



Оценка неопределенности результатов измерений при определении потери в массе при высушивании биологических лекарственных препаратов

О.В. Фадейкина , А.А. Воропаев, Д.С. Давыдов, Р.А. Волкова

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

 Фадейкина Ольга Васильевна; fadeikina@expmed.ru

Резюме

Актуальность. Исследование неопределенности результатов измерений, проводимых испытательными лабораториями, предусмотрено ГОСТ ISO/IEC 17025-2019. Оценивание неопределенности методик испытаний биологических лекарственных препаратов представляет собой сложную задачу, требующую особого подхода и значительных временных и трудовых ресурсов. Актуальной является оценка неопределенности измерений на примере методики определения потери в массе при высушивании биологических лекарственных препаратов, поскольку в процессе ее реализации анализируется именно результат измерения (взвешивания) физической величины – массы.

Цель. Оценить неопределенность результатов измерений при определении потери в массе при высушивании биологических лекарственных препаратов.

Материалы и методы. Субстанция-порошок для изготовления бифидосодержащего препарата (исследуемый образец). Испытание проводили в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации ОФС.1.2.1.0010.15. Статистическую обработку результатов выполняли с использованием программы Microsoft Excel. Расчет неопределенности проводили двумя способами: при помощи подхода «снизу вверх» и с использованием доверительного интервала.

Результаты. Идентифицированы составляющие неопределенности, влияющие на результат измерения потери в массе при высушивании. Расширенная неопределенность, рассчитанная с использованием подхода «снизу вверх», составила 0,34% (коэффициент охвата $k=2$, уровень доверия приблизительно 95%), при этом наибольший вклад вносит неопределенность измерения массы бюкса после высушивания образца – 0,147%; наименьший вклад – неопределенность измерения массы пустого бюкса – 0,003%. Неопределенность двух параллельных измерений, рассчитанная с помощью доверительного интервала, составила 0,32%.

Выводы. Два подхода к расчету неопределенности результатов измерений потери в массе при высушивании дают сопоставимые результаты. Анализ бюджета неопределенности выявил, что наибольший вклад в результат испытания вносит неопределенность измерения массы бюкса после высушивания образца, что требует тщательного контроля условий пробоподготовки. Для оценки неопределенности может быть использован способ расчета с помощью доверительного интервала. Методология анализа методики потери в массе при высушивании с точки зрения выявления факторов, влияющих на результат испытания, и представленные способы расчета неопределенности могут быть полезны специалистам испытательных лабораторий.

Ключевые слова: потеря в массе при высушивании; неопределенность результатов измерений; бюджет неопределенности; биологические лекарственные препараты

Для цитирования: Фадейкина О.В., Воропаев А.А., Давыдов Д.С., Волкова Р.А. Оценка неопределенности результатов измерений при определении потери в массе при высушивании биологических лекарственных препаратов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(3–1):452–462. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-1-452-462>


Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022000147-4).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Estimation of measurement uncertainty for the determination of loss on drying of biologicals

Olga V. Fadeikina , Andrey A. Voropaev, Dmitry S. Davydov, Rauza A. Volkova

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

 Olga V. Fadeikina; fadeikina@expmed.ru

Abstract

Scientific relevance. GOST ISO/IEC 17025-2019 requires testing laboratories to evaluate the measurement uncertainty of their results. Estimating the uncertainty of analytical methods intended for biologicals is a challenging task that requires time, effort, and a special approach. Measurement uncertainty estimation is of particular interest in the case of measuring loss on drying (LOD) for biologicals, since LOD testing procedures involve analysing measurements of a physical value, i.e. mass.

Aim. This study aimed to estimate the measurement uncertainty of LOD determination in biological medicinal products.

Materials and methods. The study examined a powdered active substance intended for a *Bifido-bacterium* product (test sample). The authors conducted the LOD test in accordance with the State Pharmacopoeia of the Russian Federation (OFS.1.2.1.0010.15). Statistical processing of the results was performed using Microsoft Excel. To estimate the measurement uncertainty, the authors employed the bottom-up approach or used the standard deviation from testing results.

Results. The authors identified the uncertainty components that affected the LOD determination results. When calculated using the bottom-up approach, the expanded uncertainty was 0.34% (coverage factor, $k=2$; approximate confidence level, 95%). In particular, the largest contributor to the expanded uncertainty was the uncertainty of measuring the mass of weighing bottles containing dried test samples (0.147%), whereas the smallest contributor was the uncertainty of weighing empty bottles (0.003%). When calculated using the standard deviation, the uncertainty of two parallel measurements amounted to 0.32%.

Conclusions. Both approaches to calculating LOD measurement uncertainty yield comparable results. According to the uncertainty budget analysis, the uncertainty of measuring the mass of weighing bottles with dried test samples is the major contributor to the test result. For this reason, the conditions of sample preparation should be carefully controlled. The study results confirm that the LOD measurement uncertainty can be calculated using the standard deviation. Testing laboratory teams may benefit from the methods for identifying the factors influencing LOD test results and the methods for calculating the uncertainty of measurement described in this study.

Key words: loss on drying; measurement uncertainty; uncertainty budget; biologicals

For citation: Fadeikina O.V., Voropaev A.A., Davydov D.S., Volkova R.A. Estimation of measurement uncertainty for the determination of loss on drying of biologicals. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(3–1):452–462. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-1-452-462>

Funding. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00052-23-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022000147-4).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Введение

В соответствии с требованиями межгосударственного стандарта ГОСТ ISO/IEC 17025-2019¹ лаборатория, проводящая испытания, должна осуществлять оценку неопределенности измерений. Неопределенность является характеристикой качества результата измерения. Сведения о неопределенности необходимы для того, чтобы оценить достоверность полученного результата в соответствии с предъявляемыми требованиями² и иметь возможность сопоставить его с результатами, полученными в других лабораториях.

В ряде документов Департамента по вопросам стандартизации биологических препаратов, сети официальных лабораторий по контролю лекарственных средств и здравоохранения (Department of Biological Standardisation, Network of Official Medicines Control Laboratories, and Healthcare, DBO) Европейского директората по качеству лекарственных средств и здравоохранения (European Directorate for the Quality of Medicines, Council of Europe, EDQM) описано несколько подходов к оценке неопределенности результатов измерений при количественных испытаниях, проводимых в официальных лабораториях по контролю качества лекарственных средств³.

Подход «снизу вверх» («пошаговый», bottom-up) предполагает проведение оценки всех факторов неопределенности, возникающих в результате влияния каждого отдельно взятого источника. Неопределенность измерений, оцениваемую с помощью стандартного отклонения параллельных измерений, называют стандартной (u). Для оценки разброса значений, который может быть приписан измеряемой величине с определенной долей вероятности (уровнем доверия), вычисляют суммарную (u_c) и/или расширенную неопределенность (U).

Оценивание неопределенности методик испытаний биологических лекарственных препаратов (БЛП) представляет собой сложную задачу, требующую особого подхода и значительных временных и трудовых ресурсов [1]. При реализации большинства биологических и аналитических методик, применяемых при контроле БЛП, аналитики имеют дело с результатом испытания,

а не прямого измерения конкретной величины, что осложняет применение традиционных метрологических подходов как при оценке показателей точности методик, так и при оценке их неопределенности [2].

Методика определения потери в массе при высушивании была использована в качестве модели для оценки неопределенности, так как в процессе ее реализации аналитик имеет дело именно с результатом измерения (взвешивания) физической величины – массы.

Физические методики оценки остаточной влажности (показатель качества «Потеря в массе при высушивании») в лиофилизированных БЛП широко применяются из-за простоты их выполнения, универсальности, отсутствия необходимости использования сложного оборудования. В основе данных методик лежит разница давления над поверхностью образца, которое должно превышать парциальное давление паров воды окружающей среды, что достигается высушиванием пробы при высоких температурах (например⁴, при 100–105 °С). Парциальное давление можно изменить физическим способом, создавая вакуум, или химически, используя влагопоглотители, например оксид фосфора. В Государственной фармакопее Российской Федерации (ГФ РФ)⁵ приведены все вышеперечисленные методики для определения потери в массе при высушивании лекарственных препаратов. Испытания проводят при разных температурах и давлении в зависимости от типа образцов.

Однако описанная в ГФ РФ методика оставляет вне внимания ряд важных аспектов пробоподготовки, связанных с проведением испытаний по потере в массе при высушивании, которые необходимо учесть для получения достоверных результатов.

1. Высота слоя навески образца. Высота слоя влияет на скорость процесса высушивания образца при одинаковой массе навески. При фиксированном времени высушивания разница в высоте слоя будет оказывать влияние на результаты измерений. Косвенно толщина слоя лимитируется диаметром бюкса и массой навески⁶. Возможным решени-

¹ ГОСТ ISO/IEC 17025-2019. Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий.

² Там же.

³ Evaluation of measurement uncertainty. Core document (PA/PH/OMCL (18) 145 R1 CORR). EDQM; 2020.

⁴ ОФС.1.2.1.0010.15 Потеря в массе при высушивании. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

⁵ Там же.

⁶ Там же.

ем является уточнение методики, аналогично описанию методики в Фармакопее США⁷, где указывается, что образец должен быть равномерно распределен в бюксе и высота слоя не должна превышать 5 мм (или 10 мм для рыхлых веществ).

2. Размер частиц в навеске образца. В ГФ РФ отсутствуют рекомендации относительно размера частиц при формировании навески образца, хотя размер частиц может непосредственно влиять на скорость и полноту процесса высушивания. В Фармакопее США⁸ рекомендуемый диаметр частиц составляет примерно 2 мм.
3. Гигроскопичность образца. Лиофилизированные препараты обладают гигроскопичностью. Скорость абсорбции влаги из окружающей среды зависит от влажности окружающего воздуха и времени взаимодействия. Наилучшим способом выполнения методики является быстрое формирование навески в специальном боксе с сухим воздухом [3].

Влияние на неопределенность результатов испытаний таких факторов, как гигроскопичность, высота слоя образца, размер частиц в навеске, в данной работе не оценивали. Проведение валидационных исследований позволит инициировать внесение в ГФ РФ изменений, касающихся подготовки образцов.

При проведении весового анализа требуется строгое выполнение правил взвешивания пробы, а также соблюдения определенных условий окружающей среды⁹ для максимального исключения неконтролируемых факторов. К основным условиям относят температуру образца (необходимо выдерживание образца при комнатной температуре) и влажность (при низкой влажности возможно накопление электростатического заряда [4]; при высокой влажности гигроскопичные образцы будут набирать влагу). В отношении пробы, подвергающейся анали-

зу, важна ее физическая однородность, высота слоя в бюксе.

Анализ данных литературы показал отсутствие единого документа, в соответствии с требованиями которого можно было бы провести оценку неопределенности результатов испытаний лекарственного средства. Описанный в ГФ РФ¹⁰ подход к оценке неопределенности аналитической методики носит общий характер. Способы расчета неопределенности, приведенные в ГОСТ¹¹, не учитывают особенности проведения испытаний лекарственных средств. Тем не менее расчет неопределенности в настоящем исследовании был выполнен согласно ГОСТ 34100.3-2017, принимая во внимание примеры, приведенные в документе EDQM¹².

Согласно ГОСТ 34100.3-2017¹³ в общем случае процедура оценки неопределенности состоит из следующих этапов.

- Этап 1 – установление измеряемой величины.
- Этап 2 – идентификация источников неопределенности и составление бюджета неопределенности.
- Этап 3 – количественная оценка составляющих неопределенности.
- Этап 4 – расчет суммарной стандартной неопределенности (u_c), который проводится путем суммирования всех компонентов неопределенности (u_i), выраженных в виде стандартных отклонений. В случае независимых результатов, когда отсутствует корреляция величин, суммирование проводится с учетом весовых коэффициентов (коэффициенты чувствительности c_i) вклада каждой неопределенности согласно формуле (1):

$$u_c = \sqrt{\sum_{i=1}^N c_i^2 \times u_i^2}. \quad (1)$$

Математически коэффициенты чувствительности являются первыми производными

⁷ USP 41-NF36 <731> Loss on drying.

⁸ Там же.

⁹ Правила надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза (утв. Решением Совета Евразийской экономической комиссии № 77 от 03.11.2016).

¹⁰ ОФС.1.1.0013.15 Статистическая обработка результатов химического эксперимента. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

¹¹ ГОСТ Р ИСО 21748-2021. Статистические методы. Руководство по использованию оценок повторяемости, воспроизводимости и правильности при оценке неопределенности измерений. ГОСТ 34100.3-2017/ISO/IEC Guide 98-3:2008. Неопределенность измерения. Часть 3. Руководство по выражению неопределенности измерения.

¹² Evaluation of measurement uncertainty. Annex 1: Estimation of measurement uncertainty of using bottom-up approach. Annex 1.1: Estimation of measurement uncertainty of concentration of solutions prepared in laboratory (PA/PH/OMCL) (18) 146 R1 CORR). EDQM; 2020.

¹³ ГОСТ 34100.3-2017/ISO/IEC Guide 98-3:2008. Неопределенность измерения. Часть 3. Руководство по выражению неопределенности измерения.

функции измерения от входящих величин¹⁴ и определяют зависимость результата измерения от изменения этих величин.

- Этап 5 – расчет расширенной неопределенности. Вычисление расширенной неопределенности требуется для определения интервала вокруг результата измерения, в который, как ожидается, попадает большая часть значений, приписанных измеряемой величине. Расчет расширенной неопределенности (U) проводится путем умножения суммарной неопределенности (u_c) на выбранный коэффициент охвата (k) по формуле (2):

$$U = k \times u_c. \quad (2)$$

Коэффициент охвата обычно принимает значение от 2 до 3 для уровня доверия приблизительно 95 и 99%¹⁵ соответственно.

- Этап 6 – анализ вклада различных источников неопределенности. Значимый вклад в общую неопределенность вносят только некоторые компоненты.
- Этап 7 – представление результата (в виде стандартной или расширенной неопределенности). При записи результата в форме $x \pm U$ указывается, какая именно неопределенность (расширенная или стандартная) приводится после знака « \pm ». В случае расчета расширенной неопределенности обязательно указывают значение коэффициента охвата k и уровня доверия, представляя результат в виде: $x \pm U$ (единицы) для k (значение, например, $k=2$) и уровня доверия (значение, например, приблизительно 95%).

В настоящей работе авторами рассмотрены два примера расчета неопределенности результатов определения потери в массе при высушивании: с помощью подхода «снизу вверх»¹⁶ и с помощью доверительного интервала¹⁷.

Цель работы – оценить неопределенность результатов измерений при определении потери в массе при высушивании биологических лекарственных препаратов.

Материалы и методы

Материалы

Субстанция-порошок для изготовления бифидосодержащего препарата отечественного производителя (испытуемый образец).

Оборудование

Взвешивание проводили на весах аналитических ВР 221S (ООО «Сартогосм», Россия), класс точности по ГОСТ 24104-2001¹⁸ – специальный. Предел погрешности взвешивания, указанный в паспорте на весы, составляет $\pm 0,4$ мг ($\theta = \pm 0,0004$ г) при измерении до 50 г.

Методы

Определение потери в массе при высушивании. Испытания проводили согласно требованиям ГФ РФ ОФС.1.2.1.0010.15 (способ 1)¹⁹.

Статистическая обработка результатов. С использованием программы Microsoft Excel рассчитывали общепринятые показатели описательной статистики [5]: среднееарифметическое значение (X_{cp}), стандартное отклонение (S), доверительный интервал.

Результаты и обсуждение

Оценка неопределенности результатов испытаний по определению потери в массе при высушивании с использованием подхода «снизу вверх»

Расчет расширенной неопределенности результатов испытаний по определению потери в массе при высушивании проводили на примере методики по способу 1²⁰.

Этап 1. Установление измеряемой величины. Измеряемая величина – потеря в массе при высушивании. Единица измерения – процент, %. Количество навесок – 2.

Расчеты потери в массе при высушивании ($X, \%$) проводили по формуле функции измерения (3):

$$X = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100\%, \quad (3)$$

¹⁴ Там же.

¹⁵ Там же.

¹⁶ Evaluation of measurement uncertainty. Annex 1: Estimation of measurement uncertainty of using bottom-up approach (PA/PH/OMCL (18) 146 R1 CORR). EDQM; 2020.

¹⁷ Evaluation of measurement uncertainty. Annex 1: Estimation of measurement uncertainty of using bottom-up approach. Annex 3: Estimation of measurement uncertainty expressed as confidence interval using standard deviation from testing results (PA/PH/OMCL (18) 146 R1 CORR). EDQM; 2020.

Evaluation of measurement uncertainty. Core document (PA/PH/OMCL (18) 145 R1 CORR). EDQM; 2020.

¹⁸ ГОСТ 24104-2001. Весы лабораторные. Общие технические требования.

¹⁹ ОФС.1.2.1.0010.15 Потеря в массе при высушивании. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

²⁰ Там же.

Таблица 1. Результаты высушивания бюксов до постоянной массы

Table 1. Results of weighing bottle drying to constant mass

Номер бюкса <i>Weighing bottle</i>	Масса пустого бюкса после первого высушивания, $m_{1,1}$, г <i>Mass of an empty bottle after drying cycle 1, $m_{1,1}$, g</i>	Масса пустого бюкса после второго высушивания, $m_{1,2}$, г <i>Mass of the empty bottle after drying cycle 2, $m_{1,2}$, g</i>	Разница масс между первым и вторым высушиванием, $\Delta m_{1,1} - m_{1,2}$, г <i>Difference in mass after drying cycles 1 and 2, $\Delta m_{1,1} - m_{1,2}$, g</i>
1	8,1538	8,1538	0,0000
2	8,2252	8,2252	0,0000

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

где m_1 – масса пустого бюкса, доведенного до постоянной массы, г; m_2 – масса бюкса с испытуемым образцом до высушивания, г; m_3 – масса бюкса с испытуемым образцом после высушивания, г.

Первый день испытаний. Проводили высушивание двух бюксов до постоянной массы. Бюксы высушивали в течение 2 ч в условиях проведения испытаний (105 °С) в сушильном шкафу. После высушивания бюксы помещали в эксикатор для охлаждения в течение 50 мин. После охлаждения бюксы взвешивали на весах с точностью до 0,0001 г, а затем помещали в сушильный шкаф для высушивания в течение 60 мин. По истечении 60 мин повторяли охлаждение и взвешивание бюксов. Оценивали разность между результатами двух взвешиваний, которая не должна превышать 0,0005 г²¹. Результаты представлены в таблице 1.

Второй день испытаний. Проводили высушивание испытуемого образца. В каждый бюкс вносили навеску испытуемого образца массой около 0,2 г. Взвешивали бюкс с навеской и помещали в сушильный шкаф. Время первого высушивания – 2 ч, время охлаждения бюксов – 50 мин, время второго высушивания – 60 мин. Результаты приведены в таблице 2.

Этап 2. Идентификация источников неопределенности. Проводили анализ процедуры ис-

пытаний. На рисунке 1 представлена диаграмма причинно-следственных связей (диаграмма Исикавы²²), отражающая факторы, которые могут сказаться на результатах измерений: погрешность весов и неточность доведения до постоянной массы – на этапах определения массы пустого бюкса (m_1) и массы с испытуемым веществом после высушивания (m_3); погрешность весов – на этапе взвешивания бюкса с навеской до высушивания (m_2).

Этап 3. Количественная оценка составляющих неопределенности.

Взвешивание пустого бюкса (m_1). Перед проведением испытаний бюксы доводили до постоянной массы высушивания в условиях процедуры испытаний. Масса считается постоянной, если разность результатов двух последовательных взвешиваний не превышает 0,0005 г²³. Неопределенность доведения бюксов до постоянной массы обусловлена неопределенностью при определении массы на весах $u_1(m_1)$ и нечетким определением постоянной массы $u_2(m_1)$, которая может отличаться в пределах 0,0005 г: $u(m_1) = u_1(m_1) + u_2(m_1)$.

Оценивание стандартной неопределенности при определении массы пустого бюкса на весах проводили, используя данные производителя средства измерений (паспортные данные

Таблица 2. Результаты взвешиваний при определении потери в массе при высушивании испытуемого образца

Table 2. Weighing results obtained for weighing bottles with test samples during the determination of loss on drying

Номер бюкса <i>Weighing bottle</i>	Масса бюкса с испытуемым образцом до высушивания, m_2 , г <i>Mass of a bottle with the test sample before drying, m_2, g</i>	Масса бюкса с испытуемым образцом после первого высушивания, $m_{3,1}$, г <i>Mass of the bottle with the test sample after drying cycle 1, $m_{3,1}$, g</i>	Масса бюкса с испытуемым образцом после повторного высушивания, $m_{3,2}$, г <i>Mass of the bottle with the test sample after drying cycle 2, $m_{3,2}$, g</i>	Разница масс между первым и вторым высушиванием, $\Delta m_{3,1} - m_{3,2}$, г <i>Difference in mass after drying cycles 1 and 2, $\Delta m_{3,1} - m_{3,2}$, g</i>
1	8,3536	8,3505	8,3505	0,0000
2	8,4253	8,4223	8,4223	0,0000

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

²¹ ОФС.1.1.0001.15 Правила пользования фармакопейными статьями. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

²² Evaluation of measurement uncertainty. Core document (PA/PH/OMCL (18) 145 R1 CORR). EDQM; 2020.

²³ ОФС.1.2.1.0010.15 Потеря в массе при высушивании. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

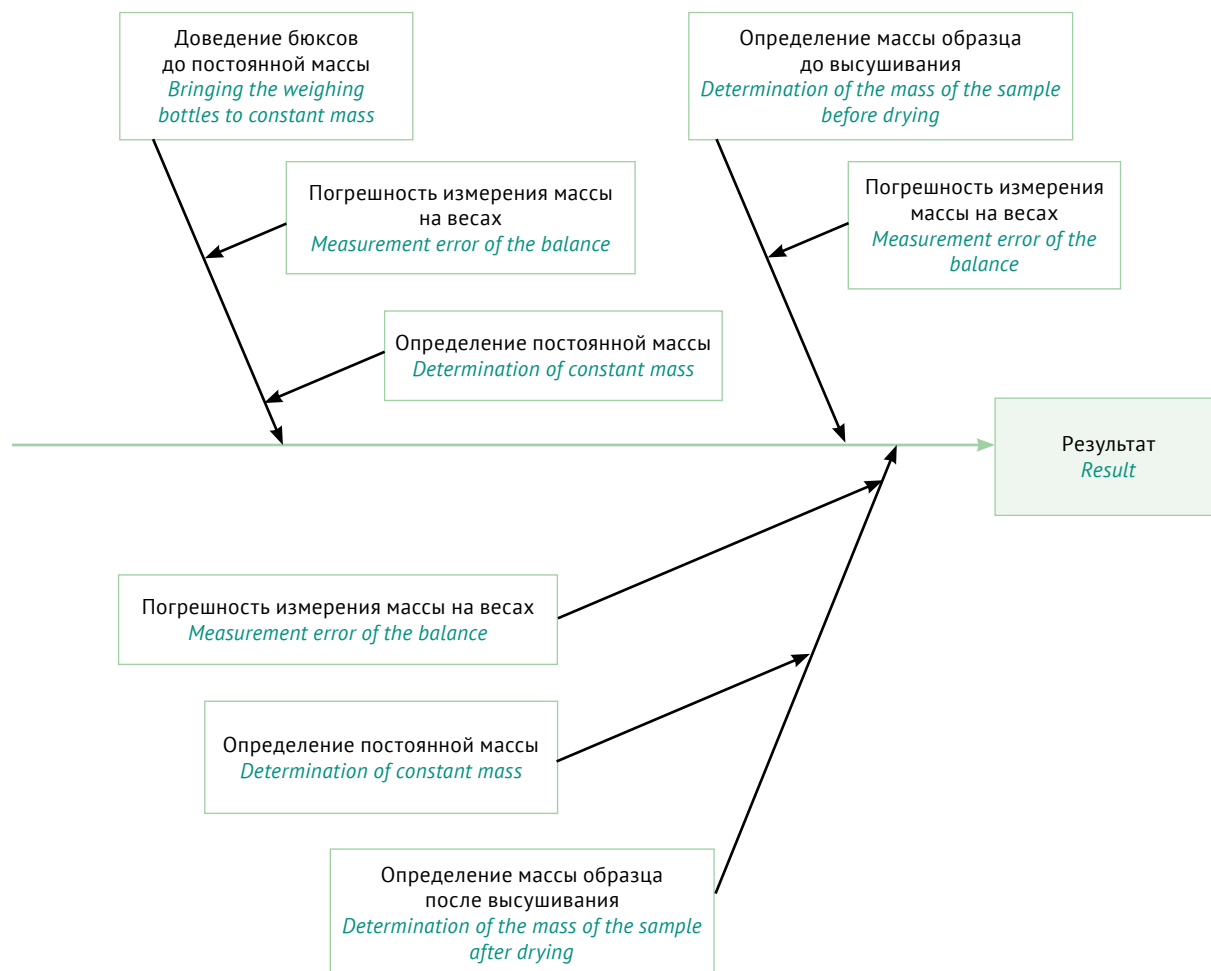


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Источники неопределенности при определении потери в массе при высушивании.

Fig. 1. Sources of uncertainty in the determination of loss on drying

весов). Значение погрешности взвешивания в документации приведено без указания уровня доверия и типа распределения. Согласно ГОСТ 34100.3-2017²⁴ в этом случае предполагается, что погрешность равномерно распределена внутри указанных границ ($\theta = \pm 0,0004$ г) и для расчета неопределенности использовали прямоугольное (равномерное) распределение ($\alpha = \sqrt{3}$). Стандартную неопределенность, связанную с погрешностью весов $u_1(m_1)$, г, рассчитывали по формуле (4):

$$u_1(m_1) = \frac{\theta}{\sqrt{3}} = \frac{0,0004}{\sqrt{3}} = 0,00023. \quad (4)$$

Оценивание неопределенности доведения до постоянной массы проводили исходя из допущения, что распределение является приближенно нормальным, и использовали формулу для расчета предела повторяемости согласно ГОСТ Р ИСО 5725-6-2002 (п. 4.1.2)²⁵. Так как коэффициент для уровня вероятности 95% равен 1,96, то формула расчета стандартной неопределенности $u(x)$, характеризующей вклад процедуры доведения до постоянной массы, принимает вид (5):

$$u(x) = \frac{r}{1,96 \times \sqrt{n}}, \quad (5)$$

²⁴ ГОСТ 34100.3–2017/ISO/IEC Guide 98-3:2008. Неопределенность измерения. Часть 3. Руководство по выражению неопределенности измерения.

²⁵ ГОСТ Р ИСО 5725-6–2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике.

где r – предел повторяемости, n – число параллельных измерений.

Неопределенность доведения до постоянной массы $u_2(m_1)$, г, составляет согласно формуле (6):

$$u_2(m_1) = \frac{0,0005}{1,96 \times \sqrt{2}} = 0,00018. \quad (6)$$

При оценивании неопределенности $u(m_1)$, г, необходимо произвести суммирование квадратов определенных выше стандартных неопределенностей согласно формуле (7):

$$u(m_1) = \sqrt{u_1^2(m_1) + u_2^2(m_1)} = \sqrt{(0,00023)^2 + (0,00018)^2} = 0,00029. \quad (7)$$

Взвешивание бюкса с навеской до высушивания, m_2 . Стандартная неопределенность $u(m_2)$ определяется только вкладом погрешности весов, так как процедура доведения до постоянной массы на этом этапе отсутствует ($u_2(m_2) = 0$). Поэтому стандартную неопределенность $u(m_2)$ рассчитывали так же, как и для пустого бюкса $u_1(m_1)$: $u_1(m_2) = 0,00023$.

Взвешивание бюкса с навеской после высушивания, m_3 . Стандартная неопределенность бюкса, связанная с взвешиванием навески образца после высушивания, определяется вкладами погрешности весов и доведения до постоянной массы. Расчет неопределенности для массы бюкса с навеской после высушивания $u_1(m_2)$ проводили таким же образом, как и расчет неопределенности для $u(m_1)$: $u_1(m_2) = u_1(m_1) = u(m_2) = 0,00023$ г.

Неопределенность, связанную с измерением постоянной массы бюксов, определяли аналогично $u_2(m_1)$: $u_2(m_3) = u_2(m_1) = 0,00018$ г. Суммарная неопределенность взвешивания бюкса с навеской после высушивания, рассчитанная по формуле (8), составила 0,00029 г.

Этап 4. Расчет суммарной стандартной неопределенности (u) результата измерения потери в массе образца. Так как все значения получены независимо при различных испытаниях, то формула (8) для расчета суммарной неопределенности ($u_c(X)$) для независимых величин имеет вид²⁶:

$$u_c(X) = \sqrt{c_1^2 u^2(m_1) + c_2^2 u^2(m_2) + c_3^2 u^2(m_3)}, \quad (8)$$

где c_1^2 , c_2^2 , c_3^2 – коэффициенты чувствительности, рассчитываемые как частные производные функции измерения:

$$c_1 = \frac{\partial X}{\partial m_1}; c_2 = \frac{\partial X}{\partial m_2}; c_3 = \frac{\partial X}{\partial m_3};$$

X – уравнение (функция измерения) для расчета потери в массе при высушивании:

$$X = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100\%.$$

В данном примере коэффициенты рассчитывали на основании результатов, полученных для первого бюкса.

Коэффициент чувствительности для массы пустого бюкса согласно формуле (9) равен:

$$c_1 = \left| \frac{\partial X}{\partial m_1} \right| = \frac{100 \times (m_2 - m_3)}{(m_2 - m_1)^2} = \frac{100 \times (8,3536 - 8,3505)}{(8,3536 - 8,1538)^2} = 7,77. \quad (9)$$

Коэффициент чувствительности для массы бюкса с навеской до высушивания согласно формуле (10) равен:

$$c_2 = \left| \frac{\partial X}{\partial m_2} \right| = \frac{100 \times (m_3 - m_1)}{(m_2 - m_1)^2} = \frac{100 \times (8,3505 - 8,1538)}{(8,3536 - 8,1538)^2} = 492,74. \quad (10)$$

Коэффициент чувствительности для массы бюкса с навеской после высушивания согласно формуле (11) равен:

$$c_3 = \left| \frac{\partial X}{\partial m_3} \right| = \left| \frac{-100}{(m_2 - m_1)} \right| = \frac{100}{8,3536 - 8,1538} = 500,5. \quad (11)$$

Суммарную стандартную неопределенность $u(X)$, %, рассчитывали с учетом коэффициентов чувствительности по формуле (12):

$$u(X) = \sqrt{7,77^2 \times 0,00029^2 + 492,74^2 \times 0,00018^2 + 500,5^2 \times 0,00029^2} = 0,17. \quad (12)$$

Этап 5. Расчет расширенной неопределенности. Расширенную неопределенность U , %, рассчитывали для уровня доверия приблизительно 95% и коэффициента охвата $k = 2$:

$$U = 2 \times 0,17 = 0,34. \quad (13)$$

Этап 6. Анализ вклада различных источников неопределенности. Вклад неопределенности от каждой входной величины рассчитывали как произведение стандартной неопределенности (u_i)

²⁶ ГОСТ 34100.3-2017/ISO/IEC Guide 98-3:2008. Неопределенность измерения. Часть 3. Руководство по выражению неопределенности измерения.

этой величины на соответствующий коэффициент чувствительности (c_i). Результаты приведены в таблице 3.

Анализ бюджета неопределенности показал, что наименьший вклад имеет неопределенность измерения массы пустого бюкса – 0,003%. Наибольший вклад вносит неопределенность измерения массы бюкса после высушивания (0,147%), что, по мнению авторов, отражает влияние подготовки образца для испытаний. Таким образом, испытательной лаборатории необходимо строго контролировать условия проведения испытаний и учитывать особенности исследуемого препарата, например гигроскопичность образца или количество препарата в емкости.

Этап 7. Расчет потери в массе при высушивании и представление результатов. Значение показателя «Потеря в массе при высушивании» для двух навесок X_1 и X_2 (в %), рассчитанное по формуле (3), составило:

$$X_1 = \frac{8,3536 - 8,3505}{8,3536 - 8,1538} \times 100\% = 1,55, \quad (14)$$

$$X_2 = \frac{8,4253 - 8,4223}{8,4253 - 8,2252} \times 100\% = 1,50, \quad (15)$$

$$X_{cp} = \frac{\sum_{i=1}^N X_i}{n} = \frac{1,55 + 1,50}{2} = 1,53. \quad (16)$$

Таким образом, потеря в массе при высушивании составила $(1,53 \pm 0,34)\%$, где число, следующее за знаком «±», является численным значением расширенной неопределенности, которая получена умножением суммарной стандартной

неопределенности на коэффициент охвата $k = 2$, уровень доверия приблизительно 95%.

Расчет неопределенности с использованием доверительного интервала

Основной составляющей неопределенности признается изменчивость в повторных наблюдениях при неизменных условиях измерений – повторяемости. Количественная оценка неопределенности измерений выражается в виде доверительного интервала, вычисленного на основании результатов параллельных измерений. Расчет границ доверительного интервала проводят с использованием значения критерия Стьюдента [5].

При определении потери в массе при высушивании образца использовали данные результатов взвешиваний, приведенные в таблицах 1 и 2. Потерю в массе при высушивании определяли по формуле (3) для каждого измерения отдельно. Далее рассчитывали среднее арифметическое значение (X_{cp}) по формуле (17):

$$X_{cp} = \frac{X_1 + X_2}{n}. \quad (17)$$

Разброс результатов единичных испытаний определяли в виде среднего квадратичного (стандартного) отклонения (S) согласно формуле (18):

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2}{(n - 1)}}. \quad (18)$$

Таблица 3. Бюджет неопределенности методики определения потери в массе при высушивании
Table 3. Uncertainty budget for the analytical procedure for the determination of loss on drying

Измеряемая величина <i>Measurand</i>	Стандартная неопределенность, г <i>Standard uncertainty, g</i>	Коэффициент чувствительности, г ⁻¹ <i>Sensitivity factor, g⁻¹</i>	Вклад в неопределенность, % <i>Contribution to the uncertainty, %</i>
Масса пустого бюкса <i>Mass of an empty bottle</i>	0,00029	7,77	0,003
Масса бюкса с навеской до высушивания <i>Mass of the bottle with the test substance before drying</i>	0,00023	492,74	0,089
Масса бюкса с навеской после высушивания <i>Mass of the bottle with the test substance after drying</i>	0,00029	500,50	0,147

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Далее рассчитывали доверительный интервал с 95% доверительной вероятностью ($P=95\%$) по формуле (19):

$$(X_{cp} \pm \Delta\bar{X}) = X_{cp} \pm \frac{t_{(\alpha=0,05), (n-1)} \times S}{\sqrt{n}}, \quad (19)$$

где $\alpha=0,05$ – уровень значимости; n – количество измерений, $t_{(p,f)}$ – коэффициент Стьюдента.

Расчет потери в массе при высушивании. Стандартное отклонение S , %, для результатов определения потери в массе при высушивании для двух навесок, рассчитанных по формулам (14–15) $X_1=1,55\%$ и $X_2=1,50\%$ составило согласно формуле (20):

$$S = \sqrt{\frac{(1,55 - 1,53)^2 + (1,50 - 1,53)^2}{(2 - 1)}} = 0,04. \quad (20)$$

Расчет доверительного интервала $\Delta\bar{X}$, %, проводили согласно формуле (21):

$$\Delta\bar{X} = \frac{12,71 \times 0,04}{\sqrt{2}} = 0,32. \quad (21)$$

Таким образом, потеря в массе при высушивании (для двух навесок) с учетом неопределенности составила $1,53 \pm 0,32\%$, где число, следующее за знаком «±», является численным значением расширенной неопределенности, которая получена при помощи расчета доверительного интервала с 95% доверительной вероятностью

для числа степеней свободы $f=2-1$ и значения коэффициента критерия Стьюдента $t_{(p,f)}=12,71$.

Расчет неопределенности при помощи подхода «снизу вверх» и с использованием доверительного интервала показал сопоставимые значения: 0,34 и 0,32% соответственно. Таким образом, при определении потери в массе при высушивании в биологических лекарственных препаратах может быть использован метод расчета неопределенности с помощью доверительного интервала как наиболее распространенный и доступный.

Заключение

Рассмотрены факторы, влияющие на неопределенность результатов измерений при определении потери в массе при высушивании в биологических лекарственных препаратах. Два способа расчета неопределенности испытаний показали сопоставимые результаты. Анализ бюджета неопределенности, рассчитанного с использованием подхода «снизу вверх», выявил, что наибольший вклад в результат испытания вносит неопределенность измерения массы бюкса после высушивания, что требует от испытательной лаборатории тщательного контроля процедуры пробоподготовки, учитывающей особенности материала препарата. Для оценки неопределенности может быть использован способ расчета с помощью доверительного интервала.

Литература/References

1. Волкова РА, Фадейкина ОВ. Проблемы оценки неопределенности методик испытаний и стандартных образцов иммунобиологических лекарственных средств. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2017;17(1):27–31. Volkova RA, Fadeikina OV. Estimation of uncertainty of test methods and reference standards used for immunobiological medicines. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2017;17(1):27–31 (In Russ.). EDN: [VWOGAY](#)
2. Волкова РА, Фадейкина ОВ. Проблемы метрологического обеспечения методик оценки качества иммунобиологических лекарственных препаратов. *Стандартные образцы в измерениях и технологиях. Материалы I Международной научной конференции*. Екатеринбург: Уральский научно-исследовательский институт метрологии; 2013. С. 88–90. Volkova RA, Fadeikina OV. Challenges of metrological support of methods for assessing the quality of immunobiologicals. *Reference standards in measurements and technologies. Materials of the 1st International Scientific Conference*. Ekaterinburg: Ural Scientific Research Institute of Metrology; 2013. P. 88–90 (In Russ.). EDN: [SHAGWL](#)
3. Malik KP, Duru C, Ahmed M, Matejtschuk P. Analytical options for the measurement of residual moisture content in lyophilized biological materials. *Am Pharm Rev*. 2010;13(5):42–7.
4. Ворopaев АА, Фадейкина ОВ, Ермолаева ТН, Давыдов ДС. Влияние материала бюксов на воспроизводимость методики определения потери в массе при высушивании. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(2):208–17. Voropaev AA, Fadeikina OV, Ermolaeva TN, Davydov DS. Influence of the material of weighing bottles on loss-on-drying reproducibility. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(2):208–17 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-2-208-217>
5. Glantz SA, ed. *Primer of Biostatistics*. New York: McGraw-Hill; 1992.

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **О.В. Фадейкина** – формирование цели и задач исследований, расчет неопределенности, написание текста рукописи; **А.А. Воропаев** – проведение экспериментальных исследований, расчет неопределенности, написание текста рукописи; **Д.С. Давыдов** – консультативная помощь при анализе результатов и оценке состояния проблемы; утверждение окончательной версии статьи для публикации; **Р.А. Волкова** – написание текста рукописи, утверждение окончательной версии статьи для публикации.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **O.V. Fadeikina** formulated the aim and objectives of the study, calculated uncertainty, and drafted the manuscript. **A.A. Voropaev** conducted experiments, calculated uncertainty, and drafted the manuscript. **D.S. Davydov** provided advisory assistance in analysing the study results and assessing the state of the art, approved the final version of the manuscript for publication. **R.A. Volkova** drafted the manuscript and approved the final version of the manuscript for publication.

Об авторах / Authors

Фадейкина Ольга Васильевна, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8473-7442>

fadeikina@expmed.ru

Воропаев Андрей Андреевич

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5786-9159>

voropaev@expmed.ru

Давыдов Дмитрий Сергеевич, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1768-362>

Davydov@expmed.ru

Волкова Рауза Асхатовна, д-р биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8698-2890>

Volkova@expmed.ru

Поступила 06.06.2023

После доработки 07.09.2023

Принята к публикации 13.09.2023

Olga V. Fadeikina, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8473-7442>

fadeikina@expmed.ru

Andrey A. Voropaev

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5786-9159>

voropaev@expmed.ru

Dmitry S. Davydov, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1768-362>

Davydov@expmed.ru

Rauza A. Volkova, Dr. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8698-2890>

Volkova@expmed.ru

Received 6 June 2023

Revised 7 September 2023

Accepted 13 September 2023