

TARTU ÜLIKOOL
Füüsika-keemiateaduskond
Keemilise füüsika instituut

JAANA JÜRGENS

**MÕÕTEMÄÄRAMATUS RAUA MÄÄRAMISEL UV-Vis
FOTOMEETRILISE JA FAAS MEETODIGA**

Magistritöö

füüsikalise ja analüütilise keemia erialal

Juhendajad: prof. IVO LEITO
knd. LILLI PAAMA

Tartu 2007

Sisukord

1	Sissejuhatus.....	4
2	Kirjanduse ülevaade.....	6
2.1	Mõõtmise ja mõõtemääramatus.....	6
2.1.1	Terminid ja määramatuse allikad.....	6
2.1.2	Sisendsuuruste mõõtemääramatuse hindamine.....	8
2.1.3	Mõõtmise laiendamääramatus ja tulemuse esitamine.....	10
2.1.4	Mõõtemääramatuse hindamine ISO GUM meetodiga.....	12
2.2	Raua tähtsus bioelemendina.....	13
2.2.1	Rauapreparaadid	15
2.3	UV-Vis fotomeetriline analüüs	16
2.3.1	UV-Vis fotomeetriselised reaktiivid raua määramiseks.....	17
2.3.2	Proovi ettevalmistamise meetodid elementide määramisel	19
2.3.3	Määramatuse allikad UV-Vis fotomeetriselise analüüsi juures	19
2.4	Aatomabsorptsioon-spektrometriselised meetodid	20
2.4.1	Määramatuse allikad AAS meetodi juures	21
3	Eksperimentaalne osa.....	23
3.1	Kasutatud aparatuur ja seadmed	23
3.2	Kemikaalid ja lahused.....	23
3.3	Töö meetodid	24
3.3.1	Proovi ettevalmistamine analüüsiks.....	24
3.3.2	UV-Vis fotomeetriline analüüs	25
3.3.3	Leek-aatomabsorptsioon spektrometriselise analüüsi.....	27
4	Mõõtemääramatuse hindamine	29
4.1	Mõõtesuuruse määratlemine	29
4.2	Matemaatilise mudeli koostamine	30
4.3	Määramatuse allikate identifitseerimine	32
4.4	Mudeli modifitseerimine.....	35
4.5	Määramatuse komponentide hindamine	36
4.6	Litstandarmääramatuse arvutamine ja tulemuse esitamine	41
5	Tulemused ja arutelu.....	42
5.1	Tulemused.....	42

5.2	UV-Vis ja FAAS meetodite määramatuse allikate analüüs.....	44
5.3	UV-Vis ja FAAS meetodite määramatuse koondite analüüs.....	49
6	Kokkuvõte.....	51
7	Summary.....	52
8	Kasutatud kirjandus.....	53
9	Lisad.....	57

1 Sissejuhatus

Mõõtmine on olnud maailma infrastruktuuri oluline osa juba iidsetest aegadest alates. Kõik teaduse, tehnika, riikliku kontrolli jne vallas tehtud järeldused ja otsused tuginevad andmetele, mis on saadud mõõtmise põhjal. Õigete otsuste langetamiseks peavad mõõtetulemused olema piisavalt usaldusväärsed, vaid sellisel juhul saab tulemusi kasutada otstarbekalt ja teha nende põhjal korrektseid järeldusi.

Suuruste mõõtmist ning tulemuste kvaliteeti ja usaldusväärsust käsitlevat teadusharu nimetatakse metroloogiaks [1, 2]. Mõõtetulemuse usaldusväärsuse olulisimaks iseloomustajaks on mõõtemääramatus¹. Mõõtemääramatus on omane kõigile mõõtetulemustele ja osutab sellele, et mõõdetava väärtus ei ole täpselt teada. Mõõtetulemus, ka pärast teadaolevate süstemaatiliste efektide parandamist, on ikkagi vaid mõõdetava suuruse väärtuse parim hinnang ning määramatuse komponendid, ka need, mis on tingitud süstemaatilistest efektidest (seotud parandite ja tugietalonidega), annavad tulemuslele oma panuse. Ideaalne mõõtemääramatuse hindamise ja väljendamise meetod peaks võimaldama sellise vahemiku määramist, mille korral võiks eeldada, et suurem osa mõõdetava suuruse jaoks mõistlike väärtuste jaotusest on sellega kaetud [3].

UV-Vis fotomeetria on väga laialt levinud meetod nii metallide kui ka orgaaniliste ühendite määramiseks, meetod põhineb molekulide omadusel neelata optilise piirkonna elektromagnetilist kiirgust. UV-Vis fotomeetriline meetodit kasutatakse näiteks mitmete ravimite ja toiduainete analüüsi juures. Aatomabsorptsioonspektrometria (AAS) on üks laialdasemalt kasutatavaid metallide kvantitatiivse määramise meetodeid. AAS meetodi korral kasutatakse erinevaid atomisaatoreid, levinuim nendest on leek, mille puhul räägitakse leek-AAS (FAAS) meetodist. Kuna mõlemad meetodid on väga levinud ja leiavad rakendust mitmete erinevate analüüside juures, siis on väga tähtis ka nende meetodite määramatuse hindamine.

Nii UV-Vis fotomeetrilise analüüsi [4], kui ka AAS meetodi [5] määramatuse allikaid on küllaltki põhjalikult uuritud. Samas ei ole kirjandusest leida nende meetodite määramatuste võrdlevat analüüsi, mis oleks aga praktikute jaoks väga kasulik. Ka on seni avaldatud AAS meetodi määramatusega tegelevad artiklid pühendatud

¹ Käesolevas töös kasutatakse sõnu “mõõtemääramatus” ja “määramatus” sünonüümidena.

elektrotermilisele AAS meetodile, mille määramatuse allikad on leek-AAS meetodi omadest väga erinevad.

Käesolev töö üritab kahte nimetatud lünka täita pakkudes detailse võrdleva määramatuse allikate analüüsi kahele konkreetsele meetodile – UV-Vis fotomeetria ja leek-AAS – sama analüüdi (raud) määramiseks samas maatriksis (farmatseutiline preparaat). Töö konkreetseks eesmärgiks on luua matemaatilised mudelid kummalegi meetodile, pidades silmas meetodite realiseerimise tavalabori tasemel, ning kasutades loodud mudeleid ning eksperimendiandmeid luua protseduur meetodite antud tulemuste määramatuse hindamiseks ja võrrelda meetodeid konkreetse näite baasil määramatuse allikate seisukohast. Selline võrdlus on väga kasulik meetodi tugevate ja nõrkade külgede hindamiseks ning määramatuse allikate panuste põhjal koondtabelisse ka mõõtemetodi optimeerimiseks.

2 Kirjanduse ülevaade

2.1 Mõõtmine ja mõõtemääramatus

2.1.1 Terminid ja määramatuse allikad

Mõõtmine – on operatsioonide kogum, mille eesmärgiks on mõõtesuuruse väärtuse määramine.

Mõõdis x_i - on üksikmõõtmisel saadud väärtus, näiteks mõõteriista näit ühekordsel lugemi võtmisel.

Mõõteväärtuse parimaks hinnanguks on normaaljaotusele alluvate mõõdiste x_i puhul nende mõõdiste aritmeetiline keskmine \bar{x} [3].

Mõõtesuuruseks nimetatakse mõõtmise objektiks olevat konkreetset suurust.

Reaalsetes tingimustes mõõtmine toimub alati suure hulga mõjurite toimel ning iga mõõteülesande korral arvutatakse meid huvitava mõõtesuuruse väärtus matemaatilise seosega teiste, antud mõõteülesande jaoks vajalike suuruste abil. Mõõtesuuruse väärtuse hinnangu leidmiseks tuleb seega mõõteülesandest lähtuvalt koostada mõõtesuuruse sõltuvust teistest vaadeldud suurustes kirjeldatav mõõtmise mudel [1].

Üldistatud kujul on mõõtmise matemaatiline mudel:

$$Y = f(X_1, X_2, \dots, X_i, \dots, X_N) \quad (1)$$

Toodud mudelis on väljundsuurus Y mõõtesuurus, mis sõltub sisendsuurustest X_i ($i = 1, 2, \dots, N$). Sisendsuurusteks võivad olla nii konstandid, parandid, mõjurid kui ka sellised suurused, mida tuleb antud ülesande lahendamise käigus omakorda mõõta [1].

Sisendsuuruste komplekti X_i võib jagada kahte rühma vastavalt viisile, kuidas on saadud suuruse väärtus ja sellega seotud määramatus:

(a) suurused, mille hinnang ja määramatus on saadud otseselt käesolevast mõõtmisest. Need väärtused võib saada näiteks üksikmõõtmisest, kordusmõõteseeriast või kogemusele tuginevast hindamisest. Need võivad sisaldada parandite määramist nii mõõteriista näitudele kui ka mõjuritele, näiteks keskkonna temperatuurile, õhu rõhule või niiskusele;

(b) suurused, mille väärtused ja määramatused on mõõteprotseduuri kaasatud välistest allikatest, näiteks kalibreeritud mõõteetalonidega, sertifitseeritud etalonainetega või käsiraamatust saadud lähteandmetega seotud suurused [6].

Mõõtemeetod – on mõõteoperatsioonide üldiselt kirjeldatud loogiline jada [3].

Mõõtetulemus – on mõõdetavale omistatavate väärtuste kogum., mis enamasti esitatakse mõõteväärtuse ja mõõtemääramatuse kaudu.

Mõõtemääramatus (e. määramatus) – on mõõtetulemusele omistatavate võimalike väärtuste hajuvust iseloomustav parameeter.[3, 2]

Mõõtemääramatuse leidmisel peame arvesse võtma kõik määramatuse komponendid.

Mõõtemääramatusel on palju võimalikke allikaid. Praktilise mõõtmise käigus mõjutavad määramatust järgmised määramatuse allikate grupid [1]:

- mõõtesuuruse puudulik defineerimine;
- mõõtesuuruse defineerimise puudulik realiseerimine;
- mõõteobjekti mittevastavus mõõtesuuruse definitsioonile;
 - o sellesse gruppi liigitub keemiliste mõõtmiste korral analüüsimetoodika ebapiisav selektiivsus analüüdi suhtes;
- puudulikud teadmised keskkonnatingimuste mõjust mõõtetotoimingule;
- mõõtevahendist tingitud mõõtevead;
- mõõtemeetodis või -protseduuris kasutatud lähendid ja eeldused, mis reaalsuses päris täpselt ei kehti;
 - o sellesse gruppi liigitub näiteks mittelineaarse analüüdi sisaldus-signaal sõltuvuse korral lineaarse kalibreerimisgraafiku kasutamine
- kirjandusest ja muudest välistest allikatest saadud konstantide ja teiste parameetrite ebatäpsed väärtused
- proovi ettevalmistamisest tingitud määramatus

Mõõtmise eesmärgiks on mõõdetava väärtuse määramine, so mingi konkreetse mõõteobjektiks oleva suuruse väärtuse määramine. Mõõtmine algab seetõttu suuruse ja mõõtemeetodi sobival viisil kindlaksmääramisega. Üldistatult on mõõtetulemus ainult mõõdetava väärtuse lähend või hinnang ja seega täielik ainult siis, kui sellega kaasneb info selle hinnangu määramatuse kohta. Määramatuse abil väljendatakse seega fakti, et teatud kindla mõõdetava ja selle mõõtetulemuse korral pole tegemist ühese väärtusega, vaid lõpmatult paljude tulemuse ümber jaotunud väärtustega [3].

Standardmääramatus y jaoks, kus y on mõõdetava Y hinnang ja seega mõõtetulemus, saadakse sisendsuuruste X_1, X_2, \dots, X_N hinnangute x_1, x_2, \dots, x_N standardmääramatuste ühendamisel sobival viisil. Väljundsuuruse määramatuse hindamisel võetakse arvesse kõigi sisendsuuruste standardmääramatused. Nii hinnatud väljundsuuruse standardmääramatust nimetatakse **liitstandardmääramatuseks** ja tähistatakse $u_c(y)$ [2]. Liitstandardmääramatust arvutatakse sõltumatute ehk mittekorreleeruvate sisendsuuruste korral järgmiselt [3]:

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

Lihtsamate avaldiste puhul üldine eeskiri (võrrand 4) lihtsustub [2]:

Kui $y = a + b$, kus a ja b on sisendsuurused, siis

$$u_c(y) = \sqrt{u(a)^2 + u(b)^2} \quad (3)$$

2.1.2 Sisendsuuruste mõõtemääramatuse hindamine

Sisendhinnanguga seotud mõõtemääramatust hinnatakse kas A või B tüüpi meetodil. **Standardmääramatuse A-tüüpi hindamismeetodil** saadakse määramatus mõõteseria statistilise analüüsi teel. Standardmääramatuse hinnangut väljendatakse eksperimentaalse standardhälbe kaudu [6, 2].

Standardmääramatuse A tüüpi hindamismeetodit saab rakendada juhul, kui kas või ühe sisendsuuruse jaoks on samades mõõtetingimustes tehtud palju sõltumatuid üksikmõõtmisi [6].

Enamasti on juhuslikult muutuva suuruse parimaks võimalikuks hinnanguks, kui selle jaoks on samades mõõtetingimustes saadud n sõltumatut mõõdist, nende n väärtuste aritmeetiline keskmine \bar{x} [3]:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (4)$$

Üksikud mõõdised x_i omavad erinevaid väärtusi mõjurite juhuslike muutuste ehk juhuslike efektide tõttu. Tunnuse hajuvust ja jaotuse kuju iseloomustavad karakteristikud leitakse sageli hälbeid kasutades. **Hälbek** nimetatakse tunnuse üksikväärtuse erinevust tunnuse keskmisest $x_i - \bar{x}$. Tunnuse hajuvust iseloomustavatest näitajatest on olulisim **dispersioon** s^2 . Dispersiooni puuduseks on see, et ta on väljendatud nõ ruutühikutes (võrreldes tunnuse enda väärtusega). Seetõttu kasutatakse praktikas rohkem **standardhälvet** $s(x)$ (mida nimetatakse ka eksperimentaalseks standardhälbek), mis on defineeritud kui ruutjuur dispersioonist [7]:

$$s(x) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (5)$$

Standardmääramatuse B-tüüpi hinnanguks nimetatakse kõiki selliseid määramatuse hinnanguid, milles ei kasutata statistilisi meetodeid. Standardmääramatust hinnatakse teadusliku analüüsi teel, mis tugineb kogu kättesaadavale informatsioonile suuruse X_i võimaliku muutumise kohta [6, 2].

Infobaas võib sisaldada [3]:

- 1) varasemaid mõõtetulemusi
- 2) kogemusi või üldteadmisi asjassepuutuvate materjalide ja mõõteriistade kohta
- 3) tootja juhendeid
- 4) andmeid, mis on esitatud kalibreerimistunnistustes ja muudes dokumentides
- 5) käsiraamatutest võetud lähteandmete määramatusi.

Määramatuse komponendid hinnatakse standardmääramatuse tasemel, st kõik määramatused tuleb teisendada standardmääramatuseks. See on lihtsasti tehtav A-tüüpi määramatuse korral, kasutades korduvkatsete standardhälvet. Kui tegemist on B-tüüpi määramatusega, siis on standardmääramatuse leidmiseks vaja teada vastava suuruse jaotusfunktsiooni. Üldiselt kui mõne suuruse X (aine puhtus sertifikaadis, pipeti täpsusklass vms) lubatud viga on antud kujul “ $\pm a$ ”, siis eeldatakse ühtlast ehk ristkülikjaotust. See tähendab, et suuruse tõeline väärtus asub vahemikus $x \pm a$,

kusjuures võib omada selles vahemikus võrdse tõenäosusega ükskõik millist väärtust. Sellisel juhul leitakse suuruse X standardmääramatus järgmiselt [8]:

$$u(x) = \frac{a}{\sqrt{3}} \quad (6)$$

2.1.3 Mõõtmise laiendmääramatus ja tulemuse esitamine

Liitstandardmääramatus $u_c(y)$ on mõõtesuuruse Y mõõtetulemuse y määramatuse esmane väljendus, siiski on sageli tarvis liitstandardmääramatuse asemel esitada vahemik, mis teatud kõrgema usaldatavusega hõlmab mõõtesuuruse väärtuse. Vastava vahemiku moodustamiseks kasutatakse nn **laiendmääramatust** tähisega U . Laiendmääramatuse saame liitstandardmääramatuse $u_c(y)$ korrutamisel katteteguriga k [1, 2]:

$$U = k \cdot u_c(y) \quad (7)$$

Mõõtetulemus on siis sobivalt esitatud kui $Y = y \pm U$, mida tuleb mõista nii, et mõõdetava Y väärtuse parimaks hinnanguks on y ja et $y - U$ kuni $y + U$ on vahemik, mis eeldatavalt sisaldab suurema osa suurusele Y mõistlikult omistatavate väärtuste jaotusest. Sellist vahemikku võib esitada ka järgmiselt: $y - U \leq Y \leq y + U$ [3].

Kattetegur k (võrrandis 7) valitakse sõltuvalt vahemikule $[y - U; y + U]$ etteantud usaldatavustasemest. Tavaliselt jääb k väärtus vahemikku 2 ... 3 [1]. Ideaalne oleks üheselt määrata kattetegur k ja esitada selle vahemikuga üheselt seotud usaldatavus. Tegelikult ei ole seda siiski lihtne teha, kuna siis peaks tõenäosusjaotus olema täpselt teada. Lihtne lähenemine on sageli adekvaatne situatsioonis, kus y ja $u_c(y)$ abil iseloomustatav tõenäosusjaotus on ligikaudu normaaljaotus. Siis võib eeldada, et $k=2$ annab vahemiku usaldatavusega ligikaudu 95.4 % ja $k=3$ vahemiku, mille usaldatavustase on ligikaudu 99.7 % [3, 2].

Kui mõõtetulemus leitakse keskmisena normaaljaotusele alluvatest üksikmõõtmiste tulemustest, siis ei allu mõõtetulemus enam mitte normaaljaotusele vaid Studenti ehk t -jaotusele [1]. Tulenevalt t -jaotuse omadustest tuleb saamaks eelnimetatud

usaldusnivoosid t-jaotuse korral kasutada kattetegurina t-kvantiile, mis on 95.4 ja 97.3% korral suuremad kui vastavalt 2 ja 3 ja mille arvvaartused sõltuvad jaotusfunktsiooni vabadusastmete arvust ν , mis n kordusmõõtmise keskmise korral leitakse $\nu = n - 1$. Väga sageli, nagu ka käesolevas töös, leitakse mõõtmistulemus vahetult mõõdetud sisendsuuruste väärtustest arvutades (vastavalt võrrandile 1), kusjuures erinevatel sisendsuurustel võivad olla erinevad jaotusfunktsioonid. Sellisel juhul on väljundsuuruse täpse jaotusfunktsiooni leidmine väga keeruline. Kui sisendsuurusi on palju ning nende kaalud on võrreldavad, siis vastavalt tsentraalsele piirteoreemile allub mõõtetulemus väga heas lähenduses normaaljaotusele. Kui sisendsuurusi on vähe või on nende hulgas 1-2 suurust, mille määramatuse panused on oluliselt kõrgemad (domineerivad sisendsuurused), kui teistel, siis see lähendus ei kehti. Keemiliste mõõtmiste juures on eriti sage selline olukord, kus mõni domineerivatest sisendsuurustest on leitud piiratud arvu kordusmõõtmiste kaudu. Sellisel juhul võib mõõtetulemuse jaotust lähendada t-jaotusele, mille efektiivne vabadusastmete arv ν_{eff} on saadud Welch-Satterthwaite valemist:

$$\nu_{\text{eff}} = \frac{u^4}{\sum \frac{u_i^4}{\nu_i}} \quad (8)$$

kus $u_i(y)$ – on i-ndast sisendsuurusest tingitud liitmääramatuse komponent
 ν_i – on i-ndast sisendsuurusest tingitud liitmääramatuse komponendi $u_i(y)$ vabadusastmete arv

Katteteguri väärtus leitakse seejärel ν_{eff} ja soovitud usaldusnivoo kaudu vastavatest tabelitest [1].

Tulemuste omavahelist kokkulangevust on võimalik hinnata kasutades E_n arvu, mis leitakse järgmiselt [2]:

$$E_n = \frac{X_1 - X_2}{\sqrt{U_1^2 + U_2^2}} \quad (9)$$

kus X_1 ja X_2 – kahe erineva mõõtmise tulemused
 U_1 ja U_2 – mõõtmiste (X_1 ja X_2) laiendmääramatused
 E_n arvu põhjal iseloomustatakse saadud tulemust järgmiselt:
 $E_n \leq 1$ – loetakse tulemused kokkulangevaks
 $E_n > 1$ – tulemused loetakse mitte kokku langevateks

2.1.4 Mõõtemääramatuse hindamine ISO GUM meetodiga

ISO GUM meetod (pakutud välja juhendis *Guide to Expression of Uncertainty in Measurement*) on praegusel ajal muutunud teatud mõttes standardmeetodiks määramatuse hindamisel. Füüsikaliste mõõtmiste juures on see kasutusel juba pikalt ja on hästi juurdunud, keemiliste mõõtmiste juures on selle meetodi rakendamine alles algusfaasis. Raskused keemiliste mõõtmiste juures tulenevad sellest, et keemilised mõõtmised sisaldavad enamasti palju etappe, millest mitmed (näiteks proovi ettevalmistamine) on halvasti matemaatiliselt kirjeldatavad [2].

Juhendi ISO GUM meetodi rakendamiseks keemiliste analüüsi tulemuste määramatuse hindamiseks on ühiselt publitseerinud organisatsioonid Eurachem ja CITAC [8]. Protseduurid, mida peab järgima ISO GUM meetodiga mõõtetulemuse määramatuse hindamisel on järgmised [2, 8]:

1. Mõõtesuuruse määratlemine (defineerimine). See on määramatuse hindamise etapp, millele sageli ei pöörata küllalt tähelepanu. Keemilises analüüsis on mõõtesuuruseks enamasti analüüdi sisaldus uuritavas objektis. Mõõtesuuruse defineerimisel on väga oluline spetsifitseerida, kas mõõtetulemus esitatakse vaid uuritud proovi kohta või tehakse proovi analüüsi alusel järeldusi üldkogumi kohta. Käesolevas töös on mõõtesuurus defineeritud punktis 4.1.

2. Mõõtmise matemaatilise mudeli koostamine. Matemaatiline mudel on avaldis, kus kõigi mõõtmist mõjutavate suuruste abil arvutatakse välja mõõtetulemus.

3. Määramatuse allikate identifitseerimine. Tehakse kindlaks kõik võimalikud määramatuse allikad. Tavaliselt tuleneb enamik määramatuse allikatest mudelis ilmutatud kujul esinevatest suurustest (st suurustest, mis on mudeli 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.

4. Mudeli modifitseerimine. Mudeli modifitseerimise vajadus võib tuleneda sellest, et identifitseeritakse määramatuse allikaid, mida esialgne mudel arvesse ei võta.

5. Määramatuse komponentide hindamine. Kõik määramatuse komponendid tuleb teisendada standardmääramatuseks. Keemilise mõõtmise juures on see etapp

sageli raske, sest mitmed mõõteprotsessi etapid võivad olla halvasti matemaatiliselt kirjeldatavad. Sisendsuuruste vastavate määramatuse komponentide hindamiseks kasutatakse, olenevalt komponendist, väga erinevaid mooduseid ning saadavad määramatuse hinnangud on enamasti erinevat tüüpi.

6. Väljundsuuruse liitstandardmääramatuse leidmine. Liitstandardmääramatus leitakse võrrandi 4 abil, kus summeeritakse sisendsuuruste suhtelised kaalud ruuteskirja järgi.

7. Laiendmääramatuse leidmine ja tulemuse esitamine. Tulemuse korrektse kirjaviisi juures peab kajastuma mõõteväärtus, määramatus, kattetegur ning võimalusel informatsioon tulemusele omistatud võimalike väärtuste jaotuse kohta.

Kahjuks on ISO GUM meetodil ka mitmeid puudusi. ISO GUM meetod annab häid tulemusi vaid siis, kui kõik olulisemad määramatuse allikad on leitud ja neile vastavad komponendid hinnatud. Vastasel korral kaldub meetod andma allahinnatud määramatuse hinnanguid. ISO GUM meetodi rakendamine nõuab enamasti analüüsimetoodika toimimispõhimõtte kohta küllalt palju sisulist informatsiooni.

2.2 Raua tähtsus bioelemendina

Organismi elementkoostis on organismi ehituse ja talitluse alus. Elussüsteemide talitlusteks on vajalik miinimum 27 keemilist elementi (bioelementi), mis jagunevad järgmiselt: biomolekulides aatomitena esinevad bioelemendid (H,C,O,N,P,S), mis moodustavad 96...98% elusorganismide elementaarkoostisest. Teiseks alarühmaks on biofunktsioone enamasti ioonidena täitvad bioelemendid (Ca^+ , Na^+ , K^+ jne) ja kolmandaks rühmaks on eluks hädavajalikud mikrobioelemendid (Fe, Cu, Zn, Mn jne) [9].

Siirdemetallidest on raud tähtsaim biometall, tema biotoime avaldub nii taimsetes kui loomsetes organismides. Raud on tänu oma redoksomadustele vajalik paljude ensüümide ja valkude ehituses ning funktsioneerimises. Inimorganismis esineb raud ainult seotud vormis, millena ta on lahustuv ja mittetoksiline. Seotud raud on

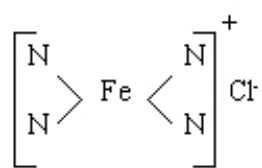
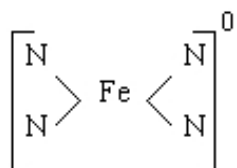
organismis kahes oksüdatsiooniastmes: Fe^{2+} (ferro-; eelkõige happelises keskkonnas) ja Fe^{3+} (ferri-; eelkõige neutraalses ja aluselises keskkonnas) [9].

Raud on obligatoorne tegur kõigi aeroobsete organismide hingamis-protsessides. Organismides esineb ta valdavalt komplekssoolade – porfüriinide koostises. Porfüriinid omakorda kuuluvad tsütokroomide, heemerütriini, hemoglobiini jt bioloogiliselt oluliste ühendite koostisesse. Rauda funktsiooniks on elektronitransport hingamisahela teatavais lülides, samuti hapniku transport kõrgemates loomorganismides, kus Fe kuulub hemoglobiini koostisse [10].

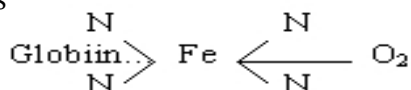
Eriti oluline protoporfüriini rauaderivaat on ühend kahevalentse rauaga – heem, mis on netolaenguta. Kolmevalentse raua ja protoporfüriini kompleks ehk hemiin omab seevastu positiivset netolaengut, mistõttu annab ta soolasid (näiteks kloriide) [10].

heem ehk ferroprotoporfüriin

hemiin ehk ferriprotoporfüriin



Vaba heem on ebastabiilne ning oksüdeerub kergesti hemiiniks. Seotuna spetsiifilise valgu globiiniga omandab heem aga suhteliselt kõrge stabiilsuse. Liitvalku, mille punane värvus tuleneb heemist ja milles valguliseks komponendiks on globiin, nimetatakse hemoglobiiniks (Hb) [10, 11]. Ühes hemoglobiinimolekulis on neli raua aatomit ja kokku sisaldub hemoglobiinis 65 % kogu inimeses olevast rauast [12]. Hemoglobiinis on rauda 1.36%. Hemoglobiini ja hapniku kompleksi nimetatakse oksühemoglobiiniks



Normaalselt sisaldab 70 kg kaaluv inimene 3-4 grammi rauda, millest ainult 3.5 mg (0.1%) sisaldub vereplasmas, kuid kogu organismis olev raud jaotub biomolekulide vahel [13]. Ööpäevas kaotab inimorganism normaalselt umbes 1 mg rauda, seda mitte uriini kaudu, vaid eelkõige vananenud rakkude elimineerumise tõttu. Teisalt,

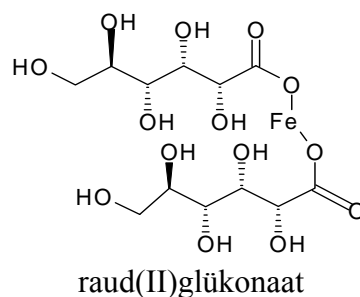
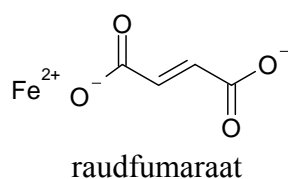
seedekulglasse sattunud rauast imendub umbes 10%. Seetõttu ongi ööpäevane vajadus 10-15 mg, kuna selline hulk kompenseerib umbes 1 mg-se rauakao ööpäevas [9].

Raua defitsiit (aneemia) on üks enamlevinud häiretest. Kuna segatoit sisaldab piisavalt rauda, siis on raua defitsiidi peamised põhjused: suurem verekaotus, rasedus, kiire kasvuperiood, toitumisäärmused. Samas on vaba raua kestev liigsus võrratult kahjulikum kergest aneemiast. Raua kuhjumise kliinilist sündroomi nimetatakse hemokromatoosiks. Raua ülemäärane kuhjumine põhjustab maksakahjustusi (tsirroos), pankreasekahjustusi (suhkrutõbi), südamekahjustusi, liigesevalu, maksavähki, naha pigmentatsiooni jne [13].

2.2.1 Rauapreparaadid

Inimesed saavad enamasti organismi jaoks piisava koguse rauda toiduga, kuid kuna raua imendumine on küllaltki väike, siis võib tema hulk kehas langeda alla kriitilise piiri põhjustades aneemiat. Teatud krooniliste haiguste (vähk, reumaatiline liigese põletik) puhul võib tekkida ka krooniline aneemia [14].

Raua puuduse raviks ja ennetamiseks on valmistatud mitmeid rauda sisaldavaid preparaate. Enamasti sisaldavad nad raud(II) ühendeid: sulfaate, fumarate, glükonaate jne [14].



Raud(II) sulfaat on sageli eelistatud, sest ta on odav ja sama efektiivne kui teisedki ühendid. Peamine põhjus raud(II) komplekside eelistamiseks on nende suurem lahustuvus pH vahemikus 3-7 (lahustuvus on oluline omadus membraanide läbimisel) [14]. Hemoglobiini regenereerimise määr ei sõltu sellest, millist soola kasutada, oluline on piisav raua sisaldus. Preparaadi valikut mõjutavad eelkõige tema hind ja kõrvalmõjud, viimaste ilmnemisel tuleks kas vähendada doosi või kasutada teist

ravimit. Paljud suu kaudu manustatavad preparaadid sisaldavad askorbiinhapet (vitamiin C) raud(II) stabiliseerimiseks. Foolhapet kasutatakse samuti koos rauasooladega aneemia ennetamiseks rasedatel naistel [15].

Raud(II) kompleksidel on ka mitmeid puuduseid. Nad on väga tundlikud oksüdatsiooni suhtes, eriti vesikeskkonnas. Lahustuvad raud(III) kompleksid (raud(III)kloriid, raud(III) ammooniumtsitraat) oleksid sellest aspektist paremad. Kahjuks on sellised kompleksid enamikus laetud, mis takistab rakumembraanide läbimist. Isegi kui need kompleksid oleksid neutraalsed, võivad nad olla toksilised [15]. Raud(II) oksüdatsiooni tablettides hoitakse tagasi tablettide katmisega. Inimese sisikonnas tabletid lahustuvad ja oksüdatsioon võib toimuda, andes halvasti lahustuvaid raud(III) sooli. Raud(III) soolad ei imendu organismis ja põhjustavad sageli seedekulglä ärritust. Sellised kõrvalmõjud võivad olla küllaltki tõsised, kuna tihti on vaja kasutada suuri doose, et piisav kogus rauda imenduks. Võib esineda ka südamepööritust, rindealust valu, kõhukinnisust [15].

2.3 UV-Vis fotomeetriline analüüs

Fotomeetrisel analüüsimetodid põhinevad määratava ühendi molekulide omadusel neelata optilise piirkonna elektromagnetilist kiirgust. Seejuures leitakse määratava ühendi kontsentratsioon ultravioletse (200-400 nm) või nähtava (400-760 nm) elektromagnetilise kiirguse neeldumise mõõtmisel määratava ühendi lahuses. Fotomeetrisel meetoditel on määratavad paljud orgaanilised ühendid. Anorgaaniliste ionide määramisel on enamikel juhtudel vajalik nende eelnev üleviimine sobivasse elektromagnetilist kiirgust neelavasse vormi, milleks reeglina on kompleksid mitmesuguste ligandidega. Anorgaaniliste ionide, kaasa arvatud raua ionide, määramisel on põhiliseks fotomeetrisel meetodid nähtava spektri piirkonnas. Vastavaid spektreid nimetatakse elektronspektriteks [16].

Fotomeetria põhiseaduseks nimetatakse Bouguer-Lambert-Beer'i ühendatud seadust (ehk lühidalt Beer'i seadust) [17]:

$$A = -\log T = \log \frac{1}{T} = \log \frac{P_0}{P} = abc \quad (10)$$

$$T = \frac{P}{P_0} = 10^{-abc} \quad (11)$$

- kus A [AU]– uuritava lahuse neelduvus
 P [W]– on lahusekihti läbinud valgusvoo intensiivsus
 P_0 [W]–on pealelangeva valgusvoo intensiivsus
 a [l/(cm·mol)]– aine molaarne neeldumiskoeffitsient
 b [cm]– neelava kihi paksus
 c [mol/l] – uuritava aine molaarne kontsentratsioon

Fotomeetria põhiseadus kehtib aga ainult teatud tingimustel: neelatavate molekulide püsival koostisel ja optimaalsel kontsentratsioonil; monokromaatse valguse kasutamisel ja mõõtmiste läbiviimisel konstantsel temperatuuril. Analüüside läbiviimiseks on seega alati vajalik optimaalsete tingimuste valik [16, 17]:

- 1) Fotomeetritava ühendi moodustamiseks vajalik reaktiiv peab olema võetud hulgas, mille edasine suurendamine enam fotomeetritava lahuse neelduvust ei muuda.
- 2) Kontsentratsiooni muutudes ei tohi muutuda määratava aine neeldumistegur
- 3) Kasutatav reaktiiv ei või moodustada analüütilisel lainepikkusel neelavaid ühendeid analüüsitava proovi teiste komponentidega. Selleks on tihti vajalik määratava ühendi eelnev eraldamine. Paljudel juhtudel piisab aga ka segavate komponentide üleviimisest vähe dissotsieeruvate kompleksühendite koostisse maskeerivate reaktiivide kasutamisel.
- 4) Lahuste optiliste tiheduste mõõtmine tuleb läbi viia sellel lainepikkusel, mille puhul valguse neeldumine määratava ühendi molekulides on kõige suurem. Vajalik lainepikkus valitakse määratava ühendi neeldumisspektri alusel, mis eelnevalt on saadud spektrofotomeetrilisel mõõtmisel.

2.3.1 UV-Vis fotomeetrilised reaktiivid raua määramiseks

UV-Vis fotomeetriline meetod on raua määramiseks suhteliselt levinud, võimalik on kasutada mitmeid erinevaid reaktiive:

- **1,10-fenantroliin** (orto-fenantroliin) [18, 19, 20] on tuntud kui hea reaktiiv raud(II) määramiseks, mis võimaldab määrata ka väga väikesi raua hulki. Määramist segavad tugevad oksüdeerijad, nitraadid ja fosfaadid. Mõõdukates kogustes kloriidid

ja sulfaadid mõju ei avalda. Kui lahuses on märgatavas koguses perkloraaate, siis võib moodustuda 1,10-fenantroliini perkloraat, mis on raskesti lahustuv sade. Neid segavaid mõjusid võib kõrvaldada reaktiivi liia lisamisega. Kui proov sisaldab raud(III) siis kasutatakse raud(III) üleviimisel raud(II)-ks hüdrokiinoni. Üheks 1,10-fenantroliini kasulikuks omaduseks on võimalus kasutada seda nõrgalt happelistes lahustes, kus paljud metallid ei sadene hüdroksiididena, fosfaatidena jne. Samamoodi on selle reaktiivi eeliseks asjaolu, et raud(II) ioonid moodustavad sellega komplekse laias pH vahemikus: 2–9. Veel üks oluline eelis on moodustunud oranžikas-punase kompleksi püsivus: lahuse neelduvus ei muutu paljude kuude jooksul ja see allub rangelt Bouguer-Lambert-Beeri seadusele.

- **sulfosalitsüülhape** (2-hüdroksü-5-sulfobensoehape) [16, 21, 22] moodustab raua ionidega sõltuvalt keskkonna pH-st kolm erineva koostisega kompleksühendit, mis erinevad ka oma värvuse poolest. Happelises keskkonnas pH väärtuste vahemikus 1.8-2.5 moodustub punakasvioletse värvusega raudmonosulfosalitsülaadi kompleks, pH väärtuste vahemikus 4.0-8.0 on domineerivaks rauddisulfosalitsülaadi kompleksanioon ja pH väärtuste vahemikus 8.0-11.5 moodustub kollase värvusega raudtrisulfosalitsülaadi kompleksanioon. Reaktiiv reageerib nii raud (II) kui ka raud(III) ionidega. Enamasti kasutatakse seda raud (III) ionide määramiseks, mis viiakse läbi aluselises keskkonnas lainepikkusel 425 nm.

- **tiroon** (4,5-dihüdrokü-1,3-benseen-disulfoonhappe dinaatrium sool) [23, 24] moodustab raud(III)ioonidega tugeval sinisevärvilise kompleksi, mille optiline tihedus mõõdetakse UV-Vis fotomeetriliselt 635 nm juures. Tiroon on täiesti sobilik reaktiiv raud(III) määramiseks ka farmatseutilistes preparaatides, kuid kuna raud esineb enamjaolt farmatseutilistes ja kliinilistes proovides raud(II) kujul, siis selleks, et kindlustada täielik oksüdatsioon raud(III)-ks, lisatakse proovidele $K_2Cr_2O_7$ lahust. Võimalikud analüüsi segajad on vask, tsink ja kaltsium.

- **aso reagentid** (PAR, 5-Br-PADAR) [25, 26, 27] võimaldavad farmatseutilistes preparaatides üheaegselt määrata tsink(II), mangaan(II) ja raud(II) ioone. Meetod sobib nimetatud ionide määramiseks ilma neid eelnevalt eraldamata. PAR (4-(püridüül-2-aso)-resortsinool) annab metalli ionidega intensiivsed värvilised vees lahustuvad kompleksid, mis neelavad valgust vahemikus 410-530 nm. PAR kuulub aso reaktiivide hulka nagu ka 2-(5-bromo-2-püridüül-2-aso)-5-dietüülaminofenool (5-Br-PADAP), mis sobib nii raud(II) kui ka raud(III) määramiseks

- **tioglükoolhape** [28] on sobiv reaktiiv raud(III) määramiseks siirupites, mis sisaldavad raudsuksinüül-proteiin komplekse, mis on raud(III) mittemürgine ühend. Tioglükoolhape annab raud(III) määramisel intensiivse stabiilse punakasvioletse kompleksi, mille neelduvuse mõõtmiseks sobib lainepikkus 535 nm. Selleks, et saavutada analüüsiks sobiv pH vahemik (10.1 ± 0.5) lisatakse lahustele NH_4OH lahust.

- *leuco Xylene cyanol FF, LXCFF* (1,3-benseen-disulfoonhappe naatriumi sool) [29] meetod baseerub LXCFF oksüdatsioonil raud(III) abil sinisesse vormi, mille värvus püsib stabiilsena üle nädala. Maksimaalne neelduvus saavutatakse pH vahemikus 2.8-4.4 ja mõõtmised teostatakse 615 nm juures.

2.3.2 Proovi ettevalmistamise meetodid elementide määramisel

Üldist proovi ettevalmistamise tehnikat, mis sobiks kõikidele proovidele, ei ole olemas. Tahked proovid võivad sisaldada suurel hulgal orgaanilist materjali, mille peamised lahustamise meetodid on kuivaks tuhastamine ja märjalt lagundamine. Happega lagundamist kasutatakse eriti kui uuritavat elementi sisaldub proovis vähesel määral, enimkasutatavamad on vesinikkloriidhape ja lämmastikhape. Happega lagundamise tehnika eeliseks on tema lihtsus ja kiirus, eriti hästi sobib happega lagundamine proovide korral, kus analüüt sisaldub hästilahustuvas vormis. Mikrolainelist lagundamist kasutati keemialaboris esimest korda aastal 1975, pärast seda on loodud mitmeid proovi lagundamise meetodeid, kasutades mikrolaineid. Mikroelementide määramisel bioloogilistes proovides on suurimaks probleemiks orgaanilise aine lahustamine. Mikrolainelise lagundamise üks suur eelis on väga väike proovi saastumise võimalus [30, 31, 32].

2.3.3 Määramatuse allikad UV-Vis fotomeetrilise analüüsi juures

UV-Vis fotomeetrilise analüüsi määramatuseallikad on hiljuti põhjalikult analüüsitud töös 4. Töös 4 eristatakse selgelt kaks määramatuse allikate perekond vastavalt nende päritolule. Esimesse perekonda kuuluvad fotomeetrist tulenevad olemuslikud määramatuse allikad (füüsikalised määramatuse allikad) – fotomeetri lugemi korduvus, fotomeetri triiv ja teised allikad. Teise perekonda kuuluvad niinimetatud keemilised määramatuse allikad, mis tulenevad uuritavast objektist (maatriksi komponentide segavad mõjud, fotomeetrilise kompleksi lagunemine jne). Töös 4

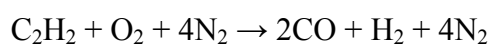
leitakse, et keemiliste määramatuseallikate panus koondmääramatusesse kaalub reeglina üles füüsikaliste allikate panuse. Kirjanduses on veel avaldatud määramatuse hindamist kajastavaid töid UV-Vis fotomeetrilise meetodi jaoks konkreetsete analüüside kohta [33, 34, 35]. Neis töödes uuritakse muuhulgas küll kalibreerimislahuste kontsentratsioonidest ja neelduvustest tingitud määramatust, kuid vaatluse alt on kõrvale jäetud kalibreerimisgraafiku mittelineaarsusest tulenev määramatuseallikas, mis sageli võib anda summaarsesse määramatusse suure panuse. Samuti ei ole töödes 33 ja 34 uuritud aparaadi triivist põhjustatud määramatust, mis samuti võib olla väga oluline määramatuse allikas. Samas on nimetatud töödes ühe olulise määramatuse allikana välja toodud korduvuse määramatust, mis tegelikult keemilise analüüsi korral harva oluline on. Seega on selge, et UV-Vis ja FAAS meetodite määramatuse allikate täiendav uurimine on kindlasti vajalik. Käesoleva töö määramatuse allikad on detailselt analüüsitud alajaotuses 4.3.

2.4 Aatomabsorptsioon-spektromeetrilised meetodid

Aatomspektromeetrilistel meetoditel on oluline osa moodsas instrumentaalanalüüsis. Aatomabsorptsioonspektroskoopia (AAS) on üks laialdasemalt kasutatavaid elementide kvantitatiivse määramise meetodeid. Meetodi populaarsus on tingitud selle selektiivsusest, lihtsusest ja mugavast kasutamisest [32].

Leek-AAS (FAAS) meetodit kasutatakse kui analüüdi kontsentratsioon on piisavalt kõrge ja proovilahuse ruumala on vähemalt mõned milliliitrid. FAAS meetodite avastamispiiriks raua määramiseks on hinnatud ligikaudu 5 µg/l [36].

Leek-aatmoabsorptsioonspektromeetria puhul on leek üksnes atomiseerimise allikas. Leek-AAS on küllalt laialt kasutusel oma lihtsuse ja paljude elementide määramise võimaluse tõttu. Atomisaatorina toimiv leek saadakse gaaside segu – põleva gaasi (kütuse) ja oksüdeerija – põlemisel, leegi temperatuur varieerub tavaliselt alates 2000 K kuni 3000 K [32, 36]. Käesolevas töös kasutatakse raua määramiseks atsetüleen-õhk leeki, mille teoreetiline temperatuur on ligikaudu 2500 K ning põlemise reaktsioon on järgmine:



Leek-AAS meetodil on määratud rauda farmatseutilistes preparaatides, mis sisaldasid nii vitamiine kui ka mineraale, raud esines proovis raud(II)sulfaadina [37]. Samuti on

avaldatud töid raua määramisest Kreeka ja Uruguai veinides [38, 39], erinevates konserveeritud puu- ja köögiviljades [40].

Elektrotermiline AAS (ehk GF-AAS) meetodit kasutatakse kui analüüdi kontsentratsioon on madalam või kui proovilahust on mikrolitrites. GF-AAS meetodite avastamispiirid on umbes 0.1 µg/l. GF-AAS meetodi eelised on madalad detekteerimispiirid ja võimalus vahetult analüüsida tahkeid proove. FAAS meetod on samas odavam osta ja ülal pidada, täpsem ja parema lineaarsusega.

AAS analüüs koosneb enamasti kolmest osast:

- 1) Proovi ettevalmistamine. Tahkest proovist ette valmistada proovilahust on enamasti üks kõige aeganõudvaim analüütiline protseduur, mis koosneb tihtipeale kaalumisest, peenestamisest, filtreerimisest ja lahustamisest. Erinevad proovi ettevalmistamise tehnikad on toodud punktis 2.3
- 2) Proovi lahjendamine. Üldiselt laborites käesolev aparatuur võimaldab ette ennustada proovi koguseid, mida saab täpselt lahjendada teise lahustiga.
- 3) Proovi sisendamine. AAS meetodi juures proovi lahus, kus analüüt sisaldub lahustuva soolana, suunatakse leeki, seal aurustatakse solvent ja toimub atomiseerimise protsess, mille käigus analüüt laguneb aatomiteks. Leegis asuvad aatomid neelavad kiirgust ning ergastuvad. Seetõttu on kiirguse intensiivsus peale leegi läbimist madalam kui enne leeki sisenemist. Kiirguse vähenemist kirjeldab matemaatiliselt Bouguer-Lambert-Beer'i ühendatud seadus (võrrand 8). Analüüsi tegemiseks tuleb sisestada seeria, mis koosneb nullproovist, standardlahustest ja proovilahusest [32].

2.4.1 Määramatuse allikad AAS meetodi juures

Määramatuse allikaid, mis on omased leek-aatomabsorptsioonspektromeetrile kui seadmele on hoolikalt uuritud töös 5. Kirjanduses on veel avaldatud määramatuse hindamist kajastavaid töid AAS meetodi jaoks konkreetsete analüüsida kohta [41 - 45]. AAS analüüsida pühendatud artiklid enamasti käsitlevad elektrotermilist AAS meetodit. Töodes on uuritud näiteks metallide jälgi taimsetes proovides [41 - 43],

mullas [44] või veres [45]. Samas ei ole meile teadaolevatel andmetel kajastatud üheski töös FAAS analüüsi määramatuse hindamist. Erinev atomiseerimise meetod muudab elektrotermilise AAS meetodi määramatuse hindamise seisukohast täiesti erinevaks FAAS meetodist. Seega vaatamata eelnevalt toodud tööde ülevaatele on siiski keemiliste analüüside tulemuste määramatuse hindamist kajastavate tööde hulk ja mitmekesisus jätkuvalt vähene. Määramatuse allikad on detailselt analüüsitud alajaotuses 4.3.

3 Eksperimentaalne osa

3.1 Kasutatud aparatuur ja seadmed

1. Fotokolorimeeter KFK-2MP ja küvetid (läbimõõduga 20 mm)
 - tööpiirkond 315 – 980 nm, kasutatud valgusfilter 540 nm, joonelaius poolkõrgusel on 40 nm.
2. Aatomabsorptsioon-spektromeeter Perkin-Elmer AAS 2100
 - kiirgusallikaks on õõneskatoodlamp (Co-Cr-Cu-Fe-Mn-Ni, N305 – 0817)
 - Premix tüüpi 10 cm pikkuse piluga ühepiluline titaanist põleti
 - Monokromaatoriks on Littrow võre (1800 joont/mm)
 - Tööpiirkond 190 – 870 nm
 - Detektoriks on fotoelektronkordisti
 - Süsteemi juhtimine ja andmete kogumine toimub arvuti abil
3. Kaal Mettler Toledo B154 – S
4. pH-meeter Evikon E6115, elektrood pH 631

3.2 Kemikaalid ja lahused

Eksperimentides kasutatud kemikaalid on toodud tabelis 1.

Tabel 1. Kasutatud kemikaalid

Nimetus	Valem	Puhtuseaste
Mohri sool	$\text{FeSO}_4(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	min 99% (Sigma)
hüdokinoon	$\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$	min 99% (Fluka)
1,10-fenantroliin	$\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	min 99% (Riedel-deHaén)
etanool	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	meditsiiniliselt puhas
trinaatrium tsitraat	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	чда
soolhape	HCl	suprapur (Merck)

Kemikaalidest valmistatakse katseteks järgmised lahused:

1. Raud(II)standardlahus 1000 mg/l. 0.7000 ± 0.0002 g Mohri soola lahustatakse vees ning lisatakse 0.5 ml kontsentreeritud (30%) soolhapet, et takistada

Fe(II) oksüdeerumist Fe(III)-ks. Lahuse ruumala viiakse 100 ml-ni. Saadud lahusest tehakse sobivad lahjendused, et valmistada raud(II)standardlahus 10 mg/l.

2. Trinaatriumtsitraadi lahus 2.5% (m/m). 2.50 g trinaatriumtsitraati lahustatakse destilleeritud vees. Lahuse ruumala viiakse 100 ml-ni.

3. Hüdrokiinoni lahus 1.0% (m/m). 1.00 g hüdrokiinoni lahustatakse destilleeritud vees. Lahuse ruumala viiakse 100 ml-ni. Saadud lahust hoitakse tumedast klaasist pudelis.

4. 1,10-Fenantroliini lahus 0.25% (m/m). 0.25 g 1,10-fenantroliini lahustatakse 10 ml etanoolis ja seejärel viiakse lahuse ruumala destilleeritud veega 100 ml-ni. Saadud lahust hoitakse tumedast klaasist pudelis.

5. Soolhappe lahus (lahjendus 1:10).

Toidulisandit Bio-Multi[®], toodetud Pharma Nord ApS poolt, kasutatakse käesolevas töös proovina raua määramiseks. Bio-Multi[®] on mineraalidega multivitamiin, üks kaetud tablett sisaldab 10 vitamiini: 60 mg askorbiinhapet (vitamiin C), 3.6 mg β-karoteeni (vitamiin A), 9 mg nikotiinamiidi (niatsiin), 4 mg d-α-tokoferüülatsetaati (vitamiin E), 1 mg riboflaviini (vitamiin B₂), 0.9 mg püridoksiinhüdrokloriidi (vitamiin B₆), 0.6 mg tiamiinmononitraati (vitamiin B₁), 7.5 µg kolekaltsiferooli (vitamiin D), 300 µg foolhapet, 1.5 µg tsüanokobalamiini (vitamiin B₁₂) ja 6 mineraali: 100 mg kaltsiumi (kaltsiumkarbonaadina), 100 mg magneesiumi (magneesiumoksiidina), 10 mg rauda (raudglükonaadina), 5 mg tsinki (tsinkglükonaadina), 60 µg seleeni (naatriumseleniidiga rikastatud pärmina), 100 µg joodi (kaaliumjodiidina). Paakumisvastasteks aineteks on tabletis mikrokristalne tselluloos, ränidioksiid, talk ja magneesiumstearaat. Stabilisaatorina on kasutatud hüpromelloosi ja polüvinüülpürrolidooni ning toiduvärviks on tabletile lisatud titaandioksiidi ja saialille ekstrakti.

3.3 Töö meetodikad

3.3.1 Proovi ettevalmistamine analüüsiks

Analüüsiks valitakse juhuslikult Bio-Multi[®] karbist 20 tabletti, mis kaalutakse ning seejärel uhmerdatakse ja segatakse. Proovilahuse valmistamiseks kaalutakse ühe tableti massile vastav kogus uhmerdatud tablettide pulbrit, millele lisatakse 30 ml soolhappe lahust (1:1) ja kuumutatakse seejärel 15 minutit, et kindlustada täielik raua

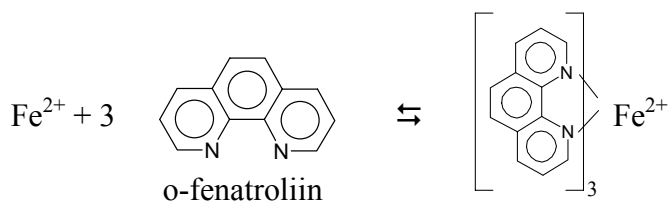
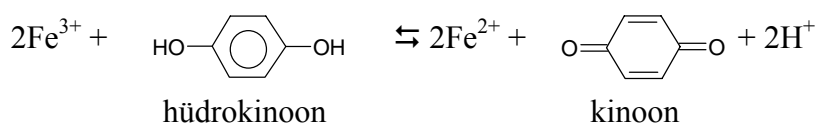
eraldumine maatriksist. Peale kuumutamist filtreeritakse proovilahus 250 ml mõõtkolbi, lahusel lastakse jahtuda ning seejärel täidetakse kolb märgini ja segatakse. Saadud proovilahust lahjendatakse 20 korda UV-Vis fotomeetrilise analüüsi jaoks ja 40 korda FAAS analüüsi jaoks.

3.3.2 UV-Vis fotomeetriline analüüs

UV-Vis fotomeetrilise analüüsi korral kasutatakse raud(II)kompleksi moodustumist 1,10-fenantroliiniga. Lahuste neelduvused mõõdetakse fotokolorimeetriga KFK-2MP, kasutades 540 nm läbilaskvusmaksimumiga valgusfiltrit.

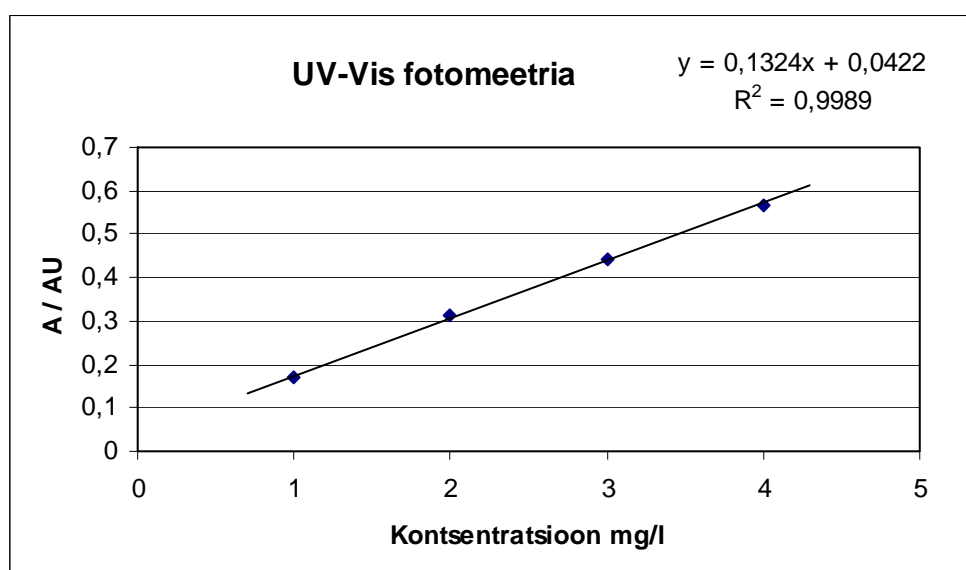
Raua määramiseks UV-Vis fotomeetriliselt valmistatakse 50 ml mõõtkolbidesse null-lahus ja kalibreerimislahused kontsentratsiooniga 1, 2, 3 ja 4 mg/l lahjendades vastavalt raud(II) standardlahust 10 mg/l. Lahuste pH reguleerimiseks lisatakse kõikidele kalibreerimislahustele trinaatriumtsitraadi lahust 2.5% (m/m) ja soolhappe lahust (1:10). Kompleks on stabiilne küllaltki laias pH vahemikus 2 – 9 [46], seega ei ole vajalik lahuste pH täpne mõõtmine. Seejärel lisatakse lahustele 1 ml hüdrokiinoni lahust 1.0% (m/m), et viia Fe(II) üle Fe(III)-ks ja 2 ml 1,10-fenantroliini lahust 0.25% (m/m). Null-lahus valmistatakse lisades kõik reagentid, kuid mitte raud(II) standardlahust.

Lahjendatud proovilahusele (vt. punkti 3.3.1) lisatakse sarnaselt kalibreerimislahustega kõik reagentide lahused peale soolhappe lahuse, mis lisati proovile juba eelnevalt proovi ettevalmistamise käigus. Lahustes toimuvad järgmised reaktsioonid:



Oranžikas-punase värvusega kompleksi moodustumine võtab natuke aega, seega lastakse kõikidel kalibreerimislahustel ja proovilahusel vähemalt 10 minutit seista ning seejärel mõõdetakse lahuste neelduvused. Käesolevas töös koostatakse mõlema meetodi jaoks kalibreerimisgraafik 4 punkti põhjal, mille kontsentratsioonid erinevad üksteisest vähemalt 30% võrra. Standardlahuste kontsentratsioonid valitakse selliselt, et määratava elemendi lahuse neelduvus oleks graafiku keskmises osas. Tüüpiline kalibreerimisgraafik on toodud joonisel 1:

Joonis 1. UV-Vis fotomeetrilise meetodi tüüpiline kalibreerimisgraafik



Käesolevas töös uuritakse ka katses kasutatud erinevate reagentide koguste mõju rauakompleksi neelduvusele. Selleks pipeteeritakse nelja 50 ml-sse kolbi 5 ml raud(II)standardlahust (kontsentratsiooniga 10 mg/l), kõikidesse kolvidesse lisatakse 5 ml trinaatriumtsitraadi lahust, 1 ml hüdrokiinoni ja soolhappe lahust ning seejärel lisatakse nelja kolbi vastavalt 1, 2, 3, 4 ml 1,10-fenantroliinilahust. Kolvid täidetakse märgini, lastakse seista 10 minutit ja mõõdetakse siis lahuste neelduvused. Sarnaselt varieeritakse ka hüdrokiinoni lahuse kogust, lisades teda vastavalt igasse kolbi 0,5, 1, 2, 5 ml ning trinaatriumtsitraadi lahuse kogust, lisades teda vastavalt 0, 2, 5, 10, 15 ja 20 ml igasse kolbi, kõikide teiste reagendilahuste kogused lisatakse konstantses hulgas.

3.3.3 Leek-aatomabsorptsioon spektromeetiline analüüs

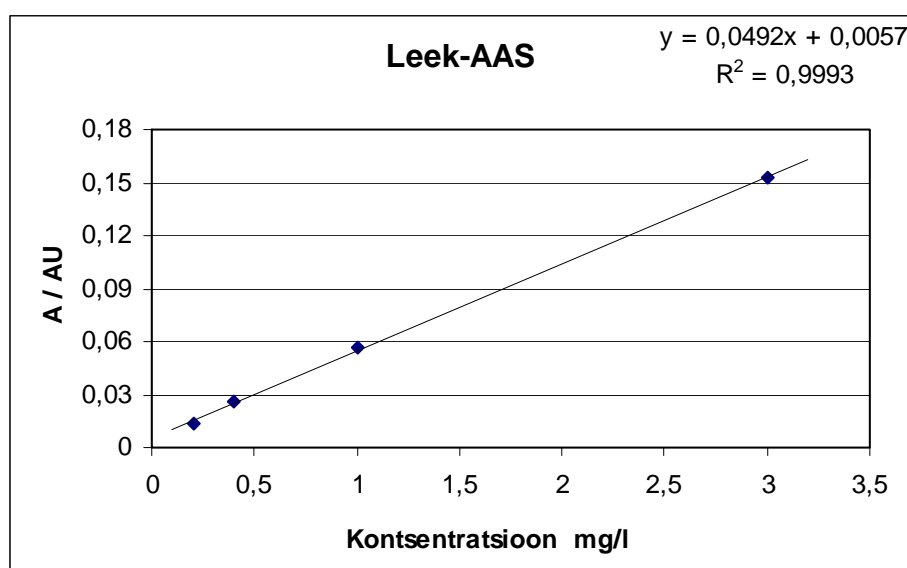
Lahuste neelduvused mõõdetakse aatomabsorptsioon-spektromeetriga Perkin-Elmer AAS 2100, mõõtmise parameetrid on toodud tabelis 2:

Tabel 2. Aparaaadi parameetrid raua määramiseks leek-aatomabsorptsioon spektromeetrilisel meetodil.

Parameeter	Väärtus (Element Fe)
Monokromaatori pilu laius (nm)	0.2
Lambi voolutugevus (mA)	10
Leek, voolukiirus (l/min)	Õhk (3.0), atsetüleen (1.1)
Integreerimisaeg (s)	3.0

Raua määramiseks leek-aatomabsorptsioon-spektromeetriselt valmistatakse 50 ml mõõtkolbidesse null-lahus ja kalibreerimislahused kontsentratsiooniga 0.2, 0.4, 1 ja 3 mg/l lahjendades vastavalt raud(II)standardlahust 10 mg/l. Kõikidele kalibreerimislahustele lisatakse soolhappelahust (1:1), kuna ka proovilahus sisaldab soolhapet. Kalibreerimislahuste ja lahjendatud proovilahuse (vt. punkti 3.4.1) neelduvus mõõdetakse lainepikkusel 248.3 nm. Tüüpiline kalibreerimisgraafik on toodud joonisel 2.

Joonis 2. FAAS meetodi tüüpiline kalibreerimisgraafik



FAAS meetodi korral uuritakse lisatava soolhappe koguse mõju kalibreerimislahuse neelduvusele, selleks pipeteeritakse viide 50 ml-sse kolbi 5 ml raud(II)standardlahust (kontsentratsiooniga 10 mg/l), igasse kolbi lisatakse vastavalt 0, 0.25, 0.5, 1 ja 2 ml soolhappe lahust (1:1). Kolvid täidetakse määrgini ning mõõdetakse lahuste neelduvused.

4 Mõõtemääramatuse hindamine

Mõõtemääramatust hinnati vastavalt ISO GUM meetodile, mis koosneb järgmistest etappidest [2]:

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

4.1 Mõõtesuuruse määratlemine

Mõõtesuuruse defineerimine on määramatuse hindamise etapp, millele sageli ei pöörata küllalt tähelepanu. Esimene samm mõõtmise sooritamisel on mõõtesuuruse täpne määratlemine ehk defineerimine. Mõõtesuurus peab olema defineeritud iga konkreetse mõõtmisega seotud praktilise eesmärgi jaoks piisavalt üksikasjalikult, et mõõtesuuresel oleks ühene väärtus. Mõõtesuuruse puudulik defineerimine annab mõõtetulemuse määramatusse lisakomponendi, mis võib sageli küllalt oluliseks osutada [3, 2, 1]. Keemilises analüüsis on mõõtesuuruseks enamasti analüüdi sisaldus uuritavas objektis [2].

Selge ja ühemõtteline mõõtesuuruse defineerimine on väga oluline osa korrektse tulemuse saamisel. Töös 47 tuuakse välja ja võetakse arutluse alla kolm erinevat mõõtesuuruse definitsiooni. Käesolevas töös defineeritakse mõõtesuurus järgnevalt: mõõtesuuruseks on vahetult mõõtmisel olnud tablettide proovis raua keskmine mass (C_{Fe} , mg/tabl). See vastab definitsioonile 1 töös 47.

Esitatud mõõtesuuruse definitsiooni korra läheb määramatuse arvutamisel arvesse ainult analüüsimeetodist tingitud määramatus. Raua sisalduse varieerumisest tablettide vahel ehk proovivõtmisest tingitud määramatuse allikat selle definitsiooni korral arvesse ei võeta. Selline definitsioon on sobilik arvestades käesoleva töö eesmärki - võrrelda analüüsimeetodeid, kasutades selleks proove, mis saadud sama proovi ettevalmistamisprotseduuri abil.

4.2 Matemaatilise mudeli koostamine

Matemaatilise mudeli üldkuju on UV-Vis ja FAAS meetodite jaoks sama. Raud(II) lähtestandardlahuse (1000 mg/l) kontsentratsioon leitakse mõlema meetodi korral järgmiselt:

$$C(\text{Femg/l}) = \frac{m_M \cdot M_{\text{Fe}} \cdot P_M \cdot 1000}{M_M \cdot V_{100}} \quad (12)$$

- kus m_M [g] – Mohri soola mass
 M_{Fe} [g/mol] – raua molaarmass
 P_M [ühikuta] – Mohri soola puhtus
 M_M [g/mol] – Mohri soola molaarmass
 V_{100} [ml] – 100 ml mõõtkolvi ruumala
1000 [mg/g] – teisendusfaktor

Raud(II) tööstandardlahuste (kalibreerimislahuste) kontsentratsioonid C_i leitakse järgmiselt:

$$C_i = \frac{V_{10} \cdot C_{\text{Fe mg/l}} \cdot V_{10} \cdot V_i}{V_{100} \cdot V_{100} \cdot V_{50}} \quad (13)$$

- kus V_i [ml] – i-nda kalibreerimislahuse valmistamiseks võetud lähtestandardlahuse ruumala
 V_{10} [ml] – 10 ml pipeti ruumala
 V_{100} [ml] – 100 ml mõõtkolvi ruumala
 V_{50} [ml] – 50 ml mõõtkolvi ruumala
 $C_{\text{Fe mg/l}}$ [mg/l] – raud(II)standardlahuse kontsentratsioon

Nii UV-Vis fotomeetria kui ka FAAS on küllaltki lineaarsed meetodid, mida kinnitavad eeltoodud kalibreerimisgraafikud. Seega eeldame, et analüüdi kontsentratsioonide $C_1 \dots C_n$ ja vastavate analüüsiseadme näitude (käesolevas töös lahuste neelduvused) $A_1 \dots A_n$ vahel on lineaarne sõltuvus ning võime kasutada lineaarse regressiooni võrrandit järgmisel kujul:

$$A_i = b_0 + b_1 \cdot C_i \quad (14)$$

- kus A_i [AU] – regressioonisirge i-ndale punktile vastava lahuse neelduvus
 C_i [mg/l] – regressioonisirge i-ndale punktile vastav lahuse kontsentratsioon
 b_0 [AU] – regressioonisirge algordinaat

b_1 [AU·l/mg] – regressioonisirge tõus

Kui uuritava proovilahuse korral seadme näit on A_{proov} , siis raua kontsentratsiooni C_{proov} uuritavas lahuses [mg/l] võib leida järgmiselt :

$$C_{\text{proov}} = \frac{(A_{\text{proov}} - b_0)}{b_1} \quad (15)$$

Lineaarse regressiooni abil leitakse parameetrite b_1 ja b_0 väärtused, kasutades järgmiseid võrrandeid:

$$b_0 = \frac{\bar{A} \cdot \sum_i C_i^2 - \bar{C} \cdot \sum_i C_i A_i}{\sum_i C_i^2 - n \cdot \bar{C}^2} \quad (16)$$

$$b_1 = \frac{\sum_i A_i C_i - n \cdot \bar{A} \cdot \bar{C}}{\sum_i C_i^2 - n \cdot \bar{C}^2} \quad (17)$$

kus \bar{A} - väärtuste A_i aritmeetiline keskmine

\bar{C} - väärtuste C_i aritmeetiline keskmine

n – punktide arv regressioonisirgel

Raua kogus proovis leitakse vastavalt järgnevale võrrandile:

$$C_{\text{Fe tabletis}} = \frac{(A_{\text{proov}} - b_0) \cdot V_{50} \cdot V_{100} \cdot V_{250} \cdot m_{\text{tablett keskmine}}}{b_1 \cdot V_{\text{proov}} \cdot V_{25} \cdot m_{\text{proov}} \cdot 1000} \quad (18)$$

kus $C_{\text{Fe tabletis}}$ [mg/tabl] – raua sisaldus uuritavates tablettides

A_{proov} [AU] – proovi lahuse neelduvus

b_0 [AU] – regressioonisirge algordinaat

b_1 [AU·l/mg] – regressioonisirge tõus

V_{50} [ml] – 50 ml mõõtkolvi ruumala

V_{100} [ml] – 100 ml mõõtkolvi ruumala

V_{250} [ml] – 250 ml mõõtkolvi ruumala

V_{25} [ml] – 25 ml pipeti ruumala

V_{proov} [ml] – proovi lahuse ruumala (100 ml mõõtkolvist 50 ml mõõtkolbi)

$m_{\text{tablett_keskmine}}$ [g] – keskmine tableti mass

m_{proov} [g] – proovi mass

1000 [ml/l] – teisendusfaktor

Võrrand 18 koos võrranditega 12, 13, 16 ja 17 on meie esialgseks matemaatiliseks mudeliks.

4.3 Määramatuse allikate identifitseerimine

Allpool vaadeldakse mõlema meetodi – UV-Vis fotomeetria ja leek-AAS – määramatuse allikaid koos.

Massi mõõtmistest tulenevad määramatuse allikad

Massi mõõtmise määramatus tuleneb kaalumise protseduurist. Määramatuse komponendid käesolevas töös on:

- (1) Kaalumise korduvusest tingitud määramatus
- (2) Kaalu triivist tingitud määramatus
- (3) Kaalu digitaalse näidu ümardamisest tingitud määramatus

Massi mõõtmise juures väärivad kaalumist veel järgmised määramatuse allikad. Elektrostaatilistest häiretest tingitud määramatus võib teatud analüüside korral olla küllaltki oluline massi määramatuse allikas [47]. Käesolevas töös elektrostaatilistest häiretest tulenevat määramatust eraldi ei hinnata vaid arvestatakse, et kaalu lugemi ebastabiilsusest tingitud määramatuseallikas on võetud arvesse läbi korduvuse ja triivi panuse. Õhu üleslükkejõudu kaalumise protseduuri juures määramatuse leidmisel käesolevas töös arvesse ei võeta, sest proovi ja standardaine tihedused ei erine teineteisest märgatavalt ja vastav määramatus oleks seega väga väike. Kaalude kalibratsioonifunktsiooni mittelineaarsus on samuti määramatuse allikas, mille võib vaatluse alt kõrvale jätta, kui kaaluda masse grammide suurusjärgus või alla selle. Sellise kitsa masside intervalli korral võib tänapäevaste kaalude korral kalibratsioonifunktsiooni lugeda lineaarseks.

Mohri soola puhtus P_M

Standardaine puhtus leitakse tavaliselt standardainega kaasas olevast sertifikaadist.

50-ml mõõtkolvi (V_{50}), 100-ml mõõtkolvi (V_{100}) ja 250-ml mõõtkolvi (V_{250}) ruumala

Mõõtkolbi valmistatud lahuste ruumala määramatuse komponendid on:

- (1) Mõõtkolvile omistatud ruumala määramatus
- (2) Mõõtkolvi märgini täitmisest tulenev määramatus
- (3) Ruumala määramatus, mis on tingitud temperatuuri erinevusest mõõtkolvi kalibreerimise protseduuri ajal ja labori temperatuuri vahel.

25-ml pipeti (V_{25}), 10-ml pipeti (V_{10}), 5-ml pipeti (V_5), 2-ml pipeti (V_2) ja 1-ml pipeti (V_1) ruumala

Lahuse pipeteerimise määramatuse komponendid on:

- (1) Pipetile omistatud ruumala määramatus
- (2) Pipeteerimise korratavuse määramatus
- (3) Ruumala määramatus, mis on tingitud temperatuuri erinevusest pipeti kalibreerimise protseduuri ajal ja labori temperatuuri vahel.

Proovilahuse neelduvus (kalibreerimisgraafiku meetodil) A_{proov} ja standardlahuste neelduvused $A_1 - A_n$.

Mõlemad käesolevas töös kasutatud meetodid (UV-Vis fotomeetria ja FAAS) on absorptsioon-spektromeetrilised ja seega on nende määramatuse allikad osaliselt samad.

Mõõdetud neelduvuste väärtuste määramatuse allikad on:

- (1) Korduvus
- (2) Triiv
- (3) Kalibreerimiskõvera mittelineaarsus
- (4) Digitaalse displei (kolm kohta peale koma) viimase koha ümardamisest tingitud määramatus
- (5) Meetod-spetsiifilised määramatuseallikad [43, 44]

Järgnevalt räägitakse lähemalt määramatuseallikatest, mis on käesoleva töö raames olulised.

Korduvus

Korduvuse määramatus on tingitud mitmetest juhuslikest efektidest. UV-Vis fotomeetria korral: küveti küvetihoidjasse paigutamise korduvus, võimalik

temperatuuri kõikumine, võimalikud tolmuosakesed küveti seintel ja lahuses. FAAS analüüsi korral: leegi ebastabiilsus, proovi leeki voolamise ja gaasirõhkude kõikumised. Mõlema meetodiga on seotud veel üks faktor – müra, mis on seotud baasjoone müraga, lambi energia kõikumisega. Käesolevas tööd ei hinnata neid allikaid eraldi. Selle asemel hinnatakse üldist korduvuse panust.

Triiv

Triiv on süstemaatiline efekt, mis on seotud instrumendi parameetrite muutmisega (lambi intensiivsuse muutumine, detektori karakteristikute muutumine, AAS meetodi korral ka gaaside voolukiiruste ja lahuse sisseimemiskiiruse muutumine) kalibreerimise ja proovi mõõtmise vahepeal. Põhimõtteliselt peaks triivi korrigeerima, aga see on rutiinanalüüside korral enamasti ebapraktiline ja seega võetakse käesolevas töös triiv arvesse kui määramatuse allikas.

Kalibreerimisgraafiku mittelineaarsus

Kalibreerimisgraafiku mittelineaarsus on alati süstemaatiline efekt, millel on palju allikaid (juhuslik valgus, optika ja/või elektroonika, lainepikkuse valik jne). Käesolevas töös ei püüta leida kalibreerimiskõvera mittelineaarsuse täpseid põhjustajaid, vaid hinnatakse mittelineaarsuse panust residuaalide analüüsi abil.

Meetod-spetsiifilised määramatuseallikad

Eriti UV-Vis fotomeetria korral, aga ka FAAS analüüsi puhul tuleb vastavalt meetodikale lisada nii kalibreerimislahustele kui ka proovilahusele mitmeid lisalahuseid. Määramatust, mis tuleneb nende lahuste lisamise täpsest kogusest kõikidele kalibreerimislahustele ja proovilahustele, võetakse käesolevas töös arvesse. Proovilahuse neelduvuse määramatus hõlmab vastavalt viitele 4 Lisaks veel järgnevaid allikaid:

- määramatus, mis tuleneb proovi teiste komponentide segavast mõjust
- määramatus, mis tuleneb analüüdi oleku erinevusest kalibreerimislahustes ja proovilahustes (nt Fe^{2+} vs Fe^{3+})
- määramatus, mis tuleneb keemilisest triivist

Need määramatuse allikad on käesolevas tööd elimineeritud järgnevalt: farmatseutilise preparaadi koostis on küllaldaselt hästi defineeritud ja sellest informatsioonist on võimalik järeldada, et segavad elemendid või orgaanilised ühendid käesoleva töö jaoks puuduvad. Lisaks kindlustatakse raua oksüdatsiooniaseme II hüdrokinooni lisamisega ja on teada, et raud(II)kompleks 1,10-fenatroliiniga on stabiilne pikka aega.

Proovi ettevalmistamisest tulenev määramatus

Farmatseutilistes preparaatides on raud kergesti lahustuvas vormis [14, 15]. Proovis, mida analüüsitakse käesolevas töös, sisaldub raud raud(II)glükonaadina, mis on käesoleva töö meetodikate korral väga hästi lahustuv ja seega saab eeldada 100% saagist. Saagise väärtus ei ole käesoleva töö seisukohalt oluline ka seetõttu, et töö eesmärk on võrrelda just analüüsimeetodeid, mitte proovi ettevalmistust, mis on mõlema analüüsimeetodi juures sama.

4.4 Mudeli modifitseerimine

Alajaotuses 4.2 koostatud matemaatilises mudelis on kalibreerimisgraafiku koostamiseks kasutatud kalibreerimislahuste kontsentratsioonid $C_1 - C_4$ omavahel tugevasti korreleeritud. See tuleneb sellest, et kaks 10 ml pipeteerimisoperatsiooni – standardlahuste 2 ja 3 valmistamiseks – sisalduvad kõikide kalibreerimislahuste kontsentratsioonide arvutustesse samal moel. Selline olukord nõuab korrektseks määramatuse hindamiseks kas korreleeruvate sisendsuuruste vahelist korrelatsiooni matemaatiliselt arvesse võtmist või mudeli ümberkorraldamist selliselt, et korrelatsiooni ei oleks. Korrelatsiooni matemaatiline arvessevõtmine nõuab korreleeruvate sisendsuuruste vaheliste korrelatsioonikordajate teadmist. Kuna kontsentratsioonid $C_1 - C_4$ leitakse mitmete muude suuruste kaudu arvutades, mitte vahetult kordusmõõtmiste keskmisena, siis ei ole nende omavaheliste korrelatsioonikordajate määramiseks muud võimalust, kui arvutisimulatsioon, kasutades vastavate suuruste eeldatavaid jaotusfunktsioone [48]. Kuna nimetatud olukord puudutab 4 sisendsuurst, siis oleks vaja sel teel leida 6 paarikaupa korrelatsioonikordajat. See oleks suur töö ja lisaks tuleks seda teha uuesti iga kord, kui muutub mõne sisendsuuruse väärtus. Seetõttu otsustati käesolevas töös minna teist teed ja modifitseerida mudelit. Selleks tuuakse mudelisse sisse faktorid f_1 ja f_2 , mis võtavad arvesse kahe ülalmainitud pipeteerimisoperatsiooni määramatust. Need faktorid on ühikuta suurused arväärtusega 1 ja nende standardmääramatus on võrdne nimetatud pipeteerimisoperatsioonide suhteliste standardmääramatusega. Et vältida samade faktorite topelt arvestamist, jäetakse vastavad määramatuse komponendid

konsentratsioonide $C_1 - C_4$ määramatuste leidmisel arvestamata. Niisiis on lõplikuks matemaatiliseks mudeliks võrrand 19 koos võrranditega 12, 13, 16 ja 17.

$$C_{\text{Fe tabletis}} = \frac{(A_{\text{proov}} - b_0) \cdot V_{50} \cdot V_{100} \cdot V_{250} \cdot m_{\text{tablett_kskmine}}}{b_1 \cdot V_{\text{proov}} \cdot V_{25} \cdot m_{\text{proov}} \cdot 1000} \cdot f_1 \cdot f_2 \quad (19)$$

Suuruste selgitused on toodud alajaotuses 4.2.

4.5 Määramatuse komponentide hindamine

Lisaks siin alajaotuses toodud informatsioonile on täielikud andmed erinevate komponentide määramatuste kohta esitatud määramatuse arvutuste väljatrükkides Lisas 2.

Massi mõõtmine

Massi määramatuseks on kaalumise määramatus, mis koosneb kaalumise korduvusest, kaalude triivist ja digitaalse näidu ümardamise määramatusest. Kaalumise korduvuse andmed pärinevad kaalude kasutusjuhendist: $u(m, \text{kor}) = 0.1 \text{ mg} = 0.0001 \text{ g}$.

Kaalumise triivist tulenevat määramatust hinnatakse tuginedes meie labori varasematele pikaajalistele kogemustele selle kaaluga: $u(m, \text{triiv}) = 0.0001 \text{ g}$.

Digitaalse näidu ümardamisest (seda teeb kaalu elektroonika automaatselt) tingitud määramatus on pool kaalu näidu viimasest kohast, st neljakohalise kaalu puhul: $u(m, \text{üm}) = 0.00005 \text{ g}$. See suurus on riskülikjaotusega, seega $u(m, \text{üm}) = 0.00005 / \sqrt{3}$

Summaarne massi standardmääramatus:

$$u(m) = \sqrt{u(m, \text{kor})^2 + u(m, \text{triiv})^2 + u(m, \text{üm})^2} \quad (20)$$

$$u(m) = \sqrt{0.0001^2 + 0.0001^2 + 0.000029^2} = 0.000144 \text{ g}$$

Mohri soola puhtus P_M

Kasutatava Mohri soola puhtuseks on vastavalt tootja andmetele “min 99%”. Sellise puhtuse iseloomustamise põhjal on määramatust raske interpreteerida. Käesolevas töös eeldatakse konservatiivselt, et Mohri soola tegelik puhtus jääb vastavalt riskülikjaotusele vahemikku 99...100%. Selliselt eeldades saadakse puhtuse

arvväärtuse hinnanguks $P_M = 0.995$ ja vastav standardmääramatus avaldub järgmiselt:

$$u(P_M) = 0.005 / \sqrt{3} = 0.0029.$$

Mõõtkolbidega mõõdetud lahuste ruumalad V_{50} , V_{100} , V_{250}

(1) Mõõtkolbide ruumalad 20 °C juures:

$$50.00 \pm 0.09 \text{ ml}$$

$$100.00 \pm 0.15 \text{ ml}$$

$$250.00 \pm 0.15 \text{ ml}$$

Mõõtkolbidele omistatud ruumala standardmääramatused leitakse vastavalt ristkülikjaotusele kasutades võrrandit 6 (vt tabel 3).

(2) Kui mõõtkolb täidetakse hoolikalt ja tilkhaaval, siis ei eksita täitmisel mingil juhul rohkem kui \pm kolme tilga võrra. Selline konservatiivne määramatuse hinnang võtab arvesse ka võimalikke kolvi kaelal olevaid tilkasid. Kui võtta ühe tilga ruumalaks 0.03 ml, siis mõõtkolvi täitmisest tulenev standardmääramatus $u(V_{\text{kolb}}, \text{täit}) = 0.09/\sqrt{3} = 0.052 \text{ ml}$.

(3) Katsete läbiviimise ajal oli labori temperatuur $20 \pm 2 \text{ °C}$, seega $\Delta t = 2 \text{ °C}$. Vee soojuspaisumiskoeffitsient on $\gamma = 2.1 \cdot 10^{-4} \text{ 1/°C}$. Temperatuuriefektist põhjustatud mõõtkolvi standardmääramatus avaldub järgmiselt: $u(V_{\text{kolb}}, \text{temp}) = V_{\text{kolb}} \cdot \gamma \cdot \Delta t / \sqrt{3}$

Lahuse ruumala summaarne standardmääramatuse avaldub seega:

$$u(V_{\text{kolb}}, \text{temp}) = \sqrt{u(V_{\text{kolb}}, \text{kal})^2 + u(V_{\text{kolb}}, \text{täit})^2 + u(V_{\text{kolb}}, \text{temp})^2} \quad (21)$$

Käesolevas töös kasutatud kolbide ruumalade standardmääramatused on toodud tabelis 3.

Pipettidega mõõdetud lahuste ruumalad V_{25} , V_{10} , V_5 , V_2 ja V_1

(1) Pipetile omistatud ruumala määramatus loetakse käesolevas töös pipetilt:

$$1 \text{ ml gradueeritud pipett: } \pm 0.01 \text{ ml}$$

$$2 \text{ ml gradueeritud pipett: } \pm 0.015 \text{ ml}$$

5 ml mahtpipett: ± 0.010 ml

10 ml mahtpipett: ± 0.03 ml

25 ml mahtpipett: ± 0.03 ml

Pipetile omistatud ruumalade standardmääramatused arvutatakse vastavalt võrrandile 6 ning saadud tulemused on esitatud tabelis 3.

(2) Käesolevas töös leitakse tuginedes labori pikaajalistele kogemustele, et pipeteerimise korduvuse standardmääramatuse konservatiivseks hinnanguks on mitte rohkem kui 0.4% pipeti ruumalast [49]. Töö kogemused näitavad, et pipeteerimise korduvuse korrektne määramine ei ole lihtne, kuna see sõltub suuresti pipeti puhtusest ja ka pipeti täitmiseks kasutatava kummipirni jäikusest. Isegi pärast kroomseguga pipeti pesemist on pipeti puhtus päevade lõikes erinev. Näiteks eksperimendid 1-ml pipetiga näitasid, et pipeti ruumala (kümne paralleelkatse põhjal) suhteline standardmääramatus (RSD) erineb erinevatel päevadel kuni kolm korda. Seega pipeti ruumala korduvuse hindamine ühepäevase eksperimendiga on komplitseeritud ja piiratud hulga andmete abil saadud määramatuse hinnangul on endal suur ja tundmatu suurusega määramatus.

(3) Sarnaselt mõõtkolbidega oli katsete läbiviimise labori temperatuur 20 ± 2 °C, seega $\Delta t = 2$ °C. Vee soojuspaisumiskoeffitsient on $\gamma = 2.1 \cdot 10^{-4}$ 1/°C. Temperatuuriefektist põhjustatud pipeti standardmääramatus avaldub järgmiselt:

$$u(V_{\text{pipett}}, \text{temp}) = V_{\text{pipett}} \cdot \gamma \cdot \Delta t / \sqrt{3}$$

Pipeti ruumala summaarne standardmääramatuse avaldub järgmiselt:

$$u(V_{\text{pipett}}) = \sqrt{u(V_{\text{pipett}}, \text{kal})^2 + u(V_{\text{pipett}}, \text{kor})^2 + u(V_{\text{pipett}}, \text{temp})^2} \quad (22)$$

Käesolevas töös kasutatud pipettide ruumalade standardmääramatused on toodud tabelis 3.

Tabel 3. Mahtnõude standardmääramatused

Mõõtkolvid					
Mahtnõu tähis	$u(V_{\text{kolb, kal}})$, ml	$u(V_{\text{kolb, täit}})$, ml	$u(V_{\text{kolb, temp}})$, ml	$u(V_{\text{kolb}})$, ml	Suhteline määramatus, %
V_{50}	0.052	0.052	0.012	0.075	0.149
V_{100}	0.087	0.052	0.024	0.010	0.104
V_{250}	0.087	0.052	0.061	0.012	0.047
Pipetid					
Mahtnõu tähis	$u(V_{\text{pipett, kal}})$, ml	$u(V_{\text{pipett, kor}})$, ml	$u(V_{\text{pipett, temp}})$, ml	$u(V_{\text{pipett}})$, ml	Suhteline määramatus, %
V_1	0.0058	0.004	0.0002	0.007	0.700
V_2	0.0087	0.008	0.0005	0.012	0.590
V_5	0.0058	0.020	0.0012	0.021	0.418
V_{10}	0.017	0.040	0.0024	0.044	0.437
V_{25}	0.017	0.100	0.0061	0.010	0.407

Tabelis 3 toodud andmetest saab järeldada, et väiksemate mahtnõude (näiteks pipetid V_1 , V_2 , mõõtkolb V_{50}) korral on nende suhteline standardmääramatus tunduvalt kõrgem kui suuremate mahtnõude korral.

Lahuste optilised neelduvused

Vastavalt punktile 4.3 võetakse arvesse järgmisi määramatuseallikaid:

(1) Korduvus. Kõige üldisem viis kvantitatiivselt väljendada korduvust on seda teha kasutades korduvuse standardhälvet. Käesolevas töös leiti korduvus tehes erinevatel päevadel mõõtmiste seeriaid 5 paralleelmõõtmisest. Leitud korduvused ühtisid omavahel. Tüüpilisteks korduvuse väärtusteks leiti UV-Vis fotomeetrilise analüüsi korral saadakse 0.00045 AU ja FAAS analüüsi korral 0.00055 AU ning vastavad aritmeetiliste keskmiste standardmääramatused on: $0.00045/\sqrt{5} = 0.00020$ AU ja $0.00055/\sqrt{5} = 0.00024$ AU. Need tulemused ühtivad hästi meie grupis varem läbi viidud neelduvuse korduvuse uuringute tulemustega [4].

(2) Võimalik triiv mõlema spektromeetri jaoks hinnatakse labori pikaajaliste kogemuste põhjal. UV-Vis fotomeetria korral $u(A, \text{triiv}) = 0.0015 \text{ AU}$ ja FAAS analüüsi korral $u(A, \text{triiv}) = 0.0018 \text{ AU}$.

(3) Kalibreerimisgraafiku mittelineaarsus. Mõlema meetodi jaoks täheldati töös kergelt kalibreerimisgraafiku kumerust, mida võetakse arvesse kasutades residuaalide analüüsi tulemusi. Mittelineaarsusest tulenev neelduvuse määramatuse hinnatakse konservatiivselt mitte suuremaks kui suurima residuaali absoluutväärtus. Käesolevas töös hinnatakse mõlemat instrumentaalmeetodit individuaalselt ning suurimaks residuaali väärtuseks UV-Vis fotomeetria korral saadi 0.007 AU ja FAAS meetodi jaoks 0.002 AU . Detailsem informatsioon on toodud lisa 2. Vastavad standardmääramatused saadakse 0.00040 ja 0.0012 AU . Esmapilgul võib tunduda, et selline lähenemine ei ole õigustatud, kuna kalibreerimisgraafiku residuaalid võiva olla põhjustatud ka lihtsalt punktide korduvusest. See ei ole aga siiski nii: esiteks kordus residuaalide "kumer" pilt kalibreerimisgraafikult kalibreerimisgraafikule ja teiseks on residuaalide väärtused kaugelt suuremad, kui võiks eeldada, arvestades teisi lahuste neelduvuse määramatuse allikaid ja lahuste kontsentratsioonide määramatuse allikaid (vt lisa 2).

(4) Kummagi analüüsiaparaadi digitaalne displei annab andmeid kolme kohaga peale koma, seega digitaalse lugemi ümardamisest tingitud määramatus avaldub järgmiselt: $u(A, \text{üm}) = 0.0005/\sqrt{3} = 0.00029 \text{ AU}$.

(5) Meetod-spetsiifilised määramatuseallikad. Käesolevas töös uuriti, kui palju mõjutab lahuse neelduvust lisatud reagentide täpne kogus. Selle määramatuseallika uurimiseks varieeritakse reagendilahuste koguseid ühe kindla kontsentratsiooniga standardlahuse valmistamise juures. Normaalseste töötingimuste korral leiti, et määramatus, mis tuleneb UV-Vis fotomeetrilise analüüsi korral 1,10-fenantroliini, hüdrokiinoni ja trinaatriumtsitraadi pipeteerimisest ning FAAS analüüsi korral soolhappe pipeteerimisest, ei ole suurem kui 0.001 AU . Seega need neli määramatuseallikat $u(A, \text{Fen})$, $u(A, \text{Hüdrok})$, $u(A, \text{Na-tsitri})$, $u(A, \text{HCl})$ hinnatakse järgmiselt: $0.001/\sqrt{3} = 0.00058 \text{ AU}$.

Proovilahuse neelduvuse summaarne standardmääramatus leitakse UV-Vis fotomeetrilise meetodi korral vastavalt võrrandile 23 ja FAAS meetodi korral vastavalt võrrandile 24:

$$u(A_{\text{proov}}) = \sqrt{u(A, \text{triiiv})^2 + u(A, \text{kor})^2 + u(A, \text{mitteli})^2 + u(A, \text{üm})^2 + u(A, \text{Fe})^2 + u(A, \text{Hüdro})^2 + u(A, \text{Na-tsit})^2} \quad (23)$$

$$u(A_{\text{proov}}) = \sqrt{u(A, \text{triiiv})^2 + u(A, \text{kor})^2 + u(A, \text{mitteli})^2 + u(A, \text{üm})^2 + u(A, \text{HC})^2} \quad (24)$$

Vastavad arvutused on toodud lisas 2. Suurem osa määramatuseallikatest, mis on toodud võrrandites 23 ja 24 on olulised ainult proovilahuse jaoks. Kalibreerimislahuste neelduvuse standardmääramatus võtab vastavalt ülalkirjeldatud põhjustele arvesse ainult korduvusest ja digitaalse displei viimase koha ümardamisest tingitud määramatust ning on leitav vastavalt järgmisele võrrandile:

$$u(A_{\text{kal_lah}}) = \sqrt{u(A, \text{kor})^2 + u(A, \text{üm})^2} \quad (25)$$

Lisas 2 toodud andmetest on näha, et kalibreerimisgraafiku mittelineaarsus on proovi neelduvuse olulisimaks määramatuse komponendiks mõlema meetodi korral. See viitab mittelineaarse regressiooni kasutamise otstarbekusele. Samas on töö eesmärgiks viia määramatuse analüüs läbi arvestades tavalaborite vajadustega. Ei UV-Vis ega FAAS meetodi korral ei ole tavalaborites mittelineaarse regressiooni kasutamine levinud ja selletõttu seda ka käesolevas töös sisse ei viidud.

4.6 Liitstandardmääramatuse arvutamine ja tulemuse esitamine

Määramatuse arvutamine on teostatud MS Excel programmi keskkonnas kasutades Kragteni arvutusskeemi [50]. Efektiivsed vabadusastmete arvud leitakse vastavalt Welch-Satterthwaite võrrandile (8). Laiendmääramatuse detailne arvutuskäik nii UV-Vis fotomeetrilise kui ka FAAS meetodi jaoks on esitatud Lisas 2.

5 Tulemused ja arutelu

5.1 Tulemused

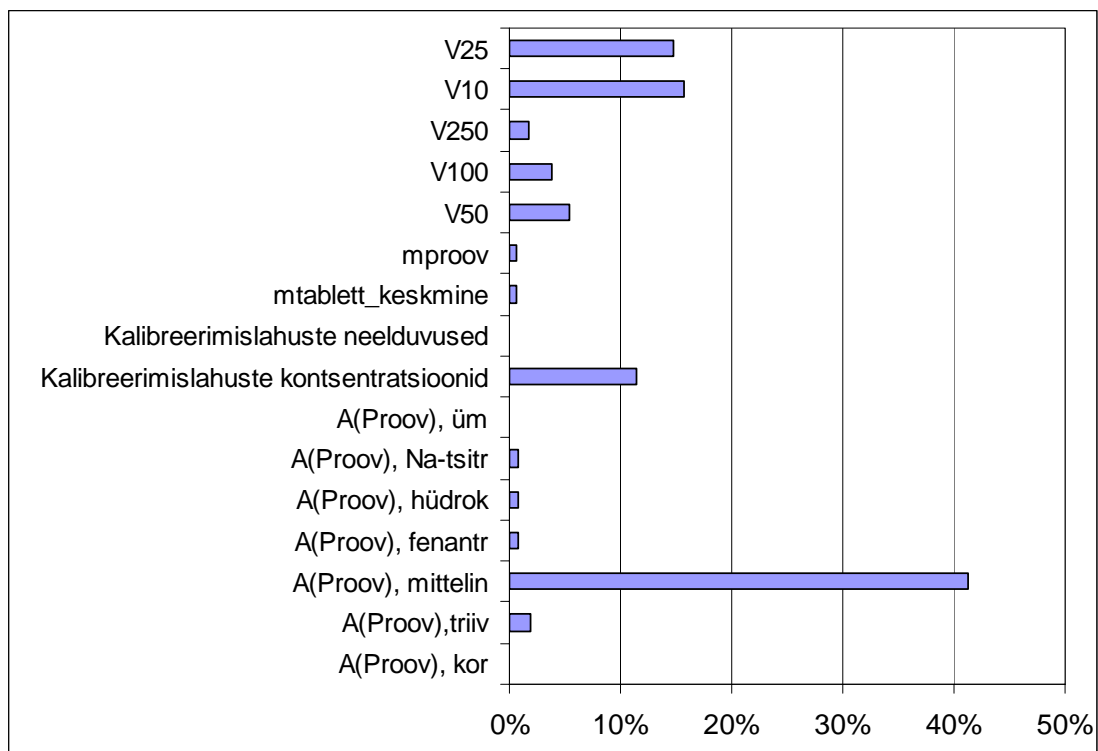
Töö tulemusena loodi mõõtemääramatuse hindamise protseduurid UV-Vis fotomeetrilise ja leek-aatomabsorptsioon spektromeetrilise (FAAS) meetodi jaoks. Loodud protseduure rakendati konkreetse ülesande juures: raua määramine farmatseutilises preparaadis. Protseduurid baseeruvad matemaatilisel mudelil (võrrand 19 koos võrranditega 12, 13, 16 ja 17), millel on UV-Vis meetodi jaoks 91 ja FAAS meetodi jaoks 86 olulisemat vahetult eksperimendist saadavat sisendsuurust. Mõõtemääramatuse arvutusnäidete väljatrükk MS Exceli formaadis koos reaalse andmetega on toodud nii UV-Vis fotomeetrilise kui FAAS analüüsi jaoks lisa 2. Raua sisalduse UV-Vis fotomeetrilise ja FAAS analüüsi tulemused konkreetses proovis koos määramatustega on toodud tabelis 4.

Tabel 4: Raua sisaldus proovis (mg/tabl) ja laiendmääramatus (ligikaudu 95% usaldatavustasemega).

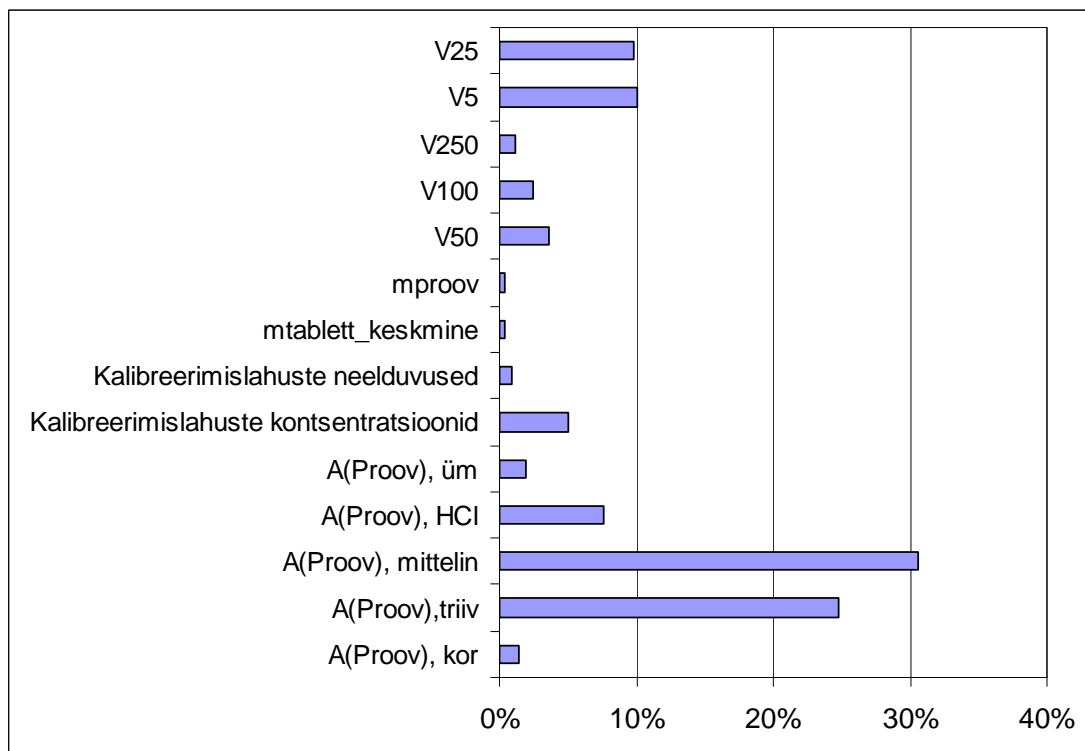
Meetod	Tulemus	Laiendmääramatus	Kattetegur
UV-Vis fotomeetria	11.4	0.5	2.5
FAAS	11.9	0.8	2.3

Erinevate määramatuseallikate panused summaarsesse mõõtemääramatusesse on toodud joonistel 3 ja 4. Detailne informatsioon arvutuste kohta on toodud lisa 2.

Joonis 3. UV-Vis fotomeetrilise analüüsi määramatuse allikate panus määramatuse koondis.



Joonis 4. FAAS analüüsi määramatuse allikate panus määramatuse koondis.



Alljärgnevalt vaadeldakse olulisemaid määramatuseallikaid ning uuritakse loodud mudelite abil mitmesuguste eksperimendiparameetrite mõju analüüsi tulemuse mõõtemääramatusele.

5.2 UV-Vis ja FAAS meetodite määramatuse allikate analüüs

UV-Vis fotomeetrilise analüüsi korral saadi natuke madalam raua sisaldus kui FAAS analüüsi korral, kuid erinevus on määramatuse piirides: E_n skoor tulemuste vahel on 0.50 (tulemuste kokkulangevuse demonstreerimiseks on nõutav $E_n \leq 1$).

Jooniste 3 ja 4 põhjal on ilmne, et kaalumisest tulenev määramatuse komponent on üks väiksemaid. Kummagi meetodi korral ei muutuks tulemuse määramatus isegi juhul, kui kaalumise määramatus üldse arvesse võtmata jätta. Kaaludes proovide masse suurusjärgus 1 g neljakohalise analüütilise kaaluga on selline olukord tavaline, kui ei esine olulisi häireid kaalumisel (elektrostaatiliselt häired, proovi lenduvus või hügrooskoopsus). See olukord on ka aluseks kaalumise määramatuse lihtsustatud arvessevõtmisele [47].

Mõõtkolbide ruumalast tingitud määramatus avaldab samuti tulemuse määramatusele väikest mõju, kuid pipettide ruumalad omavad märgatavat efekti. Kõikidest pipeteerimisoperatsioonidest tulenev summaarne määramatus annab FAAS meetodi korral rohkem kui 19% ja UV-Vis fotomeetrilise meetodi korral rohkem kui 30 % määramatuse koondist. Pipeteerimise suhteliselt kõrge panus määramatusesse on tingitud paljudest pipeteerimisoperatsioonidest ja konservatiivsest pipeteerimise korduvuse panuse hinnangust (vt punkti 4.5).

Ühine pipeteerimisoperatsioonide määramatuse panus, mis on seotud kalibreerimislahuste valmistamisega, sisaldub kalibreerimislahuste kontsentratsioonide panuses ja see moodustab kalibreerimise määramatusest peamise osa mõlema meetodi korral. Võrreldes teiste määramatuseallikatega on kalibreerimislahuste kontsentratsioonidest tulenev määramatus suhteliselt väike: 11% ja 5% vastavalt UV-Vis fotomeetrilise ja FAAS analüüsi korral.

Mõlema meetodi korral annab kõige suurema panuse mõõtemääramatusesse proovilahuse neelduvus (A_{proov}). Selle panus on 46% UV-Vis fotomeetrilise analüüsi korral ja 66% FAAS analüüsi korral. Proovi lahuse neelduvuse (A_{proov}) määramatus

koosneb omakorda mitmetest komponentidest. Mõlema meetodi korral on peamine määramatuse komponent kalibreerimisgraafiku mittelineaarsusest põhjustatud määramatus (41 % ja 31 % vastavalt UV-Vis fotomeetrilise ja FAAS meetodi jaoks), mis meie lähenduse korral on arvestatud proovilahuse neelduvuse määramatuse koosseisu (vt viidet 4). Suur kalibreerimisgraafiku mittelineaarsusest tulenev määramatuse panus on väga hoiatav seoses üldise tavaga jätta lineaarse kalibreerimisgraafikuga meetodite korral mittelineaarsusest tulenev määramatuse komponent mõõtemääramatuse hindamisel üldse vaatluse alt kõrvale, seda eriti sellise suhteliselt hea lineaarsusega meetodi korral nagu UV-Vis fotomeetria. Kui jätta kalibreerimisgraafiku mittelineaarsusest tulenev määramatus arvestamata, oleks leitav määramatuse hinnang käesoleva arvutusnäite tingimuste korral UV-Vis meetodi korral (tulenevalt määramatuse komponentide liitumise ruuteskirjast, võrrand 2) ca 2 ja FAAS meetodi korral ca 2.5 korda madalam, kui on toodud tabelis 4. See võib tunduda ootamatu, et mittelineaarsusest tulenev panus UV-Vis fotomeetria korral, mis üldiselt on oluliselt lineaarsem meetod kui FAAS, ei oma mitte ainult suuremat panust, vaid on suurem ka neelduvuse standardmääramatuse absoluutväärtuselt: 0.0040 AU vs 0.0012 AU. Siiski on FAAS meetodi korral neelduvuse väärtused ligikaudu neli korda madalamad, seega absoluutne mittelineaarsus on FAAS meetodi korral suurem: 1.18 % proovilahuse neelduvusest UV-Vis fotomeetria korral ja 1.78 % FAAS analüüsi jaoks. See leiab kinnitust ka standardmääramatuse panuses, arvutatuna ümber tulemise laiendmääramatusele: vastavalt 0.32 mg ja 0.46 mg UV-Vis fotomeetria ja FAAS meetodi jaoks.

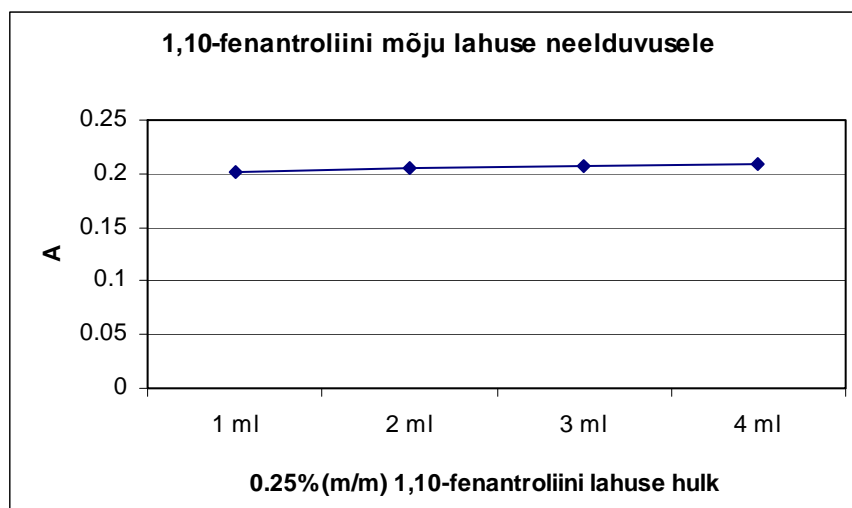
FAAS meetodi korral, mis nii korduvuse kui ka triivi seisukohast on oluliselt ebastabiilsem meetod kui UV-Vis fotomeetria, järgneb mittelineaarsuse panusele instrumendi triivist tingitud määramatuse komponent (25% kogu määramatusest). Edasi järgneb mõlema meetodi korral pipeteerimistest pärit määramatuseallikas (31% ja 20% vastavalt UV-Vis ja FAAS meetodite korral).

Fotomeetrilise reaktsiooni ebatäielikkusest ja reagentide doseerimisest tingitud määramatuse allikas UV-Vis fotomeetrilise analüüsi korral on suhteliselt madala kaaluga, moodustades määramatusest kokku vähem kui 3%. Eeldatavasti on see tingitud suhteliselt lihtsast farmatseutilise preparaadi maatriksist. Keerulisemate maatriksite korral võivad sellised määramatuseallikad saada väga oluliseks ja UV-Vis fotomeetrilise meetodi määramatus võib FAAS meetodi määramatuse suhtes kasvada.

Selline olukord, kus just proovi lahuse mõõtmisest tingitud määramatus domineerib määramatuse koondis, on instrumentaalse keemilise analüüsi juures üsna tavaline ning seda on ka varem kirjanduses kirjeldatud (UV-Vis fotomeetria [35], HPLC [47]). Tuleb aga silmas pidada, et mõningate määramatuse allikate – käesolevas töös eeskätt mittelineaarsuse ja triivi – panuseid võib põhimõtteliselt arvesse võtta ka kalibreerimislahuste kaudu. Sellisel juhul toodud väide ei kehti. Siiski on matemaatiliselt oluliselt lihtsam arvestada neid allikaid proovi neelduvuse kaudu [4].

Käesolevas töös uuriti, kui palju mõjutavad lahuste neelduvusi lisatud reagentide täpsed kogused. Selle määramatuseallika uurimiseks varieeritakse ükshaaval kõikide reagentilahuste proovile lisatavaid koguseid kindla kontsentratsiooniga (1.0 mg/l) standardlahuse juures jättes seejuures kõikide teiste reagentilahuste kogused muutmata. UV-Vis fotomeetrilise analüüsi korral uuritakse 1,10-fenantroliini (joonis 5), hüdrokinooni (joonis 6) ja trinaatriumtsitraadi (joonis 7) koguste mõju proovi lahuse neelduvusele.

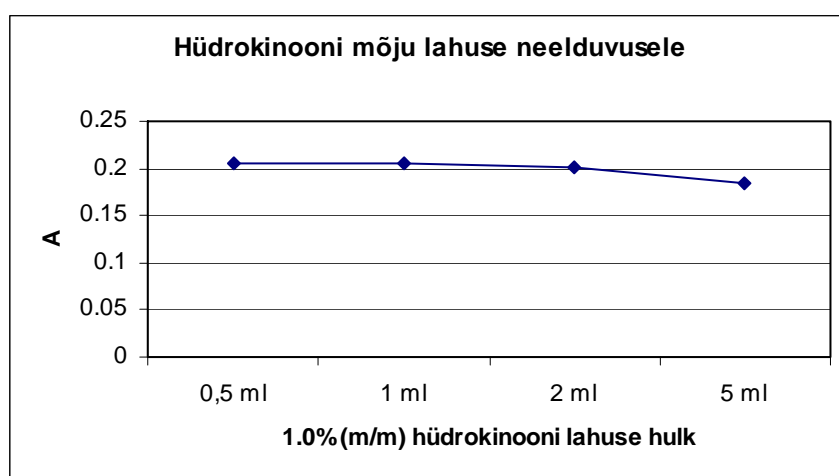
Joonis 5. 1,10-fenantroliini lahuse lisatava koguse mõju proovilahuse neelduvusele.



Jooniselt 5 järeldub, et 1,10-fenantroliini lahuse lisatava koguse varieerimine optimaalsest kogusest (2 ml) muudab neelduvuse väärtust suhteliselt vähe. Siiski on graafikult näha, et lahusel, millele lisati 1,10-fenantroliini lahust kaks korda alla optimaalse koguse (1 ml), on teistest lahustest 0.004 neelduvuse ühiku võrra madalam neelduvus.

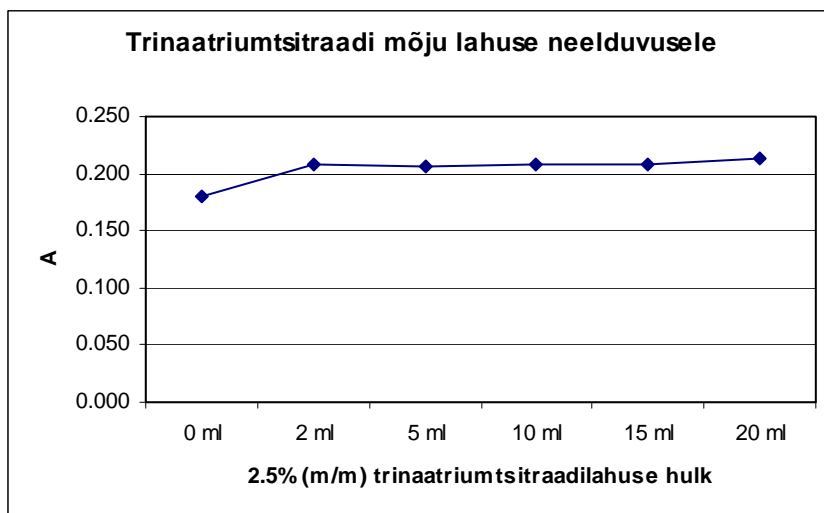
Jooniselt 6 järeldub, et lisades optimaalse koguse (1 ml) asemel 5 ml hüdrokiinoni lahust väheneb kalibreerimislahuse neeldumismaksimumi intensiivsus juba selgelt (0.021 neelduvuse ühiku võrra). Kõige kõrgema neelduvusega on lahus, millele on lisatud optimaalne kogus hüdrokiinoni lahust. Lisaks saab toodud andmete põhjal järeldada, et reagendilahuste pipeteerimisel tehtav võimalik viga ei põhjusta konservatiivselt hinnates neeldumisele suuremat määramatust kui 0.001 AU.

Joonis 6. Hüdrokiinoni lahuse lisatava koguse mõju proovilahuse neelduvusele.



Trinaatriumtsitraadi lahuse lisatud koguse mõju kajastab tegelikult lahuse pH mõju uurimist neelduvusele. Katses lisati 1.0 mg/l kalibreerimislahusele konstantne kogus hüdrokiinoni- ja 1,10-fenatrolüüni lahust, kuid erinev kogus trinaatriumtsitraati: 0, 2, 5, 10, 15 ja 20 ml. Saadud lahuste pH-d olid vastavalt: 1.9, 2.14, 3.49, 5.01, 5.56 ja 5.79. Mõõdetud lahuste neelduvuste põhjal saab vastavalt joonisele 7 järeldada, et katseks sobilik trinaatriumtsitraadilahuse hulk peaks olema 2 ml (pH=2.14) või rohkem. Lisades trineetriumtsitraati alla 2 ml on lahuse pH sedavõrd happeline, et kompleksi moodustumine ei ole enam täielik tingituna 1,10-fenantrolüüni ($pK_a = 4.84$) ulatuslikust protoneerumisest.

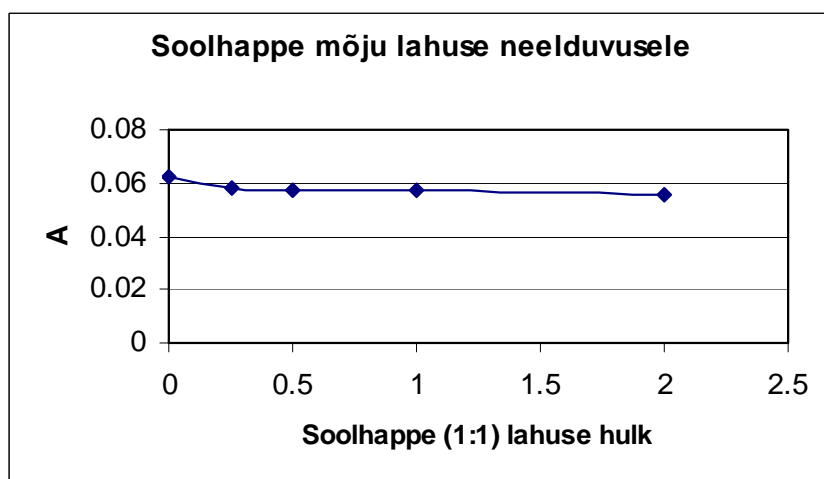
Joonis 7. Trinaatriumtsitraadilahuse mõju uurimine



Lisaks võimaldab joonis 7 järeldada, et võimalik lahuste pH reguleerimisel tehtav viga ei põhjusta lahuse neeldumismaksimumile suuremat määramatust kui 0.001 AU.

FAAS meetodi korral uuriti soolhappe lahuse lisatud koguse mõju lahuse neelduvusele. Selleks varieeriti 1.0 mg/l raud(II)standardlahuse juures lisatavat soolhappe kogust.

Joonis 8. Soolhappelahuse mõju uurimine



Joonise 8 põhjal saab järeldada, kui lisada kalibreerimislahusele soolhapet (1:1) vahemikus 0.25 – 1.0 ml, jääb lahuse neelduvus praktiliselt samaks. Seega ei saa töös

kasutatud soolhappe (1:1) koguse (1 ml) pipeteerimisel tehtav viga põhjustada neelduvusele suuremat määramatust 0.001 AU.

Nii UV-Vis kui ka FAAS meetodi korral on tulemuse efektiivne vabadusastmete arv küllaltki väike: vastavalt 6.5 ja 10.6. UV-Vis meetodi korral on selle olulisimaks mittelineaarsuse määramisel tehtud eksperimentide arv. FAAS meetodi korral mittelineaarsuse ja triivi määramiseks tehtud eksperimentide arv. FAAS meetodi kõrgem vabadusastmete arv ongi tingitud sellest, et määramatuse koondis on kaks domineerivat sisendsuurust, samas, kui UV-Vis meetodi korral on üks domineeriv sisendsuurus. Tabelist 4 on näha, et jaotuse mitternormaalsuse mitteamistamine ning katteteguri väärtuse 2 kasutamine viiks määramatuse alahindamisele 20% ja 13% võrra, vastavalt UV-Vis ja FAAS meetodi korral. FAAS meetodi korral võib seda alahindamist lugeda mitte eriti oluliseks, kuid UV-Vis meetodi korral oleks see märgatav määramatuse alahindamine.

5.3 UV-Vis ja FAAS meetodite määramatuse koondite analüüs

Kuna mõlemad meetodid on neeldumisspektroskoopia meetodid, siis on nende matemaatilised mudelid ja määramatuse allikad sarnased. Määramatuse allikate suhtelised kaalud ja neid allikaid põhjustavad peamised faktorid on aga kohati tuntavalt erinevad.

Mõlema meetodi korral on olulisimaks neelduvuse mõõtmisega seotud määramatuse allikaks kalibreerimisgraafiku mittelineaarsus. Selle põhjuseks UV-Vis fotomeetria korral on peamiselt hajuskiirgus [4]. FAAS meetodi korral on see põhjus väheoluline, sest vastavalt seadme optilisele skeemile asub monokromaator peale leeki ja elimineerib hajuskiirguse väga efektiivselt. Olulisimaks mittelineaarsuse põhjuseks FAAS meetodi korral leegi omakiirgus [5]. See efekt muutub seda olulisemaks, mida kõrgem on neelduvus (st mida madalam on kiirguse intensiivsus, mis detektorisse jõuab). Selline seaduspärasus viitab vajadusele töötada FAAS meetodi korral küllaltki madalate neelduvuste piirkonnas, mida on käesolevas töös ka tehtud. Oluliselt madalamate neelduvustega kui käesolevas töös töötada võimalik ei ole, sest siis tõusevad oluliselt neelduvuse triivi ja korduvuse panused määramatusse.

Nii neelduvuse triivi kui ka korduvuse seisukohalt on UV-Vis fotomeetria oluliselt stabiilsem meetod kui FAAS. Seda illustreerivad ilmekalt triivi panused joonistel 3 ja 4. Samas on UV-Vis fotomeetria korral reeglina keerukam ja rohkem määramatuse allikaid sisaldav proovi ettevalmistamise meetod: fotomeetrisest reaktsioonist ja potentsiaalsetest segajatest tulenev määramatus on sageli olulisim määramatuse komponent UV-Vis fotomeetria juures [4]. See koos kõrgema töömahuga on üks FAAS meetodi populaarsuse põhjusi. Käesolevas töös, kus tegemist on suhteliselt lihtsa maatriksiga, ei ole nimetatud määramatuse allikad siiski domineerivad.

Kalibreerimislahuste neelduvusest tingitud määramatuse panus on mõlema meetodi korral väike. See on põhjustatud nelja kalibreerimislahuse neelduvuse tõhusast “keskmistumisest” ja eriti asjaolust, et kaks olulist määramatuse allikat – kalibreerimisgraafiku mittelineaarsus ja triiv – on võetud arvesse proovilahuse neelduvuse määramatusesse.

6 Kokkuvõte

Käesoleva töö eesmärgiks oli luua matemaatilisel mudelil baseeruv protseduur tulemuste mõõtemääramatuse hindamiseks kahe erineva analüüsi juures – UV-Vis fotomeetria ja leek-aatomabsorptsioon spektromeetria ja võrrelda meetodeid määramatuse allikate seisukohast.

Konkreetsena rakendati protseduuri raua sisalduse määramiseks farmatseutilises preparaadis. Mudeli abil analüüsiti loodud protseduuri kasutades erinevate määramatuse allikate panust mõõtetulemuse määramatusesse ning erinevate allikate suhtelise panuse ja mõõtetulemuse summaarse määramatuse sõltuvust kasutatavast mõõtemetodist.

Töös leiti, et mõlemad meetodid on raua jaoks selektiivsed, segavaid mõjusid teiste maatriksikomponentide tõttu ei leitud. UV-Vis ja FAAS meetodiga saadi raua sisalduseks tabletis vastavalt (11.4 ± 0.5) mg ja (11.9 ± 0.8) mg (ligikaudu 95% usaldatavustasemega). Mõlema meetodi korral osutus suurimaks määramatuse allikaks kalibratsioonifunktsiooni mittelineaarsusest tulenev määramatus (0.32 ja 0.46 mg või 41% ja 31% standardmääramatusest vastavalt UV-Vis ja FAAS analüüsi jaoks). Sellise tulemuse põhjal on mittelineaarsusest tingitud määramatuse arvesse võtmine mõõtemääramatuse hindamise juures põhjendatud isegi UV-Vis meetodi jaoks, mida peetakse üldiselt kõrge lineaarsusega meetodiks. Mittelineaarsuse panusele järgneb FAAS meetodi korral instrumendi triivist ja UV-Vis analüüsi korral proovi lahuste ruumalade mõõtmisest põhjustatud määramatus. Pipeteermisoperatsioonid moodustavad tulemuse määramatusest UV-Vis fotomeetrilise ja FAAS analüüsi korral vastavalt 31 % ja 20%, mis on veidi suurem kui enamasti eeldatakse. Massi mõõtmisest ja mõõtkolbide ruumaladest tulenev määramatus on tühine.

7 Summary

UV-Vis Spectrophotometric (UV-Vis) and flame atomic absorption spectrometric (FAAS) analysis for iron determination in a pharmaceutical product were compared in terms of uncertainty budgets. Uncertainty estimation was carried out based on mathematical models of the analysis procedures using the ISO GUM method. Both methods are selective for iron, no interference due to other components present in the matrix was found. The results for UV-Vis and FAAS method were (11.4 ± 0.5) mg and (11.9 ± 0.8) mg of iron per tablet (at 95% confidence level). In both methods the main uncertainty contributor is the uncertainty due to calibration function nonlinearity (0.32 and 0.46 mg or 41% and 31% of the standard uncertainty in the case of UV-Vis and FAAS, respectively). This finding encourages to take uncertainty due to nonlinearity into account in uncertainty estimation even for highly linear methods like UV-Vis. Nonlinearity is followed by instrument drift in the FAAS method and uncertainty of volumetric measurements in UV-Vis. In particular, pipetting contributes about 31 % of the uncertainty for UV-Vis spectrometry and 20% for FAAS, which is somewhat larger than usually assumed. The uncertainty contributions of the two methods are compared and discussed in terms of experimental conditions.

8 Kasutatud kirjandus

1. R. Laaneotsa, O. Mathiesen, Mõõtmise alused, TTÜ Kirjastus, 2002.
2. I. Leito, A. Viitak, Kvaliteeditagamise analüütilises keemias, TTÜ Kirjastus, 2007.
3. V. Vabson, Mõõtemääramatuse väljendamise juhend, Riigi Metroloogiakeskus, Tartu, 1996.
4. L. Sooväli, E. I. Rõõm, A. Kütt, I. Kaljurand, I. Leito, Uncertainty sources in UV-Vis spectrophotometric measurement. *Accred. Qual. Assur.* 11 (2006) 246.
5. Y. Hirano, K. Imai, K. Yasuda, Uncertainty of atomic absorption spectrometer. *Accred. Qual. Assur.* 10 (2005) 190.
6. Mõõtemääramatuse väljendamine kalibreerimisel, Juhend-dokument EA-4/02: http://www.eak.ee/dokumendid/pdf/EA4_02_total_270103.pdf endine 41
7. E.-M. Tiit, M. Möls, Rakendusstatistika algkursus, Tartu, 1997, lk. 32-33.
8. S. L. R. Ellison, M. Rosslein, A. Williams, Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, 2nd ed., EURACHEM/CITAC, 2000.
9. M. Zilmer, E. Karelson, T. Vihalemm, Meditsiiniline biokeemia I, Tartu, 1996, lk. 4-26, 250-283.
10. V. Tohver, Üldine biokeemia, Tallinn: Valgus, 1977, lk. 164-173.
11. A. L. Lehninger, D. L. Nelson, M. M. Cox, Principles of Biochemistry, 2nd ed., New York, 1993, pp. 545-547.
12. W. Kaim, B. Schwederski, Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life, Wiley, Chichester, 1994, pp. 556-562.
13. M. Zilmer, E. Karelson, T. Vihalemm, Meditsiiniline biokeemia II, Tartu, 1999, lk. 26-31, 254-269.
14. M. T. Ahmet, C. S. Frampton, J. Silver, A Potential Iron Pharmaceutical Composition for the Treatment of Iron-deficiency Anaemia. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* (1988) 1159.
15. B. Elvers, S. Hawkins, M. Ravenscroft, G. Schulz, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, VCH, Germany, 1989, pp. 591-603.

16. L. Paama, H. Kokk, P. Burk, T. Tõnutare, J. Pentšuk, V. Mäemets, M.-L. Allsalu, H. Kuus, Laboratoorseid töid analüütilise keemia praktikumiks, Tartu, 1992, lk. 3-13.
17. G. D. Christian, Analytical Chemistry, 6th ed., Wiley, Washington, 2004, pp. 474-479.
18. Z. O. Tesfaldet, J. F. van Staden, R. I. Stefan, Sequential injection spectrophotometric determination of iron as Fe(II) in multi-vitamin preparations using 1,10-phenanthroline as complexing agent. *Talanta* 64 (2004) 1189.
19. K. S. Rugani, F. S. Semaan, P. O. Luccas, E. R. Pereira-Filho, Optimization of sample preparation using statistical methods: spectrophotometric determination of Fe and Co in pharmaceutical samples. *Microchem. J.* 78 (2004) 187.
20. A. F. Oliveira, J. A. Nóbrega, O. Fatibello-Filho, Asynchronous merging zones system: spectrophotometric determination of Fe(II) and Fe(III) in pharmaceutical products. *Talanta* 49 (1999) 505.
21. J. Traks, Fotomeetrilise analüüsi modelleerimine ning tulemuse määramatuse ja analüüsi tingimuste vahelise seose uurimine, Magistritöö, Tartu, 2004.
22. D. G. Karamanov, L. N. Nikolov, V. Mamatarkova, Rapid simultaneous quantitative determination of ferric and ferrous ions in drainage waters and similar solutions. *Minerals Engineering* 15 (2002) 341.
23. M. Kass, A. Ivaska, Spectrophotometric determination of iron (III) and total iron by sequential injection analysis technique. *Talanta* 58 (2002) 1131.
24. J. F. van Staden, H. du Plessis, R. E. Taljaard, Determination of iron(III) in pharmaceutical samples using dialysis in a sequential injection analysis system. *Anal. Chim. Acta* 357 (1997) 141.
25. J. Karpińska, M. Kulikowska, Simultaneous determination of zinc(II), manganese(II) and iron(II) in pharmaceutical preparations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 29 (2002) 153.
26. S. Oszwaldowski, A. Pikus, Reversed-phase liquid chromatographic simultaneous determination of iron(III) and iron(II) as complexes with 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol. *Talanta* 58 (2002) 773.

27. K. Sözgen, E. Tütem, Second derivative spectrophotometric method for simultaneous determination of cobalt, nickel and iron using 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol. *Talanta* 62 (2004) 971.
28. M. G. Gioia, A. M. Di Pietra, R. Gatti, Validation of a spectrophotometric method for the determination of iron (III) impurities in dosage forms. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 29 (2002) 1159.
29. T. N. K. Kumar, H. D. Revanasiddappa, Rapid and sensitive spectrophotometric determination of trace amounts of iron(III) using leuco Xylene cyanol FF. *Anal. Bioanal. Chem.* 376 (2003) 1126.
30. D. C. Harris, *Quantitative Chemical Analysis*, 4th ed., New York, 1995, pp. 57-66, 131-138.
31. D. Florian, G. Knapp, High-Temperature, Microwave-Assisted UV Digestion: A Promising Sample Preparation Technique for Trace Element Analysis. *Anal. Chem.* 73 (2001) 1515.
32. L. H. J. Lajunen, *Spectrochemical Analysis by Atomic Absorption and emission*, Cambridge, UK, 1992, p. 241.
33. R. Ramachandran, Rashmi, Uncertainty of measurement in spectrophotometric analysis: A case study. *Analyst* 124 (1999) 1099.
34. A. Drolc, M. Roš, Evaluation of measurement uncertainty in the determination of total phosphorus using standardized spectrometric method ISO 6878. *Acta Chim. Slov.* 49 (2002) 409.
35. J. Traks, L. Sooväli, I. Leito, Uncertainty in photometric analysis: a case study. *Accred. Qual. Assur.* 10 (2005) 197.
36. C. Vandecasteele, C. B. Block, *Modern methods for trace element determination*, England, 1993, pp. 101-173.
37. E. Canfranc, A. Abarca, I. Sierra, M. L. Marina, Determination of iron and molybdenum in a dietetic preparation by flame AAS after dry ashing. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25 (2001) 103.
38. M. E. R. Huguet, Monitoring of Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb and Zn in Fine Uruguayan Wines by Atomic Absorption Spectroscopy. *At. Spectrosc.* 25 (2004) 177.
39. K. A. Riganakos, P. G. Veltsistas, Comparative spectrophotometric determination of the total iron content in various white and red Greek wines. *Food Chemistry* 82 (2003) 637.

40. S.-W. Chung, W.-C. Tsai, Determination of iron and tin in canned foods by atomic absorption spectrometry. *At. Spectrosc.* 12 (1991) 59.
41. V. Synek, P. Subrt, J. Marecek, Uncertainties of mercury determinations in biological materials using an atomic absorption spectrometer – AMA 254. *Accred. Qual. Assur.* 5 (2000) 58.
42. G. Stringari, I. Pancheri, F. Möller, O. Failla, Influence of two grinding methods on the uncertainty of determinations of heavy metals in atomic absorption spectrometry/electrothermal atomisation of plant samples. *Accred. Qual. Assur.* 3 (1998) 122.
43. R. J. N. Bettencourt da Silva, M. F. G. F. C. Camões, J. Seabra e Barros, Validation of the uncertainty evaluation for the determination of metals in solid samples by atomic spectrometry. *Accred. Qual. Assur.* 3 (1998) 155.
44. U. Kurfürst, A. Desaulles, A. Rehnert, H. Muntau, Estimation of measurement uncertainty by the budget approach for heavy metal content in soils under different land use. *Accred. Qual. Assur.* 9 (2004) 64.
45. J. Kristiansen, J. M. Christensen, J. L. Nielsen, Uncertainty of atomic absorption spectrometry: Application to the determination of lead in blood. *Mikrochim. Acta* 123 (1996) 241.
46. J. F. van Staden, E. B. Naidoo, Determination of total iron as Fe(II) in multivitamins, haematinics and natural waters using a sequential injection (SIA) system. *S. Afr. J. Chem.* 53 (2000) 191.
47. S. Leito, K. Mölder, A. Künnapas, K. Herodes, I. Leito, Uncertainty in liquid chromatographic analysis of pharmaceutical product: Influence of various uncertainty sources. *J. Chromatogr. A* 1121 (2006) 55.
48. E. Koort, P. Gans, K. Herodes, V. Pihl, I. Leito, Acidity constants in different media (I=0 and I=0.1 M KCl) from the uncertainty perspective. *Anal. Bioanal. Chem.* 385 (2006) 1124.
49. Examples of ISO GUM Uncertainty Budgets for Chemical Analysis
http://www.ut.ee/katsekoda/GUM_examples/ viimati uuendatud 24.jaan. 2007
50. J. Kragten, Calculating standard deviations and confidence intervals with universally applicable spreadsheet technique. *The Analyst* 119 (1994) 2161.

9 Lisad

Lisa 1

Ajakirja *Accreditation and Quality Assurance* avaldamiseks esitatud artikli käsikiri.

Uncertainty of UV-Vis spectrophotometric and FAAS analysis for determination of iron in pharmaceutical product

Jaana Jürgens, Lilli Paama, Ivo Leito^{*}

Institute of Chemical Physics, University of Tartu, Jakobi 2, 51014 Tartu, Estonia

1. Abstract

UV-Vis Spectrophotometric (UV-Vis) and flame atomic absorption spectrometric (FAAS) analysis for iron determination in a pharmaceutical product were compared in terms of uncertainty budgets. Both methods are selective for iron, no interference due to other components present in the matrix was found. The results for UV-Vis and FAAS method were (11.4 ± 0.5) mg and (11.9 ± 0.8) mg of iron per tablet (at 95% confidence level). In both methods the main uncertainty contributor is the uncertainty due to calibration function nonlinearity (0.32 and 0.46 mg or 42% and 31% of the standard uncertainty in the case of UV-Vis and FAAS, respectively). This finding encourages to take uncertainty due to nonlinearity into account in uncertainty estimation even for highly linear methods like UV-Vis. Nonlinearity is followed by instrument drift in the FAAS method and uncertainty of volumetric measurements in UV-Vis. In particular, pipetting contributes about 16 % of the uncertainty for UV-Vis spectrometry and 10% for FAAS, which is somewhat larger than usually assumed. The uncertainty contributions of the two methods are compared and discussed in terms of experimental conditions.

Keywords: Uncertainty; ISO GUM; UV-Vis Spectrophotometry; FAAS; Iron

^{*} Corresponding author: e-mail: Ivo.Leito@ut.ee, Tel.: +372 7 375 259, Fax: +372 7 375 264
Electronic Supplemental Material for this article is available at <http://www.springeronline.com/>

1. Introduction

Iron is an important transition metal in biological systems. Sufficient iron in the diet of humans and animals is essential for tissue growth. Iron is found at the active site of many important proteins in the human body [1-3]. For example some of the most important proteins in an adult human - haemoglobin (oxygen transport in blood), myoglobin (oxygen storage in muscle), cytochrome c oxidase (converts oxygen to water) – contain iron in the active centre [1-3]. Although a formally sufficient amount of iron can be found in the diet, the level of absorption of this element from food is generally low. Because of that there are many different iron-containing pharmaceutical formulations and food additives available and reliable quantitative determination of iron in these products is very important.

Iron can be determined using different methods. The two most common methods are UV-Vis spectrophotometry [4-13] and atomic absorption spectrometry (AAS) [14-16]. UV-Vis spectrophotometry is a simple and inexpensive method for determination of elements in a variety of samples. In spectrophotometric analysis different photometric reagents are used for determination of iron: 1,10-phenanthroline (yielding an orange-red colour complex with iron) [4-6], tiron (blue-coloured complex) [7, 8], azo reagents (PAR, 5-Br-PADAP) [9-11], thioglycolic acid (red-purple complex) [12], leuco Xylene cyanol FF (blue form) [13]. In this work 1,10-phenanthroline is used as the photometric reagent. Atomic absorption spectrometry (AAS) is probably the most used technique for determination of metals in different samples. FAAS is used when the concentration of the analyte is high enough and the volume of the sample solution is at least some millilitres. Graphite furnace (GFAAS) is used when the concentration of the analyte is low or available sample size is in microlitres. The

advantages of GFAAS are lower detection limits and the possibility to analyze solid samples while FAAS is a cheaper method and has better precision and linearity [14-17]. The analytical task of this work is fully compatible with FAAS, so FAAS is used.

There are different ways of sample preparation for metal determination. Dry ashing, wet digestion with mineral acid (HCl, HNO₃) and microwave-assisted digestion are the most commonly used [4-6,8,14]. Dry ashing is a good method for removing organic material from the sample, but it is quite time-consuming and not useful for determination of volatile elements (Hg, As, Pb, Sb, Se, Cd) [18]. Microwave-assisted digestion, although an expensive method, is increasingly used in analytical chemistry. The advantage of this method is its applicability to matrices that are difficult to digest and low risk of contamination [19-21]. Wet digestion has perhaps the optimum combination of simplicity and reliability for samples with an easy-to-digest matrix. Pharmaceutical samples belong to that kind of samples and wet digestion is therefore used in this work.

Uncertainty estimate of a result of chemical analysis is an important part of the result [22, 23]. Correctly estimated uncertainty serves as the quantitative measure of reliability of the result. Uncertainty sources in photometric analysis have recently been thoroughly reviewed [24]. In that work clear distinction was made between two families of uncertainty sources according to their origin. To the first family belong the so-called intrinsic (or "physical") uncertainty sources - repeatability of spectrophotometer reading, spectrophotometer drift, etc – that originate from the instrument itself. To the second family belong the so-called "chemical" uncertainty sources that originate from the object under study (interferences from the constituents

of the matrix, decomposition of the photometric complex, etc). It was found that the chemical uncertainty sources usually outweigh the physical ones by their contribution to the overall uncertainty. Uncertainty sources that are intrinsic to a flame AA spectrometer have been carefully studied by Hirano et al. [25]. There have also been studies on uncertainty estimation of results of particular analysis tasks both with UV-Vis spectrophotometry [26-28] and AAS [29-33]. The papers devoted to AAS analysis almost exclusively deal with electrothermal AAS. The tasks are e.g. determination of trace metals in plant samples [29-31], soil [32] or blood [33]. At the same time there are to the best of our knowledge no studies available on the uncertainty estimation of FAAS analysis. The different atomization principle makes electrothermal AAS and FAAS rather different methods from uncertainty point of view. Thus, in spite of the works outlined above the number and especially the variety of case studies on uncertainty estimation of chemical analysis results continues to be scarce.

The goal of this work is to present the uncertainty estimation procedure for determination of iron in a pharmaceutical formulation using two different methods – UV-Vis spectrophotometry and FAAS – and to compare the methods based on their uncertainty budgets. Such comparison is very useful in revealing the strengths and weaknesses of methods. Uncertainty calculation files are also presented together with the uncertainty budgets to enable interested reader to follow the calculations and to modify the calculations in order to adapt them to his/her particular measurement. Uncertainty estimation has been carried out using the modeling approach according to the ISO GUM [22] and the EURACHEM/CITAC guide [23].

2. Experimental

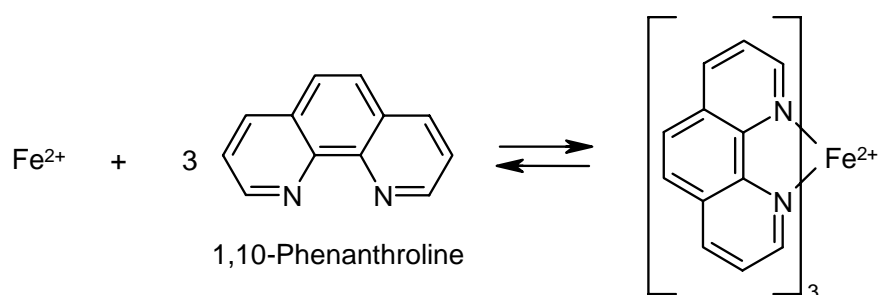
2.1. Instrumentation and measurement procedures

A KFK-2MP photometer (former Soviet Union production) was used for spectrophotometric analysis. It is a simple single-beam filter photometer. The cells used were 20-mm quartz cells (former Soviet Union production). All measurements were carried out at the filter setting of 540 nm (line width 40 nm at half height). A Perkin-Elmer AAS 2100 equipped with an air/acetylene burner was used for FAAS analysis. The instrumental settings of the FAAS are summarized in Table S1 in the Electronic Supplementary Material.

2.2. Chemicals and solutions

The stock solution I, containing 1000 mg l⁻¹ of iron, were prepared into 100 ml flask from the Mohr's salt (FeSO₄(NH₄)₂SO₂·6H₂O, min 99%, Sigma) and 0.5 ml hydrochloric acid (30%, Suprapur, Merck) to hinder the oxidation of Fe(II) to Fe(III). This solution was diluted as necessary to obtain stock solutions II and III containing 100 and 10 mg l⁻¹ of iron, respectively.

The determination of iron was carried out using reaction with 1,10-phenanthroline solution 0.25 % (m/m) as complexing agent.



Hydroquinone solution 1.0 % (m/m) was used for transferring Fe (III) to Fe(II). 1,10-phenanthroline and hydroquinone solutions were stored in amber bottles. Trisodium citrate solution 2.5 % (m/m) and hydrochloric acid (1:10) were used for adjusting pH

of the solutions. The complex is stable in a wide pH range 2–9 [34]. Thus it is not necessary to control the pH of the solutions exactly. Vitamin- and microelement-containing formulation Bio-Multi[®] (one tablet contained 10 mg Fe as stated on the label), produced by Pharma Nord ApS, was used as sample for Fe determination as sample. Bio-Multi[®] is a multivitamin with minerals. Further details are presented in Electronic Supplementary Material.

2.3. Sample preparation

Randomly selected twenty tablets from blisters were weighed, powdered and mixed. The sample solution was prepared from the amount powdered sample corresponding to one tablet. To ensure complete removal of iron from the matrix, the sample was dissolved in HCl (1:1) by heating during 15 minutes. The sample solution was filtered and diluted with deionized water to 250 ml. The sample solution was diluted 20 (for UV-Vis spectrophotometry) or 40 (for FAAS) times.

2.4. UV-Vis spectrophotometric measurement procedure

To the diluted sample solution the reagent solutions were added as follows: first trisodium citrate solution 2.5 % (m/m) were added, then hydroquinone solution 1.0 % (m/m) and finally 1,10-phenanthroline solution 0.25 % (m/m).

Iron working standard solutions for spectrophotometric analysis with concentrations ranging from 0 (blank) to 4 mg l⁻¹, were prepared in 50 ml volumetric flasks by diluting the appropriate amounts of the iron stock solution III with deionised water and adding the same reagent solutions, but iron working standard solutions need also hydrochloric acid (1:10) for obtain the same pH of the solutions as in sample solution. Formation of the orange-red colour of the complex needs some time. Therefore all sample and working standard solutions were left to stand for at least 10 minutes before measuring the absorbance. When the complex has formed then the colour of

the solution does not change during several months and it obeys the Beers law. The absorbance of the working standard solution and the sample solutions was measured at 540 nm.

2.5. AAS measurement procedure

Iron working standard solutions for FAAS analysis, ranging from 0 (blank) to 3 mg l⁻¹, were prepared by appropriate dilution of the iron stock solution III with water. 1 ml of hydrochloric acid (1:1) was added before water in order to achieve similar acidity as in the case of sample solutions.

Standard solutions and diluted sample solutions (see above) were introduced into the atomic absorption spectrometer via the conventional sample introduction system. The absorbances of the solutions were measured at 248.3 nm.

3. Derivation of the uncertainty estimation procedure

3.1 Measurand definition

Clear and unambiguous definition of measurand is vital for obtaining correct results. In a previous report from our laboratory [35] three different measurand definitions were presented and discussed. In this work we define the measurand as follows: the measurand is the mean mass of iron in the specified tablet sample that was actually analyzed (C_{Fe} , mg per tab). This corresponds to the definition No 1 in ref 35.

In the case of this definition only the uncertainty originating from the measurement method is included in the uncertainty budget and the iron content variation between the tablets cannot be considered a source of uncertainty. This definition is suitable for

our purpose – to compare the measurement methods that use samples derived from the same sample preparation procedure.

3.2 Defining the mathematical model

The concentration of iron stock solution (1000 mg l^{-1}) was found as follows:

$$C_{\text{Fe mg l}^{-1}} = \frac{m_{\text{M}} \cdot M_{\text{Fe}} \cdot P_{\text{M}} \cdot 1000}{M_{\text{M}} \cdot V_{100}}, \quad (1)$$

where m_{M} (g) is the mass of Mohr's salt, M_{Fe} (g mol^{-1}) is the molar mass of iron, P_{M} (unitless) is the purity of Mohr's salt, M_{M} (g mol^{-1}) is the molar mass of Mohr's salt and V_{100} (l) is the volume of 100 ml volumetric flask.

The absorbances of the iron working standard solutions C_1 - C_n (mg l^{-1}) were measured and the values obtained were A_1 - A_n (AU). Calibration line was constructed with the following equation:

$$A_i = b_0 + b_1 \cdot C_i, \quad (2)$$

where b_0 (AU) is the intercept of the calibration line and b_1 ($\text{AU} \cdot \text{l} \cdot \text{mg}^{-1}$) is the slope of the calibration line.

The iron content on the sample solution ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$) was found as follows:

$$C_{\text{sample}} = \frac{(A_{\text{sample}} - b_0)}{b_1} \quad (3)$$

The slope and intercept of the calibration line are found as follows:

$$b_0 = \frac{\bar{A} \cdot \sum_i C_i^2 - \bar{C} \cdot \sum_i C_i A_i}{\sum_i C_i^2 - n \cdot \bar{C}^2} \quad (4)$$

and

$$b_1 = \frac{\sum_i A_i C_i - n \cdot \bar{A} \cdot \bar{C}}{\sum_i C_i^2 - n \cdot \bar{C}^2}, \quad (5)$$

where C_i (mg l^{-1}) is the mass concentration of the iron working standard solutions, A_i (AU) is the absorbance of the solutions and n is the number of points on the line ($n=4$).

The mathematical model for iron content in the sample $C_{\text{Fe per tablet}}$ (expressed in mg per tablet) is found according to the following equation:

$$C_{\text{Fe per tablet}} = \frac{(A_{\text{sample}} - b_0) \cdot V_{50} \cdot V_{100} \cdot V_{250} \cdot m_{\text{tablet_average}}}{b_1 \cdot V_{\text{sample}} \cdot V_{25} \cdot m_{\text{sample}} \cdot 1000}, \quad (6)$$

where A_{sample} (AU) is the absorbance of the sample, b_0 (AU) is the intercept of the calibration line and b_1 ($\text{AU} \cdot \text{l} \cdot \text{mg}^{-1}$) is the slope of the calibration line, V_{50} (ml) is the volume of the 50-ml flask, V_{250} (ml) is the volume of the 250-ml flask, V_{100} (ml) is the volume of the 100-ml flask, V_{25} (ml) is the volume of 25-ml pipette, V_{sample} (ml) is the volume of sample solution from 100-ml flask to 50-ml flask, $m_{\text{tablet_average}}$ (g) is the average tablet mass and m_{sample} (g) is the mass of sample. 1000 (ml l^{-1}) is a unit conversion factor.

3.3 Identifying possible uncertainty sources

Both methods – UV-Vis spectrophotometry and FAAS have similar uncertainty sources.

Uncertainty of weighing includes the following sources: 1) repeatability uncertainty of weighing; 2) uncertainty caused by the drift of balance; 3) uncertainty caused by rounding of the reading of the balance. It has been pointed out [35] that electrostatic disturbances during weighing can be a very important (even heavily dominating) source of uncertainty. We did not experience appreciable electrostatic disturbances in

this work and we consider that all the balance reading "instability"-related uncertainty sources are taken into account by the repeatability and drift contributions. Air buoyancy is not taken into account here (densities of the sample and the standard substance are not too different and the resulting uncertainty is small) and the weights read from the balance are considered to be the masses. The nonlinearity of the balance calibration function is also an uncertainty source. However, when weighing masses in the order of a gram it can be left out of consideration, because in the case of narrow mass interval the calibration function of contemporary balances can be considered linear.

Purity of Mohr's salt (P_M). The purity of the standard substance is usually found from the certificate.

Volumes of the 250-ml flasks V_{250} , volumes of the 100-ml flasks V_{100} , volumes of the 50-ml flasks V_{50} . The uncertainty of the volumetric flasks includes the following sources: 1) calibration uncertainty of the flask volume; 2) uncertainty of filling the flask to the mark; 3) uncertainty of the volume caused by the temperature difference between the value used for the calibration of the flask and the ambient temperature of the laboratory.

Volume of the 25-ml pipette (V_{25}), 10-ml pipette (V_{10}); 5-ml pipette (V_5); 2-ml pipette (V_2) and 1-ml pipette (V_1). The uncertainty of the volume delivered by a pipette includes the following sources: 1) calibration uncertainty of the pipette; 2) repeatability of the volume delivered by the pipette; 3) uncertainty of the volume caused by the temperature difference between the value used for the calibration of the pipette and the ambient temperature in the laboratory.

Absorbance of the sample (calibration curve method) A_{sample} and absorbances of the standard solutions $A_1 - A_n$. Both methods are absorption spectrometric and thus

have in principle the same uncertainty sources. The uncertainty of the measured absorbance values includes the following sources: 1) repeatability; 2) drift; 3) nonlinearity of the calibration curve; 4) uncertainty caused by rounding of the digital reading and 5) some method-specific uncertainty sources [31, 32]. Below we will discuss the uncertainty sources that are relevant for this work.

Repeatability

Repeatability uncertainty is caused by a number of random effects. In UV-Vis spectrophotometry: repeatability of positioning the cell, possible temperature fluctuations, possible dust particles on cell walls and in the solutions. In FAAS: flickering of flame, fluctuations of pressures of the gases and sample flow into the flame. A factor present in both methods is the noise, which is related with baseline noise, fluctuations in lamp energy and log transformation. We did not estimate these sources individually. Instead overall repeatability contributions were estimated.

Drift

Drift (baseline drift, drift of lamp intensity) is a systematic effect that is related to changing of the instrument parameters between calibration and measurement of the samples. In principle drift should be corrected for but this is in most cases impractical in routine analysis and therefore we take it into account as an uncertainty contribution.

Nonlinearity of the calibration curve

Nonlinearity is also a systematic effect. It has a number of sources (stray light, optics and/or electronics, wavelength selection, etc). In this work we did not attempt to find the specific causes of nonlinearity of the calibration curves. Instead the nonlinearity contribution was estimated from residuals analysis.

Uncertainty sources from the specific properties of the procedures

Especially UV-Vis Spectrophotometry but also FAAS involves addition of a number of solutions to the sample and calibration solutions. Uncertainty, arising from the timing of adding these solutions and the exact amounts of solutions to all calibration solutions and to sample solution was estimated.

The uncertainty for the absorbance of a sample solution can according to ref 32 also involve the following sources: uncertainty due to interference from other sample components, uncertainty due to the mismatch between the state of the analyte in calibration solutions and in samples and uncertainty due to the chemical drift. These sources of uncertainty have been eliminated in this work as follows: the composition of the pharmaceutical preparation is sufficiently well defined and from this information it is known that there are no interfering elements or organic compounds; the oxidation state II for iron is ensured by the addition hydroquinone; the complex of Fe(II) with 1,10-Phenanthroline is stable for long time.

Recovery. Iron is present in pharmaceutical in a readily soluble form [1, 36]. In the preparation studied in this work iron is present as iron(II)glyconate. This form of iron is readily soluble under our experimental conditions and thus 100% recovery is expected. Furthermore, since the primary aim of this work is to compare the uncertainty budgets of two methods that include the same sample preparation step, the recovery issue is not critical.

4. Application example, quantifying the uncertainty components, calculating the combined uncertainty

Detailed information on quantification of the uncertainty is presented in the calculation files in Electronic Supplementary Material.

Balance. A Mettler Toledo B154 – S balance was used. The repeatability data were taken from the balance manual: $u(m, \text{rep}) = 0.1\text{mg} = 0.0001\text{g}$. The drift of the balance was estimated from long-term experience from our laboratory with this balance: $u(m, \text{drift}) = 0.0001\text{g}$. The digital display of the balance has four decimal places, hence the uncertainty caused by rounding of the digital reading is: $u(m, \text{round}) = 0.00005/\sqrt{3}$

The equation of the uncertainty of the weight is as follows:

$$u(m) = \sqrt{u(m, \text{rep})^2 + u(m, \text{drift})^2 + u(m, \text{round})^2} . \quad (7)$$

$$u(m) = \sqrt{0.0001^2 + 0.0001^2 + 0.000029^2} = 0.000144 \text{ g}.$$

Purity of Mohr's salt (P_M). The purity of Mohr's salt was according to information from the producer "min 99%". This kind of purity specification is difficult to interpret in terms of uncertainty. We assume that the purity was rectangularly distributed between 99 and 100%. This means that we estimate the value of purity as $P_M = 0.995$ and its standard uncertainty as follows: $u(P_M) = 0.005/\sqrt{3}$.

Volumetric flasks. The uncertainty sources identified above are quantified as follows:

1) The flasks were not calibrated in the laboratory. The data provided by the manufactures on the tolerances of the flasks were used as estimates of the calibration uncertainty of the flasks: 50-ml flask: $\pm 0.09 \text{ ml}$; 100-ml flask: $\pm 0.15 \text{ ml}$; 250-ml flask: $\pm 0.15 \text{ ml}$.

2) If a volumetric flask is filled drop by drop, then the uncertainty of filling the flask is not more than ± 3 drops. This conservative estimate takes also into account possible droplets on the neck of the flask. An estimate of 0.03 ml for the volume of a water drop was used. Thus, the standard uncertainty of filling the flask is $u(V_{\text{flask, fill}}) = 0.09/\sqrt{3} = 0.052$ ml.

3) The ambient temperature in the laboratory was on an average 20 ± 2 °C, that is $\Delta t = 2$ °C. The thermal expansion coefficient of water is $\gamma = 2.1 \cdot 10^{-4}$ °C⁻¹. The standard uncertainty caused by temperature effect is as follows: $u(V_{\text{flask, temp}}) = V_{\text{flask}} \cdot \gamma \cdot \Delta t / \sqrt{3}$

The uncertainty of the volume of a volumetric flask is found as follows:

$$u(V_{\text{flask}}) = \sqrt{u(V_{\text{flask, cal}})^2 + u(V_{\text{flask, fill}})^2 + u(V_{\text{flask, temp}})^2} \quad (8)$$

The uncertainties of volumes of the particular flasks are the following: $u(V_{50}) = 0.0745$ ml, $u(V_{100}) = 0.1039$ ml, $u(V_{250}) = 0.1178$ ml.

Pipettes. 1) The calibration uncertainties of the pipettes were estimated from the manufacturer-provided tolerances of the pipette volumes: 1-ml graduated pipette: ± 0.01 ml; 2-ml graduated pipette: ± 0.015 ml; 5-ml bulb pipette: ± 0.010 ml; 10-ml bulb pipette: ± 0.03 ml; 25-ml bulb pipette: ± 0.03 ml.

2) We have found that a conservative estimate for repeatability standard uncertainty of a medium volume (that is not below 1 ml and not above 25 ml) pipette is 0.4% of the volume of pipette, which we use in this work. The rationale for this is the following.

In the course of this work we experienced that it is not easy to correctly determine the repeatability of pipetting, because it depends on heavily on the cleanliness of the pipette and also on the stiffness of the rubber bulb used to fill the pipette. Even after washing pipette with cleaning mixture, its cleanness is still different from day to day. For example experiments on different days with a 1 ml pipette demonstrated that the

relative standard deviation (RSD) of the delivered volume (ten replicates) differs up to three times. Estimation of pipetting repeatability from single-day experiments is therefore complicated. Furthermore, the standard deviation from a limited amount of data has itself a large uncertainty.

3) The uncertainty of pipetted volume due to temperature was found in a similar way to that of the volumetric flask.

The uncertainty of the volume of a pipette is:

$$u(V_{\text{pipette}}) = \sqrt{u(V_{\text{pipette}}, \text{cal})^2 + u(V_{\text{pipette}}, \text{rep})^2 + u(V_{\text{pipette}}, \text{temp})^2} \quad (9)$$

$u(V_1) = 0.0070$ ml, $u(V_2) = 0.0118$ ml, $u(V_5) = 0.0209$ ml, $u(V_{10}) = 0.0437$ ml, $u(V_{25}) = 0.1017$ ml.

Absorbance of the solutions. As discussed above we take into account the following uncertainty sources:

1) Repeatability. The most common way of quantitatively expressing repeatability is via the repeatability standard deviation [24], which was also used in this work. The standard deviations of sample solution absorbance were 0.00045 AU for UV-Vis spectrophotometry and 0.00055 AU for FAAS. The respective standard uncertainties (five replicates) were 0.00020 and 0.00024 AU.

2) The possible drift of both spectrometers was estimated from long-term experience from our laboratory. For UV-Vis spectrophotometry $u(A, \text{drift}) = 0.0015$ AU, for FAAS $u(A, \text{drift}) = 0.0018$ AU.

3) Non-linearity. Slight curvature of the calibration graphs is observed with both methods. We have used the approach based on residual analysis at our laboratory, which is applicable to both intrinsic and chemical non-linearity [24]. The uncertainty contribution to absorbance due to non-linearity is assumed as being “not more than” the absolute value of the largest residual. We analyzed both instrumental methods

individually and the largest residual is 0.007 AU for UV-Vis spectrophotometric and 0.002 AU for FAAS analysis (see Electronic Supplementary Material for more information). Thus the respective standard uncertainties have been estimated as 0.0040 and 0.0012 AU.

4) The digital display of the apparatus has three decimal places, hence the uncertainty caused by rounding of the digital reading is: $u(A, \text{round}) = 0.0005/\sqrt{3}$

5) Uncertainty sources specific to the measurement procedure. It was investigated how much the results depend on the exact amount and timing of adding the reagents by slightly varying the amounts and timing. It was found that under the normal working conditions in the case of UV-Vis spectrophotometry the uncertainty introduced by pipetting 1,10-phenanthroline, hydroquinone, trisodium citrate solutions and in the case of FAAS uncertainty arising from pipetting of hydrochloric acid solution is never higher than 0.001 AU. Thus these four uncertainty sources $u(A, \text{Phen})$, $u(A, \text{Hydroq})$, $u(A, \text{Na-citr})$, $u(A, \text{HCl})$ have been estimated as $0.001/\sqrt{3} = 0.00058$ AU.

The general equation of the uncertainty of absorbance values of the sample solutions for UV-Vis and FAAS method is given by equations 10 and 11, respectively.

$$u(A_{\text{sample}}) = \sqrt{u(A, \text{drift})^2 + u(A, \text{rep})^2 + u(A, \text{nonlin})^2 + u(A, \text{round})^2 + u(A, \text{Phen})^2 + u(A, \text{Hydroq})^2 + u(A, \text{Na-citr})^2} \quad (10)$$

$$u(A_{\text{sample}}) = \sqrt{u(A, \text{drift})^2 + u(A, \text{rep})^2 + u(A, \text{nonlin})^2 + u(A, \text{round})^2 + u(A, \text{HCl})^2} \quad (11)$$

Most of the effects taken into account by equations 10 and 11 are relevant to sample solutions only. The standard uncertainty of the absorbance of the calibration solutions takes into account only uncertainty due to repeatability and rounding and is expressed as follows:

$$u(A_{\text{sample}}) = \sqrt{u(A, \text{rep})^2 + u(A, \text{round})^2} \quad (12)$$

Finding the combined and expanded uncertainty. The calculations were carried out with the MS Excel package using the Kragten approach [37] for approximating the partial derivatives. The effective number of degrees of freedom was found according to the Welch-Satterthwaite approach [22] and was 6.5 and 10.6 for the UV-Vis and FAAS method, respectively. The detailed calculation of combined uncertainty for both methods is presented in the Electronic Supplementary Material.

5. Results and discussion

The results of iron content measurement by UV-Vis spectrophotometry and FAAS are presented in Table 1.

Table 1. Iron content (mg per tablet) and expanded uncertainty (at 95% confidence level) in the sample.

Method	Result	Expanded uncertainty	Coverage factor
UV-Vis Spectrometry	11.4	0.5	2.5
FAAS	11.9	0.8	2.3

The uncertainty budgets are presented in Figures 1 and 2. Detailed information on the calculations and on the budgets is found in the Electronic Supplementary Material.

Fig. 1. Uncertainty contributions of different uncertainty components for UV-Vis spectrophotometric analysis.

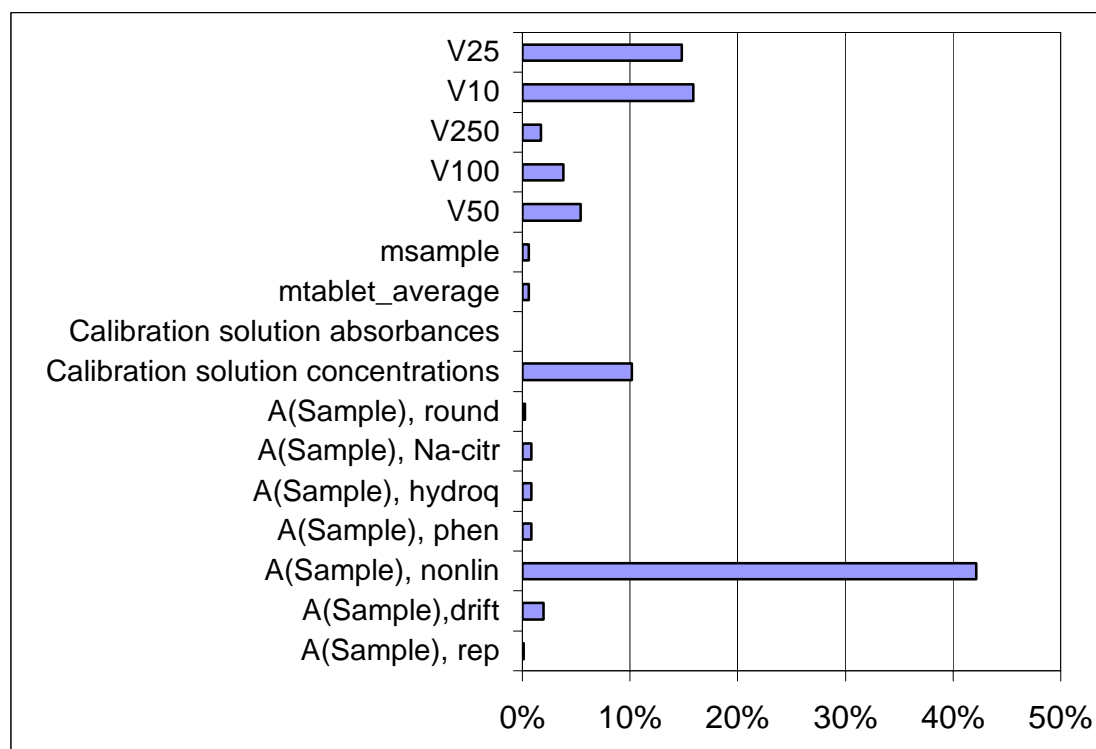
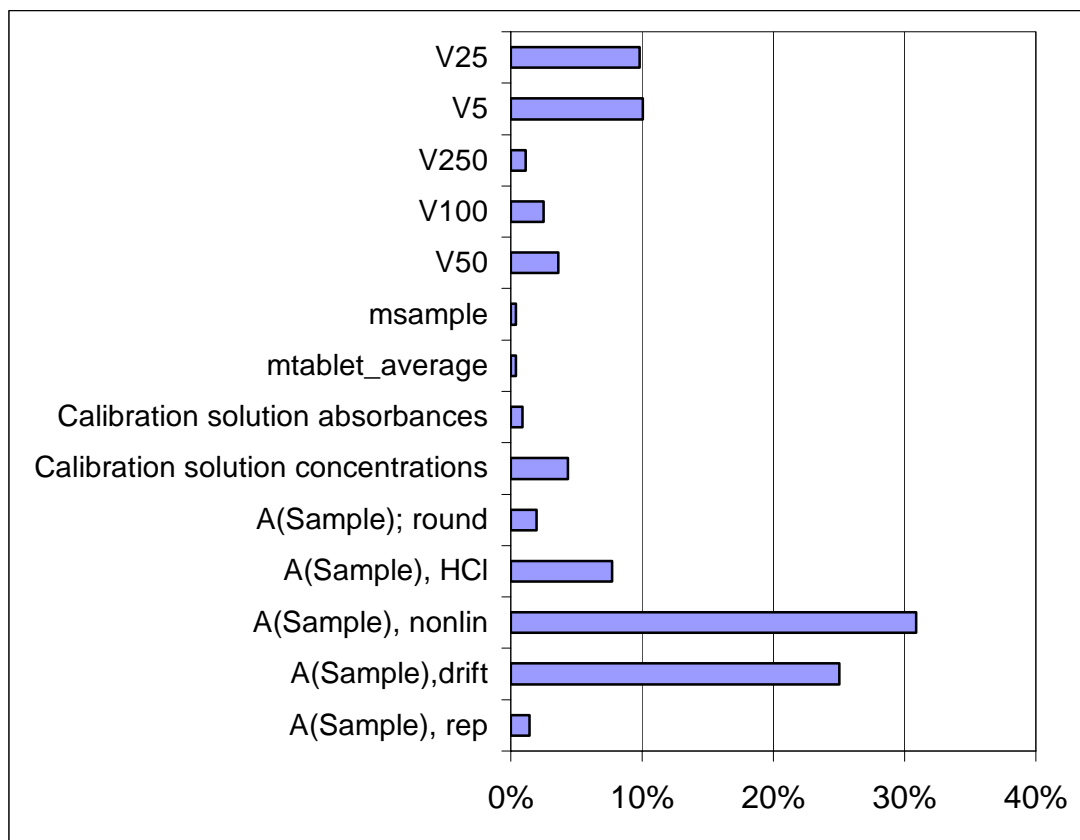


Fig. 2 Uncertainty contributions of different uncertainty components for FAAS analysis.



The UV-Vis spectrophotometric method gave slightly lower iron content than FAAS but the difference is well within the uncertainty ranges (the E_n score between the two results is 0.50).

From the uncertainty budgets it is evident that the uncertainty components from weighing were the smallest. The volumes of volumetric flasks have also a small influence on the uncertainty of the result. Contrary to that, pipette volumes do have an effect. The uncertainty coming jointly from all pipetting operations gives more than 20 percent of the combined uncertainty of the FAAS method and more than 30% of

the uncertainty of the UV-Vis spectrophotometric method. The relatively large contribution of pipetting is due to the many pipetting operations involved and the conservative estimates of pipetting repeatability uncertainty (see quantification section for details).

The joint uncertainty contribution of pipetting operations related to calibration solution preparation is included into the contribution of calibration solution concentrations and it forms the main part of the uncertainty contribution of calibration in both methods. Compared to the other uncertainty sources the uncertainty due to the calibration solution concentrations is small: 10% and 4% in the case of UV-Vis spectrophotometry and FAAS, respectively.

The main uncertainty contribution with both methods comes from the absorbance measurement of the sample solution (A_{sample}). Its contribution is 47% for spectrophotometry and 67% for FAAS. A_{sample} in turn has several uncertainty components. In both methods the main uncertainty contributor is the uncertainty due to calibration graph nonlinearity (42% and 31% of the uncertainty in the case of UV-Vis and FAAS, respectively), which in our approach has been included into the uncertainty of the sample solution absorbance (see ref 24 for details). The large contribution of nonlinearity uncertainty is at variance with the frequent practice of leaving uncertainty due to nonlinearity out of consideration in uncertainty estimation and calls for caution in doing this even for highly linear methods like UV-Vis spectrophotometry. It may seem unexpected that this contribution in the case of UV-Vis spectrophotometry, which is usually more linear method of the two, not only has higher contribution but has also higher absolute value in terms of standard uncertainty of absorbance: 0.0040 AU vs 0.0012 AU. Nevertheless the absorbance values of the

FAAS method are around four times lower meaning that in absolute terms the non-linearity of the FAAS method is higher, as expected. This is also evidenced by the standard uncertainty contributions to the final result: 0.32 mg and 0.46 mg for UV-Vis and FAAS, respectively.

In the case of FAAS, which is an intrinsically less stable method than UV-Vis spectrophotometry, this contribution is closely followed by the instrumental drift contribution. The next uncertainty contributions with both methods originate from pipetting operations.

The uncertainty contributions arising from the imperfections introduced by the photometric reaction and dosage of the reagents in the case of UV-Vis spectrophotometry are of negligible importance, jointly contributing less than 3% of the uncertainty. Evidently this is due to the relatively simple and predictable matrix of the pharmaceutical product. With a more complex matrix these uncertainty sources may become important and the uncertainty of the UV-Vis spectrophotometric method may increase with respect to the FAAS method.

The uncertainties of calibration solution absorbances have low contribution with both method. This is due to the effective "averaging" of the four calibration solution absorbances and especially due to the fact that two important uncertainty sources - calibration graph nonlinearity and drift – are taken into account as uncertainties of sample solution absorbance.

6. Conclusions

The results obtained with UV-Vis spectrophotometric and FAAS method were 11.4 ± 0.5 and 11.9 ± 0.8 mg of iron per tablet (at 95% confidence level), respectively. Thus the uncertainty of the FAAS method is higher but the difference is not large.

In both methods the main uncertainty contributor is the uncertainty due to calibration function nonlinearity (0.32 and 0.46 mg or 42% and 31% of the uncertainty in the case of UV-Vis and FAAS, respectively). This finding discourages the frequent practice of leaving uncertainty due to nonlinearity out of consideration in uncertainty estimation and calls for caution in doing this even for highly linear methods like UV-Vis spectrophotometry. Nonlinearity uncertainty is followed by instrument drift in the FAAS method and uncertainty of volumetric measurements in UV-Vis spectrophotometry.

7. Electronic Supplementary Material

Detailed sample composition, FAAS instrumental conditions and uncertainty calculation worksheets are available as Electronic Supplementary Material at <http://www.springeronline.com/>

8. Acknowledgments

This work was supported by the grants 5800 and 6701 from the Estonian Science foundation and by the basis financing project 06902 from University of Tartu.

9. References

1. Elvers B, Hawkins S, Ravenscroft M, Schulz G (1989) Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. VCH, Germany
2. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM (1993) Principles of Biochemistry (second edition). Worth, New York
3. Kaim W, Schwederski B (1994) Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life. Wiley, Chichester
4. Tesfaldet ZO, Van Staden JF, Stefan RI (2004) Talanta 64:1189-1195
5. Rugani KS, Semaan FS, Luccas PO, Pereira-Filho ER (2004) Microchem J 78:187-194
6. Oliveira AF, Nóbrega JA, Fatibello-Filho O (1999) Talanta 49:505-510
7. Kass M, Ivaska A (2002) Talanta 58:1131-1137
8. Van Staden JF, Du Plessis H, Taljaard RE (1997) Anal Chim Acta 357:141-149
9. Karpińska J, Kulikowska M (2002) J Pharmaceut Biomed Anal 29:153-158
10. Oszwaldowski S, Pikus A (2002) Talanta 58:773-783
11. Sözgen K, Tütem E (2004) Talanta 62:971-976
12. Gioia MG, Di Pietra AM, Gatti R (2002) J Pharmaceut Biomed Anal 29:1159-1164
13. Kumar TNK, Revanasiddappa HD (2003) Anal Bioanal Chem 376:1126-1130
14. Canfranc E, Abarca A, Sierra I, Marina ML (2001) J Pharmaceut Biomed Anal 25:103-108
15. Huguet MER (2004) At Spectrosc 25:177-184
16. Chung SW, Tsai WC (1991) At Spectrosc 12:59-63

17. Vandecasteele C, Block CB (1993) Modern methods for trace element determination. Wiley, Chichester
18. Lajunen LHJ (1992) Spectrochemical Analysis by Atomic Absorption and emission. RSC, Cambridge
19. Smith FE, Arsenault EA (1996) Talanta 43:1207-1268
20. Paama L, Perämäki P (1998) Anal Chem 28:87-91
21. Florian D, Knapp G (2001) Anal Chem 73:1515-1520
22. Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (1993) BIPM/IEC/IFCC/ISO/IUPAC/IUPAP/OIML, ISO, Geneva
23. Ellison SLR, Rosslein M, Williams A (eds) (2000) Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, 2nd ed. EURACHEM/CITAC
24. Sooväli L, Rõõm EI, Kütt A, Kaljurand I, Leito I (2006) Accred Qual Assur 11:246-255
25. Hirano Y, Imai K, Yasuda K (2005) Accred Qual Assur 10:190-196
26. Ramachandran R, Rashmi (1999) Analyst 124: 1099-1103
27. Drolc A, Roš M (2002) Acta Chim Slov 49:409-423
28. Traks J, Sooväli L, Leito I (2005) Accred Qual Assur 10:197-207
29. Synek V, Subrt P, Marecek J (2000) Accred Qual Assur 5:58-66
30. Stringari G, Pancheri I, Möller F, Failla O (1998) Accred Qual Assur 3:122-126
31. Bettencourt da Silva RJN, Camões MFGFC, Seabra e Barros J (1998) Accred Qual Assur 3:155-160
32. Kurfürst U, Desaulles A, Rehnert A, Muntau H (2004) Accred Qual Assur 9:64-75

33. Kristiansen J, Christensen JM, Nielsen JL (1996) *Mikrochimica Acta* 123:241-249
34. Van Staden J F, Naidoo EB (2000) *S Afr J Chem* 53:191-205
35. Leito S, Mölder K, Künnapas A, Herodes K, Leito I (2006) *J Chromatogr A* 1121:55-63
36. Ahmet MT, Frampton CS, Silver J (1988) *J Chem Soc Dalton Trans* 1159-1163
37. Kragten J (1994) *Analyst* 119:2161-2165

Lisa 2

Ajakirja *Accreditation and Quality Assurance* avaldamiseks esitatud artikli käsikirja lisainfo (MS Exceli väljatrükkidena arvutusandmed).

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Uncertainty of UV-Vis spectrophotometric and FAAS analysis for determination of iron in pharmaceutical product

Jaana Jürgens¹, Lilli Paama¹, Ivo Leito*¹

¹*Institute of Chemical Physics, University of Tartu, Jakobi 2, 51014 Tartu, Estonia*

Composition of the Bio-Multi[®] formulation

Bio-Multi[®] (one tablet contained 10 mg Fe), produced by Pharma Nord ApS, from local pharmacy were used for Fe determination as sample. Bio-Multi[®] is a multivitamin with minerals. One coated tablet contains 10 vitamins: 60 mg ascorbic acid (vitamin C), 3.6 mg β -carotene (vitamin A), 4 mg d- α -tocopheryl acetate (vitamin E), 9 mg nicotine amide (niacin), 7.5 μ g cholecalciferol (vitamin D), 1.5 μ g cyanocobalamine (vitamin B₁₂), 1 mg riboflavin (vitamin B₂), 0.9 mg pyridoxine hydrochloride (vitamin B₆), 0.6 mg thiamine hydrochloride (vitamin B₁), 300 μ g folic acid and 6 minerals: 100 mg calcium (mild lime and dicalcium phosphate), 100 mg magnesium (magnesia), 10 mg iron (ferrous gluconate), 5 mg zinc (zinc gluconate), 100 μ g iodine (potassium iodide), 60 μ g selenium (leaven, which is enriched with sodiumselenite). Anticakings are microcrystalline cellulose, silica, talcum and magnesium stearate. Stabilizers are hypromellose and polyvinylpyrrolidone. Food colours are titania and Marigold extract.

Table S1. Instrumental conditions for measurement of iron by flame atomic absorption spectrometry

Parameter	Value (Element Fe)
Wavelength (nm)	248.3
Slit (nm)	0.2
Light source	Hollow cathode lamp (Co-Cr-Cu-Fe-Mn-Ni)
Lamp current (mA)	10
Flame, flow setting (l/min)	Air (3.0), acetylene (1.1)
Integration time (s)	3.0

* Corresponding author: e-mail: Ivo.Leito@ut.ee, Tel.: +372 7 375 259, Fax: +372 7 375 264

Uncertainty of weighing and volumetric operations

1. Weighing

$u(m, \text{rep}) = 0.0001 \text{ g}$
 $u(m, \text{drift}) = 0.0001 \text{ g}$
 $u(m, \text{roun}) = 2.887\text{E-}05$
 $u(\text{weighing}) = \mathbf{0.00014 \text{ g}}$

2. Volumetric flasks

50 ml flask ($\pm 0.09 \text{ ml}$)

$u(\text{cal}) = 0.0520 \text{ ml}$
 $u(\text{fill}) = 0.0520 \text{ ml}$
 $u(\text{temp}) = 0.0121 \text{ ml}$
 $u(V_{50}) = \mathbf{0.0745 \text{ ml}}$

100 ml flask ($\pm 0.15 \text{ ml}$)

$u(\text{cal}) = 0.0866 \text{ ml}$
 $u(\text{fill}) = 0.0520 \text{ ml}$
 $u(\text{temp}) = 0.0242 \text{ ml}$
 $u(V_{100}) = \mathbf{0.1039 \text{ ml}}$

250 ml flask ($\pm 0.15 \text{ ml}$)

$u(\text{cal}) = 0.0866 \text{ ml}$
 $u(\text{fill}) = 0.0520 \text{ ml}$
 $u(\text{temp}) = 0.0606 \text{ ml}$
 $u(V_{250}) = \mathbf{0.1178 \text{ ml}}$

3. Pipettes

1-ml pipet ($\pm 0.01 \text{ ml}$)

$u(\text{cal}) = 0.0058 \text{ ml}$
 $u(\text{rep}) = 0.0040 \text{ ml}$
 $u(\text{temp}) = 0.0002 \text{ ml}$
 $u(V_1) = \mathbf{0.0070 \text{ ml}}$

2-ml pipet ($\pm 0.015 \text{ ml}$)

$u(\text{cal}) = 0.0087 \text{ ml}$
 $u(\text{rep}) = 0.0080 \text{ ml}$
 $u(\text{temp}) = 0.0005 \text{ ml}$
 $u(V_2) = \mathbf{0.0118 \text{ ml}}$

5-ml pipet ($\pm 0.010 \text{ ml}$)

$u(\text{cal}) = 0.0058 \text{ ml}$
 $u(\text{rep}) = 0.0200 \text{ ml}$
 $u(\text{temp}) = 0.0012 \text{ ml}$
 $u(V_5) = \mathbf{0.0209 \text{ ml}}$
 $df = 9$

10-ml pipet ($\pm 0.03 \text{ ml}$)

$u(\text{cal}) = 0.0173 \text{ ml}$
 $u(\text{rep}) = 0.0400 \text{ ml}$
 $u(\text{temp}) = 0.0024 \text{ ml}$
 $u(V_{10}) = \mathbf{0.0437 \text{ ml}}$
 $df = 9$

25-ml pipet ($\pm 0.03 \text{ ml}$)

$u(\text{cal}) = 0.0173 \text{ ml}$
 $u(\text{rep}) = 0.1000 \text{ ml}$
 $u(\text{temp}) = 0.0061 \text{ ml}$
 $u(V_{25}) = \mathbf{0.1017 \text{ ml}}$
 $df = 9$

4. Solutions**Stock solution 1: Solution of iron 1000 mg/l**Molar mass of Mohr's salt $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

(Source: NIST Physical Reference Data)

Element	repeater	M (g/mol)
N	2	14.0067
H	20	1.00794
Fe	1	55.845
S	2	32.065
O	14	15.9994

M (Mohr's salt) = **392.139**Purity of Mohr's salt (P_M) = 99,5% = 0.995 $u(P_M) = 0.0029$ Mass of Mohr's salt = **0.7002** g $C(\text{Fe}) = (m_M \cdot M_{\text{Fe}} \cdot P_M) / (M_M \cdot V_{\text{flask}})$ $C(\text{Fe}) = 0.9922 \text{ g/l} = \mathbf{992.18 \text{ mg/l}}$

	Unit	Value	Standard deviation	
			absolute	relative (10^4)
m_M	g	0.7002	0.00014	2.06
P_M		0.995	0.0029	29.01
V_{flask}	ml	100	0.104	10.4

 $u(C(\text{Fe}))/C(\text{Fe}) = 0.0031$ $u(C(\text{Fe})) = \mathbf{3.064 \text{ mg/l}}$

Calibration solution: Fe 0.2 µg/ml

	Unit	Value	Standard deviation	
			absolute	relative (10 ⁴)
C (Fe)	mg/l	992.18	3.06430	30.9
V10	ml	10	0.000	0.0
V10	ml	10	0.000	0.0
V1	ml	1	0.007	70.3
V100	ml	100	0.104	10.4
V50	ml	50	0.074	14.9

The uncertainty of the two 10 ml pipetting operations (stock solutions 1 and 2) is taken into account by f1 and f2 when calculating u(C(sample))

$$C(-0,2\mu\text{g/ml}) = 10\text{ml} * C_M * 10\text{ml} * 1\text{ml} / (100\text{ml} * 100\text{ml} * 50\text{ml})$$

$$C(-0,2\mu\text{g/ml}) = \mathbf{0.198}$$

$$u(C(-0,2\mu\text{g/ml})) / C(-0,2\mu\text{g/ml}) = 0.0080$$

$$u(-0,2\mu\text{g/ml}) = \mathbf{0.00158} \quad \mu\text{g/ml}$$

Explanation:

Stock solution 2: 10 ml stock solution 1 were transferred into 100 ml flask

Stock solution 3: 10 ml stock solution 2 were transferred into 100 ml flask

Standard solution (0.2 µg/ml): 1 ml stock solution 3 were transferred into 50 ml flask

Calibration solution: Fe 0.4 µg/ml

	Unit	Value	Standard deviation	
			absolute	relative (10 ⁴)
C (Fe)	mg/l	992.18	3.06430	30.9
V10	ml	10	0.000	0.0
V10	ml	10	0.000	0.0
V2	ml	2	0.012	59.0
V100	ml	100	0.104	10.4
V50	ml	50	0.074	14.9

The uncertainty of the two 10 ml pipetting operations (stock solutions 1 and 2) is taken into account by f1 and f2 when calculating u(C(sample))

$$C(-0,4\mu\text{g/ml}) = 10\text{ml} * C_M * 10\text{ml} * 2\text{ml} / (100\text{ml} * 100\text{ml} * 50\text{ml})$$

$$C(-0,4\mu\text{g/ml}) = \mathbf{0.397}$$

$$u(C(-0,4\mu\text{g/ml})) / C(-0,4\mu\text{g/ml}) = 0.0070$$

$$u(-0,4\mu\text{g/ml}) = \mathbf{0.00277} \quad \mu\text{g/ml}$$

Calibration solution: Fe 1.0 µg/ml

	Unit	Value	Standard deviation	
			absolute	relative (10 ⁴)
C (Fe)	mg/l	992.18	3.06430	30.9
V10	ml	10	0.000	0.0
V10	ml	10	0.000	0.0
V5	ml	5	0.021	41.7
V100	ml	100	0.104	10.4
V50	ml	50	0.074	14.9

$$C (\sim 1.0 \mu\text{g/ml}) = 10 \text{ ml} * C_M * 10 \text{ ml} * 5 \text{ ml} / (100 \text{ ml} * 100 \text{ ml} * 50 \text{ ml})$$

$$C (\sim 1.0 \mu\text{g/ml}) = \mathbf{0.992}$$

$$u(C (\sim 1.0 \mu\text{g/ml})) / C (\sim 1.0 \mu\text{g/ml}) = 0.0056$$

$$u (\sim 1.0 \mu\text{g/ml}) = \mathbf{0.00555} \quad \mu\text{g/ml}$$

The uncertainty of the two 10 ml pipetting operations (stock solutions 1 and 2) is taken into account by f1 and f2 when calculating u(C(sample))

Calibration solution: Fe 2.0 µg/ml

	Unit	Value	Standard deviation	
			absolute	relative (10 ⁴)
C (Fe)	mg/l	992.18	3.06430	30.9
V10	ml	10	0.000	0.0
V10	ml	10	0.000	0.0
V10	ml	10	0.044	43.7
V100	ml	100	0.104	10.4
V50	ml	50	0.074	14.9

$$C (\sim 2.0 \mu\text{g/ml}) = 10 \text{ ml} * C_M * 10 \text{ ml} * 10 \text{ ml} / (100 \text{ ml} * 100 \text{ ml} * 50 \text{ ml})$$

$$C (\sim 2.0 \mu\text{g/ml}) = \mathbf{1.984}$$

$$u(C (\sim 2.0 \mu\text{g/ml})) / C (\sim 2.0 \mu\text{g/ml}) = 0.0057$$

$$u (\sim 2.0 \mu\text{g/ml}) = \mathbf{0.01139} \quad \mu\text{g/ml}$$

The uncertainty of the two 10 ml pipetting operations (stock solutions 1 and 2) is taken into account by f1 and f2 when calculating u(C(sample))

Calibration solution: Fe 3.0 µg/ml

	Unit	Value	Standard deviation	
			absolute	relative (10 ⁴)
C (Fe)	mg/l	992.18	3.06430	30.9
V10	ml	10	0.000	0.0
V10	ml	10	0.000	0.0
V5	ml	5	0.02085	41.7
V10	ml	10	0.044	43.7
V100	ml	100	0.104	10.4
V50	ml	50	0.074	14.9

The uncertainty of the two 10 ml pipetting operations (stock solutions 1 and 2) is taken into account by f1 and f2 when calculating u(C(sample))

$$C (\sim 3.0 \mu\text{g/ml}) = 10 \text{ ml} \cdot C_M \cdot 10 \text{ ml} \cdot (10 \text{ ml} + 5 \text{ ml}) / (100 \text{ ml} \cdot 100 \text{ ml} \cdot 50 \text{ ml})$$

$$C (\sim 3.0 \mu\text{g/ml}) = \mathbf{2.977}$$

$$u(C (\sim 3.0 \mu\text{g/ml})) / C (\sim 3.0 \mu\text{g/ml}) = 0.0071$$

$$u (\sim 3.0 \mu\text{g/ml}) = \mathbf{0.02112} \quad \mu\text{g/ml}$$

Calibration solution: Fe 4.0 µg/ml

	Unit	Value	Standard deviation	
			absolute	relative (10 ⁴)
C (Fe)	mg/l	992.18	3.06430	30.9
V10	ml	10	0.000	0.0
V10	ml	10	0.000	0.0
V10	ml	10	0.044	43.7
V100	ml	100	0.104	10.4
V50	ml	50	0.074	14.9

The uncertainty of the two 10 ml pipetting operations (stock solutions 1 and 2) is taken into account by f1 and f2 when calculating u(C(sample))

$$C (\sim 4.0 \mu\text{g/ml}) = 10 \text{ ml} \cdot C_M \cdot 10 \text{ ml} \cdot (10 \text{ ml} + 10 \text{ ml}) / (100 \text{ ml} \cdot 100 \text{ ml} \cdot 50 \text{ ml})$$

$$C (\sim 4.0 \mu\text{g/ml}) = \mathbf{3.969}$$

$$u(C (\sim 4.0 \mu\text{g/ml})) / C (\sim 4.0 \mu\text{g/ml}) = 0.0072$$

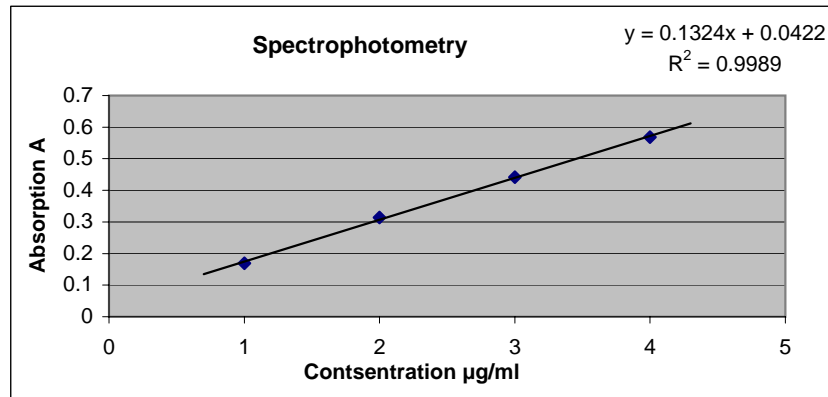
$$u (\sim 4.0 \mu\text{g/ml}) = \mathbf{0.02863} \quad \mu\text{g/ml}$$

Uncertainty of UV-Vis Spectrophotometry

Uncertainty of instrument signal for solutions of calibration curve (AU)

C (µg/ml)	A1	A2	A3	A4	A5	Average A	s	arith.aver.s	squared
Blank sol.	0.001	0.002	0.002	0.002	0.002	0.0018			
1	0.171	0.171	0.171	0.171	0.171	0.1692	0	0	0
2	0.316	0.316	0.316	0.316	0.316	0.3142	0	0	0
3	0.443	0.443	0.443	0.444	0.444	0.4416	0.000548	0.00024495	6E-08
4	0.570	0.570	0.570	0.570	0.570	0.5682	0	0	0
									6E-08 sum
									Repeatability 0.0001225
									Rounding: 0.0002887

Combined u: **0.0003136 AU**



Uncertainty of absorbance of the sample solution

Sample	A1	A2	A3	A4	A5	Average A	s	u(Avg A,rep)	Drift	u(Avg A,Drift)
Bio-Multi	0.344	0.344	0.343	0.344	0.344	0.342	0.000447	0.00020	0.0015	0.000866025

max nonlin	u(Avg A, nonlin)	u(Avg A, Phen)	u(Avg A, Hydroq)	u(Avg A, Na-citr)	u(Avg A, round)
0.007	0.00404	0.00058	0.00058	0.00058	0.000289

Uncertainty of sample solution absorbance:

$u(A(\text{sample})) \equiv u(\text{Avg A}) = \mathbf{0.00427 \text{ AU}}$

No of eff df of A(Sample) = **5**

The factors f1 and f2 take into account the uncertainties of the two common pipetting operations when preparing the standard solutions. These two pipetting operations affect C1..C4 te same way and thus introduce correlation between these concentrations. The used approach allows to automatically take this correlation into account.

The effective number of degrees of freedom of A(sample) is fully determined by the nonlinearity contribution. Formally rectangularly distributed quantities have an infinite number of degrees of freedom. However, this is unjustified in our case A more sound approach is to estimate the eff df number as the number of such calibration lines constructed during the experiments minus 1.

Kragten approach is used for calculating the uncertainty of C(sample):

	value	u	C1	C2	C3	C4	f1	f2	A1	A2	A3	A4	A(sample)
C1	0.9922	0.0056	0.9977	0.9922	0.9922	0.9922	0.9922	0.9922	0.9922	0.9922	0.9922	0.9922	0.9922
C2	1.9844	0.0114	1.9844	1.9958	1.9844	1.9844	1.9844	1.9844	1.9844	1.9844	1.9844	1.9844	1.9844
C3	2.9765	0.0211	2.9765	2.9765	2.9977	2.9765	2.9765	2.9765	2.9765	2.9765	2.9765	2.9765	2.9765
C4	3.9687	0.0286	3.9687	3.9687	3.9687	3.9973	3.9687	3.9687	3.9687	3.9687	3.9687	3.9687	3.9687
f1	1	0.004366	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0044	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
f2	1	0.004366	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0044	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
A1	0.1692	0.000314	0.1692	0.1692	0.1692	0.1692	0.1692	0.1692	0.1695	0.1692	0.1692	0.1692	0.1692
A2	0.3142	0.000314	0.3142	0.3142	0.3142	0.3142	0.3142	0.3142	0.3142	0.3145	0.3142	0.3142	0.3142
A3	0.4416	0.000314	0.4416	0.4416	0.4416	0.4416	0.4416	0.4416	0.4416	0.4416	0.4419	0.4416	0.4416
A4	0.5682	0.000314	0.5682	0.5682	0.5682	0.5682	0.5682	0.5682	0.5682	0.5682	0.5682	0.5685	0.5682
A(sample)	0.3420	0.00427	0.3420	0.3420	0.3420	0.3420	0.3420	0.3420	0.3420	0.3420	0.3420	0.3420	0.3463

C(sample)= 2.2460	2.2477	2.2491	2.2507	2.2510	2.255766	2.2557656	2.2452	2.2453	2.2454	2.2455	2.2779
u(C(sample))= 0.0357	Delta: 0.0018	0.0031	0.0048	0.0051	0.0098	0.0098	-0.0008	-0.0006	-0.0005	-0.0004	0.0320
	Delta ² : 3.134E-06	9.876E-06	2.287E-05	2.578E-05	9.614E-05	9.614E-05	5.691E-07	4.134E-07	2.827E-07	1.768E-07	1.022E-03
	Summa: 0.0012772										
	Index: 0.25%	0.77%	1.79%	2.02%	7.53%	7.53%	0.04%	0.03%	0.02%	0.01%	80.00%

Average tablet mass: $m_{\text{tablet_average}}$:

m1 = 0.8866 g
m2 = 0.8904 g
m3 = 0.9010 g
m4 = 0.8893 g
m5 = 0.9049 g
m6 = 0.9063 g
m7 = 0.9193 g
m8 = 0.8953 g
m9 = 0.9149 g
m10 = 0.8753 g
m11 = 0.9072 g
m12 = 0.9070 g
m13 = 0.8966 g
m14 = 0.8962 g
m15 = 0.8936 g
m16 = 0.8947 g
m17 = 0.9043 g
m18 = 0.8857 g
m19 = 0.9066 g
m20 = 0.8874 g

 $m_{\text{tablet_average}} = 0.89813 \text{ g}$ $m_{\text{sample}} = 0.8853 \text{ g}$

Content of iron in tablet

$$C_{\text{(Fe mg per tablet)}} = \frac{C(\text{sample}) \cdot V_{50} \cdot V_{100} \cdot V_{250} \cdot m_{\text{tablet_average}}}{V_{\text{sample}} \cdot V_{25} \cdot m_{\text{sample}} \cdot 1000}$$

C (Fe mg per tablet)= 11.393

	Unit	Value	Standard deviation		v_i	Contributions
			absolute	relative (10 ⁴)		
C _{sample}	µg/ml	2.2460	0.0357	159.1	5	57.51%
$m_{\text{tablet_average}}$	g	0.89813	0.00014	1.6		0.58%
m_{sample}	g	0.8853	0.00014	1.6		0.59%
V ₅₀	ml	50	0.0745	14.9		5.38%
V ₁₀₀	ml	100	0.1039	10.4		3.75%
V ₂₅₀	ml	250	0.1178	4.7		1.70%
V ₁₀	ml	10	0.0437	43.7	9	15.78%
V ₂₅	ml	25	0.1017	40.7	9	14.70%

u(C(Fe mg per tablet))/C(Fe mg per tablet)= 0.0171
 u(C(Fe mg per tablet))= 0.195

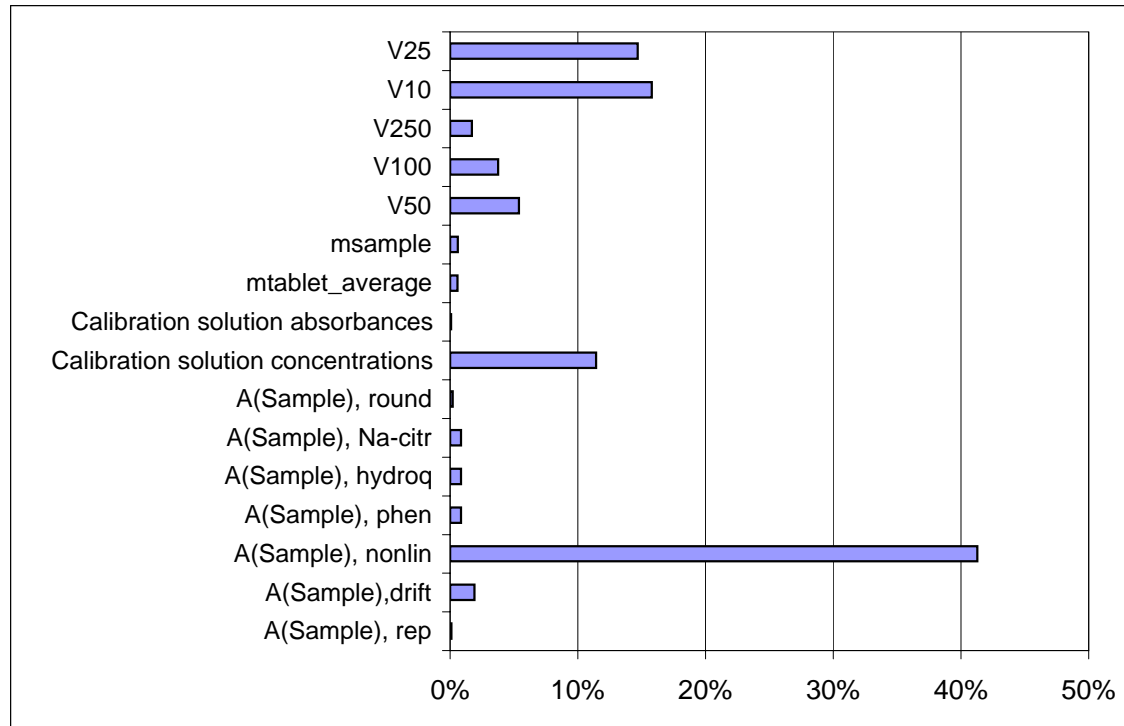
C(Fe per tablet)	u_c	U(95.45%)	U_{rel} , %
11.393	0.195	0.490	4.30

The Welch-Satterthwaite
 formula:

$$v_{\text{eff}} = \frac{u_c^4}{\sum_i \frac{u_i^4}{v_i}}$$

v_{eff} = 6.5
 $k(95.45\%)$ = 2.52

Result:				
11.39	±	0.49	mg per tablet	$k(95.45\%) = 2.52$

Uncertainty budget:

Contributions of C(sample) components:

A(sample):	46.01%
Calibration solution concentrations:	11.43%
Calibration solution absorbances:	0.06%

Components of A(sample):

	Index	u	u squared
Rep	0.10%	0.00020	4E-08
Drift	1.90%	0.000866025	0.00000075
Nonlin	41.28%	0.00404	1.63333E-05
Phen.	0.84%	0.00058	3.33333E-07
Hydroq.	0.84%	0.00058	3.33333E-07
Na-citr.	0.84%	0.00058	3.33333E-07
Rounding	0.21%	0.00029	8.33333E-08
	sumsq:		1.82067E-05

Uncertainty budget:	components (mg)	contributions (%)
A(Sample), rep	0.016	0.10%
A(Sample),drift	0.067	1.90%
A(Sample), nonlin	0.315	41.28%
A(Sample), phen	0.045	0.84%
A(Sample), hydroq	0.045	0.84%
A(Sample), Na-citr	0.045	0.84%
A(Sample), round	0.022	0.21%
Calibration solution concentrations	0.166	11.43%
Calibration solution absorbances	0.012	0.06%
mtablett_average	0.037	0.58%
msample	0.038	0.59%
V50	0.114	5.38%
V100	0.095	3.75%
V250	0.064	1.70%
V10	0.195	15.78%
V25	0.188	14.70%

UV-Vis residual analysis

SUMMARY OUTPUT

<i>Regression Statistics</i>	
Multiple R	0.99943748
R Square	0.99887527
Adjusted R Square	0.9983129
Standard Error	0.00702681
Observations	4

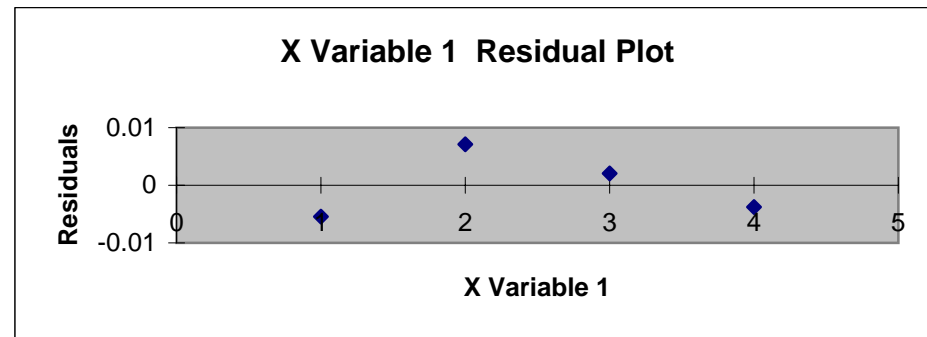
ANOVA

	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>
Regression	1	0.087701768	0.087701768	1776.202	0.000562524
Residual	2	0.000098752	0.000049376		
Total	3	0.08780052			

	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>	<i>Lower 95.0%</i>	<i>Upper 95.0%</i>
Intercept	0.0422	0.008606044	4.903530368	0.039163	0.005171154	0.07922885	0.005171154	0.079228846
X Variable 1	0.13244	0.003142483	42.1450159	0.000563	0.118918977	0.14596102	0.118918977	0.145961023

RESIDUAL OUTPUT

<i>Observation</i>	<i>Predicted Y</i>	<i>Residuals</i>	<i>Standard Residuals</i>
1	0.17464	-0.00544	-0.948170801
2	0.30708	0.00712	1.240988254
3	0.43952	0.00208	0.362535894
4	0.57196	-0.00376	-0.655353348

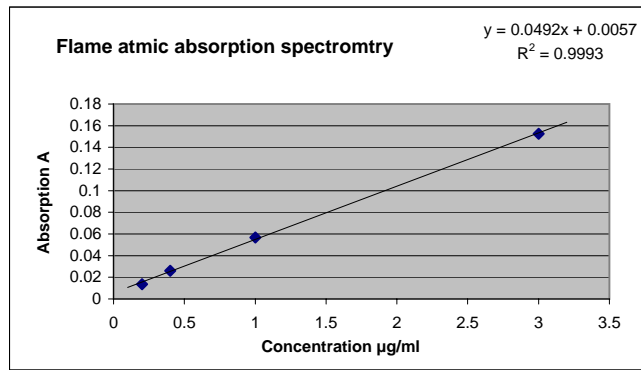


Uncertainty of Flame atomic absorption spectrometry

Uncertainty of instrument signal for solutions of calibration curve (AU)

C (µg/ml)	A1	A2	A3	A4	A5	Average A	s	arith.aver.s	squared
0.2	0.013	0.013	0.014	0.014	0.014	0.0136	0.00054772	0.000244949	6E-08
0.4	0.025	0.026	0.026	0.026	0.027	0.0260	0.00070711	0.000316228	1E-07
1	0.057	0.056	0.057	0.057	0.057	0.0568	0.00044721	0.00020000	4E-08
3	0.153	0.152	0.153	0.153	0.152	0.1526	0.00054772	0.000244949	6E-08
									2.6E-07 sum
Repeatability:									0.000255
Rounding:									0.0002887

Combined u: **0.0003851** AU



Uncertainty of absorbance of the sample solution

Sample	A1	A2	A3	A4	A5	Average A	s	u(Avg A,rep)	Drift	u(Avg A,Drift)
Bio-Multi	0.064	0.065	0.064	0.065	0.065	0.0646	0.00054772	0.00024	0.0018	0.00103923

max nonlin	u(Avg A, nonlin)	u(Avg A, HCl)	u(Avg A, Round)
0.002	0.00115	0.00058	0.00029

Uncertainty of sample solution absorbance:

$u(A(\text{sample})) \equiv u(\text{Avg A}) = \mathbf{0.00170 \text{ AU}}$

No of eff df of A(Sample) = 9.89

The factors f1 and f2 take into account the uncertainties of the two common pipetting operations when preparing the standard solutions. These two pipetting operations affect C1..C4 to same way and thus introduce correlation between these concentrations. The used approach allows to automatically take this correlation into account.

The effective number of degrees of freedom of A(sample) is fully determined by the nonlinearity contribution. Formally rectangularly distributed quantities have an infinite number of degrees of freedom. However, this is unjustified in our case A more sound approach is to estimate the eff df number as the number of such calibration lines constructed during the experiments minus 1.

Kragten approach is used for calculating the uncertainty of C(sample):

	value	u	C1	C2	C3	C4	f1	f2	A1	A2	A3	A4	A(sample)
C1	0.1984	0.0016	0.2000	0.1984	0.1984	0.1984	0.1984	0.1984	0.1984	0.1984	0.1984	0.1984	0.1984
C2	0.3969	0.0028	0.3969	0.3996	0.3969	0.3969	0.3969	0.3969	0.3969	0.3969	0.3969	0.3969	0.3969
C3	0.9922	0.0056	0.9922	0.9922	0.9977	0.9922	0.9922	0.9922	0.9922	0.9922	0.9922	0.9922	0.9922
C4	2.9765	0.0211	2.9765	2.9765	2.9765	2.9777	2.9765	2.9765	2.9765	2.9765	2.9765	2.9765	2.9765
f1	1	0.004366	1	1	1	1	1.00437	1	1	1	1	1	1
f2	1	0.004366	1	1	1	1	1	1.00437	1	1	1	1	1
A1	0.0136	0.000385	0.0136	0.0136	0.0136	0.0136	0.0136	0.0136	0.0140	0.0136	0.0136	0.0136	0.0136
A2	0.026	0.000385	0.0260	0.0260	0.0260	0.0260	0.0260	0.0260	0.0260	0.0264	0.0260	0.0260	0.0260
A3	0.0568	0.000385	0.0568	0.0568	0.0568	0.0568	0.0568	0.0568	0.0568	0.0568	0.0572	0.0568	0.0568
A4	0.1526	0.000385	0.1526	0.1526	0.1526	0.1526	0.1526	0.1526	0.1526	0.1526	0.1526	0.1530	0.1526
A(sample)	0.0646	0.00170	0.0646	0.0646	0.0646	0.0646	0.0646	0.0646	0.0646	0.0646	0.0646	0.0646	0.0663

C(sample)= 1.1884	1.1888	1.1891	1.1898	1.1941	1.1936	1.1936	1.1866	1.1865	1.1865	1.1864	1.2227
(C(sample))= 0.0358	Delta: 0.0004	0.0007	0.0014	0.0057	0.0052	0.0052	-0.0019	-0.0019	-0.0019	-0.0021	0.0343
	Delta ² : 1.450E-07	4.516E-07	1.899E-06	3.208E-05	2.692E-05	2.692E-05	3.513E-06	3.568E-06	3.734E-06	4.315E-06	1.177E-03
	Summa: 0.0012808										
	Index: 0.01%	0.04%	0.15%	2.50%	2.10%	2.10%	0.27%	0.28%	0.29%	0.34%	91.92%

Average tablet mass: $m_{\text{tablet_average}}$:

m1 = 0.8866 g

m2 = 0.8904 g

m3 = 0.9010 g

m4 = 0.8893 g

m5 = 0.9049 g

m6 = 0.9063 g

m7 = 0.9193 g

m8 = 0.8953 g

m9 = 0.9149 g

m10 = 0.8753 g

m11 = 0.9072 g

m12 = 0.9070 g

m13 = 0.8966 g

m14 = 0.8962 g

m15 = 0.8936 g

m16 = 0.8947 g

m17 = 0.9043 g

m18 = 0.8857 g

m19 = 0.9066 g

m20 = 0.8874 g

 $n_{\text{tablet_average}} = 0.89813 \text{ g}$ $m_{\text{sample}} = 0.8991 \text{ g}$

Content of iron in tablet

$$C_{(\text{Fe mg per tablet})} = \frac{C(\text{sample}) \cdot V_{50} \cdot V_{100} \cdot V_{250} \cdot m_{\text{tablet_average}}}{V_{\text{sample}} \cdot V_{25} \cdot m_{\text{sample}} \cdot 1000}$$

C (Fe mg per tablet)= 11.872

	Unit	Value	Standard deviation		v _i	Contributions
			absolute	relative (10 ⁴)		
C _{sample}	µg/ml	1.1884	0.0358	301.1	9.89	72.26%
m _{tablet_average}	g	0.8981	0.00014	1.6		0.39%
m _{sample}	g	0.8991	0.00014	1.6		0.39%
V ₅₀	ml	50	0.0745	14.9		3.57%
V ₁₀₀	ml	100	0.1039	10.4		2.49%
V ₂₅₀	ml	250	0.1178	4.7		1.13%
V ₅	ml	5	0.0209	41.7	9	10.01%
V ₂₅	ml	25	0.1017	40.7	9	9.76%

u(C(Fe mg per tablet))/C(Fe mg per tablet)= 0.0307
 u(C(Fe mg per tablet))= **0.365**

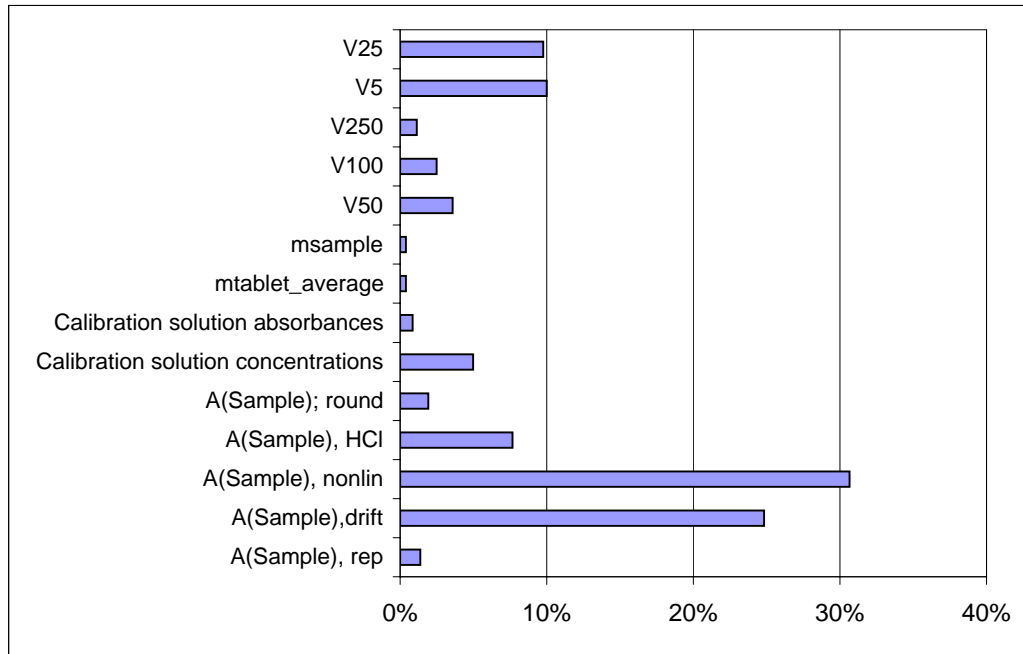
The Welch-Satterthwaite formula:

C(Fe per table)	u _c	U(95.45%)	U _{rel} (k=2), %
11.872	0.365	0.833	7.02

$$v_{\text{eff}} = \frac{u_c^4}{\sum_i \frac{u_i^4}{v_i}}$$

v_{eff}= 10.6
 k(95.45%)= 2.28

Result:					
11.87	±	0.83	mg per tablet	k(95.45%)=	2.28

Uncertainty budget:

Contributions of C(sample) components:

A(sample):	66.42%
Calibration solution concentrations:	4.99%
Calibration solution absorbances:	0.85%

Components of A(sample):

	Index	u	u squared
Rep	1.38%	0.00024	6E-08
Drift	24.82%	0.00103923	0.00000108
Nonlin	30.64%	0.00115	1.33333E-06
HCl	7.66%	0.00058	3.33333E-07
Rounding	1.92%	0.00029	8.33333E-08
	sumsq:		0.00000289

Uncertainty budget:	components (mg)	contributions (%)
A(Sample), rep	0.098	1.38%
A(Sample),drift	0.415	24.82%
A(Sample), nonlin	0.461	30.64%
A(Sample), HCl	0.231	7.66%
A(Sample); round	0.115	1.92%
Calibration solution concentrations	0.186	4.99%
Calibration solution absorbances	0.077	0.85%
mtablet_average	0.052	0.39%
msample	0.052	0.39%
V50	0.158	3.57%
V100	0.132	2.49%
V250	0.089	1.13%
V5	0.264	10.01%
V25	0.260	9.76%

FAAS residual analysis

SUMMARY OUTPUT

<i>Regression Statistics</i>	
Multiple R	0.99965312
R Square	0.99930636
Adjusted R Squ	0.99895954
Standard Error	0.0020293
Observations	4

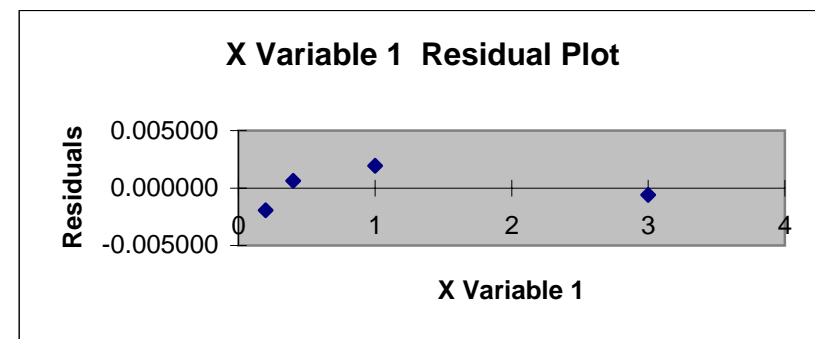
ANOVA

	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>
Regression	1	0.011865474	0.011865474	2881.337	0.000346881
Residual	2	8.23609E-06	4.11804E-06		
Total	3	0.01187371			

	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>	<i>Lower 95.0%</i>	<i>Upper 95.0%</i>
Intercept	0.00571731	0.001462429	3.909461901	0.059636	-0.00057502	0.012009641	-0.000575018	0.012009641
X Variable 1	0.04915886	0.000915809	53.67808461	0.000347	0.04521845	0.053099269	0.04521845	0.053099269

RESIDUAL OUTPUT

<i>Observation</i>	<i>Predicted Y</i>	<i>Residuals</i>	<i>Standard Residuals</i>
1	0.01554908	-0.001949	-1.176333706
2	0.02538086	0.000619	0.373673403
3	0.05487617	0.001924	1.161091765
4	0.15319389	-0.000594	-0.358431462



Lisa 3

Ajakirja *Accreditation and Quality Assurance* toimetuse kiri artikli kättesaamise kohta.

Date: Sun, 18 Mar 2007 10:45:09 -0400
From: Managing Editor ACQUAL <korte.acqual@ansci.de>
To: ivo.leito@ut.ee
Subject: - Submission Confirmation

Dear Dr. Ivo Leito,

Thank you for submitting your manuscript,
"Uncertainty of UV-Vis spectrophotometric and FAAS analysis for determination of
iron in pharmaceutical product", to Accreditation and
Quality Assurance

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by
accessing the following web site:

<http://acqual.edmgr.com/>

Your username is: ILeito-838
Your password is: *****

We will also need to receive a signed copyright transfer form from you. You can
locate the form on the opening page of Editorial Manager
under 'AUTHORS'.

Please print the form, sign it and return it to us at the below given address.

If your manuscript is accepted for publication in Accreditation and Quality Assurance,
you may elect to submit it to the Open Choice
program. For information about the Open Choice program, please access the
following URL: <http://www.springer.com/openchoice>
Thank you very much.

With kind regards,

Journals Editorial Office ACQUAL
Springer
P.O. Box 990
3300 AZ DORDRECHT
The Netherlands
Fax: +31 78 657 6555