

硫酸奈替米星效价测定的不确定度分析

刘晓瑜, 杨敏智 (江苏省无锡药品检验所, 江苏 无锡 214021)

摘要:目的 建立抗生素微生物检定法测定硫酸奈替米星效价的不确定度评定方法。方法 通过建立抗生素微生物检定法的数学模型, 寻找各不确定度分量并加以评定。结果 计算各分量的不确定度, 由此计算合成不确定度, 最终给出测量结果的扩展不确定度和置信水平。结论 建立的不确定度评定方法, 具有一定的代表性, 可用于多个品种的抗生素微生物检定法的不确定度分析。

关键词:效价; 不确定度; 硫酸奈替米星

中图分类号: R927.32 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2009)02-0145-04

Uncertainty Analysis of Antibiotics' Potency Assay of Netilmicin Sulfate

LIU Xiaoyu, YANG Minzhi (Wuxi Institute for Drug Control, Wuxi 214021, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for uncertainty analysis in antibiotics' potency assay. **METHODS** The calculation formula of uncertainty was deduced in the procedure of determining the evaluation. **RESULTS** Each component of uncertainty was calculated by analyzing the variable parameters among the procedures. The combined uncertainty was finally obtained by synthesizing the uncertainties of various component variables. **CONCLUSION** The mathematic model of uncertainty measurement established can be used to other antibiotics.

KEY WORDS: potency; uncertainty; netilmicin sulfate

奈替米星 (netilmicin) 为一半合成的氨基糖苷类广谱抗生素。其作用机理是通过抑制敏感微生物的正常蛋白质合成而起作用。按照中国药典 2005 年版, 其原料药及制剂含量测定均采用了抗生素微生物检定法。本文对硫酸奈替米星的效价测定不确定度进行分析, 找出影响不确定度的因素并对各不确定度分量进行评估, 最终给出测量结果的置信区间和置信水平, 建立适用于评估抗生素效价测定不确定度的方法, 以确定测量结果的可信程度。以便在药品检验过程中, 严格实验操作, 尽量减小实验误差, 确保实验结果的准确可靠。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

ZY-3001V 多功能微生物自动测量分析仪 (北京先驱威锋技术开发公司); Mettler AE-240 电子天平 (梅特勒-托利多); 电热隔水式恒温培养箱 (上海市跃进医疗器械厂); 奈替米星标准品 (中国药品生物制品检定所, 效价测定用, $572 \text{ u} \cdot \text{mg}^{-1}$, 批号: 0355-200001), 硫酸奈替米星样品 (由生产企业提供, 批号: 20060201C); I 号 7.8 ~ 8.0 培养基 (批号: 040303, 北京三药科技开发公司); 短小芽孢杆

菌 [CMCC (B) 63 202] (中国药品生物制品检定所); 磷酸二氢钾与磷酸氢二钾等试剂均为分析纯, 水为重蒸水; 所用培养基、刻度吸管 (用于移取短小芽孢杆菌菌悬液)、磷酸盐缓冲液、双碟、不锈钢小管均先经过灭菌。

1.2 标准品溶液与样品溶液的制备

1.2.1 标准品溶液的制备 精密称取奈替米星标准品 0.04405 g , 用磷酸盐缓冲液 ($\text{pH}7.8$) 溶解并稀释至 25 mL , 摇匀, 得溶液为 $1000 \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。精密吸取 5 mL , 用磷酸盐缓冲液 ($\text{pH}7.8$) 稀释至 50 mL , 摇匀, 得溶液为 $100 \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$; 再分别精密吸取溶液 5 mL , 分别用磷酸盐缓冲液 ($\text{pH}7.8$) 稀释至 25 mL 与 100 mL , 摇匀, 得溶液分别为 $20 \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与 $5 \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$, 作为标准品溶液的高、低剂量。

1.2.2 样品溶液的制备 精密称取奈替米星样品 0.16305 g (估计效价 $618.1319 \text{ u} \cdot \text{mg}^{-1}$), 按“1.2.1”项下方法操作, 得溶液分别为 $20 \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与 $5 \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$, 作为样品溶液的高、低剂量。

1.3 双碟的制备与培养

取平底双碟 8 套 (m), 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,放于 50 °C 的水浴锅中至恒温,加入短小芽孢杆菌菌悬液适量,摇匀,每一双碟中分别加入 5 mL,摊布均匀,作为菌层。冷却后,每一双碟中以等距离安置不锈钢小管 4 个,待用。将上述稀释好的标准品溶液与样品溶液分别以移液枪定量(250 μL)滴加于不锈钢小管内,在 35 °C ~ 37 °C 恒温培养箱中培养 16 ~ 18 h。

1.4 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,照生物检定统计法^[1]进行可靠性检验与效价计算。

实验结果成立的前提为:①可靠性检验:回归应非常显著($P < 0.01$),偏离平行应不显著($P > 0.05$);②平均可信限率 Pt 的 FL% 满足要求(硫酸奈替米星 FL% 应 $< 7\%$);③测定结果经计算所得的效价,应为估计效价的 90% ~ 110%;④抑菌圈清晰,且标准品的高浓度所致的抑菌圈直径应在 18 ~ 22 cm 之间。本次实验以上 4 点均满足。

2 方法与结果

2.1 数学模型

2.1.1 抑菌圈直径测量时,分别对 8 个双碟进行扫描测量,测定结果见表 1。ds1 为低浓度标准品溶液所致的抑菌圈直径;ds2 为高浓度标准品溶液所致的抑菌圈直径;dt1 为低浓度供试品溶液所致的抑菌圈直径;dt2 为高浓度供试品溶液所致的抑菌圈直径;ym 为一个双碟中抑菌圈直径的总和。

表 1 抑菌圈测量的直径值

Tab 1 Diameters of zones of inhibition

碟号	ds1	ds2	dt1	dt2	ym
	20 u · mL ⁻¹	5 u · mL ⁻¹	20 u · mL ⁻¹	5 u · mL ⁻¹	
No. 1	19.12	21.87	18.93	21.94	81.86
No. 2	18.92	21.60	18.81	21.64	80.97
No. 3	19.37	22.21	19.17	22.17	82.92
No. 4	18.93	21.82	19.10	21.84	81.69
No. 5	18.99	21.92	18.99	21.76	81.66
No. 6	18.96	21.67	18.77	21.41	80.81
No. 7	18.80	21.84	18.79	21.84	81.27
No. 8	19.05	22.05	19.05	21.94	82.09

2.1.2 效价的影响因素 效价由下式给出^[2]: $y =$

$$A_T \times P = \frac{W_s \times P_s \times V_x}{W_x \times V_s} \times \log^{-1} \left[\frac{I(T_2 + T_1 + S_2 - S_1)}{S_2 + T_2 - S_1 - T_1} \right],$$

式中:P 为供试品效价, A_T 为供试品的估计效价, W_s 、 W_x 分别为标准品与供试品的质量, P_s 为标准品的效价值, V_s 、 V_x 分别为标准品与供试品的稀释倍

数, I 为高低剂量之比的对数值(高低剂量之比为 4:1 时, $I = 0.602$), S_1 为标准品低浓度溶液所致抑菌圈直径的总和, S_2 为标准品高浓度溶液所致抑菌圈直径的总和, T_1 为样品低浓度溶液所致抑菌圈直径的总和, T_2 为样品高浓度溶液所致抑菌圈直径的总和。

根据上式,供试品的效价取决于标准品的质量、效价值、稀释倍数与供试品的质量、稀释倍数、标准品溶液产生的抑菌圈直径、供试品溶液产生的抑菌圈直径。

2.1.3 不确定度分析 除抑菌圈直径值引起的输入量的标准不确定度外,不确定度分量还包括标准品和样品的称重、标准品纯度、容量瓶体积、移液管体积、抑菌圈测量仪等。这个合成的不确定度即为效价测定的总不确定度。

2.2 各分量的标准不确定度

2.2.1 抑菌圈直径值的不确定度分量 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(Y)为 $600.2 \text{ u} \cdot \text{mg}^{-1}$,同时统计分析得自由度,其合并样本标准差^[3]即标准不确定度 $u(x_1)$ 为

$$\sqrt{\frac{km \sum y^2 - k \cdot \sum [\sum y(k)]^2 - m \cdot \sum [\sum ym]^2 + [\sum y]^2}{km(k-1)(m-1)}}$$

$= 0.0968$,式中 k 为 S 或 T 剂量组数的和($k = 4$), m 为每剂量所用碟数($m = 8$), $\sum y(k)$ 为 S 和 T 各剂量组内抑菌圈直径值的和, $\sum ym$ 为各只双碟内抑菌圈直径值的和, $\sum y$ 为 m 只双碟内抑菌圈直径值的总和。

则相对标准不确定度为 $u(x_1)_{\text{rel}} = u(x_1) / y = 0.0968 / 600.2 = 1.61 \times 10^{-4}$

2.2.2 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 $\pm 0.02 \text{ mm}$,则区间半宽度 $a_P = 0.02 \text{ mm}$,测量值落在该区间的概率分布为均匀分布,包含因子 $k = \sqrt{3}$ 。其标准不确定度为: $u(x_2) = \frac{0.02}{\sqrt{3}} = 0.0115 \text{ mm}$

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: $u(x_2)_{\text{rel}} = \frac{0.0115}{19} = 6.1 \times 10^{-4}$ 。

2.2.3 配制标准品溶液的不确定度分量

2.2.3.1 定容体积 V 的标准不确定度分量 (1) 根据国家计量检定规程^[4]规定, A 级 100 mL 量瓶的允许偏差为 $\pm 0.10 \text{ mL}$,认为服从矩形分布,取包含因子 $k = \sqrt{3}$,则标准不确定度 $= \frac{0.10}{\sqrt{3}} = 0.058 \text{ mL}$ 。

用 A 类方法评定,即通过对量瓶的重复实验可以估算定容变动产生的不确定度。液体的体积与其比重的乘积等于其重量,同一液体的比重为常数,因此可以对典型的 100 mL 量瓶用纯化水(新沸放冷)定容 10 次,并称量求取其标准偏差来评价其容量配置的重复性。采用贝塞尔公式计算标准偏差,标准不确定度等于一倍标准偏差,用 A 级 100 mL 量瓶配制溶液稀释至刻度线的度数重复性引起的不确定度为 0.01 mL。

配置溶液时,水温接近 20 °C,因而温度的影响可忽略不计,则定容体积 V 的标准不确定度为: $u_{v1} = \sqrt{0.058^2 + 0.01^2} = 0.059$ mL, 相对标准不确定度: $u_{v1rel} = 0.059 / 100 = 0.00059$ 。

(2) A 级 50 mL 量瓶的标准不确定度

同样地计算, A 级 50 mL 量瓶的允许偏差为 ± 0.05 mL^[4], 标准不确定度与相对标准不确定度分别为 $u_{v2} = \sqrt{(\frac{0.05}{\sqrt{3}})^2 + 0.01^2} = 0.031$ mL, $u_{v2rel} = 0.031 / 50 = 0.0006$ 。

(3) A 级 25 mL 量瓶的允许偏差为 ± 0.03 mL^[5], 标准不确定度与相对标准不确定度分别为

$u_{v3} = \sqrt{(\frac{0.03}{\sqrt{3}})^2 + 0.01^2} = 0.02$, $u_{v3rel} = 0.02 / 25 = 0.0008$ 。

定容体积的合成标准不确定度: $u_{vrel} =$

$$\sqrt{u_{v1rel}^2 + u_{v2rel}^2 + 2 \times u_{v3rel}^2} = 0.0014$$

2.2.3.2 标准品纯度引起的不确定度分量 奈替米星标准品含量的标准不确定度一般认为是 1%, 概率分布为均匀分布, 认为 100% 可信, 则包含因子 $k = \sqrt{3}$, $u_{m1rel} = \frac{0.01}{\sqrt{3}} = 0.0058$

2.2.3.3 标准品质量的标准不确定度分量

(1) 天平的不确定度分量 天平使用说明书给出的天平的分辨力为 0.01 mg, 包含因子 $k = \sqrt{3}$, 则 $u_{m2} = \frac{0.01 \times 10^{-3}}{\sqrt{3}} = 5.8 \times 10^{-6}$ g。

(2) 称量重复性不确定度 天平使用说明书给出的天平的重复性误差为 0.02 mg, 认为服从矩形分布, 包含因子 $k = \sqrt{3}$, 则 $u_{mb} = 0.02 \times 10^{-3} / \sqrt{3} = 1.15 \times 10^{-5}$ g。

(3) 合成标准品质量的相对标准不确定度

$$u_{m2rel} = \sqrt{u_{ma}^2 + u_{mb}^2} / 0.04405 = 0.0003$$

2.2.3.4 合成标准品溶液的相对标准不确定度

$$u(x3)_{rel} = \sqrt{u_{vrel}^2 + u_{m1rel}^2 + u_{m2rel}^2} = 0.0060$$

2.2.4 配制样品溶液的不确定度分量 同样计算

(1) 定容体积 V 的相对标准不确定度:

$$\sqrt{2 \times u_{v1rel}^2 + u_{v2rel}^2 + u_{v3rel}^2} = 0.0013$$

(2) 样品质量的相对标准不确定度: $u_{m2} /$

$$0.16305 = \sqrt{u_{ma}^2 + u_{mb}^2} / 0.16305 = 7.9 \times 10^{-5}$$

(3) 合成样品溶液的相对标准不确定度:

$$u(x4)_{rel} = \sqrt{0.0013^2 + (7.9 \times 10^{-5})^2} = 0.0013$$

2.2.5 移取溶液的不确定度分量

移取溶液的不确定度主要来自移液管刻度的不确定度, 根据国家计量检定规程^[4]规定, A 级 5 mL 移液管的最大允许误差为 ± 0.015 mL, 按矩形分布考虑, 取 $k = \sqrt{3}$, $u(x5) = 0.015 / \sqrt{3} = 0.0087$, 相对标准不确定度 $u(x5)_{rel} = u(x5) / 5 = 0.0017$

2.3 合成标准不确定度

上述各不确定度分量, 是各自独立的分量, 因而可按方和根方式进行合成相对标准不确定度的计算^[5]:

$$\sqrt{u(x1)_{rel}^2 + u(x2)_{rel}^2 + u(x3)_{rel}^2 + u(x4)_{rel}^2 + u(x5)_{rel}^2} = 0.0064$$

2.4 扩展不确定度实验结果用扩展不确定度表示。

$U(y)/y = 0.0064$, $y = 600.2 \mu \cdot \text{mg}^{-1}$, $U(y) = 0.0064 \times 600.2 = 3.84 \mu \cdot \text{mg}^{-1}$ 。取包含因子 $k = 2$ (置信概率约为 95%), 则扩展不确定度为 $U = 2U(y) = 2 \times 3.84 \mu \cdot \text{mg}^{-1} = 7.7 \mu \cdot \text{mg}^{-1}$ 。硫酸奈替米星湿品效价测定的结果可表示为: $(600.2 \pm 7.7) \mu \cdot \text{mg}^{-1}$ ($k = 2$)。

3 讨论

3.1 计算配制溶液的不确定度时, 取了量瓶的最大允差计算, 而在天平的不确定度评定中, 却未取天平的最大允差计算, 是因为样品与标准品的称样量很小, 应该根据称量值所在的天平量程取天平的最大允差或精度值进行计算。

3.2 不同参数对抗生素效价测定不确定度的贡献不同, 除标准品纯度的不确定度外, 移液管体积和量瓶体积对不确定度的贡献较大, 而标准品质量、样品质量、抑菌圈测量仪的不确定度对总不确定度的贡献相对较小。

3.3 管碟法测定抗生素效价操作手工化, 需熟练人员才能得到较正确的结果。抑菌圈直径值的相对标准不确定度即 $u(x1)_{rel}$ 与操作熟练程度关系较大, 从而影响到最终的合成相对标准不确定度。实际检测工作中, 通过可靠性检验对实验结果的可信度进行

评价,防止合成相对标准不确定度过大。

3.4 硫酸奈替米星原料药需以无水物折算效价,且至少需 2 个效价测定结果。为简化计算过程,本文仅分析了单份湿品效价的不确定度。

3.5 中国药典 2005 年版收录的多个品种均采用管碟法测定抗生素效价,而其实验方案及操作过程大同小异,本文建立的不确定度评定方法,具有一定的代表性,可用于多个品种的抗生素微生物检定法的不确定度分析。

REFERENCES

[1] Ch. P(2005) Vol II (中国药典 2005 年版. 二部) [S]. 2005:

Appendix, 79-84.

[2] Standard of Chinese Drug Control (中国药品检验标准操作规范) [S]. 2005: 270-272.

[3] ZHANG Z T. Antibiotic Drug Control (抗生素药品检验) [M]. People's Medical Publishing House. 1987: 48-49.

[4] State Technique Administration (国家技术监督局). National Measure Examine Regulations of China (中华人民共和国国家计量规程) [S]. Working Glass Container JJG 196-1990 (常用玻璃量器检定规程).

[5] State Quality Supervision Bureau. Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (测量不确定度评定与表示指南) [M]. Beijing. China Metrology Publishing House. 2000.

收稿日期: 2007-07-12