

SEMESTRÁLNÍ PRÁCE

Licenční studium

STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT PŘI KONTROLE A ŘÍZENÍ JAKOSTI

Předmět

KALIBRACE A LIMITY JEJÍ PŘESNOSTI

(QC EXPERT)

Příklad 1 Lineární kalibrace HPLC metody na stanovení aktivní látky paklitaxelu

Zadání:

Metodou kalibrační křivky se má stanovit obsah paklitaxelu v léčivém přípravku. Kalibrační křivka je závislostí měřené odezvy UV detektoru při vlnové délce 230 nm v HPLC měření různých koncentrací standardů paklitaxelu v matrici o rozsahu 70-120 % obsahu aktivní látky dle specifikace léčivého přípravku. Koncentrace uváděné v kalibračním modelu zohledňují veškerá ředění vzorků nezbytná pro měření v lineární oblasti rozsahu UV detektoru a související přepočty koncentrací na uváděný rozměr mg/ml. Každé měření je opakováno třikrát. Směrodatná odchylka šumu detektoru je ± 2 mAU. Stanovují se koncentrace tří vzorků „Sample 1-3“, které byly změřeny vždycky třikrát. Stanovují se bodové a 95 % intervalové odhady koncentrací a rovněž míry přesnosti kalibračního modelu.

Kalibrační a naměřená data:

c [mg/ml]	Calibration response [mAU*s]	Samples	Repetition 1 [mAU*s]	Repetition 2 [mAU*s]	Repetition 3 [mAU*s]
14,0	56,8	Sample1	63,2	63,4	64,5
14,0	58,0	Sample2	83,1	83,5	84,2
14,0	58,5	Sample3	95,5	96,1	94,3
16,0	65,0	-	-	-	-
16,0	65,5	-	-	-	-
16,0	65,9	-	-	-	-
18,0	74,2	-	-	-	-
18,0	74,1	-	-	-	-
18,0	74,4	-	-	-	-
20,0	83,2	-	-	-	-
20,0	83,5	-	-	-	-
20,0	84,0	-	-	-	-
22,0	93,0	-	-	-	-
22,0	92,0	-	-	-	-
22,0	92,8	-	-	-	-
24,0	101,0	-	-	-	-
24,0	102,0	-	-	-	-
24,0	101,1	-	-	-	-

1. Kalibrace

Název úlohy : Lineární kalibrace HPLC metody na stanovení aktivní látky paklitaxelu
Počet dat : 18
Hladina významnosti : 0,05
Volba kalibračního modelu : Automatická
Použitý kalibrační model : Lineární
Vhodnost použitého modelu : Vyhovuje
Použita vážená regrese : Ne

2. Parametry kalibračního modelu

Parametr	Odhad	Sm. odchylka	Spodní mez	Horní mez
Abs.	-4,6324	0,8436	-6,4208	-2,8440
X	4,4105	0,0437	4,3178	4,5031

Významnost absolutního členu

Hodnota		Spodní mez	Horní mez	Závěr
-4,6324		-6,4208	-2,8440	Významný

Validace směrnice

Hodnota	Spodní mez	Horní mez	Směrnice=1
4,4105	4,3178	4,5031	Ne
Citlivost metody :	4,41047619		
Zvolený faktor K :	1,959963999		
Zadaná sm.odch. slepého signálu :	2		

3. Kalibrační meze

c..kritická
d..detekce
q..kvantifikace

Metoda	Yc	Yd	Yq	Xc	Xd	Xq
Přímá metoda analytu	-2,2	0,1	2,4	0,6	1,1	1,6
Přímá metoda signálu, IUPAC	-2,2	0,2	2,5	0,6	1,1	1,6
Kombinovaná metoda Ebel,Kamm	-2,2	0,1	2,4	0,5	1,1	1,6

4. Kalibrační tabulka

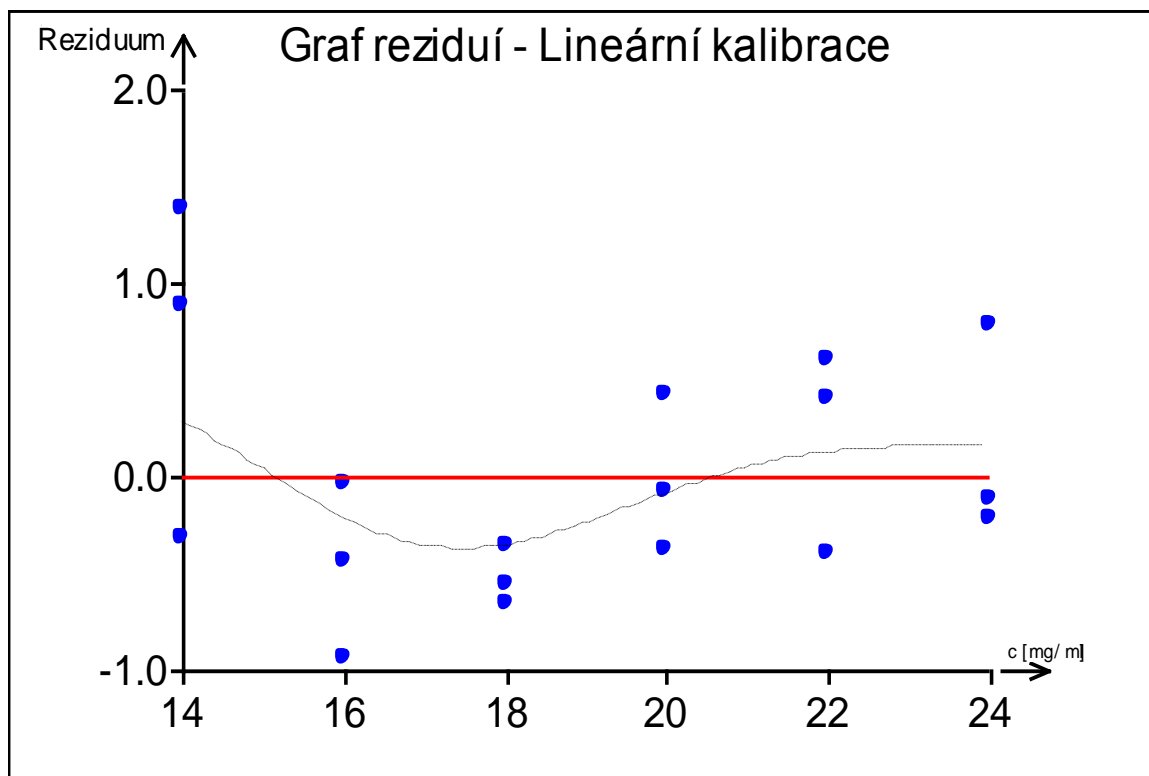
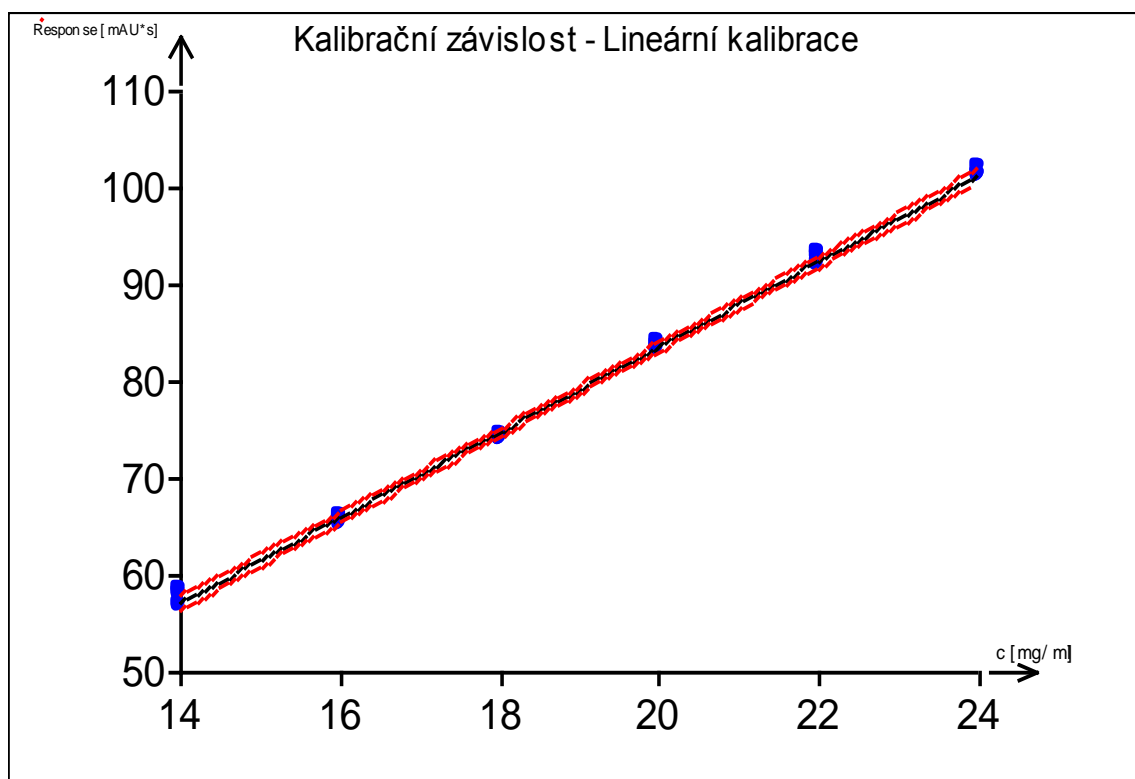
Číslo vzorku	Zpětný odhad	Spodní mez	Horní mez	Nepřímý odhad	Naměřené hodnoty		
1	15,5	14,7	16,3	0	63,2	63,4	64,5
2	20,0	19,4	20,7	0	83,1	83,5	84,2
3	22,7	21,6	23,7	0	95,5	96,1	94,3

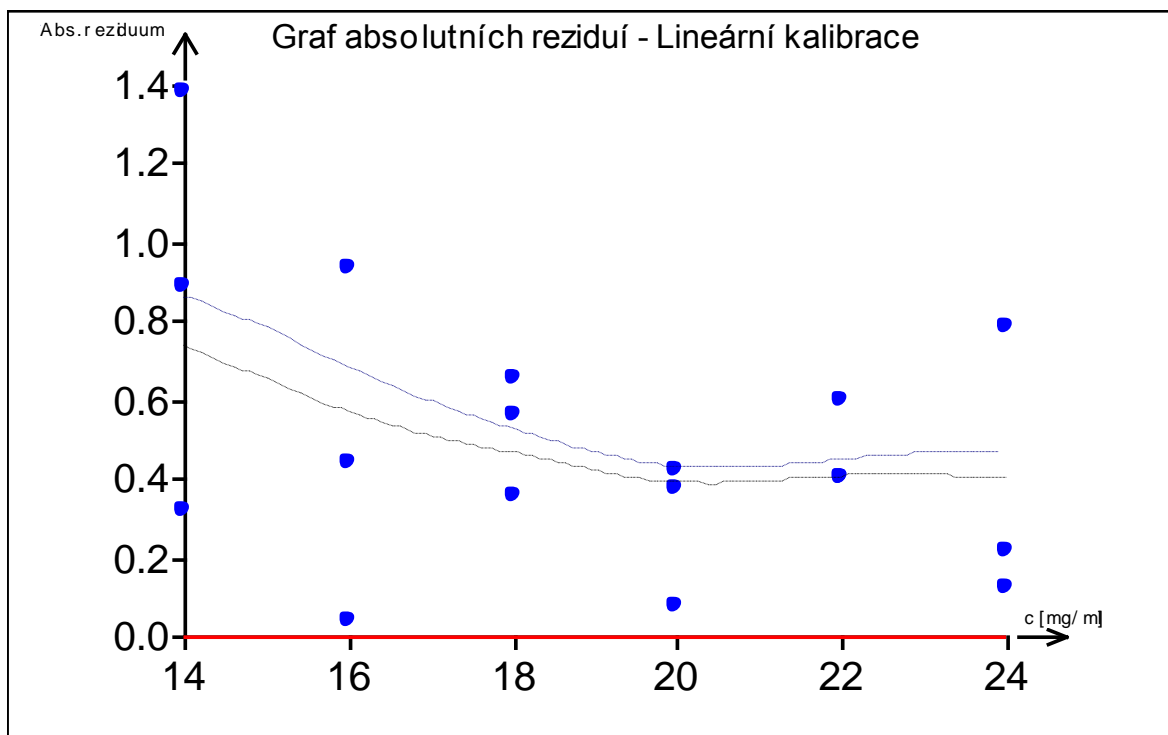
5. Analýza reziduí

Reziduální součet čtverců : 6,4169523810
Průměrné absolutní reziduum : 0,4976719577
Korelační koeficient : 0,9992154922

Číslo měření	Naměřené X	Naměřené Y	Vypočítané Y	Reziduum	Váha
1	14,0	56,8	57,11428571	-0,3142857143	1
2	14,0	58,0	57,11428571	0,8857142857	1
3	14,0	58,5	57,11428571	1,385714286	1
4	16,0	65,0	65,9352381	-0,9352380952	1
5	16,0	65,5	65,9352381	-0,4352380952	1
6	16,0	65,9	65,9352381	-0,03523809524	1
7	18,0	74,2	74,75619048	-0,5561904762	1
8	18,0	74,1	74,75619048	-0,6561904762	1
9	18,0	74,4	74,75619048	-0,3561904762	1
10	20,0	83,2	83,57714286	-0,3771428571	1
11	20,0	83,5	83,57714286	-0,07714285714	1
12	20,0	84,0	83,57714286	0,4228571429	1
13	22,0	93,0	92,39809524	0,6019047619	1
14	22,0	92	92,39809524	-0,3980952381	1
15	22,0	92,8	92,39809524	0,4019047619	1
16	24,0	101,0	101,2190476	-0,219047619	1
17	24,0	102,0	101,2190476	0,780952381	1
18	24,0	101,1	101,2190476	-0,119047619	1

6. Grafický výstup





7. Závěr

Metodou lineární kalibrace byla stanovena koncentrace tří vzorků paklitaxelu v léčivém přípravku jako zpětný odhad: $sample_1=15,5$ mg/ml (95 % interval spolehlivosti, 14,7-16,3 mg/ml); $sample_2=20,0$ mg/ml (95 % interval spolehlivosti, 19,4-20,7 mg/ml) a $sample_3=22,7$ mg/ml (95 % interval spolehlivosti, 21,6-23,7 mg/ml) opakovaně naměřených ploch HPLC píků dle tabulky. Všechny tři koncentrace jsou nad vypočtenou mezí kvantifikace [$c_q=1.6$ mg/ml; $y_q=2.4$ mAU].

Příklad 2 Nelineární kalibrace s využitím spline interpolačních uzlů u stanovení obsahu molybdenu v oceli

Zadání:

Při kalibraci obsahu molybdenu v oceli ($[C_{Cal}] = \%$) emisní spektrální analýzou u 8 standardů, bylo každé měření signálu ($[I_{Cal}] = \text{mA}$) čtyřikrát opakováno a byla naměřena kalibrační křivka dle tabulky. Zjistěte ze zpětných odhadů metodou kalibrační křivky bodové a 95 % intervalové odhady koncentrací molybdenu ve třech reálních vzorcích vz1-3, která byla podrobena emisnímu měření dle údajů obsažených v tabulce. Vyhodnoťte také míry přesnosti kalibrace.

1. Kalibrační a naměřená data:

C_{Cal} [%]	I_{Cal} [mA]	C_{Cal} [%]	I_{Cal} [mA]	Vzorek	I [mA]
0.01	0.047	0.11	0.333	Vz1	0.15
0.01	0.052	0.11	0.340	Vz2	0.25
0.01	0.038	0.11	0.339	Vz3	0.30
0.01	0.046	0.11	0.337	-	-
0.03	0.129	0.15	0.389	-	-
0.03	0.135	0.15	0.385	-	-
0.03	0.131	0.15	0.379	-	-
0.03	0.128	0.15	0.381	-	-
0.05	0.194	0.21	0.435	-	-
0.05	0.197	0.21	0.437	-	-
0.05	0.199	0.21	0.441	-	-
0.05	0.200	0.21	0.443	-	-
0.08	0.275	0.30	0.475	-	-
0.08	0.270	0.30	0.471	-	-
0.08	0.277	0.30	0.468	-	-
0.08	0.274	0.30	0.476	-	-

2. Způsob vyhodnocení kalibrační závislosti, zpětných odhadů a míry přesnosti kalibrace

Data v tabulce byla zpracována nelineární kalibrací s využitím 0 až 3-uzlové kvadratické a kubické spline interpolace. Kalkulace byly provedeny v programu Adstat. Čím je nižší odhad směrodatné odchytky reziduí a limitů přesnosti kalibrace, tím je kalibrační model korektnější. V další kapitole proto budou uvedeny výsledky výpočtů zahrnující výše uvedené kritické parametry a kompletní analýza kalibrace bude ukázána pro nejlepší model. V poslední kapitole je grafický výstup dat proložených nejlepší kalibrační křivkou nejlepšího testovaného modelu.

3. Kvadratický spline bez použití uzlů

Reziduální součet čtverců, RSC:	5.6816E-03
Průměr absolutních hodnot reziduí, Me:	1.1988E-02
Průměr relativních reziduí, Mer[%]:	6.946
Odhad reziduálního rozptylu, $s^2(e)$:	1.9592E-04
Odhad směrodatné odchytky reziduí, $s(e)$:	1.3997E-02

Kalibrační meze:

Kritická úroveň:	yc: 4.363017E-02	xc: 5.179920E-01
Limita detekce:	yd: 5.432263E-02	xd: 6.716735E-03

Kalibrační tabulka:

Měřená hodnota	Inverzní odhad	Konfidenční interval	
		dolní mez	horní mez
yexp[i]	xvyp[i]	Llxvyp[i]	Luxvyp[i]
1.500000E-01	3.756072E-02	3.508581E-02	3.993159E-02
2.500000E-01	7.519962E-02	7.271035E-02	7.776182E-02
3.000000E-01	9.723649E-02	9.415024E-02	1.004888E-00

4. Kvadratický spline s jedním uzlem

Reziduální součet čtverců, RSC:	1.0311E-03
Průměr absolutních hodnot reziduí, Me:	4.5101E-03
Průměr relativních reziduí, Mer[%]:	2.929
Odhad reziduálního rozptylu, s ² (e):	3.6823E-05
Odhad směrodatné odchylky reziduí, s(e):	6.0682E-03

Kalibrační meze:

Kritická úroveň:	yc: 1.766176E-02	xc: 1.531282E-03
Limita detekce:	yd: 2.358907E-02	xd: 2.974554E-03

Kalibrační tabulka:

Měřená hodnota	Inverzní odhad	Konfidenční interval	
		dolní mez	horní mez
yexp[i]	xvyp[i]	Llxvyp[i]	Luxvyp[i]
1.500000E-01	3.692214E-02	3.599731E-02	3.783842E-02
2.500000E-01	7.031376E-02	6.904001E-02	7.162260E-02
3.000000E-01	9.107286E-02	8.938492E-02	9.280278E-02

5. Kvadratický spline se dvěma uzly

Reziduální součet čtverců, RSC:	5.3418E-04
Průměr absolutních hodnot reziduí, Me:	3.3302E-03
Průměr relativních reziduí, Mer[%]:	2.055
Odhad reziduálního rozptylu, s ² (e):	1.9784E-05
Odhad směrodatné odchylky reziduí, s(e):	4.4480E-03

Kalibrační meze:

Kritická úroveň:	yc: 8.161210E-03	xc: 1.220935E-03
Limita detekce:	yd: 1.337745E-02	xd: 2.361855E-03

Kalibrační tabulka:

Měřená hodnota	Inverzní odhad	Konfidenční interval	
		dolní mez	horní mez
yexp[i]	xvyp[i]	Llxvyp[i]	Luxvyp[i]
1.500000E-01	3.601374E-02	3.531740E-02	3.671763E-02
2.500000E-01	6.839830E-02	6.722228E-02	6.959298E-02
3.000000E-01	9.023395E-02	8.878862E-02	9.168110E-02

6. Kvadratický spline se třema uzly

Reziduální součet čtverců, RSC: 4.5482E-04
Průměr absolutních hodnot reziduí, Me: 3.1103E-03
Průměr relativních reziduí, Mer[%]: 1.970
Odhad reziduálního rozptylu, $s^2(e)$: 1.7493E-05
Odhad směrodatné odchylky reziduí, $s(e)$: 4.1825E-03

Kalibrační meze:

Kritická úroveň: yc: 8.403663E-03 xc: 4.487351E-01
Limita detekce: yd: 1.398975E-02 xd: 2.557313E-03

Kalibrační tabulka:

Měřená hodnota	Inverzní odhad	Konfidenční interval	
		dolní mez	horní mez
yexp[i]	xvyp[i]	Llxvyp[i]	Luxvyp[i]
1.500000E-01	3.597703E-02	3.520287E-02	3.677182E-02
2.500000E-01	6.853621E-02	6.738120E-02	6.968166E-02
3.000000E-01	9.066176E-02	8.912166E-02	9.231176E-02

7. Kubický spline bez použití uzlů

Reziduální součet čtverců, RSC: 7.3721E-04
Průměr absolutních hodnot reziduí, Me: 3.7792E-03
Průměr relativních reziduí, Mer[%]: 2.354
Odhad reziduálního rozptylu, $s^2(e)$: 2.6329E-05
Odhad směrodatné odchylky reziduí, $s(e)$: 5.1312E-03

Kalibrační meze:

Kritická úroveň: yc: 1.101937E-02 xc: 1.295097E-03
Limita detekce: yd: 1.650451E-02 xd: 2.512874E-03

Kalibrační tabulka:

Měřená hodnota	Inverzní odhad	Konfidenční interval	
		dolní mez	horní mez
yexp[i]	xvyp[i]	Llxvyp[i]	Luxvyp[i]
1.500000E-01	3.628741E-02	3.551121E-02	3.706271E-02
2.500000E-01	6.967554E-02	6.852197E-02	7.085181E-02
3.000000E-01	9.123173E-02	8.975934E-02	9.272357E-02

8. Kubický spline s jedním uzlem

Reziduální součet čtverců, RSC: 4.6064E-04
Průměr absolutních hodnot reziduí, Me: 3.0860E-03
Průměr relativních reziduí, Mer[%]: 1.928
Odhad reziduálního rozptylu, $s^2(e)$: 1.7061E-05
Odhad směrodatné odchylky reziduí, $s(e)$: 4.1304E-03

Kalibrační meze:

Kritická úroveň: yc: 4.170123E-03 xc: 1.183380E-03
Limita detekce: yd: 9.539137E-03 xd: 2.272378E-03

Kalibrační tabulka:

Měřená hodnota	Inverzní odhad	Konfidenční interval	
		dolní mez	horní mez
yexp[i]	xvyp[i]	Llxvyp[i]	Luxvyp[i]
1.500000E-01	3.558769E-02	3.489619E-02	3.629029E-02
2.500000E-01	6.866888E-02	6.758199E-02	6.976023E-02
3.000000E-01	9.110159E-02	8.983575E-02	9.237910E-02

9. Kubický spline se dvěma uzly

Reziduální součet čtverců, RSC:	4.4336E-04
Průměr absolutních hodnot reziduí, Me:	3.0572E-03
Průměr relativních reziduí, Mer[%]:	1.918
Odhad reziduálního rozptylu, s ² (e):	1.7052E-05
Odhad směrodatné odchylky reziduí, s(e):	4.1294E-03

Kalibrační meze:

Kritická úroveň:	yc: 7.270467E-03	xc: 4.064259E-01
Limita detekce:	yd: 1.348026E-02	xd: 2.806228E-03

Kalibrační tabulka:

Měřená hodnota	Inverzní odhad	Konfidenční interval	
		dolní mez	horní mez
yexp[i]	xvyp[i]	Llxvyp[i]	Luxvyp[i]
1.500000E-01	3.578556E-02	3.494046E-02	3.664759E-02
2.500000E-01	6.865137E-02	6.758313E-02	6.972819E-02
3.000000E-01	9.067853E-02	8.911315E-02	9.232613E-02

10. Kubický spline se třema uzly

Reziduální součet čtverců, RSC:	3.4578E-04
Průměr absolutních hodnot reziduí, Me:	2.7381E-03
Průměr relativních reziduí, Mer[%]:	1.863
Odhad reziduálního rozptylu, s ² (e):	1.3831E-05
Odhad směrodatné odchylky reziduí, s(e):	3.7190E-03

Kalibrační meze:

Kritická úroveň:	yc: 2.172370E-03	xc: 1.488532E-03
Limita detekce:	yd: 8.785791E-03	xd: 2.723665E-03

Kalibrační tabulka:

Měřená hodnota	Inverzní odhad	Konfidenční interval	
		dolní mez	horní mez
yexp[i]	xvyp[i]	Llxvyp[i]	Luxvyp[i]
1.500000E-01	3.526164E-02	3.439065E-02	3.613762E-02
2.500000E-01	6.979010E-02	6.841383E-02	7.123337E-02
3.000000E-01	9.153392E-02	9.004411E-02	9.296699E-02

11. Kubický spline s jedním uzlovým bodem - nejlepší proložení dat

Hodnoty uzlů:

a: 1.0000E-02 k[1]: 1.5500E-01 b: 3.0000E-01

Parametre kalibrace:

Koeficienty rovnice : $e[i]*x^3+f[i]*x^2+g[i]*x+h[i]$ pro $k[i-1] < x \leq k[i]$

k[i]	e[i]	f[i]	g[i]	h[i]
1.5500E-01	4.1305E+01	-2.2372E+01	5.0072E+00	-1.7242E-03
3.0000E-01	-1.2455E+00	-2.5855E+00	1.9404E+00	1.5673E-01

Analýza reziduí:

Bod	Měřená hodnota	Predikovaná hodnota	Absolutní reziduum	Relativní reziduum
i	yexp[i]	yvyp[i]	e[i]	er[i]
1	4.7000E-02	4.6152E-02	-8.4769E-04	-1.8367E+00
2	5.2000E-02	4.6152E-02	-5.8477E-03	-1.2670E+01
3	3.8000E-02	4.6152E-02	8.1523E-03	1.7664E+01
4	4.6000E-02	4.6152E-02	1.5231E-04	3.3002E-01
5	1.2900E-01	1.2947E-01	4.7358E-04	3.6578E-01
6	1.3500E-01	1.2947E-01	-5.5264E-03	-4.2684E+00
7	1.3100E-01	1.2947E-01	-1.5264E-03	-1.1789E+00
8	1.2800E-01	1.2947E-01	1.4736E-03	1.1381E+00
9	1.9400E-01	1.9787E-01	3.8715E-03	1.9566E+00
10	1.9700E-01	1.9787E-01	8.7151E-04	4.4044E-01
11	1.9900E-01	1.9787E-01	-1.1285E-03	-5.7032E-01
12	2.0000E-01	1.9787E-01	-2.1285E-03	-1.0757E+00
13	2.7500E-01	2.7682E-01	1.8242E-03	6.5896E-01
14	2.7000E-01	2.7682E-01	6.8242E-03	2.4652E+00
15	2.7700E-01	2.7682E-01	-1.7584E-04	-6.3520E-02
16	2.7400E-01	2.7682E-01	2.8242E-03	1.0202E+00
17	3.3300E-01	3.3335E-01	3.5176E-04	1.0552E-01
18	3.4000E-01	3.3335E-01	-6.6482E-03	-1.9944E+00
19	3.3900E-01	3.3335E-01	-5.6482E-03	-1.6944E+00
20	3.3700E-01	3.3335E-01	-3.6482E-03	-1.0944E+00
21	3.8900E-01	3.8540E-01	-3.5961E-03	-9.3306E-01
22	3.8500E-01	3.8540E-01	4.0394E-04	1.0481E-01
23	3.7900E-01	3.8540E-01	6.4039E-03	1.6616E+00
24	3.8100E-01	3.8540E-01	4.4039E-03	1.1427E+00
25	4.3500E-01	4.3865E-01	3.6539E-03	8.3297E-01
26	4.3700E-01	4.3865E-01	1.6539E-03	3.7703E-01
27	4.4100E-01	4.3865E-01	-2.3461E-03	-5.3485E-01
28	4.4300E-01	4.3865E-01	-4.3461E-03	-9.9079E-01
29	4.7500E-01	4.7252E-01	-2.4811E-03	-5.2508E-01
30	4.7100E-01	4.7252E-01	1.5189E-03	3.2145E-01
31	4.6800E-01	4.7252E-01	4.5189E-03	9.5634E-01
32	4.7600E-01	4.7252E-01	-3.4811E-03	-7.3672E-01

Reziduální součet čtverců, RSC:	4.6064E-04
Průměr absolutních hodnot reziduí, Me:	3.0860E-03
Průměr relativních reziduí, Mer[%]:	1.928
Odhad reziduálního rozptylu, $s^2(e)$:	1.7061E-05
Odhad směrodatné odchylky reziduí, $s(e)$:	4.1304E-03

Analýza derivací a integrálů

Bod	Predikovan hodnota	První derivace	Druhá derivace	Integrál
i	Yvyp[i]	der1[i]	der2[i]	int[i]
1	4.6152E-02	4.5722E+00	-4.2265E+01	2.2337E-08
2	4.6152E-02	4.5722E+00	-4.2265E+01	2.2337E-08
3	4.6152E-02	4.5722E+00	-4.2265E+01	2.2337E-08
4	4.6152E-02	4.5722E+00	-4.2265E+01	2.2337E-08
5	1.2947E-01	3.7765E+00	-3.7308E+01	1.7828E-03
6	1.2947E-01	3.7765E+00	-3.7308E+01	1.7828E-03
7	1.2947E-01	3.7765E+00	-3.7308E+01	1.7828E-03
8	1.2947E-01	3.7765E+00	-3.7308E+01	1.7828E-03
9	1.9787E-01	3.0799E+00	-3.2352E+01	5.0795E-03
10	1.9787E-01	3.0799E+00	-3.2352E+01	5.0795E-03
11	1.9787E-01	3.0799E+00	-3.2352E+01	5.0795E-03
12	1.9787E-01	3.0799E+00	-3.2352E+01	5.0795E-03
13	2.7682E-01	2.2208E+00	-2.4917E+01	1.2264E-02
14	2.7682E-01	2.2208E+00	-2.4917E+01	1.2264E-02
15	2.7682E-01	2.2208E+00	-2.4917E+01	1.2264E-02
16	2.7682E-01	2.2208E+00	-2.4917E+01	1.2264E-02
17	3.3335E-01	1.5849E+00	-1.7482E+01	2.1465E-02
18	3.3335E-01	1.5849E+00	-1.7482E+01	2.1465E-02
19	3.3335E-01	1.5849E+00	-1.7482E+01	2.1465E-02
20	3.3335E-01	1.5849E+00	-1.7482E+01	2.1465E-02
21	3.8540E-01	1.0838E+00	-7.5685E+00	3.5907E-02
22	3.8540E-01	1.0838E+00	-7.5685E+00	3.5907E-02
23	3.8540E-01	1.0838E+00	-7.5685E+00	3.5907E-02
24	3.8540E-01	1.0838E+00	-7.5685E+00	3.5907E-02
25	4.3865E-01	6.8968E-01	-6.7404E+00	6.0746E-02
26	4.3865E-01	6.8968E-01	-6.7404E+00	6.0746E-02
27	4.3865E-01	6.8968E-01	-6.7404E+00	6.0746E-02
28	4.3865E-01	6.8968E-01	-6.7404E+00	6.0746E-02
29	4.7252E-01	5.2784E-02	-7.4129E+00	1.0218E-01
30	4.7252E-01	5.2784E-02	-7.4129E+00	1.0218E-01
31	4.7252E-01	5.2784E-02	-7.4129E+00	1.0218E-01
32	4.7252E-01	5.2784E-02	-7.4129E+00	1.0218E-01

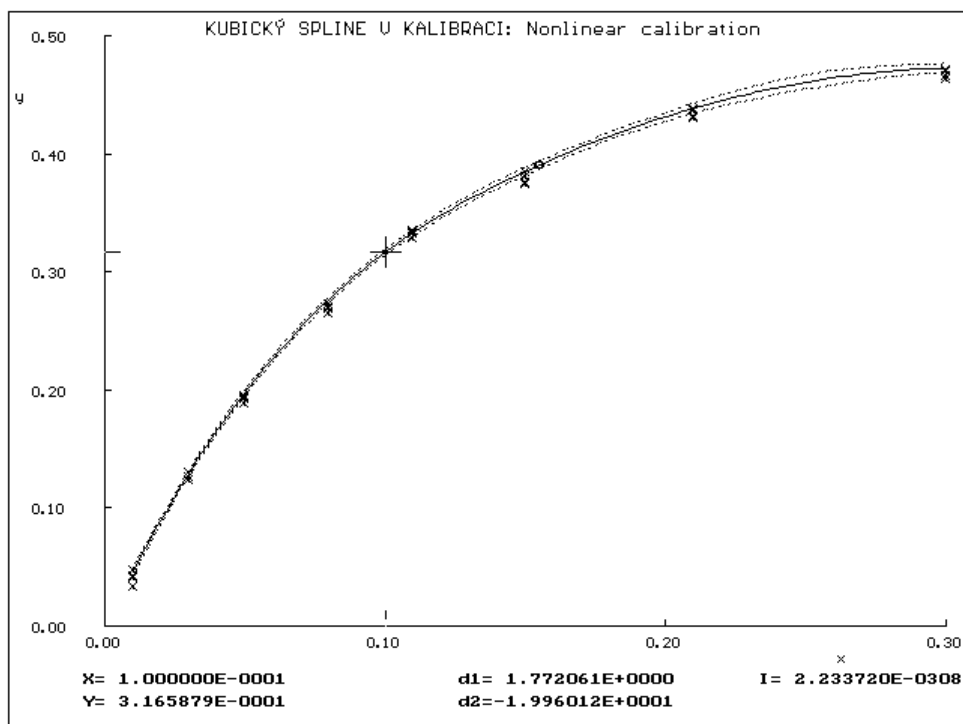
Kalibrační meze:

Kritická úroveň:	yc: 4.170123E-03	xc: 1.183380E-03
Limita detekce:	yd: 9.539137E-03	xd: 2.272378E-03

Kalibrační tabulka:

Měřená hodnota	Inverzní odhad	Konfidenční interval	
		dolní mez	horní mez
yexp[i]	xvyp[i]	Llxvyp[i]	Luxvyp[i]
1.500000E-01	3.558769E-02	3.489619E-02	3.629029E-02
2.500000E-01	6.866888E-02	6.758199E-02	6.976023E-02
3.000000E-01	9.110159E-02	8.983575E-02	9.237910E-02

12. Grafický výstup proložení dat



Obr. 12.1 Nelineární kalibrační závislost vypočtená pomocí kubické spline interpolace s 1 uzlem.

13. Závěr

Na vyhodnocení kalibrační závislosti obsahu standardů molybdenu na elektrickém proudu v emisní spektrální analýze tří reálních vzorků se úspěšně použil nelineární kalibrační model s jednouzlovou kubickou spline interpolací (Obr.12.1). Model má nejnižší směrodatnou odchylku odhadu reziduí a také nejnižší hodnoty limitů přesnosti kalibrace. Průměr relativních reziduí, který je mírou šumu v datech, byl v tomto případě rovněž nejnižší, konkrétně 1.928 %. Pro tři reální vzorky byly změřeny odezvy jejich elektrického proudu $I_{VZ1}=0.15$ mA, $I_{VZ2}=0.25$ mA a $I_{VZ3}=0.30$ mA. Zpětné bodové a 95 % intervalové odhady molybdenu ve vzorcích byly vypočítány z nejlepšího kalibračního modelu jako hodnoty $c_{Mo1}= 3.56E-02$ %, resp. 95 %: $3.49E-02-3.63E-02$ %; $c_{Mo2}= 6.87E-02$ %, resp. 95 %: $6.76E-02-6.98E-02$ % a $c_{Mo3}= 9.11E-02$ %, resp. 95 %: $8.98E-02-9.24E-02$ %. Všechna stanovení obsahu molybdenu byla nad limitem detekce $x_d=2.27E-03$ %.

Příklad 3 Rozlišení mezi lineární a nelineární kalibrací

Zadání: Studium chemické kinetiky hydrolýzy 4-methyl benzoanu etylového v mírně bázičném prostředí v etanolu při teplotě 40 °C pro účely technologie se zjistilo, že reakce probíhá sa stoprocentní selektivitou na koncovou sůl 4-metyl-benzoanu sodného v průběhu 30-90 minut. Analýza reakční směsi se provádí na spektrofotometru při 250 nm (4-methyl benzoanu etylový) a 265 nm (4-metyl-benzoan sodný). Bylo zjištěno, že kvantitativní obsah produktu závisí od pH koncové reakční směsi. V technologickém provozu se používá pH-metr v módu měření napětí.

Pro tyto účely byla laboratorně sestrojena závislost mezi koncovým pH reakční směsi, které je vyjádřeno elektrickým napětím v mV, a koncentrací 4-metyl-benzoanu sodného (C_{4-MBS}) v rozsahu očekávaných technologických konverzí. Byly aplikovány stejné reakční podmínky a stejná koncentrace katalyzující báze. Tato závislost byla použita pro simulaci podmínek v technologickém kroku jako kalibrační křivka.

Rozhodněte, zda-li je kalibrační křivka lineární nebo má „S-ovitý“ tvar typický pro protolyticky řízené děje. Z výslední kalibrační křivky vypočítejte zpětné odhady obsahu 4-metyl-benzoanu sodného v reakčních směsích reálních vzorků, když bylo na konci procesu změřeno pH (0.15, 0.26 a 0.31 mV). Vyhodnoťte limity přesnosti kalibrace.

Kalibrační a naměřená data:

C_{4-MBS} [mmol/L]	U_{Cal} [mV]	Vzorek	U [mV]
1	0.02	4-MBS ₁	0.15
2	0.04	4-MBS ₂	0.26
3	0.08	4-MBS ₃	0.31
4	0.15	-	-
5	0.24	-	-
6	0.34	-	-
7	0.70	-	-
8	0.48	-	-
9	0.53	-	-
10	0.90	-	-

3.1 Vyhodnocení kalibrační závislosti lineární regresí

Odhad parametrů a testy významnosti

Parametr	Odhad	Směrodatná odchylka	Test H0: t-kriterium	$B[j] = 0$ vs. HA: $B[j] \neq 0$ hypoteza H0 je	Hlad. výz.
$B[0]$	-1.5533E-01	8.1340E-02	-1.9097E+00	Akceptována	0.093
$B[1]$	9.1515E-02	1.3109E-02	6.9810E+00	Zamítnuta	0.000

Základní statistické charakteristiky:

Vícenásobný korelační koeficient, R:	9.2682E-01
Koeficient determinace, R^2 :	8.5899E-01
Predikovaný korelační koeficient, R_p^2 :	8.7662E-01
Středná kvadratická chyba predikce, MEP:	1.8624E-02
Akaikeho informační kritérium, AIC:	-4.0792E+01

Analýza klasických reziduí:

Bod	Meřena hodnota	Predikovaná hodnota	Směrodatná odchylka	Klasické reziduum	Relativní reziduum
i	yexp[i]	yvyp[i]	s(yvyp[i])	e[i]	er[i]
1	2.0000E-02	-6.3818E-02	6.9984E-02	8.3818E-02	4.1909E+02
2	4.0000E-02	2.7697E-02	5.9354E-02	1.2303E-02	3.0758E+01
3	8.0000E-02	1.1921E-01	4.9918E-02	-3.9212E-02	-4.9015E+01
4	1.5000E-01	2.1073E-01	4.2478E-02	-6.0727E-02	-4.0485E+01
5	2.4000E-01	3.0224E-01	3.8219E-02	-6.2242E-02	-2.5934E+01
6	3.4000E-01	3.9376E-01	3.8219E-02	-5.3758E-02	-1.5811E+01
7	7.0000E-01	4.8527E-01	4.2478E-02	2.1473E-01	3.0675E+01
8	4.8000E-01	5.7679E-01	4.9918E-02	-9.6788E-02	-2.0164E+01
9	5.3000E-01	6.6830E-01	5.9354E-02	-1.3830E-01	-2.6095E+01
10	9.0000E-01	7.5982E-01	6.9984E-02	1.4018E-01	1.5576E+01

Rezidualní součet čtverců, RSC:	1.1342E-01
Průměr absolutních hodnot reziduí, Me:	9.0206E-02
Průměr relativních reziduí, Mer:	6.7360E+01
Odhad reziduálního rozptylu, s ² (e):	1.4178E-02
Odhad směrodatné odchylky reziduí, s(e):	1.1907E-01
Odhad šikmosti reziduí, g1(e):	7.4617E-01
Odhad špicatosti reziduí, g2(e):	2.3744E+00

Testování regresního tripletu (Data + Model + Metoda):

Fisher-Snedocorův test významnosti regrese, F:	4.8735E+01
Tabulkový kvantil, F(1-alpha,m-1,n-m):	5.3177E+00
Závěr: Navržený model je přijat jako významný.	
Spočtena hladina významnosti:	0.000

Scottovo kritérium multikolinearity, M:	1.1102E-16
Závěr: Navržený model je korektní.	

Cook-Weisbergův test heteroskedasticity, Sf:	1.9752E+01
Tabulkový kvantil, Chi ² (1-alpha,1):	3.8415E+00
Závěr: Rezidua vykazují heteroskedasticitu.	
Spočtena hladina významnosti:	0.000

Jarque-Berraův test normality reziduí, L(e):	1.0911E+00
Tabulkový kvantil, Chi ² (1-alpha,2):	5.9915E+00
Závěr: Normalita je přijata.	
Spočtena hladina významnosti:	0.580

Waldův test autokorelace, Wa:	9.9994E-01
Tabulkový kvantil, Chi ² (1-alpha,1):	3.8415E+00
Závěr: Rezidua nejsou autokorelována.	
Spočtena hladina významnosti:	0.317

Znaménkový test, Dt:	-2.1073E-01
Tabulkový kvantil, N(1-alpha/2):	1.6449E+00
Závěr: Rezidua nevykazují trend.	
Spočtena hladina významnosti:	0.417

Indikace vlivných bodů

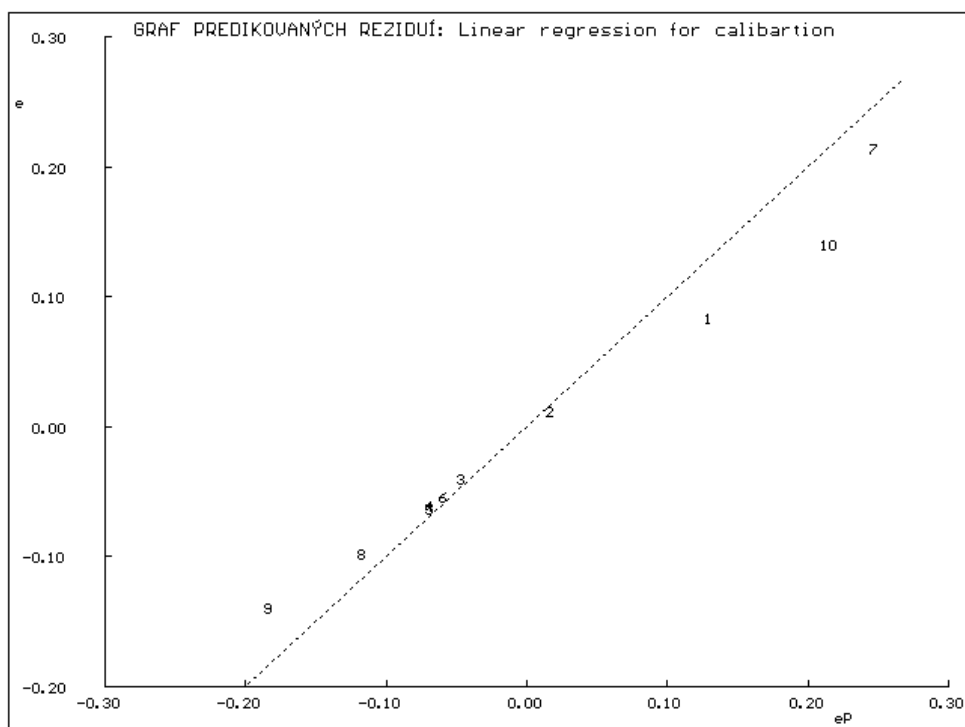
(* indikuje odlehlý nebo vlivný bod)

Bod	Standardizované reziduum	Jackknife reziduum	Predikované reziduum	Diagonální prvky
i	eS[i]	eJ[i]	eP[i]	H[i,i]
1	8.7010E-01	8.5538E-01	1.2806E-01	3.4545E-01
2	1.1919E-01	1.1159E-01	1.6371E-02	2.4848E-01
3	-3.6274E-01	-3.4213E-01	-4.7574E-02	1.7576E-01
4	-5.4594E-01	-5.2047E-01	-6.9583E-02	1.2727E-01
5	-5.5195E-01	-5.2642E-01	-6.9392E-02	1.0303E-01
6	-4.7670E-01	-4.5239E-01	-5.9932E-02	1.0303E-01
7	1.9304E+00	2.4706E+00*	2.4604E-01	1.2727E-01
8	-8.9535E-01	-8.8293E-01	-1.1743E-01	1.7576E-01
9	-1.3399E+00	-1.4231E+00	-1.8403E-01	2.4848E-01
10	1.4552E+00	1.5874E+00	2.1417E-01	3.4545E-01

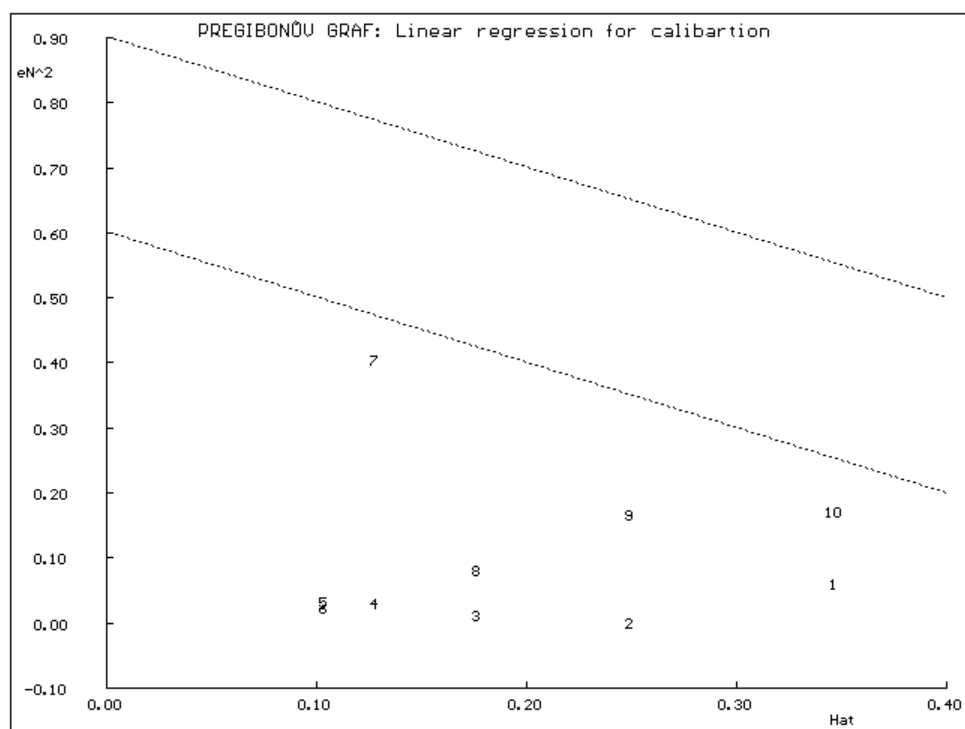
Bod	Zobecněné, diag. prvky	Cookova vzdálenost	Atkinsonova vzdálenost	Vliv na predikci
i	Hm[i,i]	D[i]	A[i]	DF[i]
1	4.0740E-01	1.9978E-01*	1.2428E+00	6.2142E-01
2	2.4982E-01	2.3486E-03	1.2833E-01	6.4167E-02
3	1.8931E-01	1.4029E-02	3.1598E-01	-1.5799E-01
4	1.5979E-01	2.1733E-02	3.9751E-01	-1.9876E-01
5	1.3719E-01	1.7496E-02	3.5682E-01	-1.7841E-01
6	1.2851E-01	1.3051E-02	3.0664E-01	-1.5332E-01
7	5.3379E-01	2.7172E-01*	1.8869E+00*	9.4347E-01*
8	2.5835E-01	8.5470E-02	8.1543E-01	-4.0771E-01
9	4.1713E-01	2.9679E-01*	1.6367E+00	-8.1833E-01
10	5.1871E-01	5.5881E-01*	2.3065E+00*	1.1532E+00*

Bod	Věrohodnostní vzdálenosti		
	LD(b)[i]	LD(s ²)[i]	LD(b,s ²)[i]
1	4.8738E-01	1.7637E-04	4.9667E-01
2	5.8699E-03	5.1842E-02	5.7136E-02
3	3.5010E-02	3.8266E-02	7.0358E-02
4	5.4185E-02	2.2207E-02	7.2998E-02
5	4.3646E-02	2.1652E-02	6.2578E-02
6	3.2575E-02	2.8561E-02	5.8785E-02
7	6.5722E-01	1.6314E+00	2.7759E+00
8	2.1142E-01	2.6277E-07	2.1372E-01
9	7.1575E-01	1.1635E-01	9.7735E-01
10	1.3077E+00	2.1874E-01	1.9287E+00

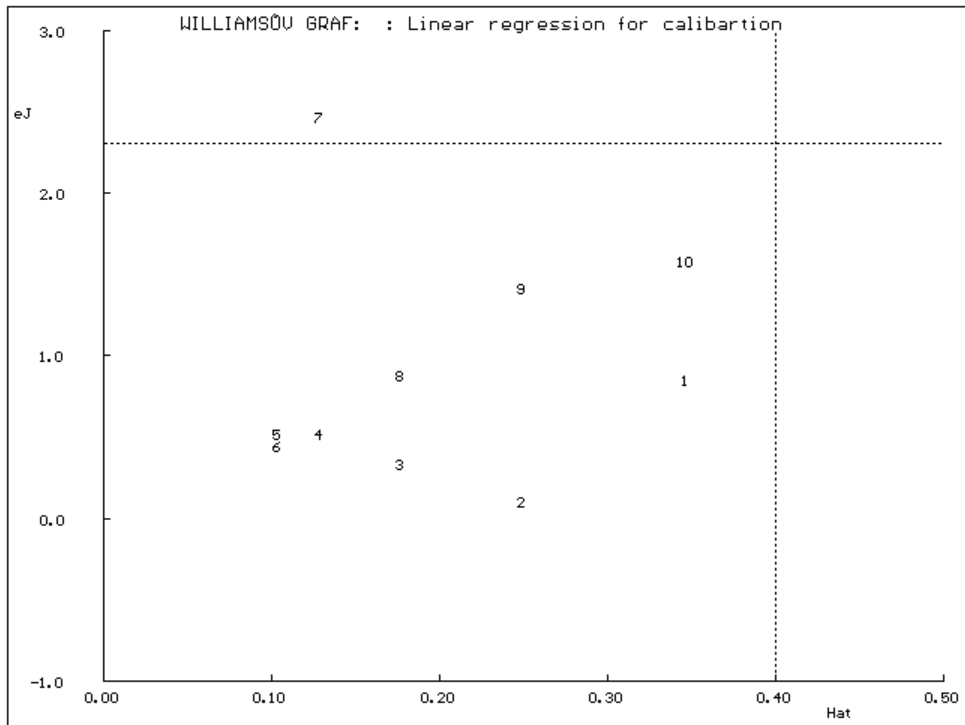
3.1.1 Grafické výstupy



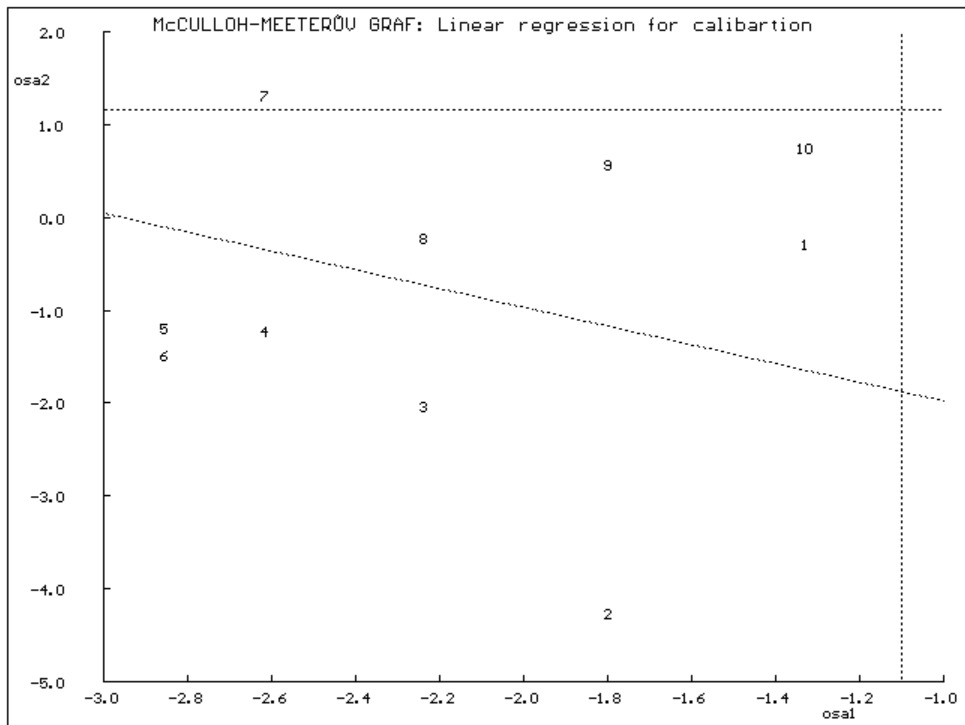
Obr. 3.1.1.1 Graf predikovaných reziduí



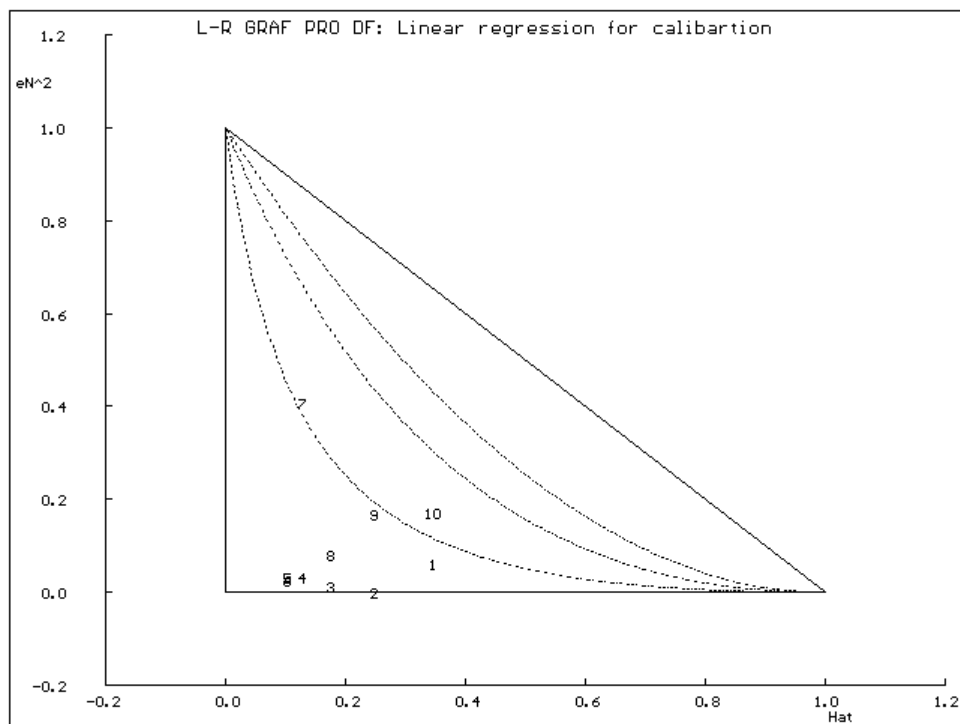
Obr. 3.1.1.2 Pregibonův graf



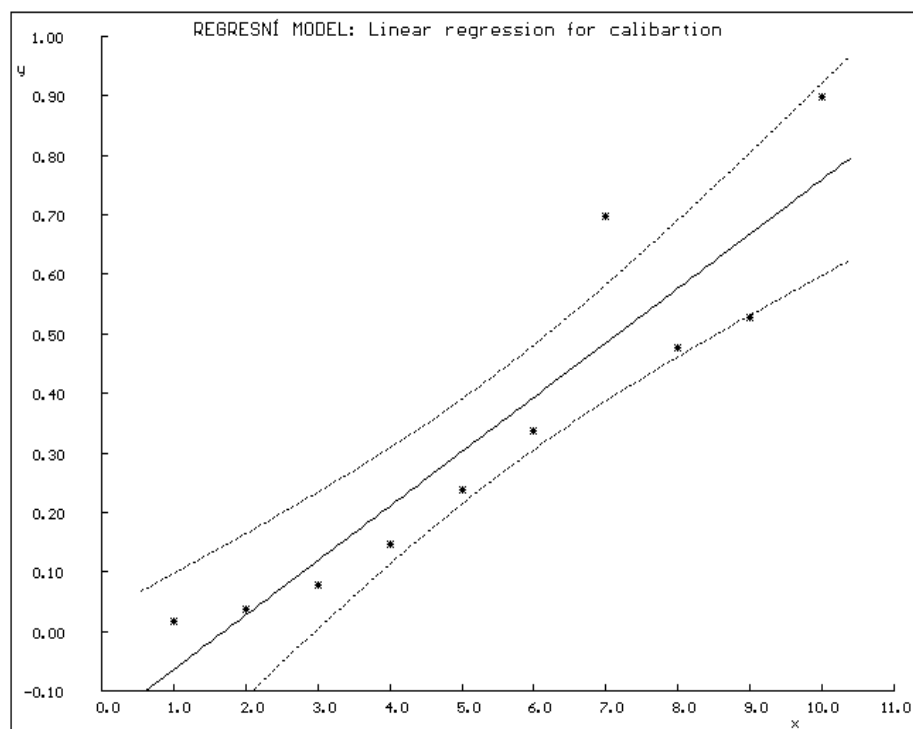
Obr. 3.1.1.3 Williamsův graf



Obr. 3.1.1.4 McCulloh-Meeterův graf



Obr. 3.1.1.5 L-R graf



Obr. 3.1.1.6 Graf regresní přímky s 95 % konfidenčními intervaly

3.1.2 Závěry vyhodnocení kalibrační závislosti pomocí lineární regrese

Odhad směrodatné odchylky reziduí $s(e)=1.19E-01$ je poměrně vysoký a evokuje špatný popis dat regresní přímkou. Z testování regresního tripletu vyplývá, že model je významný a rezidua nejsou autokorelována, nemají trend a vykazují heteroskedasticitu. Dle parametrů indikace vlivných bodů

body 1, 7, 9 a 10 jsou vlivné. Z toho body 7 a 10 jsou pravděpodobně odlehlé. Z grafu predikovaných reziduí na Obr. 3.1.1.1 lze dedukovat, že body 7 a 10 výrazně narušují kolinearitu ostatních dat. Z Pregibonova grafu (Obr. 3.1.1.2) odlehlost bodů 7 a 10 nelze potvrdit či vyvrátit. Williamsův (Obr. 3.1.1.3) a McCulloh-Meeterův graf (Obr. 3.1.1.4) poukazuje na vlivný bod 7. L-R graf (3.1.1.5) poukazuje na dva vlivné a mírně odlehlé body 7 a 10. Na obrázku lineární regrese s 95 % konfidenčním intervalem (Obr. 3.1.1.6) vidíme, že pokud vyloučíme body 7 a 10 jako odlehlé, pro další zkoumání kalibračního modelu bude vhodnější použít nelineární kalibrační model s spline interpolací. V dalším zacházení s daty budou body 7 a 10 vyloučeny jako odlehlé.

3.2 Vyhodnocení kalibrační závislosti pomocí nelineární kalibrací s spline interpolací

3.2.1 Kubický spline se dvěma uzly

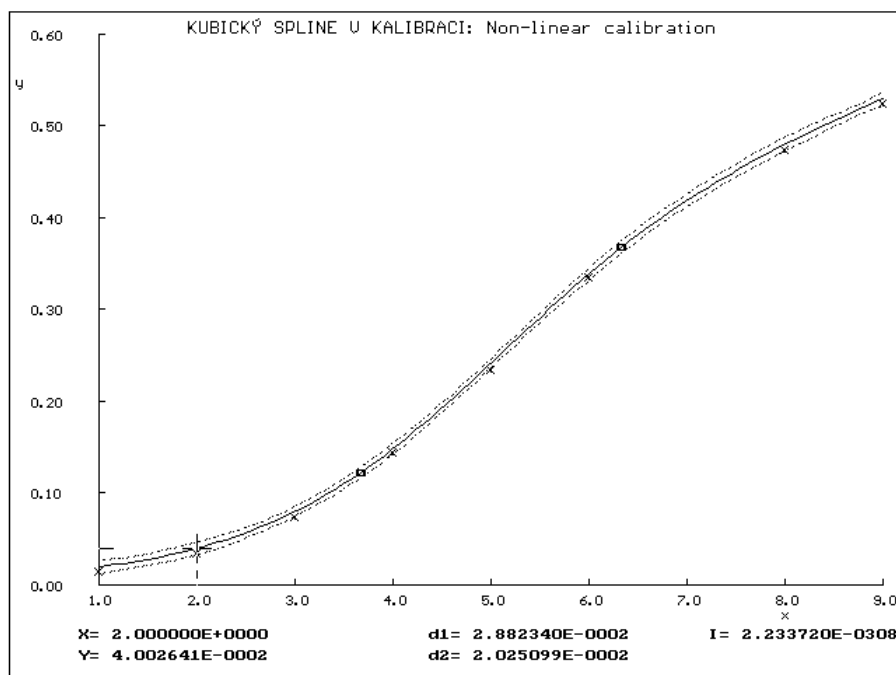
Reziduální součet čtverců, RSC: 6.2570E-06
 Průměr absolutních hodnot reziduí, Me: 5.9489E-04
 Průměr relativních reziduí, Mer[%]: 0.312
 Odhad reziduálního rozptylu, $s^2(e)$: 3.1285E-06
 Odhad směrodatné odchylky reziduí, $s(e)$: 1.7688E-03

Kalibrační meze:

Kritická úroveň: yc: 5.174033E-02 xc: 2.358982E+00
 Limita detekce: yd: 5.760134E-02 xd: 2.511582E+00

Kalibrační tabulka:

Měřená hodnota	Inverzní odhad	Konfidenční interval	
		dolní mez	horní mez
yexp[i]	xvyp[i]	Llxvyp[i]	Luxvyp[i]
1.500000E-01	4.015404E+00	-1.279154E+00	4.084108E+00
2.600000E-01	5.183275E+00	-2.124660E+00	5.234723E+00
3.100000E-01	5.692346E+00	5.630991E+00	5.757110E+00



Obr. 3.2.1.1 Grafická závislost dat po vyloučení odlehlých bodů 7 a 10 proložená nelineárním modelem s dvouuzlovou kubickou spline interpolací.

3.2.2 Kubický spline se třema uzly

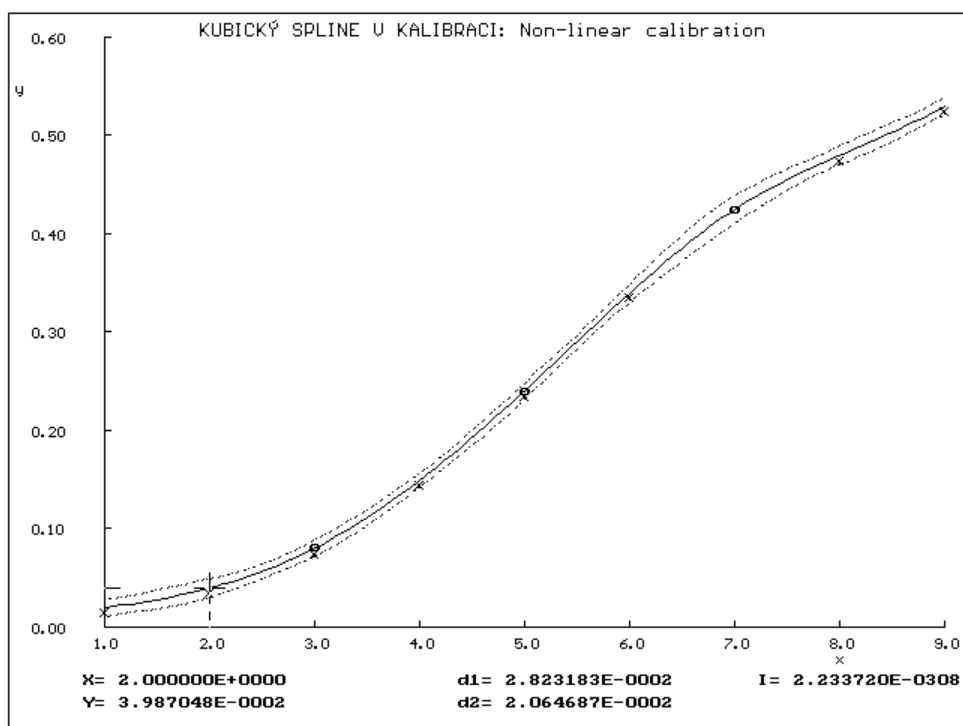
Reziduální součet čtverců, RSC: 5.5607E-07
 Průměr absolutních hodnot reziduí, Me: 1.8741E-04
 Průměr relativních reziduí, Mer[%]: 0.174
 Odhad reziduálního rozptylu, $s^2(e)$: 5.5607E-07
 Odhad směrodatné odchylky reziduí, $s(e)$: 7.4570E-04

Kalibrační meze:

Kritická úroveň: y_c : 8.877699E-02 x_c : 3.147310E+00
 Limita detekce: y_d : 9.712208E-02 x_d : 3.283178E+00

Kalibrační tabulka:

Měřená hodnota	Inverzní odhad	Konfidenční interval	
		dolní mez	horní mez
$y_{exp}[i]$	$x_{vyp}[i]$	$Lx_{vyp}[i]$	$Lux_{vyp}[i]$
1.500000E-01	4.006263E+00	3.920522E+00	4.089653E+00
2.600000E-01	5.198099E+00	-1.007740E+00	1.230847E+01
3.100000E-01	5.696147E+00	5.624402E+00	1.206359E+01



Obr. 3.2.2.1 Grafická závislost dat po vyloučení odlehlých bodů 7 a 10 proložená nelineárním modelem s kubickou spline interpolací se třema uzly.

3.2.3 Závěry vyhodnocení kalibrační závislosti pomocí nelineární kalibrací

Je vidět, že data popisují spíše protolytickou povahu hydrolyzy než jednoduchý přímkový děj. Ukázalo se, že nejlepším proložením dat je nelineární model s kubickou spline interpolací (Obr. 3.2.1.1 a Obr. 3.2.2.1). Byly otestovány dva modely se dvěma a se třema uzly. Kvantitativní mírou těsnosti proložením dat křivkou je odhad směrodatné odchylky reziduí, $s(e)$. Čím má parametr hodnotu nižší, tím je model vhodnější. Paralelně se hodnotí limity přesnosti kalibrace. Nižší

hodnoty kritické a detekční koncentrace (x_c , x_d) a napěťového signálu (y_c , y_d) favorizují model. U modelu se dvěma uzly byla $s(e) = 1.7688E-03$ a u modelu se třema uzly $s(e) = 7.4570E-04$. Model se třema uzly má vyšší hodnoty x_c , y_c , x_d , a y_d . Model se třema uzly lépe prokládá experimentální body, které jsou uvnitř 95 % konfidenčního intervalu průměrné hodnoty napěťového signálu. Proto byl pro výpočet zpětných bodových a intervalových odhadů koncentrace 4-metyl-benzoanu sodního použit druhý ze jmenovaných modelů. Bodové a 95 % intervalové odhady koncentrací jsou: C_{MBS1} : 4.006263E+00 mmol/L; 95 %: (3.920522E+00, 4.089653E+00) mmol/L
 C_{MBS2} : 5.198099E+00 mmol/L; 95 %: (-1.007740E+00, 1.230847E+01) mmol/L
 C_{MBS3} : 5.696147E+00 mmol/L; 95 %: (5.624402E+00, 1.206359E+01) mmol/L
Všechna stanovení jsou nad mezí detekce $x_d = 3.283178E+00$ mmol/L.