

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.20.018

板蓝根颗粒需氧菌总数测定不确定度分析

刘文杰,井良义,郝运伟,王 君,牛振东[△]

(北京市药品检验研究院·中药成分分析与生物评价北京市重点实验室,北京 102206)

摘要:目的 建立板蓝根颗粒需氧菌总数测定不确定度评估方法。方法 根据2020年版《中国药典(四部)》通则1105非无菌产品微生物限度检查中微生物计数法,测定样品中需氧菌总数;分析不确定度的来源,对需氧菌总数进行A类和B类不确定度评定,计算合成不确定度并确定扩展不确定度。结果 95%置信区间时,合成不确定度为0.044 0,扩展不确定度为0.092 1,需氧菌总数取值范围为400~620 cfu/g。结论 影响测定结果不确定度的主要因素为样品重复测定。所建立的不确定度分析方法可为今后实验室测定药品中需氧菌总数的不确定度评估提供参考。

关键词:板蓝根颗粒;需氧菌总数;不确定度;药品检验

中图分类号:R932;R286.0

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)20-0069-04

Uncertainty Assessment in Total Aerobic Microbial Count of Banlangen Granules

LIU Wenjie, JING Liangyi, HAO Yunwei, WANG Jun, NIU Zhendong

(Beijing Institute Drug Control · Beijing Key Laboratory of Analysis and Evaluation on Chinese Medicine, Beijing, China 102206)

Abstract: **Objective** To establish an uncertainty assessment method for the total aerobic microbial count of Banlangen Granules. **Methods** According to the microbial count method in the microbial limit test of non-sterile products in the general rule 1105 of *Chinese Pharmacopoeia* (2020 Edition, Volume IV), the total aerobic microbial count in the samples was determined. The source of uncertainty was analyzed, the total aerobic microbial count was assessed with class A and class B uncertainty, the combined uncertainty was calculated, and the expanded uncertainty was determined. **Results** Within the 95% confidence interval (95% CI), the combined uncertainty was 0.044 0, the expanded uncertainty was 0.092 1, and the total aerobic microbial count was in the range of 402-620 cfu/g. **Conclusion** The main factor affecting the uncertainty of the determination results is the repeated determination of samples. The established uncertainty assessment method can provide a reference for the uncertainty assessment of testing the total aerobic microbial count in drugs in the future.

Key words: Banlangen Granules; total aerobic microbial count; uncertainty; drug inspection

需氧菌总数是2020年版《中国药典》中非无菌产品微生物限度检查项目,也是评价药品安全性的重要指标,可反映药品生产过程中是否符合生产要求^[1-3]。微生物限度检查结果受到样品中微生物分布均匀,样品称量、制备过程,不同检验人员操作手法等因素的影响。测定不确定度是表征赋予被测量值分散性的非负参数^[4-5],由若干分量构成,可通过不确定度的A类和B类评定,用标准偏差表征。实验室认证认可明确要求,可采取多方式对检测实验室有数值要求的参数进行不确定度评估,以保证检验检测数据结果的可靠性^[6]。为实现检验结果的可靠性,中国合格评定国家认可委员会对检测和校准实验室提出了应做测定不确定度的要求^[7-8]。本研究中参考2020年版《中国药典(四部)》通则1105,依据标准《测量不确定度评定与表示》(JJF1059.1-2012)对药品微生物限度检查项目中的需氧菌总数进行A类和B类不确定度评定,建立本实验室

微生物不确定度评定方法,提高检验结果的可靠性,查找试验过程的关键操作点,为更好地指导检验机构的检验检测工作,以及建立同类制剂检测的测量不确定度评定方法提供依据^[9]。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

DL-CJ-2ND型超净工作台(北京东联哈尔仪器制造有限公司);1300 SERIES A2型生物安全柜、DLHP-Q200型恒温摇床(美国Thermo Scientific公司);LRH-250型生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);BIST-A-D型电热脉动真空灭菌器(山东新华医疗器械股份有限公司);ME1002T型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司)。

1.2 试剂

板蓝根颗粒(厂家A,规格为每袋5 g);pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液(北京奥博星生物技术有限公

第一作者:刘文杰,女,大学本科,主管药师,研究方向为药品、化妆品微生物检查,(电话)010-52779661(电子信箱)lwjh0328@163.com。

[△]通信作者:牛振东,男,硕士,副主任药师,研究方向为药品、化妆品微生物检查,(电话)010-52779659(电子信箱)dividniu@163.com。

司,批号为20201010);胰酪大豆胨琼脂(TSA)培养基(批号为8053765)、沙氏琼脂培养基(批号为815577),均购自美国BD公司。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

供试液:取样品10 g,精密称定,置100 mL容量瓶中,加pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液定容,摇匀,使样品分散均匀,制成供试液I。精密量取10 mL,加pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液90 mL,混匀,即得供试液II。

供试品组供试液:取供试液I 10 mL,加入pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液0.1 mL,混匀,即得。

菌液组供试液:取pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液10 mL,加入制备好的试验菌液0.1 mL(300~1 000 cfu),混匀,制成每1 mL稀释液中含菌量30~100 cfu的菌液。

试验组供试液:分别取供试液I 10 mL和制备好的试验菌液0.1 mL,混匀,即得。

2.2 需氧菌培养与计数

取供试液II,逐级(10倍)稀释,每个稀释级各取1 mL至平皿,平行2个平皿,倾注TSA培养基适量,33℃培养5 d,计数。另取pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液1 mL至平皿,作为阴性对照,平行2个平皿,由同一人员操作。由公式 $A = KX / V$ 计算需氧菌总数,其中, K 为稀释倍数, X 为进入TSA培养基的2个平皿平均菌落数, V 为该稀释级下的取样体积,一般 V 取1 mL,单位为cfu/g。

2.3 不确定度来源分析

回顾整个试验过程,发现影响检测结果不确定度的主要因素有样品均匀性、检测人员的不同,以及取样重复性,在称量过程中天平的使用,样品稀释过程中量筒和吸管的使用。本研究中主要对后三者引入的不确定度进行评定。

2.4 方法学考察

试验分为供试品组、菌液组和试验组,分别以2.1项下相应供试液处理,每组均平行3个平皿,除霉菌和酵母菌以沙氏琼脂培养基于33℃下培养5 d外,其余菌种均以TSA培养基培养3 d后,采用平皿法计数。结果见表1。

2.5 不确定度分量评定

2.5.1 A类不确定度评定

对重复性测量的不确定度进行评定。需氧菌总数检测中有同一人对同一个样品按照药典规定进行操作,数据的发散性较大,故对检测数据取对数再进行计算。采用极差法评定重复测量的不确定度,对20份注入

表1 方法适用性考察结果

Tab.1 Investigation results of the applicability of the method

菌种	试验 序次	供试品组 (cfu/皿)	菌液组 (cfu/皿)	试验组 (cfu/皿)	回收率 (%)
金黄色葡萄球菌	1	0	49	53	108.16
	2	0	50	49	98.00
	3	0	50	51	102.00
枯草芽孢杆菌	1	0	24	30	125.00
	2	0	28	29	103.57
	3	0	26	29	111.54
铜绿假单胞菌	1	0	42	42	100.00
	2	0	42	40	95.24
	3	0	42	43	102.38
黑曲霉	1	0	40	38	95.00
	2	0	40	41	102.50
	3	0	38	40	105.26
白色念珠菌	1	0	44	41	93.18
	2	0	46	45	97.83
	3	0	42	42	100.00
黑曲霉(沙氏琼脂培养基)	1	0	32	31	96.88
	2	0	35	30	85.71
	3	0	30	30	100.00
白色念珠菌(沙氏琼脂培养基)	1	0	52	51	98.08
	2	0	53	49	92.45
	3	0	58	52	89.66

TSA培养基的供试液I的重复2次检验结果取对数,计算结果的均值和残差平方和,结果见表2。计算合并标准偏差为

$$S_p = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\lg x_i - \lg \bar{x})^2}{p \times (n-1)}} = \sqrt{\frac{0.0491}{20 \times (2-1)}} = 0.0495$$

(P 为样本量, n 为重复次数)标准不确定为 $U_c = \frac{S_p}{\sqrt{n}} = \frac{0.0495}{\sqrt{2}} = 0.03501$, $\lg \bar{X} = \frac{1}{pn} \sum \lg X = \frac{54.3669 + 53.5009}{20 \times 2} = 2.6967$, 相对标准不确定度

$$U_{\text{rel}}(\lg \bar{X}) = \frac{U_c}{\lg \bar{X}} = \frac{0.03501}{2.6968} = 0.01300$$

2.5.2 B类不确定度评定

样品称量引入不确定度:采用电子天平称取样品,电子天平的分度值为0.01 g,最大量程为1 200 g,检定分度值为0.1 g,根据JJG1036-2008标准中电子天平检定规程,电子天平的允许误差为 ± 0.1 g,天平最大允许误差(MPE)认为矩形均匀分布,样品由二次称量完成。标准不确定度 $U_m = 0.1 / \sqrt{3} = 0.0577$, 相对标准不确定度 $U_{\text{rel}}(m) = U_m / m = 0.0577 / 10 = 0.0058$ 。

表 2 检验结果及分析

Tab. 2 Testing results and analysis

序号	X_1 (cfu/g)	X_2 (cfu/g)	$\lg X_1$	$\lg X_2$	$\lg \bar{X}$	残差平方和
1	680	490	2.832 5	2.690 2	2.761 4	0.010 1
2	700	520	2.845 1	2.716 0	2.780 6	0.008 3
3	580	460	2.763 4	2.662 8	2.713 1	0.005 1
4	430	440	2.633 5	2.643 5	2.638 5	0.000 0
5	480	420	2.681 2	2.623 2	2.652 2	0.001 7
6	510	400	2.707 6	2.602 1	2.654 8	0.005 6
7	520	470	2.716 0	2.672 1	2.694 1	0.001 0
8	460	480	2.662 8	2.681 2	2.672 0	0.000 2
9	580	580	2.763 4	2.763 4	2.763 4	0.000 0
10	540	600	2.732 4	2.778 2	2.755 3	0.001 0
11	520	480	2.716 0	2.681 2	2.698 6	0.000 6
12	520	490	2.716 0	2.690 2	2.703 1	0.000 3
13	520	430	2.716 0	2.633 5	2.674 7	0.003 4
14	500	470	2.699 0	2.672 1	2.685 5	0.000 4
15	520	450	2.716 0	2.653 2	2.684 6	0.002 0
15	560	490	2.748 2	2.690 2	2.719 2	0.001 7
17	460	450	2.662 8	2.653 2	2.658 0	0.000 0
18	510	480	2.707 6	2.681 2	2.694 4	0.000 3
19	420	490	2.623 2	2.690 2	2.656 7	0.002 2
20	530	420	2.724 3	2.623 2	2.673 8	0.005 1
合计	10 540	9 510	54.366 9	53.500 9	53.933 9	0.049 1

样品稀释引入不确定度:取样品适量用量筒加 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 90 mL,置 100 mL 容量瓶中,定容,混匀,制成 1:10(m/V)稀释液。用校准级别为 A 级的 10 mL 吸管吸取 9 mL pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液,用校准级别为 A 级的 1 mL 吸管取 1 mL (1:10, m/V)至 9 mL pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液中制成 1:100(m/V)稀释液,依此类推。稀释过程引起的相对不确定度见表 3。

表 3 稀释过程引入的相对不确定度

Tab. 3 Relative uncertainty induced by dilution process

项目	标准不确定度	相对标准不确定度(U_{rel})	容量允许误差(mL)	量取体积(mL)
100 mL 量筒	0.577 4	0.005 8	1.00	100
10 mL 分度吸管	0.028 9	0.002 9	0.05	10
1 mL 分度吸管	0.004 6	0.004 6	0.008	1

2.5.3 合成不确定度评定

相对合成不确定度为, $U_{rel}(\lg \bar{X}) = \sqrt{U_{rel}(\lg \bar{X})^2 + U_{rel}(m)^2 + U_{rel}(100)^2 + U_{rel}(10)^2 + U_{rel}(1)^2} = \sqrt{0.013\,00^2 + 0.005\,8^2 + 0.005\,8^2 + 0.002\,9^2 + 0.004\,6^2} = 0.016\,30$ 。

合成不确定度为, $U_c(\lg \bar{X}) =$

$$\lg \bar{X} \sqrt{\sum_{i=1}^N [u(xi)/xi]^2} = 2.696\,7 \times 0.016\,30 = 0.044\,0。$$

2.5.4 扩展不确定度评定

本研究中考察了 20 组测量结果,置信区间(CI)为 95%,自由度(df)为 19.00,查 $t_{0.025}$ 分布表可知 $K = 2.093$,故扩展不确定度为, $U = KU_c(\lg \bar{X}) = 2.093 \times 0.044\,0 = 0.092\,1$ 。

2.6 需氧菌计数结果

本研究中考察了 20 组测量结果,置信区间(CI)为 95%,自由度(df)为 19.00,查 $t_{0.025}$ 分布表可知 $K = 2.093$,故扩展不确定度为, $U = KU_c(\lg \bar{X}) = 2.093 \times 0.044\,0 = 0.092\,1$ 。

3 讨论

对于检验检测机构,测量结果不确定度评定既是《检测和校准实验室能力认可准则》(CNAS-CL01)的要求,又是实验室质量评价与改进的重要参考,也是实验数据可靠性的重要保障。近年来在食品领域菌落总数定量检测均有测量不确定度的报道,药品领域也有一定报道。吕婷婷等^[10]对板蓝根颗粒霉菌和酵母菌总数进行了不确定度的评定。王娟等^[11]对荆防颗粒需氧菌总数的不确定度进行了考察。需氧菌总数作为微生物限度检查项目之一,是保障药品安全的重要指标。本研究建立了板蓝根颗粒需氧菌总数的不确定度分析方法,可以为实验室同剂型制剂的相关检测提供参考。

本研究中列出了天平、量筒和吸管等引入不确定度分量,基于培养基、培养箱、培养条件、实验室温湿度等引入的不确定度不易量化^[12],对合成不确定度的贡献较小,可以通过规范实验室操作,制订相应的作业指导书,定期对实验环境进行监控,强化人员培训等减少这些不确定度因素的引入^[13]。

虽然当前不确定度评定技术在微生物检测领域应用较少,随着检测机构对不确定度评定认识的加深,在对微生物检测结果进行判定时将会得到更广泛的应用。通过对药品需氧菌总数测定不确定度的评价能客观地反映实验室检测结果的可靠性和有效性,降低误判概率,从而减少检测机构的风险。

参考文献

[1] 胡昌勤. 药品微生物控制现状与展望[J]. 中国药学杂志, 2015,50(20):1747-1751.
[2] 杨晓莉,李辉,马英英,等. 中国药典 2015 年版非无菌产品微生物限度检查:微生物计数法解读[J]. 药物分析杂志, 2016,36(6):1101-1107.