



FAKULTETA ZA KEMIJO IN KEMIJSKO TEHNOLOGIJO



Darinka Brodnjak Vončina

## **INDUSTRIJSKA ANALIZA**

Zbrano gradivo

Maribor, FEBRUAR, 2007

## KAZALO

KAZALO .....	2
1. UVOD .....	3
1.1. ANALIZNI PROBLEMI.....	3
1.2. NAPAKE PRI KVANTITATIVNI ANALIZI.....	4
1.3. VRSTE NAPAK .....	5
1.4. SLUČAJNE IN SISTEMATSKE NAPAKE PRI TITRIMETRIČNI ANALIZI .....	9
1.5. POSTOPANJE S SISTEMATSKIMI NAPAKAMI.....	13
1.6. NAČRTOVANJE IN OBLIKOVANJE EKSPERIMENTOV .....	17
1.7. KALKULATORJI IN RAČUNALNIKI PRI STATISTIČNEM RAČUNANJU .....	18
2. NAPAKE PRI KLASIČNI ANALIZI – STATISTIKA PONOVLJENIH .....	21
MERITEV .....	21
2.1. POVPREČNI IN STANDARDNI ODMIK.....	21
2.2. PORAZDELITEV NAPAK.....	24
2.3. VZORČNA PORAZDELITEV POVPREČJA .....	29
2.4. MEJA ZAUPANJA POVPREČJA .....	30
2.5. PREDSTAVITEV REZULTATOV.....	33
2.6. OSTALE UPORABE MEJE ZAUPANJA .....	35
2.7. ŠIRJENJE SLUČAJNIH NAPAK.....	35
2.8. ŠIRJENJE SISTEMATSKIH NAPAK.....	40
3. NAPAKE PRI INSTRUMENTALNI ANALIZI; REGRESIJA IN .....	41
KORELACIJA .....	41
3.1. INSTRUMENTALNA ANALIZA .....	41
3.2. KALIBRACIJSKI GRAFI PRI INSTRUMENTALNI ANALIZI .....	43
3.3. KORELACIJSKI KOEFICIENT .....	45
3.4. REGRESIJSKA PREMICA $y$ NA $x$ .....	50
3.5. NAPAKE NAKLONA IN ODSEKA REGRESIJSKE PREMICE .....	51
3.6. RAČUNANJE KONCENTRACIJE .....	54
3.7. DETEKCIJSKA METODA .....	57
3.8. METODA STANDARDNEGA DODATKA.....	59
3.9. UPORABA REGRESIJSKIH PREMICE ZA PRIMERJANJE ANALIZNIH METOD.....	62
3.10. UTEŽENE REGRESIJSKE PREMICE.....	66
3.11. LINEARNA REGRESIJA ZA KRIVULJE – UVOD .....	71
3.12. PRILAGAJANJE KRIVULJE .....	76
3.13. ODPREK PRI REGRESIJI .....	81
4. LITERATURA.....	84

---

# 1. UVOD

## 1.1. ANALIZNI PROBLEMI

Analizni kemik se lahko sooči z dvema vrstama problemov. Včasih mora dati kvalitativni odgovor. Prisotnost bora v destilirani vodi pri proizvodnji mikro - elektronskih sestavin – »Ali ta vzorec destilirane vode vsebuje bor?« Primerjava vzorcev zemlje je pogost problem **sodne** znanosti – »Ali je mogoče, da ta dva vzorca zemlje izhajata iz istega področja?« V ostalih primerih so dani problemi kvantitativni. »Koliko albumina je v tem vzorcu krvnega seruma?« »Koliko svinca je v tem vzorcu vode iz pipe?« »Ta vzorec jekla vsebuje male količine kroma, volframa in magnezija - koliko katerega?« To so tipični primeri kvantitativne analize ene ali več sestavin.

Moderna analizna kemija je pretežno **kvantitativna** znanost. Očitno je, da je v veliko primerih kvantitativni odgovor veliko dragocenejši kot kvalitativni; za analitika je lahko uporabno, če reče, da je odkril bor v vzorcu destilirane vode, ampak veliko bolj uporabno zanj pa je, če lahko pove, *koliko* bora je prisotnega. Oseba, ki je predlagala analizo in ima kvantitativne podatke, bi tako lahko presodila, ali je vsebnost bora zaskrbljujoča, lahko bi razmislila, kako bi jo lahko znižali in tako naprej. Če pa bi vedela, da je prisotnega le nekaj bora, bi bilo težje presoditi pomembnost rezultatov. V drugih primerih imajo le kvantitativni rezultati uporabno vrednost. Navedimo primer, da dejansko vsi vzorci (človeškega) krvnega seruma vsebujejo albumin; vprašanje je le koliko?

Pomembno je vedeti, da se tudi v primerih, kjer je zahtevan kvalitativni odgovor, za pridobivanje le-teh uporabljajo kvantitativne metode. V resnici ne bi analitik nikoli preprosto rekel »Lahko ali ne morem odkriti bora v tem vzorcu vode«. Uporabil bi kvantitativno metodo, ki lahko odkrije bor v raztopinah s koncentracijo  $1\mu\text{g/mL}$ . Če bi bil rezultat testa negativen, bi bilo to opisano v obliki »Ta vzorec vsebuje manj kot  $1\mu\text{g/mL}$  bora.« Če bi bil rezultat testa pozitiven, bo v poročilu napisano, da vzorec vsebuje vsaj  $1\mu\text{g/mL}$  bora. Veliko bolj kompleksni kvantitativni pristopi se lahko uporabljajo za primerjavo dveh vzorcev zemlje. Analiza vzorcev glede na velikost delcev, pri kateri se določajo sorazmerja območja velikosti določenega števila delcev, recimo 10. Vsak vzorec bi bil tako označen s temi deset delnimi podatki. Precej kompleksni postopki se lahko uporabljajo za kvantitativno

---

ugotavljanje njihovih podobnosti, podana je lahko tudi verjetnost, da so vzorci istega izvora, če so na voljo podatki vzorcev zemlje, ki se skladajo.

## 1.2 NAPAKE PRI KVANTITATIVNI ANALIZI

Ko sprejmemo dejstvo, da bodo kvantitativne študije igrale prevladujočo vlogo v kateremkoli analiznem laboratoriju, moramo sprejeti tudi dejstvo, da so napake, ki se pri takih študijah pojavljajo, zelo pomembne. Naše vodilno načelo bo, da *nimajo kvantitativni rezultati nobene vrednosti, razen če jih ne spremljajo nekatere vrednosti pripadajočih napak*. To načelo se ne navezuje le na analizo kemije, ampak tudi na katerokoli polje študije, kjer se pridobivajo številčni eksperimentalni rezultati. Preizkusimo lahko večje število enostavnih primerov, ki ne ilustrirajo le načela ampak tudi nakazujejo na vrste statističnih problemov, ki jih bomo srečali in rešili v sledečih poglavjih.

Predstavljajmo si, da kemik sintetično napravi analitski reagent, za katerega misli, da je popolnoma nov. Preučuje ga s pomočjo spektrometrične metode in zmes da vrednost 104 (večina naših rezultatov bo podana v natančno izbranih enotah, v tem hipotetičnem primeru pa se lahko uporabljajo poljubne enote). Pri preverjanju priročnikov kemik ugotovi, da še nobena predhodno odkrita **zmes** ni dala večje vrednosti od 100, ko so jo preučevali po enaki metodi, pod enakimi eksperimentalnimi pogoji. Tako se seveda pojavi vprašanje, ali je naš kemik resnično odkril novo zmes? Odgovor na to vprašanje je seveda v stopnji zanesljivosti, na katero lahko sklepamo glede na eksperimentalno vrednost 104. Katere napake so povezane z njo? Če nadaljnje preučevanje pokaže, da je rezultat pravilen do 2 (poljubnih) enot, to pomeni, da je resnična vrednost v območju  $104 \pm 2$ , je bila nova snov karakterizirana. Če pa preiskava pokaže, da napaka zajema 10 enot (to je  $104 \pm 10$ ), potem je velika verjetnost, da je resnična vrednost manj kot 100, v tem primeru pa je novo odkritje daleč od zanesljivega. Z drugimi besedami, poznavanje eksperimentalnih napak je zelo pomembno (tako pri tem kot pri kateremkoli drugem primeru) za primerno interpretacijo rezultatov.

Bolj domač primer je analitik, ki izvede nekaj zaporednih določitev pri eni sami analizi. Vzemimo, da analitik izvede titrimetrični poizkus štirikrat in dobi vrednosti 24.69, 24.73, 24.77, in 25.39 ml. Najprej opazimo, da so vrednosti titracije navedene do 0.01 ml. Takoj je

---

jasno, da so vse štiri vrednosti različne zaradi napak, ki jih vsebujejo meritve, ter da je četrta vrednost (25.39) bistveno drugačna od ostalih treh. Vprašanje, ki se tukaj pojavi je – ali lahko varno opustimo četrto vrednost in je tako srednja vrednost titrata 24.73 ml?

Naslednji pogosti problem zajema primerjavo dveh (ali več) nizov rezultatov. Vzemimo, da analitik meri vsebnost vanadija v vzorcu jekla po dveh ločenih metodah. S prvo metodo dobi povprečno vrednost 1.04%, s predvideno napako 0.07 %. Pri uporabi druge metode dobi povprečno vrednost 0.95 % in napako 0.04 %. Pri primerjavi teh rezultatov se pojavijo številna vprašanja. Ali sta povprečni vrednosti bistveno drugačni ali pa sta nerazpoznavni v mejah eksperimentalne napake? Se pri eni metodi pojavi bistveno manj napak kot pri drugi? Katera od srednjih vrednosti je torej bližje resnici?

Veliko analiz temelji na grafičnih metodah. Namesto da ponavljamo meritve na enakem vzorcu, izvedemo serijo meritev na majhni skupini vzorcev, ki imajo znane koncentracije, ki zajemajo večjo serijo. Na ta način ustvarimo kalibracijsko krivuljo, ki jo lahko uporabimo za ocenjevanje koncentracij pri testnih vzorcih, ki jih proučujemo z enakim postopkom. V praksi pri vseh meritvah lahko prihaja do napak. Potrebno je določiti napake, ki so vpletene pri risanju kalibracijske krivulje; oceniti napako v koncentraciji posameznega vzorca, ki je določen z uporabo krivulje in določiti detekcijsko mejo metode, to je najmanjša količina analita, ki ga lahko odkrijemo z določeno stopnjo zaupanja.

Ti primeri predstavljajo le delček možnih problemov, ki se pojavijo pri navzočnosti eksperimentalnih napak pri kvantitativnih analizah. Kot smo videli, pa morajo biti problemi rešeni, če hočemo, da imajo kvantitativni podatki kakšno resnično vrednost. Tako je jasno, da moramo bolj podrobno preučiti različne vrste napak.

### 1.3 VRSTE NAPAK

Eksperimentalni znanstveniki razlikujejo med tremi vrstami napak. Te so znane kot **velike**, **slučajne** in **sistematske** napake. Velike napake lahko označimo kot napake, ki so tako resne, da nimamo druge izbire, kot popolnoma opustiti eksperiment in začeti popolnoma znova. Primeri so lahko popolna okvara inštrumentov, če pomotoma opustimo ali zavržemo bistveni

vzorec ali med potekom eksperimenta odkrijemo, da je bil reagent, za katerega smo mislili, da je čist, močno onesnažen. Take napake (včasih se pojavijo tudi v najboljših laboratorijih!) ponavadi lahko hitro odkrijemo. Tako moramo skrbno razločiti med **slučajnimi** in **sistematskimi** napakami.

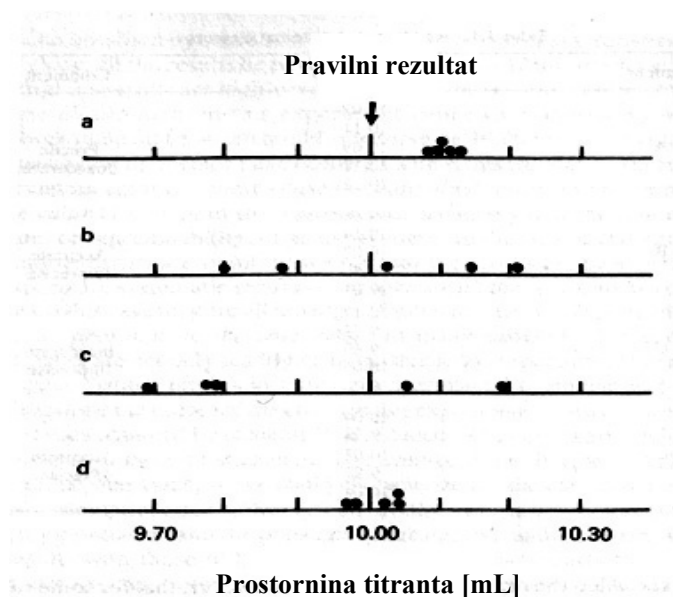
Razliko lahko najlažje naredimo s skrbnim preučevanjem resničnih eksperimentalnih situacij. Štirje študenti (A-D) izvajajo analizo, pri kateri je *natančno* 10.00 mL *natančno* 0.1M (0,1 mol/L) natrijevega hidroksida titriranega z *natančno* 0.1M klorovodikovo kislino. Vsak študent izvede pet ponovitev titracije, katerih rezultati so prikazani v tabeli 1.1.

**Tabela 1.1.** Slučajne in sistematske napake

Študent	Rezultati [mL]	Komentar
A	10.08	Natančen Netočen
	10.11	
	10.09	
	10.10	
	10.12	
B	9.88	Točen Nenatančen
	10.14	
	10.02	
	9.80	
	10.21	
C	10.19	Netočen Nenatančen
	9.79	
	9.69	
	10.05	
	9.78	
D	10.04	Točen Natančen
	9.98	
	10.02	
	9.97	
	10.04	

Rezultati, ki jih je dobil študent A imajo dve pomembni značilnosti. Prvič so si vsi zelo blizu; vsi rezultati so med 10.08 mL in 10.12 mL. Rekli bi lahko, da se rezultati lahko reproducirajo. Druga značilnost rezultatov je, da so vsi previsoki: pri tem eksperimentu (to je nenavadno) že vnaprej poznamo pravilni odgovor – ki je 10.00 ml. Jasno je, da sta se pri eksperimentu tega študenta pojavili dve popolnoma različni vrsti napake. **Slučajne napake** – *povzročijo, da individualni rezultati padejo na obeh straneh povprečne vrednosti* (v tem primeru 10.10 ml). Statistiki pravijo, da slučajne napake vplivajo na **natančnost** ali **reproducibilnost (obnovljivost)** eksperimenta. Pri primeru študenta A je jasno, da so slučajne napake majhne, tako rečemo, da so rezultati **natančni**. Pojavljajo pa se **sistematske napake** – *te povzročajo da so vsi rezultati napačni v enakem smislu* ( v tem primeru so vsi previsoki). Sistematske

napake vplivajo na **točnost**, to je *na približanje k pravi vrednosti*. Pri veliko eksperimentih slučajne in sistematske napake ne le brez težav odkrijemo pri pregledovanju rezultatov, imajo tudi različen izvor kar se tiče eksperimentalne tehnike in opreme. Preden pa preučimo vzroke napak pri tem eksperimentu, lahko na kratko pogledamo rezultate, ki so jih dobili študenti B-D. Študent B je dobil rezultate, ki so popolnoma nasprotni tistim od študenta A. Povprečje petih rezultatov (10.01 ml) je zelo blizu resnični vrednosti, zato lahko podatke označimo kot točne – brez precejšnjih sistematskih napak. Območje rezultatov je veliko, kar nakazuje slabo natančnost in prisotnost znatnih slučajnih napak. Primerjava teh rezultatov s tistimi, ki jih je dobil študent A jasno pokaže, da se lahko slučajne in sistematske napake pojavijo neodvisno ene od drugih. Ta zaključek je podkrepjen s podatki študentov C in D. Delo študenta C ni niti natančno (območje 9.69 mL – 10.19 ml) niti točno (povprečje 9.90 ml). Študent D je dosegel tako natančne (območje od 9.97 ml – 10.04 ml) kot točne (povprečje 10.01 ml) rezultate. Razlika med slučajnimi in sistematskimi napakami oz. med natančnostjo in točnostjo je povzeta v tabeli 1.1.



Slika 1.1. Točnost in natančnost – grafični prikaz (podatki so iz Tabele 1.1.). Pri (a) so podatki natančni a netočni, pri (b) so točni a nenatančni, pri (c) netočni in nenatančni in pri (d) točni in natančni.

Navidezno enostavni eksperimenti opisani v prejšnjih odstavkih si zaslužijo še dodatne razlage. Še posebej vredno omembe je, da imata besedi natančnost in točnost popolnoma drugačne pomene v teoriji napak. V vsakdanji rabi se lahko med seboj zamenjujeta. To zamenjevanje še oteži, da bi si zapomnili bistvene razlike med slučajnimi in sistematskimi napakami, na katere se nanašata besedi natančnost in točnost. Na tem mestu lahko omenimo še dve naslednji točki poimenovanja. Nekateri teksti govorijo o ‘določenih’ in ‘nedoločenih’ napakah, kar pomeni enako kot sistematske in slučajne napake. Kljub temu, da smo zgoraj uporabili besedo ‘reproducibilnost’ kot približno definicijo natančnosti, se po modernih dogovorih dela skrbna razlika med **obnovljivostjo (reproducibility)** in **ponovljivostjo (repeatability)**.

To razlikovanje lahko nakažemo z razširitvijo našega prejšnjega eksperimenta. Študent A bi po normalni poti naredil pet ponovitev titracije v hitrem zaporedju; verjetno bi celotna vaja trajala kakšno uro. Ves čas bi uporabljal enaki niz raztopin in enako steklovino, vsaki steklenici za titracijo bi dodal enako pripravljen indikator, temperatura, vlažnost in ostali laboratorijski pogoji bi ostali precej enaki. V takih okoliščinah bi bila izmerjena natančnost *znotraj poteka*: to se imenuje **ponovljivost**. Denimo, da bi iz nekih razlogov isti študent opravil titracije ob petih različnih priložnostih. V takih okoliščinah bi verjetno uporabljal različno steklovino in različno pripravljene indikatorje; od časa do časa se lahko spremenijo tudi razmere v laboratoriju. Zato ne bi bilo presenetljivo, če bi v tem primeru opazili večji območje rezultatov. Ta niz podatkov bi odražal natančnost metode *med poteki*, na to pa se nanaša izraz **obnovljivost**. Tabela 1.2 povzema definicije izrazov, ki smo jih uporabili do sedaj in odnose med njimi.

**Tabela 1.2.** Povzetek definicij

Vrste napak	
Slučajne	Sistematske
Vplivajo na natančnost Natančnost znotraj poteka je ponovljivost Natančnost med poteki je obnovljivost Znane tudi kot nedoločene napake	Vplivajo na točnost Približanost pravi vrednosti  Znane tudi kot določene napake

Iz eksperimenta titracije se lahko naučimo še nekaj. Lahko je razločiti, da so podatki, ki jih je dobil študent C nesprejemljivi in da so tisti, ki jih je dobil študent D najbolj sprejemljivi. Včasih pa se lahko zgodi, da sta za določeno analizo na voljo dve metodi. Ena od njih je



---

natančna a netočna, druga pa točna, a nenatančna. Z drugimi besedami, izbirati bi morali med dvema vrstama rezultatov, ki sta jih dobila študenta A oz. B. Pomembno je spoznanje, da lahko da metoda, ki vsebuje bistvene sistematske napake, tudi če je zelo nenatančna, povprečno vrednost, ki ni znatno oddaljena od pravilne vrednosti. Na drugi strani pa je lahko metoda, ki je natančna, a netočna (študent A), spremenjena v tako, ki je oboje natančna *in* točna (študent D), če odkrijemo in hitro odstranimo sistematske napake. Pojavili se bodo tudi primeri, pri katerih ne bo možna kontrola sistematskih napak, ker bodo meritve, ki se jih bomo lotili, popolnoma nove. Slučajne napake ne moremo odstraniti, vendar jih lahko s skrbno tehniko zmanjšamo in jih pri ponovnih meritvah izmerimo in ocenimo njihovo pomembnost. Sistematske napake v večini primerov lahko odstranimo s skrbnimi kontrolami naših eksperimentalnih tehnik in opreme.

#### **1.4 SLUČAJNE IN SISTEMATSKE NAPAKE PRI TITRIMETRIČNI ANALIZI**

Primer titrimetričnega eksperimenta študentov je jasno pokazal, da se lahko slučajne in sistematske napake pojavljajo neodvisno ene od drugih in se tako pojavijo na različnih stopnjah eksperimenta. Ker je titrimetrija dokaj enostaven in široko sprejet postopek, je zanimivo in dragoceno, da si ga v tem kontekstu natančneje ogledamo. Celotna titrimetrična analiza poteka po naslednjih korakih (nekateri od njih so bili pri predhodnem primeru izpuščeni zaradi enostavnosti).

- (1) Priprava standardne raztopine enega od reaktantov. To zajema (a) tehtanje tehtiča ali podobne posode, ki vsebuje trdni material, (b) premestitev trdnega materiala v standardno bučko in ponovno tehtanje tehtiča, da bi z odštevanjem dobili težo premeščene trdne snovi, in (c) napolnitev bučke do oznake z vodo (če delamo titracijo v vodni raztopini).
- (2) Premestitev standardne snovi v titracijsko bučko s pomočjo pipete. To zajema (a) polnjenje pipete do ustrezne oznake in (b) praznjenje na določen način v titracijsko bučko.
- (3) Titriranje tekočine v titrirki (erlenmajerici) z raztopino drugega reaktanta, dodanega iz birete. To zajema (a) polnjenje birete in praznjenje, da odteče dokler ni meniskus na konstantni višini, (b) dodajanje nekaj kapljic raztopine indikatorja v titrirko, (c) odčitavanje začetnega volumna birete, (d) dodajanje tekočine v titrirko iz birete

---

počasi, dokler ne presodimo, da smo dosegli končno točko, in (e) merjenje končnega volumna tekočine v bireti.

Tudi osnovna analiza te vrste tako zajema kakih deset ločenih korakov, zadnjih sedem je navadno, kot smo videli, večkrat ponovljenih. Načeloma bi morali preučiti vsak korak, da bi ocenili slučajne in sistematske napake, ki bi se lahko pojavile. V praksi je enostavneje ločeno preučiti tiste faze, ki potrebujejo tehtanje - koraki 1(a) in 1(b), in ostale faze, ki zajemajo uporabo volumetrične opreme. Pomembni med tistim, kar prispeva k napakam, so toleranca uteži uporabljenih pri gravimetričnih korakih in toleranca steklovine pri volumetričnih korakih. Toleranca 100 g odtehtane količine najboljše kvalitete je lahko majhna do  $\pm 0.25$  mg, vendar pa bi bila toleranca pri odtehtani količini, ki se uporablja pri rutinskem delu štirikrat tako velika. Podobno je toleranca za standardno stekleno bučko razreda A 250-mL  $\pm 0.12$  mL; steklovina razreda B ima ponavadi toleranco dvakrat tako visoko kot steklovina razreda A. Če je odtehtana količina ali steklena posoda v mejah tolerance, nima pa natančno pravilne teže ali prostornine, se bo pojavila sistematska napaka. Torej, če ima standardna bučka resnično prostornino 249.95 ml, se bo ta napaka odražala v rezultatih vseh eksperimentov, opravljenih z uporabo te bučke. Ponovitev eksperimenta ne bo odkrila te napake; pri vsaki ponovitvi bo volumen domnevno 250.00 ml, v resnici pa je manjši kot to. Če pa bi rezultate eksperimenta, pri katerem uporabljamo to bučko primerjali z rezultati številnih drugih eksperimentov (npr. v drugih laboratorijih), opravljenih z drugimi bučkami, potem bo dejstvo, da imajo bučke rahlo različne volumne, prispevalo k slučajnim različicam; domneva, da slučajne napake, ki nastanejo med poteki, vplivajo na obnovljivost rezultatov, ne velja.

Postopki tehtanja so praviloma povezani z majhnimi **slučajnimi** napakami. Pri rutinskem laboratorijskem delu se pogosto uporablja 'štirimestna' tehtnica, in slučajna napaka naj ne bi bila večja od  $\pm 0.0001 - 0.0002$  g. Denimo, da je tehtana količina navadno 1g ali več, je očitno, da slučajna napaka, ki je izražena s procenti dane teže, ni več kot 0.02%. Pri nekaterih poizkusih se za tehtanje količin nekaj miligramov uporabljajo 'mikro tehtnice' –napake bodo le nekaj mikrogramov.

**Sistematske** napake pri tehtanju so lahko precejšnje in imajo število dokazanih izvorov. Ti zajemajo absorbiranje vlage na površini tehtiča; zanemarjanje ohladitve segretyh posod na enako temperaturo, kot jo ima tehtnica pred tehtanjem; rjaste ali prašne uteži; vzgonski učinek

---

atmosfere, ki deluje v drugačnih oblikah pri predmetih različne gostote. Za najtočnejše delo moramo preveriti mere po standardih. Preverjanje je lahko zelo točno, npr.  $\pm 0.01$  mg za uteži od 1-10 g. Bistven je lahko tudi vzgonski učinek. Skoog in West sta pokazala, da bi vzorec organske tekočine, z gostoto 0.92 g/mL, ki tehta 1.2100 g v zraku, tehtal 1.2114 g v vakuumu, razlika je več kot 0.1 %. Razen uporabe procesov kalibracije lahko izvedemo nekaj varnostnih ukrepov, da zmanjšamo sistematske napake. Najpomembnejše je, da izvajamo tehtanje **ločeno**, t.j. najprej stehtamo tehtič skupaj z vzorcem in nato brez njega. **Razlika** med tem dvema tehtanjema nam da težo vzorca in tudi prepreči sistematske napake, ki bi se pojavile zaradi vlage in drugih umazanih delcev na površini stekleničke. Če izvedemo takšne varnostne ukrepe, bodo napake pri korakih tehtanja majhne. Verjetno pa bodo napake pri večini volumetričnih eksperimentov zanemarljive v primerjavi z napakami, ki nastanejo pri uporabi volumetrične opreme. Gravimetrične metode se uporabljajo za kalibracijo volumetričnih steklenih posod, tako da stehtamo (pri standardnih pogojih) vodo, ki jo vsebuje ali oddaja; ta proces je očitno veljaven le zato, ker so gravimetrične napake zanemarljive v primerjavi z volumetričnimi.

Slučajne napake pri volumetričnih postopkih se pojavijo ob uporabi steklovine. Če napolnimo 250-mL standardno bučko do oznake, je lahko napaka (t.j. razdalja med meniskusom in oznako) okoli  $\pm 0.03$  cm v steklenički z vratom, ki ima premer ca. 1.5 cm. To odgovarja prostorninski napaki okoli 0.05 ml – le 0.02 % celotne prostornine bučke. Prav tako slučajna napaka pri polnjenju 25-mL pipete ne bi smela presežati 0.03 cm v pipeti s premerom 0.5 cm; to nam da prostorninsko napako ca. 0.006 ml, 0.024 % skupnega volumna. Napaka pri odčitavanju birete (konvencionalne, razdeljeno na 0.1 ml) znaša mogoče 0.01-0.02 ml. Vsaka titracija zajema dve takšni odčitavanji; če je volumen titracije ca. 25 mL, je odstotek napake ponovno zelo majhen. Jasno je, da morajo biti pogoji eksperimenta prirejeni tako, da ni volumen titranta premajhen (recimo ne manj kot 10 mL), drugače bodo napake postale precejšnje. Kljub temu, da volumetrična analiza vsebuje nekaj korakov, v vsakem od teh se uporablja steklovina, je jasno, da morajo biti slučajne napake manjše, če eksperimente izvajamo previdno. V praksi bi dobra volumetrična analiza morala imeti relativni standardni odmik ne več kot okoli 0.1%. Če imamo izkušnje in izvedemo vse varnostne ukrepe, lahko dajo klasične metode rezultate z relativnim standardnim odkikom do 0.01%.

---

Volumetrični procesi vključujejo veliko pomembnih virov sistematskih napak. Glavne med njimi so napake pri sušenju pri uporabi steklovine, napake kalibracije pri steklovini in 'napake indikatorjev'. Morda je najpogostejša napaka pri rutinski volumetrični analizi, da pustimo premalo časa, da se pipeta izprazni ali pa, da se nivo meniskusa v bireti stabilizira. Vredno si je tudi zapomniti, da obstajata dve vrsti pipet, tiste, ki se izpraznijo z iztokom in tiste, iz katerih izpihamo ostanke tekočine. Če bi zamešali ti dve vrsti in bi s pihanjem izpraznili pipeto, ki se mora izprazniti z odtekom, bi bila to velika napaka! Napake iztoka imajo tako sistematske kot tudi slučajne učinke – dobljena prostornina je vedno manjša, kot bi morala biti. Temperatura, pri kateri izvajamo eksperiment ima dva učinka. Steklovina se po določitih kalibrira pri 20°C, toda temperatura v analiznem laboratoriju je lahko za nekaj stopinj drugačna od te, mnogo eksperimentov, pri biokemijski analizi, pa se izvaja v hladnih prostorih pri ca. 4°C. Temperatura vpliva tako na volumen steklene posode kot na gostoto tekočin. Koeficient raztezanja za razredčene vodne raztopine je okoli 0.025% na stopinjo, medtem ko se bo prostornina steklene posode za natrijev karbonat spremenila za okoli 0.003% na stopinjo in steklovina iz borovega silikata za okoli 0.001% na stopinjo. Očitno je, da bodo spremembe pri volumnih steklenih posod pomembne pri delu z najvišjo točnostjo, pa še to v primerih, če bo temperatura drugačna kot 20°C. Vplivi raztezanja raztopin bodo sami izginili, če jih bomo držali pri enaki temperaturi. Vpliv je večji pri nevodnih raztopinah.

Napake indikatorjev so lahko tudi precejšnje – mogoče celo večje, kot slučajne napake pri tipični titrimetrični analizi. Pri titraciji 0.1M klorovodikove kisline (HCl) z 0.1M natrijevim hidroksidom (NaOH) pričakujemo, da bo rezultat ustrezal pH 7. V praksi pa ocenjujemo rezultat z uporabo indikatorja, kot je metiloranž. Ločeni eksperimenti kažejo, da ta snov spremeni barvo pri vrednosti pH v območju od ca. 3 – 4. Če pri titraciji dodamo kislini bazo, bo indikator pokazal končno točko, ko je pH ca. 3.5, to je malo pred resnično končno točko. Sistematska napaka, ki se bo pojavila tukaj, bo verjetno 0.2 %. Če titracijo izvedemo v obratnem vrstnem redu, t.j. z dodajanjem kisline bazam, bo končna točka, ki jo bo pokazal metiloranž malo za resnično končno točko, zaradi potrebe, da bi pH kisline dosegel spremembo barve indikatorja. Tako je sistematska napaka indikatorja lahko ali pozitivna ali negativna, odvisno od eksperimenta; pri danem postopku bo ali vedno pozitivna ali vedno negativna. V vsakem primeru lahko napako ocenimo in popravimo z izvedbo **slepega** eksperimenta, t.j. z določanjem, koliko baze (ali kisline) je potrebno, da indikator spremeni barvo, ko kislina (baza) ni prisotna. Redkeje omenjena napaka je napaka 'zadnje kapljice'. Ni

---

znano, kolikšna količina zadnje kapljice, dodane titraciji je potrebna, da dosežemo končno točko. Ker je potrebno ali manj ali več kot polovico volumna kapljice, lahko to napako zmanjšamo z odštevanjem polovice volumna kapljice.

Pri klasičnem ali instrumentalnem postopku je mogoče upoštevati in oceniti vire za slučajne in sistematske napake, ki se pojavijo na vsaki posamezni stopnji eksperimenta. Zelo je zaželeno, da analitik to naredi, ker mu lahko omogoči, da se izogne glavnim virom napak. Vredno si je zapomniti, da je za titrimetrične analize dokaj neobičajno, da ne vsebujejo nobenega koraka, ki ima napako veliko večjo, kot so napake v drugih korakih. Pri veliko analizah pa nad skupno napako dominira napaka, ki se je pojavila pri posameznem koraku.

## **1.5 POSTOPANJE S SISTEMATSKIMI NAPAKAMI**

Primer titracije, ki je bil podan v poglavju 1.3 jasno pokaže, da sistematske napake povzročijo, da povprečne vrednosti ponovljenih meritev odstopajo od resnične vrednosti. Iz tega sledi, da (a) v nasprotju s slučajnimi napakami, sistematskih napak ne moremo odkriti zgolj s ponavljanjem meritev, in da, (b) razen če je resnični rezultat analize znan vnaprej, se lahko pojavijo zelo velike sistematske napake, vendar pa jih ne odkrijemo, razen če izvedemo primerne varnostne ukrepe. Z drugimi besedami, prelahko je popolnoma spregledati bistvene vire sistematskih napak. Nekaj primerov bo razjasnilo možne probleme in njihove rešitve.

V zadnjih letih je bilo pokazanega veliko zanimanja za prehajanje kovin v biološke vzorce, kot je krvni serum. Različni delavci, ki so vsi preučevali vzorce seruma iz zdravih predmetov, so dobili koncentracije kroma od  $<1$  do ca.  $200\text{ng/mL}$ ! Nižji rezultati so bili pridobljeni v zadnjem času, postopoma pa je postalo jasno, da so se zgodnejše, višje vrednosti pojavljale vsaj delno zaradi onesnaženih vzorcev s kromom iz nerjavečih brizgalk, pokrovov, itn. Določanje sledov kroma z atomsko absorpcijsko spektrometrijo, je v principu precej enostavno in brez dvoma je vsaka skupina delavcev dosegla rezultate, ki so se zdeli zadovoljivi glede na natančnost, toda v veliko primerih so popolnoma spregledali veliko sistematsko napako, ki jo je povzročilo onesnaženje. Metodološke sistematske napake te vrste so zelo pogoste – nepopolnospiranje oborine pri gravimetrični analizi, nadaljnji dobro znani primeri pa so še napake indikatorjev pri volumetrični analizi.

---

Naslednji razred sistematskih napak, ki se pogosto pojavlja je, ko napačno domnevamo o točnosti analiznih instrumentov. Izkušeni analitiki predobro vedo, da se naprave za merjenje valovne dolžine postopoma pokvarijo, tako da napake nekaj nanometrov pri nastavitvah valovnih dolžin niso redke. Veliko fotometričnih analiz se izvaja celo brez primerne preverjanja. Zelo preprosti pripomočki, kot so steklovina, štoparice, pH-metri in termometri lahko vsi pokažejo bistvene sistematske napake, veliko laboratorijskih delavcev pa redno uporablja instrumente, kot da bi bili vedno popolnoma točni. Razen tega pa je povečana dosegljivost instrumentov, ki jih nadzirajo mikro-procesorji in mikro-računalniki, na minimum zmanjšala število operacij in stopnjo spretnosti, ki jih potrebujejo izvajalci. V teh pogojih je skušnjava, rezultate instrumentov imeti za nekritične, prevelika – vendar so takšni instrumenti (razen če so dovolj ‘inteligentni’, da se sami kalibrirajo) še vedno predmet sistematskih napak.

Sistematske napake ne nastanejo le pri procesih ali aparatih; pojavijo se lahko tudi zaradi človeške pristranosti. Nekateri kemiki imajo astigmatizem (napačno izbočeno roženico) ali barvno slepoto - daltonizem (druga je pogostejša pri moških kot pri ženskah), kar lahko povzroči napake pri odčitavanju iz instrumentov in pri ostalih opazovanjih. Številni avtorji so pri poročanju o rezultatih govorili o različnih vrstah številčne pristranosti, tendenca k večji naklonjenosti sodim kot lihim številom, ali 0 in 5 kot ostalim številkam. Tako je očitno, da so sistematske napake veliko vrst stalne in pogosto skrite in tako rizik za analitika. Upoštevati moramo vse previdnostne ukrepe, da bi jih zmanjšali. Na voljo je veliko različnih pristopov k temu problemu. Pri vsakem analiznem postopku moramo upoštevati kateregakoli ali pa vse.

Prve varnostne ukrepe moramo izvesti, preden se začne eksperimentalno delo. Analitik mora dobro premisliti vsako stopnjo eksperimenta, ki ga bo izvedel, aparature, ki jih bo uporabljal, ter vzorčenje in analizne procese, ki jih bo privzema. Moral bi poizkusiti identificirati možne vire sistematskih napak, kot so funkcije instrumentov, ki potrebujejo kalibracijo, na tej najzgodnejši stopnji, ter korake analiznega postopka, kjer obstaja največja možnost, da se bodo pojavile napake. Moral bi tudi razmisliti o kontrolah, ki jih bo izvajal kasneje, za ugotavljanje sistematskih napak. Predvidevanje te vrste je lahko zelo dragoceno in je ponavadi vredno časa, ki ga vložimo.

---

Naslednja vrsta zaščite pred sistematskimi napakami je oblikovanje eksperimenta na vsaki stopnji. Videli smo že, da diferenčno tehtanje lahko odpravi nekaj sistematskih gravimetričnih napak, za katere predvidevamo, da nastanejo v enaki meri pri obeh tehtanjih in jih proces odštevanja odpravi. Nadaljnji primer premišljenega načrtovanja eksperimenta je prej omenjena napaka valovne dolžine spektrometra. Če moramo določiti koncentracijo vzorca posameznega materiala z atomsko absorpcijsko spektrometrijo, sta možna dva postopka. Pri prvem preučujemo vzorec v spektrometrijski celici na dolžini poti 1 cm na neki valovni dolžini, recimo 400 nm, koncentracija komponente v testu pa je določena z dobro znano enačbo

$A = \epsilon cl$  (kjer so  $A$ ,  $\epsilon$ ,  $c$  in  $l$  posamezno izmerjena absorbanca, sprejemljiva referenčna vrednost molarne absorpcijskega koeficienta [ $\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ] komponente testa, molarna koncentracija tega analita, ter dolžina poti [cm] spektrometrijske kivete). Tukaj se lahko pojavi veliko sistematskih napak: valovna dolžina je lahko recimo 405 nm namesto 400 nm in tako povzroči, da je referenčna vrednost  $\epsilon$  neprimerna; ta referenčna vrednost bi lahko bila napačna v kateremkoli primeru; skala absorbance spektrometra lahko kaže sistematsko napako; dolžina poti v celici pa mogoče ne bi bila točno 1 cm. Kot alternativo lahko analitik vzame serijo raztopin testnih spojin **znanih** koncentracij in izmeri absorbanco vsakega pri 400 nm. Rezultate bi uporabil za oblikovanje kalibracijskega grafa, ki bi ga lahko uporabljal pri analizi testnih vzorcev pri popolnoma enakih pogojih eksperimenta. Ko uporabljamo to drugo metodo, se ne zahteva vrednost  $\epsilon$ , tako da izostanejo napake zaradi sprememb valovne dolžine, napake absorbance in nepravilnosti pri dolžini poti, ker se pojavljajo enakomerno pri kalibraciji in testnih eksperimentih. Le če so pogoji dejansko enaki za testne in kalibracijske vzorce (če predvidevamo, da se uporablja enaka kiveta in da se valovne dolžine in absorbance ne spreminjajo *med eksperimentom*) smo v principu odstranili vse vire sistematskih napak.

Zadnja in verjetno najbolj pomembna zaščita pred napakami je uporaba standardnih referenčnih materialov in metod. Preden se eksperiment začne, je vsak del aparature kalibriran s primernim postopkom. Videli smo že, da lahko steklovino kalibriramo z uporabo gravimetričnih metod. Podobno se lahko kalibrirajo skale za valovno dolžino pri spektrometru s pomočjo standardnih virov svetlobe, ki imajo ozke linije emisije pri dobro vzpostavljenih valovnih dolžinah, skale absorbance spektrometra se lahko kalibrirajo s standardnimi trdnimi ali tekočimi filtri. Podobno je lahko kalibriranih večina kosov opreme, tako da so njihove sistematske napake znane že vnaprej.

---

Če se sistematske napake pojavljajo med kemijskim procesom ali kot rezultat uporabe nečistih reagentov, ne pa v opremi, moramo uporabiti alternativne oblike primerjave, npr. določanje moramo ponoviti z uporabo popolnoma neodvisnega postopka. Če za izvajanje ene analize uporabljamo dve (ali več) kemijsko in fizično nepovezanih metod in če dosledno dajejo rezultate, ki kažejo slučajne razlike, je upravičeno sklepanje, da ni prisotnih nobenih večjih sistematskih napak. Da bi ta pristop bil veljaven, mora biti *vsak korak* dveh eksperimentov samostojen. Tako bi v primeru določanja kroma v serumu ne bilo dovolj zamenjati koraka atomske absorpcijske spektrometrije s kolorimetrično metodo: sistematske napake bi bi odkrili le, če bi spremenili tudi metode izbora, npr. z zmanjšanjem ali odstranitvijo uporabe opreme iz nerjavečega jekla. Nadaljnja pomembna točka je, da mora biti primerjava izvedena na celotnem koncentracijskem območju, za katerega se bo uporabljal analizni postopek. Široko uporabna metoda uporabe bromokresol zelenega za določanje albumina v serumu se dobro ujema z alternativnimi metodami (npr. imunološke metode) pri normalni ali visoki vsebnosti albumina, ko pa so vsebnosti albumina nenormalno nizke (to je pri primerih večine kliničnih preiskav!) je sovpadanje med dvema metodama slabo, metoda z uporabo barvila daje dosledno višje koncentracije albumina.

Razširjenost sistematskih napak v vsakdanjem analiznem delu lahko dobro prikažemo z rezultati **medlaboratorijskih primerjav**. Za sposobnega in izkušenega analitika je normalno, da verjame, če najde 10 ng/mL droge v vzorcu urina, potem bi tudi drugi analitiki dobili podobne rezultate pri istem vzorcu, kakršnakoli razlika pa bi bila posledica slučajnih napak. Na žalost, je to daleč od resnične prakse. Pri veliko medlaboratorijskih preiskavah, ki vključujejo različne laboratorije, tudi če so vzorci natančno pripravljene in pregledani z istimi eksperimentalnimi postopki in istimi vrstami instrumentov, so razlike pri rezultatih pogosto večje, kot bi bilo smiselno pričakovati pri slučajnih napakah. Neizbežen zaključek je, da so v mnogih laboratorijih prisotne različne bistvene sistematske napake, oboje pozitivne in negativne, še neodkrite ali nepopravljene. Očitno je ta zaskrbljujoča situacija, ki ima veliko vplivov na vse raziskovalce v analizni kemiji, vzpodbudila veliko študij o metodologiji medlaboratorijskih primerjav in o statističnem ovrednotenju njihovih rezultatov.

Čeprav smo do sedaj dosledno ločevali med slučajnimi in sistematskimi napakami, se bo tudi zgodilo, da pri vsakodnevnih analiznih meritvah to ločevanje ne bo več tako jasno. Kadarkoli preverjamo nek proces ali instrument zaradi prisotnosti sistematskih napak, bodo sami pregledi podvrženi slučajnim napakam, tako da ne bo mogoče pravilno prepoznati ali



---

popraviti sistematskih napak. Tako bo rezultat vsake analize povezan z obema, slučajno in sistematsko napako, ki ni natanko znana. Ta kombinacija napak je postala znana v novejši literaturi kot **merilna negotovost *analiznih* rezultatov**. To je jasno nerodna situacija za obravnavo: čeprav je znano, kako se slučajne napake širijo in se v eksperimentih z več stopnjami povezujejo na predvidljiv način, pa to ne velja za sistematske napake. Podati kvantitativno oceno za celotno negotovost pri rezultatu je vse prej kot lahko. Kljub tem problemom je jasna pomembnost koncepta negotovosti in verjetno bomo v prihodnjih letih videli vloženega veliko truda za razširitev in popularizacijo tega pristopa.

## 1.6 NAČRTOVANJE IN OBLIKOVANJE EKSPERIMENTOV

Veliko kemikov smatra statistične teste kot metode, ki se uporabljajo le za ovrednotenje rezultatov dokončanih eksperimentov. Čeprav je to najpomembnejše področje uporabe statistike – videli smo, da noben kvantitativni rezultat ni ničesar vreden, če ga ne spremlja ocenitev njegovih napak – je tudi potrebno, da se zavedamo pomembnosti statističnih konceptov pri načrtovanju in oblikovanju eksperimentov. V prejšnjem delu je bila poudarjena vrednost poskusa vnaprej napovedati sistematske napake in tako dopustiti, da analitik naredi načrte, kako jih odpravljati. Enako je veljalo za slučajne napake. Da bi kombinacija slučajnih napak posameznih delov eksperimenta dala celotno napako, je potrebna uporaba enostavnih statističnih formul. V praksi nad celotno napako prevlada napaka le ene stopnje eksperimenta, ostale napake pa imajo zanemarljive učinke, če so vse napake pravilno kombinirane. Ponovno je očitno, da je potrebno poskusiti ugotoviti, *preden se eksperiment začne*, kje se bo pojavila ta prevladujoča napaka in jo potem zmanjšati. Čeprav slučajnih napak nikoli ne moremo odstraniti, jih pa lahko zagotovo zmanjšamo, če posvečamo posebno pozornost eksperimentalnim tehnikam: izboljšanje natančnosti spektrometričnega eksperimenta z uporabo vzorčne kivete s konstantno temperaturo je najenostavnejši varnostni ukrep te vrste. Tako je za oboje, slučajne in sistematske napake, jasno, da se je potrebno truditi odkriti resne vire napak preden se prične praktično delo, tako da lahko oblikujemo eksperiment in zmanjšamo takšne napake.

Predhodno moramo razmišljati tudi o oblikovanju eksperimenta. V veliko analizah najdemo eno ali več zelenih oblik metod (npr. senzitivnost, selektivnost, vzorčni primerek, nizki

---

stroški, itd.), ki so odvisne od števila eksperimentalnih faktorjev. Želimo si oblikovati eksperiment tako, da uporabimo optimalno kombinacijo teh faktorjev in tako dobiti najboljšo senzitivnost, selektivnost, itd. Čeprav bo potrebno *nekaj* predhodnih eksperimentov in predznanje, bi morali optimizacijo izvesti (zaradi prihranka virov in časa), preden je metoda namenjena široki uporabi.

Kompleksnost optimizacijskih postopkov lahko opišemo s pomočjo primera. Pri analizi encimov se koncentracija analita določi z opazovanji stopnje reakcije kataliziranih encimov. Analit je pogosto substrat. Vzemimo, da iščemo maksimalno reakcijsko stopnjo določenega eksperimenta in da je stopnja v praksi (med ostalimi faktorji) odvisna od pH reakcijske mešanice, temperature in koncentracije encimov. Kako naj najdemo optimalne pogoje? Enostavno je ugotoviti en možen pristop. Analitik lahko izvede serijo eksperimentov in pri vsakem od njih bosta koncentracija encimov in temperatura konstantni, pH pa bo variiral. V vsakem primeru bi bila stopnja reakcije katalize encimov določena in tako bi dobili optimalno pH vrednost – recimo, da je ta 7.5. Nato lahko izvedemo drugo serijo eksperimentov reakcijske stopnje, pH bi ostal na 7.5, koncentracija encimov bi bila ponovno stalna, variirala pa bi temperatura. Tako bi našli optimalno temperaturo – recimo 40°C. Končno bi serija eksperimentov pri pH 7.5 in 40°C, toda z različnimi koncentracijami encimov pokazala optimalno stopnjo encimov. Ta pristop optimizacije eksperimenta je preveč dolgotrajen; v bolj realističnih primerih bi morali preiskovati več kot tri eksperimentalne faktorje. Ima še nadaljnjo, bolj bistveno napako, da predvideva, da faktorji (pH, temperatura, koncentracija encimov) vplivajo na stopnjo reakcije na *neodvisen* način. To pa ni resnično. Ugotovili smo, da je pri pH 7.5, optimalna temperatura 40°C. Pri drugačnem pH pa optimalna temperatura ni 40°C. Z drugimi besedami, ti faktorji lahko vplivajo na stopnjo reakcije na *medsebojno odvisen* način in pogoji ustvarjeni pri seriji eksperimentov, ki so bili pravkar opisani, mogoče niso najbolj optimalni. Če bi se prva serija eksperimentov začela pri drugačnih pogojih, bi lahko dobili drugačen niz 'optimalnih' vrednosti. Iz tega enostavnega primera je razvidno, da je lahko eksperimentalna optimizacija velikanski problem.

## **1.7 KALKULATORJI IN RAČUNALNIKI PRI STATISTIČNEM RAČUNANJU**

Kemiki smo priča osupljivem razvoju, ki se je pred kratkim zgodil na področju mikroelektronike. Ta napredek je omogočil oblikovanje pripomočkov, ki močno olajšajo statistično računanje. Hitra rast 'kemometrije' – uporabe matematičnih metod za reševanje

---

vseh vrst kemijskih problemov – je pristojna za obdelovanje velikih količin podatkov in računanje zapletenih računov s kalkulatorji in računalniki.

Ti pripomočki so na voljo analiznim kemikom glede na različno stopnjo kompleksnosti in stroškov.

- (1) Kalkulatorji so izjemno poceni, zelo zanesljivi ter sposobni izvajati veliko rutinskih statističnih računov z minimalnim številom pritiska na tipke. Pri veliko kalkulatorjih bodo vnaprej programirane funkcije dopuščale računanje povprečnih in standardnih odmikov in povezavo ter linearno regresijo. Drugi kalkulatorji so lahko opremljeni s kartico ali pa jih uporabnik programira, da izvajajo dodatna računanja, kot so meja zaupanja, test ustreznosti in nelinearne regresije. Za pogosto uporabo v laboratorijih pri analiznih raziskavah ali rutinskih analizah bodo kalkulatorji te vrste več kot ustrezni. Njihove slabosti so v njihovi nesposobnosti obdelovati velike količine podatkov, ter problemi zaradi omejenega števila pomembnih simbolov, vključenih v njihove algoritme.
- (2) Mikroročunalnike ali osebne računalnike (PC-je), katerih cene padajo skoraj tako hitro, kot narašča kapaciteta njihovega spomina in hitrost delovanja, lahko najdemo v vseh kemijskih laboratorijih in večina raziskovalcev analitikov ima lastne PC-je na svojih mizah. Prenosni PC-ji olajšujejo beleženje in računanje podatkov na terenu in so takoj povezani s svojimi večjimi računalniki ob povratku v laboratorij. Vsa ta sredstva morajo biti programirana tudi za izvajanje najenostavnejših statističnih računov, za vse vrste PC-jev pa je na voljo velika količina odlične računalniške opreme. Kapaciteta spomina in hitrost PC-jev je sedaj več kot primerna za delo z vsemi, razen največjimi nizi podatkov, vendar se lahko tako kot pri kalkulatorjih pojavijo težave zaradi pomembnih simbolov med statističnimi računaji. PC-ji so serijsko opremljeni z besednimi prevajalci, ki nudijo veliko pomoč sestavljanju analiznih poročil in dokumentov, ter s programi za široke liste. Slednji so, čeprav so bili prvotno oblikovani za finančno računanje, pogosto bolj primerni za statistično delo, ker imajo vgrajenih veliko statističnih funkcij (npr. računanje standardnih odmikov ali regresije). Njihova popularnost izhaja iz enostavnosti uporabe in njihove sposobnosti, da takoj izvajajo 'kaj če' (if) račune – na primer, kakšen bi bil povprečni in standardni odmik niza rezultatov, če bi odstranili en sumljivi del podatkov? Ti

---

programi so oblikovani za to, da omogočajo hiter vnos podatkov, njihov format pa se uporablja pri specializiranih vrstah statističnega računalniškega programa.

Mogoče je največja vrednost PC-jev, da jih lahko takoj združimo s skoraj vsemi vrstami analiznih instrumentov, z dvojnimi vlogami kontrole instrumentalnih funkcij, ter zbiranja in interpretiranja končnih podatkov: v veliko primerih interpretacija podatkov zajema podajanje rezultatov v grafični obliki in celo tiskanje formalnih poročil. Dodatne funkcije PC-jev lahko zajemajo preverjanje delovanja instrumentov, prepoznavanje in poročanje o napačnem delovanju, shranjevanje velikih baz podatkov (npr. digitaliziranih spektrov) in primerjanje analiznih podatkov z bazami podatkov, optimiranje pogojev delovanja, izbiranje in uporabo različnih računanj kalibracije. Z naraščanjem moči računalnikov se bo ta razvoj tudi nadaljeval; strokovni sistemi in nevronske mreže so primeri računalniškega programa umetne inteligence, ki so že na voljo v PC formatu. Naraščajoč (čeprav ne vedno dobrodošel) trend v instrumentalni analizi je, da so merilni instrumenti brez manualnih kontrol, ker so popolnoma nadzorovani preko povezanega PC-ja. Zaskrbljujoče je tudi, da računalniški program, ki je opremljen z računalniško kontroliranimi instrumenti, ni vedno pojasnjen uporabniku: analitik lahko ima tako nesrečo, da je niz podatkov tolmačen preko običajnega postopka kalibracije, ki ni bil definiran in mogoče ni vedno primeren. To je neželena situacija, vendar je razumljiva želja, da hočejo podjetja z instrumenti zaščititi svoj drag računalniški program pred pirati.

Še ena prednost PC-jev je v tem, da se lahko takoj priključijo na omrežje, t.j. skupina PC-jev v istih ali sosednjih laboratorijih je lahko povezana tako, da se lahko tako operativni računalniški program kot tudi podatki, prosto prenašajo iz enega na drugega. Očitna prednost takega omrežja je vzpostavitev Laboratory Information Management Systems (LIMS), ki dovoljuje identifikacijo in zasleditev velikega števila analiznih vzorcev, ko se pomikajo skozi laboratorij. PC-ji, ki so priključeni na vrsto instrumentov, lahko prenesejo vrsto različnih analiznih rezultatov na centralni računalnik, ki natiska povzetek, ki zajema tudi statistično ovrednotenje.

- (3) Večji računalniki se uporabljajo v kemiji le za računanje velikih obsegov (npr. rentgenska kristalografska računanja, napredno molekularno modeliranje, ind.), ali za prekomerno shranjevanje podatkov. Njihova uporaba pri statističnem delu je povezana s preučevanjem izjemno velikih nizov podatkov, ali kjer je potrebnih veliko ponovitev.

---

Za analiznega kemika je najpomembneje, da si zapomni, da dostopnost pripomočkov za obdelovanje podatkov povečuje potrebo po dobrem poznavanju načel, ki izhajajo iz statističnega računanja. Računalnik ali kalkulator bo hitro izvedel katerikoli statistični test ali izračun, ki ga bo izbral uporabnik, *če je ta postopek primeren za podatke, ki so v obdelavi ali pa ne*. Enostavni program za testiranje pomembnosti razlike med dvema nizoma podatkov lahko predpostavlja, da sta različici dveh nizov podobni: ampak program bo slepo izvedel izračun na zahtevo in dal 'rezultat', tudi če se bosta različici bistveno razlikovali. Tudi obsežnejše serije računalniških programov včasih ne dajo ustreznih nasvetov o izbiri statističnih metod, primernih za dan niz podatkov. Analitik mora tako uporabiti svoje statistično znanje in svoj zdrav razum, da bi zagotovil pravilno izračunavanje.

## **2. NAPAKE PRI KLASIČNI ANALIZI – STATISTIKA PONOVLJENIH MERITEV**

### **2.1 POVPREČNI IN STANDARDNI ODMIK**

V tem poglavju je predstavljenih nekaj temeljnih statističnih konceptov in umeščenih v običajne situacije v klasični analizi, t.j. izvajajo se ponovljena merjenja iste količine. V 1. poglavju so bile predstavljene različne vrste napak, tako da so se upoštevali rezultati petih ponovljenih titracij, ki so jih izvedli štirje študenti; spodaj so navedeni ti rezultati:

študent	rezultati [mL]				
A	10.08	10.11	10.09	10.10	10.12
B	9.88	10.14	10.02	9.80	10.21
C	10.19	9.79	9.69	10.05	9.78
D	10.04	9.98	10.02	9.97	10.04

Uporabljala sta se dva kriterija za primerjanje rezultatov, povprečna vrednost in razpršenost. Povprečna vrednost, ki se je uporabljala je bila **aritmetična sredina**,  $\bar{x}$ , (ponavadi **povprečje**), ki je vsota vseh meritev, deljena s številom meritev:

$$\bar{x} = \sum_i \frac{x_i}{n} \quad (2.1)$$

Najbolj uporabna mera razpršenosti je standardni odmik,  $s$ . Ta je določen s formulo:

$$s = \sqrt{\sum_i \frac{(x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}} \quad (2.2)$$

Izračun standardnega odmika rezultatov študenta A je prikazan v tabeli 2.1. Standardni odmiki rezultatov študentov B, C in D so 0.17 ml, 0.21 ml, oz. 0.33 ml.

Veliko žepnih kalkulatorjev bo dalo rezultate teh računov, če so vrednosti  $x$  določene v njem. Pazljivi moramo biti, da pritisnemo ustrezno tipko, da dobimo standardni odmik. Nekateri kalkulatorji dajo dve različni vrednosti za standardni odmik, eno izračunano z uporabo enačbe (2.2) in drugo izračunano z imenovalcem te enačbe, t.j.  $(n-1)$ , zamenjan z  $n$ . (Razlog za ti dve različni obliki je opisan kasneje.) Očitno je zaradi velikih vrednosti  $n$  razlika zanemarljiva.

**Tabela 2.1.** Izračun povprečnega in standardnega odmika rezultatov A

	$x_i$ [mL]	$(x_i - \bar{x})^2$
--	------------	---------------------

	10.08	0.0004
	10.11	0.0001
	10.09	0.0001
	10.10	0.0000
	10.12	0.0004
	-----	-----
skupaj	50.50	0.0010
	$\bar{x} = \frac{50.50}{5} = 10.10 \text{ mL}$ $s = \sqrt{\frac{0.0010}{4}} = 0.016 \text{ mL}$	

Na žalost lahko kalkulator pri računanju standardnega odmika zaokroži števila, tako da za standardni odmik lahko dobimo napačno vrednost (celo nič). To se ponavadi zgodi, ko se razlika med vnesenimi vrednostmi pojavi pri četrti ali naslednji številki, odvisno od dela kalkulatorja. Veliko kalkulatorjev podajo standardni odmik treh vrednosti 100.000, 100.001 in 100.002 kot nič, čeprav je v bistvu 0.001. Ta problem lahko rešimo s **kodiranjem** vrednosti, t.j. z odštevanjem stalne vrednosti od vsake, v tem primeru recimo 100.000, da dobimo 0.000, 0.001 in 0.002. Ker standardni odmik meri razpršenost okoli povprečja, je standardni odmik kodiranih vrednosti enak kot tisti pri originalnih vrednostih. (Povprečje originalnih vrednosti dobimo s prištevanjem 100.000 k povprečju kodiranih vrednosti.)

Račun v tabeli 2.1 je bil zelo enostaven, ker smo vrednosti  $(x_i - \bar{x})^2$  lahko izračunali na pamet. To ponavadi ni tako in alternativna oblika enačbe (2.2) se lahko uporabi za poenostavitev aritmetike, če ni na voljo vnaprej programiranega kalkulatorja:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{(n-1)} - \frac{(\sum_i x_i)^2}{n(n-1)}} \quad (2.3)$$

Povprečni in standardni odmik se lahko izračunata tudi s pomočjo računalnika, s programom, ki zajema le nekaj vrstic. Takšen program bi imel vrednost le, če bi računalnik sam zbiral podatke ali če bi bila vpletena velika količina podatkov.

Kvadrat  $s$  je zelo pomembna statistična količina, znana kot **spremenljivka (varianca)**; njena vrednost bo postala vidna kasneje v tem poglavju, ko bomo govorili o širjenju napak. Pogosto se uporablja tudi **koeficient spremenljivke (CV)**, znan tudi kot **relativni standardni odmik**

(RSD) in podan s  $100 \frac{s}{\bar{x}}$ . CV ali RSD, enote katerih so procenti, je primer relativne napake, t.j. ocena napake deljena z absolutno vrednostjo merjene količine. Relativne napake se pogosto uporabljajo pri primerjavi natančnosti rezultatov, ki imajo različne enote ali obsege in so pomembne pri računanju širjenja napak.

## 2.2 PORAZDELITEV NAPAK

Čeprav da standardni odmik mero razpršenosti okoli srednje vrednosti, ne nakazuje načina, na katerega se porazdelijo rezultati. Za ilustracijo tega potrebujemo veliko število meritev kot so v tabeli 2.2. Dobimo rezultat 50 ponovnih določitev koncentracije nitratnih ionov v določenem vzorcu vode, danih v dveh diagramih. Te lahko povzamemo v **tabeli pogostosti** (Tabela 2.3). Tabela kaže, da se v tabeli 2.2 vrednost 0.46 $\mu\text{g/mL}$  pojavi enkrat, vrednost 0.47  $\mu\text{g/mL}$  trikrat in tako naprej. Povprečje teh rezultatov je 0.500 $\mu\text{g/mL}$  in standardni odmik 0.0165 $\mu\text{g/mL}$ . Porazdelitev rezultatov lahko najlažje prikažemo s **histogramom** kot je na sliki 2.1. Pokaže nam, da je porazdelitev meritev približno simetrična okoli povprečja, meritve se kopičijo proti centru.

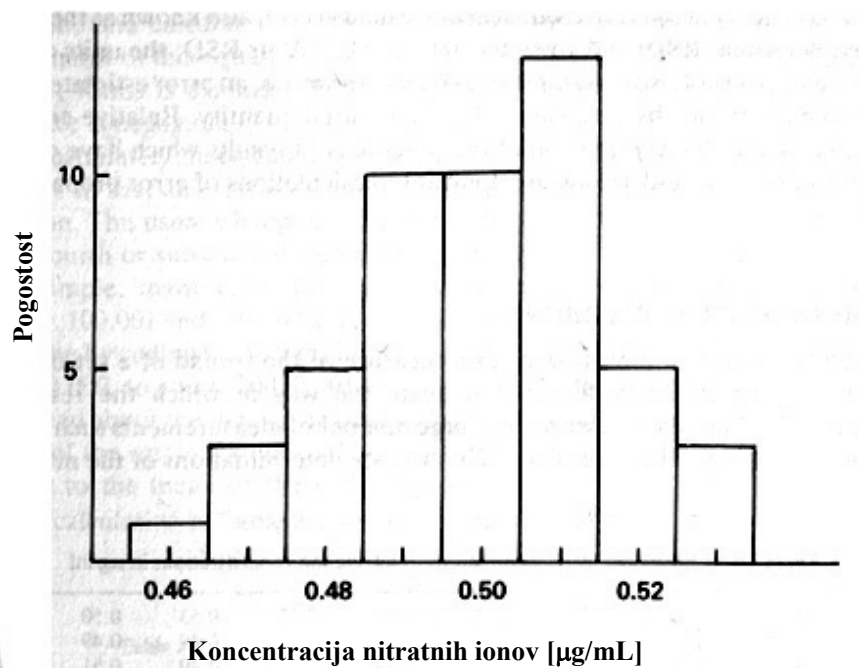
**Tabela 2.2.** Rezultat 50 ponovitev koncentracije nitratnih ionov [ $\mu\text{g/mL}$ ]

0.51	0.51	0.51	0.50	0.51	0.49	0.52	0.53	0.50	0.47
0.51	0.52	0.53	0.48	0.49	0.50	0.52	0.49	0.49	0.50
0.49	0.48	0.46	0.49	0.49	0.48	0.49	0.49	0.51	0.47
0.51	0.51	0.51	0.48	0.50	0.47	0.50	0.51	0.49	0.48
0.51	0.50	0.50	0.53	0.52	0.52	0.50	0.50	0.51	0.51

**Tabela 2.3.** Tabela pogostosti za meritve koncentracije nitratnih ionov

<u>Koncentracija nitratnih ionov [<math>\mu\text{g/mL}</math>]</u>	<u>Pogostost</u>
0.46	1
0.47	3
0.48	5
0.49	10
0.50	10
0.51	13
0.52	5
0.53	3





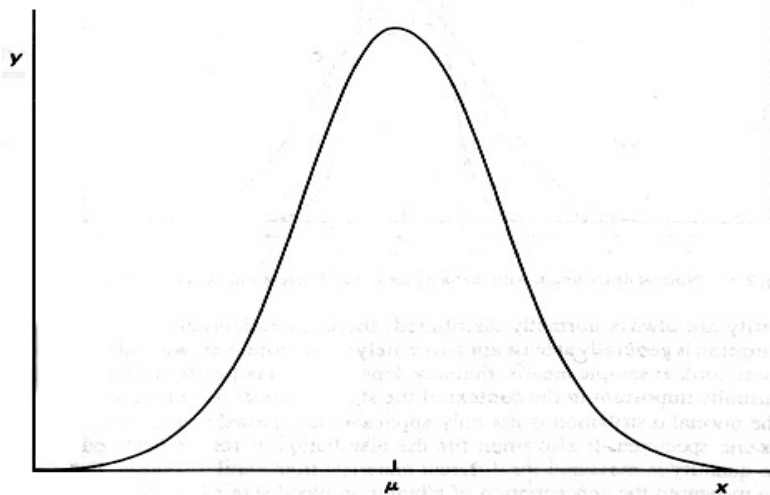
Slika 2.1. Histogram podatkov koncentracije nitratnih ionov iz tabele 2.3

Niz 50 meritev je vzorec iz zelo velikega (v teoriji neskončnega) števila meritev, ki lahko naredijo koncentracijo nitratnih ionov. Niz možnih meritev se imenuje **populacija**. Če ni nobenih sistematskih napak, potem je povprečje populacije, označeno z  $\mu$ , resnična vrednost koncentracije nitratnih ionov, ki jo poskušamo določiti. Povprečje,  $\bar{x}$ , vzorcev nam da oceno  $\mu$ . Podobno ima populacija standardni odmik, označen z  $\sigma$ . Uporaba enačbe (2.2) nam da nepristransko oceno  $\sigma$ . Če namesto  $(n-1)$  uporabimo  $n$  v imenovalcu enačbe, teži pridobljena vrednost  $s$  k podcenjenemu  $\sigma$ .

Meritve koncentracij nitratnih ionov podane v tabeli 2.2 imajo le določene izločene vrednosti, zaradi omejitve metode merjenja. V teoriji bi koncentracija lahko imela katerokoli vrednost, tako da je za opis oblike populacije iz katere je bil vzet vzorec potrebna nepretrgana krivulja. Matematični model, ki se ponavadi uporablja, je **normalna** ali **Gaussova porazdelitev**, ki je opisana z enačbo

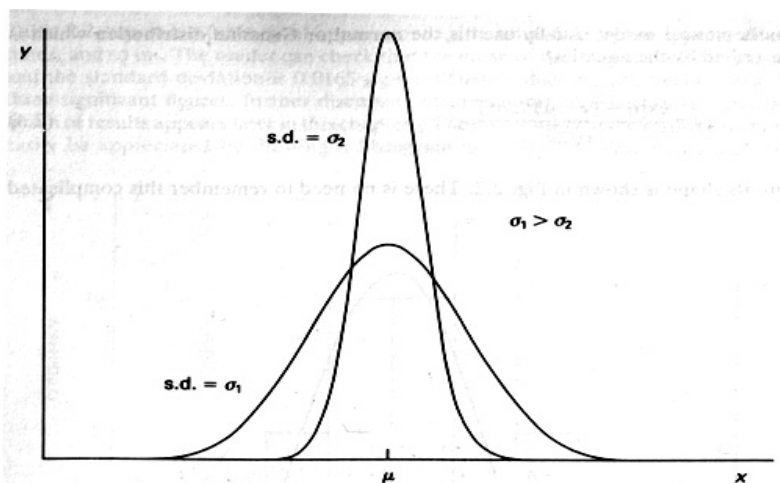
$$y = \frac{\exp\{-(x - \mu)^2 / 2\sigma^2\}}{\sigma\sqrt{2\pi}} \quad (2.4)$$

njena oblika pa je prikazana na sliki 2.2.

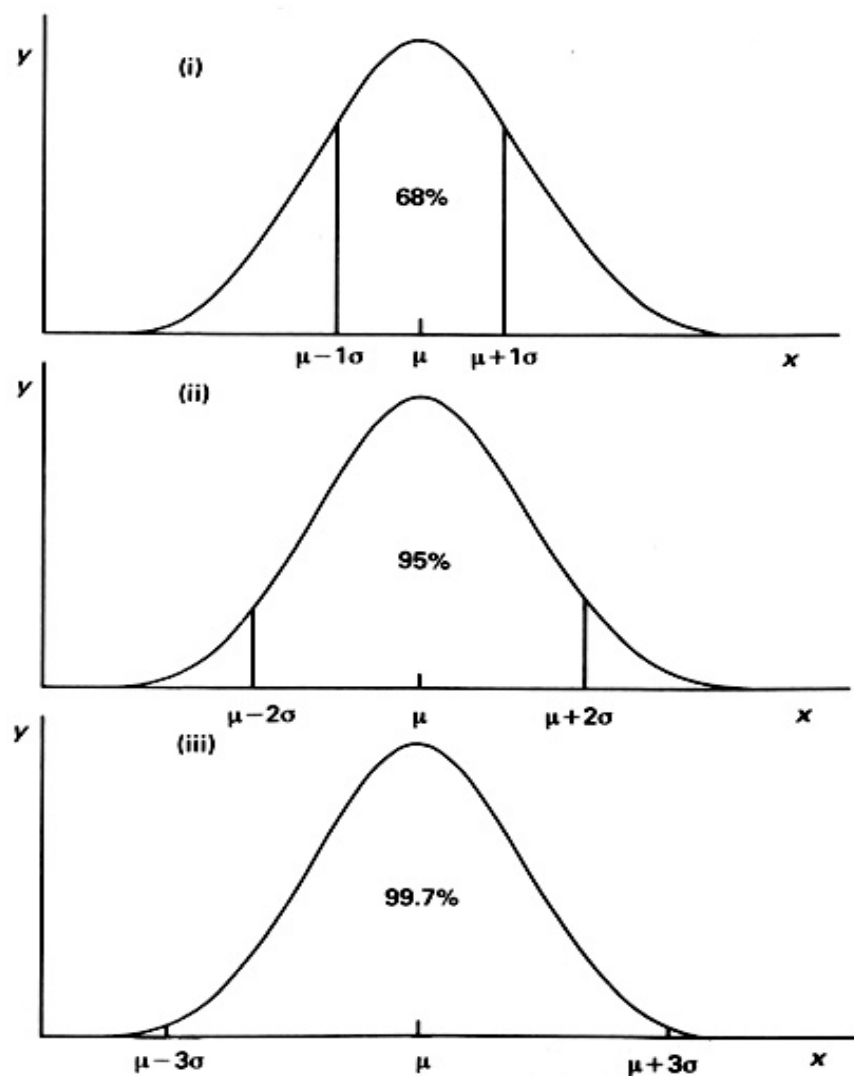


Slika 2.2. Običajna porazdelitev,  $y = \exp [ - (x - \mu)^2 / 2\sigma^2 ] / \sigma \sqrt{2\pi}$  . Povprečje je označeno z  $\mu$ .

Pomembne so nekatere splošne lastnosti. Krivulja je simetrična okoli  $\mu$  in večja kot je vrednost  $\sigma$ , večje je območje krivulje, kot kaže slika 2.3. Bolj podrobna analiza kaže, da kakršne koli so vrednosti  $\mu$  in  $\sigma$ , približno 68% populacije leži znotraj  $\pm 1\sigma$  povprečja, približno 95% vrednosti leži znotraj  $\pm 2\sigma$  povprečja in približno 99.7% vrednosti leži znotraj povprečja  $\pm 3\sigma$  (slika 2.4). To pomeni, da, če so koncentracije nitratnih ionov danih v tabeli 2.3 normalno porazdeljene, bi morale okoli 68% ležati v obsegu 0.483 - 0.517, okoli 95% v obsegu 0.467 - 0.533 in 99.7% v obsegu 0.450 - 0.550. Dejansko leži 33 od 50 rezultatov (66%) med 0.483 in 0.517, 49 (98%) med 0.467 in 0.533, ter vsi rezultati med 0.450 in 0.550, tako da je ujemanje s teorijo precej dobro.



Slika 2.3. Normalna porazdelitev z enakim povprečjem in različnimi vrednostmi standardnega odmika

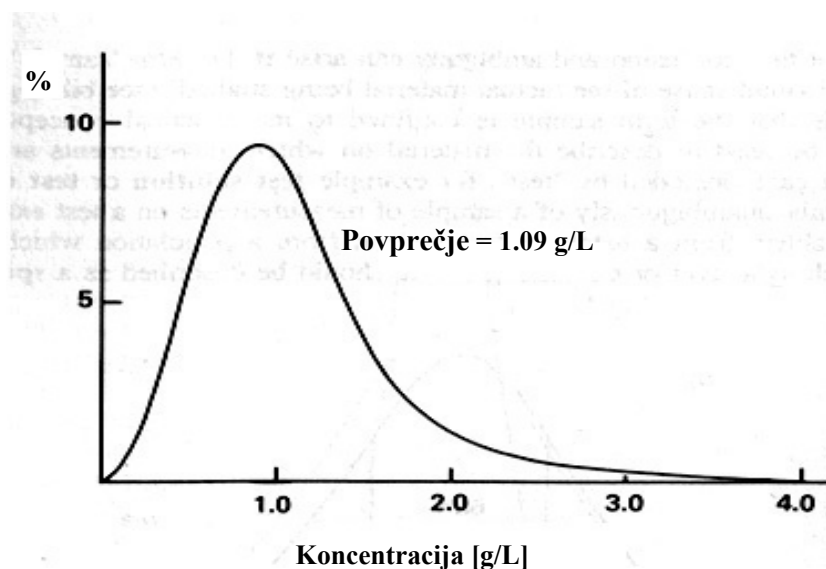


Slika 2.4. Lastnosti normalne porazdelitve: (i) približno 68% vrednosti leži znotraj  $\pm 1\sigma$  povprečja; (ii) približno 95% vrednosti leži znotraj  $\pm 2\sigma$  povprečja; približno 99.7% vrednosti leži znotraj  $\pm 3\sigma$  povprečja.

Čeprav ne moremo dokazati, da so ponovljene meritve ene same analizne količine vedno normalno porazdeljene, obstaja znatni dokaz, da je predpostavka vsaj približno resnična. Kasneje bomo videli, da vsak odklik populacije od normalnosti ni vedno pomemben v kontekstu najpogosteje uporabljenih statističnih testov.

Normalna porazdelitev ni uporabna le za ponavljajoče meritve na istem vzorcu. Pogosto ustreza tudi porazdelitvi rezultatov pridobljenih, ko merimo enako količino različnega

materiala iz podobnih virov. Če smo merili koncentracijo albumina v krvnih serumih vzetih od zdravih odraslih ljudi, bi bili rezultati porazdeljeni približno normalno. Pri drugi vrsti populacije, t.j. ena meritev na vsakem od številnih vzorcev, druge porazdelitve niso nenavadne. Še posebej pogosta je tako imenovana **log-normalna porazdelitev**. Pri tej porazdelitvi dajo *logaritmi* koncentracij (ali ostalih lastnosti), ko so grafično prikazani proti pogostosti, normalno krivuljo porazdelitve. Koncentracija protiteles v človeškem krvnem serumu je porazdeljena približno log-normalno (slika 2.5), tej porazdelitvi pa lahko sledijo tudi velikosti delcev kapljic, ki se oblikujejo z razpršilci, ki jih uporabljamo pri plamenski emisijski spektroskopiji.



Slika 2.5. Približna log – normalna porazdelitev: koncentracija seruma imunoglobina M protiteles v moških subjektih. Opazuj asimetričnost krivulje.

V tem poglavju je bila predstavljena in uporabljena beseda 'vzorec' v svojem statističnem pomenu kot skupina predmetov, izbranih iz populacije vseh takšnih predmetov, vzorec 50 merjenj koncentracije nitratnih ionov iz (neskončne) populacije vseh možnih takšnih merjenj, ali pa vzorec zdravih odraslih ljudi izbran iz celotne populacije, da bi merili koncentracijo seruma albumina za vsakega od njih. Če se izraz 'vzorec' uporablja tudi v svojem pogovornem smislu, kot 'dejanski material, ki se proučuje', se lahko pojavi zmeda in nejasnost. Priporočljivo je, da izraz vzorec ostane v svojem statističnem konceptu. Za opis materiala, na katerem se izvajajo meritve, se naj uporabljajo drugačni izrazi, pred katerimi v vsakem

---

primeru stoji 'testni', na primer **testna raztopina** ali **testni izvleček**. Potem lahko nedvoumno govorimo o vzorcu meritev na testnem izvlečku, ali o vzorcu tablet iz serije. Testna količina iz populacije, ki se s časom spreminja, kot je reka ali cirkulacija krvi, se naj imenuje **primerek**.

### 2.3 VZORČNA PORAZDELITEV POVPREČJA

Videli smo že, da nam povprečje meritev poda oceno resnične vrednosti,  $\mu$ , količine, ki jo poizkušamo izmeriti. Ker se posamezne meritve porazdelijo okoli resnične vrednosti z obsegom, ki je odvisen od natančnosti, je najbolj neverjetno, da bo povprečje *natanko* enako resnični vrednosti. Iz tega razloga je bolj uporabno podati vrsto vrednosti znotraj katerih smo skoraj prepričani, da leži resnična vrednost. Širina te vrste je odvisna od dveh faktorjev. Prvi je natančnost posamezne meritve, ki pa je spet odvisna od spreminjanja populacije. Drugi je število meritev na vzorcu. Dejstvo, da ponavljamo meritve kaže, da imamo več zaupanja v povprečje številnih vrednosti kot le v eno samo. Večina ljudi je prepričana, da več meritev kot opravimo, bolj zanesljiva bo naša ocena  $\mu$ , resnične vrednosti. Za izsleditev te misli se vrnimo k določitvi nitratnih ionov, opisane v delu 2.2. V praksi bi bilo precej nenavadno ponoviti 50 meritev v takšnem primeru. Bolj primerno število bi bilo 5 in vidimo lahko, kako se povprečje vzorcev te velikosti razširja okoli  $\mu$ , z obravnavanjem rezultatov v tabeli 2.2 kot desetih vzorcev, ki vsak vsebuje 5 rezultatov. Če vzamemo vsak stolpec kot en vzorec, so povprečja 0.506, 0.504, 0.502, 0.496, 0.502, 0.492, 0.506, 0.504, 0.500, 0.486. Naenkrat je očitno, da so ta povprečja bolj tesno nakopičene kot originalne meritve. Tako kot so bile originalne meritve vzorci iz neskončne populacije vseh možnih meritev, so ta povprečja vzorec iz možnih povprečij vzorcev 5 meritev iz celotne populacije. Porazdelitev teh vzorcev povprečij se imenuje **vzorčna porazdelitev povprečja**. Njeno povprečje je enako kot povprečje originalne populacije. Njen standardni odmik (standardna deviacija) se imenuje **standardna napaka povprečja (s.e.m.)**. Obstaja natančen matematični odnos med njo in standardnim odkikom,  $\sigma$ , porazdelitve posameznih meritev, ki je odvisen od načina, na katerega so porazdeljeni. Če je  $n$  velikost vzorca je ta odnos:

$$\text{s.e.m.} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \quad (2.5)$$

---

Intuitivno pričakujemo, da večji kot je  $n$ , manjši je obseg vzorca povprečja okoli  $\mu$ . Univerzalno uporabljani izraz, standardna *napaka* povprečja, lahko zavede bralca k razmišljanju da  $\sigma/\sqrt{n}$  da razliko med  $\bar{x}$  in  $\mu$ . Vendar temu ni tako:  $\sigma/\sqrt{n}$  da meritev negotovosti pri ocenitvi  $\mu$  iz  $\bar{x}$ .

Naslednja lastnost vzorčne porazdelitev povprečja je, da *tudi če je originalna populacija normalna*, vzorčna porazdelitev povprečja teži k normalni porazdelitvi, ko se  $n$  povečuje. Ta rezultat je znan kot **trditev centralne limite**. Ta trditev je najbolj pomembna, ker se mnogo statističnih testov izvaja na povprečju in se predpostavlja, da je normalno razporejena. Ker v praksi lahko predpostavljamo, da so porazdelitve ponovljenih meritev vsaj približno normalno porazdeljene, je smiselno predpostavljati, da so povprečja precej majhnih vzorcev (recimo  $>5$ ) normalno porazdeljena.

## 2.4 MEJA ZAUPANJA POVPREČJA

Sedaj, ko poznamo obliko vzorčne porazdelitve povprečja, se lahko vrnemo k problemu uporabe vzorca za določitev obsega, v katerem lahko utemeljeno pričakujemo, da leži resnična vrednost. (Zapomnimo si, da s tem predvidevamo, da ne bo sistematskih napak). Takšen obseg je znan kot **interval zaupanja**, skrajne vrednosti obsega pa so imenovane **meja zaupanja**. Izraz 'zaupanje' nakazuje, da lahko vrednotimo z določeno stopnjo zaupanja, t.j. določeno verjetnostjo, da interval zaupanja *zajema* resnično vrednost. Velikost intervala zaupanja bo očitno odvisna od tega, kako prepričani hočemo biti, da zajema resnično vrednost; bolj kot smo prepričani, *večji* interval bomo zajeli.

Slika 2.6 kaže vzorčno porazdelitev povprečja vzorcev velikosti  $n$ . Od sedaj naprej predvidevajmo, da je ta porazdelitev normalna, potem bo 95% povprečja vzorca ležalo v obsegu danem z:

$$\mu - 1.96 \left( \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \right) < \bar{x} < \mu + 1.96 \left( \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \right) \quad (2.6)$$

(Pri tej enačbi je uporabljena natančna vrednost 1.96, ne pa približna vrednost 2, ki se pogosto uporablja).

V praksi pa imamo pogosto en vzorec z znanim povprečjem in potrebujemo obseg za  $\mu$ , resnično vrednost. Enačba (2.6) je lahko preurejena, da nam dá:

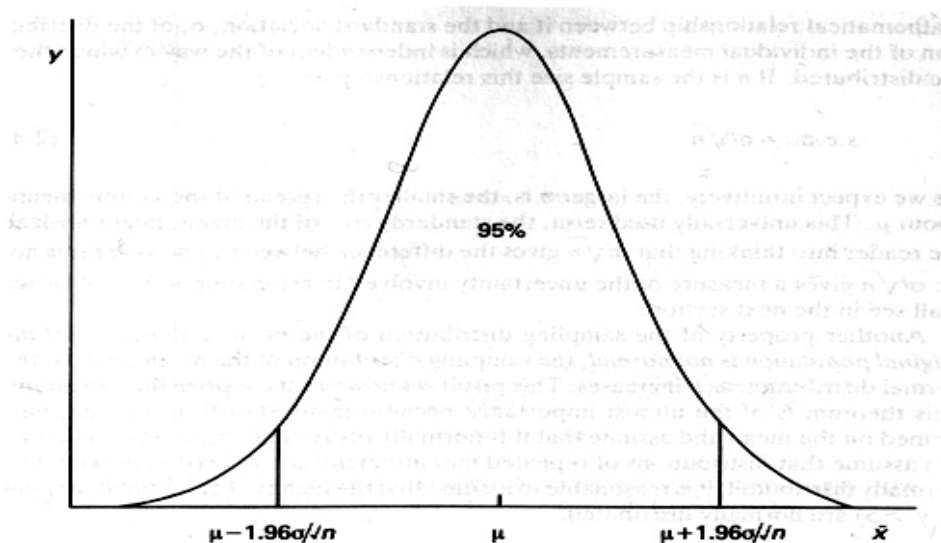
$$\bar{x} - 1.96 \left( \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \right) < \mu < \bar{x} + 1.96 \left( \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \right) \quad (2.7)$$

Enačba (2.7) nam da **95% interval zaupanja** povprečja. Podobno je interval zaupanja podan z:

$$\bar{x} - 2.97 \left( \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \right) < \mu < \bar{x} + 2.97 \left( \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \right) \quad (2.8)$$

Še en interval, ki se pogosto uporablja je interval 99% zaupanja, ki je podan z:

$$\bar{x} - 2.58 \left( \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \right) < \mu < \bar{x} + 2.58 \left( \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \right) \quad (2.9)$$



Slika 2.6. Vzorčna porazdelitev povprečja, ki prikazuje obseg v katerem leži 95% vzorčnih povprečij.

Enačba (2.7) se lahko uporabi za računanje 95% meje zaupanja za koncentracije nitratnih ionov. Podana imamo  $\bar{x} = 0.500$  in  $n = 50$ . Edina količina v enačbi, ki je ne poznamo je  $\sigma$ . Za večje vzorce, kot je tale, da  $s$  dovolj točno oceno  $\sigma$  za zamenjavo. Tako je 95% interval za koncentracijo nitratnih ionov:

$$0.500 - 1.96 \times \frac{0.0165}{\sqrt{50}} < \mu < 0.500 + 1.96 \times \frac{0.0165}{\sqrt{50}}$$

---

meja zaupanja pa je podana kot:

$$\mu = 0.500 \pm 0.0046 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Ko se velikost vzorca manjša, se povečuje nezanesljivost, ki jo povzroča uporaba za ocenitev  $\sigma$ . Za možnost uporabe te enačbe za računanje je spremenjena meja zaupanja:

$$\mu = \bar{x} \pm t \left( \frac{s}{\sqrt{n}} \right) \quad (2.10)$$

Primerna vrednost  $t$  je odvisna od  $(n-1)$ , ki je znano kot število **prostostnih stopenj** (ponavadi podano s simbolom  $\nu$ ) in stopnje potrebnega zaupanja. [Izraz 'prostostne stopnje' se nanaša na število neodvisnih odmikov  $(x_i - \bar{x})$ , ki se uporabljajo za računanje  $s$ . V tem primeru je število  $(n-1)$ , ker, ko so  $(n-1)$  odmiki znani, lahko sklepamo z uporabo očitnega rezultata  $\sum_i (x_i - \bar{x}) = 0$ ]. Vrednosti  $t$  so dane v tabeli 2.4. Iz te tabele lahko vidimo, da so za velikosti vzorcev večje kot 50 vrednosti  $t$  zelo blizu vrednostim 1.96 in 2.58, ki so uporabljene v enačbah (2.7) oz. (2.9). To potrjuje veljavnost predvidevanj, ki smo jih uporabili pri zgornjem računanju meje zaupanja za koncentracijo nitratov. Uporabo tabele lahko prikažemo s pomočjo primera.

*Primer:* Vsebnost natrijevega iona v vzorcu urina je bila določena z uporabo iono selektivne elektrode. Dobili smo naslednje vrednosti: 102, 97, 99, 98, 101, 106 mM. Kakšne je 95% in 99% meja zaupanja za koncentracijo natrijevih ionov?

Povprečje in standardni odmik teh vrednosti sta 100.5mM oz. 3.27 mM. Imamo 6 meritev in tako 5 prostostnih stopenj. V tabeli 2.4 je vrednost  $t$  za računanje 95% meje zaupanja 2.57 in iz enačbe (2.10) je 95% meja zaupanja podana z:

$$\mu = 100.5 \pm 2.57 \times \frac{3.27}{\sqrt{6}} = 100.5 \pm 3.4 \text{ mM}$$

Podobno je podana 99% meja zaupanja:

$$\mu = 100.5 \pm 4.03 \times \frac{3.27}{\sqrt{6}} = 100.5 \pm 5.4 \text{ mM}$$



**Tabela 2.4** Vrednosti  $t$  za intervale zaupanja

Prostostne stopnje	Vrednosti $t$ za interval zaupanja	
	95 %	99 %
1	12.71	63.66
2	4.30	9.92
3	3.18	5.84
4	2.78	4.60
5	2.57	4.03
10	2.23	3.17
20	2.09	2.85
30	2.04	2.75
50	2.01	2.68
100	1.98	2.63

## 2.5 PREDSTAVITEV REZULTATOV

Kot smo že poudarili, nima noben kvantitativni rezultat eksperimentalne vrednosti, razen če ga spremlja ocenitev napak, ki so prisotne pri meritvah. Splošna praksa v literaturi analize kemije je navajati povprečje kot oceno količine, ki je merjena in standardni odmik kot oceno natančnosti. Manj pogosto je standardna napaka povprečja včasih navedena namesto standardnega odmika, ali pa je rezultat podan v obliki 95% meje zaupanja povprečja. Ker ne obstaja noben univerzalni dogovor, je očitno bistveno, da navedemo uporabljeno obliko in, če je vrednost  $n$  podana, tri oblike se lahko med seboj zlahka preoblikujejo z uporabo enačb (2.5) in (2.10).

Podobni vidik predstavitve rezultatov je zaokrožanje odgovora. Pomembno načelo pri tem je, da *število signifikantnih števil kaže natančnost eksperimenta*. Nesmiselno bi bilo dati rezultat titrimetrične analize kot  $0.107846 M$  – noben analitik ne bi mogel doseči dane natančnosti  $0.000001$  v ca. 0.1, t.j. 0.001%. V praksi je običajno, da navedemo kot **signifikantne** vse cifre, ki so zanesljive in še prvo nezanesljivo. Povprečje vrednosti 10.09, 10.11, 10.09, 10.10 in 10.12 je 10.102, njihov standardni odmik pa je 0.01304. Pri drugem decimalnem mestu je jasno nezanesljivost; vsi rezultati so 10.1 do enega decimalnega mesta, ne ujemajo pa se pri drugem decimalnem mestu. Z uporabo predlagane metode bi bil rezultat naveden kot:

---

$$\bar{x} \pm s = 10.10 \pm 0.01 \quad (n = 5)$$

Če bi se zdelo, da bi bilo zaokroževanje standardnega odmika nesprejemljivo, potem bi rezultat lahko podali kot:

$$\bar{x} \pm s = 10.10_2 \pm 0.01_3 \quad (n = 5)$$

pri čem uporaba spodaj napisanega (podpisanega) nakazuje, da je število podano le, da bi se izognili izgubi informacij. Sami se lahko odločimo, če je uporabno ali ne.

Podobno tudi takrat, ko računamo mejo zaupanja [glej enačbo (2.10)], ni smiselno dajati vrednosti  $ts/\sqrt{n}$  na več kot dve bistveni številki. Vrednost  $\bar{x}$  mora takrat biti podana odgovarjajočemu številu decimalnih mest.

Število signifikantnih števil, ki so navedene, se včasih uporablja namesto specifične ocene natančnosti rezultata.  $0.1046 M$  pomeni, da so prva tri decimalna mesta zanesljiva, četrto pa je dvomljivo. Ker bi nezanesljivost zadnje številke lahko bila karkoli od 0.00005 do 0.0005, daje ta metoda slabo oceno natančnosti in ni priporočljiva. Včasih je nezanesljivost zadnje številke poudarjena z uporabo formatov  $0.104(6) M$  ali  $0.104_6 M$ , vendar je priporočljivo, da damo specifično oceno natančnosti, kot je standardni odmik.

Problem, ki se pojavi je, ali naj 5 zaokrožimo navzgor ali navzdol. Če je 9.65 zaokroženo na eno decimalno mesto, naj bo 9.6 ali 9.7? Jasno je, da bo rezultat pristranski, če bo 5 vedno zaokrožena; temu se lahko izognemo z zaokroževanjem 5 v najbližje sodo število, kar da v tem primeru 9.6. Tako se 4.75 zaokroži v 4.8.

Ko moramo za izračun končnega rezultata uporabiti veliko merjenih količin, teh količin ne smemo preveč zaokrožati ali pa se bo pojavila nepotrebna izguba natančnosti. Dobro pravilo je, da obdržimo eno cifro za zadnjo pomembno številko in pustimo nadaljnje zaokroževanje dokler ne dosežemo končnega rezultata. Enaki nasvet velja, ko uporabljamo povprečje in standardni odmik za uporabo statističnega testa kot so  $F$ - in  $t$ -testi; pri računanju uporabljamo nezaokrožene vrednosti  $\bar{x}$  in  $s$ .

## 2.6 OSTALE UPORABE MEJE ZAUPANJA

Intervali zaupanja se lahko uporabljajo kot test za sistematske napake, kot je prikazano v sledečem primeru.

*Primer.* Lestvica absorbance spektrometra se testira pri določeni valovni dolžini s standardno raztopino, ki ima dano absorbanco 0.470. Deset meritev absorbance s spektrometrom dajo  $\bar{x} = 0.461$ , in  $s = 0.003$ . Najdimo 95% interval zaupanja za povprečje absorbance merjene s spektrometrom in se nato odločimo, če je prisotna sistematska napaka.

95% meja zaupanja merjena s spektrometrom [enačba (2.10)] je:

$$\mu = \bar{x} \pm t \left( \frac{s}{\sqrt{n}} \right) = 0.461 \pm 2.26 \times \frac{0.003}{\sqrt{10}} = 0.461 \pm 0.002$$

(Vrednost  $t$  je bila dobljena iz tabele A.1 v dodatku, ki je bolj popolna različica tabele 2.4).

Ker intervali zaupanja ne zajemajo znane absorbance 0.470, je verjetno, da se je pojavila sistematska napaka.

Mejo zaupanja lahko uporabljamo tudi v primerih, ko se meritve opravljajo na vsakem od številnih vzorcev. Recimo, da potrebujemo povprečno težo velikega števila tablet. Preveč časa bi nam vzelo, če bi tehtali vsako tableto posebej. Tudi, če se uporablja destruktivna metoda analize, kot je atomska absorpcijska spektroskopija, za analizo velike količine, da bi dobili povprečno vrednost, je nemogoče pregledati vsako tableto. V vsakem primeru bi iz množice lahko vzeli vzorec (ki v takšnih okoliščinah oblikuje populacijo), iz povprečja in standardnega odmika vzorca pa bi lahko našli interval zaupanja za povprečno vrednost merjene količine.

## 2.7 ŠIRJENJE SLUČAJNIH NAPAK

Pri eksperimentalnem delu se količina, ki jo bomo določali, pogosto izračuna iz kombinacije opaznih količin. Videli smo že, da celo relativno enostavne operacije, kot je titrimetrična

---

analiza, zajemajo več stopenj, pri katerih lahko pride do napak. Končni izračun lahko zajema vsoto, razliko, produkt ali količnik dveh ali več količin ali pojav katerekoli količine.

Zelo je pomembno, da si zapomnimo, da so postopki uporabljeni za kombiniranje slučajnih in sistematskih napak popolnoma različni. To je zaradi tega, ker se slučajne napake do neke mere izključujejo same, medtem ko se vsaka sistematska napaka pojavi v določenem in znanem smislu. Recimo, da je končni rezultat eksperimenta,  $x$ , podan z  $x = a + b$ . Če imata  $a$  in  $b$  slučajno napako  $\pm 1$  je jasno, da je sistematska napaka pri  $x \pm 2$ . Če pa imata  $a$  in  $b$  oba slučajno napako  $\pm 1$ , slučajna napaka pri  $x$  ni  $\pm 2$ ; to je zaradi tega, ker se bodo pojavile situacije, ko bo slučajna napaka pri  $a$  pozitivna, pri  $b$  pa negativna (ali obratno).

Ta del se ukvarja le s širjenjem slučajnih napak. Če je znana natančnost vsakega opazovanja, potem lahko uporabimo preprosta matematična pravila za oceno natančnosti končnega rezultata.

Pravila lahko povzamemo:

(i) *Linearne kombinacije*

V tem primeru je končna vrednost,  $y$ , izračunana iz linearne kombinacije merjenih količin  $a$ ,  $b$ ,  $c$ , itd. z:

$$y = k + k_a a + k_b b + k_c c + \dots \quad (2.11)$$

pri čem so  $k$ ,  $k_a$ ,  $k_b$ ,  $k_c$ , itd. konstante. Varianca (definirana kot kvadrat standardnega odmika) ima pomembno lastnost, da je sipanje vsote ali razlike neodvisnih količin enako vsoti njihovih razhajanj. Pokažemo lahko, da če so  $\sigma_a$ ,  $\sigma_b$ ,  $\sigma_c$ , itd. standardni odmiki  $a$ ,  $b$ ,  $c$ , itd, je standardni odmik  $y$ ,  $\sigma_y$ , podan z:

$$\sigma_y = \sqrt{(k_a \sigma_a)^2 + (k_b \sigma_b)^2 + (k_c \sigma_c)^2 + \dots} \quad (2.12)$$

*Primer.* Pri titraciji je začetno odčitavanje birete 3.51 mL, končno odčitavanje pa je 15.67 mL, oboje merjeno s standardnim odmikom 0.02 mL. Kakšen je volumen uporabljenega titranta in kakšen je standardni odmik?

Uporabljen volumen = 15.67 – 3.51 = 12.16 mL

$$\text{Standardni odmik} = \sqrt{(0.02)^2 + (0.02)^2} = 0.028 \text{ mL}$$

Ta primer prikazuje pomembno točko, da je standardni odmik končnega rezultata večji kot standardni odmik posameznega odčitavanja birete, čeprav je uporabljeni volumen izračunan iz razlike, ampak je manj kot vsota standardnega odmika.

(ii) *Množilni izrazi*

Če je  $y$  izračunan iz izraza vrste:

$$y = \frac{kab}{cd} \quad (2.13)$$

(pri čem so  $a$ ,  $b$ ,  $c$  in  $d$  neodvisno merjene količine,  $k$  pa je konstanta), potem je odnos med kvadrati in relativnimi standardnimi odmiki:

$$\frac{\sigma_y}{y} = \sqrt{\left(\frac{\sigma_a}{a}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_b}{b}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_c}{c}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_d}{d}\right)^2} \quad (2.14)$$

*Primer:* kvantni donos fluorescence,  $\Phi$ , je izračunan iz izraza:

$$\Phi = I_f / kclI_0 \varepsilon$$

Vključene količine so definirane spodaj, z oceno njihovega relativnega standardnega odmika v oklepajih:

$I_0$  = slučajna jakost svetlobe (0.5 %)

$I_f$  = jakost fluorescence (2 %)

$\varepsilon$  = molarni absorpcijski koeficient (1 %)

$c$  = koncentracija (0.2 %)

$l$  = dolžina poti (0.2 %)

$k$  = instrumentalna konstanta

V enačbi (2.12) je podan relativni standardni odmik  $\Phi$ :

$$\begin{aligned} \text{RSD} &= \sqrt{(2^2 + 0.2^2 + 0.2^2 + 0.5^2 + 1^2)} = \sqrt{(4 + 0.04 + 0.04 + 0.25 + 1)} \\ &= \sqrt{5.33} = 2.3 \% \end{aligned}$$

Vidimo lahko, da relativni standardni odmik pri končnem rezultatu ni veliko večji, kot najvišji relativni standardni odmik, ki je uporabljen za računanje (t.j. 2% za  $I_f$ ). To je v veliki meri posledica kvadriranja relativnega standardnega odmika in prikazuje pomembno splošno točko: kakršenkoli trud za izboljšanje natančnosti eksperimenta mora biti usmerjen proti izboljšanju natančnosti najmanj natančnih vrednosti. Kot posledica tega ni smiselno zapravljati truda za povečevanje natančnosti najbolj natančnih vrednosti. To ne pomeni, da majhne napake niso pomembne: majhne napake na katerikoli stopnji eksperimenta, tako kot je titrimetrična analiza iz 1. poglavja, bodo povzročile znatno napako pri končnem rezultatu.

Pomembno si je zapomniti, da če je povečana moč količine, npr.  $b^3$ , potem napake ne računamo kot množenje, t.j.  $b \times b \times b$ , ker vpletene količine med seboj niso neodvisne. Če je odnos:

$$y = b^n \quad (2.15)$$

potem sta standardna odmika  $y$  in  $b$  v odnosu:

$$\frac{\sigma_y}{y} = \left| \frac{n\sigma_b}{b} \right| \quad (2.16)$$

(Znak modula  $| |$  pomeni, da je obseg priložene količine vzeta brez upoštevanja znaka, npr.  $|-2| = 2$ ).

### (iii) Ostale funkcije

Če je  $y$  splošna funkcija  $x$ :

$$y = f(x) \quad (2.17)$$

potem sta standardna odmika  $x$  in  $y$  v odnosu:

$$\sigma_y = \left| \sigma_x \frac{dy}{dx} \right| \quad (2.18)$$

*Primer:* Absorbanca,  $A$ , raztopine je dana z:

$$A = -\log(T) \quad (2.19)$$

kjer je  $T$  propustnost. Če je merjena vrednost  $T$  0.501, s standardnim odkikom 0.001, izračunajmo  $A$  in njegov standardni odmik.

Imamo:

$$A = -\log 0.501 = 0.300$$

Tudi:

$$dA/dT = -(\log e)/T = -0.434/T$$

iz enačbe (2.18):

$$\sigma_A = \left| \sigma_T \left( \frac{-\log e}{T} \right) \right| = \left| 0.001 \times \left( \frac{-0.434}{0.501} \right) \right| = 0.00087$$

Zanimivo je, da lahko v tej široko uporabni eksperimentalni metodi tudi najdemo pogoje, za katere je relativni standardni odmik minimum. Relativni standardni odmik  $A$  je podan z:

$$\text{RSD za } A = 100 \frac{\sigma_A}{A} = \frac{100\sigma_T \log e}{T \log T} \quad (2.20)$$

Diferenciacija tega izraza glede na  $T$  kaže, da je koeficient variacije  $A$  minimalen, ko je  $T = 1/e = 0.368$ .

Primer. Nernstova enačba, ki se uporablja pri potenciometrični analizi, je

$$E = E^\circ + \frac{RT}{nF} \ln c$$

kjer je  $E$  merjeni potencial elektrode,  $E^\circ$  je standardni potencial elektrode za ion, ki ga moramo določiti,  $T$  je absolutna temperatura,  $n$  je število zajetih elektronov v polovici **kivete**,  $c$  je ionska koncentracija,  $R$  je plinska konstanta in  $F$  je Faradayeva konstanta. Dobimo izraz za relativni standardni odmik koncentracije, če predpostavljamo, da je  $T = 298$  K in je brez napak. Izračunajmo vrednost relativnega standardnega odmika, če je  $n = 1$  in standardni odmik  $E = 0.001$  V.

Preoblikovanje Nernstove enačbe in zamenjava numeričnih vrednosti za  $T$ ,  $R$  in  $F$ , nam da:

$$c = \exp\{40n(E - E^\circ)\}$$

Diferenciranje z upoštevanjem  $E$ :

$$\frac{dc}{dE} = 40n \exp\{40n(E - E^\circ)\}$$

iz enačbe (2.18)

$$\sigma_c = 40n\sigma_E \exp\{40n(E - E^\circ)\} = 40nc\sigma_E$$

Tako je relativni standardni odklik  $c$

$$100 \sigma_c/c = 100 \times 40n\sigma_E \%$$

Če je  $n = 1$  in je  $\sigma_E$  0.001V, imamo

$$\text{RSD za } c = 100 \times 0.001 \times 40 = 4\%$$

V nasprotju s prejšnjim primerom je tukaj relativni standardni odklik konstanten.

## 2.8 ŠIRJENJE SISTEMATSKIH NAPAK

Pravila za kombiniranje sistematskih napak so lahko razdeljena v tri skupine:

(i) *Linearne kombinacije*

Če računamo  $y$  iz merjenih količin  $z$  uporabo enačbe (2.11) in so sistematske napake pri  $a$ ,  $b$ ,  $c$ , itd.  $\Delta a$ ,  $\Delta b$ ,  $\Delta c$ , itd., potem se sistematska napaka pri  $y$ ,  $\Delta y$ , računa iz:

$$\Delta y = k_a\Delta a + k_b\Delta b + k_c\Delta c + \dots \quad (2.21)$$

Zapomnimo si, da so sistematske napake ali pozitivne ali negativne in da predznak *mora* biti vključen pri računanju  $\Delta y$ .

Skupna sistematska napaka je včasih lahko nič. Predpostavljajmo, da se za tehtanje količin za standardno raztopino uporablja tehtnica s sistematsko napako  $-0.01\text{g}$ . Ker teže uporabljenih raztopin dobimo iz razlike med dvema tehtanjema, sistematske napake odpadejo. Natančno preišljeni postopki, kot je ta, lahko pogosto zmanjšajo sistematske napake, kot je opisano v 1. poglavju. Tukaj pa je potrebno izpostaviti, da se to nanaša le na elektronske tehtnice s posameznimi notranje zapisanimi težami; ko uporabljamo 'staromodno' tehtnico s serijo posameznih uteži, moramo teže kalibrirati in narediti ustrezne korekcije (in celo takrat se bo pojavila slučajna kalibracijska napaka!).



---

(ii) *Množilni izrazi*

Če računamo  $y$  iz merjenih količin  $z$  uporabo enačbe (2.13) potem uporabimo *relativne* sistematske napake:

$$(\Delta y/y) = (\Delta a/a) + (\Delta b/b) + (\Delta c/c) + (\Delta d/d) \quad (2.22)$$

Ko količini povečamo moč, potem uporabimo enačbo (2.16), kjer so odstranjeni znaki in je standardni odmik zamenjan s sistematskimi napakami.

(iii) *Ostale funkcije*

Uporabljena enačba je identična enačbi (2.18), ampak z odstranjenimi znaki, standardni odmik pa je zamenjan s sistematskimi napakami.

### **3. NAPAKE PRI INSTRUMENTALNI ANALIZI; REGRESIJA IN KORELACIJA**

#### **3.1 INSTRUMENTALNA ANALIZA**

---

Klasična ali 'mokra kemija' analizira tehnike, kot so titrimetrija ali gravimetrija, ki se uporabljajo v veliko laboratorijih in se jih še vedno veliko učijo pri urah analizne kemije. Predstavljajo odlično uvajanje manipulativnih in ostalih spretnosti, ki so potrebne pri analiznem delu; idealne so za analize, kjer je potrebna velika natančnost, še posebej, ko je vpleteno majhno število vzorcev, potrebne pa so tudi za analizo standardnih materialov. Nobenega dvoma ni, da se večina analiz izvaja z instrumentalnimi metodami. Tehnike, pri katerih je potrebna absorbanca in emisijska spektrometrija na različnih valovnih dolžinah, mnogo različnih elektro kemičnih metod, masna spektrometrija, plinska in tekočinska kromatografija, termične in radiokemijske metode, zajemajo verjetno 90%, ali celo več, vsega trenutnega analiznega dela. Za to obstaja več razlogov.

- (1) Z instrumentalnimi metodami lahko izvajamo analize, ki so s klasičnimi težko izvedljive ali celo nemogoče. Medtem ko lahko klasične metode le redkokdaj analizirajo materiale v mikrogramskih koncentracijah, je veliko instrumentalnih metod osupljivo občutljivejših. Metode luminescence so analizirale organske molekule pri koncentraciji  $10^{-18}$  M. Pri 'mokri metodi' je v normalnih okoliščinah mogoče odkriti istočasno le en analit, spektrometrija z uporabo plazme (ICP) pa lahko določi deset ali več elementov istočasno (in pri zelo nizkih koncentracijah), medtem ko lahko metode, ki kombinirajo visoko ločljivo tekočinsko kromatografijo s spektroskopijo, identificirajo in določijo veliko sestavin kompleksnih organskih mešaníc le v nekaj minutah. Koncentracijski obseg določene klasične analizne metode je ponavadi omejen s praktičnimi in teoretičnimi premisleki. Tako lahko EDTA titracije uspešno opravljamo s koncentracijami reaktantov, ki so  $10^{-4}$  M, zgornjo mejo ( $\sim 0.3$  M) pa predstavlja topnost EDTA v vodi. Uporabno območje koncentracije je običajno 2-3 velikostne rede pri klasičnih metodah. Nasprotno pa so nekatere instrumentalne metode sposobne določiti koncentracijo analita preko območja šest ali več velikostnih redov; ta lastnost ima pomemben vpliv na statistični pregled rezultatov, kot bomo videli v naslednjem delu.
- (2) Za veliko število vzorcev je instrumentalna analiza na splošno hitrejša in pogosto cenejša kot ročne analize, ki zahtevajo več dela. Pri kliničnih analizah je pogosta zahteva, da se enake analize opravijo na stotih vzorcih krvi ali krvnega seruma/plazme vsak dan. Kljub visokim začetnim stroškom opreme lahko takšno delo opravljamo z uporabo popolnoma avtomatskih sistemov. Avtomatizacija je postala tako pomemben

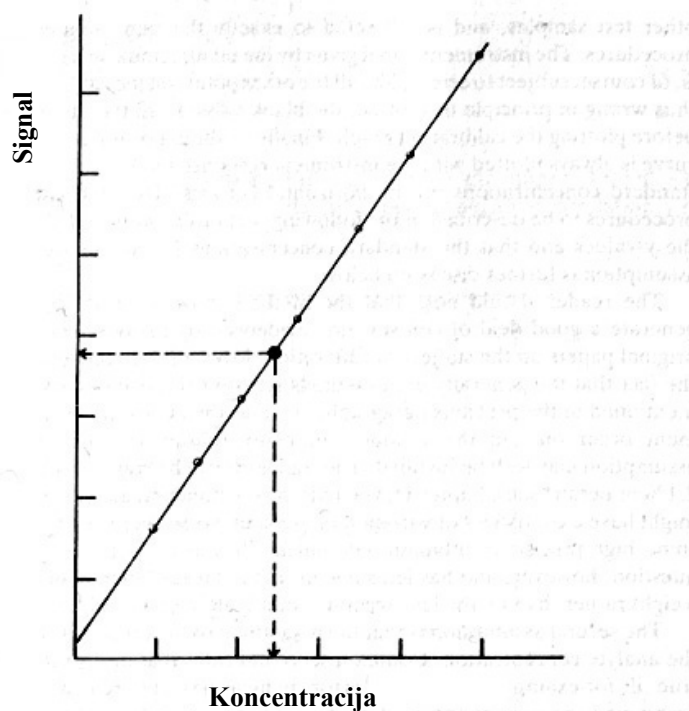
---

faktor analize kemije, da enostavnost, s katero je lahko določena tehnika avtomatizirana, pogosto določa ali naj bo sploh uporabljena. Tipična avtomatična metoda je lahko sposobna obdelovati vzorce s hitrostjo 100 na uro ali več: aparatura bo vzela določen volumen vzorca, ga primerno razredčila, opravila eno ali več reakcij, ter določila in zapisala koncentracijo analita ali derivata, ki je pri reakciji nastal. Posebni problemi ocenitve napak se bodo pojavili pri avtomatski analizi; sistematske napake moramo prepoznati in popravljati kakor hitro je mogoče.

- (3) Moderni analizni instrumenti so že povezani z računalniki. Taki sistemi lahko omogočijo precej veliko stopnjo kontrole instrumentov in upravljanja s podatki. Računalnik lahko nadzoruje časovno usklajevanje vzorčenja ali injekcijski aparat z aktiviranjem električnih stikal. Ko dobimo analizne rezultate, lahko računalnik obdela podatke, tako da izvaja operacije, kot so izvajanje derivativnih spektrov ali Fourierjeve transformacije. Lahko tudi statistično ovrednoti rezultate, ter primerja analizne rezultate s podatki shranjenimi v spominu, da primerja spektralne in ostale podatke. Vsi ti pripomočki so na voljo pri poceni računalnikih, ki delujejo s sprejemljivo hitrostjo. Nedvomno bodo z računalniki kmalu opremljeni skoraj vsi instrumenti, kar bo še povečalo njihovo sposobnost in učinkovitost.

### 3.2 KALIBRACIJSKI GRAFI PRI INSTRUMENTALNI ANALIZI

Sposobnost, da tehnike instrumentalne analize določajo široko vrsto koncentracij analitov pomeni, da se rezultati računajo in slučajne napake vrednotijo na določen način, ki se razlikuje od tistega, ki se uporablja, ko posamezno meritev velikokrat ponavljamo. Običajni postopek je sledeč. Analitik vzame serijo vzorcev (ponavadi najmanj tri ali štiri, če je možno še nekaj več) pri katerih je koncentracija analita *znana*. Kalibracijski standardi se v analiznem instrumentu merijo pod enakimi pogoji, kot se kasneje uporabijo za test (t.j. 'neznanih') vzorcev. Ko je kalibracijski graf narejen, lahko z interpolacijo dobimo koncentracijo analita pri kateremkoli vzorcu, kot je prikazano na sliki 3.1. Ta splošni postopek sproži veliko pomembnih statističnih vprašanj.



Slika 3.1. Proces kalibracije pri instrumentalni analizi; ○ kalibracijske točke; ● testni vzorec.

- (1) Ali je kalibracijski graf linearen? Če je krivulja, kakšna je njena oblika?
- (2) Če imamo v mislih, da je vsaka točka kalibracijskega grafa podvržena napaki, kaj je najboljša premica (ali krivulja) skozi te točke?
- (3) Denimo, da je grafični prikaz kalibracije res linearen, kaj so predvidene napake in meja zaupanja za naklon in odsek premice?
- (4) Če uporabimo grafični prikaz kalibracije za analizo testnega vzorca, kakšne so napake in meja zaupanja za določeno koncentracijo?
- (5) Kaj je detekcijska meja metode? To pomeni, kaj je najnižja koncentracija analita, ki jo lahko določimo z detekcijsko mejo?

Preden se podrobno lotimo teh vprašanj, moramo razmisliti številne poglede grafičnega prikaza kalibracijskih grafov. Ponavadi je bistveno, da kalibracijski standardi pokrivajo celotno območje koncentracij potrebnih pri nadaljnjih analizah. S pomembno izjemo 'metode standardnega dodatka', ki jo posebej obravnavamo kasneje, se koncentracije testnih vzorcev navadno določajo z interpolacijo in *ne* z ekstrapolacijo. Bistvenega pomena je vključiti vrednost 'slepega' vzorca v kalibracijsko krivuljo. Slep vzorec ne vsebuje namerno dodanega

---

analita, vsebuje pa enako raztopino, reagente, itd., kot ostali testni vzorci, ter je podvržen popolnoma enakemu zaporedju analiznih postopkov. Instrumentalni signal, ki ga odda slepi vzorec, pogosto ne bo nič. Seveda je predmet napak, kot ostale točke kalibracijskega grafičnega prikaza in je v principu narobe odšteti vrednost slepega vzorca od ostalih standardnih vrednosti pred načrtovanjem kalibracijskega grafa. Potrebno je omeniti, da se kalibracijska krivulja vedno oblikuje z instrumentalno vrednostjo na vertikalni ( $y$ ) osi in standardnimi koncentracijami na horizontalni ( $x$ ) osi. To je, ker veliko postopkov opisanih v sledečem delu predvideva, da se vse napake nahajajo pri  $y$ -vrednostih in da so standardne koncentracije ( $x$ -vrednosti) brez napak.

Metode, ki jih bomo sedaj opisali, vzbujajo veliko polemik na veliko znanstvenih srečanjih in v raznih znanstvenih razpravah na temo kalibracije. Veliko polemik izhaja iz dejstva, da splošno rabljene metode temeljijo na dveh predpostavkah. Prva je, da se napake pri kalibraciji pojavljajo le pri  $y$ -vrednostih. Ta predpostavka drži za mnoge rutinske instrumentalne analize. Standarde lahko pripravljamo z napako ca. 0.1% ali manj, medtem ko lahko imajo same instrumentalne meritve relativni standardni odmik med 1-2% ali več. V zadnjih letih pa je pojav nekaterih zelo preciznih avtomatičnih instrumentov postavil predpostavko pod vprašaj, nekateri uporabniki pa so se odločili delati raztopine s tehtanjem, raje kot z manj točno kombinacijo tehtanja in volumetrije.

Druga predpostavka je, da je obseg napak pri  $y$  neodvisen od koncentracije analitov. Zdrav razum nakazuje, da to pogosto ni res: če so relativne napake pri merjenju konstantne, se bodo absolutne napake povečale z večanjem koncentracije analitov. Kot bomo videli, je mogoče prirediti statistične postopke, da upoštevamo takšne faktorje.

### 3.3 KORELACIJSKI KOEFICIENT

V tem delu bomo obravnavali prvi omenjeni problem v prejšnjem delu – ali je grafični prikaz kalibracije linearen? Predvidevamo, da ima ravni grafični prikaz algebrsko obliko:

$$y = bx + a \tag{3.1}$$

kjer je  $b$  naklon črte in  $a$  odsek premice na  $y$ -osi. Posamezne točke na črti se bodo imenovali  $(x_1, y_1), (x_2, y_2), (x_3, y_3), \dots (x_i, y_i) \dots (x_n, y_n)$ , t.j. skupaj je  $n$  točk. Povprečje  $x$ -vrednosti se, kot ponavadi imenuje  $\bar{x}$ , povprečje  $y$ -vrednosti pa  $\bar{y}$ : lega  $(\bar{x}, \bar{y})$  je znana kot 'centroid' vseh točk.

Da bi lahko ocenili, kako dobro se eksperimentalne točke prilegajo ravni črti, izračunamo **korelacijski koeficient,  $r$** . Ta statistika se pogosto imenuje enostavno 'korelacijski koeficient', ker je v kvantitativni znanosti najpogosteje uporabljen. Vrednost  $r$  je podana z:

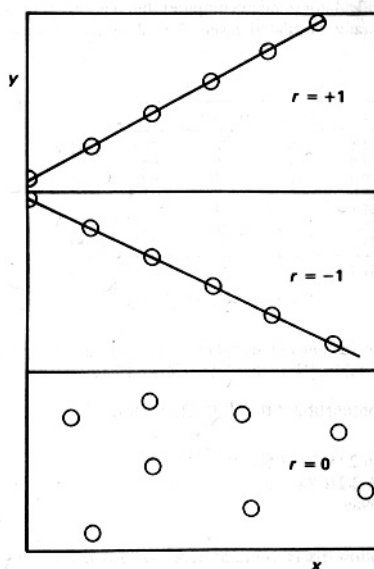
$$r = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\left\{ \left[ \sum_i (x_i - \bar{x})^2 \right] \left[ \sum_i (y_i - \bar{y})^2 \right] \right\}^{\frac{1}{2}}} \quad (3.2)$$

Natančna preučitev te enačbe pokaže, da ima  $r$  lahko vrednosti v območju  $-1 \leq r \leq +1$ . Kot je prikazano na sliki 3.2, vrednost  $r = -1$  opisuje popolno negativno korelacijo, t.j. vse eksperimentalne točke ležijo na premici negativnega naklona. Ko pa je  $r = +1$  imamo popolno pozitivno korelacijo, vse točke ležijo točno na premici pozitivnega naklona. Ko ni korelacije med  $x$  in  $y$  je vrednost  $r$  nič. V analizi praksi dajo kalibracijski grafi pogosto numerične vrednosti  $r$  več kot 0.99, vrednosti  $r$  manj kot okoli 0.90 pa so relativno redke. Tipični primer računanja  $r$  prikazuje število pomembnih točk.

*Primer.* Standardne vodne raztopine fluoresceina merimo na fluorescenčnem spektrometru in dajejo sledeče fluorescenčne jakosti (v poljubnih enotah):

<b>Fluorescenčne jakosti:</b>	2.1	5.0	9.0	12.6	17.3	21.0	24.7
<b>Koncentracija, pg/mL:</b>	0	2	4	6	8	10	12

Določimo korelacijski koeficient,  $r$ .



Slika 3.2. Korelacijski koeficient,  $r$

V praksi bi takšne izračune verjetno izvajali s pomočjo programiranega kalkulatorja ali mikroračunalnika, vendar je pomembno in poučno preučiti ročno izračunane rezultate. Podatki so predstavljeni v sledeči tabeli.

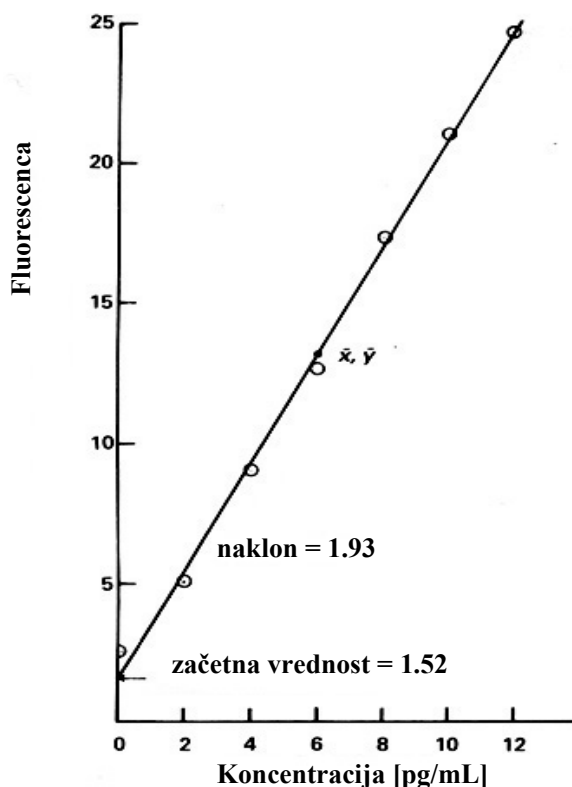
$x_i$	$y_i$	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$	$y_i - \bar{y}$	$(y_i - \bar{y})^2$	$(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$
0	2.1	-6	36	-11.0	121.00	66.0
2	5.0	-4	16	-8.1	65.61	32.4
4	9.0	-2	4	-4.1	16.81	8.2
6	12.6	0	0	-0.5	0.25	0
8	17.3	2	4	4.2	17.64	8.4
10	21.0	4	16	7.9	62.41	31.6
12	24.7	6	36	11.6	134.56	69.9
<b>42</b>	<b>91.7</b>	<b>0</b>	<b>112</b>	<b>0</b>	<b>418.28</b>	<b>216.2</b>

Številke pod črto na dnu stolpcev so pri vsakem primeru vsote števil v tabeli. Če uporabimo te vsote v kombinaciji z enačbo (3.2), imamo

$$r = \frac{216.2}{(112 \times 418.28)^{\frac{1}{2}}} = \frac{216.2}{216.44} = 0.9989$$

Iz tega primera sledita dve pripombi. Kot je prikazano na sliki 3.3, kljub temu, da veliko točk vidno odstopa od 'najboljše' premice, je vrednost  $r$  zelo blizu 1. Izkušnje kažejo, da tudi tisti grafični prikazi kalibracij, ki dokaj slabo izgledajo, dajejo visoke vrednosti  $r$ . V takšnih

primerih sta števec in imenovalc v enačbi (3.2) skoraj enaka. Tako je zelo pomembno, da izvajamo račune s primernim številom signifikantnih mest. V danem primeru bi zanemarjanje števil po decimalni piki dalo očitno nepravilno vrednost  $r$  natanko 1, uporaba samo enega decimalnega mesta bi dala nepravilno vrednost  $r$  0.9991. Ta točka je še posebej pomembna, ko za določanje  $r$  uporabljamo kalkulator ali računalnik; ti pripomočki ne dajo vedno zadostnih števil.

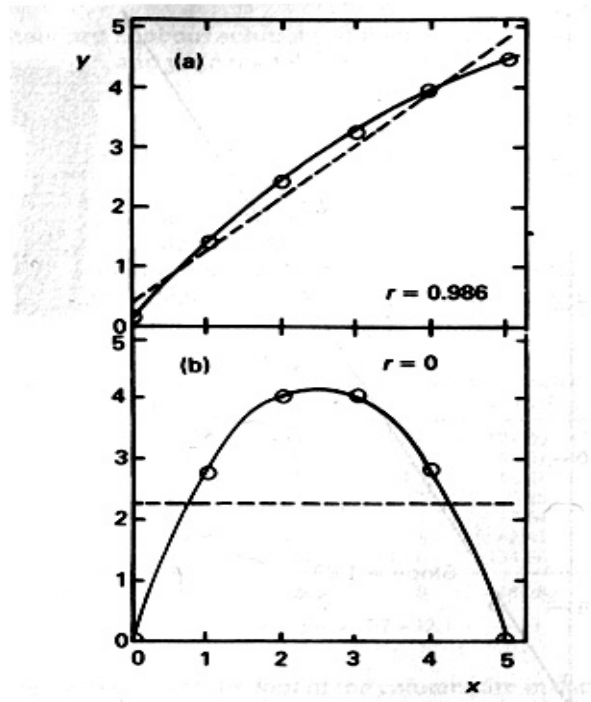


Slika 3.3. Grafični prikaz kalibracije podatkov na str. 46.

Korelacijske koeficiente je relativno lahko izračunati, vendar jih prelahko narobe razumemo. Vedno moramo imeti v mislih, da bo uporaba enačbe (3.2) vedno dala vrednost  $r$ , tudi če so podatki očitno ne-linearnega značaja. Slika 3.4 prikazuje dva primera, pri katerih bi bilo računanje  $r$  zavajajoče. Na sliki 3.4a točke kalibracije ležijo na krivulji; krivulja je dovolj blaga, da pri uporabi enačbe (3.2) dobimo visok korelacijski koeficient. Nauk tega primera je, da mora biti krivulja kalibracije vedno fizično začrtana (na grafičnem papirju ali na računalniškem zaslonu), drugače bi lahko iz izračunov  $r$  napačno sklepali o odnosu med



premicami. Slika 3.4b je namig, da nični korelacijski koeficient ne pomeni, da sta  $y$  in  $x$  popolnoma nepovezana; pomeni le, da nista povezana *linearno*.



Slika 3.4. Napačna predstava korelacijskega koeficienta,  $r$ .

Kot smo videli, so vrednosti  $r$ , ki jih dobimo z instrumentalno analizo, običajno visoke, tako da je izračunana vrednost, skupaj s samim kalibracijskim grafičnim prikazom, dovolj, da zagotovi analitiku, da je v resnici dobil uporaben linearni odnos. Vendar pa v nekaterih okoliščinah dobimo veliko nižje vrednosti  $r$ . V teh primerih bo potrebno uporabiti primeren statistični test, da ugotovimo, ali je korelacijski koeficient pomemben glede na število parov točk uporabljenih računanju. Najlažja metoda za to je izračunati vrednost  $t$  z uporabo enačbe

$$t = \frac{|r|\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}} \quad (3.3)$$

Izračunana vrednost  $t$  se primerja z vrednostjo v tabeli na želeni stopnji pomembnosti. Ničelna hipoteza v tem primeru je, da med  $x$  in  $y$  ne obstaja korelacija. Če je izračunana vrednost  $t$  večja kot tista v tabeli, je ničelna hipoteza zavrnjena; v takem primeru sklepamo, da ne obstaja bistvena korelacija.

### 3.4 REGRESIJSKA PREMICA $y$ NA $x$

V tem delu predpostavljamo, da med analiznim signalom ( $y$ ) in koncentracijo ( $x$ ) obstaja linearen odnos, ter pokažemo, kako izračunati 'najboljšo' premico skozi grafične točke kalibracije, kjer je vsaka predmet eksperimentalne napake. Ker za sedaj predpostavljamo, da so vse napake na  $y$ , iščemo premico, ki zmanjša odmike v smeri  $y$  med eksperimentalnimi točkami in izračunano premico. Ker bodo nekateri od teh odmikov (znani kot  $y$  ostanki) pozitivni in nekateri negativni, je smiselno stremeti k zmanjšanju **vsote kvadratov ostankov**. To pojasni pogosto uporabo izraza 'metoda najmanjših kvadratov' za postopek. Zahtevana premica se izračuna po tem načelu; dokazano je, da mora za rezultat premica potekati skozi 'centroid' točk,  $(\bar{x}, \bar{y})$ . Pokažemo lahko, da

$$b = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \quad (3.4)$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad (3.5)$$

Tako izračunana premica je znana kot **regresijska premica  $y$  na  $x$** , t.j. premica kaže, kako  $y$  variira, ko je  $x$  naravnano na izbrane vrednosti. Pomembno je omeniti, da linija regresije  $x$  na  $y$  *ni ista linija* (razen v zelo neverjetnem primeru, kjer vse točke ležijo točno na premici, ko je  $r$  natančno enak 1). Regresijska premica  $x$  na  $y$  (ki tudi poteka skozi centroid točk) predpostavlja, da se vse napake pojavljajo v smeri  $x$ . Če se strogo držimo pravila, da je analizni signal vedno prikazan na  $y$  osi in koncentracija na  $x$  osi, je vedno linija regresije  $y$  na  $x$  tista, ki jo moramo uporabiti pri kalibracijskih eksperimentih.

*Primer.* Izračunajmo naklon in premico za podatke dane v prejšnjem primeru (glej del 3.3).

V delu 3.3 smo izračunali, da je za to kalibracijsko krivuljo:

$$\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) = 216.2; \quad \sum_i (x_i - \bar{x})^2 = 112; \quad \bar{x} = 6; \quad \bar{y} = 13.1$$

Z uporabo enačb (3.4) in (3.5) izračunamo

$$b = \frac{216.2}{112} = 1.93$$

$$a = 13.1 - (1.93 \times 6) = 13.1 - 11.58 = 1.52$$

---

Enačba za regresijsko premico je:  $y = 1.93x + 1.52$ .

Očitno je, da so členi, ki jih uporabljamo za izračun  $r$ , potrebni tudi za izračun  $a$  in  $b$ . To omogoča izračun vseh členov s kalkulatorjem ali enostavnim računalniškim programom.

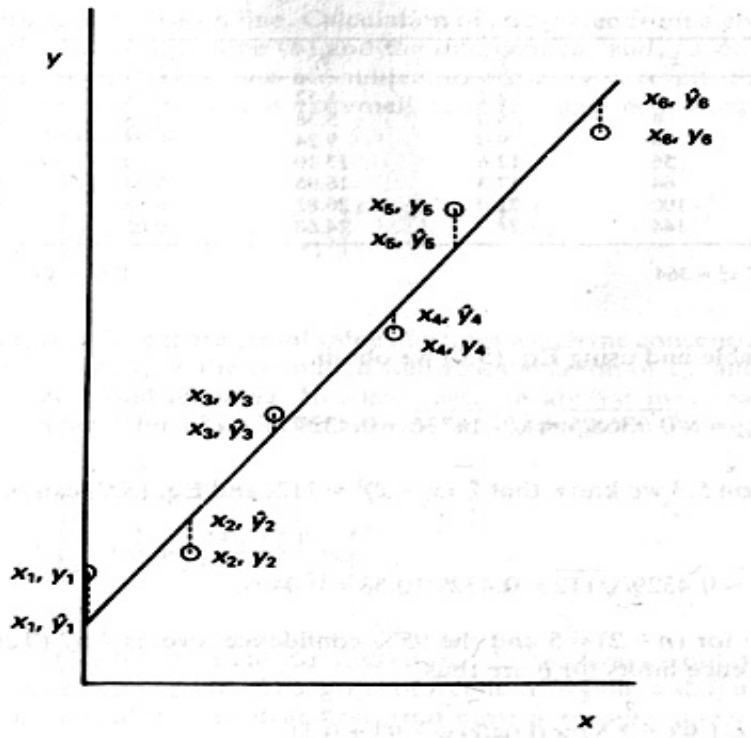
Rezultati naklona in izračuni odseka so upodobljeni na sliki 3.3. Ponovno je pomembno poudariti, da enačbi (3.4) in (3.5) ne smeta biti napačno uporabljeni – uporabne rezultate bosta dali le, če je predhodno preučevanje (računanje  $r$  in vizualni pregled točk) nakazalo, da je odnos premic realen za vprašujoči eksperiment. Ne-parametrične metode (to so metode, ki ne predpostavljajo o značaju prenosa napak) lahko prav tako uporabljamo za računanje regresijskih premic.

### 3.5 NAPAKE NAKLONA IN ODSEKA REGRESIJSKE PREMICE

Regresijsko premico izračunano v predhodnem delu, bomo v praksi uporabljali za ocenjevanje koncentracij testnih vzorcev z interpolacijo in morda tudi za ocenjevanje detekcijske meje analiznega postopka. Slučajne napake pri vrednostih za naklon in odsek so tako pomembne, v poštev pa pridejo tudi enačbe za njihovo računanje. Najprej moramo izračunati statistični  $s_{y/x}$ , ki je podan z:

$$s_{y/x} = \left\{ \frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2} \right\}^{\frac{1}{2}} \quad (3.6)$$

Videli bomo, da ta enačba koristno uporabi  $y$ -ostanke,  $y_i - \hat{y}_i$ , pri čem so  $\hat{y}_i$  vrednosti točke na izračunani liniji regresije in se ujemajo s posameznimi vrednostmi  $x$ , torej 'prirejene'  $y$  vrednosti (slika 3.5).  $\hat{y}$  vrednost za dano vrednost  $x$  je seveda izračunana iz regresijske enačbe. Enačba (3.6) je v obliki podobna enačbi za standardni odmik za niz ponovljenih meritev [enačba (2.2)]; prva se razlikuje po tem, da so odmiki,  $(y_i - \bar{y})$ , zamenjani z ostanki  $(y_i - \hat{y}_i)$ , ter da imenovalec vsebuje izraz  $(n - 2)$  ne pa  $(n - 1)$ . Pri linearni regresiji je računanje števila prostostnih stopenj (glej del 2.4)  $(n - 2)$ . To odraža očitno dejstvo, da je skozi dve točki lahko narišemo le eno premico.



Slika 3.5.  $y$  – ostanki regresijske premice.

Opremljeni z vrednostjo za  $s_{y/x}$ , lahko sedaj izračunamo  $s_b$  in  $s_a$ , standardne odmike za naklon ( $b$ ) in odsek ( $a$ ). Podani so z:

$$s_b = \frac{s_{y/x}}{\left\{ \sum_i (x_i - \bar{x})^2 \right\}^{\frac{1}{2}}} \quad (3.7)$$

$$s_a = s_{y/x} \left\{ \frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2} \right\}^{\frac{1}{2}} \quad (3.8)$$

Vrednosti  $s_b$  in  $s_a$  lahko uporabimo na običajen način, da ocenimo mejo zaupanja za naklon in odsek. Meja zaupanja je tako podana z  $b \pm ts_b$ , pri čem je vrednost  $t$  vzeta iz želene stopnje zaupanja in  $(n - 2)$  prostostne stopnje. Na podoben način podamo mejo zaupanja za odsek z  $a \pm ts_a$ .

*Primer.* Izračunajmo standardne odmike in mejo zaupanja za naklon in odsek regresijske premice izračunane v delu 3.4.

Ta vrsta računanja morda ne bo možna na programiranem kalkulatorju, čeprav so bili razviti uporabni računalniški programi. Predstavljamo ročno računanje z uporabo tabelaričnega načrta.

$x_i$	$x_i^2$	$y_i$	$\hat{y}_i$	$ y_i - \hat{y}_i $	$(y_i - \hat{y}_i)^2$
0	0	2.1	1.52	0.58	0.3364
2	4	5.0	5.38	0.38	0.1444
4	16	9.0	9.24	0.24	0.0576
6	36	12.6	13.10	0.50	0.2500
8	64	17.3	16.96	0.34	0.1156
10	100	21.0	20.82	0.18	0.0324
12	144	24.7	24.68	0.02	0.0004
$\sum_i x_i^2 = 634$		$\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2 = 0.9368$			

Iz tabele in z uporabo enačbe (3.6) dobimo

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{0.9368}{5}} = \sqrt{0.18736} = 0.4329$$

Iz dela 3.3 vemo, da je  $\sum_i (x_i - \bar{x})^2 = 112$ ; da to pokažemo, lahko uporabimo enačbo (3.7)

$$s_b = \frac{0.4329}{\sqrt{112}} = \frac{0.4329}{10.58} = 0.0409$$

Vrednost  $t$  za  $(n - 2) = 5$  in 95 % stopnja zaupanja je 2.57 (tabela A.1). Tako je 95% meja zaupanja za  $b$

$$b = 1.93 \pm 2.57 \times 0.0409 = 1.93 \pm 0.11$$

Enačba (3.8) zahteva poznavanje  $\sum_i x_i^2$  izračunane kot 364 iz tabele. Tako lahko zapišemo

$$s_a = 0.4329 \sqrt{\frac{364}{784}} = 0.2950$$

meja zaupanja pa je

$$a = 1.52 \pm 2.57 \times 0.2950 = 1.52 \pm 0.76$$

V tem primeru število potrebnih signifikantnih mest ni bilo veliko, je pa vedno koristno, da uporabimo maksimalno razpoložljivo število signifikantnih števil med takšnim računanjem in jih zaokrožamo le na koncu.

### 3.6 RAČUNANJE KONCENTRACIJE

Ko smo določili naklon in odsek regresijske premice, je zelo enostavno izračunati vrednost  $x$ , ki se ujema s katerokoli izmerjeno vrednostjo  $y$ . Bolj zapleten problem se pojavi, ko je potrebno oceniti napako pri koncentraciji, ki jo izračunamo z uporabo regresijske premice. Računanje vrednosti  $x$  iz dane vrednosti  $y$  zajema uporabo obeh, naklona ( $b$ ) in odseka ( $a$ ), ter, kot smo videli v prejšnjem delu, pri obeh vrednostih prihaja do napak. Kot rezultat je določanje napake pri vrednosti  $x$  zelo zapleteno in večina analitikov uporablja naslednjo približno formulo:

$$s_{x_0} = \frac{s_{y/x}}{b} \left\{ 1 + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2} \right\}^{\frac{1}{2}} \quad (3.9)$$

Pri tej enačbi je  $y_0$  eksperimentalna vrednost  $y$ , iz katerega bo določena koncentracijska vrednost  $x_0$ ,  $s_{x_0}$  je ocenjen standardni odmik  $x_0$ , ostali simboli pa imajo svoje običajne vrednosti. V nekaterih primerih lahko analitik opravi več ponovitev, da dobi vrednost  $y_0$ ; če je  $m$  takšnih ponovitev, potem enačba za postane  $s_{x_0}$

$$s_{x_0} = \frac{s_{y/x}}{b} \left\{ \frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2} \right\}^{\frac{1}{2}} \quad (3.10)$$

Kot je bilo pričakovati, se enačba (3.10) skrči v enačbo (3.9), če je  $m = 1$ . Kot vedno lahko mejo zaupanja izračunamo kot  $x_0 \pm t s_{x_0}$ , ( $n - 2$ ) prostostnih stopenj. Ponovno bo enostavni računalniški program izvedel vsa ta računanja, večina programiranih kalkulatorjev pa za to ne bo primernih.

---

*Primer.* Z uporabo podatkov iz primera v delu 3.3 določimo  $x_0$  in  $s_{x_0}$  vrednosti, ter  $x_0$  mejo zaupanja za raztopine z intenzitetami fluorescence 2.9, 13.5, in 23.0 enot.

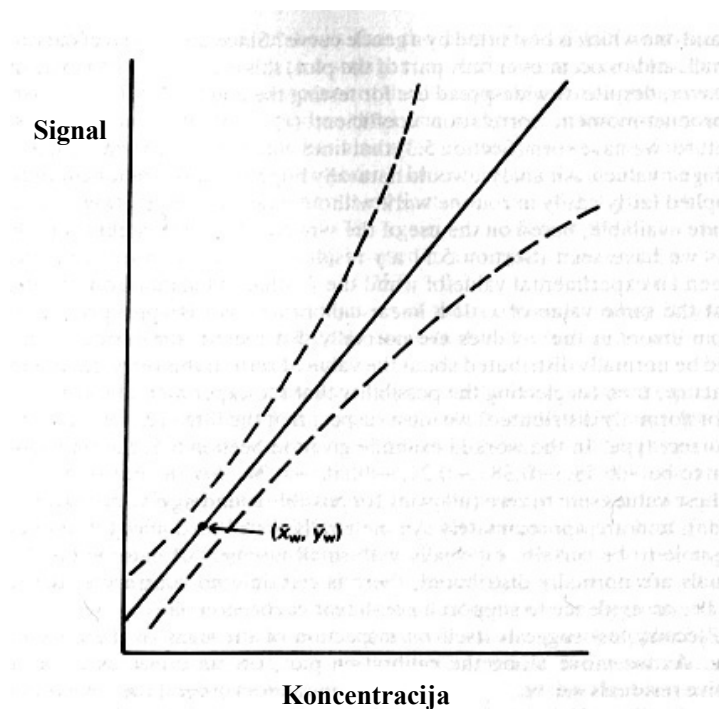
Vrednosti  $x_0$  se ponavadi enostavno izračunajo z uporabo regresijske enačbe določene v delu 3.4,  $y = 1.93x + 1.52$ . Če zamenjamo  $y_0$  vrednosti 2.9, 13.5 in 23.0, dobimo  $x_0$  vrednosti 0.76, 6.21 oziroma 11.13 pg/mL.

Da dobimo  $s_{x_0}$  vrednosti, ki se ujemajo s temi  $x_0$  vrednostmi, uporabimo enačbo (3.9), ter se ponovno spomnimo predhodnih delov, kjer  $n = 7$ ,  $b = 1.93$ ,  $s_{y/x} = 0.4329$ ,  $\bar{y} = 13.1$ , in  $\sum_i (x_i - \bar{x})^2 = 112$ . Vrednosti  $y_0$  2.9, 13.5 in 23.0 nam dajo  $s_{x_0}$  vrednosti 0.26, 0.24 oziroma 0.26. Ustrezna 95% meja zaupanja ( $t = 2.57$ ) je  $0.72 \pm 0.68$ ,  $6.21 \pm 0.62$ , oziroma  $11.13 \pm 0.68$  pg/mL.

Očitno je, da je meja zaupanja manjša (t.j. boljše) za rezultat  $y_0 = 13.5$ , kot za ostali dve  $y_0$  vrednosti. Pregled enačbe (3.9) potrjuje, da ko se  $y_0$  približuje  $\bar{y}$ , se tretji člen znotraj oklepajev približuje ničli,  $s_{x_0}$  pa se tako približuje minimalni vrednosti. Splošna oblika meje zaupanja za računano koncentracijo je prikazana na sliki 3.6. V praktični analizi bo zato kalibracijski eksperiment te vrste dal zelo natančne rezultate, ko se bo merjeni instrumentalni signal ujema s točko blizu centroida regresijske premice.

Če želimo izboljšati (zožiti) mejo zaupanja pri tem kalibracijskem eksperimentu, enačbi (3.9) in (3.10) pokažeta, da je treba upoštevati vsaj dva pristopa. Lahko bi povečali  $n$ , število kalibracijskih točk na regresijski liniji, lahko pa opravimo tudi več kot eno meritev  $y_0$  in uporabimo povprečno vrednost  $m$  takih meritev pri računanju  $x_0$ . Rezultate takšnih postopkov lahko ocenimo z upoštevanjem treh členov znotraj oklepajev v dveh enačbah. V zgornjem primeru je dominantni člen pri vseh treh računih prvi člen – ena. Iz tega sledi, da v tem primeru (in veliko ostalih) lahko dosežemo izboljšanje v natančnosti z večkratnim merjenjem  $y_0$  in z uporabo enačbe (3.10), ne pa (3.9). Če je bila vrednost  $y_0$  13.5 izračunana kot povprečje štirih ponovitev, potem bi vrednost  $s_{x_0}$  in meja zaupanja bile 0.14 oziroma  $6.21 \pm 0.36$ ; oba rezultata nakazujeta bistveno izboljšano natančnost. Seveda pa izvajanje prevelikega števila ponavljajočih meritev (predpostavljamo, da je na voljo dovolj vzorca)

povzroči veliko več dela za manjše dodatne prednosti: 8 meritev  $y_0$  nam da vrednost  $s_{x_0}$  0.12 in mejo zaupanja  $6.21 \pm 0.30$ .



Slika 3.6. Splošna oblika meje zaupanja za koncentracijo določeno z uporabo neutržene regresijske premice.

Učinek  $n$ , števila kalibracijskih točk, na mejo zaupanja določitve koncentracije, je bolj zapleten. To je zato, ker moramo upoštevati tudi spremljajoče spremembe vrednosti  $t$ . Uporaba velikega števila kalibracijskih vzorcev zajema nalogo pripravljanja velikega števila točnih standardov za le malenkost povečano natančnost (glej učinke povečanega  $m$ , opisane v prejšnjem odstavku). Na drugi strani pa majhne vrednosti  $n$  niso dopustne; v takšnih primerih ne bo le  $1/n$  večji, ampak bo tudi število prostostnih stopenj,  $(n - 2)$  postalo zelo majhno, ter zahtevalo uporabo velike številčne vrednosti  $t$  pri računanju meje zaupanja. Pri veliko eksperimentih, kot v danem primeru, bo zadostovalo okoli šest kalibracijskih točk, analitik bo pridobil dodatno pri natančnosti, če je potrebno s ponavljanjem meritev  $y_0$ .



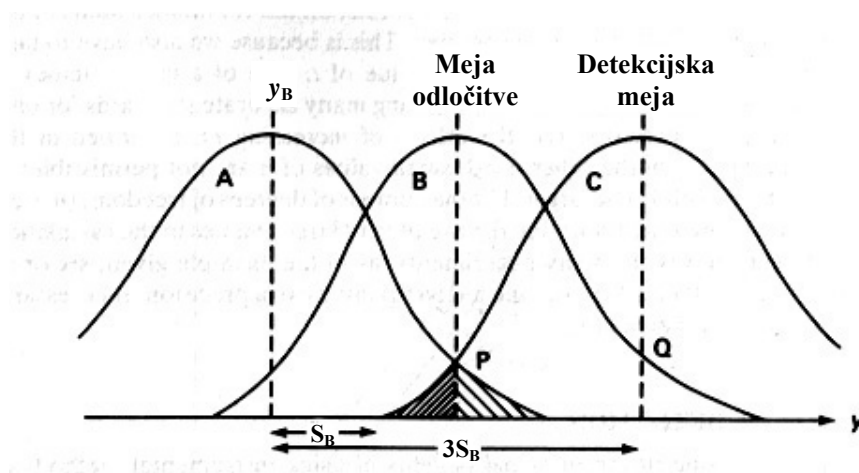
### 3.7 DETEKCIJSKA METODA

Kot smo videli, je ena od temeljnih prednosti uporabe instrumentalnih metod, da so sposobne odkriti in določiti manjše količine analitov kot klasične analizne metode. Te prednosti so vodile do dviga vrednosti pomembnosti sledenja koncentracij mnogih materialov pri bioloških in okoljskih vzorcih, in tako do razvoja veliko prihodnjih tehnik, pri katerih so nizke detekcijske meje poglavitni kriteriji za uspešno uporabo. Zato je očitno, da so statistične metode za ocenjevanje in primerjanje detekcijskih mej pomembne. Na splošno lahko detekcijsko mejo analita opišemo kot tisto koncentracijo, ki da instrumentalni signal ( $y$ ), ki je *bistveno drugačen* kot 'slepi signal' ali signal 'v ozadju' (šum). Takoj je očitno, da dopušča ta opis analitiku veliko mero svobode pri odločanju za natančno definicijo detekcijske meje, ki temelji na primerni interpretaciji fraze 'bistveno drugačen'. V praksi je bilo zelo malo sporazumov med strokovnimi in zakonskimi organi o tej točki, celotne področje pa je tako sporno kot ostali vidiki statističnih obravnav kalibracijskih analiz. Pogosto uporabljena definicija literature v analizni kemiji je, da je detekcijska meja *koncentracija analitov, ki oddaja signal enak šumu*,  $y_B$ , *ter dva standardna odmika praznega signala*,  $s_B$ . Zadnje smernice javnih organov predlagajo, da naj bo kriterij:

$$y - y_B = 3 s_B \quad (3.11)$$

Pomembnost te definicije je podrobneje razložena na sliki 3.7. Analitik, ki preučuje majhne koncentracije, se sooča z dvema problemoma: noče trditi, da je analit prisoten, ko ga v resnici ni, in prav tako noče potrditi, da analita ni, ko je pravzaprav prisoten. Možnost vsake od teh napak mora biti zmanjšana z razumno definicijo detekcijske meje. Na sliki krivulja A predstavlja normalno porazdeljenost merjenih vrednosti signala slepega vzorca. Možno bi bilo identificirati točko,  $y = P$ , proti zgornji meji porazdelitve in trditi, da višji signal, kot je ta, verjetno ne bo dosežen (slika 3.7). Za signal, nižji od P pa se predvideva, da označuje slepi vzorec. Pri vzorcu, ki bo oddajal povprečni signal P, bo 50% opazovanih signalov manj kot to, kadar bo signal imel običajno porazdelitev (enake oblike kot slepi vzorec), ki bo razširjena pod P (krivulja B). Verjetnost sklepanja, da se ta vzorec ne razlikuje od slepega vzorca, ko pravzaprav se, je 50%. Točka P, ki se imenuje meja odločitve je tako nezadovoljiva kot detekcijska meja, ker reši prvega od zgoraj omenjenih problemov, ne pa tudi drugega. Bolj primerna točka je pri  $y = Q$  (slika 3.7), pri čemer je Q dvakrat tako oddaljen kot P od  $y$ . Pokažemo lahko, da če je  $y_B - Q$  3.28 krat standardni odmik slepega vzorca,  $s_B$ , potem je verjetnost, da se pojavi katera od dveh vrst napak (označene z zasenčenimi polji na sliki 3.7)

le 5%. Če je, kot predlaga enačba (3.11), razdalja  $y_B - Q$  le  $3s_B$ , je verjetnost vsake napake okoli 7%; veliko analitikov meni, da je to razumna definicija detekcijske meje.



Slika 3.7. Definicije (a) meje odločitve; (b) detekcijska meja.

Ponovno je potrebno poudariti, da je ta definicija detekcijske meje precej poljubna in analitik ima odprte roke, da poda alternativno definicijo za določen namen. Obstajajo lahko situacije, ko se hoče analitik za vsako ceno izogniti možnosti poročanja o neprisotnosti analita, ko je dejansko prisoten, je pa relativno nezaskrbljen zaradi nasprotne napake. Jasno je, da kadarkoli navajamo detekcijsko mejo v raziskovalnem delu ali poročilu, moramo navesti tudi definicijo, kako smo jo pridobili. Narejenih je bilo nekaj poizkusov, da bi definirali 'mejo določanja', ki se jemlje kot spodnja meja pri natančnih kvantitativnih meritvah, kot nasprotje kvalitativnemu odkrivanju. Vrednost  $y_B + 10s_B$  je predlagana za to mejo, vendar pa v praksi ni preveč široko uporabljana.

Sedaj moramo obravnavati kako v praksi pridobimo člene  $y_B$  in  $s_B$ , ko za kalibracijo uporabljamo običajno regresijsko premico, kot je bilo opisano v predhodnih delih. Temeljna predpostavka neutežene metode najmanjših kvadratov, ki smo jo do sedaj preučevali v tem poglavju je, da ima vsaka točka na grafičnem prikazu (tudi točka, ki predstavlja slepi vzorec ali ozadje) običajno porazdeljeno različico (samo v smeri  $y$ ), s standardnim odmikom ocenjenim na  $s$  [enačba (3.6)]. To je opravičilo za risanje običajnih krivulj porazdelitev z enako širino na sliki 3.7. Pri oceni detekcijske meje je tako primerno  $s_{y/x}$  namesto  $s_B$ . Seveda je mogoče slepi eksperiment izvajati velikokrat in tako dobiti neodvisno vrednost za  $s_B$ ,

---

vendar tak postopek vzame veliko časa, uporaba  $s_{y/x}$  pa je v praksi kar primerna. Vrednost  $a$ , izračunan odsek, se lahko uporabi kot ocena  $y_B$ , kar je sam signal slepega vzorca.

*Primer.* Ocenimo detekcijsko mejo za določanje fluoresceina, preučeno v predhodnem delu. Uporabimo enačbo (3.11) z vrednostmi  $y_B (= a)$  in  $s_B (= s)$ , ki smo jih prej izračunali. Ugotovili smo, da je vrednost  $y$  na detekcijski meji  $1.52 + 3 \times 0.4329$ , t.j. 2.82. Uporaba enačbe regresije da detekcijsko mejo 0.67 pg/mL.

### 3.8 METODA STANDARDNEGA DODATKA

Domnevajmo, da analitik želi določiti koncentracijo srebra v vzorcih fotografskih odpadkov z atomsko absorpcijsko spektrometrijo. Z uporabo metod iz predhodnega dela bi lahko kalibriral spektrometer z nekaj vodnimi raztopinami čiste srebrove soli in uporabil iz tega dobljeni kalibracijski graf pri določevanju srebra v testnih vzorcih. Ta metoda je veljavna le, če da čista vodna raztopina srebra enako absorbanco kot vzorec fotografskega odpadka, ki vsebuje enako koncentracijo srebra. Z drugimi besedami, pri uporabi čistih raztopin za pridobivanje kalibracijskega grafa se predvideva, da ni 'učinkov matrične raztopine', t.j. zmanjševanje ali povečanje absorbance srebra preko ostalih sestavin. Na veliko področjih analize je takšno predvidevanje pogosto napačno. Učinki matrične raztopine se pojavijo tudi pri metodah, kot je spektrometrija plazme, ki imajo sloves, da so relativno proste motenj.

Prva možna rešitev tega problema je, da vzamemo vzorec fotografskega odpadka, ki je podoben testnemu vzorcu, a ne vsebuje srebra, ter mu dodamo znane količine srebrove soli, da naredimo standardne raztopine. Kalibracijski graf bo tako sestavljen z uporabo očitno primerne matrične raztopine. V veliko primerih je ta pristop nepraktičen. Ne bo odstranil učinkov matrične raztopine, ki se po obsegu razlikujejo od enega vzorca do drugega, in morda ne bo mogoče dobiti vzorca matrične raztopine, ki ne vsebuje analitov – na primer, najti vzorec fotografskih odpadkov brez srebra je skoraj nemogoče. Iz tega sledi, da morajo biti vse analizne meritve, tudi nastajanje kalibracijskega grafa, na nek način izvedene s samim vzorcem. To v praksi dosežemo z uporabo **metode standardnega dodatka**. Metoda se velikokrat uporablja pri atomski absorpcijski spektrometriji in emisijski spektrometriji, uporablja pa se tudi pri elektrokemičnih analizah in na drugih področjih. Vzamejo se enaki

volumni vzorčne raztopine, vsem razen enemu ločeno dodajajo različne količine analita, potem pa so vse razredčene na enak volumen. Instrumentalni signali so določeni za vse raztopine, rezultati pa grafično prikazani, kot na sliki 3.8. Kot ponavadi je signal prikazan na  $y$ -osi; v tem primeru je  $x$ -os razdeljena na enote, glede na količine dodanega analita (ali kot absolutna teža ali kot koncentracija). (Neutežena) regresijska linija se izračuna na običajen način. Premico ekstrapoliramo do točke na  $x$ -osi, kjer je  $y = 0$ . Jasno je, da to negativno presečišče na  $x$ -osi odgovarja količini analita v testnem vzorcu. Pregled števila pokaže, da je ta vrednost podana z  $a/b$ , razmerjem med odsekom in naklonom regresijske premice. Ker sta oba  $a$  in  $b$  predmet napak, je tudi izračunana vrednost predmet napak. V tem primeru pa količina ni predvidena iz enega merjenja vrednosti  $y$ , tako formula za standardni odmik,  $s_{x_E}$ , ekstrapolacijske  $x$ -vrednosti ( $x_E$ ) ni enaka kot v enačbi (3.9). Namesto nje uporabimo:

$$s_{x_E} = \frac{s_{y/x}}{b} \left\{ \frac{1}{n} + \frac{\bar{y}^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2} \right\}^{\frac{1}{2}} \quad (3.12)$$

Poviševanje vrednosti  $n$  ponovno dokazuje natančnost zelene količine: na splošno bi morale biti pri eksperimentih standardnega dodatka uporabljenih vsaj šest točk. Natančnost celo izboljšamo z maksimiranjem  $\sum_i (x_i - \bar{x})^2$ , tako bi morale kalibracijske raztopine pokriti, če je mogoče, kar veliko območje. Interval zaupanja za  $x_E$  je lahko, kot vedno določen z  $x_E \pm t s_{x_E}$ .

*Primer.* Koncentracija srebra v vzorcu fotografskega odpadka je bila določena z atomsko absorpcijsko spektrometrijo, z metodo standardnega dodatka. Dobili smo sledeče rezultate:

**Dodano Ag,  $\mu\text{g/mL}$**

**originalnega vzorca**

**raztopine**

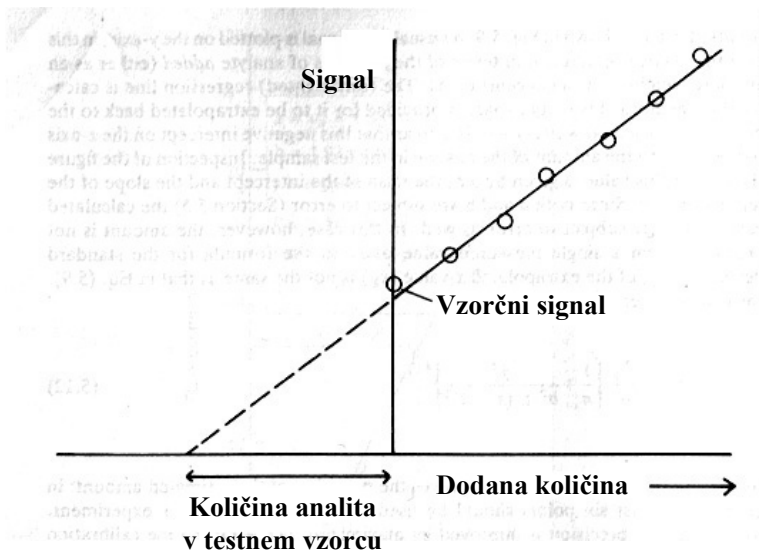
0      5      10      15      20      25      30

**Absorbanca**

0.32    0.41    0.52    0.60    0.70    0.77    0.89

Določimo koncentracijo srebra v vzorcu, ter poiščimo 95% mejo zaupanja za to koncentracijo.

Enačbe (3.4) in (3.5) dajo  $a = 0.3218$  in  $b = 0.0186$ . Kvocient teh števil nam da koncentracijo srebra v testnem vzorcu  $17.3 \mu\text{g/mL}$ . Meja zaupanja za ta rezultat se lahko določi s pomočjo enačbe (3.12). Tukaj je  $s_{y/x} = 0.01094$ ,  $\bar{y} = 0.6014$ ,  $\sum_i (x_i - \bar{x})^2 = 700$ . Vrednost  $s_{x_E}$  je tako  $0.749$ , meja zaupanja pa je  $17.3 \pm 2.57 \times 0.749$ , to je  $17.3 \pm 1.9 \mu\text{g/mL}$ .



Slika 3.8. Metoda standardnega dodatka

Čprav je prefinjen pristop k splošnim problemom učinkov motenj matrične raztopine, ima metoda standardnega dodatka veliko slabosti: težko jo je avtomatizirati, uporabi pa lahko večje število vzorcev, kot ostale metode. Statistično gledano je njena glavna slabost, da je metoda ekstrapolacije in je tako manj natančna, kot interpolacijske tehnike. V danem primeru je to enostavno pokazati, če bi dala neznan koncentracija srebra, dodanega k vzorcu fotografskega odpadka, absorbanco  $0.65$ , bi bila koncentracija dodanega srebra  $17.6 \mu\text{g/mL}$ , z mejo zaupanja  $17.6 \pm 1.6 \mu\text{g/mL}$ . Če te rezultate primerjamo s tistimi, ki smo jih dobili v primeru, je očitno zmerno izboljšana meja zaupanja. Kot smo videli, se meja zaupanja za točko na regresijski premici spreminja glede na  $y$ -vrednost in je najmanjša, ko je  $y = \bar{y}$  (glej del 3.6). V praksi, kot je bilo pokazano z obema primeroma in primerom v delu 3.6, te spremembe pri meji zaupanja s spreminjanjem  $y$  niso velike, tako meja zaupanja ni v nobenem primeru slaba, niti pri rezultatih, ki smo jih dobili z ekstrapolacijo snovi.

---

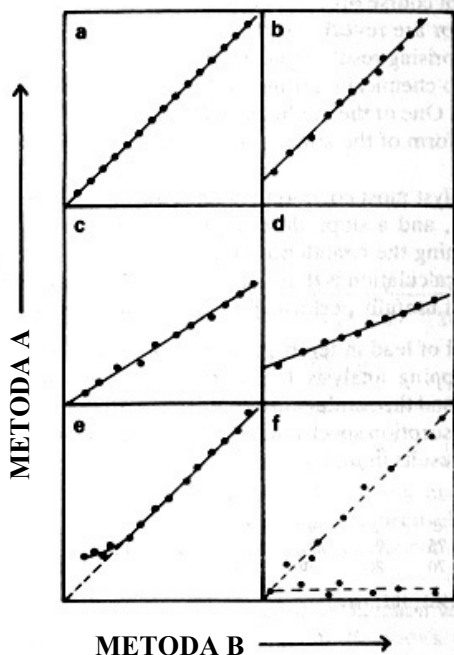
### 3.9 UPORABA REGRESIJSKIH PREMICE ZA PRIMERJANJE ANALIZNIH METOD

Če analizni kemik razvije novo metodo za določanje določenega analita, jo bo verjetno želel ovrednotiti (med ostalimi tehnikami) z uporabo pri vrsti vzorcev, ki so že bili preučeni z uporabo drugih splošno priznanih ali standardnih postopkov. Pri opravljanju takšne primerjave, bo glavno zanimanje veljalo prepoznavanju sistematskih napak – ali daje nova metoda rezultate, ki so bistveno višji ali nižji od že ustaljene metode? V primerih, kjer se analiza večkrat ponavlja v omejenem koncentracijskem območju, lahko primerjave naredimo z uporabo statističnih testov. Takšni postopki niso primerni za instrumentalne analize, ki se ponavadi uporabljajo za večje koncentracijsko območje.

Ko moramo primerjati dve metodi pri različnih koncentracijah analitov, ponavadi uporabimo postopek, prikazan na sliki 3.9. Ena os regresijskega grafa je uporabljena za rezultate, ki smo jih dobili z novo metodo, druga os pa za rezultate, ki smo jih dobili z uporabo referenčne ali primerjalne metode na obeh vzorcih. Vsaka točka na grafu tako predstavlja posamezen vzorec, ki je bil analiziran s pomočjo dveh različnih metod. Metode predhodnih delov so uporabljene za računanje naklona ( $b$ ), odseka ( $a$ ) in korelacijskega koeficienta ( $r$ ) regresijske premice. Jasno je, da če vsak vzorec da identični rezultat pri obeh analiznih metodah, bo imela regresijska premica odsek nič, ter naklon in korelacijski koeficient 1 (slika 3.9a). V praksi pa, seveda, se to nikoli ne pojavi – tudi če so sistematske napake popolnoma odsotne, slučajne napake zagotavljajo, da dva analizna postopka ne bosta dala rezultatov, ki bi se ujemali pri vseh vzorcih.

Odkloni od 'idealnega' stanja ( $a = 0, b = r = 1$ ) se lahko pojavijo na veliko različnih načinov. Prvič, mogoče je, da bo imela regresijska linija naklon 1, ampak odsek, ki ne bo nič. To pomeni, da lahko da ena metoda analize rezultat, ki je za določeno količino višji ali nižji kot ostali. Takšna napaka se lahko pojavi, če je bil signal ozadja pri eni metodi narobe izračunan (slika 3.9b). Druga možnost je, da je naklon regresijske premice  $>1$  ali  $<1$ , kar nakazuje, da se sistematska napaka lahko pojavi v naklonu enega posameznega kalibracijskega grafičnega prikaza (slika 3.9c). Ti dve napaki se lahko pojavita istočasno (slika 3.9d). Nadaljnje možne vrste sistematskih napak se pokažejo, če je grafični prikaz krivulja (slika 3.9e). Vrsta grafičnega prikaza, kot je na sliki (3.9f), lahko nastane, če se pojavi analit v dveh različnih kemičnih oblikah, razmerje obeh se razlikuje od vzorca do vzorca. Ena izmed preučevanih

metod (tukaj prikazana na  $y$ -osi) lahko odkrije samo eno obliko analita, medtem ko druga metoda lahko odkrije obe obliki.



Slika 3.9. Uporaba regresijske premice za primerjavo dveh analiznih metod: (a) kaže popolno ujemanje med dvema metodama za vse vzorce; (b) – (f) prikazuje rezultate različnih vrst sistematskih napak (glej tekst)

V praksi si analitik najpogosteje želi testirati, ali se odsek signifikantno razlikuje od nič in ali se naklon signifikantno razlikuje od 1. Takšne teste izvajajo z določanjem meje zaupanja za  $a$  in  $b$ , običajno na 95% nivoju zaupanja. Izračun je v praksi tako zelo podoben tistemu, opisanemu v delu 3.5, ter je najbolj uporabno izveden, če uporabljamo enostavni računalniški program.

*Primer.* Vsebnost svineca v desetih vzorcih pomarančnega soka je bila določena z novo metodo potenciometrične analize (PSA), pri kateri je potrebna steklena delovna-ogljikova elektroda. Rezultate primerjamo s tistimi, ki smo jih dobili z uporabo neplamenske atomske absorpcijske spektrometrije (AAS). Dobili smo naslednje podatke.

<b>Vzorec</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>Rezultat AAS</b>	35	75	75	80	125	205	205	215	240	350
<b>Rezultat PSA</b>	35	70	80	80	120	200	220	200	250	330

---

Ti rezultati so grafično prikazani na regresijski premici (slika 3.10), rezultati AAS so na  $x$ -osi, rezultati PSA pa so prikazani na  $y$ -osi. Z uporabo metod prejšnjih delov že lahko pokažemo, da:

$$a = 3.87; b = 0.968; r = 0.9945$$

Nadaljnja računanja pokažejo, da:

$$s_{y/x} = 10.56; s_a = 6.64; s_b = 0.0357$$

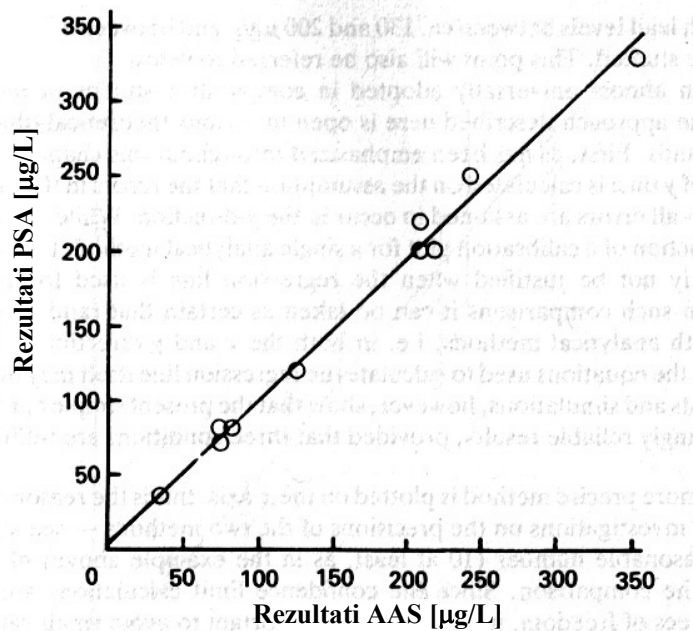
uporaba primernih vrednosti  $t$  za 8 prostostnih stopenj ( $t = 2.31$ ) pa nam da 95% mejo zaupanja za odsek in naklon:

$$a = 3.87 \pm 15.34 \quad \text{in} \quad b = 0.963 \pm 0.083$$

Iz teh števil je očitno, da se izračunan naklon in odsek ne razlikujeta bistveno od 'idealnih' vrednosti, ki so 1 oziroma 0, in tako ni dokaza za sistematske razlike med dvema nizoma rezultatov.

V povezavi s tem primerom lahko omenimo še dve nadaljnji točki. Prvič, podroben pregled literature analize kemije kaže, da avtorji pri primerjalnih študijah pogosto dajejo velik poudarek na vrednost korelacijskega koeficienta. V primeru pa to ni igralo neposredne vloge pri ugotavljanju ali so se pojavile sistematske napake ali se niso. Tudi če je regresijska premica rahlo zakrivljena, je korelacijski koeficient lahko še vedno blizu 1. Tako je očitno, da je računanje  $r$  v tem kontekstu manj pomembno, kot ugotavljanje meje zaupanja za naklon in odsek. V nekaterih primerih lahko ugotovimo, da vrednost  $r$  ni zelo blizu 1, čeprav naklon in odsek nista bistveno drugačna od 1 oziroma 0. Takšen rezultat bi pokazal slabo natančnost za eno ali obe metodi, ki jih preučujemo. Natančnost dveh metod lahko seveda določimo in primerjamo tudi z drugimi metodami. V praksi je zaželeno, da se to naredi, preden grafično prikažemo regresijsko premico primerjave metod – razlog za to je razložen spodaj. Druga točka, ki si jo moramo zapomniti je, da kljub temu, da je zaželeno primerjati metode v tako širokem območju koncentracij kot je mogoče, v praksi ni vedno možno dobiti realnih vzorcev, ki imajo koncentracije analitov, ki so enakomerno porazdeljene po celotnem območju. V danem primeru je pregledani sadni sok težil k temu, da pade v skupino s precej podobnimi koncentracijami svinca, tako vzorcev z vsebnostjo svinca med ca. 130 in 200  $\mu\text{g/L}$  in med 260 in 320  $\mu\text{g/L}$  ni bilo mogoče preučevati. Tudi k tej točki se bomo vrnili kasneje.





Slika 3.10. Primerjava dveh analiznih metod: graf prikazuje podatke, ki so na strani 63.

Kljub temu, da je skoraj univerzalno uporabljan pri primerjalnih študijah, je pristop, ki je tukaj opisan, odprt za resne teoretične ugovore. Prvič, kot je bilo poudarjeno skozi to poglavje, se regresijska premica  $y$  na  $x$  računa iz predpostavke, da so napake na vrednostih  $x$  zanemarljive – vse domnevne napake se pojavljajo v smeri  $y$ . Medtem ko je splošno veljavna pri določanju kalibracijskega grafičnega prikaza za posamezno analizno metodo, pa ta predpostavka očitno ne more biti opravičena, ko se regresijska premica uporablja za namene primerjanja. Pri takšnih primerjanjih lahko vzamemo kot zanesljivo, da se bodo slučajne napake pojavile pri obeh analiznih metodah, t.j. v obeh  $x$  in  $y$  smereh. To bi pokazalo, da uporabljene enačbe za računanje regresijske premice morda niso bile veljavne. Praktični testi in simulacije pa kažejo, da sedanji enostavni pristop daje presenetljivo zanesljive rezultate, pod pogojem, da so izpolnjeni trije pogoji.

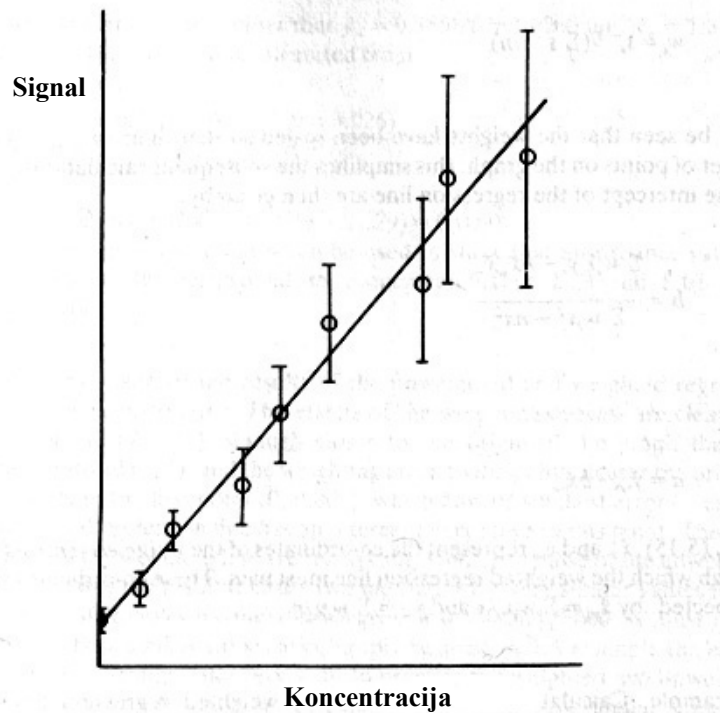
- i. Bolj natančna metoda je grafično prikazana na  $x$ -osi: to je razlog za izvajanje predhodnih raziskav natančnosti dveh metod – glej zgoraj.
- ii. Razumno število (najmanj 10) točk, ki so prikazane v primerjavi. Ker računanja meje zaupanja temeljijo na  $(n - 2)$  prostostnih stopnjah, se je še posebej pomembno izogniti nizkim vrednostim  $n$ .

- 
- iii. Eksperimentalne točke morajo pokriti koncentracijsko območje na približno enoten način: kot smo videli, je to zahtevo težko izpolniti pri primerjalnih študijah na resničnih vzorcih.

Obstaja še drugi teoretični ugovor uporabe regresijske premice  $y$  na  $x$ , kot je bilo izračunano v delih 3.4 in 3.5, pri primerjavi dveh analiznih metod. Ta regresijska premica predvideva, ne le da so napake smeri  $x$  nič, ampak tudi da je napaka pri vrednostih  $y$  *konstantna*, t.j. da se ne spreminja s koncentracijo in da imajo vse točke enako utežitev, ko se računata naklon in odsek premice. Očitno je, da v praksi ta predpostavka ne bo delovala. Pri veliko analizah je relativni standardni odmik (koeficient variacije) približno konstanten v določenem koncentracijskem območju: absolutna napaka se tako poveča s koncentracijo analita, ne pa da ima enake vrednosti pri vseh koncentracijah. Iz tega sledi, da imajo 'neutežene' regresijske premice vprašljivo vrednost v drugih situacijah, npr. ko jih uporabimo za kalibracijske grafične prikaze posameznega analiznega postopka. V principu bi morali namesto njih uporabljati utežene regresijske premice. Kljub teoretičnim ugovorom dajejo neutežene regresijske premice uporabne informacije pri primerjalnih študijah, pod pogojem, da so izpolnjeni zgoraj naštetih pogoji.

### **3.10 UTEŽENE REGRESIJSKE PREMICE**

Pripombe iz prejšnjega dela, o konvencionalnih ali neuteženih regresijskih izračunih nakazujejo, da bi morali izračune uteženih regresij uporabljati bolj pogosto, kot jih v resnici. Računi, ki jih uporabljamo pri metodah uteženih regresij so le malo bolj zapleteni kot tisti v prejšnjih delih, in jih lahko enostavno izvajamo na mikroračunalnikih, zahtevajo pa dodatne informacije o napakah, ki se pojavljajo na različnih koncentracijskih nivojih, ali vsaj oblikovanje dodatnih predvidevanj o takšnih napakah. To mogoče pojasnjuje, zakaj se izračunavanja uteženih regresij uporabljajo manj, kot bi se lahko. V tem delu je izpostavljena uporaba metod utežene regresije. Predpostavlja se, da se utežena regresijska premica uporablja pri določanju posameznega analita, ne pa pri primerjanju dveh ločenih metod.



Slika 3.11. Utežitev napak pri regresijskem izračunu

Bolj podrobno si pogledjmo enostavno situacijo, ki nastane, ko je napaka pri regresijskem izračunu približno sorazmerna s koncentracijo analita. Ko so napake v različnih točkah kalibracijskega grafa izražene s 'palicami napak' (slika 3.11), palice postanejo večje, ko se povečuje koncentracija. V tej situaciji je razvidno, da mora biti regresijska premica računana, da daje dodatno težo tistim točkam, kjer so palice napak najmanjše: bolj pomembno za izračunano premico je, da gre blizu mimo točk, ki predstavljajo višje koncentracije z večjimi napakami. Ta rezultat dosežemo, če vsako točko utežimo obratno sorazmerno z odgovarjajočo razliko,  $s^2$ ; ta logični postopek je za splošno uporabo. Če so tako označene posamezne točke z  $(x_1, y_1)$ ,  $(x_2, y_2)$  itd. kot ponavadi, in so ustrezni standardni odmiki  $s_1$ ,  $s_2$ , itd., potem so posamezne uteži,  $w_1$ ,  $w_2$ , itd. podane z:

$$w_i = \frac{s_i^{-2}}{\left( \sum_i s_i^{-2} / n \right)} \quad (3.13)$$

Videli bomo, da so bile uteži označene, tako da je njihova vsota enaka številu točk na grafu: to poenostavi nadaljnje izračunavanje. Naklon in odsek regresijske premice sta podana z:

$$b = \frac{\sum_i w_i x_i y_i - n \bar{x}_w \bar{y}_w}{\sum_i w_i x_i^2 - n \bar{x}_w^2} \quad (3.14)$$

in

$$a = \bar{y}_w - b \bar{x}_w \quad (3.15)$$

V enačbi (3.15),  $\bar{x}_w$  in  $\bar{y}_w$  predstavljata koordinate uteženega centroida,  $(\bar{x}_w, \bar{y}_w)$ , skozi katere mora potekati utežena regresijska premica. Koordinate so po pričakovanjih podane z

$$\bar{x}_w = \sum_i w_i x_i / n \quad \text{in} \quad \bar{y}_w = \sum_i w_i y_i / n.$$

*Primer.* Izračunajmo neuteženo in uteženo regresijsko premico za sledeče kalibracijske podatke. Za vsako premico izračunajmo tudi koncentracije testnih vzorcev z absorbanco 0.100 in 0.600.

Koncentracija, $\mu\text{g/mL}$	0	2	4	6	8	10
Absorbanca	0.009	0.158	0.301	0.472	0.577	0.739
Standardni odmik	0.001	0.004	0.010	0.013	0.017	0.022

Uporaba enačb (3.4) in (3.5) kaže, da sta naklon in odsek *neutežene* regresijske premice 0.0725 oziroma 0.0133. Koncentracije, ki se ujemajo z absorbanco 0.100 in 0.600 znašajo 1.20 oziroma 8.09  $\mu\text{g/mL}$ .

Nekoliko težje je izračunati uteženo regresijsko premico: če nimamo na voljo primernega računalniškega programa, je ponavadi potrebno narediti sledečo tabelo:

$x_i$	$y_i$	$s_i$	$1/s_i^2$	$w_i$	$w_i x_i$	$w_i y_i$	$w_i x_i y_i$	$w x_i^2$
0	0.009	0.001	1000000	5.535	0	0.0498	0	0
2	0.158	0.004	62500	0.346	0.692	0.0547	0.1093	1.384
4	0.301	0.010	10000	0.055	0.220	0.0166	0.0662	0.880
6	0.472	0.013	5917	0.033	0.198	0.0156	0.0935	1.188
8	0.577	0.017	3460	0.019	0.152	0.0110	0.0877	1.216
10	0.739	0.022	2066	0.011	0.110	0.0081	0.0813	1.100
		<b>SUMS:</b>	<b>1083943</b>	<b>5.999</b>	<b>1.372</b>	<b>0.1558</b>	<b>0.4380</b>	<b>5.768</b>

Iz teh števil je jasno, da je  $\bar{y}_w = 0.1558/6 = 0.0260$  in  $\bar{x}_w = 1.372/6 = 0.229$ . Z enačbo (3.14) izračunamo  $b$

$$b = \frac{0.483 - (6 \times 0.229 \times 0.026)}{5.768 - [6 \times (0.229)^2]} = 0.0738$$

tako je  $a$  podan z  $0.0260 - (0.0738 \times 0.229) = 0.0091$ .

Vrednosti za  $a$  in  $b$  lahko uporabimo, da pokažemo, da vrednosti absorbance 0.100 in 0.600 sovpadajo s koncentracijami 1.23 oziroma 8.01  $\mu\text{g/mL}$ .

Pazljiva primerjava rezultatov neuteženega in uteženega računanja je zelo poučna. Učinki uteženega postopka so jasni. Uteženi centroid  $(\bar{x}_w, \bar{y}_w)$  je veliko bliže izvoru grafa kot neuteženi centroid  $(\bar{x}, \bar{y})$ , utežitev pa je postavljena k točkam, ki so bliže izvoru – in še posebej k prvi točki (0.009), ki ima najmanjšo napako – zagotavlja, da ima utežena regresijska premica presečišče zelo blizu te točke. Naklon in odsek utežene premice sta izredno podobna tistim neutežene premice, vendar z rezultatom, da data dve metodi zelo podobne vrednosti za koncentracije vzorcev, ki imajo absorbanco 0.100 in 0.600. Ne smemo predpostavljati, da se te podobne vrednosti pojavijo enostavno, ker se v tem primeru eksperimentalne točke zelo dobro prilegajo premici. V praksi imajo utežene in neutežene regresijske premice, ki izhajajo iz niza eksperimentalnih podatkov, podobne naklone in odeke, tudi če so točke močno razmetane okoli premice.

Izračuni utežene regresije zahtevajo več informacij (v obliki ocen standardnih odmikov v različnih točkah grafa), ter so veliko bolj kompleksni za izvrševanje, ampak dajo podatke, ki so znatno podobni tistim, ki jih dobimo pri veliko enostavnejših metodah neutežene regresije. Takšna razmišljanja lahko dejansko pripomorejo k široko razširjenemu zapostavljanju izračunavanj utežene regresije v praksi. Vendar pa se analizni kemik, ki uporablja instrumentalne metode, ne poslužuje regresijskih izračunavanj le, da bi določil naklon in odsek kalibracijskega grafičnega prikaza in koncentracije testnih vzorcev. Hoče tudi dobiti ocene napak ali mejo zaupanja za tiste koncentracije, v tem kontekstu pa je tudi, da metoda utežene regresije da veliko bolj realne rezultate. V delu 3.6 smo uporabili enačbo (3.9), da bi ocenili standardni odmik ( $s_{x_0}$ ) in iz njega intervale zaupanja koncentracije, ki je bila

izračunana z uporabo posamezne  $y$ -vrednosti in neutežene regresijske premice. Uporaba te enačbe za podatke iz zgornjega primera pokaže, da znaša neutežena meja zaupanja za raztopino, ki ima absorbanco 0.100 in 0.600,  $1.20 \pm 0.65$  oziroma  $8.09 \pm 0.63$   $\mu\text{g/mL}$ . Kot v primeru v delu 3.6 je interval zaupanja zelo podoben. V trenutnem primeru je takšen rezultat popolnoma nerealističen. Eksperimentalni podatki kažejo, da napake  $y$  - vrednosti naraščajo s tem, ko narašča sam  $y$ , kar je stanje, ki se pričakuje pri metodi, ki ima približno konstanten relativni standardni odmik. Pričakovali bi, da bi se povišanje z  $s_i$  povišanjem  $y$  tudi odražalo pri meji zaupanja določene koncentracije; meja zaupanja za raztopino z absorbanco 0.600 bi morala biti veliko večja (t.j. slabše), kot tiste za raztopino z absorbanco 0.100.

Pri izračunavanju utežene regresije, je standardni odmik ( $s_{x_{0w}}$ ) predvidene koncentracije podan z:

$$s_{x_{0w}} = \frac{s_{(y/x)_w}}{b} \left\{ \frac{1}{w_0} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y}_w)^2}{b^2 \left( \sum_i w_i y_i^2 - n\bar{x}_w^2 \right)} \right\} \quad (3.16)$$

Pri tej enačbi je  $s_{(y/x)_w}$  podan z:

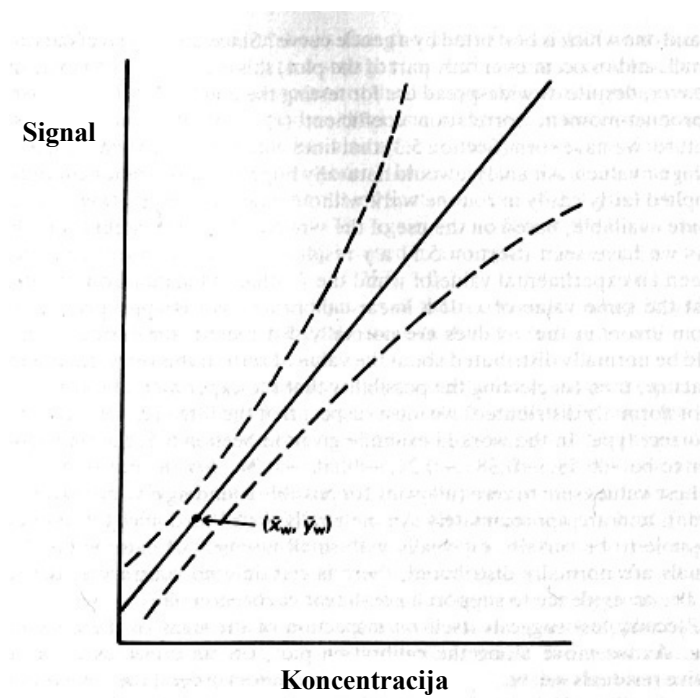
$$s_{(y/x)_w} = \left\{ \frac{\left( i \sum w_i y_i^2 - n\bar{y}_w^2 \right) - b^2 \left( \sum_i w_i x_i^2 - n\bar{x}_w^2 \right)}{n-2} \right\}^{\frac{1}{2}} \quad (3.17)$$

$w_0$  je utežitev primerna vrednosti  $y_0$ . Enačba (3.16) je po obliki jasno podobna enačbi (3.9). Potrjuje, da bodo točke blizu izvoru, kjer so utežitve največje, in točke blizu centroida, kjer je  $y_0 - \bar{y}_w$  majhen, imele najnižjo mejo zaupanja (slika 3.12). Največja razlika med tema dvema enačbama je izraz  $1/w_0$  v enačbi (3.16). Ker  $w_0$  strmo pada, ko  $y$  narašča, nam ta izraz zagotavlja, da meja zaupanja narašča z naraščajočim  $y_0$ , kot je pričakovati.

Uporaba enačbe (3.16) za podatke v zgornjem primeru nam pokaže, da imajo testni vzorci z absorbanco 0.100 in 0.600 intervale zaupanja za izračunane koncentracije ( $1.23$  in  $8.01$   $\mu\text{g/mL}$ )  $\pm 0.12$  oziroma  $\pm 0.72$   $\mu\text{g/mL}$ . Opazimo, da so intervali zaupanja sorazmerni z opazovanimi absorbcami dveh raztopin. V nadaljevanju je interval zaupanja za manj

koncentriranega od obeh vzorcev manjši kot pri izračunavanju neuteženih regresij, medtem ko za bolj koncentrirani vzorec drži nasprotno. Vsi ti rezultati veliko bolj sovpadajo z realnostjo kalibracijskih eksperimentov kot rezultati izračunavanja neutežene regresije.

Tako lahko povzamemo, da kljub temu, da so izračunavanja utežene regresije bolj zapletena kot njihova neutežena nasprotja, dajo veliko bolj realne rezultate za mejo zaupanja napovedanih koncentracij pri običajni instrumentalni analizi. Danes so na voljo računalniški programi za izračunavanje utežene regresije za različne vrste osebnih računalnikov in bi morali vzpodbuditi bolj razširjeno uporabo te metode.



Slika 3.12 Splošna oblika meje zaupanja za koncentracijo določeno z uporabo utežene regresijske premice

### 3.11 LINEARNA REGRESIJA ZA KRIVULJE – UVOD

Do sedaj je bila naša razprava o kalibracijskih metodah omejena na eksperimente, kjer lahko predpostavljamo, da je instrumentalni odziv sorazmeren koncentraciji analitov. Ta predpostavka je pogosto veljavna, ker so imeli analizni kemiki vedno – do nedavnega – raje takšne metode glede na zapletenost izračunavanj prileganja krivulj, in se tako poslužujejo ukrepov, da zagotovijo linearnost odziva na širšem koncentracijskem območju. Primeri

---

takšnih ukrepov zajemajo kontrolo emisije širine linije votle katodne svetilke pri spektrometriji atomskega vpivanja. Kljub prizadevanjem daje veliko analitičnih metod zakrivljene kalibracijske grafične prikaze. Posebej pogosta je situacija, kjer je kalibracijski grafični prikaz linearen (ali približno tako) pri nizkih analitičnih koncentracijah, pri višjih analitičnih stopnjah pa postane zakrivljen. V drugih primerih pa je kalibracijski grafični prikaz zakrivljen pri vseh koncentracijah.

Prvo vprašanje, ki ga moramo raziskati je – kako odkrijemo zakrivljenost pri kalibracijskem grafičnem prikazu? To pomeni, kako razlikujemo med grafičnim prikazom, ki se mu najbolj prilaga premica, in tistim, ki se mu najbolj prilaga rahla krivulja? Ker je stopnja ukrivljenosti lahko majhna, in/ali se pojavi le v delu grafičnega prikaza, to seveda ni brezpredmetno vprašanje. Kljub njegovi široko razširjeni uporabi za testiranje primernosti prilagajanja linearnih grafov, ima korelacijski koeficient ( $r$ ) majhno vrednost pri testiranju za ukrivljenost; videli smo, da lahko dajo linije z očitno ukrivljenostjo še zelo visoke vrednosti  $r$ . Analitik pa seveda upa, da bi katerikoli test za ukrivljenost lahko bil dokaj enostaven za uporabo brez prekomernega računanja. Na voljo je veliko testov, ki temeljijo na uporabi  $y$ -ostankov na kalibracijskem grafičnem prikazu.

Kot smo videli (del 3.5), predstavlja  $y$ -ostanek,  $y_i - \hat{y}_i$ , razliko med eksperimentalno vrednostjo  $y$  in  $\hat{y}$  vrednostjo, izračunano iz regresijske premice pri enaki vrednosti  $x$ . Če je linearni grafični prikaz primeren, in če so slučajne napake  $y$ -vrednosti običajno porazdeljene, bi morali biti ostanki normalno porazdeljeni okoli vrednosti nič. Če se izkaže, da v praksi to ne drži, potem (če zanemarimo možnost, da eksperimentalne napake niso porazdeljene na običajen način) moramo domnevati, da prilegajoča regresijska premica ni pravilna. V obdelanem primeru v delu 3.5, so bile  $y$ -vrednosti prikazane kot +0.58, -0.38, -0.24, -0.50, +0.34, +0.18, ter +0.02. Jasno je, da te vrednosti dajo vsoto nič (možne so napake pri zaokrožanju), in so približno simetrično porazdeljene okoli 0. Čeprav je nemogoče biti prepričan, še posebej pri nizkih številkah podatkovnih točk, da so ostanki normalno porazdeljeni, pa v tem primeru sigurno ne obstaja noben nasprotni dokaz, t.j. ni dokaza, ki bi podpiral ne-linearni kalibracijski grafični prikaz.



Drugi test namiguje na pregled znakov ostankov, ki so podani zgoraj. Ko se premikamo po kalibracijskem grafičnem prikazu, t.j. ko  $x$  narašča, pričakujemo, da se bodo pojavili pozitivni in negativni ostanki v slučajnem vrstnem redu, če se podatki dobro prilegajo premici. Če pa, nasprotno, poizkušamo prilagoditi premico vrsti točk, ki v bistvu ležijo na rahli krivulji, potem predznaki ostankov ne bodo več imeli slučajnega vrstnega reda, ampak se bodo pojavljali v *sosledjih* pozitivnih in negativnih vrednosti. Če še enkrat pogledamo zgoraj podane ostanke, vidimo, da je vrstni red predznakov  $+ - - - + + +$ . Za preizkus, ali sosledje  $+ -$  ostankov kaže potrebo po ne-linearni regresijski premici, moramo vedeti, kakšna je verjetnost, da bi se tak vrstni red lahko pojavil slučajno. Na žalost majhno število podatkovnih točk povzroči, da se ta in ostala sosledja lahko pojavljajo slučajno, tako je treba biti zelo previden pri izvajanju kakršnihkoli zaključkov. Izbira med metodama premice in ukrivljeno linearne regresije je verjetno najboljša, če uporabimo spodaj navedene tehnike prilagajanja krivulje.

V situaciji, kjer je kalibracijski grafični prikaz na enem delu linearen in drugje ukrivljen, je zelo pomembno, da analizni kemik določi območje, kjer lahko pričakujemo linearnost. Možni pristopi k temu problemu so izpostavljeni v naslednjem primeru.

*Primer.* Preglejmo linearno kalibracijsko območje sledečega fluorescenčnega eksperimenta.

<b>Intenziteta fluorescence</b>	0.1	8.0	15.7	24.2	31.5	33.0
<b>Koncentracija, <math>\mu\text{g/mL}</math></b>	0	2	4	6	8	10

Pregled podatkov kaže, da se del grafa, ki je blizu izvora, ujema s premico, ki ima presečišče blizu nič in naklon okoli 4. Fluorescenca 10-  $\mu\text{g/mL}$  standardne raztopine je očitno nižja, kot bi bilo pričakovati, obstaja pa tudi možnost, da je izginotje linearnosti vplivalo tudi na fluorescenco 8-  $\mu\text{g/mL}$  standarda. Za vse podatke najprej uporabimo (neuteženo) računanje linearne regresije. Uporaba metod iz delov 3.3 in 3.4 nam da rezultate:  $a = 1.357$ ,  $b = 3.479$  in  $r = 0.9878$ . Ponovno se spomnimo, da je lahko visoka vrednost  $r$  varljiva, vendar se lahko uporablja za primerjanje. Ugotovili smo, da so  $y$ -ostanki  $-1.257$ ,  $-0.314$ ,  $+0.429$ ,  $+1.971$ ,  $+2.314$  in  $-3.143$ , vsota kvadratov ostankov pa znaša 20.981. Tendanca pri vrednostih ostankov je, da je zadnja vrednost v tabeli verjetno zunaj linearne območja.

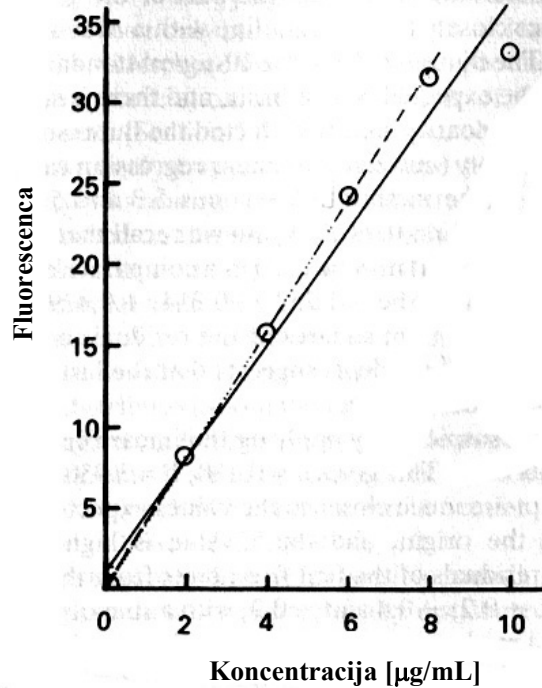
---

Predvidevanje potrdimo z uporabo enačb linearne regresije za prvih pet točk. To nam da  $a = 0.100$ ,  $b = 3.950$  in  $r = 0.9998$ . Naklon in odsek sta veliko bližje vrednostim, ki smo jih pričakovali za tisti del grafa, ki je bližje izvoru, vrednost  $r$  pa je višja kot pri prvem izračunu. Ostanke prvih petih točk pri drugi regresijski enačbi so 0, 0, -0.2, +0.4 in -0.2, vsota kvadratov pa je le 0.24. Uporaba druge regresijske enačbe kaže, da je fluorescenca, ki smo jo pričakovali od 10-  $\mu\text{g/mL}$  standarda 39.6, t.j. ostanek je -6.6. Uporaba  $t$ -testa bi pokazala, da je zadnji ostanek bistveno večji kot povprečje ostalih ostankov. Ogromen ostanek pri zadnji točki, združen z zelo nizkimi ostanki za ostalih pet točk in močno zmanjšana vsota kvadratov potrjujejo, da se linearno območje metode ne razteza do 10  $\mu\text{g/mL}$ .

Ko smo ugotovili, da je lahko zadnja podatkovna točka izključena iz linearne območja, lahko ponovimo postopek, da preučimo točko (8, 31.5). To naredimo z računanjem regresijske premice le za prve štiri točke v tabeli, z rezultati  $a = 0$ ,  $b = 4.00$ ,  $r = 0.9998$ . Vrednost korelacijskega koeficienta kaže, da se premica približno tako dobro prilega točkam, kot prejšnja, pri katerih je uporabljenih pet točk. Ostanke za ta tretji izračun so +0.1, 0, -0.3 in +0.2, s vsoto kvadratov 0.14. S to kalibracijsko premico je  $y$ -ostanek za 8-  $\mu\text{g/mL}$  raztopino -0.5; ta vrednost je višja kot ostali ostanke, ampak verjetno ne za veliko. Tako lahko povzamemo, da je dokaj varno v linearno območje metode vključiti točko (8, 31.5). Pri sprejemanju te postranske odločitve bo analizni kemik upošteval točnost, ki je potrebna pri rezultatih, ter zmanjšal vrednost metode, za katero je kalibracijsko območje zelo kratko. Zgoraj opisani izračuni so povzeti v sliki 3.13.

Ko sprejmemo odločitev, da se vrsta kalibracijskih točk ne more zadovoljivo prilagoditi premici, lahko analitik igra še na eno karto preden se preda zapletenosti izračunavanj ukrivljeno linearne regresije. Podatke lahko tako **preoblikuje**, da je ne-linearni medsebojni odnos spremenjen v linearnega. Takšne preobrazbe se pogosto izvajajo z rezultati določenih analiznih metod. Moderni paketi računalniškega programa za interpretacijo podatkov imunske analize pogosto ponujajo odločitev za preoblikovanje: splošno uporabljene metode zajemajo grafični prikaz  $\log y$  in/ali  $\log x$  namesto  $y$  in  $x$ , ali uporabo logit funkcij ( $\text{logit } x = \ln[x/(1-x)]$ ). Pomembno si je zapomniti, da lahko preoblikovanja vplivajo tudi na značaj napak na različnih točkah kalibracijskega grafičnega prikaza. Predpostavljajmo, da so v nizu meritev oblike  $y = px^q$  obsegi slučajnih napak pri  $y$  neodvisni od  $x$ .

Preoblikovanje podatkov v linearno obliko z uporabo logaritmov bo očitno dalo podatke, pri



Slika 3.13 Ukrivljeno linearna regresija: identifikacija linearnega območja. Uporabljeni so podatki na strani 73; neutržena regresijska premica skozi vse točke (—), skozi prvih pet točk (---), ter skozi prve štiri točke (.....).

katerih napake pri  $\log y$  niso neodvisne od  $\log x$ . V tem primeru, in pri vseh drugih oblikah, kjer je pričakovana oblika enačbe znana iz teoretičnih predlog ali iz dolgo trajajočih izkušenj, je mogoče, da uporabimo uteženo regresijsko enačbo (del 3.10), da preoblikujemo podatke. Pokažemo lahko, da če so podatki splošnih oblik  $y = f(x)$  preoblikovani v linearno enačbo  $Y = BX + A$ , je utežni faktor,  $w_i$ , uporabljen v enačbah (3.14)-(3.17), pridobljen iz odnosa:

$$w_i = (1/[dY_i / dy_i])^2 \quad (3.18)$$

V tem primeru,  $y = px^q$ , tako je  $Y = \ln y$ , in  $dY_i/dy_i = d \ln y_i/dy_i = 1/y_i$ . Torej sledi  $w_i = y_i^2$ . Na žalost pri analizi kemiji ni veliko primerov, kjer so natančne matematične oblike zagotovo znane, tako ima ta pristop omejeno vrednost.

Zapomniti si je potrebno tudi, da so lahko, v nasprotju s situacijo opisano v prejšnjem odstavku, rezultati preoblikovani tako, da dajo podatke, ki jih lahko obdelujemo z neutženimi

---

metodami. Podatki v obliki  $y = bx$  z napakami  $y$ -smeri močno odvisnimi od  $x$ , so včasih podvrženi preoblikovanjem log-log. Napake pri log  $y$  potem manj variirajo glede na log  $x$ , tako lahko preučujemo preoblikovane podatke z neutruženimi regresijskimi enačbami.

### 3.12 PRILAGAJANJE KRIVULJE

Glede na težave, ki se pojavljajo pri preoblikovanju podatkov, ter na naraščanje enostavnosti, s katero lahko izračunamo, da se krivulje lahko prilagodijo kalibracijskim točkam, so metode krivulj dokaj pogoste pri analizi kemiji. Pomembno je vedeti, da ukrivljeni kalibracijski grafični prikazi, ki jih srečamo v praksi, velikokrat nastanejo iz postavitve dveh ali več fizikalnih ali kemijskih pojavov. Tako bodo v molekularni fluorescenčni spektrometriji grafični prikazi signal proti koncentracij, v zelo razredčeni raztopini pogosto približno linearni, ampak bodo kazali naraščajoče (negativne) ukrivljenosti pri višjih koncentracijah zaradi (a) optičnih izdelkov (učinki notranjega filtra), (b) medmolekularno delovanje, ter (c) neuspeh algebričnih predpostavk, iz katerih je bil oblikovan linearni grafični prikaz. Učinki (a) – (c) so neodvisni drug od drugega, tako se v praksi lahko pojavi veliko krivulj različnih oblik. Zaradi tega pri analiznem delu tako poredko srečamo kalibracijske krivulje znanih in predvidljivih oblik. V praksi je bolj običajna strategija, da prilagodimo krivuljo, ki je polinomna, v  $x$ , t.j.  $y = a + bx + cx^2 + dx^3 + \dots$ . Matematični problemi, ki jih je potrebno rešiti so (i) koliko izrazov mora biti vključenih v polinom, in (ii) kakšne vrednosti morajo imeti koeficienti  $a, b$  itd? Paketi računalniškega programa, ki se nanašajo na te probleme so ponavadi iterativni: najprej se prilagajajo premici, potem kvadratni krivulji, potem kubični krivulji in tako naprej do podatkov in podajo uporabniku potrebne informacije, da se odloči, katera teh enačb je najprimernejša. Preden podrobneje pogledamo, kako se sprejemajo te odločitve, je pomembno omeniti, da v praksi kvadratne ali kubične enačbe niso popolnoma primerne za prilagajanje podatkom: polinomi z veliko izrazi so skoraj zagotovo fizikalno brez pomena in bistveno ne izboljšajo analiznih rezultatov. Kakorkoli že, če ima graf  $n$  kalibracijskih točk, potem je največji dopustni polinom tisti reda  $(n - 1)$ .

Kako se potem odločimo, ali je najboljša kvadratna ali kubična krivulja za prilagajanje kalibracijskih podatkov? Tako kot v primeru grafičnega prikaza premice se zdi smiselno uporabiti kriterij 'najmanjših kvadratov', da se odločimo za kvaliteto prilagoditve, t.j.

stremimo k zmanjšanju vsote kvadratov  $y$ -ostankov. Ta pristop nam dovoljuje uporabo enostavne analize izračunavanja variance (ANOVA), da bi ocenili kvaliteto zaporednih polinomov. Ti izračuni predpostavljajo, da se pojavljajo slučajne napake le v smeri  $y$ , ter deluje kot sledi: če imajo posamezne kalibracijske točke vrednosti  $y_1, y_2, \dots, y_i, \dots, y_n$ , in običajno srednjo vrednost  $\bar{y}$ , potem je izraz  $\sum [y_i - \bar{y}]^2$  znan kot 'vsota kvadratov (SS) okoli  $\bar{y}$ '. Pokažemo lahko, da je enak vsoti dveh drugih izrazov, 'vsoti kvadratov nastali zaradi regresije' ( $\sum [\hat{y}_i - \bar{y}]^2$ ), ter 'vsoti kvadratov okoli regresije' ( $\sum [y_i - \hat{y}_i]^2$ ). Vsota kvadratov nastala zaradi regresije je očitno del  $\sum [y_i - \bar{y}]^2$ , ki je nastal zaradi uspešnega prilagajanja enačbe podatkovnim točkam – zato mora biti tako velik, kot je mogoče. Nasprotno pa je vsota kvadratov okoli regresije jasno enaka vsoti kvadratov  $y$ -ostankov ('vsota ostankov kvadratov'), ki mora biti tako majhna, kot je mogoče, če naj bo krivulja dobro prilagojena podatkovnim točkam. Tako lahko definiramo  $R^2$ , **koeficient določitve**, kot

$$R^2 = \frac{\text{SS zaradi regresije}}{\text{skupen SS}} = 1 - \frac{\text{ostanek SS}}{\text{skupen SS}} \quad (3.19)$$

$R^2$  (včasih imenovan tudi medsebojni korelacijski koeficient) jasno variira med 0 in 1, kjer druga predstavlja popolno prilagoditev krivulje podatkovnim točkam. Pokažemo lahko, da je, v primeru grafa premice,  $R^2 = r^2$ , kvadrat korelacijskega koeficienta. Izraz **koeficient nedoločitve** se včasih nanaša na  $1 - R^2$ . Če povzamemo, izračunavanja ANOVA, ki jih dajo programi prilagajanja krivulj, razdelijo skupno vsoto kvadratov  $y_i$ -vrednosti okoli  $\bar{y}$  (ta vsota je seveda konstanta za katerikoli dani niz podatkov), v dve komponenti, katerih prispevek k skupni vsoti variira glede na primernost prilagoditve, podane z  $R^2$ .

Pri odločanju, kateri polinom da boljše prilagoditve nizu kalibracijskih točk, ki ležijo na krivulji, bi se tako zdelo, da moramo le izračunati  $R^2$  vrednosti za enačbe premice, kvadratne, kubične krivulje itd., in opustiti našo raziskavo, ko  $R^2$  ne bi več naraščal. Na žalost se izkaže, da dodajanje novega izraza k polinomu *vedno* povečuje vrednost  $R^2$ , tudi če je to majhna količina. Veliko programov omogoča dodatno ali alternativno statistiko, ponavadi znano kot 'prilagojen  $R^2$ ' ali  $R^2$ , ki se raje poslužuje srednjih vrednosti kvadrata (MS), kot pa vsote kvadratov, in je podan z:

$$R^2 = 1 - \frac{\text{ostanek MS}}{\text{skupen MS}} \quad (3.20)$$

$R^2$  upošteva, da se število prostostnih stopenj ostanka pri polinomni regresiji (podani z  $[n - k - 1]$ ), kjer je  $k$  število izrazov pri regresijski enačbi, ki vsebuje funkcijo  $x$ ), spreminja, ko se spreminja red polinomov. Kot kaže sledeči primer, je  $R^2$  vedno manjši kot  $R^2$ .

*Primer.* Pri instrumentalni analizi smo dobili naslednje podatke (poljubne enote):

<b>Koncentracija</b>	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>Signal</b>	0.2	3.6	7.5	11.5	15.0	17.0	20.4	22.7	25.9	27.6	30.2

Tem rezultatom prilagodimo ustrezeni polinom in ga uporabimo za oceno koncentracij, ki odgovarjajo signalu 5, 16 in 27 enot.

Celo običajni pregled podatkov nakazuje, da mora biti kalibracijski grafični prikaz krivulja, je pa vseeno poučno izračunati premico z metodo najmanjših kvadratov skozi točke z uporabo metode opisane v delu 3.4. Izkaže se, da ima premica enačbo  $y = 2.991x + 1.555$ . Ko računamo tabelo ANOVA za podatke, se izkaže, da ima naslednjo obliko:

Vir variacij	Vsota kvadratov	Prostostne topnje	Srednji kvadrat
<b>Regresija</b>	984.009	1	984.009
<b>Ostane</b>	9.500	9	1.056
<b>Skupna vsota</b>	993.509	10	99.351

Pokažemo lahko, da je v takšni tabeli število prostostnih stopenj za variacije, nastale zaradi regresije enako  $k$ , številu izrazov pri regresijski enačbi, ki vsebuje  $x$ ,  $x^2$ , itd. Pri premici je  $k$  jasno 1, ker imamo le izraz, ki vsebuje sam  $x$ . Ker imamo pri izračunu le eno omejitev (da je vsota ostankov nič), je skupno število prostostnih stopenj  $n - 1$ . Tako je število prostostnih stopenj določenih za ostanke v tem primeru  $(n - k - 1) = (n - 2)$ . Iz podatkov v ANOVA tabeli je jasno da je  $R^2$  podan z  $984.009/993.509 = 0.99044$ , t.j. 99.044 %. Morda se zdi, da je enačba, ki da 99 % odnos med  $x$  in  $y$  zelo zadovoljiva, ampak, kot je primer s korelacijskim koeficientom,  $r$ , moramo biti zelo previdni pri interpretaciji absolutnih vrednosti  $R^2$ ; kmalu bo postalo očitno, da kvadratna krivulja omogoča veliko boljšo prilagoditev za podatke. Izračunamo lahko tudi ujemanje vrednosti  $R^2$  iz enačbe (3.20); podana je z  $(1 - [1.056/99.351]) = 0.98937$ , t.j. 98.937 %.

Opazili smo že, da pregled ostankov ponavadi daje dragocene informacije o uspehu kalibracijske enačbe. Veliko računalniških programov omogoča pridobivanje naslednjega:

$x$	$y_i$	$\hat{y}_i$	<b>y-ostanek</b>
0	0.2	1.6	- 1.4
1	3.6	4.5	- 0.9
2	7.5	7.5	0
3	11.5	10.5	1.0
4	15.0	13.5	1.5
5	17.0	16.5	0.5
6	20.4	19.5	0.9
7	22.7	22.5	0.2
8	25.9	25.5	0.4
9	27.6	28.5	- 0.9
10	30.2	31.5	- 1.3

V tej tabeli so bila števila v desnih dveh stolpcih zaokrožena na eno decimalno mesto zaradi enostavnosti. Tendenca pri predznakih in obsegih ostankov, ki so negativni pri nizkih  $x$  - vrednostih, da se povečajo na pozitivni maksimum, in se potem vrnejo v negativne vrednosti, je takoj očitna, in je zanesljiv znak, da premica ni primerna prilagoditev za podatke.

Ko so podatki prilagojeni s krivuljo kvadratne oblike, je enačba sledeča:  $y = 0.086 + 3.970x - 0.098x^2$ , tabela ANOVA pa ima obliko:

<b>Vir variacij</b>	<b>Vsota kvadratov</b>	<b>Prostostne stopnje</b>	<b>Srednji kvadrat</b>
<b>Regresija</b>	992.233	2	496.116
<b>Ostane</b>	1.276	8	0.160
<b>Skupna vsota</b>	993.509	10	99.351

Opazimo, da so se število prostostnih stopenj za regresijo in ostanki virov variacij spremenili glede na zgoraj opisana pravila, skupni seštevek variacij pa je seveda enak kot pri prvi ANOVA tabeli. Tukaj lahko pokažemo, da je  $R^2 = 992.233/993.509 = 0.99872$ , t.j. 99.872%. Ta številka je opazno večja kot vrednost 99.044%, ki smo jo dobili pri linearnem grafičnem prikazu, pa tudi prilagojena vrednost  $R^2$  je višja pri  $(1 - [0.160/99.351]) = 0.99839$ , t.j. 99.839%. Ko računamo  $y$ -ostanke, so njihovi predznaki (po naraščajočem redu  $x$ -vrednosti): + - - + +

- + - + - + : tukaj ni nobene očitne tendence, tako je jasno, da moramo na vseh podlagah najprej izvesti kvadratno in potem linearno prilagoditev.

Na koncu pa ponovimo še izračun za kubično prilagoditev. Za to je najboljša enačba  $y = -0.040 + 4.170x - 0.150x^2 + 0.0035x^3$ . Kubični koeficient je zelo nizek, zato je vprašljivo, ali je ta enačba bistveno boljša prilagoditev kot kvadratna. Vrednost  $R^2$  je, neizogibno, rahlo višja kot tista za kvadratno krivuljo (99.879% v primerjavi z 99.872%), vrednost prilagojenega  $R^2$  pa je rahlo *nižja* kot kvadratna vrednost pri 99.827%. Vrstni red predznakov ostankov je enak kot pri kvadratni prilagoditvi. Ker ni smiselno vključevati nepotrebnih izrazov, smo lahko prepričani, da je v tem primeru zadovoljiva kvadratna prilagoditev.

Ko za oceno koncentracij, ki odgovarjajo instrumentalnim signalom 5, 16 in 27 enot, uporabimo zgornje enačbe, so rezultati ( $x$ -vrednosti v poljubnih enotah):

	Linearna	Kvadratna	Kubična
$y=5$	1.15	1.28	1.27
$y=16$	4.83	4.51	4.50
$y=27$	8.51	8.61	8.62

Kot je bilo pričakovati, razlike med izračunanimi koncentracijami iz kvadratnih in kubičnih enačb niso bistvene, tako zaradi enostavnosti uporabljamo kvadratne enačbe.

Že prej v tem delu smo omenili, da ne-linearni kalibracijski grafi nastanejo zaradi istočasnega pojava številnih fizikalno kemičnih in/ali matematičnih pojavov, tako je smiselno predpostavljati, da nobena posamezna matematična funkcija ni sposobna popolnoma zadovoljivo opisati kalibracijske krivulje. Tako se zdi logično, da poizkusimo prilagoditi točke krivulji, ki je sestavljena iz veliko povezanih delov, katerih matematične oblike so lahko različne. To je pristop, ki se zadnje čase uporablja vse pogosteje skozi uporabo **zlepljenih funkcij**. **Kubični 'zlepki'** se v praksi najpogosteje uporabljajo, to pomeni, da je zadnja krivulja sestavljena iz niza povezanih delov kubične oblike. Ti deli morajo na svojih stičiščih ('vozlih') jasno oblikovati neprekinjeno krivuljo, tako morata biti prva dva diferencialna koeficienta vsake krivulje v kateremkoli vozlu identična. Za ocenjevanje obojega, števila vozlov in enačb krivulj, ki jih povezujejo, uporabljajo veliko število različnih metod; te tehnike so prezahtevne, da bi jih sedaj podrobno obravnavali, vendar pa moramo



---

omeniti, da je na voljo veliko paketov statističnih računalniških programov, ki to omogočajo, in da je bil pristop funkcije zlepka uspešno uporabljen pri različnih analiznih metodah, tudi pri plinski kromatografiji in atomski emisijski spektrometriji.

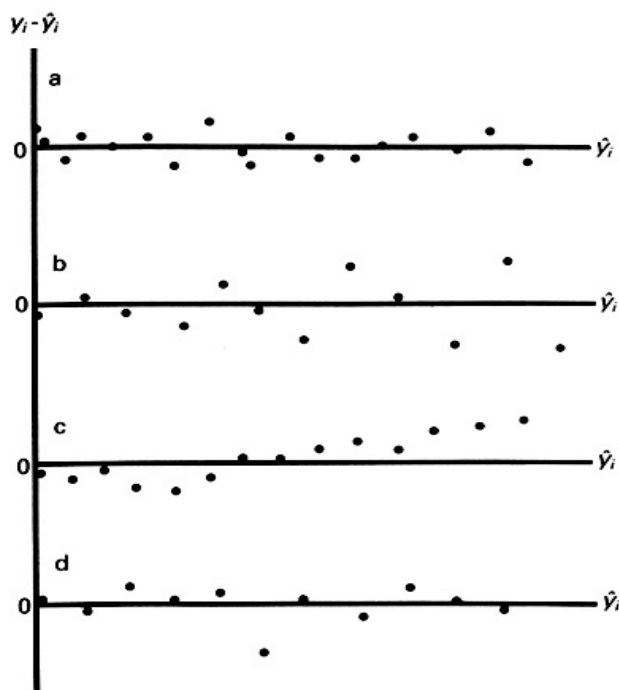
Upravičeno je vprašati, ali je v primeru kalibracijskega grafičnega prikaza, katerega ukrivljenost ni premočna, mogoče, da ne naredimo najlažjega zaključka ideje zlepkov in narišemo krivuljo kot niz premic, ki povezujejo zaporedne točke. Ta metoda je seveda popolnoma nenatančna in nam ne bi dala nobenih informacij o natančnosti, s katero se lahko določajo  $x$ -vrednosti. Za  $y$ -vrednosti 5, 16 in 27 daje ta metoda linearne interpolacije med zaporednimi točkami za  $x$ -vrednosti 1.36, 4.50 oziroma 8.65 enot. Primerjava z zgornjimi tabelami kaže, da bi bili ti rezultati, še posebej zadnja dva, dokaj sprejemljivi za veliko namenov.

### 3.13 Odstopanja pri regresiji

Ti nepravilni rezultati se neizogibno pojavijo pri kalibracijskih eksperimentih, kakor tudi pri ponavljajočih meritvah, vendar se je težje spopasti z njimi pri regresijski statistiki, raziskovalci pa nadaljujejo z odkrivanjem novih pristopov na tem področju. Ena težava je, da kljub temu, da bi posamezne  $y_i$ -vrednosti pri kalibraciji naj bile neodvisne ena od druge, ostanki ( $y_1 - \hat{y}_1$  itd.) niso neodvisni eden od drugega, ker je njihova vsota vedno nič. Zato običajno ni dopustno vzeti ostanke, kot da bi bili običajen niz ponavljajočih meritev, in uporabiti  $Q$ -test za prepoznavanje odstopanj. (Če je število  $y_i$ -vrednosti veliko – pogoj, ki ga običajno ne srečamo pri analiznem delu – lahko to prepoved sprostimo).

Kako lahko potem prepoznamo odstopanja pri tipičnem kalibracijskem eksperimentu? Najprej opazimo, da je v primerih, kjer se je pojavila očitna napaka, kot je napaka pri pisanju, ali motnja, naravno in dovoljeno zavrniti meritve (in, če je mogoče, jih ponoviti). Če pri nekaterih sumljivih meritvah ni očitnega vzroka napak, se moramo vrniti k preučevanju ostankov. Pri večini računalniških programov, ki se ukvarjajo z regresijskimi podatki, so na voljo postopki za 'diagnosticiranje ostankov'. Nekateri so enostavni, zajemajo grafične prikaze posameznih ostankov proti  $y_i$ -vrednostim (slika 3.14). Pričakovali bi, da bi takšni grafični prikazi kazali, da če so bili uporabljeni pravilni kalibracijski modeli, bi ostanki morali ostati

približno enotni po velikosti, ko se  $y_i$  povečuje, ter razporejeni okoli ničle. Slika tudi prikazuje primere, kjer se napake  $y$  - smeri povečujejo z  $y_i$  (del 3.10) in kjer je bila uporabljena napačna regresijska enačba (del 3.11 in 3.12).



Slika 3.15 Graf ostankov v regresijski diagnostiki: (a) zadovoljiva porazdelitev ostankov; (b) ostanki naraščajo kot narašča  $y_i$ , domnevno je grafični prikaz utežene regresije primeren; (c) ostanki pokažejo potek, najprej postanejo bolj negativni, potem prehajajo skozi ničlo in nato postajajo bolj pozitivni, kot narašča  $y_i$ , domnevno bi naj bila (drugačna) krivulja načrtovana; in (d) zadovoljiv grafični prikaz, razen  $y_6$  leži zunaj.


V računalniškem programu se uporablja za odkrivanje možnih odstopanj nekaj enostavnih numeričnih kriterijev. Nekateri 'označujejo' kalibracijske točke, kjer so  $y$  - ostanki več kot dvakratne vrednosti  $s_{y/x}$ . Razvitih je bilo še nekaj več naprednih metod, od katerih je najbolj znana ocena za vsako točko 'Cookove razdalje', prvič predstavljena leta 1977. Polna uporaba te metode zahteva poznavanje matrične algebre. Cookova razdalja je primer vplivne funkcije, to pomeni, da meri učinek, ki ga ima vprašljiv odklon kalibracijske točke na regresijska koeficienta  $a$  in  $b$ .

---

Končno opazimo, tako kot pri obdelovanju odstopanj pri ponavljajočih meritvah, da so lahko ne-parametrične in robustne metode zelo učinkovite pri obravnavanju odstopanj pri regresiji; robustne regresijske metode so se izkazale za posebej popularne v zadnjih letih.

---

## 4. LITERATURA

-  Miller, J.C., Miller, J.N.: Statistics for Analytical Chemistry, 3rd edition, Ellis Horwood Limited, 1993, 1.,2. in 5. poglavje.