

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.12.10

管碟法测定吉他霉素含量的不确定度评定

徐 媛,韩宁宁,于丽娜,戴 青,赵 晖,杨秀玉*

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2017-04-06 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 12-0052-05 [中图分类号] S859.2

[摘 要] 建立了管碟法测定吉他霉素含量不确定度的评定方法。通过建立数学模型,应用测量不确定度评定与表达理论,分析不确定度来源,对各个不确定度分量进行评估,计算扩展不确定度,得到测定结果的不确定度报告。本实验的测定结果可表示为 $(1636.2 \pm 11.1) \text{ U/mg } (k=2)$,测量不确定度的主要来源为溶液的制备过程。

[关键词] 吉他霉素;管碟法;不确定度

Uncertainty Evaluation in the Assay of Kitasamycin by Diffusion Method

XU Yuan, HAN Ning-ning, YU Li-na, DAI Qing, ZHAO Hui, YANG Xiu-yu*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: YANG Xiu-yu, E-mail: yangxiuyu@ivdc.org.cn

Abstract: A procedure for the evaluation in the assay of kitasamycin by diffusion method was developed. A mathematical model of uncertainty evaluation was established which was used to analyze the sources of uncertainty and to evaluate every component in the determination procedure by the application of theory of evaluation and expression of the uncertainty of measurement. The expanded uncertainty was calculated and the uncertainty report was submitted. The result of content determination can be expressed as $(1636.2 \pm 11.1) \text{ U/mg } (k=2)$. The main sources of uncertainty came from preparation of solutions.

Key words: kitasamycin; diffusion method; uncertainty

测量不确定度是表征合理地赋予被测量之值的分散性,与测量结果相联系的参数^[1]。测量不确定度对于实验室间比对、测量结果临界值的判断、方法的确认及检测工作国际化等方面都具有重要意义。ISO/IEC17025 标准明确规定检测实验室应具有并应用评定测量不确定度的程序,在国家实验室认可的评审过程中,测量不确定度报告同样被关

注。本文根据相关技术规范标准和参考文献^[2-8],对管碟法测定吉他霉素效价结果的不确定度进行评定,以期对试验方法的优化和准确认识测量结果提供参考。

1 仪器与试剂

抗生素效价测量仪(北京潮声技术开发公司, CHB-1);分析天平(METTLER-TOLEDO, AX-

作者简介:徐 媛,硕士,从事兽药检验工作。

通讯作者:杨秀玉。E-mail: yangxiuyu@ivdc.org.cn

205), 37 ℃ 恒温培养室; 钢管自动放置器(北京先驱威峰技术开发公司, ZY-300G); 吉他霉素标准品(中国食品药品检定研究院, 1462 U/mg, 批号 0357-9901); 吉他霉素供试品(企业提供); 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) [CMCC(B) 63501] (中国药品生物制品检定所); 抗生素检定培养基Ⅱ号, 灭菌 0.9% 氯化钠溶液, 灭菌磷酸盐缓冲液(pH7.8), 营养琼脂培养基(北京中海动物保健科技公司); 乙醇(国药集团化学试剂有限公司, 分析纯)。

2 方法与结果

2.1 标准品溶液与供试品溶液的制备 依据《中华人民共和国兽药典》^[9] 2015 年版一部抗生素微生物检定法配制。标准品溶液的制备: 精密称取吉他霉素标准品置 50 mL 容量瓶中, 按吉他霉素每 2 mg 加乙醇 1 mL 使溶解, 用灭菌水稀释至刻度, 摇匀制得每 1 mL 中含 1000 U 的溶液; 精密量取该溶液 10 mL, 置 50 mL 容量瓶中, 加灭菌磷酸盐缓冲液稀释至刻度, 摇匀; 再分别精密量取该溶液 10 mL, 分别置 50 mL 和 100 mL 容量瓶中, 加灭菌磷酸盐缓冲液稀释至刻度, 摇匀, 得每 1 mL 含 40 U 和 20 U 的溶液, 分别作为标准品溶液的高、低剂量。供试品溶液的制备: 精密称定吉他霉素供试品, 按上述方法制备, 得每 1 mL 含 40 U 和 20 U 的溶液, 分别作为供试品溶液的高、低剂量。

2.2 双碟的制备与培养 取平底双碟 8(n) 套, 分别加入加热融化的培养基 20 mL, 放置在水平台面上使凝固, 作为底层; 另取加热溶化后温度降至约 50 ℃ 的培养基适量, 加入 65 ℃ 保温 30 min 的枯草芽孢杆菌的菌悬液适量, 摇匀; 在凝固好的底层培养基上加入 5 mL 该含菌培养基, 使摊步均匀, 作为菌层; 凝固后, 在双碟中等距离安置不锈钢小管 4(k) 个, 静置稳定后, 将标准品溶液与供试品溶液分别滴加于不锈钢小管内, 将双碟置 37 ℃ 恒温培养室, 培养 16~18 h。

2.3 抑菌圈直径的测定与效价计算 用效价测量仪测量各抑菌圈的直径, 照生物检定统计法^[9] 进行可靠性检验与效价计算。当可靠性检验结果回归非常显著($P<0.01$) 与偏离平行不显著($P>0.05$)

时, 试验结果成立。测定结果见表 1。

表 1 吉他霉素效价测定抑菌圈直径测量结果

Tab 1 diameter of antibacterial circles in potency assay of Kitasamycin					
碟号 (No.)	dS1	dS2	dT1	dT2	Σ Y _n
1.00	17.69	19.58	17.84	19.38	74.49
2.00	17.14	18.82	17.19	19.06	72.21
3.00	16.81	18.39	16.70	18.45	70.35
4.00	17.84	19.58	17.80	19.56	74.78
5.00	17.65	19.57	17.90	19.36	74.27
6.00	17.88	19.54	17.87	19.55	74.84
7.00	16.36	17.91	16.27	17.94	68.48
8.00	17.81	19.22	17.86	19.73	74.62
Σ Y _k	139.18	152.61	139.22	153.03	584.04

3 测量不确定度的评定

3.1 数学模型

$$P_i = D \times A_i \times \lg^{-1} \left[\frac{T_2 + T_1 - S_2 - S_1}{T_2 + S_2 - T_1 - S_1} \times 1 \right]$$
$$D = \frac{C_s}{C_T} = \frac{m_s \times P_s / V_s}{m_T \times A_T / V_T} = \frac{m_s \times P_s \times V_T}{m_T \times A_T \times V_s}$$

D: 标准品溶液浓度与供试品溶液浓度的比值; A_i: 供试品的估计效价 (U/mg); S₂: 标准品高浓度溶液抑菌圈直径的和 (mm); S₁: 标准品低浓度溶液抑菌圈直径的和 (mm); T₂: 供试品高浓度溶液抑菌圈直径的和 (mm); T₁: 供试品低浓度溶液抑菌圈直径的和 (mm); C_s: 标准品溶液浓度 (U/mL); C_T: 供试品溶液浓度 (U/mL); P_s: 标准品效价 (U/mg); m_s: 标准品的称样量 (mg); m_T: 供试品的称样量 (mg); V_s: 标准品的稀释体积 (mL); V_T: 供试品的稀释体积 (mL); I: 高低剂量之比的对数, $I = \lg \frac{2}{1} = 0.301$, 为常数。

3.2 测量不确定度来源分析 测量不确定度来源的分析常从数学模型入手, 该数学模型中的各个参数可能都有一个与其数值相关的不确定, 成为不确定度的潜在来源。从样品的称量到抑菌圈的测定, 不确定度的来源除抑菌圈直径测量值引起的输入量的标准不确定度外, 还包括标准品和供试品的称

量、标准品的效价、溶液的配制、玻璃仪器和定量移液器的校准、温度、效价测量仪等。

3.3 测量不确定度的评定

3.3.1 抑菌圈直径测量的不确定度分量

3.3.1.1 抑菌圈直径重复测量引入的不确定度分量 对抑菌圈直径的数据进行统计分析,根据上述公式计算效价 (P_1) 为 1636.2 U/mg (可信限率 3.3%), 实验测定 n 个培养皿, 牛津杯个数 k , 统计分析得自由度 $f=(k-1)(n-1)$, 其合并样本标准差即标准不确定度为:

$$u_{x1} = \sqrt{\frac{kn \sum y^2 - k \sum [\sum y(n)]^2 + [\sum y]^2}{kn(k-1)(n-1)}} = 0.856,$$

$$u_{relx1} = 0.856/1636.2 = 0.00052。$$

3.3.1.2 效价测量仪引起的不确定度分量 仪器的最大允许误差为 ± 0.02 mm, 则区间半宽度 $\alpha P = 0.02$ mm, 根据矩形分布, 包含因子 $k = \sqrt{3}$, 其标准不确定度为: $u_{x2} = 0.02/\sqrt{3}$ 。效价测量仪的标准圈直径为 19 mm, 相对标准不确定度为: $u_{relx2} = 0.012/19 = 0.00063$, 合成得:

$$u_{relx} = \sqrt{u_{relx1}^2 + u_{relx2}^2} = \sqrt{0.00052^2 + 0.00063^2} = 0.00082。$$

3.3.2 溶液配制的不确定度分量

3.3.2.1 标准品溶液的不确定度分量 标准品的称量。依据本实验使用天平的检定证书, 电子天平精度为 0.01 mg, 其示值误差为 0.04 mg, 重复性标准偏差为 0.06 mg。根据矩形分布, 包含因子 $k = \sqrt{3}$, 标准不确定度为: $u_{ms1} = \frac{0.04}{\sqrt{3}} = 0.023$, 因采用减重法称量, 所以称量过程中引入的不确定度为:

$$u_{ms} = \sqrt{u_{ms1}^2 \times 2 + u_{ms1}^2} = \sqrt{0.0023^2 \times 2 + 0.035^2} = 0.048,$$

$$\text{相对标准不确定度为: } u_{relms} = \frac{0.048}{34.72}。$$

吉他霉素标准品效价为 1462 U/mg, 根据矩形分布, 置信概率为 95%, 按 B 类不确定度计算。

$$u_{A1} = \frac{0.05}{\sqrt{3}} = 0.0289, u_{relA1} = \frac{0.0289}{1462} = 0.000020。$$

10 mL 单标线刻度吸管经检定 A 级, 容量允差为 ± 0.020 mL, 根据矩形分布, 标准不确定度为:

$$u_{V11} = \frac{0.020}{\sqrt{3}} = 0.012, \text{ 相对标准不确定度为:}$$

$$u_{relV11} = \frac{0.012}{10} = 0.0012。 \text{ 温度: 该移液管在 } 20^\circ\text{C} \text{ 校}$$

准, 实验室的温度为 $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$, 在 95% 置信概率下, 依据矩形分布该影响引起的不确定度可通过估算该温度范围和体积膨胀系数进行计算。水的体积膨胀系数为 $2.1 \times 10^{-4}/^\circ\text{C}$, 因此产生的体积变化为: $\pm(10 \times 5 \times 2.1 \times 10^{-4}) = \pm 0.01$ mL; 根据矩形分布,

$$\text{标准不确定度为: } u_{V12} = \frac{0.01}{\sqrt{3}} = 0.00577, \text{ 相对标准不}$$

$$\text{确定度为: } u_{relV12} = \frac{0.00577}{10} = 0.00058, \text{ 合成得:}$$

$$u_{relV11} = \sqrt{u_{relV11}^2 + u_{relV12}^2} = \sqrt{0.0012^2 + 0.00058^2} = 0.0013。$$

50 mL 容量瓶经检定 A 级, 容量允差为 ± 0.05 mL, 根据矩形分布, 标准不确定度为: $u_{V21} = \frac{0.05}{\sqrt{3}} = 0.0289$, 相对标准不确定度为: $u_{relV21} = \frac{0.0289}{50} = 0.00058$ 。温度: 该容量瓶在 20°C 校准, 实验室的温度为 $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$, 在 95% 置信概率下, 依据矩形分布该影响引起的不确定度可通过估算该温度范围和体积膨胀系数进行计算。水的体积膨胀系数为 $2.1 \times 10^{-4}/^\circ\text{C}$, 因此产生的体积变化为: $\pm(50 \times 5 \times 2.1 \times 10^{-4}) = \pm 0.05$ mL; 根据矩形分布, 标准不确定度为: $u_{V22} = \frac{0.05}{\sqrt{3}} = 0.0289$, 相对标准不确定度为:

$$u_{relV22} = \frac{0.0289}{50} = 0.00082, \text{ 合成得:}$$

$$u_{relV2} = \sqrt{u_{relV21}^2 + u_{relV22}^2} = \sqrt{0.00058^2 + 0.00058^2} = 0.00082$$

100 mL 容量瓶经检定 A 级, 容量允差为 ± 0.10 mL, 根据矩形分布, 标准不确定度为:

$$u_{V31} = \frac{0.10}{\sqrt{3}} = 0.0577, \text{ 相对标准不确定度为:}$$

$$u_{relV31} = \frac{0.0577}{100} = 0.00058。 \text{ 温度: 该容量瓶在 } 20^\circ\text{C} \text{ 校}$$

准, 实验室的温度为 $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$, 在 95% 置信概率下, 依据矩形分布该影响引起的不确定度可通过估算该温度范围和体积膨胀系数进行计算。水的体

积膨胀系数为 $2.1 \times 10^{-4} / ^\circ\text{C}$, 因此产生的体积变化为: $\pm(100 \times 5 \times 2.1 \times 10^{-4}) = \pm 0.1 \text{ mL}$; 根据矩形分布, 标准不确定度为: $u_{V_{32}} = \frac{0.10}{\sqrt{3}} = 0.0577$, 相对标准不

确定度为: $u_{\text{rel}V_{32}} = \frac{0.0577}{100} = 0.00058$, 合成得:

$u_{\text{rel}V_3} = \sqrt{u_{\text{rel}V_{31}}^2 + u_{\text{rel}V_{32}}^2} = \sqrt{0.00058^2 + 0.00058^2} = 0.00082$, 合成标准品溶液的不确定度为,

$u_{\text{rel}S} = \sqrt{u_{\text{rel}m_S}^2 + u_{\text{rel}A_1}^2 + u_{\text{rel}V_1}^2 + u_{\text{rel}V_2}^2 + u_{\text{rel}V_3}^2}$
 $= \sqrt{0.0014^2 + 0.00020^2 + 0.0013^2 + 0.00082^2 + 0.00082^2}$
 $= 0.0022$ 。

3.3.2.2 供试品溶液的不确定度分量 同 3.3.2.1 项的方法计算。供试品的称量, 相对标准不确定度为:

$u_{\text{rel}m_T} = \frac{0.048}{31.38}$, 合成供试品溶液的不确定度 $u_{\text{rel}T}$

$u_{\text{rel}T} = \sqrt{u_{\text{rel}m_T}^2 + u_{\text{rel}V_1}^2 + u_{\text{rel}V_2}^2 + u_{\text{rel}V_3}^2}$
 $= \sqrt{0.0015^2 + 0.0013^2 + 0.00082^2 + 0.00082^2} = 0.0023$ 。

3.3.3 牛津杯加样量的不确定度分量 1 mL 可测移液器, 依据实验所使用移液器的校准证书, 容量允差为 0.14%, 重复性为 0.03%, 根据矩形分布, 标准不确定度为: $u_{V_{411}} = \frac{280 \times 0.14\%}{\sqrt{3}} = 0.23$,

$u_{V_{412}} = \frac{280 \times 0.03\%}{\sqrt{3}} = 0.048$,

$u_{\text{rel}V_{41}} = \sqrt{u_{\text{rel}V_{411}}^2 + u_{\text{rel}V_{412}}^2} = \sqrt{0.23^2 + 0.048^2} = 0.23$ 。

相对标准不确定度为: $u_{\text{rel}V_{41}} = \frac{0.23}{280} = 0.00082$ 。温

度: 该移液器在 20°C 校准, 实验室的温度为 $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$, 在 95% 置信概率下, 依据矩形分布该影响引起的不确定度可通过估算该温度范围和体积膨胀系数进行计算。水的体积膨胀系数为 $2.1 \times 10^{-4} / ^\circ\text{C}$, 因此产生的体积变化为: $\pm(280 \times 5 \times 2.1 \times 10^{-4}) = \pm 0.29 \text{ mL}$; 根据矩形分布, 标准不确定度为:

$u_{V_{42}} = \frac{0.029}{\sqrt{3}} = 0.17$, 相对标准不确定度为: $u_{\text{rel}V_{42}} =$

$\frac{0.17}{280} = 0.00061$, 合成得: $u_{\text{rel}V_4} = \sqrt{u_{\text{rel}V_{41}}^2 + u_{\text{rel}V_{42}}^2} =$

$\sqrt{0.00082^2 + 0.00061^2} = 0.0010$ 。

3.4 合成相对标准不确定度

$u_{\text{rel}(y)} = \sqrt{u_{\text{rel}x}^2 + u_{\text{rel}S}^2 + u_{\text{rel}T}^2 + u_{\text{rel}V_4}^2}$
 $= \sqrt{0.00082^2 + 0.0022^2 + 0.0023^2 + 0.0010^2} = 0.0034$,
 $u_{c(y)} = 0.0034 \times 1636.2 \text{ U/mg} = 5.56 \text{ U/mg}$ 。

3.5 扩展不确定度 取包含因子 $k, P = 95\%$, 则扩展不确定度为 $U = 2 \times 5.56 \text{ U/mg} = 11.1 \text{ U/mg}$ 。报告吉他霉素含量测定结果可表示为: $(1636.2 \pm 11.1) \text{ U/mg} (k = 2)$ 。

4 小 结

通过对管碟法测定吉他霉素含量结果的不确定度评定, 可知该方法测定结果的不确定度的主要来源是溶液的制备过程。提示实验人员应规范实验操作过程, 保证天平、玻璃量具等的稳定和可靠, 控制实验条件, 如环境温度; 并且注意, 在溶液配制过程中, 尽量减少稀释次数和避免采用小体积量器进行量取和定容。该实验过程中需要尤为注意的是, 在吉他霉素母液配制时, 经乙醇溶解后加入灭菌水定容的过程中, 应避免液体温度升高导致溶剂体积变大而影响定容的准确性, 应在适量加入灭菌水后, 待溶液温度降至室温后再定容至刻度线。通过吉他霉素含量不确定度评定, 能够更加清楚影响测定结果准确度的关键因素, 帮助判断结果的准确度, 改进实验方法, 提高检验工作的质量。

参考文献:

- [1] 国家质量监督检验检疫总局. 中华人民共和国国家计量技术规范-2012 测量不确定度评定与表示[S]. General Administration of Quality Supervision Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. Evaluation and Indication of Measurement Uncertainty of People's Republic of China National Measurement Technical Standard -2012[S].
- [2] 中国合格评定国家认可委员会. 化学分析中不确定度的评估指南[M]. 北京: 中国计量出版社, 2006: 34. China National Accreditation Service for Conformity Assessment. Guide for the Evaluation of Uncertainty in Chemical Analysis [M]. Beijing: China Metrology Publishing House, 2006: 34.
- [3] 杨 星, 于晓辉, 董玲玲, 等. 永停滴定法测定磺胺间甲氧嘧啶钠注射液含量的不确定度评定[J]. 中国兽药杂志, 2015, 49

- (3):43-47.
- Yang X, Yu X H, Dong L L, *et al.* Uncertainty Evaluation in the Assay of Sulfamonomethoxine Sodium Injection by Dead-stop Tiration [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2015,49(3): 43-47.
- [4] 白青山,胡法娟. 微生物检定法测定红霉素原料效价的不确定度分析[J]. 齐鲁药事,2011,30(6):337-339.
- Bai Q S, Hu F J. Uncertainty analysis in the Determination of Erythromycin Material by Microbiological Method[J]. Qilu Pharmaceutical Affairs, 2011,30(6):337-339.
- [5] 林红华,严乾临,陈瑞清,等. 管碟法测定单硫酸卡那霉素含量的测量不确定度评定[J]. 中国兽药杂志,2007,41(2): 50-52.
- Lin H H, Yan Q L, Chen R Q, *et al.* Uncertainty Evaluation in the Assay of Kanamycin Monosulfate by Diffusion Method. [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug,2007,41(2):50-52.
- [6] 刘 英. 效价测定法标定标准品含量的不确定度分析[J]. 中国计量,2006,6:70-72.
- Liu Y. Evaluation of Uncertainty of Determination of Standard by Microbiological Method[J]. China Metrology,2006,6:70-72.
- [7] 国家质量监督检验检疫总局. JJG196-2006 常用玻璃量器检定规程[M]. 北京:中国计量出版社,2006.
- General Administration of Quality Supervision Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. JJG196-2006 Common Glass Container Verification Procedures [M]. Beijing: China Metrology Publishing House,2006.
- [8] 国家质量技术监督局计量司. 测量不确定度评定与表示指南 [M]. 北京:中国计量出版社,2003.
- The State Bureau of Technical Supervision of China. Guide to the Evaluation and Presentation of Measurement Uncertainty [M]. Beijing:China Metrology Publishing House,2003.
- [9] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2015 年版一部 [M]. 北京:中国农业出版社,2016.
- Commission of Chinese Veterinary Pharmacopoeia. People's Republic of China Veterinary Pharmacopoeia (2015) [M]. Beijing:China Agriculture Press,2016.

(编辑:侯向辉)