·实验研究·

紫外-可见分光光度法测定 b 型流感嗜血杆菌结合疫苗中多糖含量的不确定度评估

段　艳,纪　宏*

(北京市药品检验研究院(北京市疫苗检验中心) 国家药品监督管理局监管科学创新研究基地,北京 102206)

[摘要]　**目的:**对紫外-可见分光光度法测定 b 型流感嗜血杆菌结合疫苗中多糖含量的不确定度进行评定分析。**方法:**依据现行版《中华人民共和国药典》通则 3421 对 b 型流感嗜血杆菌结合疫苗中多糖含量进行测定。根据《测量不确定度评定与表示》《化学分析中不确定度的评估指南》及实验过程,分析测量过程的各个不确定度来源,计算其大小并合成。**结果:**多糖含量的不确定度来源主要有标准溶液配制 u(P)、试样处理 u(S)、标准曲线拟合 u(C)、测量重复性 u(rep)、紫外分光光度计 u(I)及方法偏倚 u(B);合成标准不确定度 u_c 为 1.109 0 μg·mL^{-1},扩展不确定度 U 为 2.218 0 μg·mL^{-1}(k = 2,置信概率为 95%)。**结论:**测定结果的不确定度主要来自标准曲线拟合、试样处理和方法偏倚。控制标准曲线拟合降低不确定度分量,效果最为明显;试样处理引入的不确定度主要来源于移液器操作,需计量检定,试样处理 1 mL 及以上样品时用移液管,1 mL 以下用移液器配制标准曲线效率高;方法偏倚引入的不确定度需严格依照标准检验,把控好实验细节;控制实验环境温度,对仪器定期检定与维护;本研究可为基于紫外-分光光度法的药品质量控制的不确定度评估提供参考。

[关键词]　紫外-可见分光光度法;b 型流感嗜血杆菌结合疫苗;多糖含量;不确定度;评估

[中图分类号]　R917　　[文献标志码]　A　　[文章编号]　1003 - 3734(2026)14 - 1539 - 06

Uncertainty evaluation of determination of polysaccharide content in Haemophilus influenzae type b conjugate vaccine by UV spectrophotometry

DUAN Yan, JI Hong*

(*Beijing Institute for Drug Control (Beijing Center For Vaccine Control) NMPA Center for Innovation and Research in Regulatory Science, Beijing* 102206, *China*)

[**Abstract**]　**Objective**: To evaluate the uncertainty of the determination of polysaccharide content in Haemophilus influenzae type b (Hib) conjugate vaccine by ultraviolet-visible (UV) spectrophotometry. **Methods**: According to the General Rule 3421 of the Chinese Pharmacopoeia, the polysaccharide content in Haemophilus influenzae type b conjugate vaccine was determined. Based on the experimental process, the Evaluation and Representation of Measurement Uncertainty, and the Guidelines for the Evaluation of Uncertainty in Chemical Analysis, the uncertainties of the measurement results were systematically evaluated. **Results**: The sources of uncertainty mainly included the preparation of standard solution u(P), sample processing u(S), standard curve fitting u(C), measurement repeatability u(rep), UV spectrophotometry u(I), and method bias u(B). The combined standard uncertainty (u_c) was 1.109 0 μg·mL^{-1}, and the expanded uncertainty (U) was 2.218 0 μg·mL^{-1} (coverage factor k = 2, 95% confidence probability). **Conclusion**: The dominant contributors to measurement uncertainty were

[作者简介]　段艳,女,副主任药师,主要从事生物制品及疫苗质量控制研究。E-mail:duanyolanda@126.com。

[通讯作者]　*纪宏,女,主任药师,主要从事生物制品及疫苗质量控制研究。E-mail:jihong@bidc.org.cn。

[DOI]10.20251/j.cnki.1003-3734.2026.14.012

standard curve fitting, sample processing, and method bias. The fitting of the control standard curve significantly reduces measurement uncertainty, with this effect being particularly pronounced. The uncertainty introduced during sample processing primarily stems from pipette operations, which necessitate rigorous metrological verification. While standard curve preparation is time-consuming, optimized workflow efficiency can be achieved by employing pipettes for sample processing volumes of 1 mL or greater and utilizing micropipettes for standard curve preparation when the volumes are 1 mL or less. Method bias-related uncertainty requires strict compliance with standardized testing protocols, with particular attention to meticulous control of experimental parameters. Furthermore, maintaining appropriate laboratory temperature conditions, implementing regular instrument calibration, and performing systematic equipment maintenance all contribute substantially to uncertainty mitigation. This study can provide references for uncertainty assessment of drug quality control based on UV spectrophotometry.

[**Key words**] ultraviolet-visible spectrophotometry; Haemophilus influenzae type b conjugate vaccine; polysaccharide content; measurement uncertainty; uncertainty evaluation

b 型流感嗜血杆菌(Haemophilus influenza type b, Hib)是引起儿童侵袭性细菌感染的主要原因之一,可导致脑膜炎、肺炎、败血症、心包炎等疾病[1]。目前预防 Hib 感染的主要应对措施是接种疫苗,随着 Hib 疫苗使用的不断扩大,Hib 相关疾病获得了较好的控制。Hib 结合疫苗是由纯化的 Hib 荚膜多糖多聚磷酸核糖基核糖醇(polyribosylribitolphosphate, PRP)与载体蛋白共价结合后经纯化而成的多糖蛋白结合疫苗,主要有效成分为多糖-蛋白结合物[2]。在 Hib 结合疫苗的研发、生产和质量控制过程中,多糖含量是疫苗有效性的重要参数。测定多糖中的 *D*-核糖含量是 Hib 多糖的检测方法之一,依据现行版《中华人民共和国药典》通则 3421,系依据可溶性糖经无机酸处理脱水产生糖醛(戊糖)或糖醛衍生物,生成物能与酚类化合物缩合生成有色物质,以此测定多糖含量[3]。而测量的结果是衡量药品质量的重要参数,客观评价结果的可靠性尤为重要。测量不确定度(以下简称“不确定度”)是指利用可获得的信息,表征赋予被测量值分散性的非负参数,是目前国际社会普遍接受和推荐使用的定量说明测量结果质量的一个参数,是评价检测结果可信性、可比性、可接受度性的重要指标,在各行各业的检测过程均有应用。为了使不确定度的评定和表示方法达成共识,世界各国组织各领域的专家起草不确定度相关的指导原则。国内不确定度相关指导原则有国家计量技术规范、中国合格评定国家认可委员会所发布的认可规范、国家标准及行业标准。在药品检验领域,通过对方法不确定度的研究,可找出影响结果偏差的主要因素。不确定度按统计方法不同分为 A 类不确定度和 B 类不确定度,能够用对测量值进行统计分析的方法来评定的不确定度称为 A 类不确定度,其他为 B 类不确定度,表示 2 类不同的评定方法,仅为讨论方便,并不意味 2 类评定方法存在本质的区别[4-5]。本研究工作依据《测量不确定度评定与表示》[6]《化学分析中不确定度的评估指南》[7],对多糖含量测定的不确定度进行了分析,以期提高检验结果的准确性和可靠性,为相关药物分析领域的不确定度评定提供参考。

材　　料

1　仪器

UV－2600i 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司);VORTEX 2 型涡旋仪(德国 IKA 公司);Mill－Q 型水处理系统(美国 Millipore 公司);TW20 型水浴锅(德国 Julabo 公司);WGL－125B 型减压干燥仪(天津市泰斯特仪器有限公司);XSR205DU 型电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司,分度值 0.01 mg)。100 mL、10 mL 玻璃容量瓶(德国 BRAND 公司,A 类);1 mL 单标线玻璃移液管(A 类),可变量程单道移液器移液器(德国 Eppendorf 公司),其中玻璃仪器由中国计量科学研究院校准;仪器设备由北京市计量检测科学研究院检定。

2　试药和试剂

三氯化铁(国药集团化学试剂有限公司,批号:20210511,分析纯);盐酸(国药集团化学试剂有限公司,批号:20230519,优级纯);地衣酚(美国 Sigma 公司,批号:447420,生化试剂);95% 乙醇(京纯试剂公司,批号:2201120119,优级纯);*D*-核糖对照品(中国食品药品检定研究院,批号:140668-202003,含量:99.7%);水为 Mill-Q 处理的去离子水。样品为 b

型流感嗜血杆菌结合疫苗(企业 A,批号:202303001,规格:0.5 mL·支$^{-1}$)。

方法与结果

1 溶液制备

1.1 标准溶液的配制与曲线绘制

精密称取经 60 ℃减压干燥至恒重的 *D*-核糖对照品 25 mg,置 100 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,得 250 μg·mL^{-1}核糖对照品贮备液。临用时,精密量取(移液管)该贮备液 1 mL 至 10 mL 容量瓶中,用水稀释并定容至刻度,即得 25 μg·mL^{-1}核糖对照品溶液。分别精密量取(移液器)核糖对照品溶液 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 于试管中,加水至 1 mL,得 2.5、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0 μg·mL^{-1}系列对照品溶液。分别向每个试管中加入 0.1% 三氯化铁盐酸溶液 5 mL,混匀后加入地衣酚乙醇溶液 0.4 mL,混匀。沸水浴 5 min 后置冰浴 10 min,取出,室温放置 10 min 后,用空白管调零点,在波长 670 nm 处测定吸光度。

1.2 样品处理与测定

取 b 型流感嗜血杆菌结合疫苗样品 5 支,混匀,得供试品溶液。精密量取供试品溶液 1 mL,自“加入 0.1% 三氯化铁盐酸溶液 5 mL”起,步骤同标准曲线绘制,用空白管调零点,在波长 670 nm 处测定吸光度,并与标准曲线比较定量。

2 计算模型

以核糖对照品溶液浓度为横坐标,对其相应的吸光度作直线回归,求得直线回归方程。将供试品溶液的吸光度代入直线回归方程,计算出供试品溶液中的核糖含量及供试品多糖含量。

$$C_S = C \times D / 0.41$$

其中:C_S 为供试品中多糖含量(μg·mL^{-1});C 为供试品溶液中核糖含量(μg·mL^{-1}),由标准曲线拟合的线性方程($Y = bX + a$)求得;D 为供试品溶液的稀释倍数(在本实验中,样品没有进行稀释过程,故 $D = 1$);0.41 为核糖与多糖转化系数。

3 不确定度的来源分析

根据实验过程可见,不确定度的主要来源为:标准溶液配制(标准溶液配制引入的不确定度可分为标准试剂的纯度、称量、定容、稀释所用玻璃仪器校准、温度变化产生的不确定度);试样处理(试样转移、移取显色剂等步骤);标准曲线拟合;仪器;方法偏倚(显色、加热、冷却等步骤),每一步操作都会引入不确定度,采用回收率对方法偏倚进行不确定度评定[8]。

4 相对不确定度计算

4.1 标准溶液配制引入的不确定度 u(P)

4.1.1 对照品的纯度引入的不确定度 u(P_R)

配制标准溶液所用的 *D*-核糖纯度为 99.7%,标准物质证书对限制没有更详细的信息,假定 *D*-核糖纯度为(99.7 ± 0.1)%,按矩形分布处理[7],包含因子 $k = \sqrt{3}$,则对照品纯度引入的标准不确定度 u(P_R) = 0.1% ÷ $\sqrt{3}$ = 0.057 7%,相对标准不确定度为标准不确定度与测量值绝对值的比值,通常以百分比表示(下同),相对标准不确定度 $u_{rel}(P_R)$ = 0.057 7 ÷ 99.7 = 0.000 579。

4.1.2 对照品称量引入的不确定度 u(W_R)

根据天平的检定证书,天平最大称量误差为 ±0.05 mg,视为矩形分布,包含因子 $k = \sqrt{3}$,标准不确定度 u(W_R) = 0.05 ÷ $\sqrt{3}$ = 0.028 9 mg;相对标准不确定度 $u_{rel}(W_R)$ = 0.028 9 ÷ 25 = 0.001 16。

4.1.3 定容引入的不确定度 u(V_1)

主要有吸量管(A 级)校准不确定度、容量瓶(A 级)校准不确定度和温度波动导致的不确定度。根据 JJF1059.1-2012 与 JJF1135-2005,吸量管和容量瓶的不确定度按三角分布,包含因子 $k = \sqrt{6}$。温度变化应视为矩形分布,包含因子 $k = \sqrt{3}$[8-10]。

4.1.3.1 100 mL 容量瓶校准引入的不确定度 u(V_{11}) 标准溶液定容容量瓶 100 mL(最大允差:±0.10 mL),u(V_{11}) = 0.10 ÷ $\sqrt{6}$ = 0.040 8 mL,相对标准不确定度 $u_{rel}(V_{11})$ = 0.040 8 ÷ 100 = 0.000 408。

4.1.3.2 温度波动产生的不确定度 u(V_{T1}) 水的体积膨胀系数 2.1 × 10^{-4} mL·℃$^{-1}$,实验室温度波动为 ±3 ℃,校正温度为 20 ℃,u(V_{T1}) = 100 × 3 × 2.1 × 10^{-4} ÷ $\sqrt{3}$ = 0.036 4 mL,相对标准不确定度 $u_{rel}(V_{T1})$ = 0.036 4 ÷ 100 = 0.000 364。

4.1.3.3 合成不确定度 $u_{rel}(V_1)$ $u_{rel}(V_1) = \sqrt{u_{rel}(V_{11})^2 + u_{rel}(V_{T1})^2} = \sqrt{0.000\,408^2 + 0.000\,364^2}$ = 0.000 547。

4.1.4 稀释引入的不确定度 u(V_2)

主要有移液管(A 级)校准不确定度、容量瓶(A 级)校准不确定度和温度波动导致的不确定度。

4.1.4.1 10 mL 容量瓶校准引入的不确定度 u(V_{21}) 标准溶液定容容量瓶 10 mL(最大允差:±0.02 mL)

引入的标准不确定度 $u(V_{21})=0.02\div\sqrt{6}=0.008\ 16$ mL，相对标准不确定度 $u_{rel}(V_{21})=0.008\ 16\div10=0.000\ 816$。

4.1.4.2 温度波动产生的不确定度 $u(V_{T21})$ $u(V_{T21})=10\times3\times2.1\times10^{-4}\div\sqrt{3}=0.003\ 64$ mL，相对标准不确定度 $u_{rel}(V_{T21})=0.003\ 64\div10=0.000\ 364$。

4.1.4.3 1 mL 移液管校准引入的不确定度 $u(V_{22})$ 单标线移液管（最大允差：±0.007 mL）引入的标准不确定度 $u(V_{22})=0.007\div\sqrt{6}=0.002\ 86$ mL，相对标准不确定度 $u_{rel}(V_{22})=0.002\ 86\div1=0.002\ 86$。

4.1.4.4 温度波动产生的不确定度 $u(V_{T22})$ $u(V_{T22})=1\times3\times2.1\times10^{-4}\div\sqrt{3}=0.000\ 364$ mL，相对标准不确定度 $u_{rel}(V_{T22})=0.000\ 364\div1=0.000\ 364$。

4.1.4.5 合成不确定度 $u_{rel}(V_2)$ $u_{rel}(V_2)=\sqrt{u_{rel}(V_{21})^2+u_{rel}(V_{T21})^2+u_{rel}(V_{22})^2+u_{rel}(V_{T22})^2}=\sqrt{0.000\ 816^2+0.000\ 364^2+0.002\ 86^2+0.000\ 364^2}=0.003\ 02$。

4.1.5 标准溶液配制引入的不确定度 $u_{rel}(P)$ $u_{rel}(P)=\sqrt{u_{rel}(P_R)^2+u_{rel}(W_R)^2+u_{rel}(V_1)^2+u_{rel}(V_2)^2}=\sqrt{0.000\ 579^2+0.001\ 16^2+0.000\ 547^2+0.003\ 02^2}=0.003\ 33$。

4.2 试样处理引入的不确定度 u(S)

4.2.1 标称容量为 1 000 μL 的可调移液器吸取标准溶液引入的不确定度 $u(V_3)$

4.2.1.1 由 1 000 μL 的可调移液器校准引入的不确定度 $u(V_{31})$ 校准证书得到最大允许误差为 ±0.003 mL，属 B 类不确定度，按三角分布计算，$u(V_{31})=0.003\div\sqrt{6}=0.001\ 22$ mL，分别移取 0.1 mL（100 μL），0.2 mL（200 μL），0.4 mL（400 μL），0.6 mL（600 μL），0.8 mL（800 μL），1.0 mL（1 000 μL），相对标准不确定度 $u_{rel}(V_{31})=0.001\ 22\div0.1=0.012\ 2$；$0.001\ 22\div0.2=0.006\ 10$；$0.001\ 22\div0.4=0.003\ 05$；$0.001\ 22\div0.6=0.002\ 03$；$0.001\ 22\div0.8=0.001\ 53$；$0.001\ 22\div1.0=0.001\ 22$。

4.2.1.2 温度波动产生的不确定度 $u(V_{T3})$ $u(V_{T3})=0.1\times3\times2.1\times10^{-4}\div\sqrt{3}=0.000\ 036\ 37$ mL，$0.2\times3\times2.1\times10^{-4}\div\sqrt{3}=0.000\ 072\ 75$ mL，$0.4\times3\times2.1\times10^{-4}\div\sqrt{3}=0.000\ 145\ 5$ mL，$0.6\times3\times2.1\times10^{-4}\div\sqrt{3}=0.000\ 218\ 2$ mL，$0.8\times3\times2.1\times10^{-4}\div\sqrt{3}=0.000\ 291\ 0$ mL，$1.0\times3\times2.1\times10^{-4}\div\sqrt{3}=0.000\ 363\ 7$ mL，相对标准不确定度 $u_{rel}(V_{T3})=0.000\ 036\ 37\div0.1=0.000\ 364$，$0.000\ 072\ 75\div0.2=0.000\ 364$，$0.000\ 145\ 5\div0.4=0.000\ 364$，$0.000\ 218\ 2\div0.6=0.000\ 364$，$0.000\ 029\ 10\div0.8=0.000\ 364$，$0.000\ 363\ 7\div1.0=0.000\ 364$。

4.2.1.3 合成不确定度 $u_{rel}(V_3)$ $u_{rel}(V_{3n})=\sqrt{u_{rel}(V_{31})^2+u_{rel}(V_{T3})^2}=\sqrt{0.012\ 2^2+0.000\ 364^2}=0.012\ 2$，$\sqrt{0.006\ 12^2+0.000\ 364^2}=0.006\ 11$，$\sqrt{0.003\ 06^2+0.000\ 364^2}=0.003\ 07$，$\sqrt{0.002\ 04^2+0.000\ 364^2}=0.002\ 07$，$\sqrt{0.001\ 53^2+0.000\ 364^2}=0.001\ 57$，$\sqrt{0.001\ 22^2+0.000\ 364^2}=0.001\ 27$，$u_{rel}(V_3)=\sqrt{0.012\ 2^2+0.006\ 11^2+0.003\ 07^2+0.002\ 07^2+0.001\ 57^2+0.001\ 27^2}=0.014\ 3$。

4.2.2 标称容量为 1 000～5 000 μL 的可调移液器吸取 0.1% 三氯化铁盐酸溶液（显色液 1）引入的不确定度 $u(V_4)$

4.2.2.1 由 1 000～5 000 μL 的可调移液器校准引入的不确定度 $u(V_{41})$ 校准证书得到最大允许误差为 ±0.06 mL，按三角分布计算，$u(V_{41})=0.06\div\sqrt{6}=0.024\ 5$ mL，吸取 0.1% 三氯化铁盐酸溶液 5 mL，相对标准不确定度 $u_{rel}(V_{41})=0.024\ 5\div5=0.004\ 91$。

4.2.2.2 温度波动产生的不确定度 $u(V_{T4})$ $u(V_{T4})=5\times3\times2.1\times10^{-4}\div\sqrt{3}=0.001\ 82$ mL，相对标准不确定度 $u_{rel}(V_{T4})=0.001\ 82\div5=0.000\ 364$。

4.2.2.3 合成不确定度 $u_{rel}(V_4)$ $u_{rel}(V_{4n})=\sqrt{u_{rel}(V_{41})^2+u_{rel}(V_{T4})^2}=\sqrt{0.004\ 91^2+0.000\ 364^2}=0.004\ 91$，标准曲线溶液制备过程中使用 1 000～5 000 μL 的可调移液器 6 次，得 $u_{rel}(V_4)=\sqrt{6\times0.004\ 91^2}=0.012\ 0$。

4.2.3 标称容量为 1 000 μL 的可调移液器吸取地衣酚乙醇溶液（显色液 2）引入的不确定度 $u(V_5)$

4.2.3.1 由 1 000 μL 的可调移液器校准引入的不确定度 $u(V_{51})$ 标准不确定度为 $u(V_{51})=0.003\div\sqrt{6}=0.001\ 22$ mL，吸取地衣酚乙醇溶液 0.4 mL，相对标准不确定度 $u_{rel}(V_{51})=0.001\ 22\div0.4=0.003\ 05$。

4.2.3.2 温度波动产生的不确定度 $u(V_{T5})$ 标准不确定度 $u(V_{T5})=0.4\times3\times2.1\times10^{-4}\div\sqrt{3}=0.000\ 145\ 5$ mL，相对标准不确定度 $u_{rel}(V_{T5})=$

0.001 455 ÷ 0.4 = 0.000 364。

4.2.3.3 合成不确定度 $u_{rel}(V_5)$ $u_{rel}(V_{5n}) = \sqrt{u_{rel}(V_{51})^2 + u_{rel}(V_{T5})^2} = \sqrt{0.003\,05^2 + 0.000\,364^2} = 0.003\,07$，标准曲线溶液制备过程中使用 1 000 ~ 5 000 μL 的可调移液器吸取地衣酚乙醇溶液 6 次，得 $u_{rel}(V_5) = \sqrt{6 \times 0.003\,07^2} = 0.007\,52$。

4.2.4 试样处理的合成不确定度 $u_{rel}(S)$

$$u_{rel}(S) = \sqrt{u_{rel}(V_3)^2 + u_{rel}(V_4)^2 + u_{rel}(V_5)^2} = \sqrt{0.014\,3^2 + 0.012\,0^2 + 0.007\,52^2} = 0.020\,1$$。

4.3 标准曲线拟合引入的不确定度 u(C)[11]

D-核糖标准工作液每个浓度平行测定 2 份，包括零点，共 7 个梯度，拟合线性回归方程为 $y = 0.028\,6x + 0.013\,9$，其中 A 为吸光度，X 为核糖含量，$a = 0.013\,9$（截距），$b = 0.028\,6$（斜率），属 B 类不确定度。标准曲线引入的不确定度为：

$$u(C) = \frac{S_R}{b}\sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{p} + \frac{(C_x - C)^2}{\sum_{j=1}^{n}(C_j - C)^2}}$$

$$S_R = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^{n}[A_j - (a + bC_j)^2]}{n-2}}$$

式中；$p = 2$（试样重复测量次数）；$n = 14$（标准曲线溶液的测量次数）；C_x 为试样中核糖浓度（μg·mL^{-1}）；C 为标准曲线核糖浓度平均值（μg·mL^{-1}）；C_j 为标准曲线溶液各点的核糖浓度（μg·mL^{-1}）；A_j 为第 j 次测定标准曲线溶液的吸光度值；S_R 为标准曲线的剩余标准差（残差的标准差）；b 为斜率，a 为截距。根据公式计算得出 $S_R = 0.015\,757$，$u(C) = 0.417\,0$，其相对标准不确定度 $u_{rel}(C) = u(C)/Cx = 0.037\,5$。

4.4 测量重复性引入的不确定度 u(rep)

试样平行测定 6 次多糖含量，分别为 25.00、24.89、24.84、24.79、24.82、25.13 μg·mL^{-1}，平均值为 24.91 μg·mL^{-1}，标准差 S(rep) = 0.131；标准不确定度 u(rep) = S(rep) ÷ $\sqrt{6}$ = 0.053 5，相对标准不确定度 $u_{rel}(rep) = u(rep) \div 24.91 = 0.002\,15$。

4.5 紫外-分光光度计引入的不确定度 u(I)

经查紫外-分光光度计检定证书，其透射比扩展不确定度 $u_{rel} = 0.3\%$，$k = 2$，其相对标准不确定度为 $u_{rel}(I) = 0.3\% \div 2 = 0.001\,5$。

4.6 方法偏倚引入的不确定度 u(B)[8]

分析方法的偏倚表示为分析回收率。采用加样回收试验法，制备相当于供试品溶液浓度的 80%（低）、100%（中）、120%（高）的样品，每个浓度分别制备 3 份，共 9 份，低、中、高浓度供试品溶液的回收率分别为 102.4%、104.1%、103.9%；103.1%、102.5%、102.0%；114.5%、117.6%、117.8%，平均回收率为 107.54%，计算 S = 3.99%，方法偏倚的不确定度为 $u(B) = 3.99 \div \sqrt{9} = 1.33\%$，$u_{rel}(B) = 1.33\% \div 107.54\% = 0.012\,4$。

4.7 合成不确定度的评估

计算方法的合成相对标准不确定度为

$$u_{rel} = \sqrt{u_{rel}(P)^2 + u_{rel}(S)^2 + u_{rel}(C)^2 + u_{rel}(rep)^2 + u_{rel}(I)^2 + u_{rel}(B)^2}$$
$$= \sqrt{0.003\,33^2 + 0.020\,1^2 + 0.037\,5^2 + 0.002\,15^2 + 0.001\,50^2 + 0.012\,4^2} = 0.044\,52$$

标准不确定度为 $u_c = u_{rel} \times C$；其中 C 为供试品多糖含量（μg·mL^{-1}）。$u_c = 0.044\,52 \times 24.91 = 1.109\,0$。取包含因子 $k = 2$，此时对应的置信概率为 95%，扩展不确定度 $U = k \times u_c = 2.218\,0$。供试品中多糖含量的测定结果为（24.91 ± 2.2180）μg·mL^{-1}，置信概率为 95%，$k = 2$。各不确定度分量结果见表 1。

表 1 不确定度分量结果

不确定度来源	不确定度分量	相对标准不确定度
标准溶液配制引入的不确定度	u(P)	0.003 33
对照品的纯度	$u(P_R)$	0.000 579
对照品称量	$u(W_R)$	0.001 16
定容	$u(V_1)$	0.000 547
稀释	$u(V_2)$	0.003 02

续表 1

不确定度来源	不确定度分量	相对标准不确定度
试样处理引入的不确定度	u(S)	0.020 1
1 000 μL 的可调移液器吸取标准溶液	$u(V_3)$	0.014 3
1 000 ~ 5 000 μL 的可调移液器吸取显色液 1	$u(V_4)$	0.012 0
1 000 μL 的可调移液器吸取显色液 2	$u(V_5)$	0.007 52
标准曲线拟合引入的不确定度	u(C)	0.037 5
测定重复性引入的不确定度	u(rep)	0.002 15
紫外分光光度计引入的不确定度	u(I)	0.001 50
方法偏倚引入的不确定度	u(B)	0.012 4

讨　论

本文对现行版《中华人民共和国药典》通则 3421 测定 b 型流感嗜血杆菌结合疫苗多糖含量的不确定度进行评估。从不确定度评定过程中可以看出,不确定度所占比例依次为标准曲线的拟合、试样处理、方法偏倚、标准溶液配制、测量重复性、紫外分光光度计。根据“比最大的分量小 1/3 的那些分量无需深入评估”原则[7],可去掉那些不重要的分量,主要考虑标准曲线的拟合、试样处理、方法偏倚引入的不确定度分量。因此控制标准曲线拟合降低不确定度分量,效果最为明显,加强实验人员的操作水平和技术培训,并按要求严格执行标准操作规程,也可有效降低试验不确定度;试样处理引入的不确定度主要来源于移液器,均需计量检定,由于样品的测定需要测定标准曲线,耗时较多,综合考量,试样处理 1 mL 及以上的用移液管,1 mL 以下用移液器配制标准曲线效率高;方法偏倚方面,严格依照标准进行检验,把控好实验条件,如沸水浴时试管放置不要过于密集,沸水液面和冰水液面至少没过试管反应液面,保证各试管均匀受热和冷却,规范实验操作包括移液管、移液器的使用,以降低人为因素引起的不确定度;另外,合理控制实验环境温度,定期对紫外-可见分光光度计进行检定、期间核查,加强日常维护保养,确保仪器处于良好稳定的工作状态。

紫外-可见分光光度法在药物质量控制方面有广泛应用,尤其是生物制品相关检验中,操作步骤较多,影响因素较多,需考虑分析过程中各种影响因素对不确定度的贡献。本研究依据 JJF1059. 1-2012《测量不确定度评定与表示》以及《化学分析中不确定度的评估指南》中的要求,从不确定度来源和量化不确定度分量等方面对紫外-可见分光光度法测定 b 型流感嗜血杆菌结合疫苗多糖含量的过程进行全面分析,确定影响因素与结果不确定度,为数据溯源管理提供数据支持,为药品质量控制提供科学支撑,对基于紫外-分光光度法的相关领域不确定度评定具有参考意义。

[参 考 文 献]

[1] 张腾腾, 秦春君, 尹珊珊, 等. Hib 荚膜多糖在疫苗制备周期中的结构稳定性[J]. 中国生物制品学杂志, 2024, 37(2): 129 - 137.

[2] 赵丹, 李茂光, 毛琦琦, 等. b 型流感嗜血杆菌结合疫苗游离多糖含量检测高效阴离子交换色谱-脉冲安培法的建立及验证[J]. 中国生物制品学杂志, 2022, 35(1): 79 - 84.

[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2025 年版. 三部. 北京: 中国医药科技出版社, 2025: 643.

[4] 肖亭, 王晨, 姚尚辰, 等. 测量结果不确定度评定在我国药物分析领域中的应用[J]. 药物分析杂志, 2021, 41(11): 1851 - 1859.

[5] 裴文莉, 李晓旭, 金轩, 等. 药物分析领域相关测量不确定度指导原则介绍[J]. 中国药事, 2024, 38(10): 1182 - 1192.

[6] 国家质量监督检验检疫总局. 测量不确定度评定与表示: JJF 1059.1-2012[S]. 北京: 中国标准出版社, 2013.

[7] 中国合格评定国家认可委员会. 化学分析中的不确定度的评估指南[M]. 北京: 中国计量出版社, 2019.

[8] 李琼霞, 黄韬, 王咏欣. GC-MS/MS 测定枸杞中氯氰菊酯残留量的不确定度评定[J]. 今日药学, 2025, 35(1): 44 - 48.

[9] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 实验室玻璃仪器 单标线吸量管: GB/T 12808-2015[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.

[10] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 实验室玻璃仪器 单标线容量瓶: GB/T 12806-2011[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.

[11] 王佳庆, 汪祺, 刘彤彤, 等. 超高效液相色谱-串联质谱联用法测定人全血中他克莫司含量不确定度评定[J]. 中国药物警戒, 2025, 22(4): 386 - 390.

编辑:毕晓帆/接受日期:2025 - 08 - 13