

## 苯甲醇含量测定能力验证研究

杨锐, 许凯, 王珏, 张朝阳, 宋晓松, 李樾, 李海亮, 孙会敏 (中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

**摘要** 目的: 评价参与药用辅料苯甲醇含量测定的实验室的能力。方法: 依据 CNAS-RL02《能力验证规则》和 ISO/IEC 17043《合格评定能力验证的通用要求》实施实验室能力验证活动。通过研究, 制备了均匀性和稳定性均符合能力验证要求的测试样品, 根据 CNAS-GL03《能力验证样品均匀性和稳定性评价指南》, 对检测结果进行单因子方差分析和  $t$  检验分析, 结果显示样品均匀性和稳定性均符合要求。以结果的中位值作为测试样品含量的指定值, 以整体标准差作为能力评判标准差, 根据 GB/T 28043-2011/ISO13528: 2005, 利用稳健统计分析, 用  $Z$  比分数进行结果判定, 对 190 家参加实验室的报告结果进行评价。结果与结论: 190 家实验室中有 4 家实验室的检测结果可疑, 4 家实验室结果不满意, 整体满意率 95.8%; 通过本次能力验证数据分析和研究, 多数参加能力验证苯甲醇含量测定的检测结果满意, 不满意结果有仪器、称量、人员等方面引入的误差, 并要求相关实验室结合自身情况查找原因进行整改。

**关键词:** 苯甲醇; 药用辅料; 含量测定; 能力验证

中图分类号: R92 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2019)03-0295-07

doi:10.16153/j.1002-7777.2019.03.010

### The Proficiency Testing for the Determination of Benzyl Alcohol Assay

Yang Rui, Xu Kai, Wang Jue, Zhang Zhaoyang, Song Xiaosong, Li Yue, Li Hailiang, Sun Huimin (National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

**Abstract Objective:** To evaluate the capability of the laboratory involved in the determination of Benzyl Alcohol content in pharmaceutical excipients. **Methods:** The laboratory's capability-verification activities are conducted based on the CNAS-RL02 Rules for Proficiency Testing and ISO/IEC 17043 Conformity Assessment--General Requirements for Proficiency Testing. ANOVA and  $t$ -test analysis were used to evaluate the homogeneity and stability of the testing results, which were confirmed with the requirements according to CNAS-GL03 Guidance on Evaluating the Homogeneity and Stability of Samples Used for Proficiency Testing. The robust statistical method and the  $Z$  score results were used to analyze the results of the 190 laboratories' reports. **Results and Conclusion:** Among the 190 laboratories, 4 laboratories' results were suspicious and 4 laboratories' results were unsatisfactory. The overall satisfaction rate was 95.8%. Some errors in instruments, weighing, personnel, etc. were found, though most of the laboratories results for the determination of Benzyl Alcohol content were satisfactory through the proficiency testing. The relevant laboratories should find out the reasons and rectify the errors according to their own conditions.

**Keywords:** benzyl alcohol; pharmaceutical excipients; assay; proficiency testing

药用辅料苯甲醇含量测定是国家药品监督管理局首次组织的药用辅料能力验证项目,通过此次能力验证数据的研究,可以客观评价全国药用辅料检验检测机构的能力水平。能力验证是实验室质量保证体系中一个重要组成部分。国家认可制度中对实验室参加能力验证并取得满意结果提出了明确的要求<sup>[1]</sup>。本研究组织实施药用辅料苯甲醇含量的能力验证计划,使国家药品监督管理局了解国内药用辅料检测领域的整体水平,能力验证的结果可作为承担药用辅料检验检测任务的参考依据。本研究对国内190家药用辅料检验检测、生产、研究等机构的测定能力进行测试,研究药用辅料苯甲醇含量能力验证的样品制备、均匀性与稳定性、结果统计、能力评价等情况,并对测试结果进行讨论。

苯甲醇系由氯苄和碳酸钾或碳酸钠经蒸馏制备而成<sup>[2-3]</sup>,分子式为 $C_7H_8O$ ,苯甲醇为无色、澄清透明的油状液体,微具芳香和强烈的灼烧感。在药物制剂中用作抑菌剂、防腐剂、局部止痛剂<sup>[4-8]</sup>。

《中国药典》2010年版收载了苯甲醇药品标准,其含量测定方法为滴定法,滴定法的原理是将苯甲醇在醋酐-吡啶的混合液中加热回流水解成酯类和醋酸,再用氢氧化钠滴定醋酸,滴定法操作步骤繁多且容易出现偏差<sup>[9]</sup>。本次能力验证采用《中国药典》2015年版四部苯甲醇含量测定方法,用气相法直接测量样品的含量,气相法操作简便、准确度高,因此,按照气相法对苯甲醇含量进行准确的分析检测具有非常重要的意义<sup>[10]</sup>,但气相法需要药用辅料检测机构全面熟悉和掌握样品的制备、人

员的操作、气相色谱仪器的维护、《实验室认可规则》(CNAS-RL01:2011)及《能力验证规则》(CNAS-RL02:2010)等规则<sup>[11-12]</sup>。

## 1 仪器与试剂

7890A型安捷伦气相色谱仪(美国Agilent Technologies公司);MSE524S-000DA型电子天平(德国Sartorius公司);XS205型电子天平(瑞士METTLER TOLEDO公司);C30D型水分测定仪(瑞士METTLER TOLEDO公司);KBF720型恒温恒湿箱(德国BINDER公司);甲醇(德国默克公司,批号:1840507627)。

## 2 方法与结果

### 2.1 能力验证样品

为了保证参与单位有足够的样品进行试验,考虑样品为挥发性气体且在空气中可被氧化,本研究采用了安瓿瓶充氮熔封,进一步确保了样品的稳定。本试验为每个参加单位发放均匀样品各2瓶(每瓶1.2毫升,编号相同)和1支参考品(约1.5毫升,含量以气相法计)。

### 2.2 试验方法

选用DB-WAX(60 m×0.32 mm×0.25 μm)色谱柱,柱温130℃,进样口200℃,FID检测器,检测器温度为250℃,取样瓶用甲醇稀释成每1 mL含样品1 mg的溶液,进样,检测图谱见图1,结果显示苯甲醇图谱对称因子为1.004,理论塔板数为46879,说明色谱峰峰形和响应较好,色谱柱选用合适。

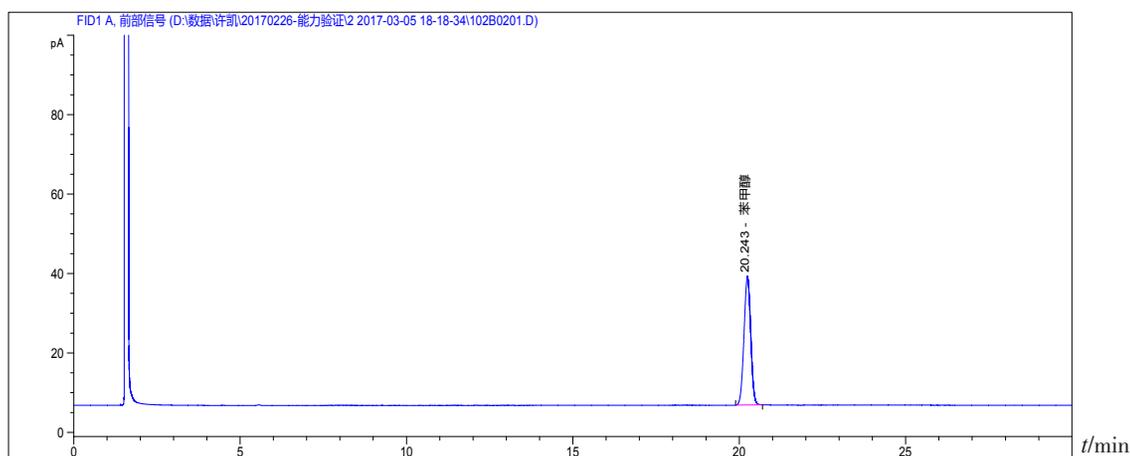


图1 苯甲醇典型图谱

药典规定苯甲醇水分小于0.5%<sup>[10]</sup>，考虑水分对样品含量的影响，对其进行了测定：以甲醇为溶剂，采用容量法进行预测定，水分含量为0.06%，样品含水量较低；考虑费休氏法测定范围和水分检测的准确性，需采用库伦水分滴定法进行测定，以甲醇为溶剂，水分检测结果为0.011%。

### 2.3 测试样品均匀性检验结果

根据CNAS-GL03:2006<sup>[13]</sup>的要求，本研究采用单因子方差分析（One Way ANOVA）对样品进行均匀性考察。本计划苯甲醇样品制备了约1000瓶，随机抽取了10瓶样品进行苯甲醇含量测定，结果表明样品均匀性符合要求，见表1、表2。

$F < 1$ ，采用 $S_s \leq 0.3 \sigma$  准则评判均匀性，由于 $MS_1 < MS_2$ 情况特殊，用 $MS_2$ 来估计。

$$S_s = \sqrt{MS_2 / n \times \sqrt{2 / (N - m)}}$$

式中： $S_s$ 为标准偏差； $\sigma$ 为能力评定标准差； $MS_1$ 为样品间均方； $MS_2$ 为样品内均方； $n$ 为单样品测量次数； $m$ 为测量样品数； $N$ 为总测量次数。计算可得 $S_s = 0.00057 < 0.3 \sigma$ 。

表 1 苯甲醇含量均匀性检测结果

| 随机编号 | 检测结果 /% |        |
|------|---------|--------|
|      | 平行测定 1  | 平行测定 2 |
| 116  | 99.50   | 99.94  |
| 002  | 99.62   | 99.60  |
| 664  | 99.70   | 99.71  |
| 016  | 99.58   | 99.68  |
| 005  | 99.73   | 99.53  |
| 962  | 99.67   | 99.51  |
| 724  | 99.59   | 99.55  |
| 714  | 99.60   | 99.66  |
| 834  | 99.69   | 99.58  |
| 946  | 99.54   | 99.61  |
| 总平均值 | 99.63   |        |
| RSD  | 0.10    |        |

表 2 苯甲醇含量方差分析结果

| 方差来源 | 平方和   | 自由度 | 均方    | F     | 显著性   |
|------|-------|-----|-------|-------|-------|
| 样品间  | 0.047 | 9   | 0.005 |       |       |
| 样品内  | 0.139 | 10  | 0.014 | 0.372 | 0.928 |
| 总数   | 0.186 | 19  |       |       |       |

### 2.4 测试样品稳定性检验结果

根据CNAS-GL03:2006<sup>[13]</sup>的要求，本研究采用 $t$ 检验对样品稳定性数据进行考察。本计划随机抽取了12瓶样品，分成4组，在40℃和75%RH下分

别放置0、3、5、7天后，对苯甲醇含量进行测定，测得含量值与0天值作比较，并用 $t$ 检验对结果进行分析，两样本无显著性差异，表明样品是稳定的，详见表3、表4。

表 3 苯甲醇含量稳定性检测结果

| 时间 /d | 随机编号 | 含量 /% | 均值 /% |
|-------|------|-------|-------|
| 0     | 116  | 99.74 | 99.59 |
|       | 2    | 99.66 |       |
|       | 664  | 99.36 |       |
| 3     | 74   | 99.69 | 99.65 |
|       | 817  | 99.72 |       |
|       | 23   | 99.71 |       |

续表3

| 时间 /d | 随机编号 | 含量 /% | 均值 /% |
|-------|------|-------|-------|
| 5     | 14   | 99.56 | 99.53 |
|       | 916  | 99.46 |       |
|       | 420  | 99.57 |       |
| 7     | 941  | 99.64 | 99.56 |
|       | 996  | 99.52 |       |
|       | 365  | 99.53 |       |
| RSD/% |      | 0.05  |       |

表4 苯甲醇稳定性统计结果 (*t* 检验)  
双样本等方差假设

| 独立样本检验  |         |                 |       |                   |       |           |       |       |              |         |
|---------|---------|-----------------|-------|-------------------|-------|-----------|-------|-------|--------------|---------|
| 0天、3天比较 |         | 方差方程的 Levene 检验 |       | 均值方程的 <i>t</i> 检验 |       |           |       |       |              |         |
|         |         | F               | Sig.  | <i>t</i>          | df    | Sig.( 双侧) | 均值差值  | 标准误差值 | 差分的 95% 置信区间 |         |
|         |         |                 |       |                   |       |           |       |       | 下限           | 上限      |
| Con     | 假设方差相等  | 9.916           | 0.035 | -1.034            | 4     | 0.359     | -0.12 | 0.116 | -0.44206     | 0.20206 |
|         | 假设方差不相等 | /               | /     | -1.034            | 2.023 | 0.409     | -0.12 | 0.116 | -0.61364     | 0.37364 |

| 独立样本检验  |         |                 |       |                   |       |           |         |         |              |         |
|---------|---------|-----------------|-------|-------------------|-------|-----------|---------|---------|--------------|---------|
| 0天、5天比较 |         | 方差方程的 Levene 检验 |       | 均值方程的 <i>t</i> 检验 |       |           |         |         |              |         |
|         |         | F               | Sig.  | <i>t</i>          | df    | Sig.( 双侧) | 均值差值    | 标准误差值   | 差分的 95% 置信区间 |         |
|         |         |                 |       |                   |       |           |         |         | 下限           | 上限      |
| Con     | 假设方差相等  | 5.182           | 0.085 | 0.469             | 4     | 0.664     | 0.05667 | 0.12088 | -0.27894     | 0.39227 |
|         | 假设方差不相等 | /               | /     | 0.469             | 2.366 | 0.679     | 0.05667 | 0.12088 | -0.3935      | 0.50683 |

| 独立样本检验  |         |                 |       |                   |       |           |         |         |              |         |
|---------|---------|-----------------|-------|-------------------|-------|-----------|---------|---------|--------------|---------|
| 0天、7天比较 |         | 方差方程的 Levene 检验 |       | 均值方程的 <i>t</i> 检验 |       |           |         |         |              |         |
|         |         | F               | Sig.  | <i>t</i>          | df    | Sig.( 双侧) | 均值差值    | 标准误差值   | 差分的 95% 置信区间 |         |
|         |         |                 |       |                   |       |           |         |         | 下限           | 上限      |
| Con     | 假设方差相等  | 4.69            | 0.096 | 0.191             | 4     | 0.858     | 0.02333 | 0.12188 | -0.31507     | 0.36174 |
|         | 假设方差不相等 | /               | /     | 0.191             | 2.437 | 0.863     | 0.02333 | 0.12188 | -0.42059     | 0.46725 |

从表4统计数据来看,  $t$ 临界值单侧 $t_{0.05(6)} = 1.943$ , 双侧 $t_{0.05(6)} = 2.447$ 。计算的 $t$ 值, 该值均小于 $t$ 临界值, 这表明在0.05显著性水平, 3、5、7天和0天的检验结果之间无显著性差异, 结果表明, 在加速40℃和75%RH条件下, 放置0、3、5、7天样品稳定性均良好。

## 2.5 样品引湿性考察

本次能力验证是面向全国各地区, 由于发样为5月份, 各地温湿度差异较大且样品有引湿性, 需对其引湿性和引湿性对最终统计结果的影响进行评价。本研究考察不同温度和湿度条件对敞口放置样品水分检测的影响<sup>[14]</sup>, 模拟不同地区温湿度条件, 设定20℃/20%RH、30℃/50%RH、40℃/80%RH条件, 观察其0 h、5 h、10 h、24 h的水分变化, 采用库伦水分测定法, 检测结果见表5。

表5 样品引湿性考察结果

| 时间/h | 温湿度条件     |           |           |
|------|-----------|-----------|-----------|
|      | 20℃/20%RH | 30℃/50%RH | 40℃/80%RH |
| 0    | 0.011%    | 0.011%    | 0.011%    |
| 5    | 0.010%    | 0.011%    | 0.011%    |
| 10   | 0.011%    | 0.012%    | 0.012%    |
| 24   | 0.012%    | 0.012%    | 0.012%    |

从表5可以发现在不同条件下水分值检测不同, 有随温湿度及时间增大而增大的趋势, 但对同一时间段的不同温湿度下检测结果及同一温湿度下不同时间段检测结果分别进行独立样本 $t$ 检验, 分析 $P$ 值均大于0.05, 即样品在不同温湿度下放置不同时间的水分值无明显差异, 温湿度和放置时间对样品的影响可以忽略。

## 2.6 测定要求

能力验证研究对每个参加实验室随机安排一个唯一性代码, 向每个参加实验室发送样品, 同时附有作业指导书、结果报告单和被测物品接收状态确认表等, 要求各参加实验室按照作业指导书进行测定, 并在规定期限内上报测试结果, 结果保留2位有效数字。

## 2.7 结果统计分析方法依据

### 2.7.1 评价方法的选择

根据GB/T 28043-2011/ISO13528: 2005<sup>[15]</sup>, 利用经典统计分析方法( Robust统计)对190家参加实验室的报告结果进行统计分析。

### 2.7.2 统计量的介绍

本研究至少包含7种综合的统计量: 结果数( $N$ )、指定值( $X$ )、能力评定标准差( $\sigma$ )、指定值的不确定度( $u_x$ )、极小值( $Min$ )、极大值( $Max$ )等, 结果数是从一个特定的检测中得到的结果总数。本研究将参加者的公议值, 即本轮能力验证计划中所有参加者报告结果的中位值作为本轮计划中所使用的指定值 $X$ 。指定值:  $X = 99.72\%$ 。

能力评定标准差: 根据GB/T 28043-2011/ISO 13528: 2005, 以各参加单位结果的整体标准差作为能力评定标准差。能力评定标准差:  $\sigma = 0.00586$ 。

本研究使用基于Robust统计量的 $Z$ 比分数评价各参加实验室的结果。采用两次检测的均值作为最终统计数据。

$Z$ 值的定义:  $Z = (x - X) / \sigma$  ( $x$ 为各参加实验室上报结果), 其中 $\sigma$ 为能力验证标准差, 本研究中 $\sigma = 0.00586$ 。

按照CNAS-GL02: 2014的原则, 本计划把离群值定义为 $|Z|$ 大于等于3的结果, 表示结果不满意; 把可疑值定义为 $|Z|$ 在2到3之间的结果对, 表示结果有问题; 而满意结果为 $|Z|$ 小于等于2。 $Z$ 的大小反映了实验室结果与中位值的偏离程度,  $Z$ 的正负表征了实验室结果相对于中位值的偏离方向。

## 3 结果和讨论

### 3.1 结果

#### 3.1.1 水分值对检测结果的影响

反馈的结果中仅48家单位对水分进行检测, 其余单位由于缺少检验资质或无库伦水分测定仪, 因此未对水分进行检测。对检测结果正态性进行分析, 采用SPSS软件, 结果显示呈单峰分布, 如图2所示, 表明水分对最终统计影响较小。

对检测水分单位扣除水分前后值进行 $t$ 检验分析,  $P$ 大于0.05, 结果见表6, 样品含量在扣除水分前后的值无显著性差异。因此, 最终统计均采用未扣除水分的结果进行统计。

## 3.1.2 参加实验室结果统计分析

通过Z比分数统计计算,结果见表7、表8、图3,此次能力验证182家单位的检测结果满意,4家

单位的检测结果可疑,4家单位结果不满意。

对所有结果进行稳健统计分析,用Z比分数进行结果判定。

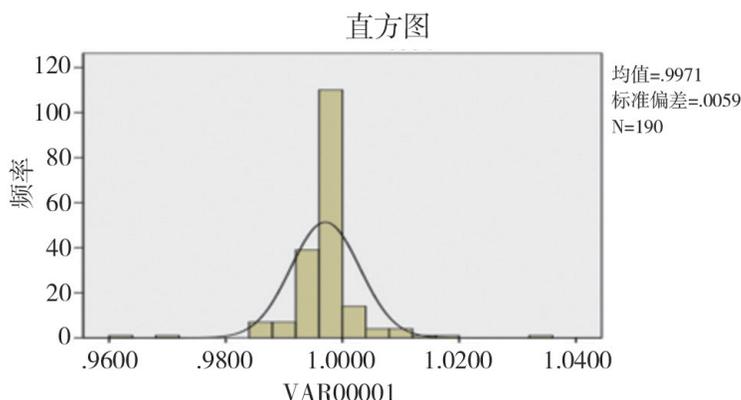


图2 实验室检测结果正态性检验

表6 48家测量水分单位提交的结果扣除水分前后t检验分析

| 水分检测前、后值比较 |         | 方差方程的 Levene 检验 |       | 均值方程的 t 检验 |        |            |
|------------|---------|-----------------|-------|------------|--------|------------|
|            |         | F               | Sig.  | t          | df     | Sig.( 双侧 ) |
| VAR00002   | 假设方差相等  | 0.282           | 0.597 | -0.074     | 86     | 0.941      |
|            | 假设方差不相等 | /               | /     | -0.074     | 85.000 | 0.941      |

表7 所有参加实验室结果汇总

|            | Count/N | Reference/% | Max/%  | Min/% | Rang/% | Mean/% | RSD/% | Σ       |
|------------|---------|-------------|--------|-------|--------|--------|-------|---------|
| Sample(AB) | 190     | 99.72       | 103.25 | 96.12 | 7.13   | 99.71  | 0.6   | 0.00586 |

表8 实验室Z值分布

| Z 值范围                   | 实验室数量 | 比例    |
|-------------------------|-------|-------|
| $ Z  \leq 2$            | 182   | 95.8% |
| 无不满意结果但含有 $2 <  Z  < 3$ | 4     | 2.1%  |
| 结果含有 $ Z  \geq 3$       | 4     | 2.1%  |

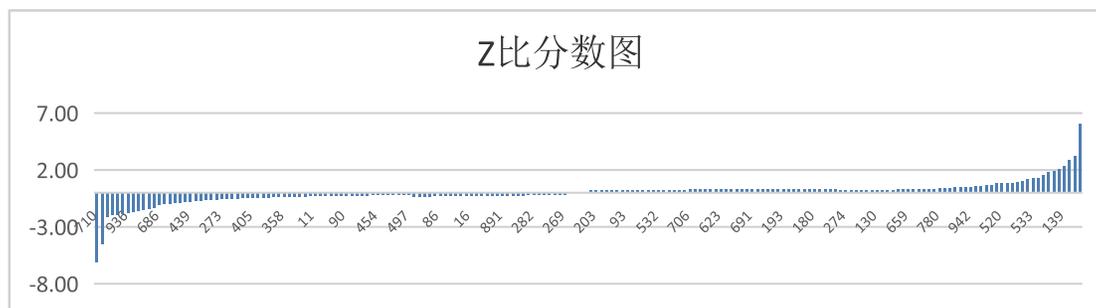


图3 实验室Z值分布图

### 3.2 讨论

本次能力验证作业指导书推荐的方法为气相色谱法,从原始记录分析,部分实验室结果不满意存在以下问题。

#### 1) 仪器来源误差

气相色谱法属于仪器分析法,《中国药典》2015年版对于色谱分析系统连续进样时响应值重复性有明确的要求,一般要求连续进样5次,峰面积测量值的相对标准偏差不得超过2%,如果超过了2%可能提示色谱系统的稳定性不佳,而个别实验室提交的原始记录显示,气相色谱法测定同一苯甲醇样品的色谱峰标准偏差已超过药典的规定,导致提交的结果与中位值差距较大;且气相色谱法一般都要考察测量结果的平行性,从而多采用重复进样,个别实验室存在气相色谱仪单针进样的情况,造成测量结果可能存在偶然误差。建议在检测前首先应对仪器稳定性进行考察,采用连续进样5针观察其相对标准偏差及采用双样双针进样,以减小仪器误差带来的测量偏差。

#### 2) 称量误差

《中国药典》凡例中明确规定“精密称定系指称取重量应准确至所取重量的千分之一”。依据此项规定,如果采用十万分之一天平称取对照品,称样量应不得低于10 mg。由于苯甲醇为无色、澄清透明的油状液体,在称量方面更需注意。在本次能力验证中发现,多个实验室在检测中使用十万分之一天平称定对照品,而称样量却远低于10 mg,最低称样量为5 mg,不满足药典对精密称量的要求,引入了较大的操作误差,导致结果不合格。虽然有些单位检测结果合格,但是应该注意称量对试验造成的误差,建议检验人员加强天平操作规范性的认识。

#### 3) 色谱峰面积手动积分带来的误差

一些实验室存在同一样品连续进样后积分条件不统一即手动积分的情况,将会引入人为因素的主观误差,不能体现数据的完整性、原始性和真实性,且《实验室数据完整性管理体系》<sup>[16]</sup>提出,只有在“(1)低分离度或相应低;(2)流动相不稳定,基线紊乱,保留时间变化小;(3)色谱柱性能:运行过程中出现异常峰;(4)软件积分的局限性;(5)由于样品母体的干扰导致的复杂色谱图:裂峰、目标杂质的同时洗脱/肩峰、基线噪音、负

峰、基线上升或下降(由于某些梯度程序)、峰的严重拖尾、烃类的存在导致自动积分不正确。”的情况下,才允许手动积分,本次能力验证苯甲醇为单组分高纯度样品,建议采用自动积分的方法对数据进行准确积分,并对检验人员进行上岗前培训。

### 参考文献:

- [1] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-RL01: 2011 实验室认可规则[S]. 2011.
- [2] 滕俊江, 乔艳辉. 相转移催化合成苯甲醇的工艺研究[J]. 自动化应用, 2006, (3): 35-36.
- [3] 郭海东. 两步法合成苯甲醇的工艺研究[D]. 南京: 南京工业大学, 2004.
- [4] 葛海生, 刘元瑞, 赵康虎, 等. HPLC法测定克林霉素磷酸酯注射液中抑菌剂苯甲醇的含量[J]. 中国药房, 2010, (25): 2376-2377.
- [5] 李茜, 刘英. HPLC法检测醋酸奥曲肽注射剂中5种抑菌剂[J]. 中国药事, 2017, (1): 62-68.
- [6] 刘青, 陈文锐, 吴宏中, 等. 气相色谱法测定化妆品中的防腐剂苯甲醇和苯氧基乙醇[J]. 检验检疫科学, 2002, 12(1): 34-35.
- [7] 周耀斌, 彭亚锋, 雷涛, 等. 应用毛细管气相色谱技术测定化妆品中防腐剂苯甲醇含量[J]. 香料香精化妆品, 2009, (4): 9-10.
- [8] 王高峰, 苏桂兰, 胡冠时, 等. 利多卡因和苯甲醇对人体肌注青霉素的药动学及生物利用度的影响[J]. 现代应用药学, 1989, (1): 34-35.
- [9] 中国药典: 二部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
- [10] 中国药典: 四部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [11] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-RL02: 2010 能力验证规则[S]. 2010.
- [12] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-GL02: 2014 能力验证结果的统计处理和评价指南[S]. 2014.
- [13] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-GL03: 2006 能力验证样品均匀性和稳定性评价指南[S]. 2006.
- [14] 李慧义, 张启明. 欧洲药典引湿性试验方法简介[J]. 中国药品标准, 2003, 4(6): 59, 62.
- [15] GB/T 28043-2011/ISO13528: 2005 利用实验室间比对进行能力验证的统计方法[S]. 2005.
- [16] PDA. 数据处理和峰的积分[S]// PDA TR 80 实验室数据完整性管理体系, 2018.

(收稿日期 2018年12月18日 编辑 王雅雯)