

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.05.022

肾宝片需氧菌总数测量不确定度评定

张莉敏¹, 李默耕², 王晓梅³

(1. 山东省枣庄市食品药品检验检测中心, 山东 枣庄 277000; 2. 山东省枣庄市山亭区疾病预防控制中心, 山东 枣庄 277200; 3. 山东省枣庄市市场监管综合服务中心, 山东 枣庄 277000)

摘要:目的 评定肾宝片需氧菌总数的测量不确定度。方法 统计20份同一批号肾宝片的需氧菌总数,建立数学模型,分析测量不确定度的来源,并评定其的分量,采用合成的方法确定需氧菌总数测量的不确定度。结果 肾宝片需氧菌总数的测量不确定度来源主要有样品重复性检测、玻璃量器、加样体积、天平称量,其相对标准不确定度分别为0.015 5, 0.004 6, 0.004 6, 0.008 2。结论 样品重复性检测是影响肾宝片需氧菌总数测量不确定度评定的主要因素,需氧菌总数测量不确定度评定主要误差来源于微生物分布的不均匀性。

关键词: 肾宝片; 需氧菌总数; 不确定度评定; 来源; 重复性检测

中图分类号: R932; R286.0

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2022)05-0093-03

Evaluation of Uncertainty in the Count Test of Total Aerobic Bacteria in Shenbao Tablets

ZHANG Limin¹, LI Mogeng², WANG Xiaomei³

(1. Zaozhuang Center for Food and Drug Control, Zaozhuang, Shandong, China 277000; 2. Zaozhuang Shanting Center for Disease Control and Prevention, Zaozhuang, Shandong, China 277200; 3. Zaozhuang Market Supervision Comprehensive Service Center, Zaozhuang, Shandong, China 277000)

Abstract: Objective To evaluate the uncertainty in the count test of the total number of aerobic bacteria in Shenbao Tablets.

Methods The total number of aerobic bacteria in 20 samples of Shenbao Tablets with the same batch number was counted, the mathematical model was established to analyze the uncertainty sources and to evaluate the uncertainty components. The uncertainty of the count test of total aerobic bacteria was evaluated by the synthetic method. **Results** The main sources of the uncertainty of the count test of total aerobic bacteria in Shenbao Tablets were sample repeatability test, glass gauge, sample volume and weighing with balance. The relative standard uncertainties were 0.015 5, 0.004 6, 0.004 6 and 0.008 2, respectively. **Conclusion** The repeatability test of samples is the main factor affecting the uncertainty evaluation of the total number of aerobic bacteria in Shenbao Tablets. The main error of the evaluation of uncertainty in the count test of the total aerobic bacteria is due to the uneven distribution of microorganisms.

Key words: Shenbao Tablets; total number of aerobic bacteria; evaluation of uncertainty; source; repeatability test

需氧菌总数的测量结果可反映药品在生产加工、包装、运输等环节的质量控制情况^[1],是评价某产品是否被微生物污染的指标。不确定度是指由于存在不可避免的误差,对被测量值不能肯定的程度。不确定度越小,测量值与被测量的真实值越接近^[2]。肾宝片具有调和阴阳、温阳补肾、扶正固本功效,本研究中评定了其需氧菌总数的测量不确定度,以促进合理用药。现

报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

仪器: PGL3002型电子天平(艾德姆衡器<武汉>有限公司,精度为0.1 g); DHP9082型电热恒温培养箱(上海一恒科技有限公司); GR60DF型立式压力灭菌器(致微<厦门>仪器有限公司); 量筒(规格为100 mL),

第一作者: 张莉敏,女,大学本科,副主任药师,研究方向为微生物检验与生物检定,(电子信箱)zhanglimin197301@163.com。

- [9] 曾 勇,李 睿,曾 岑,等. HPLC测定不同配比麻黄汤水煎液中的麻黄碱和伪麻黄碱[J]. 华西药理学杂志,2014,29(4):433-435.
- [10] 刘 威,李家春,胡军华,等. 桂枝水提液全时段双波长融合高效液相色谱指纹图谱研究及6个成分定量分析[J]. 药物分析杂志,2014,34(6):1043-1048.
- [11] 刘旺培,马 迅,刘小华,等. 盐酸麻黄碱有关物质伪麻黄碱检查方法的改进[J]. 药物分析杂志,2015,35(7):1299-1304.
- [12] 徐文杰,陈飞龙,谢 颖,等. 不同配伍对比对麻黄-桂枝药对有效成分含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,

2012,18(10):84-88.

- [13] 徐文杰,方 芳,余林中,等. 麻黄桂枝药对解热作用及其机制的实验研究[J]. 时珍国医国药,2013,24(7):1547-1549.
- [14] 郑芳昊. 麻黄-桂枝药对配伍对麻黄碱引起的大鼠中枢神经系统毒副作用的保护机制研究[D]. 广州:南方医科大学,2015.
- [15] 方 芳. 药对麻黄-附子和麻黄-桂枝的药效学配伍机理研究[D]. 广州:南方医科大学,2012.

(收稿日期:2021-04-01;修回日期:2021-08-23)

分度吸量管(规格为1 mL),均购自天津市天科玻璃仪器制造有限公司。所用仪器及量具均在检定有效期内。

试药:肾宝片(山东幸福人医药连锁有限公司,批号为2012604);胰酪大豆胨琼脂培养基(批号为200709),氯化钠-蛋白胨缓冲液(批号为190728,pH 7.0),均购自北京陆桥技术股份有限公司;纯化水(山东省枣庄市食品药品检验检测中心自制)。培养基及纯化水经适应性检查,肾宝片需氧菌计数方法经微生物检验方法学验证,均符合要求。

1.2 溶液制备

取样品10 g,精密称定,共20份(编号为1~20),置匀浆罐中,加氯化钠-蛋白胨缓冲液100 mL,均质溶解,混匀成1:10(m/V)的供试品溶液,取1 mL沿管壁缓慢加入含有9 mL氯化钠-蛋白胨缓冲液的无菌试管中,旋涡混匀,制成1:100(m/V)的稀释液。

1.3 计算方法

参照2020年版《中国药典(四部)》^{[3]160-165}通则1105项下方法测量样品中的需氧菌总数。取1:10和1:100(m/V)的稀释液各1 mL,分别加入无菌培养皿中;同时,取1 mL氯化钠-蛋白胨缓冲液加入另一无菌培养皿中,作为阴性对照。各培养皿中分别加入20 mL胰酪大豆胨琼脂培养基,混匀,琼脂凝固后,置 $(33 \pm 1)^\circ\text{C}$ 条件下培养5 d,计数。所有步骤均由同一检测人员操作。

1.4 数学模型建立

建立数学模型^[4] $Y=f(X_1, X_2 \cdots X_n) = KX/(mV)$ 。其中, Y 为单位质量样品的需氧菌总数(cfu/g); K 为样品稀释后的体积(mL); X 为某稀释级下 n 个培养皿的平均菌落数(cfu); m 为取样量(g); V 为该稀释级下取样体积(mL),一般为1 mL。

2 结果与分析

2.1 不确定度来源

依据本次试验测定的过程和数学模型分析,肾宝片需氧菌总数的测量不确定度来源主要有样品重复性检测、玻璃量器、加样体积、天平称量。

2.2 不确定度分量评定

2.2.1 样品重复性检测

检测完成后,根据菌数报告规则,选取平均菌落数小于300 cfu的稀释级为检测报告的依据^{[3]160-165},由于1:10和1:100(m/V)的稀释液均满足上述要求,故选取含菌落数最多的、稀释级为1:10(m/V)的稀释液为菌数结果报告(见表1)。按1.3项下方法计数,得 X_1 和 X_2 。阴性对照皿中菌落数均为0。

依据残差平方和公式,利用表中的数据,计算20份

表1 样品重复性检测结果

Tab.1 Results of the repeatability test of samples

样品编号	$X_1(\text{cfu/g})$	$X_2(\text{cfu/g})$	$\lg X_1$	$\lg X_2$	$\lg \bar{X}_i$	$(\lg X_i - \lg \bar{X}_i)^2$
1	430	450	2.633 5	2.653 2	2.643 4	0.000 630
2	400	430	2.602 1	2.633 5	2.617 8	0
3	370	380	2.568 2	2.579 8	2.574 0	0.001 962
4	420	470	2.623 2	2.672 1	2.647 6	0.000 858
5	460	500	2.662 8	2.699 0	2.680 9	0.003 918
6	340	390	2.531 5	2.591 1	2.561 3	0.003 249
7	320	360	2.505 1	2.556 3	2.530 7	0.007 673
8	360	400	2.556 3	2.602 1	2.579 2	0.001 529
9	480	520	2.681 2	2.716 0	2.698 2	0.006 384
10	410	450	2.612 8	2.653 2	2.633 0	0.000 216
11	300	380	2.477 1	2.579 8	2.528 4	0.008 082
12	280	360	2.477 2	2.556 3	2.516 8	0.010 302
13	400	470	2.602 1	2.672 1	2.637 1	0.000 353
14	410	500	2.612 8	2.699 0	2.655 9	0.001 414
15	430	520	2.633 5	2.716 0	2.674 8	0.003 192
16	370	430	2.568 2	2.633 5	2.600 8	0.000 306
17	350	420	2.544 1	2.623 2	2.583 6	0.001 204
18	490	540	2.690 2	2.732 4	2.711 3	0.008 649
19	470	520	2.672 1	2.716 0	2.694 0	0.005 730
20	340	460	2.531 5	2.662 8	2.597 2	0.000 445
$\bar{X}$	392	448	2.589 0	2.647 3	2.618 3	

样品的残差平方和, $\sum_{i=1}^{20}(\lg X_i - \lg \bar{X}_i)^2 = 0.066\ 096$ 。依据贝塞尔公式计算标准差(S), $S = \sqrt{\text{残差平方和}/[a(b-1)]}$ 。其中, a 为样品份数, b 为每份样品的测量次数,代入数据得 $S = \sqrt{0.066\ 096/[20 \times (20-1)]} = 0.057\ 487$ 。

因每个样品测量2次,则标准不确定度 $[U(Y)] = S/\sqrt{n} = 0.057\ 487/\sqrt{2} = 0.040\ 7$,相对标准不确定度 $U_{rel}(Y) = U(Y)/\lg \bar{X}_i = 0.040\ 7/2.618\ 3 = 0.015\ 5$ 。

2.2.2 玻璃量器

20℃时,规格为100 mL的量筒和规格为1 mL的分度吸量管的容量允差分别为 $\pm 1.0\ \text{mL}$ 和 $\pm 0.008\ \text{mL}$ ^[5],但缺乏置信水平,标准不确定度是假设校准引起的,呈矩形分布^[6]。计算100 mL量筒和1 mL的分度吸量管引入的标准不确定度(U_v)。 $U_v(100\ \text{mL}) = 1.0/\sqrt{3} = 0.577\ 4\ \text{mL}$, $U_v(1\ \text{mL}) = 0.008/\sqrt{3} = 0.004\ 6\ \text{mL}$,相对标准不确定度分别为 $U_{rel}(100\ \text{mL}) = 0.577\ 4/100 = 0.005\ 8$, $U_{rel}(1\ \text{mL}) = 0.004\ 6/1 = 0.004\ 6$ 。

2.2.3 天平称量

电子天平的允许误差为 $\pm 0.1\ \text{g}$ ^[7]。先称定空盘的质量,再称定空盘和样品的总质量,2次称量均独立完成,二者为非线性相关关系,天平最大允许误差为矩形

分布,故需计算2次不确定度^[8],标准不确定度(U_m) = $(\sqrt{2} \times 0.1) / \sqrt{3} = 0.081\ 6$,实际称取样品量(m)为10.00 g,相对标准不确定度 $[U_{rel}(m)] = U_m / m = 0.081\ 6 / 10.00 = 0.008\ 2$ 。

2.2.4 加样体积

1:10(m/V)稀释过程引入的不确定度与2.2项下玻璃量器项下的相对标准不确定度相同, $U_{rel}(V_{100\text{ mL}}) = 0.005\ 8$, $U_{rel}(V_{1\text{ mL}}) = 0.004\ 6$ 。

2.2.5 合成不确定度

各分量引入的相对标准不确定度互不相关,故需计算合成相对标准不确定度 $[U_{rel\text{ 合}}(Y)]$ 。

$$U_{rel\text{ 合}}(Y) = \sqrt{U_{rel}(Y)^2 + U_{rel}(V_{100\text{ mL}})^2 + U_{rel}(V_{1\text{ mL}})^2 + U_{rel}(m)^2} \\ = \sqrt{0.015\ 5^2 + 0.005\ 8^2 + 0.004\ 6^2 + 0.008\ 2^2} = 0.019\ 1$$

计算标准不确定度 $[U_{\text{合}}(Y)]$ 。 $U_{\text{合}}(Y) = U_{rel\text{ 合}}(Y) \times \overline{lgX_i} = 0.019\ 1 \times 2.618\ 3 = 0.049\ 9$ 。

按照《中华人民共和国国家标准》(GB/T 27418A2017)的 t 分布表[置信概率(P) = 95%,自由度(v) = 20]^[2],可查包含因子(K)为2.09,计算扩展不确定度(U),即 $U_{\text{合}} = U_{\text{合}}(Y) \times K = 0.049\ 9 \times 2.09 = 0.104\ 3$ 。

2.3 不确定度结果

由表1可知,肾宝片需氧菌总数的检测结果表示为 $2.168\ 3 \pm 0.104\ 3$, K 为2.09,取反对数,最终肾宝片需氧菌总数菌落报告总数为330~530 cfu/g。

3 讨论

分析肾宝片需氧菌总数测定的不确定度分量发现,样品重复性检测引入的不确定度分量最大,天平称量、玻璃量器、加样体积引入的不确定度分量较小。在样品重复性检测中,检测数据的差异受众多因素影响,如微生物的活体易变及分布不均匀、生态环境多样复杂、检验方法存在误差等^{[3]388},但主要因素为微生物在样品中分布不均匀,故肾宝片需氧菌总数测定的不确定度评定主要误差来源于微生物分布的不均匀。肾宝片需氧菌总数测量不确定度的评定中,培养基的质量、检验室环境洁净度、培养温度变化等分量引入的不确定度不能直接测量或以统计学方式进行评定^[9],后续研究将考虑这些因素造成的结果偏离,以降低由此引入的不确定度,促使需氧菌总数测定结果

更准确。

但由于微生物检验的特殊性及难以定量的特性,测

量不确定度在该领域的运用较缓慢^[10]。近年来,食品微生物领域多见测量不确定度评定的文献报道^[11],药品微生物相关文献报道较少^[12]。目前,国家已发布相关标准对测量不确定度评定有了明确要求。《检测和校准实验室能力的通用要求》中规定,开展检测的实验室应评定测量不确定度;当检测结果需要或客户有要求时,检测报告应带有与被需求单位要求的测量不确定度^[13]。《测量不确定度的要求》(CNAS-CL07)中规定,检测实验室应有能力对每项有数值要求的测量结果进行测量不确定度评估^[14-15]。各级食品药品检验机构对外出具的检测数据是反映样品质量是否合格的重要依据,同时反映了实验室风险控制和质量控制的情况。故引入测量不确定度对评估定量分析方法的可靠性和测量结果的准确性意义较大。

参考文献

- [1] 肖 璜,戴 翠,周发友,等. 基于板蓝根颗粒需氧菌总数计数的药品微生物检测能力验证研究[J]. 中国药业,2021,30(13):60-63.
- [2] GB/T 27418A2017,中华人民共和国国家标准:测量不确定度评定和表示[S].
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020.
- [4] 汪艳玲,赵怀荣. 果汁中菌落总数的不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报,2016,7(6):2533-2536.
- [5] JJG196-A2006,中华人民共和国国家计量检定规程:常用玻璃量器[S].
- [6] 王世爱. 食品中菌落总数测定的不确定度评定[J]. 疾病监测与控制,2017,11(11):901-902.
- [7] JJG 1036A-2008,中华人民共和国国家计量检定规程:电子天平[S].
- [8] 王 晶. 电子天平在样品制备中引入的不确定度分析[J]. 医疗装备,2019,32(1):38-39.
- [9] 杨玲玲,李海芳. 食品菌落总数测定盲样考核结果不确定度的评定[J]. 食品安全质量检测学报,2018,9(14):3780-3783.
- [10] 杨 娟,钟 昕,朱世真,等. 测量不确定度在微生物检验中的应用及研究进展[J]. 生物化工,2021,7(4):119-123.
- [11] 魏国美. 食品中菌落总数测定不确定度的评定[J]. 质量技术监督研究,2011(5):22-23.
- [12] 田树兴,吴永芳,周崇富,等. 制何首乌配方颗粒需氧菌总数测定的不确定度评定[J]. 福建分析测试,2021,30(3):58-62.
- [13] GB/T 27025-2019/ISO/IEC 17025:2017,中华人民共和国国家标准:检测和校准实验室能力的通用要求[S].
- [14] CNAS-CL07,测量不确定度的要求[S].
- [15] 董超琪,袁华峰. 微生物检定法测定庆大霉素注射液含量的不确定度分析[J]. 海峡药学,2014,26(6):86-88.

(收稿日期:2021-06-13;修回日期:2021-09-06)