

РОЗРАХУНОК НЕВИЗНАЧЕНОСТІ МЕТОДУ КАПІЛЯРНОГО ЕЛЕКТРОФОРЕЗУ ПРИ ВИЗНАЧЕННІ ВМІСТУ ХОЛІН ХЛОРИДУ В КОРМОВИХ ДОБАВКАХ І ПРЕМІКСАХ

Г. П. Ривак

Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів та кормових добавок
вул. Донецька, 11, м. Львів, 79019, Україна

У статті обґрунтовано необхідність розрахунку невизначеності аналітичних методик кількісного визначення вмісту діючих речовин, наведено ряд нормативних документів, які регламентують загальні правила та вимоги для оцінки і вираження невизначеності вимірювань, які слід дотримуватися на різних рівнях точності для забезпечення якості випробувань продукції. Подано процедуру і розраховано невизначеність методики визначення вмісту холін хлориду методом капілярного електрофорезу шляхом експериментальних спостережень і вхідних даних, зроблено їх аналіз та відповідні висновки.

Ключові слова: НЕВИЗНАЧЕНОСТІ, ОЦІНЮВАННЯ ПРИДАТНОСТІ, ПРЕЦЕЗІЙНІСТЬ, ПОВТОРЮВАНІСТЬ, ВІДТВОРЮВАНІСТЬ, ВІДНОСНА СУМАРНА СТАНДАРТНА НЕВИЗНАЧЕНОСТІ, ВІДНОСНА РОЗШИРЕНА НЕВИЗНАЧЕНОСТІ

Вимоги до компетентності випробувальних лабораторій встановлюються міжнародним стандартом ДСТУ ISO/IEC 17025:2006. Стандартом регламентовано, що коректність та надійність випробувань, що проводяться лабораторією, залежить від багатьох факторів, одним з яких є методи випробувань та оцінювання їх придатності. Обсяг та спосіб оцінювання придатності (валідації) залежить від мети і умов застосування методу випробувань в конкретній лабораторії. Крім того, випробувальна лабораторія (ВЛ) має оцінювати придатність методів, розроблених у межах лабораторії та не стандартизованих, а також стандартизованих методів, які використовуються поза цільовою сферою їх поширення або при їх модифікації. Ці вимоги обумовлюють необхідність проведення валідації (оцінювання придатності) методів, що використовуються у ВЛ [1].

Після проведення випробувань постає питання оцінювання їх результатів, встановлення достовірності отриманих даних та врахування зовнішніх впливів під час цих робіт. Сучасні вимоги щодо встановлення достовірності результатів випробувань ґрунтуються на концепції “оцінювання невизначеності вимірювань”, яка є більш точною та дозволяє врахувати практично усі можливі впливи на результати випробувань, порівняно з концепцією “оцінювання похибки”.

На сьогоднішній день розроблено досить чіткі методології оцінювання невизначеності вимірювань як загальні [2], так і для конкретних видів вимірювань або випробувань [3]. Однак ці методології, зазвичай, є загальними та не враховують усі можливі складові невизначеності, крім того процедура оцінювання невизначеності повинна коректуватися, залежно від застосовуваного випробувального устаткування. Тому для більш точного оцінювання невизначеності вимірювань та підготовки адекватної процедури, необхідно враховувати:

- метод проведення випробувань;
- застосовуване для випробувань устаткування;
- складові елементи, які мають вплив на отримані результати.

Виходячи з вищевикладеного методика оцінювання невизначеності повинна

уточнюватися при конкретних умовах проведення робіт.

Основними джерелами невизначеності при проведенні випробувань можуть бути:

- процедура відбору проб (зразків);
- приготування проб або зразків;
- властивості, стан і склад проби (зразка);
- застосовувані методи та обладнання;
- довкілля;
- оператор;
- стандартні зразки, чисті речовини, тощо.

Невизначеність оцінюється багатьма способами. Одним з основних способів оцінювання невизначеності випробувань є модельний підхід, в якому згідно з керівництвом GUM [4] розраховується стандартна і сумарна невизначеність. Такий підхід найчастіше застосовується при валідації методів у лабораторії. Інший підхід, міжлабораторний, який спирається на дані випробувань, отриманих при міжлабораторній відтворюваності, включаючи систематичну похибку. У свою чергу, міжлабораторний підхід до оцінювання невизначеності використовується при професійному тестуванні лабораторій та характеристиці методів (прецезійність, повторюваності та відтворюваності) згідно з ISO 5725-2:2002 [5]. Технічний звіт Євролаб № 1/2007 рекомендує також спосіб розрахунку невизначеності через порівняння стандартної невизначеності і стандартних відхилень [6].

Щоб замовник мав чітке уявлення про невизначеність результатів, у протоколі випробувань повинні бути вказані як характеристика методики – оцінка невизначеності, отримана при її валідації, так і практична оцінка невизначеності результатів даного конкретного аналізування. Для отримання практичної оцінки невизначеності, рекомендується за можливості використовувати статистичні методи [6].

Матеріали і методи. У період проведення досліджень в приміщенні лабораторії були дотримані такі умови: температура повітря 21,4 °С; вологість повітря 63 %; напруга в мережі 220 В; частота перемінного струму (50±1) Гц.

Визначення вмісту холін хлориду в зразках проводили методом капілярного електрофорезу за допомогою системи капілярного електрофорезу “Капель-105/105М” із позитивною полярністю джерела високої напруги, касетою з капіляром, внутрішній діаметр якого 75 мкм, повна довжина 60 см, оснащеної спеціальним програмним забезпеченням на основі персонального комп'ютера. Інші параметри подано в таблиці 1.

Таблиця 1

Параметри проведення аналізу холін хлориду в кормових добавках і преміксах

Параметри	Значення
Температура, °С	40 ± 0,5 %
Довжина хвилі, нм	267 ± 5 %
Тиск, мбар	30 (стала величина)
Напруга, кВ	20 (стала величина)

Для калібрування приладу і градування системи було використано стандартний зразок холін хлориду (CAS 67-48-1) виробництва фірми «Sigma» з масовою часткою діючої речовини не менше 99,0%.

Для проведення оцінювання придатності методу було визначено масову частку холін хлориду в пробах кормової добавки і преміксу в 10 повторях (n=10). Розраховано валідаційні характеристики: специфічність, прецизійність, точність, повторюваність, лінійність, збіжність та стандартну невизначеність даного методу.

Оцінювання невизначеності методу проводили за наступними характеристиками: відносна стандартна невизначеність, стандартне відхилення результатів вимірювання в умовах проміжної прецизійності, відносна сумарна стандартна невизначеність, відносна

розширена невизначеність [7].

Відносну стандартну невизначеність вимірювань масової концентрації холін хлориду у водній витяжці ($u_{\text{вим,від}}$ %) оцінювали із використанням нормативів контролю стабільності градуювальної характеристики.

$$u_{\text{вим,від}} = \frac{G}{2}, \quad (2)$$

де: G — норматив контролю стабільності градуювальної характеристики, %.

Для вираховування відносної стандартної невизначеності ($u_{\omega, \text{від}}$ %) використовували формулу:

$$u_{\omega, \text{від}} = \frac{100 - \omega}{\sqrt{12}}, \quad (3)$$

де: ω — масова частка основної речовини в препараті холін хлориду відповідно сертифікату виробника, %.

Невизначеність, яка виникає при вимірюванні об'єму запасного розчину холін хлориду ($V=100 \text{ см}^3$) визначається для цих цілей мірною колбою. Відносна стандартна невизначеність ($u_{V, \text{від}}$ %) запасного розчину холін хлориду оцінювали за формулою:

$$u_{V, \text{від}} = \frac{100 \cdot \Delta_V}{V \cdot \sqrt{3}}, \quad (4)$$

де: Δ_V — межа допустимого відхилення об'єму від номінального значення, см^3 .

Відносну стандартну невизначеність маси наважки холін хлориду ($u_{m, \text{від}}$ %) розраховували за формулою:

$$u_{m, \text{від}} = \frac{100 \cdot \Delta_m}{m \cdot \sqrt{3}}, \quad (5)$$

де: Δ_m — межа допустимої похибки наважки, г;

m — маса зразка, г.

Відносну стандартну невизначеність масової концентрації холін хлориду в запасному розчині ($u_{0, \text{від}}$ %) вираховували з урахуванням невизначеності маси холін хлориду, який використовувався для приготування запасного розчину, невизначеності об'єму цього розчину і чистоти вихідного препарату холін хлориду:

$$u_{0, \text{від}} = \sqrt{u_{m, \text{від}}^2 + u_{\omega}^2 + u_{V, \text{від}}^2}, \quad (6)$$

де: $u_{m, \text{від}}$ — відносна стандартна невизначеність маси холін хлориду, %;

$u_{\omega, \text{від}}$ — відносна стандартна невизначеність масової частки основної речовини в зразку холін хлориду, %;

$u_{V, \text{від}}$ — відносна стандартна невизначеність об'єму запасного розчину холін хлориду, %.

Відносну стандартну невизначеність $u_{I, \text{від}}$ розраховували з використанням стандартних відхилень повторності ($S_{r, \text{від}}$, %) і прецизійності ($S_{I, \text{від}}$, %).

$$u_{I, \text{від}} = \frac{\sqrt{S_{I, \text{від}}^2 - S_{r, \text{від}}^2}}{N_0}, \quad (7)$$

де: N_0 — число паралельних вимірювань при реалізації методики (в нашому випадку $N_0 = 2$).

У свою чергу, відносну сумарну стандартну невизначеність вимірювань (u %) розраховували за формулою:

$$u_c^0 = \sqrt{u_{I, \text{від}}^2 + u_{\text{гр,від}}^2 + u_{\text{вим,від}}^2} \quad (8)$$

де: $u_{I, \text{від}}$ — відносна стандартна невизначеність, зумовлена випадковими факторами в умовах прецизійності (фактори оператор, обладнання), %;

$u_{\text{гр,від}}$ — відносна стандартна невизначеність розчинів холін хлориду, які

застосовувалися для градуювання системи капілярного електрофорезу, %;

$u_{\text{вим,від}}$ — відносна стандартна невизначеність вимірювань масової концентрації холін хлориду у водяній витяжці проби, %.

Розрахунок розширеної невизначеності вимірювань проводився за формулою:

$$U_{\text{від}} = k \cdot u_c^0 \quad (9)$$

де: $U_{\text{від}}$ — відносна розширена невизначеність, %;

u_c^0 — відносна сумарна стандартна невизначеність, %;

k — коефіцієнт охоплення.

Результати й обговорення. Дані для оцінювання невизначеності вимірювань були отримані в ході експериментальних робіт, проведених у 2015 році. При проведенні досліджень кормової добавки і преміксу відносно відхилення результатів вимірювання від дійсного значення масової концентрації холін хлориду в стандартному зразку не перевищувало 5,0%, а в контрольованих зразках — 7,0%. Модуль різниці результатів двох вимірювань, отриманих в умовах повторності становить не більше 14,0%, а в умовах відтворюваності — $1,4 U_{\text{від}}$.

Оцінювання відносного стандартного відхилення повторюваності проведено із участю двох виконавців, при цьому було встановлено, що значення стандартного відхилення повторів $S_{\text{г,від}}$ становить 4,5%, а стандартного відхилення прецизійності $S_{\text{л,від}}$ становить 6,6%. При застосуванні формули (7) $u_{\text{л,від}}$ дорівнює 5,7%. Приймаючи, що відхилення результатів вимірювання масової концентрації компонентів у зразках для контролю стабільності градуювальної характеристики відповідають нормальному розподілу, отримуємо, що $u_{\text{вим.від}} = 3,5\%$ розраховане за формулою (2). При використанні ваг, для яких значення Δ_m складає $\pm 0,001$ г, знаходимо (5): $u_{\text{м,від}} = 0,06\%$.

При використанні мірної колби 2-го класу точності вмістом 100 см^3 $\Delta_v = \pm 0,20 \text{ см}^3$ (ГОСТ 1770-74). Таким чином, розрахована згідно формули (4) відносна стандартна невизначеність складає $u_{\text{в,від}} = 0,12\%$.

Відносна стандартна невизначеність масової концентрації холін хлориду в запасному розчині ($u_{\text{о,від}}$, %), розрахована за формулою (6), складає 0,32%. Відносна стандартна невизначеність ($u_{\omega, \text{від}}$, %) для ω — 99% (мінімальне значення) складає 0,29% за (3).

Відносна стандартна невизначеність, яка виникає при приготуванні градуювальних розчинів шляхом розведення запасного розчину ($u_{\text{гр,від}}$, %), визначається об'ємом (мірних колб, піпеток, дозаторів). Це значення знаходять за формулою з врахуванням значень окремих відхилень вмісту від номінальних значень за відповідними нормативними документами (ГОСТ 1770 для мірних колб, ГОСТ 29169 для піпеток з однією відміткою, ГОСТ 29227 для градуювальних піпеток і ГОСТ 28311 для дозаторів). Використовуючи наведений алгоритм, знаходимо, що максимальна оцінка значення $u_{\text{гр,від}}$ дозаторів (для градуювального розчину № 3) складає 2,0%. Отримані результати оцінювання невизначеності подано в табл. 2.

Таблиця 2

Результати оцінювання невизначеності методу капілярного електрофорезу визначення вмісту холін хлориду

Джерело невизначеності	Оцінка за типом	Відносна стандартна невизначеність, %
Стандартне відхилення результатів вимірювання в умовах проміжної прецизійності $u_{\text{л(Г,О,Е)}}$	A	5,7
Градуювальні розчини $u_{\text{гр,від}}$	B	2,0
Вимірювання масової концентрації холін хлориду у водяній витяжці з використанням градуювальної характеристики $u_{\text{вим,від}}$	B	3,5
Відносна сумарна стандартна невизначеність		7,1
Відносна розширена невизначеність із коефіцієнтом охоплення $k = 2$, %		14,2
Відносна розширена невизначеність із коефіцієнтом охоплення $k = 2$ (округлено), %		15,0

За результатами таблиці 2, оцінювання невизначеності проводилося за двома типами А і В, відносна сумарна стандартна невизначеність, розрахована за формулою (8) складає 7,1%, а відносна розширена невизначеність (9) із коефіцієнтом охоплення $k = 2$ (з урахуванням заокруглення до ближчого цілого числа в більшу сторону) рівна 15,0%.

В И С Н О В К И

1. Оцінювання невизначеності проводилося за типами А і В, при цьому стандартне відхилення результатів вимірювань в умовах проміжної прецизійності склало 5,7%, відносна сумарна стандартна невизначеність — 7,1%, відносна розширена невизначеність із коефіцієнтом охоплення $k = 2$ — 14,2%, з урахуванням заокруглення до цілого числа в більшу сторону — 15%.

2. Таким чином, при інтерпретації та оформленні результатів випробувань слід враховувати критерії оцінювання невизначеності даного методу при визначенні вмісту холін хлориду в кормових добавках і преміксах, а в протоколах випробувань вказувати значення відносно розширеної невизначеності вимірювань із коефіцієнтом охоплення $k = 2$.

Перспективи подальших досліджень. Подальші дослідження будуть спрямовані на оцінювання придатності методу капілярного електрофорезу при визначенні холін хлориду в комбікормах і БВМД.

CALCULATION OF UNCERTAINTY METHOD CAPILLARY ELECTROPHORESIS DEFINITION OF CHOLINE CHLORIDE CONTENT IN FEED ADDITIVES AND PREMIXES

H. P. Ryvak

State Scientific Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives,
11, Donetska str., Lviv, 79019, Ukraine

S U M M A R Y

In the article the necessity of calculating the uncertainty of analytical methods quantify the content of active substances are a number of regulations that govern the general rules and requirements for evaluating and expressing uncertainty of measurement that should follow at different levels of accuracy for quality assurance testing products. Posted procedure and calculated uncertainty methodology for determining of choline chloride content by capillary electrophoresis by experimental observations and input done their analysis and conclusions.

Keywords: VAGUENESS, EVALUATION OF FITNESS, EXACTNESS, REPETITION, PRODUCIBILITY, RELATIVE TOTAL STANDARD VAGUENESS, RELATIVE EXTENDED VAGUENESS.

РАСЧЕТ НЕОПРЕДЕЛЕННОСТИ МЕТОДА КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ СОДЕРЖАНИЯ ХОЛИН ХЛОРИДА В КОРМОВЫХ ДОБАВКАХ И ПРЕМИКСАХ

Г. П. Рывак

Государственный научно-исследовательский контрольный институт ветеринарных
препаратов и кормовых добавок
ул. Донецкая, 11, г. Львов, 79019, Украина

А Н Н О Т А Ц И Я

В статье обоснована необходимость расчета неопределенности аналитических методик количественного определения содержания действующих веществ, указан перечень нормативных документов, регламентирующих общие правила и требования к оценке и выражению неопределенности измерений, следует соблюдать на различных уровнях точности для обеспечения качества испытаний продукции. Статья содержит процедуру и расчет неопределенности методики определения содержания холин хлорида методом капиллярного электрофореза путем экспериментальных наблюдений и исходных данных, сделан их анализ и соответствующие выводы.

Ключевые слова: НЕОПРЕДЕЛЕННОСТЬ, ОЦЕНИВАНИЕ ПРИГОДНОСТИ, ТОЧНОСТЬ, ПОВТОРЯЕМОСТЬ, ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ, ОТНОСИТЕЛЬНАЯ СУММАРНАЯ СТАНДАРТНАЯ НЕОПРЕДЕЛЕННОСТЬ, ОТНОСИТЕЛЬНАЯ РАСШИРЕННАЯ НЕОПРЕДЕЛЕННОСТЬ.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. ДСТУ ISO/IEC 17025:2006. Загальні вимоги до компетентності випробувальних та калібрувальних лабораторій
2. Рекомендації з оцінювання придатності методів випробувань і калібрувань (видання офіційне). — Київ: Виконавчий орган УкрАО. — 2007. — 61 с.
3. Настанова з оцінювання невизначеності вимірювання результатів кількісних випробувань. Технічний звіт EUROLAB № 1/2006//Переклад з англ. та науково-технічне редагування: А. В. Абрамов; А. М. Коцюба, В. М. Новіков.— Київ, Євролаб-Україна, 2008. — 51 с.
4. Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement: 1 corr. Edition. ISO, Switzerland, 1995.
5. ISO 5725-2:2002. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method — Corrigendum.
6. ISO 13528:2005. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison. 2005. — 66 p.
7. Руководство ЕВРАХИМ/СИТАК «Количественное описание неопределенности в аналитических измерениях» / пер. с англ. ; под ред. Л. А. Конопелько. — 2-е изд. — СПб.: ВНИИМ им. Д. И. Менделеева, 2002. — 141 с.

Рецензент — Д. В. Янович, д. с.-г. н., ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок.