

# 评定高效液相色谱法测定婴幼儿配方乳粉中乳铁蛋白含量的不确定度

周荣杰, 葛 城, 易 灿, 周 钧, 储晓刚, 王 聪\*

(澳优乳业(中国)有限公司, 长沙 410200)

**摘 要:** **目的** 对高效液相色谱法测定婴幼儿配方乳粉中乳铁蛋白含量的不确定度进行分析。**方法** 通过对实验过程中所用标准物质、样品处理过程、测量重复性以及回收率 4 个方面进行不确定度分析, 建立了不确定度的模型, 计算合成不确定度、扩展不确定度。**结果** 当乳铁蛋白的含量为 64.9 mg/100 g 时, 高效液相色谱法测定婴幼儿乳粉中乳铁蛋白含量的合成不确定度为 0.023, 扩展不确定度为 1.5 mg/100 g, 乳粉中乳铁蛋白含量的测定结果为 $(64.9 \pm 1.5)$  mg/100 g, ( $k=2, P=95\%$ )。 **结论** 本次评定揭示了该检测方法对结果影响最大的因素是标准溶液及工作液的制备过程, 因此在此过程中应严格按照规范进行操作, 从而使检测结果更加准确可靠。

**关键词:** 婴幼儿配方乳粉; 乳铁蛋白; 不确定度; 高效液相色谱

## Uncertainty evaluation of determination of lactoferrin in infant formula milk powder by high performance liquid chromatography

ZHOU Rong-Jie, GE Cheng, YI Can, ZHOU Jun, CHU Xiao-Gang, WANG Cong\*

(Ausnutria Dairy (China) Co., Ltd, Changsha 410200, China)

**ABSTRACT: Objective** To analyze the uncertainty of determination of lactoferrin in infant formula milk powder by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** By analysing the uncertainty of the standard materials used in the experiment, sample processing, measurement repeatability and recovery rate, the uncertainty model was established to calculate the combined uncertainty and expanded uncertainty. **Results** When the content of lactoferrin was 64.9 mg/100 g, the synthetic uncertainty of lactoferrin in milk powder was 0.023, the extended uncertainty was 1.5 mg/100 g, and the content of lactoferrin in milk powder was  $(64.9 \pm 1.5)$  mg/100 g, ( $k=2, P=95\%$ ). **Conclusion** This evaluation reveals that the preparation process of standard solution and working solution is the most influential factor of the test method on the results. Therefore, specification should be strictly followed during the operation procedure to improve the reliability of the test results.

**KEY WORDS:** infant formula milk powder; lactoferrin; uncertainty evaluation; high performance liquid chromatography

\*通讯作者: 王聪, 中级工程师, 主要研究方向为乳制品质量检测及管理。E-mail: congwang@ausnutria.com

\*Corresponding author: WANG Cong, Intermediate Engineer, Ausnutria Dairy (China) Co., Ltd, No.2, Wangwang East Road, Wangcheng District, Changsha 410200, China. E-mail: congwang@ausnutria.com

## 1 引言

婴幼儿配方乳粉作为婴幼儿主要食物之一, 备受国家重视, 对于其各项指标的检测也被密切关注。而检测过程中, 由于误差的存在, 检测结果与真值之间总会存在一定程度的偏离, 因此, 为了使实验结果更加准确, 需要对其进行测量不确定度分析, 不确定度越小, 检测结果越接近真值, 可接受程度越高。测量不确定度是表征被测量值分散性的非负参数<sup>[1]</sup>。

乳铁蛋白又称为乳铁传递蛋白, 是一条单链的铁结合糖蛋白<sup>[2]</sup>, 研究表明, 乳铁蛋白具备多种生理功能: 如抗炎、抗病毒、抗癌、促进伤口愈合、促进骨骼生长、提高造血功能增强免疫力等<sup>[3]</sup>。在婴幼儿配方乳粉中添加乳铁蛋白, 可降低婴幼儿呼吸道疾病、肠道疾病的发病率<sup>[4-7]</sup>, 促进婴幼儿生长发育<sup>[8]</sup>等, 对婴幼儿的健康与发育也有着很大的裨益。

对于乳粉中乳铁蛋白的检测, 目前的方法有: 毛细管电泳法<sup>[9]</sup>、酶联免疫法<sup>[10-12]</sup>、高效液相色谱法<sup>[13-16]</sup>等。采用高效液相色谱法检测乳铁蛋白有操作简单快捷、检测周期短等特点, 但是实验过程中有多种不确定因素, 且目前对高效液相色谱法测定婴幼儿配方乳粉中乳铁蛋白含量的不确定度分析鲜有报道, 因此本研究依据 JJF 1059-2012 以及 JJG 196-2006<sup>[17,18]</sup>, 对乳铁蛋白的检测结果展开了不确定度分析, 分析实验过程中各因素产生的不确定度, 确定影响检验结果不确定度的主要因素, 以期提高乳粉中乳铁蛋白含量检测的精准度, 为婴幼儿乳粉中乳铁蛋白含量的准确测定提供科学依据。

## 2 材料与方法

### 2.1 仪器与试剂

Agilent1260 型高效液相色谱分析仪(带紫外检测器, 美国安捷伦仪器有限公司); ME204E 型分析天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司); SB-5200D 超声波振荡器(宁波新芝有限公司); 3K15 型冷冻离心机(美国 SIGMA 公司)。

乳铁蛋白标准品: 纯度 ≥ 95.9%, 日本 WAKO 公司。

乙腈(色谱纯, 德国 CNW 公司); 三氟乙酸、硫酸氢二钠、磷酸二氢钠、氯化钠(优级纯, 天津科密欧公司); 实验室用水为 Milli-Q 超纯水; 0.45 μm 水系滤膜(上海安谱公司); 3 mL 肝素亲和柱(北京美正集团)。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 样品前处理

以《食品安全国家标准 食品中乳铁蛋白的测定(征求意见稿)》为参照进行实验。

#### 2.2.2 高效液相色谱条件

色谱柱: Symmetry300<sup>TM</sup> C<sub>4</sub>柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);

柱温: 40 °C; 流动相及梯度(A:1%三氟乙酸乙腈溶液, (三氟乙酸:乙腈=1:1000 V:V); B:1%三氟乙酸水溶液, (三氟乙酸:水=1:1000 V:V), 进样量: 30 μL; 波长: 280 nm。流动相洗脱程序见表 1

表 1 流动相洗脱梯度  
Table 1 Mobile phase elution gradient

| 时间/min | 流速/(mL/min) | A/%        | B/%       |
|--------|-------------|------------|-----------|
|        |             | 1%三氟乙酸乙腈溶液 | 1%三氟乙酸水溶液 |
| 0      | 1.000       | 30         | 70        |
| 5      | 1.000       | 55         | 45        |
| 10     | 1.000       | 60         | 40        |
| 12     | 1.000       | 30         | 70        |
| 16     | 1.000       | 30         | 70        |

#### 2.2.3 数据模型

试样中乳铁蛋白的含量按式(1)计算:

$$X = \frac{C \times V_1 \times V_3 \times 100}{m \times V_2 \times 1000} \quad (1)$$

式中:

X: 试样中乳铁蛋白含量, mg/100 g; C: 由标准曲线计算得到的试样中乳铁蛋白的浓度, μg/mL; V<sub>1</sub> 试液定容体积, mL; V<sub>2</sub> 试液提取液的定容体积, mL; V<sub>3</sub> 收集液的定容体积, mL; m: 试样的称样量, g。

#### 2.2.4 方法验证过程

线性实验部分: 配制浓度为 10 mg/mL 的标准储备液并依次稀释至 20.0、50.0、80.0、100.0、150.0、200.0 μg/mL, 此 6 个级别的标准工作溶液按从小到大的顺序分别进样, 以待测物的浓度为横坐标, 待测物信号强度为纵坐标, 绘制标准曲线, 得到测定线性范围内的线性方程和相关系数。

方法精密度: 选取 1 个婴幼儿配方奶粉样品(验证样品类型关注浓度范围内), 对一样品进行 15 次平行实验, 计算平均值和相对标准偏差(relative standard deviation, RSD), 并得到变异系数。

回收率实验: 本底采用空白婴幼儿配方乳粉样品, 选取 3 个添加水平进行回收率实验, 分别约为 30、60、120 mg/100 g; 每个添加水平做 3 个平行样, 一共 9 个加标样。

## 3 结果与分析

### 3.1 方法验证结果

对该实验方法进行方法验证, 获得结果见表 2。

根据标准 GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》<sup>[19]</sup>, 该方法满足婴幼儿配方乳粉中乳铁蛋白的测定。

### 3.2 不确定度分量的主要来源

参照上述实验方法, 不确定度主要从测量重复性、样品处理过程中样品称量、定容体积、加标回收率、标准工作液稀释过程量器校准以及标准曲线拟合这几个方面引入。

### 3.3 不确定度评定

#### 3.3.1 测量重复性实验的不确定度

称取同一批次的乳粉试样进行 15 次平行实验, 处理实验数据和分析结果见表 3。

单次测量的实验标准偏差为:

$$S(\bar{X}) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}} = 2.127$$

由测定重复性引入的相对标准不确定度  $u_{rel}(f_{rep})$  为:

$$u_{rel}(f_{rep}) = \frac{S(\bar{X})}{\bar{X}\sqrt{7}} = 0.00847$$

#### 3.3.2 样品制备过程引入的不确定度

##### (1) 样品称量引入的不确定度

称取样品的质量主要受到天平的校准的影响, 天平校准又包括天平的线性和分辨力两个分量。

天平的线性: 天平制造商给出了天平的线性为  $\pm 0.001$  g, 采用矩形分布处理, 其标准不确定度为:

$$u(m_1) = \frac{0.001}{\sqrt{3}} = 0.000577 \text{ g}$$

天平的分辨力: 采用电子天平称量, 由天平分辨力引入的质量的标准不确定度为:

$$u(m_2) = \frac{0.0001}{\sqrt{3}} = 0.0000577 \text{ g}$$

表 2 方法验证结果  
Table 2 Method validation results

| 验证参数 |                            | 验证结果                             |
|------|----------------------------|----------------------------------|
|      | 校准点浓度/( $\mu\text{g/mL}$ ) | 20.0、50.0、80.0、100.0、150.0、200.0 |
| 线性   | 线性方程                       | $Y=1.75906X-8.4801$              |
|      | 相关系数                       | $r^2=0.99834$                    |
| 精密度  | 方法重复性                      | RSD=3.28%                        |
| 正确度  | 加标回收率                      | 95.89%~100.54%                   |

表 3 试样测量数据和计算结果  
Table 3 Sample measurement data and calculation results

| 编号 | 试样质量/g | 样液浓度<br>$C/(\mu\text{g/mL})$ | 样液平均浓度<br>$\bar{C}/(\mu\text{g/mL})$ | 试样含量<br>$X(\text{mg}/100 \text{ g})$ | 试样平均含量<br>$\bar{X}/(\text{mg}/100 \text{ g})$ | $S(\bar{X})$ | $u_{rel}(f_{rep})$ |
|----|--------|------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---|--------------|--------------------|
| 1  | 3.0254 | 78.952                       |                                      | 65.2                                 |   |              |                    |
| 2  | 3.0142 | 72.009                       |                                      | 59.7                                 |   |              |                    |
| 3  | 3.0558 | 79.874                       |                                      | 65.3                                 |   |              |                    |
| 4  | 3.0044 | 75.422                       |                                      | 62.8                                 |   |              |                    |
| 5  | 3.0042 | 80.207                       |                                      | 66.7                                 |   |              |                    |
| 6  | 3.0093 | 78.194                       |                                      | 65.0                                 |   |              |                    |
| 7  | 3.0036 | 78.879                       |                                      | 65.7                                 |   |              |                    |
| 8  | 3.0266 | 79.859                       | 78.337                               | 66.0                                 | 64.9  | 2.127        | 0.00847            |
| 9  | 3.0039 | 77.075                       |                                      | 64.1                                 |   |              |                    |
| 10 | 3.0026 | 79.219                       |                                      | 66.0                                 |   |              |                    |
| 11 | 3.0448 | 82.441                       |                                      | 67.7                                 |   |              |                    |
| 12 | 3.0548 | 82.995                       |                                      | 67.9                                 |   |              |                    |
| 13 | 3.0052 | 74.777                       |                                      | 62.2                                 |   |              |                    |
| 14 | 3.0101 | 77.128                       |                                      | 64.1                                 |   |              |                    |
| 15 | 3.0087 | 78.023                       |                                      | 64.8                                 |   |              |                    |

由天平称量所引入的标准不确定度可如下合成:

$$u(m) = \sqrt{u^2(m_1) + u^2(m_2)} = 0.000580 \text{ g}$$

样品称量引入的相对不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(m) = \frac{u(m)}{m} = 0.000193$$

### (2) 量器校准引入的不确定度

在样品制备过程中使用了 A 级 50 mL 单标线容量瓶。查阅 JJG 196-2006《常用玻璃仪器检定规程》<sup>[18]</sup>得, 在 20 °C 时 A 级 50 mL 单标线容量瓶容量允差为 ±0.05 mL 按矩形分布考虑, 包含因子  $k=\sqrt{3}$ , 同时考虑溶液温度和量器与校准温度引起的不确定度, 计算如下由:

JJG 196-2006《常用玻璃量器检定规程》规定, 在 20 °C 时 A 级 50 mL 单标线容量瓶体积带来的不确定度为:

$$u(V_1) = \frac{0.05}{\sqrt{3}} = 0.0289 \text{ mL}$$

A 级 50 mL 单标线容量瓶温度引起的不确定度  $u(V_2)$ , 温度变化为  $\Delta t \pm 5$  °C, 20 °C 时水的膨胀系数  $\alpha = 2.08 \times 10^{-4}$  /°C, 按矩形均匀分布:

$$u(V_2) = \frac{\alpha V \Delta t}{\sqrt{3}} = 0.0300 \text{ mL}$$

则 A 级 50 mL 单标线容量瓶的不确定度为:

$$u(V_{50\text{容}}) = \sqrt{u^2(V_1) + u^2(V_2)} = 0.0417 \text{ mL}$$

A 级 50 mL 单标线容量瓶引入的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(V_{50\text{容}}) = \frac{u(V_{50\text{容}})}{V_{50\text{容}}} = 0.000833$$

### (3) 样品制备过程引入的不确定度

由样品称量及量器校准不确定度分量合成的样品制备过程引入的相对标准不确定度  $u_{\text{rel}}(\text{sam})$  为:

$$u_{\text{rel}}(\text{sam}) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(m) + u_{\text{rel}}^2(V_{50\text{容}})} = 0.000855$$

### 3.3.3 加标回收率引入的不确定度

选取 3 个添加水平进行回收率实验, 分别为本底含量

的 0.5、1.0、1.5 倍; 每个添加水平做 3 个平行样。加标回收率数据见表 4。根据表 4 回收率数据,  $\bar{R}=97.54\%(n=9)$ , 回收率  $R$  的标准偏差为  $S(R)=1.673\%$ 。则回收率引入的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(R) = \frac{S(R)}{\sqrt{n} \times \bar{R}} = 0.00572$$

对回收率进行显著性分析以判定在结果计算时是否引入回收率校正因子  $f_R$ :

$$T = \left| \frac{1-\bar{R}}{u(R)} \right| = 4.39$$

根据测量不确定度评定指南对一般检测实验室要求, 取置信概率 95%, 在自由度为 8 时  $T$  临界值为  $T_{0.05}=2.306$ ,  $T < T_{0.05}$ , 则表明回收率与 1 之间无显著性差异, 即本实验结果计算需要引入校正因子  $f_R$ 。

### 3.3.4 标准物质引入的不确定度

#### (1) 工作液配制量器校准引入的不确定度

标准溶液校正后稀释过程中使用 A 级 1 mL 单标线吸量管、A 级 25 mL 单标线容量瓶、A 级 10 mL 单标线容量瓶。

由 JJG 196-2006《常用玻璃量器检定规程》规定, 在 20 °C 时 A 级 1 mL 单标线吸量管的容量允差为 ±0.007 mL, 取矩形均匀分布, 则 A 级 1 mL 单标线吸量管体积带来的不确定度为:

$$u(V_3) = \frac{0.007}{\sqrt{3}} = 0.00404 \text{ mL}$$

A 级 1 mL 单标线吸量管温度变化引起的不确定度  $u(V_4)$  设温度变化为  $\Delta t \pm 5$  °C, 20 °C 时水的膨胀系数  $\alpha = 2.08 \times 10^{-4}$  /°C, 按矩形均匀分布:

$$u(V_4) = \frac{\alpha V \Delta t}{\sqrt{3}} = \frac{2.08 \times 10^{-4} \times 1 \times 5}{\sqrt{3}} = 0.000600 \text{ mL}$$

则 A 级 1 mL 单标线吸量管的不确定度为:

表 4 加标回收率数据( $n=9$ )  
Table 4 Standard addition recovery data ( $n=9$ )

| 序号 | 质量/g   | 加标量/ $\mu\text{g}$ | 测定含量/ $\mu\text{g}$ | 本底含量/ $\mu\text{g}$ | 回收率 $R/\%$ | 回收率均值 $\bar{R}/\%$ |
|----|--------|--------------------|---------------------|---------------------|------------|--------------------|
| 1  | 3.0029 | 1000.5             | 1005.8              |                     | 100.52     |                    |
| 2  | 3.0176 | 1000.5             | 993.7               |                     | 99.32      |                    |
| 3  | 3.0324 | 1000.5             | 975.1               |                     | 97.46      |                    |
| 4  | 3.0128 | 2001.0             | 1939.7              |                     | 96.94      |                    |
| 5  | 3.0318 | 2001.0             | 1966.7              | 0.0                 | 98.28      | 97.54              |
| 6  | 3.0220 | 2001.0             | 1902.1              |                     | 95.06      |                    |
| 7  | 3.0409 | 4002.0             | 3873.5              |                     | 96.79      |                    |
| 8  | 3.0301 | 4002.0             | 3906.5              |                     | 97.61      |                    |
| 9  | 3.0272 | 4002.0             | 3837.4              |                     | 95.89      |                    |

$$u(V_{1\text{单标移}}) = \sqrt{u^2(V_3) + u^2(V_4)} = 0.0041 \text{ mL}$$

$$u_{\text{rel}}(V_{1\text{单标移}}) = \frac{u(V_{1\text{单标移}})}{V_{1\text{单标移}}} = 0.00409$$

在 20 °C 时 A 级 25 mL 单标线容量瓶的容量允差为 ±0.03 mL, 取矩形均匀分布, 则 A 级 100 mL 单标线容量瓶体积带来的不确定度为:

$$u(V_5) = \frac{0.03}{\sqrt{3}} = 0.0173 \text{ mL}$$

A 级 25 mL 单标线容量瓶温度变化引起不确定度  $u(V_6)$  设温度变化为  $\Delta t \pm 5$  °C, 20 °C 时水的膨胀系数  $\alpha = 2.08 \times 10^{-4} / ^\circ\text{C}$ , 按矩形均匀分布:

$$u(V_6) = \frac{\alpha V \Delta t}{\sqrt{3}} = \frac{2.08 \times 10^{-4} \times 25 \times 5}{\sqrt{3}} = 0.0150 \text{ mL}$$

则 A 级 25 mL 单标线容量瓶的不确定度为:

$$u(V_{25\text{单标容}}) = \sqrt{u^2(V_5) + u^2(V_6)} = 0.0229 \text{ mL}$$

$$u_{\text{rel}}(V_{25\text{单标容}}) = \frac{u(V_{25\text{单标容}})}{V_{25\text{单标容}}} = 0.000917$$

在 20 °C 时 A 级 10 mL 单标线容量瓶的容量允差为 ±0.02 mL, 取矩形均匀分布, 则 A 级 10 mL 单标线容量瓶体积带来的不确定度为:

$$u(V_7) = \frac{0.02}{\sqrt{3}} = 0.0115 \text{ mL}$$

A 级 10 mL 单标线容量瓶温度变化引起不确定度  $u(V_8)$  设温度变化为  $\Delta t \pm 5$  °C, 20 °C 时水的膨胀系数  $\alpha = 2.08 \times 10^{-4} / ^\circ\text{C}$ , 按矩形均匀分布:

$$u(V_8) = \frac{\alpha V \Delta t}{\sqrt{3}} = \frac{2.08 \times 10^{-4} \times 10 \times 5}{\sqrt{3}} = 0.00600 \text{ mL}$$

则 A 级 10 mL 单标线容量瓶的不确定度为:

$$u(V_{10\text{单标容}}) = \sqrt{u^2(V_7) + u^2(V_8)} = 0.0130 \text{ mL}$$

$$u_{\text{rel}}(V_{10\text{单标容}}) = \frac{u(V_{10\text{单标容}})}{V_{10\text{单标容}}} = 0.00130$$

综上, 标准系列工作液配制过程量器校准引入的各不确定度分量见表 5。由表 5 数据合成的标准系列工作液配制过程量器校准引入的不确定度  $u_{\text{rel}}(V_{\text{std}})$  为:

$$u_{\text{rel}}(V_{\text{std}}) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(V_{1\text{单标移}}) \times 7 + 1 \times u_{\text{rel}}^2(V_{25\text{单标容}}) + 6 \times u_{\text{rel}}^2(V_{10\text{单标容}})} = 0.0113$$

(2) 标准曲线引入的不确定度

用高效液相色谱分别对系列标准溶液进行测定, 得到相应的峰面积, 用最小二乘法进行拟合, 得到标准工作曲线的线性回归方程, 结果见表 6。

根据表 6 数据, 对试样测定 15 次, 测定结果见表 3。试样液中乳铁蛋白的平均浓度为:

$$C = 78.337 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

则标准曲线拟合的不确定度为:

$$u(C_{\text{std}}) = \frac{S(y)}{b} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C - \bar{C})^2}{\sum_{i=1}^n (C_i - \bar{C})^2}}$$

式中,  $S(y)$  为残差标准偏差;  $b$  为曲线斜率,  $b = 1.75906$ ;  $a$  为截距,  $a = -8.4801$ ;  $p$  为样品溶液的测定总数,  $p = 15$ ;  $n$  为标准溶液的测定总数,  $n = 6$ ;  $C$  为样液中乳铁蛋白的平均浓度,  $\mu\text{g/mL}$ ;  $\bar{C}$  为标准溶液中乳铁蛋白的平均浓度值,  $\mu\text{g/mL}$ ;  $C_i$  为标准溶液中乳铁蛋白各点的浓度,  $\mu\text{g/mL}$ ;  $Y_i$  为标准溶液各点峰面积的测定值。

根据表 6 数据及公式计算得到:

$$S(y) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [Y_i - (bC_i + a)]^2}{n - 2}} = 4.59$$

$$\bar{C} = \frac{\sum_{i=1}^n C_i}{6} = 100.050 \text{ mL}$$

$$u(C_{\text{std}}) = \frac{S(y)}{b} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C - \bar{C})^2}{\sum_{i=1}^n (C_i - \bar{C})^2}} = 1.32 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

则标准曲线拟合引入的相对标准不确定为:

$$u_{\text{rel}}(C_{\text{std}}) = \frac{u(C_{\text{std}})}{C} = 0.0168$$

表 5 量器校准引入的相对标准不确定度  
Table 5 Relative standard uncertainty introduced in the calibration of the gauge

| 玻璃量器             | 最大允差/mL | 相对标准不确定度 | 使用次数 |
|------------------|---------|----------|------|
| A 级 1 mL 单标线吸量管  | ±0.007  | 0.00409  | 7    |
| A 级 25 mL 单标线容量瓶 | ±0.03   | 0.000917 | 1    |
| A 级 10 mL 单标线容量瓶 | ±0.02   | 0.00130  | 6    |

表 6 乳铁蛋白标准曲线测定数据和计算结果  
Table 6 Data and calculation results of standard curve of lactoferrin

| 标曲溶液编号                  | 1                       | 2      | 3       | 4       | 5       | 6       |
|-------------------------|-------------------------|--------|---------|---------|---------|---------|
| 浓度/( $\mu\text{g/mL}$ ) | 20.010                  | 50.025 | 80.040  | 100.050 | 150.075 | 200.100 |
| 乳铁蛋白峰面积                 | 26.079                  | 73.754 | 130.185 | 163.621 | 254.081 | 348.884 |
| 线性方程                    | $Y = 1.75906C - 8.4801$ |        |         |         |         |         |

### (3) 标准物质引入的不确定度

由标准储备液的校正、标准系列工作液配制过程量器校准及标准曲线拟合不确定度分量合成得标准物质引入的相对标准不确定度  $u_{\text{rel}}(\text{std})$  为:

$$u_{\text{rel}}(\text{std}) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(V_{\text{std}}) + u_{\text{rel}}^2(C_{\text{std}})} = 0.0202$$

#### 3.3.5 合成不确定度

由上述各相对标准不确定度合成婴儿配方乳粉中乳铁蛋白含量的相对标准不确定度  $u_{\text{rel}}(X)$  为:

$$u_{\text{rel}}(X) = u_{\text{rel}}^2(f_{\text{rep}}) + u_{\text{rel}}^2(\text{sam}) + u_{\text{rel}}^2(R) + u_{\text{rel}}^2(\text{std}) = 0.023$$

#### 3.3.6 扩展不确定度

根据测量不确定度评定指南对一般检测实验室要求, 置信概率  $P=95\%$  时, 取  $k=2$ 。本实验种测得乳铁蛋白含量为  $64.9 \text{ mg}/100 \text{ g}$ , 因此本实验测定婴幼儿配方乳粉中乳铁蛋白含量的扩展不确定度为:  $U=k \times u_{\text{rel}}(X) \times \bar{X} = 2 \times 0.023 \times 64.9 = 1.5$ ,  $k=2$ , 则本次乳铁蛋白的测定结果为:

$$X = (64.9 \pm 1.5) \text{ mg}/100 \text{ g} (k=2)$$

### 3.4 不确定度各分量结果

综合各项不确定度的评定, 高效液相色谱法测定奶粉中乳铁蛋白含量的不确定度分析结果见表 7。从表中可

以发现, 标准物质引入的不确定最大, 它是影响乳铁蛋白检测结果的主要因素, 少有偏离将引入较大的误差, 而这些偏离主要为实验员在移液与稀释的过程中带入, 因此在配制标准储备液及标准工作液的过程中, 应保持操作的规范性与严谨性。

## 4 结论与讨论

本研究讨论了乳粉中乳铁蛋白含量测定的不确定度的主要来源、以及各不确定度分量, 其中包括样品测量重复性、样品前处理、样品回收率以及标准物质这 4 个方面, 通过计算最后获得扩展不确定度: 乳铁蛋白的测定结果为:  $(32.3 \pm 2.9) \text{ mg}/100 \text{ g}$ , ( $k=2, P=95\%$ )。经评估, 高效液相色谱法测定乳粉中乳铁蛋白含量的操作过程中, 对检验结果影响最大的是标准溶液的配制、稀释以及标准曲线的拟合过程, 其次是测量重复性, 试样处理对结果的影响较小。因此在配置标准溶液的过程中, 必须要应严格进行移液操作, 从而提高检验的精密度和准确度。此次分析可以揭示出高效液相色谱法测定乳粉中乳铁蛋白的不确定度主要来源, 有利于控制实验过程中关键步骤, 从而提高检测结果的准确性与可靠性。

表 7 乳铁蛋白含量测定的相对标准不确定度及结果表示

Table 7 Relative standard uncertainty and result expression of lactoferrin content determination

| 相对不确定度 | 重复性<br>$u_{\text{rel}}(f_{\text{rep}})$ | 样品制备<br>$u_{\text{rel}}(\text{sam})$ | 标准物质<br>$u_{\text{rel}}(\text{std})$ | 回收率不确定度<br>$u_{\text{rel}}(R)$ | 合成不确定度<br>$u_{\text{rel}}(X)$ | 结果表示<br>$X/(\text{mg}/100 \text{ g})$ |
|--------|---|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|
| 乳铁蛋白   | 0.00847                                 | 0.000855                             | 0.0202                               | 0.00572                        | 0.023                         | $64.9 \pm 1.5$                        |

## 参考文献

- [1] ISO/IEC. Guide 98-3-2008 guide to the expression of uncertainty in measurement [S].
- [2] Huang RQ, Ke WL, Qu YH, et al. Characterization of lactoferrin receptor in brain endothelial capillary cells and mouse brain [J]. J Biomed Sci, 2007, (14): 121-128.
- [3] 唐慧娟, 张振海, 赵志英, 等. 乳铁蛋白作为药物载体的研究进展[J]. 药学报, 2015, 50(6): 675-681.  
Tang HX, Zhang ZH, Zhao ZY, et al. Research progress of lactoferrin as drug carriers [J]. Acta Pharm Sin, 2015, 50(6): 675-681.
- [4] King JC, Cummings GE, Guo N, et al. A double-blind, placebo-controlled, pilot study of bovine lactoferrin supplementation in bottle-fed infants [J]. J Pediatr Gastr Nutr, 2007, 44(2): 245-251.
- [5] Ochoa TJ, Cheat-Woo E, Baicchi N, et al. Randomized double-blind controlled trial of bovine lactoferrin for prevention of diarrhea in children [J]. J Pediatr, 2013, 162(2): 349-356.
- [6] Manzoni P, Meyer M, Stolfi I, et al. Bovine lactoferrin supplementation for prevention of necrotizing enterocolitis in very-low-birth-weight neonates: a randomized clinical trial [J]. Early Hum Dev, 2014, 90(Suppl1): 60-65.
- [7] Manzoni P, Rinaldi M, Cattani S, et al. Bovine lactoferrin supplementation for prevention of late-onset sepsis in very low-birth-weight neonates: A randomized trial [J]. J Am Med Assoc, 2009, 302(13): 1421-1428.
- [8] Ke C, Lan Z, Hua L, et al. Iron metabolism in infants: influence of bovine lactoferrin from iron-fortified formula [J]. Nutrition, 2015, 31(2): 304-309.
- [9] 孙国庆, 康小红, 刘卫星, 等. 利用毛细管电泳法测定乳品中乳铁蛋白含量[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(1): 115-117.  
Sun GQ, Kang XH, Liu WX, et al. Detection of lactoferrin in milk product by capillary electrophoresis [J]. Food Res Dev, 2009, 30(1): 115-117.
- [10] 张英华, 迟玉杰, 董平. 酶联免疫法测定牛初乳中乳铁蛋白的含量[J]. 中国乳品工业, 1997, 27(6): 19-20.  
Zhang YH, Chi YJ, Dong P. The determination of Concentration for lactoferrin by enzyme-linked immunosorbent assays [J]. Chin Dairy Ind, 1997, 27(6): 19-20.
- [11] 郑云鹏, 赵红杰, 郭靖宇, 等. 酶联免疫法检测奶粉样本中的乳铁蛋白及其均匀度的探索[J]. 中国乳品工业, 2019, 47(6): 41-44.  
Zheng YP, Zhao HJ, Guo JY, et al. Explored lactoferrin and its uniformity in milk powder samples by enzyme linked immunosorbent assay [J]. Chin Dairy Ind, 2019, 47(6): 41-44.
- [12] 麦巧冰, 陈杰, 李桢枝. 酶联免疫法检测配方奶粉中乳铁蛋白含量研

- 究-以进口婴幼儿配方奶粉为例[J]. 现代商贸工业, 2016, (31): 180-181.
- Mai QB, Chen J, Li RZ. Determination of lactoferrin in formula milk powder by enzyme-linked immunosorbent assay-taking imported infant formula as an example [J]. Mod Bus Trade Ind. 2016, (31): 180-181.
- [13] 王德伟, 游景水, 黄远英. 反相高效液相色谱法快速测定乳铁蛋白含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(8): 3088-3092.
- Wang DW, You JS, Huang YY. Rapid determination of lactoferrin by reversed-phase high performance liquid chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(8): 3088-3092.
- [14] 贾云虹, 宋晓青, 杨凯, 等. 高效液相色谱法测定婴儿配方奶粉中乳铁蛋白含量[J]. 中国奶牛, 2015, (13): 49-52.
- Jia YH, Song XQ, Yang K, *et al.* Determination of lactoferrin in infant formula milk powder by high performance liquid chromatography [J]. Chin Dairy Cattle, 2015, (13): 49-52.
- [15] Pochet S, Arnould C, Debouroux P, *et al.* A simple micro-batch ion-exchange resin extraction method coupled with reverse-phase HPLC (MBRE-HPLC) to quantify lactoferrin in raw and heat-treated bovine milk [J]. Food Chem, 2018, (259): 36-45.
- [16] Tsakali E, Chatzilazarou A, Houhoula D, *et al.* A rapid HPLC method for the determination of lactoferrin in milk of various species [J]. J Dairy Res, 2019, 86(2): 238-241.
- [17] JJF 1059.1-2012 测量不确定度评定与表示[S].
- JJF 1059.1-2012 Evaluation and expression of uncertainty in measurement [S].
- [18] JJG 196-2006 常用玻璃量器检定规程[S].
- JJG 196-2006 Working glass container [S].
- [19] GB/T 27404-2008 实验室质量控制规范 食品理化检测[S].
- GB/T 27404-2008 Criterion on quality control of laboratories-Chemical testing of food [S].

(责任编辑: 李磅礴)

## 作者简介



周荣杰, 主要研究方向为乳品检测。  
E-mail: rongjie.zhou@ausnutria.com



王聪, 中级工程师, 主要研究方向为乳制品质量检测及管理。  
E-mail: congwang@ausnutria.com