

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2021.3.05

管碟法测定硫酸安普霉素效价的不确定度评定

戴青, 韩宁宁, 王轩, 杨秀玉, 赵晖*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2020-07-29 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2021) 03-0025-05 [中图分类号] S859.83

[摘要] 为对管碟法测定硫酸安普霉素效价的不确定度进行评定, 根据 JJF1059-2019《测量不确定度评定与表示》中的有关规定, 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。测定结果的扩展不确定度为 $U=1.8$ 单位, 可表示为 (103.6 ± 1.8) 单位/ mg ($k=2$)。测量不确定度的主要来源为重复性试验引入的不确定度, 其次为溶液稀释过程中引入的不确定度, 提示试验人员应注意效价测定试验中稀释定容的操作过程, 并注意保持重复性试验条件的一致性。

[关键词] 管碟法; 硫酸安普霉素; 不确定度

Evaluation of Uncertainty in Titer Determination of Apramycin Sulfate by Cylinder – plate Method

DAI Qing, HAN Ning – ning, WANG Xuan, YANG Xiu – yu, ZHAO Hui *

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

Corresponding author: ZHAO Hui, E – mail: 171977364@qq.com

Abstract: In order to evaluate the uncertainty in titer determination of apramycin sulfate by cylinder – plate method, the uncertainty was measured in accordance with the provisions of evaluation and expression of uncertainty measurement (JJF1059-2019). A mathematical model was established which was used to analyze the sources of uncertainty and to evaluate every component in the determination procedure. The extended uncertainty was $U=1.8$ units. The results was expressed as (103.6 ± 1.8) U/ mg ($k=2$). The main source of measurement uncertainty was the repeated test, followed by the dilution process of the solution, which indicated that test personnel should pay attention to the operation process of dilution and constant volume in the process of titer determination, and pay attention to keep the consistency of repeated test conditions.

Key words: cylinder – plate method; apramycin sulfate; uncertainty

作者简介: 戴青, 硕士, 从事抗生素检验检测工作。

通讯作者: 赵晖。E – mail: 171977364@qq.com

硫酸安普霉素是一种动物专用的氨基糖苷类抗菌药物,《中国兽药典》2015 年版一部^[1] 记载了硫酸安普霉素及其制剂的质量标准,其中含量测定项均采用抗菌药物微生物检定法进行测定。目前,国际上通用的抗菌药物微生物检定法包括管碟法和浊度法,管碟法是各国药典收录的经典抗菌药物微生物检定通用方法。不确定度评定是通过对实验过程各个环节引入的不确定度进行评估,以分析各因素对测定结果的影响^[2]。检测结果的可靠性很大程度上取决于测量不确定度大小,测量不确定度越小,说明检测水平越高,检测结果的使用价值越大^[3-4]。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^[5-6]。本文根据 JJF1059-2019《测量不确定度评定与表示》^[7] 中有关规定,对管碟法测定硫酸安普霉素可溶性粉中硫酸安普霉素含量的不确定度进行了分析与评估,以期为准正确认识测量结果与评价检测报告提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料 ZY-300IV 抗菌药物效价测量仪(北京先驱威锋技术开发公司);AX-205 电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);恒温培养室;安普霉素标准品(中国兽医药品监察所,效价测定用,517 单位/mg,批号:K0231610);硫酸安普霉素可溶性粉供试品(山西新世纪生物制药有限公司,批号:190401,规格:100 g : 10 g(1000 万单位));抗菌药物 I 号培养基(北京中海生物科技有限公司);枯草芽孢杆菌 CMCC(B)63501(中国兽医药品监察所);磷酸二氢钾与磷酸氢二钾试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 供试品溶液的制备 精密称取硫酸安普霉素可溶性粉供试品 250 mg,置 25 mL 容量瓶中,加灭菌水溶解并稀释制成每 1 mL 中约含 1000 单位的溶液。精密量取该溶液 5 mL,置 50 mL 容量瓶中,用磷酸盐缓冲液(pH 7.8)稀释至刻度,摇匀,制成每 1 mL 中约含 100 单位的溶液。再分别量取 100 单位/mL 的溶液 5 mL,分别置 50、100 mL 量瓶中,用磷酸盐缓冲液(pH 7.8)稀释至刻度,摇匀,得

到浓度分别为 10 单位/mL 和 5 单位/mL 的溶液,作为供试品溶液的高、低剂量。

1.2.2 标准品溶液的制备 精密称取安普霉素标准品 48 mg,置 25 mL 容量瓶中,加灭菌水溶解并稀释至刻度,制成每 1 mL 中约含 1000 单位的溶液,稀释步骤同供试品溶液。

1.2.3 双碟的制备与培养 取平底双碟约 8 套(n),分别加入加热融化的培养基 20 mL,放置水平台上使凝固,作为底层。另取加热融化后的培养基适量,放冷至 50 ℃,加入枯草芽孢杆菌的菌悬液适量,摇匀,在每一双碟中分别加入 5 mL,摊布均匀,作为菌层。冷却后,在每一双碟中以等距离安置不锈钢小管 4(k)个,待用。将上述稀释好的标准品溶液与供试品溶液分别滴加于不锈钢小管内,在 35~37 ℃ 恒温培养室中培养 16~18 h。

1.2.4 抑菌圈直径的测定与效价计算 取出培养好的双碟,用抑菌圈测量仪测量各个抑菌圈的直径,照《中国兽药典》2015 年版一部附录 1431 生物检定统计法中的 2.2 法进行可靠性检验与效价计算。当可靠性检验结果为回归非常显著($P < 0.01$)与偏离平行不显著($P > 0.05$)时,实验结果才成立。

2 结果与分析

2.1 数学模型 效价由下式给出: $P = \log^{-1} \left[\frac{T_2 + T_1 - S_2 - S_1}{T_2 + S_2 - T_1 - S_1} \times I \right] \times 100$ 。式中, P 为供试品效价, S_2 为高浓度标准品溶液所致的各抑菌圈直径的总和, S_1 为低浓度标准品溶液所致的各抑菌圈直径的总和, T_2 为高浓度供试品溶液所致的各抑菌圈直径的总和, T_1 为低浓度供试品溶液所致的各抑菌圈直径的总和, I 为高浓度与低浓度比值的对数,当剂量比率 2:1, $I = \log 2 = 0.3010$,由浓度间的比率决定,与所用碟数无关。

抑菌圈直径测定时,对供试品溶液进行扫描测定,测定结果见表 1。

2.2 不确定度来源分析 对抗菌药物微生物检定法的二剂量管碟法测量不确定度来源进行分析,可将影响硫酸安普霉素效价测定的不确定度因素归

为:抑菌圈直径重复测量的不确定度,抑菌圈测量操作)的不确定度以及重复性试验引入的不确定度,配制溶液(包括称量、稀释、定容等

表 1 抑菌圈直径测量结果

Tab 1 Diameter measurement results of bacteriostatic zone					
双碟号 K	dS ₁	dS ₂	dT ₁	dT ₂	∑ Y _n
1	17.29	19.15	17.41	19.27	73.12
2	16.62	18.50	16.61	18.52	70.25
3	18.35	20.15	18.40	20.13	77.03
4	17.99	19.62	17.85	19.60	75.06
5	17.40	19.03	17.40	19.25	73.08
6	18.36	20.24	18.39	20.42	77.41
7	17.04	18.99	17.14	19.08	72.25
8	18.19	19.99	18.25	20.26	76.69
∑ Y _k	141.24	155.67	141.45	156.53	594.89
K	S ₁	S ₂	T ₁	T ₂	∑ Y

2.3 各分量的不确定度

2.3.1 抑菌圈直径重复测量的不确定度分量 对抑菌圈直径的数据进行统计分析,根据上述公式计

$$u(x_1) = \sqrt{\frac{kn \sum y^2 - k \sum [\sum y(k)]^2 - n \sum [\sum y(n)]^2 + [\sum y]^2}{kn(k-1)(n-1)}} = 0.080$$

相对标准不确定度为: $u(x_1)_{rel} = u(x_1)/y = 0.080/102.95 = 0.00078$ 。

2.3.2 抑菌圈测量仪的不确定度分量 抑菌圈测量仪的最大允许误差为 ±0.02 mm,则区间半宽度 $aP = 0.02$ mm,测量值落在该区间的概率分布为均匀分布,其标准不确定度为: $u(x_2) = 0.02/\sqrt{3} = 0.012$ mm,抑菌圈测量仪的标准圈直径为 19 mm,其相对标准不确定度为:

$$u(x_2)_{rel} = u(x_2)/x = 0.012/19 = 0.00063$$
。

2.3.3 配制溶液的不确定度分量 分为标准品溶液的配制与供试品溶液的配制。

2.3.3.1 标准品溶液的不确定度 标准品与供试品溶液稀释过程中主要使用的是 A 级玻璃量器,由单个玻璃量器体积引入的合成不确定度为

$$u = \sqrt{u_{玻璃量器体积}^2 + u_{量取偏差}^2 + u_{温度校正}^2}$$

A 级 100、50、25 mL 单标线容量瓶的允许误差分别为:±0.10、±0.05、±0.03 mL,以 B 类不确定

算效价(y)为 102.95 单位/mg,同时统计分析得自由度 $f = (k-1)(n-1) = 21$,其合并样本标准差即标准不确定度为:

度计算,按三角分布估计,则标准不确定度分别为:

$$u_{v1} = 0.10/6 = 0.04 \text{ mL}, u_{v2} = 0.05/6 = 0.02 \text{ mL}, u_{v3} = 0.03/6 = 0.01 \text{ mL}。$$

相对标准不确定度分别为:

$$u_{v1rel} = 0.04/100 = 0.0004, u_{v2rel} = 0.02/50 = 0.0004, u_{v3rel} = 0.01/25 = 0.0004。$$

配制溶液时,实验室温度接近 21 ℃,容量器皿校准温度为 23.8 ℃,近似于矩形分布。

100 mL 容量瓶实验室温度和校准时温度引入的标准不确定度为 $u_{v4} = \frac{\alpha V \Delta t}{\sqrt{3}} = 0.03$ mL,相对标准不确定度为 $u_{v4rel} = 0.03/100 = 0.0003$ 。

50 mL 容量瓶实验室温度和校准时温度引入的标准不确定度为 $u_{v5} = \frac{\alpha V \Delta t}{\sqrt{3}} = \frac{2.1 \times 10^{-4} \times 50 \times 2.8}{\sqrt{3}} = 0.02$ mL,相对不确定度为 $u_{v5rel} = 0.02/50 = 0.0004$ 。

25 mL 容量瓶实验室温度和校准时温度引入的标准不确定度为 $u_{v6} = \frac{\alpha V \Delta t}{\sqrt{3}} = 0.01 \text{ mL}$, 相对标准不确定度为 $u_{v6rel} = 0.01/25 = 0.0004$ 。

$$\begin{aligned} & \sqrt{u_{v1rel}^2 + u_{v2rel}^2 + u_{v3rel}^2 + u_{v4rel}^2 + u_{v5rel}^2 + u_{v6rel}^2} \\ &= \sqrt{0.0004^2 + 0.0004^2 + 0.0004^2 + 0.0003^2 + 0.0004^2 + 0.0004^2} \\ &= 0.0009 \end{aligned}$$

本次标定采用的移液管为 5 mL A 级移液管, 按检定证书最大允差 0.015 mL, 按 B 类不确定度评定, 假定为三角形分布。 $u_{y1} = 0.015/\sqrt{6} = 0.006 \text{ mL}$ 。相对标准不确定度 $u_{y1rel} = 0.006/5 = 0.001$ 。

实验室温度接近 21 ℃, 容量器皿校准温度为 23.8 ℃, 近似于矩形分布: $u_{y2} = \frac{\alpha V \Delta t}{\sqrt{3}} = \frac{2.1 \times 10^{-4} \times 5 \times 2.8}{\sqrt{3}} = 0.002 \text{ mL}$, 相对不确定度为 $u_{y2rel} = 0.002/5 = 0.0004$ 。

移取溶液时的不确定度分量为: $\sqrt{0.001^2 + 0.0004^2} = 0.001$ 。

AX205 天平检定证书标明其最大误差为 0.02 mg, 考虑为矩形分布, 校准不确定度为: $u_{m1} = \frac{0.02}{\sqrt{3}} = 0.012 \text{ mg}$, 上述分量必须计算 2 次, 一次作为空盘, 一次作为毛重, 由于每次称量均为独立的观测结果, 两者的线性影响不相关, 因此, 不确定度为: $\sqrt{0.012^2 \times 2} = 0.017 \text{ mg}$, 相对标准不确定度为: $0.017/48.36 = 0.0004$, 合成标准品溶液的不确定度 $u_s(x_3) = \sqrt{0.0009^2 + 0.001^2 + 0.0004^2} = 0.0014$ 。

2.3.3.2 供试品溶液的不确定度 定容体积的标准不确定度同标准品溶液定容体积的标准不确定度, 移取溶液的不确定度分量同标准品溶液移取溶液的不确定度, 供试品质量的标准不确定度同标准品质量的不确定度, 供试品质量的相对标准不确定度为: $0.017/250.50 = 0.00007$ 。

合成供试品溶液的不确定度 $u_T(x_3) = \sqrt{0.0009^2 + 0.001^2 + 0.00007^2} = 0.0013$ 。

使用 100 mL 容量瓶、50 mL 容量瓶、25 mL 容量瓶, 因此, 定容体积的合成标准不确定度为:

2.3.3.3 配制溶液的不确定度

$$\begin{aligned} u(x_3)_{rel} &= \sqrt{u_s(x_3)^2 + u_T(x_3)^2} = \\ &= \sqrt{0.0013^2 + 0.0014^2} = 0.0019 \end{aligned}$$

2.3.4 重复性试验引入的不确定度 结果如表 2 所示。重复性试验取供试品两份, 同时操作, 用极差评定相对不确定度:

表 2 硫酸安普霉素效价重复性试验测定结果
Tab 2 Determination results of Apramycin sulfate potency repeated test

序号	标准品称 样量/mg	供试品称 样量/mg	效价 (单位/mg)	效比值
1	48.64	250.50	102.95	1.0295
2	/	254.07	104.35	1.0435
平均值	/	252.28	103.65	1.0365

$$\begin{aligned} u(x_4)_{rel} &= \frac{|A - B|}{1.13 \times \sqrt{2}} \times \frac{2}{(A + B)} \\ &= \frac{|1.0295 - 1.0435|}{1.13 \times \sqrt{2}} \times \frac{2}{(1.0295 + 1.0435)} \\ &= 0.0085 \end{aligned}$$

2.4 总合成标准不确定度

$$\begin{aligned} u(x)_{rel} &= \frac{u(x)}{x} = \\ &= \sqrt{u(x_1)_{rel}^2 + u(x_2)_{rel}^2 + u(x_3)_{rel}^2 + u(x_4)_{rel}^2} = \\ &= \sqrt{0.00078^2 + 0.00063^2 + 0.0019^2 + 0.0085^2} = \\ &= 0.0088 \end{aligned}$$

2.5 扩展不确定度 $U \quad u(x)/x = 0.0088, x = 103.65 \text{ 单位/mg}, u(x) = 0.0088 \times 103.65 = 0.91 \text{ 单位/mg}$ 。本试验采用置信概率为 95% 的包含因子, 根据 t 分布表, 取 $k = 2$, 则扩展不确定度为 $U = 2u(x) = 2 \times 0.91 = 1.8 \text{ 单位/mg}$ 。硫酸安普霉素效

价测定的结果可表示为: (103.6 ± 1.8) 单位/mg ($k=2$)。

3 讨论与结论

参照《中国药品检验标准操作规范》^[8], 二剂量管碟法加样顺序为: 高浓度标准品溶液→高浓度供试品溶液→低浓度标准品溶液→低浓度供试品溶液, 每次滴加的溶液应为同一浓度。由加样时间引入的不确定度对测定结果的影响为系统误差, 在试验中, 应尽量减少加样时间, 以将该因素的影响控制在最小, 在不确定度评定中做零项处理^[9-10]。

综上, 各因素对测定结果的影响依次为: 重复性试验 > 溶液稀释 > 抑菌圈直径重复测量 > 抑菌圈测量仪 > 样品称量。由此可见, 本试验标准品与供试品称量引入的不确定度最小, 仪器引入的不确定度次之, 而测量不确定度的主要来源为重复性试验, 其次为溶液的稀释过程, 提示试验人员应注意效价测定过程中稀释定容的操作过程, 并注意保持重复性试验条件的一致性, 可采用四分法取样以保证试验样品的均匀性。通过对硫酸安普霉素效价的不确定度评定, 有助于准确衡量检测结果, 为提高抗生素效价测定结果的准确度提供了参考依据。

参考文献:

- [1] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典[M]. 北京: 中国农业出版社, 2015.
Chinese Veterinary Pharmacopoeia Committee. Chinese Veterinary Pharmacopoeia[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2015.
- [2] 董玲玲, 于晓辉, 杨星, 等. 气相色谱内标法测定双甲脒溶液含量的不确定度评定[J]. 中国兽药杂志, 2017, 51(5): 33-36.
Dong L L, Yu X H, Yang X, *et al.* Evaluation of Uncertainty of Determination of Amitraz Solution by the GC Internal Standard Method[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2017, 51(5): 33-36.
- [3] 杨娟, 王立云, 杨龙华, 等. 测量不确定度在化学药物质量控制中的应用及研究进展[J]. 中国药师, 2020, 23(3): 530-534.
Yang J, Wang L Y, Yang L H, *et al.* Application and Research Progress of Uncertainty Measurement in Quality Control of Chemical Medicines[J]. China Pharmacist, 2020, 23(3): 530-534.
- [4] 侯梦妮, 谢珍, 刘柱, 等. 不确定度评定在药品检验中的研究进展[J]. 海峡药学, 2018, 30(6): 55-57.
Hou M N, Xie Zhen, Liu Z, *et al.* Research Progress of Uncertainty in Drug Testing[J]. Strait Pharmaceutical Journal, 2018, 30(6): 55-57.
- [5] 徐娜, 韩宁宁, 于丽娜, 等. 管碟法测定吉他霉素含量的不确定度评定[J]. 中国兽药杂志, 2017, 51(12): 52-56.
Xu Y, Han N N, Yu L N, *et al.* Uncertainty Evaluation in the Assay of Kitasamycin by Diffusion Method[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2017, 51(12): 52-56.
- [6] 史喜菊, 马贵平, 李冰玲, 等. 牛布鲁菌病补体结合试验测量不确定度评估[J]. 中国兽医杂志, 2013, 49(5): 65-69.
Shi X J, Ma G P, Li B L, *et al.* Measurement Uncertainty Evaluation of Complement Fixation Test for Detection of Bovine Brucellosis[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2013, 49(5): 65-69.
- [7] 国家质量监督检验检疫总局. JJF1059-2019 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. JJF1059-2019 Evaluation and Expression of Uncertainty in Measurement[S].
- [8] 中国食品药品检定研究院. 中国药品检验标准操作规范[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2019.
National Institutes for Food and Drug Control. Standard Operation Procedures for Drug Control[M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2019.
- [9] 韩宁宁, 戴青, 于丽娜, 等. 三剂量浊度法庆大霉素效价测定的不确定度分析[J]. 中国兽医杂志, 2017, 53(11): 97-99.
Han N N, Dai Q, Yu L N, *et al.* Analysis of Uncertainty in the Titer Determination of Gentamicin with the Three Dose Turbidity Method[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2017, 53(11): 97-99.
- [10] 常艳. 抗生素标准品的定值及其不确定度评定[D]. 北京: 北京协和医学院研究生院, 2011.
Chang Y. Uncertainty Estimation of Antibiotic Reference Standards[D]. Beijing: Graduate School of Peking Union Medical College Hospital, 2011.

(编辑: 侯向辉)