# ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΜΠΥΛΩΝ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ: ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΚΑΙ ΝΕΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ

**Μάριος Γ. Κωστάκης, Νικόλαος Σ. Θωμαΐδης, Μιχαήλ Α. Κουππάρης**
**Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιούπολη Ζωγράφου, 157 71, Αθήνα**
**e-mail: makostak@chem.uoa.gr**

**Περίληψη**

Απαραίτητο χαρακτηριστικό για την επικύρωση και εφαρμογή μιας αναλυτικής μεθόδου είναι η συσχέτιση του σήματος με τη μετρούμενη ποσότητα. Στο μεγαλύτερο ποσοστό των αναλυτικών μεθόδων η συσχέτιση αυτή είναι γραμμική. Ο έλεγχος για την ύπαρξη της γραμμικότητας είναι μια συνηθισμένη διαδικασία κατά την επικύρωση των μεθόδων. Στο πρώτο μέρος της εργασίας, γίνεται μια ανασκόπηση των συνηθισμένων ελέγχων που πραγματοποιούνται για την ύπαρξη της γραμμικότητας, τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα του συντελεστή συσχέτισης (r) και ο έλεγχος της γραμμικότητας με την χρήση της ανάλυσης των διακυμάνσεων (ANOVA).

Στο δεύτερο μέρος θα γίνει αναφορά στη ζυγισμένη παλινδρόμηση. Η ζυγισμένη παλινδρόμηση, αν και αποτελεί μια λιγότερη χρησιμοποιούμενη στατιστική μέθοδο για τον έλεγχο της γραμμικότητας, αρχίζει να κερδίζει έδαφος λόγω της μεγάλης ανάπτυξης των τεχνικών φασματομετρίας μαζών σε συνδυασμό με την υγροχρωματογραφία. Η αναλογική σχέση μεταξύ σήματος και μετρούμενης παραμέτρου, στα φασματόμετρα μαζών, μπορεί να επηρεασθεί, είτε λόγω της πηγής των ιόντων, είτε εξαιτίας της μεταφορά τους στον αναλυτή μαζών, είτε λόγω της φύσης του ανιχνευτή των ιόντων. Για τους παραπάνω λόγους, πολλές φορές χρησιμοποιείται η ζυγισμένη παλινδρόμηση. Σε αυτό το μέρος, θα παρουσιαστεί η διαδικασία για την εκτίμηση της αναγκαιότητας της ζύγισης και την αναζήτηση του κατάλληλου συντελεστή ζύγισης στην παλινδρόμηση.

*Λέξεις-Κλειδιά: γραμμικότητα, ζυγισμένη παλινδρόμηση, ANOVA, LC-MS/MS.*

**Abstract**

A necessary part of validation and application of an analytical method is calibration. In most analytical methods, the calibration curve is linear. The access of linearity is also a common procedure. In the first part of our presentation, it is presented a review of linearity test, the advantages and disadvantages of correlation coefficient (r) and ANOVA as a statistical test for linearity.

In the second part, the weighted calibration is discussed. Even if weighted calibration is not so usual in common practice, it is used more and more common because of the large development of Liquid Chromatography – Mass Spectrometry methods. The reason is because the linearity of signal in mass spectrometers is influenced of the type of ion source or the ion transportation inside the mass spectrometer or the design of mass analyzer. In this part it will presented the calculations of weighted calibration and the access of the best weighting factor.

*Keywords: linearity, weighted calibration, ANOVA, LC-MS/MS.*

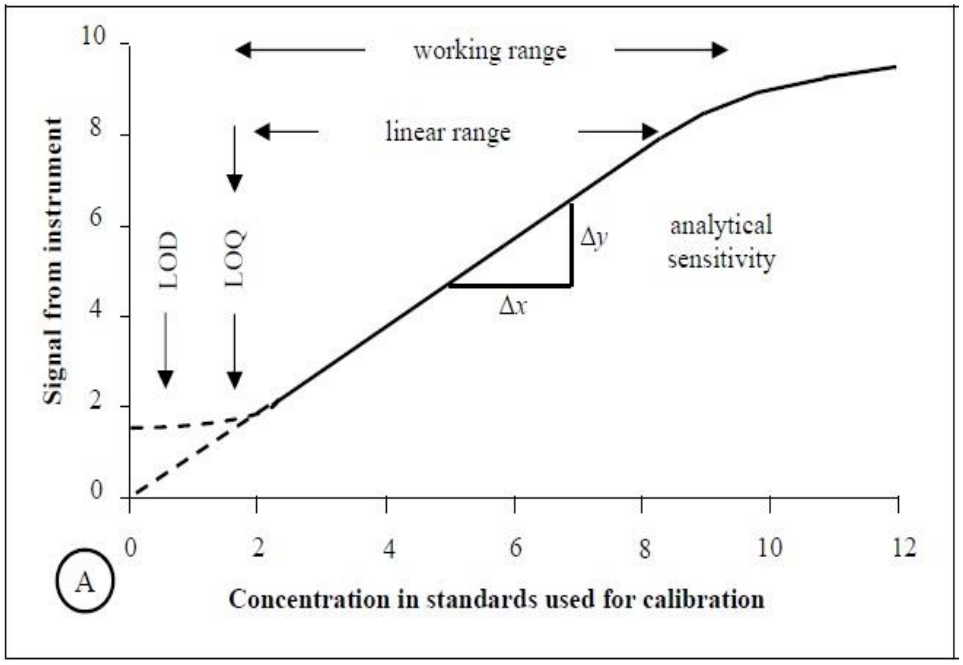
## 1. Εισαγωγή - Έννοιες

Απαραίτητο χαρακτηριστικό ποιότητας για την επικύρωση μιας αναλυτικής μεθόδου είναι η εκτίμηση του εύρους συγκεντρώσεων μέσα στο οποίο μπορεί να εφαρμοσθεί η μέθοδος. Το εύρος αυτό ονομάζεται εύρος εργασίας (working range) και ορίζεται ως το εύρος συγκεντρώσεων μέσα στο οποίο η μέθοδος παρέχει αποτελέσματα με αποδεκτή αβεβαιότητα, σύμφωνα με τη δεύτερη έκδοση του οδηγό της Eurachem "The fitness for Purpose of Analytical Methods" (Mangusson and Ornemark 2014). Σύμφωνα με τον ίδιο οδηγό, το εύρος αυτό κυμαίνεται από το όριο ποσοτικοποίησης έως το σημείο στο οποίο παύει να ισχύει η σχέση μεταξύ σήματος και συγκέντρωσης, δηλαδή της καμπύλης βαθμονόμησης.

Κατά την επικύρωση της μεθόδου, σύμφωνα με τον παραπάνω οδηγό, για την εκτίμηση του εύρους εργασίας θα πρέπει να γίνουν τα εξής:

1. Επιβεβαίωση της σχέσης βαθμονόμησης.
2. Το εύρος εργασίας του οργάνου να περικλείει το εύρος εργασίας της μεθόδου.
3. Επαλήθευση ότι η προτεινόμενη σχέση ποσοτικοποίησης δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Στην Αναλυτική Χημεία η σχέση αυτή τις περισσότερες φορές είναι γραμμική και ο υπολογισμός της γίνεται με την μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων, ενώ μερικές φορές η σχέση μπορεί να είναι και μη γραμμική (λογαριθμική, πολυωνυμική κλπ). Παράλληλα, μαζί με τον υπολογισμό της σχέσης βαθμονόμησης γίνεται και υπολογισμός της ευαισθησίας της μεθόδου. Όλα τα παραπάνω φαίνονται στο σχήμα 1 διαγραμματικά.




Σχήμα 1 Διαγραμματική απεικόνιση του εύρους εργασία, του εύρους γραμμικότητας και της αναλυτικής ευαισθησίας (Mangusson and Ornemark 2014).

## 2. Σχεδιασμός, εκτίμηση και αξιολόγηση της Γραμμικότητας

Ο σχεδιασμό της επικύρωσης της μεθόδου, στην εκτίμηση του εύρους εργασίας, πολλές φορές δημιουργεί προβληματισμό στον αναλυτή για το εύρος μέσα στο οποίο θα κινηθεί ώστε να εκτιμήσει την γραμμικότητα. Ο οδηγός της EURACHEM δίνει μια προσέγγιση για το πώς μπορεί να σχεδιαστεί και να εκτιμηθεί η γραμμικότητας μέσα από τρία στάδια (Mangusson and Ornemark 2014):

- **1ο Στάδιο: Εκτίμηση της σχέσης και του εύρους γραμμικότητας**

Στο στάδιο αυτό γίνεται μια εκτίμηση ποιο είναι το εύρος. Επίσης ελέγχεται αν η σχέση μεταξύ σήματος και συγκέντρωσης είναι γραμμική. Η διαδικασία αυτή γίνεται με μέτρηση 6 προτύπων σε όλο το επιθυμητό εύρος συγκεντρώσεων. Το επιθυμητό εύρος είναι το εύρος συγκεντρώσεων μέσα στο οποίο αναμένεται η συγκέντρωση των δειγμάτων. Συνήθως το εύρος αυτό είναι το ±10% ή το ±20% της αναμενόμενης τιμής (αν υπάρχει). Η κατανομή των συγκεντρώσεων πρέπει να είναι σε όμοια διαστήματα, ενώ η εκτίμηση της ύπαρξης γραμμικότητας γίνεται οπτικά. Το αποτέλεσμα της παραπάνω διαδικασίας είναι η εκτίμηση του κατώτερου και του ανώτερου ορίου εργασίας, που ολοκληρώνεται η γραμμική περιοχή και μια εκτίμηση του ορίου ποσοτικοποίησης. Τέλος στην περίπτωση που είναι γνωστό ότι το σήμα δεν έχει άμεση γραμμική συσχέτιση με τη συγκέντρωση, τότε πριν την αξιολόγηση θα πρέπει να γίνει η μετατροπή της μετρούμενης ποσότητας (π.χ. λογαριθμική μετατροπή της συγκέντρωσης πρωτονίων ή της συγκέντρωσης ιόντων στην ποτενσιομετρία ή του σήματος στις ανοσοχημικές μεθόδους).

- **2ο Στάδιο: Υπολογισμός της σχέσης και στατιστική επεξεργασία**

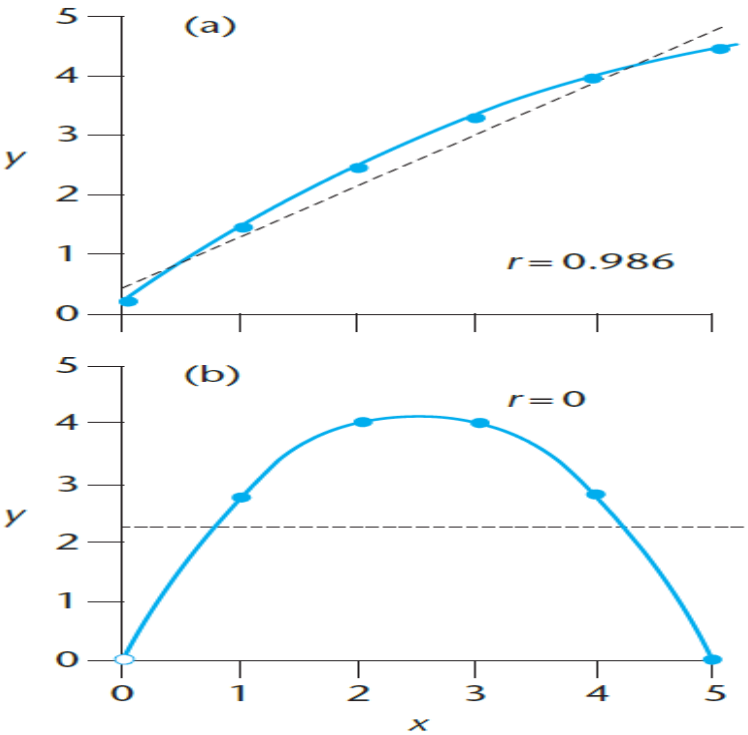
Το επόμενο στάδιο αφορά τον υπολογισμό της σχέσης μεταξύ σήματος με συγκέντρωση. Για το σκοπό αυτό μετρούνται, στο εύρος της γραμμικότητας που επιλέχθηκε παραπάνω, 2-3 φορές τα πρότυπα βαθμονόμησης. Από τα δεδομένα γίνεται πρώτα οπτική εκτίμηση αν υπάρχει κάποια έκτροπη τιμή και στη συνέχεια γίνεται στατιστική επεξεργασία. Η στατιστική επεξεργασία περιλαμβάνει τον υπολογισμό της σχέσης μέσω της μεθόδου ελαχίστων τετραγώνων και του ελέγχου ύπαρξης ομοσκεδαστικότητας ή ετεροσκεδαστικότητας. Για το λόγο αυτό υπολογίζεται το διάγραμμα υπολοίπων. Τυχαία κατανομή των σημείων γύρω από το μηδέν, στο διάγραμμα υπολοίπων, επιβεβαιώνει την γραμμικότητα μεταξύ σήματος και συγκέντρωσης (πλέον ακριβέστερα την καλή προσαρμογή των δεδομένων στο γραμμικό μοντέλο). Σε αντίθετη περίπτωση, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η ζυγισμένη παλινδρόμηση, λόγω της εξάρτησης της διακύμανσης των σημείων από την συγκέντρωση (ετεροσκεδαστικότητα).

- **3ο Στάδιο: Αξιολόγηση της προτεινόμενη μεθόδου βαθμονόμησης**

Στο οδηγό αναφέρεται ότι η αξιολόγηση του εύρους εργασίας γίνεται μέσω εμβολιασμού (spiking) δειγμάτων σε επίπεδα συγκεντρώσεων σε όλο το εύρος εργασίας της μεθόδου. Η αξιολόγηση της γραμμικότητας και κατ' επέκταση του εύρους εργασίας γίνεται μέσω του διαγράμματος της μετρούμενης συγκέντρωσης συναρτήσει της προστιθέμενης. Το διάγραμμα θα πρέπει να είναι ευθεία γραμμή και στο διάγραμμα υπολοίπων τα σημεία υπολοίπων θα πρέπει να έχουν τυχαία κατανομή. Σε περίπτωση συστηματικής κατανομής των σημείων γύρω από το μηδέν είναι ένδειξη ύπαρξης μη γραμμικότητας.

### 3. Συντελεστής συσχέτισης (r) και προσδιορσιμού ($R^2$).

Στη νέα έκδοση του οδηγού της EURACHEM δεν αναφέρεται ο συντελεστής προσδιορισμού ως κριτήριο για την αξιολόγηση της γραμμικότητας. Αναφέρεται πολύ συχνά στη διεθνή βιβλιογραφία ότι ο συντελεστής συσχέτισης και προσδιορισμού είναι ένα κριτήριο για τη γραμμικότητα που μπορεί πολύ εύκολα να δώσει λανθασμένα συμπεράσματα (Analytical Method Committee 1988, Kruve et al 2015, Miller and Miller 2010, Raposo 2016). Στο σχήμα 2 φαίνεται ο λόγος για τον οποίο οι συντελεστές συσχέτισης και προσδιορισμού μπορούν να αποπροσανατολίσουν ως προς την ύπαρξη γραμμικότητας και συσχέτισης.




Σχήμα 2 Προβλήματα κατά τη χρήση του συντελεστή συσχέτισης για την αξιολόγηση της γραμμικότητας (Miller and Miller 2010).

Όπως φαίνεται και στο σχήμα 2 το πρόβλημα του συντελεστή συσχέτισης είναι ότι σε μικρές αποκλίσεις από τη γραμμικότητα το r είναι αρκετά μεγάλο με αποτέλεσμα να οδηγεί στο λανθασμένο συμπέρασμα ότι υπάρχει συσχέτιση γραμμική. Επίσης σε περιπτώσεις όπου υπάρχει συσχέτιση, αλλά δεν είναι γραμμική το r δίνει τιμές κοντά στο μηδέν άρα δεν μπορεί να διακρίνει τις διαφορετικές συσχετίσεις πέραν της γραμμικής. Οι παραπάνω λόγοι οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο συντελεστής συσχέτισης (r) και προσδιορισμού ($R^2$) δεν αποτελούν ιδανικά εργαλεία για την αξιολόγηση της γραμμικότητας.

## 4. Δοκιμές Σημαντικότητας – Ανάλυση Διακυμάνσεων (ANOVA)

Ένα στατιστικό εργαλείο για την επιβεβαίωση του μοντέλου, κυρίως σε οριακές περιπτώσεις όπου δεν είναι ξεκάθαρο αν το μοντέλο είναι όντως γραμμικό, είναι η Ανάλυση των Διακυμάνσεων (ANOVA). Η ANOVA για την εκτίμηση της γραμμικότητας είναι μια παραλλαγή της κλασικής. Στην περίπτωση της παλινδρόμησης, οι διακυμάνσεις που συγκρίνονται είναι η διακύμανση που προκύπτει από την παλινδρόμηση και η διακύμανση των υπολοίπων, δηλαδή εκτός της παλινδρόμησης. Η διακύμανση των υπολοίπων είναι η διακύμανση που προκύπτει λόγω μη καλής προσαρμογής (fitting) του μοντέλου. Για να είναι το μοντέλο γραμμικό θα πρέπει η διακύμανση της παλινδρόμησης να είναι στατιστικά διαφορετική από την διακύμανση των υπολοίπων και πιο συγκεκριμένα, όσο πιο σημαντικά διαφορετική είναι η διακύμανση της παλινδρόμησης σε σχέση με αυτή των υπολοίπων, τόσο καλύτερη είναι η προσαρμογή του μοντέλου της παλινδρόμησης. Ένα πλεονέκτημα της ANOVA, είναι ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο οποιουδήποτε μοντέλου γραμμικού ή μη (Miller and Miller 2010). Αυτό που χρειάζεται προσοχή είναι στο κλάσμα του F-test ποια διακύμανση είναι στο παρονομαστή και ποια στον αριθμητή, καθώς σε όλες τις οδηγίες για την ANOVA η διακύμανση των υπολοίπων είναι στον αριθμητή, ενώ της παλινδρόμησης στον παρονομαστή. Επομένως, όταν η μηδενική υπόθεση ισχύει το μοντέλο είναι γραμμικό. Αντίθετα στο Microsoft Excel, το κλάσμα είναι αντίθετο, επομένως για να είναι γραμμικό το μοντέλο πρέπει να απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση (Miller and Miller 2010, Raposo 2016).

## 5. Ζυγισμένη Παλινδρόμηση

Όταν το κριτήριο της ομοσκεδαστικότητας δεν ισχύει (διαφορετική διασπορά των yi), τότε η ζυγισμένη παλινδρόμηση είναι μια εναλλακτική λύση. Παλαιότερα η ζυγισμένη παλινδρόμηση ήταν πιο σπάνια περίπτωση και η χρήση της περιοριζόταν σε περιπτώσεις βιοαναλυτικών μεθόδων. Η μεγάλη ανάπτυξη της υγροχρωματογραφίας σε σύζευξη με φασματομετρία μαζών τα τελευταία χρόνια αρχίζει να κάνει όλο και πιο συχνή τη χρήση της ζυγισμένης παλινδρόμησης. Τρεις είναι οι παράγοντες που κάνουν την ζυγισμένη παλινδρόμηση πιο πιθανή λύση για την βαθμονόμηση στις μεθόδους με χρήση τεχνικών φασματομετρίας μαζών (Kruve et al 2015). Πρώτον η συμπεριφορά της πηγής ιοντισμού, η οποία για να συμπεριφέρεται γραμμικά θα πρέπει ο ιοντισμός να είναι ανεξάρτητος από τη συγκέντρωση των αναλυτών στο έκλουσμα. Ένα παράδειγμα είναι η πηγή ιοντισμού με ηλεκροψεκασμό (ESI), στον οποίο αυξανόμενης της συγκέντρωσης του αναλύτη μπορεί να μειωθεί ο αριθμός των ιόντων που παράγονται λόγω ανταγωνισμού με τα γειτονικά μόρια ή με ενώσεις που συνεκλούονται. Ο δεύτερος παράγοντας είναι η μεταφορά των ιόντων μέσα στο φασματόμετρο μαζών. Για να υπάρχει γραμμική σχέση θα πρέπει τα ιόντα που φτάνουν στον ανιχνευτή να είναι ανάλογα με τα ιόντα που εισέρχονται στο τριχοειδές. Υπάρχουν περιπτώσεις όπου έχει βρεθεί ότι όσο αυξάνονται τα ιόντα που εισέρχονται στο φασματόμετρο μειώνονται τα ιόντα που καταλήγουν στον ανιχνευτή. Τελευταίος παράγοντας που επηρεάζει τη γραμμικότητα του σήματος του ανιχνευτή είναι ο σχεδιασμός του αναλυτή μαζών. Ανάλογα με τον αναλυτή μαζών, η μεταφορά των ιόντων μπορεί να γίνει συνεχόμενα (π.χ. τετράπολο) ή παλμικά (π.χ. χρόνου πτήσης). Η συνεχόμενης λειτουργίας αναλυτές παρουσιάζουν μεγαλύτερη γραμμική περιοχή σε σχέση με τους παλμικούς, για τους οποίους η γραμμικότητα εξαρτάται από την ποσότητα του φορτίου που συλλέγεται για να σταλθεί στον ανιχνευτή (Kruve et al 2015).

Με βαση όλα τα παραπάνω, ακολουθεί μια συνοπτική παρουσίαση της βασικής αρχής της ζυγισμένης παλινδρόμησης και της αξιολόγησης του κατάλληλου παράγοντα

ζύγισης. Η διαφοροποίηση της ζυγισμένης παλινδρόμησης είναι ο πολλαπλασιασμός της απόκρισης με ένα παράγοντα ζύγισης, ο οποίος έχει άμεση εξάρτηση από τη συγκέντρωση. Υπάρχουν δύο προσεγγίσεις πάνω στις οποίες βασίζεται η επιλογή του παράγοντα ζύγισης. Η πρώτη προσέγγιση είναι και η ορθότερη, αλλά και ταυτόχρονα η λιγότερο πρακτική, καθώς απαιτεί μεγάλο αριθμό πειραμάτων. Αντίθετα, η δεύτερη είναι συχνότερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος στην εργαστηριακή πρακτική.

Στην πρώτη προσέγγιση ως παράγοντας ζύγισης χρησιμοποιείται το αντίστροφο της διακύμανσης ($1/s^2$) του κάθε σημείου. Αλλά η χρήση του είναι περιορισμένη γιατί χρειάζεται μεγάλο αριθμό επαναλήψεων για κάθε σημείο και επιπλέον χρειάζεται κατασκευή εκ νέου της καμπύλης για κάθε σειρά πειραμάτων . Στη δεύτερη προσέγγιση, ως παράγοντες ζύγισης μπορούν να χρησιμοποιηθούν εμπειρικοί παράγοντες όπως $1/x^{1/2}$, $1/x$, $1/x^2$, $1/y^{1/2}$, $1/y$, $1/y^2$. Οι εμπειρικοί παράγοντες είναι πιο εύκολοι στην εφαρμογή τους και δεν απαιτούν μεγάλο αριθμό πειραμάτων και επαναλήψεων (Almeida et al 2002).

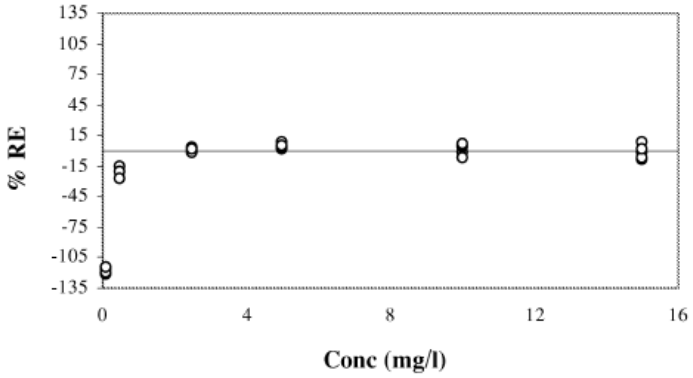
Το πρόβλημα που προκύπτει στη δεύτερη περίπτωση είναι η επιλογή του κατάλληλου παράγοντα ζύγισης. Για το σκοπό αυτό έχουν προταθεί διάφοροι τρόποι αξιολόγησης του παράγοντα ζύγισης. Η επιλογή του κατάλληλου παράγοντα ζύγισης γίνεται μέσω του υπολογισμού του ποσοστιαίου σχετικού σφάλματος (%RE). Ο υπολογισμός γίνεται σύμφωνα με την εξίσωση (1):

$$\%RE = \frac{C_{found} - C_{nom}}{C_{nom}} \times 100 \qquad (1)$$

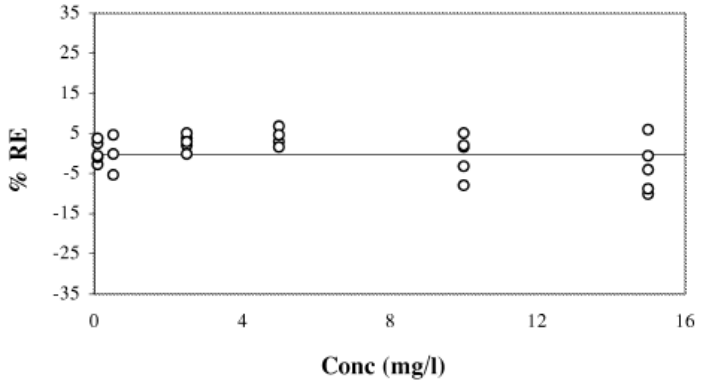
Όπου: $C_{found}$: είναι η υπολογιζόμενη συγκέντρωση από το μοντέλο.

$C_{nom}$: είναι η συγκέντρωση του προτύπου.

Από την εξίσωση (1) υπολογίζεται το %RE για κάθε σημείο της καμπύλης για κάθε παράγοντα ζύγισης. Μια προσέγγιση για την αξιολόγηση του κατάλληλου παράγοντα είναι το άθροισμα της απόλυτης τιμής όλων των σχετικών σφαλμάτων. Ο παράγοντας με το μικρότερο άθροισμα %RE είναι και ο προτιμότερος (Almeida 2002). Εναλλακτικά, έχουν προταθεί από τη βιβλιογραφία ο μέσος όρος του σχετικού σφάλματος($\%RE_{ave}$) ως εκτίμηση του συνολικού σφάλματος του παράγοντα ζύγισης και το μέγιστο του σχετικού σφάλματος ($\%RE_{max}$) ως το μέγιστο σφάλμα του κάθε παράγοντα (Raposo 2016). Τέλος, πιο αναλυτικά μπορεί να γίνει μελέτη για κάθε παράγοντα ζύγισης χωριστά με την διαγραμματική απεικόνιση του %RE συναρτήσει της συγκέντρωσης. Ο κατάλληλος παράγοντας είναι αυτός που παρέχει μια στενή ζώνη %RE τυχαία κατανεμημένων γύρω από το μηδέν και παρουσιάζει το μικρότερο σφάλμα. Ένα παράδειγμα φαίνεται στα σχήματα 3 και 4.




Σχήμα 3 Απεικόνιση σχετικού σφάλματος συναρτήσει της συγκέντρωσης για μη ζυγισμένη παλινδρόμηση (Almeida 2002).




Σχήμα 4 Απεικόνιση σχετικού σφάλματος συναρτήσει της συγκέντρωσης για ζυγισμένη παλινδρόμηση με παράγοντα ζύγισης $1/x^2$ (Almeida 2002).

Όπως φαίνεται στο σχήμα 3 το σφάλμα μειώνεται όσο αυξάνεται η συγκέντρωση ενώ σε χαμηλές συγκεντρώσεις το σφάλμα είναι αρκετά μεγάλο. Αντίθετα στο σχήμα 4, όπου η παλινδρόμηση είναι ζυγισμένη το σφάλμα είναι σταθερό γύρω από το μηδέν.

Αν και οι περιπτώσεις που η ζυγισμένη παλινδρόμηση είναι ορθότερη λύση είναι πολλές, η πολυπλοκότητα σε σχέση με τη ευκολία που έχει η μη ζυγισμένη παλινδρόμηση είναι ένας ανασταλτικός παράγοντας για την καθημερινή πρακτική. Το Excel δεν δίνει τη δυνατότητα για ζυγισμένη παλινδρόμηση και πολλές φορές η χρήση ενός άλλου λογισμικού απαιτεί χρόνο, κόστος και επικύρωση του λογισμικού. Ωστόσο από το Excel μπορούν να υπολογιστούν όλοι οι παράγοντες της ζυγισμένης παλινδρόμησης (κλίση, σταθερός όρος, r, %RE).

## 6. Συμπεράσματα

Η γραμμικότητα της καμπύλης βαθμονόμησης είναι απαραίτητο στοιχείο στην επικύρωση και εφαρμογή μιας αναλυτικής μεθόδου. Η νέα έκδοση της οδηγίας της Eurachem τροποποιεί τα στάδια για την εκτίμηση και την αξιολόγηση της γραμμικότητας. Ο Συντελεστής συσχέτισης (r) δεν προτείνεται ως κριτήριο για τη γραμμικότητα λόγω της μη ορθής εκτίμησης σε οριακές περιπτώσεις και σε περίπτωση τιμής r κοντά στη μονάδα είναι ορθότερο να δηλώνεται καλή προσαρμογή των δεδομένων στο γραμμικό μοντέλο Αντίθετα για τις οριακές περιπτώσεις προτείνεται χρήση της Ανάλυσης Διακυμάνσεων (ANOVA). Τέλος προτείνεται η αναγκαιότητα της ζυγισμένης παλινδρόμησης ως εναλλακτικού τρόπου βαθμονόμησης, κυρίως για περιπτώσεις που υπάρχει ετεροσκεδαστικότητα, καθώς και τα εργαλεία με τα οποία μπορεί να αξιολογηθεί ο κατάλληλος παράγοντας ζύγισης.

## 7. Βιβλιογραφία


Almeida A.M., Castel-Branco M.M., Falcao A.C., "*Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods*", Journal of Chromatography B, pp 215-222, 2002.

Analytical Methods Committee, "*Uses (Proper and Improper) of Correlation Coefficients*", Analyst, 113, pp. 1469-1471, 1988.

Kruve A., Rebane R., Kipper K., Oldekop ML., Evard H., Herodes K., Ravio P., Leito I., "*Tutorial review on validation of liquid chromatography-mass spectrometry methods: Part II*", Analytica Chimica Acta, 870, pp 8-28, 2015.

Magnusson B. and Ornemark U. (eds), "*Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*", 2014, Eurachem.

Miller N. J. and Miller C. J., "*Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*", 2010, Pearson Education Limited.

Raposo F., "*Evaluation of analytical calibration based on least-squares linear regression for instrumental techniques: A tutorial review*", Trends in Analytical Chemistry, 77, pp. 167-185, 2016.