

Критерии оценки адекватности аппроксимирующих функций в методе калибровочных кривых

Ю. А. КУДЕЯРОВ, А. Н. ПАНЬКОВ

Всероссийский научно-исследовательский институт метрологической службы,
Москва, Россия, e-mail: kudeyarov@vniims.ru

Рассмотрены критерии адекватности модельных функций в методе калибровочных кривых, используемом при количественном иммуноанализе. Показано, что критерий Колмогорова, в силу простоты, можно использовать для первоначальной отбраковки заведомо неадекватных модельных функций.

Ключевые слова: иммуноанализ, калибровочная кривая, коэффициент детерминации, информационные критерии Акаике и Байеса, критерий Колмогорова.

The adequacy criteria of model functions in the calibration curves method used at the quantitative immunoanalysis are considered. It is shown that Kolmogorov criterion due to simplicity can be used for initial rejection of deliberately inadequate model functions.

Key words: immunoanalysis, calibration curve, determination coefficient, Akaike and Bayes information criteria, Kolmogorov criterion.

Метод калибровочных кривых (КК) (градуировочных характеристик) широко используют в весовых операциях, при измерении количества жидкостей в резервуарах разной конфигурации, решении задачи идентификации веществ в хроматографии, проведении различных химических, биологических и медицинских анализов и т. д. Рассмотрим применение метода КК в иммуноанализе, поскольку с его помощью можно перейти от качественных результатов к количественным. Под КК в предлагаемой работе будем понимать графическое или табличное представление аналитической зависимости выходного сигнала анализатора от входного воздействия, как это принято у химиков и биологов, но которое значительно отличается от понятия калибровки в метрологии.

Надежность и точность аналитических результатов, найденных количественными методами, существенно зависят от выбора адекватной КК. В свою очередь адекватность КК оценивается разного рода критериями. Распространен критерий, основанный на вычислении коэффициентов детерминации в соответствии с выражением

$$\sum_{n=1}^N (y_n - \bar{y})^2 = \sum_{n=1}^N (\hat{y}_n - \bar{y})^2 + \sum_{n=1}^N (\hat{y}_n - y_n)^2, \quad (1)$$

где N — объем выборки (число экспериментальных точек); y_n — экспериментально измеренный выходной отклик на входное воздействие x_n ; $\bar{y}$ — среднее значение (математическое ожидание) выходных сигналов (откликов), оцененное по всем экспериментальным точкам; $\hat{y}_n$ — модельная функция отклика (аппроксимирующая функция).

Выражение (1) можно записать символически [1]:

$$SST = SSR + SSE,$$

$$\text{где } SST = \sum_{n=1}^N (y_n - \bar{y})^2; SSR = \sum_{n=1}^N (\hat{y}_n - \bar{y})^2; SSE = \sum_{n=1}^N (\hat{y}_n - y_n)^2.$$

Под модельной функцией отклика понимается аналитическое выражение регрессионной модели (аппроксимирующей функции). Например, в случае линейной регрессии модельная функция отклика имеет вид

$$\hat{y} = \beta_0 + \beta_1 x,$$

где β_0, β_1 — модельные параметры, подлежащие определению по методу наименьших квадратов (МНК).

Коэффициент детерминации вычисляют по формуле [1]:

$$R^2 = SSR/SST = 1 - SSE/SST. \quad (2)$$

Скорректированный коэффициент детерминации находят как

$$R_{\text{кор}}^2 = 1 - SSE(N-1)/[SST(N-K)], \quad (3)$$

где K — число параметров регрессионной модели (число степеней свободы), $K < N$.

Коэффициенты, определяемые по (2), (3), принимают значения в интервале $[0, 1]$. Когда они близки к единице, т. е. дисперсия остаточных членов меньше дисперсии измеренных значений откликов, модельная функция отклика адекватна входному воздействию.

Пример использования коэффициентов детерминации приведен, например в [2]. Для случая с измерением концентрации иммуноглобулина с помощью иммунохроматографических тест-систем оказалось, что $R^2 = 0,92$. Такое значение указывает на высокую достоверность определения концентрации методом КК.

Анализ разных критериев адекватности КК представлен в [3]. При этом основное внимание уделено использованию информационных критериев Акаике (AIC) и Байеса (BIC), выборочного критерия Акаике (AICc), позволяющих сформировать

ровать адекватную модель. Эти критерии редко используют в аналитической химии для выбора адекватной калибровочной кривой, но авторы [3] утверждают, что их применение открывает новые возможности в иммуноанализе.

В [3] вычисление коэффициентов детерминации и использование информационных критериев относятся к четырем аналитическим методам: трем разновидностям метода жидкостной хроматографии и методу безводного капиллярного электрофореза, применяемым при анализе активных веществ в биологических жидкостях или количественном определении примесей в лекарственных веществах. Для каждого экспериментального метода использовали восемь способов аппроксимации полученных зависимостей, от простой линейной и до взвешенной квадратичной, параметры модельных функций определяли по МНК.

Методы аппроксимации, являющиеся разновидностями взвешенного МНК, требуют пояснения. В метрологии понятие веса применяют в случае неравноточных измерений, т. е. когда различны средние квадратические отклонения (СКО) для разных серий измерений одной и той же величины. При этом вес w_n определяется как величина, обратно пропорциональная оценке дисперсии случайной погрешности n -й серии измерений S_n^2 [4]:

$$w_n = \frac{1}{S_n^2} / \sum_{n=1}^k \frac{1}{S_n^2},$$

где k — число измерений в n -й серии.

Однако в [3] использован упрощенный подход. На практике дисперсии S_n^2 обычно неизвестны. В такой ситуации их иногда приравнивают значениям независимой переменной, т. е. $S_n^2 \approx x_n$, тогда $w_n = x_n^{-1}$. Теперь минимизируемый функционал в МНК принимает вид

$$F(\beta_0, \beta_1) = \sum_{n=1}^N w_n (y_n - \hat{y}_n)^2 = \min,$$

где N — число точек, по которым строится градуировочная характеристика.

Наибольший интерес в [3] вызывают указанные выше информационные критерии. Так, исходная формула для критерия Акаике записывается в виде

$$AIC = -2 \lg \left(L(\hat{\theta}|y) \right) + K.$$

В частном случае погрешностей остаточных членов, распределенных нормально, критерий Акаике можно представить как

$$AIC = N \lg \left(\hat{S}^2 \right) + 2K, \quad (4)$$

где $S^2 = SSE/N$.

Критерий Акаике обычно используют для сравнения моделей с разным числом параметров, когда требуется выбрать наилучшие подгоночные параметры, что и было сделано в [3]. Среди нескольких альтернативных моделей пред-

почтение отдается той, у которой значение AIC меньше, поэтому (4) можно выразить в виде

$$AIC = N \lg \left(\hat{S}^2 \right) + 2K/N.$$

При увеличении числа подгоночных параметров первое слагаемое в правой части уменьшается, а второе увеличивается. Таким образом, критерий Акаике не только «вознаграждает» за качество приближения, но и «штрафует» за использование излишнего числа параметров модели.

Для малых выборок используют выборочный критерий Акаике

$$AIC_c = AIC + 2K(K+1)/(N-K-1).$$

С критерием Акаике тесно связан информационный критерий Байеса

$$BIC = -2 \lg L \left(\left(\hat{\theta} | y \right) \right) + K \lg(N), \quad (5)$$

но при увеличении числа параметров последний «штрафует» строже. В действительности критерий (5) был предложен Шварцем в 1978 г. (см., например [5]), поэтому часто его называют также критерием Шварца и получают с помощью такой же процедуры, что и критерий Акаике. При этом допускают, что распределение экспериментальной выборки принадлежит к семейству экспоненциальных и является наиболее часто используемой модификацией AIC. В дальнейшем этот критерий будем называть критерием Шварца; в случае линейной регрессии он выражается через SSE:

$$BIC = -N \lg [SST/M] + K \lg(N).$$

Получение (вывод) всех информационных критериев основывается на оценке расстояния Кульбака—Лейблера между функциями, описываемого формулой [5]:

$$I(F, \theta) = \int F(x) \lg \left(F(x) / \hat{y}(x, \theta) \right) dx,$$

где функция $y = F(x)$ относится к «истинной» зависимости выходного сигнала анализатора y от концентрации анализируемого вещества x ; $\hat{y}(x, \theta)$ — модельная оценка (аппроксимация) «истинной» функции; θ — набор параметров модельной функции, подлежащий определению.

Согласно теории информации замена «истинной» функции F на модельную $\hat{y}(x, \theta)$ приводит к потере информации $I(F, \theta)$, однако если $\hat{y}(x, \theta)$ полностью совпадает с F , то потеря информации отсутствует. Все информационные критерии сводятся к оценке потери информации, минимизированной по принципу максимального правдоподобия, причем в качестве функций правдоподобия берутся математические ожидания, в том числе и двойные, которые оптимизируются соответствующим набором параметров θ [5].

Приведенные в [3] результаты показывают, что иногда информационные критерии действительно позволяют выделять среди используемых функций отклика наиболее адекватную, тогда как с помощью только лишь коэффициентов детерминации этого сделать не удастся. Вместе с тем, авторы [3] отмечают, что не выявили большой разницы между тремя информационными критериями. Отметим, что эти критерии применяли для достаточно простых модельных функций, самая сложная функция была квадратичной, и не ясно, как критерии поведут себя в случае более сложных нелинейных аппроксимирующих функций.

Наряду с информационными имеются также другие критерии согласия, основанные на оценке расстояния между функциями. Прежде всего следует назвать критерий согласия А. Н. Колмогорова, который обычно применяют для оценки функций распределения случайных величин. Вместе с тем имеется аналогия между этой задачей и задачей оценки адекватности модельных функций отклика в методе КК. Если это так, то получаем дополнительный критерий адекватности. При использовании критерия Колмогорова приходится иметь дело с тремя функциями:

$y = y(x)$ — описывающей объективно существующую (действительную) зависимость выходного сигнала от входного, которая неизвестна;

$y_n = y(x_n)$ — эмпирической, построенной по выборке $(x_0, x_1, \dots, x_n, \dots, x_N)$ и являющейся опытным представлением функции $y = y(x)$ (отметим, что функция $y_n = y(x_n)$ известна в конечном числе точек x_n);

$\hat{y}(x|\theta)$ — теоретической (модельной), которая предлагается для описания функции $y = y(x)$ на основе анализа данных, используемых при построении эмпирической функции, и которая известна и оценена, например по МНК (θ — совокупность модельных параметров).

Статистика Колмогорова D (максимальное расстояние между функциями, точная верхняя граница множества $S = |y(x_n) - \hat{y}(x|\theta)|$ для функции $y_n = y(x_n)$) определяется соотношением (см., например [6]):

$$D = \sup |y(x_n) - \hat{y}(x|\theta)|. \quad (6)$$

Отсюда следует некоторое преимущество критерия Колмогорова по сравнению с информационными критериями, а именно: в явном виде он имеет дело с определяемыми и наблюдаемыми величинами. При применении этого критерия необходимо сформулировать статистическую гипотезу H_0 , заключающуюся в утверждении, что $\hat{y}(x|\theta)$ совпадает с $y = y(x)$, и можно записать

$$\text{гипотеза } H_0: \hat{y}(x|\theta) = y(x).$$

Эмпирическая функция $y(x_n)$ при $n \rightarrow \infty$ и любом x все точнее представляет $y(x)$, т. е. $y(x_n) \rightarrow y(x)$, и если гипотеза H_0 справедлива, то и $\hat{y}(x|\theta) \rightarrow y(x)$. При больших выборках эмпирическая функция также все точнее представляет действительную, т. е. $\hat{y}(x|\theta) \rightarrow y(x_n)$. При этом $D \rightarrow 0$ согласно (6). Если же гипотеза H_0 неверна, т. е. справедлива альтернативная гипотеза $H_1: \hat{y}(x|\theta) \neq y(x)$, то $D > 0$ и не будет стремиться к нулю. Такое различие в поведении D в зависимости от того, верна гипотеза H_0 или нет, позволяет использовать D как статистику для проверки H_0 .

Колмогоровым было показано, что независимо от вида теоретической (модельной) функции, связанной с непрерывной случайной величиной x , при неограниченном увеличении числа независимых измерений N вероятность неравенства

$$D\sqrt{N} \leq \lambda \quad (7)$$

стремится к предельной $P(\lambda) = \sum_{i=-\infty}^{\infty} (-1)^i e^{-2i^2\lambda^2}$.

Из (7) следует, что вероятность $P(\lambda)$ реализации такого неравенства велика для больших значений λ . Если положить $P(\lambda) = 0,95$, то найденная экспериментально статистика D для адекватной модельной функции с такой же большой вероятностью заведомо будет удовлетворять (7) (напомним, что для адекватных функций значение D мало). В свою очередь, вероятности $P(\lambda) = 0,95$ соответствует квантиль распределения $\lambda_{0,95} = 1,39$. Можно заключить, что если найденное из эксперимента критериальное значение $\lambda_3 = D\sqrt{N}$ удовлетворяет условию $\lambda_3 < \lambda_{0,95} = 1,39$, то гипотеза H_0 об адекватности модельной функции справедлива. Если же $\lambda_3 > \lambda_{0,95}$, то гипотеза H_0 отвергается.

При практическом применении критерия Колмогорова принимают

$$\lambda_3 = D\sqrt{N}. \quad (8)$$

Значение D находят после построения на одном графике эмпирической и теоретической (модельной) функций; максимальное их расхождение и представляет D .

Эмпирическая функция $y_n = y(x_n)$ известна в конечном числе точек x_n . Для применения критерия Колмогорова требуется выразить эту функцию аналитически, т. е. необходимо прибегнуть к экстраполяции значений функции на промежуточные значения аргумента (входного сигнала), которые в эксперименте не используются. Наиболее простой способ экстраполяции заключается в предположении кусочно-линейного вида эмпирической функции в промежуточных точках:

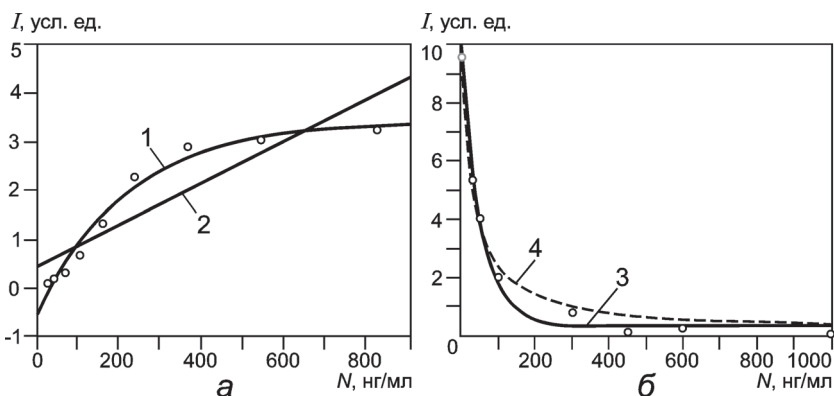
$$y(x_n < x < x_{n+1}) = y_n + (y_{n+1} - y_n)(x - x_n)/(x_{n+1} - x_n), \quad (9)$$

где $n = 0, 1, 2, \dots, N-1$. Именно эту кривую будем использовать в дальнейшем для нахождения величины D . При $n \rightarrow \infty$ функция (9) будет стремиться к «истинной» эмпирической $y_n = y(x_n)$, если все рассматриваемые функции достаточно гладкие и не имеют особенностей.

Таким образом, применение критерия Колмогорова при оценке адекватности модельных функций в методе КК сводится к выполнению следующей последовательности действий.

1. В реальном эксперименте, например по измерению светимости аналитических полосок тест-системы в иммунохроматографическом анализе [7], получить эмпирическую зависимость $y_n = y(x_n)$ выходного сигнала y_n от входного x_n .

2. С помощью экстраполяционной процедуры (9) найти аналитическое выражение для $y(x_n)$.



Модельные функции, построенные по экспериментальным данным, взятым из [8] (а) и [9] (б). Также см. таблицу

3. На основе анализа полученной экспериментальной информации и (или) теоретических соображений предложить теоретическую (модельную) функцию, описывающую зависимость выходной реакции анализатора на входные воздействия.

4. Методом наименьших квадратов оценить значения параметров θ модельной функции.

5. Графически или программно из сравнения эмпирической и модельной функций найти значение D .

6. По (8) вычислить критериальный параметр λ_3 и сравнить его с критическим значением $\lambda_{0,95}$ квантиля распределения.

Как и ранее, если найденное из эксперимента критериальное значение λ удовлетворяет условию $\lambda < \lambda_{0,95} = 1,39$, то гипотезу H_0 о соответствии экспериментальной функции модельной следует рассматривать как правдоподобную, не противоречащую опытным данным, а модельную функцию адекватной. В противном случае следует принять гипотезу H_1 . Аналогичную процедуру можно провести по отношению к набору различных модельных функций и выяснить, какая из них наиболее адекватна эмпирической.

Для подтверждения возможностей обсуждаемых критериев рассмотрим применение нескольких модельных функций для описания экспериментальных зависимостей, полученных при проведении иммуносорбентного анализа ферментно связанных моноклональных антител [8] и при определении концентрации бензодиазепина методом иммунохроматографии [9].

На рисунке и в таблице приведены модельные функции, аппроксимирующие данные из [8, 9] вместе с параметрами критериев, предназначенных для оценки адекватности используемых функций. Эти данные относятся как к прямой зависимости [8], когда сигнал анализатора растет с увеличением концентрации анализируемого вещества, так и к обратной зависимости [9], когда сигнал анализатора уменьшается с увеличением концентрации. Механизм образования прямой и обратной зависимостей детально рассмотрен в [9].

В качестве модельных функций использовали две экспоненциальные: $y = \beta_0 + \beta_1(1 - e^{-\beta_2 x})$ для прямой зависимости

и $y = \beta_0 e^{-\beta_1 x} + \beta_2$ — для обратной (см. кривые 1, 3); линейную функцию $y = \beta_0 + \beta_1 x$ (см. кривую 2); обратно пропорциональную функцию $y = \beta_0 / (1 + \beta_1 x)$ (см. кривую 4). Из них только экспоненциальные функции имеют простейшее кинетическое обоснование, аппроксимация другими функциями носит подгоночный характер, их параметры в большинстве своем не имеют четкого физико-химического смысла и выбраны только для того, чтобы яснее представить возможности обсуждаемых критериев для неадекватных функций.

Из рисунка следует, что адекватные функции действительно удовлетворяют всем используемым критериям, тогда как для линейной, обратно пропорциональной и для некоторых других функций критерии, основанные на вычислении коэффициентов детерминации, не позволяют оценивать их неадекватность, а критерий Колмогорова такие функции бракует. Отметим, что критерий Колмогорова, наряду с другими критериями, дает возможность провести отбор модельных функций, при этом он отличается от других критериев своей простотой и его удобно использовать, в первую очередь, для первоначальной отбраковки заведомо неадекватных модельных функций.

Литература

1. Montgomery D. C., Runger G. C. Applied statistics and probability for engineers. N.J.: John Wiley & Sons, 2003.
2. ФР.1.39.2013.16093. Референтная методика калибровки иммунохроматографических тест-систем (экспресс-тестов) широкого применения, в том числе медицинского назначения.
3. Rozet E., Ziemons E., Marini R. D., Hubert Ph. Usefulness of Information Criteria for the Selection of Calibration Curves // Analyt. Chem. // 2013. V. 85. P. 6327—6335.
4. Кузнецов В. А., Исаев Л. К., Шайко И. А. Метрология. М.: Стандартинформ, 2005.
5. Burnham K. P., Anderson D. A. Multimodel inference: Understanding AIC and BIC in Model Selection // Sociological methods & research. 2004. V. 33. N. 2. P. 261—304.
6. Тюрин Ю. Н., Макаров А. А. Анализ данных на компьютере. М.: ИНФРА-М, 2003.
7. Берлина А. Н., Венгеров Ю. Ю., Голубев С. С., Дзантиев Б. Б., Жердев А. В., Киселева Ю. В., Короленко Я. А., Кудяров Ю. А., Малюченко В. М., Таранова Н. А. Метод калибровочных кривых для иммунохроматографических экспресс-тестов. Ч. 2. Иммунохроматографические экспресс-тесты с квантовыми точками // Метрология. 2012. № 10. С. 30—41.
8. Findlay J.W.A., Dillard R. F. Appropriate Calibration Curve Fitting in Ligand Binding Assays // The AAPS J. 2007. V. 9. N. 2. P. E260—E267.
9. Голубев С. С., Дзантиев Б. Б., Жердев А. В., Киселева Ю. В., Короленко Я. А., Кудяров Ю. А., Малюченко В. М., Смирнова Н. И., Сотников Д. В. Метод калибровочных кривых для иммунохроматографических экспресс-тестов. Ч. 1. Иммунохроматографические экспресс-тесты с коллоидным золотом // Метрология. 2012. № 10. С. 14—29.

Дата принятия 13.01.2015 г.

Модельные функции и параметры критериев

Модельная функция	Номер кривой на рисунке	Критерий Колмогорова ($\lambda_{0,95} = 1,39$)	R^2	$R^2_{кор}$	AIC	BIC
$y = \beta_0 + \beta_1(1 - e^{-\beta_2 x})$, $\beta_0 = -0,65, \beta_1 = 4,09,$ $\beta_2 = 220,32$	1	$\lambda_3 = 0,73$ $\lambda_3 < \lambda_{0,95}$	0,99	0,97	-2,77	-0,99
$y = \beta_0 + \beta_1 x$, $\beta_0 = -0,398, \beta_1 = 0,004$	2	$\lambda_3 = 2,73$ $\lambda_3 > \lambda_{0,95}$	0,80	0,77	-0,73	1,27
$y = \beta_0 e^{-\beta_1 x} + \beta_2$, $\beta_0 = 9,14, \beta_1 = 0,30,$ $\beta_2 = 0,02$	3	$\lambda_3 = 1,28$ $\lambda_3 < \lambda_{0,95}$	0,99	0,99	-2,07	-0,22
$y = \beta_1 / (1 + \beta_2 x)$, $\beta_0 = 9,65, \beta_1 = 0,03$	4	$\lambda_3 = 1,52$ $\lambda_3 > \lambda_{0,95}$	0,99	0,99	-1,91	0,19