การจัดทำเส้นโค้งการสอบเทียบ
(Preparation of Calibration Curve)

ดร. วันดี ลือสายวงศ์

28 สิงหาคม 2557

หัวข้อที่นำเสนอ

- บทนำ
- กระบวนการการสอบเทียบ (Calibration Process)
- รูปแบบของวิธีการสอบเทียบ (Calibration methods)
- ตัวอย่างเส้นโค้งการสอบเทียบสำหรับเทคนิค เช่น AAS, ICP-OES

คำนิยาม

- Calibration

operation that, under specified conditions, in a first step, establishes a relation between the **quantity values** with **measurement uncertainties** provided by **measurement standards** and corresponding **indications** with associated measurement uncertainties and, in a second step, uses this information to establish a relation for obtaining a **measurement result** from an indication

คำนิยาม

NOTE 1 A calibration may be expressed by a statement, calibration function, **calibration diagram**, **calibration curve**, or calibration table. In some cases, it may consist of an additive or multiplicative **correction** of the indication with associated measurement uncertainty.

NOTE 2 Calibration should not be confused with **adjustment of a measuring system**, often mistakenly called “self-calibration”, nor with **verification** of calibration.

NOTE 3 Often, the first step alone in the above definition is perceived as being calibration.

JCGM 200:2008, International vocabulary of metrology — Basic and general concepts and associated terms (VIM)

คำนิยาม

- **Calibration curve**

  expression of the relation between **indication** and corresponding **measured quantity value**

  NOTE: A calibration curve expresses a one-to-one relation that does not supply a **measurement result** as it bears no information about the **measurement uncertainty**.

JCGM 200:2008, International vocabulary of metrology — Basic and general concepts and associated terms (VIM)

การวิเคราะห์ทางเคมีด้วยเครื่องมือ

- ปัจจุบันการวิเคราะห์ทางเคมีส่วนใหญ่ทำโดยการใช้วิธีทางเครื่องมือ (instrumental methods) เทคนิคต่างๆ ที่ใช้ เช่น absorption and emission spectrometry, electrochemical methods, mass spectrometry, gas and liquid chromatograghy, etc.
- วิธีทางเครื่องมือมีข้อดีคือ
  - สามารถทำการวิเคราะห์ที่ยากหรือไม่สามารถใช้วิธีแบบดั้งเดิม โดยมีสภาพไว (sensitive) สูง และช่วงความเข้มข้นของการวิเคราะห์สิ่งที่ต้องการวัดกว้าง

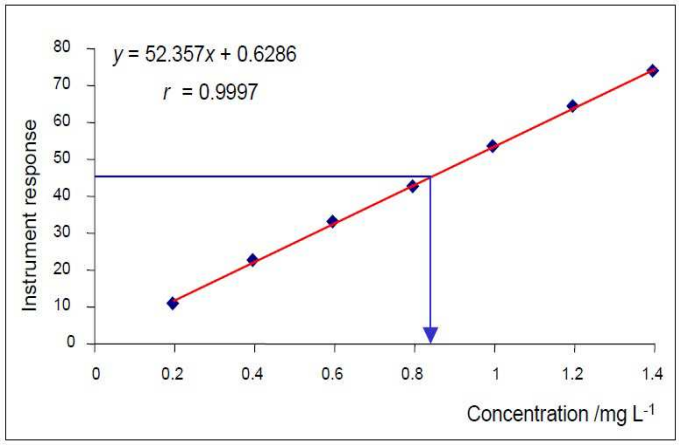
การวิเคราะห์ทางเคมีด้วยเครื่องมือ

- วิธีทางเครื่องมือมีข้อดีคือ
  - การวิเคราะห์ทำได้รวดเร็ว และประหยัดแรงงานกว่า
  - เครื่องมือวิเคราะห์มีการเชื่อมต่อกับคอมพิวเตอร์ทำให้สามารถควบคุมระบบที่มีความซับซ้อน เก็บข้อมูล ประมวลผล และรายงานผลได้สะดวก
- วิธีการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือต้องการการสอบเทียบของเครื่องมือ ซึ่งการสอบเทียบเครื่องมือ (Instrument calibration) เป็นขั้นตอนที่จำเป็นในการปฏิบัติการวัด
- การสอบเทียบเครื่องมือเป็นชุดปฏิบัติการที่สร้างความสัมพันธ์ระหว่างผลที่ได้รับของระบบการวัด และค่าที่ยอมรับของสารมาตรฐานการสอบเทียบ (calibration standards)

การวิเคราะห์ทางเคมีด้วยเครื่องมือ

- การสอบเทียบเครื่องมือทำโดย
  - เตรียมชุดของสารมาตรฐานการสอบเทียบ (อย่างน้อย 3 หรือ 4 หรืออาจมากกว่า) ที่ทราบความเข้มข้นของสิ่งที่ต้องการวัด
  - ทำการวัดการตอบสนองของเครื่องมือ (instrument response) ของสารมาตรฐานแต่ละสาร สร้างเส้นโค้งการสอบเทียบที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองของเครื่องมือกับความเข้มข้นของสิ่งที่ต้องการวัด
  - เมื่อได้เส้นโค้งการสอบเทียบ แล้ว สามารถหาความเข้มข้นของสิ่งที่ต้องการวัดในตัวอย่างโดยการ interpolation

ตัวอย่างเส้นโค้งการสอบเทียบ



Preparation of Calibration Curves, A Guide to Best Practice, September 2003, LGC/VAM/2003/032.

คำถามเกี่ยวกับการสร้างเส้นโค้งการสอบเทียบ

1. กราฟการสอบเทียบเป็นเส้นตรงไหม
2. เส้นตรงที่ดีที่สุดที่จะผ่านแต่ละจุดบนเส้นโค้งการสอบเทียบเป็นอย่างไร
3. ถ้าเส้นโค้งการสอบเทียบเป็นเส้นตรงจริง อะไรคือความคลาดเคลื่อน (errors) และขีดจำกัดความเชื่อมั่น (confidence limits) สำหรับความชันและจุดตัดแกนของเส้นตรงนี้
4. เมื่อมีการใช้กราฟการสอบเทียบสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่าง อะไรคือความคลาดเคลื่อน และขีดจำกัดความเชื่อมั่นสำหรับความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้

กระบวนการการสอบเทียบ (Calibration Process)

ขั้นตอนในกระบวนการการสอบเทียบ

- การวางแผนการทดลอง
- การทำการวัด
- การเขียนผลการวัด
- การวิเคราะห์ความถดถอย (regression analysis) ของข้อมูลที่ได้
- การประเมินผลของการวิเคราะห์ความถดถอย
- การใช้ฟังก์ชั่นการสอบเทียบเพื่อประมาณค่าของสิ่งที่ต้องการวัดในตัวอย่าง
- การประมาณค่าความไม่แน่นอนของค่าที่ได้รับในตัวอย่าง

การวางแผนการทดลอง

สิ่งที่จำเป็นต้องพิจารณาในการวางแผน

- จำนวนของสารมาตรฐานการสอบเทียบ
- ความเข้มข้นของแต่ละสารมาตรฐานการสอบเทียบ
- จำนวนซ้ำของแต่ละความเข้มข้น
- การเตรียมสารมาตรฐานการสอบเทียบ

สิ่งที่จำเป็นต้องพิจารณาในการวางแผน

- สารละลายการสอบเทียบเตรียมจากสารบริสุทธิ์ที่ทราบค่าความบริสุทธิ์หรือสารละลายของสารที่ทราบค่าความเข้มข้น ซึ่งต้องพิจารณาข้อมูลของวัสดุที่ใช้เตรียมสารมาตรฐานโดยเฉพาะค่าความไม่แน่นอนที่มากับค่าความเข้มข้น
- เนื้อสาร (Matrix) ที่ใช้เพื่อเตรียมสารมาตรฐาน
  - จะเตรียมสารมาตรฐานในตัวทำละลายบริสุทธิ์หรือเนื้อสารต้องมีความใกล้เคียงกับเนื้อสารของตัวอย่าง
  - ธรรมชาติของเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์ตัวอย่างและสารมาตรฐาน

สิ่งที่จำเป็นต้องพิจารณาในการวางแผน

  - ต้องมีการเติมสารมาตรฐานภายในที่เหมาะสมเพื่อปรับปรุงความแม่น (accuracy) ไหม
- ในอุดมคติ => สารมาตรฐานที่ใช้ควรเป็นอิสระต่อกัน ไม่ควรเตรียมจาก stock solution เดียวกันเพื่อลดความคลาดเคลื่อนในการเตรียม
- สำหรับการเตรียมชุดสารมาตรฐานเพื่อการสอบเทียบ เช่นในการตรวจสอบความสมเหตุสมผลของวิธี (method validation) ควรเตรียมชุดของสารมาตรฐานอย่างน้อย 7 ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน (รวมแบลงค์)

สิ่งที่จำเป็นต้องพิจารณาในการวางแผน

- ความเข้มข้นของสารมาตรฐานควรครอบคลุมช่วงความเข้มข้นที่ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่าง และมีช่วงห่างที่เท่ากันตลอดช่วงความเข้มข้น
- ทำการวัดแต่ละระดับความเข้มข้นอย่างน้อย 2 ซ้ำ โดยจำนวนซ้ำควรเตรียมแยกจากกัน

การทำการวัด

- ควรทำการวิเคราะห์ชุดสารมาตรฐานแบบสุ่ม แทนที่การวิเคราะห์เรียงตามลำดับความเข้มข้น
- เครื่องมือที่ใช้ในวิธีวิเคราะห์ต้องเหมาะสมกับวัตถุประสงค์การใช้งาน
- เป็นการดีที่สามารถแสดงว่าเครื่องมือเหมาะสมกับวัตถุประสงค์ โดยมีการจัดทำเอกสารหลักฐานเพื่อแสดงและมีการสอบเทียบ บำรุงรักษาที่สอดคล้องกับการใช้งาน

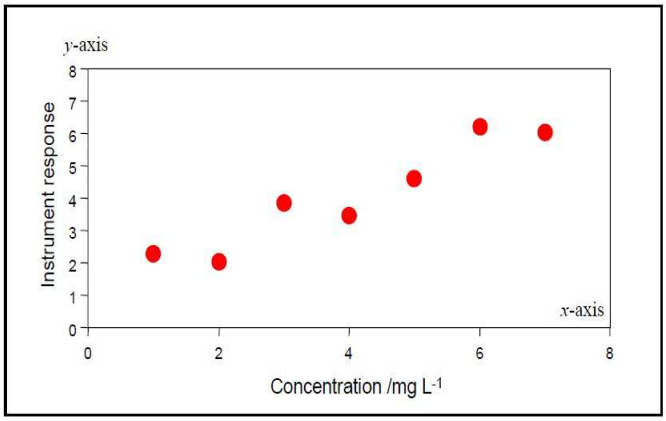
การพลอตผลการวัด

- การปฏิบัติที่ดีคือการพลอตข้อมูลก่อนการวิเคราะห์ทางสถิติ ซึ่งเป็นสิ่งที่จำเป็นในกรณีของความถดถอย (regression) เพราะค่าสถิติที่คำนวณอาจทำให้เกิดความเข้าใจผิดถ้าถูกพิจารณาแยกกัน
- ชุดข้อมูลของจำนวนที่เท่ากันสามารถถูกนำไปพลอตเพื่อดูว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างกันหรือไม่ โดยแกนนอนถูกนิยามให้เป็นแกน x และแกนตั้งเป็นแกน y

การพลอตผลการวัด

- ในการพลอตข้อมูลจากการทดลองการสอบเทียบ นิยมเขียนข้อมูลการตอบสนองของเครื่องมือบนแกน y และค่าของสารมาตรฐานบนแกน x เพราะสถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ความถดถอย (regression analysis) มีสมมุติฐานว่าความคลาดเคลื่อนของค่าบนแกน x ไม่มีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับความคลาดเคลื่อนของค่าบนแกน y
- ค่าที่เขียนบนแกน y ถือว่าเป็นตัวแปรที่ไม่อิสระเพราะค่าจะขึ้นกับปริมาณของตัวแปรอื่นๆ

ตัวอย่างการเขียนการกระจาย (Scatter Plot)



Preparation of Calibration Curves, A Guide to Best Practice, September 2003, LGC/VAM/2003/032.

การพลอตผลการวัด

การประเมินแผนภาพการกระจาย (Scatter plot)

- การเขียนของข้อมูลควรมีการตรวจสอบ outliers และจุดที่มีผลกระทบ (points of influence) ที่เป็นไปได้
- Outlier เป็นผลการวัดที่แตกต่างจากชุดข้อมูลที่เหลืออย่างมาก ซึ่งในกรณีของการสอบเทียบ outlier จะปรากฏเป็นจุดที่ควรเอาออกจากจุดการสอบเทียบอื่นๆ

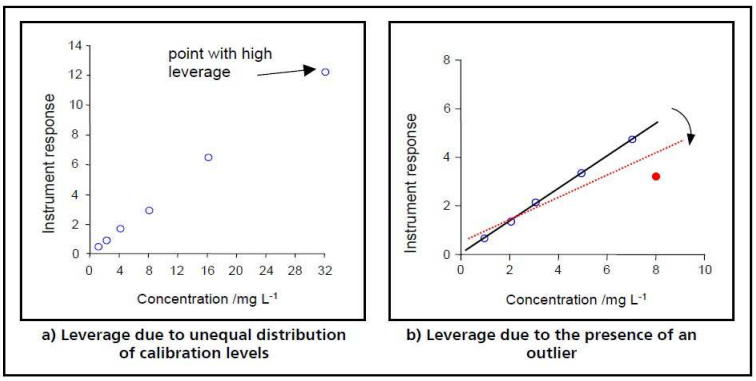
การพลอตผลการวัด

- จุดที่มีผลกระทบเป็นจุดการสอบเทียบที่มีผลกระทบที่ไม่ได้ส่วน (disproportionate effect) บนตำแหน่งของเส้นความถดถอย (regression line) ซึ่งอาจเป็น outlier หรือมีสาเหตุจากการออกแบบการทดลองที่ไม่เหมาะสม และสามารถมีผลกระทบต่อเส้นการสอบเทียบแบบ leverage หรือ bias

Leverage

- Leverage สามารถทำให้เกิดปัญหา ถ้าจุดการสอบเทียบหนึ่งหรือสองจุดเป็นจุดที่ห่างจากจุดอื่นๆบนแกน x ซึ่งจุดเหล่านี้จะมี leverage สูง ถึงแม้ว่าจะไม่เป็น outlier (รูป a)
- ความคลาดเคลื่อนเล็กน้อยในสัญญาณที่วัดได้จะมีผลกระทบมากต่อจุดของเส้นความถดถอย เหตุการณ์นี้เกิดเมื่อสารมารตฐานการสอบเทียบถูกเตรียมโดยการเจือจางสารละลายเป็นลำดับ
- Outlier ที่มีค่าแตกต่างออกไปอย่างมากของช่วงการสอบเทียบจะเปลี่ยนตำแหน่งของเส้นการสอบเทียบโดยการเอียงขึ้นหรือลง (รูป b)

Leverage

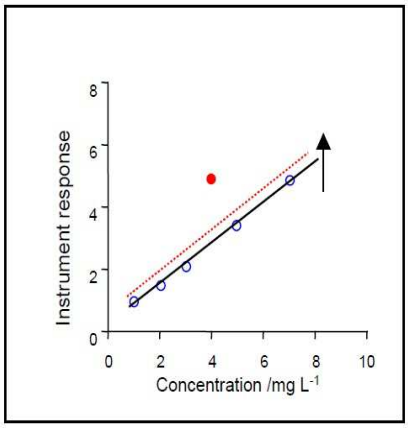


Preparation of Calibration Curves, A Guide to Best Practice, September 2003, LGC/VAM/2003/032.

Bias

- Outlier ที่อยู่ช่วงกลางของการสอบเทียบจะทำให้เส้นความถดถอยเลื่อนขึ้นหรือลงได้
- Outlier เป็นจุดที่มีผลกระทบเพราะมันนำไปสู่ความลำเอียง (bias) ในตำแหน่งของเส้น
- ความลาดชันของเส้นจะถูกต้องโดยประมาณ แต่จุดตัดแกน y จะผิดพลาด

Bias



Preparation of Calibration Curves, A Guide to Best Practice, September 2003, LGC/VAM/2003/032.

การวิเคราะห์ความถดถอยของข้อมูล

การวิเคราะห์ความถดถอย (Regression analysis)

- เป็นการศึกษาความสัมพันธ์ของตัวแปรตั้งแต่ 2 ตัวขึ้นไป โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อประมาณหรือพยากรณ์ค่าของตัวแปรตัวหนึ่งจากตัวแปรอื่นๆ ที่มีความสัมพันธ์กับตัวแปรที่ต้องการประมาณค่า โดยที่จะต้องทราบค่าตัวแปรอื่นล่วงหน้า
- ตัวอย่างการวิเคราะห์ความถดถอยเชิงเส้นอย่างง่าย (Simple linear regression analysis)

$$Y = a + bX + e$$

การวิเคราะห์ความถดถอยของข้อมูล

เมื่อ a = ค่าคงที่ หรือจุดตัด (intercept) ของสมการถดถอยเชิงเส้น

b = ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของตัวแปรอิสระ X หรือความชันของสมการถดถอยเชิงเส้น

e = ค่าความคลาดเคลื่อน (Residual) ที่เกิดจากผลต่างของค่าที่วัดได้ (y_i) กับค่าประมาณ ($\hat{y}_i$)

- การใช้ความถดถอยเชิงเส้นอยู่บนสมมุติฐานที่ว่าความคลาดเคลื่อนทั้งหมดอยู่ในค่าของ y และความคลาดเคลื่อนในค่าของ x ไม่มีนัยสำคัญ

การวิเคราะห์ความถดถอยของข้อมูล

- ในการสอบเทียบเครื่องมือ วัตถุประสงค์ของการใช้ความถดถอยเชิงเส้น (linear regression) เพื่อสร้างสมการที่อธิบายความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างการตอบสนองของเครื่องมือ (y) กับระดับของสิ่งที่ต้องการวัด (x) ที่ดีที่สุด
- ความสัมพันธ์นี้อธิบายโดยสมการเชิงเส้น เช่น

$$y = bX + a$$

เมื่อ *b* คือความชันของเส้น และ a คือจุดตัด

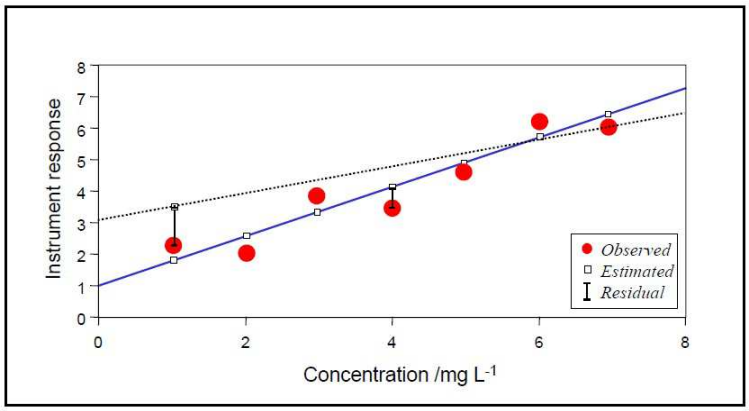
การวิเคราะห์ความถดถอยของข้อมูล

- ความถดถอยเชิงเส้นสร้างค่าของความชันและจุดตัดที่อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างชุดข้อมูลได้ดีที่สุด
- สมมุติฐานของความถดถอยเชิงเส้นสามารถประยุกต์ใช้กับวิธีการวิเคราะห์ต่างๆ เพราะมีความเป็นไปได้ที่จะเตรียมชุดสารมาตรฐานที่ค่าความไม่แน่นอนของความเข้มข้นไม่มีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับความแปรปรวนแบบสุ่มของเครื่องมือที่วิเคราะห์ ดังนั้นต้องมั่นใจว่าข้อมูลการตอบสนองของเครื่องมือและความเข้มข้นของสารมาตรฐานถูกกำหนดอย่างถูกต้อง

การวิเคราะห์ความถดถอยของข้อมูล

- Residual คือค่าความคลาดเคลื่อนที่เกิดจากผลต่างระหว่างค่าที่วัดได้ (y) กับค่า y ที่คำนวณโดยใช้สมการของเส้นที่เหมาะสม ($\hat{y}_i$)
- ค่าความคลาดเคลื่อนนี้เป็นเครื่องแสดงว่าเส้น fit กับข้อมูลดีแค่ไหน
- เส้นที่ให้ผลรวมกำลังสองของค่าความคลาดเคลื่อนที่น้อยที่สุดแสดงถึงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างตัวแปร x และ y ที่ดีที่สุด => “least squares regression”

Least squares linear regression



Preparation of Calibration Curves, A Guide to Best Practice, September 2003, LGC/VAM/2003/032.

สมมุติฐานต่างๆ สำหรับ Least squares linear regression

- การที่จะได้เส้น 'best-fit' เมื่อข้อมูลเป็นไปตามสมมุติฐานต่างๆ
- สมมุติฐานที่ 1 => ความคลาดเคลื่อนทั้งหมดอยู่ในค่าของ y และความคลาดเคลื่อนในค่าของ x ไม่มีนัยสำคัญ
- สมมุติฐานที่ 2 => ปริมาณความคลาดเคลื่อนในค่าของ y ควรมีค่าคงที่ตลอดช่วงที่สนใจ กล่าวคือส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation)ควรมีค่าคงที่

สมมุติฐานต่างๆ สำหรับ Least squares linear regression

- สมมุติฐานที่ 3 => ข้อมูลของ x และ y ต้องถูกให้ค่าอย่างต่อเนื่องได้ สมมุติฐานนี้ใช้ในกรณีของการสอบเทียบเครื่องมือ เพราะในทางทฤษฎีทั้งการตอบสนองของเครื่องมือและความเข้มข้นของชุดสารมาตรฐานสามารถใช้ค่าใดๆ บนมาตรฐานการวัดที่ต่อเนื่อง

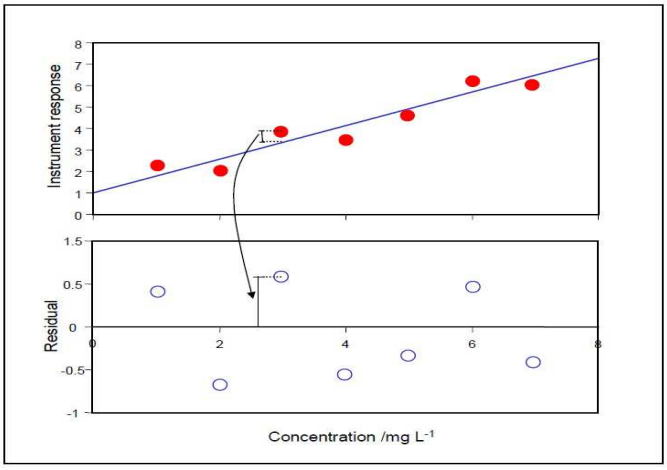
การวิเคราะห์ความถดถอยของข้อมูลโดยใช้ซอร์พแวร์

- การวิเคราะห์ความถดถอยโดยทำโดยใช้ซอร์พแวร์ที่มากับเครื่องมือหรือโปรแกรม Excel
- ซอร์พแวร์ส่วนมากทำการวิเคราะห์ความถดถอยโดยไม่ต้องทำการเขียนข้อมูลเบื้องต้น
- อย่างไรก็ตามจะเป็นการปฏิบัติที่ดีหากมีการเขียนก่อนทำการวิเคราะห์ทางสถิติ และถ้าเลือกได้ มันจะมีประโยชน์ที่จะเขียน plot of the residuals ด้วย
- ซอร์พแวร์ส่วนมากสามารถเลือกที่จะตั้งค่าจุดตัดแกน y เป็นศูนย์เมื่อทำการวิเคราะห์ความถดถอย ทางเลือกนี้ไม่ควรใช้จนกว่าจะมีการพิสูจน์ว่าจุดตัดแกน y ไม่แตกต่างจากศูนย์อย่างมีนัยสำคัญ

การประเมินผลของการวิเคราะห์ความถดถอย

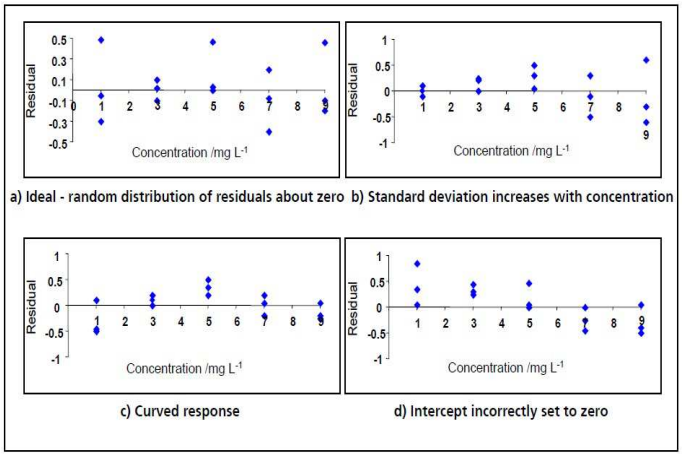
- การใช้ซอร์พแวร์เพื่อทำการวิเคราะห์ความถดถอยให้ผลเป็นพารามิเตอร์ทางสถิติที่แตกต่างกันจำนวนหนึ่ง และอาจมีตารางและ/หรือ plot of residuals
- Plot of residuals มีความสำคัญเพราะมันสามารถทำให้เห็นถึงปัญหากับข้อมูลการสอบเทียบที่อาจไม่เห็นได้อย่างชัดเจนจากแผนภาพการกระจาย (scatter plot) ของชุดข้อมูล

Residual Plot



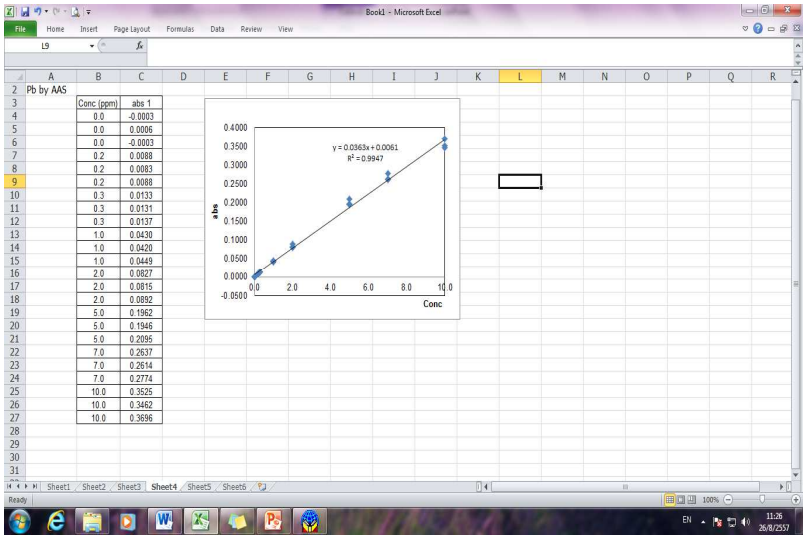
Preparation of Calibration Curves, A Guide to Best Practice, September 2003, LGC/VAM/2003/032.

Examples of Residuals Plot

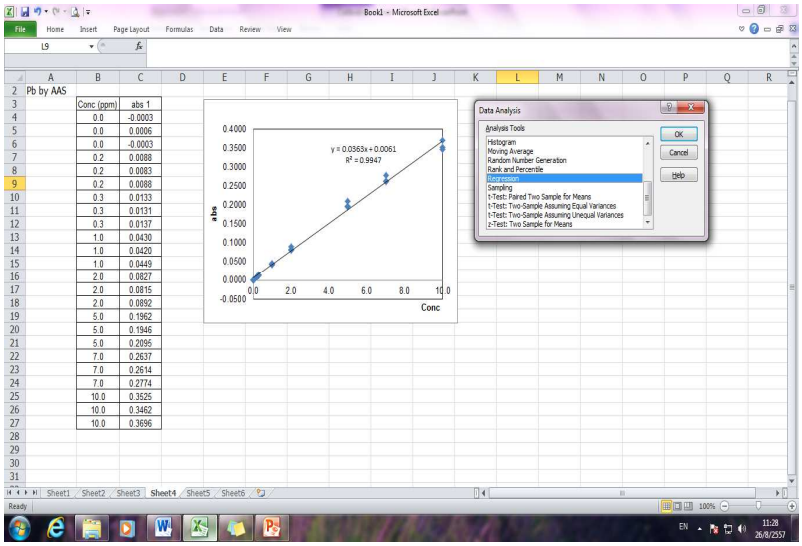


Preparation of Calibration Curves, A Guide to Best Practice, September 2003, LGC/VAM/2003/032.

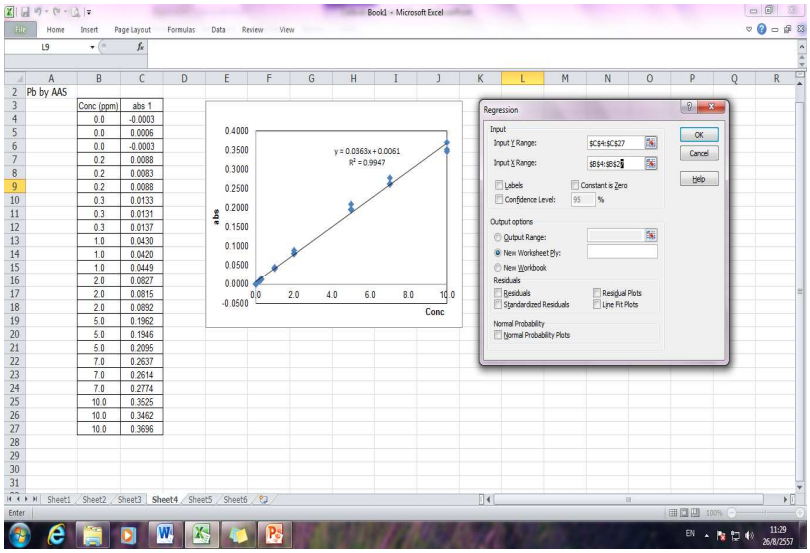
การวิเคราะห์ความถดถอยโดยใช้ Excel



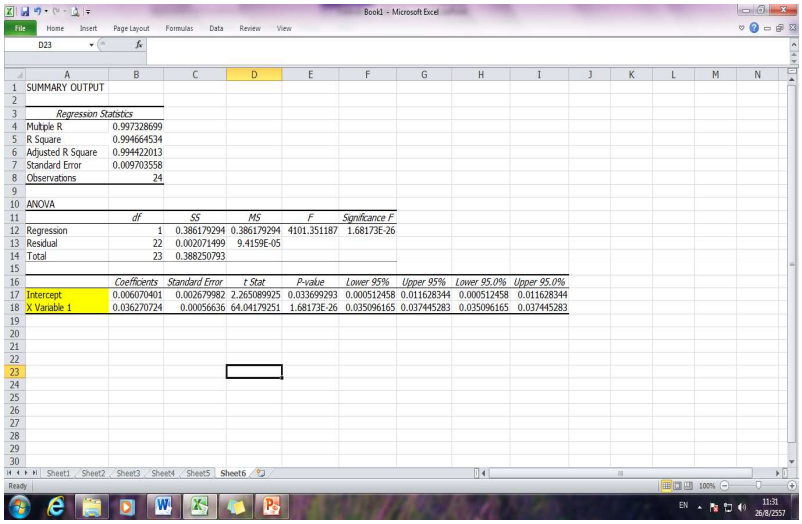
การวิเคราะห์ความถดถอยโดยใช้ Excel



การวิเคราะห์ความถดถอยโดยใช้ Excel



การวิเคราะห์ความถดถอยโดยใช้ Excel



	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	SUMMARY OUTPUT								
2									
3	*Regression Statistics*								
4	Multiple R	0.997328699							
5	R Square	0.994664534							
6	Adjusted R Square	0.994422013							
7	Standard Error	0.009703558							
8	Observations	24							
9									
10	ANOVA								
11		*df*	*SS*	*MS*	*F*	*Significance F*			
12	Regression	1	0.386179294	0.386179294	4101.351187	1.68173E-26			
13	Residual	22	0.002071499	9.4159E-05					
14	Total	23	0.388250793						
15									
16		*Coefficients*	*Standard Error*	*t Stat*	*P-value*	*Lower 95%*	*Upper 95%*	*Lower 95.0%*	*Upper 95.0%*
17	Intercept	0.006070401	0.002679982	2.265089925	0.033699293	0.000512458	0.011628344	0.000512458	0.011628344
18	X Variable 1	0.036270724	0.00056636	64.04179251	1.68173E-26	0.035096165	0.037445283	0.035096165	0.037445283

สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient)

- สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เป็นการวัดความเข้มแข็งของระดับความสัมพันธ์ (correlation) ระหว่างค่า y และ x โดยเป็นหนึ่งในค่าสถิติที่ใช้กันทั่วไปในการวัดด้านการวิเคราะห์
- สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มีค่าอยู่ระหว่าง +1 และ -1 โดยค่าที่เข้าใกล้ 1 แสดงถึงความสัมพันธ์อย่างมาก
- ใน Excel output ค่านี้แสดงเป็น Multiple R

สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient)

ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ถูกแปลความผิดโดยง่ายเพราะ

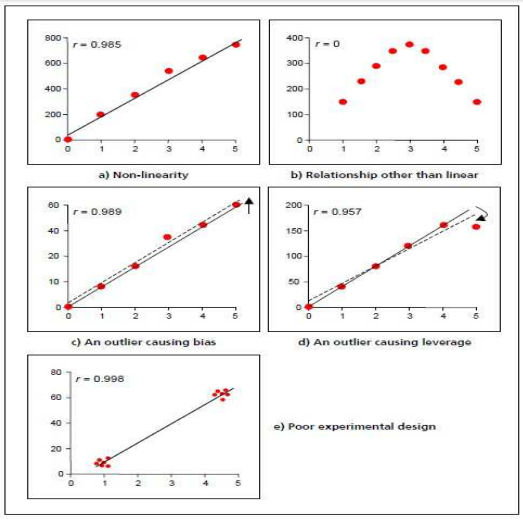
- สหสัมพันธ์ (correlation) และความสัมพันธ์เชิงเส้น (linearity) มีความเกี่ยวข้องกันอย่างหลวมๆ สัมประสิทธิ์ r เป็นการวัดสหสัมพันธ์ไม่ใช่การวัดความสัมพันธ์เชิงเส้น
- มันเป็นการง่ายที่จะสร้างข้อมูลที่มีสหสัมพันธ์ที่ดี อย่างไรก็ตามการพลอตข้อมูลอาจทำให้รู้ว่าข้อมูลไม่เป็นที่พึงพอใจสำหรับวัตถุประสงค์ของการสอบเทียบ

สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient)

ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ถูกแปลความผิดโดยง่ายเพราะ

- สำหรับการคาดการณ์ที่ทำจากเส้นการสอบเทียบเพื่อมีค่าความไม่แน่นอนน้อย r จำเป็นต้องใกล้ 1 อย่างมาก
- ค่า r ที่น้อยไม่ได้หมายความว่าไม่มีสหสัมพันธ์อาจมีความสัมพันธ์ระหว่าง y และ x แต่ไม่ได้เป็นเส้นตรง

Interpreting the Correlation Coefficient

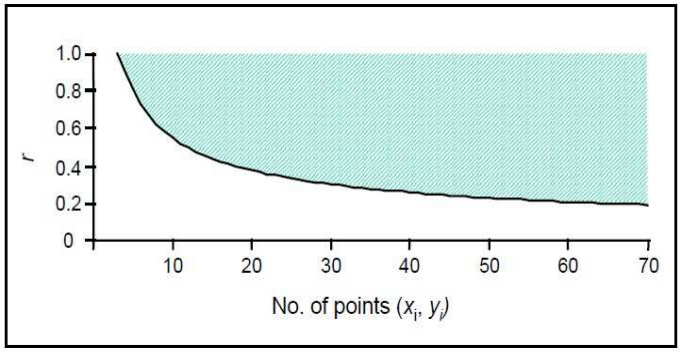


Preparation of Calibration Curves, A Guide to Best Practice, September 2003, LGC/VAM/2003/032.

สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient)

- คำถาม “สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ต้องเข้าใกล้ 1 แค่ไหนสำหรับเส้นการสอบเทียบที่ดี”
  - นักวิเคราะห์ต้องพิจารณาเส้นการสอบเทียบว่าจะให้ระดับความเชื่อมั่นของค่าความไม่แน่นอนในค่าที่คำนวณจากเส้นโค้งการสอบเทียบอย่างไร
- ค่าเฉพาะของ r ที่แสดงถึงสหสัมพันธ์ที่สำคัญทางสถิติระหว่าง y และ x ขึ้นกับจำนวนของข้อมูลที่ใช้ในการคำนวณ

Statistically significant values of r at the 95% confidence level



Preparation of Calibration Curves, A Guide to Best Practice, September 2003, LGC/VAM/2003/032.

สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient)

- การทดสอบทางสถิติที่เหมาะสมเพื่อพิจารณาว่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มีนัยสำคัญสามารถทำโดยการคำนวณ t-value ดังสมการ

  H_o = zero correlation

$$t = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$$

- นำค่าที่คำนวณได้ของ *t* ไปเปรียบเทียบกับค่าในตารางที่ระดับความเชื่อมั่นที่ต้องการโดยใช้ *two-sided t*-test และ degrees of freedom เท่ากับ n – 2
- ถ้าค่าที่คำนวณของ *t* มากกว่าค่าในตาราง นั่นคือ ปฏิเสธ H_o และสรุปว่าสหสัมพันธ์มีนัยสำคัญ

สัมประสิทธิ์ของตัวกำหนด (Coefficient determination)

- สัมประสิทธิ์ของตัวกำหนด (Coefficient determination, r^2) ใช้อธิบายส่วนหนึ่งของความแปรปรวนทั้งหมดในข้อมูลที่มีผลต่อเส้นการสอบเทียบ
- คุณสมบัติของสัมประสิทธิ์ของตัวกำหนด
  - ไม่มีหน่วยเพราะเป็นอัตราส่วนระหว่างค่าการกระจาย 2 ค่า
  - มีค่าเป็นบวกเสมอ โดยมีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 1 นั่นคือ $0 \leq r^2 \leq 1$
- ถ้ามีความสัมพันธ์เชิงเส้นที่ดี ค่าที่เปลี่ยนแปลงได้ส่วนใหญ่สามารถใช้เพื่ออธิบายเส้นการสอบเทียบที่เหมาะสม ดังนั้น r^2 ควรเข้าใกล้ 1 เช่นกัน

Residual Standard Deviation

- Residual standard deviation หรือ Residual standard error เป็นการวัดทางสถิติของความเบี่ยงเบนของข้อมูลจากความเหมาะสมของเส้นความถดถอย
- สมการการคำนวณคือ

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum(y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$$

เมื่อ y_i คือค่าที่วัดได้ของ y สำหรับค่าที่ให้ของ x_i

$\hat{y}_i$ คือค่าของ y ที่คำนวณโดยสมการของเส้นการสอบเทียบสำหรับค่าที่ให้ของ x_i

n คือจำนวนจุดของการสอบเทียบ

Regression Coefficients

SUMMARY OUTPUT

Regression Statistics	
Multiple R	0.997328699
R Square	0.994664534
Adjusted R Square	0.994422013
Standard Error	0.009703558
Observations	24

ANOVA

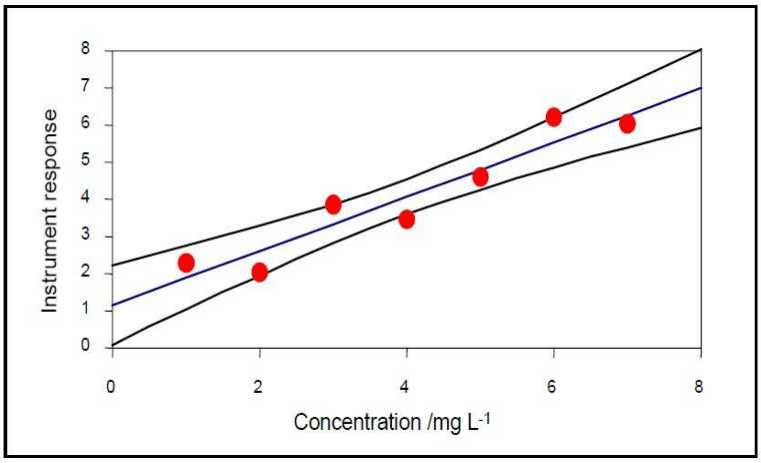
	df	*SS*	*MS*	*F*	*Significance F*
Regression	1	0.386179294	0.386179294	4101.351187	1.68173E-26
Residual	22	0.002071499	9.4159E-05		
Total	23	0.388250793			

	Coefficients	*Standard Error*	*t Stat*	*P-value*	*Lower 95%*	*Upper 95%*	*Lower 95.0%*	*Upper 95.0%*
Intercept	0.006070401	0.002679982	2.265089925	0.033699293	0.000512458	0.011628344	0.000512458	0.011628344
X Variable 1	0.036270724	0.00056636	64.04179251	1.68173E-26	0.035096165	0.037445283	0.035096165	0.037445283

การใช้ฟังก์ชั่นการสอบเทียบเพื่อประมาณค่าของสิ่งที่ต้องการวัดในตัวอย่าง

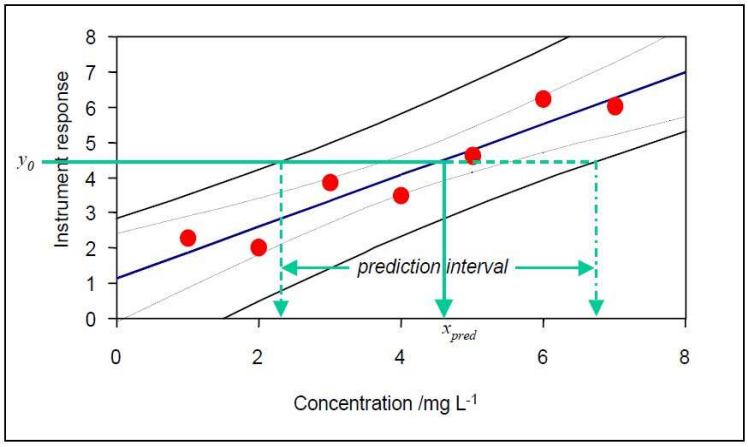
- หลังจากการพลอตข้อมูลและพิจารณาสถิติความถดถอย ข้อมูลการสอบเทียบที่ถูกตัดสินความพอใจของสมการการสอบเทียบ (กล่าสคือความลาดชันลุดตัดแกน) สามารถใช้เพื่อประมาณความเข้มข้นของสิ่งที่ต้องการวัดในตัวอย่าง
- การปฏิบัติส่วนนี้แต่ละตัวอย่างจะถูกวิเคราะห์หนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งครั้ง ภายใต้ภาวะการวัดเดียวกับที่สารมาตรฐานการสอบเทียบถูกทำการวัด
- มันมีประโยชน์ที่จะประมาณค่าความไม่แน่นอนที่ติดมากับค่าความเข้มข้นที่คำนวณสำหรับตัวอย่างที่ทดสอบ

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของสิ่งที่ต้องการวัดในตัวอย่าง



Preparation of Calibration Curves, A Guide to Best Practice, September 2003, LGC/VAM/2003/032.

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของสิ่งที่ต้องการวัดในตัวอย่าง



Preparation of Calibration Curves, A Guide to Best Practice, September 2003, LGC/VAM/2003/032.

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของสิ่งที่ต้องการวัดในตัวอย่าง

$$u(X_0) = \frac{s_{y/x}}{b}\sqrt{\frac{1}{m}+\frac{1}{n}+\frac{(X_0-\bar{X})^2}{\sum_i (X_i-\bar{X})^2}}$$

b = ความชัน (slope)
m = จำนวนครั้งในการวัดค่า x_o
n = จำนวนครั้งในการวัดเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน
x_0 = ค่าที่วัดได้ของตัวอย่าง
$\bar{X}$ = ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ที่ใช้สร้างกราฟมาตรฐาน (วัดทั้งหมด n ครั้ง)
i = จำนวนจุดที่ใช้สร้างกราฟมาตรฐาน

55

รูปแบบของวิธีการสอบเทียบ (Calibration methods)

1. เส้นโค้งการสอบเทียบ (calibration curve)
2. วิธีการเติมสารมาตรฐาน (standard addition method)
3. วิธีสารมาตรฐานภายใน (internal standard method)

เส้นโค้งการสอบเทียบ (Calibration curve)

- เส้นโค้งการสอบเทียบ อาจเรียกว่า working curve หรือ analytical curve
- ทำโดยการวิเคราะห์แบลงค์และชุดของสารมาตรฐานที่ทราบค่าความเข้มข้นโดยใช้เครื่องมือ และบันทึกการตอบสนองของเครื่องมือ
- พลอตกราฟของการตอบสนองของเครื่องมือกับความเข้มข้นของสิ่งที่ต้องการวัด

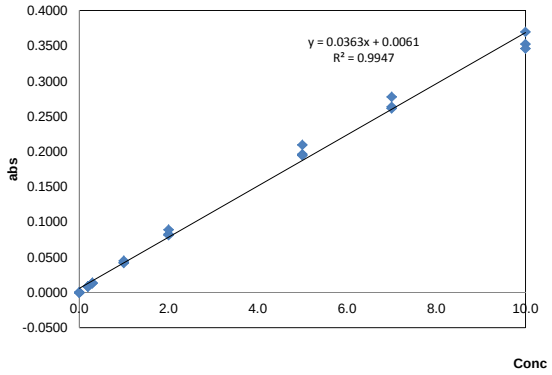
เส้นโค้งการสอบเทียบ (Calibration curve)

- การพลอตเป็นเส้นตรงครอบคลุมช่วงความเข้มข้น (dynamic range) และคำนวณสมการของเส้นโค้งการสอบเทียบโดย least-squares technique และใช้สมการเพื่อคำนวณความเข้มข้นของตัวอย่าง
- ความถูกต้องเหมาะสมของเส้นโค้งการสอบเทียบ ขึ้นกับความถูกต้องของความเข้มข้นของสิ่งที่ต้องการวัดของสารมาตรฐานและความใกล้เคียงของเนื้อสารในสารมาตรฐานกับเนื้อสารในตัวอย่าง

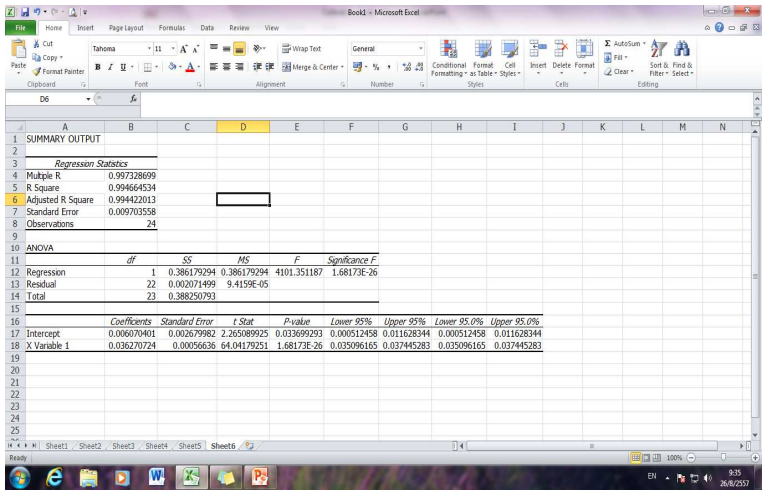
ตัวอย่างเส้นโค้งการสอบเทียบของเทคนิค AAS

การวิเคราะห์ตะกั่วในทองแดง

(Normal calibration curve)



ตัวอย่าง Regression Analysis ของข้อมูลจาก AAS



SUMMARY OUTPUT

Regression Statistics	
Multiple R	0.997328699
R Square	0.994664534
Adjusted R Square	0.994422013
Standard Error	0.009703558
Observations	24

ANOVA

	df	SS	MS	F	Significance F
Regression	1	0.386179294	0.386179294	4101.351187	1.68173E-26
Residual	22	0.002071499	9.4159E-05		
Total	23	0.388250793			

	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%	Lower 95.0%	Upper 95.0%
Intercept	0.006070401	0.00267982	2.265089925	0.033699293	0.000512458	0.011628344	0.000512458	0.011628344
X Variable 1	0.036270724	0.00056636	64.04179251	1.68173E-26	0.035096165	0.037445283	0.035096165	0.037445283

วิธีการเติมสารมาตรฐาน (Standard addition method)

- วิธีการเติมสารมาตรฐานมีประโยชน์สำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีความซับซ้อน เช่น มีผลกระทบจากเนื้อสาร
- สามารถทำได้หลายวิธี โดยวิธีที่ใช้กันทั่วไปคือการเติมสารละลายมาตรฐานลงไปในสารละลายตัวอย่าง และเจือจางให้ได้ปริมาตรตามต้องการก่อนการวัด
- การวัดทำโดยวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างและชุดสารละลายตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน
- พลอตกราฟของการตอบสนองของเครื่องมือกับความเข้มข้นของสิ่งที่ต้องการวัด

วิธีสารมาตรฐานภายใน (Internal standard method)

- สารมาตรฐานภายใน (Internal standard) คือสารที่ถูกเติมในสารมาตรฐานการสอบเทียบ แบลงค์และทุกตัวอย่างในปริมาณที่เท่ากันสำหรับการวิเคราะห์ หรืออาจเป็นองค์ประกอบหลักของตัวอย่างและสารมาตรฐานที่มีปริมาณมาก
- การสร้างเส้นโค้งการสอบเทียบทำโดยการพลอตอัตราส่วนของสัญญาณของสิ่งที่ต้องการวัดต่อสัญญาณของสารมาตรฐานภายในกับความเข้มข้นของของสารมาตรฐาน
- อัตราส่วนนี้สำหรับตัวอย่างจะถูกใช้เพื่อคำนวณค่าความเข้มข้นของสิ่งที่ต้องการวัดจากเส้นโค้งการสอบเทียบ

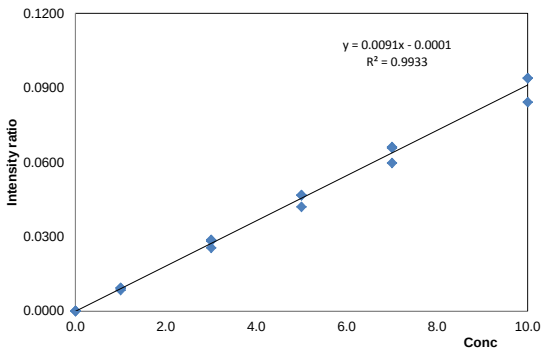
วิธีสารมาตรฐานภายใน (Internal standard method)

- การเลือกใช้สารมาตรฐานภายในที่เหมาะสมสามารถแก้ไขทั้งความคลาดเคลื่อนแบบสุ่มและเชิงระบบ
- เมื่อสารมาตรฐานภายในเป็นองค์ประกอบหลักของตัวอย่างและสารมาตรฐาน สามารถใช้เพื่อแก้ไขความคลาดเคลื่อนต่างๆ ที่มาจากการเตรียมตัวอย่าง สารละลาย และการทำความสะอาด (cleanup)

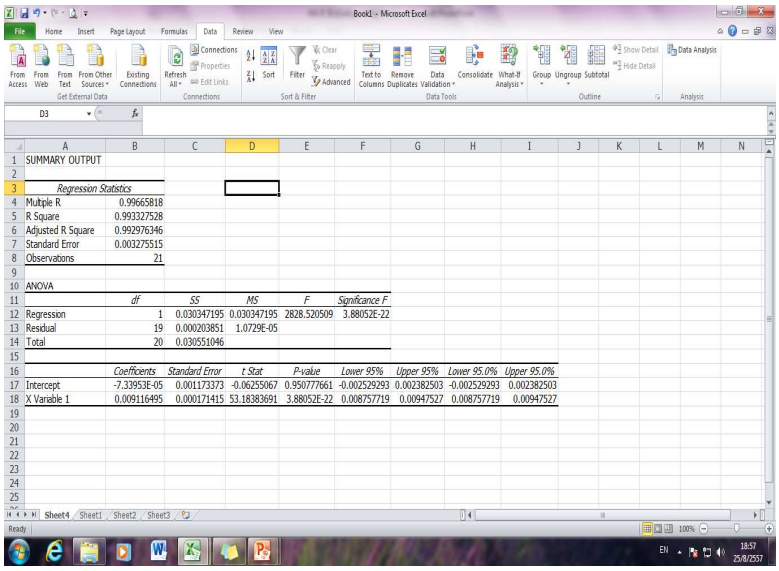
ตัวอย่างเส้นโค้งการสอบเทียบของเทคนิค ICP-OES

การวิเคราะห์ตะกั่วในโลหะบัดกรีไร้ตะกั่ว

(Internal standard method)



ตัวอย่าง Regression Analysis ของข้อมูลจาก ICP-OES



	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	SUMMARY OUTPUT								
2									
3	*Regression Statistics*								
4	Multiple R	0.99665818							
5	R Square	0.993327528							
6	Adjusted R Square	0.992976346							
7	Standard Error	0.003275515							
8	Observations	21							
9									
10	ANOVA								
11		*df*	*SS*	*MS*	*F*	*Significance F*			
12	Regression	1	0.030347195	0.030347195	2828.520509	3.88052E-22			
13	Residual	19	0.000203851	1.0729E-05					
14	Total	20	0.030551046						
15									
16		*Coefficients*	*Standard Error*	*t Stat*	*P-value*	*Lower 95%*	*Upper 95%*	*Lower 95.0%*	*Upper 95.0%*
17	Intercept	-7.33953E-05	0.001173373	-0.06255067	0.950777661	-0.002529293	0.002382503	-0.002529293	0.002382503
18	X Variable 1	0.009116495	0.000171415	53.18383691	3.88052E-22	0.008757719	0.0094752	0.008757719	0.0094752

บทสรุป

สิ่งที่ควรกระทำในการจัดทำเส้นโค้งการสอบเทียบเพื่อให้มีความถูกต้องคือ

- มีการวางแผนการวิเคราะห์ และการทำการวัด
- เลือกใช้รูปแบบการสร้างเส้นโค้งการสอบเทียบให้เหมาะสม
- พิจารณาข้อมูลการวิเคราะห์ความถดถอยว่าเป็นไปตามเกณฑ์และสมมุติฐานต่างๆ
- การประมาณค่าความไม่แน่นอนของสิ่งที่ต้องการวัดในตัวอย่างเหมาะสมกับวัตถุประสงค์การใช้งาน

เอกสารอ้างอิง

- JCGM 200:2008, International vocabulary of metrology — Basic and general concepts and associated terms (VIM)
- Preparation of Calibration Curves, A Guide to Best Practice, September 2003, LGC/VAM/2003/032.
- James N Miller & Jane C Miller, Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry, 5th edition, Pearson Education Limited, 2005, p 107-145.
- Douglas A. Skoog, et.al. Principles of Instrumental Analysis, 5th edition, Harcourt Brace College Publishers, 1998, p 11-19.
- เอกสารการฝึกอบรมหลักสูตร สถิติที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทดสอบ โครงการเครือข่ายห้องปฏิบัติการทดสอบ วันที่ 15-16 สิงหาคม 2549 กรมวิทยาศาสตร์บริการ