

13.10 PHÂN TÍCH THỐNG KÊ KẾT QUẢ ĐỊNH LƯỢNG SINH HỌC

1. Mở đầu

Chuyên luận này hướng dẫn cách thiết kế thí nghiệm sinh học và phương pháp phân tích thống kê các kết quả thử nghiệm sinh học có trong Dược điển Việt Nam.

Có thể dùng kiểu thiết kế thí nghiệm và cách tính toán kết quả khác với phương pháp mô tả trong chuyên luận này, miễn là các phương pháp đó có độ tin cậy không kém phương pháp được mô tả ở đây.

Phương pháp sinh học được dùng để thử nghiệm các chất hay chế phẩm mà hoạt lực của chúng không thể xác định một cách chính xác bằng các phương pháp phân tích hóa - lý. Nguyên tắc của phương pháp là so sánh chế phẩm cần định lượng với một chế phẩm chuẩn để xác định lượng chế phẩm cần định lượng cho cùng tác động sinh học với lượng đã cho, tính bằng đơn vị, của chế phẩm chuẩn. Để đảm bảo độ chính xác của kết quả định lượng, các phép thử được tiến hành với chế phẩm chuẩn và chế phẩm cần định lượng phải thực hiện đồng thời và trong cùng điều kiện thí nghiệm.

Bất kỳ một định giá nào của thử nghiệm sinh học luôn luôn mắc phải sai số ngẫu nhiên do tính biến thiên vốn có của đáp ứng sinh học, do đó nếu có thể, khi tính kết quả của mỗi thử nghiệm phải tính sai số, kể cả khi dùng phương pháp chính thức. Vì vậy, chuyên luận này có hướng dẫn các phương pháp thiết kế thử nghiệm và cách tính sai số. Các phương pháp tính toán trình bày ở đây chỉ tính đến sai số ngẫu nhiên gây ra bởi các sinh vật thử và giả định rằng các sai số hệ thống, ví dụ sai số do cân, pha loãng,... là rất nhỏ và không ảnh hưởng đáng kể đến kết quả định lượng (do đó phải có biện pháp thích hợp để giảm sai số hệ thống đến mức có thể chấp nhận được). Trong mọi trường hợp, trước khi áp dụng một phương pháp thống kê bất kỳ, phải tiến hành thử sơ bộ một số lần thích hợp để bảo đảm chắc chắn tính khả dụng của phương pháp đó.

Độ chính xác của kết quả thử nghiệm sinh học được xác định bởi các giới hạn tin cậy, hoặc là khoảng tin cậy của hoạt lực. Giới hạn tin cậy ở xác suất 95 % thường được chọn trong các thử nghiệm sinh học, do đó cũng được chọn trong chuyên luận này. Khoảng tin cậy tính bằng các phương pháp toán thống kê giới thiệu ở đây có khả năng chứa hoạt lực thật của chế phẩm cần định lượng với xác suất 95 %. Một số chuyên luận Dược điển quy định giới hạn tin cậy phải không được vượt quá một ngưỡng nhất định, ví dụ phải nằm trong khoảng từ 95 % đến 105 % so với hoạt lực tính được, trong một số trường hợp cần phải lặp lại thử nghiệm hai hay nhiều lần để đạt được giới hạn tin cậy cho phép.

Chú giải các ký hiệu dùng trong chuyên luận này được trình bày trong bảng ở phần cuối của chuyên luận.

2. Ngẫu nhiên hóa

Việc phân bố những xử lý (liều, nồng độ,...) khác nhau của chế phẩm chuẩn và chế phẩm thử cho các đơn vị thí nghiệm (ví dụ động vật thí nghiệm, ống nghiệm,...) phải được thực hiện một cách hoàn toàn ngẫu nhiên. Bất kỳ một sự lựa chọn nào khác về những điều kiện thí nghiệm (ví dụ chọn lựa cân nặng, tuổi của động vật thí nghiệm, điều kiện môi trường thí nghiệm,...), cũng không được phép cố ý trong thiết kế thí nghiệm mà đều phải lựa chọn ngẫu nhiên. Chọn vị trí của chuồng nuôi động vật thí nghiệm trong phòng thí nghiệm, trình tự dùng các xử lý cũng phải được thực hiện một cách ngẫu nhiên.

Ngẫu nhiên hóa có thể thực hiện bằng cách ném xúc xắc, xào các lá bài có đánh số, dùng bảng số ngẫu nhiên hay các phần mềm vi tính thích hợp.

3. Các thử nghiệm dựa trên đáp ứng định lượng

3.1 Mô hình thống kê

3.1.1 Nguyên tắc chung

Hai mô hình thống kê thường dùng trong các thử nghiệm sinh học là mô hình đường thẳng song song và mô hình tỷ lệ độ dốc. Trong chuyên luận này chỉ giới thiệu mô hình đường thẳng song song. Để tìm hiểu thêm về mô hình còn lại, xin tham khảo Dược điển châu Âu hay các tài liệu thống kê khác.

Chỉ có thể áp dụng mô hình thống kê đường thẳng song song nếu thử nghiệm hội đủ các điều kiện sau:

- 1) Các xử lý khác nhau của chế phẩm chuẩn và chế phẩm cần định lượng đã được phân bố ngẫu nhiên cho từng đơn vị thí nghiệm;
- 2) Các đáp ứng của mỗi xử lý tuân theo phân phối chuẩn;
- 3) Độ lệch chuẩn của các đáp ứng trong mỗi nhóm xử lý của cả chế phẩm chuẩn và chế phẩm cần định lượng không khác nhau có ý nghĩa.

Khi thử nghiệm được triển khai sử dụng, nhà phân tích phải xác định xem các số liệu thu thập được từ nhiều thử nghiệm có thỏa mãn các điều kiện lý thuyết sau không:

Điều kiện 1 có thể thỏa mãn nếu thực hiện đúng theo các hướng dẫn trình bày ở mục 2 (Ngẫu nhiên hóa).

Điều kiện 2 là một giả định mà trong thực tế hầu như đều được thỏa mãn. Những sai lệch nhỏ so với giả định này nói chung không gây ảnh hưởng lớn đến kết quả, nếu mỗi xử lý được tiến hành nhiều thí nghiệm lặp lại.

Điều kiện 3 có thể được kiểm tra bằng phép thử tính đồng nhất của các phương sai, ví dụ bằng phép kiểm Bartlett hoặc phép kiểm Hartley (xem các ví dụ trong mục 3.2.8). Nếu điều kiện 2 và/hoặc điều kiện 3 không thỏa mãn, chuyển đổi đáp ứng y bằng $\ln(y)$, \sqrt{y} hay y^2 có thể cho kết quả tốt.

Phép chuyển đổi y thành $\ln(y)$ rất hữu ích trong trường hợp tính đồng nhất của các phương sai không thỏa mãn. Phép chuyển đổi này cũng giúp cải thiện tính chuẩn nếu phân phối bị lệch về bên phải.

Sự chuyển đổi y thành \sqrt{y} thường được dùng khi các quan sát tuân theo phân phối Poisson, ví dụ khi các quan sát thu được bằng phương pháp đếm.

3.1.2 Các thử nghiệm thường nhật

Trong các thử nghiệm thường nhật, rất khó kiểm tra một cách hệ thống các điều kiện lý thuyết mô tả ở mục 3.1.1, bởi vì trong thực tế số quan sát trong một thử nghiệm thường nhỏ do đó ảnh hưởng đến độ nhạy của các phép kiểm thống kê. Tuy nhiên, trong những thử nghiệm cân xứng (là những thử nghiệm có số xử lý của chế phẩm chuẩn bằng với số xử lý của chế phẩm cần định lượng, ví dụ: thử nghiệm 2 + 2, 3 + 3,...) những sai lệch nhỏ so với tính chuẩn hay so với tính đồng nhất của phương sai không ảnh hưởng lớn đến kết quả thử nghiệm. Do đó, chỉ cần kiểm tra lại các điều kiện lý thuyết nói trên khi một loạt các thử nghiệm liên tiếp không thỏa mãn phép kiểm tính có giá trị (xem mục 3.2.4).

Ngoài 3 điều kiện lý thuyết đã nói trên, mô hình đường thẳng song song còn yêu cầu mỗi thử nghiệm phải thỏa mãn thêm 2 điều kiện sau:

4) Đường biểu diễn mối quan hệ giữa logarit liều và đáp ứng phải tuyến tính trong khoảng liều đã dùng.

5) Đường thẳng ln(liều) - đáp ứng của chế phẩm cần định lượng phải song song với đường ln(liều) - đáp ứng của chế phẩm chuẩn.

Chỉ có thể kiểm tra điều kiện 4 và 5 nếu thử nghiệm được tiến hành với ít nhất 3 nồng độ pha loãng của mỗi chế phẩm (định lượng 3 liều hay lớn hơn). Tuy nhiên, nếu tính tuyến tính của đường logarit liều - đáp ứng, trong một khoảng liều nhất định, đã được chứng minh bởi một số lượng đủ lớn các thử nghiệm có 3 liều trở lên, có thể tiến hành thử nghiệm chỉ với 2 liều của mỗi chế phẩm (thử nghiệm 2 liều) trong các thử nghiệm hàng ngày, dùng trong khoảng liều đã cho.

Trước khi tính hoạt lực và các giới hạn tin cậy, cần phải tiến hành phân tích phương sai để kiểm tra xem thử nghiệm có đáp ứng các điều kiện 4 và 5 hay không.

Các thử nghiệm dựa trên mô hình thống kê đường thẳng song song được trình bày trong mục 3.2.

Nếu có bất cứ điều kiện nào trong 5 điều kiện nói trên không thỏa mãn, các phương pháp tính toán giới thiệu ở đây sẽ không có giá trị. Khi đó, phải tiến hành rà soát lại các kỹ thuật thử nghiệm để tìm ra nguyên nhân.

Nếu các phép kiểm thống kê cho thấy bất kỳ một điều kiện nào trong 5 điều kiện nói trên không thỏa mãn, không được chuyển ngay sang một phép chuyển đổi khác, trừ khi có đủ bằng chứng rằng nguyên nhân gây ra hiện tượng đó không phải do ngẫu nhiên mà là kết quả của một sự thay đổi có hệ thống của các điều kiện thí nghiệm. Trước khi áp dụng một phép chuyển đổi mới vào các thử nghiệm thường nhật, phải lặp lại phép kiểm thống kê đã trình bày ở mục 3.1.1.

Để thu được một kết quả thử nghiệm đáng tin cậy, có thể phải tiến hành một vài thử nghiệm độc lập, sau đó phối hợp các kết quả thử nghiệm lại với nhau (xem mục 4 - Phối hợp các kết quả thử nghiệm).

Nhằm mục đích kiểm soát chất lượng của các thử nghiệm hàng ngày, nên ghi các trị định giá về độ dốc hồi qui và sai số dư dưới dạng biểu đồ kiểm tra.

Nếu sai số dư lớn một cách bất thường, nguyên nhân đầu tiên phải nghĩ đến là có sai sót kỹ thuật nào đó. Nếu các khảo sát khẳng định có sai sót trong quá trình thử nghiệm, phải lặp lại thử nghiệm. Sai số dư cũng có thể rất lớn nếu trong dãy số liệu đó có một giá trị bất thường. Chỉ được loại bỏ giá trị nghi ngờ là bất thường nếu giá trị đó khác có ý nghĩa thống kê với các giá trị còn lại.

Một sai số dư nhỏ bất thường có thể xảy ra một lần hoặc một lúc nào đó làm cho các tỷ số F vượt quá giá trị tới hạn. Trong những trường hợp như vậy, có thể thay sai số dư định giá được của từng thử nghiệm riêng bằng một sai số dư trung bình dựa vào các số liệu trước đó trong biểu đồ kiểm tra.

3.1.3 Cách tính toán và những hạn chế

Dưới đây là 3 hạn chế áp đặt cho mỗi thử nghiệm nhằm làm đơn giản hóa việc tính toán và làm tăng độ chính xác của thử nghiệm:

- a) Số nồng độ pha loãng của mỗi chế phẩm trong một thử nghiệm phải bằng nhau;
- b) Tỷ lệ giữa các liều kế tiếp nhau phải là một hằng số đối với tất cả các xử lý trong một thử nghiệm, ví dụ: $S_2/S_1 = S_3/S_2 = \dots = Z_3/Z_2$;

c) Số các đơn vị thí nghiệm của mỗi xử lý phải bằng nhau. Các công thức tính toán áp dụng cho một thiết kế thử nghiệm tuân thủ đúng 3 hạn chế nêu trên được giới thiệu ở mục 3.2. Đối với các thiết kế thử nghiệm không tuân theo các hạn chế đã nêu, các công thức tính toán sẽ rất phức tạp và không được giới thiệu trong chuyên luận này.

Trong mục 3.2.8 có trình bày một số ví dụ để minh họa về phương pháp tính thống kê. Có thể dùng các số liệu trong các ví dụ đó để kiểm tra các phần mềm dùng trong phân tích thống kê kết quả thử nghiệm sinh học.

3.2 Mô hình đường thẳng song song

3.2.1 Giới thiệu

Mô hình đường thẳng song song dựa trên quan hệ tuyến tính giữa đáp ứng Y và logarit X của liều D .

$$Y = a + bX$$

Trong đó:

Y là đáp ứng mong đợi;

X là $\ln(\text{liều}) = \ln(D)$;

a và b là các hằng số.

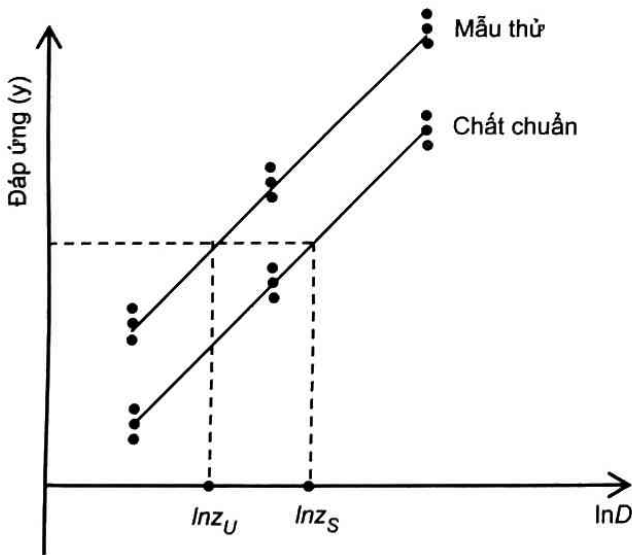
Mô hình đường thẳng song song có thể được minh họa bởi đồ thị trong Hình 13.10.1. Trên đồ thị, trục hoành biểu diễn các logarit liều với nồng độ thấp ở bên trái và nồng độ cao ở bên phải, trục tung biểu diễn các đáp ứng đo được.

Các đáp ứng riêng của mỗi xử lý được biểu thị bằng các chấm đen. Hai đường trên đồ thị biểu diễn mối quan hệ giữa logarit liều và đáp ứng tính được của chế phẩm chuẩn và chế phẩm cần định lượng.

Từ trục tung kẻ một đường thẳng bất kỳ song song với trục hoành, cắt hai đường ln(liều) - đáp ứng tại hai điểm có hoành độ là $\ln z_S$ và $\ln z_U$, đây là hai logarit nồng độ hoặc logarit liều của chế phẩm chuẩn và chế phẩm thử cho cùng đáp ứng sinh học.

Để cho thử nghiệm thỏa mãn, hoạt lực giả định của chế phẩm thử phải gần với hoạt lực thực. Dựa vào hoạt lực giả định này và hoạt lực ấn định của chế phẩm chuẩn, pha các độ pha loãng có hoạt lực tương đương sao cho hoạt lực Z_U của chế phẩm thử U bằng hoạt lực Z_S của chế phẩm chuẩn S .

Khoảng cách nằm ngang giữa 2 đường thẳng: $\ln(z_S) - \ln(z_U)$ là hoạt lực thực của chế phẩm thử so với hoạt lực giả định của nó. Nếu đường thẳng của chế phẩm thử ở bên phải của chế phẩm chuẩn, hoạt lực giả định đã được định giá quá cao và việc tính toán sẽ cho hoạt lực định giá được thấp hơn hoạt lực giả định; cũng tương tự nếu đường thẳng của chế phẩm thử ở bên trái của chế phẩm chuẩn, hoạt lực giả định đã được định giá quá thấp và việc tính toán sẽ cho hoạt lực định giá được cao hơn hoạt lực giả định. Trong một thử nghiệm, nếu đoạn thẳng $\ln(z_S) - \ln(z_U)$ càng nhỏ, hoạt lực giả định của chế phẩm cần thử nghiệm càng gần với hoạt lực thật của nó và kết quả thử nghiệm sẽ càng chính xác.



Hình 13.10.1 - Mô hình đường thẳng song song của một thử nghiệm 3 + 3.

Chú ý: Logarit tự nhiên ln (hay \log_e) được sử dụng xuyên suốt trong chuyên luận này, do đó, antilogarit tương đương với e^x . Tuy vậy, nếu muốn, hoàn toàn có thể dùng logarit cơ số 10 (hay \log_{10}) thay cho ln, khi đó, antilogarit tương ứng với 10^x .

3.2.2 Thiết kế thử nghiệm

Các thử nghiệm sinh học có thể được thiết kế theo một số cách khác nhau như trình bày dưới đây.

3.2.2.1 Thiết kế ngẫu nhiên hoàn toàn

Nếu toàn bộ các đơn vị thí nghiệm (động vật, ống nghiệm,...) tương đối đồng nhất, việc phân chia các đơn vị thí nghiệm cho các xử lý khác nhau phải được tiến hành một cách ngẫu nhiên, ví dụ dùng bảng hoán vị ngẫu nhiên. Nếu chia các đơn vị thí nghiệm thành các phân nhóm, ví dụ theo vị trí vật lý hay theo ngày thí nghiệm, nên chia theo cách tính đồng nhất hơn là chỉ xét đến số lượng các đơn vị thí nghiệm, ta có thể tăng độ chính xác của thử nghiệm bằng cách áp dụng một hoặc nhiều hạn chế trong cách thiết kế thí nghiệm. Sự phân chia các đơn vị thí nghiệm theo các hạn chế đó cho phép loại bỏ những nguồn gây sai số không liên quan.

3.2.2.2 Thiết kế ngẫu nhiên theo khối

Trong kiểu thiết kế thí nghiệm này, có thể tách các nguồn biến thiên ra khỏi sai số toàn phần, ví dụ biến thiên do sự nhạy cảm giữa các lứa động vật thí nghiệm hoặc biến thiên giữa các hộp Petri trong định lượng vi sinh vật bằng phương pháp khuếch tán. Thiết kế thí nghiệm ngẫu nhiên theo khối đòi hỏi mỗi khối (lứa động vật hoặc hộp Petri) phải có số xử lý bằng nhau và chỉ thích hợp nếu khối đủ lớn để có thể chứa tất cả các xử lý của thử nghiệm.

Bảng 13.10.6 trình bày công thức tính toán áp dụng cho các thử nghiệm thiết kế thí nghiệm ngẫu nhiên theo khối, trong đó mỗi xử lý chỉ xuất hiện một lần duy nhất trong mỗi khối (thiết kế thí nghiệm ngẫu nhiên theo khối không lặp). Ví dụ minh họa cho kiểu thiết kế thí nghiệm này được trình bày trong ví dụ 3.2.8.2.

3.2.2.3 Thiết kế hình vuông Latin

Kiểu thiết kế thí nghiệm này thích hợp với những thử nghiệm mà đáp ứng chịu ảnh hưởng của 2 nguồn biến thiên khác nhau, trong đó mỗi nguồn biến thiên có k mức hay k vị trí khác nhau. Ví dụ, trong định lượng kháng sinh bằng phương pháp khuếch tán, các xử lý có thể được sắp xếp thành $k \times k$ dãy trên một khay lớn, mỗi xử lý chỉ xuất hiện một lần duy nhất trong mỗi hàng và mỗi cột. Chỉ có thể áp dụng kiểu thiết kế thí nghiệm hình vuông Latin khi số hàng, số cột và số xử lý của mỗi chế phẩm đều phải bằng nhau.

Các đáp ứng được ghi vào một bảng hình vuông gọi là hình vuông Latin. Biến thiên do sự khác nhau về đáp ứng giữa k hàng và giữa k cột sẽ được tách khỏi biến thiên toàn phần, do đó làm giảm sai số của định lượng.

Bảng 13.10.6 trình bày công thức tính toán áp dụng cho các thử nghiệm hình vuông Latin, trong đó mỗi xử lý chỉ xuất hiện một lần duy nhất trong mỗi hàng và mỗi cột. Ví dụ minh họa cho kiểu thiết kế thí nghiệm này được trình bày trong ví dụ 3.2.8.3.

3.2.2.4 *Thiết kế chéo*

Kiểu thiết kế thí nghiệm này được áp dụng trong trường hợp thí nghiệm có thể chia thành các khối, nhưng mỗi khối chỉ có thể nhận hai xử lý, ví dụ một khối là một đơn vị thí nghiệm được thử hai lần vào hai thời điểm khác nhau. Mục đích của kiểu thiết kế chéo là làm tăng độ chính xác của thử nghiệm bằng cách loại trừ ảnh hưởng do sự khác nhau giữa các đơn vị thí nghiệm. Nếu thử nghiệm tiến hành với 2 liều của chế phẩm chuẩn và 2 liều của chế phẩm cần định lượng, ta có kiểu thí nghiệm chéo đôi.

Bảng 13.10.1 - Cách sắp xếp các liều trong thiết kế thí nghiệm chéo

Nhóm các đơn vị thí nghiệm	Giai đoạn I	Giai đoạn II
1	s_1	u_2
2	s_2	u_1
3	u_1	s_2
4	u_2	s_1

Trong thiết kế chéo đôi, thử nghiệm được chia thành hai giai đoạn, mỗi giai đoạn tiến hành vào những thời điểm khác nhau. Các đơn vị thí nghiệm được chia thành bốn nhóm, mỗi nhóm nhận một trong bốn xử lý ở giai đoạn đầu của thí nghiệm. Đơn vị nhận một chế phẩm trong giai đoạn đầu sẽ nhận chế phẩm khác trong giai đoạn sau, và các đơn vị nhận liều thấp trong giai đoạn đầu sẽ nhận liều cao trong giai đoạn sau. Cách sắp xếp các liều cho ở Bảng 13.10.1. Ví dụ minh họa cho kiểu thiết kế thí nghiệm này được trình bày trong Ví dụ 3.2.8.4.

Bảng 13.10.2 - Công thức tính toán cho các thử nghiệm hai liều đa chế phẩm

	Chế phẩm chuẩn S	Chế phẩm thử thứ nhất U	Chế phẩm thử thứ $(h - 1)$ Z
Tổng đáp ứng của liều thấp	S_1	U_1	Z_1
Tổng đáp ứng của liều cao	S_2	U_2	Z_2
Tổng đáp ứng của chế phẩm	$S_1 + S_2 = S$	$U_1 + U_2 = U$	$Z_1 + Z_2 = Z$
Tương phản tuyến tính	$S_2 - S_1 = L_S$	$U_2 - U_1 = L_U$	$Z_2 - Z_1 = L_Z$

Bảng 13.10.3 - Công thức tính toán cho các thử nghiệm ba liều đa chế phẩm

	Chế phẩm chuẩn S	Chế phẩm thử thứ nhất U	Chế phẩm thử thứ $(h - 1)$ Z
Tổng đáp ứng của liều thấp	S_1	U_1	Z_1
Tổng đáp ứng của liều trung gian	S_2	U_2	Z_2
Tổng đáp ứng của liều cao	S_3	U_3	Z_3
Tổng đáp ứng của chế phẩm	$S_1 + S_2 + S_3 = S$	$U_1 + U_2 + U_3 = U$	$Z_1 + Z_2 + Z_3 = Z$
Tương phản tuyến tính	$S_3 - S_1 = L_S$	$U_3 - U_1 = L_U$	$Z_3 - Z_1 = L_Z$
Tương phản bậc hai	$S_1 - 2S_2 + S_3 = Q_S$	$U_1 - 2U_2 + U_3 = Q_U$	$Z_1 - 2Z_2 + Z_3 = Q_Z$

3.2.3 *Phân tích phương sai*

Mục này trình bày các công thức cần thiết để phân tích phương sai. Người đọc sẽ dễ hiểu hơn khi tham khảo thêm các ví dụ ở mục 3.2.8 và Bảng ghi chú các ký hiệu ở mục 6. Các công thức trình bày ở đây có thể áp dụng cho các định lượng đối xứng trong đó một hay nhiều chế phẩm cần thử (U, \dots, Z) được so sánh với cùng một chế phẩm chuẩn S , với điều kiện thử nghiệm phải đáp ứng được các điều kiện sau: 1) tỷ lệ giữa các liều kế tiếp nhau của tất cả các chế phẩm phải là một hằng số; 2) số xử lý của mỗi chế phẩm và 3) số đơn vị thí nghiệm (số thử nghiệm lặp lại) trong mỗi xử lý phải bằng nhau (xem mục 3.1.3).

Ngoại trừ một vài khác biệt nhỏ trong cách tính sai số dư, phương pháp phân tích các số liệu của mỗi thử nghiệm sinh học về cơ bản là giống nhau đối với các kiểu thiết kế thí nghiệm ngẫu nhiên hoàn toàn, ngẫu nhiên theo khối và hình vuông Latin. Thiết kế thí nghiệm chéo có công thức tính hoàn toàn khác và do đó được trình bày trực tiếp trong Ví dụ 3.2.8.4.

Để chuẩn bị số liệu cho phân tích phương sai, đầu tiên phải tính tổng đáp ứng của mỗi liều, tổng đáp ứng và tương phản tuyến tính (*linear contrast*) của mỗi chế phẩm; đối với các định lượng có nhiều hơn hai liều của mỗi chế phẩm, cần tính thêm tương phản bậc hai (*quadratic contrast*). Các Bảng 13.10.2, 13.10.3 và 13.10.4 trình bày các công thức tính đó.

Bảng 13.10.4 - Công thức tính toán cho các thử nghiệm bốn liều đa chế phẩm

	Chế phẩm chuẩn S	Chế phẩm thử thứ nhất U	Chế phẩm thử thứ $(h - 1) Z$
Tổng đáp ứng của liều thấp nhất	S_1	U_1	Z_1
Tổng đáp ứng của liều thứ hai	S_2	U_2	Z_2
Tổng đáp ứng của liều thứ ba	S_3	U_3	Z_3
Tổng đáp ứng của liều cao nhất	S_4	U_4	Z_4
Tổng đáp ứng của chế phẩm	$S_1 + S_2 + S_3 + S_4 = S$	$U_1 + U_2 + U_3 + U_4 = U$	$Z_1 + Z_2 + Z_3 + Z_4 = Z$
Tương phản tuyến tính	$3S_4 + S_3 - S_2 - 3S_1 = L_S$	$3U_4 + U_3 - U_2 - 3U_1 = L_U$	$3Z_4 + Z_3 - Z_2 - 3Z_1 = L_Z$
Tương phản bậc hai	$S_1 - S_2 - S_3 + S_4 = Q_S$	$U_1 - U_2 - U_3 + U_4 = Q_U$	$Z_1 - Z_2 - Z_3 + Z_4 = Q_Z$
Tương phản bậc ba	$3S_2 - S_1 + S_4 - 3S_3 = J_S$	$3U_2 - U_1 + U_4 - 3U_3 = J_U$	$3Z_2 - Z_1 + Z_4 - 3Z_3 = J_Z$

Trong bước kế tiếp, biến thiên toàn phần của thử nghiệm, còn gọi là sai số chung, được phân tích thành các biến thiên riêng phần như trình bày ở Bảng 13.10.5, các tổng các bình phương được tính từ các giá trị thu được ở các Bảng 13.10.2, 13.10.3 và 13.10.4.

Bảng 13.10.5 - Phép thử tính có giá trị của thử nghiệm

Nguồn biến thiên	Bậc tự do (f)	Tổng các bình phương		
		2 liều/chế phẩm	3 liều/chế phẩm	4 liều/chế phẩm
Chế phẩm	$h - 1$	$\frac{S^2 + U^2 + \dots + Z^2}{2n} - K$	$\frac{S^2 + U^2 + \dots + Z^2}{3n} - K$	$\frac{S^2 + U^2 + \dots + Z^2}{4n} - K$
Hồi qui tuyến tính	1	$\frac{(L_S + L_U + \dots + L_Z)^2}{2nh} = E$	$\frac{(L_S + L_U + \dots + L_Z)^2}{2nh} = E$	$\frac{(L_S + L_U + \dots + L_Z)^2}{20nh} = E$
Tính không song song	$h - 1$	$\frac{L_S^2 + L_U^2 + \dots + L_Z^2}{2n} - E$	$\frac{L_S^2 + L_U^2 + \dots + L_Z^2}{2n} - E$	$\frac{L_S^2 + L_U^2 + \dots + L_Z^2}{20n} - E$
Tính không tuyến tính (Độ cong)	h (3 liều) $2h$ (4 liều)	-	$\frac{Q_S^2 + Q_U^2 + \dots + Q_Z^2}{6n}$	$\frac{Q_S^2 + Q_U^2 + \dots + Q_Z^2}{4n} + \frac{J_S^2 + J_U^2 + \dots + J_Z^2}{20n}$

Tính sai số dư (*residual error*) bằng cách lấy sai số toàn phần của thử nghiệm trừ đi các sai số riêng của các nguồn biến thiên khác nhau (Bảng 13.10.6), nguồn biến thiên có thể nhận dạng được tùy theo kiểu thiết kế thí nghiệm trong Bảng 13.10.6, $\sum y^2$ là tổng bình phương của tất cả các đáp ứng đo được trong thử nghiệm, K là đại lượng để hiệu chỉnh:

$$K = \frac{(\sum y)^2}{N}$$

Kết thúc phân tích phương sai bằng cách chia các tổng các bình phương tính được từ Bảng 13.10.5 cho bậc tự do tương ứng để được các bình phương trung bình.

Bình phương trung bình của sai số dư cũng được tính theo cách tương tự, dùng số liệu tương ứng ở Bảng 13.10.6. Bình phương trung bình của mỗi biến số cần kiểm tra sẽ được biểu diễn dưới dạng một tỷ số với sai số dư s^2 , gọi là tỷ số F . Đánh giá mức ý nghĩa của các tỷ số F bằng cách so sánh F tính được (viết tắt là $F_{cal.}$) với giá trị F tới hạn (viết tắt là $F_{crit.}$) tra từ Bảng 13.10.7 hay bằng cách dùng các phần mềm vi tính thích hợp. Nếu dùng bảng tra cứu, đọc $F_{crit.}$ từ Bảng 13.10.7 tại giao điểm giữa cột tương ứng với bậc tự do của bình phương trung bình của biến số cần kiểm tra (f_1) và hàng tương ứng với bậc tự do của s^2 (f_2). Biến số cần kiểm tra được coi là có ý nghĩa nếu $F_{cal.} > F_{crit.}$ ở xác suất $P = 0,05$ hay rất có ý nghĩa nếu $F_{cal.} > F_{crit.}$ ở xác suất $P = 0,01$.

Bảng 13.10.6 - Định giá của sai số dư

Nguồn biến thiên	Bậc tự do (f)	Tổng các bình phương		
		Ngẫu nhiên hoàn toàn	Ngẫu nhiên theo khối	Hình vuông Latin
Giữa các xử lý	k - 1	$\frac{S_1^2 + S_2^2 + \dots + Z_d^2}{n} - K$	$\frac{S_1^2 + S_2^2 + \dots + Z_d^2}{n} - K$	$\frac{S_1^2 + S_2^2 + \dots + Z_d^2}{n} - K$
Giữa các khối (hàng)	n - 1	-	$\frac{R_1^2 + R_2^2 + \dots + R_n^2}{k} - K$	$\frac{R_1^2 + R_2^2 + \dots + R_n^2}{k} - K$
Giữa các khối (cột)	n - 1	-	-	$\frac{C_1^2 + C_2^2 + \dots + C_n^2}{k} - K$
Sai số dư	Hiệu số	*	*	*
Sai số toàn phần	N - 1	$\sum y^2 - K$	$\sum y^2 - K$	$\sum y^2 - K$

* Lấy sai số toàn phần trừ đi các tổng các bình phương tương ứng của mỗi phương pháp thiết kế thí nghiệm.

Bảng 13.10.7 - Giá trị tới hạn của tỷ số F

		f ₁									
		1	2	3	4	5	6	7	8	20	∞
f ₂	12	4,75	3,89	3,49	3,26	3,11	3,00	2,91	2,85	2,54	2,30
		9,33	6,93	5,95	5,41	5,06	4,82	4,64	4,50	3,86	3,36
	15	4,54	3,68	3,29	3,06	2,90	2,79	2,71	2,64	2,33	2,07
		8,68	6,36	5,42	4,89	4,56	4,32	4,14	4,00	3,37	2,87
	20	4,35	3,49	3,10	2,87	2,71	2,60	2,51	2,45	2,12	1,84
		8,10	5,85	4,94	4,43	4,10	3,87	3,70	3,56	2,94	2,42
	25	4,24	3,39	2,99	2,76	2,60	2,49	2,40	2,34	2,01	1,71
		7,77	5,57	4,68	4,18	3,85	3,63	3,46	3,32	2,70	2,17
	30	4,17	3,32	2,92	2,69	2,53	2,42	2,33	2,27	1,93	1,62
		7,56	5,39	4,51	4,02	3,70	3,47	3,30	3,17	2,55	2,01
	40	4,08	3,23	2,84	2,61	2,45	2,34	2,25	2,18	1,84	1,51
		7,31	5,18	4,31	3,83	3,51	3,29	3,12	2,99	2,37	1,80
	60	4,00	3,15	2,76	2,53	2,37	2,25	2,17	2,10	1,75	1,39
		7,08	4,98	4,13	3,65	3,34	3,12	2,95	2,82	2,20	1,60
	∞	3,84	3,00	2,60	2,37	2,21	2,10	2,01	1,94	1,57	1,00

* Nếu F tính được > F tới hạn, biến số cần kiểm tra được coi là có ý nghĩa (dòng trên, p = 0,05), hay rất có ý nghĩa (dòng dưới, p = 0,01). f₁ là bậc tự do của tử số, f₂ là bậc tự do của mẫu số.

3.2.4. Phép thử tính có giá trị của thử nghiệm

Kết quả thử nghiệm được coi là có giá trị thống kê (statistically valid) nếu:

- 1) Đại lượng hồi qui tuyến tính rất có ý nghĩa, $F_{cal.} > F_{crit.}$ ở xác suất $P = 0,01$ ($P < 0,01$), chứng tỏ độ dốc của đường ln(liều) - đáp ứng rất khác 0.
- 2) Đại lượng không tuyến tính (non-linearity) phải không có ý nghĩa, $F_{cal.} < F_{crit.}$ ở xác suất 0,05 ($P > 0,05$), chứng tỏ thỏa mãn điều kiện 4, tức là các đường ln(liều) - đáp ứng của chế phẩm chuẩn \underline{S} và các chế phẩm thử ($\underline{U}, \dots, \underline{Z}$) thẳng.
- 3) Đại lượng không song song (non-parallelism) phải không có ý nghĩa, $F_{cal.} < F_{crit.}$ ở xác suất 0,05 ($P > 0,05$), chứng tỏ thử nghiệm đáp ứng điều kiện 5, hay nói cách khác các đường ln(liều) - đáp ứng của các chế phẩm thử ($\underline{U}, \dots, \underline{Z}$) song song với đường ln(liều) - đáp ứng của chế phẩm chuẩn \underline{S} .

Nếu đại lượng không song song có ý nghĩa trong một thử nghiệm có h chế phẩm, kể cả chế phẩm chuẩn, một trong số các chế phẩm cần thử có thể có độ dốc của đường ln(liều) - đáp ứng khác với các chế phẩm còn lại. Tính t' (phép kiểm Dunnett) của mỗi chế phẩm cần định lượng ($\underline{U}, \dots, \underline{Z}$) theo công thức:

$$t' = \frac{L_S - L_U}{2\sqrt{ns^2}} \quad (3.2.4.-1)$$

Đối với các thử nghiệm có bốn liều đơn chế phẩm, tính t' theo công thức:

$$t' = \frac{L_S - L_U}{2\sqrt{10ns^2}}$$

So sánh mỗi t' tính được với giá trị tới hạn đọc từ Bảng 13.10.8, với $f_1 = h - 1$, f_2 là bậc tự do của s^2 . Nếu t' có ý nghĩa thống kê với một chế phẩm bất kỳ, loại bỏ tất cả các số liệu liên quan đến chế phẩm đó và lặp lại từ đầu phép kiểm tính có giá trị với các chế phẩm còn lại.

Bảng 13.10.8 - Giá trị tới hạn của t'

$f_1 = (h - 1) = \text{số chế phẩm cần định lượng}$									
f_2	1	2	3	4	5	6	7	8	9
5	2,57	3,03	3,29	3,48	3,62	3,73	3,82	3,90	3,97
6	2,45	2,86	3,10	3,26	3,39	3,49	3,57	3,64	3,71
7	2,36	2,75	2,97	3,12	3,24	3,33	3,41	3,47	3,53
8	2,31	2,67	2,88	3,02	3,13	3,22	3,29	3,35	3,41
9	2,26	2,61	2,81	2,95	3,05	3,14	3,20	3,26	3,32
10	2,23	2,57	2,76	2,89	2,99	3,07	3,14	3,19	3,24
11	2,20	2,53	2,72	2,84	2,94	3,02	3,08	3,14	3,19
12	2,18	2,50	2,68	2,81	2,90	2,98	3,04	3,09	3,14
13	2,16	2,48	2,65	2,78	2,87	2,94	3,00	3,06	3,10
14	2,14	2,46	2,63	2,75	2,84	2,91	2,97	3,02	3,07
15	2,13	2,44	2,61	2,73	2,82	2,89	2,95	3,00	3,04
16	2,12	2,42	2,59	2,71	2,80	2,87	2,92	2,97	3,02
17	2,11	2,41	2,58	2,69	2,78	2,85	2,90	2,95	3,00
18	2,10	2,40	2,56	2,68	2,76	2,83	2,89	2,94	2,98
19	2,09	2,39	2,55	2,66	2,75	2,81	2,87	2,92	2,96
20	2,09	2,38	2,54	2,65	2,73	2,80	2,86	2,90	2,95
24	2,06	2,35	2,51	2,61	2,70	2,76	2,81	2,86	2,90
30	2,04	2,32	2,47	2,58	2,66	2,72	2,77	2,82	2,86
40	2,02	2,29	2,44	2,54	2,62	2,68	2,73	2,77	2,81
60	2,00	2,27	2,41	2,51	2,58	2,64	2,69	2,73	2,77
120	1,98	2,24	2,38	2,47	2,55	2,60	2,65	2,69	2,73
∞	1,96	2,21	2,35	2,44	2,51	2,57	2,61	2,65	2,69

Biến thiên do chế phẩm không được dùng trong phép thử tính có giá trị của thử nghiệm, tuy nhiên, trong những thử nghiệm mà sai số dư lớn một cách bất thường và tỷ số F của nguồn biến thiên do chế phẩm cao rất có ý nghĩa, hoạt lực giả định của chế phẩm cần định lượng rất khác với hoạt lực thật của nó, cần phải lặp lại thử nghiệm dùng hoạt lực tính được làm hoạt lực giả định.

Nếu thử nghiệm thỏa mãn phép thử tính có giá trị, hay nói cách khác, thử nghiệm có giá trị thống kê, hoạt lực và các giới hạn tin cậy có thể được định giá bằng các phương pháp mô tả trong mục kế tiếp.

3.2.5 Định giá hoạt lực và các giới hạn tin cậy

Đề định giá hoạt lực và các giới hạn tin cậy, trước hết phải tính đáp ứng trung bình của mỗi chế phẩm ($\bar{y}_S, \bar{y}_U, \dots, \bar{y}_Z$):

$$\bar{y}_S = \frac{S}{N_S} \tag{3.2.5.-1}$$

Tiến hành tương tự như vậy với các chế phẩm khác.

Gọi I là khoảng cách giữa ln các liều kế tiếp nhau của một chế phẩm bất kỳ (I là hằng số trong một thử nghiệm), ví dụ $I = \ln(S_2) - \ln(S_1)$, độ dốc chung (b) của một thử nghiệm bao gồm h chế phẩm, mỗi chế phẩm có d liều khác nhau được tính theo công thức:

$$b = \frac{L_s + L_U + \dots + L_Z}{(d-1)Inh} \quad (3.2.5.-2)$$

Đối với các thử nghiệm bốn liều đơn chế phẩm, tính b theo công thức:

$$b = \frac{L_s + L_U + \dots + L_Z}{10Inh}$$

ln(tỷ lệ hoạt lực) của chế phẩm cần định lượng \underline{U} được tính theo công thức:

$$M'_U = \frac{\bar{y}_U - \bar{y}_s}{b} \quad (3.2.5.-3)$$

Gọi A_U là hoạt lực giả định của chế phẩm \underline{U} , logarit hoạt lực của \underline{U} (M_U) sẽ bằng:

$$M_U = M'_U + \ln(A_U) \quad (3.2.5.-4)$$

Hoạt lực tính được là ước lượng của hoạt lực thật của mỗi chế phẩm cần định lượng. Các giới hạn tin cậy của hoạt lực tính được là khoảng chứa hoạt lực thật của chế phẩm cần định lượng với xác suất 95%. Logarit của các giới hạn tin cậy được tính theo công thức sau:

$$\ln(A_U) + CM'_U \pm \frac{st\sqrt{C}}{b} \sqrt{\frac{1}{N_s} + \frac{1}{N_U} + \frac{(\bar{y}_s - \bar{y}_U)^2}{E - s^2t^2}} \quad (3.2.5.-5)$$

$$\text{với: } C = \frac{E}{E - s^2t^2} \quad (3.2.5.-6)$$

E là giá trị tính được từ Bảng 13.10.5, tính s^2 bằng cách chia tổng các bình phương của biến số sai số dư trong Bảng 13.10.6 cho bậc tự do tương ứng của nó, t là giá trị đọc được từ Bảng 13.10.28 với xác suất $P = 0,95$ và f là bậc tự do của s^2 .

Trong những thử nghiệm đối xứng, công thức tính các giới hạn tin cậy có thể đơn giản hóa thành:

$$\ln(A_U) + CM'_U \pm \sqrt{(C-1)(CM_U'^2 + 2H)} \quad (3.2.5.-7)$$

$$\text{với: } H = \frac{E}{b^2dn}$$

Trong đó:

C là tiêu chí đánh giá ý nghĩa của đường hồi qui. Trong một thử nghiệm có độ dốc đạt yêu cầu, giá trị của C rất gần với 1. Nếu $C < 0$ hồi qui tuyến tính không có ý nghĩa.

Tính định giá hoạt lực của chế phẩm \underline{U} (R_U) và các giới hạn tin cậy của nó bằng cách lấy antilogarit các giá trị tính được từ các công thức 3.2.5.-4 và 3.2.5.-7.

$$R_U = \text{anti ln}(M_U) \quad (3.2.5.-8)$$

$$FL_U = \text{anti ln}\left(\ln(A_U) + CM'_U + \sqrt{(C-1)(CM_U'^2 + 2H)}\right) \quad (3.2.5.-9)$$

$$FL_L = \text{anti ln}\left(\ln(A_U) + CM'_U - \sqrt{(C-1)(CM_U'^2 + 2H)}\right) \quad (3.2.5.-10)$$

FL_U là giới hạn tin cậy trên và FL_L là giới hạn tin cậy dưới của hoạt lực tính được R_U .

Nếu nồng độ dung dịch gốc của chế phẩm chuẩn và các chế phẩm thử không hoàn toàn bằng nhau, phải hiệu chỉnh hoạt lực tính được và các giới hạn tin cậy với một hệ số, gọi là hệ số hiệu chỉnh (xem Ví dụ 3.2.8.3). Hệ số hiệu chỉnh là tỷ số giữa nồng độ dung dịch gốc của chế phẩm chuẩn và nồng độ dung dịch gốc của mỗi chế phẩm cần định lượng.

3.2.6 Các giá trị bị mất

Trong một thử nghiệm đối xứng, một sự cố ngẫu nhiên có thể dẫn đến việc mất một hay nhiều giá trị đo, ví dụ động vật thí nghiệm chết, vòng vô khuẩn bị méo không đo được trong một thử nghiệm kháng sinh ... Nếu sự cố xảy ra không liên

quan đến thành phần của chế phẩm đã sử dụng, vẫn có thể tính được kết quả định lượng một cách chính xác, tuy nhiên khi đó các công thức tính toán sẽ trở nên rất phức tạp. Để có thể tiếp tục dùng các công thức tính toán đơn giản của thiết kế thí nghiệm đối xứng, có thể áp dụng một trong hai cách sau:

1) Nếu số đáp ứng của mỗi xử lý đủ lớn, giảm số đáp ứng trong các xử lý có số đáp ứng lớn hơn cho đến khi số đáp ứng của tất cả các xử lý bằng nhau. Nếu động vật thí nghiệm đã được phân bố một cách ngẫu nhiên cho mỗi xử lý, bỏ một hay vài đáp ứng, được chọn ngẫu nhiên, từ các xử lý có số đáp ứng lớn sẽ thu được thử nghiệm đối xứng. Đối với các thiết kế thí nghiệm ngẫu nhiên theo khối, cách đơn giản nhất là bỏ tất cả các đáp ứng của khối có giá trị bị mất. Ví dụ, chỉ giữ lại kết quả đo của các hộp Petri có đủ 6 vòng vô khuẩn trong thử nghiệm kháng sinh 3 + 3 bằng phương pháp khuếch tán, dùng hộp Petri.

2) Thay các giá trị bị mất bằng các giá trị tính được từ những giá trị còn lại. Công thức tính các giá trị mất được trình bày ở bên dưới. Số bậc tự do của sai số toàn phần và sai số dư sẽ phải giảm đi một đơn vị cho mỗi giá trị bị mất. Cần nhớ rằng đây chỉ là phương pháp gần đúng, phương pháp chính xác luôn luôn cho kết quả đáng tin cậy hơn.

Nếu có nhiều quan sát bị mất, thay tất cả các giá trị bị mất, trừ một quan sát, bằng các giá trị ước lượng thô và dùng công thức thích hợp để tính giá trị của quan sát đó dựa trên các giá trị còn lại, kể cả các giá trị ước lượng thô. Thay quan sát bị mất bằng giá trị vừa tính được. Tiếp tục tính theo cách trên với giá trị ước đoán thô thứ nhất... Sau khi đã thay thế lần lượt tất cả các quan sát bị mất, lặp lại từ đầu chu trình tính toán, mỗi lần tính dùng một giá trị ước đoán hoặc giá trị tính được cho đến khi hai chu trình kế tiếp nhau cho cùng kết quả.

Kết quả thử nghiệm chỉ được chấp nhận nếu số các giá trị thay thế tương đối nhỏ (nhỏ hơn 5 %) so với tổng số đáp ứng của toàn bộ thử nghiệm. Cần đặc biệt thận trọng trong trường hợp các giá trị bị mất có khuynh hướng tập trung trong một xử lý hay một khối.

Thiết kế ngẫu nhiên hoàn toàn

Trong kiểu thiết kế ngẫu nhiên hoàn toàn, thay giá trị bị mất bằng trung bình số học của các đáp ứng khác trong cùng xử lý.

Thiết kế ngẫu nhiên theo khối

Giá trị bị mất (y') được tính bằng công thức:

$$y' = \frac{nB' + kT' - G'}{(n-1)(k-1)} \tag{3.2.6.-1}$$

Trong đó:

B' là tổng đáp ứng của khối chứa giá trị bị mất, T' là tổng đáp ứng của xử lý chứa giá trị bị mất, G' là tổng tất cả các đáp ứng còn lại trong thử nghiệm, n và k theo thứ tự là số khối và số xử lý.

Đề minh họa, giả sử giá trị của u_1 trong khối thứ nhất (trong trường hợp này là hàng hay hộp Petri) ở ví dụ 3.2.8.2, Bảng 3.10.14 bị mất ($u_1 = 174$). Với:

- $B' = 1.050$
- $T' = 869$
- $G' = 7.189$
- $k = 6$
- $n = 6$

$y' = 173$. Dùng giá trị tính được 173 thay cho đáp ứng của u_1 trong hộp số 1 của Bảng 3.10.14 và tiếp tục tính toán như trình bày trong ví dụ 3.2.8.2 nhưng với bậc tự do của sai số toàn phần là 34, và bậc tự do của sai số dư là 24.

Thiết kế hình vuông Latin

Giá trị bị mất (y') được tính bằng công thức:

$$y' = \frac{k(B'+C'+T') - 2G'}{(k-1)(k-2)} \tag{3.2.6.-2}$$

Trong đó:

B' và C' là tổng các đáp ứng trong hàng và cột chứa giá trị bị mất. G' là tổng các đáp ứng còn lại trong thử nghiệm (Bảng 13.10.18), còn T' là tổng các đáp ứng của xử lý chứa giá trị bị mất (Bảng 13.10.19). Trong thiết kế hình vuông Latin $k = n$. Giả sử giá trị 161 của đáp ứng ở cột thứ 1 và hàng thứ 1 trong Bảng 13.10.18 và Bảng 13.10.19 (Ví dụ 3.2.8.3) bị mất, nó sẽ được thay thế bởi giá trị 150 tính được bằng công thức 3.2.6.-2 với:

- $B' = 890$
- $C' = 876$
- $T' = 791$
- $G' = 6.175$
- $k = 6$

Các bậc tự do sẽ bị giảm xuống còn 19 đối với sai số dư và 34 đối với sai số toàn phần.

Thiết kế chéo

Nếu có giá trị bị mất trong kiểu thiết kế thí nghiệm chéo phải tham khảo các tài liệu thống kê vì công thức tính sẽ rất khác nhau tùy theo cách phối hợp các xử lý.

3.2.7 Các thử nghiệm đối xứng một phần

Nếu hoạt lực giả định của chế phẩm cần định lượng, là hoạt lực được dùng để tính lượng chế phẩm thử cần lấy khi pha các dung dịch của chế phẩm thử, khác xa với hoạt lực thật, nồng độ cao nhất hoặc nồng độ thấp nhất của chế phẩm thử có thể nằm lọt ra ngoài vùng tuyến tính của đường ln(liều) - đáp ứng, do đó thử nghiệm sẽ không có giá trị thống kê do không thỏa mãn tính tuyến tính và/hoặc tính song song.

Có thể tính hoạt lực từ các số liệu còn lại, sau khi loại bỏ các đáp ứng của nồng độ cao nhất hoặc nồng độ thấp nhất của chế phẩm thử và dùng hoạt lực tính được làm hoạt lực giả định cho những lần thử nghiệm lặp lại.

Logarit tỷ lệ hoạt lực được tính bằng công thức:

$$M'_U = \frac{\bar{y}_U - \bar{y}_S}{b} \pm \frac{I}{2} \quad (3.2.7.-1)$$

Công thức trên rất giống với phương trình 3.2.5.-3, tuy nhiên, ln(tỷ lệ hoạt lực) sẽ bị trừ đi một đại lượng bằng I/2 nếu bỏ nồng độ thấp nhất, và cộng thêm I/2 nếu bỏ nồng độ cao nhất.

Tính các đáp ứng trung bình \bar{y}_S và \bar{y}_U theo cách tương tự như thử nghiệm cân xứng hoàn toàn (phương trình 3.2.5.-1), nhưng công thức tính độ dốc (b) có một số biến đổi tùy theo thiết kế thí nghiệm.

Trong thử nghiệm hai liều đa chế phẩm, tính độ dốc bằng công thức:

$$b = \frac{L_S + \dots + L_Z}{\ln(h-1)} \quad (3.2.7.-2)$$

Chú ý: Trong công thức trên, từ số không bao gồm L_U vì chế phẩm U chỉ còn một nồng độ. Đối với thử nghiệm đơn chế phẩm:

$$b = \frac{L_S}{\ln} \quad (3.2.7.-3)$$

Trong thử nghiệm ba liều đa chế phẩm, tính các tương phản tuyến tính (L_S, \dots, L_Z) theo công thức cho ở Bảng 13.10.3, riêng L_U tính bằng công thức ở Bảng 13.10.2. Công thức tính độ dốc sẽ là:

$$b = \frac{2(L_S + \dots + L_Z) + L_U}{\ln(4h-3)} \quad (3.2.7.-4)$$

Đối với thử nghiệm đơn chế phẩm, công thức trên trở thành:

$$b = \frac{2L_S + L_U}{5\ln} \quad (3.2.7.-5)$$

3.2.8 Các ví dụ

Mục này trình bày một số ví dụ minh họa cách sử dụng các công thức tính toán liên quan đến mô hình đường thẳng song song.

Các ví dụ giới thiệu ở đây chỉ nhằm mục đích minh họa cho các phương pháp tính toán thống kê và không phải là phương pháp bắt buộc phải áp dụng nếu chuyên luận riêng cho phép dùng phương pháp khác.

Để có thể sử dụng các ví dụ trong chuyên luận này như nguồn số liệu tham khảo phục vụ cho việc kiểm tra các chương trình vi tính, thương mại hay tự biên soạn, dùng trong phân tích thống kê kết quả định lượng sinh học, các kết quả tính toán có thể chứa nhiều số thập phân hơn mức cần thiết. Có thể dùng phương pháp tính toán khác với phương pháp giới thiệu trong chuyên luận này, nhưng kết quả cuối cùng phải giống như các kết quả trong các ví dụ trình bày ở đây.

Ví dụ 3.2.8.1 Thử nghiệm hai liều đa chế phẩm với thiết kế ngẫu nhiên hoàn toàn

Thử nghiệm định lượng corticotrophin bằng phương pháp tiêm dưới da chuột cống trắng

Liều dùng của chế phẩm chuẩn là 0,25 và 1,0 đơn vị cho mỗi 100 g thể trọng chuột thí nghiệm. Hai chế phẩm thử đều có hoạt lực giả định là 1 đơn vị/mg và có liều dùng giống như chế phẩm chuẩn. Các đáp ứng riêng và đáp ứng trung bình của mỗi nhóm xử lý cho ở Bảng 13.10.9.

Bảng 13.10.9 - Đáp ứng metameter y - khối lượng acid ascorbic (mg) trên 100 g tuyến thượng thận

	Chế phẩm chuẩn \underline{S}		Chế phẩm thử \underline{U}		Chế phẩm thử \underline{Z}		Tổng số
	s_1	s_2	u_1	u_2	z_1	z_2	
	300	289	310	230	250	236	
	310	221	290	210	268	213	
	330	267	360	280	273	283	
	290	236	341	261	240	269	
	364	250	321	241	307	251	
	328	231	370	290	270	294	
	390	229	303	223	317	223	
	360	269	334	254	312	250	
	342	233	295	216	320	216	
	306	259	315	235	265	265	
Trung bình	332,0	248,4	323,9	244,0	282,2	250,0	
Phương sai (var _i)	1.026,7	483,8	725,0	718,7	854,6	784,7	$\sum \text{var}_i = 4.593,4$
ln (var _i)	6,9341	6,1817	6,5862	6,5774	6,7507	6,6653	$\sum \ln(\text{var}_i) = 39,6953$

Bảng 13.10.10 - Các tổng đáp ứng và tương phản tuyến tính (xem công thức tính ở Bảng 13.10.2)

	Chế phẩm chuẩn \underline{S}	Chế phẩm thử \underline{U}	Chế phẩm thử \underline{Z}	Tổng số
Liều thấp	$S_1 = 3.320$	$U_1 = 3.239$	$Z_1 = 2.822$	
Liều cao	$S_2 = 2.484$	$U_2 = 2.440$	$Z_2 = 2.500$	
Tổng đáp ứng của chế phẩm	$S = 5.804$	$U = 5.679$	$Z = 5.322$	$\sum y = 16.805$
Tương phản tuyến tính	$L_S = -836$	$L_U = -799$	$L_Z = -322$	$\sum L = 1.957$

$$K = \frac{(\sum y)^2}{N} = \frac{16.805^2}{60} = 4.706.800,42$$

$$\sum y^2 = 4.826.447$$

Tính các tổng các bình phương theo công thức trong các Bảng 13.10.5 và 13.10.6 dùng các số liệu tính được ở Bảng 13.10.10:

$$\text{Chế phẩm} = \frac{S^2 + U^2 + Z^2}{2n} - K = \frac{5.804^2 + 5.679^2 + 5.322^2}{20} - 4.706.800,42 = 6.256,63$$

$$\text{Hồi qui tuyến tính} = \frac{(L_S + L_U + \dots + L_Z)^2}{2nh} = \frac{(-836 - 799 - 322)^2}{60} = 63.830,817 = E$$

$$\text{Không song song} = \frac{L_S^2 + L_U^2 + \dots + L_Z^2}{2n} - E = \frac{(-836)^2 + (-799)^2 + (-322)^2}{20} - 63.830,817 = 8.218,233$$

$$\text{Giữa các xử lý} = \frac{S_1^2 + S_2^2 + \dots + Z_d^2}{n} - K = \frac{3.320^2 + 2.484^2 + \dots + 2.500^2}{10} - K = 78.305,68$$

$$\text{Toàn phần} = \sum y^2 - K = 4.826.447 - 4.706.800,42 = 119.646,58$$

$$\text{Sai số dư} = \text{Toàn phần} - \text{Giữa các xử lý} = 119.646,58 - 78.305,68 = 41.340,90$$

Bảng 13.10.11- Phân tích phương sai

Nguồn biến thiên	Bậc tự do	Tổng các bình phương	Bình phương trung bình	Tỷ số F	Xác suất
Chế phẩm	2	6.256,6	3128,3		
Hồi qui tuyến tính	1	63.830,8	63.830,8	83,4	< 0,01
Không song song	2	8.218,2	4109,1	5,4	< 0,05
Giữa các xử lý	5	78.305,7			
Sai số dư	54	41.340,9	765,572		
Sai số toàn phần	59	119.646,6			

Phép thử tính có giá trị của thử nghiệm

Kết quả phân tích phương sai cho thấy, tỷ số F của biến số hồi qui $F_{cal.} = 83,4$ rất lớn so với F tới hạn ở xác suất $P = 0,01, f_1 = 1$ và $f_2 = 54: F_{(P=0,01; f_1=1; f_2=54)} = 7,13^{(1)}$, do đó biến số hồi qui rất có ý nghĩa.

Biến số không song song cũng có ý nghĩa, $F_{cal.} = 5,4 > F_{(P=0,05; f_1=2; f_2=54)} = 3,17$. Khảo sát Bảng 13.10.10 cho thấy chế phẩm Z có tương phản tuyến tính L_Z rất khác với L_S và L_U . Do đó, có khả năng độ dốc của đường ln(liều) - đáp ứng của chế phẩm Z không phù hợp với các chế phẩm còn lại và là nguyên nhân làm cho tính có giá trị của thử nghiệm không thỏa mãn. Kiểm tra giả thuyết trên bằng phép kiểm Dunnett (t' được tính theo công thức 3.2.4 - 1 ở mục 3.2.4) :

Đối với chế phẩm U:

$$t' = \frac{L_S - L_U}{2\sqrt{ns^2}} = \frac{-836 - (-799)}{2\sqrt{10 \times 765,572}} = -0,21$$

Đối với chế phẩm Z:

$$t' = \frac{L_S - L_Z}{2\sqrt{ns^2}} = \frac{-836 - (-322)}{2\sqrt{10 \times 765,572}} = -2,94$$

Đối với chế phẩm Z, $|t'_{cal.}| = 2,94 > t'_{crit.} = 2,27$ đọc từ Bảng 13.10.8 với $P = 0,05, f_1 = 2$ và $f_2 = 54$, do đó đường ln(liều) - đáp ứng của nó không song song với đường ln(liều) - đáp ứng của chế phẩm chuẩn. Loại các số liệu liên quan đến chế phẩm Z và lặp lại phân tích chỉ với các số liệu của chế phẩm U và chế phẩm chuẩn, với $\sum y = 11.483$ và $\sum L = -1.635$ (Bảng 13.10.10).

$$K = \frac{(\sum y)^2}{N} = \frac{11.483^2}{40} = 3.296.482,225$$

$$\sum y^2 = 3.390.325$$

Bảng 13.10.12 - Phân tích phương sai không có chế phẩm Z

Nguồn biến thiên	Bậc tự do	Tổng các bình phương	Bình phương trung bình	Tỷ số F	Xác suất
Chế phẩm	1	390,6	390,6		
Hồi qui tuyến tính	1	66.830,6	66.830,6	90,5	< 0,01
Không song song	1	34,2	34,2	0,05	> 0,05
Giữa các xử lý	3	67.255,5			
Sai số dư	36	26.587,3	738,54		
Sai số toàn phần	39	93.842,8			

⁽¹⁾ Trong bảng 13.10.7 không có $f_2 = 54$. Tuy nhiên $F_{(P=0,01; f_1=1; f_2=40)} = 7,31$ nên ở đây $F_{crit.} = F_{(P=0,01; f_1=1; f_2=54)}$ phải < 7,31, còn $F_{cal.} = 83,4$, do đó $F_{cal.} > F_{crit.}$ nên biến số hồi qui rất có ý nghĩa. Nếu có bảng tra cứu chi tiết hơn, có $f_2 = 54$ thì $F_{crit.} = 7,13$. Trị số này có thể tìm được bằng phép nội suy của bảng 13.10.7 hoặc cũng có thể tính được bằng hàm FINV(p, f₁, f₂) của chương trình bảng tính Excel.

Sau khi loại chế phẩm Z, kết quả phân tích phương sai cho thấy thử nghiệm thỏa mãn các yêu cầu về cả hồi qui và cả tính không song song.

Định giá hoạt lực và các giới hạn tin cậy

$$\bar{y}_S = \frac{S}{N_S} = \frac{5.804}{20} = 290,2$$

$$\bar{y}_U = \frac{U}{N_U} = \frac{5.679}{20} = 283,95$$

Tỷ lệ giữa các liều kế tiếp nhau bằng $1,0/0,25 = 4$, do đó $I = \ln(4) = 1,3863$, $t = 2,03$ với $P = 0,95$ và $f = 36$ (Bảng 13.10.28).

$$b = \frac{L_S + L_U}{Inh} = \frac{-1.635}{20I} = -58,970$$

$$M'_U = \frac{\bar{y}_U - \bar{y}_S}{b} = \frac{283,95 - 290,2}{-58,970} = 0,1060$$

Hoạt lực giả định A_U của chế phẩm U là 1 đơn vị/mg, do đó:

$$M_U = M'_U + \ln(A_U) = 0,1060 + 0 = 0,1060$$

Hoạt lực của chế phẩm U bằng $\text{antiln}(M_U) = \text{antiln}(0,1060) = 1,11$ đơn vị/mg.

$$C = \frac{E}{E - s^2 t^2} = \frac{66.830,6}{66.830,6 - 738,5 \times 2,03^2} = 1,0477$$

$$H = \frac{E}{b^2 dn} = \frac{66.830,6}{(-58,970)^2 \times 2 \times 10} = 0,969091$$

$$(C-1)(CM'_U)^2 + 2H = (1,0477 - 1)(1,0477 \times 0,1060)^2 + 2 \times 0,969091 = 0,09223$$

Logarit các giới hạn tin cậy bằng:

$$\ln(A_U) + CM'_U \pm \sqrt{0,09223} = 0 + 0,1110 \pm 0,3037$$

Các giới hạn tin cậy là 0,82 và 1,51 đơn vị/mg.

Ví dụ 3.2.8.2 Thử nghiệm 3 liều đơn chế phẩm, với thiết kế thí nghiệm ngẫu nhiên theo khối không lặp

Thử nghiệm định lượng kháng sinh bằng phương pháp khuếch tán dùng hộp Petri

Các dung dịch thử của chế phẩm chuẩn s_1, s_2 và s_3 có nồng độ lần lượt là 2, 4 và 8 IU/ml. Chế phẩm thử có hoạt lực giả định là 1.500 IU/ml và cũng được pha thành 3 dung dịch thử u_1, u_2 và u_3 có nồng độ tương đương với nồng độ các dung dịch của chế phẩm chuẩn. Mỗi hộp Petri đều có 3 dung dịch của chế phẩm chuẩn và 3 dung dịch của chế phẩm thử, trong đó mỗi dung dịch thử chỉ xuất hiện một lần duy nhất trong mỗi hộp Petri (không lặp). Trật tự sắp xếp các dung dịch thử trong mỗi hộp được phân bố như trong Bảng 13.10.13.

Các đáp ứng riêng và đáp ứng trung bình của mỗi dung dịch thử cho ở Bảng 13.10.14.

Bảng 13.10.13 - Cách bố trí các dung dịch thử trong các hộp

Hộp số	Số vị trí trong hộp					
	1	2	3	4	5	6
1	u_2	u_3	s_3	s_1	u_1	s_2
2	s_3	u_1	s_2	u_3	s_1	u_2
3	u_3	u_2	s_1	s_3	s_2	u_1
4	s_1	s_2	u_3	u_1	u_2	s_3
5	u_1	s_1	u_2	s_2	s_3	u_3
6	s_2	s_3	u_1	u_2	u_3	s_1

Các đáp ứng riêng và giá trị trung bình đáp ứng của mỗi nồng độ được cho ở Bảng 13.10.14.

Bảng 13.10.14 - Đáp ứng y - đường kính vòng vô khuẩn (mm × 10)

Hộp số	Chế phẩm chuẩn \underline{S}			Chế phẩm thử \underline{U}			Tổng khối
	s_1	s_2	s_3	u_1	u_2	u_3	
1	176	205	235	174	202	232	$R_1 = 1224$
2	178	208	238	175	206	234	$R_2 = 1239$
3	178	207	237	177	203	236	$R_3 = 1238$
4	175	205	235	173	201	232	$R_4 = 1221$
5	176	206	235	174	204	231	$R_5 = 1226$
6	174	204	236	170	202	229	$R_6 = 1215$
Tổng cột	1057	1235	1416	1043	1218	1394	7363
Trung bình	176,2	205,8	236,0	173,8	203,0	232,3	
Phương sai	2,6	2,2	1,6	5,4	3,2	5,9	

Kiểm tra số liệu thu được bằng các phép thử tương tự như ở ví dụ 3.2.8.1 cho thấy thử nghiệm đáp ứng các điều kiện ở mục 3.1.1.

$$K = \frac{(\sum y)^2}{N} = \frac{7.363^2}{36} = 1.505.938,03$$

$$\sum y^2 = 1.527.127$$

Bảng 13.10.15- Các tổng đáp ứng và tương phản tuyến tính (xem công thức tính ở Bảng 13.10.3)

	Chế phẩm chuẩn \underline{S}	Chế phẩm thử \underline{U}	Tổng số
Liều thấp	$S_1 = 1.057$	$U_1 = 1.043$	
Liều trung gian	$S_2 = 1.235$	$U_2 = 1.218$	
Liều cao	$S_3 = 1.416$	$U_3 = 1.394$	
Tổng đáp ứng của chế phẩm	$S = 3.708$	$U = 3.655$	$\sum y = 7.363$
Tương phản tuyến tính	$L_S = 359$	$L_U = 351$	$\sum L = 710$
Tương phản bậc hai	$Q_S = 3$	$Q_U = 1$	$\sum Q = 4$

Các tổng các bình phương được tính bằng các công thức trong Bảng 13.10.5 và 13.10.6 với các số liệu ở Bảng 13.10.15.

$$\text{Chế phẩm} = \frac{S^2 + U^2}{18} - K = 78,026$$

$$\text{Hồi qui tuyến tính} = \frac{(L_S + L_U)^2}{24} = 21.004,167 = E$$

$$\text{Không song song} = \frac{L_S^2 + L_U^2}{12} - E = 2,666$$

$$\text{Độ cong} = \frac{Q_S^2 + Q_U^2}{6n} = \frac{3^2 + 1^2}{36} = 0,278$$

$$\text{Giữa các xử lý} = \frac{S_1^2 + S_2^2 + S_3^2 + U_1^2 + U_2^2 + U_3^2}{6} - K = 21.085,137$$

$$\text{Giữa các khối} = \frac{R_1^2 + R_2^2 + R_3^2 + R_4^2 + R_5^2 + R_6^2}{6} - K = 75,805$$

$$\text{Toàn phần} = \sum y^2 - K = 21.188,97$$

$$\text{Sai số dư} = \text{Toàn phần} - \text{Giữa các xử lý} - \text{Giữa các khối} = 28,03$$

Bảng 13.10.16 - Phân tích phương sai

Nguồn biến thiên	Bậc tự do	Tổng các bình phương	Bình phương trung bình	Tỷ số F	Xác suất
Chế phẩm	1	78,03	78,03		
Hồi qui tuyến tính	1	21.004,17	21.004,17	18.737	< 0,01
Không song song	1	2,67	2,67	2,4	> 0,05
Độ cong	2	0,28	0,16	0,1	> 0,05
Giữa các xử lý	5	21.085,14			
Giữa các khối (hộp Petri)	5	75,80	15,16	13,5	< 0,01
Sai số dư	25	28,03	1,121		
Sai số toàn phần	35	21.188,97			

Kết quả phân tích phương sai cho thấy sự khác nhau có ý nghĩa cao ($P < 0,01$) của kích thước đường kính vòng vô khuẩn giữa các hộp Petri. Nếu thí nghiệm thiết kế theo kiểu ngẫu nhiên hoàn toàn, biến thiên giữa các khối sẽ không được tách ra khỏi sai số toàn phần, do đó bình phương trung bình của sai số dư s^2 sẽ lớn hơn, dẫn đến khoảng tin cậy sẽ rộng hơn. Đây là ưu điểm của thiết kế thí nghiệm ngẫu nhiên theo khối so với thiết kế thí nghiệm kiểu ngẫu nhiên hoàn toàn.

Phép thử tính có giá trị của thử nghiệm

Hồi qui tuyến tính rất có ý nghĩa ($P < 0,01$), các đại lượng không song song và độ cong không có ý nghĩa ($P > 0,05$), do đó thử nghiệm thỏa mãn cách tính hiệu lực.

Định giá hoạt lực và các giới hạn tin cậy

$$\bar{y}_U - \bar{y}_S = \frac{U - S}{3n} = \frac{3655 - 3708}{18} = \frac{-53}{18}$$

Tỷ lệ giữa các nồng độ kế tiếp bằng 2,0, do đó:

$$I = \ln(2) = 0,69315$$

$$b = \frac{L_S + L_U}{2Inh} = \frac{359 + 351}{2 \times I \times 6 \times 2} = \frac{710}{24I} = 42,6797$$

$$M' = \frac{\bar{y}_U - \bar{y}_S}{b} = -0,0690$$

$$M = M' + \ln(A_U) = -0,0690 + \ln(1.500) = 7,2442$$

Hoạt lực của chế phẩm U là $R = \text{antiln}(M) = 1.400$ IU/ml.

Với $P = 0,95$ và $f = 25$, $t = 2,06$ (Bảng 13.10.28), ta có:

$$C = \frac{E}{E - s^2 t^2} = \frac{21.004,17}{21.004,17 - 1,121 \times 2,06^2} = 1,0002$$

$$H = \frac{E}{b^2 dn} = \frac{21.004,17}{(42,6797)^2 \times 3 \times 6} = 0,640605$$

$$(C - 1)(CM'^2 + 2H) = (1,0002 - 1)(1,0002 \times (-0,0690)^2 + 2 \times 0,640605) = 0,00026$$

Các $\ln(\text{giới hạn tin cậy})$ bằng:

$$\ln(A_U) + CM' \pm \sqrt{0,00026} = \ln(1.500) + 1,0002 \times (-0,0690) \pm \sqrt{0,00026} = 7,2442 \pm 0,0160$$

Các giới hạn tin cậy bằng 1.378 và 1.423 IU/ml.

Nếu phân tích bằng máy tính, các kết quả sẽ là:

$$C = 1,000227$$

$$(C - 1)(CM'^2 + 2H) = 0,00029128$$

Khoảng tin cậy: 1.376,3 – 1.424,1 IU/ml.

Ví dụ 3.2.8.3 Thử nghiệm 3 liều đơn chế phẩm thiết kế hình vuông Latin không lặp

Thử nghiệm định lượng kháng sinh bằng phương pháp khuếch tán, dùng khay vuông

Chế phẩm chuẩn có hoạt lực biết trước 4.855 IU/mg. Chế phẩm thử có hoạt lực giả định là 5.600 IU/mg. Pha các dung dịch gốc bằng cách hòa tan 25,2 mg chế phẩm chuẩn và 21,4 mg chế phẩm thử trong lượng vừa đủ dung môi pha loãng để được 25 ml. Sau đó, pha loãng các dung dịch gốc đến nồng độ pha loãng 1/20 và tiếp tục pha loãng xa hơn với tỷ lệ pha loãng 1:1,5 để được các dung dịch thử cuối cùng của chuẩn và mẫu.

Các dung dịch thử của chế phẩm chuẩn và chế phẩm thử được thiết kế trên khay theo bố trí thí nghiệm hình vuông Latin như trong Bảng 13.10.17. Các đường kính vòng vô khuẩn của thử nghiệm được trình bày trong Bảng 13.10.18. Trung bình đường kính vòng vô khuẩn, phương sai (var_i) và $\ln(var_i)$ của mỗi nhóm dung dịch thử trình bày trong Bảng 13.10.19.

Bảng 13.10.17 - Cách bố trí các dung dịch thử trên khay

	1	2	3	4	5	6
1	s_1	u_1	u_2	s_3	s_2	u_3
2	u_1	u_3	s_1	s_2	u_2	s_3
3	u_2	s_3	s_2	s_1	u_3	u_1
4	s_3	s_2	u_3	u_1	s_1	u_2
5	s_2	u_2	s_3	u_3	u_1	s_1
6	u_3	s_1	u_1	u_2	s_3	s_2

Phép thử tính đồng nhất của các phương sai

Đối với một nhóm gồm k phương sai, trong đó mỗi phương sai có $f = (n - 1)$ bậc tự do, công thức tính sẽ như sau:

$$\chi^2 = \frac{3kf^2 \left[k \ln \left(\frac{\sum var_i}{k} \right) - \sum \ln var_i \right]}{3kf + k + 1}$$

Với $k = 6$, bậc tự do $f = 5$, công thức trên sẽ rút gọn thành:

$$\begin{aligned} \chi^2 &= \frac{450}{97} \times \left[6 \ln \left(\frac{\sum var_i}{6} \right) - \sum \ln var_i \right] \\ &= \frac{450}{97} \times \left(6 \ln \frac{209,20}{6} - 20,494 \right) = 3,78 \end{aligned}$$

Giá trị tính được nhỏ hơn giá trị tới hạn 11,07 đọc từ Bảng 13.10.29 với $P = 0,95$ và $f = (k - 1) = 5$. Do đó, sự khác biệt giữa các phương sai của mỗi nhóm dung dịch thử không có ý nghĩa thống kê.

Bảng 13.10.18 - Đáp ứng y - đường kính vòng vô khuẩn ($mm \times 10$)

	1	2	3	4	5	6	Tổng hàng
1	161	160	178	187	171	194	$R_1 = 1.051$
2	151	192	150	172	170	192	$R_2 = 1.027$
3	162	195	174	161	193	151	$R_3 = 1.036$
4	194	184	199	160	163	171	$R_4 = 1.071$
5	176	181	201	202	154	151	$R_5 = 1.065$
6	193	166	161	186	198	182	$R_6 = 1.086$
Tổng cột	$C_1 = 1.037$	$C_2 = 1.078$	$C_3 = 1.063$	$C_4 = 1.068$	$C_5 = 1.049$	$C_6 = 1.041$	

Bảng 13.10.19 - Trung bình đường kính vòng vô khuẩn và phương sai của mỗi nhóm dung dịch thử

STT (hộp petri)	Chế phẩm chuẩn \underline{S}			Chế phẩm thử \underline{U}			Tổng số
	s_1	s_2	s_3	u_1	u_2	u_3	
1	161	171	187	160	178	194	
2	150	172	192	151	170	192	
3	161	174	195	151	162	193	
4	163	184	194	160	171	199	
5	151	176	201	154	181	202	
6	166	182	198	161	186	193	
Tổng cột	952	1059	1167	937	1048	1173	
Trung bình	158,67	176,50	194,50	156,17	174,67	195,50	
Phương sai (var_i)	43,47	28,70	23,50	22,17	75,07	16,30	$\Sigma var_i = 209,20$
ln (var_i)	3,772	3,357	3,157	3,099	4,318	2,791	$\Sigma \ln(var_i) = 20,494$

Bảng 13.10.20 - Các tổng đáp ứng và tương phản tuyến tính (xem công thức tính ở Bảng 13.10.3)

	Chế phẩm chuẩn \underline{S}	Chế phẩm thử \underline{U}	Tổng số
Liều thấp	$S_1 = 952$	$U_1 = 937$	
Liều trung gian	$S_2 = 1.059$	$U_2 = 1.048$	
Liều cao	$S_3 = 1.167$	$U_3 = 1.173$	
Tổng đáp ứng của chế phẩm	$S = 3.178$	$U = 3.158$	$\Sigma y = 6.336$
Tương phản tuyến tính	$L_S = 215$	$L_U = 236$	$\Sigma L = 451$
Tương phản bậc hai	$Q_S = 1$	$Q_U = 14$	$\Sigma Q = 15$

$$K = \frac{(\Sigma y)^2}{N} = \frac{6.336^2}{36} = 1.115.136$$

$$\Sigma y^2 = 1.124.692$$

Các tổng các bình phương được tính bằng các công thức trong Bảng 13.10.5 và 13.10.6 với các số liệu ở Bảng 13.10.18 và Bảng 13.10.20.

$$\text{Chế phẩm} = \frac{S^2 + U^2}{3n} - K = \frac{3.178^2 + 3.158^2}{18} - 1.115.136 = 11,1111$$

$$\text{Hồi qui tuyến tính} = \frac{(L_S + L_U)^2}{2nh} = \frac{451^2}{24} = 8.475,0416 = E$$

$$\text{Không song song} = \frac{L_S^2 + L_U^2}{2n} - E = \frac{215^2 + 236^2}{12} - 8.475,0416 = 18,3750$$

$$\text{Độ cong (không tuyến tính)} = \frac{Q_S^2 + Q_U^2}{6n} = \frac{1^2 + 14^2}{36} = 5,4722$$

$$\text{Giữa các xử lý} = \frac{S_1^2 + S_2^2 + S_3^2 + U_1^2 + U_2^2 + U_3^2}{n} - K = \frac{952^2 + 1.059^2 + \dots + 1.173^2}{6} - 1.115.136 = 8.510$$

$$\text{Giữa các hàng} = \frac{R_1^2 + R_2^2 + R_3^2 + R_4^2 + R_5^2 + R_6^2}{k} - K = \frac{1.051^2 + 1.027^2 + \dots + 1.086^2}{6} - 1.115.136 = 412$$

$$\text{Giữa các cột} = \frac{C_1^2 + C_2^2 + C_3^2 + C_4^2 + C_5^2 + C_6^2}{k} - K = \frac{1.037^2 + 1.078^2 + \dots + 1.041^2}{6} - 1.115.136 = 218,6667$$

$$\text{Toàn phần} = \Sigma y^2 - K = 1.124.692 - 1.115.136 = 9.556$$

$$\text{Sai số dư} = \text{Toàn phần} - \text{Giữa các xử lý} - \text{Giữa các hàng} - \text{Giữa các cột} = 415,3333$$

Bảng 13.10.21 - Phân tích phương sai

Nguồn biến thiên	Bậc tự do	Tổng các bình phương	Bình phương trung bình	Tỷ số F	Xác suất
Chế phẩm	1	11,1111	11,1111		
Hồi qui tuyến tính	1	8.475,0416	8.475,0416	408,1	< 0,01
Không song song	1	18,3750	18,3750	0,885	> 0,05
Độ cong	2	5,4722	2,7361	0,132	> 0,05
Giữa các xử lý	5	8510			
Giữa các hàng	5	412	82,40	3,968	< 0,05
Giữa các cột	5	218,6667	43,73	2,106	> 0,05
Sai số dư	20	415,3333	20,7667		
Sai số toàn phần	35	9.556			

Phân tích phương sai cho thấy sự khác nhau có ý nghĩa ($P < 0,05$) giữa các hàng chứng tỏ thiết kế thí nghiệm hình vuông Latin cho độ chính xác cao hơn thiết kế thí nghiệm ngẫu nhiên hoàn toàn.

Phép thử tính có giá trị của thử nghiệm

Hồi qui tuyến tính rất có ý nghĩa ($P < 0,01$), tính không tuyến tính và tính không song song của các đường ln(liều) - đáp ứng không có ý nghĩa ($P > 0,05$), do đó thử nghiệm thỏa mãn các phép thử tính có giá trị.

Định giá hoạt lực và các giới hạn tin cậy

Tỷ lệ giữa các nồng độ kế tiếp nhau bằng 1,5, do đó $I = \ln(1,5) = 0,405465$. Với $P = 0,95$ và $f = 20$, $t = 2,09$ (Bảng 13.10.28).

$$\bar{y}_s = \frac{S}{N_s} = \frac{3.178}{18} = 176,556$$

$$\bar{y}_v = \frac{U}{N_v} = \frac{3.158}{18} = 175,444$$

$$b = \frac{L_s + L_v}{2Inh} = \frac{451}{24I} = 46,346$$

$$M' = \frac{\bar{y}_v - \bar{y}_s}{b} = \frac{175,444 - 176,556}{46,346} = -0,023974$$

$$M = M' + \ln(A_v) = -0,023974 + \ln(5.600) = 8,606548$$

Hoạt lực của chế phẩm \underline{U} là $R = \text{antiln}(M) = 5.467,3$ IU/mg.

$$C = \frac{E}{E - s^2t^2} = \frac{8.475,0416}{8.475,0416 - 20,7667 \times 2,09^2} = 1,0108$$

$$H = \frac{E}{b^2dn} = \frac{8.475,0416}{46,346^2 \times 3 \times 6} = 0,2192$$

Các ln(giới hạn tin cậy) được tính theo công thức:

$$\begin{aligned} \ln(A_v) + CM' \pm \sqrt{(C-1)(CM'^2 + 2H)} &= \\ &= \ln(5.600) + 1,0108 \times (-0,023974) \pm \sqrt{0,0108 \times [1,0108 \times (-0,023974)^2 + 2 \times 0,2192]} \\ &= 8,60629 \pm 0,06878 \end{aligned}$$

Các giới hạn tin cậy bằng 5.102,6 và 5.855,1 IU/mg ở $P = 0,05$

Vì các dung dịch gốc của chế phẩm chuẩn và chế phẩm thử có hoạt lực không hoàn toàn bằng nhau dựa trên hoạt lực giả định, cần hiệu chỉnh hoạt lực tính được và các giới hạn tin cậy bằng cách nhân với một hệ số hiệu chỉnh:

$$\frac{4.855 \times 25,2 / 25}{5.600 \times 21,4 / 25} = 1,02091$$

Sau khi hiệu chỉnh, hoạt lực tính được sẽ bằng 5.582 IU/mg với giới hạn tin cậy từ 5.209 IU/mg đến 5.977 IU/mg ở xác suất 95 %.

Ví dụ 3.2.8.4 Thiết kế chéo đôi

Thử nghiệm định lượng insulin bằng phương pháp tiêm dưới da thỏ

Các dung dịch của chế phẩm chuẩn có nồng độ 1 và 2 IU/ml. Hoạt lực giả định của chế phẩm thử là 40 IU/ml và được pha loãng thành các dung dịch có nồng độ tương đương với các dung dịch của chế phẩm chuẩn. Tiêm dưới da các thỏ thí nghiệm với liều 0,5 ml mỗi dung dịch thử theo thiết kế ở Bảng 13.10.22. Các kết quả thí nghiệm trình bày trong Bảng 13.10.23. Phương sai lớn cho thấy biến thiên lớn giữa các thỏ thí nghiệm và cần thiết phải dùng thiết kế thí nghiệm chéo.

Bảng 13.10.22 - Cách sắp xếp các xử lý

Ngày thí nghiệm	Nhóm thử			
	1	2	3	4
Ngày I	s_1	s_2	u_1	u_2
Ngày II	u_2	u_1	s_2	s_1

Phép thử tính đồng nhất của các phương sai bằng phép kiểm Hartley

Tính tỷ số F theo công thức:

$$F = \frac{\text{var}_{\max.}}{\text{var}_{\min.}} = \frac{1.215,1}{230,6} = 5,3$$

Trong đó $\text{var}_{\max.}$ là phương sai lớn nhất và $\text{var}_{\min.}$ là phương sai nhỏ nhất trong k phương sai cần kiểm tra. F tính được ($F_{\text{cal}} = 5,3$) nhỏ hơn F tới hạn ($F_{\text{crit}} = 12,7$) đọc từ Bảng 13.10.30 với $P = 0,95$, $k = 8$ và bậc tự do $f = 7$. Do đó, sự khác nhau giữa các phương sai của mỗi nhóm dung dịch thử không có ý nghĩa thống kê. Nếu dùng phép kiểm Bartlett với cùng số liệu, giá trị tính được sẽ là 6,4 so với giá trị tới hạn bằng 14,1.

Trong các thử nghiệm dùng thiết kế chéo, các tổng đáp ứng và tương phản tuyến tính được tính riêng rẽ cho mỗi giai đoạn thí nghiệm. Kết quả thu được trình bày trong Bảng 13.10.24.

Bảng 13.10.23 - Đáp ứng y: glucose huyết (mg/100 ml) ở 1 và 2½ h

	Nhóm 1			Nhóm 2			Nhóm 3			Nhóm 4		
	s_1	u_2	Tổng số	s_2	u_1	Tổng số	u_1	s_2	Tổng số	u_2	s_1	Tổng số
	112	104	216	65	72	137	105	91	196	118	144	262
	126	112	238	116	160	276	83	67	150	119	149	268
	62	58	120	73	72	145	125	67	192	42	51	93
	86	63	149	47	93	140	56	45	101	64	107	171
	52	53	105	88	113	201	92	84	176	93	117	210
	110	113	223	63	71	134	101	56	157	73	128	201
	116	91	207	50	65	115	66	55	121	39	87	126
	101	68	169	55	100	155	91	68	159	31	71	102
Tổng cột	765	662		557	746		719	533		579	854	5415
Trung bình	95,6	82,8		69,6	93,3		89,9	66,6		72,4	106,8	
Phương sai	709,7	627,9		525,1	1.012,5		479,6	230,6		1.214,3	1.215,1	

Bảng 13.10.24 - Các tổng đáp ứng và tương phản tuyến tính

	Chế phẩm chuẩn \underline{S}	Chế phẩm thử \underline{U}	Tổng số
Ngày I			
Nồng độ thấp	$S_{1I} = 765$	$U_{1I} = 719$	
Nồng độ cao	$S_{2I} = 557$	$U_{2I} = 579$	
Tổng số	$S_I = 1.322$	$U_I = 1.298$	$D_I = 2.620$
Ngày II			
Nồng độ thấp	$S_{1II} = 854$	$U_{1II} = 746$	
Nồng độ cao	$S_{2II} = 533$	$U_{2II} = 662$	
Tổng số	$S_{II} = 1.387$	$U_{II} = 1.408$	$D_{II} = 2.795$
Tổng chế phẩm	$S = 2.709$	$U = 2.706$	$\sum y = 5.415$
Tương phản tuyến tính			
Ngày I	$L_{SI} = -208$	$L_{UI} = -140$	$L_I = -348$
Ngày II	$L_{SII} = -321$	$L_{UII} = -84$	$L_{II} = -405$
Tổng số	$L_S = -529$	$L_U = -224$	$\sum L = -753$

Phân tích phương sai trong các thử nghiệm thiết kế chéo phức tạp hơn các kiểu thiết kế thí nghiệm khác vì biến thiên do cấu phần tổng các bình phương, gây bởi tính song song không độc lập với biến thiên do cấu phần gây bởi sự khác nhau của thỏ. Tính song song của các đường hồi qui sẽ được kiểm tra bằng đại lượng bình phương trung bình của sai số dư thử hai, được tính bằng cách lấy tổng các bình phương của cấu phần do sự khác nhau về thỏ (khối) trừ đi cấu phần không song song và hai cấu phần tương tác.

Ba cấu phần tương tác được đưa thêm vào phân tích phương sai là do sự lặp lại trong mỗi nhóm thỏ thí nghiệm, gồm: Giữa các ngày \times chế phẩm; Giữa các ngày \times hồi qui; Giữa các ngày \times tính song song.

Ba đại lượng này biểu thị khuynh hướng của 3 cấu phần (chế phẩm, hồi qui và song song) thay đổi từ ngày thí nghiệm này sang ngày thí nghiệm khác. Tính có giá trị của thử nghiệm phụ thuộc vào các tỷ số F tương ứng của ba đại lượng nói trên. Nếu F tính được rất có ý nghĩa, $F_{cal.} > F_{crit.}$ ở $P = 0,01$, cần phải rất thận trọng khi suy diễn các kết quả của thử nghiệm, và nếu có thể, phải lặp lại thử nghiệm.

$$K = \frac{(\sum y)^2}{N} = \frac{5.415^2}{64} = 458.159,77$$

$$\sum y^2 = 511.583$$

Tính giá trị của tổng các bình phương của chế phẩm, hồi qui và không song song theo công thức trong Bảng 13.10.5 với số liệu trong Bảng 13.10.24.

Chú ý trong thử nghiệm này $n = 16$, là tổng số đáp ứng của mỗi xử lý qua hai ngày thí nghiệm.

$$\text{Chế phẩm} = \frac{S^2 + U^2}{2n} - K = \frac{2.709^2 + 2.706^2}{32} - 458.159,77 = 0,14$$

$$\text{Hồi qui tuyến tính} = \frac{(L_S + L_U)^2}{2nh} = \frac{(-753)^2}{64} = 8.859,52 = E$$

$$\text{Không song song} = \frac{L_S^2 + L_U^2}{2n} - E = \frac{(-529)^2 + (-224)^2}{32} - 8.859,52 = 1.453,51$$

$$\text{Giữa các khối (thỏ)} = \frac{\sum B_i^2}{2} - K = \frac{216^2 + 238^2 + \dots + 102^2}{2} - 458.159,77 = 39.794,73$$

Trong đó B_i là các tổng đáp ứng của mỗi thỏ thí nghiệm trong Bảng 13.10.23.

$$\text{Giữa các ngày} = \frac{D_I^2 + D_{II}^2}{2n} - K = \frac{2.620^2 + 2.795^2}{32} - 458.159,77 = 478,51$$

Trong đó D_I và D_{II} là tổng đáp ứng của mỗi ngày thí nghiệm.

$$\text{Giữa các ngày} \times \text{Chế phẩm} = \frac{(S_I - S_{II} - U_I + U_{II})^2}{N} = \frac{[1.322 - 1.387 - 1.298 + 1.408]^2}{64} = 31,64$$

Trong đó S_I, S_{II}, U_I và U_{II} là tổng đáp ứng của từng chế phẩm trong mỗi ngày.

$$\text{Giữa các ngày} \times \text{hồi qui} = \frac{(L_{SII} - L_{SI} + L_{UII} - L_{UI})^2}{N} = \frac{[(-321) - (-208) + (-84) - (-140)]^2}{64} = 50,77$$

$$\text{Giữa các ngày} \times \text{Không song song} = \frac{(L_{SII} - L_{SI} - L_{UII} + L_{UI})^2}{N} = \frac{[(-321) - (-208) - (-84) + (-140)]^2}{64} = 446,27$$

Trong đó L_{SI}, L_{SII}, L_{UI} và L_{UII} là tương phản tuyến tính của mỗi ngày thí nghiệm.

$$\text{Toàn phần} = \sum y^2 - K = 511.583 - 458.159,77 = 53.423,23$$

$$\text{Sai số dư giữa các thờ} = \text{Giữa các khối} - \text{Không song song} - (\text{Giữa các ngày} \times \text{chế phẩm}) - (\text{Giữa các ngày} \times \text{hồi qui}) = 39.794,73 - 1.453,51 - 31,64 - 50,76 = 38.258,81$$

$$\text{Sai số dư trong mỗi thờ} = \text{Toàn phần} - \text{Giữa các khối} - \text{Giữa các ngày} - \text{Chế phẩm} - \text{Hồi qui} - (\text{Giữa các ngày} \times \text{không song song}) = 53.423,23 - 39.794,73 - 478,51 - 0,14 - 8.859,52 - 446,27 = 3.844,06$$

Phép thử tính có giá trị của thử nghiệm

Phân tích phương sai cho thấy thử nghiệm thỏa mãn phép thử tính có giá trị:

- 1) Hồi qui tuyến tính rất có ý nghĩa: tỷ số F của đại lượng hồi qui được tính dựa trên bình phương trung bình của sai số dư trong mỗi thờ, $F_{cal.} = 64,5 > F_{crit.} = 7,63$ với $P = 0,01, f_1 = 1$ và $f_2 = 28$.
- 2) Tính không song song của đường hồi qui: phép thử tính không song song trong thiết kế chéo dựa trên bình phương trung bình của sai số dư giữa các thờ, $F_{cal.} = 1,06 < F_{(P=0,05, f_1=1, f_2=28)} = 4,19$, chứng tỏ các đường ln(liều) – đáp ứng của chuẩn và mẫu song song với nhau.
- 3) Ba cấu phần tương tác đều không có ý nghĩa, các tỷ số F tính được lần lượt là 0,02, 0,04 và 3,25 và đều nhỏ hơn $F_{crit.} = 4,19$.

Bảng 13.10.25 - Phân tích phương sai

Nguồn biến thiên	Bậc tự do	Tổng các bình phương	Bình phương trung bình	Tỷ số F	Xác suất
Không song song	1	1.453,5	1.453,5	1,06	> 0,05
Giữa các ngày × chế phẩm	1	31,6	31,6	0,02	> 0,05
Giữa các ngày × hồi qui	1	50,8	50,8	0,04	> 0,05
Sai số dư giữa các thờ	28	38.258,8	1.366,4		
Giữa các khối (thờ)	31	39.794,7	1.283,7		
Chế phẩm	1	0,1	0,1	0,00	> 0,05
Hồi qui	1	8.859,5	8.859,5	64,5	< 0,01
Giữa các ngày	1	478,5	478,5	3,48	> 0,05
Giữa các ngày × không song song	1	446,3	446,3	3,25	> 0,05
Sai số dư trong mỗi thờ	28	3.844,1	137,3		
Toàn phần	63	53.423,2	847,9878472		

Định giá hoạt lực và các giới hạn tin cậy

Tỷ lệ pha loãng bằng 2, do đó $I = \ln(2) = 0,69315$. Với $P = 0,95$ và $f = 28, t = 2,05$ (Bảng 13.10.28).

$$\bar{y}_U - \bar{y}_S = \frac{U - S}{2n} = \frac{2.706 - 2.709}{32} = \frac{-3}{32}$$

$$b = \frac{L_S + L_U}{2nI} = \frac{-753}{32I} = -33,948$$

$$M' = \frac{\bar{y}_U - \bar{y}_S}{b} = \frac{-3}{32 \times (-33,948)} = 0,00276$$

$$M = M' + \ln(A_v) = 0,00276 + \ln(40) = 3,6916$$

Hoạt lực $R = \text{antiln}(M) = \text{antiln}(0,00276) = 40,1 \text{ IU/ml}$.

$$C = \frac{E}{E - s^2 t^2} = \frac{8.859,5}{8.859,5 - 137,3 \times 2,05^2} = 1,0697$$

$$H = \frac{E}{b^2 dn} = \frac{8.859,5}{(-33,948)^2 \times 2 \times 16} = 0,24023$$

$$(C-1)(CM'^2 + 2H) = 0,0697(1,0697 \times 0,00276^2 + 2 \times 0,24023) = 0,033488$$

Logarit các giới hạn tin cậy bằng:

$$\ln(A_v) + CM' \pm \sqrt{0,033488} = 3,6918 \pm 0,1830$$

Khoảng tin cậy của hoạt lực từ 33,4 đến 48,2 IU/ml.

4. Phối hợp các kết quả thử nghiệm

4.1 Mơ đầu

Để đáp ứng các yêu cầu của Dược điển, ví dụ yêu cầu về độ chính xác, có thể phải lặp lại hai hay nhiều thử nghiệm độc lập và phối hợp các kết quả thử nghiệm để được kết quả cuối cùng chính xác và đáng tin cậy hơn.

Hai thử nghiệm được coi là độc lập với nhau nếu quá trình thực hiện của mỗi thử nghiệm không gây bất cứ ảnh hưởng nào đến kết quả của thử nghiệm khác. Điều đó có nghĩa là các sai số ngẫu nhiên của các yếu tố chủ yếu ảnh hưởng đến kết quả thử nghiệm (ví dụ: sự pha loãng chế phẩm chuẩn và chế phẩm thử, độ nhạy của chỉ thị sinh học) của một thử nghiệm phải độc lập với các sai số ngẫu nhiên tương ứng của thử nghiệm kia. Các thử nghiệm thực hiện vào những ngày kế tiếp nhau dùng cùng dung dịch gốc của chế phẩm chuẩn không phải là những thử nghiệm độc lập.

Có nhiều phương pháp phối hợp kết quả của các thử nghiệm độc lập, tuy nhiên, dưới đây chỉ trình bày ba phương pháp gần đúng do tính đơn giản và dễ áp dụng của chúng.

Trước khi phối hợp, các hoạt lực phải được hiệu chỉnh với hoạt lực giả định của mỗi chế phẩm thử (xem Ví dụ 3.2.8.3) và phải được biểu diễn dưới dạng logarit.

4.2 Phối hợp cân chỉnh (weighted combination) các kết quả thử nghiệm

Phương pháp này có thể áp dụng nếu thỏa mãn các điều kiện sau:

- 1) Các thử nghiệm phải độc lập với nhau;
- 2) Đại lượng C của mỗi thử nghiệm phải nhỏ hơn 1,1 (xem công thức 3.2.5-6 để biết công thức tính và ý nghĩa của C);
- 3) Bậc tự do của sai số dư của mỗi thử nghiệm không được nhỏ hơn 6, tốt nhất là lớn hơn 15;
- 4) Sự khác nhau giữa các định giá hoạt lực riêng phải không có ý nghĩa thống kê (xem mục 4.2.2).

Nếu các điều kiện trên không thỏa mãn, phương pháp này không được áp dụng. Khi đó dùng phương pháp giới thiệu ở mục 4.3 để tính hoạt lực trung bình và lấy kết quả tính được làm hoạt lực giả định cho lần thử nghiệm kế tiếp.

4.2.1 Tính các hệ số cân chỉnh W

Giả sử các kết quả đo của mỗi n' thử nghiệm đã được phân tích để được n' giá trị logarit hoạt lực M và các giới hạn tin cậy tương ứng. Đối với mỗi thử nghiệm, tính theo logarit khoảng tin cậy L bằng cách lấy giới hạn tin cậy trên trừ đi giới hạn tin cậy dưới. Tính hệ số cân chỉnh W cho mỗi giá trị của M theo phương trình 4.2.1.-1, với t có cùng giá trị như khi tính các giới hạn tin cậy.

$$W = \frac{4t^2}{L^2} \quad (4.2.1.-1)$$

4.2.2 Tính đồng nhất của các hoạt lực

Để kiểm tra tính đồng nhất của một dãy các logarit hoạt lực, thành lập biểu thức có phân phối xấp xỉ phân phối χ^2 như sau:

$$\chi^2 = \sum_{n'} W(M - \bar{M})^2 = \sum_{n'} (WM^2) - \frac{\left[\sum_{n'} (WM) \right]^2}{\sum_{n'} W} \quad (4.2.2.-1)$$

với:

$$\bar{M} = \frac{\sum WM}{\sum W}$$

Nếu χ^2 tính được nhỏ hơn giá trị tương ứng với bậc tự do $f = (n' - 1)$ tra từ Bảng 13.10.29, sự khác nhau giữa các hoạt lực không có ý nghĩa thống kê và, do đó, có thể tiếp tục tính hoạt lực trung bình và các giới hạn tin cậy theo các công thức ở mục 4.2.3.

Nếu χ^2 tính được lớn hơn giá trị tới hạn tương ứng đọc từ Bảng 13.10.29, các hoạt lực tính được không đồng nhất và không thể sử dụng các công thức ở mục 4.2.3, thay vào đó, có thể dùng các công thức ở mục 4.2.4.

4.2.3 Tính hoạt lực trung bình có cân chỉnh (weighted mean) và các giới hạn tin cậy

Logarit hoạt lực trung bình có cân chỉnh được tính theo công thức:

$$\bar{M} = \frac{\sum WM}{\sum W} \quad (4.2.3.-1)$$

Độ lệch chuẩn của logarit hoạt lực trung bình là căn bậc hai của nghịch đảo của tổng các hệ số cân chỉnh W :

$$s_{\bar{M}} = \sqrt{\frac{1}{\sum W}} \quad (4.2.3.-2)$$

và các logarit giới hạn tin cậy của hoạt lực trung bình được tính theo phương trình sau:

$$\bar{M} \pm ts_{\bar{M}} \quad (4.2.3.-3)$$

Trong đó t là giá trị tới hạn đọc được từ Bảng 13.10.29 với bậc tự do bằng tổng số bậc tự do của các sai số dư của mỗi thử nghiệm riêng.

4.2.4 Hoạt lực trung bình có cân chỉnh và các giới hạn tin cậy dựa trên biến thiên trong mỗi thử nghiệm và giữa các thử nghiệm

Khi phối hợp các kết quả của một số thử nghiệm lặp lại, giá trị χ^2 có thể có ý nghĩa. Biến thiên của các hoạt lực có thể phân tích thành hai cấu phần, gồm:

1) Biến thiên trong mỗi thử nghiệm $s_M^2 = 1/W$

2) Biến thiên giữa các thử nghiệm $s_{\bar{M}}^2 = \frac{\sum (M - \bar{M})^2}{n'(n' - 1)}$

với \bar{M} là trung bình chưa cân chỉnh (trung bình số học) của các M . Biến thiên đầu thay đổi từ thử nghiệm này đến thử nghiệm khác, trong khi biến thiên sau là chung cho tất cả các M .

Đối với mỗi M , tính hệ số cân chỉnh theo công thức:

$$W' = \frac{1}{s_M^2 + s_{\bar{M}}^2}$$

Dùng W' thay thế cho W trong các công thức ở mục 4.2.3, với $t = 2$.

4.3 Phối hợp phi cân chỉnh (unweighted combination) các kết quả thử nghiệm

Cách phối hợp các kết quả thử nghiệm đơn giản nhất là tính trung bình số học của n' logarit hoạt lực M và sau đó tính độ lệch chuẩn của nó theo công thức:

$$s_{\bar{M}}^2 = \frac{\sum (M - \bar{M})^2}{n'(n' - 1)} \quad (4.3.-1)$$

Các logarit giới hạn tin cậy bằng:

$$\bar{M} \pm ts_{\bar{M}} \quad (4.3.-2)$$

Trong đó t có $(n' - 1)$ bậc tự do. Vì số các thử nghiệm cần phối hợp thường nhỏ nên giá trị của t khá lớn.

4.4 Ví dụ

Bảng 13.10.26 liệt kê các hoạt lực cùng các giới hạn tin cậy của 6 thử nghiệm độc lập của cùng một chế phẩm và bậc tự do của sai số dư tương ứng. Tất cả các thử nghiệm đều đáp ứng điều kiện 1, 2 và 3 trong mục 4.2. Các hệ số cân chỉnh W được tính theo công thức 4.2.1.-1 ở mục 4.2.

Phép thử tính đồng nhất của các hoạt lực

$$\chi^2 = \sum_{n'} W(M - \bar{M})^2 = \sum_{n'} (WM^2) - \frac{\left[\sum_{n'} (WM) \right]^2}{\sum_{n'} W} = 2.123.323,8792 - \frac{216.478,4988^2}{22.070,6028} = 4,42$$

χ^2 tính được 4,42 nhỏ hơn giá trị tới hạn 11,07 đọc từ Bảng 13.10.29 với bậc tự do $f = 5$. Do đó, sự khác nhau giữa các hoạt lực không có ý nghĩa thống kê, và do đó đạt tất cả các điều kiện.

Bảng 13.10.26 - Hoạt lực và các giới hạn tin cậy của sáu thử nghiệm độc lập

Lần thử nghiệm	Hoạt lực R (IU/lq)	Các giới hạn tin cậy (IU/lq)		Bậc tự do DF
		Giới hạn dưới	Giới hạn trên	
1	18.367	17.755	19.002	20
2	18.003	17.415	18.610	20
3	18.064	17.319	18.838	20
4	17.832	17.253	18.429	20
5	18.635	17.959	19.339	20
6	18.269	17.722	18.834	20
Tổng số				120

Bảng 13.10.27

Với $f = 20$, $P = 0,05$, Bảng 13.10.28 cho $t = 2,09$. Tính $W = 4t^2/L^2$ theo công thức 4.2.1.-1

	$M = \ln(R)$	L^*	W	WM	WM^2
	9,8183	0,0679	3.777,8301	37.091,9101	364.179,9033
	9,7983	0,0664	3.951,6825	38.719,7456	379.387,4392
	9,8017	0,0841	2.462,5579	24.137,1950	236.584,9721
	9,7887	0,0659	4.003,1116	39.185,4586	383.576,6531
	9,8328	0,0740	3.175,7400	31.226,4061	307.042,9060
	9,8130	0,0609	4.699,6807	46.117,7833	452.552,0054
Tổng số	58,8528		22.070,6028	216.478,4988	2.123.323,8792

* $L = \ln(\text{giới hạn tin cậy trên}) - \ln(\text{giới hạn tin cậy dưới})$

Hoạt lực trung bình và các giới hạn tin cậy:

Hoạt lực trung bình và các giới hạn tin cậy của nó được tính bằng các công thức ở mục 4.2.3 và các số liệu trong Bảng 13.10.26 và 13.10.27.

$$\bar{M} = \frac{\sum WM}{\sum W} = \frac{216.478,4988}{22.070,6028} = 9,8085$$

$$s_{\bar{M}} = \frac{1}{\sqrt{\sum W}} = \frac{1}{\sqrt{22.070,6028}} = 0,00673$$

Với số bậc tự do $f = 120$, $P = 0,95$, $t = 1,98$.

$$\bar{M} \pm ts_{\bar{M}} = 9,8085 \pm 1,98 \times 0,00673 = 9,7951 \text{ và } 9,8218$$

Bằng cách lấy antilogarit các giá trị tính được, hoạt lực trung bình bằng 18.187 IU/lq với khoảng tin cậy ở xác suất 95 % từ 17.946 đến 18.431 IU/lq.

5. Các Bảng tra cứu

Bảng 13.10.28 - Bảng giá trị tới hạn của phân phối t

<i>f</i>	P		<i>f</i>	P	
	0,05	0,01		0,05	0,01
1	12,71	63,66	18	2,10	2,88
2	4,30	9,92	19	2,09	2,86
3	3,18	5,84	20	2,09	2,85
4	2,78	4,60	21	2,08	2,83
5	2,57	4,03	22	2,07	2,82
6	2,45	3,71	23	2,07	2,81
7	2,36	3,50	24	2,06	2,80
8	2,31	3,36	25	2,06	2,79
9	2,26	3,25	26	2,06	2,78
10	2,23	3,17	27	2,05	2,77
11	2,20	3,11	28-29	2,05	2,76
12	2,18	3,05	30	2,04	2,75
13	2,16	3,01	40-43	2,02	2,70
14	2,14	2,98	57-63	2,00	2,66
15	2,13	2,95	102-126	1,98	2,26
16	2,12	2,92	600-∞	1,96	2,58
17	2,11	2,90			

Nếu giá trị quan sát lớn hơn giá trị trong bảng, nó được coi là có ý nghĩa ($P = 0,05$) hay rất có ý nghĩa ($P = 0,01$).

Bảng 13.10.29 - Bảng giá trị tới hạn của χ^2

<i>f</i>	P		<i>f</i>	P	
	0,05	0,01		0,05	0,01
1	3,84	6,63	11	19,68	24,73
2	5,99	9,21	12	21,03	26,22
3	7,81	11,34	13	22,36	27,69
4	9,49	13,28	14	23,68	29,14
5	11,07	15,09	15	25,00	30,58
6	12,59	16,81	16	26,30	32,00
7	14,07	18,48	20	31,41	37,57
8	15,51	20,09	25	37,65	44,31
9	16,92	21,67	30	43,77	50,89
10	18,31	23,21	40	55,76	63,69

Nếu giá trị quan sát lớn hơn giá trị trong bảng, nó được coi là có ý nghĩa ($P = 0,05$) hay rất có ý nghĩa ($P = 0,01$).

Bảng 13.10.30 - Giá trị tới hạn của tỷ số $F = \text{var}_{\max}/\text{var}_{\min}$

k là số phương sai trong nhóm xử lý, mỗi phương sai có f bậc tự do (Hartley's test).

k	4	6	8	9	10	12
f						
4	20,6 49	29,5 69	37,5 89	41,1 97	44,6 106	51,4 120
5	13,7 28	18,7 38	22,9 46	24,7 50	26,5 54	29,9 60
6	10,4 19,1	13,7 25	16,3 30	17,5 32	18,6 34	20,7 37
7	8,44 14,5	10,8 18,4	12,7 22	13,5 23	14,3 24	15,8 27
8	7,18 11,7	9,03 14,5	10,5 16,9	11,1 17,9	11,7 18,9	12,7 21
9	6,31 9,9	7,80 12,1	8,95 13,9	9,45 14,7	9,91 15,3	10,7 16,6
10	5,67 8,6	6,92 10,4	7,87 11,8	8,28 12,4	8,66 12,9	9,34 13,9

Nếu F tính được lớn hơn giá trị trong bảng, biến số cần kiểm tra được coi là có ý nghĩa (dòng trên, $P = 0,05$), hay rất có ý nghĩa (dòng dưới, $P = 0,01$).

6. Bảng chú giải các ký hiệu

Ký hiệu	Định nghĩa
b	Độ dốc hồi qui tuyến tính của đường thẳng liều - đáp ứng hay ln(liều) - đáp ứng của tất cả các chế phẩm trong một thử nghiệm
d	Số mức liều của mỗi chế phẩm trong một thử nghiệm đối xứng
e	Cơ số của logarit tự nhiên. $e = 2,718281828\dots$
f	Số bậc tự do
h	Số chế phẩm trong một thử nghiệm, kể cả chế phẩm chuẩn
k	Số xử lý trong một thử nghiệm, $k = dh$
n	Số thí nghiệm lặp lại hoặc số đơn vị thí nghiệm của mỗi xử lý
n'	Số các định giá hoạt lực riêng
s^2	Trị định giá của phương sai được tính từ bình phương trung bình của sai số dư. s^2/n là phương sai của logarit hoạt lực M
s	Trị định giá của Độ lệch chuẩn, $(= \sqrt{s^2})$
s_1, s_2, s_3	Nồng độ liều thấp, trung gian và cao của chế phẩm chuẩn S . Trong một thử nghiệm chỉ có 2 nồng độ của mỗi chế phẩm, s_2 đại diện cho nồng độ cao
t	Thống kê t của Student (Bảng 13.10.28)
t'	Thống kê t' của Dunnett (Bảng 13.10.8)
$u_1 \dots z_3$	Nồng độ (liều) của các chế phẩm thử $U \dots Z$
y	Đáp ứng riêng hay đáp ứng riêng đã được chuyển đổi
y'	Đáp ứng tính được dùng để thay thế cho giá trị bị mất
$\bar{y}_S \dots \bar{y}_Z$	Đáp ứng trung bình của chế phẩm chuẩn và các chế phẩm thử

Ký hiệu	Định nghĩa
$A_1 \dots A_Z$	Hoạt lực giả định của các chế phẩm thử $\underline{U} \dots \underline{Z}$, là hoạt lực được dùng để tính lượng chế phẩm cần lấy khi pha các dung dịch thử
$B_1 \dots B_{2n}$	Tổng đáp ứng của mỗi đơn vị thí nghiệm (1 đến $2n$) trong thiết kế chéo đôi
B'	Tổng đáp ứng của khối hay hàng có chứa giá trị bị mất
C	Đại lượng biểu thị ý nghĩa của hồi qui, dùng trong tính toán các giới hạn tin cậy (phương trình 3.2.5-5). Trong một số tài liệu thống kê kết quả thử nghiệm sinh học, ý nghĩa của hồi qui được biểu thị theo g: $C = \frac{1}{1 - g}$
$C_1 \dots C_n$	Tổng đáp ứng của mỗi cột (1 đến n) trong thiết kế hình vuông Latin
C'	Tổng đáp ứng của cột không kể một giá trị bị mất trong thiết kế hình vuông Latin
D	Liều
D_I, D_{II}	Tổng đáp ứng của giai đoạn I và giai đoạn II trong thiết kế chéo đôi
E	Tổng các bình phương của đại lượng hồi qui (Bảng 13.10.5)
F	Tỷ số của hai trị định giá độc lập của phương sai theo phân phối F (Bảng 13.10.7)
G'	Tổng đáp ứng trong một thử nghiệm không kể giá trị bị mất
I	Khoảng cách giữa các ln(liều) kế tiếp nhau, $I = \ln(s_2/s_1) = \ln(s_2) - \ln(s_1)$
K	Đại lượng được dùng để tính tổng các bình phương trong phân tích phương sai $K = \frac{(\sum y)^2}{N}$
L	Độ rộng của logarit giới hạn tin cậy, $L = \ln(\text{giới hạn tin cậy trên}) - \ln(\text{giới hạn tin cậy dưới})$
$L_S \dots L_Z$	Tương phản tuyến tính của chế phẩm chuẩn và các chế phẩm thử (Bảng 13.10.2, 13.10.3 và 13.10.4)
M	Trị định giá của logarit hoạt lực, trong thử nghiệm đa chế phẩm, M được dùng kèm với một ký tự ($U \dots Z$) ghi ở dưới, ví dụ M_U , để chỉ rõ một chế phẩm riêng ($M = \ln R$).
\bar{M}	Trung bình của một vài trị định giá độc lập của M
M'	Logarit tỷ lệ hoạt lực hay trị định giá của logarit hoạt lực trước khi hiệu chỉnh với hoạt lực giả định ($M' = \ln R'$)
N	Tổng số đáp ứng trong một thử nghiệm
N_S, N_U	Tổng số đáp ứng của chế phẩm \underline{S} và \underline{U}
P	Xác suất
$Q_S \dots Q_Z$	Tương phản bậc hai của chế phẩm chuẩn và các chế phẩm thử
R	Hoạt lực định giá được dùng với một ký tự ($U \dots Z$) ghi ở dưới, ví dụ R_U để chỉ rõ một chế phẩm thử riêng trong một thử nghiệm đa chế phẩm ($R = \text{antiln}M$)
R'	Định giá hoạt lực hoặc tỷ số hoạt lực trước khi hiệu chỉnh bởi hoạt lực giả định ($R' = \text{antiln}M'$).
$R_1 \dots R_n$	Tổng đáp ứng của mỗi hàng (1 đến n) trong thiết kế hình vuông Latin, hay mỗi khối trong thiết kế ngẫu nhiên theo khối.
\underline{S}	Chế phẩm chuẩn
S	Tổng đáp ứng của chế phẩm chuẩn
S_1, S_2, S_3	Tổng đáp ứng của liều (nồng độ) thấp, trung gian và cao của chế phẩm chuẩn \underline{S} . Trong một thử nghiệm chỉ có 2 mức liều, S_2 là tổng đáp ứng của liều cao
T'	Tổng đáp ứng trong một xử lý không kể giá trị bị mất
$U \dots Z$	Tổng đáp ứng của các chế phẩm thử $\underline{U} \dots \underline{Z}$
$\underline{U} \dots \underline{Z}$	Các chế phẩm cần thử
U_1, U_2, U_3	Tổng đáp ứng của liều thấp, trung gian và cao của chế phẩm \underline{U} , trong một định lượng chỉ có 2 nồng độ của mỗi chế phẩm, U_2 đại diện cho nồng độ cao
W	Hệ số cân chỉnh dùng trong phối hợp một số định giá độc lập (phương trình 4.2.1.-1)
X	$\ln(\text{liều})$