

**ОЦЕНКА НЕОПРЕДЕЛЕННОСТИ ИЗМЕРЕНИЙ СОДЕРЖАНИЯ
ЛИГНАНА СЕКОИЗОЛАРИЦИРЕЗИНОЛА ДИГЛЮКОЗИДА
В СЕМЕНАХ ЛЬНА***Белорусский государственный технологический университет, Минск*

Введение. В настоящее время в Республике Беларусь актуальным вопросом является идентификация биологически активных соединений в различных растениях. На основе растительного сырья, богатого такими соединениями, возможно создание лекарственных препаратов, биологически активных добавок, фитопрепаратов. В плане характера воздействия на организм, лекарственные средства растительного происхождения имеют ряд преимуществ перед синтетическими аналогами, как правило, они имеют мягкий, более выраженный терапевтический эффект [1, 2].

Лигнаны – природные фенольные соединения, обладающие широким спектром биологической активности, содержащиеся в различных органах некоторых растений. Семена льна масличного богаты лигнаном секоизоларицирезинола диглюкозидом (СДГ). Данное соединение обладает антиоксидантным, противоопухолевым и антимикробным действием. На основе семян льна, а также лигнана СДГ возможно создание фитопрепаратов и лекарственных средств, поэтому точность определения данного компонента, как в препарате, так и в исходном сырье является актуальным вопросом [1, 2]. В соответствии с национальным стандартом СТБ ИСО/МЭК 17025 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий» оценка точности результата измерений должна сопровождаться расчетом неопределенности.

Неопределенность (измерения) – это параметр, связанный с результатом измерения и характеризующий разброс значений, которые с достаточным основанием могут быть приписаны измеряемой величине. В отличие от погрешности этот параметр характеризует более широкий разброс значений и помогает определить истинное значение измеряемой величины.

Цель данной работы – выявление, анализ и количественная оценка неопределенности измерений содержания лигнана СДГ в семенах льна.

Материалы и методы. Количественное содержание СДГ в семенах льна в расчете на обезжиренное сырье (мг/г) определяли методом ВЭЖХ. Условия проведения анализа представлены в [2]. Перед проведением анализа проводили пробоподготовку, то есть получали лигнанобогащенные экстракты. Общая схема получения лигнансодержащих экстрактов включала в себя следующие стадии: измельчение и обезжиривание семян льна, высушивание, взвешивание, экстракцию водно-этанольной смесью, совмещенную со щелочным гидролизом [2].

В данной работе применялся модельный подход для оценки неопределенности. Были выявлены источники неопределенности, рассчитаны

стандартные, суммарная и расширенная неопределенности. Стандартные неопределенности рассчитывали на основании статистического распределения результатов ряда наблюдений (по типу А), а также на основании предполагаемых распределений вероятностей, основанных на опыте (по типу Б) [3].

Результаты и их обсуждение. Выявленные источники неопределенности при анализе содержания СДГ в семенах льна методом ВЭЖХ и результаты их расчета представлены в таблице.

Таблица 1 – Количественные характеристики источников неопределенности измерений содержания СДГ в семенах льна

Входная величина	Обозначение входной величины	Стандартная неопределенность	Ссылка на формулу, по которой ведется расчет
Масса обезжиренных семян, г	m	$5,77 \cdot 10^{-4}$	(1)
Объем основного раствора с учетом погрешности калибровки пипет-дозатора, мкл	V_{k1}	2,4495	(2)
Объем основного раствора с учетом поправки на температуру, мкл	V_{t1}	2,8868	(1)
Чистота коммерческого препарата СДГ, %	$P_{СДГ}$	1,15	(1)
Объем градуировочных растворов (200, 100, 50, 25 мкг/мл) с учетом погрешности калибровки пипет-дозатора, мкл	V_{k2}	2,4495	(2)
Объем градуировочных растворов (200, 100, 50, 25 мкг/мл) с учетом поправки на температуру, мкл	V_{t2}	0,2887	(1)
Концентрация СДГ по калибровочному графику, мкг/мл	C_0	0,015	(3–5)
Объем экстракта с учетом погрешности калибровки мерной посуды, мл	V_{k3}	2,04	(2)
Объем экстракта с учетом поправки на температуру, мл	V_{t3}	0,6	(1)
Повторяемость метода, мг/г	$C_{СДГ}^{повт.}$	0,057	(6)

Как видно из таблицы 1, в процессе подготовки пробы для анализа неопределенность вносит погрешность калибровки весов при определении массы обезжиренных семян, фактор неполного высушивания семян, фактор экстракции, фактор гидролиза. Неопределенностью последних факторов пренебрегали в расчете на то, что гидролиз, экстракция и высушивание проходят полностью. Количество СДГ, содержащееся в экстракте, находили с помощью построенной градуировочной зависимости. С этой целью были приготовлены четыре градуировочных раствора с концентрациями 200, 100, 50, 25 мкг/мл из исходного основного раствора с концентрацией СДГ 1000 мкг/мл. Приготовление градуировочных растворов также вносит вклад в неопределенность измерений. На концентрацию основного раствора влияет степень чистоты коммерческого препарата СДГ (ChromaDex, США), погрешность калибровки пипет-дозатора (перед поставкой дозаторы

калибруются), поправка объема пипет-дозатора на температуру (дозатор калибруется при температуре 20°C, когда в лаборатории температура колеблется (20 ± 5) °C).

На концентрацию градуировочных растворов, приготовленных из основного раствора, влияет неопределенность разведения, которая складывается также из погрешности калибровки пипет-дозаторов и поправки объема на температуру. При определении объема полученного экстракта учитывали вклад неопределенности за счет погрешности калибровки мерной посуды и поправки объема на температуру.

Стандартные неопределенности вышеуказанных факторов рассчитывались по формуле 1 или 2 в зависимости от треугольного или прямоугольного типа распределения случайной величины соответственно.

$$u(x_i) = \frac{a}{\sqrt{3}} \quad (1)$$

$$u(x_i) = \frac{a}{\sqrt{6}} \quad (2)$$

где $u(x_i)$ – стандартная неопределенность; a - интервал, в котором находится оцененное значение (информацию о котором получали из свидетельств о калибровке, паспортов средств измерений, стандартов на мерную посуду и других источников).

Треугольное распределение использовали при оценке вкладов неопределенности, связанных с применением мерной посуды.

На неточность определения концентрации лигнана по градуировочной кривой влияет неопределенность, возникающая при ее построении методом наименьших квадратов. Расчет этой стандартной неопределенности производился в соответствии с формулами 3–5 [3].

$$u(C_0) = \frac{S}{b} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_0 - \bar{C})^2}{S_{xx}}} \quad (3)$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [A_i - (f + g \cdot C_i)]^2}{n - 2}} \quad (4)$$

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^n (C_i - \bar{C})^2 \quad (5),$$

где A – площадь пика; S – остаточное стандартное отклонение; f, g – коэффициенты в уравнении для градуировочной прямой; p – число измерений при определении C_0 ; n – общее число измерений при градуировке; C_0 – найденное значение концентрации СДГ в семенах льна; \bar{C} – среднее значение концентрации для градуировочных растворов; i – общий индекс измерения при градуировке.

Повторяемость метода рассчитывали как среднеквадратическое отклонение (СКО) результатов измерений по формуле 6.

$$u(x_i) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n \cdot (n-1)}} \quad (6),$$

где $u(x_i)$ – стандартная неопределенность; \bar{x} – среднее значение результатов измерений; n – количество проведенных измерений.

Суммированием всех стандартных неопределенностей, выраженных в относительных единицах, находили суммарную неопределенность по формуле 7.

$$U_c = C \sqrt{\left(\frac{u(m)}{m}\right)^2 + \left(\frac{u(V_{k1})}{V_{k1}}\right)^2 + \left(\frac{u(V_{t1})}{V_{t1}}\right)^2 + \left(\frac{u(P_{\text{СДГ}})}{P_{\text{СДГ}}}\right)^2 + 4\left(\frac{u(V_{k2})}{V_{k2}}\right)^2 + 4\left(\frac{u(V_{t2})}{V_{t2}}\right)^2 + \left(\frac{u(C_0)}{C_0}\right)^2 + \left(\frac{u(V_{k3})}{V_{k3}}\right)^2 + \left(\frac{u(V_{t3})}{V_{t3}}\right)^2 + \left(\frac{u(C^{\text{повт.}})}{C}\right)^2} \quad (7),$$

Рассчитанная суммарная неопределенность количественного содержания СДГ составила $U_c(C_{\text{сдг}}) = 0,7213$ мг/г. Также была рассчитана расширенная неопределенность, обозначающая интервал вокруг результата измерений, в пределах которого находится большая часть распределения значений. Принимали коэффициент охвата $k=2$ для интервала, имеющего уровень доверия 95% ($U=2 \cdot U_c(C_{\text{сдг}}) = 2 \cdot 0,7213 = 1,44$ мг/г). Таким образом, содержание СДГ в семенах льна с учетом расширенной неопределенности составило $(14,20 \pm 1,44)$ мг/г.

Выводы. Была оценена неопределенность измерений содержания лигнана СДГ в семенах льна путем выявления источников неопределенности, расчета стандартных, суммарных и расширенных неопределенностей. Таким образом, расширенная неопределенность измерений содержания СДГ в семенах льна составила 1,44 мг/г. Представленная схема расчета может использоваться для разработки методики расчета неопределенности при количественном анализе лигнанов и других биологически активных соединений, как в растительном материале, так и в фитопрепаратах на основе данных веществ.

Литературные источники

1. Mazur, W. Naturally occurring oestrogens in food / W. Mazur, H. Adlercreutz // Pure & Appl. Chem. – 1998. – Vol. 70, № 9. – P. 1759–1776.
2. Стасевич, О.В. ВЭЖХ анализ лигнансодержащих экстрактов из семян льна масличного / О.В. Стасевич, С.Г. Михаленок, В.П. Курченко // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2008. – № 6. – С. 903–909.
3. Количественное описание неопределенности в аналитических измерениях. Руководство Еврахим/Ситак / под ред. Л.А. Конопелько; пер. Р.Л. Кадиса. – Санкт-Петербург : ВНИИМ им. Д.И. Менделеева, 2002. – 149 с.

O.V. Stasevich

THE ESTIMATION OF UNCERTAINTY OF MEASUREMENTS DURING THE DETERMINATION OF SECOISOLARICIRESinOL DIGLUCOSIDE IN FLAXSEED

Summary

In this work the estimation of uncertainty of quantitative identification of lignan secoisolariciresinol diglucoside (SDG) in flaxseed is performed. It is possible to create drugs on the basis of flaxseed and lignan SDG, that is why the accuracy of definition of this component is an actual question. The performed scheme of estimation of uncertainty can be used for the definition of biological active substances both in the vegetable material and drugs based on these compounds.