

TARTU ÜLIKOOL  
Füüsika-keemiateaduskond  
Keemilise füüsika instituut

SIGNE LEITO

**Mõõtemääramatuse hindamine ISO GUM meetodil  
vedelik-kromatograafias**

Magistritöö

füüsikalise ja analüütilise keemia erialal

Juhendaja: professor IVO LEITO

Tartu 2005

## Sisukord

1	Sissejuhatus.....	3
2	Kirjanduse ülevaade.....	5
2.1	Mõõtetulemuste kvaliteet ja mõõtemääramatus.....	5
2.2	Olulisemad mõisted vedelik-kromatograafias .....	10
2.3	Vedelik-kromatograafiliste meetodite määramatuse hindamine .....	12
2.4	Simvastatiin ja tema määramine .....	13
3	Eksperimentaalne osa.....	15
3.1	Kemikaalid ja muud vahendid .....	15
3.2	Aparatuur .....	16
3.3	Kasutatud tarkvara ja arvutusmeetodid.....	16
3.4	Analüüsimeetodi kirjeldus .....	19
3.5	Määramatuse hindamine .....	20
4	Tulemused ja arutelu.....	32
4.1	Määramatuse sõltuvus mõõtesuuruse definitsioonist.....	32
4.2	Määramatuse komponentide panuste analüüs erinevate eksperimendiparameetrite korral .....	34
4.3	Määramatuse hindamise mooduli võimalikkus kromatograafilise süsteemi tarkvaras.....	39
5	Kokkuvõte.....	44
6	Summary .....	45
7	Kasutatud kirjandus .....	46
8	Lisad.....	49

# 1 Sissejuhatus

Mõõtemääramatus<sup>1</sup> on mistahes mõõtetulemuse kvaliteedi üks tähtsamaid iseloomustajaid [1]. Mõõtemääramatuse hindamine<sup>2</sup> on muutumas keemiliste mõõtmiste<sup>3</sup> (keemiliste analüüside) juures standardnõudmiseks [2,3]. Viimastel aastatel on keemiliste mõõtmiste määramatuse hindamise metodoloogia arendamisel saavutatud omajagu edu [2]. Siiski, tulenevalt keemiliste mõõtmiste iseärasustest, on veel palju teha, enne kui olukorda selles valdkonnas võib rahuldavaks pidada. Seda demonstreerivad ilmekalt laboritevahelised võrdlusmõõtmised, kus erinevate osalejate tulemuste vahelised erinevused on sagedasti kordades suuremad kui osalejate poolt oma tulemustele omistatud määramatuse hinnangud [4].

Määramatuse hindamise keerukus keemiliste mõõtmiste juures tuleneb nende märksa halvemast modelleeritavusest võrreldes füüsikaliste mõõtmistega, määramatuse allikate paljususest ja raskustest nende kvantitatiivsel arvestamisel, uuritavate objektide ebahomogeensusest ning – mis on vast olulisim – tõsistest probleemidest, mis on seotud mõõtmise selektiivsuse ja analüüdi objektist eraldamisega [5].

Määramatuse allikaid vedelik-kromatograafilisel analüüsil on omajagu uuritud ning sellel teemal on avaldatud mitmeid artikleid [6,7]. Vedelik-kromatograafia meetodite alastes töödes on tulemuse täpsus peaaegu alati vaatluse all, aga seda ei väljendata enamasti mitte summaarse, kõiki allikaid arvesse võtva määramatuse kaudu vaid mitmesugustel muude mooduste abil (antakse päevadevahelisi korratavusi, ruutkeskmisi hälbeid kalibreerimisgraafikust jms.). Selget konkreetset vedelik-kromatograafilise analüüsi määramatuse arvutamise protseduuri ISO GUM meetodi järgi, kus süstemaatiliselt esitatakse erinevad määramatuse allikad ja nende arvessevõtmise võimalused ning kvantitatiivselt nende kaalud tulemuse määramatusse ei ole avaldatud. Selline protseduur, kui see on tarkvaraliselt realiseeritud on suure praktilise väärtusega, kuna ta võimaldab mudelipõhiselt uurida erinevate eksperimendiparameetrite muutmise mõju tulemuse määramatusele.

Suurem osa praeguse aja keemilisi mõõtmisi tehakse arvutijuhitavate analüüsiseadmetega. Võtmerolli mängib seejuures tarkvara, mis näiteks kromatograafiliste mõõtmiste juures on arenenud väga kõrgele tasemele. Tarkvara abil ei teostata praegusel ajal mitte ainult seadmete juhtimist vaid ka andmete analüüsi ja töötlemist ning tulemuste vormistamist. Oleks loogiline, et selline tarkvara pakuks kasutajale tuge ka määramatuse hindamise alal. Ometigi puudub praegusel ajal ka kõige kõrgetasemelisemates kromatograafilistes tarkvarapakettides tulemuse määramatuse hindamise võimalus [8].

<sup>1</sup> Käesolevas töös on sõnad "mõõtemääramatus" ja "määramatus" kasutusel sünonüümidena.

<sup>2</sup> Kuigi määramatus leitakse arvutuste abil, kasutatakse nende arvutuste jaoks andmetena sageli mitmesuguseid hinnanguid ning enamasti osutub lõpuks leitud määramatus hinnanguliseks suuruseks. Seetõttu on õigustatud määramatuse arvutamise nimetamine määramatuse hindamiseks. Käesolevas töös kasutatakse määramatuse arvutamist ja määramatuse hindamist sünonüümidena.

<sup>3</sup> Käesolevas töös nimetatakse keemiliseks mõõtmiseks mingis objektis mingi aine sisalduse mõõtmist. Keemiline analüüs on mingi objekti uurimine keemiliste mõõtmiste abil ning võib sisaldada endas ühte või mitut keemilist mõõtmist.

Mõõtemääramatuse hindamine ei paku huvi mitte pelgalt mõõtetulemuse kvaliteedi hindamise sisukohast. ISO GUM meetodil [1] määramatuse hindamisel saadakse tulemusena lisaks määramatuse arväärtusele ka erinevate määramatuse allikate panuste koondtabel. See tabel koos määramatuse hindamise protseduuriga on kasulik abivahend mõõtemetodi käitumise uurimiseks erinevate parameetrite muutmisel ja mõõtemetodi optimeerimiseks.

Käesolevas töös luuakse matemaatiline mudel ravimpreparaadi kvaliteedikontrolli vedelik-kromatograafilisele meetodile ning esitatakse sellel mudelil baseeruv protseduur tulemuse määramatuse hindamiseks. Konkreetse näitena rakendatakse loodud protseduuri simvastatiini sisalduse määramisel tablettides. Määramatuse allikate kvantiseerimisel esitatakse praktilised ja lihtsalt kasutatavad võtted mõnede sageli raskusi põhjustavate määramatuse allikate panuste hindamiseks. Loodud protseduuri kasutades analüüsitakse erinevate määramatuse allikate panust mõõtetulemuse määramatusse ning erinevate allikate suhtelise panuse ja mõõtetulemuse summaarse määramatuse sõltuvust mõõtemetodi parameetrite varieerimisest. Tulemusi vaadeldakse erinevatest mõõtesuuruse definitsioonidest lähtudes ning näidatakse, et mõõtesuuruse selge defineerimine on ülimalt oluline korrektse ning üheselt mõistetava tulemuse saamiseks. Demonstreeritakse meetodi valideerimise olulisust ja valideerimisandmete kasutamist erinevate määramatuse allikate panuste hindamisel.

Tulemustele toetudes esitatakse üldine lähenemisviis, kuidas luua määramatuse hindamise moodul vedelik-kromatograafilise süsteemi juhtimise tarkvarasse [8].

## 2 Kirjanduse ülevaade

### 2.1 Mõõtetulemuste kvaliteet ja mõõtemääramatus

#### 2.1.1 Üldised seisukohad

Tänapäeval on üha enam levinud nõue, mis kohustab keemilisi analüüse teostavaid laboreid järgima kvaliteedihindamise meetmeid, et olla kindlad oma pädevuses ja väljastatavate mõõtetulemuste kvaliteedis. Kvaliteedihindamise meetmed kätkevad endas: valideeritud analüüsimeetodite kasutamist, kvaliteedikontrolli protseduuride järgimist, pädevuskatsetes osalemist, akrediteeritust vastavalt standardile ISO 17025, mõõtetulemuste jälgitavuse tagamist [2]. Mõõtetulemuste kvaliteedi ja usaldusväärsuse tõendamisel on olulise tähtsusega mõõtetulemuste määramatuse hindamine. Mõõtemääramatust defineeritakse kui mõõtetulemusele omistavate võimalike väärtuste hajusust iseloomustavat parameetrit [3]. Määramatuse hindamine nõuab kasutatava meetodi (võimalikud segavad mõjud, meetodi lineaarsus, ...) ja uuritavate proovide (analüüdi võimalik lagunemine, võimalike segajate sisaldus, ...) omaduste põhjalikku tundmist, sest arvesse tuleb võtta kõik olulised määramatuse allikad.

Järgnevalt on toodud mõned olulised definitsioonid ja seosed:

**Mõõdis**  $y_i$  on üksikmõõtmisel saadud väärtus, näiteks mõõteriista näit ühekordsel lugemi võtmisel või ühe tiitrimise tulemus.

**Mõõteväärtuse** parimaks hinnanguks normaaljaotusele alluvate mõõdiste  $y_i$  puhul on nende mõõdiste aritmeetiline keskmine  $\bar{y}$ .

**Mõõtemääramatus** on mõõtetulemusele omistatavate võimalike väärtuste hajusust iseloomustav parameeter.

Normaaljaotusele alluvaid korduskatsete (mõõdiste) väärtusi  $y_i$  saab statistiliselt töödelda ja leida vastav **standardhälve**  $s(y)$ , mida nimetatakse ka **eksperimentaalseks standardhälbeks** (vanemas kirjanduses on seda nimetatud ruutkeskmiseks hälbeks).

$$s(y) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{n-1}} \quad (1)$$

Samades tingimustes samal päeval sama mõõtja poolt teostatud kordusmõõtmiste standardhälve iseloomustab mõõtmiste **korduvust**. Kui korduvus on ainsaks oluliseks määramatuse allikaks, siis võibki mõõtemääramatuse esitada kordusmõõtmiste standardhälvena. **Enamasti see siiski nii ei ole!** Küll aga on korduvus peaaegu alati üheks määramatuse allikaks ning läheb sellisena määramatuse arvutusse sisse.

**Mõõtetulemus** on mõõdetavale omistatavate võimalike väärtuste kogum, mis enamasti esitatakse mõõteväärtuse ja mõõtemääramatuse kaudu. Kui mõõtemääramatus on väljendatud standardhälbe tasemel, siis nimetatakse seda **standardmääramatuseks** ja tähistatakse  $u(y)$ .

Enamasti ei ole mõõtetulemuseks lihtsalt mõõteriista näit. Keerulisemate mõõtmiste tulemus saadakse üldiselt mitme erineva lihtsama mõõtmise tulemustest arvutuste teel. Sellisel juhul käsitletakse lihtsamate mõõtmiste tulemusi **sisendsuurustena** ning keerulisema mõõtmise tulemus **väljundsuurusena**. Kui mingi mõõtmise puhul väljundsuurus  $Y$  sõltub mitmest sisendsuurusest  $X_1, X_2 \dots X_n$ , siis selle sõltuvuse võib kirjutada:

$$Y = F(X_1, X_2 \dots X_n) \quad (2)$$

Võrrandit 2 nimetatakse vastava mõõtmise **matemaatiliseks mudeliks**.

Väljundsuuruse määramatuse hindamisel võetakse arvesse kõigi sisendsuuruste standardmääramatused. Niiviisi hinnatud väljundsuuruse standardmääramatust nimetatakse **liitstandardmääramatuseks** ja tähistatakse  $u_c(y)$ .

Eksperimentaalse standardhälbe kaudu väljendatud standardmääramatuse hinnangut nimetatakse **standardmääramatuse A-tüüpi hinnanguks**. Mõningaid väljundsuuruse määramatuse komponente, näiteks standardaine puhtuse standardmääramatust, ei ole võimalik antud tiitrimise katsetulemuste statistilise töötlemise abil hinnata. Kõiki selliseid määramatuse hinnanguid, milles ei kasutata statistilisi meetodeid, nimetatakse **määramatuse B-tüüpi hinnanguteks**. Näiteks standardaine puhtuse määramatust hinnatakse tootja poolt antud sertifikaadis sisalduva info alusel. Neil juhtudel toimub määramatuse hindamine mittestatistiliste meetoditega (B-tüüpi hinnang).

Tulenevalt normaaljaotuse omadustest väljendab mõõtetulemuse standardmääramatus selliseid piire, mille sees paikneb mõõdetava suuruse tõeline väärtus **ca 68% tõenäosusega**. Sellest kõrgema usaldatavusega mõõtetulemuse saamiseks tuleb mõõtemääramatust  $u_c(y)$  korrutada vastava **katteteguriga  $k$** .

Kui  $k = 2$ , siis saadakse mõõtetulemus usaldatavusega ca **95,4 %**. Sel juhul mõõdetava tõeline väärtus  $y_t$  asub ca 95% tõenäosusega vahemikus  $y - k \cdot u_c(y) \leq y_t \leq y + k \cdot u_c(y)$ . Kompaktsemalt kirjutatakse seesama mõõtetulemus järgmiselt:  $y_t = [y \pm k \cdot u_c(y)][Y]$ , kus  $[Y]$  on mõõdetava suuruse ühik. Katteteguri väärtusel  $k = 3$  saadakse mõõtetulemuse usaldatavus ca **99,7 %**. Parameetrit  $k \cdot u_c(y)$  tähistatakse  $U$  ja nimetatakse **laiendmääramatuseks**, mille defineeriv valem on  $U = k \cdot u_c(y)$ .

### 2.1.2 Raskused määramatuse hindamisel keemiliste mõõtmiste juures

Keemiliste mõõtmiste määramatuse hindamine on sageli komplitseeritud kuna teatud juhtudel võib analüüsimeetodi olemus välistada kindla, metrooloogiliselt ja statistiliselt kehtiva mõõtemääramatuse arvutuse. Sellisel juhul peab identifitseerima kõik määramatuse komponendid ja tegema asjakohase hindamise, mis põhineb meetodi sisu tundmisel ja mõõteulatusel ning peab kasutama, näiteks labori varasemaid kogemusi ja valideerimisandmeid [3]

Määramatuse allikad keemilise analüüsi puhul on näiteks [2]:

- Proovivõtmine ja säilitamine enne analüüsi:
  - Proovi mitteesinduslikkus;
  - Proovi säilitusaeg ja –tingimused;

- Proovi töötlemine:
  - Proov ebahomogeenne;
  - Analüüdi eraldamine pole täielik;
  - Analüüt laguneb;
  - Analüüt lendub;
  - Analüüt adsorbeerub;
  - Proov saastub töötlemise käigus;
- Standardainete puhtus;
- Aparatuurist ja mõõtevahenditest tulenev määramatus:
  - Mõõtevahendi näidu korduvus;
  - Mõõtevahendi triiv;
  - Temperatuur;
- Analüüsimeetodist tulenev määramatus:
  - Selektiivsus
- Mõõtmine
  - Mõõtevahend saastub mõõtmise käigus;
  - Analüütiku subjektiivsus.

### 2.1.3 ISO GUM meetod määramatuse hindamiseks

ISO GUM (*Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*) meetod mõõtemääramatuse hindamiseks on praegusel ajal üks tunnustatumaid. Meetod on välja töötatud Rahvusvahelise Standardiseerimisorganisatsiooni (ISO) poolt koostöös kuue organisatsiooniga: BIMP (Rahvusvaheline Kaalude ja Mõõtude Büroo), IEC (Rahvusvaheline Elektrotehnika Komisjon), IFCC (Rahvusvaheline Kliinilise Keemia Föderatsioon), IUPAC (Rahvusvaheline Puhta ja Rakenduskeemia Liit), IUPAP (Rahvusvaheline Puhta ja Rakendusfüüsika Liit) ja OIML (Rahvusvaheline Legaalmetroloogia Organisatsioon) üle kümne aasta tagasi. Meetod on põhjalikult esitatud kirjandusallikas [1]. Juhendi ISO GUM meetodi rakendamiseks keemiliste analüüside tulemuste määramatuse hindamiseks on ühiselt publitseerinud organisatsioonid Eurachem ja CITAC [2]. ISO meetodi järgi toimub määramatuse hindamine alljärgnevate etappide kaupa:

#### 1. Mõõtesuuruse määratlemine (defineerimine)

See on etapp, millele sageli ei pöörata küllalt tähelepanu. Keemilises analüüsis on mõõtesuuruseks enamasti analüüdi sisaldus uuritavas objektis. Sageli on selleks analüüdi summaarne sisaldus objektis, teinekord jälle teatud meetodiga objektist ekstraheeritav analüüdi kogus. Samuti on mõõtesuuruse defineerimisel väga oluline spetsifitseerida, kas mõõtetulemus esitatakse vaid uuritud proovi kohta või tehakse proovi analüüsi alusel järeldusi üldkogumi kohta. See on ka käesoleva töö seisukohalt väga oluline erinevus ja sellest on põhjalikult juttu alajaotuses 3.5.1.

#### 2. Mõõtmise matemaatilise mudeli koostamine

See on matemaatiline avaldis kus kõigi mõõtmist mõjutavate suuruste abil arvutatakse välja mõõtetulemus. See etapp on käesolevas töös kirjeldatud alajaotuses 3.5.2.

### 3. Määramatuse allikate identifitseerimine

Tavaliselt tuleneb enamus määramatuse allikatest mudelis ilmutatud kujul esinevatest suurustest (st suurustest, mis on mudelis sees). Seejuures võib ühele sisendsuurusele vastata mitu määramatuse allikat. Mõned võivad tuleneda ka mudelis ilmutamata kujul esinevatest suurustest (st suurustest, mille kohta me küll saame aru, et see on oluline suurus, aga mida mudel ei sisalda). Sellisel juhul on vaja mudelit modifitseerida. Käesolevas töös on määramatuse allikate identifitseerimisele pühendatud alajaotus 3.5.3.

### 4. Vajadusel mudeli modifitseerimine

Mudeli modifitseerimine tuleb teha nii, et enne ilmutamata esinenud suurused saaksid mudelisse sisse toodud.

### 5. Sisendsuuruste väärtuste arvutamine ning mudeli abil väljundsuuruse väärtuse arvutamine

### 6. Määramatuse komponentide hindamine

Määramatuse komponentide hindamiseks kasutatakse olenevalt komponendist väga erinevaid mooduseid ning saadavad määramatuse hinnangud on enamasti erinevat tüüpi. Edasiste arvutuste tegemiseks tuleb kõik määramatuse komponendid teisendada standardmääramatuseks. Käesolevas töös on sellele etapile pühendatud alajaotus 3.5.4

### 7. Väljundsuuruse liitstandardmääramatuse arvutamine

Kui väljundsuurus  $Y$  sõltub mitmest sisendsuurusest  $X_1, X_2 \dots X_n$ :

$$Y = F(X_1, X_2 \dots X_n) \quad (3)$$

siis mittekorreleeruvate sisendsuuruste korral leitakse  $Y$  liitstandardmääramatus  $u_c(y)$  sellise üldise avaldise abil:

$$u_c(y) = \sqrt{\left[ \frac{\partial Y}{\partial X_1} u(x_1) \right]^2 + \left[ \frac{\partial Y}{\partial X_2} u(x_2) \right]^2 + \dots + \left[ \frac{\partial Y}{\partial X_n} u(x_n) \right]^2} \quad (4)$$

Käesolevas töös võetakse arvesse ka sisendsuuruste vahelist korrelatsiooni ja arvutus toimub keerukama võrrandi (võrrand 13) abil. Seda on lähemalt seletatud alajaotuses 3.3.1.

### 8. Tulemuse esitamine

Tulemuse korrektse kirjaviisi juures peab kajastuma mõõteväärtus, määramatus, kattetegur, informatsioon tulemusele omistatud võimalike väärtuste jaotuse kohta ja juhul, kui olulise panuse määramatusse annab mõni A tüüpi komponent, mille vabadusastmete arv on madal, siis ka efektiivsete vabadusastmete arv.

## 9. Tulemustest järelduste tegemine

See on määramatuse hindamise etapiks nimetatav vaid tinglikult, kuid on väga oluline tegevus mõõtmismeetodi optimeerimiseks, millele käesolevas töös on pühendatud alajaotus 4.

### 2.1.3.1 ISO meetodil mõõtemääramatuse hindamine lineaarse regressiooni kasutamisel

Lineaarse regressiooni meetodil koostatud kalibreerimisgraafikuga seotud määramatus pakub suurt huvi, sest praktiliselt kõik instrumentaalsed analüüsimetodid kasutavad kalibreerimisgraafikuid. On kaks võimalust mõõtemääramatuse hindamiseks lineaarse regressiooni kasutamisel:

- "**Täielik meetod**", mille korral võetakse eraldi arvesse kõigi regressioonisirge punktide määramatused nii abstsiss- kui ka ordinaat-telje sihis.
- "**Lihtsustatud meetod**", mille korral regressioonisirge punktide määramatus hinnatakse regressioonisirge standardhälbe kaudu.

Lihtsustatud meetodi puuduseks on, et kalibreerimisgraafiku punktidele süstemaatilist mõju avaldavad määramatuse allikad tuleb kas eraldi arvesse võtta või jäävad nad üldse arvessevõtmata, samas kui täieliku meetodiga lähevad nad automaatselt arvesse. Kuna käesolevas töös on oodata süstemaatiliste efektide ulatuslikku mõju, siis kasutatakse täielikku meetodit ja seetõttu kirjeldatakse ka siin ainult täielikku meetodit.

Olgu mingite analüüdi kontsentratsioonide korral  $C_1 \dots C_n$  on saadud seadme näidud (kromatograafi piigi pindalad, kolorimeetri neelduvuse lugemid vms)  $A_1 \dots A_n$ . Kui  $C$  ja  $A$  vahel lineaarne sõltuvus, võib regressiooni sirge võrrandi kirjutada avaldise 26 kujul.

Lineaarse regressiooni abil on kergesti leitavad parameetrite  $b_1$  ja  $b_0$  väärtused (ning ka nende standardhälbed).

Olgu uuritava lahuse korral seadme näit  $A$  ning selle näidu standardmääramatus  $u(A)$ . Sellisel juhul saab analüüdi kontsentratsiooni  $C$  uuritavas lahuses leida võrrandi 29 kaudu.

Vaja on leida kontsentratsiooni  $C$  määramatus. Määramatuse arvutamine käib regressioonisirge parameetrite võrrandeid 27 ja 28 kasutades.

Need võrrandid sisestatakse programmi GUM Workbench mudelisse või kasutatakse mõnda tabelarvutusüsteemi. Suurused  $A_i$  ja  $C_i$  sisestatakse koos määramatustega. Sisestatakse ka võrrand 29 ning  $A$  koos määramatusega. Programm arvutab nende andmete abil automaatselt  $C$  koos määramatusega.

### 2.1.4 Teised määramatuse hindamise meetodid

Üks levinumaid muid määramatuse hindamise meetodeid praegusel ajal on niinimetatud **Nordtest'i meetod** [9]. Kuna see on teistest määramatuse hindamise meetoditest ainus, mis on piisava tasemeni formaliseeritud ja eraldi dokumendina avaldatud, siis piirdumegi siin vaid selle meetodi vaatlemisega.

ISO meetodi kasutamisel võib määramatuse allikaid uurida ja arvesse võtta erineva põhjalikkusega. Tõeliselt süvitsi minnakse uurimisasutustes ja kõrgetasemelisele metroloogiale orienteeritud laborites. Tavaanalüüsi laborites piirduakse enamasti vähema detailsusega. Teatud mõttes võibki Nordtest'i meetodit vaadelda ISO GUM meetodi piirjuhuna. Selles meetodis grupeeritakse kõik määramatuse allikad kaheks grupiks: "juhuslikud" ja "süsteemaatilised" ja sisuliselt opereeritaksegi kahe kompleksse määramatuse allikaga. Määramatus hinnatakse statistikale tuginedes. Meetodi eeliseks on, et ta vajab vähem süvateadmisi kasutatava meetodi kohta kui ISO GUM meetod ja seetõttu on määramatuse allahindamise oht väiksem. Meetodi põhilisteks puudusteks on mõnevõrra vähem korrektne matemaatiline vundament, vajadus ulatuslike statistiliste andmete järgi ja meetodi võimetus aidata kaasa määramatuse tegelike allikate tuvastamisele ja meetodi optimeerimisele. Käesolevas töös seda meetodit ei kasutata.

## 2.2 Olulisemad mõisted vedelik-kromatograafias

Kromatograafilistel analüüsimeetoditel on praeguse aja analüütilises keemias eriline koht. Teaduse ja tehnika arenedes on vaja määrata järjest suuremat hulka aineid järjest mitmekesisemates ja keerulisema koostisega objektides. Seoses sellega on väga oluline analüüsimeetodi selektiivsus. Võib kindlalt väita, et kui tegemist on orgaaniliste ainete määramisega, siis praegusel ajal kromatograafilistele meetoditele selektiivsuse ja mitmekülguse poolest vastast ei ole.

Vedelik-kromatograafia kujutab endast väga mitmekesiste omadustega meetodite gruppi. Mitmekesisuse tingib erakordselt lai statsionaarsete faaside valik ning ulatuslikud võimalused mobiilse faasi koostise modifitseerimiseks.

Kromatograafia on ainete eraldamise meetod, kus erinevad proovi komponendid liikudes läbi statsionaarse faasi (nt. kolonn) jaotuvad erineval määral kahe faasi – statsionaarse ja mobiilse – vahel. Proovi molekulidega hakkavad kolonnis toimuma korduvad sorptsiooni ja desorptsiooniprotsessid. Komponenti A jaoks võib kirjutada järgmise võrrandi [10]:

$$A_{\text{mobiilfaas}} \rightleftharpoons A_{\text{stats.faaas}} \quad (5)$$

Selle reaktsiooni tasakaalukonstanti  $K$  nimetatakse **jaotuskonstandiks** (*distribution coefficient*) ja sellega võib iseloomustada komponendi faasi eelistust:

$$K_A = \frac{c_{\text{stat}}}{c_{\text{mob}}} \quad (6)$$

kus  $c_{\text{stat}}$  - komponendi A kontsentratsioon statsionaarses faasis  
 $c_{\text{mob}}$  - komponendi A kontsentratsioon mobiilfaasis.

Ka **mahtuvusfaktoriga** (*capacity factor* või *retention factor*) võib väljendada komponendi faasi eelistust [11, 12]:

$$k'_A = \frac{n_{\text{stat}}}{n_{\text{mob}}} \quad (7)$$

kus  $n_{\text{stat}}$  - komponendi A moolide arv statsionaarses faasis  
 $n_{\text{mob}}$  - komponendi A moolide arv mobiilfaasis.

Kui kolonni lõppu paigutada detektor, mis reageerib uuritava(te) aine(te) kontsentratsiooni(de)le ja detektori signaal kujutada graafiliselt aja (või lisatud mobiilfaasi hulga) funktsioonina, saadakse rida maksimume (edaspidi piike), mis on ideaalis Gaussi kõvera kujuga. Sellist graafikut nimetatakse **kromatogrammiks**. Piigi asukoha järgi aja teljel saab identifitseerida proovi komponendid, piigi aluse pindala (või piigi kõrguse) kaudu saab leida komponendi sisalduse proovis.

**Mahtuvusfaktorit  $k'$**  kasutatakse sageli aine kolonnis liikumise kiiruse kirjeldamiseks [11, 12]:

$$k'_A = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (8)$$

kus  $t_R$  – komponendi A retentsiooniaeg;  
 $t_0$  – surnud aeg ehk statsionaarse faasiga mitteinterakteeruvate osakeste retentsiooniaeg.

Erinevalt retentsiooniajast,  $k'$  suurus ei sõltu kolonni pikkusest ja mobiilfaasi voolukiirusest.

Mahtuvusfaktori optimaalsed väärtused on 2 kuni 10. Kui  $k'$  on väga väike, siis ühendid läbivad kolonni liiga kiiresti, interaktsioonid statsionaarse faasiga on liiga põgusad ning lahutumine halb. Suurte  $k'$  väärtuste puhul on analüüsi ajad väga pikad. On selge, et kahte komponenti ei saa eraldada, kui neil on sama  $k'$  (või väga lähedane) väärtus.

Süsteemi võimet eraldada kahte komponenti iseloomustatakse **selektiivsusefaktoriga  $\alpha$**  (*relative retention* ehk *separation factor*) [11, 12]:

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} = \frac{t_{RB} - t_0}{t_{RA} - t_0} \quad (9)$$

kus  $K_B$  - kolonnis kauem olevate osakeste B jaotuskonstant  
 $K_A$  on kiiremini elueeruvate osakeste A jaotuskonstant.

Kui selektiivsusefaktor on 1.3, siis üks komponent seondub statsionaarse faasiga 30% tugevamini kui teine.  $\alpha$  väärtused võiksid jääda vahemikku 1.1 – 1.4.

Selektiivsusefaktori puuduseks on see, et ta ei võta arvesse piikide laiust. Seega ei ole paljalt selektiivsusefaktori järgi võimalik teha järeldusi piikide lahutumise kohta.

**Lahutuvuskriteerium (*resolution*) ( $R_s$ )** väljendab samuti kromatograafilise süsteemi võimet lahutada kahe komponendi piigid [11, 12]:

$$R_s = \frac{t_{RA} - t_{RB}}{0.85 \cdot (w_{1/2(A)} + w_{1/2(B)})} \quad (10)$$

kus  $w_{1/2}$  – piigi poolkõrguslaius

$R_s$  eeliseks  $\alpha$  ees on see, et ta võtab arvesse nii ainete mahtuvusfaktorite erinevuse kui ka piikide laiuse. Piigid loetakse lahutunuks (*baseline resolved*) kui  $R_s > 1.5$ . Ohutu on töötada olukorras, kus  $R_s = 1.7 \dots 2.0$ .

Kromatograafilise kolonni **efektiivsuseks** nimetatakse kolonni võimet takistada kolonni mööda liikuvate ainete tsoonide laienemist. Kolonni efektiivsuse kvantitatiivseks väljendamiseks kasutatakse kahte omavahel seotud suurust: (1) teoreetilise taldriku kõrgus  $H$  [1/cm] ja (2) teoreetiliste taldrikute arv  $N$ .

$$N = \frac{L}{H} \quad (11)$$

kus  $L$  – kolonni pikkus [cm]

Taldrikute arvu leidmiseks kasutatakse sageli järgmist võrrandit [11, 12]:

$$N = 5.54 \left( \frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2 \quad (12)$$

Kolonni efektiivsuse määravad järgmised tegurid:

- Mobiilfaasijoonkiirus
- Analüüdi molekuli diffusioonikoefitsient mobiilfaasis
- Analüüdi molekuli diffusioonikoefitsient statsionaarses faasis
- Analüüdi mahtuvusfaktor
- Kolonni täidise osakeste suurus (läbimõõt) ja suuruse ühtlikkus
- kolonni täidise osakeste kuju
- Statsionaarset faasi katva vedelikukihi paksus

## 2.3 Vedelik-kromatograafiliste meetodite määramatuse hindamine

### 2.3.1 Määramatuse allikad vedelik-kromatograafilise analüüsi juures

Vedelik-kromatograafiliste analüüsimeetodite määramatuse allikaid on palju uuritud ja need on üldiselt hästi teada. Määramatuse allikate kohta on avaldatud nii ülevaateartikleid [6] kui ka üksikuid määramatuse allikaid käsitlevaid artikleid ja raamatuid [7, 13, 14, 15, 16]. Ülevaade vedelik-kromatograafilisi analüüsimeetodeid mõjutavatest teguritest on toodud tabelis 1.

**Tabel 1. Vedelik-kromatograafilisi analüüsimeetodeid mõjutavad tegurid.**

Parameeter või meetodi osa	Parameetrit mõjutavad tegurid
Analüüsitulemus	Kolonni temperatuur, mobiilfaasi koostis, voolukiirus, proovi ruumala, võimalike segavate ainete piikide kattumine analüüdi piigiga, <i>sample carryover</i> , detektori karakteristiku lineaarsus
Piigi pindala	Baasijoon triiv, kolonni temperatuur, detektori

	lainepikkus, süstimise täpsus, integraatori seadistused, mobiilfaasi koostis, voolukiirus, piigi “sabatamine”, üleüldine süsteemi täpsus, signaal-müra suhe, lahutuvuskriteerium
Piigi kõrgus/laius	Kolonni temperatuur, detektori kosteaeg, lainepikkus, integraatori seadistused, mobiilfaasi koostis, voolukiirus, üleüldine süsteemi täpsus, proovi ruumala korduvus, signaal-müra suhe, gradiendi profiil
Mahtuvusfaktor	Kolonni vanus, kolonni temperatuur, mobiilfaasi koostis, gradiendi profiil
Retentsiooniaeg	Kolonni vanus, kolonni temperatuur, integreerimine, mobiilfaasi koostis, voolukiirus, signaal-müra suhe, gradiendi profiil
Lahutuvuskriteerium	Kolonni vanus, kolonni temperatuur, mobiilfaasi koostis, proovi ruumala
UV-VIS-detekteerimine	Solventide degaseerimine, lainepikkuse täpsus

### 2.3.2 Vedelik-kromatograafilise analüüsi tulemuste määramatuse hindamine

Nagu eelnevalt nimetatud, on mõõtetulemuste kvaliteedi ja usaldusväärsuse tõendamisel oluline osa mõõtetulemuste määramatuse hindamisel. Arvestades vedelik-kromatograafilisi meetodeid mõjutavate tegurite arvukust, ei ole antud juhul mõõtemääramatuse hindamine lihtne ülesanne. Samas, kõiki määramatuse allikaid kokku võtvaid määramatuse arvutusi vedelik-kromatograafilise meetodi jaoks pole avaldatud. Antakse päevadevahelisi korratavusi, kalibreerimisgraafikult leitud standardhälbeid jms. [7, 17, 18, 19], aga selget määramatuse arvutuse protseduuri ISO GUM meetodi järgi, kus süstemaatiliselt esitatakse erinevad määramatuse allikad ja nende kvantitatiivse arvestamise võimalused, pole avaldatud. Aspekte, mida arvestada vedelik-kromatograafilise analüüsi tulemuste määramatuse hindamisel, on veel päris palju, aga nendest tuleb põhjalikumalt juttu alajaotustes, kus käsitletakse määramatuse allikate identifitseerimist ja komponentide kvantiseerimist.

## 2.4 Simvastatiin ja tema määramine

### 2.4.1 Simvastatiin ja tema omadused

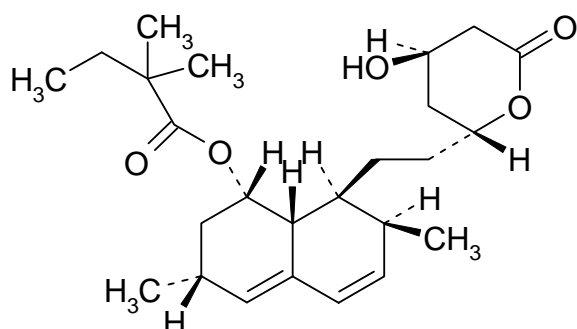
Simvastatiin on pool-sünteetiline vere lipiidide sisaldust alandav aine, mida toodetakse lovastatiinist, *Aspergillus terreuse* fermentatsiooniproduktist [20, 21, 22]. Keemilise struktuuri poolest erineb simvastatiin lovastatiinist vaid ühe metüülrühma võrra (Vaata Joonis 1 ja Joonis 2).

Simvastatiin on valge vees praktiliselt lahustumatu kristalne pulber. Väga hästi lahustub metüleenkloriidis ja 96%-lises etanoolis [23]

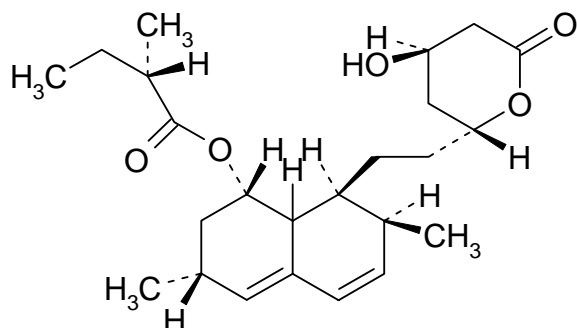
Pärast suukaudset manustamist hüdrolyüsib simvastatiin vastavaks beeta-hüdroksühapeks, L-654 969. See simvastatiini peamine metaboliit inhibeerib 3-hüdroksü-3-metüülglutarüül-koensüüm A (HMG CoA) reduktaasi, mis katalüüsib ühte kolesterooli biosünteesi varajast etappi, vähendades sel teel organismis sünteesitava kolesterooli koguhulka. Simvastatiini kasutatakse vere kõrge kolesteroolisisalduse või ateroskleroosi (südame veresoonte ahenemise) korral, kui

dieet ja muud mittefarmakoloogilised ravimeetodid (näiteks keheline treening ja kehakaalu langetamine) ei ole osutunud vere kolesteroolisisalduse vähendamisel piisavaiks [20].

Esimene HMG-CoA reduktaasi inhibiitori, lovastatiini, preparaat sai müügiloa 1987.-ndal aastal Ameerika Ühendriikides [24, 27]. Simvastatiin võeti esimest korda kasutusele 1988.-ndal aastal Rootsis. 2004.-nda aasta juulist on Suurbritannias simvastatiini 10 mg preparaadid saadaval käsimüügiravimina. Eesti ravimiregistris on 4. veebruari 2005 seisuga kaheksa tootja 31 simvastatiini preparaati [20]. Kõik Eestis registreeritud simvastatiini preparaadid on retseptiravimid.



Joonis 1. Simvastatiini keemiline struktuur [6, 23, 21].



Joonis 2. Lovastatiini keemiline struktuur [23, 21]

#### 2.4.2 Simvastatiini määramise meetodid

Kõige levinum analüüsimeetod simvastatiini määramiseks on kirjanduse andmetel vedelik-kromatograafia [21]. Detekteerimiseks kasutatakse nii ultraviolet-, fluoretsents- kui ka massidetektoreid.

Ravimpreparaatide koostisesse kuuluva simvastatiini kvantitatiivse sisalduse määramiseks kasutatakse enamasti farmakopöades kirjeldatud vedelik-kromatograafilisi meetodeid, kus analüütiliseks lainepikkuseks on 238 nm [23,25].

Euroopa farmakopöas kirjeldatud meetod on lisaks simvastatiini määramisele ette nähtud ka mitmesuguste lisandite määramiseks toimeaines<sup>4</sup>.

Niinimetatud ametlike ehk farmakopöades kirjeldatud meetoditele lisaks on välja töötatud ka rida alternatiivseid meetodeid, mis võimaldavad määrata simvastatiini sisaldust ravimpreparaatides:

- Godoy *et al* on välja töötanud vedelik-kromatograafilise meetodi, mis sobib simvastatiini määramiseks nii toimeaines kui ka ravimpreparaatides [28]. Kirjeldatud meetodi suureks eeliseks on analüüsi kiirus. Monoliitse kolonni kasutamine võimaldab rakendada suuri voolukiiruseid, mis lühendab oluliselt analüüsiks kuluvat aega ja seetõttu sobib kirjeldatud meetod hästi rutiinanalüüsiks.

Sirivasu *et al* kirjeldavad lovastatiini ja simvastatiini määramise meetodit, mis põhineb mitsellaarsel elektrokineetilisel kromatograafial [29]. Kuigi nimetatud meetodi puhul on analüüsiaeg pikem kui kromatograafiliste meetodite puhul, võib seda meetodit eelistada madalama hinna ja kasutatavate kemikaalide keskkonnasõbralikkuse tõttu.

### 3 Eksperimentaalne osa

#### 3.1 Kemikaalid ja muud vahendid

- Kaalium divesinikfosfaat,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , *reagent grade*, Scharlau Chemie S.A
- Atsetonitriil, *gradient grade for liquid chromatography*, Merck KGaA
- orto-Fosforhape, 85% (m/m),  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , *GR for analysis*, Merck KGaA
- Puhastatud vesi: puhastamiseks kasutati *Milli-Q*-veepuhastussüsteemi (*Milli-RO<sup>6</sup> plus* ja *Milli-Q plus*), Millipore Corporation;
- Simvastatiini standardaine, Ph Eur CRS, 99.4%
- Lovastatiini tööstandardaine, Medinsa
- Simvastatiini tabletid: “Simvastatin 10 mg” [20]
  - Koostis: 1 kilekattega tablett sisaldab 10 mg simvastatiini
  - Abiained:
    - Tableti tuum: veevaba laktoos, mikrokristalne tselluloos, preželatiniseeritud maisitärklis, butüleeritud hüdroksüanisool, magneesiumstearaat, talk.
    - Kilekate: hüdroksüpropüültselluloos, hüpromelloos, titaandioksiid.
- Ühekordsed süstlafiltrid, Millex-LCR 13 mm/0.45 filter, Millipore Corporation
- Mõõtkolvid standardlahuste ja proovi lahuse valmistamiseks 50-ml mõõtkolb ( $\pm 0.06$  ml), 5 tk;

<sup>4</sup> Toimeaine on ravimi iga koostisaine, mis omab farmakoloogilist aktiivsust või muud otsest toimet haiguse diagnoosimisel, ravimisel või vältimisel, või mis on mõeldud inimese või looma organismi või selle funktsiooni farmakoloogiliseks mõjutamiseks. Ravim võib sisaldada rohkem kui ühte toimeainet. Ekvivalentsed mõisted: aktiivaine, raviaine (active substance, active ingredient, drug substance, medicinal substance). Abiaine (*excipient*) on ravimi iga koostisaine, mis ei ole toimeaine(d), või aine, mida kasutatakse ravimi tootmisel. Abiaine funktsiooniks on luua toimeaine(te) organismi viimiseks sobiv keskkond ja sellega parandada näiteks ravimi stabiilsust, biofarmatseutilisi omadusi, välimust ja patsiendile vastuvõetavust ning lihtsustada ravimi tootmist. Tavaliselt kasutatakse ravimi koostises rohkem kui ühte abiainet [23].

100-ml mõõtkolb ( $\pm 0.1$  ml), 1 tk.

### 3.2 Aparatuur

- Waters™ 2690 Separation Module, Waters Corporation
- Waters™ 996 PDA detector, Waters Corporation
- Analüütilised kaalud BP211D, Sartorius AG
- pH-meeter GC 840, Schott-Geräte GmbH;
- Ultrahelivann Finnsonic W-181-TL-T, OY Ultra Sonic Finland Ltd.

### 3.3 Kasutatud tarkvara ja arvutusmeetodid

Selles alajaotuses antakse ülevaade kasutatud tarkvarast, pidades eeskätt silmas määramatuse arvutamise seotud aspekte.

#### 3.3.1 GUM Workbench

Määramatuse arvutused viidi läbi programmiga GUM Workbench (versioon 1.3 TrainMiC, edaspidi GWB). Selle programmi ja tema võimaluste detailne kirjeldus on toodud viites 32. Liitstandardmääramatuse  $u_c(y)$  arvutus selle programmiga toimub vastavalt ISO GUM meetodile [1] ning baseerub võrrandil 13:

$$u_c(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^n \left( \frac{\partial y}{\partial x_i} u(x_i) \right)^2 + 2 \cdot \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n r(x_i, x_j) \cdot \frac{\partial y}{\partial x_i} u(x_i) \cdot \frac{\partial y}{\partial x_j} u(x_j)} \quad (13)$$

kus  $y$  on väljundsuurus ning  $x_i$  (ja  $x_j$ ) on sisendsuurused. Ruutjuute all olev teine liige tuleb kasutusse ainult sel juhul, kui mõne sisendsuuruste paari vahel esineb korrelatsioon, kusjuures  $r(x_i, x_j)$  on vastav korrelatsioonikoefitsient. Laiendmääramatus  $U(y)$  leitakse korrutades liitstandardmääramatus läbi katteteguriga, võttes arvesse tulemuse efektiivset vabadusastmete arvu:

$$U(y) = u_c(y) \cdot k \quad (14)$$

Efektiivsete vabadusastmete arv leitakse vastavalt allikas 32 toodud lähenemisviisile, mis kujutab endast ISO GUM jaoks soovitud Welch-Satterthwaite meetodi [1] modifikatsiooni. Sisendsuuruste panused tulemuse määramatusse leitakse vastavalt võrrandile 15.

$$\%(x_j) = \frac{\left( \frac{\partial y}{\partial x_j} u(x_j) \right)^2}{\sum_i \left( \frac{\partial y}{\partial x_i} u(x_i) \right)^2} \cdot 100\% \quad (15)$$

Et paremini mõista lisades 3 ja 4 toodud määramatuse arvutusnäiteid, on alljärgnevalt kirjeldatud GWB mõned omadused:

**Sisend- ja vahesuurused ning väljundsuurus.** Suurust, mis on mõõtmise tulemuseks, nimetatakse väljundsuuruseks ehk tulemuseks (*output quantity, result*). Suurused, millele kasutaja saab omistada väärtused ning määramatused, on sisendsuurused (*input quantity*). Matemaatilise mudeli võib GWB programmis kirja panna ühe võrrandina, et see sisaldabki vaid tulemust ja sisendsuursi. Vähegi keerukamate mõõtmiste korral on aga märksa otstarbekam esitada matemaatiline mudel paljude väiksemate võrranditena kasutades vahesuursi. Suursi, mis arvutatakse sisendsuurustest (ja millele seega ei ole võimalik vahetult omistada ei väärtust ega ka määramatust) ning mida kasutatakse edasi tulemuse arvutamiseks nimetatakse vahesuurusteks ehk vahetulemusteks (*interim quantity, interim result*).

**Suuruste-vahelise korrelatsiooni arvestamine.** Korrelatsioon on määramatuse analüüsis oluline ja sageli liiga vähest tähelepanu pälvinud aspekt [32,33]. GUM Workbench võimaldab sisendsuuruste vahelist korrelatsiooni arvesse võtta. Seda võimalust käesolevas töös ka kasutatakse, kuna mõnedel juhtudel on tugev alus arvata, et korrelatsioon on olemas (kuigi vastavate korrelatsioonikoefitsientide arväärtused tuleb enamasti võtta hinnangulised).

Hoopis tavalisem, kui sisendsuuruste omavaheline korrelatsioon on korrelatsioon vahesuuruste vahel. Korrelatsioon kahe vahesuuruse vahel tekib kohe, kui nende arvutamiseks kasutatakse osaliselt samu sisendsuursi. GWB hea omadus on see, et sellise korrelatsiooni võtab ta automaatselt arvesse ilma igasuguse täiendava vaevanägemiseta kasutaja poolt. Võib julgesti öelda, et suurem osa korrelatsiooni, mis määramatuse arvutustes tekib, on just sellise päritoluga. Kuna seda on väga lihtne arvesse võtta, siis on lihtne soovitus see, et kõik suurused tuleb üritada GWB-s sisendsuurusteks lahti kirjutada nii detailselt kui võimalik.

**Igal sisendsuurusel võib olla vaid üks määramatuse komponent.** See võib esmapilgul näida takistusena. Näiteks eeldatakse mõõtkolvi ruumala jaoks enamasti kolme määramatuse komponenti: mõõtkolvi ruumala erinevus nominaalsest ruumalast, mõõtkolvi märgini täitmise määramatuse ja temperatuuriefektist põhjustatud määramatuse. Praktilises kasutuses aga ei põhjusta see mingeid probleeme. Võttes näiteks sajamilliliitrise mõõtkolvi Lisas 3 toodud arvutusest, esitatakse selle ruumala GWB programmis vahesuurusena järgmiselt:

$$V_{100} = V_{100\_cal} + V_{100\_fill} + V_{100\_temp} \quad (16)$$

Vahesuuruse  $V_{100\_cal}$  sisaldab kolvi ruumala arväärtusena ja tema määramatuseks on kolvi kalibreerimise määramatuse. Suuruste  $V_{100\_fill}$  ja  $V_{100\_temp}$  arväärtused on nullid ja nende määramatusteks on vastavalt täitmise määramatuse ja temperatuuriefektist põhjustatud määramatuse. Sellisel moel saab Suuruse  $V_{100}$  arväärtuseks kolvi ruumala arväärtus ja tema määramatuseks selle ruumala liitstandardmääramatuse, mis koosneb kolmest ruuteskirja järgi liidetud komponendist, just nii, nagu ongi taotletud.

### 3.3.2 Microsoft Excel

Programmi MS Excel kasutati meetodi valideerimise andmete töötlemisel. Selle programmi üldised omadused ja lihtsamad statistilised võimlused (standardhälve, lineaarne regressioon jne) on hästi teada ja siinkohal keskendume vaid

dispersioonanalüüsi (*Analysis of Variance*, ANOVA) meetodile, mida valideerimisandmete töötlemisel põhiliselt kasutati [34,35]. See on tehnika, mille abil on võimalik mingi suuruse korduva, teatud süsteemi järgi korraldatud, mõõtmise tulemustest saada andmeid erinevate mõjurite poolt põhjustatud dispersiooni kohta. Teiste sõnadega – on võimalik summaarne dispersioon (SS) lahutada erineva päritoluga komponentideks:

$$SS = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{n_i} (y_{ij} - \bar{y})^2 \quad (17)$$

$$SS = SS_{\text{within}} + SS_{\text{between}} \quad (18)$$

$$SS_{\text{within}} = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2 \quad (19)$$

$$SS_{\text{between}} = \sum_{i=1}^a n_i (\bar{y}_i - \bar{y})^2 \quad (20)$$

kus  $a$  – gruppide arv  
 $n$  – grupis olevate liikmete arv  
 $y_{ij}$  – üksikmõõtmise väärtus  
 $SS_{\text{within}}$  – grupisisene dispersioon  
 $SS_{\text{between}}$  – gruppidevaheline dispersioon

$$\text{Summaarse dispersiooni vabadusastmete arv } df = \sum n_i - 1 \quad (21)$$

$$\text{Grupisisene vabadusastmete arv } df_{\text{within}} = \sum n_i - a \quad (22)$$

$$\text{Gruppidevaheline vabadusastmete arv } df_{\text{between}} = a - 1 \quad (23)$$

Grupisisene standardhälve ( $s_{\text{within}}$ ), mis iseloomustab korduvuse standardmääramatust leitakse järgmiselt:

$$s_{\text{within}} = \sqrt{\frac{SS_{\text{within}}}{df_{\text{within}}}} \quad (24)$$

Gruppidevaheline standardhälve ( $s_{\text{between}}$ ), mis omakorda iseloomustab triivist tulenevat standardmääramatust leitakse järgmiselt:

$$s_{\text{between}} = \sqrt{\frac{\frac{SS_{\text{between}}}{df_{\text{between}}} - s_{\text{within}}^2}{\frac{n}{a}}} \quad (25)$$

Käesolevas töös kasutati dispersioonanalüüsi massi mõõtmise andmetest korduvuse ja triivi komponentide eraldamiseks ning tablettide simvastatiinisalduse

paralleelmõõtmistest tablettidevahelise varieeruvuse ja meetodi korduvuse komponentide eraldamiseks.

### **3.4 Analüüsimeetodi kirjeldus**

Simvastatiini kvantitatiivse sisalduse määramise meetod tablettides põhineb Euroopa farmakopöa [23] ja Ameerika Ühendriikide farmakopöa [25] simvastatiini monograafiates kirjeldatud analüüsimeetoditel.

Simvastatiini identifitseerimiseks võrreldakse simvastatiini piigi retentsiooniaegasid ja ning diodrivi detektori abil saadud spektreid proovi ja standardlahuse süstimisel saadud kromatogrammidel (vt lisa 1).

Simvastatiini kvantitatiivne sisaldus proovis leitakse kas ühe-punkti kalibreerimise või kalibreerimisgraafiku meetodil.

Meetodi valideerimisandmed on toodud lisa 1.

#### **3.4.1 Lahuste valmistamine**

##### **3.4.1.1 0.1% fosforhappe lahus (V/V)**

1.0 ml fosforhapet 85% (m/m) lahjendatakse 1000 ml mõõtkolvis veega, kolb täidetakse sama lahustiga.

##### **3.4.1.2 Mobiilfaas A**

Valmistatakse atsetonitriili ja 0.1% fosforhappe lahus (V/V) segu vahekorras 50:50 (V/V).

##### **3.4.1.3 Mobiilfaas B**

1.0 ml fosforhapet 85% (m/m) lahjendatakse 1000 ml mõõtkolvis atsetonitriiliga, kolb täidetakse sama lahustiga.

##### **3.4.1.4 Solvendisegu simvastatiini lahustamiseks (edaspidi solvendisegu)**

Umbes 1.4 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  viiakse 1000 ml mõõtkolbi. Sool lahustatakse ja kolb täidetakse veega. Saadud lahuse pH viiakse fosforhappega 4.0-ni. Saadud lahus segatakse atsetonitriiliga vahekorras 20:80 (V/V).

##### **3.4.1.5 Simvastatiini standardlahused**

Kalibreerimisgraafiku koostamiseks valmistatakse 5 standardlahust [30, 31]. Selleks kaalutakse 50-ml mõõtkolbidesse vastavalt 20, 30, 40, 50 ja 60 mg simvastatiini standardainet (täpsed kogused on toodud lisades 2-4). Simvastatiin lahustatakse ja kolb täidetakse solvendiseguga. Ühe-punkti kalibratsiooni korral kasutati kolmanda lahusega tehtud mõõtmiste andmeid.

##### **3.4.1.6 Proovilahus**

8 "Simvastatiin 10 mg tabletti" viiakse 100 ml mõõtkolbi. Lisatakse umbes 4 ml vett, kolbi loksutatakse kuni tablettide kate "koorub maha". Seejärel lisatakse umbes 80 ml solvendisegu ning kolb asetatakse 15 minutiks ultrahelivanni. Lõpuks kolb täidetakse solvendiseguga.

Lahus filtreeritakse läbi ühekordse 0.45  $\mu\text{m}$  poori läbimõõduga süstlafiltritri (Millipore Millex-LCR 13 mm/0.45) ja viiakse üle kromatograafi viaali.

### 3.4.1.7 Lahus süsteemi valideerimiseks

Umbes 1 mg simvastatiini standardainet ja 1 mg lovastatiini tööstandardainet kaalutakse 50-ml mõõtkolbi. Ained lahustatakse ja kolb täidetakse solvendiseguga.

### 3.4.2 Kromatograafiline süsteem

Analüütiline kolonn: Prodigy ODS (3), 30 x 4.60 mm,  $d_p = 3 \mu\text{m}$  (Phenomenex) (ID RP19-33)

Eelkolonn: ODS ( $C_{18}$ ), 4 x 3.0 mm (Phenomenex)

Temperatuur:  $(20 \pm 4)^\circ\text{C}$

Detektori (diod-rivi detektor) analüütilise lainepikkusena kasutati 238 nm. Analüüdi identiteedi täiendavaks kinnitamiseks registreeriti lisaks ka UV spekter lainepikkuste vahemikus 200-300 nm.

Süsti ruumala: 10  $\mu\text{l}$ ;

Elueerimisel kasutati gradiendiprogrammi, mis on toodud Tabelis 2.

**Tabel 2. Kasutatud gradiendiprogramm.**

Aeg, min	Mobiilfaas A, %	Mobiilfaas B, %	Voolukiirus, ml/min
0.0	100	0	3.0
4.5	100	0	3.0
4.6	95	5	3.0
8.0	25	75	3.0
11.5	25	75	3.0
11.6	100	0	3.0
13.0	100	0	3.0

## 3.5 Määramatuse hindamine

Mõõtemääramatuse hindamine ISO GUM meetodil koosneb järgmistest etappidest:

1. Mõõtesuuruse defineerimine
2. Matemaatilise mudeli koostamine
3. Määramatuse allikate identifitseerimine
4. Määramatuse komponentide hindamine
5. Liitstandardmääramatuse leidmine ja tulemuse esitamine

### 3.5.1 Mõõtesuuruse defineerimine

Mõõtesuuruse definitsioonile pööratakse mõõtmiste tegemisel sageli liiga vähe tähelepanu. Käesolevas töös demonstreeritakse, et mõõtesuuruse konkreetne defineerimine on korrektse tulemuse andmiseks ülimalt oluline.

Kasutatud simvastatiini määramismeetodi kohta on võimalik rakendada kolme erinevat mõõtesuuruse definitsiooni, mida võib kirja panna selliselt:

1. Mõõtesuuruseks on vahetult mõõtmise all olnud 8 tableti keskmine simvastatiini-sisaldus milligrammides tableti kohta ( $C_{SVT}$ , mg/tab).

2. Mõõtesuuruseks on kogu partii ulatuses tableti keskmine simvastatiini-sisaldus milligrammides tableti kohta ( $C_{SVT}$ , mg/tab).
3. Mõõtesuuruseks on kogu partii ulatuses ühe suvaliselt valitud tableti simvastatiini-sisaldus milligrammides tableti kohta ( $C_{SVT}$ , mg/tab).

Need definitsioonid on sarnased, kuid pole identsed. Esimese definitsiooni korral läheb määramatuse arvutamisel arvesse ainult analüüsimeetodist tingitud määramatus. Teise ja kolmanda definitsiooni korral läheb lisaks analüüsimeetodist tingitud määramatusele arvesse ka määramatus, mis on tingitud simvastatiini sisalduse varieeruvusest tablettides. Üldistatult vaadeldes vastab see lisanduv määramatus sisuliselt proovivõtmise määramatusele: suurest tablettide üldkogumist võetakse analüüsiks piiratud kogus tablette – proov.

Käesoleva töö eesmärgiks on eeskätt just analüüsimeetodist tuleneva määramatuse uurimine. Samuti, vastavalt OMCL (*Official Medicines Control Laboratories* - ametlikud ravimite kvaliteedikontrolli laborid) määramatuse hindamise alasele raamdokumendile ei ole proovi võtmine ega proovivõtu kvaliteedi eest vastutamine ravimi kvaliteedikontrolli labori ülesanne (tsiteerides [36]: *It should be noted that sampling, which may introduce a high degree of uncertainty, is not the responsibility of an OMCL and therefore results reported only relate to the specific sample*). Samas aga on määramatuse analüüsi ja määramatuse allikate kaalude jaotuse võrdlus nende kolme erineva definitsiooni vahel praktilisest seisukohast väga huvipakkuv. Seetõttu kasutame paralleelselt kõiki kolme definitsiooni.

### 3.5.2 Matemaatiline mudeli koostamine

Kui analüüdi kontsentratsioonide  $C_1 .. C_n$  ja vastavate analüüsiseadme näitude (käesolevas töös kromatogrammilt leitud piigi pindalad)  $A_1 .. A_n$  vahel on lineaarne sõltuvus, võime regressioonisirge võrrandi kirjutada järgmisel kujul:

$$A_i = C_i \cdot b_1 + b_0 \quad (26)$$

- kus  $A_i$  – regressioonisirge  $i$ -ndale punktile vastava piigi pindala [AU]  
 $C_i$  - regressioonisirge  $i$ -ndale punktile vastav kontsentratsioon [mg/ml]  
 $b_0$  – regressioonisirge algordinaat (*Intercept of the calibration line*) [AU]  
 $b_1$  – regressioonisirge tõus (*Slope of the calibration line*) [AU·ml/mg]

Regressioonisirge parameetrid leitakse järgmiste võrrandite kaudu:

$$b_0 = \frac{\bar{A} \cdot \sum_i C_i^2 - \bar{C} \cdot \sum_i C_i A_i}{\sum_i C_i^2 - n \cdot \bar{C}^2} \quad (27)$$

$$b_1 = \frac{\sum_i A_i C_i - n \cdot \bar{A} \cdot \bar{C}}{\sum_i C_i^2 - n \cdot \bar{C}^2} \quad (28)$$

- kus  $\bar{A}$  - punktide  $A_i$  aritmeetiline keskmine  
 $\bar{C}$  - punktide  $C_i$  aritmeetiline keskmine  
 $n$  - punktide arv regressioonisirgel

Kui uuritava lahuse korral seadme näit on  $A$ , siis analüüdi kontsentratsiooni  $C$  uuritavas lahuses võib leida järgmiselt:

$$C = \frac{A - b_0}{b_1} \quad (29)$$

### 3.5.2.1 Ühe-punkti kalibreerimise meetod

$$C_{SVT} = \frac{A_{\text{sample}} \cdot C_{\text{std}} \cdot V_{100}}{A_{\text{std}} \cdot n_{\text{tab}} \cdot R} \quad (30)$$

$$C_{\text{std}} = \frac{m_{\text{std}} \cdot P_{\text{std}}}{V_{50} \cdot 100}$$

- kus  $C_{SVT}$  – simvastatiini sisaldus uuritavates tablettides (*Content of simvastatin in Simvastatin 10 mg tablets*) [mg/tab]  
 $A_{\text{sample}}$  – simvastatiini piigi pindala proovi lahuses (*Peak area of the sample solution*) [AU]  
 $A_{\text{std}}$  – simvastatiini piigi pindala standardlahuses (*Peak area of the standard solution*) [AU]  
 $C_{\text{std}}$  – simvastatiini standardlahuse kontsentratsioon (*Concentration of the calibration standard solution*) [mg/ml]  
 $V_{100}$  – proovilahuse ruumala (*Volume of the sample solution*) [ml]  
 $R$  – analüüsimetodi saagis (*Recovery*) [ühikuta]  
 $n_{\text{tab}}$  – tablettide hulk, millest valmistati proovilahus (*Number of the tablets taken for preparation of the sample solution*) [tab]  
 $m_{\text{std}}$  – simvastatiini standardaine mass standardlahuses (*Mass of the Simvastatin CRS taken for preparation of the standard solution*) [mg]  
 $V_{50}$  – standardlahuse ruumala (*Volume of the standard solution*) [ml]  
 $P_{\text{std}}$  – simvastatiini standardaine puhtus (*Purity of the Simvastatin CRS*) [%]  
 $100$  – teisendusfaktor [%]

### 3.5.2.2 Viit punkti sisaldava kalibreerimisgraafiku meetod

$$C_{SVT} = \frac{(A_{\text{sample}} - b_0) \cdot V_{100}}{b_1 \cdot n_{\text{tab}} \cdot R} \quad (31)$$

- kus  $C_{SVT}$  – simvastatiini sisaldus uuritavates tablettides (*Content of simvastatin in Simvastatin 10 mg tablets*) [mg/tab]  
 $A_{\text{sample}}$  – simvastatiini piigi pindala proovi lahuses (*Peak area of the sample solution*) [AU]

$V_{100}$  – proovilahuse ruumala (*Volume of the sample solution*) [ml]  
 $R$  – analüüsimeetodi saagis (*Recovery*) [ühikuta]  
 $n_{\text{tab}}$  – tablettide hulk, millest valmistati proovilahus (*Number of the tablets taken for preparation of the sample solution*) [tab]  
 $b_0$  – regressioonisirge algordinaat (*Intercept of the calibration line*) [AU]  
 $b_1$  – regressioonisirge tõus (*Slope of the calibration line*) [AU·ml/mg]

Regressioonisirge parameetrid  $b_0$  ja  $b_1$  arvutatakse valemite 27 ja 28 järgi, kus:

$$\sum_{i=1}^5 c_i \cdot A_i = c_1 \cdot A_1 + c_2 \cdot A_2 + c_3 \cdot A_3 + c_4 \cdot A_4 + c_5 \cdot A_5 \quad (32)$$

$$\sum_{i=1}^5 c_i^2 = c_1^2 + c_2^2 + c_3^2 + c_4^2 + c_5^2 \quad (33)$$

$$c_i = \frac{m_i \cdot P_{\text{std}}}{V_{50} \cdot 100} \quad (34)$$

kus  $C_i$  –  $i$ -nda kalibreerimislahuse kontsentratsioon (*Concentration of the calibration standard solution*) [mg/ml]  
 $m_i$  –  $i$ -nda kalibreerimislahuse valmistamiseks võetud simvastatiini standardaine mass (*Mass of the Simvastatin CRS taken for preparation of the calibration standard solution*) [mg]  
 $P_{\text{std}}$  – simvastatiini standardaine puhtus (*Purity of the Simvastatin CRS*) [%]  
 100 – teisendusfaktor [%]

Võrrandid 30 ja 31 koos abivõrranditega on matemaatiliseks mudeliks mõõtesuuruse definitsiooni 1 korral (vt alajaotus 3.5.1). Definitsioonide 2 ja 3 korral tuleb aga nendele võrranditele lisada lisaliige, mis võtab arvesse tablettidevahelist varieeruvust. Sellise sõltumatu abiliikme sissetoomine on õigustatud, sest tablettidevaheline varieeruvus on ilmselgelt täiesti sõltumatu analüüsimeetodi toimimisest ja määramatuse allikatest.

Seega definitsioonide 2 ja 3 jaoks avalduvad põhivõrrandid alljärgnevalt:

$$C_{\text{SVT}} = \frac{A_{\text{sample}} \cdot V_{100}}{A_{\text{std}} \cdot V_{50} \cdot n_{\text{tab}} \cdot R} + C_{\text{SVT\_between\_tab}} \quad (35)$$

$$C_{\text{SVT}} = \frac{(A_{\text{sample}} - b_0) \cdot V_{100}}{b_1 \cdot n_{\text{tab}} \cdot R} + C_{\text{SVT\_between\_tab}} \quad (36)$$

Lisaliige  $C_{\text{SVT\_between\_tab}}$  on defineeritud selliselt, et tema arvvärtus on null ( $C_{\text{SVT\_between\_tab}} = 0$ ) ja tema standardmääramatus avaldub tablettidevahelise simvastatiini sisalduse varieeruvuse standardhälvena ( $s_{\text{between\_tab}}$ ). Seejuures definitsiooni 2 korral on see vastava aritmeetilise keskmise standardhälve:

$$u(C_{\text{SVT\_between\_tab}}) = \frac{s_{\text{between\_tab}}}{\sqrt{n}} \quad (37)$$

kus  $n$  - tablettidevahelise simvastatiini sisalduse varieeruvuse määramisel uurimiseks võetud tablettide arv

Definitsiooni 3 korral on vastav standardmääramatus võrdne üksikmõõtmise standardhälbega:

$$u(C_{\text{SVT\_between\_tab}}) = s_{\text{between\_tab}} \quad (38)$$

Sedalaadi lähenemisviis on täiendavate määramatuse allikate arvessevõtmiseks küllaltki laialt levinud [1]. Muuhulgas on seda näiteks kasutatud  $pK_a$  väärtuste [37] ja lahustunud hapniku sisalduse [38] määramatuse arvutamisel.

### 3.5.3 Määramatuse allikate identifitseerimine

#### Simvastatiini standardaine mass $m_i$ :

Massi määramatus tuleneb kaalumise protseduurist. Kaalumise määramatuse komponendid on:

- (1) Kaalumise korduvusest tingitud määramatus (*Repeatability component of uncertainty of mass  $m_i$* ),  $u(m_{i\text{-rep}})$  [mg];
- (2) Kaalu parameetrite triivist tingitud määramatus (*Drift component of uncertainty of mass  $m_i$* )  $u(m_{i\text{-drift}})$  [mg];
- (3) Digitaalse kaalu näidu ümardamisest tingitud määramatus (*Rounding component of uncertainty of mass  $m_i$* ),  $u(m_{i\text{-round}})$  [mg];
- (4) Aerostaatilise parandi määramatus (*Air buoyancy component of uncertainty of mass  $m_i$* ),  $u(m_{i\text{-buoyancy}})$  [mg];
- (5) Elektrostaatilistest häiretest tingitud määramatus (*Electrostatic component of uncertainty of mass  $m_i$* ),  $u(m_{i\text{-electrost}})$  [mg];

#### Simvastatiini standardaine puhtus $P_{\text{std}}$ :

Standardaine puhtus saadakse standardainega kaasas olevast sertifikaadist.

#### Lahuste ruumalad $V_{50}$ ja $V_{100}$ :

Lahuse ruumala määramatuse komponendid on:

- (1) Mõõtkolvile omistatud ruumala määramatus (*Calibration component of uncertainty*),  $u(V_{\text{cal}})$  [ml];
- (2) Mõõtkolvi täitmise määramatus (*Filling component of uncertainty of volume*),  $u(V_{\text{fill}})$  [ml];
- (3) Temperatuuriefektist tingitud määramatus (*Uncertainty component of volume due to temperature difference from 20°C*),  $u(V_{\text{temp}})$  [ml];

#### Piikide pindalad $A_{\text{proof}}$ ja $A_{\text{std}}$ :

Kontsentratsioonitundlike detektorite puhul sõltub analüüdi piigi pindala ( $A$ ) detektori tundlikkuses ( $S_c$ ), sissesüstitava analüüdi massist ( $m$ ) ja mobiilfaasi voolukiirusest ( $F$ ) järgmiselt [6, 13]:

$$A = \frac{S_c \cdot m}{F} \quad (39)$$

Sissesüstitava analüüdi mass  $m$ :

- (1) Sissesüstitamise korduvus;
- (2) Proovi ülekannet eelmisest süstist (*Cross contamination*);
- (3) Sissesüstitatud ruumala temperatuuriefekt.

Mobiilfaasi voolukiirus  $F$ :

- (4) Eluendi voolukiiruse varieeruvus;
- (5) Eluendi koostise varieeruvus;
- (6) Kolonni temperatuuri varieeruvus.

Detektori tundlikkus  $S_c$ :

- (7) Neelduvuse näidu korduvus ja triiv.
- (8) Detektori lainepikkuse korratavus ja õigsus.
- (9) Lahustunud hapniku sisaldus eluendis
- (10) Piikide integreerimisest tulenev määramatus (*Integration uncertainty component of the sample/standard peak area*),  $u(A_{\text{sample-integr}})$  ja  $u(A_{\text{std-integr}})$  [AU].
- (11) Kalibreerimisgraafiku mittelineaarsusest tingitud määramatus (*Uncertainty component of the sample peak area that takes into account the slight non-linearity of the calibration graph*),  $u(A_{\text{sample-nonlin}})$  [AU].

### Saagis $R$ :

Kuna käesolevas töös esitatakse tulemus saagise suhtes korrigeeritult [40], siis on saagise määramatus automaatselt tulemuse määramatuse üheks allikaks. Saagise väärtus alla 1 väljendab eeskätt proovi ettevalmistusmeetodi ebatäiuslikkust – võimetust kogu analüüti proovist eraldada, samuti analüüdi võimalikku lagunemist proovi ettevalmistuse või analüüsi käigus ning proovi maatriksi võimalikku mõju kalibreerimisgraafiku tõusule. Saagise väärtus on vahel ka üle ühe. See võib olla põhjustatud meetodi piiratud selektiivsusest – mõni maatriksi komponent käitub analüüsimeetodi suhtes kui analüüt või siis maatriksi võimalikust muust mõjust kalibreerimisgraafiku tõusule.

Kuna käesolevas analüüsiks võetakse terved tabletid, mis tervelt ka ära lahustatakse, siis langeb ära üks põhilisi faktoreid, mis ekstraheerimist sisaldavate analüüsimeetodite puhul sageli põhjustab  $R$  suure määramatuse ja arväärtuse märgatavalt alla 1: proovist analüüdi ebatäielik ekstraheerimine/väljalahustamine. Saagise määramine abil on siiski hädavajalik selleks, et võtta vajadusel arvesse ülejäänud süstemaatilisi efekte, mida on ülal mainitud.

Saagise määramatuse allikad on järgmised:

- (1) Meetodi saagise korduvus. See korduvus sisaldab endas proovist analüüdi eraldamise efektiivsuse varieeruvust. See varieeruvus tuleneb analüüsi teostaja võimetusest proovi ettevalmistust iga kord perfektselt sama moodi läbi viia. Saagise määramise meetoditest usaldusväärseima saagise hinnangu saab üldiselt sel moel, et, määrata saagis sertifitseeritud referentsmaterjali analüüsimisel [41]. Kahjuks ei ole sobivat referentsmaterjali saada. Seetõttu viidi käesolevas töös saagise määramine läbi spaikimis- e. rikastamiskatsete abil.<sup>5</sup>
- (2) Spaikimisel lisatud simvastatiini ja tabletti juba olemas olnud simvastatiini erinev käitumine. Selle määramatuse allika hindamiseks puudub võimalus, kuna ei ole võimalik rikastada tabletti ennest – saab rikastada vaid tableti lahust. Samas, ei ole oodata, et see määramatuse allikas omaks märkimisväärset kaalu, sest proovi lahustamiseks kasutatavas solvendisegus on 80% atsetonitriili ja simvastatiin lahustub selles hästi. Lisaks jääb ka tablettist vaid väga väike kogus lahustumata. Põhiliselt aga tekivad erinevused käitumises just sel juhul, kui proovist jääb lahustumata suur osa ja/või analüüt ei lahustu kasutatavas lahustis väga hästi. Seega võib selle määramatuse allika suhteliselt julgesti vaatluse alt välja jätta.
- (3) Oluliseks määramatuse allikaks, mis olenevalt analüüdist võib esineda või mitte, on analüüdi võimalik osaline lagunemine või lendumine peale lahusesse viimist. Käesolevas töös uuriti seda võimalust valideerimise käigus ning leiti, et kui analüüs teha samal päeval, siis on see efekt väga väike. Kuna seda ei olnud võimalik eraldada kromatograafilise süsteemi enda parameetrite triivist, siis on need efektid võetud koos arvesse analüüdi piigi pindala määramatuse juures.
- (4) Määramatus on omane ka saagise arväärtuse määramise meetodile. Kuna saagise määramine on samamoodi mõõtmine, siis selle tulemusel on definitsiooni järgi määramatus. See määramatus võib mõnikord olla küllalt oluline ja jääb paratamatult saagise määramatuse üheks komponendiks.

### 3.5.4 Määramatuse komponentide hindamine

Lisaks siin alajaotuses toodud informatsioonile on määramatuse hinnangute saamine valideerimisandmetest esitatud Lisas 2. Täielikud andmed erinevate komponentide määramatuste kohta on esitatud määramatuse arvutuste väljatrukkides Lisades 3 ja 4.

#### Simvastatiini standardaine mass $m_i$ :

Massi määramatus tuleneb kaalumise määramatusest. Antud juhul leitakse aine mass kahe kaalumise vahest: kõigepealt asetatakse kaalukausile mõõtkolb, kaal tareeritakse. Seejärel viiakse mõõtkolbi kaalutav aine registreeritakse aine mass.

- (1) Kaalumise korduvusest tingitud määramatus. Kaalumise korduvusest tuleneva määramatuse väärtuse oleks võinud võtta ka iga-aastase kaalude kalibreerimistunnistusest. Et aga võimalikult täpselt järgida realselt kasutatavat kaalumise protseduuri, kasutati kaalumise korduvuse määramiseks tareerimisvihti ja kontrollvihti massiga. Tareerimisviht asetati kaalualusele ja kaal tareeriti. Seejärel asetati kontrollviht tareerimisvihi peale ja kaalu näit registreeriti. Kirjeldatud katse viidi läbi kolme tunni jooksul, kusjuures iga tund määrati seitse

<sup>5</sup> Käesolevas töös kasutame traditsioonilise väljendi "spaikimine" asemel eelistatult eesti keeles välja pakutud vastet "rikastamine".

korda kontrollvihi mass. Kaalumise andmetest leiti dispersioonanalüüsi (ANOVA) meetodi abil kaalumise korduvuse ja triivi väärtused (vt lisa 2)

Kaalumise korduvuse standardmääramatuseks saadi:  $u(m_{i\text{-drift}}) = 0.0196$  mg.

Kalibreerimislabori poolt väljastatud kalibreerimistunnistusel on korduvusest tingitud määramatuse komponendi väärtus 0.01 mg. Selline kahekordne väärtuste erinevus näitab, kui oluline on hinnata määramatuse komponente imiteerides võimalikult täpselt laboris realselt kasutatavaid tööprotseduure.

- (2) Triivist tingitud määramatuse leidmise protseduuri on kirjeldatud eelmises punktis.

Kaalude triivist tulenev standardmääramatus on:  $u(m_{i\text{-drift}}) = 0.0097$  mg

- (3) Digitaalse kaalu näidu ümardamisest tingitud määramatus:  $u(m_{i\text{-round}})$  on pool kaalu näidu viimasest kohast ehk antud eksperimendis kasutatud kaalu puhul

0.005 mg (ristkülikjaotus). Seega  $u(m_{i\text{-round}}) = \frac{0.005\text{mg}}{\sqrt{3}} = 0.0029\text{mg}$

- (4) Aerostaatilise parandi määramatus. Enamasti keemilisel analüüsil aerostaatilist parandit ei kasutata ja selle parandi mittekasutamisest tingitud määramatust arvesse ei võeta. See on õigustatud, kui tulemus on antud "mass-massi-kohta"- või "mass-ruumala-kohta"-tüüpi ühikutes. Sellisel juhul taandub see parand enamasti praktiliselt välja. Käesoleva töö mõõtesuurus on sisuliselt defineeritud massiühikutes (tablettide arv on ühikuta suurus). Seetõttu on mõistlik aerostaatilise parandi arvestamine. See parand toob aga kaasa ka oma määramatuse, mis tuleb arvesse võtta.

- (5) Elektrostaatilistest häiretest tingitud määramatus. Kuna standardaine oli väga kuiv, siis esinesid selle kaalumisel küllaltki tülikad elektrostaatilised häired – massi näit muutus ajas (enamasti oli tegemist massi näidu vähenemisega aja jooksul) ja nii mõnelgi juhul ei olnud selge, millal ta on paika jäänud. See efekt ei allu hästi modelleerimisele ning seda oldi sunnitud arvesse võtma kogemusliku hinnangu abil. Eeldati, et tõeline mass asub ujumise piiride sees ja vaatlusandmetest leiti, et ujumise piirkonna maksimaalne laius oli konservatiivse hinnangu järgi  $\pm 0.5\%$  kaalutavast massist. See hinnang (eeldades ristkülikjaotust) võeti elektrostaatilistest häiretest põhjustatud määramatuse hinnanguks.

Summaarne massi standardmääramatus:

$$u(m_i) = \sqrt{u(m_{i\text{-rep}})^2 + u(m_{i\text{-drift}})^2 + u(m_{i\text{-round}})^2 + u(m_{i\text{-buoyancy}})^2 + u(m_{i\text{-electrost}})^2} \quad (40)$$

### Simvastatiini standardaine puhtuse $P_{\text{std}}$ määramatus $u(P_{\text{std}})$ :

EurPh simvastatiini standardis simvastatiini sisaldus  $99.4 \pm 0.6\%$  (ristkülikjaotus),

seega  $u(P_{\text{std}}) = \frac{0.6\%}{\sqrt{3}} = 0.35\%$

### Lahuste ruumalad $V_{50}$ ja $V_{100}$ :

Käesoleva töö eksperimentaalses osas kasutati A-klassi mõõtkolbe, mille ruumalad 20°C juures on  $50.00 \pm 0.06$  ml ja  $100.00 \pm 0.1$  ml

(1) Mõõtkolbidele omistatud ruumalade standardmääramused:

$$u(V_{50\text{-cal}}) = \frac{0.06\text{ml}}{\sqrt{3}} = 0.035\text{ml} \quad \text{ja} \quad u(V_{100\text{-cal}}) = \frac{0.1\text{ml}}{\sqrt{3}} = 0.058\text{ml}$$

(2) Mõõtkolvi täitmise määramatus. Kolvi hoolikal täitmisel ei eksita üldiselt rohkem kui  $\pm$  ühe tilga võrra. Samas, arvestades, et vahel on ka kolvi kaelal tilkasid, on ohutum hinnata see määramatus  $\pm 3$  tilka. Kui võtta ühe tilga ruumalaks 0.03 ml, siis mõõtkolvi täitmisest tulenev standardmääramatus  $u(V_{\text{fill}}) = \frac{0.09\text{ml}}{\sqrt{3}} = 0.052\text{ml}$

(3) Temperatuuriefektist tingitud määramatus. Temperatuuriefekt on kahesugune: temperatuur mõjutab nii kolvi mõõtmeid kui ka vedeliku tihedust. Temperatuuri mõju kolvi mõõtmetele on vedeliku tiheduse muutumisega võrreldes suhteliselt väike (u. 20 korda väiksem).

Kolvi kasutamisel ei erine labori temperatuur 20 °C-st rohkem kui  $\Delta t = \pm 4$  °C.

Vee soojuspaisumiskoeffitsient on  $\gamma_v = 2.1 \cdot 10^{-4}$  1/°C. Temperatuuriefektist

põhjustatud standardmääramatus avaldub järgmiselt:  $u(V_{\text{temp}}) = \frac{V_k \cdot \Delta t \cdot \gamma_v}{\sqrt{3}}$ .

Lahuste ruumalade summaarsed standardmääramused avalduvad seega:

$$u(V_{50}) = \sqrt{u(V_{50\text{-cal}})^2 + u(V_{50\text{-fill}})^2 + u(V_{50\text{-temp}})^2} \quad (41)$$

$$u(V_{100}) = \sqrt{u(V_{100\text{-cal}})^2 + u(V_{100\text{-fill}})^2 + u(V_{100\text{-temp}})^2} \quad (42)$$

### Piikide pindalade $A_{\text{proov}}$ ja $A_{\text{std}}$ määramused:

(1) Sissesüstimise korduvus – määrati eksperimentaalselt korduvus ( $A_{\text{std-rep}}$  ja  $A_{\text{sample-rep}}$ ), milles sisaldub ka sissesüstimise korduvus.

(2) Proovi ülekanne eelmisest süstist (*Cross contamination*). See on raskesti arvesse võetav määramatuse allikas, kuna selle arvvärtus sõltub eelmisest süstitud proovist, mis võib olla milline tahes. Käesolevas töös on eeskätt mindud seda teed, et on näidatud, et see efekt on tühine. See on tehtud nii, et kõik korduvuse määramised on tehtud kolmesüstiliste seeriade abil. Kui süstida sama lahust kolm korda järjest, siis oleks märkimisväärne proovi ülekanne näha esimese süsti pindala tuntava erinevusena kahe ülejäänud süsti pindaladest. Lisas 2 toodud andmetest on näha, et selline efekt puudub täiesti. Seega võib olla üsna julge, et proovi ülekande tõttu määramatust nimetamisväärselt sisse ei tule. Seda veendumust kinnitavad veel kaks kaalutlust:

a) Proovi ülekanne on probleemiks eeskätt juhul, kui süstitavaid lahuseid filtreeritakse *on-line*. Käesolevas töös aga kanti kõik lahused autosampleri viaalidesse filtreeritult ja HPLC süsteem neid enam täiendavalt ei filtreerinud. Filtri puudumine sisestus-süsteemis võimaldab selle palju efektiivsemalt läbi loputada.

b) Proovi ülekannet on eriti ohtlikuks määramatuse allikaks jälgede analüüsil.

Käesolevas töös määrati aga suhteliselt suuri analüüdi sisaldusi.

- (3) Sissesüstitud ruumala temperatuuriefekt.
- (4) Eluendi voolukiiruse varieeruvus.
- (5) Eluendi koostise varieeruvus.
- (6) Kolonni temperatuuri varieeruvus.
- (7) Neelduvuse näidu korduvus ja triiv.

Efekte 3-7 vaatlame koos. Need variatsioonid võivad olla kas lühiajalised või pikaajalised (triivi tüüpi). Käesolevas töös võetakse need efektid arvesse vastavalt kas piikide pindalade korduvuse või triivi määramiste abil. Mõlemat tüüpi katsed on tehtud nii proovilahusega kui ka standardlahusega (vt Lisa 2).

- (8) Detektori lainepikkuse korratavus ja õigsus.

Kuna kõik mõõtmised tehakse sama seadme peal ja kasutatav detektor on diodrivi-detektor (ei sisalda liikuvaid osi), siis on see määramatuse allikas vähe oluline. Lisaks saab selle allika kaal, niivõrd kuivõrd seda on, võetud arvesse korduvuse ja triivi määramatuse komponentide abil.

- (9) Lahustunud hapniku sisaldus eluendis.

See on salakaval ja sageli alahinnatud probleemide allikas vedelik-kromatograafilisel analüüsil. Samas võib lahustunud hapnik eluendis olla äärmiselt oluline faktor analüüsitulemuste kvaliteedi halvendamisel. Lahustunud hapnik neelab UV kiirgust lainepikkusel alla ca 210 nm ja kui detekteerimisel kasutada sellist madalat lainepikkust, siis võib eluendis lahustunud hapnik põhjustada baasijoonet fluktuatsiooni ja triivimist. Lisaks võib lahustunud hapnik reageerida analüüdi molekulidega. Kuna selline reaktsioon ei kulge kolonnis kuigi kontrollitult, siis põhjustab see tulemuste hüplemist ja triivimist. Iseäranis tõsine on olukord siis, kui tegemist on jälgede analüüsiga.

Käesolevas töös kasutatud kromatograafilisel süsteemil on *on-line* degasaator, mis peaks vähendama lahustunud hapniku sisalduse minimaalseks. Kasutatud detekteerimise lainepikkus on piisavalt pikk, et hapnik sellel lainepikkusel UV kiirgust ei neela. Tulemuste hüplemist ja triivi ei esine, mis on demonstreeritud valideerimisandmete abil (Lisa 2). Tulenevalt nendest kaalutlustest ei olnud alust lahustunud hapnikku määramatuse allikana eraldi arvesse võtta.

- (10) Piikide integreerimisest tulenev määramatus.

Piikide integreerimist ja määramatust selle juures on palju uuritud [13, 15, 16]. Selle määramatuse allikaga võetakse arvesse eeskätt piikide integreerimise algoritmi piiratud võimekust piigi õige alguse ja lõpu leidmisel (baasijoonet pikenduse joonistamisel) ning võimalike segajate piikide analüüdi piigiga osaliselt kattuvate piikide eraldamisel. Käesolevas töös on nende efektide arvessevõtmiseks kasutatud järgmist lähenemisviisi: Piike on integreeritud kahte moodi – ühel juhul piigi pindala selgelt alla hinnates ja teisel juhul selgelt üle hinnates (vt näide Lisas 1). Piigi tegelikult pindalaks võeti saadud kahe pindala keskmine ja määramatuse hinnanguks (ristkülikjaotusega) nende kahe pindala poolvahe.

Kalibreerimisgraafiku mittelineaarsusest tingitud määramatus. Kalibreerimisgraafiku mittelineaarsusest tingitud määramatus on mõnikord küllaltki oluline ja samas sageli unustatud määramatuse komponent. See on tegelikult tüüpiline süstemaatiline efekt, mida põhimõtteliselt oleks soovitatav korrigeerida. Samas oleks ainus loogiline korrigeerimise moodus mittelineaarse regressiooni kasutamine. See aga tõstaks

kõvasti meetodi keerukust ja kahandaks tema rakendatavust tava-analüüsilaborites. Samuti pole üldse selge, kas kalibreerimisgraafiku mittelineaarsusest tingitud määramatuse panus tulemuse määramatusse on sedavõrd suur, et selline korrigeerimine tooks kaasa tulemuse määramatuse märkimisväärset alanemist (käesoleva töö raames on võimalik seda hinnata, vt tulemuste arutelu alajaotus). Seetõttu on käesolevas töös mindud seda teed, et korrigeerimise asemel on võimalikku mittelineaarsust määramatuse panuste kaudu arvesse võetud. Seda on tehtud konservatiivsel moel: on kasutatud residuaalide analüüsi tulemusi ja määramatuse hinnanguks (piigi pindala dimensioonis) on võetud pluss-minus suurima residuaali väärtus. Detailid on toodud lisas 2. Residuaalide süstemaatiline käitumine näitab veenvalt, et mõningane mittelineaarsus tõesti esineb.

### Saagis $R$ :

Saagise leidmine rikastamiskatsetest [41] baseerub järgneval võrrandil:

$$R = \frac{\Delta m_{\text{found}}}{\Delta m_{\text{spiked}}} \quad (43)$$

kus  $\Delta m_{\text{spiked}}$  on proovile (või proovi lahusele) lisatud analüüdi mass [mg]  
 $\Delta m_{\text{found}}$  on analüüsi teel leitud analüüdi massi suurenemine proovis [mg]

Analüüti lisatakse lahuseks ja analüüsimeetodi tulemus saadakse piikide pindalade kaudu. Käesoleva meetodi korral leitakse saagis sellisest avaldisest:

$$R = \frac{(A_{\text{spiked}} - b_0) \cdot (V_{\text{sample}} + V_{\text{spike}}) - (A_{\text{nonspiked}} - b_0) \cdot V_{\text{sample}}}{b_1 \cdot C_{\text{spike}} \cdot V_{\text{spike}}} \quad (44)$$

kus  $V_{\text{sample}}$  - rikastatava proovi lahuse ruumala enne rikastamist [ml]  
 $V_{\text{spike}}$  - lisatud rikastamislahuse ruumala [ml]  
 $C_{\text{spike}}$  - lisatud rikastamislahuse kontsentratsioon [mg/ml]  
 $A_{\text{nonspiked}}$  - analüüdi piigi pindala proovi lahusest, mis on saadud enne rikastamist [AU]  
 $A_{\text{spiked}}$  - analüüdi piigi pindala, mis on saadud rikastatud proovi lahusest [AU]  
 $b_0$  - kalibreerimisgraafiku vabaliige [AU]  
 $b_1$  - kalibreerimisgraafiku tõus [AU·ml/mg]

Seda avaldist on määramatuse hindamisel vahetult raske kasutada, sest saagise korduvuse määramatus ei omistu vahetult ühelegi avaldises olevale suurusele. See omistub kahe pindala vahele, aga sellisena on teda ebamugav leida. Otstarbekam on teha nii, et määrata saagise arväärtused ( $R_0$ ) erinevatest rikastamiskatsetest ja kasutada nende standardhälvet saagise korduvuse standardmääramatuse hinnanguna ( $u(R_0) = s(R_0)$ ). Kõikidest ülejäänud avaldises 44 sisalduvatest parameetritest omavad saagise määramatusele märkimisväärset kaalu vaid piikide pindalad. Pindalade puhul ei lähe eraldi arvesse määramatuse korduvuse komponent, kuna see saab  $R_0$  korduvuses juba arvesse võetud. Samuti ei ole alust arvestada triivi komponenti, kuna mõõtmised on tehtud ajaliselt väga lähestikku. Küll aga tuleb arvesse võtta piikide integreerimise ja kalibreerimisgraafiku mittelineaarsuse määramatus. Kuna saagise määramine käib sisuliselt pindalade vahe kaudu (vabaliige  $b_0$  on väga väike), siis

tuleb arvestada seda, et need mõlemad efektid on teatud mõttes süstemaatilised ja osaliselt kompenseeruvad. Sisuliselt on kõige mõistlikum opereerida nii-öelda efektiivse piigi pindalaga  $A_{R\_eff} = A_{spiked} - A_{nonspiked}$  ja sellele pindalale omistada määramatuse komponendid sarnaselt teiste piikide pindaladega. Saadava efektiivse piigi pindala määramatuse haaramine saagise  $R$  määramatusse on kõige efektiivsemalt tehtav kasutades selleks koefitsienti  $f_{R\_eff}$ , mis on defineeritud selliselt, et tema arväärtus on 1 ja tema standardmääramatus on efektiivse piigi pindala  $A_{R\_eff}$  suhteline standardmääramatus. Selliselt toimides avaldub saagis  $R$  kasutatava mudeli seisukohalt järgmiselt:

$$R = R_0 \cdot f_{R\_eff} \quad (45)$$

Konkreetsed arvulised väärtused määramatuse omistamisel on näha Lisades 3 ja 4.

### 3.5.5 Liitstandardmääramatuse leidmine ja tulemuse esitamine

Määramatuse arvutamine on teostatud GUM Workbench programmi keskkonnas. Selle programmi väljatrüki formaat võimaldab esitada määramatuse arvutuse väga detailselt ja süstematiseeritult ning seda võimalust ongi käesolevas töös kasutatud. Määramatuse arvutus on ühe punkti kalibratsiooni ja kalibreerimisgraafiku meetodi puhul toodud programmi väljatrükkidena vastavalt lisades 3 ja 4.

## 4 Tulemused ja arutelu

Töö tulemusena on GWB keskkonnas loodud määramatuse hindamise protseduuride komplekt simvastatiini määramismeetodi erinevate variatsioonide jaoks. Kaks protseduuri on GWB failide väljatrükkide kujul toodud koos reaalsel andmetel baseeruvate arvutusnäidetega Lisades 3 ja 4. Väljatrükkid sisaldavad kõiki andmeid, mis on vajalikud määramatuse arvutuse reprodutseerimiseks kas siis GWB või mõne muu tarkvara abil. Protseduuri aluseks olev GWB fail on mugav ja võimas tööriist, mille abil saab uurida analüüsimeetodi käitumist. Määramatuse arvutuse ning tulemuste analüüsi koondtulemused on esitatud Tabelis 3. Mitmesuguste määramatuse allikate hindamise tulemused (kasutades ANOVA, kogutud standardhälbe jne. meetodeid) on toodud Lisas 2.

### 4.1 Määramatuse sõltuvus mõõtesuuruse definitsioonist

Vaatleme nüüd tulemuste sõltuvust mõõtesuuruse definitsioonist (vt alajaotus 3.5.1).

Definitsioonide 2 ja 3 järgi sisaldab mõõtesuuruse määramatus endas sisuliselt ka proovivõtu määramatust. Need definitsioonid eeldavad, et tablettidevahelise varieeruvuse määramiseks kasutada olnud tabletid esindavad kogu partiid. Partii all ei peeta siinjuures silmas mitte tehases toodetud partiid (mis on väga suur ja mille täielik esindamine laborisse toodud proovidega oleks selgelt ebareaalne) vaid käesolevaks uuringuks kasutada olnud partiid, mis koosnes ühtekokku 120 tablettist. Tulemustest tehtavad järeldused käesoleval juhul partii suurusel ei sõltu.

Tabelis 3 toodud andmetest on näha, et definitsioonide 1 ja 2 korral määramatus erineb vähe: määramatuse kasv tablettide varieeruvuse sissetoomise tagajärjel on alla 10%. See pole üllatav. Analüüsimeetodi tulemuse enda standardmääramatused on 1P ja 5P kalibreerimise korral vastavalt 0.126 ja 0.114 mg/tab, samas tablettidevahelise varieeruvuse standardhälve väljendatuna 8 tableti keskmise kohta on vaid 0.054 mg/tab (Vt tablettidevahelise varieeruvuse andmed Lisas 2). Tablettidevahelise varieeruvuse panus summaarsesse määramatusse on definitsiooni 2 korral küll märkimisväärne, aga kaugeltki mitte domineeriv määramatuse allikas.

Tugevalt erinev on aga olukord kolmanda definitsiooni korral: Määramatus on oluliselt suurem ning tablettidevahelisest varieeruvusest põhjustatud määramatus on selgelt domineeriv määramatuse allikas mõlema kalibreerimismeetodi juures. See tähendab seda, et analüüsimeetodi enda määramatuse panus tulemuse määramatusse on selges vähemuses võrreldes tablettidevahelise varieeruvuse standardhälbega, mis on 0.153 mg/tab. Kui jätta analüüsimeetodi määramatus üldse vaatluse alt välja ja eeldada, et kogu määramatus koosnebki vaid tablettidevahelise varieeruvuse määramatusest ning arvutada välja laiendmääramatus (kasutades vabadusastmete arvule 7 vastavat kattetegurit 2.43), saame 0.37 mg/tab, mis ei ole oluliselt madalam Tabelis 3 toodud määramatusest!

**Tabel 3. Määramatuse koondtabel mitmesuguste eksperimenditingimuste juures. Tablettidevahelist sisalduse erinevust arvesse ei võeta.**

Eksperimentaalsed tingimused ja tulemused <sup>a</sup>							
Mõõtesuurus	UTK	UTK	PK	PK	ÜT	ÜT	
Kalibreerimine	1P	5P	1P	5P	1P	5P	
Tulemus (mg/tab)	9.64	9.67	9.64	9.67	9.64	9.67	
Tulemuse laiendmääramatus (absoluutne ja suhteline) <sup>b</sup>							
$U$ (mg/tab)	0.25	0.23	0.27	0.25	0.42	0.41	
$U_{rel}$ (%)	2.6	2.4	2.8	2.6	4.3	4.2	
Efektiivne vabadusastmete arv <sup>c</sup>	2000	1300	260	190	19	16	
Kattetegur $k^c$	2.00	2.00	2.00	2.00	2.14	2.17	
Määramatuse komponendid <sup>d</sup>		Komponentide panused tulemuse määramatusse <sup>c</sup>					
$u(A_{sample\_rep})$	$A_{sample\_rep}$	3.0	3.9	2.6	3.2	1.2	1.4
$u(A_{sample\_drift})$	$A_{sample\_drift}$	10.1	12.9	8.5	10.5	4.1	4.6
$u(A_{sample\_integr})$	$A_{sample\_integr}$	3.4	4.4	2.9	3.6	1.4	1.6
$u(A_{sample\_nonlin})$	$A_{sample\_nonlin}$	18.8	5.7	15.9	4.7	7.6	2.0
$u(A_1) .. u(A_5)$	$A_1 .. A_5$	10.2	7.4	8.6	6.1	4.0	2.5
$u(P_{std})$	$P_{std}$	7.1	8.8	6.0	7.2	2.9	3.1
$u(R)$	$R$	41.1	50.8	34.7	41.5	16.6	18.0
<b>Kaalumised</b>		5.0	5.1	4.2	4.2	2	1.8
<b>Mahu mõõtmised</b>		1.3	1.0	1.1	0.6	0.7	0.6
$u(C_{SVT\_between\_tab})$	$C_{SVT\_between\_tab}$	—	—	15.5	18.4	59.5	64.4

<sup>a</sup> Mõõtesuurused (vt alajaotus 3.5.1) on tähistatud järgmiselt: UTK – uuritud tablettide keskmine, PK – partii keskmine, ÜT – sisaldus suvalises üksikus tablettis.

Kalibreerimismeetodid on tähistatud järgmiselt: 1P – ühe punkti kalibratsioon; 5P – lineaarne regressioon. <sup>b</sup>  $U$  on absoluutne ja  $U_{rel}$  on suhteline laiendmääramatus. Kõik määramatused on antud 95.45% usaldusnivool, mis vastab Normaaljaotuse  $k = 2$  tasemele. <sup>c</sup> Komponentide panused ja efektiivsed vabadusastmete arvud on leitud programmi GUM Workbench abil nagu on kirjeldatud alajaotuses 3.3.1.

Komponentide panused on esitatud protsentidena. <sup>d</sup> Vasakus veerus on tekstis kasutatud tähistused, paremas veerus on GUM Workbench arvutusfailis kasutatud tähistused.

See tulemus kinnitab konkreetsete arvutuste abil seda, et proovivõtt on üks kõige tõsisemaid määramatuse allikaid keemilisel analüüsil (tõsiduselt järgmine on enamasti proovi ettevalmistamine). Käesolev meetod on tegelikult veel väga heas olukorras, sest summaarne suhteline määramatus on 4-5%. Samas, kui on tegemist tõeliselt heterogeensete looduslike objektidega, nagu näiteks muld, võib proovidevaheline varieeruvus olla protsentide asemel kordades [43]. Sellisel juhul kaotab tulemuse määramatus igasuguse mõtte, kui mõõtesuuruse definitsiooni kaudu pole selgelt välja öeldud, mis on määramatuse hinnangusse kaasatud.

## **4.2 Määramatuse komponentide panuste analüüs erinevate eksperimentidiparameetrite korral**

Alljärgnevalt analüüsime Tabelis 3 toodud andmeid erinevate määramatuse komponentide panuste seisukohast ning nende panuste sõltuvusest eksperimentidingimustest.

### **4.2.1 Määramatuse komponentide panused: üldpilt**

Siinkohal vaatleme vaid definitsiooni 1 abil defineeritud mõõtesuurust. Definitsioonide 2 ja 3 korral on pilt sama, lihtsalt komponentide panused on proportsionaalselt väiksemad.

**Suure panuse määramatusse annab proovi ettevalmistamisest tulenev määramatus.** Mõõtemetodi määramatusest moodustab proovi ettevalmistamise määramatus olenevalt kalibreerimismeetodist 41.1 või 50.8%. Selline proovi ettevalmistamise määramatuse panus viitab mitte eriti keerulisele proovile (kuid on selge, et pole tegemist ka päris "lahuse analüüsiga"! ) ning suhteliselt kõrgele analüüdi sisaldusele.

**Vahetult instrumentaalmõõtmisega seotud etappide korduvusest tingitud määramatuse panus summaarsesse määramatusse on väike.** Vahetult mõõtmisega seotud etappideks loeme kõiki etappe peale proovi ettevalmistamise. Käesolevas mõõtmises ainsaks korduvusest põhjustatud määramatuse komponendiks, mis nimetamisväärselt kaalu omab, on proovi piigi pindala korduvus, mille panus summaarsesse määramatusse on 1P ja 5P kalibratsiooni korral vastavalt 3.0 ja 3.9%. Kõik teised korduvuse komponendid kokku annavad panuse alla 1%. Seega, lõviosa meetodi määramatusest annavad mitmesugused efektid, mis (vähemasti ühe päeva raames) käituvad süstemaatilistena.

Need andmed on väga hästi kooskõlas Lisas 2 toodud tablettide ebahütlusest põhjustatud määramatuse leidmise andmetega. Seal on tablettide ebahütlus ja mõõtemetodi korduvus ANOVA-analüüsi abil üksteisest eraldatud ja meetodi korduvus on sedavõrd väike, et summaarne standardhälve on praktiliselt tervikuna määratud tablettide ebahütluse poolt. Need tulemused kinnitavad varasemaid järeldusi selle kohta, et keemiliste mõõtmiste mõõtetulemuste summaarse määramatuse oluliseks vähendamiseks ei ole paljalt mõõtmise (ilma igakordse prooviettevalmistuseta) suurearvuline kordamine samal päeval enamasti tõhusaks meetodiks [37].

Sellest ei tule aru saada nii, et selline kordamine on mõttetu. Sugugi mitte! Päevasisene kordamine valideerib eksperimendisüsteemi (kromatograaf, lahused, mõõtnõud jne), aidates kinnitada, et mõõtmine on kontrolli all ja ei esine ebaselge päritoluga häireid. Viimased avalduvad sageli just paralleelmõõtmiste tulemuste mittekokkulangemise kaudu.

Märksa kaalukam on siiski mõõtmise kordamine sellisel moel, et iga kord korratakse algusest peale ka proovi ettevalmistust. Proovi ettevalmistusest tingitud määramatust võtab käesolevas meetodis arvesse saagis  $R$  ja selle panust summaarsesse määramatusse on suur, nagu ülalpool juba märgitud. Samas tuleb arvesse võtta, et sellisel juhul tuleb tulemuse määramatusse sisse ka proovi koostise varieeruvusest põhjustatud määramatus ja sisuliselt hakkab kehtima alajaotuses 3.5.1 toodud definitsioon 2. Seega on seda võimalik teha siis, kui eesmärgiks ongi sooritada mõõtmine vastavalt definitsioonile 2.

**Proovi lahuse instrumentaalmõõtmisest tuleneva määramatuse panus on märksa suurem, kui kõikide kalibreerimisgraafiku lahuste mõõtmisest tulenevate panuste summa.** 5P kalibratsiooni korral on see 26.9% vs 7.4%. See tulemus viitab selgelt sellele, et jõupingutusi meetodi parendamisel tuleb teha eeskätt proovi mõõtmise määramatuse alandamiseks (mõõtmiste kordamine selleni kahjuks ei vii, nagu eelmises lõigus näidati).

1P kalibratsiooni korral 35.3% vs 10.2%. 1P kalibreerimise puhul tuleb arvestada, et mittelineaarsuse määramatuse komponent, mis standardlahusel puudub, annab suure osa määramatuse panusest. Ilma selle komponendita oleksid proovi ja standardlahuse mõõtmise määramatuse panused võrreldavad.

**Kaalumise ja mahumõõtmisega seotud määramatuse komponentide panused on väikesed.** See on jälle küllaltki tavaline olukord keemilisel analüüsil, kui on tegemist vähegi sisukamate proovidega (st mitte lihtsalt lahuste analüüsimisega) ja kui ei esine ekstreemseid mahumõõtmisi või kaalumisi (eeskätt on siin silmas peetud väga väikeste vedelikumahtude täpset mõõtmist ja väga väikeste kaalutiste kaalumist). Tegelikult on kaalumise viieprotsendiline panus tulemuse määramatusse isegi veidi suurem kui tavaliselt. See tuleneb eeskätt kahest faktorist:

1. Kuna simvastatiini standardainet oli kasutada väga väikeses koguses, siis oli vaja kaaluda väikesi masse 20 .. 60 mg.
2. Kaalumisel esinesid tugevad elektrostaatilised häired. Selle kohta on täiendavalt juttu alajaotuses 4.2.3.

#### 4.2.2 Määramatus erinevate kalibreerimismeetodite korral

Analüüsil kasutati kahte erinevat kalibreerimismeetodit: ühe-punkti kalibreerimist (1P) ja viit punkti sisaldava kalibreerimisgraafiku meetodit (5P). Tabelis 3 toodud andmete abil on alljärgnevalt analüüsitud mõõtmismeetodi käitumist erinevate kalibreerimismeetodite korral.

Sama prooviga erinevaid kalibreerimismeetodeid kasutades saadud tulemused langevad omavahel väga hästi kokku: kaugelt paremini, kui võiks eeldada, vaadates nende tulemuste määramatusi. See on ootuspärane ja ei vihja sugugi sellele, et määramatus oleks üle hinnatud. Põhjuseks on see, et need tulemused on omavahel

väga tugevas korrelatsioonis – suurem jagu määramatuse allikaid mõjutab neid tulemusi täpselt samamoodi ja samas suunas.

Tulemusest on näha, et määramatus on 1P kalibreerimise puhul vaid natuke suurem kui 5P kalibreerimise puhul. Erinevus on aga väike ja kõigi tavaliste rakenduste seisukohalt võib need määramatused jämedates joontes samadeks lugeda. Olemasolevate GWB failide abil on võimalik imiteerida ka mittelineaarset kalibratsiooni. Selleks omistatakse määramatuse mittelineaarsuse komponendile väärtus null. Tulemusena alaneb definitsiooni 1 korral määramatuse väärtus 0.23 mg/tab väärtuseni 0.22 mg/tab. Nagu näha, on määramatuse muutus väga väike ja seega käesoleva analüüsi tingimustel pole mittelineaarse kalibratsiooni kasutamine otstarbekas.

Saadud tulemused toetavad ravimite kvaliteedikontrollil tavaks võetud ühe-punkti-kalibratsiooni kasutamist, kuid nad annavad ka tingimused, millal seda kasutada tohib:

1. Kalibreerimisgraafik peab olema lineaarne;
2. Kalibreerimisgraafiku telglõik peab olema nullilähedane.
3. Kalibreerimisgraafiku punktide korduvusest põhjustatud määramatus peab olema muude määramatuse allikatega võrreldes väikese kaaluga (st. punktid peavad olema väga heas lähenduses ühel sirgel).

Nende tingimuste täidetud-olemine peab kas olema ette usaldusväärset teada (kui meetod on pärit standardist või muust usaldusväärsest allikast) või siis tuleb see teha kindlaks meetodit kasutavas laboris valideerimise käigus! Seejuures on laboris valideerimine kindlasti kasulik ka standardmeetodi korral, sest meetodit kasutavas laboris erinevad määramise tingimused (aparatuur, reaktiivide margid jne) kindlasti mõnevõrra standardis toodutest. Valideerimise käigus tuleb kalibreerimisgraafik koostada niikuinii ja kui meetodit kasutatakse samal päeval, siis on igati mõistlik seda kalibreerimisgraafikut ka kvantiseerimisel kasutada. Kui aga meetodit kasutatakse rutiinmeetodina pika aja jooksul, siis võib rutiinselt kasutada ühe-punkti-kalibratsiooni ja vaid vahetevahel kontrolli mõttes kalibreerimisgraafik koostada. Võttes kokku: kalibreerimisgraafiku koostamine on igati mõistlik, aga seda eeskätt meetodi valideerimise seisukohalt. Kalibreerimisgraafiku kasutamisest ei maksa loota määramatuse märkimisväärset alanemist.

Analoogne on olukord sama lahuse mitmekordse süstimisega, nii standardlahus(t)e kui ka proovi lahuse süstemisel: korduvast süstimisest ei maksa loota määramatuse olulist alanemist, aga seda on siiski aeg-ajalt kasulik teha meetodi toimimise kontrolli jaoks. Kindlasti tuleb silmas pidada, et ülaltoodud tingimus 3 oleks täidetud! Vastasel korral see järeldus ei kehti.

Võib tunduda, et toodud järeldused lähevad vastuollu matemaatilise statistika ja kemomeetria põhitõdedega [45,46]. Peetakse ju üldiselt kalibreerimisgraafikut seda usaldusväärsemaks ja tulemust seda täpsemaks, mida rohkem on kalibreerimisgraafikul punkte. Siiski, siin vastuolu ei ole. Kalibreerimisgraafiku punktide hulk on kindlasti oluline sel juhul, kui nende punktide koordinaatide põhilised määramatuse allikad on korduvuse-tüüpi, ehk siis juhuslike suundadega ja erinevate punktide korral mitte korreleeritud. Puhtal statistikal baseeruvad lähenemised enamasti just selliseid juhtusid vaatlevadki. Meie juhul aga ülaltoodud

kolmanda tingimuse kehtivuse tõttu on punktide statistilise hajuvuse kaal väga väike ning märksa olulisemad on süstemaatilised efektid, mis mõjuvad samas suunas kõigile punktidele.

Huvipakkuv on efektiivsete vabadusastmete arvu käitumine liikumisel viiepunktiliselt kalibreerimisgraafikult ühe-punkti-kalibreerimisele: efektiivsete vabadusastmete arv kahanemise asemel hoopis veidi kasvab. See võib esmapilgul tunduda absurdne – kalibreerimisgraafiku punktide arvu vähenedes peaks ju vabadusastmete arv vähenema. Tegelikult siin vastuolu puudub. Kui sisendsuurusi (ja seega ka määramatuse allikaid) on palju, siis mõjutab efektiivsete vabadusastmete arvu eeskätt see, kui esineb mõni suur kaalu omav A-tüüpi määramatuse allikas, mille hinnang on saadud vähesest hulgast paralleelmõõtmistest. Mõõtesuuruse definitsioonide 1 ja 2 (vt alajaotus 3.5.1) korral selliseid ei ole. Mõõtesuuruse definitsiooni 3 korral on selliseks tablettidevahelise korduvuse määramatus (7 vabadusastet ja panus üle 50%). 1P kalibratsiooni korral on efektiivsete vabadusastmete arv kõigil juhtudel veidi suurem sellepärast, et oluliselt suurem kui 5P kalibratsiooni korral on kalibreerimisgraafiku mittelineaarsusest määramatuse panus (see aga on B-tüüpi määramatuse hinnang). Selle suurt panust omava komponendi tõttu on kõigi A-tüüpi (korduvusest põhjustatud) määramatuse komponentide summaarne panus tulemuse määramatusse mõnevõrra väiksem, kui on 5P kalibreerimise puhul.

Enamasti tavataseme mõõtmiste ja analüüside määramatuse arvutuste juures efektiivsete vabadusastmete arvu ei hinnata ja eeldatakse, et kui määramatuse allikaid on palju, siis (tsentraalsele piirteoreemi järgi) kehtib normaaljaotus [2] ja võib lugeda efektiivsete vabadusastmete arvu (praktilises mõttes) suureks ning  $k = 2$  tasemele määramatuse usaldusnivoo jämedates joontes 95% olevaks. See eeldus on täiesti õigustatud, kui põhilise panuse tulemuse määramatusse annavad mitu (enamasti loetakse piisavaks 3) lähedase kaaluga määramatuse allikat [44].

Tabelist 3 on näha, et ka käesolevad tulemused toetavad tavamõõtmiste juures omaks võetud lähenemisviisi. Mõõtesuuruse definitsioonide 1 ja 2 (vt alajaotus 3.5.1) korral selline teguviis igati õigustatud ja ka definitsiooni 3 korral jääb määramatuse hinnangute vähenemine alla 10%, mis on kõigi tavaliste rakenduste juures vastuvõetav.

#### 4.2.3 Metodoloogilisi aspekte määramatuse hindamisel

Alljärgnevalt on esitatud mõned metodoloogilised aspektid, mis kerkisid esile käesolevas töös ja mis väärivad eraldi välja toomist, sest need võivad olla kasulikud ka paljude muude mõõtmiste juures määramatuse hindamisel ja samal ajal pole nende praktilise lahendamise kohta kirjandusest kuigi palju infot leida.

**Kromatograafilise piigi integreerimisest tulenev määramatus.** Selle määramatuse allika arvessevõtmist on kirjeldatud alajaotuses 3.5.4. See on lihtne moodus ja on hästi kasutatav ka tavalaboris. Ainsaks võimalikuks probleemiks selle mooduse korral on, et see kipub määramatust mõnevõrra üle hindama ja kui piikide integreerimisest tulenev määramatus on domineeriv määramatuse allikas, siis võib tulemuse määramatus osutada ülehinnatuks. Samas aga, kui piikide integreerimisest tulenev määramatus ei ole suure kaaluga, on selline konservatiivne määramatuse hindamise

moodus väga kohane. Käesolevas töös kehtibki just see olukord, kuna piikide integreerimisest tulenev määramatuse panus on väike (vt Tabel 3).

**Elektrostaatilised häired kaalumisel.** Tulenevalt standardaine omadustest oli kaalumise elektrostaatilistel häiretel käesoleva töö käigus läbi viidud kaalumiste tulemuse määramatuse arvutamisel väga oluline roll. Kui vaadata määramatuse arvutusi Lisades 3 ja 4, on näha, et massi mõõtmise juures on elektrostaatilistest häiretest tulenev määramatus oma kaalu poolest mitte ainult mäekõrguselt üle kõigist teistest massi mõõtmisega seotud määramatuse allikatest vaid ta on meie tingimustel tegelikult ainus massi mõõtmise määramatuse allikas, mida üldse on mõtet arvestada. Kõigi teiste massi mõõtmisest tulenevate määramatuse allikate summaarne kaal on kokku nullilähedane.

Elektrostaatilised häired, samuti ka ebaselge päritoluga näidu ebastabiilsus kaalumisel pole sugugi haruldased. Samas, määramatuse hindamise juhendites (näiteks allikas 2) pööratakse neile väga vähe tähelepanu. Käesolevas töös saadud tulemused vihjavad sellele, et nii mõnelgi juhul võivad need olla kaalumisel domineerivaks määramatuse allikaks, samas kui kasutajad ise neid määramatuse hindamisel üldiselt arvesse ei võta.

**Korrelatsioon sisendsuuruste vahel.** Rõhuval enamusel juhtudest kasutatakse liitstandardmääramatuse arvutamisel täieliku võrrandi 13 asemel lihtsustatud võrrandit 46, mis muutjate vahelist korrelatsiooni arvesse ei võta.

$$u_c(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^n \left( \frac{\partial y}{\partial x_i} u(x_i) \right)^2} \quad (46)$$

Enamusel juhtudel ongi see õigustatud. Samas on mõningad määramatuse allikad, mille puhul on alust eeldada, et nad on omavahel korrelatsioonis. Konkreetselt puudutab see mitmesuguseid triive ja kaalumise korral elektrostaatilistest häiretest tingitud määramatust. Näiteks, kui mingi süsteemi parameeter triivib ajas, siis ei ole loogiline eeldada, et see triiv on juhusliku suunaga näiteks iga kalibreerimisgraafiku punkti juures. Vastupidi, on vägagi ootuspärane, et see mõjutab kõiki punkte sarnasel moel ja samas suunas. Lihtne on mõista, et kui mingi efekt mõjutab kalibreerimisgraafiku punkte juhuslikus suunas, siis selle efekti mõju kalibreerimisgraafikule suurel määral keskmistub. Samas aga kõiki punkte korreleeritult samas suunas mõjutav efekt "nihutab" paigast kogu kalibreerimisgraafiku ja põhjustab seeläbi olulist määramatuse kasvu. Seetõttu enamasti korrelatsiooniefektide arvestamatajätmine viib määramatuse alahindamisele.

Käesolevas töös on kalibreerimisgraafiku meetodi korral punktide vahelist korrelatsiooni arvestatud. Lisas 4 on näha, milliste suuruste vahel on korrelatsioon arvesse võetud. Siiski käesolevas töös korrelatsioon kui faktor väga oluline ei ole. Kui jätta kõik arvessevõetud korrelatsioonid arvestamata, siis saaksime esimese mõõtesuuruse definitsiooni korral määramatuse alanemise 0.23 mg/tab tasemelt 0.22 mg/tab tasemele, mis on tühine määramatuse allahindamine. See on põhjustatud sellest, et ükski korrelatsioonis olevatest suurustest ei anna tulemuse summaarsesse määramatuse olulist panust. Olulisemate määramatuse komponentide korral aga on võimalik määramatuse märgatav allahindamine.

### 4.3 Määramatuse hindamise mooduli võimalikkus kromatograafilise süsteemi tarkvaras

Töö tulemustele baseerudes on alljärgnevalt välja pakutud lähenemisviis määramatuse hindamise mooduli sisseviimiseks kromatograafiliste süsteemide tarkvarasse.

Suurem jagu praegusel ajal tehtavatest vähegi keerukatest instrumentaalmõõtmistest tehakse arvutitarkvara vahendusel. Tarkvara ülesanneteks on analüüsiaparatuuri juhtimine, andmehõive, tulemuste töötlemine ja vormistamine. Teisest küljest, määramatuse hindamine on andmete töötlemise lahutamatu osa. Arvestades neid asjaolusid oleks väga loogiline teostada määramatuse hindamine sellesama tarkvara abil. On ju suur osa vajalikke andmeid programmil niikuinii juba olemas. See haakuks väga hästi ka mõõtetulemuste määramatuse hinnangute üha kasvava olulisusega ja laboritele selles vallas esitatavate üha rangemate nõuetega.

Huvitaval kombel ei ole seda mõtet seni tarkvaras realiseeritud. Meile pole teada ühtegi kromatograafilise süsteemi (ega ka muu analüütilise süsteemi) tarkvarapaketti, mis võimaldaks teostada määramatuse arvutusi. See on seda hämmastavam, et näiteks teine mõõtetulemuste kvaliteedi tagamise alustala – meetodite valideerimine – on leidnud tee analüüsisüsteemide tarkvarasse [26].

Tekib küsimus, et kas on põhimõttelisi takistusi määramatuse hindamise mooduli sisseviimiseks analüüsiaparatuuri tarkvarasse. Järgnevalt demonstreeritakse, et põhimõttelisi takistusi pole.

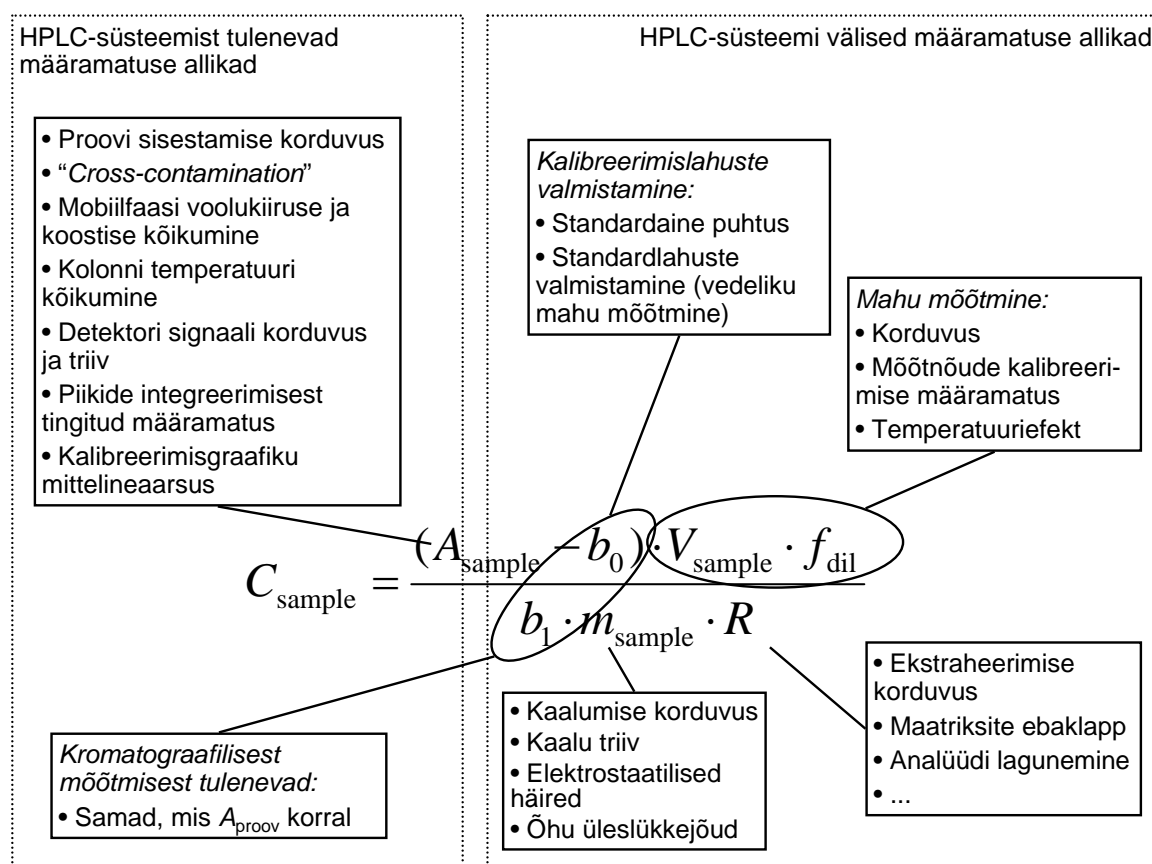
Allpool (Joonis 3) on esitatud tavalise vedelik-kromatograafilise analüüsi puhul tekkiva matemaatilise mudeli üldistatud kuju koos määramatuse allikatega. Mudelis esinevatest suurustest on enamus vahesuurused, selles mõttes, et nad arvutatakse omakorda erinevate sisendsuuruste kaudu. Praeguse arutelu jaoks pole aga vajalik neid suurusi detailsemalt välja kirjutada.

Joonisel toodud suurused on võimalik jagada kahte gruppi: Aparatuurist tulenevad ja aparatuurivälised. Aparatuurist tulenevad määramatuse allikad on võimalik kvantiseerida vahetult tarkvara enda poolt kogutavate andmete baasil. Need andmed võivad pärineda samast mõõtmisest või siis varem kogutud valideerimisandmetest. Aparatuurivälised andmed peab süsteemile sisestama kasutaja. Alljärgnevalt esitatakse ülevaade erinevatest sisendsuurustest tulenevatest määramatuse allikatest ja nende kvantiseerimise võimalustest.

**Piigi pindala  $A_{\text{sample}}$ .** Selle sisendsuuruse määramatuse allikad on aparatuurse päritoluga. Suurem osa neist on väga hästi hinnatavad valideerimisandmete abil, nagu on tehtud ka käesolevas töös. Kui valideerimismoodul on süsteemi tarkvaras sees, siis on võimalik valideerimise käigus andmed salvestada ja neid hiljem määramatuse arvutuses otse kasutada. Kõige raskem on tarkvaral kvantitatiivselt hinnata selliseid määramatuse allikaid nagu piikide osaline kattumine ja baasijoone ebahühtlus (joonisel kokku võetud määramatuse allika "Piikide integreerimisest tingitud määramatus" all). Nende hindamisel on programmil kindlasti vaja kasutajapoolset abi ning hinnang saab paratamatult olema teatud määral subjektiivne ja arvamusel baseeruv.

Mõned joonisel toodud määramatuse allikad on sellised, et neist tulenevate määramatuse panuste eraldi hindamine on väga raske ja tegelikult ka mittevajalik: proovi sisestamise korduvus, kolonni temperatuuri kõikumine, detektori signaali korduvus jne. Nende eraldi hindamise asemel on täiesti vastuvõetavaks lahenduseks arvestada neid kõiki koos, summaarse korduvuse määramatuse kaudu.

Eraldi äramärkimist väärib määramatus, mis tuleneb piikide leidmisest ja integreerimisest [47]. Sellel määramatuse allikal on omakorda kolm põhilist komponenti: 1) määramatus, mis tuleneb detektori poolt andmepunktide kogumise lõplikust sagedusest; 2) määramatus, mis tuleneb piigi all oleva baasijoonse käitumise hindamisest ning 3) piigi alguse ja lõpu leidmisega seotud määramatus. Kui tegemist on sirge baasijoonega ja korralikult lahutunud piikidega, siis ei ole moodsate detektorite ja tarkvara korral see määramatuse allikas vedelik-kromatograafias reeglina eriti oluline [18, 19]. See kehtib ka käesolevas töös: definitsiooni 1 korral moodustab see määramatuse allikas 3.4 ja 4.4% üldisest määramatusest vastavalt 1P ja 5P kalibratsiooni korral. Seejuures vähene piikide kattumine esines, aga kasutatud määramatuse hindamise moodusega sai see arvesse võetud.



Joonis 3. Vedelik-kromatograafilise mõõtmise lihtsustatud matemaatiline mudel koos olulisimate aparatuurist tulenevate ja aparatuurivälise määramatuse allikatega.

Samas, kui esineb oluline piikide kattumine, mis vajab eraldi võtteid kattuvate piikide eraldamiseks, siis on oodata suurt määramatuse kasvu ja see määramatuse allikas võib osutada üheks olulisemaks üldse. On terve rida mooduseid, kuidas kattuvaid piike sedasi integreerida, et nende "tõelised" pindalad võimalikult usaldusväärselt hinnatud

saaks. Need varieeruvad lihtsast "perpendikulaaride" meetodist keeruliste kemomeetriliste algoritmideni [48, 49]. Mõned autorid on uurinud ka selliste meetoditega saadud pindalahinnangute määramatust [49]. On näidatud, et eriti raske on olukord juhul, kui piigid, mille pindala on vaja määrata on madala intensiivsusega ja nad kattuvad suure intensiivsusega piikidega. Sellistel juhtudel sõltub määramatus väga tugevalt piikide lahutamise meetodist – graafilised meetodid, Fourier' dekonvolutsioon jne – ning võib kergesti olla kuni  $\pm 50\%$  piigi pindalast [49].

**Kaalumisest ja mõõtnõudest tulenevad määramatuse allikad** ( $m_{\text{sample}}, V_{\text{sample}}, f_{\text{dil}}$ ). Vedeliku mahu ja ainete massi mõõtmisest tulenev määramatus on üldiselt küllatki lihtsasti hinnatav, vastavalt näiteks Eurachem'i määramatuse juhendile [2]. Siiski on oluline märkida, et mõningad olulised määramatuse allikad leiavad selles juhendis liiga vähe kajastamist. Massi mõõtmise juures on selliseks häired, mis tulenevad kaalutava objekti elektrostaatilisest laadumisest ning selle olulisust rõhutati juba ülalpool.

**Regressioonikoefitsiendid  $b_0$  ja  $b_1$ .** Need koefitsiendid on vahesuurused, mis leitakse alajaotuses 3.5.2 toodud võrrandite abil. Need koefitsiendid sõltuvad nii aparatuursetest (piikide pindalad) kui ka aparatuurivälistest (kaalutavate ainete massid, mahumõõtenõude mahud) suurustest. Piikide pindalad ja nendega seonduv on käsitletav samamoodi kui eelmises alajaotuses. Aparatuurivälised andmed aga tuleb sisestada kasutajal endal. Tarkvara peaks võimaldama vähemalt kahe lahendusoperatsiooni andmete (mõõtkolvi ja pipeti ruumala) sisestamist. Samuti peaks programmis olema ette nähtud võimalus kalibreerimis-standardlahuste valmistamiseks nii lähtestandardlahusest lahjenduste tegemise teel kui ka eraldi standardaine koguste kaalumise teel iga standardlahuse jaoks.

**Saagis R.** Ilmselt on see suurus aparatuuriväline ning selle suurus ja määramatus tuleb anda ette kasutajal endal. Samas kuulub saagise määramine ühe etapina ka meetodi valideerimise juurde ning seetõttu on võimalik ka siin tuua tarkvarasse sisse koostöö määramatuse hindamise mooduli ja valideerimismooduli vahel. Tuleb aga silmas pidada, et saagise ja eriti saagise määramatuse leidmine on märksa keerulisem kui näiteks meetodi korduvusparameetrite leidmine. Ka on saagise leidmise meetodid ning matemaatilised arvutusvõtted märksa mitmekesisemad kui korduvusparameetritel, mis nõuab tarkvaralt saagise käsitlemise juures märksa suuremat paindlikkust. Iseäranis on väljakutseks saagise määramatuse leidmine. Võib julgesti öelda, et just see karakteristik on sageli võtmetähtsusega meetodi saagise määramatuse leidmisel. Kuigi on olemas küllaltki tõhus üldine lähenemine saagise määramatuse leidmiseks [50], on selle rakendamine praktikas sageli seotud raskustega (referentsmaterjalide puudumine paljude analüüt-matriks kombinatsioonide jaoks, rikastamiskatsete piiratud tõhusus paljude matriksite korral). Saagise ja saagise määramatuse sisestamine on väga mõttekas ka sellisel juhul, kui saagise arväärtus ei ole ühest erinev: sellisel juhul saagise arväärtus tulemusele mõju ei avalda, aga saagise määramatuse võimaldab arvesse võtta proovi ettevalmistusprotseduuri korratavust.

Kui sisendsuurused ja nende määramatuse hinnangud on tarkvarasse sisestatud või tarkvara enda poolt leitud, võib määramatuse arvutuse läbi viia Kragteni meetodi abil [51] (kirjeldatud ka kirjandusallikas 2). Selle meetodi üks olulisi eeliseid on, et kui erinevad vahesuurused arvutatakse samade sisendsuuruste kaudu, siis nende

vahesuuruste vaheline võimalik korrelatsioon (hea näide on korrelatsioon sama regressioonisirge tõusu ja algordinaadi vahel) saab arvutusmeetodi poolt automaatselt arvesse võetud, ilma, et kasutaja peaks sellele eraldi tähelepanu pühendama [8,39].

Kui samalt kromatogrammilt leitakse samaaegselt mitme analüüdi sisaldused, siis peaks igale neist olema omistatud omaenda määramatuseparameetrite komplekt. Mõned määramatuse parameetrid (näiteks need, mis on seotud kaalumise ja mõõtnõudega) võivad olla küll samad kõikide analüütide jaoks, aga enamuse erineb siiski analüüdilt analüüdile (eri analüütide sisalduse leidmise jaoks kasutatakse erinevaid piike, mis võivad erineval määral kattuda tundmatute piikidega või olla mõjutatud baasijoonel ebataasuse poolt, eri analüütide korral on saagiste  $R$  väärtused erinevad jne). Määramatuse hindamise parameetreid sisaldava menüü paigutus tarkvaras sõltub tugevalt konkreetsest tarkvarapaketest, aga üsna ilmne oleks selle paigutamise analüütide defineerimise moodulisse.

Määramatuse hindamise tulemuste esitamine on loogiline realiseerida vastava tarkvara tulemuste vormistamise mooduli kaudu. Praegusaegsel tarkvaral on tulemuste vormistamise võimalused sageli väga ulatuslikud. Kui määramatuse hindamise tulemused on esitatud intelligentsel moel, siis võivad need omada suurt praktilist väärtust nii analüüsi teostaja kui ka analüüsi tulemuse kasutaja jaoks. Küllaltki heaks näiteks määramatuse hindamise tulemuste esitamisel on programmi GUM Workbench tulemuste esitus, nii nagu see on toodud Lisades 3 ja 4.

Väljakutseks määramatuse hindamise mooduli sisseviimisel kromatograafi tarkvarasse on matemaatilise mudeli sisestamise lahendamine. Erinevate analüüsiülesannete korral on matemaatilised mudelid erinevad. Siin esitatud mudel, kuigi küllalt sageli esinev, on vaid üks näide. Tarkvara arendamisel võib minna kahte erinevat teed pidi: a) matemaatiline mudel on kasutaja poolt matemaatiliste valemite abil paindlikult sisestatav (sarnaselt GUM Workbench programmile, vt mudelite sisestamise näiteid Lisades 3 ja 4); b) tarkvara sisaldab sisseehitatud mudelite või mudelite "fragmentide" valikut. Fragmentide all mõistetakse siin teatavaid analüüsi etappe kirjeldavaid alamvõrrandeid. Näiteks kalibreerimislahused võivad olla valmistatud nii tahkest standardainest kui ka sertifitseeritud standardlahusest. Esimesel juhul mõõdetakse standardaine hulka massi mõõtmise teel, teisel juhul vedeliku ruumala mõõtmise teel. Nendele variantidele vastaksid erinevad "tükid" standardlahuste kontsentratsioonide leidmise avaldistes. Mõlemal lähenemisviisil on eeliseid ja puuduseid.

Kui kasutajal on võimalik mudelit ise matemaatiliste valemite abil sisestada, siis tähendab see seda, et sisestada saab praktiliselt mistahes mudelit (kasutatavad on näiteks lisamiseetod, sisestandardi abil kvantiseerimine jne), mis tagab suure paindlikkuse ning rakendatavuse praktiliselt mistahes mõõtemetodi jaoks. Samas toob see kaasa vajaduse väga tõsise tarkvara-arendustöö järgi – sisuliselt tuleb programmeerijatel kirjutada kromatograafi tarkvarasse sisse täisfunktsionaalne määramatuse hindamise tarkvara. Samuti võib sellise süsteemi kasutama õppimine nõuda kasutajalt küllaltki palju aega ja vaeva.

Kui kasutajal on võimalik kasutada vaid piiratud hulka mudeleid või mudelifragmente, siis on paratamatult piiratud ka meetodite arv, mida sedasi saab katta. Samas, selline lähenemine on kindlasti lihtsamini tarkvaras realiseeritav ning ka

väiksema vaevaga kasutama õpitav. Ka erinevaid fragmente kombineerides on võimalik saavutada vägagi suurt paindlikkust. Tundubki, et kõige praktilisem lähenemine mudeli sisestamisele oleks mudelifragmentide kui "ehituskivide" abil. Fragmentid vastaksid näiteks järgmistele analüüsi etappidele: proovi ettevalmistamine (ekstraheerimine ja lahjendamine), kalibreerimislahuste valmistamine, kalibreerimine ise (kalibreerimisgraafiku või lisamismeetod, kumbki võib olla realiseeritud sisestandardiga või ilma, mõnel juhul pakub huvi ka absoluutsete pindalade meetod) ja proovi mõõtmine. Igal fragmendil võib olla omaenda valitavate parameetrite komplekt ja kombineerides annavad need fragmentid küllaltki paindliku (ja samas tarkvaraliselt suhteliselt lihtsasti realiseeritava) süsteemi.

## 5 Kokkuvõte

Käesoleva töö raames loodi matemaatiline mudel ravimpreparaadi kvaliteedikontrolli vedelik-kromatograafilisele meetodile ning esitati sellel mudelil baseeruv protseduur tulemuse määramatuse hindamiseks. Konkreetse näitena rakendati loodud protseduuri simvastatiini sisalduse määramisel tablettides.

Määramatuse allikate kvantiseerimisel, mis keemiliste mõõtmiste juures on sageli üheks olulisemaks probleemiks, esitati praktilised ja (ka tavalaboris) lihtsalt kasutatavad võtted mõnede sageli raskusi põhjustavate määramatuse allikate panuste hindamiseks. Loodud protseduuri kasutades analüüsiti erinevate määramatuse allikate panust mõõtetulemuse määramatusse ning erinevate allikate suhtelise panuse ja mõõtetulemuse summaarse määramatuse sõltuvust mõõtemetodi parameetrite varieerimisest. Tulemusi vaadeldi erinevatest mõõtesuuruse definitsioonidest lähtudes ning näidati, et mõõtesuuruse selge defineerimine on ülimalt oluline korrektse ning üheselt mõistetava tulemuse saamiseks. Demonstreeriti meetodi valideerimise olulisust ja valideerimisandmete kasutamist erinevate määramatuse allikate panuste hindamisel.

Tulemustele toetudes esitati üldine lähenemisviis, kuidas luua määramatuse hindamise moodul vedelik-kromatograafilise süsteemi juhtimise tarkvarasse.

## 6 Summary

Mathematical model and measurement uncertainty estimation procedure based on that model have been developed for liquid-chromatographic drug quality control method. The procedure has been applied to real-life situation: quality control of simvastatin in tablets.

In quantification of uncertainty components, which is often the most difficult part of uncertainty estimation of chemical measurements, several practical and easy-to-use (also at routine laboratory level) ways to take into account several difficult-to-estimate sources of uncertainty. Using the created procedure analysis of uncertainty contributions of the various uncertainty sources was carried out. The behavior of the combined uncertainty and the uncertainty contributions of the input parameters of the method in response to changes in experimental parameters was studied. The results were calculated based on different definitions of the measurand and it was demonstrated that unequivocal definition of the measurand is very important in order to get a correct uncertainty estimate. The importance of method validation as a source of uncertainty data was demonstrated.

Based on the results a general approach for implementing uncertainty estimation into liquid chromatography software.

## 7 Kasutatud kirjandus

1. *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement* (in collaboration with: BIPM IEC IFCC ISO IUPAC IUPAP OIML), ISO, Geneva, **1993**.
2. S. L. R. Ellison, M. Rösslein, A. Williams, Eds., *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*, 2<sup>nd</sup> ed., EURACHEM/CITAC, **2000**.
3. *General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*, ISO/IEC 17025:2000.
4. Suure hulga väga ilmekaid näited leiab EC JRC IRMM poolt korraldatavate IMEP võrdlusmõõtmiste tulemustest: <http://www.imep.ws/>
5. B. King, *Accred. Qual. Assur.*, **2000**, 5, 429-436.
6. V. J. Barwick, *J. Chromatogr. A*, **1999** 849 13-33.
7. V. J. Barwick, S. L. R. Ellison, C. L. Lucking, M. J. Burn, *J. Chromatogr. A*, **2001**, 918, 267-276.
8. S. Leito, I. Leito, *Accred. Qual. Assur.*, **2004**, 9, 666-670.
9. B. Magnusson, T. Näykki, H. Hovind, M. Krysell, *Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories*, 2<sup>nd</sup> ed., Nordtest Report TR 537. Nordtest, **2004**.
10. D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman, *Principles of Instrumental Analysis*. 5<sup>th</sup> ed., Harcourt Brace & Company, Philadelphia, **1998**.
11. Veronika R. Meyer, *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. 2<sup>nd</sup> ed., John Wiley & Sons, Chichester, **1994**.
12. B. A. Bidlingmeyer, *Practical HPLC Methodology and Application*. John Wiley & Sons, New York, **1992**.
13. N. Dyson, *Chromatographic Integration Methods*, 2<sup>nd</sup> ed, The Royal Society of Chemistry, **1998**.
14. J. Gilroy, J. Dolan, *Liquid Chromatography- Gas Chromatography*, **2004**, 17, 566-572.
15. J. Hinshaw, *Liquid Chromatography- Gas Chromatography*, **2002**, 15, 1-4.
16. Y. Grize, H. Schmidli, J. Born, *J. Chromatogr. A*, **1994**, 686, 1-10.
17. E. Hund, D. Massart, J. Smeyers-Verbeke, *Anal. Chim. Acta*, **2003**, 480, 39-52.
18. Anglov T, Byrialsen K, Carstensen J K, Christensen F, Christensen S, Madsen B S, Sørensen E, Sørensen J N, Toftegård K, Winther H, Heydorn K, *Accred. Qual. Assur.*, **2003**, 8, 225-230.
19. D. Hibbert, J. Jiang, M. Mulholland, *Anal. Chim. Acta*, **2001**, 443, 205-214.
20. Pharmaca Estica 2005, OÜ Pharmaca Estica, Tartu, **2005**
21. S. Ertürk, A. Önal, S.Müge Çetin, *J. Chromatogr. B*, **2003**, 793, 193-205.
22. M. Vuletic, M. Cindric, J. D. Koruznjak, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, Article in press.
23. *European Pharmacopoeia*, 5<sup>th</sup> ed., Council of Europe, **2004**

24. A. Endo, *International Congress Series*, **2004**, 1262, 3-8.
25. *The United States Pharmacopoeia / The National Formulary USP 27 / NF 22*, United States Pharmacopoeial Convention Inc., **2004**.
26. Vt näiteks: the Chemstation Plus Method Validation Pack (Agilent Inc., <http://www.agilent.com/>) või the Empower Software Method Validation Option (Waters Inc., <http://www.waters.com/>).
27. T. R. Pedersen, J. A. Tobert, *Expert Opin. Pharmacother.*, **2004**, 5, 2583-2596.
28. R. Godoy, C. G. Godoy, M. de Diego, C. Gomez, *J. Chil. Chem. Soc.*, **2004**, 49, 3.
29. M. K. Sirinvasu, A. Narasa Raju, G. Om Reddy, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2002**, 29, 715-721.
30. *Technical Guide for Elaboration of Monographs*, Pharmeuropa Special Issue, **2002**.
31. *Validation of analytical procedures: methodology*, ICH Guideline Q2B. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, **1996**.
32. Kessel R. *A Novel Approach to Uncertainty Evaluation of Complex Measurements in Isotope Chemistry*, Dissertation for the Degree of Doctor in Science, University of Antwerp, **2003**. Available at [http://www.metrodata.de/pdf/PhD\\_Thesis\\_Ruediger\\_Kessel\\_2003.pdf](http://www.metrodata.de/pdf/PhD_Thesis_Ruediger_Kessel_2003.pdf)
33. W. Bremser, W. Hässelbarth, *Accred Qual Assur.*, **1998**, 3, 106-110.
34. E-M. Tiit, M. Möls, *Rakendusstatistika lühikursus*. Tartu, **1997**.
35. A.M.H., van der Veen, J. Pauwels, *Accred. Qual. Assur.*, **2000**, 5, 464-469.
36. *OMCL Policy on the Estimation and Application of Uncertainty in Analytical Measurement*, European OMCL Network of the Council of Europe, **2003**.
37. E. Koort, K. Herodes, V. Pihl, I. Leito, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2004**, 379, 720-729.
38. L. Jalukse, I. Leito, A. Mashirin, T. Tenno, *Accred. Qual. Assur.*, **2004**, 9, 340-348.
39. J. Traks, L. Sooväli, I. Leito, *Accred. Qual. Assur.*, **2005**, 10, published online April 21, 2005, (kättesaadav aadressilt <http://dx.doi.org/10.1007/s00769-005-0909-3>).
40. *Harmonised Guidelines for the Use of Recovery Information in Analytical measurement*. IUPAC Technical Report. Published in *Pure Appl. Chem.*: M. Thompson, S. L. R. Ellison, A. Fajgelj, P. Willetts, R. Wood *Pure Appl. Chem.*, **1999**, 71, 337-348.
41. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. EURACHEM, LGC Teddington, **1998**.
42. Vt aadressil [http://www.ut.ee/katsekoda/GUM\\_examples/](http://www.ut.ee/katsekoda/GUM_examples/) näide "Phosphorus Content in Feed by Photometry".
43. *WEPAL, International Soil Analytical Exchange, Quarterly Report 2004.3*, Wageningen University, **2004**.
44. *EA Guidelines on Expression of Uncertainty in Quantitative Testing*. Publication Reference EA-4/16, European Cooperation for Accreditation, **2003**.

45. D. Massart, L. Kaufman, Y. Michotte, S. Deming, B. Vandeginste, *Chemometrics: A Textbook*, Elsevier, Amsterdam, **1988**.
46. J.C. Miller, J.N. Miller, *Statistics for Analytical chemistry*, 3<sup>rd</sup> ed., Ellis Horwood Ltd., London, **1993**.
47. N. Dyson, *J Chromatogr. A*, **1999**, 842, 321-340.
48. A. Papas, T. Tougas, *Anal Chem.*, **1990**, 62, 234-239.
49. P. Dahl, V. Meyer, *Quaternary Sci. Rev.*, **1999** 18, 1549-1559.
50. V. Barwick, S. Ellison, *Evaluating Uncertainties Associated with Recovery, VAM project 3.2.2 Evaluating Confidence in Analytical Measurement, Part (d): Lab-based studies of measurement uncertainty contributions*, LGC/VAM, **1998**.
51. J. Kragten, *Analyst*, **1994**, 119, 2161-2165.

## 8 Lisad

## Lisa 1 Kromatogrammid ja spektrid

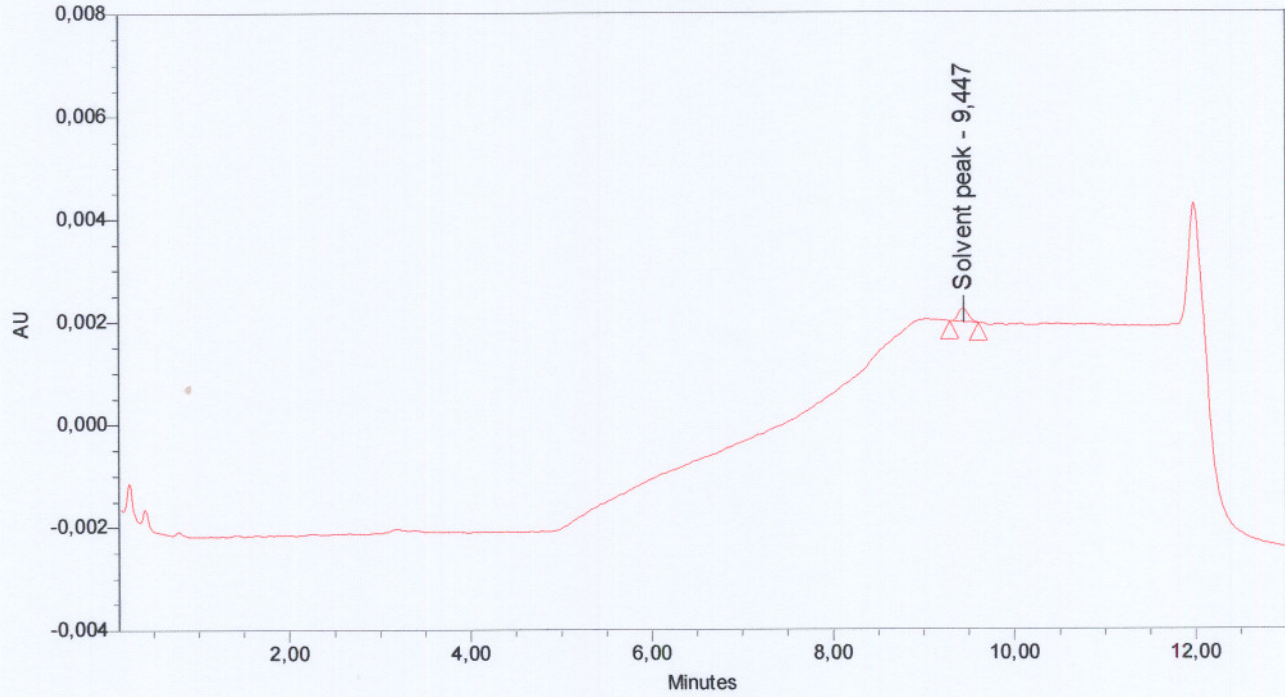
Järgnevatel lehekülgedel on esitatud järgmised näidiskromatogrammid ja spektrid:

- Null-lahuse (*blank*) kromatogramm.
- Süsteemi valideerimise lahuse kromatogramm.
- Standardlahuse (0.77 mg/ml) kromatogrammid:
  - Integreerimine piigi pindala alla hinnates;
  - Integreerimine piigi pindala üle hinnates;
  - Kromatograafia tarkvara poolt integreeritud piik.
- Proovi lahuse kromatogrammid:
  - Integreerimine piigi pindala alla hinnates;
  - Integreerimine piigi pindala üle hinnates;
  - Kromatograafia tarkvara poolt integreeritud piik.
- Simvastatiini standardlahuse kromatogrammilt registreeritud UV spekter.
- Proovi lahuse kromatogrammilt registreeritud UV spekter.

# Simvastatin

SampleName	SolvSol	Sample Type	Unknown
Vial	24 Injection 1	LC column	
Injection Volume	10,00 ul	Date Acquired	13.04.05 11:20:16
Channel	996 Run Time 13,0 Minutes	Acq Method Set	Simvastatin
Software Version 3.05.01	User Name SigneLeito	Processing Method	Simvastatin_blank

## Chromatogram



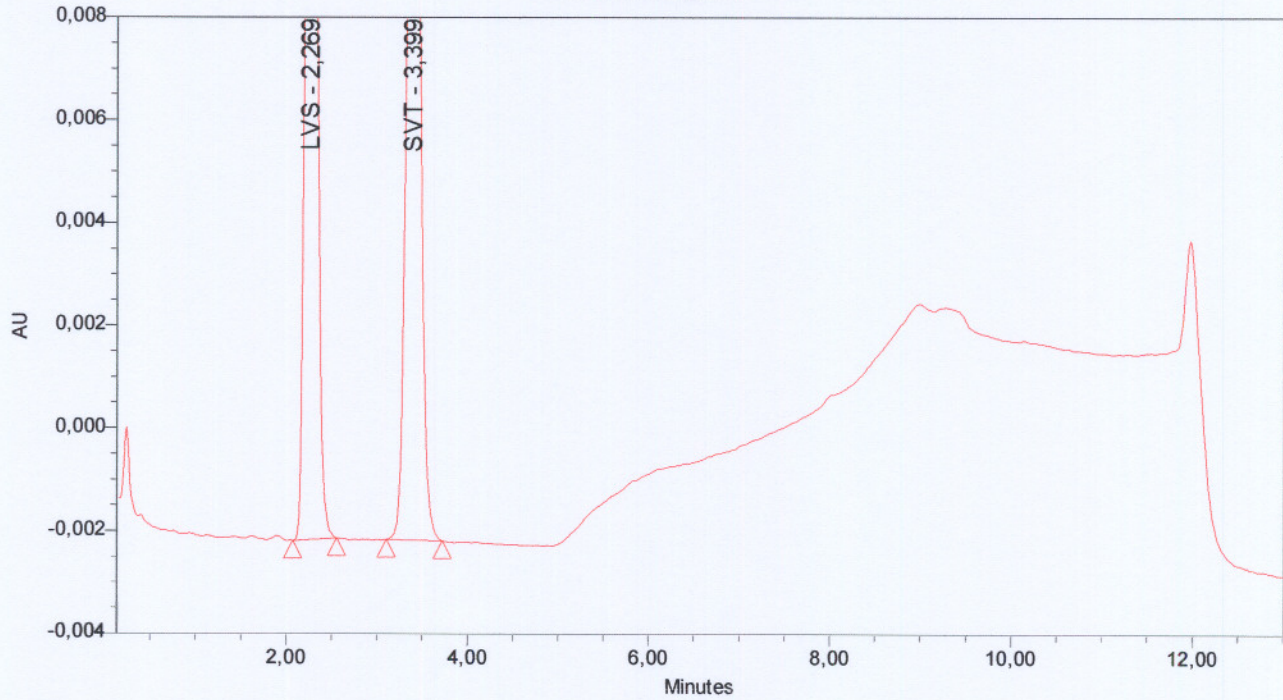
## Peak Results

	Name	RT	Area	Height
1	SVT	3,401		
2	Solvent peak	9,447	1955	264

# Simvastatin

SampleName	SSS_12.04.	Sample Type	Unknown
Vial	23 Injection 1	LC column	
Injection Volume	10,00 ul	Date Acquired	13.04.05 11:05:44
Channel	996 Run Time	13,0 Minutes	Acq Method Set Simvastatin
Software Version	3.05.01	User Name	SigneLeito
		Processing Method	SVT_syst_suit

## Chromatogram



### Peak Results

	Name	RT	Area	Height
1	LVS	2,269	269945	39308
2	SVT	3,399	199699	21392

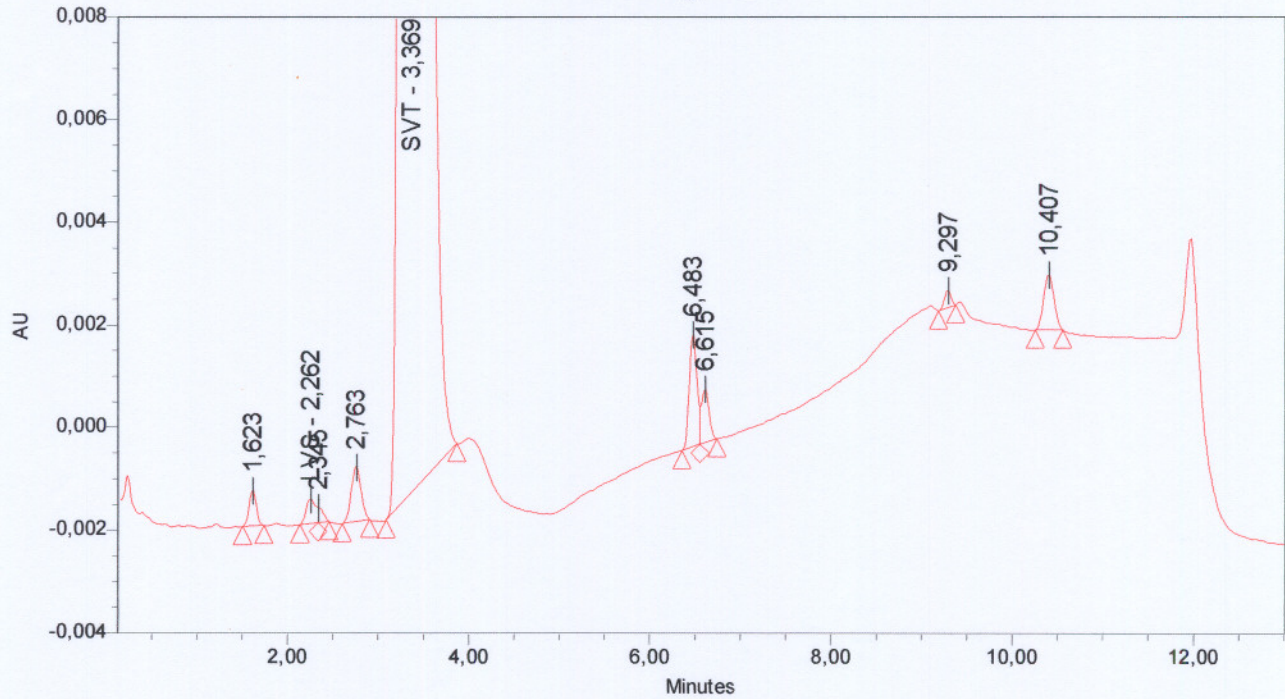
### System Suitability Separation Results

	Name	RT	Resolution	Symmetry Factor	K Prime	Width @ 50%
1	LVS	2,269		1,124581e+000	1,034524e+001	1,056538e-001
2	SVT	3,399	5,354697e+000	1,095020e+000	1,599571e+001	1,433816e-001

# Simvastatin

SampleName SVT\_std\_13.04      Sample Type Standard  
Vial 6 Injection 3      LC column RP19-33  
Injection Volume 10,00 ul      Date Acquired 13.04.05 12:50:47  
Channel 996 Run Time 13,0 Minutes      Acq Method Set Simvastatin  
Software Version 3.05.01      User Name SigneLeito      Processing Method Simvastatin\_V3

## Chromatogram



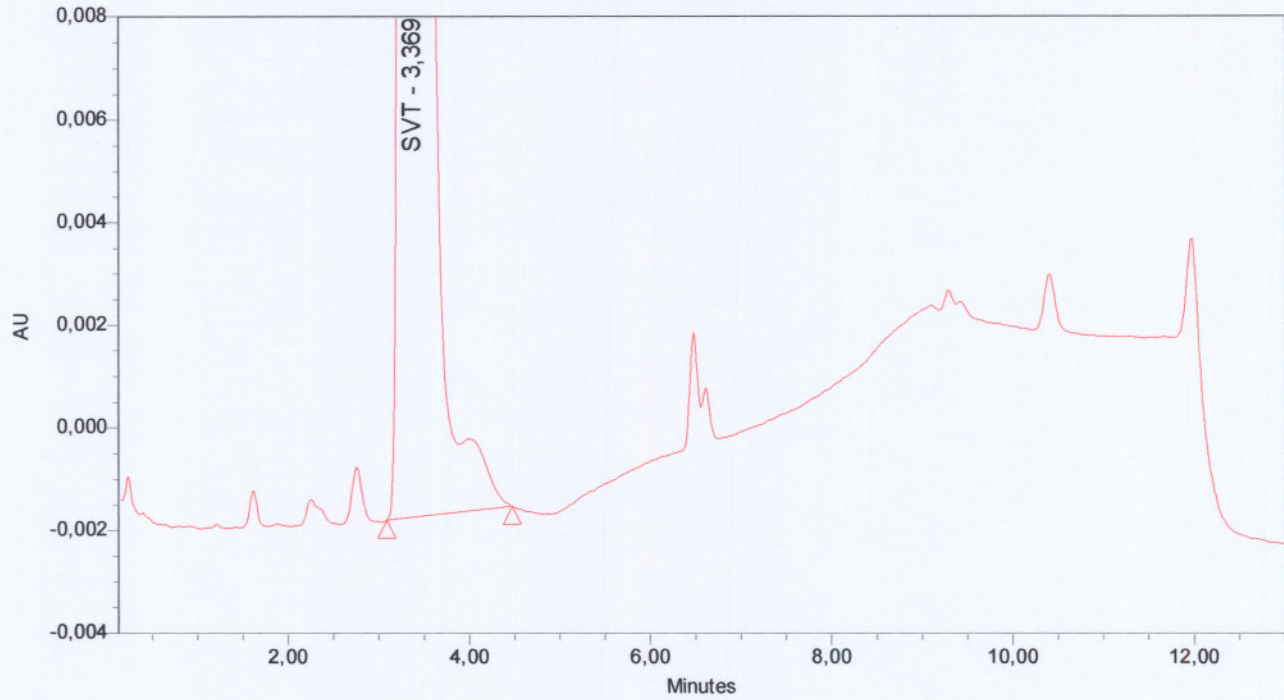
## Peak Results

Name	RT	Area	Height
1	1,623	3912	705
2 LVS	2,262	3463	475
3	2,345	1118	296
4	2,763	8039	1067
5 SVT	3,369	8192762	868409
6	6,483	12904	2213
7	6,615	6037	1053
8	9,297	1684	336
9	10,407	8445	1077

# Simvastatin

SampleName SVT\_std\_13.04      Sample Type Standard  
Vial 6      Injection 3      LC column RP19-33  
Injection Volume 10,00 ul      Date Acquired 13.04.05 12:50:47  
Channel 996      Run Time 13,0 Minutes      Acq Method Set Simvastatin  
Software Version 3.05.01      User Name SigneLeito      Processing Method SVT\_integr\_max

## Chromatogram



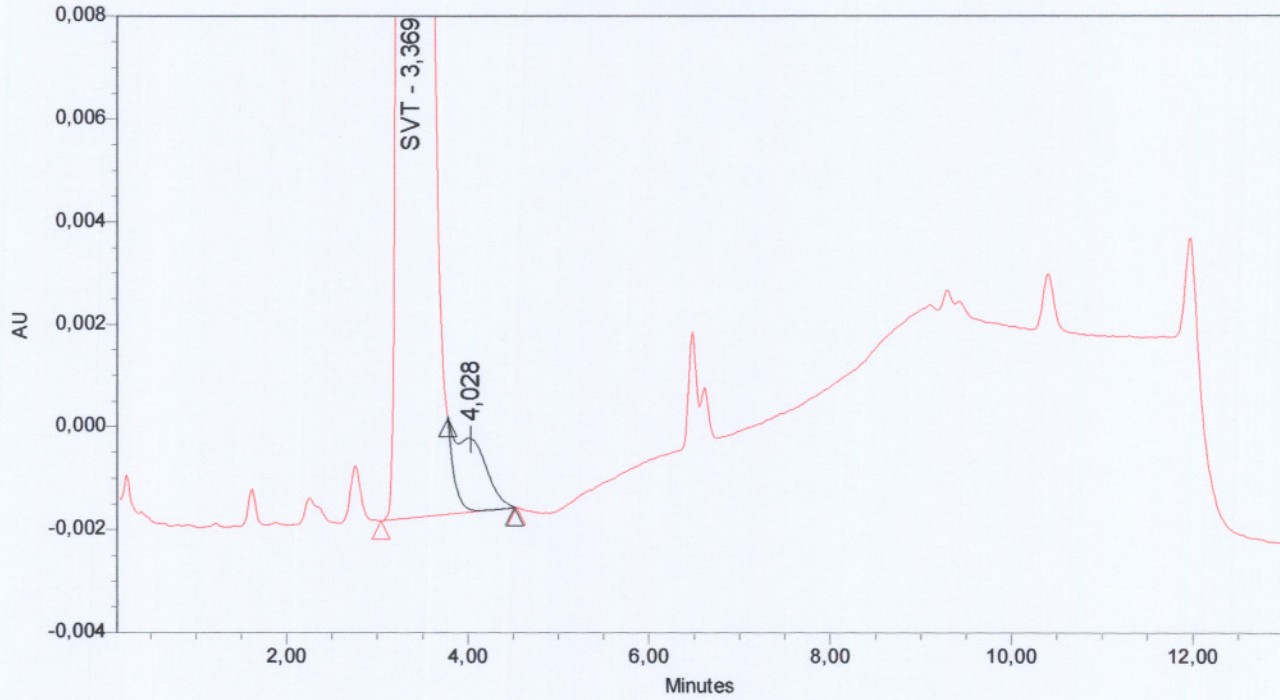
## Peak Results

Name	RT	Area	Height
1 SVT	3,369	8253267	868875

# Simvastatin

SampleName SVT\_std\_13.04      Sample Type Standard  
Vial 6      Injection 3      LC column RP19-33  
Injection Volume 10,00 ul      Date Acquired 13.04.05 12:50:47  
Channel 996      Run Time 13,0 Minutes      Acq Method Set Simvastatin  
Software Version 3.05.01      User Name SigneLeito      Processing Method SVT\_exp\_skim\_PDA

## Chromatogram



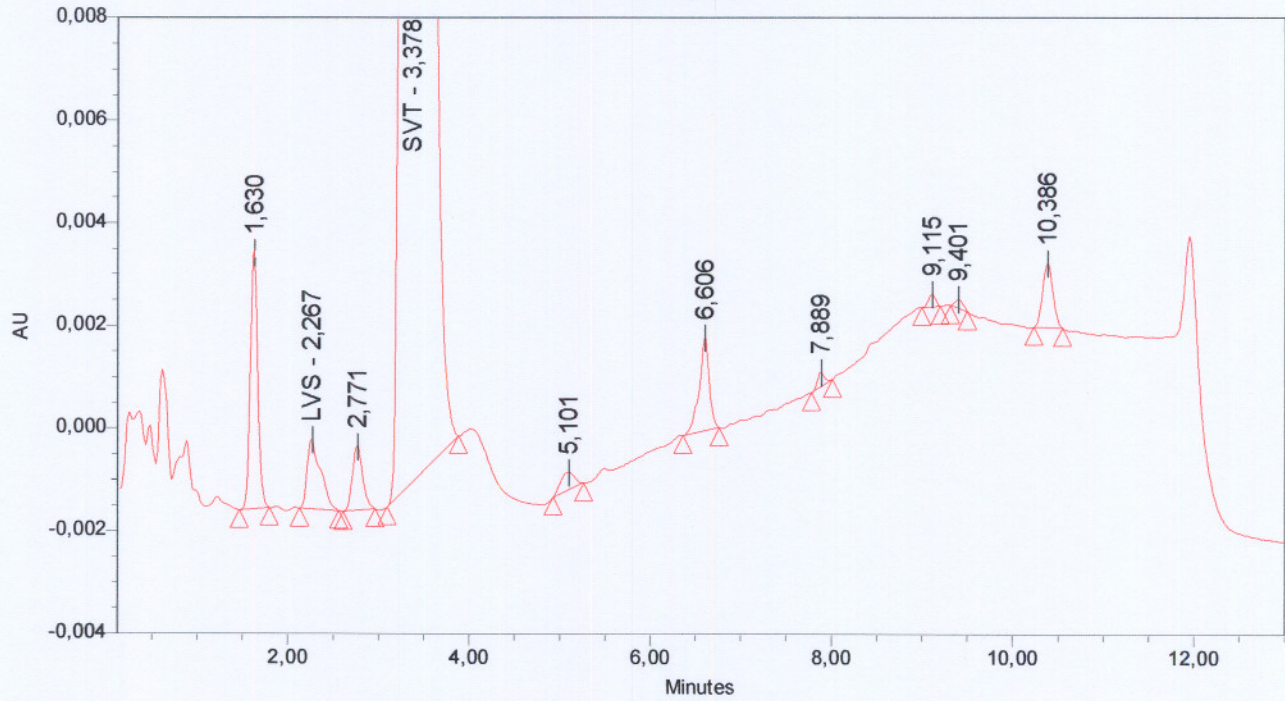
## Peak Results

Name	RT	Area	Height
1 SVT	3,369	8224792	868911
2	4,028	32274	1375

# Simvastatin

SampleName SVT10mgtab Sample Type Unknown  
Vial 7 Injection 1 LC column RP19-33  
Injection Volume 10,00 ul Date Acquired 13.04.05 13:06:22  
Channel 996 Run Time 13,0 Minutes Acq Method Set Simvastatin  
Software Version 3.05.01 User Name SigneLeito Processing Method Simvastatin\_V3

## Chromatogram



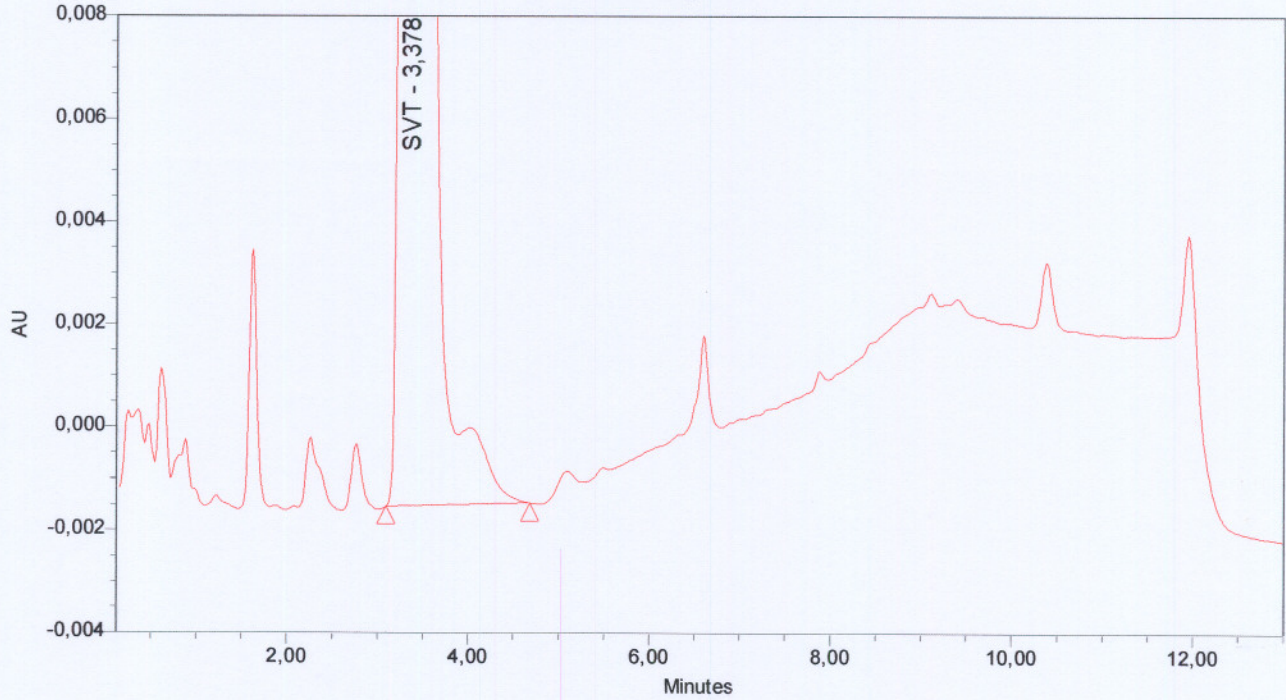
## Peak Results

Name	RT	Area	Height
1	1,630	29015	5025
2 LVS	2,267	13796	1357
3	2,771	9832	1261
4 SVT	3,378	8319198	881997
5	5,101	3771	347
6	6,606	13853	1822
7	7,889	1471	274
8	9,115	1331	248
9	9,401	1073	171
10	10,386	9882	1258

# Simvastatin

SampleName SVT10mgtab      Sample Type Unknown  
Vial 7      Injection 1      LC column RP19-33  
Injection Volume 10,00 ul      Date Acquired 13.04.05 13:06:22  
Channel 996      Run Time 13,0 Minutes      Acq Method Set Simvastatin  
Software Version 3.05.01      User Name SigneLeito      Processing Method SVT\_integr\_max

## Chromatogram



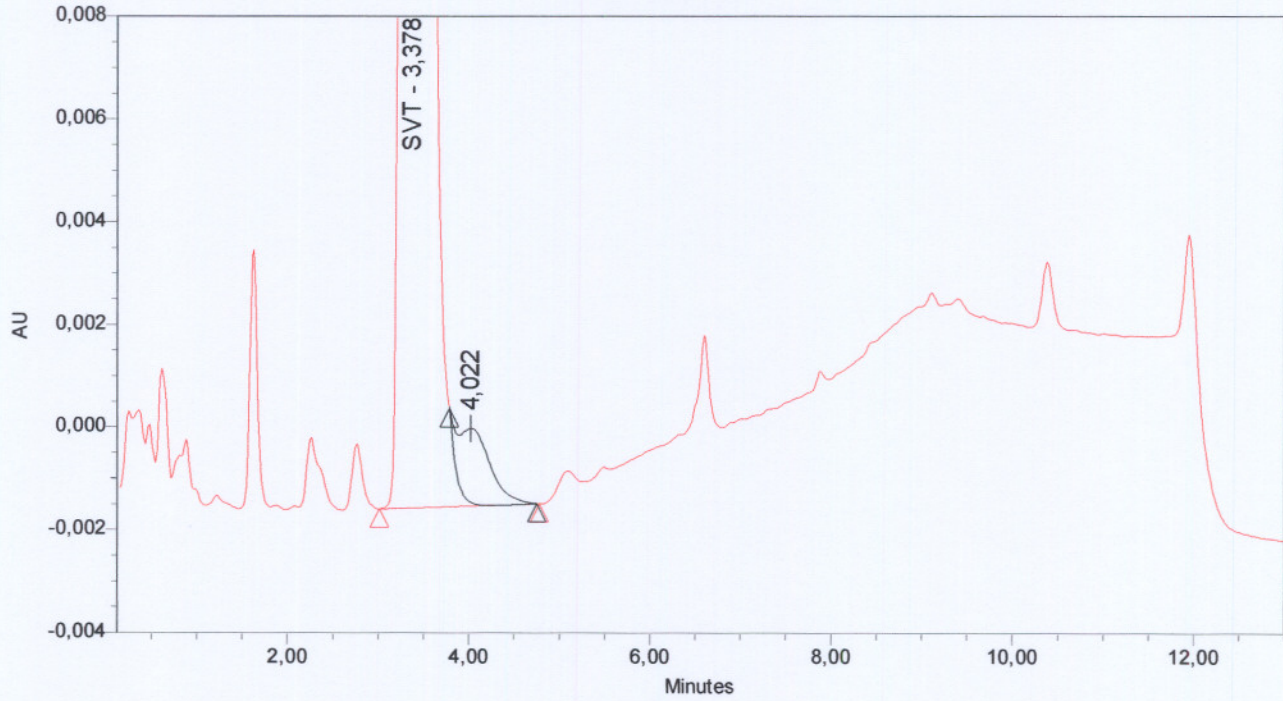
## Peak Results

Name	RT	Area	Height
1 SVT	3,378	8384174	882475

# Simvastatin

SampleName SVT10mgtab Sample Type Unknown  
Vial 7 Injection 1 LC column RP19-33  
Injection Volume 10,00 ul Date Acquired 13.04.05 13:06:22  
Channel 996 Run Time 13,0 Minutes Acq Method Set Simvastatin  
Software Version 3.05.01 User Name SigneLeito Processing Method SVT\_exp\_skim\_PDA

## Chromatogram



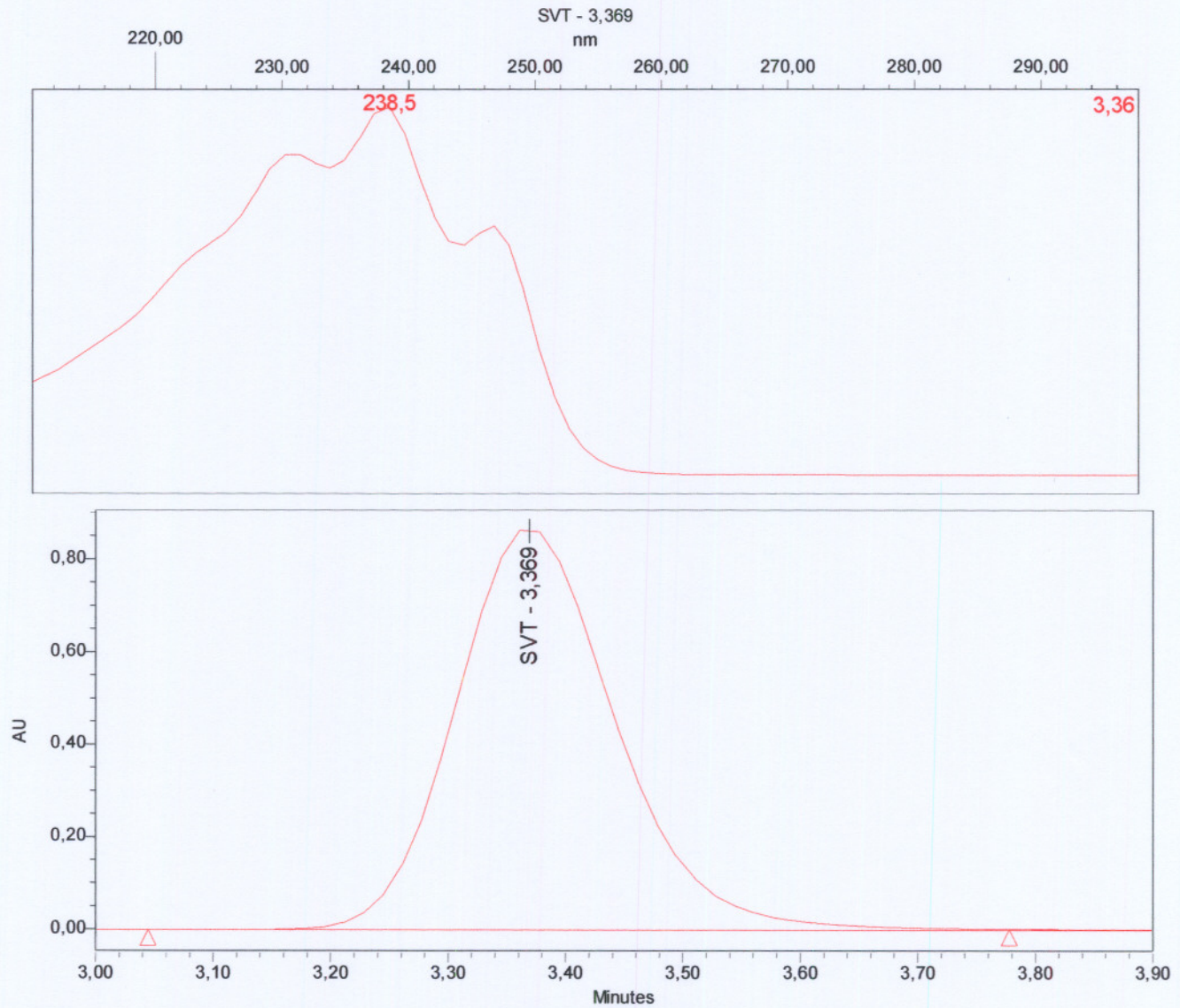
## Peak Results

Name	RT	Area	Height
1 SVT	3,378	8352571	882532
2	4,022	36115	1456

# Simvastatin

SampleName	SVT_std_13.04	Sample Type	Standard
Vial	6 Injection 3	LC column	RP19-33
Injection Volume	10,00 ul	Date Acquired	13.04.05 12:50:47
Channel	996 Run Time	13,0 Minutes	Acq Method Set Simvastatin
Software Version	3.05.01	User Name	SigneLeito
		Processing Method	SVT_exp_skim_FDA

## Spectrum Index Plot

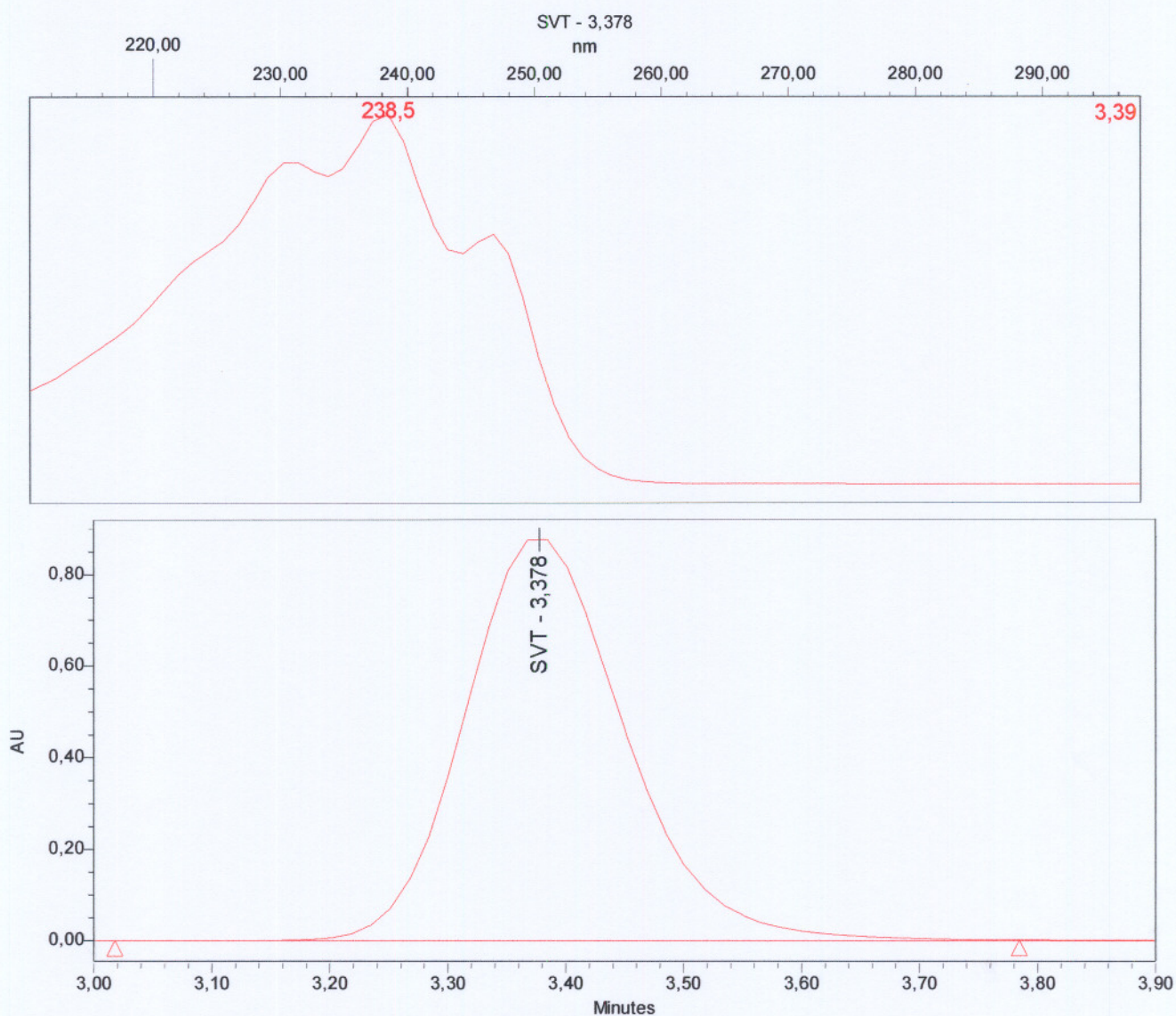


SampleName SVT\_std\_13.04 Vial 6 Injection 3 Date Acquired 13.04.05 12:50:47

# Simvastatin

SampleName	SVT10mgtab	Sample Type	Unknown
Vial	7 Injection 1	LC column	RP19-33
Injection Volume	10,00 ul	Date Acquired	13.04.05 13:06:22
Channel	996 Run Time 13,0 Minutes	Acq Method Set	Simvastatin
Software Version 3.05.01	User Name SigneLeito	Processing Method	SVT_exp_skim_FDA

## Spectrum Index Plot



SampleName SVT10mgtab Vial 7 Injection 1 Date Acquired 13.04.05 13:06:22

## Lisa 2 Valideerimisandmed

Järgnevatel lehekülgedel on MS Excel-i väljatrükkidena esitatud järgmised valideerimisandmed ja nende töötlus:

- Kaalumise korduvuse ja triivi määramine.
- Tablettidevahelise varieeruvuse (proovivõtmise määramatuse panuse) määramine.
- Sisestatud lahuse kontsentratsiooni ja piigi pindala vahelise sõltuvuse mittelineaarsuse panuse hindamine ühe-punkti kalibreerimise ja kalibreerimisgraafiku meetodi jaoks. Samadest andmetest on leitud ka kalibreerimisgraafiku lahuste piikide integreerimisest põhjustatud suhteline määramatus.
- Standardlahuse stabiilsuse hindamise andmed ning töötlus. Samadest andmetest on hinnatud piigi pindala muutust ajas ehk triivi.
- Proovi lahuse pikaajalise stabiilsuse hindamise andmed ning töötlus. Samadest andmetest on hinnatud ka proovi lahuse piigi pindala korduvus (kogutud standardhälbe abil) ning proovi piigi integreerimisest põhjustatud määramatus.
- Standardlahuse pikaajalise stabiilsuse hindamise andmed ning töötlus. Samadest andmetest on hinnatud ka standardlahuse piigi pindala korduvus (kogutud standardhälbe abil).
- Saagise  $R$  leidmine spaikimis(rikastamis)katsete abil.

## Massi mõõtmise korduvuse ja triivi määramatuse hindamine dispersioonanalüüsi (ANOVA) abil

12.04.2005

Aeg	9:43:13	10:55:13	11:54:23
Mass, g	grupp1	grupp2	grupp3
	1.0012	1.00122	1.00119
	1.00119	1.00121	1.00125
	1.00118	1.00122	1.00121
	1.00119	1.00115	1.00119
	1.0012	1.0012	1.0012
	1.00118	1.0012	1.00122
	1.00118	1.00119	1.00123

Kogu std hälve:

stdev funktsiooniga:

0.0000212 g

SS kaudu:

0.0000212 g

Summaarselt punkte:

21

Gruppe

3

Grupis punkte:

7

Summaarselt vabadusastmeid:

20

Grupisiselt vabadusastmeid:

18

Grupivaheliselt vabadusastmeid:

2

MS grupisisene:

3.841E-10 g<sup>2</sup>

**std hälve grupisiselt:**

**0.0000196 g**

see on sisuliselt korduvuse standardmääramatus, s\_within

MS gruppidevaheline:

1.043E-09 g<sup>2</sup>

**std hälve gruppide vahel:**

**0.0000097 g**

see on sisuliselt triivist tulenev standardmääramatus, s\_between

Arvestades vaid korduvust ja triivi oleks massi standardmääramatus:

**mass standardmääramatus:**

**0.0000219 g**

Anova: Single Factor

SUMMARY

Groups	Count	Sum	Average	Variance
grupp1	7	7.00832	1.001188571	8.09526E-11
grupp2	7	7.00839	1.001198571	5.80952E-10
grupp3	7	7.00849	1.001212857	4.90476E-10

ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	2.08572E-09	2	1.04286E-09	2.714879473	0.093227	3.555
Within Groups	6.91428E-09	18	3.84127E-10			
Total	9.00000E-09	20	4.50000E-10			

SS: Sum of Squared differences: vastava taseme (kas grupisisestl, üle gruppide vms) üksikliikmete ja keskmise vahede ruutude summa

df: Degrees of Freedom: vastava taseme vabadusastmete arv

MS: Mean Squares: vastava taseme ruutude summa (SS) jagatud vabadusastmete arvuga (df)

MS = SS / df

## Tablettide ebäühtlusest põhjustatud määramatuse leidmine

m(SVT), mg A(SVT)st  
21.05 3E+06

	Inj 1	Inj 2	Sisaldus 1 mg/tab	Sisaldus 2 mg/tab
Sample1	3131911	3133278	9.55	9.55
Sample2	3246485	3246589	9.89	9.89
Sample3	3193855	3195283	9.73	9.74
Sample4	3206956	3206315	9.77	9.77
Sample5	3100463	3098216	9.45	9.44
Sample6	3119103	3111128	9.51	9.48
Sample7	3136667	3139522	9.56	9.57
Sample8	3163880	3163717	9.64	9.64

Kogu std hälve: 0.1484083 mg/tab  
Esimesest veerust: 0.1517312 mg/tab  
Teisest veerust: 0.1554728 mg/tab  
Veergude keskmine: 0.1536020 mg/tab

Summaarselt punkte: 16  
Gruppe: 8  
Grupis punkte: 2

Summaarselt vabadusastmeid: 15  
Grupiseselt vabadusastmeid: 8  
Grupivaheliselt vabadusastmeid: 7

MS grupisene: 4.712E-05 mg<sup>2</sup>/tab  
**std hälve grupiseselt: 0.0068640 mg/tab**

MS gruppidevaheline: 0.0471426 mg<sup>2</sup>/tab  
**std hälve gruppide vahel: 0.1534528 mg/tab**  
**Aritm. k. std. hälve: 0.0542537 mg/tab**

Anova: Single Factor

### SUMMARY

Groups	Count	Sum	Average	Variance
Row 1	2	19.09466	9.54733	8.68E-06
Row 2	2	19.7892	9.8946	5.02E-08
Row 3	2	19.47243	9.73621	9.47E-06
Row 4	2	19.54598	9.77299	1.91E-06
Row 5	2	18.89196	9.44598	2.34E-05
Row 6	2	18.98812	9.49406	0.000295
Row 7	2	19.12819	9.56409	3.79E-05
Row 8	2	19.28487	9.64243	1.23E-07

### ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	0.329998	7	0.04714	1000.583	3.97E-11	3.5005
Within Groups	0.000377	8	4.7E-05			
Total	0.330375	15	0.02203			

**Grupisene standardhälve väljendab sisuliselt meetodi korduvust**

**Gruppidevaheline standardhälve väljendab tablettide ebäühtlasest toimeaine sisaldusest tulenevat määramatuse komponenti (std määramatuse tasemel) ühe tableti kohta**

**Aritmeetilise keskmise standardhälve väljendab sama, aga keskmise Tableti jaoks.**

## Kalibreerimisgraafiku lineaarsuse hindamine (andmed)

	m(SVT), mg	c (SVT), mg/ml	Area (max)	Area (min)	Area(max)-Area(min)	[Area(max)-Area(min)]/2	Area(min)+[Area(max)-Area(min)]/2	Integreerimise suhtelised määramused
Std1, inj1	20.42	0.4084	4421596	4388889	32707	16353.5	4405242.5	0.003712
Std1, inj2	20.42	0.4084	4437185	4397893	39292	19646	4417539	0.004447
Std1, inj3	20.42	0.4084	4417178	4380862	36316	18158	4399020	0.004128
Std2, inj1	29.72	0.5944	6457461	6402623	54838	27419	6430042	0.004264
Std2, inj2	29.72	0.5944	6468336	6411883	56453	28226.5	6440109.5	0.004383
Std2, inj3	29.72	0.5944	6466904	6410148	56756	28378	6438526	0.004408
Std3, inj1	41.82	0.8364	9015981	8938416	77565	38782.5	8977198.5	0.00432
Std3, inj2	41.82	0.8364	9029780	8951317	78463	39231.5	8990548.5	0.004364
Std3, inj3	41.82	0.8364	9031792	8955926	75866	37933	8993859	0.004218
Std4, inj1	49.83	0.9966	10690064	10595987	94077	47038.5	10643025.5	0.00442
Std4, inj2	49.83	0.9966	10686608	10592726	93882	46941	10639667	0.004412
Std4, inj3	49.83	0.9966	10689825	10595074	94751	47375.5	10642449.5	0.004452
Std5, inj1	61.48	1.2296	13120190	13007078	113112	56556	13063634	0.004329
Std5, inj2	61.48	1.2296	13128845	13011458	117387	58693.5	13070151.5	0.004491
Std5, inj3	61.48	1.2296	13135081	13020477	114604	57302	13077779	0.004382

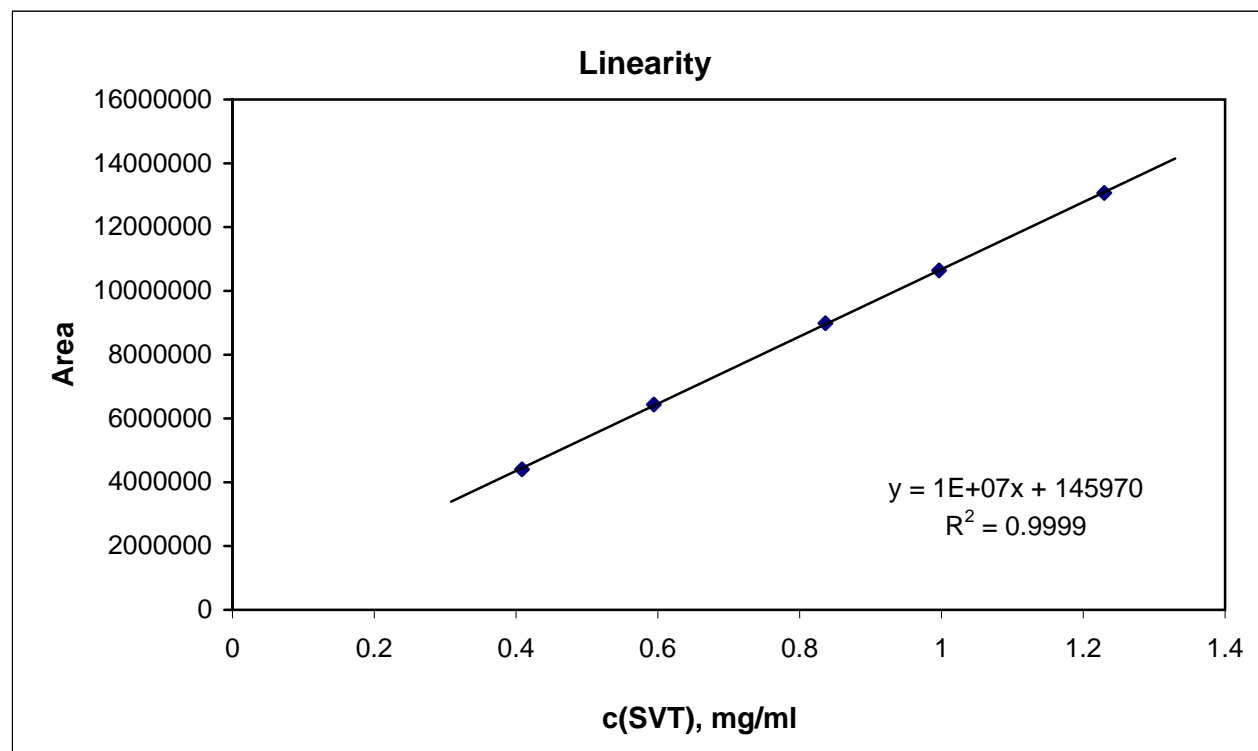
**Integreerimise suhteline ruutkeskmine määramatus**

**0.004319**

**(± tasemel, ristkülikjaotusega)**

## Näidis-kalibreerimisgraafik

	c(SVT) mg/ml	Area (average)
Std1	0.4084	4407267
Std2	0.5944	6436226
Std3	0.8364	8987202
Std4	0.9966	10641714
Std5	1.2296	13070522



## Kalibreerimisgraafiku mittelineaarsusest ja telglõigust tuleneva määramatuse hindamine (Ühe-punkti-kalibratsiooni meetod)

### SUMMARY OUTPUT

<i>Regression Statistics</i>	
Multiple R	0.999826
R Square	0.999652
Adjusted R	0.749652
Standard E	63612.21
Observatio	5

### ANOVA

	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>ignificance F</i>
Regressior	1	4.65E+13	4.65E+13	11488.87	1.79E-06
Residual	4	1.62E+10	4.05E+09		
Total	5	4.65E+13			

	<i>Coefficient</i>	<i>standard Err</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>	<i>ower 95.0%</i>	<i>pper 95.0%</i>
Intercept	0	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
X Variable	10690405	32960.16	324.3432	5.42E-10	10598892	10781917	10598892	10781917

### RESIDUAL OUTPUT

<i>Observatio</i>	<i>Predicted Y</i>	<i>Residuals</i>
1	4365961	41305.89
2	6354377	81849.28
3	8941454	45747.51
4	10654057	-12343.33
5	13144922	-74400.12

Kalibreerimisgraafiku mõningasest ebelineaarsusest ja positiivsest telglõigust tulenevalt ei vasta tegelik olukord päris täpselt ühe punkti kalibratsiooni korral eeldatavale mudelile (lineaarne graafik nullise telglõiguga). Residuaalide käitumise järgi saab hinnata võimalikke lahknevusi reaalsuse ja mudeli vahel. Kuna eesmärgiks on uurida just ühe punkti kalibreerimist ja selle määramatust, siis korrektsioone arvesse võtta ei saa. Selle asemel kasutame residuaale hindamaks maksimaalset võimalikku lahknevut ning kasutame seda "mudelile mittevastavusest" tingitud määramatuse komponendina. Maksimaalne lahknevus toodud andmete järgi on  $\pm 82000$  pindala ühikut.

## Kalibreerimisgraafiku mittelineaarsusest tuleneva määramatuse hindamine (kalibreerimisgraafiku meetod 5 punktiga)

SUMMARY OUTPUT

<i>Regression Statistics</i>	
Multiple R	0.999955
R Square	0.99991
Adjusted R	0.99988
Standard E	37386.45
Observatio	5

ANOVA

	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>ignificance F</i>
Regressior	1	4.65E+13	4.65E+13	33269.16	3.63E-07
Residual	3	4.19E+09	1.4E+09		
Total	4	4.65E+13			

	<i>Coefficient</i>	<i>standard Err</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>	<i>ower 95.0%</i>	<i>pper 95.0%</i>
Intercept	145970.3	49833.16	2.929181	0.061041	-12621.16	304561.9	-12621.16	304561.9
X Variable	10531086	57736.74	182.3984	3.63E-07	10347342	10714831	10347342	10714831

RESIDUAL OUTPUT

<i>Observator</i>	<i>Predicted Y</i>	<i>Residuals</i>
1	4446866	-39598.88
2	6405648	30577.71
3	8954171	33030.96
4	10641251	462.919
5	13094994	-24472.72

Residuaalide selline käitumine (graafiku alguses ja lõpus on nad negatiivsed, vahepeal positiivsed) viitab mittelineaarsusele. Mittelineaarsuse efekt tundmatu lahuse kontsentratsiooni määramisel sõltub tugevasti selle lahuse signaali asukohast graafikul. Seda on võimalik vahetult arvesse võtta, kuid see muudaks arvutused väga keerukaks. Lisaks on mittelineaarsus võrreldes piikide pindalade arvvaartustega väga väike. Seetõttu otsustati kasutada lihtsustatud lähenemist, mille korral hinnatakse maksimaalne võimalik hälve ja kasutatakse seda  $\pm$  tasemel (ristkülikjaotus) hinnanguna. Käesolevate andmete põhjal on maksimaalne hälve  $\pm 40000$  pindala ühikut.



## Tableti lahuse pikaajalise stabiilsuse hindamine (töötlus)

Kuupäev	10.03	11.03	14.03	15.03	17.03
Aeg (päevi):	0	1	4	5	7

### Piikide pindalad

#### Toatemp, Filtreerimata, Pimedas

	8343994	8328413	8399733	8355607	8388624
	8356788	8324564	8400106	8347150	8392979
	8346486	8415175	8406415	8341507	8383094
Keskmine:	8349089	8356051	8402084	8348088	8388232

LINEST:

pindala muutus päevas:	4650.707	8352896
Selle muutuse std hälve:	4188.554	17868.98
	0.291257	24134.21

#### Külmikus, Filtreerimata, Pimedas

	8343994	8407306	8401727	8349669	8402479
	8356788	8383253	8421862	8369185	8392700
	8346486	8376789	8406478	8388167	8393224
Keskmine:	8349089	8389116	8410022	8369007	8396134

LINEST:

pindala muutus päevas:	4268.878	8368159
Selle muutuse std hälve:	4107.411	17522.81
	0.264736	23666.67

#### Külmikus, Filtreeritud, Pimedas

	8343994	8581371	8363807	8362894
	8356788	8592052	8394389	8395572
	8346486	8608819	8387441	8374906
Keskmine:	8349089	8594080	8381879	8377791

LINEST:

pindala muutus päevas:	-14502.8	8461967
Selle muutuse std hälve:	32020.73	103759
	0.093026	132024.8

Piigi pindala korduvuse parimaks iseloomustajaks toodud andmete korral on kogutud standardhälve

**Kogutud std hälve: 18824.44**

#### Lahuse ebastabiilsusest põhjustatud määramatuse hindamine

Eeldame, et pindala muutus päevas ei ületa mingil juhul suurema muutuse juhul leitud pindala muutust päevas pluss kahte standardhälvet.

**Seega, maksimaalne pindala muutus päevas on:**

**Toatemp, Filtreerimata, Pimedas 13027.81**

**Külmikus, Filtreerimata, Pimedas 12483.7**

**Külmikus, Filtreeritud, Pimedas 78544.26**

Määramatuse leidmisel hinnatakse, mitu tundi maksimaalselt lahus seisab valmistamisest mõõtmiseni ning korrutatakse päevade arvuga.

Vastav määramatus saadakse ± tasemel (eeldatakse riskülikjaotust)

Kahel esimesel juhul lagunemine sisuliselt puudub ja vastav määramatus "upub" korduvuse sisse.

Viimsel juhul esines kahe esimese päeva vahel suur hüpe, mis on ka tulemustest näha.

Need määramatuse hinnangud lähevad kasutusse vaid siis, kui lahuseid hoitakse üleöö, mida käesolevas töös ei tehtud.

#### Integreerimise määramatuse hinnang

**Kasutame väärtuste  $[Area(max)-Area(min)]/2$**

**ruutkeskmist: 35308.49**

**See annab määramatuse hinnangu ± tasemel.**

## Standardlahuse pikaajalise stabiilsuse hindamine

Kuupäev	8.03	10.03	14.03	17.03
Aeg (päevi):	0	2	6	9

### Piikide pindalad

#### Toatemp, Pimedas

	8668434	8665096	8619580
	8669883	8666942	8635515
	8663693	8663827	8655620
Keskmine:	8689871	8667337	8665288
			8636905

#### LINEST:

pindala muutus päevas:	-5003.214	8686114
Selle muutuse std hälve:	1407.091	7739.002
	0.863417	9824.48

#### Külmikus, Pimedas

	8629644	8719461	8666490
	8634041	8696005	8676966
	8622453	8696685	8684060
Keskmine:	8689871	8628712	8704050
			8675838

#### LINEST:

pindala muutus päevas:	1964.395	8666269
Selle muutuse std hälve:	5565.096	30608.03
	0.058646	38856.17

Piigi pindala korduvuse parimaks iseloomustajaks toodud andmete korral on kogutud standardhälve

**Kogutud std hälve: 11909.56**

### Lahuse ebastabiilsusest põhjustatud määramatuse hindamine

Eeldame, et pindala muutus päevas ei ületa mingil juhul suurema muutuse juhul leitud pindala muutust päevas pluss kahte standardhälvet.

**Seega, maksimaalne pindala muutus päevas on:**

Toatemp, Pimedas	7817.396
Külmikus, Pimedas	13094.59

Määramatuse leidmisel hinnatakse, mitu tundi maksimaalselt lahus seisab valmistamisest mõõtmiseni ning korrutatakse päevade arvuga.

Vastav määramatus saadakse ± tasemel (eeldatakse riskülikjaotust)

Esimesel juhul lagunemine esineb, aga vastav määramatus "upub" korduvuse sisse.

Teisel juhul on päevadevaheline efekt olemas, aga pole selget trendi.

Need määramatuse hinnangud lähevad kasutusse vaid siis, kui lahuseid hoitakse üleöö, mida käesolevas töös ei tehtud.

## Saagise R määramine spaikimis(rikastamis)katsete abil

### Spaikimiseks kasutatav lahus:

m_SVT_std_rec, mg	199.66
V_SVT_std_rec, ml	25
C_SVT_std_rec, mg/ml	7.9864
d_SVT_std_rec, g/ml	0.839

### Tablettide lahuste tihedus:

d_tab_lahus, g/ml	0.845
-------------------	-------

Tähistused	Piikide Pindala	Lahuste valmistamine	massid	C(SVT) mg/ml	Δm, found mg	Δm, spiked mg	R ühikuta
Area_tab_1	inj1	8392569	m_tab_1 sol (4 tabletti/50ml), g	80.7522	0.789906		
	inj2	8404359	m_kolb_1, g	38.86529	0.791016		
	inj3	8409989			0.791546		
Area_tab_1 + 0.9ml SVT_rec	inj1	11241528	m_keeduklaas_1, g	51.03548	1.058049	7.0439272	7.026699347
	inj2	11269606	keeduklaas_1 + tab_1 sol, g	70.33184	1.060692	7.0812244	
	inj3	11251050	keeduklaas_1 + tab_1 sol + 0.9ml SVT_rec, g	71.07002	1.058945	7.0277433	1.003453
Area_tab_2	inj1	8441919	m_tab_2 sol (4 tabletti/50ml), g	80.4381	0.794551		
	inj2	8454018	m_kolb_2, g	38.53744	0.79569		
	inj3	8451765			0.795478		
Area_tab_2 + 0.9ml SVT_rec	inj1	11010525	m_keeduklaas_2, g	44.53249	1.036307	6.998145	6.98129395
	inj2	11006892	keeduklaas_2 + tab_2 sol, g	65.86170	1.035965	6.9604927	
	inj3	11009839	keeduklaas_2 + tab_2 sol + 0.9ml SVT_rec, g	66.59511	1.036243	6.9730807	0.999419
Area_tab_3	inj1	8434913	m_tab_3 sol (4 tabletti/50ml), g	80.7307	0.793891		
	inj2	8415169	m_kolb_3, g	38.73840	0.792033		
	inj3	8423210			0.79279		
Area_tab_3 + 0.9ml SVT_rec	inj1	11177124	m_keeduklaas_3, g	44.59422	1.051988	7.2660836	7.281521669
	inj2	11198139	keeduklaas_3 + tab_3 sol, g	65.27768	1.053965	7.3617254	
	inj3	11175656	keeduklaas_3 + tab_3 sol + 0.9ml SVT_rec, g	66.04263	1.051849	7.2895258	1.003331

<b>Keskmine Saagis R0 =</b>	<b>1.002068</b>	<b>Proovidevahelise varieeruvuse standardmääramatus:</b>	<b>0.002295</b>
		<b>Vabadusastmete arv:</b>	<b>2</b>

### **Lisa 3 Määramatuse arvutus ühe-punkti kalibratsiooni korral**

Esitatud on programmi GUM Workbench abil teostatud määramatuse arvutuse väljatrukk, mis sisaldab kõiki andmeid, mis on vajalikud arvutuse reprodutseerimiseks muu tarkvara abil.

## Assay of Simvastatin in Tablets by HPLC

The measurand: mean Simvastatin content of the 8 tablets that were taken for analysis.

The prototype of the method is based on the monographs of Simvastatin in the European Pharmacopoeia (Ph.Eur. 5th Ed.) and the United States Pharmacopoeia / the National Formulary (USP 27 / NF 22).

Scope of use and validation: Quantitative determination of Simvastatin in drug products.

Principle: The drug substance is extracted from the tablets by using solution of the 0.01M phosphate buffer pH4.0 and acetonitrile in the ratio 20:80 (V/V). The samples are filtered and the resulting solution is injected into HPLC. Separation is achieved at room temperature in a Phenomenex Prodigy 3 u ODS (end-capped) column (30 x 4.60 mm), detection wavelength is 238 nm. A Single standard solution or a series of calibration solutions (depending on the calibration procedure) of Simvastatin standard substance is used for calibration.

### Model Equation:

{ The main equation

Single point calibration method is used for quantitation (Calibration sample No 3 is used)

The result is given Recovery-corrected (R)

The sample solution is prepared by dissolving several tablets to achieve averaging

}

$$C_{SVT} = A_{\text{sample}} * C_3 * V_{100} / ( A_3 * n_{\text{tab}} * R );$$

{ Chromatographic measurements

Peak areas are used as the basis for quantification.

We assume that the uncertainty of the chromatographic peak area of the sample solution has 4 components

- Repeatability (contained in  $A_{\text{sample\_rep}}$ )
- Uncertainty due to detector drift ( $A_{\text{sample\_drift}}$ )
- Uncertainty due to imperfection of peak integration ( $A_{\text{sample\_integr}}$ )
- Uncertainty due to the slight nonlinearity of the calibration graph ( $A_{\text{sample\_nonlin}}$ )

The  $A_{\text{sample\_rep}}$  carries the value and the repeatability uncertainty. The other components carry the respective uncertainty component only, their value is 0.

}

{ Sample peak area }

$$A_{\text{sample}} = A_{\text{sample\_rep}} + A_{\text{sample\_drift}} + A_{\text{sample\_integr}} + A_{\text{sample\_nonlin}};$$

{ Recovery

The value of Recovery ( $R_0$ ) has been determined from spiking studies.

The  $R_0$  also contains the sample-to-sample variability uncertainty component

The  $A_{R\_eff}$  is the effective peak area during recovery determination and it takes into account the uncertainty in determining the recovery value.

The division by the const() function reforms  $A_{R\_eff}$  into a coefficient with vaule 1 and uncertainty

equal to the relative uncertainty of  $A_{R\_eff}$ .

}

$$R = R_0 * A_{R\_eff} / \text{const}(A_{R\_eff});$$

$$A_{R\_eff} = A_{R\_eff\_integr} + A_{R\_eff\_nonlin};$$

{ Peak area of the calibration standard solution

The area has the same components as the sample peak area, except that the nonlinearity uncertainty contribution is not included.

}

$$A_3 = A_{3rep} + A_{3drift} + A_{3integr};$$

{ Preparation of the standard solution }

$$C_3 = m_3 * P_{std} / (V_{3\_50} * 100);$$

{ Uncertainty of weighing

}

$$m_3 = m_{3\_rep} + m_{3\_buoyancy} + m_{3\_drift} + m_{3\_round} + m_{3\_electrost};$$

$$m_{3\_buoyancy} = m_{3\_rep} * f_{buoyancy};$$

{ Volumes of 50 ml volumetric flask }

$$V_{3\_50} = V_{3\_50\_cal} + V_{3\_50\_fill} + V_{3\_50\_temp};$$

$$V_{3\_50\_temp} = V_{3\_50\_cal} * \Delta t * \gamma_w;$$

{ Volume of the sample solution }

$$V_{100} = V_{100\_cal} + V_{100\_fill} + V_{100\_temp};$$

$$V_{100\_temp} = V_{100\_cal} * \Delta t * \gamma_w;$$

**List of Quantities:**

Quantity	Unit	Definition
$A_3$	AU	Peak area of the 3. calibration standard solution
$A_{3drift}$	AU	Drift uncertainty component of the peak area of the 3. calibration standard solution
$A_{3integr}$	AU	Integration uncertainty component of the peak area of the 3. calibration standard solution
$A_{3rep}$	AU	Value and the repeatability uncertainty component of the peak area of the 3. calibration standard solution
$A_{R\_eff}$	AU	The effective peak area during the Recovery determination (difference of the peak areas of spiked and unspiked solutions)

Assay of Simvastatin in Tablets by HPLC

Quantity	Unit	Definition
$A_{R\_eff\_integr}$	AU	The value and integration uncertainty of the effective peak area during the recovery determination
$A_{R\_eff\_nonlin}$	AU	The uncertainty of the effective peak area due to nonlinearity of the calibration graph during the recovery determination
$A_{sample}$	AU	Peak area of the sample solution
$A_{sample\_drift}$	AU	Drift uncertainty component of the sample peak area
$A_{sample\_integr}$	AU	Integration uncertainty component of the sample peak area
$A_{sample\_nonlin}$	AU	Uncertainty component of the sample peak area that takes into account the slight non-linearity of the calibration graph
$A_{sample\_rep}$	AU	The value of the sample solution peak area together with its repeatability uncertainty
$C_3$	mg/ml	Concentration of the 3. calibration standard solution
$C_{SVT}$	mg/tab	Content of simvastatin in Simvastatin 10 mg tablets
$f_{buoyancy}$	unitless	Correction factor for air buoyancy
$m_3$	mg	Mass of the Simvastatine CRS taken for preparation of the 3. calibration standard solution
$m_{3\_buoyancy}$	mg	Air buoyancy component of uncertainty of mass $m_3$
$m_{3\_drift}$	mg	Drift component of uncertainty of mass $m_3$
$m_{3\_electrost}$	mg	Electrostatic component of uncertainty of mass $m_3$
$m_{3\_rep}$	mg	Value of the mass of the Simvastatine CRS taken for preparation of the 3. calibration standard solution together with repeatability component of uncertainty
$m_{3\_round}$	mg	Rounding component of uncertainty of mass $m_3$
$n_{tab}$	tab	Number of the tablets taken for preparation of the sample solution
$P_{std}$	%	Purity of the Simvastatin CRS
$R$	unitless	Recovery
$R_0$	unitless	The value of $R$ and its uncertainty component that is due to the imperfection of the sample preparation procedure
$V_{100}$	ml	Volume of the sample solution
$V_{100\_cal}$	ml	Value of the volume of the sample solution together with calibration component of uncertainty
$V_{100\_fill}$	ml	Filling component of uncertainty of volume $V_{100}$
$V_{100\_temp}$	ml	Uncertainty component of volume $V_{100}$ due to temperature difference from 20°C
$V_{3\_50}$	ml	Volume of the 3. calibration standard solution
$V_{3\_50\_cal}$	ml	Value of the volume of the 3. calibration standard solution together with calibration component of uncertainty
$V_{3\_50\_fill}$	ml	Filling component of uncertainty of volume $V_{3\_50}$
$V_{3\_50\_temp}$	ml	Uncertainty component of volume $V_{3\_50}$ due to temperature difference from 20°C
$\Delta t$	°C	Diference of solution temperature from 20°C

Quantity	Unit	Definition
$\gamma_w$	1/°C	Thermal expansion coefficient of water

**A<sub>3</sub>:** Interim Result

**A<sub>3drift</sub>:** Type B rectangular distribution  
Value: 0 AU  
Halfwidth of Limits: 48000 AU

The drift per hour is maximum 12 000 peak area units. Assuming that the solution will be kept no longer than 4 hours between preparation and measurement we arrive at this uncertainty estimate. This uncertainty estimate is essentially independent of the peak area.

**A<sub>3integr</sub>:** Type B rectangular distribution  
Value: 0 AU  
Halfwidth of Limits: 38500 AU

This uncertainty contribution has been obtained by integrating the peak in two ways - one somewhat underestimating (Area(min)) and the other somewhat overestimating (Area(max)) the peak area. The uncertainty contribution has been taken equal to [Area(max)-Area(min)]/2. See text for more detail. According to our data this uncertainty contribution is proportional to the peak area.

**A<sub>3rep</sub>:** Type A summarized  
Mean: 8987202 AU  
Standard Uncertainty: 12000 AU  
Degrees of Freedom: 12

The repeatability uncertainty has been estimated using the pooled standard deviation of triplicate injections (altogether 3 x 6 injections) of a standard solution subjected to different stability tests. See the text for more detail. According to our data this uncertainty contribution is essentially independent of the sample peak area.

**A<sub>R\_eff</sub>:** Interim Result

The systematic influences are practically limited to the systematic effects in peak areas (repeatability can thus be excluded). Also, it is necessary to keep in mind that calculation of Recovery by spiking experiments leads to differences of areas of peaks that have been obtained within short time intervals (the drift component can thus be excluded). Therefore the components to be included are the integration uncertainty and the uncertainty due to nonlinearity.

**A<sub>R\_eff\_integr</sub>:** Type B rectangular distribution  
Value: 3000000 AU  
Halfwidth of Limits: 12600 AU

**A<sub>R\_eff\_nonlin</sub>:** Type B rectangular distribution  
Value: 0 AU  
Halfwidth of Limits: 40000 AU

**A<sub>sample</sub>:** Interim Result

**A<sub>sample\_drift</sub>:** Type B rectangular distribution  
Value: 0 AU  
Halfwidth of Limits: 60000 AU

The drift per hour is maximum 12 000 peak area units. Assuming that the sample solution will be kept no longer than 5 hours between preparation and measurement we arrive at this uncertainty estimate. This uncertainty estimate is essentially independent of the peak area.

**A<sub>sample\_integr</sub>:** Type B rectangular distribution  
 Value: 0 AU  
 Halfwidth of Limits: 35000 AU

This uncertainty contribution has been obtained by integrating the peak in two ways - one somewhat underestimating (Area(min)) and the other somewhat overestimating (Area(max)) the peak area. The uncertainty contribution has been taken equal to [Area(max)-Area(min)]/2. See text for more detail. According to our data this uncertainty contribution is proportional to the peak area.

**A<sub>sample\_nonlin</sub>:** Type B rectangular distribution  
 Value: 0 AU  
 Halfwidth of Limits: 82000 AU

This uncertainty contribution has been estimated from the behavior of the residuals of the calibration line. The uncertainty corresponds to the maximum possible deviation (in terms of peak area) of the calibration line from the actual concentration vs peak area relationship. This uncertainty contribution is assigned only to the peak area of the sample and not to the peak areas of the standard solutions. According to this approach this uncertainty contribution is assumed to be independent of the peak area of the sample.

**A<sub>sample\_rep</sub>:** Type A summarized  
 Mean: 8349089 AU  
 Standard Uncertainty: 19000 AU  
 Degrees of Freedom: 28

The repeatability uncertainty has been estimated using the pooled standard deviation of triplicate injections (altogether 3 x 14 injections) of a sample solution subjected to different stability tests. See the text for more detail. According to our data this uncertainty contribution is essentially independent of the sample peak area.

**C<sub>3</sub>:** Interim Result

**C<sub>SVT</sub>:** Result

**f<sub>buoyancy</sub>:** Type B rectangular distribution  
 Value: 0.0010 unitless  
 Halfwidth of Limits: 0.0002 unitless

The buoyancy factor is the part (around one thousandth under our conditions) of the mass that is added to the balance reading in order to get the physical mass of the weighed substance. The uncertainty estimate is deliberately very conservative.

**m<sub>3</sub>:** Interim Result

**m<sub>3\_buoyancy</sub>:** Interim Result

**m<sub>3\_drift</sub>:** Type A summarized  
 Mean: 0 mg  
 Standard Uncertainty: 0.0097 mg  
 Degrees of Freedom: 2

**m<sub>3\_electrost</sub>:** Type B rectangular distribution  
 Value: 0 mg  
 Halfwidth of Limits: 0.21 mg

When weighing the standard substance, interference from electrostatics (instability of the reading) was quite serious and is thus taken into account as an uncertainty component. This uncertainty component has been estimated as 0.5% of the mass of the substance.

Assay of Simvastatin in Tablets by HPLC

**m<sub>3\_rep</sub>**: Type A summarized  
 Mean: 41.82 mg  
 Standard Uncertainty: 0.0196 mg  
 Degrees of Freedom: 18

**m<sub>3\_round</sub>**: Type B rectangular distribution  
 Value: 0 mg  
 Halfwidth of Limits: 0.005 mg

**n<sub>tab</sub>**: Constant  
 Value: 8 tab

**P<sub>std</sub>**: Type B rectangular distribution  
 Value: 99.4 %  
 Halfwidth of Limits: 0.6 %

**R**: Interim Result

**R<sub>0</sub>**: Type A summarized  
 Mean: 1.002068 unitless  
 Standard Uncertainty: 0.002295 unitless  
 Degrees of Freedom: 2

Recovery value and sample-to-sample variability uncertainty. The standard uncertainty is the standard deviation of the single mavlue, not the standard deviation of the mean

**V<sub>100</sub>**: Interim Result

**V<sub>100\_cal</sub>**: Type B rectangular distribution  
 Value: 100.00 ml  
 Halfwidth of Limits: 0.1 ml

**V<sub>100\_fill</sub>**: Type B rectangular distribution  
 Value: 0 ml  
 Halfwidth of Limits: 0.09 ml

**V<sub>100\_temp</sub>**: Interim Result

**V<sub>3\_50</sub>**: Interim Result

**V<sub>3\_50\_cal</sub>**: Type B rectangular distribution  
 Value: 50.00 ml  
 Halfwidth of Limits: 0.06 ml

**V<sub>3\_50\_fill</sub>**: Type B rectangular distribution  
 Value: 0 ml  
 Halfwidth of Limits: 0.09 ml

**V<sub>3\_50\_temp</sub>**: Interim Result

**Δt**: Type B rectangular distribution  
 Value: 0 °C  
 Halfwidth of Limits: 4 °C

**γ<sub>w</sub>**: Constant  
 Value: 0.00021 1/°C

Assay of Simvastatin in Tablets by HPLC

**Uncertainty Budget:**

Quantity	Value	Standard Uncertainty	Degrees of Freedom	Distribution	Sensitivity Coefficient	Uncertainty Contribution	Index
A <sub>3drift</sub>	0.0 AU	27700 AU	infinity	rectangular	-1.1·10 <sup>-6</sup>	-0.030 mg/tab	5.6 %
A <sub>3integr</sub>	0.0 AU	22200 AU	infinity	rectangular	-1.1·10 <sup>-6</sup>	-0.024 mg/tab	3.6 %
A <sub>3rep</sub>	8.9872·10 <sup>6</sup> AU	0.0120·10 <sup>6</sup> AU	12	normal	-1.1·10 <sup>-6</sup>	-0.013 mg/tab	1.0 %
A <sub>R_eff_integr</sub>	3.00000·10 <sup>6</sup> AU	0.00727·10 <sup>6</sup> AU	infinity	rectangular	-3.2·10 <sup>-6</sup>	-0.023 mg/tab	3.4 %
A <sub>R_eff_nonlin</sub>	0.0 AU	23100 AU	infinity	rectangular	-3.2·10 <sup>-6</sup>	-0.074 mg/tab	34.6 %
A <sub>sample_drift</sub>	0.0 AU	34600 AU	infinity	rectangular	1.2·10 <sup>-6</sup>	0.040 mg/tab	10.1 %
A <sub>sample_integr</sub>	0.0 AU	20200 AU	infinity	rectangular	1.2·10 <sup>-6</sup>	0.023 mg/tab	3.4 %
A <sub>sample_nonlin</sub>	0.0 AU	47300 AU	infinity	rectangular	1.2·10 <sup>-6</sup>	0.055 mg/tab	18.8 %
A <sub>sample_rep</sub>	8.3491·10 <sup>6</sup> AU	0.0190·10 <sup>6</sup> AU	28	normal	1.2·10 <sup>-6</sup>	0.022 mg/tab	3.0 %
f <sub>buoyancy</sub>	0.001000 unitless	0.000115 unitless	infinity	rectangular	9.6	0.0011 mg/tab	0.0 %
m <sub>3_drift</sub>	0.0 mg	0.00970 mg	2	normal	0.23	0.0022 mg/tab	0.0 %
m <sub>3_electrost</sub>	0.0 mg	0.121 mg	infinity	rectangular	0.23	0.028 mg/tab	4.9 %
m <sub>3_rep</sub>	41.8200 mg	0.0196 mg	18	normal	0.23	0.0045 mg/tab	0.1 %
m <sub>3_round</sub>	0.0 mg	0.00289 mg	infinity	rectangular	0.23	0.00067 mg/tab	0.0 %
n <sub>tab</sub>	8.0 tab						
P <sub>std</sub>	99.400 %	0.346 %	infinity	rectangular	0.097	0.034 mg/tab	7.1 %
R <sub>0</sub>	1.00207 unitless	0.00229 unitless	2	normal	-9.6	-0.022 mg/tab	3.1 %
V <sub>100_cal</sub>	100.0000 ml	0.0577 ml	infinity	rectangular	0.096	0.0056 mg/tab	0.2 %
V <sub>100_fill</sub>	0.0 ml	0.0520 ml	infinity	rectangular	0.096	0.0050 mg/tab	0.2 %
V <sub>3_50_cal</sub>	50.0000 ml	0.0346 ml	infinity	rectangular	-0.19	-0.0067 mg/tab	0.3 %
V <sub>3_50_fill</sub>	0.0 ml	0.0520 ml	infinity	rectangular	-0.19	-0.010 mg/tab	0.6 %

Assay of Simvastatin in Tablets by HPLC

Quantity	Value	Standard Uncertainty	Degrees of Freedom	Distribution	Sensitivity Coefficient	Uncertainty Contribution	Index
$\Delta t$	0.0 °C	2.31 °C	infinity	rectangular	not valid!	$430 \cdot 10^{-21}$ mg/tab	0.0 %
$\gamma_w$	0.00021 1/°C						
$C_{SVT}$	9.644 mg/tab	0.126 mg/tab	2000				

**Result:** Quantity:  $C_{SVT}$   
 Value: 9.64 mg/tab  
 Expanded Uncertainty:  $\pm 0.25$  mg/tab  
 Coverage Factor: 2.00  
 Coverage: 95% (t-table 95.45%)

## **Lisa 4 Määramatuse arvutus kalibreerimisgraafiku meetodi korral**

Esitatud on programmi GUM Workbench abil teostatud määramatuse arvutuse väljatrükk, mis sisaldab kõiki andmeid, mis on vajalikud arvutuse reprodutseerimiseks muu tarkvara abil.

## Assay of Simvastatin in Tablets by HPLC

The measurand: mean Simvastatin content of the set of 8 tablets that were taken as the sample.

The prototype of the method is based on the monographs of Simvastatin in the European Pharmacopoeia (Ph.Eur. 5th Ed.) and the United States Pharmacopoeia / the National Formulary (USP 27 / NF 22).

Scope of use and validation: Quantitative determination of Simvastatin in drug products.

Principle: The drug substance is extracted from the tablets by using solution of the 0.01M phosphate buffer pH4.0 and acetonitrile in the ratio 20:80 (V/V). The samples are filtered and the resulting solution is injected into HPLC. Separation is achieved at room temperature in a Phenomenex Prodigy 3 u ODS (end-capped) column (30 x 4.60 mm), detection wavelength is 238 nm. A Single standard solution or a series of calibration solutions (depending on the calibration procedure) of Simvastatin standard substance is used for calibration.

### Model Equation:

{ The main equation

Calibration graph method (with slope  $b_1$  and intercept  $b_0$ ) is used for quantitation

The result is given Recovery-corrected (R)

The sample solution is prepared by dissolving several tablets to achieve averaging

}

$$C_{SVT} = (A_{\text{sample}} - b_0) * V_{100} / (b_1 * n_{\text{tab}} * R);$$

{ Chromatographic measurements

Peak areas are used as the basis for quantification.

We assume that the uncertainty of the chromatographic peak area of the sample solution has 4 components

- Repeatability (contained in  $A_{\text{sample\_rep}}$ )
- Uncertainty due to detector drift ( $A_{\text{sample\_drift}}$ )
- Uncertainty due to imperfection of peak integration ( $A_{\text{sample\_integr}}$ )
- Uncertainty due to the slight nonlinearity of the calibration graph ( $A_{\text{sample\_nonlin}}$ )

The  $A_{\text{sample\_rep}}$  carries the value and the repeatability uncertainty. The other components carry the respective uncertainty component only, their value is 0.

}

{ Sample peak area }

$$A_{\text{sample}} = A_{\text{sample\_rep}} + A_{\text{sample\_drift}} + A_{\text{sample\_integr}} + A_{\text{sample\_nonlin}};$$

{ Recovery

The value of Recovery ( $R_0$ ) has been determined from spiking studies.

The  $R_0$  also contains the sample-to-sample variability uncertainty component

The  $A_{R\_eff}$  is the effective peak area during recovery determination and it takes into account the uncertainty in determining the recovery value.

The division by the const() function reforms  $A_{R\_eff}$  into a coefficient with value 1 and uncertainty

equal to the relative uncertainty of  $A_{R\_eff}$ .

}

$$R = R_0 * A_{R\_eff} / \text{const}(A_{R\_eff});$$

$$A_{R\_eff} = A_{R\_eff\_integr} + A_{R\_eff\_nonlin};$$

{ Peak areas of the calibration standard solutions

Their areas have the same components as the sample peak area, except that the nonlinearity uncertainty contribution is not included.

}

$$A_1 = A_{1rep} + A_{1drift} + A_{1integr};$$

$$A_2 = A_{2rep} + A_{2drift} + A_{2integr};$$

$$A_3 = A_{3rep} + A_{3drift} + A_{3integr};$$

$$A_4 = A_{4rep} + A_{4drift} + A_{4integr};$$

$$A_5 = A_{5rep} + A_{5drift} + A_{5integr};$$

{ Linear regression equations (Calibration graph is used for quantitation) }

$$\Sigma AC = C_1 * A_1 + C_2 * A_2 + C_3 * A_3 + C_4 * A_4 + C_5 * A_5;$$

$$\text{AvgC} = (C_1 + C_2 + C_3 + C_4 + C_5) / n;$$

$$\text{AvgA} = (A_1 + A_2 + A_3 + A_4 + A_5) / n;$$

$$\Sigma CC = C_1 * C_1 + C_2 * C_2 + C_3 * C_3 + C_4 * C_4 + C_5 * C_5;$$

$$b_1 = (\Sigma AC - n * \text{AvgC} * \text{AvgA}) / (\Sigma CC - n * \text{AvgC} * \text{AvgC});$$

$$b_0 = \text{AvgA} - b_1 * \text{AvgC};$$

{ Preparation of standard solutions }

$$C_1 = m_1 * P_{std} / (V_{1\_50} * 100);$$

$$C_2 = m_2 * P_{std} / (V_{2\_50} * 100);$$

$$C_3 = m_3 * P_{std} / (V_{3\_50} * 100);$$

$$C_4 = m_4 * P_{std} / (V_{4\_50} * 100);$$

$$C_5 = m_5 * P_{std} / (V_{5\_50} * 100);$$

{ Uncertainty of weighing

}

$$m_1 = m_{1\_rep} + m_{1\_buoyancy} + m_{1\_drift} + m_{1\_round} + m_{1\_electrost};$$

$$m_2 = m_{2\_rep} + m_{2\_buoyancy} + m_{2\_drift} + m_{2\_round} + m_{2\_electrost};$$

$$m_3 = m_{3\_rep} + m_{3\_buoyancy} + m_{3\_drift} + m_{3\_round} + m_{3\_electrost};$$

$$m_4 = m_{4\_rep} + m_{4\_buoyancy} + m_{4\_drift} + m_{4\_round} + m_{4\_electrost};$$

Assay of Simvastatin in Tablets by HPLC

$$m_5 = m_{5\_rep} + m_{5\_buoyancy} + m_{5\_drift} + m_{5\_round} + m_{5\_electrost};$$

$$m_{1\_buoyancy} = m_{1\_rep} * f_{buoyancy};$$

$$m_{2\_buoyancy} = m_{2\_rep} * f_{buoyancy};$$

$$m_{3\_buoyancy} = m_{3\_rep} * f_{buoyancy};$$

$$m_{4\_buoyancy} = m_{4\_rep} * f_{buoyancy};$$

$$m_{5\_buoyancy} = m_{5\_rep} * f_{buoyancy};$$

{ Volumes of 50 ml volumetric flask }

$$V_{1\_50} = V_{1\_50\_cal} + V_{1\_50\_fill} + V_{1\_50\_temp};$$

$$V_{2\_50} = V_{2\_50\_cal} + V_{2\_50\_fill} + V_{2\_50\_temp};$$

$$V_{3\_50} = V_{3\_50\_cal} + V_{3\_50\_fill} + V_{3\_50\_temp};$$

$$V_{4\_50} = V_{4\_50\_cal} + V_{4\_50\_fill} + V_{4\_50\_temp};$$

$$V_{5\_50} = V_{5\_50\_cal} + V_{5\_50\_fill} + V_{5\_50\_temp};$$

$$V_{1\_50\_temp} = V_{1\_50\_cal} * \Delta t * \gamma_w;$$

$$V_{2\_50\_temp} = V_{2\_50\_cal} * \Delta t * \gamma_w;$$

$$V_{3\_50\_temp} = V_{3\_50\_cal} * \Delta t * \gamma_w;$$

$$V_{4\_50\_temp} = V_{4\_50\_cal} * \Delta t * \gamma_w;$$

$$V_{5\_50\_temp} = V_{5\_50\_cal} * \Delta t * \gamma_w;$$

{ Volume of the sample solution }

$$V_{100} = V_{100\_cal} + V_{100\_fill} + V_{100\_temp};$$

$$V_{100\_temp} = V_{100\_cal} * \Delta t * \gamma_w;$$

**List of Quantities:**

Quantity	Unit	Definition
A <sub>1</sub>	AU	Peak area of the 1. calibration standard solution
A <sub>1drift</sub>	AU	Drift uncertainty component of the peak area of the 1. calibration standard solution
A <sub>1integr</sub>	AU	Integration uncertainty component of the peak area of the 1. calibration standard solution
A <sub>1rep</sub>	AU	Value and the repeatability uncertainty component of the peak area of the 1. calibration standard solution
A <sub>2</sub>	AU	Peak area of the 2. calibration standard solution
A <sub>2drift</sub>	AU	Drift uncertainty component of the peak area of the 2. calibration standard solution
A <sub>2integr</sub>	AU	Integration uncertainty component of the peak area of the 2. calibration standard solution
A <sub>2rep</sub>	AU	Value and the repeatability uncertainty component of the peak area of the 2. calibration standard solution
A <sub>3</sub>	AU	Peak area of the 3. calibration standard solution

Assay of Simvastatin in Tablets by HPLC

Quantity	Unit	Definition
$A_{3\text{drift}}$	AU	Drift uncertainty component of the peak area of the 3. calibration standard solution
$A_{3\text{integr}}$	AU	Integration uncertainty component of the peak area of the 3. calibration standard solution
$A_{3\text{rep}}$	AU	Value and the repeatability uncertainty component of the peak area of the 3. calibration standard solution
$A_4$	AU	Peak area of the 4. calibration standard solution
$A_{4\text{drift}}$	AU	Drift uncertainty component of the peak area of the 4. calibration standard solution
$A_{4\text{integr}}$	AU	Integration uncertainty component of the peak area of the 4. calibration standard solution
$A_{4\text{rep}}$	AU	Value and the repeatability uncertainty component of the peak area of the 4. calibration standard solution
$A_5$	AU	Peak area of the 5. calibration standard solution
$A_{5\text{drift}}$	AU	Drift uncertainty component of the peak area of the 5. calibration standard solution
$A_{5\text{integr}}$	AU	Integration uncertainty component of the peak area of the 5. calibration standard solution
$A_{5\text{rep}}$	AU	Value and the repeatability uncertainty component of the peak area of the 5. calibration standard solution
$A_{R\_eff}$	AU	The effective peak area during the Recovery determination (difference of the peak areas of spiked and unspiked solutions)
$A_{R\_eff\_integr}$	AU	The value and integration uncertainty of the effective peak area during the recovery determination
$A_{R\_eff\_nonlin}$	AU	The uncertainty of the effective peak area due to nonlinearity of the calibration graph during the recovery determination
$A_{\text{sample}}$	AU	Peak area of the sample solution
$A_{\text{sample\_drift}}$	AU	Drift uncertainty component of the sample peak area
$A_{\text{sample\_integr}}$	AU	Integration uncertainty component of the sample peak area
$A_{\text{sample\_nonlin}}$	AU	Uncertainty component of the sample peak area that takes into account the slight non-linearity of the calibration graph
$A_{\text{sample\_rep}}$	AU	The value of the sample solution peak area together with its repeatability uncertainty
AvgA	AU	Interim quantity for regression statistics calculation
AvgC	mg/ml	Interim quantity for regression statistics calculation
$b_0$	AU	Intercept of the calibration line
$b_1$	AU*ml/mg	Slope of the calibration line
$C_1$	mg/ml	Concentration of the 1. calibration standard solution
$C_2$	mg/ml	Concentration of the 2. calibration standard solution
$C_3$	mg/ml	Concentration of the 3. calibration standard solution
$C_4$	mg/ml	Concentration of the 4. calibration standard solution
$C_5$	mg/ml	Concentration of the 5. calibration standard solution

Assay of Simvastatin in Tablets by HPLC

Quantity	Unit	Definition
$C_{SVT}$	mg/tab	Content of simvastatin in Simvastatin 10 mg tablets
$f_{buoyancy}$	unitless	Correction factor for air buoyancy
$m_1$	mg	Mass of the Simvastatin CRS taken for preparation of the 1. calibration standard solution
$m_{1\_buoyancy}$	mg	Air buoyancy component of uncertainty of mass m1
$m_{1\_drift}$	mg	Drift component of uncertainty of mass m1
$m_{1\_electrost}$	mg	Electrostatic component of uncertainty of mass m1
$m_{1\_rep}$	mg	Value of the mass of the Simvastatin CRS taken for preparation of the 1. calibration standard solution together with repeatability component of uncertainty
$m_{1\_round}$	mg	Rounding component of uncertainty of mass m1
$m_2$	mg	Mass of the Simvastatine CRS taken for preparation of the 2. calibration standard solution
$m_{2\_buoyancy}$	mg	Air buoyancy component of uncertainty of mass m2
$m_{2\_drift}$	mg	Drift component of uncertainty of mass m2
$m_{2\_electrost}$	mg	Electrostatic component of uncertainty of mass m2
$m_{2\_rep}$	mg	Value of the mass of the Simvastatine CRS taken for preparation of the 2. calibration standard solution together with repeatability component of uncertainty
$m_{2\_round}$	mg	Rounding component of uncertainty of mass m2
$m_3$	mg	Mass of the Simvastatine CRS taken for preparation of the 3. calibration standard solution
$m_{3\_buoyancy}$	mg	Air buoyancy component of uncertainty of mass m3
$m_{3\_drift}$	mg	Drift component of uncertainty of mass m3
$m_{3\_electrost}$	mg	Electrostatic component of uncertainty of mass m3
$m_{3\_rep}$	mg	Value of the mass of the Simvastatine CRS taken for preparation of the 3. calibration standard solution together with repeatability component of uncertainty
$m_{3\_round}$	mg	Rounding component of uncertainty of mass m3
$m_4$	mg	Mass of the Simvastatine CRS taken for preparation of the 4. calibration standard solution
$m_{4\_buoyancy}$	mg	Air buoyancy component of uncertainty of mass m4
$m_{4\_drift}$	mg	Drift component of uncertainty of mass m4
$m_{4\_electrost}$	mg	Electrostatic component of uncertainty of mass m4
$m_{4\_rep}$	mg	Value of the mass of the Simvastatine CRS taken for preparation of the 4. calibration standard solution together with repeatability component of uncertainty
$m_{4\_round}$	mg	Rounding component of uncertainty of mass m4
$m_5$	mg	Mass of the Simvastatine CRS taken for preparation of the 5. calibration standard solution
$m_{5\_buoyancy}$	mg	Air buoyancy component of uncertainty of mass m5
$m_{5\_drift}$	mg	Drift component of uncertainty of mass m5

Assay of Simvastatin in Tablets by HPLC

Quantity	Unit	Definition
$m_{5\_electrost}$	mg	Electrostatic component of uncertainty of mass $m_5$
$m_{5\_rep}$	mg	Value of the mass of the Simvastatine CRS taken for preparation of the 5. calibration standard solution together with repeatability component of uncertainty
$m_{5\_round}$	mg	Rounding component of uncertainty of mass $m_5$
$n$	unitless	Number of points on the calibration line
$n_{tab}$	tab	Number of the tablets taken for preparation of the sample solution
$P_{std}$	%	Purity of the Simvastatin CRS
$R$	unitless	Recovery
$R_0$	unitless	The value of $R$ and its uncertainty component that is due to the imperfection of the sample preparation procedure
$V_{100}$	ml	Volume of the sample solution
$V_{100\_cal}$	ml	Value of the volume of the sample solution together with calibration component of uncertainty
$V_{100\_fill}$	ml	Filling component of uncertainty of volume $V_{100}$
$V_{100\_temp}$	ml	Uncertainty component of volume $V_{100}$ due to temperature difference from 20°C
$V_{1\_50}$	ml	Volume of the 1. calibration standard solution
$V_{1\_50\_cal}$	ml	Value of the volume of the 1. calibration standard solution together with calibration component of uncertainty
$V_{1\_50\_fill}$	ml	Filling component of uncertainty of volume $V_{1\_50}$
$V_{1\_50\_temp}$	ml	Uncertainty component of volume $V_{1\_50}$ due to temperature difference from 20°C
$V_{2\_50}$	ml	Volume of the 2. calibration standard solution
$V_{2\_50\_cal}$	ml	Value of the volume of the 2. calibration standard solution together with calibration component of uncertainty
$V_{2\_50\_fill}$	ml	Filling component of uncertainty of volume $V_{2\_50}$
$V_{2\_50\_temp}$	ml	Uncertainty component of volume $V_{2\_50}$ due to temperature difference from 20°C
$V_{3\_50}$	ml	Volume of the 3. calibration standard solution
$V_{3\_50\_cal}$	ml	Value of the volume of the 3. calibration standard solution together with calibration component of uncertainty
$V_{3\_50\_fill}$	ml	Filling component of uncertainty of volume $V_{3\_50}$
$V_{3\_50\_temp}$	ml	Uncertainty component of volume $V_{3\_50}$ due to temperature difference from 20°C
$V_{4\_50}$	ml	Volume of the 4. calibration standard solution
$V_{4\_50\_cal}$	ml	Value of the volume of the 4. calibration standard solution together with calibration component of uncertainty
$V_{4\_50\_fill}$	ml	Filling component of uncertainty of volume $V_{4\_50}$
$V_{4\_50\_temp}$	ml	Uncertainty component of volume $V_{4\_50}$ due to temperature difference from 20°C
$V_{5\_50}$	ml	Volume of the 5. calibration standard solution

Assay of Simvastatin in Tablets by HPLC

Quantity	Unit	Definition
$V_{5\_50\_cal}$	ml	Value of the volume of the 5. calibration standard solution together with calibration component of uncertainty
$V_{5\_50\_fill}$	ml	Filling component of uncertainty of volume $V_{5\_50}$
$V_{5\_50\_temp}$	ml	Uncertainty component of volume $V_{5\_50}$ due to temperature difference from 20°C
$\Delta t$	°C	Diference of solution temperature from 20°C
$\gamma_w$	1/°C	Thermal expansion coefficent of water
$\Sigma AC$	AU*mg/ml	Interim quantity for regression statistics
$\Sigma CC$	mg <sup>2</sup> /ml <sup>2</sup>	Interim quantity for regression statistics

**A<sub>1</sub>:** Interim Result

**A<sub>1drift</sub>:** Type B rectangular distribution  
Value: 0 AU  
Halfwidth of Limits: 24000 AU

The drift per hour is maximum 12 000 peak area units. Assuming that the solution will be kept no longer than 2 hours between preparation and measurement we arrive at this uncertainty estimate. This uncertainty estimate is essentially independent of the peak area.

**A<sub>1integr</sub>:** Type B rectangular distribution  
Value: 0 AU  
Halfwidth of Limits: 18000 AU

This uncertainty contribution has been obtained by integrating the peak in two ways - one somewhat underestimating (Area(min)) and the other somewhat overestimating (Area(max)) the peak area. The uncertainty contribution has been taken equal to [Area(max)-Area(min)]/2. See text for more detail. According to our data this uncertainty contribution is proportional to the peak area.

**A<sub>1rep</sub>:** Type A summarized  
Mean: 4407267 AU  
Standard Uncertainty: 12000 AU  
Degrees of Freedom: 12

The repeatability uncertainty has been estimated using the pooled standard deviation of triplicate injections (altogether 3 x 6 injections) of a standard solution subjected to different stability tests. See the text for more detail. According to our data this uncertainty contribution is essentially independent of the sample peak area.

**A<sub>2</sub>:** Interim Result

**A<sub>2drift</sub>:** Type B rectangular distribution  
Value: 0 AU  
Halfwidth of Limits: 36000 AU

The drift per hour is maximum 12 000 peak area units. Assuming that the solution will be kept no longer than 3 hours between preparation and measurement we arrive at this uncertainty estimate. This uncertainty estimate is essentially independent of the peak area.

**A<sub>2integr</sub>:** Type B rectangular distribution  
Value: 0 AU  
Halfwidth of Limits: 28000 AU

This uncertainty contribution has been obtained by integrating the peak in two ways - one somewhat underestimating (Area(min)) and the other somewhat overestimating (Area(max)) the peak area. The uncertainty contribution has been taken equal to  $[\text{Area}(\text{max})-\text{Area}(\text{min})]/2$ . See text for more detail. According to our data this uncertainty contribution is proportional to the peak area.

**A<sub>2rep</sub>**: Type A summarized  
 Mean: 6436226 AU  
 Standard Uncertainty: 12000 AU  
 Degrees of Freedom: 12

The repeatability uncertainty has been estimated using the pooled standard deviation of triplicate injections (altogether 3 x 6 injections) of a standard solution subjected to different stability tests. See the text for more detail. According to our data this uncertainty contribution is essentially independent of the sample peak area.

**A<sub>3</sub>**: Interim Result  
**A<sub>3drift</sub>**: Type B rectangular distribution  
 Value: 0 AU  
 Halfwidth of Limits: 48000 AU

The drift per hour is maximum 12 000 peak area units. Assuming that the solution will be kept no longer than 4 hours between preparation and measurement we arrive at this uncertainty estimate. This uncertainty estimate is essentially independent of the peak area.

**A<sub>3integr</sub>**: Type B rectangular distribution  
 Value: 0 AU  
 Halfwidth of Limits: 38500 AU

This uncertainty contribution has been obtained by integrating the peak in two ways - one somewhat underestimating (Area(min)) and the other somewhat overestimating (Area(max)) the peak area. The uncertainty contribution has been taken equal to  $[\text{Area}(\text{max})-\text{Area}(\text{min})]/2$ . See text for more detail. According to our data this uncertainty contribution is proportional to the peak area.

**A<sub>3rep</sub>**: Type A summarized  
 Mean: 8987202 AU  
 Standard Uncertainty: 12000 AU  
 Degrees of Freedom: 12

The repeatability uncertainty has been estimated using the pooled standard deviation of triplicate injections (altogether 3 x 6 injections) of a standard solution subjected to different stability tests. See the text for more detail. According to our data this uncertainty contribution is essentially independent of the sample peak area.

**A<sub>4</sub>**: Interim Result  
**A<sub>4drift</sub>**: Type B rectangular distribution  
 Value: 0 AU  
 Halfwidth of Limits: 60000 AU

The drift per hour is maximum 12 000 peak area units. Assuming that the solution will be kept no longer than 5 hours between preparation and measurement we arrive at this uncertainty estimate. This uncertainty estimate is essentially independent of the peak area.

**A<sub>4integr</sub>**: Type B rectangular distribution  
 Value: 0 AU  
 Halfwidth of Limits: 47000 AU

This uncertainty contribution has been obtained by integrating the peak in two ways - one somewhat underestimating (Area(min)) and the other somewhat overestimating (Area(max)) the peak area. The uncertainty contribution has been taken equal to  $[\text{Area}(\text{max})-\text{Area}(\text{min})]/2$ . See text for more detail. According to our data this uncertainty contribution is proportional to the peak area.

**A<sub>4rep</sub>**: Type A summarized  
 Mean: 10642449.5 AU  
 Standard Uncertainty: 12000 AU  
 Degrees of Freedom: 12

The repeatability uncertainty has been estimated using the pooled standard deviation of triplicate injections (altogether 3 x 6 injections) of a standard solution subjected to different stability tests. See the text for more detail. According to our data this uncertainty contribution is essentially independent of the sample peak area.

**A<sub>5</sub>**: Interim Result  
**A<sub>5drift</sub>**: Type B rectangular distribution  
 Value: 0 AU  
 Halfwidth of Limits: 72000 AU

The drift per hour is maximum 12 000 peak area units. Assuming that the solution will be kept no longer than 6 hours between preparation and measurement we arrive at this uncertainty estimate. This uncertainty estimate is essentially independent of the peak area.

**A<sub>5integr</sub>**: Type B rectangular distribution  
 Value: 0 AU  
 Halfwidth of Limits: 57500 AU

This uncertainty contribution has been obtained by integrating the peak in two ways - one somewhat underestimating (Area(min)) and the other somewhat overestimating (Area(max)) the peak area. The uncertainty contribution has been taken equal to  $[\text{Area}(\text{max})-\text{Area}(\text{min})]/2$ . See text for more detail. According to our data this uncertainty contribution is proportional to the peak area.

**A<sub>5rep</sub>**: Type A summarized  
 Mean: 13070522 AU  
 Standard Uncertainty: 12000 AU  
 Degrees of Freedom: 12

The repeatability uncertainty has been estimated using the pooled standard deviation of triplicate injections (altogether 3 x 6 injections) of a standard solution subjected to different stability tests. See the text for more detail. According to our data this uncertainty contribution is essentially independent of the sample peak area.

**A<sub>R\_eff</sub>**: Interim Result

The systematic influences are practically limited to the systematic effects in peak areas (repeatability can thus be excluded). Also, it is necessary to keep in mind that calculation of Recovery by spiking experiments leads to differences of areas of peaks that have been obtained within short time intervals (the drift component can thus be excluded). Therefore the components to be included are the integration uncertainty and the uncertainty due to nonlinearity.

**A<sub>R\_eff\_integr</sub>**: Type B rectangular distribution  
 Value: 3000000 AU  
 Halfwidth of Limits: 12600 AU

**A<sub>R\_eff\_nonlin</sub>**: Type B rectangular distribution  
 Value: 0 AU  
 Halfwidth of Limits: 40000 AU

**A<sub>sample</sub>**: Interim Result

**A<sub>sample\_drift</sub>**: Type B rectangular distribution  
 Value: 0 AU  
 Halfwidth of Limits: 60000 AU

The drift per hour is maximum 12 000 peak area units. Assuming that the sample solution will be kept no longer than 5 hours between preparation and measurement we arrive at this uncertainty estimate. This uncertainty estimate is essentially independent of the peak area.

**A<sub>sample\_integr</sub>**: Type B rectangular distribution  
 Value: 0 AU  
 Halfwidth of Limits: 35000 AU

This uncertainty contribution has been obtained by integrating the peak in two ways - one somewhat underestimating (Area(min)) and the other somewhat overestimating (Area(max)) the peak area. The uncertainty contribution has been taken equal to [Area(max)-Area(min)]/2. See text for more detail. According to our data this uncertainty contribution is proportional to the peak area.

**A<sub>sample\_nonlin</sub>**: Type B rectangular distribution  
 Value: 0 AU  
 Halfwidth of Limits: 40000 AU

This uncertainty contribution has been estimated from the behavior of the residuals of the calibration line. The uncertainty corresponds to the maximum possible deviation (in terms of peak area) of the calibration line from the actual concentration vs peak area relationship. This uncertainty contribution is assigned only to the peak area of the sample and not to the peak areas of the standard solutions. According to this approach this uncertainty contribution is assumed to be independent of the peak area of the sample.

**A<sub>sample\_rep</sub>**: Type A summarized  
 Mean: 8349089 AU  
 Standard Uncertainty: 19000 AU  
 Degrees of Freedom: 28

The repeatability uncertainty has been estimated using the pooled standard deviation of triplicate injections (altogether 3 x 14 injections) of a sample solution subjected to different stability tests. See the text for more detail. According to our data this uncertainty contribution is essentially independent of the sample peak area.

**AvgA**: Interim Result

**AvgC**: Interim Result

**b<sub>0</sub>**: Interim Result

**b<sub>1</sub>**: Interim Result

**C<sub>1</sub>**: Interim Result

**C<sub>2</sub>**: Interim Result

**C<sub>3</sub>**: Interim Result

**C<sub>4</sub>**: Interim Result

**C<sub>5</sub>**: Interim Result

**C<sub>SVT</sub>:** Result  
**f<sub>buoyancy</sub>:** Type B rectangular distribution  
 Value: 0.0010 unitless  
 Halfwidth of Limits: 0.0002 unitless

The buoyancy factor is the part (around one thousandth under our conditions) of the mass that is added to the balance reading in order to get the physical mass of the weighed substance. The uncertainty estimate is deliberately very conservative.

**m<sub>1</sub>:** Interim Result  
**m<sub>1\_buoyancy</sub>:** Interim Result  
**m<sub>1\_drift</sub>:** Type A summarized  
 Mean: 0 mg  
 Standard Uncertainty: 0.0097 mg  
 Degrees of Freedom: 2  
**m<sub>1\_electrost</sub>:** Type B rectangular distribution  
 Value: 0 mg  
 Halfwidth of Limits: 0.10 mg

When weighing the standard substance, interference from electrostatics (instability of the reading) was quite serious and is thus taken into account as an uncertainty component. This uncertainty componen has been estimated as 0.5% of the mass of the substance.

**m<sub>1\_rep</sub>:** Type A summarized  
 Mean: 20.42 mg  
 Standard Uncertainty: 0.0196 mg  
 Degrees of Freedom: 18  
**m<sub>1\_round</sub>:** Type B rectangular distribution  
 Value: 0 mg  
 Halfwidth of Limits: 0.005 mg

**m<sub>2</sub>:** Interim Result  
**m<sub>2\_buoyancy</sub>:** Interim Result  
**m<sub>2\_drift</sub>:** Type A summarized  
 Mean: 0 mg  
 Standard Uncertainty: 0.0097 mg  
 Degrees of Freedom: 2  
**m<sub>2\_electrost</sub>:** Type B rectangular distribution  
 Value: 0 mg  
 Halfwidth of Limits: 0.15 mg

When weighing the standard substance, interference from electrostatics (instability of the reading) was quite serious and is thus taken into account as an uncertainty component. This uncertainty componen has been estimated as 0.5% of the mass of the substance.

**m<sub>2\_rep</sub>:** Type A summarized  
 Mean: 29.72 mg  
 Standard Uncertainty: 0.0196 mg  
 Degrees of Freedom: 18

Assay of Simvastatin in Tablets by HPLC

**m<sub>2\_round</sub>**: Type B rectangular distribution  
 Value: 0 mg  
 Halfwidth of Limits: 0.005 mg

**m<sub>3</sub>**: Interim Result

**m<sub>3\_buoyancy</sub>**: Interim Result

**m<sub>3\_drift</sub>**: Type A summarized  
 Mean: 0 mg  
 Standard Uncertainty: 0.0097 mg  
 Degrees of Freedom: 2

**m<sub>3\_electrost</sub>**: Type B rectangular distribution  
 Value: 0 mg  
 Halfwidth of Limits: 0.21 mg

When weighing the standard substance, interference from electrostatics (instability of the reading) was quite serious and is thus taken into account as an uncertainty component. This uncertainty componen has been estimated as 0.5% of the mass of the substance.

**m<sub>3\_rep</sub>**: Type A summarized  
 Mean: 41.82 mg  
 Standard Uncertainty: 0.0196 mg  
 Degrees of Freedom: 18

**m<sub>3\_round</sub>**: Type B rectangular distribution  
 Value: 0 mg  
 Halfwidth of Limits: 0.005 mg

**m<sub>4</sub>**: Interim Result

**m<sub>4\_buoyancy</sub>**: Interim Result

**m<sub>4\_drift</sub>**: Type A summarized  
 Mean: 0 mg  
 Standard Uncertainty: 0.0097 mg  
 Degrees of Freedom: 2

**m<sub>4\_electrost</sub>**: Type B rectangular distribution  
 Value: 0 mg  
 Halfwidth of Limits: 0.25 mg

When weighing the standard substance, interference from electrostatics (instability of the reading) was quite serious and is thus taken into account as an uncertainty component. This uncertainty componen has been estimated as 0.5% of the mass of the substance.

**m<sub>4\_rep</sub>**: Type A summarized  
 Mean: 49.83 mg  
 Standard Uncertainty: 0.0196 mg  
 Degrees of Freedom: 18

**m<sub>4\_round</sub>**: Type B rectangular distribution  
 Value: 0 mg  
 Halfwidth of Limits: 0.005 mg

**m<sub>5</sub>**: Interim Result

**m<sub>5\_buoyancy</sub>**: Interim Result

Assay of Simvastatin in Tablets by HPLC

**m<sub>5\_drift</sub>**: Type A summarized  
 Mean: 0 mg  
 Standard Uncertainty: 0.0097 mg  
 Degrees of Freedom: 2

**m<sub>5\_electrost</sub>**: Type B rectangular distribution  
 Value: 0 mg  
 Halfwidth of Limits: 0.31 mg

When weighing the standard substance, interference from electrostatics (instability of the reading) was quite serious and is thus taken into account as an uncertainty component. This uncertainty component has been estimated as 0.5% of the mass of the substance.

**m<sub>5\_rep</sub>**: Type A summarized  
 Mean: 61.48 mg  
 Standard Uncertainty: 0.0196 mg  
 Degrees of Freedom: 18

**m<sub>5\_round</sub>**: Type B rectangular distribution  
 Value: 0 mg  
 Halfwidth of Limits: 0.005 mg

**n**: Constant  
 Value: 5 unitless

**n<sub>tab</sub>**: Constant  
 Value: 8 tab

**P<sub>std</sub>**: Type B rectangular distribution  
 Value: 99.4 %  
 Halfwidth of Limits: 0.6 %

**R**: Interim Result

**R<sub>0</sub>**: Type A summarized  
 Mean: 1.002068 unitless  
 Standard Uncertainty: 0.002295 unitless  
 Degrees of Freedom: 2

Recovery value and sample-to-sample variability uncertainty. The standard uncertainty is the standard deviation of the single mavlue, not the standard deviation of the mean

**V<sub>100</sub>**: Interim Result

**V<sub>100\_cal</sub>**: Type B rectangular distribution  
 Value: 100.00 ml  
 Halfwidth of Limits: 0.1 ml

**V<sub>100\_fill</sub>**: Type B rectangular distribution  
 Value: 0 ml  
 Halfwidth of Limits: 0.09 ml

**V<sub>100\_temp</sub>**: Interim Result

**V<sub>1\_50</sub>**: Interim Result

**V<sub>1\_50\_cal</sub>**: Type B rectangular distribution  
 Value: 50.00 ml  
 Halfwidth of Limits: 0.06 ml

Assay of Simvastatin in Tablets by HPLC

**V<sub>1\_50\_fill</sub>**: Type B rectangular distribution  
 Value: 0 ml  
 Halfwidth of Limits: 0.09 ml  
**V<sub>1\_50\_temp</sub>**: Interim Result  
**V<sub>2\_50</sub>**: Interim Result  
**V<sub>2\_50\_cal</sub>**: Type B rectangular distribution  
 Value: 50.00 ml  
 Halfwidth of Limits: 0.06 ml  
**V<sub>2\_50\_fill</sub>**: Type B rectangular distribution  
 Value: 0 ml  
 Halfwidth of Limits: 0.09 ml  
**V<sub>2\_50\_temp</sub>**: Interim Result  
**V<sub>3\_50</sub>**: Interim Result  
**V<sub>3\_50\_cal</sub>**: Type B rectangular distribution  
 Value: 50.00 ml  
 Halfwidth of Limits: 0.06 ml  
**V<sub>3\_50\_fill</sub>**: Type B rectangular distribution  
 Value: 0 ml  
 Halfwidth of Limits: 0.09 ml  
**V<sub>3\_50\_temp</sub>**: Interim Result  
**V<sub>4\_50</sub>**: Interim Result  
**V<sub>4\_50\_cal</sub>**: Type B rectangular distribution  
 Value: 50.00 ml  
 Halfwidth of Limits: 0.06 ml  
**V<sub>4\_50\_fill</sub>**: Type B rectangular distribution  
 Value: 0 ml  
 Halfwidth of Limits: 0.09 ml  
**V<sub>4\_50\_temp</sub>**: Interim Result  
**V<sub>5\_50</sub>**: Interim Result  
**V<sub>5\_50\_cal</sub>**: Type B rectangular distribution  
 Value: 50.00 ml  
 Halfwidth of Limits: 0.06 ml  
**V<sub>5\_50\_fill</sub>**: Type B rectangular distribution  
 Value: 0 ml  
 Halfwidth of Limits: 0.09 ml  
**V<sub>5\_50\_temp</sub>**: Interim Result  
**Δt**: Type B rectangular distribution  
 Value: 0 °C  
 Halfwidth of Limits: 4 °C  
**γ<sub>w</sub>**: Constant  
 Value: 0.00021 1/°C  
**ΣAC**: Interim Result  
**ΣCC**: Interim Result

**Correlation Coefficients:**

	A <sub>1drift</sub>	A <sub>2drift</sub>	A <sub>3drift</sub>	A <sub>4drift</sub>	A <sub>5drift</sub>
A <sub>1drift</sub>	1	0.8	0.8	0.8	0.8
A <sub>2drift</sub>	0.8	1	0.8	0.8	0.8
A <sub>3drift</sub>	0.8	0.8	1	0.8	0.8
A <sub>4drift</sub>	0.8	0.8	0.8	1	0.8
A <sub>5drift</sub>	0.8	0.8	0.8	0.8	1

	m <sub>1_drift</sub>	m <sub>2_drift</sub>	m <sub>3_drift</sub>	m <sub>4_drift</sub>	m <sub>5_drift</sub>
m <sub>1_drift</sub>	1	0.8	0.8	0.8	0.8
m <sub>2_drift</sub>	0.8	1	0.8	0.8	0.8
m <sub>3_drift</sub>	0.8	0.8	1	0.8	0.8
m <sub>4_drift</sub>	0.8	0.8	0.8	1	0.8
m <sub>5_drift</sub>	0.8	0.8	0.8	0.8	1

	m <sub>1_electrost</sub>	m <sub>2_electrost</sub>	m <sub>3_electrost</sub>	m <sub>4_electrost</sub>	m <sub>5_electrost</sub>
m <sub>1_electrost</sub>	1	0.8	0.8	0.8	0.8
m <sub>2_electrost</sub>	0.8	1	0.8	0.8	0.8
m <sub>3_electrost</sub>	0.8	0.8	1	0.8	0.8
m <sub>4_electrost</sub>	0.8	0.8	0.8	1	0.8
m <sub>5_electrost</sub>	0.8	0.8	0.8	0.8	1

Assay of Simvastatin in Tablets by HPLC

**Uncertainty Budget:**

Quantity	Value	Standard Uncertainty	Degrees of Freedom	Distribution	Sensitivity Coefficient	Uncertainty Contribution	Index
A <sub>1drift</sub>	0.0 AU	13900 AU	infinity	rectangular	-270·10 <sup>-9</sup>	-0.0038 mg/tab	0.8 %
A <sub>1integr</sub>	0.0 AU	10400 AU	infinity	rectangular	-270·10 <sup>-9</sup>	-0.0029 mg/tab	0.0 %
A <sub>1rep</sub>	4.4073·10 <sup>6</sup> AU	0.0120·10 <sup>6</sup> AU	12	normal	-270·10 <sup>-9</sup>	-0.0033 mg/tab	0.0 %
A <sub>2drift</sub>	0.0 AU	20800 AU	infinity	rectangular	-260·10 <sup>-9</sup>	-0.0053 mg/tab	1.1 %
A <sub>2integr</sub>	0.0 AU	16200 AU	infinity	rectangular	-260·10 <sup>-9</sup>	-0.0041 mg/tab	0.1 %
A <sub>2rep</sub>	6.4362·10 <sup>6</sup> AU	0.0120·10 <sup>6</sup> AU	12	normal	-260·10 <sup>-9</sup>	-0.0031 mg/tab	0.0 %
A <sub>3drift</sub>	0.0 AU	27700 AU	infinity	rectangular	-230·10 <sup>-9</sup>	-0.0065 mg/tab	1.3 %
A <sub>3integr</sub>	0.0 AU	22200 AU	infinity	rectangular	-230·10 <sup>-9</sup>	-0.0052 mg/tab	0.2 %
A <sub>3rep</sub>	8.9872·10 <sup>6</sup> AU	0.0120·10 <sup>6</sup> AU	12	normal	-230·10 <sup>-9</sup>	-0.0028 mg/tab	0.0 %
A <sub>4drift</sub>	0.0 AU	34600 AU	infinity	rectangular	-220·10 <sup>-9</sup>	-0.0076 mg/tab	1.6 %
A <sub>4integr</sub>	0.0 AU	27100 AU	infinity	rectangular	-220·10 <sup>-9</sup>	-0.0059 mg/tab	0.3 %
A <sub>4rep</sub>	10.6424·10 <sup>6</sup> AU	0.0120·10 <sup>6</sup> AU	12	normal	-220·10 <sup>-9</sup>	-0.0026 mg/tab	0.0 %
A <sub>5drift</sub>	0.0 AU	41600 AU	infinity	rectangular	-200·10 <sup>-9</sup>	-0.0081 mg/tab	1.7 %
A <sub>5integr</sub>	0.0 AU	33200 AU	infinity	rectangular	-200·10 <sup>-9</sup>	-0.0065 mg/tab	0.3 %
A <sub>5rep</sub>	13.0705·10 <sup>6</sup> AU	0.0120·10 <sup>6</sup> AU	12	normal	-200·10 <sup>-9</sup>	-0.0023 mg/tab	0.0 %
A <sub>R_eff_integr</sub>	3.00000·10 <sup>6</sup> AU	0.00727·10 <sup>6</sup> AU	infinity	rectangular	-3.2·10 <sup>-6</sup>	-0.023 mg/tab	4.2 %
A <sub>R_eff_nonlin</sub>	0.0 AU	23100 AU	infinity	rectangular	-3.2·10 <sup>-6</sup>	-0.074 mg/tab	42.8 %
A <sub>sample_drift</sub>	0.0 AU	34600 AU	infinity	rectangular	1.2·10 <sup>-6</sup>	0.041 mg/tab	12.9 %
A <sub>sample_integr</sub>	0.0 AU	20200 AU	infinity	rectangular	1.2·10 <sup>-6</sup>	0.024 mg/tab	4.4 %
A <sub>sample_nonlin</sub>	0.0 AU	23100 AU	infinity	rectangular	1.2·10 <sup>-6</sup>	0.027 mg/tab	5.7 %
A <sub>sample_rep</sub>	8.3491·10 <sup>6</sup> AU	0.0190·10 <sup>6</sup> AU	28	normal	1.2·10 <sup>-6</sup>	0.022 mg/tab	3.9 %

Assay of Simvastatin in Tablets by HPLC

Quantity	Value	Standard Uncertainty	Degrees of Freedom	Distribution	Sensitivity Coefficient	Uncertainty Contribution	Index
f <sub>buoyancy</sub>	0.001000 unitless	0.000115 unitless	infinity	rectangular	9.7	0.0011 mg/tab	0.0 %
m <sub>1_drift</sub>	0.0 mg	0.00970 mg	2	normal	0.058	0.00056 mg/tab	0.0 %
m <sub>1_electrost</sub>	0.0 mg	0.0577 mg	infinity	rectangular	0.058	0.0033 mg/tab	0.6 %
m <sub>1_rep</sub>	20.4200 mg	0.0196 mg	18	normal	0.058	0.0011 mg/tab	0.0 %
m <sub>1_round</sub>	0.0 mg	0.00289 mg	infinity	rectangular	0.058	0.00017 mg/tab	0.0 %
m <sub>2_drift</sub>	0.0 mg	0.00970 mg	2	normal	0.054	0.00052 mg/tab	0.0 %
m <sub>2_electrost</sub>	0.0 mg	0.0866 mg	infinity	rectangular	0.054	0.0047 mg/tab	0.8 %
m <sub>2_rep</sub>	29.7200 mg	0.0196 mg	18	normal	0.054	0.0011 mg/tab	0.0 %
m <sub>2_round</sub>	0.0 mg	0.00289 mg	infinity	rectangular	0.054	0.00016 mg/tab	0.0 %
m <sub>3_drift</sub>	0.0 mg	0.00970 mg	2	normal	0.049	0.00048 mg/tab	0.0 %
m <sub>3_electrost</sub>	0.0 mg	0.121 mg	infinity	rectangular	0.049	0.0060 mg/tab	1.1 %
m <sub>3_rep</sub>	41.8200 mg	0.0196 mg	18	normal	0.049	0.00097 mg/tab	0.0 %
m <sub>3_round</sub>	0.0 mg	0.00289 mg	infinity	rectangular	0.049	0.00014 mg/tab	0.0 %
m <sub>4_drift</sub>	0.0 mg	0.00970 mg	2	normal	0.046	0.00045 mg/tab	0.0 %
m <sub>4_electrost</sub>	0.0 mg	0.144 mg	infinity	rectangular	0.046	0.0066 mg/tab	1.2 %
m <sub>4_rep</sub>	49.8300 mg	0.0196 mg	18	normal	0.046	0.00090 mg/tab	0.0 %
m <sub>4_round</sub>	0.0 mg	0.00289 mg	infinity	rectangular	0.046	0.00013 mg/tab	0.0 %
m <sub>5_drift</sub>	0.0 mg	0.00970 mg	2	normal	0.041	0.00040 mg/tab	0.0 %
m <sub>5_electrost</sub>	0.0 mg	0.179 mg	infinity	rectangular	0.041	0.0074 mg/tab	1.4 %
m <sub>5_rep</sub>	61.4800 mg	0.0196 mg	18	normal	0.041	0.00081 mg/tab	0.0 %
m <sub>5_round</sub>	0.0 mg	0.00289 mg	infinity	rectangular	0.041	0.00012 mg/tab	0.0 %
n	5.0 unitless						

Assay of Simvastatin in Tablets by HPLC

Quantity	Value	Standard Uncertainty	Degrees of Freedom	Distribution	Sensitivity Coefficient	Uncertainty Contribution	Index
$n_{\text{tab}}$	8.0 tab						
$P_{\text{std}}$	99.400 %	0.346 %	infinity	rectangular	0.097	0.034 mg/tab	8.8 %
$R_0$	1.00207 unitless	0.00229 unitless	2	normal	-9.6	-0.022 mg/tab	3.8 %
$V_{100\_cal}$	100.0000 ml	0.0577 ml	infinity	rectangular	0.097	0.0056 mg/tab	0.2 %
$V_{100\_fill}$	0.0 ml	0.0520 ml	infinity	rectangular	0.097	0.0050 mg/tab	0.2 %
$V_{1\_50\_cal}$	50.0000 ml	0.0346 ml	infinity	rectangular	-0.024	-0.00082 mg/tab	0.0 %
$V_{1\_50\_fill}$	0.0 ml	0.0520 ml	infinity	rectangular	-0.024	-0.0012 mg/tab	0.0 %
$V_{2\_50\_cal}$	50.0000 ml	0.0346 ml	infinity	rectangular	-0.032	-0.0011 mg/tab	0.0 %
$V_{2\_50\_fill}$	0.0 ml	0.0520 ml	infinity	rectangular	-0.032	-0.0017 mg/tab	0.0 %
$V_{3\_50\_cal}$	50.0000 ml	0.0346 ml	infinity	rectangular	-0.041	-0.0014 mg/tab	0.0 %
$V_{3\_50\_fill}$	0.0 ml	0.0520 ml	infinity	rectangular	-0.041	-0.0021 mg/tab	0.0 %
$V_{4\_50\_cal}$	50.0000 ml	0.0346 ml	infinity	rectangular	-0.046	-0.0016 mg/tab	0.0 %
$V_{4\_50\_fill}$	0.0 ml	0.0520 ml	infinity	rectangular	-0.046	-0.0024 mg/tab	0.0 %
$V_{5\_50\_cal}$	50.0000 ml	0.0346 ml	infinity	rectangular	-0.051	-0.0018 mg/tab	0.0 %
$V_{5\_50\_fill}$	0.0 ml	0.0520 ml	infinity	rectangular	-0.051	-0.0026 mg/tab	0.0 %
$\Delta t$	0.0 °C	2.31 °C	infinity	rectangular	not valid!	$-430 \cdot 10^{-21}$ mg/tab	0.0 %
$\gamma_w$	0.00021 1/°C						
$C_{\text{SVT}}$	9.668 mg/tab	0.114 mg/tab	1300				

**Result:** Quantity:  $C_{\text{SVT}}$   
 Value: 9.67 mg/tab  
 Expanded Uncertainty:  $\pm 0.23$  mg/tab  
 Coverage Factor: 2.00  
 Coverage: 95% (t-table 95.45%)