

# Stanovení mědi metodou přidavku standardu s doplněním na konstantní objem

Ze zásobního roztoku o koncentraci  $\text{Cu}^{2+}$   $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  připravíme pracovní roztok I o koncentraci  $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Navážením připravíme 100 ml pracovního roztoku II - 1% KCl.

Vzorek vína zahřejeme na cca 80 st.C, poté ochladíme na laboratorní teplotu.

Z pracovního roztoku I připravíme ředěním do 25ml odměrných baněk roztoky o následujících koncentracích mědi:  $0,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $0,2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $0,4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $0,6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $0,8 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $1,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $1,2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Do každé z odměrných baněk přidáme 5 ml nezředěného vzorku vína, napipetujeme takové množství 1% KCl, aby jeho obsah v baňce byl 0,1% a doplníme 1%  $\text{HNO}_3$ .

Jako blank použijeme roztok 1%  $\text{HNO}_3$ . Každý roztok proměříme **7krát** a hodnoty absorbance přepíšeme do Excelu na samostatný list a uložíme ve formátu **txt** pod názvem **prid\_st** do složky kalibrace. **Dbáme na to, abychom místo desetinných čárek používali tečky**. Jako blank použijeme roztok bez přidavku upravený stejným způsobem jako kalibrační roztoky.

Je vhodné data přepsat do Excelu způsobem, který zobrazuje následující tabulka:

Tab. č. 6: Data získaná z měření pomocí metody přidavku standardu

blank	0 mg/l	0.2 mg/l	0.4 mg/l	0.6 mg/l	0.8 mg/l	1.0 mg/l	1.2 mg/l
0.003411	0.005832	0.008668	0.01149	0.01452	0.01686	0.02094	0.02291
0.00362	0.005789	0.008652	0.01144	0.01413	0.01687	0.02039	0.02302
0.003653	0.005916	0.009171	0.01123	0.01401	0.01656	0.02083	0.02407
0.003467	0.005946	0.008877	0.01131	0.01411	0.01730	0.02052	0.02334
0.003153	0.005714	0.009624	0.01149	0.01501	0.01696	0.02035	0.02358
0.003489	0.005509	0.009425	0.01159	0.01454	0.01766	0.02086	0.02309
0.003744	0.005717	0.009619	0.01182	0.01472	0.01725	0.02030	0.02306

Můžeme pokračovat se zpracováním v R Studiu. Pokud není v záložkách příkazového řádku otevřen soubor prid\_st, klikneme na „File“, zvolíme „Open File“ a ze složky kalibrace vybereme soubor prid\_st.R. Před začátkem práce je opět vhodné smazat data z prostředí (Enviroment -> Clear) a z oblasti grafů (Plots -> Clear all).

Myší modře označíme první řádek skriptu a klikneme na RUN, nebo zmáčkneme Ctrl+R, tím načteme vstupní data.

- `prid_st0<-read.delim("c:\\kalibrace\\prid_st.txt",header=TRUE)`

Pokud jsme vstupní data ukládali bez hlavičky, přepíšeme ve skriptu header=FALSE. Opět umístění souboru (červený text) se může lišit. Kliknutím na název v okně prostředí zkontrolujeme načtená data.

Poté načteme vektor koncentrace

- `konc2<-c(seq(0,3,by=0.5))`

Dále musíme ze vstupní matice vyčlenit blank, který je v prvním sloupci,

- `blank2<-prid_st0[,1];blank2`

a z něj vypočítat průměr

- `mean(blank2)`

dále blank z původní matice odstraníme:

- `prid_st1<-prid_st0[,-1];prid_st1`

Nyní můžeme od vstupní matice odečíst blank a dostaneme tak data ponížena o tuto hodnotu:

- `ps_blankless<-prid_st1[1:length(prid_st1)]-mean(blank2);ps_blankless`

Nakonec vypočítáme z každého sloupce průměr, který použijeme pro zobrazení průměrných hodnot v grafu kalibrační přímky:

- `prumer_blankless2<-apply(ps_blankless,2,mean);prumer_blankless2`

Nyní musíme data otestovat na odlehlost pomocí Grubbsova testu, ale testujeme data pro lineární závislost, takže napřed musíme tuto závislost vytvořit. V následujícím skriptu se vstupní data uspořádají do dvou sloupců a díky tomu budeme dále schopni udělat regresi pro všechna vstupní data. Označíme následující část skriptu a spustíme:

- `a<-length(ps_blankless[1,]);a`
- `b<-length(ps_blankless[,1]);b`
- `X<-rep(konc2,b);X`
- `Y<-ps_blankless[1,]`
- `for(i in 2:b){`  
    `YY<ps_blankless[i,]`  
    `Y<-as.numeric(c(Y,YY));Y`

Označíme další řádek, kterým R Studiu zadáme příkaz, že data jsou lineárního charakteru:

- `linear<-lm(Y~X);linear`

přivoláme potřebnou knihovnu

- `library(car)`

a provedeme samotné testování odlehlosti

- `outlierTest(linear,cutoff=0.05, n.max=10, order=TRUE)`

Pokud jsou data v pořádku, zobrazí se v okně konzoly:

No studentized residuals with Bonferroni  $p < 0,05$

Ale zobrazí se největší hodnota. Pokud zjistíme, že nějaká hodnota je odlehlá, poznamenejme si ji a uvedeme do protokolu.

Nyní provedeme testování úseku a směrnice dle nulových hypotéz  $a = 0$  a  $b = 1$ , přivoláme potřebnou knihovnu a provedeme testování

- `library(lmtest)`
- `coefTest(linear, vcov. = NULL, df = NULL)`

Zobrazí se tabulka

t test of coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )	
(Intercept)	0.0023536	0.0001966	11.972	7.171e-05	***
konc2	0.1447293	0.0027263	53.086	4.485e-08	***

---  
Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Pravděpodobnosti pro úsek i směrnici by se měly blížit nule. Pokud ne, měření zopakujeme. Hodnoty **úseku** („Intercept“) a **směrnice** („konc“) si poznamenejme a přepíšeme v legendě, aby odpovídaly kalibrační přímce pro naše data.

Dále zobrazíme graf kalibrační přímky

- `plot(X,Y,type="n",main="Kalibrační přímka",xlab="Koncentrace Cu (mg.l-1)",ylab="Absorbance (a.u.)",col=3)`

Zobrazí se prázdný rámeček. Podle toho změním umístění legendy. Fialová hodnota musí odpovídat nejmenší hodnotě na ose x a zelená hodnota zase největší hodnotě na ose y.

- `legend(0,0,0.016,legend=c("kalibrační přímka - y = 0,0024 + 0,1447x", "chybové úsečky - int. spolehlivosti"),col=c(4,"red"),box.lwd = 0,box.col = "white",bg = "white",lty=c(1,1),cex=0.9,lwd=1.5,pch=c("-", "-"))`
- `abline(linear,col=4)`
- `points(konc2,prumer_blankless2,col=1)`

do grafu ale musíme přidat chybové úsečky, pro jejich výpočet potřebujeme směrodatnou odchylku z každého sloupce

- `sm.odch_blankless2<-apply(ps_blankless,2,sd);sm.odch_blankless2`

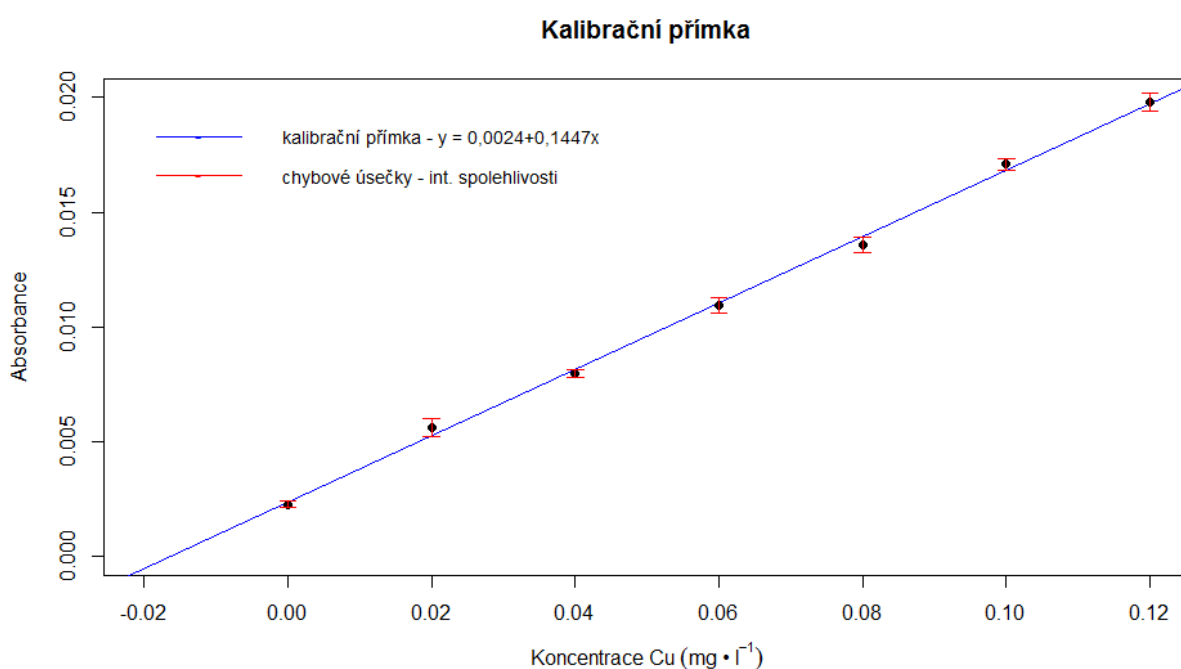
a hodnotu, kterou budeme přičítat a odečítat k průměrným hodnotám (směrodatná odchylka vynásobena kritickou hodnotou Studentova rozdělení pro  $v = n - 1$ , to celé poděleno odmocninou z  $n$ , což je počet měření pro každý kalibrační bod):

- `L2<-((sm.odch_blankless2*qt(0.975,6))/sqrt(length(blank2)));L2`

Přivoláme potřebnou knihovnu a zobrazíme chybové úsečky

- `library(Hmisc)`
- `errbar(konc2, prumer_blankless2, yplus=(prumer_blankless2+L2), yminus=(prumer_blankless2-L2), cap=0.015, add=T, errbar.col="red")`

Graf uložíme a přidáme do protokolu.

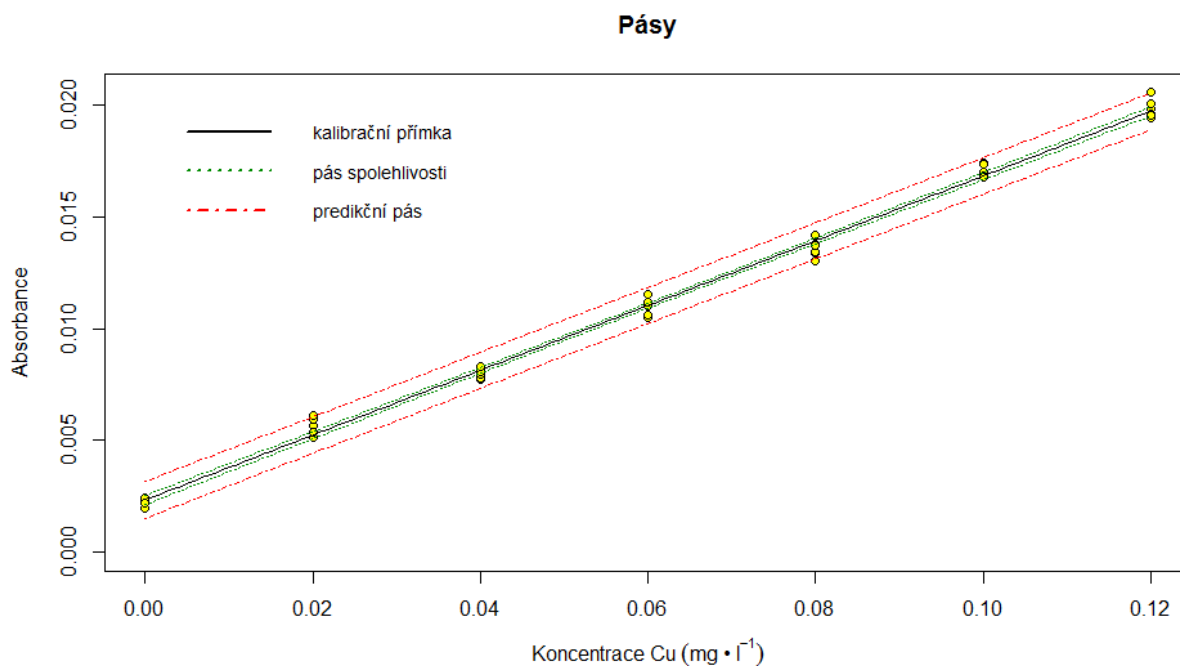


Obrázek č 14: Kalibrační přímka a chybové úsečky pro metodu přidavku

Nyní zobrazíme pásy spolehlivosti a predikce

- `library(chemCal)`
- `source("C:\\kalibrace\\calplot_primka.r")`
- `linear2<-calplot_primka(linear, xlim = c("auto", "auto"), ylim = c("auto", "auto"), xlab="Koncentrace Cu (mg.l-1)",ylab="Absorbance (a.u.)", alpha=0.05, varfunc = NULL)`

Graf uložíme a přiložíme do protokolu.



Obrázek č. 15: Pásky spolehlivosti a predikce

Poté vypočítáme mez detekce a stanovitelnosti, opět nás zajímají hodnoty na ose x, tudíž odečítáme první čísla, což odpovídá koncentraci.

- `lod(linear)`
- `> ld<-as.numeric(lod(linear));ld`

```
[1] 0.009460677 0.003722824
```

- `> lq<-(ld*10/3);lq`

```
[1] 0.03153559 0.01240941
```

Hodnoty poznameneáme a uvedeme do protokolu.

Pokračujeme výpočtem intervalů spolehlivosti pro parametry. K tomu opět potřebujeme směrodatné odchylky úseku a směrnice

- `coefest(linear, vcov. = NULL, df = NULL)`

které ale musíme zobrazit jako tabulku a jednotlivé hodnoty zobrazit samostatně

- `pint2<-as.matrix(coefest(linear, vcov. = NULL, df = NULL));pint2`
- `pint2_a1<-pint2[1,1];pint2_a1`
- `pint2_a2<-pint2[1,2];pint2_a2`
- `pint2_b1<-pint2[2,1];pint2_b1`

- `pint2_b2<-pint2[2,2];pint2_b2`

Směrodatné odchylky zaokrouhlíme na dvě platné číslice a podle počtu desetinných míst zaokrouhlíme výsledné intervaly:

- `pa2<-signif(pint2_a2, digits=2);pa2`
- `pb2<-signif(pint2_b2, digits=2);pb2`

Dostaneme např.: `pa2 = 0.00010` a `pb2 = 0.0014`

Pokračujeme samotným výpočtem

- `La<-c(pint2_a1-pint2_a2*qt(0.975,5),pint2_a1+pint2_a2*qt(0.975,5));La`
- `Lb<-c(pint2_b1-pint2_b2*qt(0.975,5),pint2_b1+pint2_b2*qt(0.975,5));Lb`

Podle desetinných míst u směrodatných odchylek intervaly zaokrouhlíme

- `L2a<-round(La, digits=5);L1a`
- `L2b<-round(Lb, digits=4);L1b`

Zobrazené intervaly uvedeme do protokolu jako

`L(a)1,2 = <0.00210;0.00261>`

`L(b)1,2 = <0.1411;0.1483>`

Poté zobrazíme elipsu pro parametry regresní přímky

- `library(ellipse)`
- `level = 0.975`
- `ell <- ellipse(linear, which = c(1, 2), level = level)`
- `plot(ell, type = "l", main="Elipsa pro parametry", ylab="Směrnice", xlab="Úsek")`

Zobrazí se elipsa, musíme ovšem upravit zobrazovanou oblast. Potřebujeme si udělat místo pro legendu nad elipsou, takže pokud se nám na ose y zobrazí oblast například od 0.10 po 0.11, v dalším řádku upravíme barevná čísla v závorce tak, aby fialové odpovídalo zobrazené nejnižší hodnotě na ose y a zelené zvolíme například o jednu setinu větší, tedy 0.12.

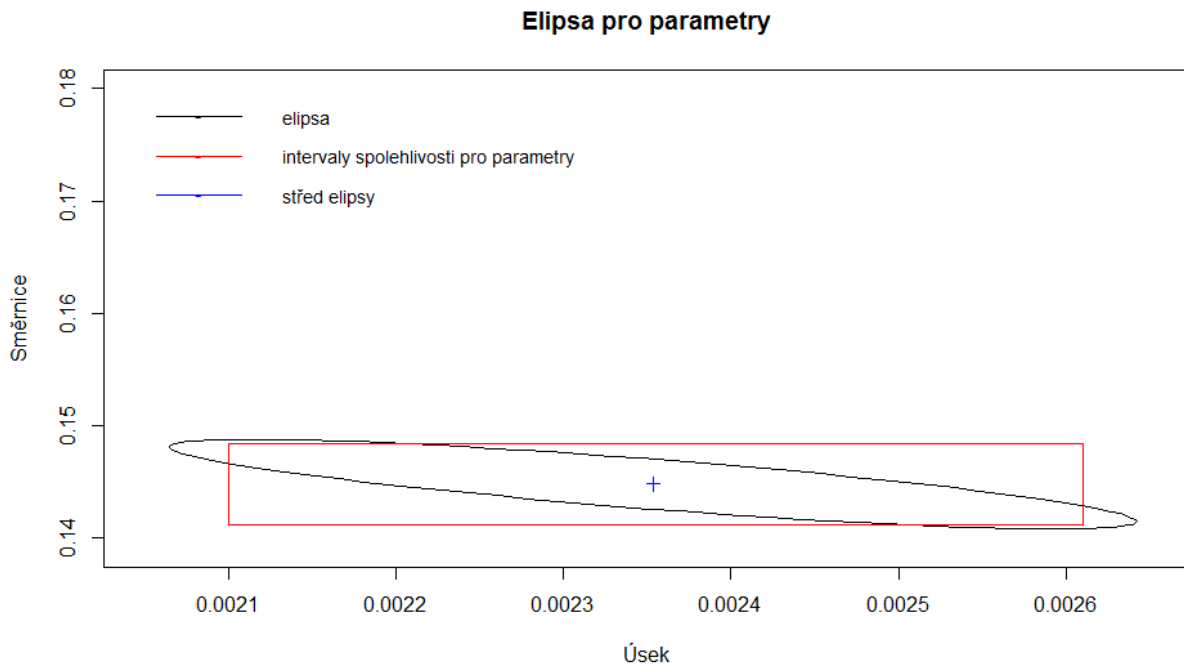
- `plot(ell, type = "l", main="Elipsa pro parametry", ylab="Směrnice", xlab="Úsek", ylim = c(0.10, 0.12))`

Přidáme legendu, opět upravíme čísla pozice legendy tak, aby byla v grafu vidět. **Fialové číslo odpovídá nejnižší hodnotě na ose x a zelené odpovídá nejvyšší hodnotě na ose y:**

- `legend(0.0039,0.09,legend=c("elipsa","intervaly spolehlivosti pro parametry"), col=c(1,2),box.lwd = 0,box.col = "white",bg = "white", lty=c(1,1),cex=0.9, lwd=1.5, pch=c("-", "-"))`
- `points(linear$coefficients[1], linear$coefficients[2],pch=3)`
- `segments(L2a[1],L2b[1],L2a[2],L2b[1],col=2)`

- `segments(L2a[1],L2b[2],L2a[2],L2b[2],col=2)`
- `segments(L2a[1],L2b[1],L2a[1],L2b[2],col=2)`
- `segments(L2a[2],L2b[2],L2a[2],L2b[1],col=2)`

Graf uložíme a přidáme do protokolu



Obrázek č. 16: Elipsa pro parametry regresní přímky

Nyní zobrazíme elipsy spolehlivosti a predikce

- `level <- 0.95`
- `shape <- var(cbind(X, Y))`
- `center <- c(mean(konc2), mean(prumer_blankless2))`
- `radiusC <- sqrt(2 * (length(konc2)-1) * qf(level, 2, (length(konc2) - 2)) / (length(konc2) * (length(konc2) - 2)))`
- `radiusP <- radiusC * sqrt(length(konc2) + 1)`
- `ellcalc <- function(center, shape, radius, segments=1000){`  
`segments=segments`  
`angles <- seq(from=0, to=(2*3.1415926), by=1/segments)`  
`unit.circle <- cbind(cos(angles), sin(angles))`  
`ELLIPSE <- t(center + radius * t(unit.circle %*% chol(shape)))`

```
return(ELLIPSE)}
```

- `ellC<- ellcalc(center, shape, radiusC)`
- `ellP<- ellcalc(center, shape, radiusP)`
  
- `plot(X, Y, type="p",main="elipsy",xlab="Koncentrace Cu (mg.l-1)", ylab="Absorbance (a.u.)")`

Zobrazí se pouze rámeček grafu. Nyní musíme upravit zobrazovanou oblast tak, aby elipsy byly vidět celé. Toho dosáhneme tak, že změníme hodnoty v rámečku tak, aby odpovídali trojnásobku zobrazované vzdálenosti rámečku. Pokud se nám na ose x zobrazí 0 - 0.12, nastavíme hodnoty `xlim` na -0,12 a 0,24. obdobně postupujeme u osy y a hodnot `ylim`.

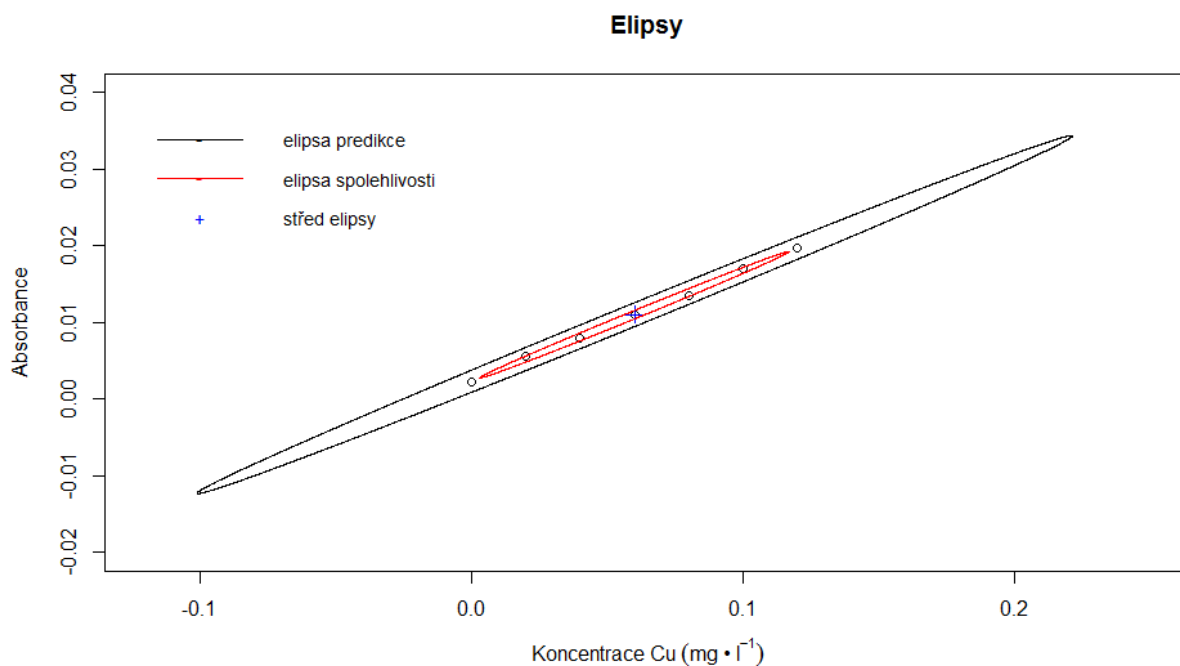
- `plot(X,Y, type="n",main="elipsy", xlab=expression(Koncentrace ~ Cu ~ (mg ~ "*" ~ l-1)), ylab="Absorbance (a.u.)", xlim=c(-0.12,0.25),ylim=c(-0.02,0.04))`

Dále zobrazíme legendu. Pozici legendy musíme upravit podle zobrazované oblasti, z `xlim` vybereme první souřadnici (-0,12) a z `ylim` druhou (0.04), podle barev.

- `legend(-0.12,0.04,c("elipsa predikce", "elipsa spolehlivosti", "průměr"), col=c(1,2,4), lty=c(1,1,0),box.lwd = 0,box.col = "white",bg = "white", cex=0.9, lwd=1.5,pch=c("-", "-", "+"))`
- `points(konc2,prumer_blankless2)`
- `points(center[1], center[2], pch = 3,col=4,cex=1.25)`
- `points(ellC[1],ellC[2],col=2,type="l")`
- `points(ellP[1],ellP[2],col=1,type="l")`

Obrázek uložíme a přidáme k protokolu.





Obrázek č. 16: Elipsa spolehlivosti a elipsa predikce

Nyní můžeme přikročit k výpočtu koncentrace mědi ve vzorku

- $\text{konc.Cu} \leftarrow -((\text{pint2\_a1}/\text{pint2\_b1}) * 5); \text{konc.Cu}$

Pro výpočet intervalu spolehlivosti potřebujeme směrodatnou odchylku, pro její výpočet zase potřebujeme směrodatnou odchylku  $s_{y,x}$ :

- $xpr2 \leftarrow \text{mean}(\text{konc2}); xpr2$
- $ypr2 \leftarrow \text{mean}(\text{prumer\_blankless2}); ypr2$
- $Q2 \leftarrow \text{sum}(7 * (\text{konc2} - xpr2)^2); Q2$
- $Y2 \leftarrow (\text{pint2\_a1} + \text{konc2} * \text{pint2\_b1}); Y2$
- $n \leftarrow (\text{length}(\text{konc2}) * \text{length}(\text{blank2})); n$
- $ps1 \leftarrow ps\_blankless[1,]; ps1$
- $ps2 \leftarrow ps\_blankless[2,]; ps2$
- $ps3 \leftarrow ps\_blankless[3,]; ps3$
- $ps4 \leftarrow ps\_blankless[4,]; ps4$
- $ps5 \leftarrow ps\_blankless[5,]; ps5$
- $ps6 \leftarrow ps\_blankless[6,]; ps6$
- $ps7 \leftarrow ps\_blankless[7,]; ps7$
- $psY1 \leftarrow (\text{sum}((ps1 - Y2)^2)); psY1$

- $psY2 \leftarrow -(\text{sum}((ps2 - Y2)^2)); psY2$
- $psY3 \leftarrow -(\text{sum}((ps3 - Y2)^2)); psY3$
- $psY4 \leftarrow -(\text{sum}((ps4 - Y2)^2)); psY4$
- $psY5 \leftarrow -(\text{sum}((ps5 - Y2)^2)); psY5$
- $psY6 \leftarrow -(\text{sum}((ps6 - Y2)^2)); psY6$
- $psY7 \leftarrow -(\text{sum}((ps7 - Y2)^2)); psY7$
- $psY \leftarrow -(psY1 + psY2 + psY3 + psY4 + psY5 + psY6 + psY7); psY$
- $syx2 \leftarrow -\text{sqrt}((psY)/(n-2)); syx2$

Nyní můžeme vypočítat směrodatnou odchylku  $s_x$

- $sx \leftarrow -((syx2/pint2\_b1) * \text{sqrt}((1/n) + ((0 - ypr2)^2 / (pint2\_b1^2 * Q2))))); sx$

Směrodatnou odchylku zaokrouhlíme na dvě platné číslice a podle počtu míst za desetinnou tečkou pak také zaokrouhlíme interval spolehlivosti

- $sx1 \leftarrow -\text{signif}(sx, \text{digits}=2); sx1$

Vypočítáme samotný interval spolehlivosti

- $Lvz \leftarrow -c(\text{konc.Cu} - qt(0.975, 47) * sx1, \text{konc.Cu} + qt(0.975, 47) * sx1); Lvz$

Interval zaokrouhlíme

- $Lvz \leftarrow -\text{round}(Lv, \text{digits}=5); Lvz$

a stanovený obsah  $\text{Cu}^{2+}$  uvedeme do protokolu jako

$L_{vz} = \langle 0.07962; 0.08300 \rangle \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ .