonovo rozdělení tabelováno. Střední hodnota i rozptyl rozdělení $Po(\lambda)$ je λ . Rozdělením $Po(\lambda)$ můžeme nahradit binomické rozdělení při $p(x) < 0,05$. Řídí se jím např. četnost impulsů naměřených Geigerovou–Müllerovou trubicí, četnost červených krvinek v zorném poli mikroskopu, četnost zmetků v dodávce zboží apod.

1.2 Statistika opakovaných měření, náhodný výběr

Uvažujme náhodný pokus, jehož výsledkem je hodnota x náhodné veličiny ξ , která má distribuční funkci $F(x)$. Opakujeme-li náhodný pokus nezávisle nkrát, dostaneme hodnoty x_1, x_2, \dots, x_n . Množina těchto hodnot se nazývá *náhodným výběrem* rozsahu n z rozdělení, majícího distribuční funkci $F(x)$. Vzhledem k tomu, že hodnoty náhodného výběru pocházejí z téhož základního souboru, mají stejnou střední hodnotu a stejný rozptyl.

K charakterizaci náhodného výběru používáme charakteristik, které nazýváme výběrovými charakteristikami. Zmíníme se hlavně o dvou – výběrovém průměru a výběrovém rozptylu.

Výběrový průměr (aritmetický průměr) je definován jako

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_n x_i. \quad (1.23)$$

Střední hodnota výběrového průměru je μ , rozptyl je σ^2/n . Střední hodnota výběrového průměru je tedy stejná jako střední hodnota základního souboru, zatímco rozptyl výběrového průměru je roven n tině rozptylu rozdělení, z něhož pochází.

Výběrový rozptyl (odhad rozptylu) je definován vztahem

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \sum_n (x_i - \bar{x})^2 \quad (1.24)$$

nebo vztahem

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \left[\sum_n x_i^2 - \frac{1}{n} \left(\sum_n x_i \right)^2 \right]. \quad (1.25)$$

Podobně jako v případě výběrového průměru se dá dokázat, že očekávaná hodnota výběrového rozptylu je σ^2 .

Výběrová směrodatná odchylka, s , je druhá odmocnina výběrového rozptylu.

Srovnáme-li vztah pro výběrový rozptyl se vztahem pro výběrový druhý centrální moment

$$M_2 = \sum_n (x_i - \bar{x})^2 \quad (1.26)$$

vidíme, že druhý centrální moment $(n-1)$ krát větší než odhad rozptylu náhodného výběru. Připomínáme, že uvedené vztahy platí pro jakékoli rozdělení základního souboru.

Definujme si jednu důležitou charakteristiku, *Studentův poměr* T :

$$T = \frac{x - \mu}{s} \sqrt{n}. \quad (1.27)$$

Tato veličina má t -rozdělení o $(n-1)$ stupních volnosti.

Definujme ještě výběrový třetí a čtvrtý centrální moment náhodného výběru:

$$M_3 = \sum_n (x_i - \bar{x})^3 \quad (1.28)$$

$$M_4 = \sum_n (x_i - \bar{x})^4 \quad (1.29)$$

Potom výběrový koeficient *šikmosti* je určen rovnicí

$$A_3 = \frac{M_3}{\sqrt{M_2^3}} \quad (1.30)$$

a výběrový koeficient *špičatosti* rovnicí

$$B_4 = \frac{M_4}{M_2^2} \quad (1.31)$$

Obě výběrové charakteristiky používáme k testování typů rozdělení.

Rozpětí, R , je definované jako rozdíl mezi nejvyšší (x_n) a nejnižší (x_1) hodnotou jednotlivých výsledků v sérii měření:

$$R = x_n - x_1 \quad (1.32)$$

Z rozpětí můžeme vypočítat odhad směrodatné odchylky s :

$$s = k_n \cdot R \quad (1.33)$$

Hodnoty koeficientu k_n jsou tabelovány v běžných statistických tabulkách.

1.3 Nejistota výsledku

Podle terminologického slovníku VIM 3 [cit. 1] je nejistota definována jako

„nezáporný parametr charakterizující rozptýlení hodnot veličiny přiřazených měřené veličině na základě použité informace“.

V úvodu této kapitoly si nejprve vysvětlíme některé základní pojmy, které se k definici nejistoty vztahují. Základním informačním zdrojem pro všechny definice a vysvětlení některých důležitých pojmů je výše zmíněný metrologický slovník VIM 3.

Měření je proces experimentálního získávání jedné nebo více hodnot veličiny, které mohou být důvodně přiřazeny veličině. Měření v sobě obsahuje porovnání veličin a zahrnuje zjišťování počtu entit. Měření předem předpokládá popis veličiny přiměřený určenému použití výsledku měření, popis postupu měření a kalibrovaného měřicího systému pracujícího v souladu se specifikovaným postupem měření, včetně podmínek měření.

Měřená veličina (angl. *measurand*) je veličina, která má být měřena. Specifikace měřené veličiny vyžaduje znalost druhu veličiny, popis stavu jevu, tělesa nebo látky nesoucích veličinu, včetně jakékoliv relevantní složky a zahrnutých chemických entit. Měřená veličina je charakterizována hodnotou a příslušnou jednotkou měření. Příkladem měřené veličiny může být

- celkový obsah olova ve vzorku půdy (mg kg^{-1})
- koncentrace celkového cholesterolu v séru (mmol L^{-1})
- obsah alkoholu v krvi (mg g^{-1})
- obsah dioxinu (2,3,7,8-TCDBD) v mase ($\mu\text{g kg}^{-1}$)

V chemii se pro měřenou veličinu někdy používá termín „analyt“ nebo název sloučeniny. Takové použití je chybné, protože tyto výrazy neodkazují na veličiny.

Výsledek měření je definován jako soubor hodnot veličiny přiřazený měřené veličině společně s jakoukoliv další dostupnou relevantní informací (obvykle nejistota výsledku).

Nový metrologický slovník VIM 3 [cit. 1] zavedl tzv. „nejistotový“ přístup k měření a vyjadřování výsledků. V této publikaci se budeme tohoto principu důsledně držet. Na rozdíl od „chybového“ přístupu nevyžaduje nejistotový přístup odhad chyby (náhodné, systematické), pouze odhad nejistoty výsledku. K tomuto přístupu se váží další důležité pojmy.

Pravdivost měření (angl. *trueness*) je těsnost shody mezi aritmetickým průměrem nekonečného počtu opakovaných naměřených hodnot veličiny a referenční hodnotou veličiny. Pravdivost je kvalitativní pojem a nemůže být vyjádřena číselně. Míra těsnosti shody se nazývá *vychýlení* (angl. *bias*).

Preciznost měření (angl. *precision*) je těsnost shody mezi indikacemi (signály) nebo naměřenými hodnotami veličiny získaných *opakovanými* měřeními na stejném objektu za specifikovaných podmínek. Preciznost měření se zpravidla vyjadřuje výběrovou směrodatnou odchylkou nebo odhadem rozptylu za specifikovaných podmínek. Specifikovanými podmínkami mohou být např. podmínky opakovatelnosti, podmínky mezilehlé preciznosti nebo podmínky reprodukovatelnosti. Preciznost se používá pro definování některých validačních parametrů (viz další kapitoly).

Standardní nejistota, $u(x)$, je nejistota hodnoty veličiny x vyjádřená jako směrodatná odchylka.

Vyhodnocení nejistoty měření způsobem A je postup vyhodnocení složky nejistoty měření statistickou analýzou opakovaných naměřených hodnot veličiny získaných za definovaných

podmínek měření (opakovatelnost, mezilehlá preciznost, reprodukovatelnost). Výsledkem je standardní nejistota příslušné veličiny.

Vyhodnocení nejistoty měření způsobem B je postup vyhodnocení složky nejistoty měření stanovené jinými způsoby než vyhodnocením nejistoty měření způsobem A. Používají se přitom informace z kalibračních listů, certifikátů referenčních materiálů, údajů výrobce přístrojů, údajů v odborné literatuře apod. Výsledkem je standardní nejistota příslušné veličiny.

Nyní přistoupíme k výkladu o nejistotě výsledku. V mnoha případech analytických měření není měřená veličina (např. látkové množství daného analytu) měřena přímo, ale její hodnota se stanoví nepřímo pomocí hodnot jiných veličin prostřednictvím funkčního vztahu (*modelu měření*)

$$\psi = f(\xi_1, \xi_2, \dots, \xi_N), \quad (1.34)$$

ve kterém ψ je měřená veličina nabývající hodnot y , a kde ξ_1 až ξ_N jsou jiné veličiny, nabývající hodnot x_1 až x_N . V dalším textu budeme považovat hodnoty všech veličin za jejich odhady. Veličina ψ se nazývá *výstupní veličinou*, ξ_1 až ξ_N *veličinami vstupními*. Vstupní veličiny zahrnují i všechny korekce a korekční faktory, které přispívají k nejistotě výsledku měření. Pokud data indikují, že funkce f nevyjadřuje model měření dostatečně, musíme rozšířit vstupní veličiny o další členy. Informace můžeme získat např. z validační studie. Kromě znalosti hodnot vstupních veličin musíme znát i jejich standardní nejistoty.

Vstupní veličiny, x_1 až x_N , mohou být děleny na

- a) veličiny, jejichž hodnoty (odhad) a nejistoty (rovněž odhad) se stanovují přímo současným měřením (**způsob A**). Odhady hodnot a jejich nejistot lze získat jedním měřením, opakovaným měřením, nebo odhadem založeným na zkušenosti. Zahrnují rovněž korekce měřicích přístrojů, korekce na vliv okolního prostředí apod. Standardní nejistota se odhadne pomocí výběrové směrodatné odchylky opakovaných měření;
- b) veličiny, jejichž hodnoty a nejistoty se získávají z externích zdrojů (**způsob B**), jako jsou veličiny spojené s etalonem (standardem), certifikovaným referenčním materiálem nebo veličiny, jejichž hodnoty jsou převzaty z tabulek nebo manuálů výrobce přístrojů. Standardní nejistota se odhadne např. pomocí rovnoměrného rozdělení (viz další kapitolu).

Odhad hodnoty y veličiny ψ pomocí odhadů hodnot x_1 až x_N je dán rovnicí

$$y = f(x_1, \dots, x_N). \quad (1.35)$$

Kombinovaná standardní nejistota a zákon propagace nejistot

Vztah mezi kombinovanou standardní nejistotou $u(y)$ hodnoty y veličiny ψ a standardními nejistotami $u(x_i)$ hodnot x_i veličin ξ_i vychází ze zákona propagace nejistot:

- a) pro nezávislé veličiny x_i :

$$u(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^N c_i^2 u(x_i)^2}, \quad (1.36)$$

ve kterém $c_i = \frac{\partial f}{\partial x_i}$ je citlivost (selektivní koeficient) měřené hodnoty y vzhledem k hodnotám jednotlivých vstupních veličin. Jednotlivé citlivosti mohou být získány experimentálně. Je třeba připomenout, že uvedený vztah je vztahem aproximativním, ve kterém jsou vynechány členy s parciálními derivacemi vyšších řádů. V chemických měřeních je tato aproximace dostačující.

b) pro závislé veličiny x_i :

$$u(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^N c_i^2 u(x_i)^2 + 2 \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=i+1}^N c_i c_j u(x_i, x_j)} \quad (1.37)$$

nebo po zavedení odhadu korelačního koeficientu, r :

$$u(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^N c_i^2 u(x_i)^2 + 2 \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=i+1}^N c_i c_j u(x_i) u(x_j) r(x_i, x_j)} \quad (1.38)$$

Existují jednoduchá pravidla pro výpočet kombinované standardní nejistoty.

Pravidlo 1: Pro model měření, který zahrnuje pouze součet nebo rozdíl vstupních veličin, např.

$$y = k(x_1 + x_2 + x_3) \quad (k \text{ je konstanta}), \quad (1.39)$$

je kombinovaná standardní nejistota dána vztahem

$$u(y) = k \sqrt{u(x_1)^2 + u(x_2)^2 + u(x_3)^2} \quad (1.40)$$

Pravidlo 2: Pro model měření, který nazýváme multiplikativní:

$$y = k(x_1 \cdot x_2 \cdot x_3) \quad (k \text{ je konstanta}) \quad (1.41)$$

je kombinovaná nejistota dána vztahem

$$u(y) = y \cdot k \sqrt{\left(\frac{u(x_1)}{\bar{x}_1}\right)^2 + \left(\frac{u(x_2)}{\bar{x}_2}\right)^2 + \left(\frac{u(x_3)}{\bar{x}_3}\right)^2} \quad (1.42)$$

Kombinovaná rozšířená nejistota

Kombinovaná rozšířená nejistota určuje interval, ve kterém se s danou pravděpodobností dá předpokládat skutečná hodnota měřené veličiny. Kombinovaná rozšířená nejistota se odhaduje podle vztahu

$$U(y) = k \cdot u(y), \quad (1.43)$$

ve kterém k je koeficient rozšíření. Ve většině případů se hodnota koeficientu rozšíření volí rovna 2. Pokud v kombinované standardní nejistotě převládá jedna složka s malým počtem stupňů volnosti (např. $\nu < 6$), potom koeficient rozšíření můžeme zaměnit za kvantil t -rozdělení a pro danou hladinu významnosti α platí t -rozdělení, $t_{1-\alpha/2; \nu}$.

Presentace výsledku

Výsledek měření prezentujeme vždy ve tvaru:

výsledek = hodnota měřené veličiny \pm rozšířená nejistota (použitá hodnota k)

tedy
$$V = y \pm U(y) \quad (k = 2) \text{ [nebo: } (k = 3)] . \quad (1.44)$$

1.4 Nejistoty elementárních operací v chemické a biologické laboratoři

1.4.1 Volumetrické operace

Nejistoty volumetrických operací jsou řešeny v Metodickém listě EURACHEM-ČR [2]. Metodické listy jsou jako excelové soubory ke stažení na internetové adrese <http://www.eurachem.cz/metodicke-listy.php>.

1.4.2 Vážení

Při gravimetrických operacích se v chemické analýze uplatňují hlavně dvě složky nejistoty: nejistota spojená s opakováním gravimetrické operace (vážení) a nejistota spojená s kalibrací vah.

Nejistotu spojenou s opakovaným vážením získáme experimentálně (typ A). Opakovaně zvážíme (např. 15krát) závaží o určité hmotnosti, např. 20 g. Výběrová směrodatná odchylka takového pokusu je zároveň standardní nejistotou operace, $u(m_1)$. Při *diferenčním* vážení započítáváme tento příspěvek dvakrát.

Nejistotu spojenou s kalibrací vah lze rozdělit na tři příspěvky: nejistota linearity deklarovaná výrobcem, nejistota kalibrace způsobená odchylkou kalibrovaného závaží od nominální hodnoty a nejistota nominální hodnoty. Výrobce deklaruje odchylku od linearity jako toleranční limit, $\pm t$. Tato hodnota udává maximální odchylku mezi skutečnou hmotností na misce vah a hmotností odečítanou z displeje. Předpokládáme, že tolerance má rovnoměrné rozdělení a lze tedy převést toleranci na směrodatnou odchylku (typ B). Při *diferenčním* vážení započítáváme tento příspěvek dvakrát. Nejistotu nominální hodnoty závaží, $u(m_3)$, lze získat z kalibračního certifikátu po kalibraci závaží v Českém metrologickém institutu. Její příspěvek k celkové nejistotě je obvykle zanedbatelný.

1.4.3 Nejistota hodnoty měřeného signálu

Při měření jakéhokoliv signálu (absorbance, plocha píku, atd.) uvažujeme, že standardní nejistota hodnoty signálu se skládá ze tří příspěvků: pravdivosti, reprodukovatelnosti a opakovatelnosti hodnoty měřeného signálu, získaných z validace přístroje (typ A). První dva příspěvky bývají uvedeny v příručce k přístroji jako toleranční interval (typ B, rovnoměrné rozdělení). Následující příklad objasňuje odhad standardní nejistoty hodnoty měřeného signálu.

Příklad

Údaje výrobce přístroje:

pravdivost (trueness), přesnost (accuracy) 0,005 a.u.

reprodukovatelnost 0,005 a.u.

Validace přístroje:

opakovatelnost (n = 10) 0,0025 a.u.

$$u(\text{signál}) = \sqrt{\frac{0,005^2}{3} + \frac{0,005^2}{3} + 0,0025^2} = 0,004 \text{ a.u.}$$

Pokud údaje výrobce chybí, je standardní nejistota hodnoty měřeného signálu dána pouze opakovatelností. Připomínáme, že standardní nejistota hodnoty měřeného signálu může být závislá na hodnotě měřeného signálu, takže je třeba ji odhadnout v celém měřicím rozsahu. V tomto případě se doporučuje zjistit závislost nejistoty na hodnotě měřené veličině.

1.4.4 Titrační stanovení

Ukážeme si příklad stanovení látkové koncentrace EDTA (titr odměrného roztoku). Odvážené množství chloridu olovnatého se titruje odměrným roztokem EDTA na indikátor xylenolovou oranž. Koncentrace EDTA se vypočte podle vztahu:

$$c = \frac{m_{\text{PbCl}_2}}{M_{\text{PbCl}_2} \cdot V_{\text{kt}}},$$

ve kterém m_{PbCl_2} je hmotnost naváženého chloridu olovnatého, M_{PbCl_2} je molární hmotnost chloridu olovnatého, V_{kt} je objem EDTA spotřebovaný do konce titrace. Indikátorová chyba je zanedbatelná, což lze odhadnout s použitím rovnovážných údajů o titračním systému. Rovněž systematická chyba způsobená „nečistotou“ chloridu olovnatého je malá, což lze vysvětlit způsobem přípravy základní látky. Standardní nejistota hmotnosti se odhadne výše uvedeným postupem, standardní nejistotu spotřebovaného objemu můžeme odhadnout hodnotou 0,03 ml, což je přibližný objem kapky titračního činidla. Standardní nejistota molární hmotnosti chloridu olovnatého byla z tabulek odhadnuta na 0,05 g mol⁻¹ [3]. Kombinovaná standardní nejistota koncentrace EDTA se vypočte podle rovnice

$$u(c) = c \sqrt{\frac{[u(m_{\text{PbCl}_2})]^2}{(m_{\text{PbCl}_2})^2} + \frac{[u(V_{\text{kt}})]^2}{(V_{\text{kt}})^2} + \frac{[u(M_{\text{PbCl}_2})]^2}{(M_{\text{PbCl}_2})^2}}$$

Další příklady jsou uvedeny v přílohách na CD-ROM.

1.5 Vyhodnocování nejistot postupy „zdola nahoru“ a „shora dolů“

Postup „zdola nahoru“ (bottom up)

Při tomto způsobu vyhodnocení vycházíme z úplné rovnice měření. Pro výpočet nejistoty budeme používat Kragtenovo schéma vyhodnocení, které bylo publikováno např. v Kvalimetrii 11 [cit. 4]. Kragtenův způsob je založen na aproximaci zákona o propagaci nejistot.

Zákon o propagaci nejistot:

$$u(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^N c_i^2 u(x_i)^2} \quad (1.45)$$

kde

$$c_i = \frac{\partial y}{\partial x_i} \quad (1.46)$$

Parciální derivace můžeme aproximovat vztahem

$$\frac{\partial y}{\partial x_i} \cong \frac{y[x_i + u(x_i)] - y(x_i)}{u(x_i)} \quad (1.47)$$

a dílčí příspěvek jednotlivé vstupní veličiny x_i k celkové nejistotě aproximovat vztahem

$$u(y, x_{ii}) = y\{x_1, x_2, \dots, [x_i + u(x_i)], \dots, x_N\} - y(x_1, x_2, \dots, x_i, \dots, x_N) \quad (1.48)$$

Na základě této aproximace je vytvořen algoritmus výpočtu v souboru kragten_vysvetleni.xls:

1. navrhnout model měření $y = f(x_i)$, $i = 1, \dots, p$ (p je počet vstupních veličin),
2. vložit hodnoty vstupních veličin a jejich standardních nejistot do sloupců,
3. zkopírovat sloupec hodnot do matice $p \times p$ pomocí F4 (\$ před označením sloupce),
4. diagonální prvky matice zvětšit o standardní nejistotu příslušné veličiny,
5. vypočítat výstupní veličinu pod sloupcem původních hodnot,
6. zkopírovat vzorec (model měření) do řádků pod maticí,
7. vypočítat difference hodnoty výstupní veličiny nezměněné a změněné,
8. vypočítat druhé mocniny diferencí,
9. vypočítat sumu mocnin diferencí,
10. odmocnina ze sumy je kombinovaná standardní nejistota,
11. vypočítat příspěvky jednotlivých veličin k celkové nejistotě.

Postup „shora dolů“ (top down)

Při tomto způsobu vycházíme z předpokladu, že největšími příspěvky k celkové nejistotě je vnitrolaboratorní reprodukovatelnost, vyjádřená směrodatnou odchylkou s_{repro} a vychýlení, reprezentující pravdivost výsledku. Oba parametry se získají při validaci postupu měření. Kombinovaná nejistota se počítá podle rovnice

$$u(y) = y \sqrt{(s_{\text{repro}})_{\text{rel}}^2 + u(\mathbf{B})_{\text{rel}}^2}, \quad (1.49)$$

ve kterém je B vychýlení.

1.6 Testy hypotéz

Testování hypotéz je důležitou součástí interpretace výsledků měření. Postup spočívá v tom, že nejprve vytvoříme tzv. nulovou hypotézu, tj. hypotézu, že studovaný soubor (resp. jeho charakteristický parametr) má určitou očekávanou vlastnost. Jsou to obvykle hypotézy o základních parametrech rozdělení pravděpodobnosti měřené veličiny. Hypotézy vždy testujeme na určité hladině významnosti α , obvykle volíme hodnotu $\alpha = 0,05$. Tradiční, klasický způsob testování hypotéz vychází pouze z dat získaných opakovaným měřením. Je to však způsob velice ilustra-

tivní a slouží i k pochopení testování hypotéz datových souborů, u kterých známe nejistotu měření.

1.6.1 Statistika opakovaných pokusů

Testy hypotéz pro opakované pokusy neberou v úvahu nejistotu výsledku. Mírou proměnlivosti je pouze výběrová směrodatná odchylka opakovatelnosti nebo reprodukovatelnosti. Vstupními hodnotami pro všechny testy jsou hodnoty některých charakteristik výběru: aritmetický průměr \bar{x} , směrodatná odchylka výběru, s , rozsah měření, n , kvantily t - a F -rozdělení pro určitý počet stupňů volnosti a hladinu významnosti α .

Test hypotézy $H_0: \mu = \mu_0$

Testujeme hypotézu, že střední hodnota náhodné veličiny nabývá určité hodnoty. Hypotéza H_0 platí, když je hodnota μ_0 uvnitř oboustranného intervalu spolehlivosti L_{12} :

$$L_{12} = \bar{x} \pm t_{1-\alpha/2; (n-1)} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (1.50)$$

Test hypotézy $H_0: \mu < \mu_0$

Testujeme hypotézu, že střední hodnota náhodné veličiny nabývá hodnot menších než je určitá hodnota. Hypotéza H_0 platí, jestliže hodnota μ_0 je uvnitř jednostranného intervalu $\langle L_1; \infty \rangle$. Interval L_1 se vypočte podle rovnice

$$L_1 = \bar{x} - t_{1-\alpha; (n-1)} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (1.51)$$

Test hypotézy $H_0: \mu > \mu_0$

Testujeme hypotézu, že střední hodnota náhodné veličiny nabývá hodnot větších než je určitá hodnota. Hypotéza H_0 platí, jestliže hodnota μ_0 je uvnitř jednostranného intervalu $\langle -\infty; L_2 \rangle$. Interval L_2 se vypočte podle rovnice

$$L_2 = \bar{x} + t_{1-\alpha; (n-1)} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (1.52)$$

Testování hypotézy $H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2$

Testujeme hypotézu, že rozptyly dvou náhodných veličin jsou shodné. Hypotéza H_0 platí, jestliže vypočtená hodnota $F \leq F_{1-\alpha/2; v_{\text{čít}}; v_{\text{jmen}}}$, $v_{\text{čít}}$ je počet stupňů volnosti v čitateli vztahu pro výpočet F , v_{jmen} je počet stupňů volnosti ve jmenovateli stejného vztahu:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad \text{pro } s_1 > s_2 \quad (1.53)$$

nebo

$$F = \frac{s_2^2}{s_1^2} \quad \text{pro } s_2 > s_1 \quad (1.54)$$

Test hypotézy $H_0: \mu_1 = \mu_2$

Testujeme hypotézu, že střední hodnoty dvou nezávislých náhodných veličin jsou shodné za předpokladu shodnosti rozptylů. Před testem této hypotézy musíme provést test hypotézy $\sigma_1^2 = \sigma_2^2$.

Mějme hodnoty aritmetických průměrů a výběrových směrodatných odchylek dvou nezávislých souborů: $\bar{x}_1; s_1; \bar{x}_2; s_2$. Za předpokladu platnosti hypotézy $\sigma_1^2 = \sigma_2^2$ platí pro odhad společné výběrové směrodatné odchylky

$$s = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \cdot s_1^2 + (n_2 - 1) \cdot s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}} . \quad (1.55)$$

Hypotéza H_0 platí, když vypočtená hodnota $T < t_{1-\alpha/2; (n_1 + n_2 - 2)}$

$$T = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} . \quad (1.56)$$

1.6.2 Testování hypotéz s použitím nejistoty výsledku

Předpokladem vhodnosti těchto testů je znalost standardní kombinované nejistoty výsledku. Ve všech testech je u standardní kombinované nejistota a U je rozšířená nejistota $U = k \cdot u$. Pro 5% hladinu významnosti volíme $k = 2$.

Test hypotézy $H_0: \mu = \mu_0$

Hypotéza H_0 platí, když

$$\frac{|x - \mu_0|}{u} \leq 1,96 \quad (x \text{ je výsledek měření}) \quad (1.57)$$

Test hypotézy $H_0: \mu < \mu_0$

Hypotéza H_0 platí, když

$$x \leq (\mu_0 + 1,64u) \quad (x \text{ je výsledek měření}) \quad (1.58)$$

Test hypotézy $H_0: \mu > \mu_0$

Hypotéza platí, když

$$x \geq (\mu_0 - 1,64u) \quad (x \text{ je výsledek měření}) \quad (1.59)$$

Test hypotézy $H_0: \mu_1 = \mu_2$

Hypotéza platí, když

$$\frac{|x_1 - x_2|}{\sqrt{u_1^2 + u_2^2}} \leq 1,96 \quad (1.60)$$

(x_1 a x_2 jsou výsledky měření dvou nezávislých souborů, u_1 a u_2 jsou příslušné standardní kombinované nejistoty).

1.7 Příklady ke kapitole 1

<i>excel_syntaxe.pdf</i>	obsahuje vysvětlení některých funkcí v programu MS-Excel
<i>hypotezy_1.xls</i>	obsahuje řešené příklady testování hypotéz
<i>hypotezy_2.xls</i>	obsahuje řešené příklady testování hypotéz
<i>kragten_vysvetleni.xls</i>	obsahuje vysvětlení výpočtu nejistot podle Kragtena
<i>spreadsheet36.xls</i>	obsahuje šablony pro výpočet nejistot podle Kragtena pro 3-6 vstupních veličin (anglická verze)
<i>vazeni.xls</i>	obsahuje řešený příklad výpočtu nejistoty při gravimetrickém stanovení železa
<i>molarni_hmotnosti.xls</i>	obsahuje řešené příklady výpočtu nejistot molárních hmotností sloučenin
<i>mohrova_sul_konc.xls</i>	obsahuje řešený příklad výpočtu koncentrace a nejistoty roztoku Mohrovy soli
<i>zakladni_operace.xls</i>	obsahuje řešené příklady výpočtu nejistot některých základních operací: opakovatelnost, nejistota instrumentálního signálu, nejistota volumetrických operací
<i>nejistoty_kalibracnich_roztoku.xls</i>	obsahuje šablonu pro výpočet koncentrace pěti kalibračních roztoků postupným ředěním standardního roztoku
<i>titrace_1.xls</i>	obsahuje řešený příklad odměrného manganometrického stanovení peroxidu vodíku
<i>titrace_2.xls</i>	obsahuje řešený příklad odměrného chelatometrického stanovení Ni
<i>fotometrie.xls</i>	obsahuje řešený příklad stanovení Mn fotometricky
<i>nejistoty_top down.xls</i>	obsahuje šablonu pro výpočet nejistoty měřicího postupu metodou „shora dolů“

2 Optimalizace měřicích postupů v chemii a biologických vědách

2.1 Plánování experimentů

Chceme-li najít optimální podmínky měřicích postupů, musíme nejprve zjistit, které faktory statisticky významně ovlivňují hodnotu závisle proměnné veličiny. Závisle proměnnou veličinou bývá obvykle fyzikální (instrumentální) signál. Faktory, které hodnotu závisle proměnné veličiny ovlivňují, budeme považovat za nezávisle proměnné veličiny. Faktory mohou být kvantitativní (koncentrace, teplota, tlak) nebo kvalitativní (druh metody, způsob technologického řešení). Cílenou kombinaci všech faktorů podle určitého schématu nazýváme *plán experimentu*. Jednou z metod, kterými zjišťujeme statistickou významnost působení faktorů na hodnotu závisle proměnné veličiny, je metoda *analýzy rozptylu*.

Analýza rozptylu

Definujme některé základní pojmy. Faktory značíme velkými písmeny latinské abecedy, tedy A, B, C atd. Hodnotám, kterých jednotlivé faktory mohou nabývat, říkáme úrovně faktorů. Tak např. budeme-li sledovat vliv teploty na výtěžek technologického procesu při dvou teplotách 25 °C a 50 °C, říkáme, že vliv teploty sledujeme na dvou úrovních. Nižší úroveň označíme indexem 1 a vyšší úroveň indexem 2. Studujeme-li vliv většího množství faktorů při více úrovních každého z faktorů, říkáme kombinacím úrovní všech faktorů *postupy*. Např. při studiu vlivu 3 faktorů A, B, C, které jsou na úrovních A₁, A₂, B₁, B₂, C₁, C₂, C₃, budou některé z postupů A₁B₁C₁, A₂B₁C₃ apod. Postupy mohou být s jedním nebo více opakováními. Při experimentálním provedení je zajímavé, že ačkoli musíme pečlivě nastavovat hodnoty úrovní jednotlivých faktorů a držet je při experimentu neměnné, při statistickém zpracování se hodnoty těchto faktorů nepoužívají (viz dále). Úrovně jednotlivých faktorů jsou ve statistickém modelu vlastně normalizovány na hodnoty 0, ±1, ±2 atd.

Matematický model analýzy rozptylu vyjádříme takto:

Mějme n signálů náhodné veličiny, y_1, \dots, y_n , které jsou lineární funkcí parametrů (počet p) a náhodných chyb e_1, \dots, e_n . Parametry ztotožníme s faktory. Model má potom tvar:

$$y_i = \sum_p x_{ji} \beta_j + e_i \quad (2.1)$$

($i = 1, \dots, n$; $j = 1, \dots, p$), kde x_{ji} jsou pevné konstanty (zpravidla 0, ±1, ±2, atd.), β_j jsou tzv. efekty faktorů, které mohou být odhadnuty regresní analýzou. O náhodných chybách předpokládáme, že mají nulovou střední hodnotu, všechny stejný rozptyl, jsou nekorelované a mají normální rozdělení.

Celková proměnlivost výsledků, S , je dána součtem čtverců odchylek jednotlivých pozorování od celkového aritmetického průměru:

$$S = \sum_n (y_i - \bar{y})^2 \quad (2.2)$$

Analýza rozptylu spočívá v rozdělení celkové proměnlivosti na složky příslušející jednotlivým faktorům a tzv. reziduální proměnlivosti, která odpovídá náhodným chybám. F-Testem potom zjistíme statistickou významnost jednotlivých složek celkového rozptylu a tím i vliv jednotlivých faktorů na hodnotu závisle proměnné veličiny.

Plán experimentu pro jeden faktor a analýza rozptylu

Uvažujme experiment, v němž je vyšetřován vliv jednoho faktoru, např. A, který bude sledován na I úrovních ($I > 2$). Při každé úrovni provedeme stejný počet opakování měření závisle proměnné veličiny (vyvážený plán), r, přičemž pro celkový počet pokusů n platí

$$n = r \cdot I \quad (2.3)$$

Výsledky pokusů tvoří tzv. experimentální matici (viz tabulku 2.1), jejíž obecný člen označíme y_{iv} , kde v je počet opakování měření signálu na *ité* úrovni.

Tabulka 2.1. Experimentální plán pro jeden faktor

Faktor	Opakování			
A_1	y_{11}	y_{12}	...	y_{1r}
...
A_i	y_{i1}	y_{i2}	y_{iv}	y_{ir}
...
A_I	y_{I1}	y_{I2}	...	y_{Ir}

Pro *i*-tou úroveň můžeme model pro analýzu rozptylu vyjádřit vztahem:

$$y_{iv} = \mu + \alpha_i + e_{iv} \quad (2.4)$$

ve kterém μ je střední hodnota závisle proměnné pro všechny úrovně, neboť experimentální matici si můžeme představit jako náhodný výběr ze základního souboru. Parametr α_i je vliv faktoru A na *ité* úrovni.

Definujme si nyní pomocné mezisoučty v experimentální matici:

$$Y_{..} = \sum_I \sum_r y_{iv} \quad (2.5)$$

$$Y_{i.} = \sum_r y_{iv} \quad (2.6)$$

Odhady parametrů jsou potom vyjádřeny rovnicemi

$$\begin{aligned}\hat{\mu} &= \frac{Y_{..}}{n} \\ \hat{\alpha} &= \frac{Y_{i.}}{r} - \hat{\mu} \\ e_{iv} &= y_{iv} - \frac{Y_{i.}}{r}\end{aligned}\tag{2.7}$$

Nyní budeme testovat hypotézu, že vlivy faktoru A na všech úrovních jsou stejné (a zároveň nulové), tedy hypotézu H_0 :

$$\alpha_1 = \alpha_2 = \dots = \alpha_r = 0$$

proti alternativní hypotéze H_A :

$$\sum_{i=1}^r \alpha_i^2 > 0$$

Celkovou proměnlivost experimentální matice, S , můžeme rozdělit na část odpovídající vlivu faktoru A, S_A , a část odpovídající reziduální proměnlivosti, S_r :

$$S = S_A + S_r.\tag{2.8}$$

Nulová hypotéza se dá potom vyjádřit takto:

$$H_0 : \sigma_A^2 \leq \sigma_r^2$$

kde σ_A^2 je rozptyl odpovídající proměnlivosti vyšetřovaného faktoru A, σ_r^2 je rozptyl odpovídající reziduální proměnlivosti.

Testovací kritérium F je potom vyjádřeno rovnicí:

$$F = \frac{\frac{S_A}{I-1}}{\frac{S_r}{n-I}},\tag{2.9}$$

ve kterém

$$S_A = \frac{1}{r} - \frac{1}{n} Y_{..}^2,\tag{2.10}$$

$$S_r = \sum_I \sum_r y_{iv}^2 - \frac{1}{r} \sum_I Y_{i.}^2\tag{2.11}$$

Hodnotu F srovnáváme s $F_{1-\alpha, (I-1; n-I)}$. Odhad rozptylu měřené veličiny vypočteme z reziduální proměnlivosti:

$$s^2 = S_r / (n - I).\tag{2.12}$$

Faktoriální experimenty a analýza rozptylu

V případě, že vyšetřujeme vliv více faktorů, bude model pro analýzu rozptylu vyjádřen vztahem, například pro dva faktory A, B,

$$y_{ijv} = \mu + \alpha_i x_{1i} + \beta_j x_{2j} + \alpha_i \beta_j x_{1i} x_{2j} + e_{ijv}, \quad (2.13)$$

takže faktor A vyšetřujeme na I a faktor B na J úrovních ($i = 1, 2, \dots, I; j = 1, 2, \dots, J$). Součinu $\alpha_i \beta_j$ říkáme interakce faktorů.

Z ekonomického i časového hlediska je výhodné pracovat na dvou úrovních pro každý faktor ($I = J = 2$). Experimentální plány v takovém případě značíme 2^N , kde N je počet vyšetřovaných faktorů. Při tomto typu pokusů měříme závisle proměnnou veličinu při všech kombinacích faktorů, takže celkový počet pokusů je dán hodnotou $r \cdot 2^N$, kde r je počet opakování každého měření, stejný pro všechny postupy. Jednotlivým kombinacím úrovní studovaných faktorů říkáme postupy a podle zavedené Yatesovy symboliky [5] je označujeme kombinací malých písmen. Tak např. pro dva faktory A, B máme tyto postupy (v závorce je uvedeno značení postupů): $A_1 B_1$ (-1), $A_1 B_2$ (b), $A_2 B_1$ (a), $A_2 B_2$ (ab). Z uvedeného příkladu je zřejmé, že při označení postupu použijeme malé písmeno k označení faktoru, který je na vyšší úrovni. Z experimentálně zjištěných hodnot závisle proměnné veličiny při všech postupech vypočteme součty čtverců odchylek odpovídající vlivu jednotlivých faktorů na výsledek, součty čtverců odchylek odpovídající interakcím faktorů, tj. spolupůsobení kombinace faktorů na výsledek pokusu, a reziduální rozptyl. Test významnosti je založen na F-testu, tzn. na porovnání rozptylů odpovídajících vlivu jednotlivých faktorů a reziduálního rozptylu.

Uveďme si příklad experimentální matice faktoriálního pokusu $2 \cdot 2^3$:

Tabulka 2.2. Experimentální matice faktoriálního pokusu $2 \cdot 2^3$

C ₁				C ₂			
B ₁		B ₂		B ₁		B ₂	
A ₁	A ₂	A ₁	A ₂	A ₁	A ₂	A ₁	A ₂
y ₁₁	y ₂₁	y ₃₁	y ₄₁	y ₅₁	y ₆₁	y ₇₁	y ₈₁
y ₁₂	y ₂₂	y ₃₂	y ₄₂	y ₅₂	y ₆₂	y ₇₂	y ₈₂
(-1)	a	b	ab	c	ac	bc	abc

Yatesovo značení pokusů vyjadřuje v tomto případě součet jednotlivých hodnot pokusů, Y_i .

Proměnlivost odpovídající vlivu jednotlivých faktorů a interakcí, P, je dána vztahem

$$S_p = \frac{[P]^2}{r \cdot 2^N}, \quad (2.14)$$

kde [P] je algebraický součet hodnot jednotlivých pokusů, resp. jejich součtu (viz experimentální matici). Znaménka jednotlivých členů součtu nalezneme pomocí *znaménkového schématu* (viz tabulku 2.3). Vypočtená proměnlivost má jeden stupeň volnosti.

Tabulka 2.3. Znaménkové schéma pro faktoriální pokus 2^3

Efekt	Postup							
	(-1)	a	b	ab	c	ac	bc	abc
A	-	+	-	+	-	+	-	+
B	-	-	+	+	-	-	+	+
AB	+	-	-	+	+	-	-	+
C	-	-	-	-	+	+	+	+
AC	+	-	+	-	-	+	-	+
BC	+	+	-	-	-	-	+	+
ABC	-	+	+	-	+	-	-	+

Uvedené znaménkové schéma můžeme používat i pro působení dvou faktorů. Neuvádíme znaménkové schéma pro působení více než tří faktorů, neboť pro vyšetřování vlivu takového počtu faktorů se používají jiné experimenty, tzv. krácené faktoriální experimenty. Podle našich zkušeností z používání faktoriálních pokusů vystačíme většinou s 2–3 faktory.

Vysvětlíme si použití znaménkového schématu ve faktoriálním pokusu 2^3 . Pro výpočet proměnlivosti odpovídající vlivu faktoru A dostaneme pro [A]

$$[A] = -(-1) + a - b + ab - c + ac - bc + abc$$

pro [B]

$$[B] = -(-1) - a + b + ab - c - ac + bc + abc$$

a např. pro [AC]

$$[AC] = +(-1) - a + b - ab - c + ac - bc + abc .$$

Připomínáme, že do těchto vztahů dosazujeme za jednotlivé postupy hodnoty závisle proměnné veličiny. Pokud máme více opakování ($r > 1$), dosazujeme součet hodnot závisle proměnné veličiny pro všechna opakování.

Odhad rozptylu s^2 pro N faktorů se vypočte z rovnice

$$s^2 = \frac{S_r}{2^N(r-1)} , \quad (2.15)$$

kde

$$S_r = \sum_{2^N} \sum_r y_{ir}^2 - \frac{1}{r} \sum_{2^N} Y_i^2 . \quad (2.16)$$

Odhad rozptylu má $2^N(r-1)$ stupňů volnosti.

Vypočtenou hodnotu F_p

$$F_p = \frac{S_p}{s^2} \quad (2.17)$$

porovnáváme obvyklým způsobem s tabelovanou hodnotou $F_{1-\alpha, [(1; 2^N)_{(r-1)}]}$.

2.2 Experimentální optimalizace

Pro optimalizaci je výhodné formulovat závislost analytického signálu na hodnotách významných faktorů. Zmíněné faktoriální pokusy (str. 25) nám skýtají příležitost aproximace rovinou podle rovnice

$$Y_{\text{reg}} = b_0 + b_1 x_1 + \dots + b_N x_N , \quad (2.18)$$

ve které jsou veličiny x normalizované hodnoty významných faktorů. Koeficienty b se vypočtou podle vztahů

$$b_0 = \sum_{2^N} y_i \quad (2.19)$$

$$b_j = \sum_{2^N} x_{ji} y_i , \quad (2.20)$$

kde y_i jsou průměrné hodnoty Y_i .

Vzhledem k tomu, že je výhodnější znát koeficienty regresního vztahu v původních proměnných x_{puv} , můžeme přepočítat normalizované hodnoty na původní podle vztahů

$$\Delta_{1/2} = (x_{\text{max}} - x_{\text{min}})/2 \quad (2.21)$$

$$x_{\text{stred}} = (x_{\text{max}} + x_{\text{min}})/2 \quad (2.22)$$

$$x_{\text{puv}} = x \Delta_{1/2} + x_{\text{stred}} , \quad (2.23)$$

x_{max} je hodnota faktoru na vyšší úrovni, x_{min} je hodnota faktoru na nižší úrovni.

Rovnice výsledkové (odezvové, response surface) plochy, v našem případě roviny, můžeme použít v některé z optimalizačních metod. Optimalizační metody jsou vesměs založeny na znalosti velikosti a směru gradientu výsledkové plochy, který má pro rovnici roviny tvar

$$\mathbf{grad} Y = b_1 dx_1 + b_2 dx_2 + \dots + b_N dx_N , \quad (2.24)$$

kde dx_i jsou jednotkové vektory ve směru os významných faktorů.

Pokud chceme znát rovnici výsledkové plochy v okolí maxima (minima) této plochy, musíme použít jiný experimentální plán, který umožňuje odhadnout rovnici plochy vyššího řádu.

Ukažme si uvedený případ pro experimentální plán 3^2 , ve kterém jsou dva významné faktory na třech úrovních.

Proměnné x (faktory) transformujeme do úrovní $-1, 0, +1$. Rovnice plochy odezvy je dána rovnicí

$$\eta = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2 . \quad (2.25)$$

Experimentální matice má tvar

Bod	Úrovně faktorů		Výsledek
	x_1	x_2	y
1.	-1	-1	y_1
2.	-1	0	y_2
3.	-1	+1	y_3
4.	0	-1	y_4
5.	0	0	y_5
6.	0	+1	y_6
7.	+1	-1	y_7
8.	+1	0	y_8
9.	+1	+1	y_9

Odhady koeficientů β_i regresní rovnice jsou veličiny

$$b_1 = (1/6)(-y_1 - y_2 - y_3 + y_7 + y_8 + y_9) \quad (2.26)$$

$$b_2 = (1/6)(-y_1 + y_3 - y_4 + y_6 - y_7 + y_9) \quad (2.27)$$

$$b_{11} = (1/6)(y_1 + y_2 + y_3 - 2y_4 - 2y_5 - 2y_6 + y_7 + y_8 + y_9) \quad (2.28)$$

$$b_{22} = (1/6)(y_1 - 2y_2 + y_3 + y_4 - 2y_5 + y_6 + y_7 - 2y_8 + y_9) \quad (2.29)$$

$$b_{12} = (1/4)(y_1 - y_3 - y_7 + y_9) \quad (2.30)$$

$$b_0 = (1/n)\sum y_i - (2/3)(b_{11} + b_{22}) \quad (2.31)$$

Regresní rovnice plochy odezvy má tvar

$$Y_{\text{reg}} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2 \quad (2.32)$$

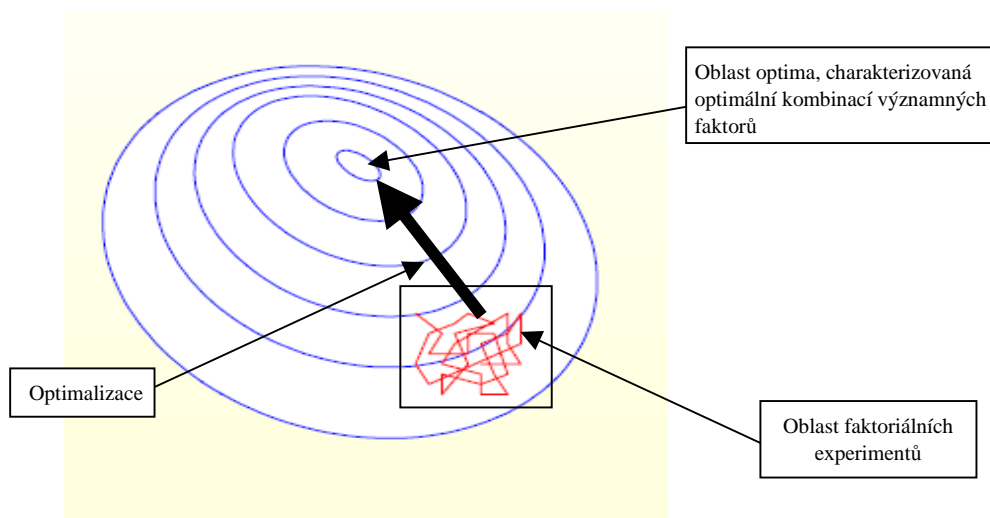
Maximum (minimum) funkce popisující plochu odezvy nazýváme stacionárním bodem a vypočteme ho řešením rovnic pro x_1 a x_2

$$\frac{\partial Y_{\text{reg}}}{\partial x_1} = 0 \quad \text{a} \quad \frac{\partial Y_{\text{reg}}}{\partial x_2} = 0 \quad (2.33)$$

Simplexová metoda

Pomocí analýzy rozptylu experimentálních hodnot závisle proměnné veličiny určíme, které z původně uvažovaných faktorů významně ovlivňují závisle proměnnou veličinu. Dále je třeba zjistit optimální kombinaci hodnot významných faktorů, tj. nalézt oblast, ve které má závisle proměnná veličina z hlediska použití analytického postupu „nejlepší“ hodnotu. Může to být například nejvyšší absorbance roztoku, nejkratší doba nebo nejnižší náklady na analýzu apod.

Možný tvar výsledkové plochy (plochy odezvy) znázorňuje obrázek 2.1.



Obrázek 2.1. Možný tvar výsledkové plochy a optimalizace

Pro nalezení optimálních podmínek můžeme použít řady metod, které byly vypracovány pro aplikace v jiných oblastech přírodních nebo ekonomických věd. Pro experimentální optimalizaci v chemii je nejvhodnější tzv. *simplexová metoda*, která je velmi jednoduchá a rychle vede k nalezení optima. Principem metody je pohyb experimentálně zjištěného bodu v N-rozměrném faktorovém prostoru (N je počet významných faktorů) ve směru největšího gradientu závisle proměnné veličiny. Souřadnice bodu jsou dány hodnotami významných faktorů.

Experimentální plán simplexové metody spočívá v numerickém sestrojení pravidelného N-rozměrného tělesa (simplexu), které má N + 1 vrcholů, a v postupném sestrojování dalších simplexů, které se vytvářejí podle určitých pravidel. V počátečním simplexu změříme hodnotu závisle proměnné veličiny ve všech vrcholech tělesa a rozhodneme, která je nejhorší, tj. která má nejnižší (nejvyšší) hodnotu signálu. K nejhoršímu vrcholu numericky sestrojíme zrcadlový obraz, takže vznikne nový simplex, který má s předchozím společné všechny vrcholy kromě jednoho. V tomto novém vrcholu opět změříme hodnotu závisle proměnné a znovu rozhodneme, který vrchol má nejhorší hodnotu závisle proměnné veličiny. Postupujeme tak dlouho, až nalezneme optimum.

Při volbě počátečního simplexu postupujeme takto:

Ve faktoriálním pokusu 2^N , který musí předcházet simplexové metodě, přiřadíme nižší úrovni faktorů hodnotu 0 a vyšší úrovni hodnotu 1 podle vztahu

$$x_{j,n} = \frac{x_j - x_{\min}}{x_{\max} - x_{\min}}, \quad (2.34)$$

ve kterém $x_{j,n}$ je normalizovaná hodnota faktoru, x_j je skutečná hodnota faktoru, x_{\max} a x_{\min} jsou maximální a minimální hodnoty jednotlivých faktorů (vyšší a nižší úrovně).

Volbu N + 1 vrcholů počátečního simplexu provádíme podle následující tabulky 2.3, ve které jsou uvedeny normalizované hodnoty pro 4 sledované faktory.

Tabulka 2.3. Volba počátečního simplexu

Faktory	A	B	C	D
1. vrchol	0	0	0	0
2. vrchol	1	0	0	0
3. vrchol	0,5	0,866	0	0
4. vrchol	0,5	0,289	0,817	0
5. vrchol	0,5	0,289	0,204	0,791

Po sestavení počátečního simplexu se opět vrátíme ke skutečným hodnotám jednotlivých faktorů a další postup simplexu probíhá v původním souřadnicovém systému.

Postup bodu lze vektorově vyjádřit vztahem

$$\mathbf{P}_j^* = 2\mathbf{P}_. - \mathbf{P}_j \quad (2.35)$$

kde

$$\mathbf{P}_. = (1/N)(\mathbf{P}_1 + \mathbf{P}_2 + \dots + \mathbf{P}_{j-1} + \mathbf{P}_{j+1} + \dots + \mathbf{P}_{N+1}) \quad (2.36)$$

\mathbf{P}_j je souřadnice nejhoršího bodu a \mathbf{P}_j^* je nová souřadnice.

Vzhledem k tomu, že každý vektor se skládá ze složek podél jednotlivých os, platí předchozí rovnice také pro složky vektoru na jednotlivých osách.

Postup bodu se uskutečňuje po každém měření závisle proměnné veličiny.

Algoritmus postupu bodu ve faktorovém prostoru:

1. Nový vrchol se počítá podle uvedených rovnic pro každou osu.
2. Jestliže má nový vrchol v novém simplexu opět nejhorší hodnotu signálu, vrátíme se zpět k předchozímu simplexu a vyloučíme druhý nejhorší bod.
3. Jestliže nějaký vrchol zůstává v $N + 1$ postupných simplexech, nalézáme se v okolí optima nebo jsme při měření závisle proměnné veličiny udělali hrubou chybu. Musíme proto znovu v tomto vrcholu změřit hodnotu závisle proměnné.

2.3 Příklady ke kapitole 2

<i>anova_jednofak.xls</i>	obsahuje šablonu a řešený příklad jednofaktoriální analýzy rozptylu
<i>anova.xls</i>	obsahuje šablony pro analýzu rozptylu typu 2^2 a 2^3
<i>simplex_1.xls</i>	řešený příklad pro procvičování algoritmu simplexu

3 Hodnocení závislosti mezi proměnnými

V laboratorní i technologické praxi nastává velmi často případ, kdy jsou jedna či více měřených veličin závislé na jiných, experimentálně zjištěných veličinách. Znázorníme-li graficky tuto závislost, např. pro dvě veličiny x , y , dostaneme tzv. *korelační diagram*, který je grafickým zobrazením funkce $y = f(x)$, popř. $x = f(y)$. Vzhledem k tomu, že se obě veličiny získaly měřením, můžeme obvykle rozhodnout, která z nich je veličinou nezávisle a která závisle proměnnou.

V dalším výkladu budeme předpokládat, že

- existuje vztah mezi závisle proměnnou veličinou (veličinami) a nezávisle proměnnou veličinou (veličinami),
- nezávisle proměnné veličiny nejsou zatíženy systematickými či náhodnými chybami, nebo náhodné chyby těchto veličin jsou zanedbatelné vůči náhodným chybám, kterými jsou zatíženy závisle proměnné veličiny,
- rozdělení závisle proměnné je normální,
- jednotlivé hodnoty závisle proměnné veličiny jsou získány nezávislým měřením.

Metody, kterými zjišťujeme matematické vyjádření funkčního vztahu mezi měřenými veličinami, nazýváme metodami *regresní analýzy*. Při regresní analýze nejprve formulujeme tvar funkční závislosti mezi proměnnými. Funkční závislost obsahuje, kromě známých veličin (nezávisle a závisle proměnná) ještě tzv. parametry, které funkční vztah charakterizují. Model může být buď lineární nebo nelineární v parametrech. Je-li model lineární v parametrech, platí pro vztah mezi závisle a nezávisle proměnnými rovnice

$$y = \beta_1 f_1 + \beta_2 f_2 + \dots + \beta_p f_p, \quad (3.1)$$

kde $f_i = f_i(x_1, x_2, \dots, x_k)$ je známou funkcí nezávisle proměnných neobsahující parametry β_i . Tak např. pro regresní přímku

$$y = \beta_0 + \beta_1 x \quad (3.2)$$

je $f_1 = 1$ a $f_2 = x$.

3.1 Lineární regrese

Lineární regresi (LR) tradičně používáme pro vyhodnocování kalibračních experimentálních dat. Je třeba připomenout, že použití lineární regrese je omezeno podmínkou malé nebo nulové nejistoty na ose x (koncentrační osa), resp. zanedbatelné velikosti nejistot na ose x vzhledem k ose y (osa signálů, indikací). Další podmínkou je homoskedasticita (rovnost rozptylů) závisle proměnné veličiny (signály) v celém kalibračním rozsahu.

Kalibrační křivka

Kalibrace metody je v analytickém procesu stěžejní záležitost. Většina metod vyžaduje kalibraci s pomocí standardů různé úrovně. Hlavním smyslem je nalézt vztah mezi experimentálně zjištěnými veličinami, tj. závisle a nezávisle proměnnými. V této příručce budeme respektovat novou definici kalibrace, která je uvedena v novém metrologickém slovníku, známém pod názvem VIM 3 [cit. 1, § 2.39]:

„kalibrace je činnost, která za specifikovaných podmínek v prvním kroku stanoví vztah mezi **hodnotami veličiny s nejistotami měření** poskytnutými **etalony (standardy)** a odpovídajícími **indikacemi** s přidruženými nejistotami měření a ve druhém kroku se použijí tyto informace ke stanovení vztahu pro získání **výsledku měření** z indikace“.

V definici se indikacemi míní hodnota analytického signálu.

Matematicko-statistické vyhodnocení funkčního vztahu vyžaduje několik předpokladů. Za prvé musíme rozhodnout, zda je nutné, aby kalibrační závislost byla lineární, za druhé, pokud chceme tento požadavek splnit, musíme se přesvědčit, zda skutečně lineární je. Tento druhý požadavek se většinou mlčky předpokládá i když jeho oprávněnost není vždy samozřejmá. Za třetí musíme testovat, zda platí předpoklad o rovnosti rozptylů závisle proměnné podél celé kalibrační křivky (homoskedasticita). Posledním z velice důležitých předpokladů, který plyne z nové definice kalibrace, je zjištění poměru nejistot závisle a nezávisle proměnné. Pokud jsou nejistoty na koncentrační ose srovnatelné s nejistotami na ose signálů, není použití lineární regrese oprávněné.

Z uvedených předpokladů vychází i experimentální postup při tvorbě kalibrační křivky.

a) Testování rovnosti rozptylů

Experimentální schéma pro testování pro tento případ je

$$\begin{array}{cccccc} x_1 = c_1 & y_{11} & y_{12} & \dots & y_{1n} \\ x_2 = c_2 & y_{21} & y_{22} & \dots & y_{2n} \end{array}$$

(hodnoty závisle proměnné y pro dvě úrovně $x(c)$, kde c je koncentrace).

Z tabulky je patrné, že zvolíme dvě úrovně hodnoty nezávisle proměnné, při kterých naměříme větší počet hodnot závisle proměnné ($n \approx 10$).

Test hypotézy o rovnosti rozptylů je založen na výpočtu F-kritéria

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (3.3)$$

a porovnáním s kritickou hodnotou $F_{0,975}\{(n-1);(n-1)\}$ pro hladinu významnosti 0,05. Tímto testem se přesvědčíme, zda je splněn základní požadavek pro lineární regresi, tj. konstantnost rozptylů závisle proměnné podél celé kalibrační přímky. Všimněte si, že pro test používáme pouze dvou měření závisle proměnné veličiny, obvykle při nejnižší a nejvyšší hodnotě nezávisle proměnné veličiny.

b) Sestrojení kalibrační křivky a její vyhodnocení

Mějme n dvojic x_i (obsah analytu v kalibračním vzorku) a y_i (naměřený signál) a označme

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}, \quad (3.4)$$

$$\bar{x}^2 = \frac{\sum x_i^2}{n}, \quad (3.5)$$

$$\bar{y} = \frac{\sum y_i}{n}. \quad (3.6)$$

Závislost $y = f(x)$ se nazývá kalibrační závislost.

Lineární kalibrační závislost $y = b_0 + b_1x$

Směrnice kalibrační závislosti b_1 se odhadne metodou nejmenších čtverců:

$$b_1 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})y_i}{\sum (x_i - \bar{x})^2}. \quad (3.7)$$

Úsek kalibrační přímky b_0 se odhadne

$$b_0 = \bar{y} - b_1\bar{x}. \quad (3.8)$$

Reziduální rozptyl kalibrační závislosti, s_{yx}^2 , se vypočte podle vztahu

$$s_{yx}^2 = \frac{1}{n-2} \sum (y_i - b_0 - b_1x_i)^2. \quad (3.9)$$

Interval spolehlivosti pro parametr b_0 se vypočte

$$L_{12} = b_0 \pm t_{1-\alpha/2, (n-2)} s_{yx} \frac{\sqrt{\sum x_i^2}}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2}}. \quad (3.10)$$

Konstanta b_0 je statisticky odlišná od nuly, jestliže absolutní hodnota veličiny

$$T = \frac{b_0 \sqrt{n}}{s_{yx}} \frac{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2}}{\sqrt{\sum x_i^2}} \quad (3.11)$$

přesáhne $1 - \alpha/2$ kvantil Studentova rozdělení.

Interval spolehlivosti pro parametr b_1 se určí jako

$$L_{12} = b_1 \pm t_{1-\alpha/2, (n-2)} s_{yx} \frac{1}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2}}. \quad (3.12)$$

Interval spolehlivosti pro regresní hodnotu y v bodě x se vypočte

$$L_{12} = x \pm t_{1-\alpha/2, (n-2)} s_{yx} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(x-\bar{x})^2}{\sum_n x_i^2}} . \quad (3.13)$$

c) Test linearitý kalibrační závislosti

Po zjištění rovnice regresní přímky se musíme přesvědčit, zda přímka vystihuje vztah mezi experimentálními hodnotami dvojic bodů x_i, y_i alespoň s takovou precizností, s jakou byly experimentálně určeny hodnoty závisle proměnné. Předpokládejme proto, že funkční vztah je vyjádřen regresní rovnicí $y = \beta_0 + \beta_1 x + \delta$, kde $\delta = \delta(x)$ je odchylka od přímky, která je také neznámým parametrem. Test linearitý spočívá v testu hypotézy

$$H_0: \delta = 0$$

a pro tento případ se použije jako testového kritéria F-rozdělení.

Označme y_{lk} závisle proměnnou (analytický signál) a uvažujme případ, kdy z n hodnot x_1, x_2, \dots, x_n je jich různých jen m , přičemž hodnota x_1 se vyskytuje n_1 krát, x_2 n_2 krát, až x_m n_m krát, a platí

$$\sum_m n_l = n . \quad (3.14)$$

Označme dále \bar{y}_l průměrnou hodnotu opakovaných měření pro určité x_l a \bar{y} průměr všech n hodnot. Testovací kritérium má potom tvar

$$F = \frac{(n-m)}{(m-2)} \frac{\sum_m n_l (\bar{y}_l - Y_{reg,l})^2}{\sum_m \sum_{n_l} (y_{lk} - \bar{y}_l)^2} \quad (3.15)$$

($l = 1, \dots, m; k = 1, \dots, n$).

Porovnáním F s hodnotou $F_{1-\alpha, (m-2; n-m)}$ rozhodneme o platnosti lineárního vztahu. V případě, že $F \leq F_{1-\alpha, (m-2; n-m)}$, vyhovují experimentální data lineárnímu modelu.

d) Predikce nezávisle proměnné

Neznámou hodnotu nezávisle proměnné (koncentrace) a její nejistotu $u(x)$ vypočteme na základě N krát opakovaného měření vzorku (z_j) podle následujících rovnic

$$x = \frac{\hat{y} - b_0}{b_1} \quad (3.16)$$

$$\hat{y} = \frac{\sum_N z_j}{N} \quad (3.17)$$

$$u(x) = \frac{s_{yx}}{b_1} \cdot \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{N} + \frac{(\hat{y} - \bar{y})^2}{b_1^2 Q_{xx}}} , \quad (3.18)$$

ve které $Q_{xx} = \sum_n (x_i - x_0)^2$.

3.2 Vážená lineární regrese

V případě heteroskedasticity (nehomogenity) rozptýlů závisle proměnné veličiny je nutno použít vážené lineární regrese.

Váhy jednotlivých měření w_i závisle proměnné veličiny se vypočítají podle vztahu

$$w_i = n \frac{\frac{1}{s_i^2}}{\sum_{i=1}^n \frac{1}{s_i^2}} \quad (3.19)$$

ve kterém s_i jsou výběrové směrodatné odchylky (nebo lépe standardní nejistoty) jednotlivých signálů.

Střední kalibrační závislosti jsou dány vztahem

$$\bar{x}_w = \frac{\sum_i w_i x_i}{n} \quad (3.20)$$

a

$$\bar{y}_w = \frac{\sum_i w_i y_i}{n} . \quad (3.21)$$

Směrnice kalibrační závislosti $b_1 = \frac{\sum_i w_i x_i y_i - n \bar{x}_w \bar{y}_w}{\sum_i w_i x_i^2 - n \bar{x}_w^2} . \quad (3.22)$

Úsek kalibrační závislosti $b_0 = \bar{y}_w - b_1 \bar{x}_w . \quad (3.23)$

Výběrová směrodatná odchylka signálu

$$s_{yz,w} = \sqrt{\frac{(\sum_i w_i y_i^2 - n \bar{y}_w^2) - b_1^2 (\sum_i w_i x_i^2 - n \bar{x}_w^2)}{n - 2}} . \quad (3.24)$$

Predikce nezávisle proměnné (koncentrace)

V následující rovnici je z nezávislé měření vzorku po kalibraci, x je hodnota nezávisle proměnné vypočtená z nezávislého měření, $u(x)$ je nejistota x

$$x = \frac{z - b_0}{b_1} \quad (3.25)$$

$$u(x) = \frac{s_{yx,w}}{b_1} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{w_z} + \frac{(z - \bar{y}_w)^2}{b_1^2 \sum_{i=1}^n (w_i x_i^2 - n \bar{x}_w^2)}} , \quad (3.26)$$

w_z je váha nezávislého měření z , kterou je třeba odhadnout z kalibrační závislosti nebo z hodnoty závislosti vah, w_i , na x .

3.3 Lineární regrese s nejistotami v obou proměnných (bivariátní, bilineární regrese)

Podle nové definice kalibrace [1, § 2.39] musíme uvažovat nejistoty obou veličin lineárního vztahu – nezávisle i závisle proměnných. Lineární i vážená lineární regrese tyto podmínky nespĺňují, musíme postupovat jiným způsobem. V této příručce popíšeme algoritmus zpracování experimentálních dat, který navrhl J. M. Lisý s kolektivem autorů [6].

Máme zjistit parametry lineárního vztahu $y = f(x)$ za předpokladu, že experimentální data mají strukturu $x_i \pm s_{x_i}$ a $y_i \pm s_{y_i}$, kde s_i jsou odhady nejistot x a y . Metoda nejmenších čtverců je nejvhodnější metodou pro nalezení řešení. Hledáme tedy minimum veličiny U

$$U = \sum_N w_{R_i} [y_i - f(x_i, \mathbf{b}_j)]^2, \quad (3.27)$$

kde $j = 1, 2$ a N je počet experimentálních bodů.

Tuto rovnici může psát ve zjednodušené formě

$$U = \sum_N w_{R_i} R_i^2, \quad (3.28)$$

kde R_i jsou residuály, w_{R_i} jsou statistické váhy:

$$R_i = y_i - f(x_i, \mathbf{b}_j) \quad (3.29)$$

$$w_{R_i} = 1/s_{R_i}^2. \quad (3.30)$$

Pro rovnici typu $y = \beta_1 + \beta_2 x$ vypočítáme odhady b_1 a b_2 řešením soustav normálních rovnic.

V maticové formě se popisuje lineární problém rovnicí

$$\mathbf{R} \cdot \mathbf{b} = \mathbf{g} \quad (3.31)$$

Prvky matic jednotlivých členů rovnice lze vyjádřit vztahy

$$\mathbf{R} = \begin{pmatrix} \sum_N \frac{1}{s_{R_i}^2} & \sum_N \frac{x_i}{s_{R_i}^2} \\ \sum_N \frac{x_i}{s_{R_i}^2} & \sum_N \frac{x_i^2}{s_{R_i}^2} \end{pmatrix} \quad (3.32)$$

$$\mathbf{b} = \begin{bmatrix} b_1 \\ b_2 \end{bmatrix} \quad (3.33)$$

$$\mathbf{g} = \begin{pmatrix} \sum_N \left\{ \frac{y_i}{s_{R_i}^2} + \frac{1}{2} \left[\frac{R_i}{s_{R_i}^2} \right]^2 \cdot \frac{\partial s_{R_i}^2}{\partial b_1} \right\} \\ \sum_N \left\{ \frac{x_i y_i}{s_{R_i}^2} + \frac{1}{2} \left[\frac{R_i}{s_{R_i}^2} \right]^2 \cdot \frac{\partial s_{R_i}^2}{\partial b_2} \right\} \end{pmatrix} \quad (3.34)$$

Pro lineární závislost typu $y = \beta_1 + \beta_2 x$ se veličina s_{R_i} může vyjádřit vztahem

$$s_{R_i}^2 = s_{y_i}^2 + b_2^2 s_{x_i}^2 \quad (3.35)$$

Parametry lineárního vztahu se počítají iterativně podle maticové rovnice

$$\mathbf{b} = \mathbf{R}^{-1} \cdot \mathbf{g} \quad (3.36)$$

Kovarianční matice \mathbf{V} se počítá podle následujících vztahů.

Označme si jednotlivé členy matic \mathbf{R}^{-1} a \mathbf{V} :

$$\mathbf{R}^{-1} = \begin{pmatrix} r_{11} & r_{12} \\ r_{21} & r_{22} \end{pmatrix} \quad \mathbf{V} = \begin{pmatrix} v_{11} & v_{12} \\ v_{21} & v_{22} \end{pmatrix} \quad (3.37)$$

Vztahy mezi jednotlivými členy obou matic lze vyjádřit takto:

$$v_{11} = \frac{r_{11}}{N-2} \sum_N \frac{R_i^2}{s_{R_i}^2}, \quad (3.38)$$

$$v_{22} = \frac{r_{22}}{N-2} \sum_N \frac{R_i^2}{s_{R_i}^2}. \quad (3.39)$$

Kovariance, $\text{cov}(b_1, b_2) = v_{12}$

$$v_{12} = \frac{r_{12}}{N-2} \sum_N \frac{R_i^2}{s_{R_i}^2}, \quad (3.40)$$

přičemž $v_{21} = v_{12}$.

Korelační koeficient, $\rho(b_1, b_2)$

$$\rho(b_1, b_2) = \frac{v_{21}}{\sqrt{v_{11} v_{21}}} \quad (3.41)$$

Nejistoty odhadů b_1 a b_2

$$\begin{aligned} u(b_1) &= \sqrt{v_{11}} \\ u(b_2) &= \sqrt{v_{22}} \end{aligned} \quad (3.42)$$

Testování významnosti parametrů lineárního vztahu

Test hypotézy $\beta_1 = 0$

Test hypotézy $\beta_2 = 1$

$$\frac{|b_1|}{u(b_1)} < 2 \qquad \frac{|b_2 - 1|}{u(b_2)} < 2 \qquad (3.43)$$

Predikce hodnoty nezávisle proměnné, x

$$x = \frac{y - b_1}{b_2} \qquad (3.44)$$

Nejistota predikované hodnoty se odhadne podle zákona o šíření nejistot s použitím korelace mezi směrnicí a úsekem:

$$u(x) = \sqrt{\frac{u_y^2 + x^2 u_{b_2}^2 + 2xv_{12} + u_{b_1}^2}{b_2^2}} \ . \qquad (3.45)$$

3.4 Nelineární regrese v biologických měřicích postupech

Teoretický nelineární model můžeme, stejně jako v předchozím lineárním případě, popsat rovnicí

$$Y = f(x_i; \beta_j) \ , \qquad (3.46)$$

ve kterém jsou x_i nezávisle proměnné veličiny, β_j jsou parametry modelu, $j = 1, 2, \dots, p$. Tak např. pro nelineární model s jednou nezávisle proměnnou platí rovnice

$$Y = \beta_1 \exp(\beta_2 x) \ , \qquad (3.47)$$

ve které $p = 2$.

Odpovídající regresní model je odhadem teoretického modelu, takže obecně píšeme

$$Y_{\text{reg}} = f(x_i; b_j) + e \ . \qquad (3.48)$$

V této rovnici jsou hodnoty b_j odhady β_j , e je náhodná chyba modelu, která má nulovou střední hodnotu a normální rozdělení $N(0, \sigma^2)$, tedy totožné s lineárním případem.

Směrodatná odchylka závisle proměnné, s_y

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum e_i^2}{n - p}} \ , \qquad (3.49)$$

n je počet experimentálních bodů, p je počet parametrů.

Směrodatné odchylky parametrů b_j

$$s(b_j) = s_y \sqrt{[(\mathbf{J}^{\text{final,T}} \cdot \mathbf{J}^{\text{final}})^{-1}]_{jj}} \ . \qquad (3.50)$$

Jacobián \mathbf{J} s maticovými prvky

$$J_{ij} = \frac{\partial Y_i}{\partial b_j} \quad (3.51)$$

Korelační koeficient parametrů, ρ_{12} (pro dvouparametrový případ):

$$\rho_{12} = \frac{J_{12}}{\sqrt{J_{11} \cdot J_{22}}} \quad (3.52)$$

Kovarianční matice \mathbf{V} :

$$\mathbf{V} = (\mathbf{J}^T \cdot \mathbf{J})^{-1} \quad (3.53)$$

Zpracování dat nelineární regrese si osvětlíme na následujícím příkladu.

Příklad

V následující tabulce jsou uvedeny aktivity enzymu, A , jako funkce času t :

t	0	1	2	3	7	10	15	18
A	20,2	17,2	14,1	10,7	4,9	2,9	2,2	1,2

Předpokládáme, že je to reakce 1. řádu, která se řídí rovnicí $A(t) = B \exp[-(\ln 2) \cdot t/t_{1/2}]$

Naším úkolem je vypočítat poločas $t_{1/2}$.

$$J_{i1} = \frac{\partial A_i}{\partial B} = \exp[-(\ln 2) \cdot t/t_{1/2}]$$

$$J_{i2} = \frac{\partial A_i}{\partial t_{1/2}} = [-(B \ln 2) / (t_{1/2}^2)] \exp[-(\ln 2) \cdot t/t_{1/2}]$$

Výpočetní tabulka v Excelu vypadá takto:

t	A	A_{reg}	e	J_1	J_2
0	20,2	20,32583	-0,12583	1	0
1	17,2	16,76296	0,437041	0,824712	0,898221
2	14,1	13,82461	0,275385	0,680150	1,481547
3	10,7	11,40133	-0,70133	0,560928	1,832774
7	4,9	5,27430	-0,37430	0,259488	1,978314
10	2,9	2,958502	-0,05850	0,145554	1,585274
15	2,2	1,128713	1,071287	0,055531	0,907209
18	1,2	0,633127	0,566873	0,031149	0,610655

Výstupní tabulka je následující:

		U	2,387058	
		s_y	0,630748	
B	20,33	u(B)	0,49	2,4 %
$t_{1/2}$	3,60	u($t_{1/2}$)	0,21	5,9 %
		ρ_{12}	-0,60	

Vstupní hodnoty pro výpočet byly odhadnuty lineární regrese, příklad byl řešen funkcí řešitel v programu Excel.

Pro úplnost uvádíme algoritmus použití funkce řešitel v programu Excel.

V Excelu naleznete příkaz řešitel (v angl. versi „solver“) pod nabídkou Nástroje / Řešitel (u starších verzí Hledání řešení). Kliknutím na příkaz Řešitel se objeví panel, který musíte vyplnit. Nejprve si ale vysvětlíme některé pojmy.

Nastavit buňku. V této buňce bude výraz nebo rovnice, ve které se zobrazuje řešení problému. Pro náš případ nelineární regrese to bude suma čtverců odchylek experimentálních hodnot závisle proměnné a regresní proměnné. Musíte tedy znát tvar regresního modelu. Pozor, v našem případě to bude jenom jedna buňka!

Rovno: Zde označíte cílové řešení; v našem případě hledáme minimum sumy čtverců, označíte tedy *Min*.

Měněné buňky: Zde značíte buňky, ve kterých bude řešení, tedy vektor parametrů. Hodnoty v těchto buňkách se během iterací mění, řešení však vyžaduje, abyste před spuštěním zadali počáteční hodnoty parametrů. Výsledné řešení je silně závislé na počátečních hodnotách (nulové přiblížení) parametrů.

Pokud kliknete na Možnosti, objeví se vám panel s dalšími variantami řešení. My prozatím ponecháme původně nastavené hodnoty (default). Po vyplnění hlavního panelu kliknete na Řešit.

Další příklady jsou uvedeny v excelových sešitech.

3.5 Další experimentální plány v kalibraci

3.5.1 Metoda přidavku standardu (SAM)

Tato metoda, velice často používaná v analytické chemii a dalších přírodních vědách, je použitelná pro analýzu látek v roztocích. Uvedme několik předpokladů, které jsou nezbytné pro úspěšné použití metody SAM:

- měřicí postup je validován,
- vazba analytu ve vzorku se příliš neliší od analytu v přidavku (spiku), významné při analýze organických látek,
- nemusíme korigovat na slepý pokus.

Metoda není citlivá na složení matrice.

Metoda SAM má několik modifikací.

a) Příklad přidání jednoho standardu ke vzorku

aa) Přidání malého množství standardu ke vzorku, celkový objem není konstantní, „metoda jednoho roztoku“.

Vstupní veličiny: objem vzorku V_{vz} , signál vzorku Y_{vz} , objem přidávku standardu V_{st} , signál vzorku se standardem Y_{vz+st} , koncentrace standardu c_{st} .

Výstupní veličiny: c_{vz} .

Algoritmus měření:

1. měření signálu Y_{vz} ve vzorku o objemu V_{vz} ,
2. přidání V_{st} standardu o koncentraci c_{st} ke vzorku o objemu V_{vz} ,
3. měření signálu Y_{vz+st} .

Rovnice měření:

$$c_{vz} = \frac{Y_{vz} c_{st} \frac{V_{st}}{V_{vz}}}{Y_{vz+st} \left(\frac{V_{vz} + V_{st}}{V_{vz}} \right) - Y_{vz}} \quad (3.54)$$

ab) Přidání standardu ke vzorku, matrice a celkový objem je konstantní, „metoda dvou roztoků“

Vstupní veličiny: V_{vz} , Y_{vz} , V_{st} , Y_{vz+st} , V_{celk} , c_{st} .

Výstupní veličiny: c_{vz} .

Algoritmus měření:

1. odměření objemu V_{vz} postupně do dvou odměrných baněk V_{celk} ,
2. přidání V_{st} standardu o koncentraci c_{st} do jedné odměrné baňky,
3. měření signálu Y_{vz} v odměrné baňce jen se vzorkem,
4. měření signálu Y_{vz+st} v odměrné baňce se vzorkem a standardem.

Rovnice měření:

$$c_{vz} = \frac{Y_{vz}}{(Y_{vz+st} - Y_{vz})} \cdot \frac{V_{st} c_{st}}{V_{vz}} \quad (3.55)$$

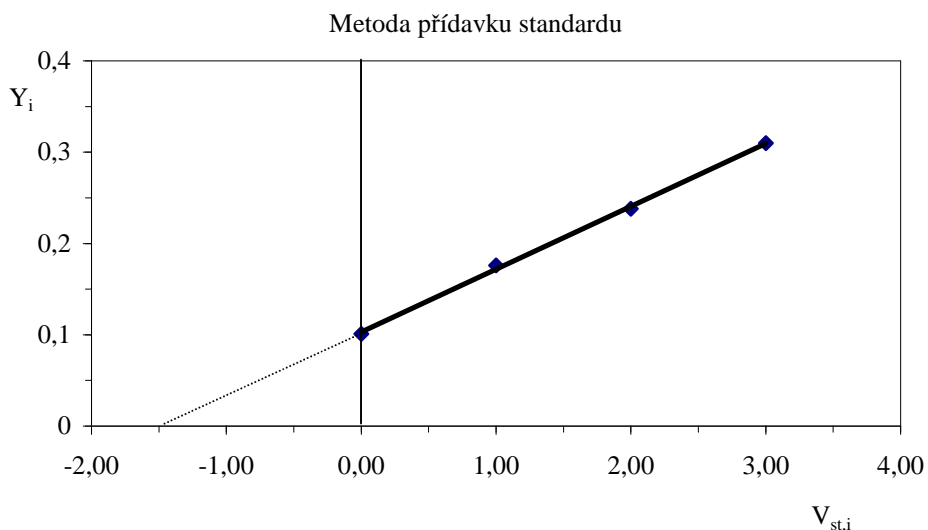
b) Přidání více standardů ke vzorku (a zpracování lineární regrese)

Vstupní veličiny: V_{celk} , $V_{st,i}$, V_{vz} , Y_i , c_{st} .

Výstupní veličiny: b_0 (úsek), b_1 (směrnice), c_{vz} , $u(c_{vz})$.

Algoritmus měření:

1. odměření objemu vzorku V_{vz} do i odměrných baněk,
2. přidání $V_{st,i}$ standardu o koncentraci c_{st} do všech odměrných baněk; přidání standardu do první baňky $V_{st,1} = 0$,
3. měření signálů Y_i ,
4. lineární regrese (obrázek 3.1).



Obr. 3.1. Zobrazení metody přidavku standardu do vzorku

Rovnice měření:
$$c_{vz} = \frac{c_{st}}{V_{vz}} \cdot \frac{b_0}{b_1} \quad (3.56)$$

Standardní nejistota objemu při $y_c = 0$, u_v

$$u_v = \frac{s_{yx}}{b_1} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(y_c - \bar{y})^2}{b_1^2 Q_{xx}}}, \quad (3.57)$$

kde $y_c = 0$ a $Q_{xx} = \sum_n (x_i - \bar{x})^2$.

Standardní nejistota vypočtené koncentrace, u_c

$$u_c = \frac{b_1 c_{vz} u_v}{b_0}. \quad (3.58)$$

3.5.2 Metoda „bracketing“

Principem této metody kalibrace je měření signálu analytu ve vzorku a ve dvou standardech, z nichž jeden má nižší koncentraci (obsah) a druhý vyšší koncentraci (obsah) než je koncentrace (obsah) analytu ve vzorku. Metoda je citlivá na matriční efekt. Uveďme několik požadavků, které jsou pro úspěšné použití metody nezbytné:

- SOP identická pro vzorek a standardy,
- vzorek a standardy jsou složením podobné,
- měřicí postup je validován.

Vstupní veličiny:

koncentrace analytu v obou standardech, c_1 , c_2 , přičemž platí $c_1 < c_{vz} < c_2$,
měřené signály odpovídající analytu ve vzorku a standardech, y_1 , y_2 , y_{vz} .

Výstupní veličina:

koncentrace analytu ve vzorku, c_{vz} , včetně nejistoty, $u(c_{vz})$.

Rovnice měření:

$$c_{vz} = \frac{c_2(y_{vz} - y_1) + c_1(y_2 - y_{vz})}{(y_2 - y_1)} . \quad (3.59)$$

3.6 Příklady ke kapitole 3

<i>5_bodova_kalibrace.xls</i>	obsahuje šablonu pro pětibodovou lineární kalibraci a predikci koncentrace analytu ve vzorku s korekcí na výtěžnost
<i>linergsu.xls</i>	obsahuje šablonu pro lineární kalibraci a predikci koncentrace analytu ve vzorku (max. 15 bodů s 10 opakováními) včetně testu lineariry
<i>kalibrace_prikklady.xls</i>	obsahuje řešené příklady metody srovnání se standardem a metody přídavku standardu (SAM) pro 1, 3 a 4 přídavky
<i>bracketing_kalibrace.xls</i>	obsahuje šablonu pro „bracketing“, pětibodovou kalibraci a predikci koncentrace analytu ve vzorku s korekcí na výtěžnost
<i>bilinear_kalibrace_10.xls</i>	obsahuje šablonu pro bivariátní (bilineární) kalibraci a predikci koncentrace analytu ve vzorku, pro maximálně 10 bodů s korekcí na výtěžnost
<i>porovnani_postupu_60.xls</i>	obsahuje šablonu pro porovnání referenčního postupu s novým postupem pro max. 60 vzorků; obsahuje řešený příklad
<i>nelinearni_regrese.xls</i>	obsahuje šablonu pro nelineární regresi pro min. 8 a max. 10 dvojic bodů; šablona obsahuje řešení konkrétního problému. Při použití této šablony pro jiný problém je nutno změnit model měření a vztahu pro derivace.

4 Validace měřicích postupů

4.1 Terminologie

V této publikaci je použita terminologie, definovaná v novém metrologickém slovníku VIM 3 [cit. 1].

Měření (§ 2.1) je proces experimentálního získávání jedné nebo více hodnot veličiny, které mohou být důvodně přiřazeny veličině. Měření v sobě obsahuje porovnání veličin a zahrnuje zjišťování počtu entit. Měření předem předpokládá popis veličiny přiměřený určenému použití výsledku měření, popis postupu měření a kalibrovaného měřicího systému pracujícího v souladu se specifikovaným postupem měření, včetně podmínek měření.

Princip měření (§ 2.4) je jev sloužící jako základ měření.

Metoda měření (§ 2.5) je generický popis logického organizování činností použitých při měření. Metody měření smějí být kvalifikovány různými způsoby, na příklad:

- substituční metoda měření
- diferenční metoda měření
- nulová metoda měření; nebo
- přímá metoda měření
- nepřímá metoda měření

Postup měření (§ 2.6) je podrobný popis měření podle jednoho nebo více měřicích principů a dané metody měření, založený na modelu měření a zahrnující jakýkoliv výpočet k získání výsledku měření.

Výsledek měření (§ 2.9) je soubor hodnot veličiny, přiřazený měřené veličině společně s jakoukoliv další dostupnou relevantní informací. Výsledek měření se obecně vyjadřuje jako jedna naměřená hodnota veličiny a nejistota měření.

Validace (§ 2.45) je ověřování, že jsou specifikované požadavky přiměřené pro zamýšlené použití.

Verifikace (ověřování) (§ 2.44) je poskytnutí objektivního důkazu, že daná položka splňuje specifikované požadavky.

Měřená veličina (§ 2.3) je veličina, která má být měřena. Specifikace měřené veličiny vyžaduje znalost druhu veličiny, popis stavu jevu, tělesa nebo látky nesoucích veličinu, včetně jakékoliv relevantní složky a zahrnutých chemických entit. V chemii jsou pro měřenou veličinu někdy používány termíny „analyt“ nebo název látky nebo sloučeniny. Toto použití je chybné, protože tyto termíny neodkazují na veličiny.

Přesnost měření (measurement accuracy) (§ 2.13) je těsnost shody mezi naměřenou hodnotou veličiny a pravou (skutečnou) hodnotou veličiny měřené veličiny

Pravdivost měření (measurement trueness) (§ 2.14) těsnost shody mezi aritmetickým průměrem nekonečného počtu opakovaných naměřených hodnot veličiny a referenční hodnotou veličiny. Mírou pravdivosti je vychýlení (bias).

Preciznost měření (measurement precision) (§ 2.15) je těsnost shody mezi indikacemi nebo naměřenými hodnotami veličiny získanými opakovanými měřeními na stejném objektu nebo na podobných objektech za specifikovaných podmínek

Opakovatelnost (repeatability) (§ 2.21) je preciznost měření za souboru podmínek opakovatelnosti měření. Podmínka opakovatelnosti je podmínka měření za souboru podmínek, který zahrnuje stejný postup měření, stejný obslužný personál, stejný měřicí systém, stejné pracovní podmínky a stejné místo, a opakování měření na stejném nebo podobných objektech v krátkém časovém úseku. Mírou opakovatelnosti je směrodatná odchylka opakovatelnosti.

Reprodukovatelnost (reproducibility) (§ 2.25) je preciznost měření za podmínek reprodukovatelnosti měření. Podmínka reprodukovatelnosti je podmínka měření ze souboru podmínek, který zahrnuje různá místa, obslužný personál, měřicí systémy a opakování měření na stejném nebo podobných objektech. Mírou reprodukovatelnosti je směrodatná odchylka reprodukovatelnosti.

4.2 Experimentální plán pro validaci

Validace zahrnuje

- analytické požadavky, stanovení charakteristiky postupu,
- kontrolu, že postup vyhovuje požadavkům,
- prohlášení o platnosti postupu.

Charakteristiky postupu můžeme rozdělit na dvě skupiny:

1. Pracovní charakteristiky postupu:

kvalitativní: selektivita,

kvantitativní: pracovní (lineární) rozsah, citlivost, mez detekce (angl. limit of detection, LOD), mez stanovitelnosti (angl. limit of quantification, LOQ), výtěžnost, interference.

2. Vlastnosti výsledku získaného daným postupem:

návaznost, nejistota výsledku uvažující např. opakovatelnost / vnitrolaboratorní reprodukovatelnost, robustnost.

V této příručce se budeme věnovat především pracovním charakteristikám postupu, dále pak opakovatelnosti/reprodukovatelnosti a robustnosti. Všechny validační parametry získáváme experimentem a vyhodnocením experimentálních dat.

4.3 Selektivita (interference)

Selektivitu metody (interference) ověřujeme podle informací v normě, podle zkušeností nebo podle znalostí studovaného systému. Pro každý interferent děláme pokusy zvlášť, kumulativní efekt interferentů ověřujeme experimentálním plánem, podobným v testu robustnosti. Algoritmus experimentálního postupu:

- analyzujeme 10× vzorek čistého analytu (vnitrolaboratorní standard), průměrná hodnota \bar{x}_s ;

- analyzujeme 10× vzorek čistého analytu s přidavkem příměsí v takových koncentracích (obsahu), které jsou přibližně stejné jako v reálné matici, průměrná hodnota \bar{x}_M ;
- vypočteme hodnoty odhadů směrodatných odchylek pro oba soubory; s_S, s_M ;
- F-testem testujeme hypotézu $\sigma_S^2 = \sigma_M^2$.

$$F = \frac{s_M^2}{s_S^2} \quad \text{nebo} \quad F = \frac{s_S^2}{s_M^2} \quad (F \text{ musí být větší než jedna}).$$

Když je $F < F(0,975;9,9) = 4,02$, je hypotéza potvrzena a variabilita je stejná.

t-Testem testujeme hypotézu $\mu_S = \mu_M$

$$s = \sqrt{\frac{s_S^2 + s_M^2}{2}} \qquad T = \frac{|\bar{x}_S - \bar{x}_M|}{s\sqrt{\frac{2}{10}}}$$

Když $T < t(0,975;18) = 2,10$, je hypotéza potvrzena a interferent nemá vliv.

Není-li hypotéza potvrzena, vypočteme korekci podle vztahu

$$\Delta = x_{p,M} - x_{p,S}$$

Sestrojíme regulační diagram korekce.

4.4 Rozsah měření, linearita

Rozsah měření by měl odpovídat analytickým požadavkům. Ve zvoleném rozsahu měření je zapotřebí ověřit základní charakteristiky kalibrační křivky, přičemž lze použít standardní roztoky čistého analytu a postupovat dle ISO 8466-1:1994 [cit. 18].

Postup:

1. Posoudí se rozsah měření podle analytických požadavků a dalších informací (legislativní požadavky, běžně analyzované vzorky, apod.).
2. Ve zvoleném rozsahu měření se změří závislost signálu na koncentraci pro řadu kalibračních standardů: $y_{\text{exp}} = f(c)$ a vyhodnotí lineární regresí. Volíme maximálně 10 bodů na koncentrační ose včetně slepého vzorku, měření neopakujeme.
3. Získaná závislost se zobrazí v grafu a její linearita se ověří subjektivním posouzením. Pro objektivní posouzení linearity lze použít jednoduché statistické vyhodnocení, které je detailně popsáno v normě ISO 8466-1:1994 [cit. 18].
4. Pokud se nejnižší nebo nejvyšší body jeví být mimo lineární oblast, potom je odebereme a vrátíme se ke kroku 3 tohoto postupu.

4.5 Opakovatelnost

Opakovatelnost je preciznost měření za podmínek opakovatelnosti (viz oddíl 4.1).

Postup:

1. Opakovaně (5–10×) změříme postupem měření signál vybraného vzorku při známé koncentrační hladině (nemusí to být standard). Vypočteme směrodatnou odchylkou opakovatelnosti měření signálu, s_{opak} . Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti, $s_{\text{opak,rel}}$ je invariantní ke koncentraci.
2. Stejný postup opakujeme pro další koncentrační úrovně v celém pracovním rozsahu.
3. Zobrazíme závislost s_{opak} , resp. $s_{\text{opak,rel}}$ na koncentraci (výběr polynomu v Excelu).

4.6 Reprodukovatelnost

Reprodukovatelnost je preciznost měření za podmínek reprodukovatelnosti (viz oddíl 4.1, str. 47). V této části se budeme zabývat vnitrolaboratorní reprodukovatelností, mezilaboratorní reprodukovatelnost budeme diskutovat v kapitole o mezilaboratorních testech.

Postup:

Tento postup je v souladu s normou ISO 5725-3:2001 [cit. 7].

Postup vychází z validačních údajů laboratoře o daném měřicím postupu. Vnitrolaboratorní reprodukovatelnost zahrnuje i randomizovanou systematickou odchylku laboratoře, nikoli randomizovanou systematickou odchylku postupu (bias postupu měření).

Experimentální plán a výpočet

Experimentální plán spočívá ve změření signálu a následném výpočtu hodnot obsahu nebo koncentrace (pomocí různých kalibračních metodik) pro minimálně 15 časově odlišených měření. Používáme k tomu jeden komutabilní matricový vzorek (*komutabilita = matriční přiměřenost*), který musí být stabilní v průběhu časově odlišených měření. Měření provedeme pro různé koncentrační úrovně a stejně jako v případě opakovatelnosti zobrazíme závislost směrodatné odchylky reprodukovatelnosti na koncentraci. Vyhodnocení provedeme analýzou rozptylu v Excelu. Vzorový sešit osvětluje výpočet a odhad směrodatné odchylky reprodukovatelnosti.

4.7 Výtěžnost

Pravdivost měření může být charakterizována výtěžností měření.

Výtěžnost, R , je definována rovnicí

$$R = \frac{\text{nalezená hodnota}}{\text{referenční hodnota}} \quad (4.1)$$

Referenční hodnotu získáme buď z hodnoty certifikovaného referenčního materiálu nebo z přídatku standardu (spike) do matrice.

Postup:

CRM je k dispozici, hodnota veličiny c_{ref}

Danou metodou změříme signál (např. absorpenci, plochu píku, čas, atd.) odpovídající zvolenému referenčnímu materiálu. Ze signálu vypočteme koncentraci nebo hodnotu obsahu sledovaného analytu s pomocí kalibrační křivky. Měření opakujeme alespoň N krát (N je 5 až 10) za podmínek opakovatelnosti (krátký časový interval, stejný operátor, stejný přístroj). Vypočteme aritmetický průměr \bar{x} , výběrovou směrodatnou odchylku s a nejistotu opakovatelnosti u_{opak}

$$u_{\text{opak}} = \frac{s}{\sqrt{N}} \quad (4.2)$$

popř. relativní standardní nejistotu opakovatelnosti, R_{su} (%).

$$R_{su} = \frac{u_{\text{opak}}}{\bar{x}} \cdot 100 \quad \% . \quad (4.3)$$

Výtěžnost, R (%) se vypočte ze vztahu

$$R = \frac{\bar{x}}{c_{\text{ref}}} \cdot 100 \quad \% . \quad (4.4)$$

Odhad kombinované (relativní) nejistoty výtěžnosti, $u_{R,\text{rel}}$ je dán vztahem

$$u_{R,\text{rel}} = \sqrt{R_{su}^2 + \left(\frac{u_{\text{ref}}}{c_{\text{ref}}} \cdot 100 \right)^2} \quad \% . \quad (4.5)$$

4.8 Mez detekce, mez stanovitelnosti

Pro definici meze detekce je důležité porozumět některým pojmům, které jsou uvedeny v kontingenční tabulce 4.1.

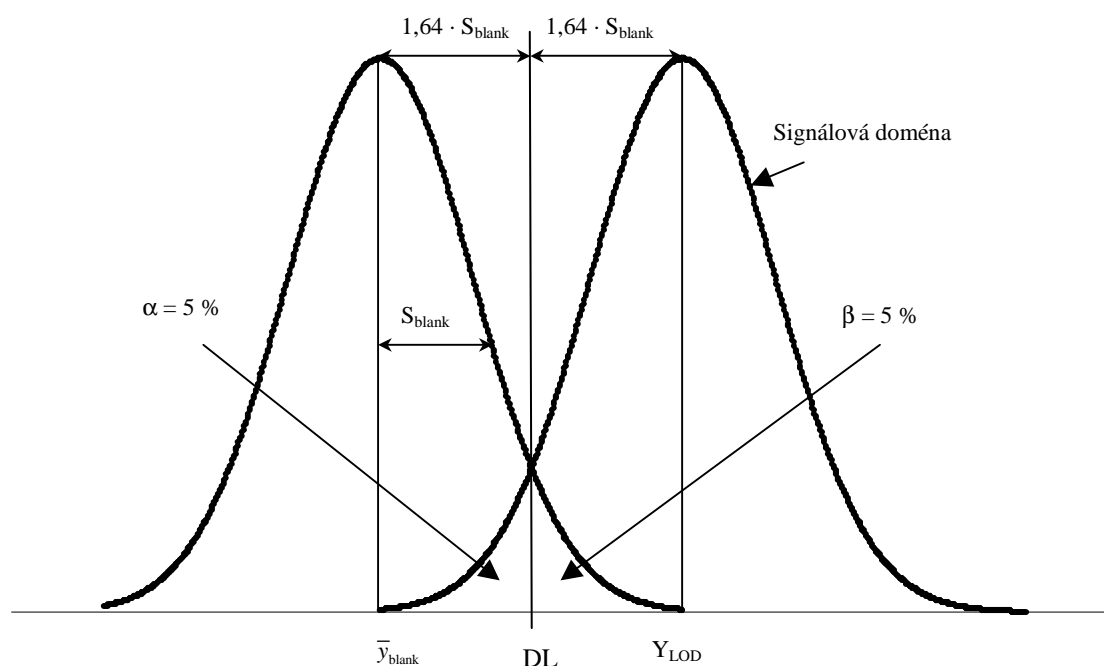
Tabulka 4.1. Kontingenční tabulka pro definici meze detekce

Reálná situace	analyt přítomen	analyt nepřítomen
<i>pozitivní</i>	TP = P(e/A)	FP = P(e/¬A)
<i>negativní</i>	FN = P(¬e/A)	TN = P(¬e/¬A)

Vysvětlivky:

- A** přítomnost analytu ve vzorku **¬A** nepřítomnost analytu ve vzorku
- e** důkaz (pozitivní výsledek testu) **¬e** negativní výsledek testu
- P(e/A)** pravděpodobnost kladného důkazu analytu za předpokladu, že analyt je přítomen
- P(¬e/A)** pravděpodobnost falešně negativního výsledku (výsledek testu je negativní, i když analyt je přítomen), chyba I. druhu α
- P(e/¬A)** pravděpodobnost falešně pozitivního výsledku (výsledek je pozitivní, i když analyt není přítomen), chyba II. druhu β
- P(¬e/¬A)** pravděpodobnost negativního důkazu analytu za předpokladu, že analyt není přítomen

Předchozí kontingenční tabulka je znázorněna na obrázku 4.1.



Obr. 4.1. Grafické znázornění odhadu meze detekce (měřicí schopnosti), LOD

Vysvětlivky:

- \bar{y}_{blank} je průměrná hodnota signálu slepého vzorku;
- S_{blank} je směrodatná odchylka opakovaného měření slepého vzorku;
- α, β jsou chyby I. a II. druhu,
- DL je rozhodovací mez (cut-off);
- Y_{LOD} je signál odpovídající mezi detekce

Mez detekce LOD (měřicí schopnost postupu) je definována jako nejmenší množství (obsah, koncentrace) látky, která může být detekována, identifikována nebo stanovena v daném vzorku (matrice) s danou chybou II. druhu β při určité chybě I. druhu α . Jinými slovy, měřicí postup je schopen potvrdit přítomnost analytu či substance s pravděpodobností $(1 - \beta)$.

Určení meze detekce se skládá z 5 kroků:

1. volba apriorních pravděpodobností α a β , obvykle $\alpha, \beta = 0,05$ (5 %),
2. odhad nejistoty měření slepého (matričního) vzorku, obvykle nahrazený směrodatnou odchylkou opakovatelnosti nebo reprodukovatelnosti opakovaného měření slepého vzorku, S_{blank} ,
3. výpočet rozhodovací meze DL v signálové doméně: $DL = 1,64S_{\text{blank}}$,
4. výpočet LOD v signálové doméně: $LOD = 1,64S_{\text{blank}}$,
5. konverze LOD v jednotkách signálu na koncentrační jednotky s použitím kalibrační závislosti v blízkosti LOD. Alternativní postup je změření poměru signál/šum, S/N, v závislosti na koncentraci v blízkosti LOD.

Poslední bod předchozího algoritmu je nejcitlivějším bodem celého algoritmu, protože kalibrační závislost v okolí LOD je často značně odlišná od kalibrační závislosti v pracovním (lineárním) rozsahu.

Výpočet meze detekce je uveden v excelových sešitech.

Mez stanovitelnosti LOQ není definována statisticky, Z praktického hlediska můžeme za mez stanovitelnosti považovat nejnižší koncentraci (obsah) na kalibrační křivce (přímce) či počátek rozsahu měření.

4.9 Robustnost měřicího postupu

Robustnost patří mezi základní validační parametry. Při robustnosti určujeme matematicko-statistickým postupem jak je analytický signál závislý na malých změnách parametrů charakterizujících analytický postup, popř. standardní pracovní postup, SOP. Kritické parametry měření a jejich tolerance musí být známy pro každý analytický postup. Příklady takových kritických parametrů jsou teplota, tlak, vlhkost, chemické faktory jako jsou koncentrace činidel, pH, napětí a frekvence elektrických přístrojů. Nejsou to tedy parametry, které přímo ovlivňují závisle proměnnou veličinu, ale jsou to další, mnohdy těžko odhalitelné vlivy, které musíme brát v úvahu při sestavování SOP. Kritické parametry měření odhalíme experimentálně pomocí testu robustnosti parametrů. Postup Youdenova testu [8] ukazuje tabulka 4.2. Velkými písmeny jsou označeny nominální hodnoty parametrů, tedy ty hodnoty, jež uvádíme v SOP. Malými písmeny jsou označeny alternativní hodnoty, tedy takové, kde byly úmyslně pozměněny nominální hodnoty o malou hodnotu. Pokud je parametr kvalitativního rázu, vyjádříme jak nominální, tak alternativní hodnoty slovně. V testu se zkoušejí pozměněné objemy, časy, navážky, vlivy různých šarží činidel, osobní vlivy analytika a podobně.

Tabulka 4.2. Tabulka testu robustnosti

Parametry	Kombinace							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	A	A	A	A	a	a	a	a
B/b	B	B	b	b	B	B	b	b
C/c	C	c	C	c	C	c	C	c
D/d	D	D	d	d	d	d	D	D
E/e	E	e	E	e	e	E	e	E
F/f	F	f	f	F	F	f	f	F
G/g	G	g	g	G	g	G	G	g
Výsledky měření	r	t	u	v	w	x	y	z

Schéma výpočtu testu robustnosti

$$\begin{aligned}
 V_A &= \frac{1}{4}(r + t + u + v) - \frac{1}{4}(w + x + y + z) = (A - a) \\
 V_B &= \frac{1}{4}(r + t + w + x) - \frac{1}{4}(u + v + y + z) = (B - b) \\
 V_C &= \frac{1}{4}(r + u + w + y) - \frac{1}{4}(t + v + x + z) = (C - c) \\
 V_D &= \frac{1}{4}(r + t + y + z) - \frac{1}{4}(u + v + w + x) = (D - d) \\
 V_E &= \frac{1}{4}(r + u + x + z) - \frac{1}{4}(t + v + w + y) = (E - e) \\
 V_F &= \frac{1}{4}(r + v + w + z) - \frac{1}{4}(t + u + x + y) = (F - f) \\
 V_G &= \frac{1}{4}(r + v + x + y) - \frac{1}{4}(t + u + w + z) = (G - g)
 \end{aligned}
 \tag{4.6}$$

Test robustnosti spočívá v testu hypotézy $H_0: V_i = 0$, předpokládající, že všechny kontrasty V jsou nulové. Vypočteme-li interval spolehlivosti kontrastu

$$L_{1,2} = \frac{V_i \pm t_{1-\alpha/2;7} \cdot s}{\sqrt{2}} \tag{4.7}$$

a obsahuje-li vypočtený interval spolehlivosti bod nula, potom je kontrast statisticky nevýznamný a měřicí postup je pro daný parametr robustní.

Hodnotu odhadu směrodatné odchylky vypočteme obvyklým způsobem z osmi měření:

$$s = \sqrt{\frac{1}{7} \left[(r - \bar{x})^2 + \dots + (z - \bar{x})^2 \right]} \tag{4.8}$$

kde \bar{x} je aritmetický průměr všech osmi měření.

Pokud prověřujeme testem robustnosti méně než sedm parametrů, můžeme doplnit soubor formálními parametry, např. kvalitativními, a pracovat s nimi jako s reálnými parametry. Větší počet parametrů připadá pro běžnou metodu zřídka v úvahu. V těchto ojedinělých případech volíme jiný typ kráceného faktoriálního pokusu, neboť schéma pro Youdenův test robustnosti je vlastně krácený faktoriální pokus $(1/16) \cdot 2^7$.

4.10 Příklady ke kapitole 4

validace.xls obsahuje šablonu pro výpočet validačních parametrů: rozsah, LOD, opakovatelnost, robustnost, výtěžnost; obsahuje šablonu pro konstrukci regulačního diagramu přesnosti a preciznosti (15 duplicitních bodů)

5 Statistické metody při přípravě a používání referenčních materiálů

Při zpracování této kapitoly jsme vycházeli z publikací komise pro referenční materiály ISO REMCO [9, 10]. Tato kapitola se týká hlavně výrobců referenčních materiálů, popř. certifikačního orgánu, který organizuje certifikační kampaň. Omezíme se tedy pouze na základní principy odhadu nejistoty homogenity a stability. Tato kapitola není doprovázena řešenými příklady.

5.1 Statistické principy certifikace

5.1.1 Stanovení nejistoty homogenity

Experimentální schéma je jednoduché: změříme hodnotu dané vlastnosti ve vybraných vzorcích (počet vzorků je a), každý vzorek opakujeme n_i krát ($i \in \langle 1, a \rangle$). Experimentální matici vyhodnotíme analýzou rozptylu (ANOVA) a vypočítáme směrodatnou odchylku mezi vzorky (tzv. mezibaničkovou směrodatnou odchylku), s_{mv} , která je mírou složky nejistoty referenčního materiálu odpovídající nehomogenitě.

Vztahy pro výpočet jsou následující:

průměrná hodnota počtu opakování měření, n_0 :

$$n_0 = \frac{1}{a-1} \left(\sum_{i=1}^a n_i - \frac{\sum_{i=1}^a n_i^2}{\sum_{i=1}^a n_i} \right), \quad (5.1)$$

směrodatná odchylka, s_{mv} :

$$s_{mv} = \sqrt{\frac{MS_{mezi} - MS_{uvnitř}}{n_0}}, \quad (5.2)$$

směrodatná odchylka opakovatelnosti mezi analýzami (tzv. vnitrobaničková směrodatná odchylka), s_r :

$$s_r = \sqrt{MS_{uvnitř}}. \quad (5.3)$$

Hodnoty průměrných součtů čtverců odchylek, MS_{mezi} a $MS_{uvnitř}$, získáme z analýzy rozptylu (viz následující příklad).

Příkladem vyhodnocení takto organizovaného pokusu jsou data převzatá z ISO Guide 35 [cit. 9, příloha B3]. Data jsou uvedena v tabulce 5.1.

Tabulka 5.1. Stanovení homogenity chromu ve vzorku půdy (obsah Cr v mg kg⁻¹)

Vzorek	Výsledek 1	Výsledek 2	Výsledek 3
1	121,30	128,74	119,91
2	120,87	121,32	119,24
3	122,44	122,96	123,45
4	117,60	119,66	118,96
5	110,65	112,24	110,29
6	117,29	120,79	121,42
7	115,27	121,45	117,48
8	118,96	123,78	123,29
9	118,67	116,67	114,58
10	126,24	123,51	126,20
11	128,65	122,02	121,93
12	126,54	124,72	123,14
13	122,61	128,48	126,20
14	118,95	123,82	118,11
15	118,74	118,23	117,38
16	119,74	121,78	121,01
17	121,21	123,28	116,38
18	129,30	124,10	122,02
19	136,81	129,80	128,47
20	127,81	117,66	122,90

Analýza rozptylu poskytla následující výsledky:

Zdroj variability	SS	Stupně volnosti	MS	F	F krit
mezi vzorky	1037,315	19	54,59553	6,63	1,85
mezi analýzami	329,1557	40	8,228892	–	–
celkem	1366,471	59	–	–	–

Vypočtená hodnota F je větší než kritická, takže vzorek vykazuje nehomogenitu. Vypočtená hodnota $n_0 = 3$, s_{mv} je

$$s_{mv} = \sqrt{\frac{54,55593 - 8,228892}{3}} = 3,93 \text{ mg kg}^{-1} .$$

Hodnota směrodatné odchylky opakovatelnosti, s_{opak} :

$$s_{opak} = \sqrt{8,228892} = 2,87 \text{ mg kg}^{-1} .$$

5.1.2 Stanovení nejistoty stability

Při stanovení dlouhodobé stability referenčního materiálu (RM) a odpovídající nejistoty postupujeme tak, že měříme hodnotu vlastnosti RM v závislosti na době. Pokud lineární závislost vlastnosti na čase nevykazuje významnou hodnotu směrnice (t-test), potom nejistota odpovídající dlouhodobé stabilitě je dána rovnicí

$$u_{\text{Ist}} = s_b \cdot t, \quad (5.4)$$

ve které u_{Ist} je nejistota odpovídající dlouhodobé stabilitě, s_b je směrodatná odchylka směrnice, t je expirační doba (shelf life).

Příklad pro stanovení dlouhodobé stability a její nejistoty je opět převzat z ISO Guide 35 [cit. 9], příloha B5.

Experimentální data jsou uvedena v tabulce 5.2.

Tabulka 5.2. Stabilitní studie pro vzorek půdy a obsah chromu

Čas, měsíce	w_{Cr} , mg kg ⁻¹
0	97,76
12	101,23
24	102,14
36	97,72

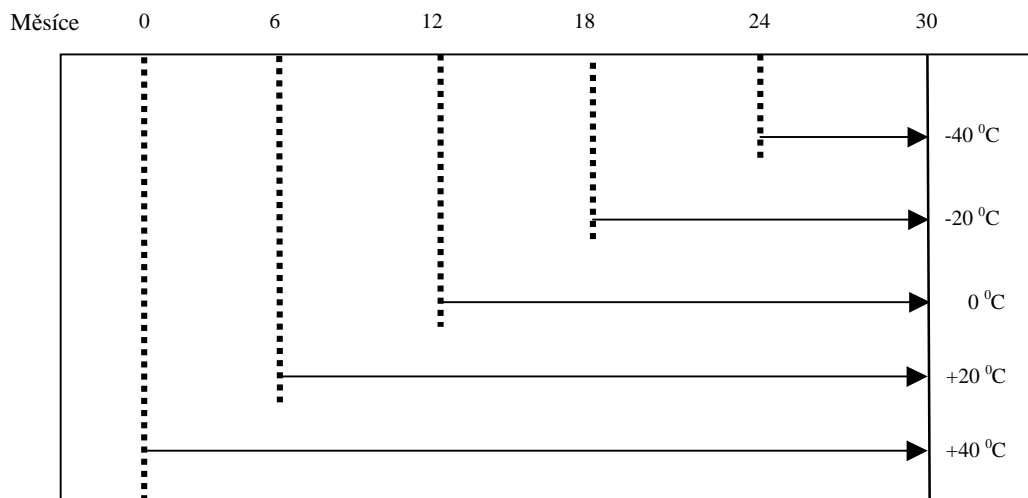
Lineární regrese výsledků předchozí tabulky poskytla tyto výsledky:

Parametr	Hodnota	Nejistota
úsek, b_0	99,594	2,362484815
směrnice, b_1	0,006583333	0,105233438

T-Test nepotvrdil významnost hodnoty směrnice, tudíž se dá konstatovat, že po dobu 36 měsíců je daný RM stabilní. Nejistota odpovídající dlouhodobé stabilitě je

$$u_{\text{Ist}} = 0,105 \cdot 36 = 3,78 \text{ mg kg}^{-1}$$

Stabilitní studie se musí provádět při různých teplotách. Potom postupujeme tzv. isochronním postupem, který je patrný z obrázku 5.1. V jednotlivých intervalech měříme hodnoty vlastností při všech teplotách za podmínek opakovatelnosti, přičemž počátky dílčích stabilitních studií se liší v závislosti na teplotě.



Obr. 5.1. Schéma isochronního postupu při stabilitní studii

5.2 Použití certifikovaných referenčních materiálů

Stanovení pravdivosti měření

Pravdivost měření se provádí porovnáním průměrné hodnoty naměřených výsledků s certifikovanou hodnotou. Můžeme postupovat dvojím způsobem:

- postupem, který je uveden v Metodickém listu č. 3, EURACHEM-ČR [2],
- výpočtem výtěžnosti (viz kapitolu Validace měřicích postupů, str. 47), ve kterém uvažujeme nejistotu CRM a opakovatelnost měřicího postupu.

5.3 Příklady ke kapitole 5

homogenita.xls obsahuje šablonu pro test homogenity referenčního materiálu (max. 20 vzorků, 5 opakování)

6 Mezilaboratorní porovnání

Výsledek analytického měření je vždy dán hodnotou měřené veličiny (látkové množství, koncentrace analytu, obsah analytu ve vzorku) a příslušnou nejistotou. Spolehlivost výsledku samozřejmě závisí na správně odhadnuté nejistotě. V souvislosti se spolehlivostí výsledku a jejich interpretacemi vyvstává celá řada otázek:

- a) Je laboratoř kompetentní a demonstrovala schopnost poskytovat spolehlivé výsledky?
- b) Můžeme výsledkům laboratoře důvěřovat?

Podle normy ISO/IEC 17025 [cit. 11] je jedním ze způsobů prokazování technické způsobilosti laboratoře účast v mezilaboratorním porovnání. Mezilaboratorní porovnání by mělo odpovědět na dvě základní otázky:

1. Jsou mé výsledky spolehlivé?
2. Je mnou odhadnutá nejistota výsledku přijatelná?

Oddíly 6.1 a 6.2 se týkají kvantitativních zkoušek, oddíl 6.3 pojednává o zkouškách kvalitativních.

6.1 Norma ISO 13528

Norma ISO 13528 [cit. 12] se týká statistického vyhodnocení zkoušení způsobilosti (PT). V této příručce se budeme zabývat pouze statistickými nástroji, které se v PT používají.

Hlavními body zmíněné normy jsou:

1. Určení vztažné (přiřazené) hodnoty charakteristiky vzorku pro PT
2. Určení nejistoty hodnoty charakteristiky
3. Určení směrodatné odchylky pro vyhodnocování PT
4. Určení výkonových statistik, charakterizující účast laboratoří v PT

Určení vztažné (přiřazené) hodnoty a její nejistoty

Vztažnou (přiřazenou) hodnotu charakteristiky můžeme získat několika způsoby, z nichž pouze některé lze doporučit organizátorům PT. Dále uvedeme jenom doporučené způsoby:

- a) Vztažná hodnota je definována (umělou) *přípravou*, např. ředěním standardních roztoků, mícháním standardních roztoků a dalších látek, simulující matrici vzorku. Nejistota vztažné hodnoty se potom odhadne pomocí zákona o propagaci nejistot. Postup je popsán v Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement [13].
- b) Při použití certifikovaného referenčního materiálu (CRM) je vztažnou hodnotou certifikovaná hodnota, nejistotou certifikovaná nejistota.
- c) Při použití QCM (Quality Control Material, viz kapitolu 9) jsou vztažná hodnota a její nejistota přímo dány charakteristikami QCM.

- d) Pokud expertní laboratoře stanovují pro organizátora PT příslušné charakteristiky, potom vztažná hodnota je hodnota dohodnutá expertními laboratořemi (např. robustní průměr) a nejistota vzorku pro PT se počítá podle vztahu

$$u_x = 1,23 \sqrt{\sum_{i=1}^p \frac{u_i^2}{p}} \quad (6.1)$$

ve kterém p je počet expertních laboratoří, u_i jsou nejistoty výsledků jednotlivých laboratoří.

Určení směrodatné odchylky pro vyhodnocování PT

Směrodatná odchylka s se pro vyhodnocování PT odhaduje několika způsoby:

- s je dána legislativou nebo jinými požadavky,
- s je určena zkušenostmi organizátora,
- směrodatnou odchylku odhadneme pomocí Horwitzova vztahu

$$s = 0,02 \cdot c^{0,8495} \quad (6.2)$$

ve kterém c je hmotnostní obsah v mg kg^{-1} ,

- z výsledků studie reprodukovatelnosti podle ISO 5725-2 [cit. 14]; s je směrodatná odchylka reprodukovatelnosti.

Určení výkonových statistik

Doporučené výkonové statistiky jsou následující:

- rozdíl laboratoře, D :

$$D = x - X \quad (6.3)$$

kde x je výsledek laboratoře, X je vztažná hodnota;

- relativní rozdíl laboratoře, $D_{\%}$

$$D_{\%} = 100 \cdot (x - X) / X \quad (6.4)$$

- z -skóre, z

$$z = (x - X) / s \quad (6.5)$$

kde s je směrodatná odchylka určená organizátorem pro vyhodnocení PT,

- ζ -skóre, ζ

$$\zeta = \frac{(x - X)}{\sqrt{u_x^2 + u_X^2}} \quad (6.6)$$

kde u_x je standardní nejistota výsledku laboratoře, u_X je standardní nejistota vztažné hodnoty,

- číslo E_n

$$E_n = \frac{(x - X)}{\sqrt{U_x^2 + U_X^2}} \quad (6.7)$$

kde U_x je rozšířená nejistota výsledku laboratoře, U_x je rozšířená nejistota vztažné hodnoty.

6.2 Harmonizovaný protokol IUPAC

Organizace IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) vydala v roce 2006 doporučení [19] (IUPAC Technical Report), v anglickém znění „The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories“, ve kterém je podrobně vysvětlena problematika mezilaboratorního porovnávání. Tuto informaci uvádíme pro čtenáře, kteří se podrobně chtějí seznámit s problematikou PT jak z hlediska technického provedení, tak se způsoby vyhodnocování a interpretace.

6.3 Kvalitativní zkoušky

Mezilaboratorní testy se i v oblasti kvalitativní analýzy musí řídit stejnými pravidly, jakými se řídí testy pro kvantitativní stanovení. Některé zvláštnosti jsou zdůrazněny v následujících bodech:

- Mezilaboratorní testy jsou organizovány v oblasti nízkých koncentrací nebo v oblastech legislativních limitů, kde jsou pravděpodobné falešně pozitivní a falešně negativní výsledky.
- Falešně pozitivní (FP) a falešně negativní (FN) výsledky jsou zahrnuty do zpracování pomocí z-skóre.
- Účastníci mezilaboratorních testů musí prezentovat výsledky jednoznačně v binárním vyjádření (ano/ne, pod limitem/nad limitem).
- Statistická expertíza výsledků je povinnou součástí mezilaboratorních testů.

Je důležité distribuovat více vzorků s určitým poměrem pozitivních a negativních vzorků. Účastníci musí znát rozsah nespolehlivosti (C_0 , C_1) pro danou analýzu, aby mohli správně klasifikovat jednotlivé vzorky.

Tabulka 6.1. Simulované výsledky mezilaboratorního testu (0 – správná odpověď; 1 – chybná odpověď)

Vzorek	Lab 1	Lab 2	Lab 3	Lab 4
A(+)	0	0	0	1
B(+)	0	0	1	0
C(-)	0	1	0	0
D(-)	0	0	0	1
E(-)	0	0	0	0
F(-)	0	0	0	0
G(+)	0	0	0	0
H(-)	0	0	1	0
I(-)	0	0	0	1
J(-)	0	0	0	0

Tabulka 6.1 ukazuje výsledky hypotetického testu pro 4 laboratoře. Příklad byl převzat z literatury [15]. Správná klasifikace je uvedena v závorce u jednotlivých vzorků. Kromě klasického zpracování pomocí z-skóre a odvozených veličin je výhodné posuzovat laboratoře podle úspěšnosti pozitivních odpovědí (% T).

V následující tabulce 6.2 jsou vypočteny některé parametry posuzování PT.

Tabulka 6.2. z-Skóre a další parametry posuzování

	Lab 1	Lab 2	Lab 3	Lab 4
T, %	100	90	80	70
SZ	0	1	2	3
RSZ = SZ / \sqrt{n}	0	0,32	0,63	0,95
SZ, %	0	10	20	30
RSZ, %	0	1	2	3
posouzení	výborné	akceptovatelné	akceptovatelné	nevyhovující

Veličina SZ je definována vztahem

$$SZ = \sum_n z_i \quad (6.8)$$

ve kterém n je počet vyšetřovaných vzorků. V tabulce 6.1 je počet vzorků n = 10.

Pro veličinu RSZ platí

$$RSZ = SZ / \sqrt{n} \quad (6.9)$$

Veličinu SZ můžeme extrapolovat (normovat) ke sto vzorkům (n = 100). Z této veličiny vypočteme podle vztahu (6.9) normovanou veličinu RSZ (%). Tato veličina slouží k posuzování úspěšnosti laboratoře podle stejných pravidel jako v kvantitativní analýze.

Úspěšnosti laboratoří se posuzují podle stejných pravidel jako v kvantitativní analýze.

7 Kontingenční tabulky

Používání kontingenčních tabulek je nejvíce rozšířené při vyhodnocování epidemiologických studií, tedy v oblasti medicínského výzkumu.

Mějme dvojrozměrný náhodný vektor $\mathbf{X} = (Y, Z)$ takový, že Y může nabývat pouze hodnot $1, 2, \dots, r$ a Z hodnot $1, 2, \dots, c$. Označme pravděpodobnosti

$$p_{ij} = P(Y = i, Z = j) \quad (7.1)$$

$$p_{i.} = P(Y = i) = \sum_{j=1}^c p_{ij} \quad \text{a} \quad p_{.j} = P(Z = j) = \sum_{i=1}^r p_{ij} \quad (7.2)$$

Uvažujme nyní výběr o rozsahu n , ve kterém výše zmíněné pravděpodobnosti zaměníme četnostmi n_{ij} . Výsledky můžeme zapsat ve tvaru tzv. kontingenční tabulky (tabulka 7.1).

Tabulka 7.1. Kontingenční tabulka pro výběr rozsahu n

Y	Z				Σ
	1	2	...	c	
1	n_{11}	n_{12}	...	n_{1c}	$n_{1.}$
2	n_{21}	n_{22}	...	n_{2c}	$n_{2.}$
...
r	n_{r1}	n_{r2}	...	n_{rc}	$n_{r.}$
Σ	$n_{.1}$	$n_{.2}$...	$n_{.c}$	n

Marginální četnosti $n_{i.}$ a $n_{.j}$ jsou definovány rovnicemi

$$n_{i.} = \sum_{j=1}^c n_{ij} \quad \text{a} \quad n_{.j} = \sum_{i=1}^r n_{ij} \quad (7.3)$$

Nejčastěji se v kontingenčních tabulkách testuje hypotéza H_0 , že veličiny Y a Z jsou nezávislé. Pro zamítnutí hypotézy H_0 musí platit, že vypočtená hodnota χ^2 je větší než $\chi^2\{\alpha; (r-1)(c-1)\}$. Hodnotu χ^2 vypočteme z kontingenční tabulky podle vztahu

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^c \frac{\left(n_{ij} - \frac{n_{i.} n_{.j}}{n} \right)^2}{\frac{n_{i.} n_{.j}}{n}} \quad (7.4)$$

Nejjednodušší a nejčastěji používanou tabulkou v epidemiologických studiích je tzv. čtyřpolní tabulka, ve které veličiny Y a Z mohou nabývat pouze dvou hodnot (viz tabulku 7.2).

Tabulka 7.2. Čtyřpolní kontingenční tabulka pro výběr rozsahu n

Y	Z		Σ
	1	2	
1	n ₁₁	n ₁₂	n _{1.}
2	n ₂₁	n ₂₂	n _{2.}
Σ	n _{.1}	n _{.2}	n

Hodnotu χ^2 vypočteme z kontingenční tabulky podle vztahu

$$\chi^2 = n \frac{(n_{11}n_{22} - n_{12}n_{21})^2}{n_{1.}n_{2.}n_{.1}n_{.2}} \quad (7.5)$$

Pokud platí, že χ^2 je větší než $\chi^2\{\alpha;1\}$, zamítneme hypotézu o nezávislosti veličin Y a Z. Tento test je vhodný pro poměr $n_i n_j / n > 5$.

Příklad

U 27 náhodně vybraných pacientů bylo zjišťováno, zda byly proti určité chorobě očkovaní a jaký má choroba průběh, tj. zda průběh choroby závisí na očkovaní. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce:

Tabulka 7.3. Výsledky experimentu

Očkování	Průběh choroby		Σ
	lehký	těžký	
ano	10	2	12
ne	4	11	15
Σ	14	13	27

$$\chi^2 = 27 \cdot \frac{(10 \cdot 11 - 4 \cdot 2)^2}{12 \cdot 15 \cdot 14 \cdot 13} = 8,57 \quad \chi^2(0,05;1) = 3,84$$

Hypotéza H₀ se zamítá, tzn.. průběh choroby závisí na očkovaní.

Čtyřpolní kontingenční tabulku můžeme využít také pro odhad nejistoty kvalitativních testů. Tato problematika byla řešena v Kvalimetrii 13, kapitola 7. Uveďme jen nejdůležitější poznatky, charakterizované čtyřpolní tabulkou pro kvalitativní test určitého analytu (tabulka 7.4).

Tabulka 7.4. Kontingenční tabulka pro kvalitativní test

Důkaz	Reálná situace	
	analyt přítomen	analyt nepřítomen
pozitivní	TP	FP
negativní	FN	TN

Vysvětlivky:

TP – skutečně pozitivní výsledek znamená, že výsledek testu je pozitivní za předpokladu, že analyt je přítomen

TN – skutečně negativní výsledek znamená, že výsledek testu je negativní za předpokladu, že analyt není přítomen

FP – falešně pozitivní výsledek znamená, že výsledek testu je pozitivní za předpokladu, že analyt není přítomen

FN – falešně negativní výsledek znamená, že výsledek testu je negativní za předpokladu, že analyt nepřítomen

Na základě této kontingenční tabulky můžeme charakterizovat dvě hlavní charakteristiky testu, které mohou být použity pro odhad nejistoty výsledku kvalitativního měřicího postupu.

Citlivost
$$SEN = \frac{TP}{TP + FN} \quad (7.6)$$

Specifičnost
$$SP = \frac{TN}{TN + FP} \quad (7.7)$$

Příklad

Testováno bylo 223 osob na přítomnost určité substance charakterizující chorobu. Z toho 108 osob vykazovalo pozitivní test, přičemž u 8 osob této skupiny nebyla choroba prokázána jiným způsobem. Negativní test byl prokázán u 105 prokazatelně zdravých jedinců. Vypočítejte citlivost a specifičnost testu.

Kontingenční tabulka pro tento příklad je zobrazena v tabulce 7.5.

Tabulka 7.5. Kontingenční tabulka pro charakterizaci testu

Test	Choroba		Σ
	ano	ne	
pozitivní	100	8	108
negativní	10	105	115
Σ	110	113	223

$$SEN = \frac{100}{100 + 10} = 0,909$$

$$SP = \frac{105}{105 + 8} = 0,929$$

Příklad

Epidemiologická studie výrobce testu pro stanovení protilátky IgG proti *Toxoplasma gondii*.

Testováno 919 prokazatelně zdravých jedinců (předpoklad), bylo nalezeno 6 pozitivních výsledků.

Testováno 606 prokazatelně toxikovaných jedinců, byly nalezeny 4 negativní výsledky.

Kontingenční tabulka vypadá takto:

Výsledek testu	IgG přítomen	IgG nepřítomen
pozitivní výsledek	602	6
negativní výsledek	4	913

$$SEN = \frac{602}{602 + 4} = 0,993$$

$$SP = \frac{913}{913 + 6} = 0,993$$

Čtyřpolní tabulka se dá využít pro porovnání nově vypracovaného klinického postupu testování ke konfirmačnímu (referenčnímu) postupu. Postup je naznačen v tabulce 7.6:

Tabulka 7.6. Kontingenční tabulka pro porovnání dvou postupů

Referenční postup	Nový postup		součet
	pozitivní výsledek	negativní výsledek	
pozitivní výsledek	n_{11}	n_{12}	$n_{1.}$
negativní výsledek	n_{21}	n_{22}	$n_{2.}$
součet	$n_{.1}$	$n_{.2}$	–

Test pro významný rozdíl mezi dvěma metodami (ověření nulové hypotézy H_0 : není rozdíl) můžeme provést dvěma způsoby.

1. McNemarovým testem (χ^2 test) [16]

$$\chi^2 = \frac{(|n_{12} - n_{21}| - 1)^2}{n_{12} + n_{21}} \quad (7.8)$$

H_0 platí na hladině významnosti 5 %, je-li $\chi^2 < 3,84$.

2. Výpočtem kappa koeficientu, κ [16]

Pro výpočet koeficientu κ potřebujeme znát některé veličiny:

$$p_0 = (n_{11} + n_{22}) / n \quad (7.9)$$

$$p_e = [(n_{1.} \cdot n_{.1}) + (n_{2.} \cdot n_{.2})] / n^2 \quad (7.10)$$

$$\kappa = \frac{p_0 - p_e}{1 - p_e} \quad (7.11)$$

Hodnocení H_0 :	$\kappa \leq 0,20$	neshoda
	$\kappa \in \{0,21-0,40\}$	špatná shoda
	$\kappa \in \{0,41-0,60\}$	mírná shoda
	$\kappa \in \{0,61-0,80\}$	dobrá shoda
	$\kappa > 0,80$	vynikající shoda

7.1 Příklady ke kapitole 7

sen_sp.xls obsahuje šablonu pro výpočet parametru citlivosti a specifčnosti klinického testu

porovnaní.xls obsahuje šablonu pro porovnání dvou klinických metod

8 Vícerozměrné metody

8.1 Kovarianční matice a testy hypotéz

Základním podkladem pro vícerozměrnou analýzu je datová matice typu $(n \times p)$. Řádky odpovídají jednotlivým studovaným objektům (n), sloupce jednotlivým zjišťovaným znakům p (příznakům, pozorovaným proměnným). Tohoto značení budeme v dalším důsledně používat. Datovou experimentální matici budeme označovat \mathbf{X} , popř. \mathbf{Y} .

Prvek datové matice \mathbf{X} , x_{ij} , je hodnota j tého příznaku ($j = 1, 2, \dots, p$) zjištěná u i tého prvku ($i = 1, 2, \dots, n$). Vektor datové matice \mathbf{X} , \mathbf{x}_i , nazveme *obrazem*.

Tak např. pro datovou matici

3	7
5	6
6	8
7	10
9	9

kteřá je charakterizována dvěma příznaky, je prvním obrazem vektor \mathbf{x}_1 (3 7), pátým obrazem vektor \mathbf{x}_5 (9 9).

Studované objekty bývají předměty (vzorky), události, instituce (laboratoř), apod. Používání statistických metod vyžaduje, aby byl studován přiměřeně rozsáhlý soubor objektů. Vedle pojmu objekt budeme používat také pojmy jednotka, individuum nebo prvek.

Typickým cílem statistické analýzy je poznání vlastností objektů, popř. závislostí mezi těmito vlastnostmi. O úspěchu zjišťování přitom mimo jiné rozhoduje to, jak se podaří vyjádřit měřitelnými znaky jednotlivé vlastnosti, o které se zajímáme. Různorodý charakter zkoumaných proměnných je běžným jevem ve všech aplikacích vícerozměrné statistické analýzy. Jako příklad lze uvést záznam o kontrole kvality výrobku, protokoly o kontrole stavu životního prostředí, atd. Klasifikace proměnných a klasifikace objektů je velice složitý problém. V dalším se budeme zabývat základy klasifikací proměnných a objektů, které se uplatňují při interpretaci dat, hlavně z oblasti životního prostředí a medicíny.

Příznaky, měřené veličiny, můžeme rozdělit podle toho, zda popisují kvalitativní nebo kvantitativní charakteristiky objektů.

Nyní si definujeme a objasníme pojem kovarianční matice. Při definici budeme vycházet z již definované datové matice \mathbf{X} s prvky x_{ij} ($j = 1, \dots, p$; $i = 1, \dots, n$), p je počet příznaků.

Kovarianční matice, \mathbf{S} , je potom definována vztahem (pozor! ve vzorci jsou \mathbf{x}_i obrazy, tedy vektory)

$$\mathbf{S} = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (\mathbf{x}_i - \bar{\mathbf{x}})(\mathbf{x}_i - \bar{\mathbf{x}})^T \quad (8.1)$$

(index T je znakem transpozice vektoru nebo matice).

V Excelu se dá kovarianční matice vypočítat. Vzhledem k tomu, že v různých verzích se používá jiný jmenovatel ve vztahu pro výpočet (buď $n - 1$ nebo n), naučíme se počítat kovarianční matice sami.

Pro matici

3	7
5	6
6	8
7	10
9	9

vypočítáme nejprve vektor průměrů $\bar{\mathbf{x}}$ (pozor, dohodli jsme se, že vektory budou sloupcové):

$$\bar{\mathbf{x}}: \begin{matrix} 6 \\ 8 \end{matrix}$$

takže první řádek vektoru průměru odpovídá prvnímu příznaku (první sloupec datové matice), druhý řádek druhému příznaku.

Kovarianční matice bude mít dva řádky a dva sloupce, bude to tedy vždy čtvercová matice.

Prvky na hlavní diagonále se vypočítají podle vztahu

$$s_{jj} = s_j^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_{ij} - \bar{x}_j)^2 \quad (8.2)$$

a na vedlejší diagonále podle vztahu

$$s_{j\bar{j}} = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_{ij} - \bar{x}_j)(x_{i\bar{j}} - x_{j\bar{j}}) \quad (8.3)$$

(to druhé j má čárku jako index, asi to je špatně vidět).

Zkusme spočítat kovarianční matici:

$$s_{11} = (1/4)[(3-6)^2 + (5-6)^2 + (6-6)^2 + (7-6)^2 + (9-6)^2] = 5$$

$$s_{22} = (1/4)[(7-8)^2 + (6-8)^2 + (8-8)^2 + (10-8)^2 + (9-8)^2] = 2,5$$

$$s_{12} = s_{21} = (1/4)[(3-6)(7-8) + (5-6)(6-8) + (6-6)(8-8) + (7-6)(10-8) + (9-6)(9-8)] = 2,5$$

Kovarianční matice má tvar:

$$\mathbf{S} \begin{matrix} 5 & 2,5 \\ 2,5 & 2,5 \end{matrix}$$

Zkuste si porovnat tento výpočet s výpočtem v Excelu, abyste zjistili, jaký vztah používá váš software. Může se lišit ve jmenovateli, buďto má jmenovatel hodnotu 4 (správně) nebo 5 (nesprávně). Přepočtení je jasné. V Excelu najdete výpočet kovarianční matice pod nabídkou Nástroje / Analýza dat / Kovariance.

Uvažujme nyní experiment, v němž je vyšetřován vliv jednoho faktoru, např. A. Datová matice \mathbf{X} je rozdělena na k submatic, které odpovídají k skupinám lišícím se úrovní faktoru. Nejprve testujme hypotézu, že kovarianční submatice se neliší, tedy

$$H_0 : \mathbf{S}_1 = \mathbf{S}_2 = \dots = \mathbf{S}_k$$

Pro testování použijeme test, který je obdobou Bartlettova testu a nazývá se Boxův test.

Ve vzorcích bude p počet proměnných (příznaků) ($p > 1$), \mathbf{S}_h je vnitroskupinová výběrová kovarianční matice ($h = 1, 2, \dots, k$).

8.2 Boxův test

$$B = \frac{1}{C_p} [(n - k) \ln[\det(\bar{\mathbf{S}})] - \sum_{h=1}^k (n_h - 1) \ln[\det(\mathbf{S}_h)]] \quad (8.4)$$

$$\bar{\mathbf{S}} = \frac{\sum_{h=1}^k \mathbf{S}_h (n_h - 1)}{n - k} \quad (8.5)$$

$$C_p = 1 + \frac{2p^2 + 3p - 1}{6(k-1)(p+1)} \left[\left(\sum_{h=1}^k \frac{1}{n_h - 1} \right) - \frac{1}{n - k} \right] \quad (8.6)$$

Pro testování platnosti uvedené hypotézy zvolíme testovací kritérium B , které má χ^2 rozdělení. Hypotéza platí, je-li $B < \chi^2_{(1-\alpha)}[(k-1)p(p+1)/2]$.

8.3 Ověření úplné nezávislosti zkoumaných proměnných

Ve vícerozměrných úlohách je vždy důležité ověřit nezávislost proměnných veličin (příznaků). Pro toto ověření používáme tak zvané kritérium K .

Vypočteme výběrovou korelační matici všech dat (viz Excel, nabídka Nástroje / Analýza dat / Korelace) a vypočteme kritérium K :

$$K = -n \ln \det(\mathbf{R}) \quad (8.7)$$

ve kterém \mathbf{R} je výběrová korelační matice všech n dat. Příznaky jsou statisticky nezávislé, pokud $K < \chi^2_{(1-\alpha)}[p(p-1)/2]$.

Analýza rozptylu – jednofaktoriální, vícerozměrná ($p > 1$) MANOVA

Mějme datovou matici \mathbf{X} , kterou lze rozdělit na k submatic, odpovídající skupinám, které se liší úrovní faktoru. V matici je definován vektor pozorování \mathbf{x}_{hi} ($h \in \langle 1, k \rangle$; $i \in \langle 1, n_h \rangle$), ve kterém n_h je počet vícerozměrných individuálních pozorování v jednotlivých skupinách. Složky vektoru individuálních pozorování x_{hij} jsou složky vektoru pozorování ($j \in \langle 1, p \rangle$); $n = \sum_k n_h$).

Rozklad celkové variability

$$\mathbf{T} = \mathbf{B} + \mathbf{E} \quad (8.8)$$

\mathbf{T} je matice celkové variability dat; \mathbf{B} je matice meziskupinové variability (vliv faktoru, třídící hledisko); \mathbf{E} je matice vnitroskupinové variability (residuální).

Rovnice pro výpočet jednotlivých matic

Skupinové vektory průměrů:

$$\bar{\mathbf{x}}_h = \frac{1}{n_h} \sum_{i=1}^{n_h} \mathbf{x}_{hi} \quad (8.9)$$

Výběrová skupinová kovarianční matice \mathbf{S}_h

$$\mathbf{S}_h = \frac{1}{n_h - 1} \sum_{i=1}^{n_h} (\mathbf{x}_{hi} - \bar{\mathbf{x}}_h)(\mathbf{x}_{hi} - \bar{\mathbf{x}}_h)^\top \quad (8.10)$$

Celkový vektor průměrů

$$\bar{\mathbf{x}} = \frac{1}{n} \sum_{h=1}^k n_h \bar{\mathbf{x}}_h \quad (8.11)$$

Matice \mathbf{T}

$$\mathbf{T} = \sum_{h=1}^k \sum_{i=1}^{n_h} (\mathbf{x}_{hi} - \bar{\mathbf{x}})(\mathbf{x}_{hi} - \bar{\mathbf{x}})^\top \quad (8.12)$$

Matice \mathbf{B}

$$\mathbf{B} = \sum_{h=1}^k n_h (\bar{\mathbf{x}}_h - \bar{\mathbf{x}})(\bar{\mathbf{x}}_h - \bar{\mathbf{x}})^\top \quad (8.13)$$

Matice \mathbf{E}

$$\mathbf{E} = \sum_{h=1}^k (n_h - 1) \mathbf{S}_h \quad (8.14)$$

Test hypotézy $H_0 = \boldsymbol{\mu}_1 = \boldsymbol{\mu}_2 = \dots = \boldsymbol{\mu}_k$

$$F = \frac{n - k - p + 1}{(k - 1)p} \text{st}(\mathbf{BE}^{-1}) \quad (8.15)$$

Hypotéza platí, jestliže

$$F < F_{(1-\alpha)}(v_1; v_2)$$

kde

$$v_1 = \frac{(k-1)p(n-k-p)}{n-2-(k-1)p} \quad (8.16)$$

a

$$v_2 = n - k - p + 1 \quad (8.17)$$

a $\text{st}(\mathbf{BE}^{-1})$ je stopa matice \mathbf{BE}^{-1} , což je součet prvků na hlavní diagonále matice.

8.4 Lineární diskriminační analýza

Metody vícerozměrné analýzy (MANOVA, testy hypotéz), které jsme dosud probírali, byly v podstatě zobecněním známých metod jednorozměrné statistiky. Téma, kterým se budeme nyní zabývat, je typické pro vícerozměrnou analýzu. Jedná se o *lineární diskriminační analýzu*, LDA. Analýza LDA je příklad tzv. klasifikace s učitelem. To znamená, že na základě známé klasifikace jsme schopni vytvořit „učící“ algoritmus, který nám potom dovolí klasifikovat neznámé objekty.

Diskriminační analýza se zabývá závislostí jedné kvalitativní proměnné na několika kvantitativních proměnných. Kvalitativní proměnná může přitom nabývat několika variant. Může to být např. ložisko ropy, zdroj materiálů (např. v archeologii), skupina pacientů s danou diagnózou, atd.

Začneme nejprve s příkladem, který sice přichází v úvahu zřídka, na kterém si ale vysvětlíme základní pojmy a princip diskriminační analýzy. Jedná se o rozdělení datové matice na dvě skupiny, kvalitativní proměnná může nabývat pouze dvou variant. Jedná se tedy o alternativní proměnnou.

Datová matice \mathbf{X} o n objektech je rozdělena na dvě části. Počet objektů x (charakterizovaných p kvantitativními veličinami, příznaky), patřící do první skupiny, je n_1 , počet objektů patřící do druhé skupiny je n_2 . Označme si jev „příslušnost k h té skupině“ jako A_h ($h = 1, 2$) a dále si označme symbolem π_h *apriorní pravděpodobnost* příslušnosti objektu k h té skupině. V našem jednoduchém příkladu máme tedy dvě *apriorní pravděpodobnosti* π_1 a π_2 , definované jako

$$\pi_1 = P(A_1) \quad \text{a} \quad \pi_2 = P(A_2)$$

Jakmile u některého objektu známe výsledky měření, můžeme definovat *aposteriorní pravděpodobnosti* příslušnosti objektu k dané skupině. *Aposteriorní pravděpodobnost* je vlastně podmíněná pravděpodobnost $P(A_h | x)$, kterou můžeme vypočítat pro každý objekt x ze znalosti hustot pravděpodobnosti $f_1(x)$ a $f_2(x)$ podle tzv. Bayesova pravidla:

$$P(A_h | x) = \frac{\pi_h f_h(x)}{\pi_1 f_1(x) + \pi_2 f_2(x)} \quad (8.18)$$

Nabízí se potom jednoduché rozhodovací pravidlo: zařadit objekt do té skupiny, u které je *aposteriorní pravděpodobnost* příslušnosti ke skupině vyšší.

Bayesovo pravidlo je jednoduché klasifikační pravidlo, které ovšem předpokládá znalosti *apriorních pravděpodobností* π_h a znalost hustot pravděpodobnosti $f_h(x)$. To zas tak jednoduché není.

Jak je to v přírodních vědách obvyklé, budeme předpokládat, že statistické rozdělení objektů v první skupině je $N_p(\boldsymbol{\mu}_1; \mathbf{C}_1)$, ve druhé skupině $N_p(\boldsymbol{\mu}_2; \mathbf{C}_2)$, tedy v obou případech normální s vektorem středních hodnot $\boldsymbol{\mu}_i$ a kovariančními maticemi \mathbf{C}_i . Obecně můžeme hustotu pravděpodobnosti vyjádřit vztahem:

$$f(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi|\mathbf{C}|}} \exp\left(-\frac{1}{2}(x - \boldsymbol{\mu})^T \mathbf{C}^{-1} (x - \boldsymbol{\mu})\right) \quad (8.19)$$

Podle Bayesova rozhodovacího pravidla zařadíme objekt do první skupiny, jestliže

$$\pi_1 f_1(x) > \pi_2 f_2(x),$$

jinak jej zařadíme do druhé skupiny.

Tuto nerovnici můžeme přepsat do tvaru

$$\frac{f_1(\mathbf{x})}{f_2(\mathbf{x})} > \frac{\pi_1}{\pi_2}. \quad (8.20)$$

Předpokládáme-li rovnost kovariančních matic celé datové matice \mathbf{X} a skupin 1 a 2 (viz Boxův test), můžeme bez odvození přepsat předchozí rovnici na tvar

$$L(x) = -\gamma \quad (8.21)$$

kde $L(x)$ je *lineární diskriminační funkce*

$$L(x) = \boldsymbol{\beta}^T x = [(\boldsymbol{\mu}_1 - \boldsymbol{\mu}_2)^T \mathbf{C}^{-1}] x \quad (8.22)$$

a

$$\gamma = -\frac{1}{2}\beta^T(\mu_1 + \mu_2) - \ln \frac{\pi_1}{\pi_2} \quad (8.23)$$

Algoritmus výpočtu LDA pro dvě skupiny:

1. Odhadneme apriorní pravděpodobnosti, podle principu neurčitosti volíme $\pi_1 = \pi_2 = 0,5$.
2. Datovou matici $\mathbf{X}(n \times p)$ rozdělíme na dvě skupiny podle variant kvalitativní proměnné.
3. Vypočteme skupinové vektory výběrových průměrů $\bar{\mathbf{x}}_1$ a $\bar{\mathbf{x}}_2$, výběrové kovarianční matice \mathbf{S}_1 a \mathbf{S}_2 a výběrovou kovarianční matici celé datové matice \mathbf{S} .
4. Ověříme shodu výběrových kovariančních matic (Boxův test).
5. Vypočteme odhad vektoru β : $\mathbf{b}^T = (\bar{\mathbf{x}}_1 - \bar{\mathbf{x}}_2)\mathbf{S}^{-1}$.
6. Vypočteme odhad konstanty γ : $c = -\frac{1}{2}\mathbf{b}^T(\bar{\mathbf{x}}_1 + \bar{\mathbf{x}}_2) - \ln \frac{\pi_1}{\pi_2}$.
7. Přesvědčíme se o správnosti klasifikace tak, že vybereme náhodně jeden objekt z první skupiny (itý objekt a vypočteme hodnotu diskriminační statistiky A_i :

$$A_i = \mathbf{b}^T \mathbf{x}_i + c \quad (8.24)$$

Pokud hodnota A_i bude kladná, je objekt správně zařazen do 1. skupiny. To samé provedeme s jedním náhodně zvoleným objektem (jtý objekt) z druhé skupiny. V tomto případě musí být hodnota A_j záporná. Správný postup je takto ocenit všechny objekty a vypočítat účinnost diskriminace jako podíl správně zařazených objektů ke všem objektům. Říká se tomu resubstituční postup.

Nyní si zobecníme náš postup pro více skupin.

8.5 Lineární diskriminační analýza pro více skupin ($k > 2$)

Algoritmus výpočtu

1. Výpočet vektorů středních hodnot pro všechny skupiny, výběrové kovarianční matice \mathbf{S}_h pro všechny skupiny, průměrné kovarianční matice \mathbf{S} a její inverze:

$$\bar{\mathbf{x}}_h ; \quad \bar{\mathbf{S}} = \frac{\sum_{h=1}^k \mathbf{S}_h (n_h - 1)}{n - k} \quad (8.25)$$

2. Odhad π_h (např. pro $k = 3$, budou všechny $\pi_h = 0,33$).
3. Výpočet vektoru \mathbf{a} a konstanty k_h pro všechny skupiny

$$\mathbf{a}_h^T = \bar{\mathbf{x}}_h^T \bar{\mathbf{S}}^{-1} \quad (8.26)$$

$$k_h = \ln \pi_h - \frac{1}{2} \mathbf{a}_h^T \bar{\mathbf{x}}_h \quad (8.27)$$

4. Klasifikace neznámého objektu, popsaného vektorem pozorování \mathbf{x} diskriminační skóre Ψ_h

$$\Psi_h = \mathbf{a}_h^T \mathbf{x} + k_h \quad (8.28)$$

Nejvyšší diskriminační skóre pro htou skupinu odpovídá zařazení objektu do hté třídy.

Používání programu MS-Excel pro účely multivariační analýzy v jednoduché formě, jak je presentováno v této příručce, není příliš vhodné a vyžaduje větší zkušenosti s Excelem. V přílohách řešených příkladů uvádíme pro multivariační analýzu i výsledky, získané programovým souborem XLSTAT, který pracuje na pozadí Excelu. Tento programový soubor je autorem Kvalimetrie používán již řadu let a lze ho jen doporučit. Bližší informace o koupi programového balíku XLSTAT a jeho aplikacích získáte na webové stránce www.xlstat.com.

8.6 Příklady ke kapitole 8

multivariacni analyza.xls obsahuje řešený příklad pro zpracování dat metodami multivariační analýzy podle kapitoly 8; obsahuje výstup programu XLSTAT pro stejná vstupní data

9 Používání referenčních materiálů při řízení kvality (ISO Guide 80)

ISO/CD Guide 80 Commercial and in-house production of non-certified reference materials, verze říjen 2007 [cit. 17], byl pokusem komise pro referenční materiály ISO/REMCO o vytvoření pokynu jak připravovat a charakterizovat referenční materiály pro řízení kvality (QCM). Na posledním zasedání ISO/REMCO v červenci 2009 bylo rozhodnuto o pozastavení prací do té doby, až bude se zněním pokynu všeobecný souhlas.

V této příručce využijeme dostupné informace, abychom ukázali možnosti přípravy vnitrolaboratorních maticových referenčních materiálů, používaných v laboratořích např. pro tvorbu regulačních diagramů, pro zjištění některých validačních parametrů (robustnost, opakovatelnost, reprodukovatelnost) a při mezilaboratorních pokusech.

Pro demonstraci testů homogenity, stability a odhadu nejistoty charakteristik referenčních materiálů použijeme příklady, které jsou uvedeny v citované verzi ISO/CD Guide 80.

9.1 Homogenita

Homogenita referenčního materiálu významně přispívá k celkové nejistotě hodnoty charakteristiky. Měřenou veličinu analyzujeme vhodným měřicím postupem. Jako příklad zvolíme testování homogenity laktózy v potravinové matrici. Výsledky testování jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 9.1. Vstupní matrice pro test homogenity. Počet opakování $r = 2$, hmotnostní obsah laktózy, w , g/g

Jednotka RM	Opakování 1	Opakování 2	Průměr	Rozptyl
1	7,98	7,88	7,930	0,00500
2	7,93	7,86	7,895	0,00245
3	7,50	7,61	7,555	0,00605
4	7,28	7,65	7,465	0,06845
5	7,38	7,62	7,500	0,02880
6	7,46	7,51	7,485	0,00125
7	7,48	7,39	7,435	0,00405
8	7,66	7,48	7,570	0,01620
9	7,79	7,51	7,650	0,03920
10	7,42	7,25	7,335	0,01445

Analýza rozptylu

Výstup z Excelu

Zdroj variability	SS	Stupně volnosti	MS	F	F krit
mezi vzorky	0,67402	9	0,074891	4,029	3,02
mezi analýzami	0,18590	10	0,018590	–	–
celkem	0,85992	19	–	–	–

Vzhledem k tomu, že vypočtená hodnota F (4,029) je větší než příslušný kvantil F-rozdělení (3,02), můžeme konstatovat nehomogenitu materiálu na 5% hladině významnosti.

Mezivýběrová (mezi vzorky) směrodatná odchylka, s_{mv} , se vypočte podle vztahu

$$s_{mv} = \sqrt{\frac{MS_{mezi} - MS_{uvnitř}}{r}} = \sqrt{\frac{0,07489 - 0,01859}{2}} = 0,168 \quad (9.1)$$

Směrodatná odchylka opakovatelnosti, s_{opak} , je dána vztahem

$$s_{opak} = \sqrt{MS_{uvnitř}} = \sqrt{0,01859} = 0,136 \quad (9.2)$$

Nejistota odpovídající homogenitě je dána větší hodnou z obou směrodatných odchylek, tedy

$$u_{hom} = 0,168$$

9.2 Dlouhodobá stabilita

Dlouhodobá stabilita rovněž významně přispívá k celkové nejistotě hodnoty charakteristiky referenčního materiálu. V případě referenčních materiálů postupujeme takto:

Změříme charakteristiku v čase 0 a poté v čase t . Při odhadu významnosti difference hodnot charakteristiky v čase 0 a t používáme z-test ($z \leq 2$).

Příklad

Průměrná hodnota charakteristiky v čase 0: $x_0 = 26,7 \mu\text{g kg}^{-1}$

Nejistota výsledku, $u_0 = 1,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ ($k = 1$)

Průměrná hodnota charakteristiky v čase t : $x_t = 22,8 \mu\text{g kg}^{-1}$

Nejistota výsledku, $u_t = 1,25 \mu\text{g kg}^{-1}$ ($k = 1$)

Rozdíl, $D = 22,8 - 26,7 = -3,9 \mu\text{g kg}^{-1}$

Standardní nejistota rozdílu, u_D :

$$u_D = \sqrt{u_0^2 + u_t^2} = \sqrt{1^2 + 1,25^2} = 1,6 \mu\text{g kg}^{-1}$$

$$z = \frac{|D|}{u_D} = \frac{3,9}{1,6} = 2,43$$

Materiál vykazuje nestabilitu v čase t .

9.3 Použití QCM při tvorbě regulačních diagramů

Regulační diagram (RD) je grafické zobrazení funkce $X = f(t)$, kde t je časová funkce nebo číslo pokusu. Výpočet parametrů RD závisí na typu RD. Při konstrukci RD používáme QCM maticového typu s maticí podobnou předpokládaným vzorkům.

Regulační diagram průměru \bar{X} a rozpětí R nebo směrodatné odchytky s

Základní kostra RD se skládá z centrální linie (μ) a čtyř mezí: horní a spodní *varovná mez*, VM, ($\mu \pm 2\sigma$), a horní a spodní *regulační mez*, RM, ($\mu \pm 3\sigma$). Jak centrální linie, μ , tak směrodatná odchytky, σ , musí být *odhadnuty* během tzv. trénovací periody.

Definujme nyní některé parametry:

Veličina N je počet pokusů (podskupin) při trénovací periodě, n je počet měření v jednom pokusu, x_{ji} je j té měření v i té podskupině ($j \in \langle 1, n \rangle$; $i \in \langle 1, N \rangle$), \bar{x}_i je poskupinový průměr.

Odhad střední hodnoty (centrální linie), $\bar{\bar{x}}$, se vypočte podle následujícího vztahu

$$\bar{\bar{x}} = \frac{\sum \bar{x}_i}{N} \quad (9.3)$$

ve kterém

$$\bar{x}_i = \frac{\sum_{j=1}^n x_{ji}}{n} \quad (9.4)$$

Odhad směrodatné odchytky, s, je dán rovnicí:

$$s = \sqrt{\frac{\sum s_{\bar{x}_i}^2}{N}} \quad (9.5)$$

kde

$$s_{\bar{x}_i} = \sqrt{\frac{\sum (x_{ji} - \bar{x}_i)^2}{n(n-1)}} \quad (9.6)$$

Odhad směrodatné odchytky, s, můžeme počítat i jiným způsobem, jak je popsáno v ISO 8258 [lit. 20].

$$s = \frac{\sum s_{\bar{x}_i}}{Nc_4(n)} \quad \text{nebo} \quad s = \frac{\sum R_i}{Nd_2(n)} = \frac{\bar{R}}{d_2(n)} \quad (9.7)$$

V těchto vztazích jsou $c_4(n)$ a $d_2(n)$ konstanty, které jsou uvedeny v tabulce 9.1 (převzato z lit. 20, tabulka 2).

Tabulka 9.1. Hodnoty některých konstant pro výpočet parametrů regulačního diagramu

Počet měření v podskupině, n	c ₄	d ₂
2	0,7979	1,128
3	0,8862	1,693
4	0,9213	2,059
5	0,9400	2,326

Centrální linie má potom hodnotu $\bar{\bar{x}}$, varovné a regulační meze jsou $\bar{\bar{x}} \pm 2s$ a $\bar{\bar{x}} \pm 3s$.

Regulační diagram individuálních hodnot, X a pohyblivého rozpětí R

V případě tvorby regulačního diagramu pro měřené jednotlivé hodnoty se jednotlivé meze počítají z pohyblivého rozpětí dvou po sobě následujících párů měření v celé trénovací periodě. Průměrná hodnota rozpětí, \bar{R} , se vypočítá podle vztahu

$$\bar{R} = \frac{\sum_{i=1}^{N-1} R_i}{N-1} \quad (9.8)$$

ve kterém je N počet individuálních měření v trénovací sérii.

Odhad střední hodnoty (centrální linie), $\bar{\bar{x}}$, je dán rovnicí:

$$\bar{\bar{x}} = \frac{\sum x_i}{N} \quad (9.9)$$

Regulační meze pro individuální měření jsou $\bar{\bar{x}} \pm 2,66\bar{R}$, horní regulační mez pro pohyblivé rozpětí, \bar{R} , je $3,27\bar{R}$.

10 Literatura

- [1] ISO/IEC GUIDE 99:2007. International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM 3).
[TNI 01 0115:2009 – Mezinárodní metrologický slovník – Základní a všeobecné pojmy a přidružené termíny (VIM)].
- [2] Plzák Z.: Porovnání výsledků s certifikovanou hodnotou CRM. Metodický list č. 3. EURACHEM-ČR, Praha 2007.
Dostupné na adrese URL http://www.eurachem.cz/user-files/files/nj_objemym1-2008.xls.
- [3] IUPAC: Pure Appl.Chem. **70**, 237-257 (1998); též <http://www.webelements.com>.
- [4] Kvalimetrie 11. Stanovení nejistoty analytického měření. Editor M. Suchánek. EURACHEM-ČR, Praha 2001. ISBN 80-901868-9-0.
- [5] F. Yates: Design and analysis of factorial experiments. Technical Communications, Imperial Bureau of Soil Sciences, London (1937) No. 35.
- [6] J. M. Lisý, A. Cholvadová, J. Kutej: Computers Chem. **14**, 189 (1990).
- [7] ISO 5725-3:1994. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method.
- [8] W. J. Youden, E. H. Steiner: Statistical Manual of the Association of Official Analytical Chemists. AOAC International, Arlington 1975. ISBN 0-935584-15-3.
- [9] ISO Guide 35:2006. Reference materials – General and statistical principles for certification.
- [10] ISO Guide 33:2000. Uses of certified reference materials.
- [11] ČSN EN ISO/IEC 17025:2005. Posuzování shody – Všeobecné požadavky na způsobilost zkušebních a kalibračních laboratoří.
- [12] ISO 13528:2005. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons.
- [13] ISO/IEC Guide 98-3:2008. Uncertainty of measurement – Part 3: Guide to the expression of uncertainty in measurement.
- [14] ISO 5725-2:1994. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method.
- [15] B. M. Simonet: Trends in Anal.Chem. **24**, 525 (2005).
- [16] ISO/REMCO/SG2/AHG01, 2008. Evaluation of results from qualitative methods.
- [17] ISO/CD Guide 80:2007. Commercial and in house production of non-certified reference materials. ISO/REMCO.
- [18] ČSN ISO 8466-1:1994. Jakost vod. Kalibrace a hodnocení analytických metod a určení jejich charakteristik. Část 1: Statistické hodnocení lineární kalibrační funkce.
- [19] M. Thompson, S. L. R. Ellison, R. Wood: Pure Appl. Chem. **78**, 145-196 (2006). Dostupné na adresách URL <http://www.iupac.org/publications/pac/2006/pdf/7801x0145.pdf> nebo <http://media.iupac.org/publications/pac/2006/pdf/7801x0145.pdf>.
- [20] ČSN ISO 8258:1994. Shewhartovy regulační diagramy.

Dále uvádíme významné literární zdroje, které mohou sloužit k doplnění znalostí o statistických metodách. Některé zdroje informací byly uvedeny již v jednotlivých kapitolách.

1. D. L. Massart, B. G. M. Vandeginste, L. M. C. Buydens, S. DeJong, P. J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke: *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, Part A*. B. Elsevier, Amsterdam 1997. ISBN 0-444-89724-0.
2. J. Likeš: *Navrhování průmyslových experimentů*. SNTL, Praha 1968.
3. J. N. Miller, J. C. Miller: *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. 4. vydání. Prentice Hall, 2000. ISBN 0-130-022888-5.
4. *ISO Standards Handbook: Statistical Methods for Quality Control. Vol. 1 Terminology and symbols. Acceptance sampling*. ISO, Ženeva 1995. ISBN 92-67-10211-7.
5. *ISO Standards Handbook: Statistical Methods for Quality Control. Vol. 2 Measurement methods and results. Interpretation of statistical data. Process control*. ISO, Ženeva 1995, ISBN 92-67-10212-5.
6. J. Šperková, M. Suchánek: *Statistika a Internet*. *Chem. Listy* **93**, 338 (1999).
7. Meloun M., Mílitký J.: *Statistická analýza experimentálních dat*. 2. vydání. Academia, Praha 2004. ISBN 80-200-1254-0.
8. ISO/IEC 17043:2010. *Conformity assessment – General requirements for proficiency testing*.

11 Seznam zkratek

a.u.	arbitrární jednotka
A_3	koeficient šikmosti
B	vychýlení (bias)
B_4	koeficient špičatosti
c	látková koncentrace [mol l^{-1}]
$C(\xi, \eta)$	kovariance náhodných veličin ξ, η
$D(\xi)$	rozptyl
$D(\xi), \sigma^2$	rozptyl základního souboru
e	náhodná chyba
$E(\xi)$	střední (očekávaná) hodnota
$E(\xi), \mu$	střední (očekávaná) hodnota základního souboru
E_n	číslo E_n (mezilaboratorní porovnávání)
F	Snedecorovo testovací kritérium
H_0	hypotéza (nulová)
I	počet úrovní (plánování experimentů)
index	procentové zastoupení jednotlivých složek v celkové nejistotě
J	Jacobián (kapitola 3)
k	koeficient rozšíření
L_1, L_2	interval spolehlivosti (jednostranný)
$L_{1,2}$	interval spolehlivosti (oboustranný)
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
M_2	výběrový druhý centrální moment
M_3	výběrový třetí centrální moment
M_4	výběrový čtvrtý centrální moment
MS	průměrný součet čtverců (ANOVA)
n	počet měření
N	počet opakování měření vzorku (regrese)
P	pravděpodobnost
$P(x)$	pravděpodobnostní (frekvenční) funkce
Po	Poissonovo rozdělení
Q	součtová veličina (lineární regrese)
R	výtěžnost (recovery), rozpětí (kapitola 1)
repro	reprodukovatelnost
Rsu	relativní standardní nejistota
R	výběrová korelační matice (kapitola 8)
s	směrodatná odchylka náhodného výběru, výběrová směrodatná odchylka
S	celková proměnlivost
S	výběrová kovarianční matice (kapitola 8)
S_r	residuální proměnlivost (ANOVA)
S_p	proměnlivost odpovídající faktoru P (ANOVA)
s_e	residuální rozptyl kalibrační závislosti (regrese)

$S_{opak,rel}$	relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti
S_{mv}	směrodatná odchylka mezi vzorky (kapitola 5)
SEN	citlivost (kapitola 7)
SOP	standardní pracovní postup
SP	specifičnost (kapitola 7)
SS	součet čtverců (sum of squares) (ANOVA)
u	standardní nejistota
u(B)	nejistota vychýlení
u(repro)	nejistota reprodukovatelnosti
U	rozšířená nejistota
V	výsledek měření (kapitola 1)
w_i	í-tá statistická váha (regrese)
w_{Ri}	váha í-tého měření (bivariátní regrese)
w_z	váha nezávislého měření z (vážená lineární regrese)
x_p	100·P% kvantil
\bar{x}	aritmetický průměr náhodného výběru
Y	instrumentální signál
Y, y	změřená hodnota signálu
$Y_{..}$	součtová veličina (ANOVA)
Y_i	součtová veličina (ANOVA)
α	hladina významnosti
ψ	měřená veličina
ξ	vstupní veličina
ρ, r	korelační koeficient
μ_0	určitá hodnota střední hodnoty (nulová hypotéza)
v	počet stupňů volnosti
$v_{\text{čit}}$	je počet stupňů volnosti v čitateli (kapitola 1)
v_{jmen}	je počet stupňů volnosti ve jmenovateli (kapitola 1)
σ	směrodatná odchylka základního souboru
ζ	zeta-skóre (mezilaboratorní porovnávání)
ζ	normovaná náhodná veličina