

УДК 006.91-048.26:579.66.083.1.088.1:620.193.8

Л. И. Антоновская, аспирант; Н. И. Заяц, доцент; Н. А. Белясова, доцент

ОЦЕНКА МЕТРОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК МЕТОДИКИ ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ «ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕПЕНИ УСТОЙЧИВОСТИ МАТЕРИАЛОВ И ИЗДЕЛИЙ С БИОЦИДНЫМИ ДОБАВКАМИ К БИООБРАСТАНИЯМ»

The adsorption-titrimetrical method of definition of stability degree to biofouling for materials and products with biocide components has been developed. All measurements required for series of new hollow fibrous ultrafiltrational diaphragm elements with various biocide components have been carried out, the relations describing the influence of biocide substances for fibrous ultrafiltrational elements on the quantity of dairy acid accumulated by bacteria have been received. The metrological characteristics of the developed technique for the definition of dairy acid concentration in cultural fluid have been determined: error, adequacy, repeatability and reproducibility in the laboratory. The project of the method for uncertainty calculation has been developed. Now the developed technique «Definition of stability degree to biofouling for materials and products with biocide components» is tested in Belarussian state institute of metrology.

Введение. Одной из актуальных проблем, с которыми сталкиваются производители и потребители продукции разных стран, является биоповреждение материалов и изделий.

Биоповреждение – разрушение материалов и изделий под действием присутствующих в среде микроорганизмов (бактерий, грибов, водорослей, простейших). Микроорганизмы образуют на поверхности материалов и изделий сложные системы, объединенные слизистым матриксом, так называемые биообрастания.

Серьезность этой проблемы состоит не только в порче или разрушении материалов и изделий, но, в первую очередь, в том, что биоповреждения материалов зачастую могут приводить к угрозе здоровья и жизни людей, поскольку бактерии и грибы, повреждающие материал, могут быть причиной кожных, аллергических и других заболеваний, а также источником сильнодействующих токсинов.

Для защиты материалов и изделий от биообрастаний в их состав вводят различные биоцидные добавки, эффективность которых должна быть оценена. Однако на сегодняшний день в Республике Беларусь стандартизованные методики по определению степени устойчивости материалов и изделий к биообрастаниям отсутствуют.

Анализ международных стандартов и стандартов других стран показал, что имеющиеся методы [1–3] обладают рядом существенных недостатков. Они довольно трудоемки, имеют высокую погрешность и низкую воспроизводимость, их невозможно использовать для оценки широкого круга материалов, например материалов с развитой структурой поверхности.

Цель данной работы состояла в разработке документа методики выполнения измерений (МВИ), устанавливаемой порядок определения

степени устойчивости материалов и изделий с биоцидными добавками к биообрастаниям, на основе разработанного нами ранее [4] адсорбционно-титриметрического метода.

Основная часть. Адсорбционно-титриметрический метод [4] заключается в определении количества молочной кислоты, образующейся в среде за счет жизнедеятельности адсорбированных на поверхности материала жизнеспособных клеток молочнокислых бактерий. Большое число прикрепившихся к материалу и сохранивших жизнеспособность клеток обеспечивает более высокое содержание молочной кислоты в культуральной жидкости, что отражает выживаемость и метаболическую активность бактерий в зависимости от антимикробных свойств исследуемого материала.

Степень устойчивости материалов и изделий к биообрастаниям оценивали с помощью разработанного показателя (DS), устанавливающего соотношение количества образующейся молочной кислоты в культуральной жидкости с опытным образцом (с биоцидной добавкой) к количеству молочной кислоты в культуральной жидкости с контрольным образцом (не содержащим биоцидную добавку):

$$DS = 1 - \frac{C'_{оп}}{C'_к}, \quad (1)$$

где $C'_{оп}$ – среднее значение концентрации молочной кислоты в культуральной жидкости с опытным образцом; $C'_к$ – среднее значение концентрации молочной кислоты в культуральной жидкости с контрольным образцом.

По результатам экспериментальных данных было установлено, что материал можно признать устойчивым к биообрастаниям, если значение $DS \geq 0,45$.

Содержание молочной кислоты определяли кислотнo-основным титрованием с установлением точки эквивалентности по оптической плотности, определяемой спектрофотометрически.

Концентрацию накопившейся молочной кислоты в культуральной жидкости рассчитывали по формуле

$$C = \frac{C_1(V_{11} - V'_{12})}{V}, \quad (2)$$

где C_1 – концентрация щелочи, ммоль/л; V_{11} – объем щелочи, пошедший на титрование анализируемой пробы, мл; V'_{12} – средний объем щелочи, пошедший на титрование питательной среды по результатам трех параллельных измерений, мл; V – объем пробы, мл.

За результат принимали среднее арифметическое трех параллельных измерений.

Проект МВИ, разработанный в соответствии с требованиями ГОСТ 8.010, содержит все необходимые разделы, включая информацию о метрологических характеристиках (точности). Оценка точности МВИ являлась одним из основных этапов ее разработки.

В настоящее время существует два альтернативных подхода к оценке точности измерений. Первый (традиционный) основан на расчете погрешности, второй, предложенный сравнительно недавно, связан с оценкой неопределенности измерений. Погрешность в МВИ может быть выражена также различными показателями: показателем точности (общей погрешности), показателем правильности (систематической погрешности) и показателями прецизионности (случайной погрешности). Причем в зависимости от учетных влияющих факторов различают следующие виды прецизионности: межлабораторную воспроизводимость (близость результатов, полученных в разных лабораториях), внутрилабораторную воспроизводимость или промежуточную прецизионность (близость результатов, полученных в одной лаборатории, но в разных условиях) и повторяемость (близость параллельных результатов). Показатели прецизионности характеризуются разбросом результатов, который оценивается средним квадратическим отклонением (СКО).

Для разработанной МВИ установление приписанных характеристик погрешности проводили путем определения показателей точности, правильности, повторяемости и внутрилабораторной воспроизводимости, которые рассчитывали в соответствии с требованиями МИ 2336 и СТБ ИСО 5725-2.

Оценку показателя правильности (систематической погрешности) выполняли одним из существующих методов – расчетным, основанным на построении композиции всех составляющих, формирующих систематическую погрешность. Для этого были выявлены составляющие систематической погрешности на каждом этапе проведения измерений (рисунок). Факторами, формирующими

систематическую погрешность, являются: погрешность используемых средств измерений (весов, рН-метра), погрешность оборудования (термостата), погрешность мерной посуды (мерных колб, пипеток, микробюретки, дозаторов), погрешность чистоты применяемых реактивов.

Исходя из равномерного распределения, границы систематической погрешности рассчитывали по следующей формуле:

$$\Delta_{cb} = |\Delta_{cb}| = \Delta_c = K \sqrt{\sum_{i=1}^I \Theta_i^2}, \quad (3)$$

где K – коэффициент, определяемый принятой доверительной вероятностью (при $p = 0,95$ $K = 1,1$); Θ_i^2 – граница i -й неисключенной составляющей систематической погрешности, выраженная в относительной форме; i – число составляющих систематической погрешности.

Показатели прецизионности оценивались нами путем статистической обработки результатов определения показателя степени устойчивости материалов и изделий с биоцидными добавками (DS) опытных образцов.

В качестве опытных образцов использовали экспериментально синтезированные в ГНУ «Институт химии новых материалов» НАН Беларуси половолоконные ультрафильтрационные мембранные элементы (ПВУМ), содержащие различные биоцидные добавки. Образцы условно обозначены как В-ПГ₁, В-ПГ₂, В-ПГ₃, В-ПГ₄. Для контроля применяли волокно на основе полисульфона, не содержащее биоцидных добавок (V_k). Образцы для оценивания были выбраны так, чтобы они имели значение DS во всем диапазоне измерений, который в соответствии с МВИ изменяется от 0 до 1. Для каждого образца (количество образцов $m = 4$) получали 10 серий результатов измерений ($l = 10$) в разных условиях, каждая серия включала три параллельных определения DS ($n = 3$). В свою очередь каждый из трех параллельных определений DS рассчитывался по результатам 9-ти измерений концентрации молочной кислоты: по три параллельных измерения опытного, контрольного образцов и среды Tetr.

Показатель повторяемости вычисляли по выборочной дисперсии результатов трех параллельных измерений DS по формуле

$$S^2_{ml} = \frac{\sum_{i=1}^N (X_{mli} - X_{ml})^2}{N - 1}, \quad (4)$$

где N – число параллельных измерений; X_{ml} – среднее арифметическое результатов единичного анализа, полученных в условиях повторяемости, рассчитывали по формуле

$$X_{ml} = \frac{\sum_{i=1}^N X_{mli}}{N}. \quad (5)$$

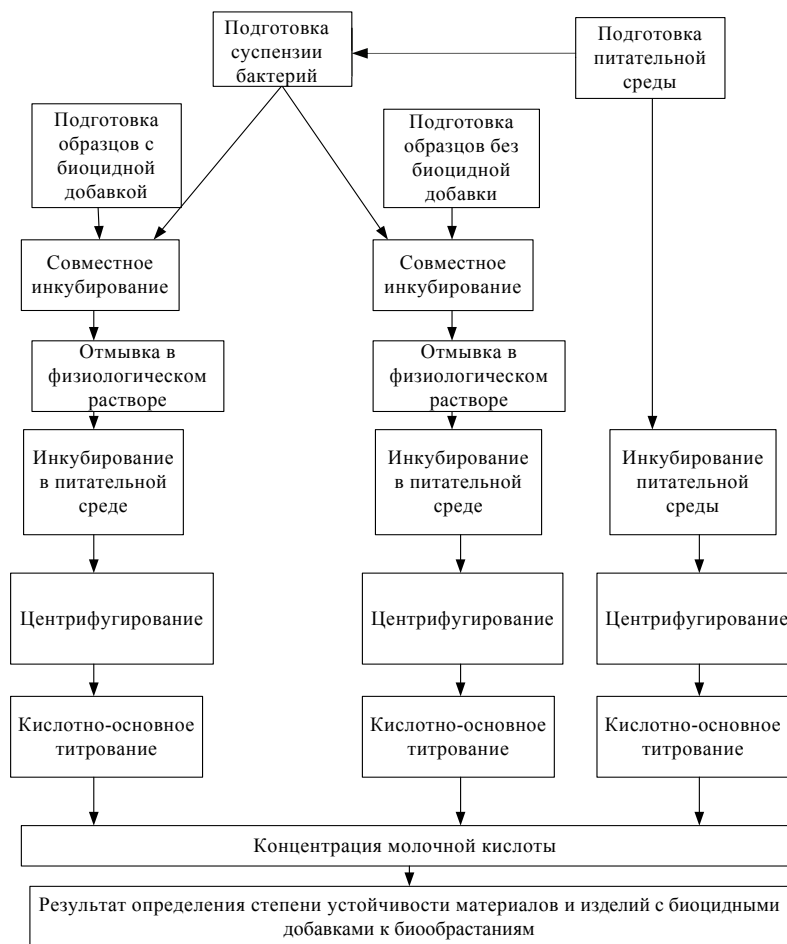


Рисунок. Блок-схема проведения измерений

Поскольку таких серий параллельных измерений было 10, то повторяемость результатов определения DS каждого из четырех образцов находили как среднее арифметическое СКО результатов параллельных измерений:

$$\delta_r = S_{r,m} = \sqrt{\frac{\sum_{l=1}^L S_{ml}^2}{L}}. \quad (6)$$

Показатель повторяемости был использован для расчета норматива повторяемости, который служит в МВИ для контроля приемлемости результатов параллельных измерений. Контроль приемлемости результатов измерений заключается в сравнении расхождений параллельных определений DS с нормативом повторяемости r .

Норматив повторяемости рассчитывали по следующей формуле:

$$r = Q(p, n) \delta_r, \quad (7)$$

где $Q(p, n)$ – коэффициент, определяемый по таблице распределения Стьюдента, равный 3,31 при $n = 3$ и $p = 0,95$; δ_r – показатель повторяемости.

Результаты параллельных измерений считаются приемлемыми, если

$$C_{\max} - C_{\min} \leq r, \quad (8)$$

где C_{\max} – максимальный результат из 3-х параллельных измерений; C_{\min} – минимальный результат из 3-х параллельных измерений.

Аналогично расчету повторяемости был осуществлен расчет показателя внутрилабораторной воспроизводимости (δ_R) МВИ, но при этом учитывался разброс значений DS (СКО) по одному и тому же образцу, полученных в лаборатории в разных условиях (в разное время, разными операторами, использовали разные партии реактивов, разные наборы мерной посуды и т. д.).

Результаты расчетов показателей повторяемости и внутрилабораторной воспроизводимости методики представлены в табл. 1.

Таблица 1

Показатели повторяемости и внутрилабораторной воспроизводимости

Образец	X_{cp}	$\delta_r, \%$	$\delta_R, \%$
В-ПГ ₁	0,2150	0,86	2,61
В-ПГ ₂	0,6357	0,86	0,87
В-ПГ ₃	0,7550	0,68	0,74
В-ПГ ₄	0,9360	0,59	0,58

За показатель повторяемости и внутрилабораторной прецизионности МВИ выбран больший из показателей для четырех различных образцов.

**Входные величины, формирующие источник
и неопределенности МВИ**

Этап МВИ	Входная величина	Обозначение
Подготовка питательной среды Tetr	Масса питательного бульона	m_1
	Масса дрожжевого экстракта	m_2
	Масса ферментативного пептона	m_3
	Значение pH среды	pH
	Объем дистиллированной воды	V_1
Подготовка суточной культуры	Объем среды Tetr	V_2
	Температура инкубирования	t_1
Подготовка суспензии бактерий	Объем среды Tetr	V_3
	Объем суточной культуры бактерий	V_4
Совместное инкубирование	Объем суспензии бактерий	V_5
	Температура инкубирования	t_2
Отмывка в ФР	Приготовление ФР: – масса хлорида натрия – объем дистиллированной воды	m_4 V_6
	Объем ФР	V_7
	Объем среды Tetr	V_8
Инкубирование в питательной среде Tetr	Температура инкубирования	t_3
	Объем среды Tetr	V_8
Центрифугирование	Объем пробы	V_9
Кислотно-основное титрование	Приготовление фенолфталеина: – масса фенолфталеина – объем этилового спирта	m_5 V_{10}
	Приготовление 0,005 н. раствора гидроксида натрия: – масса гидроксида натрия – объем дистиллированной воды	m_6 V_{11}
	Объем пробы	V_{12}
	Объем гидроксида натрия, пошедший на титрование	V_{13}
	Значение оптической плотности (погрешность спектрофотометра)	A
	Сходимость метода	$\delta_{сх}$

Показатель точности (верхнюю и нижнюю границы, в которых погрешность результата измерений находится с принятой доверительной вероятностью $p = 0,95$), рассчитанный как композиция случайной (δ_r) и систематической (Δ_c) погрешности, составил для разработанной МВИ 7,7%.

Этот показатель представляет собой максимально допустимую погрешность определения DS по разработанной методике. Однако в соответствии с современными представлениями каждый конкретный результат имеет собственную неточность измерений. Эта неточность, согласно требованиям СТБ ИСО/МЭК 17025, должна быть оценена неопределенностью. Поэтому лаборатории должны иметь методики расчета неопределенности результатов измерений, полученных по используемым в них МВИ, а вновь разрабатываемые МВИ в соответствии с требованиями ГОСТ 8.010 должны содержать их в приложении. Разработанная нами и приведенная в приложении МВИ методика устанавливает порядок расчета неопределенности определения степени устойчивости материалов и изделий с биоцидными добавками к биообрастаниям. В соответствии с этой методикой, учитывая все факторы, при которых проводились измерения, можно рассчитать неопределенность конкретного результата.

Неопределенность – это оценка, характеризующая диапазон значений, в пределах которого находится истинное значение измеряемой величины. Неопределенность так же, как и погрешность, может быть выражена СКО (стандартная неопределенность) или интервалом (расширенная неопределенность) и рассчитана по методу А (на основании ряда экспериментальных данных) или по методу В (на основе дополнительной информации).

Первым этапом расчета неопределенности является описание измеряемой величины, составление модели и выявление источников неопределенности.

Модель измерения – это функциональная зависимость, по которой рассчитывается результат. Подставив в формулу (1) значения концентраций (формула (2)), получили модель измерения:

$$DS = 1 - \frac{C_1(V_{1\text{оп}} - V'_{12})V_{\text{к}}}{V_{\text{оп}}C_1(V_{1\text{к}} - V'_{12})}. \quad (9)$$

Входящие в модель величины являются источниками неопределенности определения показателя DS .

Анализ процесса измерений (рисунок) позволил выявить, помимо входящих в модель, и другие источники неопределенности (табл. 2).

От каждого из источников рассчитывался его вклад в суммарную стандартную неопределенность (СКО) либо по типу А, либо по типу В. Расчет проводился исходя из принятого закона распределения случайной величины по следующим формулам:

$$u(x_i) = \frac{a}{\sqrt{3}} \text{ (равномерное распределение),}$$

$$u(x_i) = \frac{a}{\sqrt{6}} \text{ (треугольное распределение),}$$

где a – половина интервала погрешности измерений, информацию о котором получали из свидетельств о калибровке, паспортов на СИ и оборудование, стандартов на мерную посуду и других источников.

Треугольное распределение использовали при оценивании вкладов неопределенности, связанных с применением мерной посуды (V_1-V_{13}).

Неопределенность от всех других источников, включая неопределенность, связанную с поправкой на расширение мерной посуды при колебании температуры в лаборатории (20 ± 5)°C, рассчитывали по формуле равномерного распределения.

Сходимость метода (δ_r) равна повторяемости результатов определения параметра DS .

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

$$u_c(DS) = DS \sqrt{\left(\frac{u(m_1)}{m_1}\right)^2 + \left(\frac{u(m_2)}{m_2}\right)^2 + \left(\frac{u(m_3)}{m_3}\right)^2 + \left(\frac{u(\text{pH})}{\text{pH}}\right)^2 + \left(\frac{u(V_1)}{V_1}\right)^2 + \left(\frac{u(V_2)}{V_2}\right)^2 + \left(\frac{u(t_1)}{t_1}\right)^2 + \left(\frac{u(V_3)}{V_3}\right)^2 + \left(\frac{u(V_4)}{V_4}\right)^2 + \left(\frac{u(V_5)}{V_5}\right)^2 + \left(\frac{u(t_2)}{t_2}\right)^2 + \left(\frac{u(m_4)}{m_4}\right)^2 + \left(\frac{u(V_6)}{V_6}\right)^2 + \left(\frac{u(V_7)}{V_7}\right)^2 + \left(\frac{u(t_3)}{t_3}\right)^2 + \left(\frac{u(V_8)}{V_8}\right)^2 + \left(\frac{u(m_5)}{m_5}\right)^2 + \left(\frac{u(V_9)}{V_9}\right)^2 + \left(\frac{u(V_{10})}{V_{10}}\right)^2 + \left(\frac{u(m_6)}{m_6}\right)^2 + \left(\frac{u(V_{11})}{V_{11}}\right)^2 + \left(\frac{u(V_{12})}{V_{12}}\right)^2 + \left(\frac{u(V_{13})}{V_{13}}\right)^2 + \left(\frac{u(A)}{A}\right)^2 + \left(\frac{u(\delta_{\text{ex}})}{\delta_{\text{ex}}}\right)^2}. \quad (10)$$

Умножив суммарную стандартную неопределенность на коэффициент охвата k ($k = 2$ при $p = 0,95$), получили расширенную неопределенность результата определения DS :

$$u = ku_c(DS). \quad (11)$$

В табл. 3 приведены результаты определения показателя степени устойчивости материалов и изделий к биообрастаниям (DS) образца В-ПГ₃, полученные по МВИ.

Рассчитанная по разработанной методике неопределенность результата измерений составляет:

– суммарная стандартная неопределенность:

$$u_c(DS) = 0,028 \text{ ммоль/л};$$

– расширенная неопределенность:

$$u = 2 \cdot 0,028 = 0,06 \text{ ммоль/л};$$

– результат:

$$(0,76 \pm 0,06) \text{ ммоль/л}.$$

Таблица 3

Результаты определения параметра DS для образца В-ПГ₃

$C_{\text{к}}$, ммоль/л	$C'_{\text{к}}$, ммоль/л	$C_{\text{оп}}$, ммоль/л	$C'_{\text{оп}}$, ммоль/л	DS
6,00	5,93	1,50	1,43	0,76
5,90		1,40		
6,00		1,40		

Заключение. Таким образом, в результате проведенных исследований был разработан проект МВИ по определению степени устойчивости материалов и изделий с биоцидными добавками к биообрастаниям, оценены ее метрологические характеристики и разработана методика расчета неопределенности. В настоящее время данная МВИ проходит подтверждение пригодности в Белорусском государственном институте метрологии.

Литература

1. Противомикробные изделия – Тест на противомикробную активность и эффективность: японский промышленный стандарт JIS Z 28001. – Введ. 20.12.2000. – Токио: Японская ассоциация стандартов, 2001. – 15 с.

2. Пластмассы. Оценка воздействия микроорганизмов: ISO 846:1997. – Введ. 15.06.1997. – Технический комитет ИСО/ТК 61 «Пластмассы», 1997. – 42 с.

3. Единая система защиты от коррозии и старения. Материалы полимерные и их компоненты. Методы лабораторных испытаний на стойкость к воздействию плесневых грибов: ГОСТ 9.049-91. – Введ. 01.07.1992. – Минск: Госстандарт, 1991. – 17 с.

4. Антоновская, Л. И. Разработка метода определения степени устойчивости к биообрастаниям материалов и изделий с биоцидными добавками / Л. И. Антоновская // Молодежь в науке – 2009: прил. к журн. «Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі». – Минск: Белорус. наука, 2009. (в печати).