

Licenční studium Galileo: Statistické zpracování dat



# Kalibrace a limity její přesnosti

Semestrální práce

Lenka Husáková

Pardubice 2016

# Obsah

1	Lineární kalibrace .....	3
1.1	Zadání .....	3
1.2	Data .....	3
1.3	Použitý software.....	3
1.4	Návrh modelu.....	3
1.5	Regresní diagnostika.....	4
1.6	Kalibrační meze přesnosti .....	8
1.7	Kalibrační tabulka .....	8
1.8	Závěr .....	9
1.9	Literatura .....	9
2	Nelineární kalibrace.....	10
2.1	Zadání .....	10
2.2	Data .....	10
2.3	Použitý software.....	11
2.4	Návrh modelu.....	11
2.5	Statistická analýza reziduí .....	11
2.6	Kalibrační meze přesnosti .....	13
2.7	Kalibrační tabulka .....	13
2.8	Závěr .....	14
2.9	Literatura .....	14
3	Rozlišení mezi lineární a nelineární kalibrací.....	15
3.1	Zadání .....	15
3.2	Data .....	15
3.3	Použitý software.....	15
3.4	Návrh kalibračního modelu .....	16
3.5	Analýza reziduí.....	17
3.6	Kalibrační meze přesnosti .....	18
3.7	Kalibrační tabulka .....	18
3.8	Závěr .....	19
3.9	Literatura .....	19

# 1 Lineární kalibrace

## 1.1 Zadání

### *Stanovení uranu ve vodách metodou oa-TOF-ICP-MS*

Stanovení obsahu uranu ve vodách je důležité z hlediska jeho chemické toxicity. Ve vodách se uran obvykle vyskytuje v ultra-stopových koncentracích. Světová zdravotnická organizace (WHO) navrhuje pro uran v pitné vodě jako přijatelnou limitní hodnotu  $30 \mu\text{g L}^{-1}$ . Vyhláška MZ č.252/2004 Sb. stejně jako evropská Směrnice Rady č.98/83/ES limitní koncentraci pro uran z hlediska jeho chemické toxicity nestanovuje. Podle doporučení hlavního hygienika ČR je za žádoucí cílovou hodnotu považován limit  $15 \mu\text{g L}^{-1}$ . Metoda hmotnostní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu umožňuje rychlé stanovení uranu v ultra-stopových koncentracích při malé spotřebě vzorku a prakticky bez výskytu spektrálních interferencí. Závislost relativní intenzity signálu na hmotě izotopu  $^{238}\text{U}^+$  na koncentraci uranu určená metodou ICP-MS na spektrometru s průletovým analyzátozem s ortogonální akcelerací iontů (oa-TOF-ICP-MS) je uvedena v tabulce 1.1. Cílem bylo navrhnout vhodný kalibrační model uvedené závislosti a na hladině významnosti 0.05 vyčíslit limity přesnosti kalibrace a určit bodový a intervalový odhad koncentrace U ve vzorku pitné vody pro velikosti signálu 0.20557, 0.20998 a 0.20256, získané analýzou tří nezávislých podílů vzorku.

## 1.2 Data

**Tabulka 1.1** Závislost relativní intenzity signálu<sup>a</sup> určené metodou oaTOF-ICP-MS na koncentraci uranu ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )<sup>b</sup>

Stanovení U metodou oaTOF-ICP-MS							
Koncentrace U ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	0.0	0.1	0.2	0.5	1.0	2.0	5.0
Relativní intenzita	0.00143	0.1992	0.3874	1.0034	2.0273	4.0441	10.0754

<sup>a</sup> Relativní intenzita je dána intenzitou ( $\text{Imp s}^{-1}$ ) určenou na hmotě izotopického iontu příslušného analytu / intenzita ( $\text{Imp s}^{-1}$ ) porovnávacího prvku (Rh).

<sup>b</sup> Hodnoty odpovídají stanovení na hmotě  $m/z = 238$ , tj. izotopického iontu uranu  $^{238}\text{U}^+$ .

## 1.3 Použitý software

Naměřená data byla vyhodnocena pomocí statistického programu QCExpert™ 2.9 (TriloByte Statistical software, s.r.o., ČR) v modulu „Lineární regrese“ a „Kalibrace“.

## 1.4 Návrh modelu

Typ kalibračního modelu je možné v daném případě předpovědět již vzhledem k charakteru vlastní metody. Metoda ICP-MS se vyznačuje vysokou linearitou kalibrace, a to v rozsahu několika řádů.

Pro kalibrační závislost s rozsahem koncentrací uvedeným v tabulce 1.1, lze tedy očekávat možnost aproximace přímkou. Navržen byl tedy model s absolutním členem ve tvaru (1):

$$y = \beta_0 + \beta_1 x \quad (1)$$

kde  $y$  představuje závislou veličinu (relativní intenzita),  $\beta_0$  je absolutní člen,  $\beta_1$  směrnice regresní přímky a  $x$  koncentrace  $U$  v  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Parametry navrženého kalibračního modelu jsou shrnuty v tabulce 1.2.

**Tabulka 1.2 Parametry lineárního regresního modelu určené na hladině významnosti 0.05 při použití klasické metody nejmenších čtverců**

Parametr	Odhad <sup>a</sup>	Sm. odchylka <sup>b</sup>	Závěr	Pravděpodobnost	Spodní mez <sup>c</sup>	Horní mez <sup>c</sup>
$\beta_0$	-0.00102 <sup>d</sup>	0.00505	Nevýznamný	0.8476	-0.01402	0.01197
$\beta_1$	2.01652	0.00243	<b>Významný</b>	$4.82 \times 10^{-14}$	2.01028	2.02277

<sup>a</sup> Odhad parametru.

<sup>b</sup> Odhad směrodatné odchylky parametru.

<sup>c</sup> Spodní anebo horní mez intervalu spolehlivosti parametru na hladině významnosti 0.05.

<sup>d</sup> Absolutní člen byl shledán na hladině významnosti 0.05 jako statisticky nevýznamný.

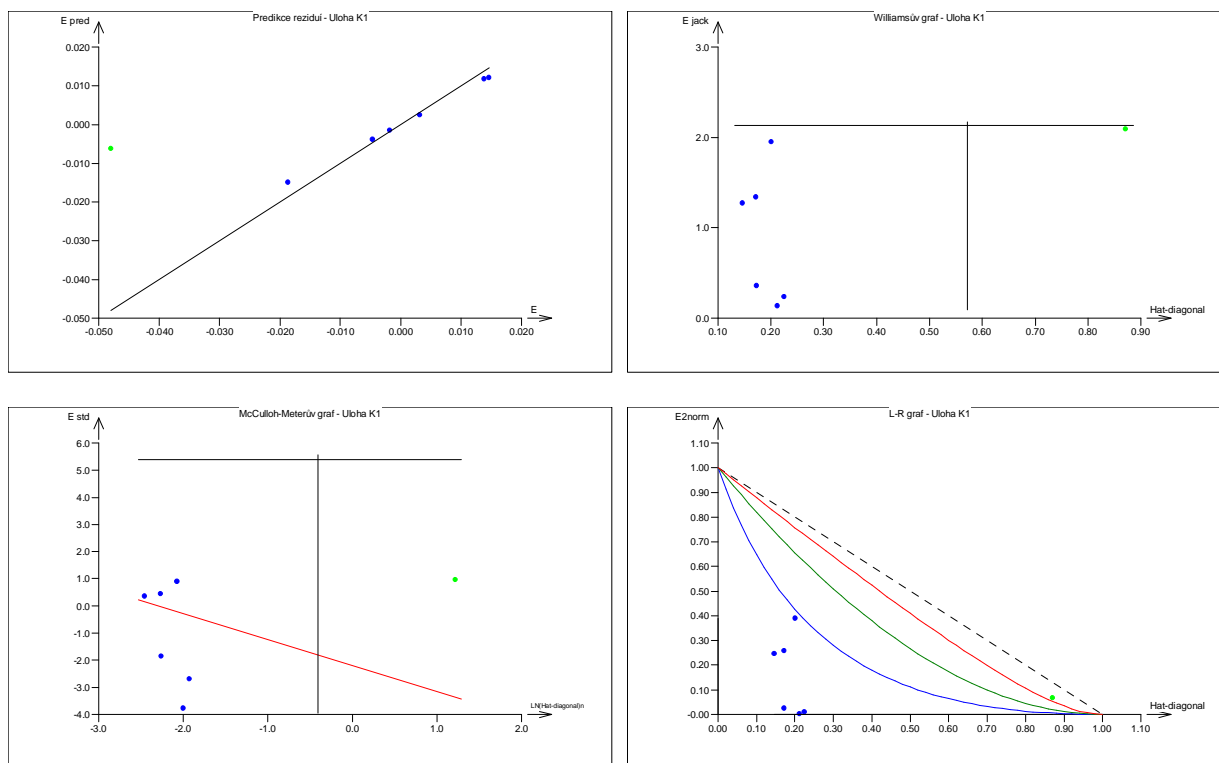
## 1.5 Regresní diagnostika

Před potvrzením konečných odhadů parametrů modelu uvedených v tabulce 1.2, bylo nutné provést regresní diagnostiku s cílem posoudit kvalitu dat pro navržený model, potvrdit kvalitu modelu a prověřit podmínky splnění všech předpokladů požadovaných metodou nejmenších čtverců.

Pro identifikaci případných vlivných bodů (odlehilých hodnot a extrémů) ve zdrojových datech bylo použito grafické i numerické analýzy reziduí. Graf predikovaných reziduí, Williamsův graf, McCullohův-Meeterův graf a L-R graf, které jsou uvedeny na obrázku 1.1, neindikují v datech žádný odlehlý bod. Patrný je v datech extrém, který je na výše uvedených obrázcích zobrazen zelenou barvou. Jedná se o bod č. 7, tj. kalibrační standard s koncentrací  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ , vzdálený na x-ové ose ostatním kalibračním roztokům. Výsledky statistické analýzy ostatních reziduí výše uvedené informace potvrzují (viz Tabulka 1.3). Statistické charakteristiky analýzy klasických reziduí shrnuje tabulka 1.4.

**Tabulka 1.3 Indikace vlivných bodů\* pomocí analýzy vybraných typů reziduí**

Index	Jackknife	Predikované	Diag(Hii)
1	0.23548	0.00316	0.22501
2	-0.13552	-0.00182	0.21246
3	-1.95342	-0.01862	0.20095
4	-0.35988	-0.00464	0.17266
5	1.27003	0.01382	0.14629
6	1.34140	0.01458	0.17154
7	-2.09262	-0.04797	<b>0.87108*</b>



**Obr. 1.1** Vybrané grafické diagnostiky identifikace vlivných bodů: (A) graf predikovaných reziduí, (B) Williamsův graf, (C) McCullohův-Meeterův graf, (E) L-R graf

**Tabulka 1.4** Statistické charakteristiky analýzy klasických reziduí

RSC	Me	$s^2(e)$	$s(e)$	$g_1(e)$	$g_2(e)$
$5.677 \times 10^{-4}$	$7.524 \times 10^{-3}$	$1.135 \times 10^{-4}$	$1.066 \times 10^{-2}$	0.0011	1.99

Reziduální součet čtverců, RSC; Průměr absolutních reziduí, Me; Odhad reziduálního rozptylu,  $s^2(e)$ ; Odhad směrodatné odchylky reziduí,  $s(e)$ ; Šikmost reziduí,  $g_1(e)$ ; Špičatost reziduí,  $g_2(e)$ .

Pro posouzení kvality nalezených odhadů parametru modelu slouží interval spolehlivosti či rozptyl. Pro posouzení kvality dosažené těsnosti proložení slouží hodnota reziduálního rozptylu  $s(y)$  a regresního rabatu D. Vhodnost navrženého modelu je posuzována dle Akaikeho informačního kritéria AIC a střední kvadratické chyby predikce MEP. Statistické charakteristiky regrese pro navržený model shrnuje tabulka 1.5. Z tabulky 1.5 je zřejmé, že navržený model vysvětluje téměř 100% variability v datech.

V tabulce 1.6 jsou uvedeny výsledky statistické analýzy reziduí určené programem QCExpert v modulu „Kalibrace“. Těsnost proložení, čili velikost klasických reziduí, střídání znaménka a statistické charakteristiky jsou mírou vhodnosti navrženého kalibračního modelu. O vhodnosti navrženého modelu svědčí i graf regresní přímky a graf reziduí  $e_i$  proložený neparametrickým jádrovým modelem  $K(e_i)$  (černá křivka) uvedené na obrázku 1.2. Graf reziduí nevykazuje výrazné zakřivení, které by svědčilo o nelinearitě kalibrační závislosti, kterou by se nepodařilo postihnout použitým modelem, případně o vybočujících bodech.

**Tabulka 1.5** Statistické charakteristiky regrese

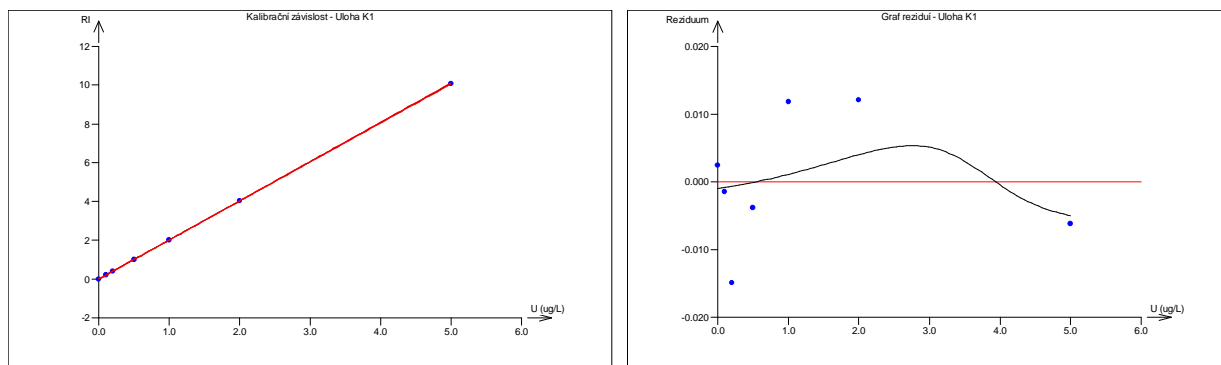
R	D	Rp	MEP	AIC
0.999996	0.999993	0.999921	$4.41 \times 10^{-4}$	-61.94

Vícenásobný korelační koeficient, r; Koefficient determinace, D; Predikovaný korelační koeficient, Rp; Střední kvadratická chyba predikce, MEP; Akaikeho informační kritérium, AIC.

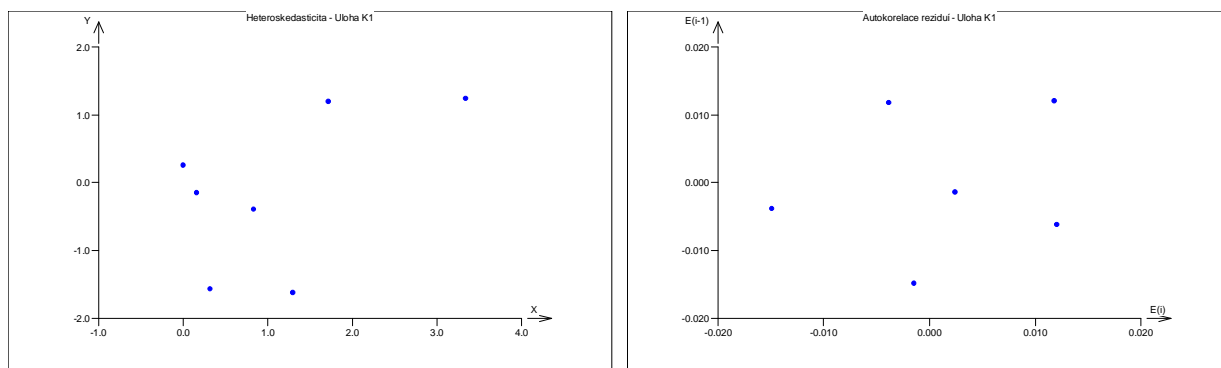
**Tabulka 1.6** Analýza reziduí (mód Kalibrace)

Číslo měření	Naměřené X	Naměřené Y	Vypočítané Y	Reziduum	Váha
1	0	0.00143	-0.00102	0.00245	1
2	0.1	0.1992	0.20063	-0.00143	1
3	0.2	0.3874	0.40228	-0.01488	1
4	0.5	1.0034	1.00724	-0.00384	1
5	1	2.0273	2.01550	0.01180	1
6	2	4.0441	4.03202	0.01208	1
7	5	10.0754	10.08158	-0.00618	1

<sup>a</sup> Reziduální součet čtverců RSC =  $5.68 \times 10^{-4}$ ; Průměrné absolutní reziduum  $7.52 \times 10^{-3}$ ; Korelační koeficient 0.999996.



**Obrázek 1.2** Graf kalibrační závislosti a graf reziduí



**Obr. 1.3** Graf heteroskedasticity a autokorelace

Kritika metody představuje nástroje pro ověření předpokladů metody nejmenších čtverců a spočívá ve vyšetření heteroskedasticity, autokorelace, multikolinearity, normality náhodných chyb, omezení parametrů a vyšetření trendu v reziduích. Graf heteroskedasticity (obr. 1.3) tvoří náhodný mrak bodů a svědčí spíše o homoskedasticitě. Graf závislosti  $\hat{\epsilon}_{i-1}$  na  $\hat{\epsilon}_i$  neindikuje významnou autokorelaci (obr. 1.3).

**Tabulka 1.7 Výsledky statistické testování regresního tripletu**

Testování regresního tripletu	
Fisher-Snedecorův test významnosti modelu	
Hodnota kritéria F:	688976.33
Kvantil F (1-alfa, m-1, n-m):	6.608
Pravděpodobnost:	$4.82 \times 10^{-14}$
Závěr:	<b>Model je významný</b>
Scottovo kritérium multikolinearity	
Hodnota kritéria SC:	0.3333
Závěr:	Model vykazuje multikolinearitu!
Cook-Weisbergův test heteroskedasticity	
Hodnota kritéria CW:	0.00314
Kvantil $\chi^2(1-\text{alfa},1)$ :	3.842
Pravděpodobnost :	0.955
Závěr:	<b>Rezidua vykazují homoskedasticitu.</b>
Jarque-Berrův test normality	
Hodnota kritéria JB:	0.3009
Kvantil $\chi^2(1-\text{alfa},2)$ :	5.992
Pravděpodobnost:	0.8603
Závěr:	<b>Rezidua mají normální rozdělení</b>
Waldův test autokorelace	
Hodnota kritéria WA:	0.1462
Kvantil $\chi^2(1-\text{alfa},1)$ :	3.842
Pravděpodobnost:	0.702
Závěr:	<b>Autokorelace je nevýznamná</b>
Durbin-Watsonův test autokorelace	
Hodnota kritéria DW:	-1
Kritické hodnoty DW:	0 2
Závěr:	<b>Pozitivní autokorelace reziduí není prokázána</b>
Znaménkový test reziduí	
Hodnota kritéria Sg:	0.0606
Kvantil $N(1-\text{alfa}/2)$ :	1.960
Pravděpodobnost:	0.952
Závěr:	<b>V reziduích není trend</b>

Výsledky souhrnného testování regresního tripletu ve formě vybraných testů (*Fisher-Snedecorův test celkové regrese posouzení významnosti navrženého modelu, Scottovo kritérium multikolinearity, Cook-Weisbergův test heteroskedasticity, Jarque-Berrův test normality reziduí, Waldův test*

autokorelace, Znaménkový test reziduí pro určení trendu v datech) shrnuje tabulka 1.7. Fischerův-Snedecorův test významnosti regrese potvrdil, že navržený model je přijat jako významný a tedy závisle proměnná  $y$  a nezávisle proměnná  $x$  jsou v lineární závislosti. Cookův-Weisbergův test heteroskedasticity dokazuje, že rezidua vykazují homoroskedasticitu, Jargueův-Berraův test normality reziduí ukazuje, že klasická rezidua vykazují normalitu, Waldův test autokorelace ukazuje, že klasická rezidua nejsou autokorelována a Znaménkový test prokazuje, že znaménko klasických reziduí se dostatečně střídá a rezidua tedy nevykazují žádný trend.

## 1.6 Kalibrační meze přesnosti

Míry přesnosti kalibrace (kritická hodnota, mez detekce a mez kvantifikace) pro úroveň signálu  $y$  i pro úroveň koncentrace  $x$  vypočítané metodami  $K \cdot \text{Sigma}$ , přímou metodou analytu, přímou metodou signálu, kombinovanou metodou Ebel-Kamm a metodou  $K \cdot \text{Sigma}$  z regrese, jsou uvedeny v tabulce 1.8. Pro výpočet byla použita hodnota faktoru  $K = 1.96$ . Z tabulky 1.8 je zřejmé, že s výjimkou metody ISO 11843-2 a metody  $K \cdot \text{Sigma}$ , ACS poskytují všechny výše uvedené metody hodnoty meze detekce  $U = 0.017 \mu\text{g L}^{-1}$ . Mez stanovitelnosti metody pak dosahuje hodnoty  $0.025 \mu\text{g L}^{-1}$   $U$ . Jak je patrné z tabulky 1.9, tato hodnota je dostatečná z hlediska potřeby stanovení  $U$  v pitných vodách.

Tabulka 1.8 Kalibrační meze

Metoda	$y_c$	$y_D$	$y_Q$	$x_c$	$x_D$	$x_Q$
Metoda podle ISO 11843-2	0.1886	0.2418	0.3783	0.094	0.120	0.188
Přímá metoda analytu	0.0158	0.0324	0.0491	0.008	0.017	0.025
Přímá metoda signálu, IUPAC	0.0158	0.0325	0.0492	0.008	0.017	0.025
Kombinovaná metoda Ebel,Kamm	0.0157	0.0324	0.0491	0.008	0.017	0.025
Metoda $K \cdot \text{Sigma}$ z regrese	0.0158	0.0325	0.0493	0.008	0.017	0.025
Metoda $K \cdot \text{Sigma}$ , ACS	0.0199	0.0407	0.0616	0.010	0.021	0.031

$y_c$  kritická úroveň  $y$  (nejmenší hodnota  $y$  rozeznatelná od šumu)

$y_D$  mez detekce  $y$  (hodnota, nad níž můžeme bezpečně s pravděpodobností  $1-\alpha$  prokázat přítomnost analytu)

$y_Q$  mez kvantifikace  $y$  (hodnota, nad níž lze stanovit skutečnou hodnotu  $y$  s relativní chybou menší než  $\alpha$ )

$x_c$  kritická úroveň  $x$  (hodnota odpovídající  $y_c$  podle kalibračního modelu)

$x_D$  mez detekce  $x$  (minimální detekovatelná hodnota  $x$ )

$x_Q$  mez kvantifikace  $x$  (minimální hodnota  $x$ , kterou lze stanovit s relativní chybou menší než  $\alpha$ )

## 1.7 Kalibrační tabulka

Výsledky stanovení  $U$  ve vzorcích vody jsou uvedeny v tabulce 1.9. Výsledky obsahují bodový a intervalový odhad výsledku, tj. interval, ve kterém se s 95% statistickou jistotou nachází stanovovaný obsah analytu.



**Tabulka 1.9 Výsledky stanovení U ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) v pitné vodě**

Číslo vzorku	Zpětný odhad	Spodní mez <sup>a</sup>	Horní mez <sup>a</sup>	Naměřené hodnoty
1	0.102	0.094	0.111	0.20557
2	0.105	0.097	0.113	0.20998
3	0.101	0.093	0.109	0.20256

<sup>a</sup> Spodní a horní mez 95% konfidenčního intervalu.

## 1.8 Závěr

Parametry lineárního regresního modelu stanovení uranu metodou oa-TOF-ICP-MS určené na hladině významnosti 0.05 při použití klasické metody nejmenších čtverců jsou následující:  $y = 2.017(2.43 \times 10^{-3})x$ , kde  $y$  představuje závislou veličinu (relativní intenzita signálu),  $x$  koncentrace U v  $\mu\text{g L}^{-1}$ , v závorce je uvedena směrodatná odchylka odhadu směrnice. Míry přesnosti kalibrace shrnuje tabulka 1.8, výsledky stanovení uranu v pitné vodě (bodové i intervalové odhady) jsou uvedeny v tabulce 1.9.

## 1.9 Literatura

1. Meloun M., Militký J.: Kompendium statistického zpracování dat, Vyd. 3., nakl. Karolinum, Praha, 2012. ISBN: 978-80-246-2196-8.
2. Meloun M., Militký J.: Interaktivní statistická analýza dat, Vyd. 3., nakl. Karolinum, Praha, 2012. ISBN: 978-80-246-2173-9.
3. [http://www.szu.cz/uploads/documents/chzp/voda/pdf/uran\\_12032013.pdf](http://www.szu.cz/uploads/documents/chzp/voda/pdf/uran_12032013.pdf) (citováno 1. 2. 2016).
4. WHO (2012). Uranium in Drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. WHO/SDE/WSH/03.04/118/Rev/1. WHO, Geneva. (citováno 1. 2. 2016)
5. <http://www.trilobyte.cz/downloadfree/qcmanual/calibration.pdf> (citováno 1. 2. 2016).

## 2 Nelineární kalibrace

### 2.1 Zadání

#### *Termooxidační stanovení rtuti ve vzorcích z požářiště*

Pro stanovení rtuti ve vzorcích z požářiště provozní laboratoře, které měly sloužit jako podklady uplatnění nároku úhrady sanačních prací pojišťovnou, byla použita metoda termooxidačního stanovení. Měření byla realizována na spektrometru AMA 254 (Altec, ČR). Metoda patří mezi techniky atomové absorpční spektrometrie a je jednou z nejrozšířenějších metod stanovení rtuti. Umožňuje přímou analýzu pevných vzorků bez jakékoliv úpravy, čímž výrazně snižuje čas analýzy a zejména omezuje ztráty rtuti způsobenétékáním nebo adsorpcí na stěny nádob, k nimž dochází při zpracování vzorku a též snižuje riziko kontaminace. Technikou generování par kovové rtuti s následným zachycením a nabohacením na zlatém amalgamátoru se dosahuje mimořádně vysoké citlivosti a relativní nezávislosti na matrici vzorku. K uvolnění rtuti ze vzorku dochází během kontrolovaného zahřívání a spalování v kyvetě za přítomnosti kyslíku. Závislost absorbance měřené při vlnové délce 253.7 nm na koncentraci, resp. absolutním množství Hg v ng, je uvedena v tabulce 2.1. Cílem bylo navrhnout vhodný kalibrační model uvedené závislosti a na hladině významnosti 0.05 vyčíslit limity přesnosti kalibrace a určit bodový a intervalový odhad koncentrace Hg v reálných vzorcích. Analyzovány byly vzorky saze a omítky odebrané v místnosti sousedící bezprostředně s ohniskem požáru (sklad chemikálií), vzorek omítky exponované místnosti před a po oplachu vodou a vzorek omítky z neexponované místnosti. Vzorky byly analyzovány přímo, anebo po předchozím zředění pomocí uhličitanu vápenatého vysoké čistoty (p.p.) a homogenizaci vzorku pomocí kulového vibračního mlýnku Wig-L-Bug 30 (Crescent Manufacturing Co., USA). Hodnoty absorbance určené při analýze vzorků s informacemi o navážkách jednotlivých vzorků a zředovacích faktorech použitých před vlastní analýzou jsou uvedeny v tabulce 2.2.

### 2.2 Data

**Tabulka 2.1 Závislost absorbance na množství Hg (ng) stanovená na spektrometru AMA 254**

Stanovení Hg termooxidační metodou, n = 8								
Hg (ng)	0	1	2	3	5	10	20	30
Absorbance	0.0012	0.0298	0.0606	0.0913	0.1465	0.2932	0.5582	0.7926

**Tabulka 2.2 Absorbance analyzovaných vzorků, navážky a zředění použité pro vlastní analýzu**

Vzorek	Typ vzorku	Absorbance	Navážka (mg)	Zředovací faktor
1	Saze	0.6756	25.0	10 000
2	Omítka z požářiště před oplachem	0.5532	25.5	250
3	Omítka z požářiště po oplachu	0.5540	24.8	25
4	Neexponovaná omítka	0.2910	25.1	1

## 2.3 Použitý software

Naměřená data byla vyhodnocena pomocí statistického programu QC-Expert™ 2.9 (TriloByte Statistical software, s.r.o., ČR).

## 2.4 Návrh modelu

Program QCExpert™ v modulu „Kalibrace“ nabízí kalibrační modely pro lineární a nelineární kalibrační závislosti s možností automatické detekce linearity. Pro experimentální data uvedená v tabulce 2.1, tj. závislost absorbance na absolutním množství Hg (ng) byl jako model, který nejlépe vyjadřuje vztah mezi známými  $x_i$  a experimentálně stanovenými  $y_i$  hodnotami vybrán kvadratický model (rovnice 1). Jelikož lze v oblasti stopové analýzy očekávat kalibrační model s nekonstantní chybou, byla pro výpočet použita metoda vážené regrese. Parametry navrženého kalibračního modelu jsou shrnuty v tabulce 2.3. Graf kalibrační závislosti s vyznačeným pásem spolehlivosti (plná čára červená) je uveden na obrázku 2.1.

$$y = ax^2 + bx + c \quad (1)$$

**Tabulka 2.3 Parametry kvadratického kalibračního modelu určené n a hladině významnosti 0.05 při použití metody vážené regrese**

Parametr <sup>a</sup>	Odhad <sup>b</sup>	Sm. odchylka <sup>c</sup>	Spodní mez <sup>d</sup>	Horní mez <sup>d</sup>
c <sup>e</sup>	$-6.544 \times 10^{-4}$	$1.131 \times 10^{-3}$	$-3.562 \times 10^{-3}$	$2.253 \times 10^{-3}$
b	$3.090 \times 10^{-2}$	$1.6139 \times 10^{-4}$	$3.048 \times 10^{-2}$	$3.131 \times 10^{-2}$
a	$-1.486 \times 10^{-4}$	$4.54 \times 10^{-6}$	$-1.6023 \times 10^{-4}$	$-1.369 \times 10^{-4}$

<sup>a</sup> Symbol „c“ značí absolutní člen, symbol „b“ lineární člen a „a“ kvadratický člen.

<sup>b</sup> Odhad parametru.

<sup>c</sup> Odhad směrodatné odchylky parametru.

<sup>d</sup> Spodní anebo horní mez intervalu spolehlivosti parametru na hladině významnosti 0.05.

<sup>e</sup> Absolutní člen byl shledán na hladině významnosti 0.05 jako statisticky nevýznamný.

## 2.5 Statistická analýza reziduí

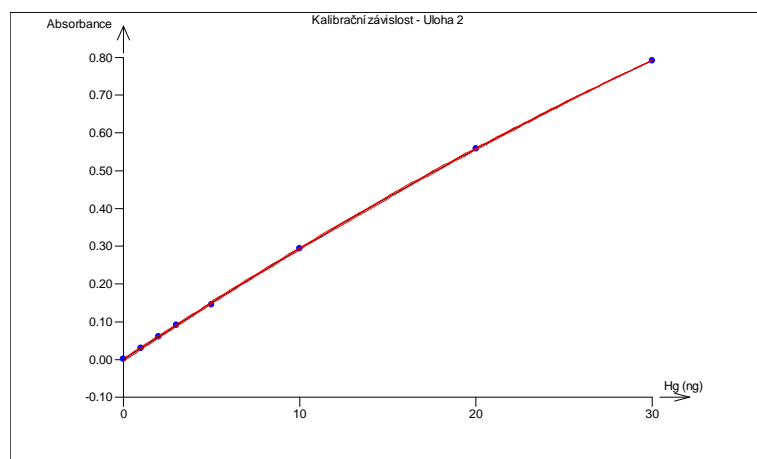
V tabulce 2.4 jsou uvedeny výsledky statistické analýzy reziduí. Těsnost proložení, čili velikost klasických reziduí, střídání znaménka a statistické charakteristiky jsou mírou vhodnosti navrženého kalibračního modelu.

Toto tvrzení dokumentuje též graf regresní křivky a graf reziduí  $e_i$  proložený neparametrickým jádrovým modelem  $K(e_i)$  (černá křivka).

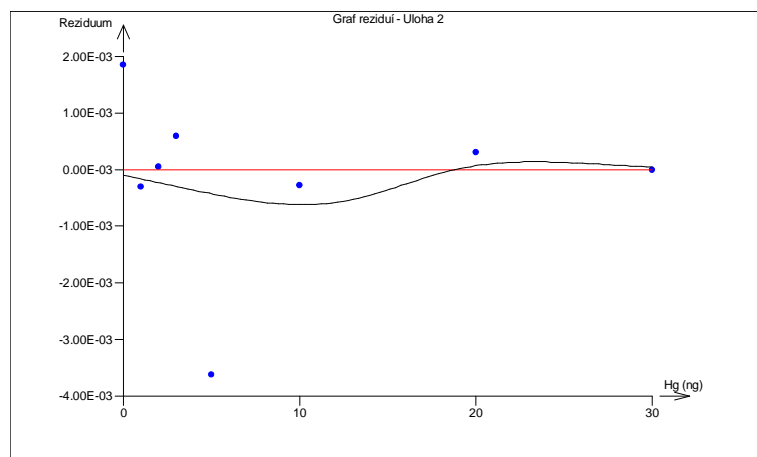
**Tabulka 2.4 Analýza reziduí<sup>a</sup>**

Bod	Naměřené x	Naměřené y	Vypočítané y	Reziduum	Váha
1	0	0.0012	-0.00065	$1.85 \times 10^{-3}$	0.8288
2	1	0.0298	0.0301	$-2.96 \times 10^{-4}$	0.8007
3	2	0.0606	0.06055	$5.07 \times 10^{-5}$	0.7748
4	3	0.0913	0.0907	$5.95 \times 10^{-4}$	0.7518
5	5	0.1465	0.1501	$-3.63 \times 10^{-3}$	0.7169
6	10	0.2932	0.2935	$-2.79 \times 10^{-4}$	0.7458
7	20	0.5582	0.5579	$3.01 \times 10^{-4}$	5.5654
8	30	0.7926	0.7926	$-5.36 \times 10^{-6}$	121.979

<sup>a</sup> Reziduální součet čtverců RSC =  $1.720 \times 10^{-5}$ ; Průměrné absolutní reziduum  $8.76 \times 10^{-4}$ ; Korelační koeficient 0.99998.



**Obrázek 2.1 Graf kalibrační závislosti absorbance na absolutním množství Hg (ng)**



**Obrázek 2.2 Graf reziduí**

## 2.6 Kalibrační meze přesnosti

Vybrané míry přesnosti kalibrace, tj. kritická hodnota, mez detekce a mez kvantifikace pro y i pro x vypočítané metodami K\*Sigma, přímou metodou analytu, přímou metodou signálu, kombinovanou metodou Ebel-Kamm a metodou K\*Sigma z regrese jsou uvedeny v tabulce 2.5. Pro výpočet byla použita hodnota faktoru K = 1.96. S výjimkou metody ISO 11843-2 dosahují hodnoty meze detekce Hg termooxidační metodou podobných hodnot, pohybujících se okolo 0.25 ng Hg. Mez stanovitelnosti metody se pohybuje okolo 0.4 ng Hg. Koncentrace Hg v analyzovaných vzorcích se pohybují vysoko nad touto hladinou, a to i pro případ analýzy nekontaminovaného vzorku č. 4.

**Tabulka 2.5 Kalibrační meze**

Metoda	$y_c$	$y_d$	$y_q$	$x_c$	$x_d$	$x_q$
Metoda podle ISO 11843-2	0.081	0.106	0.163	2.680	3.516	5.360
Přímá metoda analytu	0.003	0.007	0.011	0.128	0.253	0.376
Přímá metoda signálu, IUPAC	0.003	0.007	0.011	0.128	0.254	0.379
Kombinovaná metoda Ebel,Kamm	0.003	0.007	0.011	0.126	0.253	0.376
Metoda K*Sigma z regrese	0.003	0.007	0.011	0.128	0.256	0.385
Metoda K*Sigma, ACS	0.003	0.007	0.010	0.118	0.236	0.354

$y_c$  kritická úroveň y (nejmenší hodnota y rozeznatelná od šumu)

$y_d$  mez detekce y (hodnota, nad níž můžeme bezpečně s pravděpodobností  $1-\alpha$  prokázat přítomnost analytu)

$y_q$  mez kvantifikace y (hodnota, nad níž lze stanovit skutečnou hodnotu y s relativní chybou menší než  $\alpha$ )

$x_c$  kritická úroveň x (hodnota odpovídající  $y_c$  podle kalibračního modelu)

$x_d$  mez detekce x (minimální detekovatelná hodnota x)

$x_q$  mez kvantifikace x (minimální hodnota x, kterou lze stanovit s relativní chybou menší než  $\alpha$ )

## 2.7 Kalibrační tabulka

Výsledky stanovení Hg ve vzorcích sazí a omítek pomocí zvoleného kalibračního modelu jsou uvedeny v tabulce 2.6, resp. tabulce 2.7. Výsledky uvedené v tabulkách obsahují vždy bodový a intervalový odhad výsledku, tj. interval, ve kterém se s 95% statistickou jistotou nachází stanovovaný obsah. Výsledky uvedené v tabulce 6 obsahují přímý výstup programu QCExpert™ uvedený v příloze na CD. Tyto výsledky však nelze považovat za konečné, jelikož reflektují pouze absolutní množství rtuti v analyzovaném podílu vzorku bez ohledu na přípravu vzorku k analýze!. **Výsledky uvedené v tabulce 2.7 odpovídají hodnotám koncentrace rtuti v  $\text{mg kg}^{-1}$  ve vzorku, tj. po zohlednění naváжки vzorku a zředovacího faktoru.**

**Tabulka 2.6 Kalibrační tabulka výsledků stanovení Hg (ng) v analyzovaném podílu vzorku určených programem QCExpert. Výsledky nezohledňují přípravu vzorku k analýze.**

Číslo vzorku	Zpětný odhad	Spodní mez	Horní mez	Naměřené hodnoty
1	24.86	24.78	24.93	0.6756
2	19.81	19.71	19.92	0.5532
3	19.84	19.74	19.95	0.554
4	9.91	9.82	10.00	0.291

**Tabulka 2.7 Konečné výsledky stanovení Hg (mg kg<sup>-1</sup>) v analyzovaných vzorcích**

Vzorek	Typ analyzovaného vzorku	Zpětný odhad	Spodní mez <sup>a</sup>	Horní mez <sup>a</sup>
1	Saze	9943	9913	9971
2	Omítka z požářiště před oplachem	194.2	193.2	195.2
3	Omítka z požářiště po oplachu	20.0	19.9	20.1
4	Neexponovaná omítka	0.395	0.391	0.399

<sup>a</sup> Spodní a horní mez 95% konfidenčního intervalu

## 2.8 Závěr

Parametry kvadratického kalibračního modelu určené na hladině významnosti 0.05 při použití metody vážené regrese pro stanovení Hg na spektrometru AMA 254 jsou následující:  $y = -1.486 \times 10^{-4}(4.54 \times 10^{-6}) \times x^2 + 3.090(1.614 \times 10^{-4}) \times x$ , kde  $y$  představuje závislou veličinu (absorbanci),  $x$  absolutní množství Hg v analyzátoru v ng, v závorce je uvedena směrodatná odchylka odhadu parametru. Míry přesnosti kalibrace shrnuje tabulka 2.5, výsledky stanovení Hg ve vybraných vzorcích (bodové i intervalové odhady) jsou uvedeny v tabulce 2.7.

Z výsledků analýzy vyplývá, že nejvyšší koncentrace rtuti byla nalezena v sazích. Koncentrace rtuti ve vzorku sazí dosáhla extrémních hodnot 9943 mg kg<sup>-1</sup>! Koncentrace Hg v omítce kontaminované sazemi, a to pro vzorek před oplachem (194.2 mg kg<sup>-1</sup>) i po oplachu tlakovou vodou (20 mg kg<sup>-1</sup>) překročila mnohonásobně hodnotu (0.395 mg kg<sup>-1</sup>) stanovenou v místnosti nezasazené požárem.

## 2.9 Literatura

1. Meloun M., Militký J.: Kompendium statistického zpracování dat, Vyd. 3., nakl. Karolinum, Praha, 2012. ISBN: 978-80-246-2196-8.
2. Meloun M., Militký J.: Interaktivní statistická analýza dat, Vyd. 3., nakl. Karolinum, Praha, 2012. ISBN: 978-80-246-2173-9.
3. <http://www.trilobyte.cz/downloadfree/qcemanual/calibration.pdf> (citováno 1. 2. 2016)

## 3 Rozlišení mezi lineární a nelineární kalibrací

### 3.1 Zadání

*Validace přímého stanovení Mn v moči metodou ETAAS*

Byla vyvinuta metoda přímého stanovení Mn v moči metodou atomové absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací (ETAAS). Závislost absorbance na koncentraci manganu je uvedena v tabulce 3.1. Pro ověření správnosti metody byly analyzovány tři certifikované referenční materiály moči Seronorm™ Trace Elements Urine Blank LOT OK4636, Seronorm™ Trace Elements Urine LOT 0511545 (SERO AS, Norsko) a Lyphochek® Urine Metals Control Level 1 (Bio-Rad, USA) (viz tabulka 3.2), které v uvedeném pořadí poskytly hodnotu absorbance 0.2011, 0.2062 (hodnota pro vzorek ředěný 10x redestilovanou vodou) a 0.6937. Cílem bylo u experimentální kalibrační závislosti rozhodnout o počtu uzlových bodů, typu splinové závislosti, určit míry přesnosti kalibrace a vyčíslit bodový a intervalový odhad pro analýzu CRM a ověřit zda navržená metoda na hladině významnosti 0.05 poskytuje správné výsledky.

### 3.2 Data

**Tabulka 3.1 Závislost absorbance na koncentraci Mn ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) (n = 9) pro metodu ETAAS**

Stanovení Mn metodou ETAAS									
Koncentrace ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	0	0.5	1	1.5	2	3	4	5	6
Absorbance	0.0047	0.0872	0.1681	0.2483	0.3251	0.4773	0.6111	0.728	0.8374

**Tabulka 3.2 Koncentrace Mn ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) ve vybraných certifikovaných referenčních materiálech moči**

CRM <sup>a</sup>	Koncentrace Mn ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )		
	Deklarováno	Spodní mez <sup>b</sup>	Horní mez <sup>b</sup>
Seronorm™ LOT OK4636	1.2	0.8	1.6
Seronorm™ LOT 0511545	12.3	10.9	13.7
Bio-Rad Lyphochek® Level 1	4.7	3.8	5.7

<sup>a</sup> Certifikovaný referenční materiál.

<sup>b</sup> Spodní, resp. horní mez 95% konfidenčního intervalu.

### 3.3 Použitý software

Naměřená data byla vyhodnocena pomocí statistického programu ADSTAT 1.25 (TriloByte Statistical software, s.r.o., ČR) v modulu „Kalibrace“.

### 3.4 Návrh kalibračního modelu

Při hledání vhodného kalibračního modelu byly postupně testovány model přímky, lineární, kvadratický a kubický spline s různými alternativami zadávání uzlových bodů. Vhodnost použitého modelu byla posuzována na základě vybraných parametrů, konkrétně limity detekce koncentrace  $x_D$ , odhadu směrodatné odchyly reziduí  $s(e)$  a průměru relativních hodnot reziduí  $Mer$ . Pro optimální model nabývají tyto parametry minimálních hodnot. Jak je patrné z hodnot uvedených v tabulce 3.3, nejnižších hodnot parametru  $x_D$  bylo dosaženo pro metodu lineární spline se 4 uzlovými body, metodu kvadratického spline se 3 uzlovými body a metodu kubického spline se 2 uzlovými body. Nejnižší hodnoty  $Mer$  bylo dosaženo pro poslední z výše uvedených metod. Pokud srovnáme uvedené metody z hlediska dosažených hodnot směrodatné odchyly reziduí a průměru absolutních reziduí, bude z hlediska prvně jmenovaného faktoru před kubickým a kvadratickým modelem mírně favorizovaná metoda lineárního spline, ve druhém z parametrů dosahuje příznivějších hodnot kubický spline. Nicméně s přihlédnutím k hodnotám uvedeným v tabulce 3.3 je zřejmé, že ani jeden z parametrů  $s(e)$ ,  $Me$ , či  $RSC$  nekoresponduje z hlediska své minimální hodnoty s modelem poskytujícím minimální hodnotu  $x_D$ . Konkrétně tedy minimální hodnoty  $s(e)$  je dosaženo pro model kubického spline bez uzlových bodů, pro parametr  $Me$  je nejnižší hodnoty dosaženo pro kvadratický spline se 4 uzlovými body, pro nějž je dosaženo zároveň i nejnižší hodnoty  $RSC$ . Z parametrů uvedených v tabulce 3.3 je zřejmé, že nejlépe koresponduje s hodnotou  $x_D$  parametr  $Mer$  (%). Jelikož z hlediska dosažené detekční schopnosti je rozdíl tří tisícín  $\mu\text{g L}^{-1}$  mezi metodou lineárního spline se 4 uzlovými body a metodou kubického spline se 2 uzlovými body zanedbatelný, přičemž druhá z uvedených metod dosahuje nižší hodnoty  $Mer$  při nižším počtu uzlových bodů, byla pro kalibrační účely zvolena metoda kubického spline se 2 uzlovými body. Parametry zvoleného modelu (rovnice 1) jsou uvedeny v tabulce 3.4.

Těsnost proložení dat modelem přímky, lineárního spline se 4 uzlovými body, kvadratického a kubického spline se 3, resp. 2 uzlovými body dokumentuje obrázek 3.1

**Tabulka 3.3 Hodnoty statistických charakteristik regrese pro různé regresní modely s alternativami zadávání uzlových bodů**

Metoda	Počet uzlů	$x_D$	$s(e)$	$Me$	$Mer$ (%)	$RSC$
<b>Přímka</b>	---	0.386	$2.191 \times 10^{-2}$	$1.623 \times 10^{-2}$	62.77	$3.361 \times 10^{-3}$
<b>Lineární spline</b>	1	0.108	$5.312 \times 10^{-3}$	$3.534 \times 10^{-3}$	4.545	$1.693 \times 10^{-4}$
	2	0.085	$3.544 \times 10^{-3}$	$2.009 \times 10^{-3}$	2.531	$6.281 \times 10^{-5}$
	3	0.034	$1.202 \times 10^{-3}$	$6.761 \times 10^{-4}$	1.512	$5.782 \times 10^{-6}$
	<b>4</b>	<b>0.030</b>	<b><math>8.827 \times 10^{-4}</math></b>	<b><math>4.453 \times 10^{-4}</math></b>	<b>0.728</b>	<b><math>2.337 \times 10^{-6}</math></b>
	5	0.048	$1.027 \times 10^{-3}$	$3.175 \times 10^{-4}$	0.563	$2.110 \times 10^{-6}$
<b>Kvadratický spline</b>	0	0.066	$3.283 \times 10^{-3}$	$2.395 \times 10^{-3}$	35.459	$6.466 \times 10^{-5}$
	1	0.054	$2.181 \times 10^{-3}$	$1.284 \times 10^{-3}$	2.933	$2.377 \times 10^{-5}$
	2	0.042	$1.407 \times 10^{-3}$	$7.797 \times 10^{-4}$	1.242	$7.923 \times 10^{-6}$
	<b>3</b>	<b>0.033</b>	<b><math>9.179 \times 10^{-4}</math></b>	<b><math>3.827 \times 10^{-4}</math></b>	<b>0.183</b>	<b><math>2.528 \times 10^{-6}</math></b>
	4	0.038	$7.843 \times 10^{-4}$	$2.335 \times 10^{-4}$	0.236	$1.230 \times 10^{-6}$
<b>Kubický spline</b>	0	0.060	$2.320 \times 10^{-4}$	$1.371 \times 10^{-3}$	2.397	$2.692 \times 10^{-5}$
	1	0.046	$1.475 \times 10^{-3}$	$8.354 \times 10^{-4}$	1.700	$8.700 \times 10^{-6}$
	<b>2</b>	<b>0.033</b>	<b><math>9.040 \times 10^{-4}</math></b>	<b><math>3.804 \times 10^{-4}</math></b>	<b>0.172</b>	<b><math>2.452 \times 10^{-6}</math></b>
	3	0.048	$1.012 \times 10^{-3}$	$3.129 \times 10^{-4}$	0.319	$2.047 \times 10^{-6}$

Průměr absolutních hodnot reziduí,  $Me$ ; Průměr relativních reziduí,  $Mer$  (%);  $x_D$  limita detekce koncentrace; odhad směrodatné odchyly reziduí,  $s(e)$ .



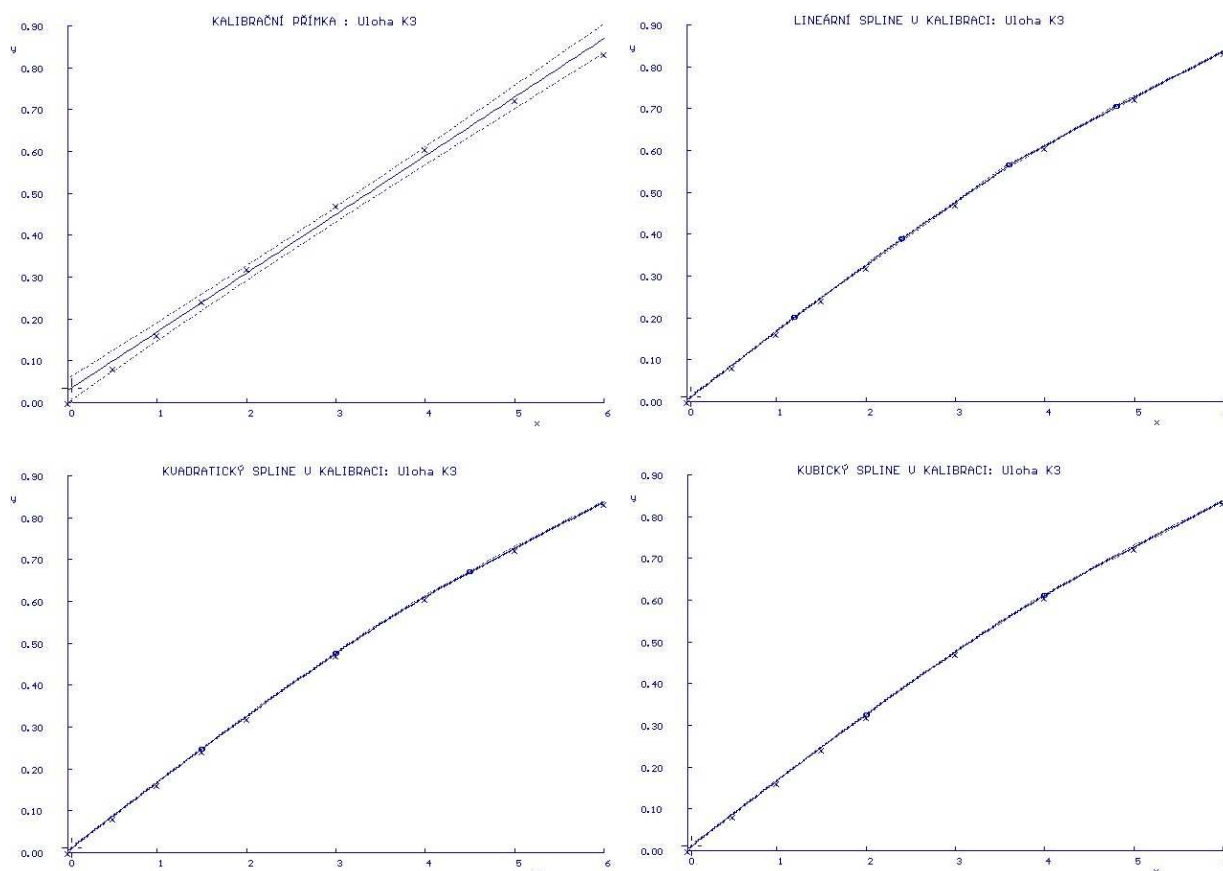
$$y = e[i] \times x^3 + f[i] \times x^2 + g[i] \times x + h[i], \text{ pro } k[i-1] < x < k[i] \quad (1)$$

**Tabulka 3.4** Parametry kubického modelu se dvěma uzlovými body<sup>a,b</sup>

k[i]	e[i]	f[i]	g[i]	h[i]
2.0	$-8.476 \times 10^{-5}$	$-2.553 \times 10^{-3}$	0.1661	$4.728 \times 10^{-3}$
4.0	$-1.468 \times 10^{-3}$	$5.746 \times 10^{-3}$	0.1495	$1.579 \times 10^{-2}$
6.0	$2.895 \times 10^{-3}$	$-4.661 \times 10^{-2}$	0.3589	$-2.634 \times 10^{-1}$

<sup>a</sup> Koeficienty rovnice:  $e[i] \cdot x^3 + f[i] \cdot x^2 + g[i] \cdot x + h[i]$  pro  $k[i-1] < x \leq k[i]$ .

<sup>b</sup> Podmínky analýzy: počet bodů,  $n=9$ ; počet uzlů,  $m=2$ ; hodnoty uzlů  $k[1]=2, k[2]=4$ .



**Obr. 3.1** Těsnost proložení experimentálních dat modelem přímky, lineárního spline se 4 uzlovými body, kvadratického spline se 3 uzlovými body a kubického spline se 2 uzlovými body

## 3.5 Analýza reziduí

V tabulce 3.5 jsou uvedeny výsledky statistické analýzy reziduí. Těsnost proložení, čili velikost reziduí, střídání znaménka a statistické charakteristiky jsou mírou vhodnosti navrženého kalibračního modelu.

**Tabulka 3.5 Analýza reziduí**

Bod [i]	Naměřené $y_{exp}[i]$	Predikované $y_{vyp}[i]$	Absolutní reziduum $e[i]$	Relativní reziduum $e_r[i]$
1	$4.700 \times 10^{-3}$	$4.728 \times 10^{-3}$	$2.843 \times 10^{-5}$	$6.014 \times 10^{-1}$
2	$8.720 \times 10^{-2}$	$8.713 \times 10^{-2}$	$-7.455 \times 10^{-5}$	$-8.557 \times 10^{-2}$
3	$1.681 \times 10^{-1}$	$1.682 \times 10^{-1}$	$8.223 \times 10^{-5}$	$4.890 \times 10^{-2}$
4	$2.483 \times 10^{-1}$	$2.478 \times 10^{-1}$	$-4.648 \times 10^{-4}$	$-1.875 \times 10^{-1}$
5	$3.251 \times 10^{-1}$	$3.260 \times 10^{-1}$	$9.208 \times 10^{-4}$	$2.824 \times 10^{-1}$
6	$4.773 \times 10^{-1}$	$4.764 \times 10^{-1}$	$-9.477 \times 10^{-4}$	$-1.989 \times 10^{-1}$
7	$6.111 \times 10^{-1}$	$6.118 \times 10^{-1}$	$6.522 \times 10^{-4}$	$1.066 \times 10^{-1}$
8	$7.280 \times 10^{-1}$	$7.278 \times 10^{-1}$	$-2.247 \times 10^{-4}$	$-3.088 \times 10^{-2}$
9	$8.374 \times 10^{-1}$	$8.374 \times 10^{-1}$	$2.809 \times 10^{-5}$	$3.354 \times 10^{-3}$

<sup>a</sup> Reziduální součet čtverců RSC =  $2.452 \times 10^{-6}$ ; Průměr absolutních hodnot reziduí, Me  $3.804 \times 10^{-4}$ ; Průměr relativních reziduí, Mer (%) 0.172; Odhad reziduálního rozptylu,  $s(e)^2$   $8.172 \times 10^{-7}$ ; Odhad směrodatné odchylky reziduí,  $s(e)$ ,  $9.040 \times 10^{-4}$ .

## 3.6 Kalibrační meze přesnosti

Míry přesnosti kalibrace, tj. kritická úroveň a limita detekce signálu a koncentrace jsou uvedeny v tabulce 3.6.

**Tabulka 3.6 Kalibrační meze**

	Kritická úroveň	Limita detekce
Signálu	$y_C: 7.527 \times 10^{-3}$	$y_D: 1.013 \times 10^{-2}$
Koncentrace ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$x_C: 0.0169$	$x_D: 0.0325$

## 3.7 Kalibrační tabulka

Výsledky stanovení Mn ve vzorcích CRM moči pomocí zvoleného kalibračního modelu jsou uvedeny v tabulce 3.7. Výsledky obsahují bodový a intervalový odhad výsledku, tj. interval, ve kterém se s 95% statistickou jistotou nachází stanovovaný obsah analytu.

**Tabulka 3.7 Výsledky stanovení Mn ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) ve vybraných CRM moči**

Vzorek	Inverzní odhad	Spodní mez <sup>a</sup>	Horní mez <sup>a</sup>	Naměřeno
Seronorm <sup>TM</sup> LOT OK4636	1.21	1.19	1.21	0.2011
Seronorm <sup>TM</sup> LOT 0511545	12.38 <sup>b</sup>	12.27 <sup>b</sup>	12.48 <sup>b</sup>	0.2062
Bio-Rad Lyphochek Level 1	4.69	4.67	4.72	0.6937

<sup>a</sup> Spodní a horní mez 95% konfidenčního intervalu.

<sup>b</sup> Výsledek zohledňuje faktor ředění vzorku (10), který byl použit před vlastní analýzou.

### 3.8 Závěr

Jako nejlepší kalibrační model závislosti absorbance na koncentraci Mn stanovené metodou ETAAS byl zvolen kubický spline se dvěma uzlovými body. Model poskytl příznivou hodnotu limity detekce a směrodatné odchylky reziduí, nejnižší hodnotu průměru relativních reziduí, při nižším počtu uzlových bodů nežli lineární spline se 4 uzlovými body, pro který bylo dosaženo jen nepatrně lepší hodnoty  $x_D$ . Pomocí zvoleného kalibračního modelu byly určeny bodové a intervalové odhady koncentrace Mn ve třech certifikovaných referenčních materiálech moči. Výsledky shrnuje tabulka 3.7. Na základě uvedených výsledků lze konstatovat, že s 95% statistickou jistotou se koncentrace Mn bude nacházet v intervalu 1.19–1.21  $\mu\text{g L}^{-1}$  pro CRM Seronorm<sup>TM</sup> LOT OK4636, 12.27–12.48  $\mu\text{g L}^{-1}$  pro Seronorm<sup>TM</sup> LOT 0511545 a 4.67–4.72  $\mu\text{g L}^{-1}$  pro Bio-Rad Lyphochek Level 1. Jelikož certifikované hodnoty Mn (1.2, 12.3 a 4.7  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) se pro jednotlivé materiály v uvedeném pořadí (viz tabulka 3.2) nacházejí v uvedených intervalech, lze na hladině významnosti 0.05 potvrdit správnost stanovení Mn v moči pomocí navržené metody.

### 3.9 Literatura

1. Meloun M., Militký J.: Kompendium statistického zpracování dat, Vyd. 3., nakl. Karolinum, Praha, 2012. ISBN: 978-80-246-2196-8.
2. Meloun M., Militký J.: Interaktivní statistická analýza dat, Vyd. 3., nakl. Karolinum, Praha, 2012. ISBN: 978-80-246-2173-9.