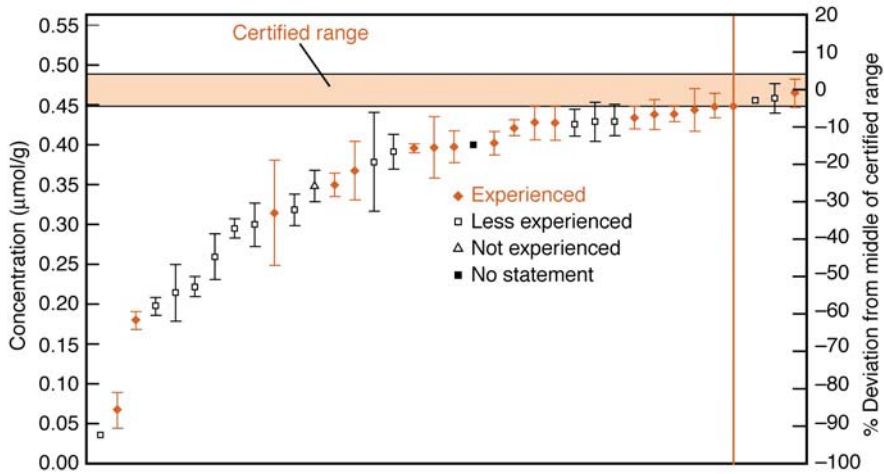


The results are back from the lab:
John Smith is pregnant.

A photograph of a clear plastic cup with a grey lid. The cup is partially filled with a dark, opaque liquid. A black label with white text is attached to the front of the cup, which reads 'JOHN SMITH' in a stylized, hand-drawn font. The cup is placed on a light-colored surface.

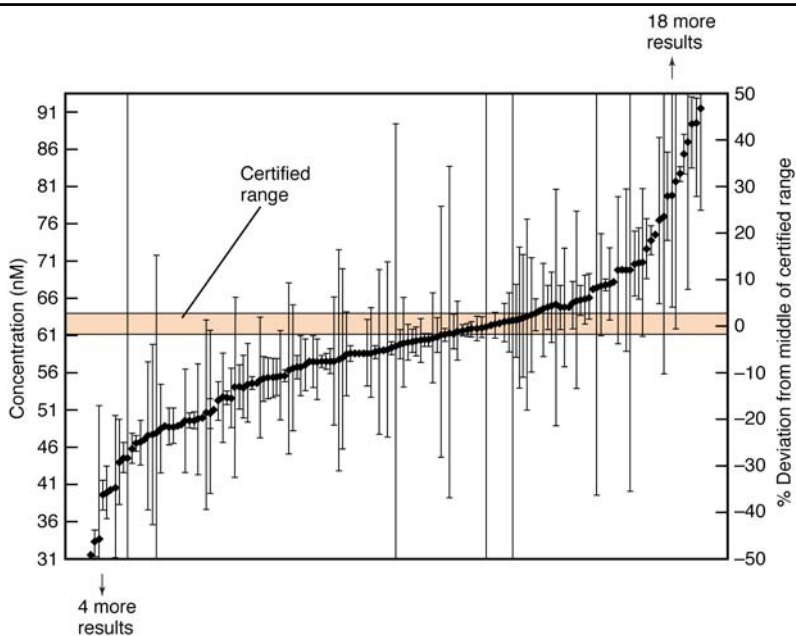
- přesnost
(reprodukovatelnost)
- správnost
(skutečná hodnota)

? Skutečná hodnota
použití různých metod



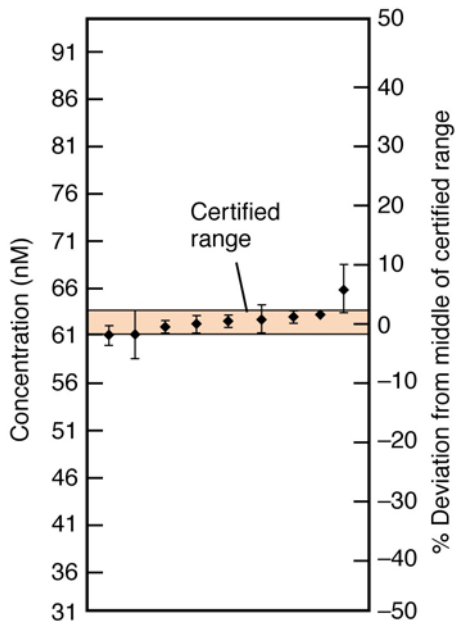
Měření Pb v polyethylenu 36 různými laboratořemi

$0,47_0 \pm 0,02_1 \mu\text{mol.g}^{-1}$ tj. $97,4 \pm 4,3 \mu\text{g.g}^{-1}$



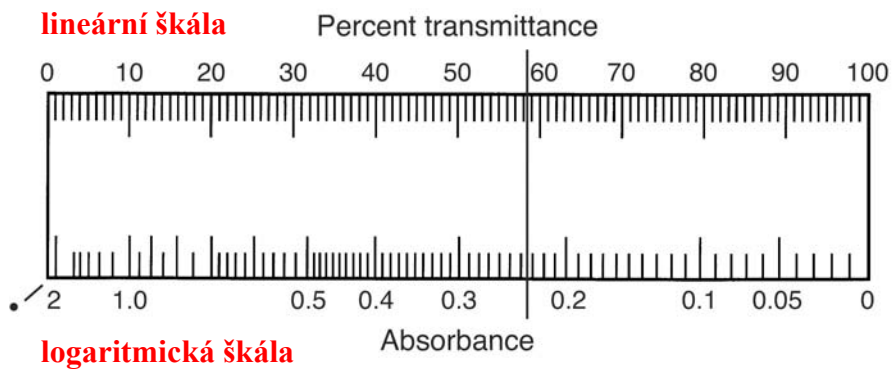
Měření Pb v říční vodě 181 různými laboratořemi

$12,9 \pm 0,3 \text{ ng.l}^{-1}$ tj. $62,3 \pm 1,3 \text{ nM}$



Měření Pb v říční vodě národními certifikovaným laboratořemi

Absorbance - měření



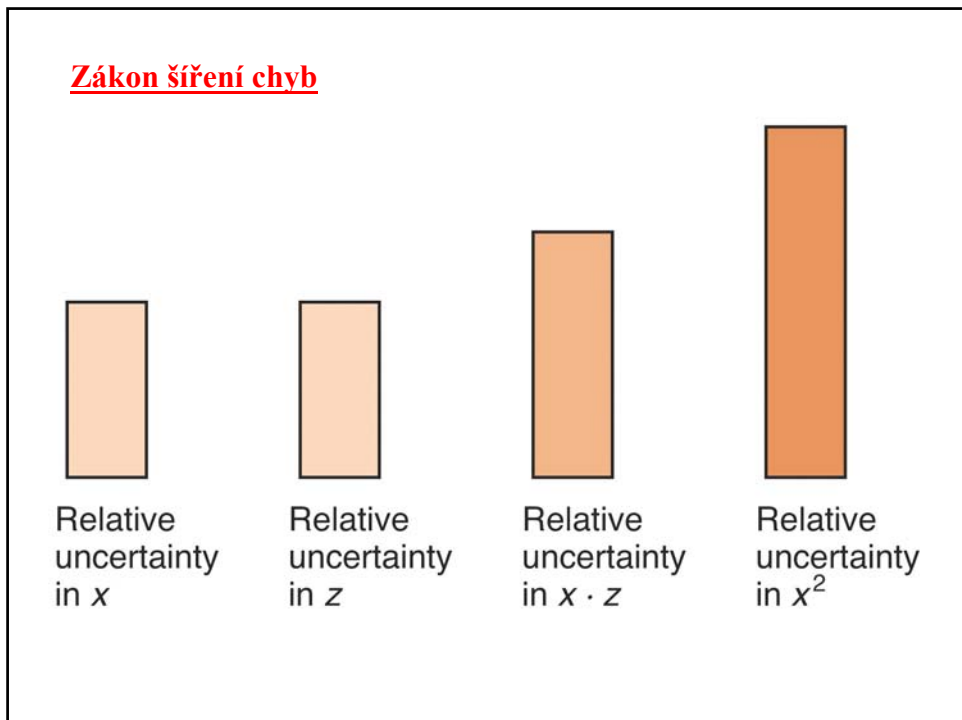
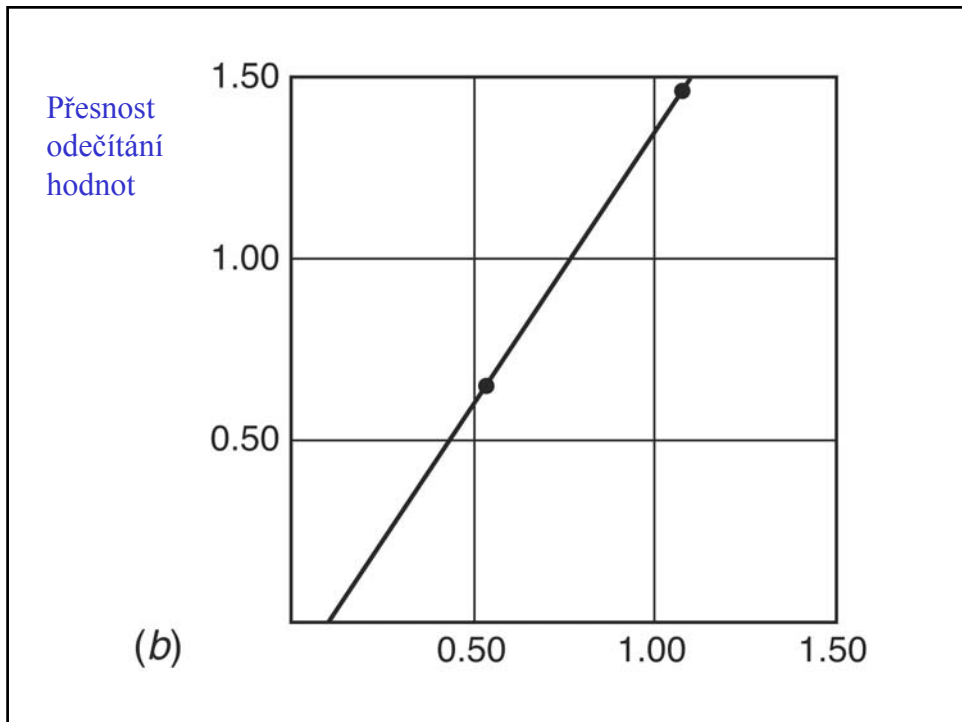


Table 3-1 Summary of rules for propagation of uncertainty

Function	Uncertainty	Function	Uncertainty
$y = x_1 + x_2$	$e_y = \sqrt{e_{x_1}^2 + e_{x_2}^2}$	$y = x^a$	$\%e_y = a \%e_x$
$y = x_1 - x_2$	$e_y = \sqrt{e_{x_1}^2 + e_{x_2}^2}$	$y = \log x$	$e_y = \frac{1}{\ln 10} \frac{e_x}{x} \approx 0.434 29 \frac{e_x}{x}$
$y = x_1 \cdot x_2$	$\%e_y = \sqrt{\%e_{x_1}^2 + \%e_{x_2}^2}$	$y = \ln x$	$e_y = \frac{e_x}{x}$
$y = \frac{x_1}{x_2}$	$\%e_y = \sqrt{\%e_{x_1}^2 + \%e_{x_2}^2}$	$y = 10^x$	$\frac{e_y}{y} = (\ln 10) e_x \approx 2.302 6 e_x$
		$y = e^x$	$\frac{e_y}{y} = e_x$

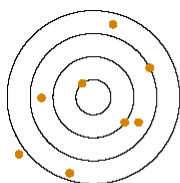
NOTE: x represents a variable and a represents a constant that has no uncertainty. e_x/x is the relative error in x and $\%e_x$ is $100 \times e_x/x$.

Geometrický význam – Pythagorova věta

Typy chyb

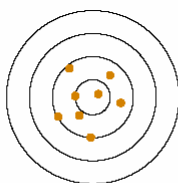
- **Chyby soustavné (systematické):**
 - jsou příčinou rozdílů mezi správnou a změřenou hodnotou;
 - ovlivňují správnost měření;
 - jejich příčiny lze nalézt a eliminovat.
př. špatná kalibrace přístrojů a pomůcek, špatné hodnoty koncentrace roztoků vzatých pro kalibraci, matrixový efekt
- **Chyby náhodné:**
 - projevují se odchylkami mezi opakovanými (paralelními) měřeními;
 - ovlivňují přesnost měření;
 - jejich příčiny není možno eliminovat;
 - lze hodnotit jejich vliv na výsledek měření.
- **Chyby hrubé:**
 - vznikají nedopatřením, neznalostí či malou pečlivostí pracovníka.

Výsledky analýz prováděných 4 různými lidmi



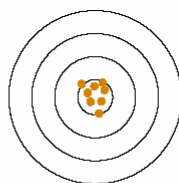
Cheryl

**nepřesná
nesprávná**



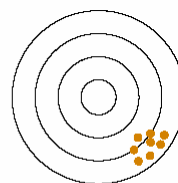
Cynthia

**nepřesná
správná**



Carmen

**přesná
správná**



Chastity

**přesná
nesprávná**

Detekce druhu chyb

- **Správnost měření** (vliv soustavných chyb)
- porovnání změřené hodnoty s hodnotou správnou.
- **Přesnost měření** (vliv náhodných chyb) -
testování vyhodnocením výsledků
opakovaných měření vhodným statistickým
(chemometrickým) postupem.

Detekce systematických chyb

- analýza vzorků o známém složení (*Standardní referenční materiály, SRM – rozdíly indikují systematickou chybu*)
- analýza vzorku blanku (*nenulový výsledek indikace systematické chyby*)
- použití různých analytických metod (*neshodný výsledek – systematická chyba v jedné nebo více metodách*)
- kruhový („round robin“) test – analýza různými lidmi v různých laboratořích – ANOVA TEST – vyšší neshoda než je náhodná chyba indikuje systematickou chybu)

Table 29-1 Calibration standards

Element	Source ^a	Purity	Comments ^b
Li	SRM 924 (Li ₂ CO ₃) Li ₂ CO ₃	100.05 ± 0.02% five-six 9s	E; dry at 200°C for 4 h. M; purity calculated from impurities. Stoichiometry unknown.
Na	SRM 919 or 2201 (NaCl) Na ₂ CO ₃	99.9% three 9s	E; dry for 24 h over Mg(ClO ₄) ₂ . M; purity based on metallic impurities.
K	SRM 918 (KCl) SRM 999 (KCl)	99.9% 52.435 ± 0.004% K	E; dry for 24 h over Mg(ClO ₄) ₂ . E; ignite at 500°C for 4 h.
Rb	K ₂ CO ₃ SRM 984 (RbCl)	five-six 9s 99.90 ± 0.02%	M; purity based on metallic impurities. E; hygroscopic. Dry for 24 h over Mg(ClO ₄) ₂ .
Cs	Rb ₂ CO ₃ Cs ₂ CO ₃		M
Be	metal	three 9s	M
Mg	SRM 929 metal	100.1 ± 0.4% five 9s	E, M; purity based on metallic impurities. E; magnesium gluconate clinical standard. Dry for 24 h over Mg(ClO ₄) ₂ .
Ca	SRM 915 (CaCO ₃) CaCO ₃	three 9s five 9s	E; purity based on metallic impurities. E; use without drying.
Sr	SRM 987 (SrCO ₃) SrCO ₃	99.8% five 9s	E, M; dry at 200°C for 4 h in CO ₂ . User must determine stoichiometry. E; ignite to establish stoichiometry. Dry at 110°C for 1 h. M; up to 1% off stoichiometry. Ignite to establish stoichiometry. Dry at 200°C for 4 h.
Ba	BaCO ₃	four-five 9s	M; dry at 200°C for 4 h.
B	SRM 951 (H ₃ BO ₃)	100.00 ± 0.01	E; expose to room humidity (~35%) for 30 min before use.
Al	metal	five 9s	E, M; SRM 1257 Al metal available.
Ga	metal	five 9s	E, M; SRM 994 Ga metal available.
In	metal	five 9s	E, M

Transition metals: Use pure metals (usually ≥four 9s) for elemental and matrix standards. Assays are based on impurities and do not include dissolved gases.

Lanthanides: Use pure metals (usually ≥four 9s) for elemental standards and oxides as matrix standards. Oxides may be difficult to dry and stoichiometry is not certain.

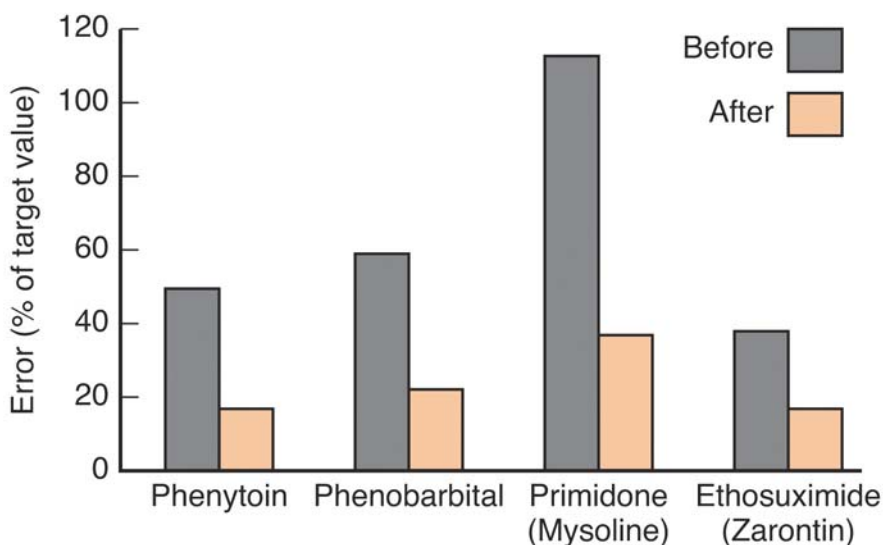
a. SRM is the National Institute of Standards and Technology designation for a Standard Reference Material.
b. E means elemental assay standard; M means matrix matching standard.

SOURCE: J. R. Moody, R. R. Greenberg, K. W. Pratt, and T. C. Rains, "Recommended Inorganic Chemicals for Calibration," *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 1203A.

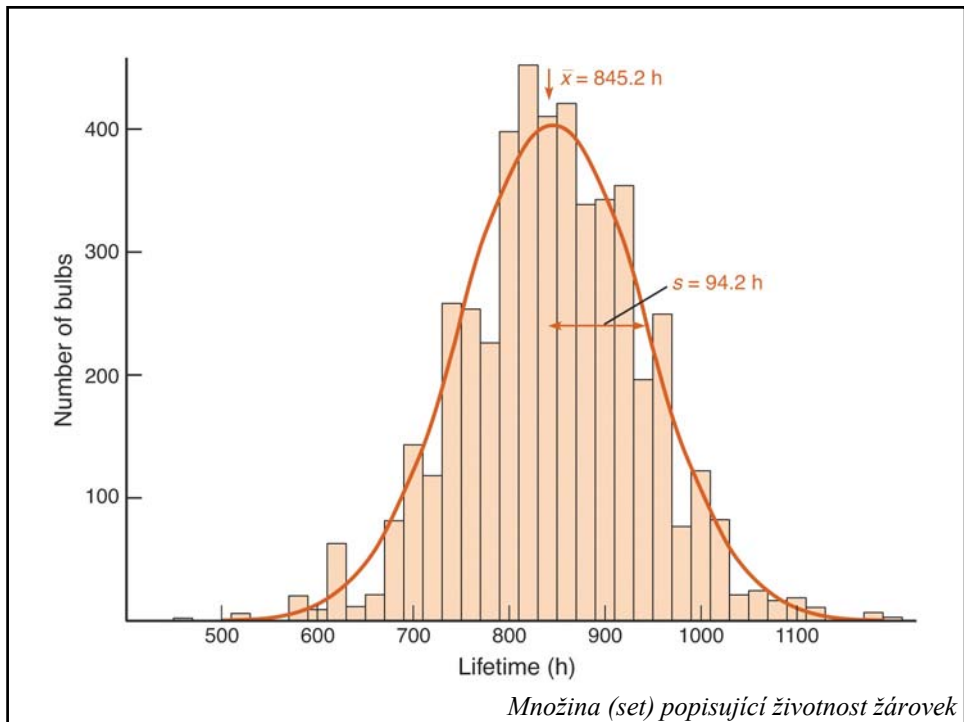
Table 29-1 (continued) Calibration standards

Element	Source ^a	Purity	Comments ^b
Tl	metal	five 9s	E, M; SRM 997 Tl metal available.
C			No recommendation.
Si	metal	six 9s	E, M; SRM 990 SiO ₂ available.
Ge	metal	five 9s	E, M
Sn	metal	six 9s	E, M; SRM 741 Sn metal available.
Pb	metal	five 9s	E, M; several SRMs available.
N	NH ₄ Cl	six 9s	E; can be prepared from HCl + NH ₃ .
	N ₂	>three 9s	E
	HNO ₃	six 9s	M; contaminated with NO _x . Purity based on impurities.
P	SRM 194 (NH ₄ H ₂ PO ₄)	three 9s	E
	P ₂ O ₅	five 9s	E, M; difficult to keep dry.
	H ₃ PO ₄	four 9s	E; must titrate 2 hydrogens to be certain of stoichiometry.
As	metal	five 9s	E, M
	SRM 83d (As ₂ O ₃)	99.992 6 ± 0.003 0%	Redox standard. As assay not ensured.
Sb	metal	four 9s	E, M
Bi	metal	five 9s	E, M
O	H ₂ O	eight 9s	E, M; contains dissolved gases.
	O ₂	>four 9s	E
S	element	six 9s	E, M; difficult to dry. Other sources are H ₂ SO ₄ , Na ₂ SO ₄ , and K ₂ SO ₄ . Stoichiometry must be proved (e.g., no present).
Se	metal	five 9s	E, M; SRM 726 Se metal available.
Te	metal	five 9s	E, M
F	NaF	four 9s	E, M; no good directions for drying.
Cl	NaCl	four 9s	E, M; dry for 24 h over Mg(ClO ₄) ₂ . Several SRMs (NaCl and KCl) available.
Br	KBr	four 9s	E, M; need to dry and demonstrate stoichiometry.
	Br ₂	four 9s	E
I	sublimed I ₂	six 9s	E
	KI	three 9s	E, M
	KIO ₃	three 9s	Stoichiometry not ensured.

Analýza antikonvulsantních léčiv v krevním séru



Použití SRM – NIST (USA)



Testování přesnosti měření

(základní statistické hodnocení výsledků analýzy)

- Opakování analýzy téhož vzorku:

n počet opakovaných (paralelních) analýz
 x_i (x_1 až x_n) výsledek i -tého měření

- Určení střední hodnoty:

pro $n < 7$ **medián**

pro $n > 7$ **aritmetický průměr**

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

- Odhad směrodatné odchylky:

$$n < 7$$

k_n , tabelovaný koeficient

$$R = x(\max) - x(\min), \text{ rozpětí } S = k_n R$$

$$n > 7$$

s^2 variance

$$S = \sqrt{\frac{\sum (\bar{x} - x_i)^2}{n - 1}}$$

- Výpočet relativní směrodatné odchylky (v %):

$$n < 7$$

$$s_r = 100 \frac{S}{\tilde{x}}$$

$$n > 7$$

$$s_r = 100 \frac{S}{\bar{x}}$$

- Určení intervalu spolehlivosti:

$$n < 7 \quad L_{1,2} = K_n R$$

K_n , tabelovaný koeficient

$$n > 7 \quad L_{1,2} = \frac{t \cdot S}{\sqrt{n}}$$

t , tabelovaný koeficient

- Vyjádření výsledku:

$$n < 7$$

$$\tilde{x} \pm L_{1,2}$$

$$n > 7$$

$$\bar{x} \pm L_{1,2}$$

- výsledek je nutné doplnit údajem o počtu stanovení, n , a o zvolené hladině pravděpodobnosti, pro kterou byl interval spolehlivosti určen (95 či 99%)

n	k_n
2	0,8862
3	0,5908
4	0,4857
5	0,4299
6	0,3946
7	0,3698

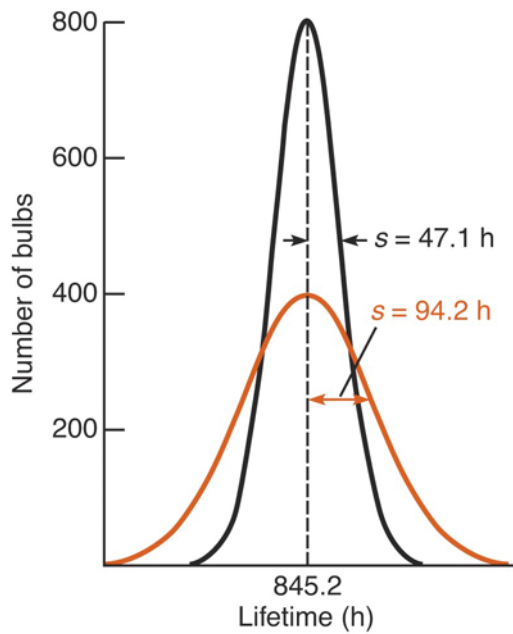
n	$K_n(0,95)$	$K_n(0,99)$
2	6,4	31,8
3	1,3	3,01
4	0,92	1,32
5	0,51	0,84
6	0,40	0,63
7	0,33	0,51

Table 4-2 Values of Student's t

Degrees of freedom	Confidence level (%)						
	50	90	95	98	99	99.5	99.9
1	1.000	6.314	12.706	31.821	63.657	127.32	636.619
2	0.816	2.920	4.303	6.965	9.925	14.089	31.598
3	0.765	2.353	3.182	4.541	5.841	7.453	12.924
4	0.741	2.132	2.776	3.747	4.604	5.598	8.610
5	0.727	2.015	2.571	3.365	4.032	4.773	6.869
6	0.718	1.943	2.447	3.143	3.707	4.317	5.959
7	0.711	1.895	2.365	2.998	3.500	4.029	5.408
8	0.706	1.860	2.306	2.896	3.355	3.832	5.041
9	0.703	1.833	2.262	2.821	3.250	3.690	4.781
10	0.700	1.812	2.228	2.764	3.169	3.581	4.587
15	0.691	1.753	2.131	2.602	2.947	3.252	4.073
20	0.687	1.725	2.086	2.528	2.845	3.153	3.850
25	0.684	1.708	2.060	2.485	2.787	3.078	3.725
30	0.683	1.697	2.042	2.457	2.750	3.030	3.646
40	0.681	1.684	2.021	2.423	2.704	2.971	3.551
60	0.679	1.671	2.000	2.390	2.660	2.915	3.460
120	0.677	1.658	1.980	2.358	2.617	2.860	3.373
∞	0.674	1.645	1.960	2.326	2.576	2.807	3.291

NOTE: In calculating confidence intervals, σ may be substituted for s in Equation 4-6 if you have a great deal of experience with a particular method and have therefore determined its "true" population standard deviation. If σ is used instead of s , the value of t to use in Equation 4-6 comes from the bottom row of Table 4-2.

n	$t/\sqrt{n} (0,95)$	$t/\sqrt{n} (0,99)$
4	1,59	4,61
6	1,05	2,25
8	0,84	1,60
9	0,77	1,42
10	0,72	1,29
25	0,41	0,67



Počet žárovek stejný v obou případech

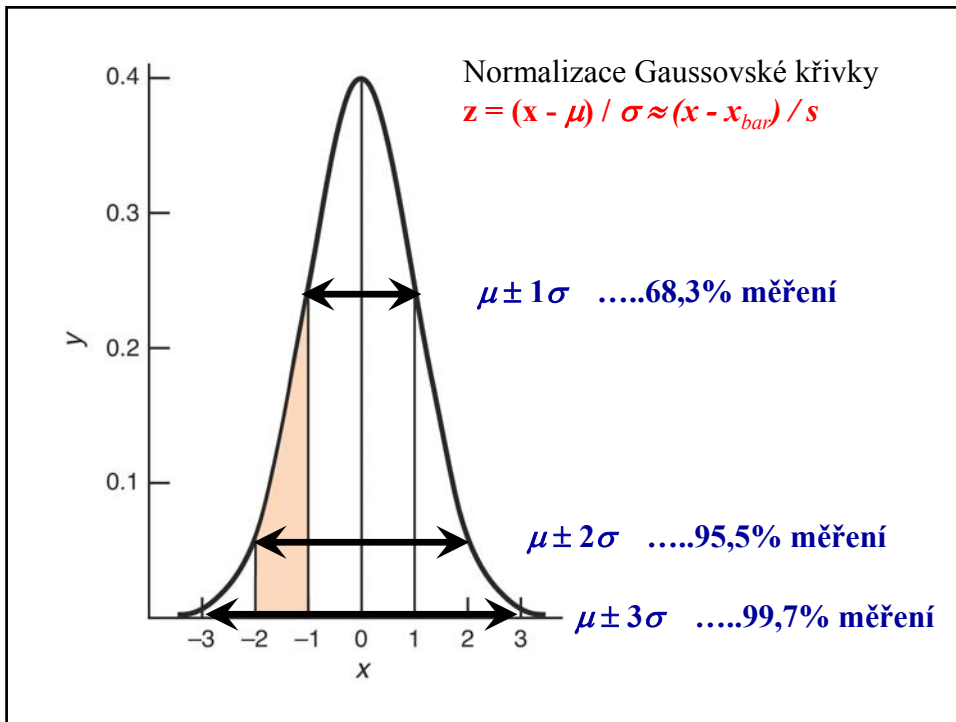


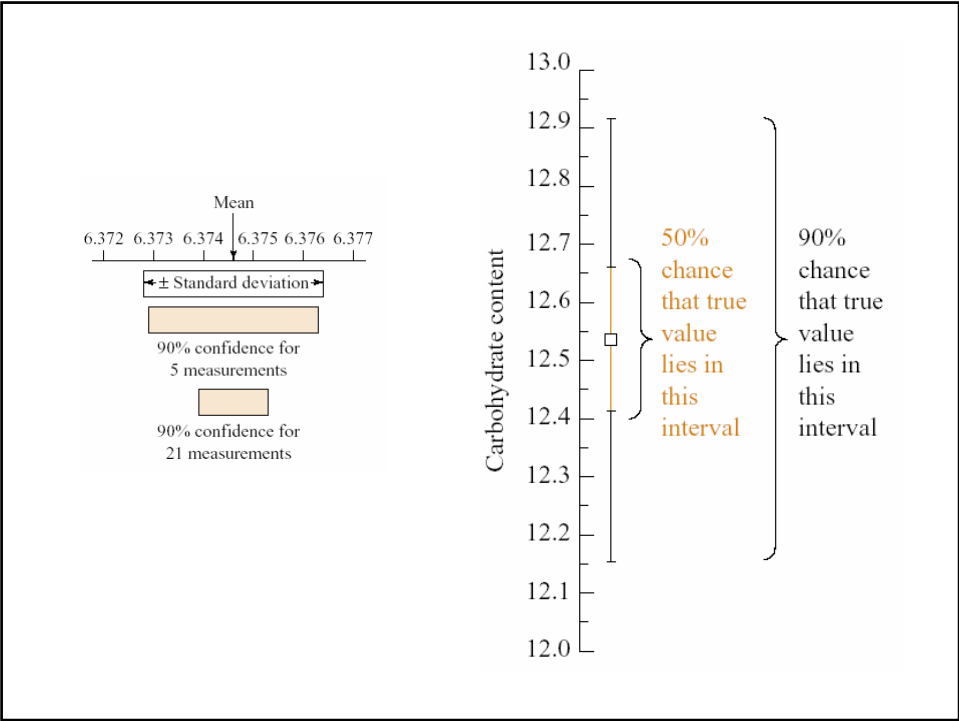
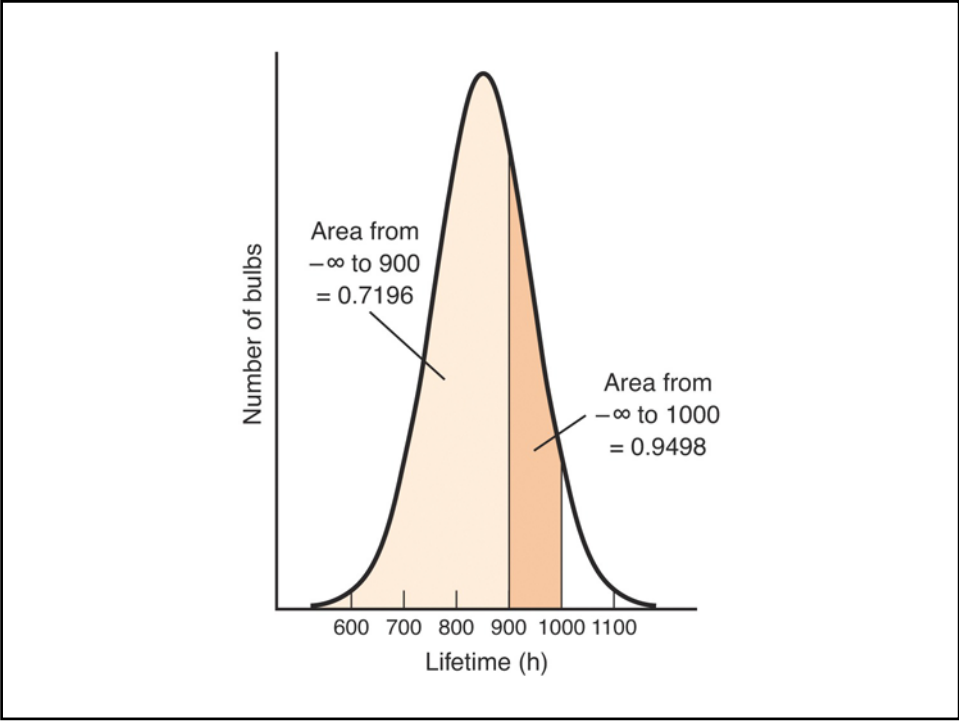
Table 4-1 Ordinate and area for the normal (Gaussian) error curve,

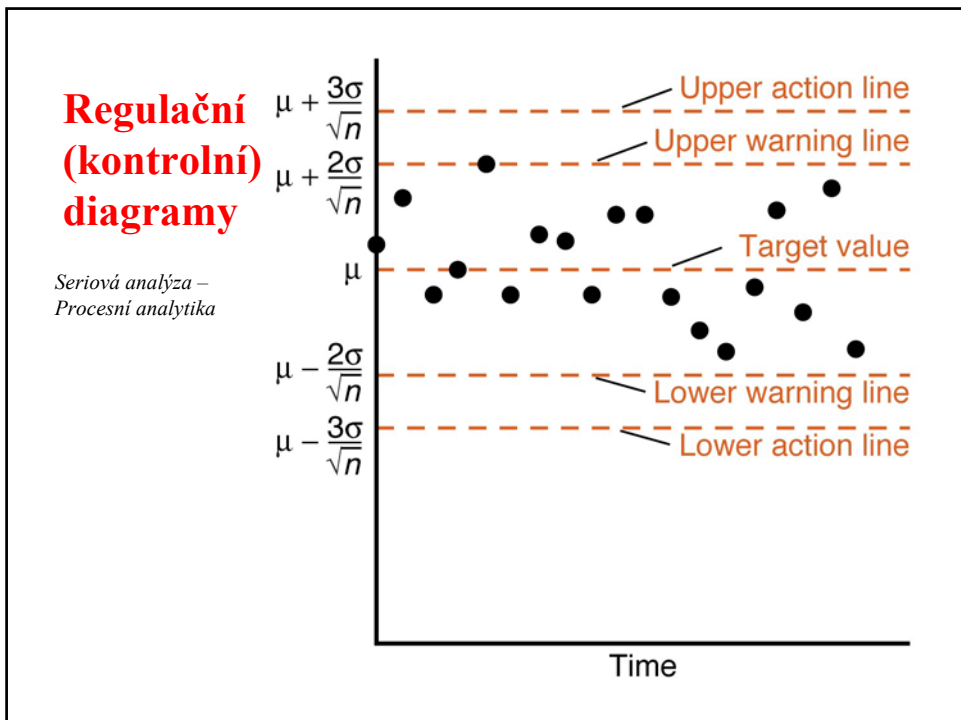
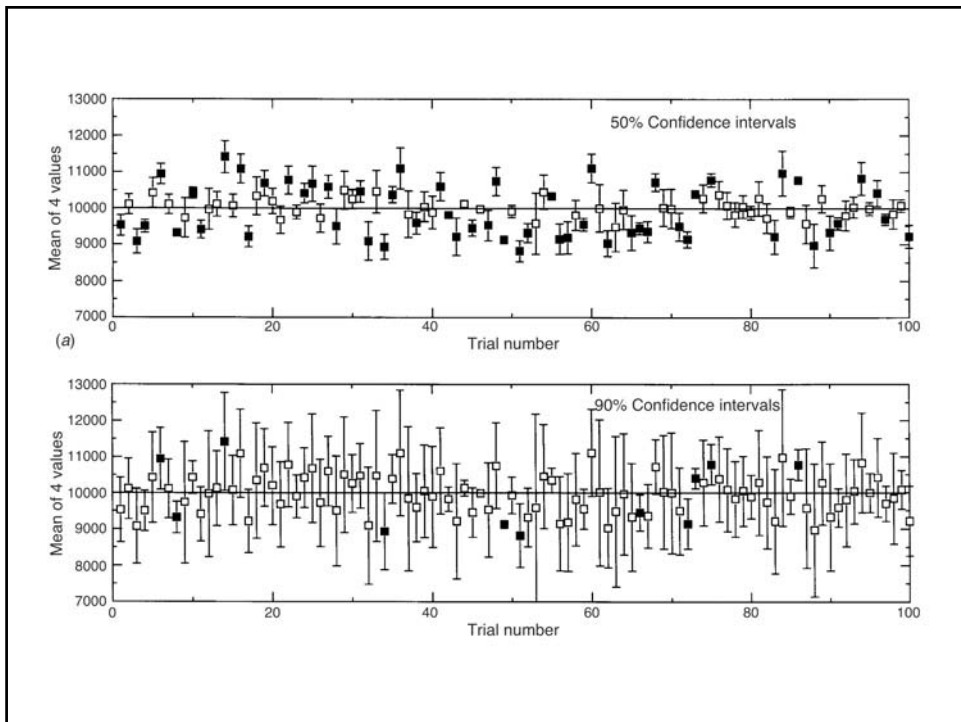
$$y = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-z^2/2}$$

$ z ^a$	y	Area ^b	$ z $	y	Area	$ z $	y	Area
0.0	0.398 9	0.000 0	1.4	0.149 7	0.419 2	2.8	0.007 9	0.497 4
0.1	0.397 0	0.039 8	1.5	0.129 5	0.433 2	2.9	0.006 0	0.498 1
0.2	0.391 0	0.079 3	1.6	0.110 9	0.445 2	3.0	0.004 4	0.498 650
0.3	0.381 4	0.117 9	1.7	0.094 1	0.455 4	3.1	0.003 3	0.499 032
0.4	0.368 3	0.155 4	1.8	0.079 0	0.464 1	3.2	0.002 4	0.499 313
0.5	0.352 1	0.191 5	1.9	0.065 6	0.471 3	3.3	0.001 7	0.499 517
0.6	0.333 2	0.225 8	2.0	0.054 0	0.477 3	3.4	0.001 2	0.499 663
0.7	0.312 3	0.258 0	2.1	0.044 0	0.482 1	3.5	0.000 9	0.499 767
0.8	0.289 7	0.288 1	2.2	0.035 5	0.486 1	3.6	0.000 6	0.499 841
0.9	0.266 1	0.315 9	2.3	0.028 3	0.489 3	3.7	0.000 4	0.499 904
1.0	0.242 0	0.341 3	2.4	0.022 4	0.491 8	3.8	0.000 3	0.499 928
1.1	0.217 9	0.364 3	2.5	0.017 5	0.493 8	3.9	0.000 2	0.499 952
1.2	0.194 2	0.384 9	2.6	0.013 6	0.495 3	4.0	0.000 1	0.499 968
1.3	0.171 4	0.403 2	2.7	0.010 4	0.496 5			

a. $z = (x - \mu) / \sigma$.

b. The area refers to the area between $z = 0$ and $z =$ the value in the table. Thus the area from $z = 0$ to $z = 1.4$ is 0.419 2. The area from $z = -0.7$ to $z = 0$ is the same as from $z = 0$ to $z = 0.7$. The area from $z = -0.5$ to $z = +0.3$ is $(0.191 5 + 0.117 9) = 0.309 4$. The total area between $z = -\infty$ and $z = +\infty$ is unity.





Význam Studentova t-testu

Stanovení systematické chyby

- srovnání opakovaného výsledku se „známou“ hodnotou – SRM

$$t_{\text{calc}} = |\bar{x}_{\text{bar}} - \text{„známá hodnota“}| \times \sqrt{n/s}$$

- srovnání opakovaných výsledků získaných dvěma metodami
- srovnání jednotlivých rozdílů u různých vzorků bez opakování – bioanalytika, ŽP

Stejné populace

$$t_{\text{calculated}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s_{\text{pooled}}} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}}$$

$$s_{\text{pooled}} = \sqrt{\frac{\sum_{\text{set 1}} (x_i - \bar{x}_1)^2 + \sum_{\text{set 2}} (x_j - \bar{x}_2)^2}{n_1 + n_2 - 2}} = \sqrt{\frac{s_1^2(n_1 - 1) + s_2^2(n_2 - 1)}{n_1 + n_2 - 2}}$$

Jestliže $t_{\text{calc}} > t(n_1+n_2-2, 95\%)$ významný rozdíl
? systematická chyba

Různé populace

$$t_{\text{calculated}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{s_1^2/n_1 + s_2^2/n_2}}$$

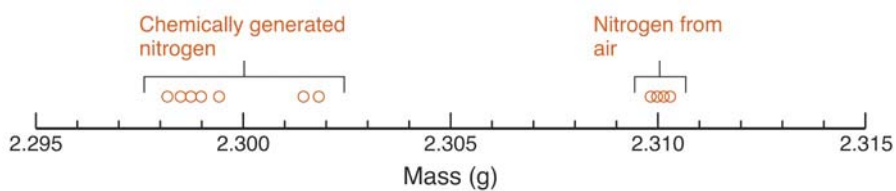
$$\text{Degrees of freedom} = \left\{ \frac{(s_1^2/n_1 + s_2^2/n_2)^2}{\left(\frac{(s_1^2/n_1)^2}{n_1 + 1} + \frac{(s_2^2/n_2)^2}{n_2 + 1} \right)} \right\} - 2$$

Jestliže $t_{\text{calc}} > t(\text{degrees_of_freedom}, 95\%)$
významný rozdíl ? systematická chyba

Table 4-3 Masses of gas isolated
by Lord Rayleigh

From air (g)	From chemical decomposition (g)
2.310 17	2.301 43
2.309 86	2.298 90
2.310 10	2.298 16
2.310 01	2.301 82
2.310 24	2.298 69
2.310 10	2.299 40
2.310 28	2.298 49
—	2.298 89
Average	
2.310 11	2.299 47
Standard deviation	
0.000 14 ₃	0.001 38

SOURCE: R. D. Larsen, *J. Chem. Ed.* **1990**, 67, 925; see also C. J. Giunta, *J. Chem. Ed.* **1998**, 75, 1322.



Statistický rozdíl na obou hladinách (95% a 99,9%)
Systematická chyba



Srovnání jednotlivých diferencí – analýzy neopakovány –
stanovení v lidské krevní plazmě

Table 4-4 Comparison of two methods for measuring cholesterol

Plasma sample (d_i)	Cholesterol content (g/L)		Difference
	Method A	Method B	
1	1.46	1.42	0.04
2	2.22	2.38	-0.16
3	2.84	2.67	0.17
4	1.97	1.80	0.17
5	1.13	1.09	0.04
6	2.35	2.25	0.10
			$\bar{d} = +0.06_0$

$$t_{\text{calc}} = |d_{\text{bar}}| \times \sqrt{n} / s_d$$

$$s_d = \sqrt{\frac{\sum (d_i - \bar{d})^2}{n-1}}$$

F-test

$$F_{\text{calc}} = s_1^2 / s_2^2 = \text{var}_1 / \text{var}_2$$

Table 4-5 Critical values of $F = s_1^2 / s_2^2$ at 95% confidence level

Degrees of freedom for s_2	Degrees of freedom for s_1													
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	30	∞
2	19.0	19.2	19.2	19.3	19.3	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.5	19.5
3	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.84	8.81	8.79	8.74	8.70	8.66	8.62	8.53
4	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96	5.91	5.86	5.80	5.75	5.63
5	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.68	4.62	4.56	4.50	4.36
6	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	4.00	3.94	3.87	3.81	3.67
7	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.58	3.51	3.44	3.38	3.23
8	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.28	3.22	3.15	3.08	2.93
9	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.07	3.01	2.94	2.86	2.71
10	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.91	2.84	2.77	2.70	2.54
11	3.98	3.59	3.36	3.20	3.10	3.01	2.95	2.90	2.85	2.79	2.72	2.65	2.57	2.40
12	3.88	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	2.75	2.69	2.62	2.54	2.47	2.30
13	3.81	3.41	3.18	3.02	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67	2.60	2.53	2.46	2.38	2.21
14	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	2.60	2.53	2.46	2.39	2.31	2.13
15	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54	2.48	2.40	2.33	2.25	2.07
16	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.42	2.35	2.28	2.19	2.01
17	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45	2.38	2.31	2.23	2.15	1.96
18	3.56	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.34	2.27	2.19	2.11	1.92
19	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38	2.31	2.23	2.16	2.07	1.88
20	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35	2.28	2.20	2.12	2.04	1.84
30	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16	2.09	2.01	1.93	1.84	1.62
∞	3.00	2.60	2.37	2.21	2.10	2.01	1.94	1.88	1.83	1.75	1.67	1.57	1.46	1.00

**Testování hrubých chyb
(vylučování odlehlých výsledků)**

- Dean-Dixonův test
(pro malý počet měření)

$Q_{\text{calc}} = \text{rozdíl} / \text{rozpětí}$

$$Q_1 = \frac{x_2 - x_1}{R} \quad Q_n = \frac{x_n - x_{n-1}}{R}$$

- Grubbsův test
(pro větší množinu měření
s opakováním)

$$T_1 = \frac{|x_1 - \bar{x}|}{S} \quad T_n = \frac{|x_n - \bar{x}|}{S}$$

$$S = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

$$S = s \times \sqrt{\frac{n-1}{n}}$$

Table 4-6 Values of Q for
rejection of data

Q (90% confidence) ^a	Number of observations
0.76	4
0.64	5
0.56	6
0.51	7
0.47	8
0.44	9
0.41	10

a. $Q = \text{gap/range}$. If $Q_{\text{calculated}} > Q_{\text{table}}$, the value in question can be rejected with 90% confidence.

SOURCE: R. B. Dean and W. J. Dixon, *Anal. Chem.* **1951**, 23, 636; see also D. R. Rorabacher, *Anal. Chem.* **1991**, 63, 139.

n	k_n	K_n		Q_n		T_n	
		$\alpha = 0,05$	$\alpha = 0,01$	$\alpha = 0,05$	$\alpha = 0,01$	$\alpha = 0,05$	$\alpha = 0,01$
2	0,8862	6,353	31,822	--	--	--	--
3	0,5908	1,304	3,008	0,941	0,988	1,412	1,416
4	0,4857	0,717	1,316	0,765	0,889	1,689	1,723
5	0,4299	0,507	0,843	0,642	0,760	1,869	1,955
6	0,3946	0,399	0,628	0,560	0,698	1,996	2,130
7	0,3698	0,333	0,507	0,507	0,637	2,093	2,265
8	0,3512	0,288	0,429	0,468	0,590	2,172	2,374
9	0,3367	0,255	0,374	0,437	0,555	2,237	2,464
10	0,3249	0,230	0,333	0,412	0,527	2,294	2,540

ANOVA

Analysis of Variances

- umožňuje analýzu zdroje chyb

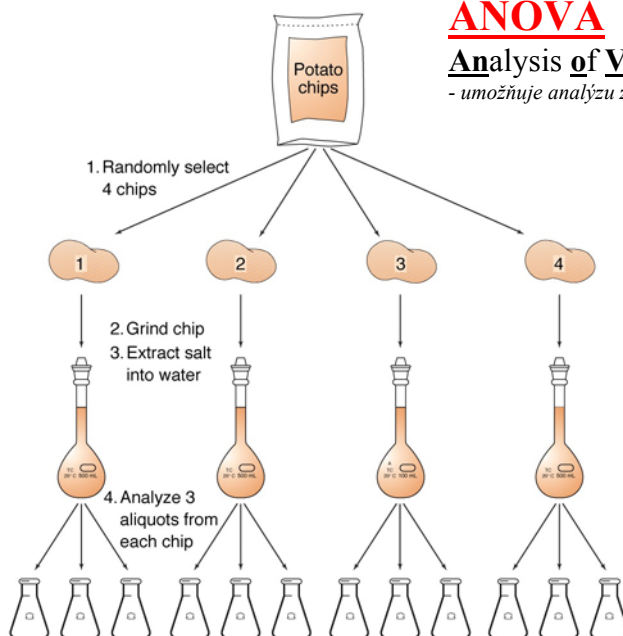


Table 29-2 Analysis of sodium (wt %) in potato chips

Statistic	Sample			
	Chip 1	Chip 2	Chip 3	Chip 4
FINDING STANDARD DEVIATION WITHIN SAMPLE:				
wt % Na	0.324	0.455	0.420	0.447
	0.311	0.467	0.463	0.377
	0.352	0.448	0.424	0.398
Average within sample	0.329 ₀	0.456 ₇	0.435 ₇	0.407 ₃
	\bar{x}_1	\bar{x}_2	\bar{x}_3	\bar{x}_4
Standard deviation within sample	0.020 ₉₅	0.009 ₆₁	0.023 ₇₆	0.035 ₉₂
	s_1	s_2	s_3	s_4
$h = \text{number of samples} = 4$ $n = \text{number of replicates} = 3$ $nh = \text{total measurements}$				
FINDING VARIANCE WITHIN SAMPLES:				
Variance within samples	$4.39_0 \times 10^{-4}$	$9.23_3 \times 10^{-5}$	$5.64_3 \times 10^{-4}$	$1.29_0 \times 10^{-3}$
	s_1^2	s_2^2	s_3^2	s_4^2

$$\text{Average variance within samples} = s_{\text{within}}^2 = \frac{1}{h} \sum (s_i^2) \quad (29-T1)$$

$$= \frac{1}{4} (4.39_0 \times 10^{-5} + 9.23_3 \times 10^{-5} + 5.64_3 \times 10^{-4} + 1.29_0 \times 10^{-3})$$

$$= 5.96_5 \times 10^{-4}$$

Degrees of freedom for variance within samples = $nh - h = 12 - 4 = 8$

FINDING VARIANCE BETWEEN SAMPLES:

$$\text{Overall average} = \bar{x} = \frac{1}{nh} \sum (\text{all measurements}) \quad (29-T2)$$

$$= \frac{1}{12} (0.324 + 0.311 + 0.352 + 0.455 + \dots + 0.377 + 0.398)$$

$$= 0.407_2$$

Table 29-2 (continued) Analysis of sodium (wt %) in potato chips

Variance of average values from overall mean value

$$= s_{\text{means}}^2 = \frac{1}{h-1} \sum (\text{sample mean} - \bar{x})^2 \quad (29-T3)$$

$$= \frac{1}{3} [(0.329_0 - 0.407_2)^2 + (0.456_7 - 0.407_2)^2 + (0.435_7 - 0.407_2)^2 + (0.407_3 - 0.407_2)^2]$$

$$= 3.12_4 \times 10^{-3}$$

Degrees of freedom for variance of average values from overall mean = $h - 1 = 4 - 1 = 3$

$$s_{\text{means}} = s_{\text{between}} / \sqrt{n} \quad (29-T4)$$

$$\Rightarrow s_{\text{between}}^2 = n s_{\text{means}}^2 = 3(3.12_4 \times 10^{-3}) = 9.37_3 \times 10^{-3} \quad (29-T5)$$

HYPOTHESIS TESTING WITH F TEST:

$h - 1 = 3$ degrees of freedom

$$F = \frac{s_{\text{between}}^2}{s_{\text{within}}^2} = \frac{9.37_3 \times 10^{-3}}{5.96_5 \times 10^{-4}} = 15.7 > 4.07 \text{ in Table 4-5} \quad (29-T6)$$

$nh - h = 8$ degrees of freedom

ASSIGNING SOURCES OF VARIANCE:

$$s_{\text{between}}^2 = s_{\text{within}}^2 + n s_{\text{sampling}}^2$$

$$\Rightarrow s_{\text{sampling}}^2 = \frac{1}{n} (s_{\text{between}}^2 - s_{\text{within}}^2) = \frac{1}{3} (9.37_3 \times 10^{-3} - 5.96_5 \times 10^{-4}) = 2.92_6 \times 10^{-3} \quad (29-T7)$$

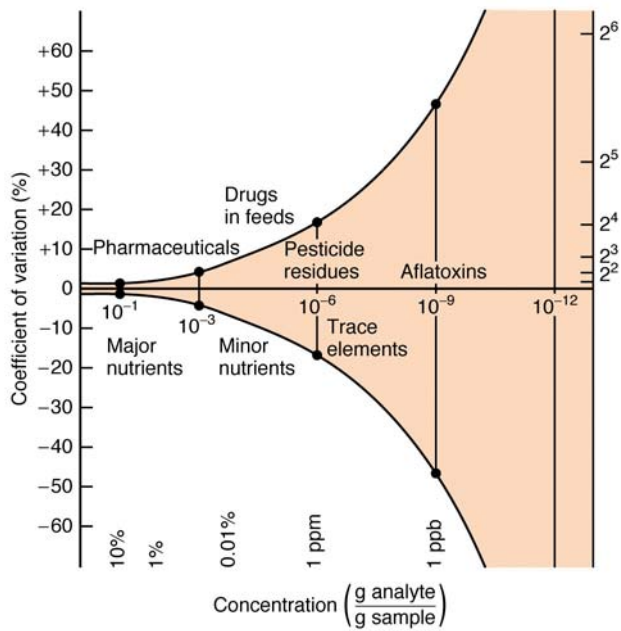
STANDARD DEVIATIONS:

$$s_{\text{sampling}} = \sqrt{s_{\text{sampling}}^2} = \sqrt{2.92_6 \times 10^{-3}} = 0.054 \text{ 1}$$

$$s_{\text{analysis}} = s_{\text{within}} = \sqrt{s_{\text{within}}^2} = \sqrt{5.96_5 \times 10^{-4}} = 0.024 \text{ 4}$$

SOURCE: From F. A. Settle and M. Pleva, "The Weakest Link Exercise," *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 538A. Two entries in each column are real and the third is a fictitious value added for the sake of this example. The article cited here takes the analysis one step further and shows how to break the overall error down into components from sampling, sample preparation, and analysis. See also D. Harvey, "Two Experiments Illustrating the Importance of Sampling in Quantitative Chemical Analysis," *J. Chem. Ed.* **2002**, *79*, 360.

	A	B	C	D	E	F	G
1	Analysis of Variance: Potato chip example from Table 29-2						
2							
3	Chip 1	Chip 2	Chip 3	Chip 4			
4	0.324	0.455	0.420	0.447			
5	0.311	0.467	0.463	0.377			
6	0.352	0.448	0.424	0.398			
7							
8	Anova: Single Factor						
9							
10	SUMMARY						
11	Groups	Count	Sum	Average	Variance		
12	Column 1	3	0.987	0.3290	4.390E-04		
13	Column 2	3	1.370	0.4567	9.233E-05		
14	Column 3	3	1.307	0.4357	5.643E-04		
15	Column 4	3	1.222	0.4073	1.290E-03		
16							
17							
18	ANOVA						
19	Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
20	Between Groups	0.028118	3	0.00937256	15.712583	0.001025	4.0661803
21	Within Groups	0.004772	8	0.0005965			
22							
23	Total	0.03289	11				

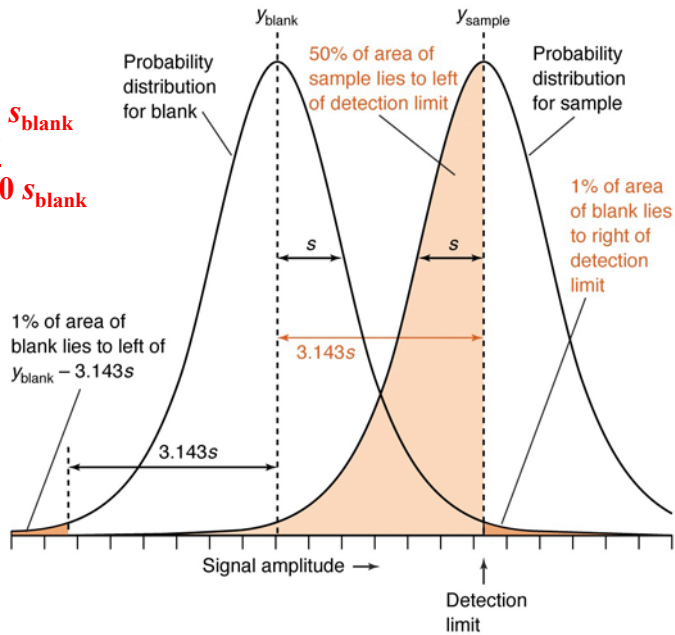


Limit detekce

$$c_{dl} = c_{blank} + 3 s_{blank}$$

Limit stanovení

$$c_{st} = c_{blank} + 10 s_{blank}$$



Kalibrace analytické metody (přístroje)

Analytické metody

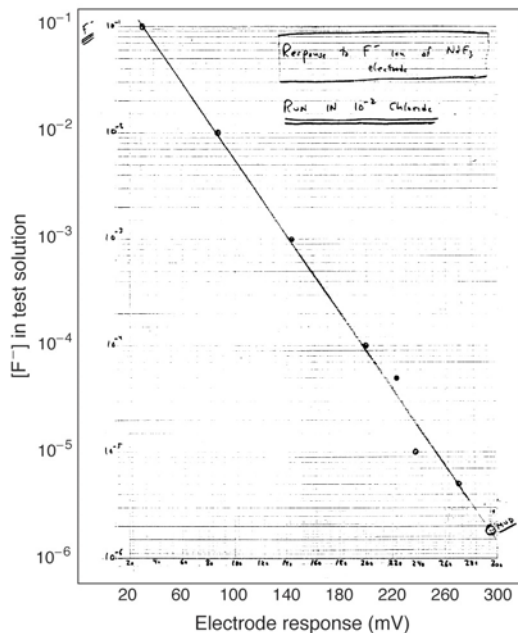
- **absolutní** – nevyžadují kalibraci; *klasické a některé instrumentální metody (např. elektrogravimetrie, coulometrie, aj.)*
- **relativní (komparativní)** – stanovení založeno na kalibraci přístroje použitého k měření analytického signálu; *většina instrumentálních metod*

Dvoustupňový analytický proces u relativních instrumentálních metod

- **Kalibrace** – hledání funkčního vztahu mezi odezvou přístroje produkující analytický signál, S , a koncentrací analytu (standardy), c :

$$S = f(c)$$

- **Vlastní stanovení** – změření signálu S pro neznámý vzorek a výpočet jeho koncentrace z funkce použité pro kalibraci – inverzní problém



Stránka laboratorního
deníku Martina Franta
(fa Orion)

první F⁻ elektroda

Příklady $S = f(c)$

- lineární : $A = \varepsilon \times c \times l$, $I_F = k \times c$,
 $I_{l,dif} = k \times c$
- lineární po transformaci
 $E = const + \log(c)$
 $\log(I) = const + b \times \log(c)$
- exponenciální $E = 10^{-c}$
 $I = a \times c^b$

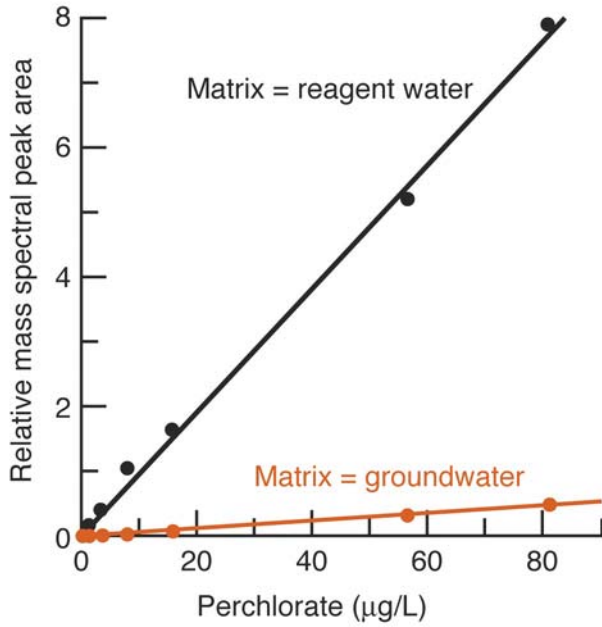
Linearizace funkční závislosti – lineární regrese
Citlivost – směrnice kalibrační přímky (křivky)

Metody kalibrace přístroje

- metoda kalibrační křivky
- metoda standardního přídatku
- metoda vnitřního (interního) standardu
- metoda vnějšího (externího) standardu

Volba většinou podle velikosti maticového efektu

Prezentace matricového efektu



Lineární regrese – metoda nejmenších čtverců

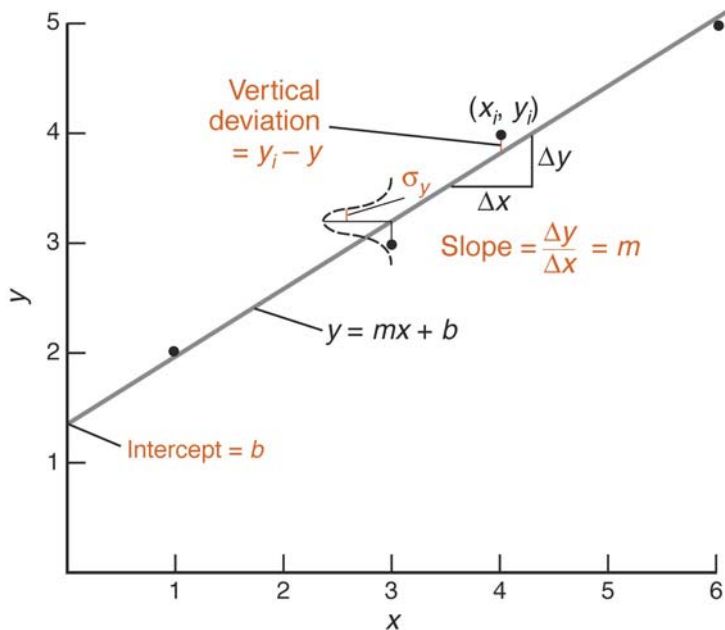


Table 5-1 Calculations for least-squares analysis

x_i	y_i	$x_i y_i$	x_i^2	$d_i (= y_i - mx_i - b)$	d_i^2
1	2	2	1	0.038 46	0.001 479 3
3	3	9	9	-0.192 31	0.036 982
4	4	16	16	0.192 31	0.036 982
6	5	30	36	-0.038 46	0.001 479 3
$\Sigma x_i = 14$	$\Sigma y_i = 14$	$\Sigma(x_i y_i) = 57$	$\Sigma(x_i^2) = 62$		$\Sigma(d_i^2) = 0.076 923$

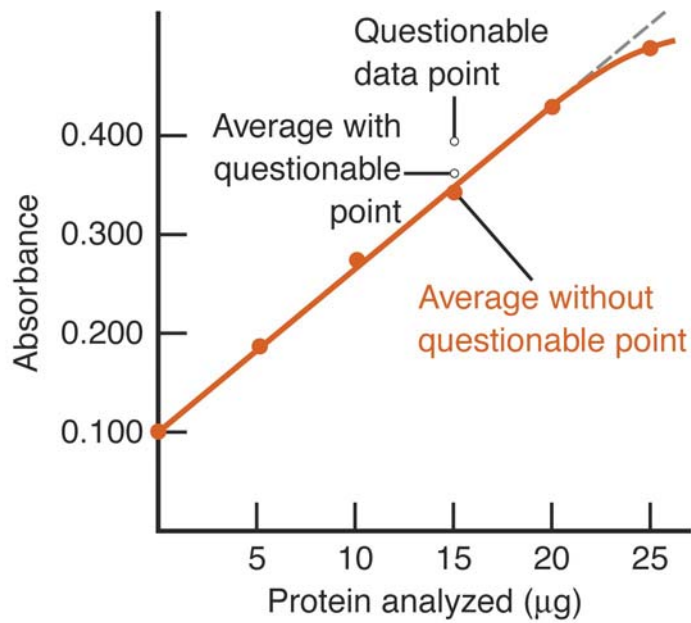
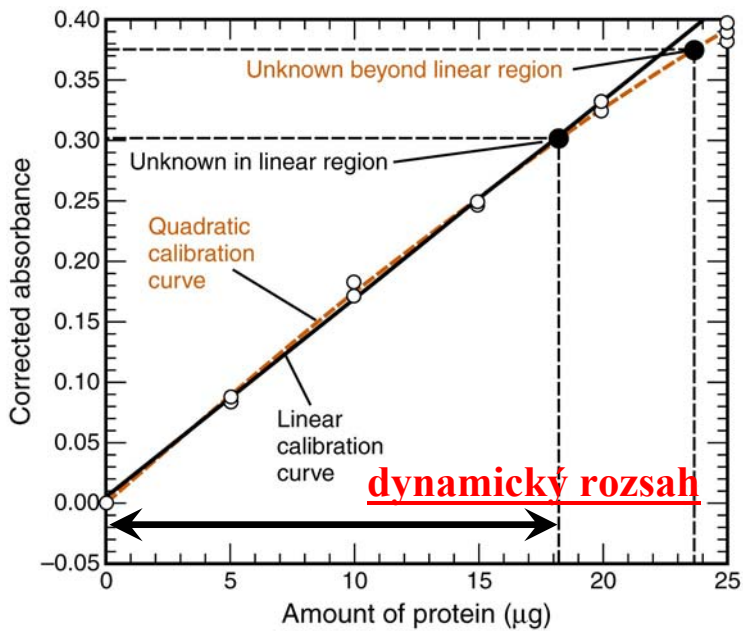
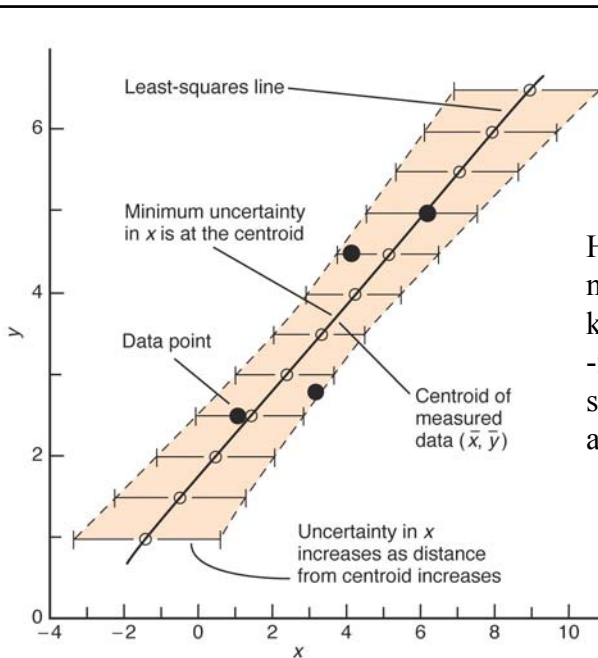
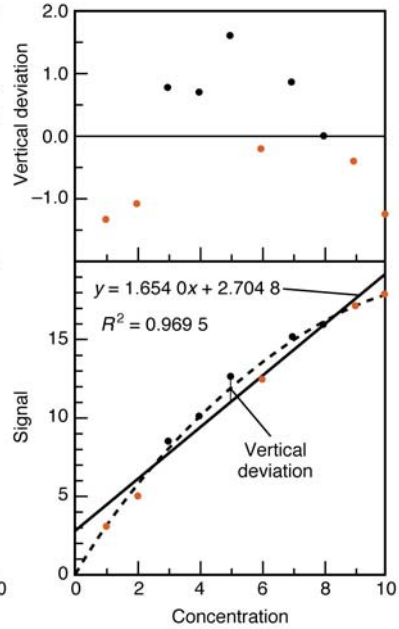
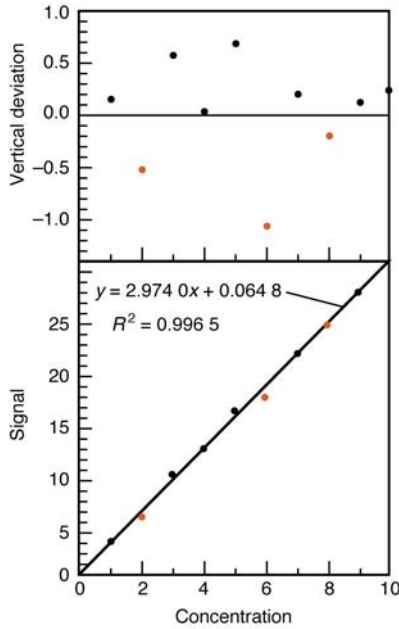


Table 5-2 Spectrophotometer data used to construct calibration curve

Amount of protein (μg)	Absorbance of independent samples			Range	Corrected absorbance		
0	0.099	0.099	0.100	0.001	-0.000 ₃	-0.000 ₃	0.000 ₇
5.0	0.185	0.187	0.188	0.003	0.085 ₇	0.087 ₇	0.088 ₇
10.0	0.282	0.272	0.272	0.010	0.182 ₇	0.172 ₇	0.172 ₇
15.0	0.345	0.347	(0.392)	0.047	0.245 ₇	0.247 ₇	—
20.0	0.425	0.425	0.430	0.005	0.325 ₇	0.325 ₇	0.330 ₇
25.0	0.483	0.488	0.496	0.013	0.383 ₇	0.388 ₇	0.396 ₇

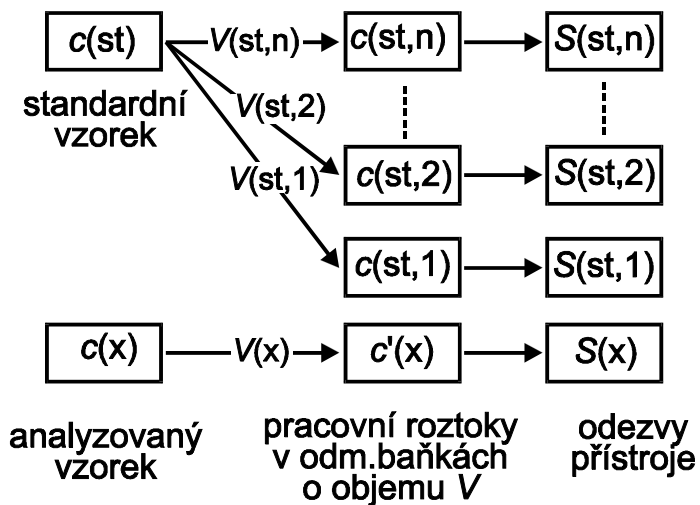


Detekce linearity

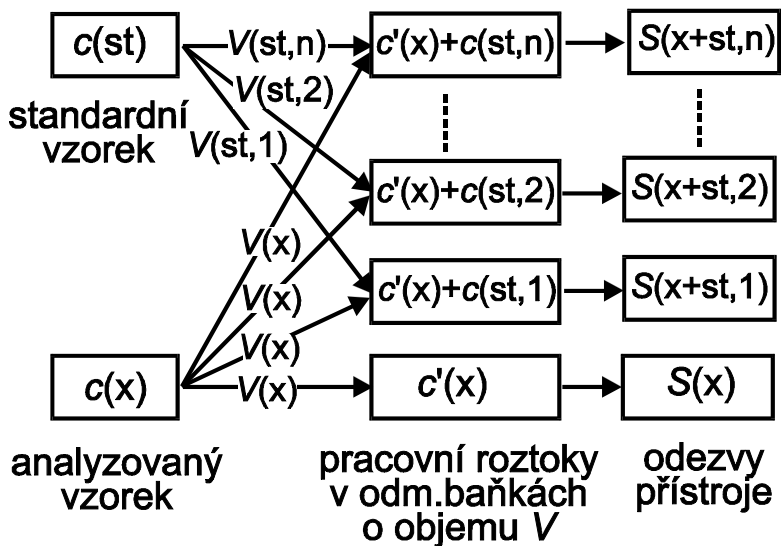


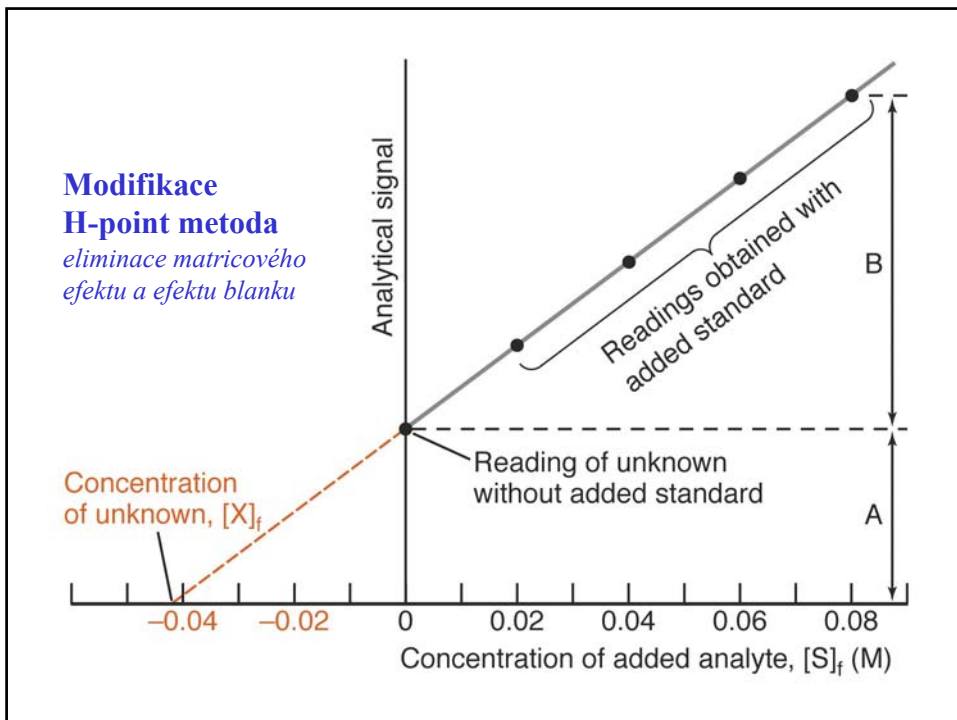
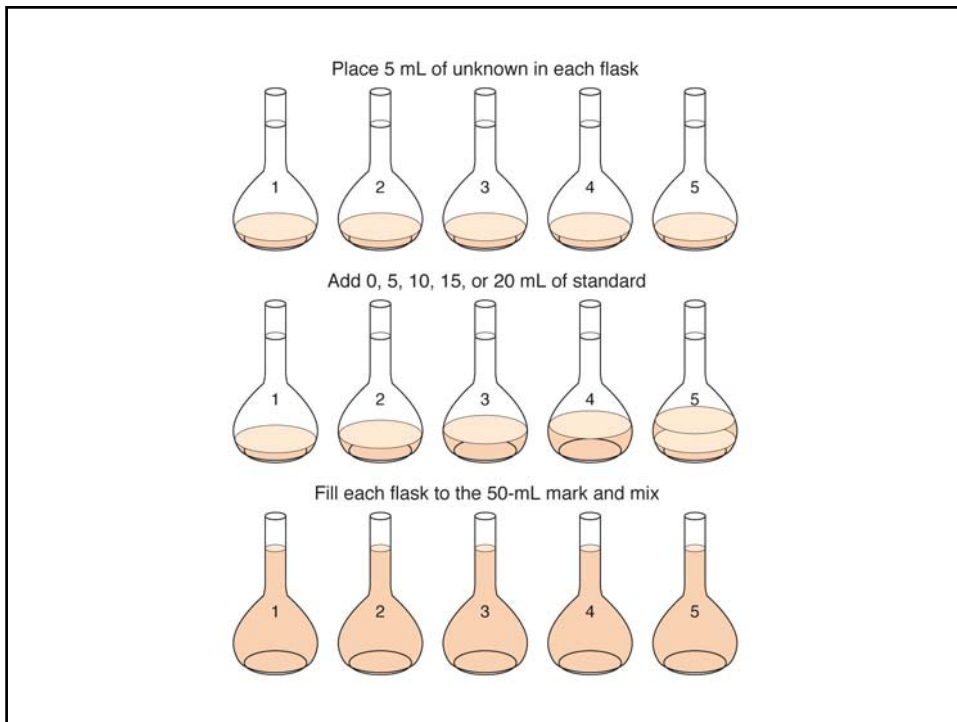
Hyperbolická
neurčitost
kalibrační křivky
-inverzní problém
stanovení koncentrace
analytu

Metoda kalibrační křivky



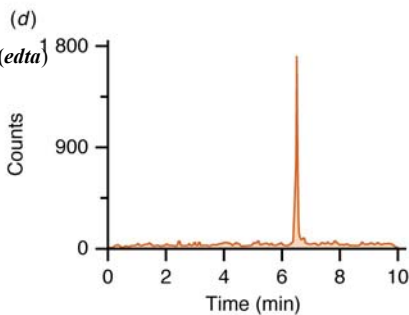
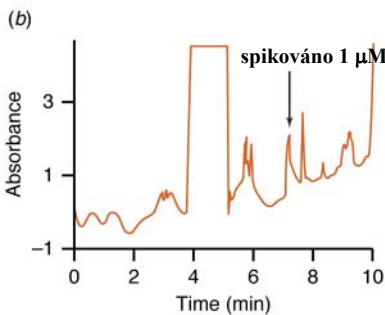
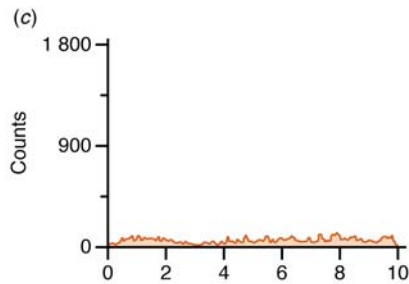
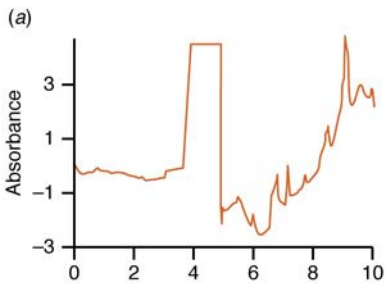
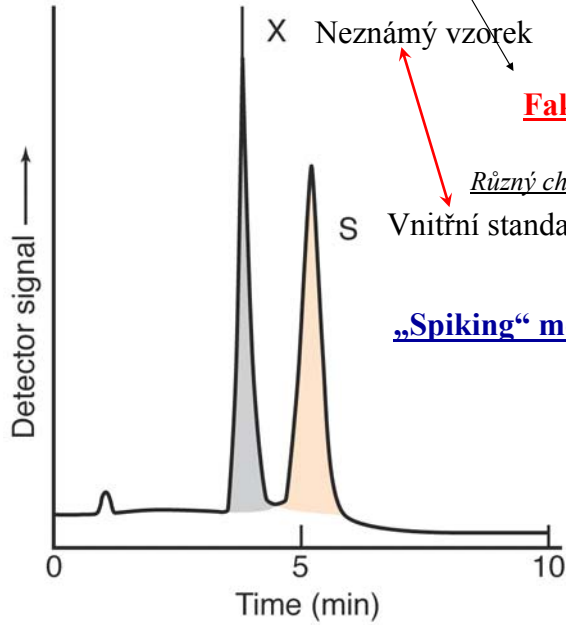
Metoda standardního přídavku – lineární závislost





Metoda vnitřního standardu

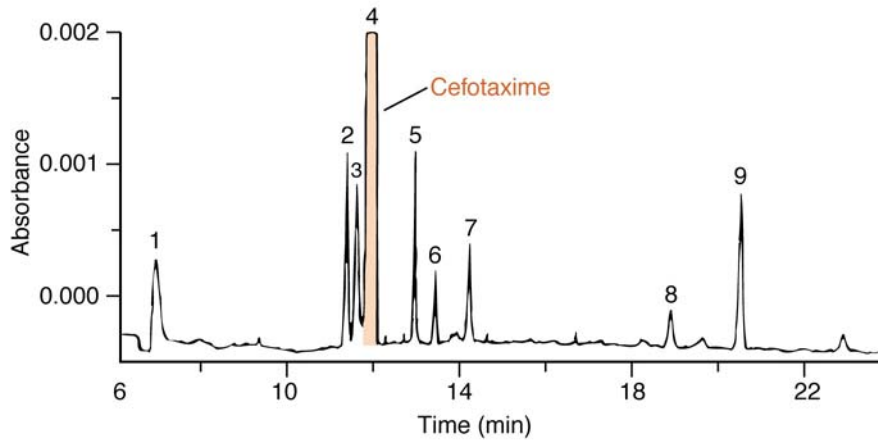
$$A_X / c_X = F (A_{st} / c_{st})$$



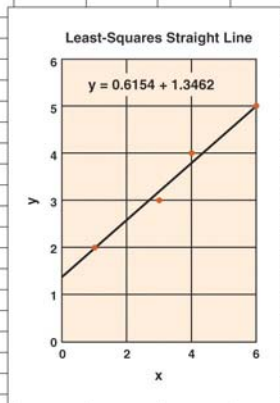
Stanovení EDTA v krevní plazmě

Stanovení léčiva Cefotaximu

známé nečistoty 2,3,5-9



	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	Least-Squares Spreadsheet											
2												
3	Number of	x	y	xy	x ²	d	d ²					
4	points (n)	1	2	2	1	0.03846	0.00148					
5		4	3	3	9	-0.19231	0.03698					
6			4	4	16	0.19231	0.03698					
7			6	5	30	-0.03846	0.00148					
8	----- Column Sums -----											
9		14	14		57	62	0.0000	7.7E-02				
10												
11	D =	std dev(y)=		A12 = \$A\$5*\$E9-\$B9*\$B9								
12		52	0.19612	A14 = (D19*\$A\$5-\$B9*\$C9)/\$A\$12								
13	m =	std dev(m)=		A16 = (E9*\$C9-\$D9*\$B9)/\$A\$12								
14		0.61538	0.05439	B12 = SQRT(G9/(\$A\$5-2))								
15	b =	std dev(b)=		B14 = \$B\$12*SQRT(\$A\$5/\$A\$12)								
16		1.34615	0.21414	B16 = \$B\$12*SQRT(E9/\$A\$12)								
17	F4 = C4-\$A\$14*\$B4-\$A\$16											
18												
19	Finding uncertainty in x with Equation 5-14:											
20												
21	Measured y =	Number of replicate values of y measured (k) =										
22		2.72										
23	Derived x =	Uncertainty in x =										
24		2.23250	0.3735									
25												
26	Derived x in cell A24 = (A22-A16)/A14											
27	Uncertainty in x cell G24 = (\$B\$12/ABS(\$A\$14))*SQRT((1/\$G\$22)											
28	+\$A\$24^2*\$A\$5/\$A\$12+\$E\$9/\$A\$12 - 2*\$A\$24*\$B\$9/\$A\$12)											



Obecné zásady při provádění kalibrace

- počet kalibračních vzorků $n > 6$;
- při metodě kalibrační křivky by koncentrace neznámého vzorku měla ležet v dynamickém rozsahu metody
- koncentrace analytu v kalibračních roztocích by měly být odstupňovány nelineárně (např. 1, 2, 4, 8, 16...), resp. podle chemometrických požadavků

Výhody a nevýhody kalibrace pomocí metody kalibrační křivky

- kalibrační graf či rovnici lze použít opakovaně;
- závislost $S = f(c)$ nemusí být lineární;
- *kalibrační roztoky mají jinou matici než vzorek*

Výhody a nevýhody kalibrace pomocí metody standardního přídávku

- vliv matrice na odezvu je stejný u vzorku i kalibračních roztoků;
- *kalibraci je nutno provádět při analýze každého vzorku;*
- *metoda je použitelná pouze v případě lineární závislosti $S = f(c)$*

Validace metody

Příklad

spektrofotometrické stanovení rimantadinu