Kalibracijska premica

Izračun vseh parametrov kalibracijske premice je osnovna naloga večine kvantitativnih analiznih postopkov.
Izhajali bomo iz **4** ponovitev vsake meritve pri **5** različnih standardnih koncentracijah, ki so podane v spodnji tabeli.

Tabela 1. Ponovitve za umeritev kalibracijske premice pri petih različnih standardnih koncen-tracijah. Skupno število meritev N=20. Za račun premice ni nujno, da je pri vsaki koncen-traciji narejeno enako število ponovitev. Primerno pa je, da sta v vsaki točki narejeni najmanj dve ponovitvi.

	j	1	2	3	4	5
Standardne koncentracije	x_j	1.00	2.00	3.00	5.00	10.00
Ponovitve meritev	y_{j1}	10.60	24.80	31.00	52.30	102.40
	y_{j2}	8.70	22.20	32.30	51.40	85.90
	y_{j3}	12.80	23.80	35.20	59.30	95.20
	y_{j4}	9.50	21.80	32.30	54.60	98.40
Število ponovitev	n_j	4	4	4	4	4

Za začetni izračun parametrov same kalibracijske premice (naklona in odsek na ordinatni osi), ne potrebujemo posameznih vrednosti vseh ponovitev, ampak povprečja meritev za vsako koncentracijo.

Posamezne vrednosti vseh meritev različnih koncentracij potrebujemo šele pri ovrednotenju kvalitete modela, t.j. pri ovrednotenju linearnosti kalibracijske premice z *F*-testom (glej poglavje ANOVA).

Tabela 2

Standardne koncentracije		x_j	1.00	2.00	3.00	5.00	10.00
Povprečja meritev	$\bar{y}_j = (1/n_j)\sum_{i=1}^{n_j} y_{ij}$	$\bar{y}_j$	10.40	23.15	32.70	54.40	95.48

Število različnih koncentracij na x-osi k = 5

Vsota koncentracij	$S_x = \sum_{j=1}^{k} x_j$	21.00	
Vsota povprečij meritev $\bar{y}_j$	$S_y = \sum_{j=1}^{k} \bar{y}_j$	216.13	
Vsota kvadratov koncentracij	$SS_x = \sum_{j=1}^{k} x_j^2$	139.00	
Vsota kvadratov povprečij $\bar{y}_j$	$SS_y = \sum_{j=1}^{k} \bar{y}_j^2$	13788.21	ne potrebujemo za izračun kalibracijske premice
Vsota produktov	$SP_{xy} = \sum_{j=1}^{k} x_j \bar{y}_j$	1381.55	
Totalna vsota vseh meritev y_{ij}	$TS_y = \sum_{j=1}^{k}\sum_{i=1}^{n_j} y_{ij}$	864.50	ne potrebujemo za izračun kalibracijske premice

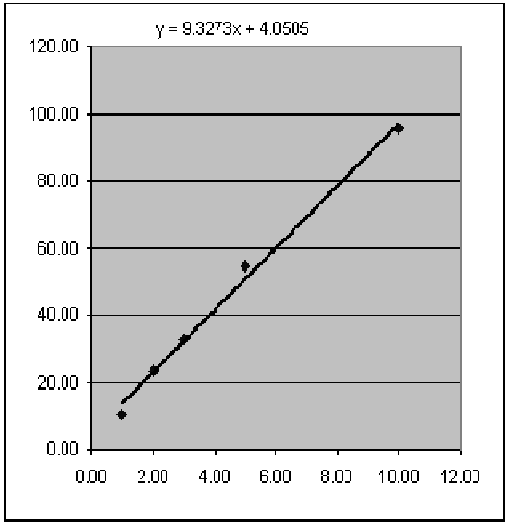
Enačba kalibracijske premice **y = a + bx**

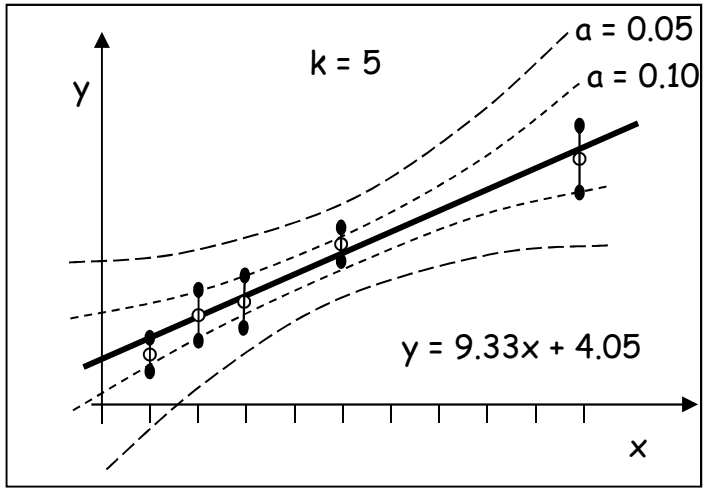
$$b = \frac{\sum_{j=1}^{k}(x_j - \bar{x})(\bar{y}_j - \bar{\bar{y}})}{\sum_{j=1}^{k}(x_j - \bar{x})^2} = \frac{k\sum_{j=1}^{k} x_j \bar{y}_j - \sum_{j=1}^{k} x_j \sum_{j=1}^{k} \bar{y}_j}{k\sum_{j=1}^{k} x_j^2 - (\sum_{j=1}^{k} x_j)^2}$$

Naklon premice
b = 9.33

$$a = \bar{y} - b\bar{x} = \frac{\sum_{j=1}^{k} \bar{y}_j \sum_{j=1}^{k} x_j^2 - \sum_{j=1}^{k} x_j \sum_{j=1}^{k} x_j \bar{y}_j}{k\sum_{j=1}^{k} x_j^2 - (\sum_{j=1}^{k} x_j)^2}$$

Odsek na ordinatni osi
a = 4.05





Interval zaupanja (Confidence interval)

$$y_0 = a + bx_0 \pm t(\alpha, k-2)s_e \sqrt{\frac{1}{k} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{\sum_{j=1}^{k}(x_j - \bar{x})^2}}$$

napaka modela $$s_{\hat{y}_0} = s_e \sqrt{\frac{1}{k} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{\sum_{j=1}^{k}(x_j - \bar{x})^2}}$$

celotna napaka s_e $$s_e = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^{k}(\bar{y}_j - \hat{y}_j)^2}{k-2}} = \sqrt{\frac{\sum_{j-1}^{k}\bar{y}_j^2 - (1/k)(\sum_{j-1}^{k}\bar{y}_j)^2 - b\left[\sum_{j=1}^{k}x_j\bar{y}_j - (1/k)(\sum_{j=1}^{k}x_j)(\sum_{j=1}^{k}\bar{y}_j)\right]}{k-2}}$$

napaka naklona s_b $$s_b = \frac{s_e}{\sqrt{\sum_{j=1}^{k}x_j^2 - \frac{1}{k}(\sum_{j=1}^{k}x_j)^2}}$$

napaka odseka s_a $$s_a = s_b\sqrt{\frac{\sum_{j=1}^{k}x_j^2}{k}}$$

Za izračun hiperbolične oblike intervala zaupanja pri določeni stopnji zaupanja α in za določitev napak naklona s_b in odseka s_a, potrebujemo samo vrednosti, ki so že podane v prvi tabeli.

To so S_x, S_y, S_{x2}, S_{y2} in S_{xy}

Določitev koncentracije analita in napake določitve s pomočjo kalibracijske premice

Pri analitskem delu je, potem ko določimo vse lastnosti kalibracijske premice, t.j., njene parametre in njihove napake, osnovna naloga določiti koncentracijo iskane substance v neznanem vzorcu in določiti napako napovedi.

Enačbe za izračun napake in intervala zaupanja, ki smo jih uporabili na prejšnji strani, veljajo le za regresijsko premico, ne pa tudi za napako, ki jo storimo pri določitvi koncentracije analita na osnovi te premice.

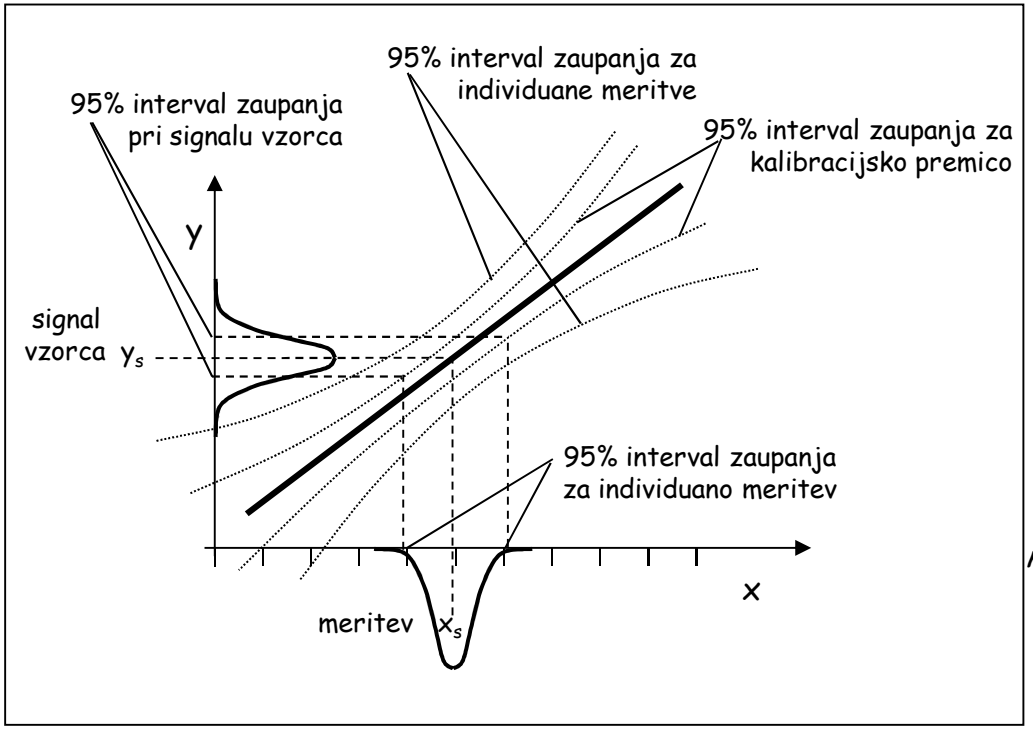
Meritev neznanega vzorca $\bar{y}_s$ dobimo na podlagi n_s ponovljenih meritev:

$$\bar{y}_s = \frac{1}{n_s}\sum_{i=1}^{n_s} y_{is} \ , \quad \textit{pri neznanem } x_s \qquad\qquad \hat{x}_s = \frac{\bar{y}_s - a}{b}$$

Koncentracijo v neznanem vzorcu določimo iz kalibracijske premice, y = a + bx.
Napaka pri določitvi koncentracije neznanega vzorca, je odvisna tako od napake same meritve, $\bar{y}_s$, kot tudi od vseh napak s katerimi smo določili parametre kalibracijske premice. Skupni izraz za določitev koncentracije in napake te določitve je:

$$\hat{x}_s = \frac{\bar{y}_s - a}{b} \pm t(obojestranski, 0.05, k-2)\frac{s_e}{b}\sqrt{\frac{1}{n_s} + \frac{1}{k} + \frac{(\bar{y}_s - \bar{y})^2}{b^2\sum_{j=1}^{k}(x_j - \bar{x})^2}}$$

V zgornjem izrazu sta le n_s in $\bar{y}_s$ dobljena iz meritev neznanega vzorca, vsi ostali parametri pripadajo kalibracijski premici: k je število točk na njej, a in b sta naklon in odsek, x_j, $\bar{x}$ in $\bar{y}$ pa so vrednosti dobljene s kalibracijo na prvotnih podatkih. Niz vrednosti $\{x_j\}$ so koncentracije pri katerih je bila narejena kalibracija, $\bar{x}$ je njihovo povprečje, $\bar{y}$ pa povprečje vseh odzivov pri kalibraciji.



$$y_0 = bx_0 + a$$

$$\textit{napaka kalibracijske premice} \Rightarrow s_{y_0} = s_e \sqrt{\frac{1}{k} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{\sum_{j=1}^{k}(x_j - \bar{x})^2}}$$

$$\textit{napaka enega odziva} \Rightarrow s_{y_s} = s_e \sqrt{1 + \frac{1}{k} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{\sum_{j=1}^{k}(x_j - \bar{x})^2}}$$

$$\textit{napaka odziva za } n_s \textit{ replikacij} \Rightarrow s_{y_s} = s_e \sqrt{\frac{1}{n_s} + \frac{1}{k} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{\sum_{j=1}^{k}(x_j - \bar{x})^2}}$$

$$\textit{napaka meritve koncentr.} \Rightarrow s_{x_s} = \frac{s_e}{b} \sqrt{\frac{1}{n_s} + \frac{1}{k} + \frac{(y_s - \bar{y})^2}{b^2 \sum_{j=1}^{k}(x_j - \bar{x})^2}}$$

$$\textit{napaka meritve koncentr.} \Rightarrow s_{x_s} = \frac{1}{b} \sqrt{\frac{s_s^2}{n_s} + \frac{s_e^2}{k} + \frac{(y_s - \bar{y})^2}{b^2 \sum_{j=1}^{k}(x_j - \bar{x})^2}}$$

Pri računanju standardnih napak je treba vedno paziti katero napako računamo in kakšni podatki so nam na voljo. Če se standardna napaka meritve na vzorcu s_s razlikuje od standardne napaka meritev pri kalibraciji s_e, potem moramo to tudi upoštevati (glej razliko med levim zgornjim in levim spodnjim izrazom). Napaka s_e je podana na prejšnji strani, napako s_s pa izračunamo z znanim obrazcem za standardno napako vzorca v katerem smo naredili n_s ponovitev (ne smemo pozabiti, da merimo odzive y_{is}):

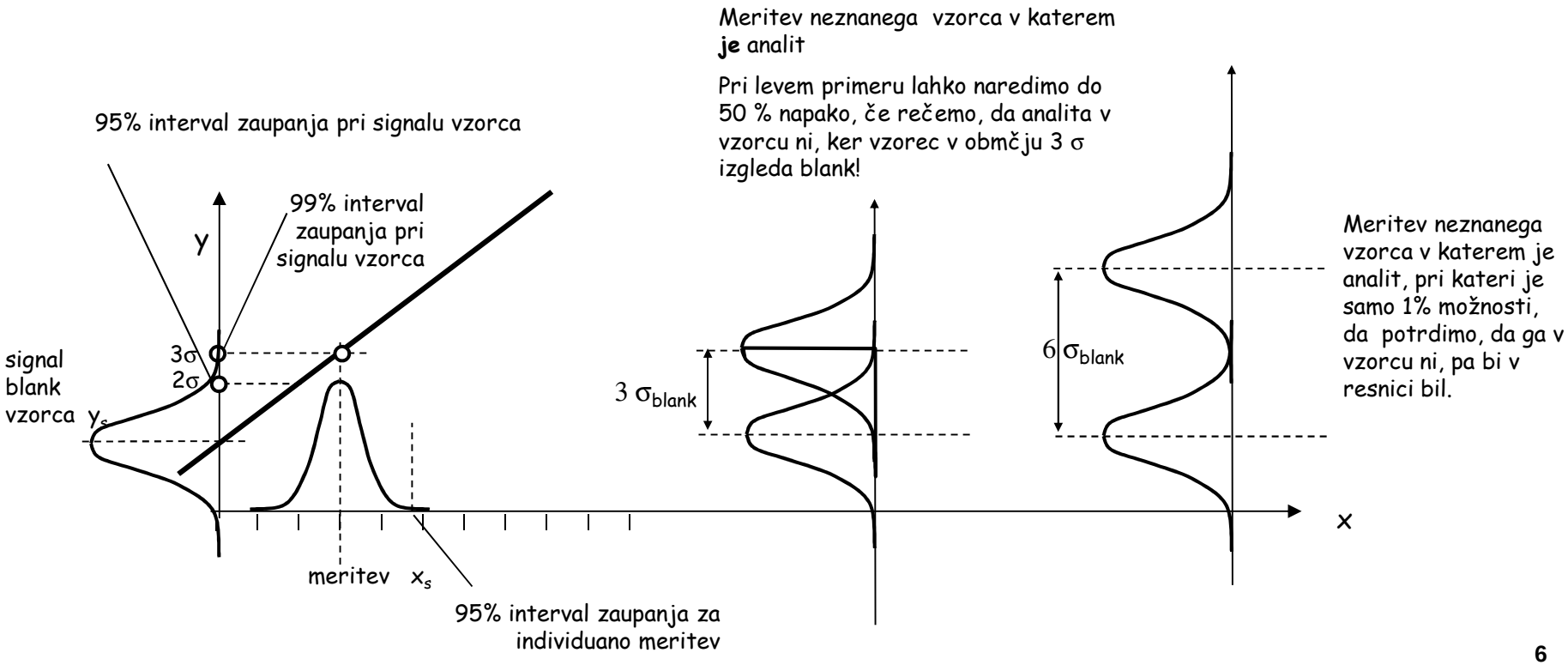
$$s_s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_s}(y_{is} - \bar{y})^2}{n_s - 1}}$$

Meja detekcije

Detekcijska limita je najmanjša količina substance, ki jo je ob predpisanem tveganju (stopnji zanesljivosti α) možno razlikovati od meritve praznega vzorca (blank sample). Stara IUPAC definicija limite detekcije, ki podaja enačbo:

$$y_{ld} = \bar{y}_{blank} + k\sigma_{blank}$$

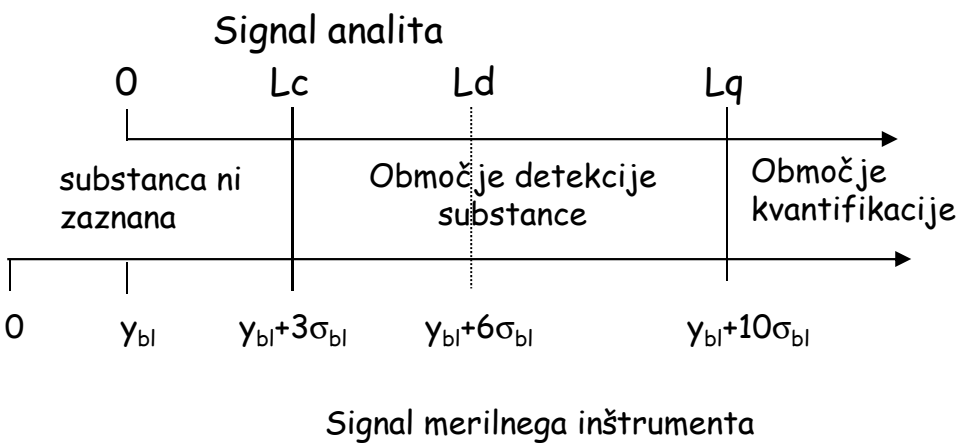
pri kateri je veljalo priporočilo, da je *k = 3,* danes splošno ni več sprejemljiva (čeprav se še precej uporablja). Stara definicija upošteva samo napake α, ne pa tudi napak β. Z drugimi besedami povedano, stara definicija zagotovi, da je napaka <u>potrditve navzočnosti</u> substance v analitu, če te v resnici ni v njem, z zanesljivostjo $3\sigma_{bankl}$ (t.j. s tveganjem, ki je manjše od 0.13 %), a je hkrati pri tem lahko napaka pri <u>zanikanju</u> navzočnosti substance v analitu, če ta v njem v resnici je, velika do 50% (glej spodnjo sliko!).



Detekcijska limita (Detection limit)

Sedanji izračun in definicije detekcijskih območij

$$y_{ld} = \bar{y}_{blank} + k\sigma_{blank}$$



Lc	odločitveni ali posteriorni nivo	(decision level)	1/3 = 33.3%
Ld	limita detekcije	(detection limit)	1/6 = 16.7%
Lq	kvantifikacijska limita	(qunatification limit)	1/10 =10%

Relativna standadna napaka na nivoju $L_i = k_i\sigma_{bl}$ je $1/k_i$

Določitev limite detekcije s pomočjo intervala zaupanja kalibracijske premice

Če limita detekcije ni predpisana z določitvijo faktorja k_i (n.pr. k_i = 3 ali 10), jo lahko določimo tudi na podlagi intervala zaupanja. V vsakem primeru je koristno, da ti dve določitvi med seboj primerjamo. Tveganje β (da naredimo β-napako) in število meritev v vzorcu n_s s katerim določamo neznane koncentracije, moramo določiti posebej v predpisu (protokolu, ki opisuje analizno meritev). Število meritev v vzorcih, n, s katerimi smo določil kalibracijsko premico, je lahko različno od števila meritev n_s s katerimi smo določili koncentracije v neznanih vzorcih. To ni priporočljivo, primerneje je vedno delati z istim številom meritev.

$$y_0 = bx_0 + a \pm t_{\alpha,k-2}\, s_e \sqrt{\frac{1}{n_s} + \frac{1}{k} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{\sum_{j=1}^{k}(x_j - \bar{x})^2}}$$

Če je $x_0 = 0$

$$y_c = a + t_{\alpha,k-2}\, s_e \sqrt{\frac{1}{n_s} + \frac{1}{k} + \frac{(\bar{x})^2}{\sum_{j=1}^{k}(x_j - \bar{x})^2}}$$

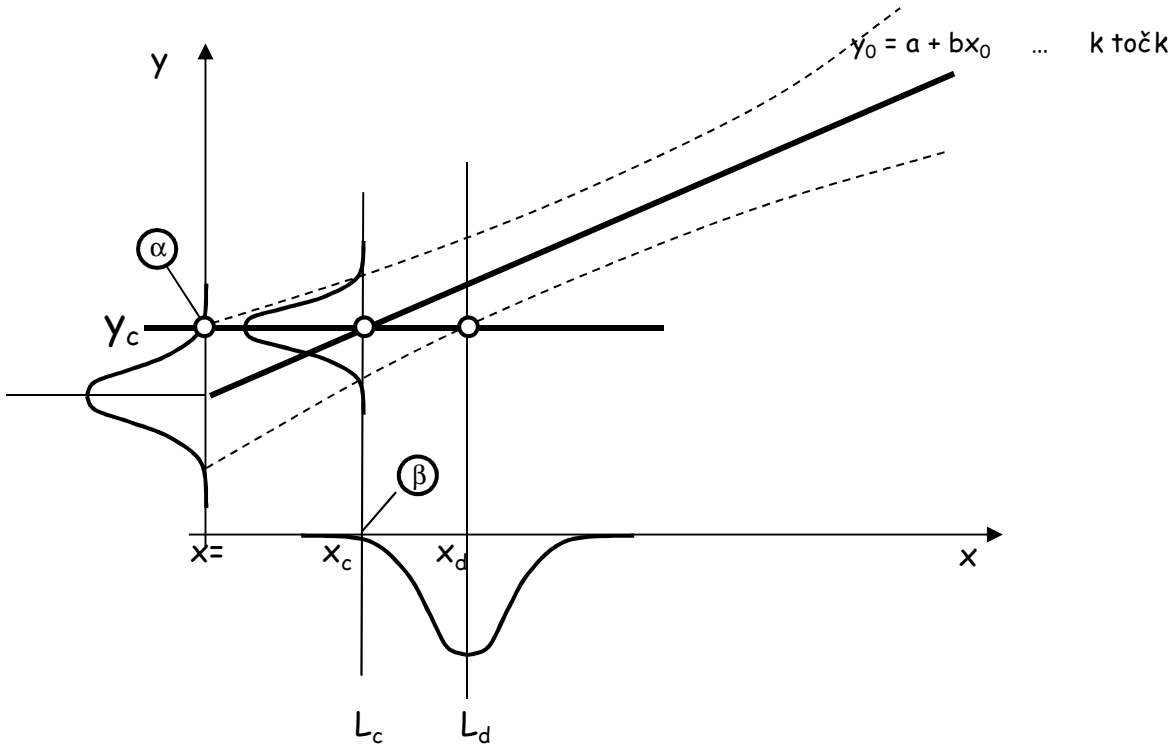
$x_c = (y_c - a)/b$

$$x_c = x_d - t_{\beta,k-2}\, \frac{s_e}{b} \sqrt{\frac{1}{n_s} + \frac{1}{k} + \frac{(x_d - \bar{x})^2}{\sum_{j=1}^{k}(x_j - \bar{x})^2}}$$

gornji izraz obrnemo, da izračunamo x_d in aproksimiramo x_d pod korenom z vrednostjo $2x_c$

$$x_d = x_c + t_{\beta,k-2}\, \frac{s_e}{b} \sqrt{\frac{1}{n_s} + \frac{1}{k} + \frac{(2x_c - \bar{x})^2}{\sum_{j=1}^{k}(x_j - \bar{x})^2}}$$

$$x_d = x_c + t_{\beta,k-2}\, \frac{1}{b} \sqrt{\frac{s_s}{n_s} + \frac{s_e}{k} + \frac{(2x_c - \bar{x})^2}{\sum_{j=1}^{k}(x_j - \bar{x})^2}}$$



1. Najprej s pomočjo kalibracijske premice izračunamo za "blank" vzorec ($x_0 = 0$) točko y_c, ki leži na <u>zgornji</u> meji intervala zaupanja. Zato je med "a" in "t" znak "+":

$$y_c = bx_0 + a + t_{\alpha,k-2}\, s_e \sqrt{\frac{1}{n_s} + \frac{1}{k} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{\sum_{j=1}^{k}(x_j - \bar{x})^2}} \quad \Rightarrow \quad y_c = a + t_{\alpha,k-2}\, s_e \sqrt{\frac{1}{n_s} + \frac{1}{k} + \frac{(\bar{x})^2}{\sum_{j=1}^{k}(x_j - \bar{x})^2}}$$

2. Izračunamo koncentracijo x_c, ki jo da kalibracijska premica za vrednost odziva y_c (to je meja področja pod katerim koncentracija analita ni zaznavna:

$$x_c = \frac{y_c - a}{b}$$

3. Predpostavimo, da leži koncentracija x_c na <u>skrajnem levem</u> robu detekcijske limite. Zato imamo znak "-":

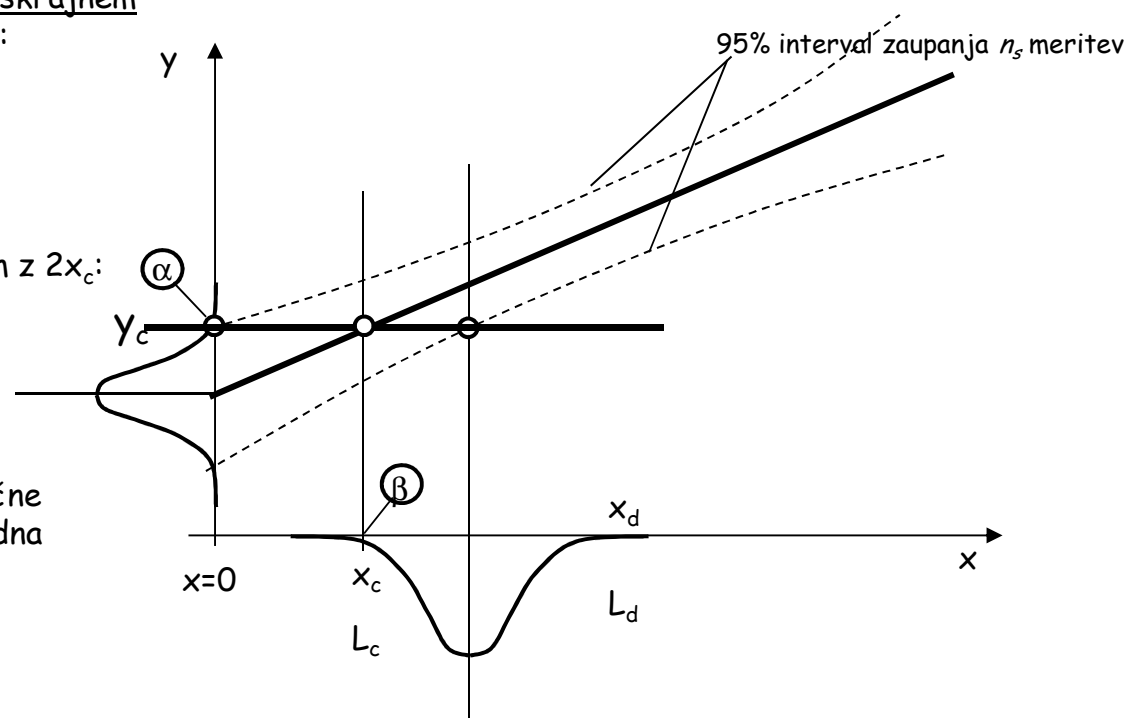
$$x_c = x_d - t_{\beta,k-2}\, \frac{s_e}{b} \sqrt{\frac{1}{n_s} + \frac{1}{k} + \frac{(x_d - \bar{x})^2}{\sum_{j=1}^{k}(x_j - \bar{x})^2}}$$

4. Izraz obrnemo in aproksimiramo x_d pod korenom z $2x_c$:

$$x_D = x_C + t_{\beta,k-2}\, \frac{s_e}{b} \sqrt{\frac{1}{n_s} + \frac{1}{k} + \frac{(2x_C - \bar{x})^2}{\sum_{j=1}^{k}(x_j - \bar{x})^2}}$$

5. Če imamo pri meritvi in kalibraciji različne standardne napake, vnesemo dva različna standardna odmika:

$$x_D = x_C + t_{\beta,k-2}\, \frac{1}{b} \sqrt{\frac{s_s}{n_s} + \frac{s_e}{k} + \frac{(2x_C - \bar{x})^2}{\sum_{j=1}^{k}(x_j - \bar{x})^2}}$$



$$s_e = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^{k}(\bar{y}_j - \hat{y}_j)^2}{k-2}}$$

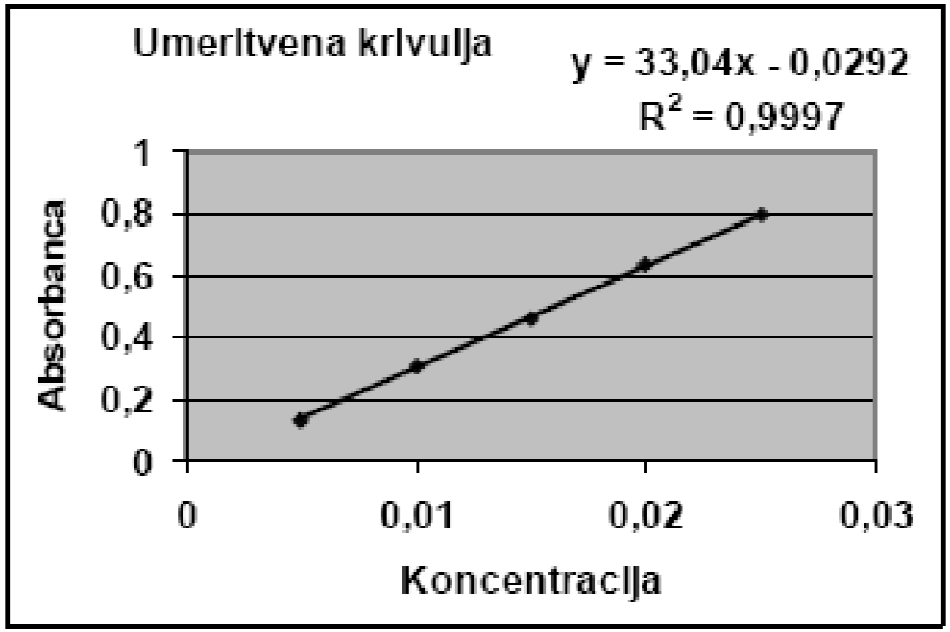
Pri premici (s_e) imamo dve prostostni stopnji manj, ker računamo 2 parametra, a in b,

$$s_s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_s}(y_{is} - \bar{y}_s)^2}{n_s - 1}}$$

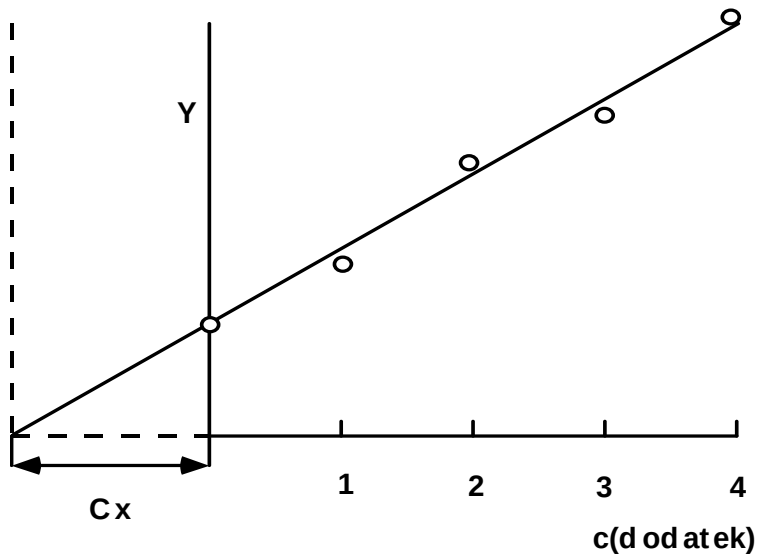
pri meritvah pa imamo eno samo prostostno stopnjo manj, ker smo izračunali samo povprečje.

Umeritvena krivulja

Skoraj vse instrumentalne tehnike je potrebno umeriti, saj ne poznamo zveze med merjenim signalom in koncentracijo iskane snovi. V prvem sklopu si bomo pogledali metodo umeritvene krivulje.



Metoda standardnega dodatka



Neznani vzorec in vzorce z dodatki analiziramo po enakem postopku. Iz umeritvene krivulje, ki jo izdelamo iz merjenih vrednosti, lahko ugotovimo neznano koncentracijo tako, da dobljeno premico ekstrapoliramo na absciso.