

Úloha 1: Lineární kalibrace

U pacientů s podezřením na rakovinu prostaty byl metodou GC/MS měřen obsah sarkosinu v moči. Pro kvantitativní stanovení bylo nutné změřit řadu kalibračních roztoků o různé koncentraci. Jako vnitřní standard sloužil značený sarkosin D3. Koncentrace sarkosinu je vyjádřena v $\mu\text{mol/l}$ moči. U třech vzorků pacientů určete koncentraci sarkosinu v moči, vzorky o $RF_1=3.893$, $RF_2=4.931$ a $RF_3=1.103$.

Data:

c [$\mu\text{mol/l}$]	RF
0.5	0.06
1	0.13
2	0.23
5	0.60
10	1.21
20	2.42
35	4.20
50	6.02
100	12.00
200	24.03
300	36.15
400	48.05
500	60.05

RF= odezvoový faktor (plocha píku analytu/plocha píku vnitřního standardu)

1.1. REGRESNÍ DIAGNOSTIKA DAT:

Byla provedena regresní diagnostika dat – výstup ADSTAT viz. Příloha č. 1

Metodou nejmenších čtverců byly nalezeny následující parametry b_0 a b_1 :

Test $H_0: b_j=0$ vs. $H_A: b_j \neq 0$

Parametr	Odhad	Směrodatná ochylka	t-kriterium	Hypotéza H_0 je	Hlad. Význam.
b_0	2.8598E-03	1.2903E-02	2.2164E-01	Akceptována	0.829
b_1	1.2016E-01	6.0036E-05	2.0015E+03	Zamítnuta	0.000

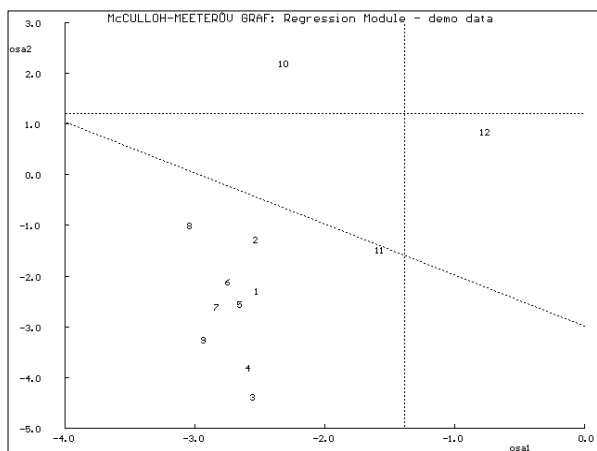
STATISTICKÉ CHARAKTERISTIKY MODELU

Vícenásobný korelační koeficient, R	1.0000E+00
Koeficient determinace, R^2	1.0000E+00
Predikovaný koeficient determinace, Rp^2	1.0000E+00
Střední kvadratická chyba predikce, MEP	1.7136E-03
Akaikeho informační kritérium, AIC	-7.8828E+01

Testování regresního tripletu

Fisher-Snedecorův test významnosti regrese, F	: 4.0061E+06
Tabulkový kvantil, $F_{1-\alpha}(m-1, n-m)$: 4.9646E+00
Závěr: Navržený model je přijat jako významný.	
Spočtená hladina významnosti	: 0.000
Scottovo kritérium multikolinearity, M	: 3.2739E-13
Závěr: Navržený model je korektní.	
Cook-Weisbergův test heteroskedasticity, S_f	: 2.4913E+01
Tabulkový kvantil, $\chi^2_{1-\alpha}(1)$: 3.8415E+00
Závěr: Rezidua vykazují heteroskedasticitu.	
Spočtená hladina významnosti	: 0.000
Jarque-Berraův test normality reziduí, $L(e)$: 1.7798E+01
Tabulkový kvantil, $\chi^2_{1-\alpha}(2)$: 5.9915E+00
Závěr: Normalita není přijata.	
Spočtená hladina významnosti	: 0.000
Waldův test autokorelace, W_a	: 1.5763E-01
Tabulkový kvantil, $\chi^2_{1-\alpha}(1)$: 3.8415E+00
Závěr: Rezidua nejsou autokorelována.	
Spočtená hladina významnosti	: 0.691
Znaménkový test, D_t	: 1.1498E-01
Tabulkový kvantil, $N(1-\alpha/2)$: 1.6449E+00
Závěr: Rezidua nevykazují trend.	
Spočtená hladina významnosti	: 0.454

Analýzou reziduí (tabulky viz. Příloha 1) a diagnostikou grafů vlivných bodů (viz. příklad McCulloh-Meeterův graf odlehlých bodů – Obr. 1) byl identifikován bod č. 10 jako odlehlý. Po jeho odstranění došlo ke zlepšení předpokladů MNČ a ke zpřesnění modelu:



Obr. 1: McCulloh-Meeterův graf vlivných bodů

1.2. ZPŘESNĚNÝ MODEL:

Test $H_0: b_j=0$ vs. $H_A: b_j \neq 0$

Parametr	Odhad	Směrodatná ochylka	t-kriterium	Hypotéza H_0 je	Hlad. Význam.
b_0	9.3416E-04	4.0039E-03	2.3331E-01	Akceptována	0.821
b_1	1.2011E-01	1.9490E-05	6.1626E+03	Zamítnuta	0.000

MNČ byly nalezeny parametry b_0 , a b_1 Výstup ADSTAT viz. Příloha 2

STATISTICKÉ CHARAKTERISTIKY ZPŘESNĚNÉHO MODELU

Vícenásobný korelační koeficient, R	1.0000E+00
Koeficient determinace, R^2	1.0000E+00
Predikovaný koeficient determinace, Rp^2	1.0000E+00
Střední kvadratická chyba predikce, MEP	1.5842E-04
Akaikeho informační kritérium, AIC	-9.7898E+01

Testování regresního tripletu

Fisher-Snedocorův test významnosti regrese, F	: 3.7977E+07
Tabulkový kvantil, $F_{1-\alpha}(m-1, n-m)$: 5.1174E+00
Závěr: Navržený model je přijat jako významný.	
Spočtená hladina významnosti	: 0.000
Scottovo kritérium multikolinearity, M	: 2.8938E-11
Závěr: Navržený model je korektní.	
Cook-Weisbergův test heteroskedasticity, S_f	: 2.0216E+01
Tabulkový kvantil, $\chi^2_{1-\alpha}(1)$: 3.8415E+00
Závěr: Rezidua vykazují heteroskedasticitu.	
Spočtená hladina významnosti	: 0.000
Jarque-Berraův test normality reziduí, $L(e)$: 1.0541E+00
Tabulkový kvantil, $\chi^2_{1-\alpha}(2)$: 5.9915E+00
Závěr: Normalita je přijata.	
Spočtená hladina významnosti	: 0.590
Waldův test autokorelace, W_a	: 4.4724E-01
Tabulkový kvantil, $\chi^2_{1-\alpha}(1)$: 3.8415E+00
Závěr: Rezidua nejsou autokorelována.	
Spočtená hladina významnosti	: 0.504
Znamkový test, D_t	: 2.9161E-02
Tabulkový kvantil, $N(1-\alpha/2)$: 1.6449E+00
Závěr: Rezidua nevykazují trend.	
Spočtená hladina významnosti	: 0.488

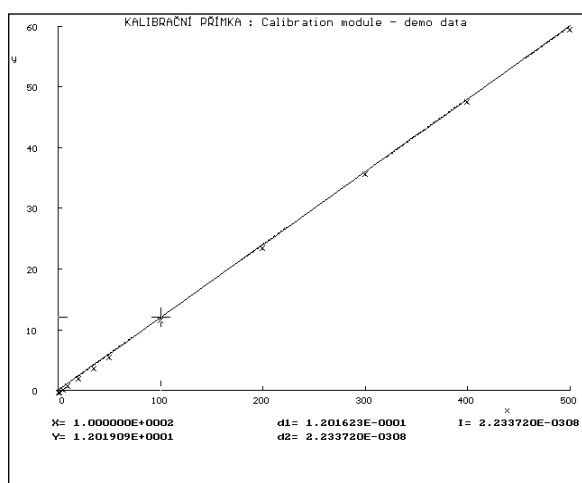
1.3. KALIBRACE:

Pro kalibraci byla použita zpřesněná data s vyloučeným odlehlým bodem

Pomocí programu ADSTAT – Kalibrace byla nalezena rovnice kalibrační přímky, ve které lze na základě metody nejmenších čtverců a studentova t -testu úsek považovat za nulový.

$$y = 1.2011E-01(\pm 1.9490E-05)x$$

Těsnost proložení lze sledovat na grafu kalibrační přímky (viz. Obr. 2). Kompletní výstup z programu ADSTAT viz Příloha 3.



Obr. 2: Graf kalibrační přímky

Závěr:

Byly stanoveny následující limity přesnosti kalibrační přímky:

Kritická úroveň, $y_c: 9.9916E-03$ $x_c: 7.5412E-02$

Limita detekce, $y_d: 1.9045E-02$ $x_d: 1.5079E-01$

Mez stanovitelnosti, $y_s: 1.1486E-01$ $x_s: 9.4857E-01$

Měřená hodnota	Přímý odhad	Nasodiho odhad	Dolní mez	Horní mez
$Y_{exp,i}$	$X_{vyp,i}$	$X_{vyp,i}$	$L_D X_{vyp,i}$	$L_H X_{vyp,i}$
3.8930E+00	3.2405E+01	3.2405E+01	3.2191E+01	3.2620E+01
4.9310E+00	4.1048E+01	4.1048E+01	4.0834E+01	4.1261E+01
1.1030E+00	9.1758E+00	9.1758E+00	8.9601E+00	9.3915E+00

Přímé bodové odhady i Nasodiho modifikované odhady koncentrací jsou v případě všech vzorků v podstatě totožné. Model tak splňuje všechny předpoklady a není třeba jeho korekce.

Úloha 2. Nelineární kalibrace

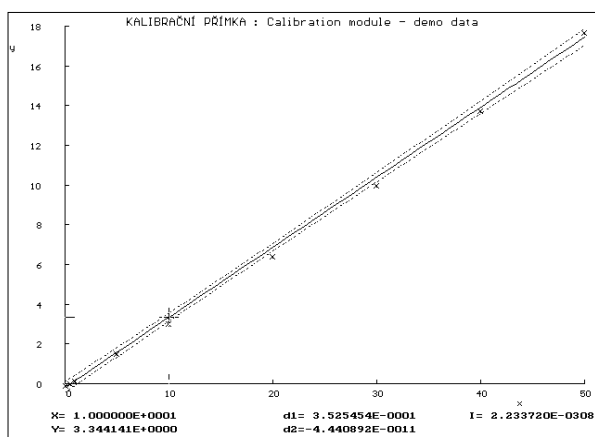
V extraktech hemolymfy hmyzu byla metodou GC/MS stanovována trehalosa. Pro potřebu kvantitativního stanovení bylo nutné proměřit řadu kalibračních roztoků o různých koncentracích. Byla sledována závislost odezvového faktoru RF na koncentraci trehalosy ve vzorku. Jako vnitřní standard byl používán xylitol. Najděte nejlepší rovnici kalibrační křivky trehalosy a zjistěte koncentraci tohoto cukru ve třech vzorcích hemolymfy hmyzu o $RF_1=8,47$, $RF_2=15,23$ a $RF_3=12,28$.

Data:

$\mu\text{g}/\text{vz}$	RF
0.1	0.030616
0.5	0.142937
1	0.265392
5	1.652613
10	3.143054
20	6.531273
30	10.13204
40	13.88796
50	17.79991

RF = odezvový faktor (výška píku analytu/výška píku vnitřního standardu)

Při pohledu na graf závislosti RF na koncentraci trehalosy je patrné, že závislost není lineární (Obr.3). Pro metodu kalibrace bylo třeba vybrat kvadratický nebo kubický spline a nalézt optimální počet uzlových bodů. Při hledání optimální kalibrace byly sledovány nejnižší hodnoty limity detekce x_D , směrodatné odchylky reziduí s_e a nejnižší hodnoty průměru relativních reziduí M_{er} . Tyto hodnoty jsou uvedeny v tabulce Tab.1.



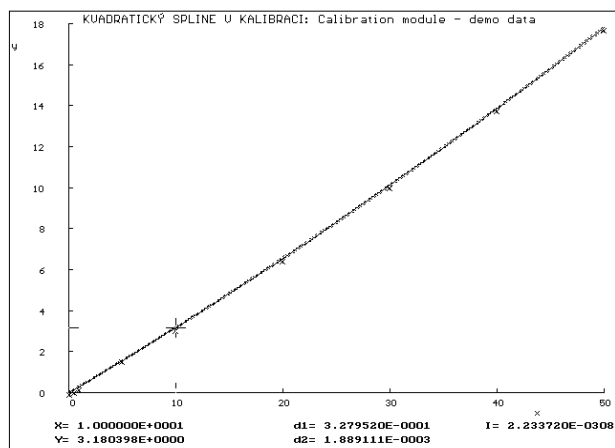
Obr.3: Kalibrační přímka

2.1. HLEDÁNÍ OPTIMÁLNÍ KALIBRAČNÍ METODY

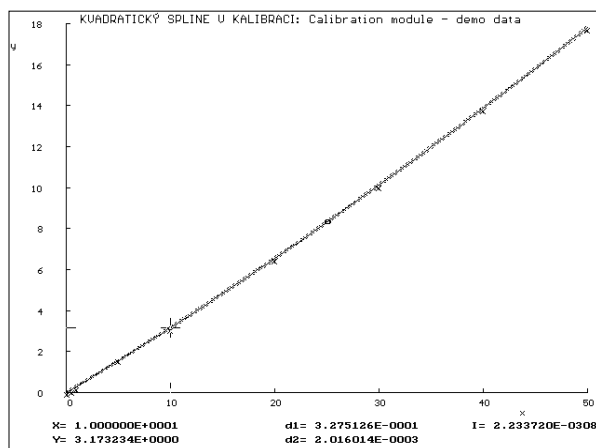
Tab.1: Hledání optimální kalibrační metody a počtu uzlů kalibrace

	přímka	Kvadratický spline.				Kubický spline		
Počet uzlů		0	1	2	3	0	1	2
Prům. rel. rez. M_{er}	81.87	4.657	3.396	6.442	10.894	3.784	8.55	20.682
limita detekce x_D	1.51	0.377	0.461	0.542	0.658	0.471	0.529	0.611
Směrodatná ochylka reziduí s_e	0.246	0.0445	0.0483	0.0513	0.0550	0.0486	0.0499	0.0511

Z výsledků vyplývá, že nejnižší hodnoty pro danou kalibraci dává obecně kvadratický spline, z toho nejnižší limitu detekce vykazuje křivka, která nemá žádný uzlový bod. Také z grafu kalibrace je patrné, že těsnější proložení poskytuje spline bez jediného uzlového bodu (viz obr. 4 a 5). Tato metoda byla proto dále použita pro zjištění rovnice křivky a nalezení koncentrace trehalosy v reálných vzorcích.



Obr.4: Kvadratická spline – 0 uzlů



Obr. 5: Kvadratický spline – 1 uzel

2.2. KALIBRACE

Podmínky:

Počet bodů, n	9
Počet uzlů, m	0
Strategie výběru uzlů	Konstantní uzlové intervaly

Rovnice kalibrační křivky: $y = 9.4456E-04 \cdot x^2 + 3.0906E-01 \cdot x - 4.6661E-03$

Kalibrační meze:

Kritická úroveň	y_c : 5.451812E-02	x_c : 1.913852E-01
Limita detekce	y_d : 1.118729E-01	x_d : 3.766412E-01

Kalibrační tabulka:

Vzorek č.	Měřená hodnota	Inverzní odhad	Dolní mez	Horní mez
	$Y_{exp,i}$	$X_{vyp,i}$	$L_D X_{vyp,i}$	$L_H X_{vyp,i}$
1	8.478964E+00	2.546747E+01	2.527908E+01	2.565555E+01
2	1.522503E+01	4.349543E+01	4.332794E+01	4.366529E+01
3	1.227651E+01	3.581650E+01	3.565729E+01	3.597503E+01

Závěr: Ze statického zpracování vyplývá, že nevhodnější model kalibrace poskytuje kvadratický spline bez uzlového bodu. Limita detekce u této kalibrace je 0,38 μg trehalosy. Kompletní výstup ADSTAT viz. Příloha 4.

Úloha 3: Rozlišení mezi lineární a nelineární kalibrací

Pro kvantitativní LC/MS stanovení sarkosinu v moči pacientů s podezřením na rakovinu prostaty byla připravena řada kalibračních roztoků o 10-ti různých koncentracích. Každý roztok o dané koncentraci byl měřen 3x. Byl stanoven odezвовý faktor RF každého roztoku = poměr výšky signálu analytu ku výšce signálu vnitřního standardu. Jako vnitřní standard byl použit značený sarkosin D3. Nalezněte optimální rovnici kalibrační křivky a vyčíslete bodový a intervalový odhad pro tři neznámé koncentrace o $RF_1=2,727$, $RF_2=4,584$ a $RF_3=0,678$.

Data:

c [$\mu\text{mol/l}$]	RF měř.1	RF měř.2	RF měř.3
0,5	0,316	0,338	0,329
2	0,512	0,491	0,472
5	0,761	0,839	0,776
20	2,211	2,250	2,146
50	5,111	5,304	5,613
100	10,985	11,125	11,097
200	25,360	25,886	1,355
300	41,159	41,403	41,289
400	60,482	60,793	60,682
500	93,366	94,055	92,595

3.1. REGRESNÍ DIAGNOSTIKA

Regresní diagnostika dat:

Byla provedena regresní diagnostika dat – výstup ADSTAT viz Příloha č.5.

Metodou nejmenších čtverců byly nalezeny následující parametry b_0 a b_1 :

Test $H_0: b_j=0$ vs. $H_A: b_j \neq 0$

Parametr	Odhad	Směrodatná ochylka	t-kriterium	Hypotéza H_0 je	Hlad. Význam.
b_0	-2.6868E+00	1.2524E+00	-2.1453E+00	Zamítnuta	0.040
b_1	1.7028E-01	5.4135E-03	3.1455E+01	Zamítnuta	0.000

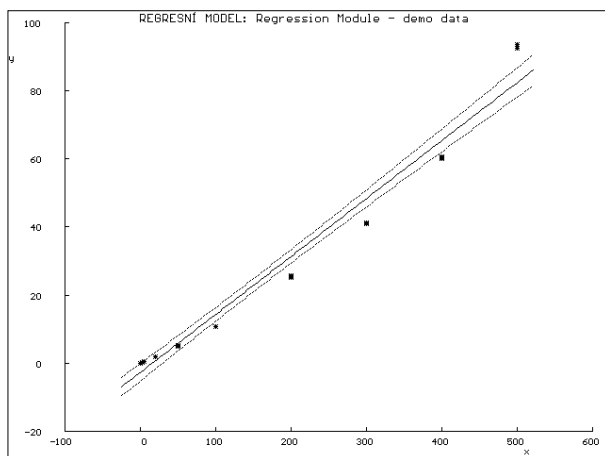
STATISTICKÉ CHARAKTERISTIKY MODELU

Vícenásobný korelační koeficient, R	9.8566E-01
Koeficient determinace, R^2	9.7153E-01
Predikovaný koeficient determinace, Rp^2	9.8190E-01
Střední kvadratická chyba predikce, MEP	3.2137E+01
Akaikeho informační kritérium, AIC	1.0441E+02

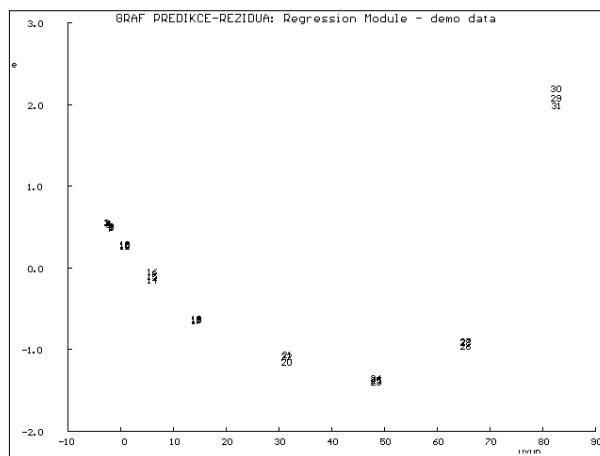
Testování regresního tripletu

Fisher-Snedocorův test významnosti regrese, F	: 9.8944E+02
Tabulkový kvantil, $F_{1-\alpha}(m-1, n-m)$: 4.1830E+00
Závěr: Navržený model je přijat jako významný.	
Spočtená hladina významnosti	: 0.000
Scottovo kritérium multikolinearity, M	: 6.8939E-16
Závěr: Navržený model je korektní.	
Cook-Weisbergův test heteroskedasticity, S_f	: 2.1025E+02
Tabulkový kvantil, $\chi^2_{1-\alpha}(1)$: 3.8415E+00
Závěr: Rezidua vykazují heteroskedasticitu.	
Spočtená hladina významnosti	: 0.000
Jarque-Berraův test normality reziduí, $L(e)$: 1.4659E+00
Tabulkový kvantil, $\chi^2_{1-\alpha}(2)$: 5.9915E+00
Závěr: Normalita je přijata.	
Spočtená hladina významnosti	: 0.480
Waldův test autokorelace, W_a	: 9.6004E+01
Tabulkový kvantil, $\chi^2_{1-\alpha}(1)$: 3.8415E+00
Závěr: Rezidua jsou autokorelována.	
Spočtená hladina významnosti	: 0.000
Znaménkový test, D_t	: -4.7488E+00
Tabulkový kvantil, $N_{(1-\alpha/2)}$: 1.6449E+00
Závěr: Rezidua vykazují trend.	
Spočtená hladina významnosti	: 0.000

Z testu regresního tripletu vyplývá, že rezidua vykazují autokorelaci a trend. Stejně tak z grafického záznamu závislosti vyplývá, že data nejsou vhodná pro lineární kalibraci (viz. Obr.6,7)



Obr.6: Regresní model



Obr.7: Analýza klasických reziduí

3.2. KALIBRACE

Z regresní a grafické diagnostiky vyplývá, že pro data není vhodná lineární kalibrace. Musíme proto zvolit jednu z nelineárních metod. Výběr metody a počtu uzlů je prováděn na základě minima limity detekce x_D a směrodatné odchylky reziduí s_e .

	Kvadratický spline						Kubický spline				
počet uzlů	0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4
s_e	1,61	0,87	0,20	0,21	0,20	0,20	0,87	0,21	0,23	0,20	0,20
x_D	22,45	8,65	2,79	3,15	2,92	2,99	7,94	3,45	3,69	2,94	-

Nejnižší hodnoty s_e a x_D poskytl kvadratický spline se 2 uzlovými body.

Hodnoty uzlů:

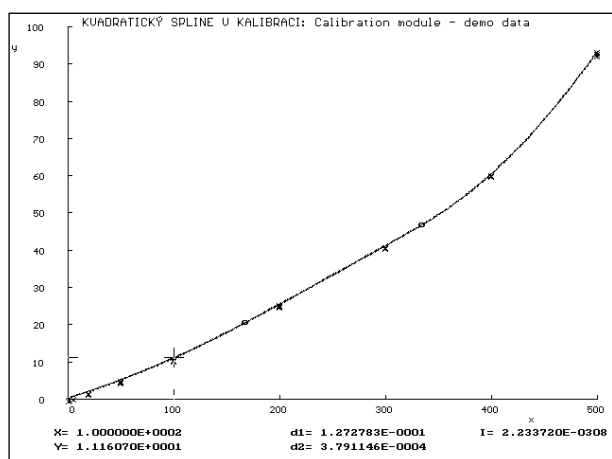
a : 5.0000E-01 k[1]: 1.6700E+02 k[2]: 3.3350E+02
 b : 5.0000E+02

PARAMETRY KALIBRACE:

Koeficienty rovnice: $f_i \cdot x^2 + g_i \cdot x + h_i$ pro $k_{i-1} < x < k_i$

k_i	f_i	g_i	h_i
1.6700E+02	1.8956E-04	8.9367E-02	3.2844E-01
3.3350E+02	2.7434E-05	1.4352E-01	-4.1930E+00
5.0000E+02	7.1227E-04	-3.1327E-01	7.1976E+01

Graf proložení kalibrační křivky ukazuje, že křivka prokládá body velmi těsně (viz. Obr.8)



Obr. 8: Kvadratický spline v kalibraci se 2 uzlovými body

Kalibrační meze:

Kritická úroveň y_c : 4.576723E-01 x_c : 1.441699E+00
 Limita detekce y_d : 5.789486E-01 x_d : 2.786698E+00

Kalibrační tabulka:

Vzorek č.	Měřená hodnota	Inverzní odhad	Dolní mez	Horní mez
	$Y_{exp,i}$	$X_{vyp,i}$	$L_D X_{vyp,i}$	$L_H X_{vyp,i}$
1	8.478964E+00	2.546747E+01	2.527908E+01	2.565555E+01
2	1.522503E+01	4.349543E+01	4.332794E+01	4.366529E+01
3	1.227651E+01	3.581650E+01	3.565729E+01	3.597503E+01

Kompletní výstup z ADSTATU viz. Příloha č.6.

Závěr: Ze statistické analýzy vyplývá, že nejvhodnější model kalibrace je kvadratický spline se 2 uzlovými body. Limita detekce u této kalibrace je 2,78 μ mol sarkosinu na l moči.