

УДК 543.426

В. Карманов, д-р техн. наук
Л. Тараборкін, канд. фіз.-мат. наук
М. Слободяник, д-р хім. наук

ОЦІНКА НЕВИЗНАЧЕНОСТІ ДЛЯ РЕНТГЕНОФЛУОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛІЗУ РЕЧОВИНИ

Розглянуто теоретичні й практичні аспекти оцінки невизначеності для рентгенофлуоресцентного аналізу речовини. Наведено процедуру оцінки невизначеності на прикладі аналізу вмісту мангану в зразку ферромангану.

Theoretical and practical aspects of quantifying uncertainty for XRFA of materials are considered. The procedure for the assessment of uncertainty in case of the content analysis of manganese in a ferromanganese sample is described in details.

Нині, в умовах активного поступу України до європейських та інших міжнародних структур, великого значення набуває проблема освоєння й упровадження в аналітичну практику нового підходу для характеристики якості вимірювань – концепції невизначеності вимірювань. Відповідне "Керівництво для вираження невизначеності у вимірюваннях" [6], опубліковане в 1993 р. Міжнародною організацією зі стандартизації (ISO), було розроблене під егідою ISO та ряду інших авторитетних міжнародних організацій, які утворили Об'єднаний комітет з керівництв у галузі метрології (JCGM). Відзначимо, що до нього також приєдналась організація з Міжнародного співробітництва у сфері акредитації лабораторій (ILAC). До кінця минулого століття зазначений документ [6] трансформувався в стандарт США [3] і Європейський стандарт [4].

З 1 січня 2005 р. в нашій державі діє нова редакція Закону України "Про метрологію та метрологічну діяльність", яка на законодавчому рівні вводить ще один метод оцінювання результатів вимірювань – невизначеність вимірювань (ст. 10 Закону).

Отже, актуальність детального вивчення концепції невизначеності вимірювань (особливо в частині порівняння її з класичною теорією похибок) і застосування її для подання результатів вимірювань в Україні є безсумнівною.

Розглянемо в цьому контексті особливості аналітичних вимірювань для визначення хімічного складу речовини методом рентгенофлуоресцентного аналізу (РСФА) і процедури оцінювання відповідних невизначеностей.

Спиратися при цьому будемо на документ ЄВРА-ХІМ/СІТАК "Кількісний опис невизначеності в аналітичних вимірюваннях" [5], що вийшов другим, переробленим і доповненим виданням у 2000 р.

Відзначимо, що концепція невизначеності вимірювання фактично виключає з розгляду поняття істинного значення вимірюваної величини, що є цілком виправданим у випадку аналітичних досліджень хімічного складу речовини (оскільки, наприклад, істинне значення вмісту певного хімічного елемента в зразку теоретично дорівнює точній кількості атомів цього елемента в зразку, яке, очевидно, практично визначити неможливо). Звідси випливає, що в загальному випадку втрачає сенс і традиційне поняття похибки вимірювань.

Відповідно до документа [5], можливі два основні підходи до оцінювання невизначеності в аналітичних вимірюваннях. Перший передбачає розгляд усіх і кожного зокрема джерел невизначеності та наступне сумування складових підсумкової невизначеності, ураховуючи рівняння вимірювань. Другий підхід базується на безпосередньому визначенні сумарного внеску невизначеності від деяких або всіх цих джерел з використанням характеристик конкретної аналітичної методики в цілому. За другого підходу аналітичну лабораторію, що виконує аналіз за даною методикою, розглядають як один з елементів множини лабораторій, використовуючи для розрахунку невизначеності результати міжлабораторного експерименту й застосо-

вуючи методи статистичної обробки даних, що не потребує знання формалізованих функцій і детального аналізу впливу різних факторів у РСФА. Допустима також комбінація описаних двох підходів.

Необхідно відзначити, що розвинута таким чином у документі [5] концепція визначення невизначеності для аналітичних досліджень істотно розширює положення вихідного документа ISO [6].

Дослідження відповідності числових параметрів невизначеності та характеристик похибки приводить до необхідності розрізняти невизначеності результатів вимірювань і невизначеність вимірюваної величини для РСФА.

Як і в загальному випадку, для РСФА необхідно враховувати невизначеність вимірювань типу *A*, якщо її зумовлено джерелами випадкового характеру, і типу *B*, якщо невизначеність пов'язано з джерелами, які мають систематичний характер. При цьому не можна забувати, що насправді невизначеності класифікують не за природою їхньої появи (подібно до похибок – "випадкові" та "систематичні"), а за способом їхнього оцінювання, а саме: невизначеності за типом *A* оцінюють *апостеріорно* за допомогою статистичного аналізу результатів багаторазових вимірювань, тоді як невизначеності за типом *B* – *априорно*, використовуючи, наприклад, дані перевірки, калібрування, паспортних відомостей про прилад, відомостей про невизначеності констант і довідкових даних, загальної інформації по поведінку та властивості приладів і матеріалів.

Відповідно до документа [5], наведемо можливі джерела невизначеності на різних етапах реалізації аналітичної процедури в разі використання спектральних методів:

- 1) на етапі пробовідбору слід урахувати фактори неоднорідності матеріалу зразка, вплив обраної стратегії відбору, фізичний стан матеріалу, можливий вплив процесу відбирання проб для визначення складу зразка тощо;
- 2) на етапі пробопідготовки беруть до уваги ефекти гомогенізації, шліфування поверхні, помел, забруднення тощо;
- 3) на етапі калібрування вимірювального приладу – похибки калібрування, виконаного за допомогою стандартних зразків;
- 4) на етапі аналізу – вплив матриці зразка й супутніх елементів, установка параметрів вимірювального приладу й систематичні ефекти, внесені оператором-людиною;
- 5) на етапі обробки даних – вплив похибок арифметичних операцій, статистичних процедур і неадекватності вибраних моделей і розрахункових алгоритмів;
- 6) нарешті, на етапі подання результатів невизначеність вносить сама оцінка невизначеності та вибраний рівень надійної ймовірності.

Очевидно, що в загальному випадку практично надто складно виконати вичерпний опис кожного з можливих джерел невизначеності для установлення хімічного складу матеріалів спектральними методами.

Розглянемо в цьому ракурсі оцінювання невизначеності для РСФА, виконаного з використанням розрахунково-емпіричних співвідношень для знаходження

інтенсивності випромінювання від концентрації визначуваного елемента [1].

Рівняння вимірювань у цій ситуації можна подати у вигляді однієї з таких моделей:

$$C^{(1)} = a_1 I + a_0, \quad (1)$$

$$C^{(2)} = b_2 I^2 + b_1 I + b_0, \quad (2)$$

$$C^{(3)} = a_0 + \sum_{j=1}^n a_j I_j, \quad (3)$$

де $I(I_j)$ – інтенсивність випромінювання (j -го елемента); $C^{(k)}$, $k=1,2,3$ – концентрація визначуваного елемента (речовини), верхній індекс позначає номер використовуваної моделі; a_j, b_j – коефіцієнти, значення яких установлюють під час калібрування спектрометра.

Подані моделі насправді є моделями регресії (лінійної, квадратичної та множинної відповідно), а зазначені коефіцієнти обчислюють методом найменших квадратів.

Порядок розрахунку невизначеності в рамках лінійної моделі (1) (але в дещо іншій ситуації – для калібрування вимірювального приладу) детально викладено в документі [5].

Розглянемо детальніше випадок РСФА з використанням рівняння вимірювань (1). Керуючись документом [5], сформулюємо опис чотирьох основних джерел невизначеності, що зумовлюють невизначеність оцінюваного значення концентрації аналізованого елемента:

1) випадкові коливання у вимірюваннях характеристичної інтенсивності елемента, що впливають як на значення інтенсивності для стандартних зразків, так і аналізованого зразка (наприклад, унаслідок особливостей установки проби в прилад, непаралельності під час пресування тощо);

2) випадкові ефекти, зумовлені невизначеністю атестованих значень концентрацій елементів у стандартних зразках;

3) одержані значення інтенсивностей і концентрацій можуть бути піддані певному невідомому зміщенню (наприклад, викликаному дрейфом апаратури, репера або неточною установкою струму чи напруги на рентгєнівській трубці);

4) припущення про лінійність моделі може виявитися неадекватним.

Для калібрування фактично синтезують регресійну модель вигляду

$$I = b_0 + b_1 C, \quad (4)$$

де C – концентрація вимірюваного елемента в еталонному зразку, I – отримана під час вимірювання інтенсивність випромінювання. Після синтезу моделі її використовують, для визначення концентрації досліджуваного елемента $C^{(1)}$ у зразку за формулою (1) (що впливає з формули (4) очевидним чином), в якій $a_0 = -(b_0/b_1)$,

$a_1 = 1/b_1$, $I = I^{(1)}$ – спостережувана інтенсивність випромінювання. Тоді дисперсію $\text{var}(C^{(1)})$, необхідну для знаходження невизначеності, обчислюємо за формулою

$$\text{var}(C^{(1)}) = \frac{S^2}{b_1^2} \left(\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C^{(1)} - \bar{C})^2}{\sum_{k=1}^n (C_k - \bar{C})^2} \right),$$

де S – середньоквадратичний залишок, обчислюваний за формулою $S = \sqrt{\sum (I_k - I^{(1)})^2 / (n-2)}$, $\bar{C} = (\sum_{k=1}^n C_k) / n$, n – кількість зразків, p – кількість паралельних вимірювань.

Розглянемо конкретний приклад аналізу вмісту мангану у феромангані. Для калібрування виконали вимірювання інтенсивності MnK_{α} в 11 зразках:

Номер зразка	Концентрація, %	Відносна інтенсивність
1	91.5	1.00
2	88.9	0.95
3	89.4	0.98
4	79.3	0.82
5	89.6	0.95
6	87.9	0.96
7	85.0	0.91
8	83.2	0.88
9	87.7	0.92
10	90.7	0.99
11	83.3	0.88

Обробка даних методом найменших квадратів дає: $b_0 = -0.305$; $b_1 = 0.014$. Стандартна похибка оцінки дорівнює 0.032 (для 9 степенів вільності), а коефіцієнт кореляції $r = 0.98$.

Показник	Значення	Стандартна похибка
b_0	-0,305	0,091
b_1	0,014	0,001

У разі, коли виконано лише одне вимірювання ($p=1$) дисперсія для $C^{(1)} = 0.9$ дорівнює

$$\text{var}(C^{(1)}) = \frac{0.0243^2}{0.014^2} \left(\frac{1}{1} + \frac{1}{11} + \frac{(88.298 - 86.965)^2}{\sum (C_k - 0.926)^2} \right) \cong 4.34$$

Тоді стандартне відхилення буде мати значення 2.08, отже, стандартна невизначеність $u(C) = 2.08$.

Аналіз одержаного регресійного рівняння показує, що лінійна модель задовільно описує оброблені експериментальні дані, залишки не мають систематичного тренду і немає необхідності підвищувати порядок рівняння (перевірка свідчить, що член другого порядку буде статистично незначущим).

Отже, четвертим із перелічених джерел невизначеності можна знехтувати.

Розраховуючи невизначеність вимірювань, виконуваних методом РСФА для встановлення хімічного складу зразків, слід узяти до уваги такі джерела невизначеності, оцінювані за типом B:

- ✓ невизначеність еталонів (стандартних зразків);
- ✓ невизначеність пробопідготовки;
- ✓ невизначеність приладу (спектрометра).

Невизначеність еталонів (стандартних зразків) оцінимо за даними Свідоцтва на стандартний зразок. У нашому випадку, наприклад, стандартний зразок феромангану 201д має атестований вміст мангану 91.5 ± 0.1 , де величина після знака "±" відповідає надійній імовірності 0.95 (за даними дев'яти лабораторій). Оскільки вид розподілу у свідоцтві не зазначено, розраховуємо невизначеність стандартного зразка як $u_0 = 0.1/2 = 0.05$ [4].

Відносно невизначеності пробопідготовки слід послатися на відоме з літератури твердження, що для відлагодженої методики РСФА похибка процедури пробопідготовки має бути істотно меншою за сумарну похибку аналізу. Переформулювавши це твердження в термінах невизна-

ченості, можна сказати, що невизначеність, зумовлена прободіготовкою, у відлагодженій методиці має бути істотно меншою за невизначеність вимірювань.

Розглядаючи для конкретності такі процедури прободіготовки зразків для РСФА, як механічне подрібнення й шліфування поверхні, можемо відзначити, що невизначеність, зумовлена зазначеними процедурами, для відлагодженої методики має бути досить малою порівняно з невизначеністю результатів аналізу, тому нею завдяки цьому нехтуємо.

Однак у загальному випадку (наприклад, у разі розробки методики визначення хімічного складу матеріалів методом РСФА) невизначеність, пов'язану з прободіготовкою, слід розраховувати на основі оцінки відтворюваності вимірювань інтенсивності для серії з 10–15 паралельних проб і розрахунку середньоквадратичного відхилення.

Насамкінець, невизначеність спектрометра оцінимо за даними перевірки приладу.

У нашому випадку межа абсолютної похибки для надійної ймовірності 0.95 становить 0.18 %. Оскільки вид розподілу в перевірочному документі не зазначено, розраховуємо невизначеність спектрометра як $u_d = 0.18/2 = 0.09$ 0.18/2=0.09 [5].

Тепер можемо розрахувати комбіновану невизначеність звичайним чином як корінь квадратний із суми квадратів невизначеностей:

$$u_c = \sqrt{u(C)^2 + u_0^2 + u_d^2} = \sqrt{2.08^2 + 0.05^2 + 0.09^2} \approx 2.081$$

Тоді результат вимірювання вмісту мангану в зразку феромангану подамо у вигляді 88.3; 2.08.

Розширену невизначеність обчислимо, використовуючи коефіцієнт покриття 2:

$$U_r = 2.081 \times 2 = 4.16$$

УДК 543.2, 542.61, 611.185.1

Результат розрахунку розширеної невизначеності вмісту мангану в досліджуваному зразку подамо у вигляді $(88.30 \pm 4.16)\%$, $P = 0.95$.

Аналогічно, скориставшись відомими формулами методу найменших квадратів для розрахунку дисперсій і коваріацій, можна одержати оцінку невизначеності для квадратичної регресійної моделі (2).

Порядок оцінювання невизначеності в рамках лінійної моделі множинної регресії (3) відповідно до документу [6] подано в роботі [2].

Оскільки невизначеність розраховують як дисперсію досить великої кількості (більше 10) вимірювань, то застосування поняття невизначеності для подання результатів РСФА має практичний сенс у випадку виконання акредитаційних випробувань або атестації методик. Проте у випадку виконання поточних оперативних аналітичних вимірювань (наприклад, у заводських лабораторіях), коли з міркувань доцільності або вимушено реально допустиму кількість вимірювань обмежено, звичайний стандартний спосіб подання результатів вимірювань варто залишити без змін.

1. Кадис Р.Л. Оценивание неопределенности в аналитических измерениях. От Руководства ISO к Руководству ЕВРАХИМ/СИТАК: от общего к частному и обратно // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. – 2002. – Т. 68, № 6. – С. 52–60. 2. Ціделко В.Д., Яремчук Н.А. Невизначеність вимірювання. Обробка даних і подання результату вимірювання: Монографія. – К., 2002. 3. ANSI/NCCL Z540-2-1997 U.S. Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement. – National Conference of Standards Laboratories. 4. ENV 13005:1999 Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement. – European Committee for Standardization. 5. EUROCHEM/CITAK Guide. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement: Second edition. – 2000. 6. Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement: First Edition. – ISO, Switzerland, 1993.

Надійшла до редакції 07.05.07

Т. Костюк, асп.,
С. Куліченко, канд. хім. наук

НИЗКОТЕМПЕРАТУРНА МІЦЕЛЯРНА ЕКСТРАКЦІЯ ДЛЯ КОНЦЕНТРУВАННЯ БІОМОЛЕКУЛ

Досліджено вплив природи та концентрації неіонних ПАВ, кислотності, різних добавок на параметри фазоутворення в розчинах при температурі помутніння. Досліджена можливість вилучення альбуміну в міцелярні фази неіонних ПАВ Triton X-100 та Акуро LF1. Показано, що природа ПАВ і кислотність середовища є основними факторами регулювання процесу екстракції.

The influence of nature and concentration of the nonionic surfactants, acidity and introduction of different additives on parameter of the phase separation at the cloud point temperature was investigated. The possibility of the extraction of albumin into micellar-rich phases of the nonionic surfactants was shown. The nature of surfactants and the acidity of the medium are the base factors for the regulation of the micelle extraction processes was indicated.

Вступ. Останнім часом все більший інтерес викликає міцелярно-екстракційне концентрування органічних речовин для подальшого визначення фізичними та фізико-хімічними методами [5–7; 12]. У першу чергу, це зумовлено вимогами до створення простих, експресних та чутливих методик визначення мікрокількостей органічних сполук, у тому числі білкової природи, в об'єктах навколишнього середовища та біологічних рідинах. Незважаючи на інтенсивний розвиток фізико-хімічних методів аналізу, визначення органічних сполук в об'єктах зі складним фоновим складом залишається нетривіальним завданням. Так, у клінічному аналізі традиційні лабораторно-діагностичні методи часто не вирішують проблему визначення білка в сечі на рівні норми та при початкових патологічних станах [2; 10]. Тому проблема розробки ефективних методів концентрування біологічних молекул залишається актуальним.

Міцелярна екстракція є ефективним прийомом концентрування, очищення та розділення компонентів біологічних рідин, у тому числі й протеїнів; чутливим, точним і експресним методом розділення гідрофобних і гідрофільних біоматеріалів при аналізі великої кількості зразків [11]. Ряд методик біохімічної очистки протеїнів з використанням міцелярної екстракції фазами НПАВ прийняті як стандартні [13; 14]. Трициклова методика міцелярно-екстракційного розділення з використанням Triton X-100 була використана для вилучення ($R > 99\%$) ендотоксину з препаратів протеїну. Методика не втрачає ефективності при роботі з великими кількостями протеїну (в інтервалі 200–500 мг) [15]. У деяких випадках міцелярна екстракція фазами НПАВ виступає альтернативою хроматографічному методу очистки та розділення рослинних протеїнів. Так, додатки НПАВ перешкоджають взаємодії фенолів з ферментом, що аналізують, унаслідок якої можуть змінитися характеристики