昆明学院学报　2019，41（3）：108～112　ISSN 1674－5639　CN 53－1211/G4
Journal of Kunming University

一种医院制剂中需氧菌总数不确定度的评定

牛杰振[1]，赵　改[1]，张　琪[2]，彭　颖[1]，马渊浩[3]，董丽荣[1]
（1．昆明市食品药品检验所 药品检验中心，云南 昆明 650032；
2．云南师范大学 职业技术教育学院，云南 昆明 650092；
3．云南省农业科学院 生物技术与种质资源研究所，云南 昆明 650223）

摘要：为保证药品质量，建立药品不确定度的评定方法，以及有效评价检测过程带来的不确定度和检验每个环节引入的误差．根据《中华人民共和国药典》对20份同一批次胸痹通脉丸中的需氧菌总数进行检测，采用《测量不确定度评定与表示》分析其不确定度来源和评定不确定度分量，然后使用合成的方法评定需氧菌总数的不确定度，并确定其置信区间．结果表明，需氧菌总数检测结果合成不确定度为0.019 6，扩展不确定度为0.046 1，置信区间为180～281 cfu/g，检测数据符合正态分布．

关键词：医院制剂；需氧菌总数；不确定度；评定；置信区间
中图分类号：R286.0　**文献标识码**：A　**文章编号**：1674－5639（2019）03－0108－05
DOI：10.14091/j.cnki.kmxyxb.2019.03.023

Uncertainty Evaluation of Total Aerobic Microbial Count in the Hospital Preparation

NIU Jiezhen[1]，ZHAO Gai[1]，ZHANG Qi[2]，PENG Ying[1]，MA Yuanhao[3]，DONG Lirong[1]
（1．Center for Drug Control，Kunming Institute for Food and Drug Control，Kunming，Yunnan，China　650032；
2．Faculty of Vocational Education，Yunnan Normal University，Kunming，Yunnan，China　650092；
3．Institute of Biotechnology & Germplasmic Resource，Yunnan Academy of Agricultural Sciences，Kunming，Yunnan，China　650223）

Abstract：To guarantee the quality of drug，the uncertainty evaluation method was designed to evaluate effectively the uncertainty in the examining process and the errors in every test step．The total aerobic microbial count of 20 samples in the same batch of Xiongbitongmai pills were checked under the direction of *Chinese Pharmacopoeia*．*Evaluation and expression of uncertainty in measurements* was used to analyze the uncertainty sources and evaluate the uncertainty components．Synthetic method was used to assess the uncertainty of total aerobic microbial count（TAMC）and to make sure the confidence interval．The result showed that the combined uncertainty was 0.019 6；the expanded measurement uncertainty was 0.046 1；the confidence interval of the samples was 180—281 cfu/g．The examining data was normal distribution．

Key words：hospital preparation；total aerobic microbial count（TAMC）；uncertainty；evaluation；confidence interval

不确定度用来表征赋予被测量值的分散性，也是评价检测数据质量的重要参数之一[1]．由于不确定度的认可度高，现行检测实验室资质认定和能力认可均要求评定[2-3]．当检测结果的不确定度影响符合性判定情况时，不可简单判定，而应对样品检测全过程进行不确定度的评定[4]．目前，虽然在食品微生物检验领域中，不确定度的评定是司空见惯的[5-6]，但对药品微生物检查不确定度评定的报道较少[7]．需氧菌总数是2015年版《中华人民共和国药典》（以下简称《中国药典》）首次提出的检测项目，其指胰酪大豆胨琼脂培养基上生长的总菌落数（包括真菌菌落数）[8]，反映药品在生产、流通环节是否符合相关规定要求的技术指标．胸痹通脉丸具有益气活血、温通心阳之功效，用于气虚血瘀、胸痹心痛等的治疗．为此，本研究拟通过胸痹通脉丸需氧菌总数的检测，为建立其不确定

收稿日期：2019－01－03
作者简介：牛杰振（1986—），男，河南郸城人，助理工程师，微生物检验技术初级师，硕士，主要从事药品、保健食品、化妆品微生物检验研究．

度的评定方法，并确定其置信区间，寻找检测过程关键控制点，保证检验结果准确，以期为其日常检测不确定度评定提供技术参考.

1　仪器、试药与试剂

1.1　仪器

MLS-3781L-PC 型高压蒸汽灭菌器（松下健康医疗器械（上海）有限公司）；Scout SE 型电子天平（奥豪斯仪器（常州）有限公司，分度值为 0.01 g，量程为 0.00 ~ 600.00 g）；HTY-761 型匀浆仪（浙江泰林生物技术股份有限公司）；HPP260 型恒温恒湿培养箱（美墨尔特（上海）贸易有限公司）；DK-98-Ⅱ型电热恒温水浴锅（天津市泰斯特仪器有限公司）.

1.2　试药、试剂

胰酪大豆胨琼脂培养基（TSA，批号：170713）和胰酪大豆胨液体培养基（TSB，批号：161222），均购于北京陆桥技术股份有限公司；胸痹通脉丸（来自于某医疗机构委托，规格为：60 g/瓶，批号：270931，已验证含有微生物）.

2　方法与结果

2.1　检测过程

根据 2015 年版《中国药典》四部通则 1105，取 20 份样品，每份样品做 2 个平行，均由同一技术人员进行检测[8].

2.2　不确定度评定

2.2.1　数学模型的构建

检测中，当检测结果需氧菌总数 Y 由 N 个菌落数 X 通过测量函数 f 来确定. 依据检测方法，确定测量函数 f，则构建数学模型[9]如下：

$$Y = f(X_1, X_2, \cdots, X_N) = KX/V, \qquad (1)$$

其中，X 为 TSA 平板菌落数，单位：cfu；V 为取样体积，单位：mL；K 为稀释倍数，无量纲；Y 为单位体积需氧菌总数，单位：cfu/mL.

2.2.2　不确定度来源分析

不确定度主要分为 A 类和 B 类. A 类不确定度是在规定检测条件（重复性检测、重现性检测和期间精密度检测）下，对所得检测数值进行统计分析而得的不确定度；B 类不确定度是基于人员经验或校准证书等有关信息，获得假设概率分布[10-11]，如样品称量及玻璃量器量取等引入的不确定度. 在合成不确定度中，B 类不确定度贡献较小[12].

2.2.3　分量不确定度的评定

1）重复性检测引入的不确定度. 在需氧菌总数检测中，由于微生物间有互生、共生和拮抗等关系的存在[13]，同一稀释级别平行之间，检测数据差异较大，稀释级别越高，这种差异越显著[14]. 检测数据 X 取对数后，按照贝塞尔公式计算对数值的均值和残差平方和，然后计算标准不确定度，结果见表 1.

表 1　需氧菌总数检测结果及数据转换

检测次数	检测结果/(cfu·g^{-1})		lg$X$		lg$\overline{X}$	残差平方和	需氧菌总数置信区间/(cfu·g^{-1})	
	X_1	X_2	lgX_1	lgX_2				
1	190	210	2.278 8	2.322 2	2.300 5	0.000 9	249	160
2	330	240	2.518 5	2.380 2	2.449 4	0.009 6	351	225
3	200	190	2.301 0	2.278 8	2.289 9	0.000 2	243	156
4	180	220	2.255 3	2.342 4	2.298 8	0.003 8	249	159
5	260	180	2.415 0	2.255 3	2.335 1	0.012 8	270	173
6	280	220	2.447 2	2.342 4	2.394 8	0.005 5	310	199
7	170	180	2.230 4	2.255 3	2.242 9	0.000 3	218	140
8	280	260	2.447 2	2.415 0	2.431 1	0.000 5	337	216
9	300	310	2.477 1	2.491 4	2.484 2	0.000 1	381	244
10	240	220	2.380 2	2.342 4	2.361 3	0.000 7	287	184
11	380	410	2.579 8	2.612 8	2.596 3	0.000 5	493	316
12	200	240	2.301 0	2.380 2	2.340 6	0.003 1	274	175
13	180	160	2.255 3	2.204 1	2.229 7	0.001 3	212	136
14	260	290	2.415 0	2.462 4	2.438 7	0.001 1	343	220
15	320	270	2.505 1	2.431 4	2.468 3	0.002 7	367	235
16	200	260	2.301 0	2.415 0	2.358 0	0.006 5	285	183
17	130	140	2.113 9	2.146 1	2.130 0	0.000 5	168	108
18	120	180	2.079 2	2.255 3	2.167 2	0.015 5	184	118

续表 1

检测次数	检测结果/(cfu·g^{-1})		lg$X$		lg$X$	残差平方和	需氧菌总数置信区间/(cfu·g^{-1})	
	X_1	X_2	lgX_1	lgX_2				
19	160	190	2.204 1	2.278 8	2.241 4	0.002 8	218	140
20	280	320	2.447 2	2.505 1	2.476 2	0.001 7	374	240
合计	4 660	4 690	46.952 3	47.116 5	47.034 4	0.070 2	5 813	3 727

因为贝塞尔公式为：

$$S_p=\sqrt{\frac{\Sigma(\lg X_i-\lg\overline{X})^2}{m\times(n-1)}},\qquad(2)$$

其中，X 为菌落数，m 为样本数，n 为重复次数.

由公式（2）计算合并标准差，得

$$S_p=\sqrt{\frac{0.070\,2}{20\times(2-1)}}=0.059\,3,$$

其中，m 为 20，重复次数 n 为 2.

因此，标准不确定度为：

$$u_c=S_p/\sqrt{n}=0.059\,3/\sqrt{2}=0.041\,9,\qquad(3)$$

其中重复次数 n 为 2.

需氧菌总数对数值平均值公式为：

$$\lg\overline{X}=\frac{1}{m\times n}\times\sum_{i=1}\lg X_i,\qquad(4)$$

因此，由（4）式可得：

$$\lg\overline{X}=\frac{1}{20\times2}\times(46.952\,3+47.116\,5)=2.351\,7,$$

其中，菌落数为 X，样本数 m 为 20，重复次数 n 为 2.

相对标准不确定度公式为：

$$u_{rel}(\lg\overline{X})=\frac{u_c}{\lg\overline{X}},\qquad(5)$$

因此，由（5）式可得：

$$u_{rel}(\lg\overline{X})=\frac{0.041\,9}{2.351\,7}=0.017\,8.$$

2）称量样品引入的不确定度. 取样称量由两次完成，一次作为空盘，另一次作为毛质量. 由于每次称质量都是独立的，两者线性关系为非相关，因此不确定度要计算两次[15]. 根据检定证书，标示扩展不确定度 $U=0.5e(e=0.1\ \text{g},k=2)$.

标准不确定度为：

$$u_m=(\sqrt{2}\times0.5\times0.1)/2=0.035\,4,$$

实际称取 m = 10.00 g 样品，则相对不确定度为：

$$u_{rel}(m)=u_m/m=0.035\,4/10.00=0.003\,5.\qquad(6)$$

3）玻璃量器引入的不确定度. 校准：JJG 196—2006 规定，当 20℃时，标称容量 100 mL 的量出式量筒和标称容量 1 mL 的 A 级流出式分度吸量管的容量允差为 ±1.0 mL 及 ±0.008 mL[7]. 上述规定给出的不确定度的数值没有置信水平，标准不确定度是假设校准引起的不确定度，呈矩形分布.

标准不确定度为：

$$u_V(100)=1.0/\sqrt{3}=0.577\,4\ \text{mL};$$

$$u_V(1)=0.008/\sqrt{3}=0.004\,6\ \text{mL}.$$

则相对不确定度为：

$$u_{relV}(100)=0.577\,4/100=0.005\,8;$$

$$u_{relV}(1)=0.004\,6/1=0.004\,6.$$

温度：上述玻璃量器的校准温度是 20℃，实际检测温度范围为 18 ~26℃，温度波动为 T ±4℃，水体膨胀系数为 2.1×10^{-4}/℃，温度引起上述量筒和分度吸量管取样体积变化分别为 ±0.084 mL，±0.000 8 mL. 假定温度变化呈矩形均匀分布.

标准不确定度为：

$$u_T(100)=0.084/\sqrt{3}=0.048\,5\ \text{mL};$$

$$u_T(1)=0.000\,8/\sqrt{3}=0.000\,5\ \text{mL}.$$

则相对不确定度为：

$$u_{relT}(100)=0.084\,5/100=0.000\,5;$$

$$u_{relT}(1)=0.000\,5/1=0.000\,5.$$

玻璃量器引入的不确定度，汇总于表 2.

表 2 流出式量具引入的不确定度

玻璃量具	容量允差/mL	标准不确定度		移取或定容体积/mL	相对标准不确定度
		u_v	u_T		
100 mL 具塞量出式量筒	±1.000	0.577 4	0.048 5	100	0.005 8
A 级 1 mL 分度吸量管	±0.008	0.004 6	0.000 5	1	0.004 6

4）供试液制备过程引入的不确定度. 称取样品 10.0 g，用量出式量筒量取无菌 TSB 使总体积至 100 mL，充分混合均匀，作为 1∶10 供试液，用校准级别为 A 级的 10 mL 分度吸量管吸取 9.0 mL

TSB，用 A 级的 1.0 mL 分度吸量管吸取 1.0 mL 上述供试液至 9.0 mL TSB 中，作为 1∶100 供试液. 依次 10 倍递增稀释，获得 10 倍系列稀释液.

菌数报告规则规定：需氧菌总数的检测宜选取菌落数小于 300 cfu 的稀释级，作为检测报告的依据[8]. 由于稀释级 1∶10 和 1∶100 均满足上述要求，本研究可选取菌落数最高的稀释级作为菌数报告，因此采用稀释级别为 1∶10 作为结果报告. 而稀释过程引入的相对不确定度与标称容量 100 mL 的量出式量筒量引入的相对不确定度 $u_{rel}(100)$ 相等，即为 0.005 8.

5）取样过程引入的不确定度. 用 2.0 mL 分度吸量管各吸取 1.0 mL 至 2 个平皿中，所引入的相对不确定度与标称容量 1 mL 的 A 级流出式分度吸量管引入的相对不确定度 $u_{rel}(1)$ 相等，即 0.004 6.

2.2.4　合成不确定度

合成标准不确定度公式为：

$$u(\lg \overline{X}) = \sqrt{\sum_{i=1}^{N}[u(X_i)/X_i]^2} = \sqrt{u_{rel}(\lg \overline{X})^2 + u_{rel}(m)^2 + u_{rel}(V100)^2 + u_{rel}(V1)^2}\ , \tag{7}$$

因此，由（7）式可得合成标准不确定度：

$$u(\lg \overline{X}) = \sqrt{0.017\ 8^2 + 0.003\ 5^2 + 0.005\ 8^2 + 0.004\ 6^2} = 0.019\ 6.$$

合成相对不确定度公式为：

$$u_{rel}(\lg\overline{X}) = \lg \overline{X} \times \sqrt{\sum_{i=1}^{N}[u(X_i)/X_i]^2}\ , \tag{8}$$

因此，由（5）可得合成相对不确定度：

$$u_{rel}(\lg \overline{X}) = 2.351\ 7 \times 0.019\ 6 = 0.046\ 1.$$

2.2.5　统计描述

利用软件 SPSS 17. 0 进行统计分析，结果见图 1 和表 3. 图 1 显示检测数据对数值近似围绕直线，表 3 中的 P 值均显著大于 0.05，说明检测数据的对数值近似正态分布.

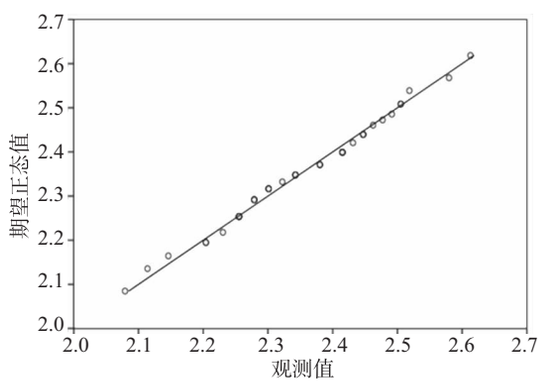

图1　检测数据对数值的正态Q-Q图

表 3　正态性检验

Kolmogorov-Smirnov 检验			Shapiro-Wilk 检验		
统计量	*df*	*P* 值	统计量	*df*	*P* 值
0.095	40	0.200	0.986	40	0.884

2.2.6　扩展不确定度

由 2.2.5 项下可知，检测数据呈正态分布，重复取样为 20 次，每次取样做 2 个平行，自由度为 $n \times (m-1) = 19$，取置信水平 95%，从 T 分布表查得 $t_{0.025}(19) = 2.093$.

根据扩展不确定度公式，得

$$U = k \times u_{rel}(\lg\overline{X}) = 2.093 \times 0.046\ 1 = 0.096\ 5.$$

2.2.7　报告检测结果

本研究需氧菌总数的对数值为：

$$Y = \lg\overline{X} \pm U = 2.351\ 7 \pm 0.096\ 5,$$

即 $2.551 \leqslant Y \leqslant 2.371\ 3$. 取反对数，20 份样品需氧菌总数在 95% 置信限的菌落数为 180 ~ 281 cfu/g. 由此推算，第 1 份供试品需氧菌总数的置信区间为 160 ~ 249 cfu/g.

3　小结与讨论

3.1　小结

本研究仅列出了重复性检测、天平、玻璃量具引入的不确定度，详见表 4. 重复性检测引入的 A 类不确定度（0.017 8）远远大于其他引入的 B 类不确定度（0.008 2），与文献［16］报道相一致.

表 4　不确定度分量汇总

项目	类别	数值	标准不确定度	相对不确定度	贡献率/%	合计
重复性检测	A	2.35	0.041 9	0.017 8	82.53	0.017 8
天平	B	10.00	0.035 4	0.003 5	3.19	
100 mL 量出式量筒	B	100.00	0.579 4	0.005 8	8.76	0.008 2
1 mL 分度吸量管	B	1.00	0.004 6	0.004 6	5.51	

3.2　讨论

本研究采用的医院制剂是依据临床经验丰富的

名老中医提供的验方研制而成，并经注册核准而配制的自用制剂，因其疗效确切、经济实惠、安全可靠等优点而广泛用于临床实践[17]．在中药医疗的处方中，由于中药味多，化学成分复杂多样，导致其不确定性增加．随着新版《中国药典》的实施，中药医院制剂的质量标准应随之提高，并切实达到严格执行标准、质量得到控制的目的．在本医疗制剂中，由于药材细粉直接入药，导致微生物污染的风险增加，用药安全性受到挑战．因此应严格执行相关标准，切实保障用药安全，同时检测全过程不确定度的评定也是应有之义[18]．

目前，评定不确定度主要在理化检测中开展，而在微生物的检测领域则较少，需氧菌总数检测尤甚．虽然两者原理及方法存在较大差异，但均存在评定不确定度的问题，前者不确定度的评定日益趋于规范，而后者尚未成熟[19]．此外，评定化学不确定度的数学模型是基于化学物质良好均一性而建立起来的，而微生物的检测存在供试液制备及稀释、培养、菌落计数和数据修约等环节，引起检测数据分散性大[12]，所以其评定不确定度只能参照该数学模型．

文献［7］报道显示，由于微生物本身的特殊性，检测数据不呈正态分布时，不宜进行 A 类不确定度评定．由本研究实验数据的统计描述可知，检测数据呈正态分布，适合进行 A 类不确定度的评定和合并不确定度的计算．

本研究列出天平、温度、校准等引入的不确定分量，基于培养基质量、培养条件、计数的个体差异等引入的不确定度不易量化和统计评价[20]，对合成不确定度的贡献较小．而完善作业指导书，规范操作程序，增加内部审查次数，强化业务培训等可减少由此引入的不确定度[21]；参加能力验证可评估由此引入的不确定度[22]．总之，需氧菌总数不确定度的评定，可提高检测结果可信度和准确性，降低误判的可能性，从而降低检测机构的风险．

［参考文献］

［1］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）：54－57．

［2］刘畅．不确定度在药品检验中的应用［J］．饮食保健，2018，5（6）：56．

［3］刘伟平，杨新春，殷明刚．HBV-DNA 实时荧光定量检测程序的测量不确定度评估及分析［J］．国际检验医学杂志，2019，40（1）：59－61．

［4］牛夏娟．螺旋藻菌落总数检验不确定度的评定［J］．中国保健营养，2016（7）：332－332．

［5］董志涛．浅析饮用纯净水微生物检验中菌落总数的不确定度检验［J］．临床研究，2017，2（4）：173－174．

［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）：901－903．

［7］王娟，许春，李兵兰，等．荆防颗粒微生物需氧菌总数不确定度评定［J］．中国药师，2018，21（2）：363－365．

［8］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，2015：140－144．

［9］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．

［10］NIEMELA S I．Uncertanty of quantitative determinations derived by cultivation of microorganisms［M］．Helsinki：Mikes Publication，2003：14－17．

［11］王娟，李兵兰，许春，等．中国药典 2010 年版和 2015 年版微生物计数检查法比较［J］．中国药师，2017，20（9）：1687－1689．

［12］周捷，姚羚羚，瘳惠青．农村饮用水菌落总数测量不确定度评定［J］．医学动物防制，2014（7）：814－816．

［13］李志明．影响菌落总数测定结果的特殊因素［J］．中国卫生检验杂志，2008，18（2）：371－384．

［14］王海华．湿米粉中菌落总数测定结果不确定度的评定［J］．食品安全导刊，2015（11）：68－70．

［15］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．

［16］岳苑，马桂娟．全脂乳粉中菌落总数的测量不确定度评定［J］．食品与发酵科技，2018，54（3）：124－126．

［17］郭红玲，邓曼静．2 种外用医院制剂微生物限度检查方法学的验证与建立［J］．湖南中医杂志，2017，33（12）：144－146．

［18］杨静，詹才智，柴建辉，等．2 种医院制剂微生物限度检查方法的建立［J］．医药导报，2017，36（8）：79－81．

［19］朱勇．食品中菌落总数测定不确定度评定的应用［J］．中国卫生产业，2017，14（18）：41－44．

［20］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，2018，14（9）：3780－3783．

［21］姚丽芳，朱洪坤，李蔚，等．大肠菌群 MPN 计数法不确定度评估［J］．食品安全质量检测学报，2016，7（1）：193－196．

［22］王海华，兰茜．能力验证菌落总数测定结果不确定度的评定［J］．食品安全质量检测学报，2015，6（6）：2352－2355．