方法 OIV-MA-AS323-09　　方法类型Ⅳ

纳 他 霉 素

1 前言

纳他霉素的不同测定方法主要基于高效液相色谱/二极管阵列检测器(HPLC/DAD)和液相色谱-质谱(LC-MS)联用。对于方法限制—检测限和定量限的估计，实验室可根据认证体系(如 ISO/EN 17025:2005)，采用 OIV(OENO 7/2000，E-AS1-10-LIMDET)的推荐方法进行。

因为缺乏一个可信的实验室间评估标准，在有可靠的实验室间评估或其他更有力的标准水平做依据之前，暂且将检出限定为 5 μg/L。

2 方法

2.1 应用液相色谱-高分辨率质谱联用仪测定葡萄酒中的纳他霉素(游霉素)

2.1.1 范围

此方法描述了测定葡萄酒中纳他霉素(游霉素)的含量的分析步骤。纳他霉素含量以 μg/L 表示。方法确认使用溶剂法，对白葡萄酒和红葡萄酒进行确认，检出浓度的范围为 5 μg/L～2 600 μg/L。

2.1.2 原理

葡萄酒中纳他霉素(游霉素)含量是通过直接进样于液相色谱仪与高分辨率质谱检测系统(LC-HR/MS)，用标准添加法来定量测定。首先检测估算样品中纳他霉素的浓度。然后通过添加适合样品中纳他霉素浓度的校准标准再重复一次测定。

2.1.3 试剂

2.1.3.1 分析物

纳他霉素(游霉素)纯度＞95％。

2.1.3.2 化学试剂

2.1.3.2.1 甲醇，色谱纯。

2.1.3.2.2 实验室用纯净水，例：ISO 3696 等级〔实验室分析用水规格和检测方法(ISO 3696:1987)〕。

2.1.3.2.3 100％乙酸。

2.1.3.3 溶液

2.1.3.3.1 纳他霉素标准储备液(1000 μg/mL)

用万分之一天平准确称取 10 mg 纳他霉素于 10 mL 棕色容量瓶中，用甲醇∶水∶乙酸溶液(2.1.3.3.4)定容至刻度。盖上瓶盖超声处理。计算每毫升溶液中纳他霉素的毫克数。

2.1.3.3.2 工作溶液 1:纳他霉素(10 μg/mL)

移取 100 μL 储备液(2.1.3.3.1)于一个 10 mL 棕色容量瓶中,用甲醇∶水∶乙酸溶液(2.1.3.3.4)定容至刻度。

2.1.3.3.3 工作液 2:纳他霉素(0.5 μg/mL)

移取 500 μL 工作液 1(2.1.3.3.2)于一个 10 mL 棕色容量瓶中,用甲醇∶水∶乙酸溶液(2.1.3.3.4)定容至刻度。

2.1.3.3.4 甲醇∶水∶乙酸溶液(50∶47∶3,体积比)

量筒量取 500 mL 甲醇(3.2.1)加入到 1 L 的容量瓶中,加入 470 mL 水(2.1.3.2.2)并混匀,再加入 30 mL 乙酸(2.1.3.2.3)混匀。

2.1.3.3.5 甲醇,含 3%乙酸

量筒量取 30 mL 乙酸(2.1.3.2.3)加入到 1 L 的容量瓶中,用甲醇(2.1.3.2.1)定容并且混匀。

2.1.3.3.6 水,含 3%乙酸

量筒量取 30 mL 乙酸(2.1.3.2.3)加入到 1 L 容量瓶中。再用水(2.1.3.2.2)定容至刻度并混匀。

2.1.4 仪器

注:这里仅仅列出了一些特殊用途或者特别规格的仪器设备,实验中用到的常用的实验室玻璃仪器和设备都可用。

2.1.4.1 液相色谱仪(LC)

配备有一个自动进样器,一个 100 μL 的进样环和高分辨率质谱仪。

2.1.4.1.1 液相色谱柱

能够获得重复性较好的纳他霉素峰,具备将纳他霉素峰从样品基质和/所使用溶剂的干扰峰中分离开的能力。

注:所使用的分析仪器的类型,需对合适的操作条件进行优化确认。

2.1.4.1.2 HPLC 分析

下面是常用的较合适的柱子及其参数:

柱子:Waters Sunfire C_{18},150 mm×2.1 mm,3.5 μm;

柱温:30℃;

流速:0.25 mL/min;

进样体积:20 μL;

流动相 A:水∶乙酸=97∶3(体积比)(2.1.3.3.6);

流动相 B:甲醇∶乙酸=97∶3(体积比)(2.1.3.3.5);

运行时间:30 min;

自动进样器托盘:8℃。

梯度:

表 1

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	90	10
25	10	90
27	10	90
27.1	90	10
30	90	10

2.1.4.2 质谱检测(LC-HR/MS)

电离模式:正极电喷雾;

质荷比:m/z;

AGC 指标:高动态范围;

最大注射时间:50 ms;

扫描范围:m/z 480～670;

吹扫量:60 L/min;

载气:5 L/min;

喷雾电压:3.75 V;

纳他霉素:m/z 666.3106 9$[M+H]^+$;

确认离子:m/z 503.226 72;

保留时间:16.5 min。

2.1.5 试验步骤

取样前将样品摇匀确保样品均匀。

2.1.5.1 扫描

对于每一个酒样,分别移取 2 mL 于 2 个 2 mL 的 Eppendorf 离心管中,再分别加入 0 μL、20 μL 浓度为 0.5 μg/mL 的纳他霉素工作液,即分别加入 0 μg/L 和 5 μg/L 的纳他霉素。震荡离心管 1 min,然后在 14 000 rpm 条件下离心 10 min,经 0.2 μm PTFE 膜全部过滤到另一个 2 mL 的棕色管中,通过 LC-HR/MS(第 6 章)分析并且估算样品(第 7 章)中纳他霉素的含量。

如果浓度小于 5 μg/L,报告数据为<5 μg/L,如果浓度大于 5 μg/L,则依照 5.2 进行定量。

2.1.5.2 定量

测定纳他霉素估计含量大于 5 μg/L 的样品。分别移取 2 mL 酒样于 5 支 2 mL 的 Eppendorf 离心管中,分别添加 0 μL、5 μL、10 μL、20 μL 和 50 μL 的纳他霉素工作液 1(2.1.3.3.2)。即相当于添加 0 μg/L、25 μg/L、50 μg/L、100 μg/L 和 250 μg/L 的纳他霉素。震荡离心管 1 min,然后在 14 000 rpm 条件下离心 10 min。经 0.2 μm PTFE 膜全部过滤到另一个 2 mL 的管中,利用 LC-HR/MS(第 6 章)分析并且评估样品(第 7 章)中纳他霉素的含量。

2.1.6 分析

注:当开始测量时,应该检测检测器的基线稳定性和响应线性,同时要确认检测限。保证所有样品和校

准标准物测定过程中的条件一致。依据保留时间和精确的质谱通道确定纳他霉素峰,并测量峰面积。向液相柱中注入准备好的溶液。逐个测量定量的和确认通道中的纳他霉素的峰面积。图 1 给出了一个典型的色谱图示例。

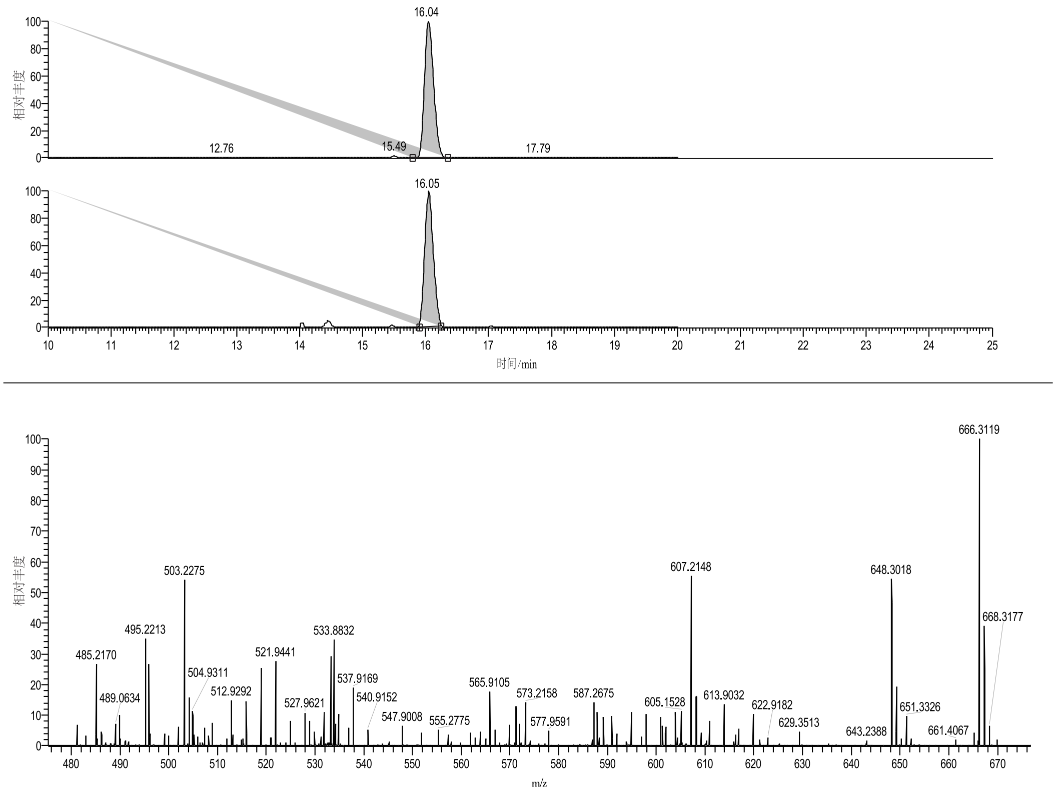


图 1　纳他霉素加标量为 50 μg/L 的白葡萄酒 LC-HR/MS 典型质谱光谱图

做出峰面积对纳他霉素的浓度(μg/L)的曲线,测定回归曲线的斜率、截距点和校正系数。校准曲线应该呈线性且相关系数要达到 0.99 或以上。

2.1.7　结果计算

分析物水平计算

样品中纳他霉素的含量使用下列公式计算,单位为 μg/L。

$$c=b/a$$

其中:c——葡萄酒中纳他霉素的含量(μg/L);

a——回归曲线的斜率;

b——回归曲线在 Y 轴上的截距。

2.1.8　确认

运用下列标准确认样品中纳他霉素的存在:

在相同的保留时间内,在精确质谱通道 m/z 666.310 69 和 m/z 503.226 72 中都存在峰。计算主要定量质谱通道的峰面积以及确认通道峰面积比值。标准允许与通过标准添加的校准样计算的比值有±25%的偏差。

2.1.9 方法性能数据

2.1.9.1 线性

以溶剂、白葡萄酒或红葡萄酒为基质（图 2、图 3 和图 4）时，本方法的线性范围为 1 μg/L～2 640 μg/L。

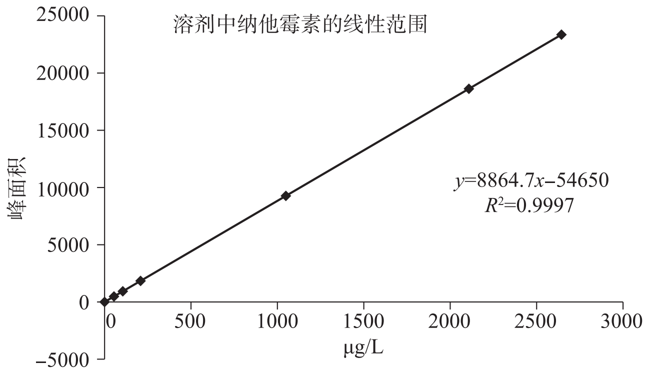


图 2 溶剂中添加从 1 μg/L～2 600 μg/L 浓度纳他霉素校准曲线

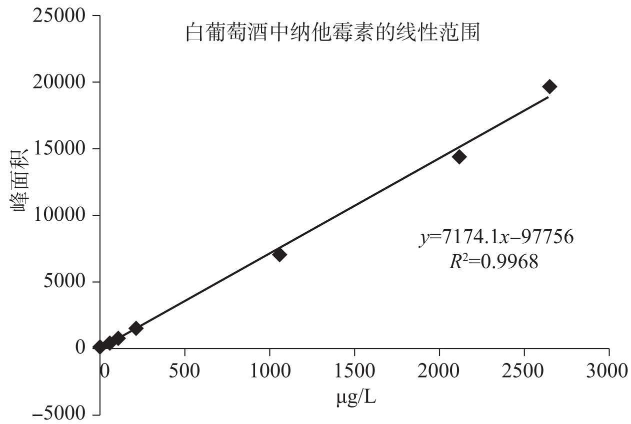


图 3 白葡萄酒中添加从 1 μg/L～2 600 μg/L 浓度纳他霉素标准曲线

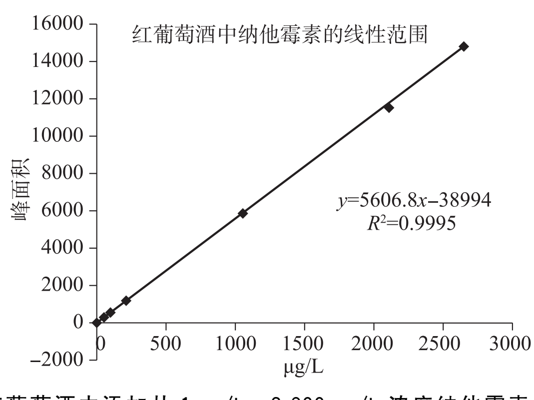


图 4 红葡萄酒中添加从 1 μg/L～2 600 μg/L 浓度纳他霉素标准曲线

表 2　溶剂校准残差

纳他霉素/(μg/L)	预测浓度/(μg/L)	残差	标准残差
0	6.4	−6.4	−0.4
1.056	6.8	−5.7	−0.3
5.28	10.9	−5.6	−0.3
10.56	16.8	−6.3	−0.4
52.8	58.9	−6.1	−0.3
105.6	108.3	−2.7	−0.2
211.2	200.1	11.1	0.6
1 056	1 029.8	26.2	1.5
2 112	2 084.8	27.2	1.6
2 640	2 671.8	−31.8	−1.8

表 3　白葡萄酒作为基质的校准残差

纳他霉素/(μg/L)	预测浓度/(μg/L)	残差	标准残差
0	15.5	−15.5	−0.3
1.056	15.6	−14.6	−0.3
5.28	18.8	−13.5	−0.2
10.56	23.9	−13.3	−0.2
52.8	63.6	−10.8	−0.2
105.6	109.3	−3.7	−0.1
211.2	212.8	−1.6	0.0
1 056	989.0	67.0	1.2
2 112	2 003.2	108.8	2.0
2 640	2 742.7	−102.7	−1.8

表 4　红葡萄酒基质的校正残差

纳他霉素/(μg/L)	预测浓度/(μg/L)	残差	标准残差
0	7.2	−7.2	−0.3
1.056	8.2	−7.1	−0.3
5.28	10.9	−5.7	−0.3
10.56	16.8	−6.2	−0.3
52.8	52.1	0.7	0.0
105.6	102.1	3.5	0.2
211.2	199.8	11.4	0.5
1 056	1 055.2	0.8	0.0
2 112	2 063.7	48.3	2.3
2 640	2 678.4	−38.4	−1.8

2.1.9.2 准确度和精确度

以溶剂、红葡萄酒和白葡萄酒为基质，在干预限值 5 μg/L 和 200 μg/L 处进行测定以评价方法重现性是否符合要求，结果如表 4，表 5 和表 6 所示。通过在红葡萄酒和白葡萄酒中选择两个浓度来加标进行方法准确性评估。由第二个不知纳他霉素浓度的试验者进行分析测试，分析结果如表 7 所示。

表 5 两浓度的纳他霉素在溶剂(甲醇：水：醋酸＝50：47：3,体积比)中的重现性

项目	纳他霉素浓度/(μg/L)	回收率/%
标准物质浓度 5 ng/mL 重复 1	5.3	99.7
标准物质浓度 5 ng/mL 重复 2	5.4	101.8
标准物质浓度 5 ng/mL 重复 3	5.8	108.6
标准物质浓度 5 ng/mL 重复 4	5.7	108.2
标准物质浓度 5 ng/mL 重复 5	5.8	109.0
标准物质浓度 5 ng/mL 重复 6	5.9	112.2
标准物质浓度 5 ng/mL 重复 7	5.7	108.4
标准物质浓度 5 ng/mL 重复 8	6.4	120.2
平均值	5.8	108.5
标准差	0.3	6.2
RSD/%	5.7	5.7
标准物质浓度 200 ng/mL 重复 1	238.3	112.9
标准物质浓度 200 ng/mL 重复 2	237.1	112.4
标准物质浓度 200 ng/mL 重复 3	231.5	109.7
标准物质浓度 200 ng/mL 重复 4	228.0	108.1
标准物质浓度 200 ng/mL 重复 5	244.0	115.7
标准物质浓度 200 ng/mL 重复 6	220.7	104.6
标准物质浓度 200 ng/mL 重复 7	229.4	108.7
标准物质浓度 200 ng/mL 重复 8	251.7	119.3
平均值	235.1	111.4
标准差	9.8	4.7
RSD/%	4.2	4.2

表 6　白葡萄酒中添加 5 μg/L 和 200 μg/L 纳他霉素的重复性

项目	纳他霉素含量/(μg/L)	回收率/%
5.3 ng/mL 浓度白葡萄酒重复 1	5.3	99.1
5.3 ng/mL 浓度白葡萄酒重复 2	4.4	82.8
5.3 ng/mL 浓度白葡萄酒重复 3	5.1	96.0
5.3 ng/mL 浓度白葡萄酒重复 4	4.9	92.5
5.3 ng/mL 浓度白葡萄酒重复 5	4.6	86.4
5.3 ng/mL 浓度白葡萄酒重复 6	5.1	96.4
5.3 ng/mL 浓度白葡萄酒重复 7	4.8	90.9
5.3 ng/mL 浓度白葡萄酒重复 8	4.9	92.2
平均值	4.9	92.0
标准偏差	0.3	5.4
RSD/%	5.9	5.9
211 ng/mL 浓度白葡萄酒重复 1	217.6	103.1
211 ng/mL 浓度白葡萄酒重复 2	223.3	105.8
211 ng/mL 浓度白葡萄酒重复 3	213.0	101.0
211 ng/mL 浓度白葡萄酒重复 4	216.8	102.7
211 ng/mL 浓度白葡萄酒重复 5	211.4	100.2
211 ng/mL 浓度白葡萄酒重复 6	208.6	98.9
211 ng/mL 浓度白葡萄酒重复 7	204.2	96.8
211 ng/mL 浓度白葡萄酒重复 8	214.4	101.6
平均值	213.7	101.3
标准偏差	5.8	2.8
RSD/%	2.7	2.7

表 7　红葡萄酒中添加 5 μg/L 和 200 μg/L 纳他霉素的重复性

项目	纳他霉素含量/(μg/L)	回收率/%
5.3 ng/mL 浓度红葡萄酒重复 1	5.3	99.7
5.3 ng/mL 浓度红葡萄酒重复 2	5.0	93.8
5.3 ng/mL 浓度红葡萄酒重复 3	3.8	72.5
5.3 ng/mL 浓度红葡萄酒重复 4	5.1	96.5
5.3 ng/mL 浓度红葡萄酒重复 5	5.0	95.0
5.3 ng/mL 浓度红葡萄酒重复 6	5.5	103.5
5.3 ng/mL 浓度红葡萄酒重复 7	4.3	80.9

表 7(续)

项目	纳他霉素含量/(μg/L)	回收率/%
5.3 ng/mL 浓度红葡萄酒重复 8	4.8	90.7
平均值	4.9	91.6
标准偏差	0.5	10.2
RSD/%	11.1	11.1
211 ng/mL 浓度红葡萄酒重复 1	183.9	87.1
211 ng/mL 浓度红葡萄酒重复 2	178.4	84.5
211 ng/mL 浓度红葡萄酒重复 3	181.1	85.8
211 ng/mL 浓度红葡萄酒重复 4	197.5	93.6
211 ng/mL 浓度红葡萄酒重复 5	178.2	84.5
211 ng/mL 浓度红葡萄酒重复 6	184.2	87.3
211 ng/mL 浓度红葡萄酒重复 7	181.2	85.9
211 ng/mL 浓度红葡萄酒重复 8	171.3	81.2
平均值	182.0	86.2
标准偏差	7.5	3.6
RSD/%	4.1	4.1

表 8 白葡萄酒和红葡萄酒中添加 125 μg/L 和 220 μg/L 纳他霉素的重复性

项目	理论浓度/(μg/L)	测定浓度/(μg/L)	准确度%	Z 值
白葡萄酒 A 重复 1	125	135	108	0.50
白葡萄酒 A 重复 2	125	142	114	0.85
白葡萄酒 A 重复 3	125	138	110	0.65
白葡萄酒 B 重复 1	220	230	105	0.28
白葡萄酒 B 重复 2	220	230	105	0.28
白葡萄酒 B 重复 3	220	239	109	0.54
红葡萄酒 A 重复 1	220	213	97	−0.20
红葡萄酒 A 重复 2	220	234	106	0.40
红葡萄酒 A 重复 3	220	223	101	0.09
红葡萄酒 B 重复 1	125	129	103	0.20
红葡萄酒 B 重复 2	125	129	103	0.20
红葡萄酒 B 重复 3	125	120	96	−0.25

计算

$$Z=(\text{测定浓度}-\text{实际浓度})/\text{目标的标准偏差}$$

$$\text{目标的标准偏差}=0.16\times\text{加标浓度}$$

依据 Horwitz 理论。

2.2 应用 HPLC/DAD 检测酒中的纳他霉素

2.2.1 范围

本方法应用液相分析检测葡萄酒中的纳他霉素，纳他霉素含量单位为 μg/L。

该方法已经通过实验室确认，将酒体基质(例如红葡萄酒或白葡萄酒)的影响考虑在内。

2.2.2 原理

没有加标的酒样直接进样到液相色谱中。加标酒样首先过滤消泡或放入超声水浴锅中消泡。用 C_8 的柱子分离分析物，小部分分析物会自动转移到 C_{18} 柱进一步分离。在波长为 304 nm 和319 nm 检测纳他霉素，并使用二极管阵列检测谱进行确认，通过外标法进行定量。

2.2.3 试剂和材料

2.2.3.1 试剂

2.2.3.1.1 去离子水。

2.2.3.1.2 甲醇，色谱纯。

2.2.3.1.3 分析用甲酸。

2.2.3.1.4 分析用乙酸。

2.2.3.1.5 分析用盐酸，0.1 mol/L。

2.2.3.1.6 基质酒，无纳他霉素检出。

2.2.3.1.7 纳他霉素>95%。

以 0.1 mol/L 的盐酸溶液为空白，在 291 nm、304 nm 和 319 nm 下测定溶解于 0.1 mol/L 盐酸溶液中的纳他霉素，以鉴定纳他霉素的纯度。

依照文献所得的参考数据	291 nm	304 nm	319 nm
消光(1%纳他霉素，1 cm 比色皿)	758	1 173	1 070

另一种方法：

稀释后(如稀释因子 20)的储备液(2.1.3.3.1)直接用于光谱测定。例如，移液管吸取 1.0 mL 原液到 20 mL 的容量瓶中，并使用 0.1 mol/L 盐酸定容至刻度线。以与稀释储备液的相同溶剂作为空白做对比测定。

2.2.3.2 准备流动相

2.2.3.2.1 流动相溶液：

2.2.3.2.1.1 5 mL 醋酸添加到 2 L 的甲醇中。

2.2.3.2.1.2 5 mL 醋酸添加到 2 L 的去离子水中。

2.2.3.2.2 洗脱液 1：甲醇-醋酸/去离子水-醋酸 (65/35)。

2.2.3.2.3 洗脱液 2：甲醇-醋酸/去离子水-醋酸(80/20)。

2.2.3.3 储备液和标准溶液的配置

所有溶液稳定性较差，需避光储存在冰箱内。储备液(2.1.3.3.1.1)的保值期为几周，但在

使用前(例如,见替代方法 2.2.3.1.7)需要对浓度进行测定。稀释溶液Ⅰ(2.2.3.3.1.2)和稀释溶液Ⅱ(2.2.3.3.1.3)和标准溶液(2.2.3.3.2)必须现配现用。

2.2.3.3.1 标准储备液和稀释溶液的制备

2.2.3.3.1.1 储备液(约 100 mg/L)

称量大约 5 mg 纳他霉素(3.1.7),使用甲醇转移到 50 mL 容量瓶。添加 0.5 mL 甲酸,确保纳他霉素完全溶解,在 20℃下用甲醇定容到刻度线。

2.2.3.3.1.2 稀释溶液Ⅰ(约 5 mg/L)

移取 2.5 mL 稀释溶液(2.1.3.3.1.1)到 50 mL 容量瓶并添加去离子水到刻度线。

2.2.3.3.1.3 稀释液Ⅱ(约 1 mg/L)

移取 4 mL 的稀释液Ⅰ(2.2.3.3.1.2)到 20 mL 容量瓶,使用酒基(2.2.3.1.6)添加到刻度线。

2.2.3.3.2 标准溶液制备

对于标准溶液,使用基质酒(2.2.3.1.6)将稀释液Ⅱ(2.2.3.1.6)稀释相应的浓度。如,添加 50 μL~10 mL 容量瓶浓度为 5 μg/L:

体积	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL
稀释溶液Ⅱ/μL	50	100	200	400	500	1 000	3 700
纳他霉素含量/(μg/L)	5	10	20	40	50	100	370

2.2.4 实验器材

常用实验室设备,个别如下所示:

2.2.4.1 装置 6 通阀和两个系列高效液相色谱泵或梯度泵保证分离的 HPLC-DAD 装置。

2.2.4.2 HPLC-柱 RP-8。

2.2.4.3 HPLC-柱 RP-18。

2.2.4.4 光度计。

2.2.5 进样

非汽酒样品直接注射到 HPLC 系统。起泡酒的样品首先通过过滤或使用超声波脱气。如样品需存储应储存在冷暗条件下。

2.2.6 步骤

2.2.6.1 HPLC 操作条件

柱子和参数如下:

柱 1:C_8 柱(例如,选择 B 125×4 mm/5 μm 封尾,默克公司);

流动相:室温下使用洗脱剂 1(2.2.3.2.2);

流量:1 mL/min。

柱 2:C_{18}柱(例如 Lichrospher 125×4 mm/5 μm,默克公司);

流动相:30℃洗脱液 2(2.2.3.2.3);

流量:1 mL/min;

进样量:500 μL;

紫外检测器:304 nm 和 319 nm 处。

分析窗口：在进一步分析前，需要确认目标物出峰的时间(图 5)。分析窗口必须包含目标物出峰的时间前后 0.5 min。

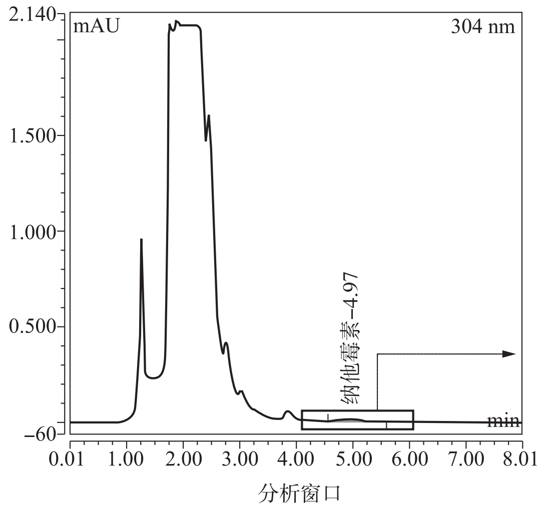


图 5　柱 1　色谱图分析窗口

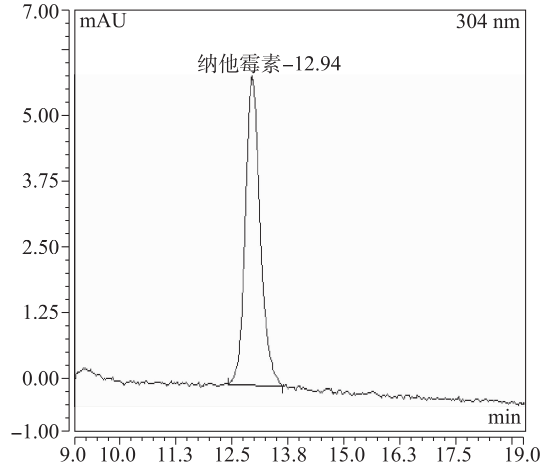


图 6　柱 2　色谱图加标样品(纳他霉素)

2.2.6.2　识别/确认

峰的识别是通过比较标准和样品在两个测量波长 304 nm 和 319 nm 的保留时间。在 2.2.6.1 提到的参数设置下，色谱系统对纳他霉素的保留时间约为 12.9 min(图 6)。

DAD 光谱用来进一步确认阳性结果(图 7 和图 8)。

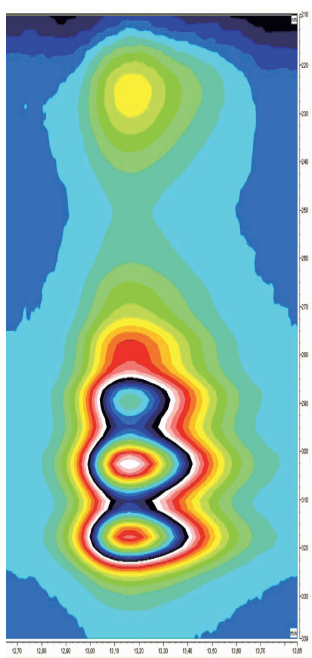


图 7　纳他霉素 3 维 DAD 光谱图

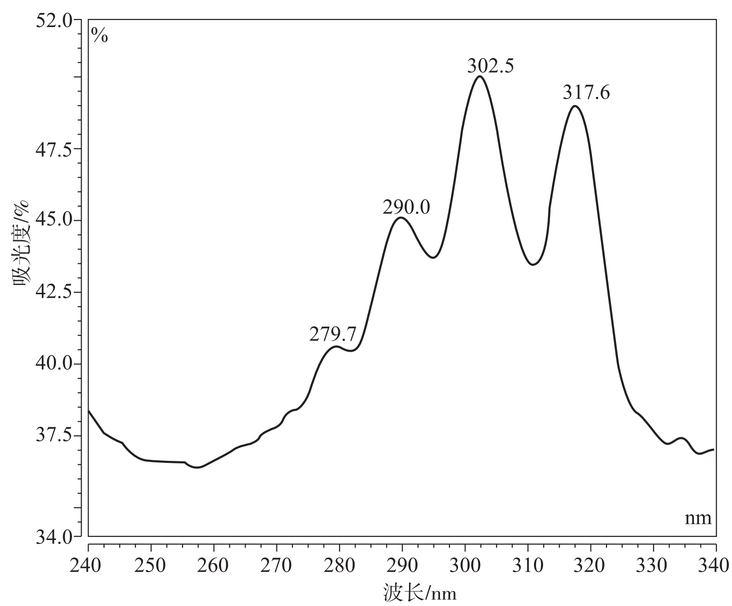


图 8　纳他霉素 DAD 光谱图

2.2.7　结果的计算和表示

使用标准溶液(2.2.3.3.2)在 304 nm 的色谱图作为校准曲线。使用外标法进行纳他霉素的定量。峰面积和相关的浓度的曲线应该成线性,相关系数至少应该为 0.99。结果表示单位为 μg/L。

2.2.8　方法性能数据

检出限,定量限。

检出限的确定和定量限根据 DIN 32645(直接测定:多次测量空白基质样品,$n=10$;覆盖全部工作范围的校准曲线)

检出限:2.5 μg/L;

定量限:8.5 μg/L。

线性

在 5 μg/L～100 μg/L 的校准范围内,确认葡萄酒基质具有良好的线性度关系(图 9)。

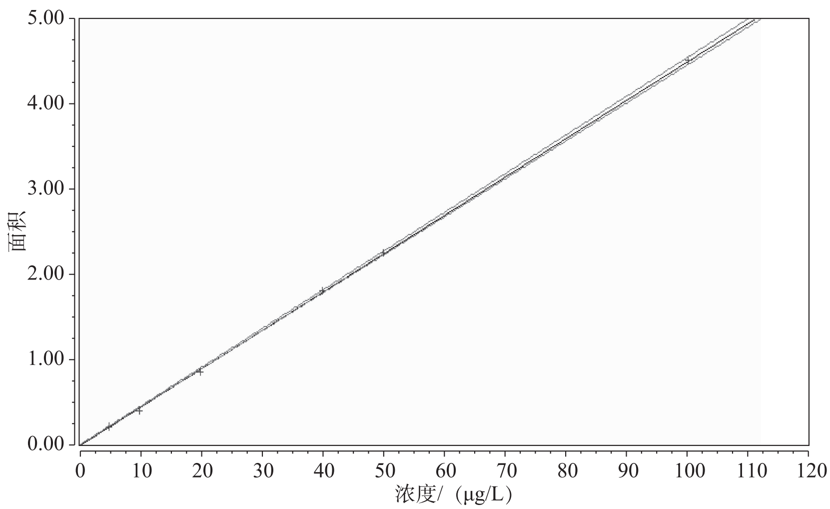


图 9　加标白葡萄酒中纳他霉素的校准曲线

($R^2=0.9999$)

2.2.9　正确度和精密度

分别对加有纳他霉素标准物的白、桃红葡萄酒和红葡萄酒样品测定 5 次,对其正确度和可重复性进行评估,其结果如表 9 所示。

表 9　添加到白葡萄酒、桃红葡萄酒和红葡萄酒中纳他霉素检测结果汇总表

基质	在基体中的纳他霉素的含量/(μg/L)	添加纳他霉素含量/(μg/L)	测量的纳他霉素的含量/(μg/L)	回收率%	Z 值
白葡萄酒	未检出*	5.02	5.04	100.4	0.0
			4.70	93.6	−0.2
			5.12	102.0	0.1
			5.29	105.4	0.2
			4.97	99.0	0.0

表 9(续)

基质	在基体中的纳他霉素的含量/(μg/L)	添加纳他霉素含量/(μg/L)	测量的纳他霉素的含量/(μg/L)	回收率%	Z 值
		平均值	5.02	100.1	
		标准差	0.22		
		RSD/%	4.3		
		重现性 *r*	0.85		
桃红葡萄酒	未检出*	5.02	4.79	95.4	−0.1
			4.83	96.2	−0.1
			4.76	94.8	−0.1
			4.79	95.4	−0.1
			4.73	94.2	−0.2
		平均值	4.78	95.2	
		标准差	0.04		
		RSD/%	0.78		
		重现性 *r*	0.15		
红葡萄酒	未检出*	5.02	4.61	91.8	−0.2
			4.65	92.6	−0.2
			4.89	97.4	−0.1
			4.67	93.0	−0.2
			4.34	86.5	−0.4
		平均值	4.63	92.3	
		标准差	0.20		
		RSD/%	4.2		
		重现性 *r*	0.77		
红葡萄酒	未检出*	21.2	19.73	93.1	−0.2
			20.66	97.5	−0.1
			21.16	99.8	0.0
			19.73	93.1	−0.2
			19.58	92.4	−0.3
		平均	20.17	95.2	
		标准差	0.70		
		RSD/%	3.5		
		重现性 *r*	2.7		

表 9(续)

基质	在基体中的纳他霉素的含量 μg/L	添加纳他霉素含量 μg/L	测量的纳他霉素的含量 μg/L	回收率%	Z 值
红葡萄酒	未检出[a]	53.2	51.84	97.4	−0.1
			51.91	97.6	−0.1
			51.42	96.7	−0.1
			50.12	94.2	−0.2
			50.62	95.2	−0.2
		平均值	51.18	96.2	
		标准差	0.78		
		RSD/%	1.5		
		重现性 r	3.1		

[a] 检出限 2.5 μg/L。

计算(表 1):

$$重复性限\ r = 标准差 \times t_{4,0.95} \times 2^{1/2}$$

$$Z\ 值 = (测定量 - 添加量)/目标物标准偏差^{*}$$

$$目标标准偏差 = 1/100 \times 添加量 \times 2^{(1-0.5\log 添加量)}$$

参 考 文 献

[1] DIN 32645:2008-11

[2] UV-und IR-Spektren wichtiger pharmazeutischer Wirkstoffe. Editio Cantor Aulendorf. 1978. Herausgeber/Editior Hans-Werner Dibbern in Zusammenarbeit mit E. Wirbitzki.

[3] Macarthur R. Feinberg M. Bertheau Y. 2010. Construction of measurement uncertainty profiles for quantitative analysis of genetically modified organisms based on interlaboratory validation data. Journal of the Association of Official Analytical Chemists. 93(3). 1046-1056.

[4] FV 1351. Dominic Roberts and Adrian Charlton. Determination of natamycin in wine by liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry: standard operating procedure and method performance data. OIV SCMA March 2010.

[5] FV 1355. TomaszBrzezina. Natamycin in Wein. OIV SCMA March 2010.

* 依据 Horwitz 理论。

邻苯酸二甲酯

1 适用范围

本法适用于葡萄酒中邻苯二甲酸酯类物质含量的测定。

2 原理

使用异己烷提取样品，采用蒸发法净化富集提取物。富集后的提取物通过氘代内标的气相-质谱方法进行分析测定。

3 试剂与材料

除另有说明外，全部所用试剂均为分析纯。

3.1 DMP 邻苯二甲酸二甲酯。

3.2 DnBP 邻苯二甲酸二丁酯。

3.3 DEHP 邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯。

3.4 BBP 邻苯二甲酸丁基苄基酯。

3.5 DINP 邻苯二甲酸二异壬酯。

3.6 DIDP 邻苯二甲酸二异癸酯。

3.7 DCHP 邻苯二甲酸二环己酯。

3.8 DEP 邻苯二甲酸二乙酯。

3.9 DiBP 邻苯二甲酸二异丁酯。

3.10 DnOP 邻苯二甲酸二正辛酯。

3.11 DMP-d4 内标。

3.12 DEP-d4 内标。

3.13 DiBP-d4 内标。

3.14 DnBP-d4 内标。

3.15 BBP-d4 内标。

3.16 DCHP-d4 内标。

3.17 DEHP-d4 内标。

3.18 DnOP-d4 内标。

3.19 异己烷、丙酮。

3.20 标准溶液：用于配制校准溶液的所有容量瓶必须先用丙酮再用异己烷冲洗，以防污染。

3.20.1 储备液

1 g/L 邻苯二甲酸酯单一溶液：分别称取 100 mg 各种邻苯二甲酸酯于 100 mL 容量瓶

中，用异己烷溶解并定容至刻度。

5 g/L DINP-DIDP 单一溶液：分别称取 500 mg DINP 和 DIDP 于 100 mL 容量瓶中，用异己烷溶解并定容至刻度。

0.5 g/L 内标单一溶液：氘代标准品包装在密封的 25 mg 安瓿瓶中。每一种内标都需将瓶内全部标准品转移至 50 mL 容量瓶中，并用异己烷定容至刻度。

3.20.2 工作液

1 mg/L 邻苯二甲酸酯工作液(S_1)：

从 1 g/L 和 5 g/L 邻苯二甲酸酯储备液(3.20.1)中各取 100 μL 至 100 mL 容量瓶中，并用异己烷定容至刻度。

10 mg/L 邻苯二甲酸酯工作液(S_2)：

从 1 g/L 和 5 g/L 邻苯二甲酸酯储备液(3.20.1)中各取 1 mL 至 100 mL 容量瓶中，并用异己烷定容至刻度。

10 mg/L 内标工作液(IS)

从 0.5 g/L 氘代标准品储备液(3.20.1)中各取 1 mL～50 mL 容量瓶中，并用异己烷定容至刻度。

3.20.3 标准曲线

将不同浓度异己烷工作液(3.20.2)，依照表 1 直接注入预先加热处理、冲洗干燥(详见 5.1)的进样瓶中，进行配制。

表 1

校准点	邻苯二甲酸酯浓度/(mg/L)[a]	S_1 体积/μL	S_2 体积/μL	IS 体积/μL	异己烷体积/μL
C1	0	0	0	50	1 000
C2	0.05	50	0	50	950
C3	0.10	100	0	50	900
C4	0.20	200	0	50	800
C5	0.50	0	50	50	950
C6	0.80	0	80	50	920
C7	1.00	0	100	50	900

[a] DINP 和 DIDP 浓度应乘以 5。

4 实验仪器

4.1 玻璃容器和体积量取仪器：

4.1.1 50 mL 和 100 mL A 级容量瓶。

4.1.2 50 mL 具塞玻璃离心管。

4.1.3 10 mL 具塞玻璃试管。

4.1.4 25 μL～1 000 μL 范围的微量移液枪，通过 ISO 8655-6 校正。

4.1.5 氮吹仪。

4.2 分析天平。

4.3 气相-质谱联用仪器(如 Varian 450GC-300 MS)。

5 步骤

5.1 预处理

——由于塑化剂可能存在于实验室环境中，所以必须预处理以排除相关化合物的干扰：

——尽可能避免和任何塑料器材接触(特别是软塑料 PVC)，必须确保其没有污染物。

——检测实验所使用的溶剂和溶剂瓶。

——对所有未标有刻度的玻璃器皿进行加热处理(在 400℃下至少烘 2 h)。

——(先用丙酮再用异己烷)小心冲洗所有器材。

——确保玻璃注射器的隔垫为非塑料材质。

——每次使用注射器之前和之后都需要冲洗若干次。

——在条件允许的情况下，在洁净的专用实验室里完成操作。

5.2 样品处理

——取 12.5 mL 样品于 50 mL 离心管中，并加入 10 mL 异己烷。

——振荡(用振荡器)至少 1 min。

——静置分层(用 50℃超声处理 30 min 可以加速分层)。取 8 mL 有机相并转移到 10 mL 试管中。在 35℃条件下进行氮吹(0.3 bar)，但避免吹干(提示：温度不能超过 40℃)。

——用异己烷定容至 1 mL，并在每个提取液中加入 50 μL 0.01 g/L 标准溶液作为内标，转移至进样瓶中待测。

注：例如十一酸甲酯可以在仪器分析的过程中作为保护剂加入浓缩样品中。在氮吹之前，分别加入 20 μL 到样品提取液和标准溶液中。

5.3 空白试验

按 5.2 描述的步骤，进行不加样品的空白对照实验的准备。

5.4 气质联用分析

根据气质联用仪器的性能，选择合适的图谱进行定性和定量。仪器分析条件见附录 A，特征色谱图见附录 B。

5.4.1 浓度计算

——首先，先将溶剂进样几次(至少 2 次)。其次，标准样品重复进样几次(3.20.3)来提高响应值，最后再使用溶剂至少进样两次。

——对每种塑化剂绘制标准曲线：

——$(A_{样品}/A_{IS})=f(c_{样品}/c_{IS})$。

其中：

A——峰面积；

c——浓度；

IS——内标。

——每一种邻苯二甲酸酯需要用相对应的标准品定量，此外，DINP 和 DIDP 用 DnOP-d4 定量。

5.4.2 样品分析

从空白对照实验(5.3)开始建立进样序列并分析。然后重复进样(5.2)2 次，高浓度样品进样后，使用溶剂清洗进样针。

结束序列进样后，至少使用标准溶液进样一次，以检验信号漂移和进样器的状况。

计算每一次进样的目标峰和内标的峰面积，并代入标准曲线(5.4.1)中计算出提取物样品的浓度。

5.4.3 结果表示

计算出每个样品两次进样结果的平均值，并用 mg/L 表示。

6 质量控制

在每一次样品分析中，根据红酒样品标准中塑化剂限量值 0.020 mg/L 进行质量控制。

5.2 中所准备的样品提取物在进样序列中最先进行检测，检测结果和回收率都需要在质量控制表格中反映出来。

7 方法特性

在实验室中完成的分析实验需要具有良好的重复性和再现性，红葡萄酒和白葡萄酒中的塑化剂限量值分别为 0.040 mg/L 和 0.080 mg/L。重复性(CV_r)、重现性(CV_{IP})和回收率的值如表 2 所示：

表 2

邻苯二甲酸酯	回收率/%	重复性/%	重现性/%
DMP 邻苯二甲酸二甲酯	67	5	8
DEP 邻苯二甲酸二乙酯	84	8	11
DiBP 邻苯二甲酸二异丁酯	93	7	10
DnBP 邻苯二甲酸二丁酯	95	5	7
BBP 邻苯二甲酸二异丁酯	98	5	6
DCHP 邻苯二甲酸二环己酯	97	5	7
DEHP 邻苯二甲酸二环己酯	98	6	7
DnOP 邻苯二甲酸二正辛酯	98	6	7
DINP 邻苯二甲酸二壬酯	104	7	8
DIDP 邻苯二甲酸二异癸酯	96	8	11

以下是上述全部邻苯二甲酸酯的平均值：

重复性：(CV_r)：6%。

中间重现性：(CV_{IP})：8%。

8 检出限及定量限

测定每一种邻苯二甲酸酯的检测限及定量限，如表 3 所示：

表 3

邻苯二甲酸酯	定量限/(mg/L)	检出限/(mg/L)
DMP 邻苯二甲酸二甲酯	0.010	0.004
DEP 邻苯二甲酸二乙酯	0.010	0.004
DiBP 邻苯二甲酸二异丁酯	0.010	0.004
DnBP 邻苯二甲酸二丁酯	0.010	0.004
BBP 邻苯二甲酸二异丁酯	0.010	0.004
DCHP 邻苯二甲酸二环己酯	0.010	0.004
DEHP 邻苯二甲酸二环己酯	0.010	0.004
DnOP 邻苯二甲酸二正辛酯	0.010	0.004
DINP 邻苯二甲酸二壬酯	0.050	0.020
DIDP 邻苯二甲酸二异癸酯	0.050	0.020

附 录 A
邻苯酸二甲酯类气相/质谱联用测定条件

A.1 气相色谱条件

VF-5 ms 色谱柱:30 m×0.25 mm 内径,0.25 μm 涂层厚度。

升温程序:

100℃保留 1 min;10℃/min 升温速率升到 230℃;继续以 10℃/min 升温速率升到 270℃;保留 2 min,25℃/min 升温速率升到 300℃;保留 8 min。

注:此程序可将 DEHP 和 DCHP 峰分离开(但在 MRM 模式过程无用)。

MRM 模式升温程序:柱温箱 80℃保留 1 min;以 20℃/min 升温速率升到 200℃;以 10℃/min 升温速率升到 300℃;保留 8 min。

进样口:150℃保持 0.5 min;不分流模式下,以 200℃/min 升温速率升到 280℃。

氦气流速:1 mL/min 恒流模式。

进样量:1 μL。

A.2 质谱条件

离子源:EI 模式下 70eV。

离子源温度:250℃。

传输线温度:300℃。

分流阀温度:40℃。

邻苯二甲酸酯定量和定性选择离子。

在 SIM 模式下,表 A.1 提供了每种邻苯二甲酸酯以及其氘代同位素的定量离子和两种定性离子。

在 MRM 模式下,表 A.2 表示了每种提供了每种邻苯二甲酸酯以及其氘代同位素的定量和定性离子转化率。

注:DIDP 和 DINP 是一种混合物,色谱不能完全分离它们,所以它们作为一个组分标注。

表 A.1

名称		定量离子 m/z	定性离子 m/z	
中文名称	英文名称		1	2
邻苯二甲酸二甲酯	DMP	163	77	194
	DMP-d4	167	81	198
邻苯二甲酸二乙酯	DEP	149	177	222
	DEP-d4	153	181	226
邻苯二甲酸二异丁酯	DIBP	149	167	223
	DIBP-d4	153	171	227
邻苯二甲酸二丁酯	DnBP	149	205	223
	DnBP-d4	153	209	227

表 A.1(续)

名称		定量离子 m/z	定性离子 m/z	
中文名称	英文名称		1	2
邻苯二甲酸丁基苄基酯	BBP	149	91	206
	BBP-d4	153	95	210
邻苯二甲酸二环己酯	DCHP	149	167	249
	DCHP-d4	153	171	253
邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯	DEHP	149	167	279
	DEHP-d4	153	171	283
邻苯二甲酸二正辛酯	DNOP	149	167	279
	DNOP-d4	153	171	283
邻苯二甲酸二壬酯	DINP	149	293	
邻苯二甲酸二异癸酯	DIDP	149	307	

表 A.2

名称		定量离子 m/z	定性离子 m/z
中文名称	英文名称		
邻苯二甲酸二甲酯	DMP	194>163	194>77
	DMP-d4	198>167	198>81
邻苯二甲酸二乙酯	DEP	177>149	177>93
	DEP-d4	181>153	181>97
邻苯二甲酸二异丁酯	DIBP	223>149	205>149
	DIBP-d4	227>153	209>153
邻苯二甲酸二丁酯	DnBP	223>149	205>149
	DnBP-d4	227>153	209>153
邻苯二甲酸丁基苄基酯	BBP	206>149	149>121
	BBP-d4	210>153	153>125
邻苯二甲酸二环己酯	DCHP	249>149	249>93
	DCHP-d4	253>153	253>97
邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯	DEHP	279>149	279>93
	DEHP-d4	283>153	283>97
邻苯二甲酸二正辛酯	DNOP	279>149	279>93
	DNOP-d4	283>153	283>93
邻苯二甲酸二壬酯	DINP	293>149	
邻苯二甲酸二异癸酯	DIDP	307>149	

参考文献

[1] FV 1371. Detection and assay of phthalates in alcoholic beverages. 2011.
[2] FV 1234. Questions about phthalates. 2006.

第4章 微生物检验

方法 OIV-MA-AS4-01　　方法类型Ⅳ

微生物检验

(Oeno 206-2010)

【目的】

微生物学检验的目的是跟踪酒精发酵和/或苹果酸-乳酸发酵中微生物的进程，不仅针对成品的检验还包括对各生产环节中出现的各种异常情况的监测。

注：所有实验必须使用灭菌的器具在微生物常用的无菌条件下进行。靠近本生火焰灯或者在洁净的超净台中，将移液管、试管、烧瓶等器具的开口用火焰稍微烧烤进行消毒。在进行微生物分析实验之前，必须确保正确取样。

【适用范围】

微生物分析适用于因细菌活动而改变的葡萄酒、葡萄汁、蜜甜尔和所有同类的产品。这些方法也可以用于特定微生物工业制剂的分析，如活性干酵母和乳酸菌。

1 试剂和材料

常用的实验室仪器和设备，如标准 ISO 7218：2007《食品和动物饲料中的微生物　微生物学检验通则》所列出的设备名单。

建议使用以下的试剂和材料：

——常规的无菌实验室材料和玻璃器具(已消毒的或者准备消毒的)；

——16 mm×160 mm 或者类似规格的试管，可容纳 9 mL 无菌蛋白胨水(蛋白胨含量：1 g/L)或用于样品连续稀释的其他稀释液；

——乙醇消毒过的接种环和镊子；

——3%过氧化氢溶液；

——微量移液器的无菌吸液头：1 mL 和 0.2 mL；

——L 型或者三角形的玻璃或塑料涂布棒；

——带平直边的不锈钢镊子；

——独立包装的无菌纤维素滤膜(或同类产品)，孔径 0.2 μm 和 0.45 μm，滤膜直径 47 mm或者 50 mm；

——无菌量筒；

——10 mL 的无菌吸管。

2 设备和仪器

常用的实验室仪器和设备，如标准 ISO 7218：2007《食品和动物饲料中的微生物　微生

物学检验通则》所列出的设备名单。

建议使用以下设备：

——微生物无菌室或者超净工作台。如没有，可靠近煤气灯(50 cm 内)操作；

——天平，精确度±0.01 g；

——高压蒸汽灭菌器；

——培养箱，温度范围为 25℃～37℃；

——pH 计，精确度为±0.1 pH，最小刻度为±0.01 pH；

——冰箱，温度设定在 5℃±3℃；冷冻柜，温度设定应低于－18℃，最理想温度能达到－24℃±2℃；

——恒温水浴箱，温度设定为 45℃±1℃；

——微波炉；

——光学显微镜；

——煤气灯；

——菌落计数仪；

——厌氧培养设备(配有厌氧发生器的密封罐)；

——可使用 47 mm 或者 50 mm 滤膜直径的过滤器；

——涡旋振荡器或者同类产品；

——干热灭菌培养箱；

——离心机；

——真空泵。

3 取样

取样必须具有代表性。为得到容器底部的微生物，取样前应尽可能将样品摇匀。如果难以将实验样品摇匀，应从微生物最可能存在的位置抽取样品(如检测酵母菌，应抽取容器底部的样品)，但在此情况下，结果不能用于定量。在打开塞子抽取样品前，容器开口处必须用火烤一下消毒，并且先放掉 2 L～3 L 的样品。抽取的样品必须放置在无菌容器中。

抽取的样品必须冷冻保存并尽快检验分析。

微生物学检验需要以下数量样品：

存样的葡萄汁、发酵的葡萄汁或者葡萄酒，不少于 250 mL；

瓶装或者有包装的葡萄酒，不论容器大小，不少于 1 个独立包装。

4 质量检测

4.1 目的

目的在于提前预测微生物污染的风险。

4.2 原理

由于一定的通风和温度条件影响会引起微生物的活动，从而导致葡萄酒的一些感官变化(浑浊、酒膜、沉淀、颜色异常)，可通过显微镜观察来确定其特性变化。

4.3 操作方法

4.3.1 自然条件下的稳定性实验

将 50 mL 的酒样用无菌滤纸粗滤后放置于一个用棉花封口的 150 mL 无菌锥形瓶中，室温条件下至少放置 3 d，然后观察澄清度、颜色和可能出现的浑浊、沉淀和酒膜。当出现浑浊、沉淀、酒膜或颜色变化时用显微镜进行观察。

4.3.2 培养箱条件下的稳定性实验

将 100 mL 的酒样经过无菌滤纸过滤后放置于用棉花封口的 300 mL 无菌锥形瓶中，置于 30℃的培养箱至少培养 72 h，如出现感官特性的变化应使用显微镜观察。

5 微生物的检测、鉴别和酵母菌的直接计数

5.1 液体或沉淀物的显微镜检验

5.1.1 目的

通过使用显微镜观察大小和形状，可将酵母从细菌中区分和鉴别出来。但显微镜观察不能区分微生物是死是活。

注：通过适当的染色（见下述），可估算出活酵母数目。

5.1.2 原理

通过显微镜的放大作用可观察到大小以微米计算的微生物。

操作方法：

液体或者沉淀物可直接用显微镜观察。当微生物细胞数量足够多（多于5×10^5 个/mL）时才可直接观察。

当酒样只含有较少的微生物数量，则需要将样品浓缩。可将 10 mL 均质后的酒样以 3 000 r/min～5 000 r/min 的速度离心 5 min～15 min。弃去上清液，将沉淀物与留在离心管底部的液体混匀。

用巴斯德吸管吸取一滴液体样品或用无菌的金属丝挑取混匀的沉淀物于干净的载玻片上。盖上盖玻片并置于显微镜载物台上。选择一个清晰的视野或较好的对比度，采用 400～1 000 的放大倍数，可得到更好的观察结果。

5.2 革兰氏染色区分菌落中分离得到的细胞（详见第 6 节）

5.2.1 目的

革兰氏染色可用于区分乳酸菌细胞（革兰氏阳性）和醋酸菌（革兰氏阴性）以及观察它们的形态。

注：不能只根据革兰氏染色结果下结论，因为除了乳酸菌和醋酸菌之外还可能存在其他细菌。

5.2.2 原理

革兰氏染色的原理是根据细胞的结构和化学构成的多样性区分阳性菌和阴性菌。革兰氏阴性菌的细胞壁富含脂肪类而含有很少的肽聚糖，这使得酒精能够进入内壁，溶解龙胆紫-碘的混合物，从而使细胞呈现无色状态，然后用蕃红复染红。相反，革兰氏阳性菌的内壁富有肽聚糖而脂类很少，因此，富有肽聚糖的内壁和酒精的脱水作用使得酒精不能进入细胞，从而使细胞保留了龙胆紫-碘的混合物所形成的紫色或者深蓝色。

如果培养时间过长，革兰氏染色就失去了意义。因此，染色对象是从菌落和液体培养基

中分离出来，培养 24 h～72 h 正处于对数生长期的菌株。

5.2.3 **实验用水**（必须是蒸馏水）

5.2.3.1 龙胆紫溶液

制备：称取 2 g 龙胆紫（或结晶紫）于 100 mL 锥形瓶中，加入 20 mL 95％的酒精溶解。称取 0.8 g 草酸铵于 80 mL 蒸馏水中溶解。将两溶液混合并于 24 h 后使用。每次使用前用滤纸过滤，于棕色瓶中避光保存。

5.2.3.2 路戈氏溶液

制备：称取 2 g 碘化钾溶于少量水（4 mL～5 mL）中并加入 1 g 碘溶解于此饱和溶液中，加蒸馏水至 300 mL，于棕色瓶中避光保存。

5.2.3.3 蕃红溶液

制备：称取 0.5 g 蕃红于 100 mL 锥形瓶中，加入 10 mL 95％的酒精和 90 mL 蒸馏水，混匀，于棕色瓶中避光保存。

5.2.4 **操作方法**

5.2.4.1 涂片准备

将固体或液体培养基中细菌进行接种。用接种环或金属丝挑取新鲜的培养物（液体培养液离心后）或直接从固体培养基中挑取，与一滴无菌水混匀。

将一滴悬浮微生物放在载玻片上，使其变干，然后将载玻片快速通过本生灯 3 次或采用其他类似做法使其固定。待冷却后，进行染色。

5.2.4.2 染色

在固定好的涂片中滴加几滴龙胆紫溶液，2 min 后用蒸馏水冲洗干净。

加入 1～2 滴路戈氏溶液，30 s 后用蒸馏水冲洗干净并用滤纸吸干。

加入 95％酒精，15 s 后用蒸馏水冲洗干净并用滤纸吸干。

加入几滴蕃红溶液，10 s 后洗去并用滤纸吸干。

加入一滴镜油，调整油镜，选择一个清晰的视野观察结果。

结果：乳酸菌（革兰氏阳性菌）呈紫色或蓝黑色。醋酸菌（革兰氏阴性菌）呈红色。

5.3 **触酶实验**（详见第 6 节）

5.3.1 **目的**

区分醋酸菌和乳酸菌。酵母和醋酸菌为触酶阳性，乳酸菌则为触酶阴性。

注：不能只根据触酶结果下结论，因为除了乳酸菌和醋酸菌之外还会存在其他的细菌。

5.3.2 **原理**

需氧细菌有分解过氧化氢释放氧气的特性：

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{触酶}} 2H_2O+O_2$$

5.3.3 **试剂**

3％过氧化氢溶液。

制备：吸取 10 mL 30％过氧化氢于 100 mL 的定容瓶中，添加刚煮沸后的无菌蒸馏水至刻度。摇匀并在棕色瓶中低温避光保存。溶液需现配现用。

5.3.4 **操作方法**

在玻片上滴加一滴 3％的过氧化氢溶液并加入一点新鲜的菌液。如果有气体释放出来，

表明培养液中含有过氧化氢酶。有时很难立即清晰地观察到有气体释放，尤其当有菌落存在的时候。建议此时通过显微镜观察结果(10 倍目镜)。

5.4 酵母细胞计数——血球计数器

5.4.1 范围

在发酵的葡萄汁、葡萄酒和活的干酵母中确定酵母细胞数目。需要一定浓度的细胞液，至少有 5×10^6 个/mL。发酵的葡萄汁和葡萄酒可直接计算细胞数目，活的干酵母则需要稀释 1 000 倍或 10 000 倍后计算。葡萄汁或葡萄酒含有较少酵母细胞时需要离心(3 000 g，5 min)后，用一定体积的液体重新混匀沉淀物。

5.4.2 原理

滴一滴酵母悬浮液于带有计数室的载玻片上。计数室具有一定的计数体积，其表面被划分成正方形的小格子。计数需在显微镜光场下进行。如果细胞被染色，相差将不能显示出来。

5.4.3 试剂和材料

血细胞计数器，双计数室，最好带有盖玻片，如 Bürker、Thoma、Malassez、Neubauer 等类型。

血细胞计数器的盖玻片：普通的盖玻片(宽度 0.17 mm)容易弯曲变形，不能保证计数室宽度恒定，不适用于此仪器。

1 mL 和 10 mL 的移液管、吸液头。

100 mL 的容量瓶。

250 mL 的烧杯。

5.4.4 设备

带明视野的显微镜，放大倍数 250～500，禁用相差。

磁盘和搅拌棒。

血细胞计数器可配备 Bürker、Thoma、Malassez、Neubauer 等不同的计数室。确定好使用的计数室计算体积。Bürker、Thoma 和 Neubauer 的计数室深度为 0.1 mm，Malassez 则深 0.2 mm。

Thoma 计数室中间有 1 个面积为 1 mm^2 的大正方形，因此计算体积是 0.1 mm^3(10^{-4} mL)。此大正方形被平均分成 16 个中正方形，然后每个中正方形再进一步分成 16 个小正方形。每个小正方形大小为宽 0.05 mm×0.05 mm，深 0.1 mm，因此每个小正方形的体积为 0.000 25 mm^3(25×10^{-8} mL)。用中正方形进行计数也是可行的，每个中正方形有 16 个小正方形，边长 0.2 mm×0.2 mm，面积为 0.004 mm^2 或者体积为 4×10^{-6} mL。

Bürker 计数室包括有 9 个大小为 1 mm^2 的正方形，每个正方形又被 0.05 mm 间隔的双线细分为 16 个边长为 0.2 mm 的中正方形，此中正方形的面积为 0.04 mm^2，体积为 0.004 mm^3。用双线分隔而成的小正方形面积为 0.025 mm^2。

Neubauer、Thoma 和 Bürker 计数室的大中小正方形面积都是统一的。Bürker 计数室的中正方形没有其他分割线，因此比较容易进行计数。

5.4.5 检验技术

计数室和盖玻片在使用前必须保持清洁和干燥。计数室未清洁干净会影响样品的体积，因此需将计数室擦洗干净。可用软化水或者酒精清洁并用软纸或布吸干。

如果需要将絮状酵母一起计数，选择 0.5% 的硫酸作为悬浮液基质可避免絮状产生，但可能会影响亚甲基蓝染色以及活细胞和死细胞计数。可通过超声处理进行再悬浮。

用吸液管吸取样品到载玻片上，按照以下两步骤完成。

步骤 1

将酵母悬浮液混匀，如果需要稀释，通常采用十倍稀释。如果采用亚甲基蓝染色，则选取样品的最高稀释度进行染色，将 1 mL 样品于 1 mL 亚甲基蓝溶液混匀。不断摇动酵母悬浮液。用吸液管吸取样品，排掉前面的 4～5 滴悬浮液并在载玻片的两个计数区各滴一滴悬浮液（如有必要，可对样品进行稀释），20 s 内盖上盖玻片并压紧。计数区域将被液体完全充满，但无液体溢出边缘。

步骤 2

盖好盖玻片确保两个计数室都能覆盖。用夹子将盖玻片压紧计数室，直到出现彩虹色线（牛顿环）。

不断摇动酵母悬浮液。用吸液管吸取一点样品，排掉前面的 4～5 滴样品，滴一滴样品在血球计和盖玻片中间流动。在玻片的另一边采用同样的操作。计数区域应被液体完全充满，但无液体溢出边缘。

加样好的玻片停留 3 min，让酵母细胞沉淀，然后放置显微镜下观察。

每个视野计算 10 个中方格，必须按标准程序操作，避免同一个方格被计算两次。对于接触或者静止在顶部或者右边边缘的细胞不计算在内，静止在底部或者左边边缘的细胞则计算在内。带孢子的酵母细胞，如果芽孢体积小于母体细胞的一半，按照一个计算，否则两个细胞一起计算。

为得到准确的细胞数目，建议选择平均 200～500 个细胞进行计算。玻片的两边计数数目相差应少于 10%。如果对样品进行了稀释，稀释系数在计算时需考虑进去。

5.4.6　结果表述

如果 C 是一个 0.2 mm 边长的中方格细胞计数的平均数，则样品细胞总数 T 为：

表述单位为细胞/mL：$T=C\times0.25\times10^6\times$稀释因子

如果 C 是一个 0.05 mm 边长的小方格细胞计数的平均数，则样品细胞总数 T 为：

表述单位为细胞/mL：$T=C\times4\times10^6\times$稀释因子

5.5　酵母细胞计数——酵母的亚甲基蓝染色

5.5.1　范围

该方法可快速估算活酵母细胞的百分率，活酵母没有被染色，而死细胞呈现蓝色。除了含糖量大于 10 g/L 的葡萄汁样品，该方法可适用于所有含有酵母的样品。细菌细胞太小，采用该方法染色看不到。

注：选择良好的焦距可看到不同的深度，便于观测亚甲基蓝着色。

5.5.2　原则

活酵母细胞的还原活性可将亚甲基蓝转换成无色衍生物。死酵母细胞将被染成蓝色。

已知活细胞数目和总细胞数目可计算出活细胞的比率。当活细胞数少于 80% 时，该方法由于无法区分活细胞及其繁殖能力（活的但不可培养的细胞），从而将高估真正有活力的细胞数。

如果糖分浓度高于 100 g/L，大部分细胞将呈淡蓝色，不建议使用该方法。

如果葡萄酒具有较低的 pH 和很强的缓冲性，染色不能正常进行。此时候必须使用至少十倍稀释后的溶液进行计数。

5.5.3 试剂和材料

溶液 A：亚甲基蓝蒸馏水溶液，0.5 g/500 mL。

溶液 B：KH_2PO_4 蒸馏水溶液，13.6 g/500 mL。

溶液 C：$Na_2HPO_4 \times 12H_2O$ 蒸馏水溶液，2.4 g/100 mL。

溶液 D：498.75 mL 溶液 B+1.25 mL 溶液 C。

溶液 E：将 500 mL 溶液 D 和 500 mL 的溶液 A 混匀成最终的亚甲基蓝缓冲溶液，调节 pH 至 4.6。

5.5.4 装置和设备

显微镜，放大倍数 250～500。禁用相差。

显微镜的载玻片和盖玻片，或者血细胞计数器（Thoma，Bürker 或 Neubauer chamber）。

试管和搅拌棒。

移液管和吸液头。

5.5.5 实验技术

活细胞计数

在一试管中用亚甲基蓝溶液稀释酵母悬浮液，直到显微镜视野下的悬浮液含有大约 100 个酵母细胞为止。吸取一小滴混合好的悬浮液于载玻片上并盖上盖玻片。在 10 min 内用 400 的放大倍数仔细观察染色。

计算总共 400 个细胞（T），标注蓝色细胞的数目（C），包括死的、破碎的、干瘪的和已经质壁分离的细胞。对带芽孢的酵母细胞计数，如果芽孢体积小于母细胞的一半，则计算为 1 个细胞。如果芽孢体积大小等于或者大于母细胞的一半，则两者都计数。呈淡蓝色的细胞应视为活细胞。

5.5.6 结果表述

如果 T 为总细胞数，C 代表蓝色细胞数目，则活细胞百分数为：

$$活细胞百分数=\frac{T-C}{T}\times 100$$

6 微生物的培养计数

目的：通过培养计算微生物数量评估样品受污染的程度，换言之，估算活的微生物数量。根据使用的培养基和培养条件，有 4 种微生物可以计数，即酵母、乳酸菌、醋酸菌和霉菌。

原理：根据微生物在营养培养基和适宜的培养条件下生长形成菌落，从而进行计数。在固体培养基中一个细胞可繁殖为一簇肉眼可见的细胞，即菌落。

6.1 微生物的鉴定、鉴别和计数（平板计数）

6.1.1 范围

此标准为活酵母、霉菌、乳酸菌和醋酸菌的计数通则，通过对适宜的培养条件下在固体培养基中生长的菌落进行计数，适用于生产过程中或者瓶装后的葡萄汁、浓缩葡萄汁，特别是发酵葡萄汁、葡萄酒（包括起泡葡萄酒）。对微生物进行分析的目的在于对酿酒过程的品

质控制和防止葡萄汁或葡萄酒中的微生物腐败。

6.1.2 术语和定义

术语中“平板”和“有盖培养皿”相同。

CFU 为菌落形成单位。

6.1.3 方法

葡萄汁或者葡萄酒中活的微生物数量检测，是将已知一小体积的样品分散在培养基表面或者将样品以渗入法加入培养基中(见 6.1.7.4)，并将平板以适宜微生物生长的条件培养一定时间计算所得。每个细胞或者一堆细胞，聚集成簇成为肉眼可见的菌落。在平板表面形成的菌落数量代表原始样品中的细胞数量。因此，结果可表述为“每单位体积所含细胞数目(CFU)”。如果样品中的细胞数量多，则进行连续的十倍稀释以使每个平板获得的菌落数量范围在 10～300 之间。如果样品中单位体积细胞数量低，可用 0.45 μm～0.88 μm 的无菌滤膜(酵母用 0.22 μm，细菌用 0.45 μm)将细胞富集，然后置于培养基表面中培养。

此方法的计数范围是原始样品中细胞数目＜1 CFU/测试体积～10^9 CFU/mL 或 10^{10} CFU/g。

6.1.4 试剂和材料

如第 1 节所述的材料，以及：

——(16 mm×160 mm 或同类)试管，装有 9 mL 无菌蛋白胨水(蛋白胨：1 g/L)或用于样品连续稀释的其他稀释液(附录 D)。不同样品所需的试管数量建议如下：

不发酵葡萄汁：4 管/样品；

发酵葡萄汁：7 管/样品；

贮藏的葡萄酒：2 管/样品；

灭菌微量吸液头：1 mL 和 0.1 mL；

L 型或者三角形的弯曲玻璃棒或塑料涂布棒。

倾注平板法：使用直径为 90 mm 的培养皿(56 cm^2)，倾注 15 mL～20 mL 生长培养基；膜过滤法：提前 18 h～24 h 于直径为 90 mm 或者 60 mm 的培养皿中倾注 15 mL～20 mL 的培养基，然后在培养基表面再倾注 6 mL～8 mL 的生长培养基(每个测试样品做 1～2 个平板)。

酵母菌计数：采用 YM、YEPD、WL 营养琼脂、YM 琼脂或 TGY 琼脂。如果检测非酿酒酵母，可用赖氨酸琼脂和 WL 琼脂平板(附录 E，培养基)或等效的培养基。

醋酸菌计数：采用 GYC 琼脂、G2 或者 Kneifel 培养基(附录 E，培养基琼脂)或等效的培养基。

乳酸菌计数：采用 MRS 加 20%番茄(或苹果、葡萄)汁、改良的 ATB 琼脂(酒类酒球菌培养基)、TJB 加琼脂、MTB 琼脂(附录 E，培养基)或等效的培养基。

丝状真菌计数：采用改良察氏琼脂、DRBC 琼脂或 MEA 加四环素(100 mg/L)和链霉素(100 mg/L)(附录 E，培养基)或等效的培养基。

加入抗生素的目的是为了选择性计数，因为葡萄酒中所有微生物都混合在一起(见附录 A，培养基)。

6.1.5 装置及设备

参考 5.2 中的装置和设备。

6.1.6 **取样**

参考 5.3 中的方法取样。

需要如下样品数量进行平板计数：

葡萄汁、发酵葡萄汁或储藏葡萄酒：不少于 250 mL；

瓶装或包装葡萄酒：无论容量，不少于一个单位。

6.1.7 **检测技术**

6.1.7.1 准备要求

测试中要用到的所有材料和设备都必须经过灭菌，并且整个操作过程都必须在无菌条件下进行。

超净工作台必须在使用前 5 min 打开使其保持无菌和稳定的气流。

6.1.7.2 灭菌

培养基必须在 121℃下高压蒸汽灭菌至少 15 min(大样品 20 min)。一次性的灭菌材料和玻璃器皿必须在超净工作台上打开和使用。接种环和镊子使用前必须用酒精灯火焰灭菌。不锈钢漏斗在每次使用后都必须酒精火焰灭菌，玻璃和聚碳酸酯漏斗用前必须高压蒸汽灭菌，因此，这些漏斗必须和测试样品在同一批次下使用。

6.1.7.3 样品稀释(附录 A)

用移液管吸取 1 mL 样品到已灭菌的 9 mL 蛋白胨水试管中，用漩涡震荡仪搅拌 20 s。这是第一次(十倍)稀释，再从中移取 1 mL 到下一个 9 mL 的无菌蛋白胨水试管中进行第二次稀释。摇晃 20 s，如有需要，可重复操作稀释步骤。

以下样品所需连续稀释的次数如下：

未发酵的葡萄汁：4 次(十倍稀释)；

发酵葡萄汁：7 次(十倍稀释)；

老化时未过滤的葡萄酒(酵母计数)：2 次(十倍稀释)；

老化时未过滤的葡萄酒(乳酸菌计数)：6 次(十倍稀释)；

过滤葡萄酒或包装(瓶装)葡萄酒：不稀释；

浓缩葡萄汁：将 10 mL 样品稀释到 100 mL 蛋白胨水中(或 100 mL 到 1000 mL 中)，稀释到蛋白胨水中的瓶装或过滤葡萄酒及浓缩葡萄汁用膜过滤技术进行分析。

6.1.7.4 倒板

必要的连续稀释是为平板计数作准备。如果平板计数的菌落数太多，可以使用多次连续稀释，但所有稀释必须在 20 min 内完成平板倾注。

将每个平板吸取 0.1 mL 或 0.2 mL3 个最低稀释度的稀释液进行培养，如下：

未发酵葡萄汁　稀释 2 倍；3 倍；4 倍。

发酵葡萄汁　稀释 5 倍；6 倍；7 倍。

老化时未过滤膜葡萄酒　稀释 0 倍；1 倍；2 倍。

在高稀释倍数下培养不一定比低稀释倍数好。

在无菌条件下(最好在超净工作台下进行)将样品在其液体被吸收前(通常在 1 min～2 min内)用无菌带三角形玻璃棒或一次性棒涂布到培养基表面。一个单独的“曲棒”必须用于每个样品从最高稀释度的平板开始涂布，直到涂布最低稀释度。将平板在超净工作台中放置几分钟，直到液体完全被吸收。

注 1：与以往报道一样，将 0.2 mL 而不是 0.1 mL 稀释液涂布可以更容易扩散或延迟扩散。计算时必须考虑此点。

注 2：对于酵母菌计数，为避免细菌生长可在培养基高压灭菌后添加 50 mg/L 氯霉素（或经验证的等效抗生素），添加 150 mg/L 联苯（或经验证的等效抗生素）到培养基可避免霉菌的生长。

注 3：乳酸菌计数时，通过添加 0.1 g/L 的纳他霉素（游霉素）（或经验证的等效抗生素）来抑制酵母菌的生长，通过厌氧培养抑制醋酸菌的生长。

注 4：醋酸菌计数时，添加 0.1 g/L 的纳他霉素（游霉素）（或经验证后等效的抗生素）来抑制酵母菌的生长；添加 12.5 mg/L 的青霉素（或经验证后的等效抗生素）来抑制乳酸菌的生长。

抗生素在高压蒸汽灭菌后添加。

如果对非酿酒酵母进行特定的研究，按上述方法将稀释液接种到 3 个赖氨酸琼脂平板和 3 个 WL 特异琼脂平板上。

掺入法（替代方法）

制备装有 15 mL 培养基的试管并灭菌，将其置于 47℃±1℃的水浴（或经验证后等效的方式）中。

将 1 mL 的样品或稀释液倒入空的带盖培养皿中。

添加 15 mL 的液体培养基到带盖培养皿中并温和搅拌，使培养基内的微生物均匀分布。

将培养皿放置在冷凉平面上进行冷却，使琼脂凝固（琼脂的凝固时间不超过 10 min）。

6.1.7.5　膜过滤后浓度计数

酵母计数的膜孔隙必须是 0.45 μm 或 0.8 μm；细菌计数的膜孔隙为 0.2 μm 或 0.45 μm。膜表面最好带有交叉线，以便于菌落计数。

放膜的平板可以含琼脂营养培养基或一个分散有干基的衬垫，后者使用前必须用无菌水浸没衬垫。一些厂家会提供含无菌衬垫的无菌平板，该衬垫在使用前要用 2 mL 一次性的消毒液体培养基浸没。

无菌安装好过滤设备，按照 6.1.7.2 的方法对漏斗进行杀菌并连接到真空系统。

将接种环蘸少许酒精并灼烧：灼烧停止几秒后，用接种环将膜放在过滤装置的固定器上。

打开瓶子前，摇匀；用酒精上下擦渍瓶颈（1 cm～2 cm）并用火焰灭菌。

对每个样品进行 3 次取样计数：用 10 mL 无菌吸管吸取 10 mL 样品，用 100 mL 无菌圆柱吸管吸取 100 mL 样品，可能的话将剩余的样品直接从瓶中取出。将葡萄酒倒入漏斗中进行过滤。

当过滤得到所需数量的葡萄酒时，释放真空，火焰灼烧接种环，打开漏斗，用接种环将膜的反面边缘放在固体培养基平板上，将其紧密贴附在培养基表面，避免中间产生气泡。

6.1.7.6　样品培养

将平板倒置在 25℃±2℃需氧条件下对酵母菌或乳酸菌培养 4 d。如果温度＜23℃则延长培养 1 d，如果温度＜20℃则延长培养 3 d。最高温度不得超过 28℃。

在对酿酒酵母（或德克酵母）进行计数时，将培养时间增加一倍。

在对乳酸菌进行计数时，将平板置于厌氧瓶或袋中，在 30℃±2℃下倒置培养 10 d。如果温度＜28℃则延长培养 1 d，如果温度＜25℃则延长培养 3 d。最高温度不得超过 33℃。

6.1.8　结果表述

6.1.8.1　酵母菌落和细菌计数

对生长了 4 d 的酵母菌和醋酸菌进行计数（酿酒酵母或德克酵母为 8 d），乳酸菌则为 10 d，如有需要，可使用菌落计数仪。进行总酵母菌计数时可不考虑菌落的形态，当然，如有要求，也可考虑。

培养基和培养条件对菌株具有特异性，可以用肉眼观察到不同类型的微生物菌落。

6.1.8.2 结果计算

最可靠的结果是从含 10～300 个菌落的平板上进行计数（ISO 7218：2007《食品和动物饲料中的微生物　检验通则》）。

用以下公式计算样品中微生物数量的 N 值，结果为来自两个连续稀释度的两次计数的平均值。

$$N = \frac{\sum C}{V \times 1.1 \times d}$$

其中：$\sum C$—— 两连续稀释液平板上的菌落总数，两平板中至少有一个平板的菌落数不低于 10；

V—— 指接种到平板中的体积（mL）；

d—— 指相对第一次稀释的倍数（当液体样品未稀释时，$d = 1$）。

换句话说，如果连续倍数稀释的平板中含 10～100 个菌落，计算每个稀释液中的菌落数 CFU/mL，然后计算这两个值的平均数：即样品的 CFU/mL 值。如果两平行值相差很大，把较小值作为 CFU/mL 值。

只有在转换到 CFU/mL 时才能完成两个特征值的结果计算，并用数值 1.0～9.9 乘以适当的倍数 10 来表达结果（ISO 7218：2007《食品和动物饲料中的微生物　检验通则》）。

如果样品接种到双份稀释系列中，并且一或两个平板接种相同的含菌落的稀释液，计算平均菌落数并乘以稀释系数的倒数，来获得 CFU/mL 值。如果没有平板含 10～300 个菌落，且所有平板上的菌落数都大于 300，计算数量较少的那些平板。如果平板的菌落数少于 10 个/cm^2，对 12 个 1 cm^2 的方格进行计数并乘以平均数 56（90 mm 直径平板）。如果菌落更加密集，对 4 个 1 cm^2 的正方形进行计数并乘以平均数 56。将结果表达为“估测 CFU/mL”，无论何时都不要表达为 TNTC（多不可计）。

如果仅有的平板含菌落数在 4～10 之间，用通用方法进行计数，并表达为“估测 CFU/mL”。如果菌落数在 1～3 之间，结果的准确度就非常低，且结果要表达为“（目标微生物）检出但少于 $4 \times d$CFU/mL”。如果所有的样品稀释液平板上都没有菌落，将结果表达为“少于 $1/d$ CFU/mL”，此时要考虑到样品中抑制剂的影响。

当采取膜过滤技术时，结果表达的是滤过液中的菌落数，如 CFU/瓶，CFU/100 mL 或 CFU/10 mL。

6.1.9 测量不确定度

6.1.9.1 结果控制的标准

对每批培养基，用灭菌后的平板作无菌对照。测试过程的每一批培养基在操作过程中取其中一个培养基平板在超净工作台上打开，作为工作环境的无菌测试对照，并和其他接种平板一起培养。

定期将一个样品接种两次，实验的 K_p 可用如下公式进行计算：

$$K_p = \frac{|C_1 - C_2|}{\sqrt{C_1 + C_2}}$$

式中 C_1 和 C_2 是两次计数的结果。

如果 $K_p < 1.96 \approx 2.0$，则结果可以接受：将两次计数的平均值作为结果。

如果 $2.0 < K_p \leqslant 2.576 \approx 2.6$，则两次计数的差异处于临界状态，在将两次计数平均值作为结果前必须仔细评价。

如果 $K_p > 2.6$，则两次计数的差异异常，结果不被接受并需重复实验。在此情况下，实验室负责人必须核查自上一次获得可接受结果后的所有结果。

6.1.9.2 测量不确定度

如果可计数平板的菌落数少于10，结果可接受，但是菌落数分布应符合泊松分布。单个平板中估算菌落计数在95%置信水平下的测量不确定度见表1。

表1

菌落数	95%水平置信限		误差百分率*	
	下限	上限	下限	上限
1	<1	6	−97	457
2	<1	7	−88	261
3	<1	9	−79	192
4	1	10	−73	156
5	2	12	−68	133
6	2	13	−63	118
7	3	14	−60	106
8	3	16	−57	97
9	4	17	−54	90
10	5	18	−52	84
11	6	20	−50	79
12	6	21	−48	75
13	7	22	−47	71
14	8	24	−45	68
15	8	25	−44	65

* 与第1列细菌总数比较。

如果菌落数大于10，p 概率下的置信限可用如下公式计算：

$$C = C_i \pm K_{\mathrm{p}} \sqrt{C_i}$$

其中：C_i——平板中的菌落数；

K_{p}——包含因子。通常，包含因子为2或1.96。

C 值来自计数结果或者可用每个平板上的菌落数乘以稀释倍数计算得到。

6.2 液态培养——“最大可能数”(MPN)

6.2.1 目的

该技术是为了测定含有高浓度悬浮固体颗粒和/或高堵塞率的葡萄酒中活的微生物数量。

6.2.2 原理

该技术是基于样品中微生物的正态分布规律来估测液体培养基中活的微生物数量。

6.2.3 稀释液和液体培养基

见附录 D 和附录 E。

6.2.4 制备方法

制备几种定量和连续的稀释溶液，然后培养。部分实验中菌株不生长(阴性测试)，另外的则开始生长(阳性测试)。如果样品和稀释液是均匀的，且稀释倍数足够高，则可以用适当的表格对结果进行统计(表格根据 McCrady 概率计算)，并类推到原始样品。

6.2.5 稀释液制备

从摇匀的葡萄酒样品开始，制备一系列的 10 倍(1/10)稀释液。

在第一个试管中取 1 mL 的葡萄酒样品到 9 mL 的稀释液中，混匀。取 1 mL 的上述稀释液加入 9 mL 的稀释液到第二个试管中，继续该稀释方式直到获得最适浓度，该浓度是通过估计微生物数量来预测的，上述所有移取都采用无菌移液枪。稀释至无菌，即在较低的稀释浓度下，接近无菌。在最低的稀释浓度下应无菌落生长(附录 B)。

6.2.6 接种液的制备

接种 1 mL 的葡萄酒和 1 mL 制备好的稀释液，分别混合 3 支管，加入适当培养基(附录 E)，剧烈混合。

将接种后的试管在需氧条件下于 25℃培养箱中培养酵母菌(3 d，直至 10 d)，乳酸菌则在厌氧或微好氧条件下培养(8 d～10 d)，定期观察直到培养的最后一天。

6.2.7 结果

所有试管都有微生物生长并出现白色沉淀物，具有或多或少明显或显著的扰动被认为是阳性。结果必须通过显微镜观察来证实。应列明培养周期。

试管的读数是通过记录每 3 支试管(每一稀释浓度)组合中阳性或阴性试管的数目来确定的。例如，“3-1-0”表示：在 10^{0} 稀释倍数下有 3 支阳性试管，在 10^{-1} 稀释倍数下有 1 支阳性试管，在 10^{-2} 稀释倍数下无阳性试管。

当稀释次数超过 3 次时，所有结果中只有 3 个是有意义的，要选出可以进行“MPN”测定的结果，就必须根据下表中的例子来确定“典型数字”。

表 2

每一稀释度下阳性管数						典型数字
例	10	10	10	10	10	3-1-0
a	3	3	3	1	0	3-2-0
a	3	3	2	0	0	3-2-1
a	3	2	1	0	0	3-0-1

表 2(续)

每一稀释度下阳性管数						典型数字
例	10	10	10	10	10	3-1-0
a	3	0	1	0	0	3-2-3
b	3	2	2	1	0	3-2-3
b	3	2	1	1	0	3-2-2
c	2	2	2	2	0	2-2-2
d	0	1	0	0	0	0-1-0
例 a:选取所有管为阳性的最大稀释度以及其后的两个稀释度。 例 b:如果另外有阳性管的稀释度大于已选取的稀释度,则将该稀释度的阳性管加入上一稀释度。 例 c:如果无任一稀释度所有管为阳性,选取接下来出现阳性管的 3 个稀释度。 例 d:为出现少量阳性管的情况。选择典型数字以使阳性管稀释度出现在十位数(中间位置)上。						
注:改编自 Bourgeois,C. M. and Malcoste,R. *in*:Bourgeois,C. M. et Leveau,J. Y. (1991)。						

最大可能数(MPN)的计算

根据获得的典型数字,MPN 由表 A(附录 C)基于 McCrady 的概率计算决定,同时还要考虑稀释度。如果稀释系列是 10^{0}、10^{-1}、10^{-2},可以直接读数,如果稀释系列是 10^{1}、10^{0}、10^{-1},读数是该值的 0.1 倍。如果稀释系列是 10^{-1},10^{-2},10^{-3},读数则是该值的 10 倍。

注:如果需要提高灵敏度,可用 10^{1} 的葡萄酒。为了获得 1 mL 中的该浓度微生物,可将 10 mL 葡萄酒离心,取 1 mL 沉淀(移走 9 mL 多余的液体)并按前述方法进行接种。

6.2.8 结果的表述

葡萄酒中微生物的含量必须表述成每毫升样品中的细胞数,保留一位小数。如果含量低于 1.0 细胞/mL,结果可表述为“<1.0 细胞/mL”。

附　录　A
稀释液和接种液的制备

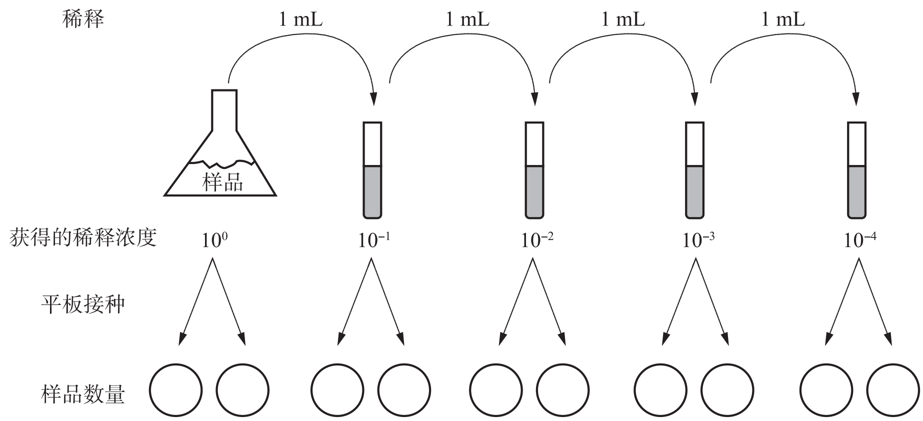


图 A.1

附　录　B
稀释液和接种液的制备

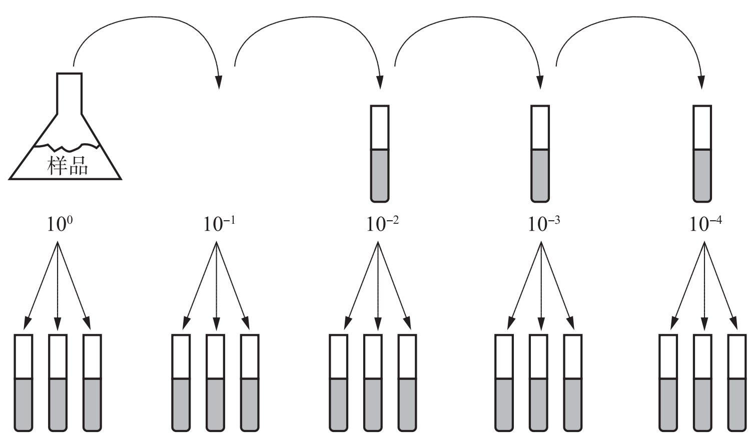


图 B.1

附　录　C
最大可能计数方法

表 C.1　1 mL 样品在 3 支试管(1 mL、0.1 mL、0.01 mL)中的最大可能数(MPN)

阳性管数				阳性管数				阳性管数			
1 mL	0.1 mL	0.01 mL	MPN 1 mL	1 mL	0.1 mL	0.01 mL	MPN1 mL	1 mL	0.1 mL	0.01 mL	MPN1 mL
0	0	0	0.0	2	0	2	2.0	1	1	1	7.5
0	0	1	0.3	2	1	0	1.5	3	1	2	11.5
0	1	0	0.3	2	1	1	2.0	3	1	3	16.0
0	1	1	0.6	2	1	2	3.0	3	2	0	9.5
0	2	0	0.6	2	2	0	2.0	3	2	1	15.0
1	0	0	0.4	2	2	1	3.0	3	2	2	20.0
1	0	1	0.7	2	2	2	3.5	3	2	3	30.0
1	0	2	1.1	2	2	3	4.0	3	3	0	25.0
1	1	0	0.7	2	3	0	3.0	3	3	1	45.0
1	1	1	1.1	2	3	1	3.5	3	3	2	110.0
1	2	0	1.1	2	3	2	4.0	3	3	3	>140.0
1	2	1	1.5	3	0	0	2.5				
1	3	0	1.6	3	0	1	4.0				
2	0	0	0.9	3	0	2	6.5				
2	0	1	1.4	3	1	0	4.5				
注:改编自“水和废水检测的标准方法”(1976)。											

附 录 D
稀 释 液

稀释液按照实例中的方法制备。所用水必须经过蒸馏、二次蒸馏或去离子化，不含痕量金属、抑制剂或其他抗生素类物质。

D.1 生理盐水

制备：称取 8.5 g 氯化钠到 1 000 mL 刻度瓶中。溶解后，加水定容。充分混合，过滤。移取 9 mL 到测试管中。塞上粗梳棉并在 121 ℃下高压蒸汽灭菌 20 min。

D.2 Ringer's 溶液

制备：称取 2.250 g 氯化钠、0.105 g 氯化钾、0.120 g 氯化钙（$CaCl_2 \cdot 6H_2O$）和 0.050 g 碳酸氢钠到 1 000 mL 刻度瓶中。溶于水后，加水到刻度，充分混合。移取 9 mL 到测试管中，塞上粗梳棉并在 121℃下高压蒸汽灭菌 15 min（该溶液可商业化采购）。

D.3 蛋白胨水

制备：称取 1 g 蛋白胨到 1 000 mL 刻度瓶中，溶解后，加水定容，充分混匀。塞上粗梳棉并在 121℃下高压蒸汽灭菌 20 min。

附 录 E
培 养 基

培养基和抗菌剂将通过实例的方式展示。

所用的水必须经过蒸馏、二次蒸馏或去离子化，不含痕量金属、抑制剂或其他抗生素类物质。

E.1 固体培养基

如无其他声明，所有培养基的 pH 都应该调节到 pH5.5～6.0。

E.1 酵母计数培养基

E.1.1 YM

葡萄糖	50 g
蛋白胨	5 g
酵母提取物	3 g
麦芽提取物	3 g
琼脂	20 g
添加水至	1 000 mL

如有需要，添加 100 mg 氯霉素抑制细菌生长，添加 150 mg 联苯抑制霉菌生长。

E.1.2 YEPD

葡萄糖	20 g
蛋白胨	20 g
酵母提取物	10 g
琼脂	20 g
添加水至	1 000 mL

如有需要，添加 100 mg 氯霉素抑制细菌生长，添加 150 mg 联苯抑制霉菌生长。

E.1.3 WL 营养琼脂

葡萄糖	20 g
蛋白胨	5 g
酵母提取物	4 g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	0.55 g
氯化钾(KCl)	0.425 g
氯化钙($CaCl_2$)	0.125 g
硫酸镁($MgSO_4$)	0.125 g
氯化铁($FeCl_3$)	0.002 5 g
硫酸锰($MnSO_4$)	0.002 5 g
溴甲酚绿	0.022 g
细菌琼脂粉	12 g
添加水至	1 000 mL

pH	5.5

WL 选择性琼脂由添加 4 mg/L 的环己酰亚胺到 WL 营养琼脂中制得。

如有需要，添加 100 mg 氯霉素抑制细菌生长。

E.1.4 ASBC 赖氨酸琼脂

溶液 A：

酵母炭基	2.35 g
添加水至	100 mL

通过膜过滤消毒。

溶液 B：

赖氨酸-HCl	0.5 g
琼脂	4 g
添加水至	100 mL

121℃，灭菌 20 min。

如有需要，添加 100 mg 氯霉素抑制细菌生长。

E.2 乳酸菌计数培养基

E.2.1 M.R.S＋番茄(或苹果)汁

葡萄糖	20 g
蛋白胨	10 g
牛肉提取物	8 g
酵母提取物	4 g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	2 g
三水醋酸钠	5 g
柠檬酸铵	2 g
六水硫酸镁	0.2 g
四水硫酸锰	0.05 g
吐温 80	1 mL
琼脂-琼指	12 g
番茄(或苹果、葡萄)汁	200 mL
添加水至	1 000 mL

添加 100 mg/L 的纳他霉素(游霉素)抑制酵母菌的生长，使用前高压蒸汽灭菌。

E.2.2 番茄汁琼脂培养基

番茄汁(来自 400 mL 的干提取物)	20 g
蛋白胨	10 g
牛奶蛋白胨	10 g
琼脂	14 g
水	1 000 mL
pH	6.1

添加 100 mg/L 的纳他霉素(游霉素)抑制酵母菌的生长，使用前高压蒸汽灭菌。

E.2.3 改良的ATB培养基或酒酒球菌培养基(原先的酒明串珠菌培养基)

溶液A：

葡萄糖	10 g
酵母提取物	5 g
蛋白胨	10 g
硫酸镁	0.2 g
硫酸锰	0.050 g
番茄汁(或苹果汁、葡萄汁)	250 mL
琼脂	12 g
水	750 mL

121℃高压蒸汽灭菌20 min。

溶液B：

结晶HCl	1 g
添加水至	100 mL
pH	4.8

膜过滤灭菌。

添加100 mg/L的纳他霉素(游霉素)抑制酵母菌的生长,使用前高压蒸汽灭菌。

E.2.4 Lafon-Lafourcade培养基

葡萄糖	20 g
酵母提取物	5 g
牛肉提取物	10 g
蛋白胨	10 g
醋酸钠	5 g
柠檬酸三铵	2 g
六水硫酸镁	0.2 g
四水硫酸锰	0.05 g
吐温80	1 mL
琼脂-琼脂	20 g
添加水至	1 000 mL
pH	5.4

添加100 mg/L纳他霉素(游霉素)抑制酵母菌的生长,使用前高压蒸汽灭菌。

E.2.5 杜布瓦培养基(培养基104)

番茄汁	250 mL
酵母提取物	5 g
蛋白胨	5 g
苹果酸	3 g
六水硫酸镁	0.05 g
四水硫酸锰	0.05 g
琼脂-琼脂	20 g

添加水至	1 000 mL
pH	4.8

添加 100 mg/L 纳他霉素(游霉素)抑制酵母菌的生长,使用前高压蒸汽灭菌。

E.2.6 MTB 培养基

葡萄糖	15 g
Lab-Lemco 粉(Oxoid)	8 g
水解干酪素	1 g
酵母提取物	5 g
番茄汁	20 mL
醋酸钠	3 g
柠檬酸铵	2 g
苹果酸	6 g
硫酸镁	0.2 g
硫酸锰	0.035 g
吐温 80	1 mg
伊格尔氏基本 TC 维生素,100×(BD-Difco)	10 mL*
pH	5.0
添加水至	1 000 mL

添加 100 mg/L 纳他霉素(游霉素)抑制酵母菌的生长,使用前高压蒸汽灭菌。

E.3 醋酸菌计数培养基

E.3.1 GYC

葡萄糖	50 g
酵母提取物	10 g
碳酸钙	30 g
琼脂	25 g
添加水至	1000 mL

添加 100 mg/L 纳他霉素(游霉素)抑制酵母菌的生长,添加 12.5 mg/L 青霉素来去除乳酸菌的生长,使用前高压蒸汽灭菌。

E.3.2 G2 培养基

酵母提取物	1.2 g
磷酸铵	2 g
苹果汁	500 mL
琼脂	20 g
水	1 000 mL
pH	5.0

添加 100 mg/L 纳他霉素(游霉素)抑制酵母菌的生长,添加 12.5 mg/L 青霉素来去除

* 灭菌后添加。

乳酸菌的生长，使用前高压蒸汽灭菌。

E.3.3 Kneifel 培养基

酵母提取物	30 g
乙醇	20 mL*
琼脂	20 g
2.2%溴甲酚绿	1 mL
添加水至	1 000 mL

添加 100 mg/L 纳他霉素(游霉素)抑制酵母菌的生长，添加 12.5 mg/L 青霉素来去除乳酸菌的生长，使用前高压蒸汽灭菌。

蓝色菌落：醋酸杆菌属、葡糖醋杆菌属

绿色菌落：葡糖杆菌属

E.4 霉菌培养基

E.4.1 改良察氏培养基

蔗糖	3 g
$NaNO_3$	1 g
K_2HPO_4	1 g
$MgSO_4$	0.5 g
KCl	0.5 g
$FeSO_4$	0.01 g
琼脂	15 g
最终 pH(25℃)	7.3±0.2

添加 10 mg/L 的环己酰亚胺抑制酵母生长(环己酰亚胺-抑制酵母生长效果较抑制霉菌生长作用小)。

注：该培养基允许只依赖硝酸盐生长的霉菌生长。

添加四环素(100 mg/L)和链霉素(100 mg/L)抑制细菌增长。

E.4.2 氯硝胺玫瑰红氯霉素琼脂培养基(DRBC 培养基)

葡萄糖	10 g
蛋白胨	5 g
KH_2PO_4	1 g
$MgSO_4$	0.5 g
玫瑰红	0.025 g
氯硝胺(2,6-二氯-4-硝基苯胺)	0.002 g
氯霉素溶液(0.1 g/10 mL)**	10 mL
琼脂	15 g
最终 pH(25℃)	5.6±0.2

* 灭菌后添加。

** 灭菌后添加。

E.4.3 麦芽提取物琼脂培养基(MEA)

葡萄糖	20 g
麦芽提取物	20 g
蛋白胨	5 g
琼脂	15 g
最终 pH(25℃)	5.5±0.2

添加四环素(100 mg/L)和链霉素(100 mg/L)抑制细菌的增长。

E.5 液体培养基

E.5.1 用于酵母菌

YEPD 培养基(酵母提取物,蛋白胨,葡聚糖)+氯霉素

制备:称取 10.0 g 酵母提取物(Difco 或等同物)、20 g 蛋白胨、20 g 葡萄糖和 100 mg 氯霉素。溶解,加水到 1 000 mL,混合。

将 5 mL 该培养基移入测试管中并于 121℃中高压蒸汽灭菌 15 min。

E.5.2 用于乳酸菌

MTJ 培养基(50%MRS 培养基"乳酸杆菌液体培养基和夏普液体培养基"+50%TJB 培养基"番茄汁液体培养基")+放线菌酮。

制备:称取 27.5 gMRS"乳酸杆菌液体培养基和夏普液体培养基"(Difco 或等同物)。添加 500 mL 水,煮沸使其完全溶解并添加 20.5gTJB"番茄汁培养基"(Difco 或等同物)。添加 50 g 放线菌酮,溶于水,并用 1 mol/L 的盐酸调节到 pH5,加水配成 1 000 mL 溶液。

移取 10 mL 该培养基到试管中并于 121℃下高压蒸汽灭菌 15 min。

注:由于酵母菌较乳酸菌而言,对氧气更敏感,所以用于酵母菌的培养基采用 5 mL 而非 10 mL。

附 录 F
识别特定的微生物

F.1 WL 琼脂营养培养基上酵母菌落的识别

使用该培养基不是为了鉴定菌种，但可为非专业实验室提供预报活的和可培养的酵母菌的快速和廉价方法。培养 4 d 后按 Pallman 和 Cavazza 的方法估测菌落的形态：

酵母菌属：生长了 4 d 的菌落在 WL 营养琼脂上形成圆形奶油色到浅绿色的菌落。不同的颜色深浅可能不能表明存在不同菌株，但可显示存在小的突变体；菌落中心凸起，具光滑和暗表面，奶油状黏稠。在赖氨酸琼脂培养基上不生长。

有孢圆酵母属：菌落和酵母菌属相似，可在赖氨酸琼脂培养基上生长。

汉森氏酵母(有孢汉逊酵母属)：在 WL 营养琼脂上培养 4 d 后，得到深绿色光滑平整的奶油状菌落。能在赖氨酸琼脂培养基和 WL 选择性琼脂培养基上生长。

星形假丝酵母：在 WL 营养琼脂上生长 4 d 后，得到豆绿色光滑的奶油状菌落，随着菌龄的增长颜色变深。可在赖氨酸琼脂培养基上生长。

类酵母属：在 WL 营养琼脂上生长 4 d 后，得到浅绿色光滑奶油状凸起菌落。可在赖氨酸琼脂培养基上生长，但在 WL 选择性培养基上不生长。

注：其细胞非常大(大至 25 μm)，在显微镜下易于观察。

粟酒裂殖酵母：在 WL 营养琼脂上生长 4 d 后，得到深绿色针尖大小光滑菌落，可在赖氨酸培养基上生长。

注：其细胞由于典型的切断分裂在显微镜下易于识别。

红酵母属：在 WL 营养琼脂上生长 4 d 后，得到深粉红色、表面光滑黏稠的奶油状菌落。在赖氨酸琼脂培养基上可生长。

梅奇酵母属：在 WL 营养琼脂上生长 4 d 后，得到清晰光滑的奶油状小菌落。红色染料分散在培养基的菌落下。在赖氨酸培养基中可生长。

膜璞毕赤酵母：在 WL 营养琼脂上生长 4 d 后，得到浅灰色或蓝色阴影的粗糙和粉状凸起菌落。在赖氨酸琼脂培养基上可生长。

异常毕赤酵母(以前称为异常汉逊酵母)：在 WL 营养琼脂上生长 4 d 后，得到米色或蓝色的菌落，8 d 后出现明显的蓝色。菌落为圆形，表面光滑，奶油状黏稠，有时为清晰黏液。在赖氨酸培养基上生长。

德克酵母属或**酒香酵母属：**在 WL 营养琼脂上生长 8 d 后，得到小圆顶状、米色光滑的奶油状菌落。它产生大量的醋酸，明显可闻到气味，使培养基呈黄色。可在赖氨酸琼脂培养基和 WL 选择性琼脂培养基上生长。而在后一培养基上生长使其可与拜耳结合酵母区分开来。

注：镜检可以证实：德克酵母菌有小细胞，部分细胞呈现典型的尖顶状。

拜耳结合酵母：在 WL 营养琼脂上生长 4 d 后，得到小圆形、米色平滑奶油状的菌落。可在赖氨酸琼脂培养基上生长，但不能在 WL 选择性琼脂培养基上生长。初期菌落周围会出现黄色晕圈。

注：在瓶装葡萄酒内生长时产生棕色、0.5 mm～1 mm 菌落，无尖顶状细胞。

醋酸菌:在 WL 营养琼脂上生长,产生小至针尖的深绿色明亮菌落,过氧化氢酶实验强阳性。

注:该培养基不适合醋酸菌计数。

乳酸菌:在 WL 营养琼脂上生长 10 d 后,产生针尖大小、清晰的过氧化氢酶-阴性菌落。

注:该培养基不适合乳酸菌计数。

F.2 乳酸菌菌落的识别

乳酸菌菌落半透明,直径大小从针尖大小到几毫米,为革兰氏阳性和过氧化氢酶阴性菌。酒类酒球菌生长呈短链状,片球菌形成四联球菌和双球菌,乳酸杆菌形成长或短杆菌。

F.3 醋酸菌菌落识别

醋酸菌菌落为过氧化氢酶阳性和革兰氏阴性,且为强酸生产菌:这点可从培养基菌落周围含碳酸钙的清晰区域和培养基中 pH 指示剂显示的不同颜色看出。醋酸菌细胞为球状和杆状,一般比乳酸菌略大。

参 考 文 献

[1] European Brewery Convention. Analytica Microbiologica-EBC. Fachverlag Hans Carl,2001.

[2] European Brewery Convention. Analytica Microbiologica-EBC. Fachverlag Hans Carl,2001.

[3] ISO 4833:2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal medium for the enumeration of microorganisms-Colony count technique at 30℃.

[4] ISO 7218:2007-Microbiology of food and animal feeding stuff-General rules for microbiological examinations.

[5] ISO 7667:1983. Microbiology-Standard layout for methods of microbiological examination.

[6] Pallman,C. ,J. B. Brown,T. L. Olineka,L. Cocolin,D. A. Mills and L. F. Bisson. 2001. Use of WL medium to profile native flora fermentations. American Journal of Enology and Viticulture 52:198-203;

[7] A. Cavazza,M. S. Grando,C. Zini,1992. Rilevazione della flora microbica di mosti e vini. Vignevini,9-1992,17-20.-ANDREWS,W. et MESSER,J. (1990). Microbiological Methods. in :AOAC Official Methods of Analysis, 15th edition,1,425—497,Association of Analytical Chemist,Washington.

[8] BIDAN,P. (1992). AnalysesMicrobiologiques du Vin. F. V. O. I. V. no 910,Paris.

[9] BOURGEOIS,C. M. et LEVEAU,J. Y. (1991). Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro alimentaires,2ème édition,3. Le Contrle Microbiologique Lavoisier,Tec. & Doc. ,APRIA Ed. Paris.

[10] CARR,J. G. (1959). Acetic acid bacteria in ciders. Ann. Rep. Long Ashton Res. Sta. ,160.

[11] DE MAN,J. C. (1975). The probability of most probable number. European Journal of Applied Microbiology,1,67-78.

[12] LAFON-LAFOURCADE,S. et al. (1980). Quelques observations sur la formation d'acide acétique par les bactéries lactiques. Conn. Vigne Vin,14,3,183-194.

[13] MAUGENET,J. (1962). Les Acétobacter du cidre. Identification de quelques souches. An. Technol. Agric. ,11,1,45-53.

[14] PLARIDIS et LAFON-LAFOURCADE,S. (1983). Contrôle microbiologique des vins. Bull. O. I. V. , 618,433-437,Paris.

[15] RIBÉREAU-GAYON,J. et PEYNAUD,E. (2004). Traité d'Oenologie,Tome 2,Librairie Polytechnique CH. Béranger,Paris et Liège.

[16] Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water(1976). 14th edition, American Public Health Association, Incorporated, New York.

[17] Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water(1985). 16th edition, American Public Health Association, DC 20005, Washington.

[18] VAZ OLIVEIRA, M., BARROS, P. et LOUREIRO, V. (1995). Analyse microbiologique du vin. Technique des tubes multiples pour l'énumération de micro-organismes dans les vins-"Nombre le plus probable"(NPP), F. V. O. I. V. no 987, Paris.

[19] VAZ OLIVEIRA, M. et LOUREIRO, V. (1993). L'énumération de micro-organismes dans les vins ayant un indice de colmatage élevé, Compte rendu des travaux du groupe d'experts "Microbiologie du Vin" de l'O. I. V., 12ème session, annexe 2, Paris.

[20] VAZ OLIVEIRA, M. et LOUREIRO, V. (1993). L'énumération de micro-organismes dans les vins ayant un indice de colmatage élevé, 2ème partie, Doc. Travail du groupe d'experts "Microbiologie du Vin" de l'O. I. V., 13ème session, Paris.

[21] Pallman, C., J. B. Brown, T. L. Olineka, L. Cocolin, D. A. Mills and L. F. Bisson. 2001. Use of WL medium to profile native flora fermentations. American Journal of Enology and Viticulture 52:198-203; A. Cavazza, M. S. Grando, C. Zini, 1992. Rilevazione della flora microbica di mosti e vini. Vignevini, 9-1992 17-20.

JUNGE Ch., *Zeits. Unters. Lebensmit.*, 1967, 133, 319

方法 OIV-MA-AS4-02A　　　　方法类型Ⅳ

防腐剂和发酵抑制剂

（A35；Oeno 6/2006，377/2009 对其修订）

1　目的

显示葡萄酒中可能存在着一种或几种发酵抑制剂，但无须具体说明发酵抑制剂的特性。

2　原理

将葡萄酒的酒精度调节为10%（V/V），其中游离的二氧化硫与添加的乙醛水溶液结合。添加葡萄糖，使该营养液中的糖浓度在20 g/L～50 g/L之间。

接种酒精耐受性酵母菌发酵后，对其释放的二氧化碳进行判定。

将组分相似的纯正天然葡萄酒以及调节pH到6（发酵过程中大多数矿物质和有机酸在该pH条件下无活性）的测试葡萄酒的发酵速率相比较。这两种参照葡萄酒和测试葡萄酒的接种方式一致。

3　仪器

90 mL带橡胶塞的密封烧瓶，该烧瓶的顶端有一个可放置锥形小管的洞。

4　试剂和培养基

4.1　乙醛水溶液

在硫酸存在下将聚乙醛或三聚乙醛蒸馏获得乙醛溶液，使用亚硫酸钠溶液进行标定。调整乙醛溶液的浓度为6.9 g/L。1 mL乙醛溶液能与10 mg的二氧化硫结合。

4.2　营养液

硫酸铵 $(NH_4)_2SO_4$	25 g/L
天冬酰胺	20 g/L

溶液必须储存在冰箱中。

4.3　培养基

固体培养基：麦芽汁琼脂培养基

麦芽粉	3 g
葡萄糖	10 g
胰蛋白胨	5 g
酵母粉	3 g
琼脂	20 g
水	1 L
pH	6

118℃灭菌20 min。

该混合液已有商业化制备产品。

液体培养基(可选):

将含糖量为 170 g/L～200 g/L 的葡萄汁以每管 10 mL 分装到带棉塞的试管中,在 100℃水浴中灭菌 10 min。

液体麦芽培养基:与固体培养基成分相同,只是不含琼脂。

4.4 贝酵母菌的培养和保藏及酵母的制备

固体培养基培养和保藏菌种:收集菌株,划线接种菌株至含固体培养基试管。试管放置 25℃ 的培养箱中培养,直到培养物体清晰可见(大约 3 d)。将试管储存在冰箱中,可使用 6 个月。

酵母的制备:

采用适宜的微生物学技术将固体培养基培养菌株接种到一管液体培养基中,待菌株生长(24 h～48 h)后,连续两次接种到相同的含 10%(V/V)乙醇的培养基,使菌株适应。

活跃发酵时的第二次培养菌液中含有 5×10^7/mL 的酵母菌。将该培养物接种到被研究的葡萄酒中。培养物进行计数后以 10^5/mL 酵母菌比例进行接种。

5 步骤

葡萄酒的制备:

100 mL 的葡萄酒用适量的乙醛(按游离二氧化硫量来计算,44 mg 的乙醛结合 64 mg 的二氧化硫)处理。24 h 后检测葡萄酒中的游离二氧化硫含量低于 20 mg/L。

如果葡萄酒的酒精度超过 10%,需用葡萄糖溶液或水进行稀释,使得最终溶液中糖的浓度为 20 g/L～50 g/L,酒精度大约为 10%。对于酒精度小于 10%的葡萄酒,无需稀释,须添加固体葡萄糖使浓度在 20 g/L～50 g/L 之间。最终发酵速率将不因糖含量而变化。

发酵性能测试:在 90 mL 的烧瓶中,加入 60 mL 上述制备好的葡萄酒、2.4 mL 的硫酸铵溶液和2.4 mL的天冬酰胺溶液。接种 3 滴培养了 3 d 的贝酵母菌培养液以获得初始浓度接近 10^5/mL 的酵母菌。将塞子塞入各瓶管口,准确称重到 10 mg,然后放入 25℃ 的烘箱中。

每天称重,至少 8 d。

来源和成分类似、不含有任何防腐剂的葡萄酒和 pH 调节至 6 的测试葡萄酒同时进行测试。

用未接种的带葡萄酒烧瓶反映蒸发损失。

6 判读

大多数情况下,发酵在 48 h 开始,每天气体释放的最大量出现在第 3 天和第 5 天之间。

只有在下列条件下才能证实发酵抑制剂的存在:

a) 如果发酵未开始或与两组对照中的一组相比至少延迟 2 d。当延迟时间很短时,可能出现"假阳性"结果,很难确定抑制剂是否存在,这是因为某些天然甜葡萄酒有时会表现出好像含有微量抑制剂(特别是从含贵腐菌的葡萄酿造的甜葡萄酒)。

b) 如果每天的最大释放量未发生在第 3 天和第 5 天之间,但在第 7 天之后,每 60 mL 葡萄酒释放量大于或等于 50 mg。

c) 在难于判别时,绘制发酵曲线和每日释放 CO_2 量的时间函数曲线以方便判断。

方法 OIV-MA-AS4-02B　　　　方法类型Ⅳ

防腐剂和发酵抑制剂(山梨酸、苯甲酸、对氯苯甲酸、水杨酸和对羟基甲酸及其酯)

(A35;Oeno 6/2006,377/2009 对其修订)

1　薄层色谱

1.1　原理

用乙醚从预酸化的葡萄酒中提取防腐剂，通过聚酰胺薄层色谱分离后，在紫外灯下对色谱图进行定位并检测。

1.2　仪器

色谱展开缸、20 cm×20 cm 玻璃平板。

平板的制备：将 12 g 的干聚酰胺粉和 0.3 g 的荧光指示剂充分混合；边搅拌边添加 60 mL的甲醇；将其在平板上铺展开，厚度为 0.3 mm，并在常温下干燥。

注：可以使用商业化制备的平板。

1.3　试剂

——乙醚；

——甲醇；

——96%(V/V)的乙醇；

——稀释到 20%的硫酸；

——无水硫酸钠；

——聚酰胺色谱柱(如马歇雷-纳格尔或默克)；

——荧光指示剂(F_{254}默克或同类)；

——溶剂：

正戊烷	10 体积；
正己烷	10 体积；
冰醋酸	3 体积；

——标准溶液：

将山梨酸、对氯苯甲酸、水杨酸、对羟基苯甲酸及其酯类溶入 96%(V/V)的乙醇制成浓度为 0.1 g/100 mL 的标准溶液。

制备 100 mL 含 0.2 g 苯甲酸的 96%乙醇溶液。

1.4　步骤

将 50 mL 葡萄酒移入分液漏斗中，用 20%的稀硫酸酸化，每次用 20 mL 乙醚提取，提取 3 次。将 3 次洗涤液一并收集到分液漏斗中，用少量蒸馏水清洗。用无水硫酸钠干燥乙醚。用 100℃的水浴或旋转蒸发仪将乙醚蒸干。如果蒸发在水浴上进行，建议使用缓和的气流来促进蒸发直至剩余 2 mL～3 mL，然后在不加热情况下继续蒸发至干。

将残留物溶解在 1 mL 乙醇中，取 3 μL～5 μL 该溶液和不同的防腐剂标准乙醇溶液滴加到聚酰胺平板上。将平板放入层析槽中，用溶剂蒸气饱和。让溶剂迁移到高度约 15 cm

处，该过程一般需要 1.5 h～2.5 h。

将平板从槽中移出并在常温下风干。在 254 nm 波长的紫外灯下检测，防腐剂从平板底部向上的出现顺序如下：对羟基苯甲酸、对羟基苯甲酸酯、水杨酸、对氯苯甲酸、苯甲酸、山梨酸。

在黄绿色荧光背景下，除了水杨酸有淡蓝色荧光外，其他防腐剂都显示黑色斑点。

灵敏度：对于下列防腐剂，该技术能够检测的最低含量(mg/L)分别是：

水杨酸	3
山梨酸	5
对羟基苯甲酸酯	5
对羟基苯甲酸	5～10
对氯苯甲酸	5～10
苯甲酸	20

2　高效液相色谱

2.1　步骤

该方法不需要制备样品，可直接对葡萄酒进行检测。为保护色谱柱，在注入色谱前需要将红葡萄酒进行稀释。

该方法对溶液中的防腐剂的检测阈值约为 1 mg/L。

2.2　操作条件

适宜的条件如下：

a）山梨酸和苯甲酸的检测

按本检测方法大全提供的高效液相色谱法（OIV-MA-AS313-20）测定葡萄酒中山梨酸、苯甲酸和水杨酸的操作进行。

b）对氯苯甲酸、对羟基苯甲酸及其酯的检测

色谱柱：见 OIV-MA-AS 313-20。

流动相：0.01 mol/L 的醋酸铵溶液＋甲醇(60＋40)。

pH：4.5～4.6。

流速：见 OIV-MA-AS 313-20。

进样体积：见 OIV-MA-AS 313-20。

检测器：紫外检测器，254 nm。

温度：见 OIV-MA-AS 313-20。

方法 OIV-MA-AS4-02C **方法类型Ⅳ**

防腐剂和发酵抑制剂(乙酸单卤代衍生物)

(A35 方法;Oeno 6/2006 对其修订)

1 原理

从酸化的葡萄酒中用乙醚提取一卤乙酸衍生物。然后用0.5 mol/L 氢氧化钠溶液提取乙醚层。提取液的碱度必须维持在0.4 mol/L～0.6 mol/L之间。在添加硫代水杨酸后,按以下步骤合成硫靛蓝:

a) 用硫代水杨酸将一卤乙酸衍生物凝结,生成邻羟基苯巯基乙酸;

b) 在热的碱性介质下进行酸的环化,生成噻茚酚;

c) 在碱性介质下用铁氰化钾将噻茚酚氧化形成硫靛蓝,该化合物可溶于氯仿中,并呈现红色。

2 仪器

——100℃水浴;

——机械搅拌器;

——200℃±2℃的烘箱。

3 试剂

——乙醚;

——盐酸稀释到1/3(V/V):将一体积纯盐酸($\rho_{20\,℃}=1.19$ g/mL)和两体积蒸馏水混合;

——无水硫酸钠;

——硫代水杨酸溶液:硫代水杨酸3g溶解到100 mL NaOH溶液中,浓度为1.5 mol/L;

——0.5 mol/L 氢氧化钠溶液;

——铁氰化钾溶液:2g $K_3Fe(CN)_6$溶于100 mL水中;

——氯仿。

4 步骤

将100 mL葡萄酒样移入带磨砂玻璃塞的抽提瓶中,加入2 mL盐酸和100 mL乙醚,用手剧烈摇荡几秒钟,然后机械搅拌1 h,将混合液体转移到分液漏斗中,分离和回收乙醚层。

将乙醚提取液和8 g～10 g无水硫酸钠混合振荡几秒钟。

将提取液转移到分液漏斗,添加10 mL 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液,振荡1 min后静置。

取0.5 mL碱提取物,用0.05 mol/L硫酸滴定,保证其碱度在0.4 mol/L～0.6 mol/L之间。将分液漏斗中的碱提取物转移到含1 mL硫代水杨酸溶液的试管中。如有必要,可用已知浓度的浓氢氧化钠溶液调节提取液碱度,使其达到上述要求的碱度。振荡测试管30 s,并转移到蒸发皿中。

将蒸发皿放入100℃水浴中,用冷气流吹其表面,准确计时1 h,残留物在短时间内将基本变干。如果蒸发过程中残留物表面结有硬皮,可用玻璃棒将其压碎或磨碎以便加快蒸发。

将蒸发皿放入烘箱中，在 200℃±2℃加热 30 min。冷却后，用 4 mL 水将其复溶，转移到分液漏斗中。添加 3 mL 铁氰化钾溶液到蒸发皿中使残留物完全溶解，并将溶液转移到分液漏斗中。振荡 30 s 以加速氧化。加入 5 mL 氯仿，翻转 3～4 次使其混合。静置分离。

出现紫色或红色(根据硫靛蓝形成的量而定)说明存在一卤乙酸衍生物。

灵敏度-该方法允许对葡萄酒中 1.5 mg/L～2 mg/mL 的一氯乙酸及其相应的衍生物进行检测。由于混合抽提物的产量不能定量，因此，该方法不能用来测定葡萄酒中一卤乙酸衍生物的量。

参考文献

[1] Friedlander, Ber. Deutsch. Chem. Gesell., 1906, 39, 1062.

[2] Ramsey L. L., Patterson W. I., J. Ass. Off. Agr. Chem., 1951, 34, 827.

[3] Peronnet M., Rocques S., Ann. Fals. Fraudes, 1953, 21-23.

[4] Traité de chimieorganique, edited by V. Grignard, 1942, 19, 565-566.

[5] Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 11th édition, publiée par l'Association of Official Analytical Chemists, Washington, 1970, 340-341.

[6] TERCERO C., F. V., O. I. V., 1967, n° 224.

方法 OIV-MA-AS4-02D　　方法类型Ⅳ

防腐剂和发酵抑制剂(焦碳酸酯)

(A35 方法;Oeno 6/2006 对其修订)

1 原理

焦炭酸乙酯在乙醇存在时降解形成碳酸二乙酯,用二硫化碳将其从葡萄酒中提取出来,用气相色谱测定其含量。

可用以下两种方法进行检测。

2 仪器

2.1 带火焰离子化检测器的气相色谱仪

2.2 柱子

——涂有聚乙二醇 1 540 的毛细管柱:

柱长:15.24 m;

内径:0.51 mm。

——聚丙二醇涂布的硅藻土 545(15∶100),60 目～100 目:

柱长:2 m;

内径:3 mm。

3 试剂

3.1 无水硫酸钠。

3.2 二硫化碳:按 4.2 中气相色谱条件,在最大灵敏度条件下,二硫化碳不含有 5 min～7 min出峰的杂质。

4 步骤

4.1 毛细管柱的使用

移取 100 mL 葡萄酒到 250 mL 分液漏斗中,加入 1 mL 的二硫化碳,充分混合1 min。快速离心分离,取二硫化碳层,用无水硫酸钠干燥。

取 10μL 上清液进样到色谱仪中。

色谱条件:

——检测器气体:

氢气:37 mL/min;

空气:250 mL/min。

——载气:

氮气:40 mL/min;

1/10 的分流到检测器,气体混合物的流速为 3 mL/min～5 mL/min。

——温度:

进样器：150℃；柱箱：80℃；检测器：150℃。

——检出限：0.05 mg/L(葡萄酒)。

4.2 聚丙二醇柱的使用

将 20 mL 葡萄酒和 1 mL 的二硫化碳装入一个带塞的锥形离心管中，剧烈搅拌 5 min，然后在 1 000 g～1 200 g 的离心力下离心 5 min，用尖嘴吸管吸出上清液。用玻璃棒边搅拌边添加少量无水硫酸钠，干燥二硫化碳层。取 1 μL 上清液进样到气相色谱仪中进行检测。

色谱条件：

——检测器气体：

氢气：35 mL/min；

空气：275 mL/min。

——载气流：

氮气：25 mL/min。

——温度：

进样器：240℃；

柱箱：100℃；

检测器：240℃。

——灵敏度范围：

12×10^{-11} A～3×10^{-11} A。

——走纸速度：

1 cm/min。

——检出限：0.10 mg/L～0.05 mg/L(葡萄酒)。

在该提取条件下，碳酸二乙酯的保留时间约为 6 min。

采用分别含 0.01%(m/V)和 0.05%(m/V)碳酸二乙酯在二硫化碳溶液校准仪器。

5 计算

碳酸二乙酯的定量测定优先使用内标法，参比峰为异丁醇或异戊醇的峰，这两个峰与碳酸二乙酯的峰很接近。

制备两种待测葡萄酒：一份葡萄酒添加 10 mL 10%的乙醇，另一份同样的葡萄酒中加入 10 mL 100 mg/L 的碳酸二乙酯的乙醇[10%(V/V)]溶液使碳酸二乙酯的含量为 1 mg。

葡萄酒中碳酸二乙酯的浓度(mg/L)为：

$$\frac{S_\chi}{S\times\frac{i}{I}-S_\chi}$$

其中：S——加标葡萄酒中碳酸二乙酯的峰面积；

S_χ——葡萄酒中碳酸二乙酯的峰面积；

i——葡萄酒中内标的峰面积；

I——加标葡萄酒中内标的峰面积；

在使用纯的碳酸二乙酯标准溶液进行外标法定量时，需要根据使用的方法预先确定二硫化碳的提取率。该提取率用提取因子 F 表达，保留一位小数，数值小于或等于 1(100%)。

葡萄酒中碳酸二乙酯的浓度(mg/L)为：

$$\frac{C\times S_{\chi}\times E_{\chi}\times V_{s}}{S_{e}\times E_{e}\times F\times V_{\chi}}$$

如果注入色谱中的两种溶液浓度相近，则 S_{χ} 和 S_{e} 记录值的响应相同，计算公式可以简化为：

$$\frac{C\times S_{\chi}\times V_{s}}{S_{e}\times F\times V_{\chi}}$$

其中：S_{χ}——葡萄酒中碳酸二乙酯的峰面积；

S_{e}——进样同体积浓度为 C(mg/L)的标准碳酸二乙酯的峰面积；

V_{χ}——用于二硫化碳提取的葡萄酒体积；

V_{s}——提取所用二硫化碳的体积；

E_{e}——S_{χ} 记录值的灵敏度。

参考文献

[1] Kielhofer E. ,Wurdig G. ,Dtsch. Lebensmit. Rdsch. ,1963,59,197-200 & 224-228.

[2] Prillinger F. ,Weinberg u. Keller,1967,14,5-15.

[3] Reinhard C. ,Dtsch. Lebensmit. Rdsch. ,1967,5,151-153.

[4] Bandion F. ,Mitt. Klosterneuburg,Rebe u. Wein,1969,19,37-39.

方法 OIV-MA-AS4-02E 方法类型Ⅳ

防腐剂和发酵抑制剂(脱氢乙酸)

(A35 方法;Oeno 6/2006 对其修订)

1 原理

葡萄酒样液被硫酸酸化后,用乙醚和石油醚等体积混合物提取。蒸发溶剂后,用少量96%(V/V)乙醇复溶提取物,在带荧光指示剂的硅胶及聚酰胺薄层上点样,经过流动相(苯丙酮乙酸)作用分离。脱氢乙酸可用紫外光检测鉴定。

2 仪器

2.1 薄层色谱仪。

2.2 烘箱。

2.3 旋转蒸发仪。

2.4 254 nm 紫外灯。

3 试剂

3.1 乙醚。

3.2 石油醚(沸点≤40℃)。

3.3 甲醇。

3.4 硫酸,20%(V/V)。

3.5 无水硫酸钠。

3.6 乙醇,96%(V/V)。

3.7 色谱分离层:10g 带荧光指示剂的聚酰胺粉(如马歇雷-纳格尔公司的聚酰胺 DC II UV_{254})与 60 mL 乙醇充分混合。边搅拌边添加 10 mL 水和 10 mL 硅胶(带荧光指示剂,如默克公司的 Kiesselgel GF_{254})。将该混合物涂布到 5 个平板(200 mm×200 mm)上,厚度控制为 0.25 mm。将平板在室温下放置 30 min 晾干,然后放入 70℃的烘箱烘烤 10 min。

3.8 迁移溶剂

结晶苯	60 体积
丙酮	3 体积
结晶醋酸	1 体积

3.9 参比溶液

0.2%醋酸和苯甲酸的乙醇溶液。

0.1%(m/V)的山梨酸、对氯苯甲酸、水杨酸、对羟基苯甲酸及其丙、甲及乙酯的乙醇溶液。

4 步骤

用 10 mL 20%的硫酸将 100 mL 葡萄酒酸化,然后用 50 mL 50%的乙醚-石油醚进行提

取,提取3次。移除澄清的水相,留下乳化层和醚相。将分离瓶中剩余的乳化层和醚相再次混合。剩余的水相通常可以和醚相彻底分离。如果有残留的乳化层,可通过添加几滴乙醇消除。

回收的乙醚-石油醚相用50 mL水进行清洗,硫酸钠干燥后,在30℃~35℃旋转蒸发至干。残留物用1 mL乙醇复溶。

取20 μL的该溶液在平板起始线上画一条2 cm宽的条带,或点上10 μL的圆点。作为对比,将5 μL的标准溶液一同进行上述处理。经薄层色谱分离后(在正常的展开缸内,迁移高度上升到15 cm,用时75 min~115 min),将平板在常温下干燥。脱氢乙酸和其他防腐剂在254 nm紫外光下都能显色。

当色谱图检测出对氯苯甲酸、对羟基苯甲酸丙酯或甲酯,但不能完全分离时,采用"OIV-MA-AS4-02B中2.1薄层色谱所述方法鉴定上述提取物。

参考文献

[1] Haller H. E., Junge Ch., F. V., O. I. V., 1972, n°397, Mitt. Bl. der Gd CH, Fachgruppe, Lebensmitt. u. gerichtl. Chem., 1971, 25, n° 5, 164-166

方法 OIV-MA-AS4-02F　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　**方法类型Ⅳ**

防腐剂和发酵抑制剂

（A35 方法；Oeno 6/2006 对其修订）

1　高效液相色谱法

1.1　原理

用双蒸水从葡萄酒中分离出叠氮酸，采用 3，5-二硝基苯酰氯衍生化后用高效液相色谱检测波长为 240 nm。

1.2　仪器

1.2.1　蒸馏装置（用于测定酒精度）；冷凝管终端插入收集管。

1.2.2　500 mL 带磨砂玻璃颈的球形烧瓶。

1.2.3　10 mL 带磨砂玻璃塞的烧瓶。

1.2.4　高效液相色谱仪。操作条件：

柱子：C_{18}，柱长 25 cm；

流动相：乙腈-水（50：50）；

流速：1 mL/min；

进样体积：20 μL；

检测器：紫外吸收检测器（UVD）谱；

温度：室温。

1.3　试剂

1.3.1　5%（*m*/*V*）氢氧化钠。

1.3.2　10%（*m*/*V*）硫酸溶液。

1.3.3　指示剂：甲基红 100 mg，亚甲基蓝 50 mg，100 mL50%（*V*/*V*）酒精。

1.3.4　色谱纯乙腈。

1.3.5　衍生剂：10%（*m*/*V*）3，5-二硝基苯酰氯溶于乙腈。

1.3.6　pH4.7 的醋酸钠缓冲溶液：将 1 体积 1 mol/L 的醋酸钠溶液（$NaC_2H_3O_2 3H_2O$）和 1 体积 1 mol/L 的乙酸溶液混合。

1.3.7　叠氮化钠（NaN_3）。

1.4　步骤

1.4.1　样品的制备

取 100 mL 葡萄酒放入磨口球形烧瓶中，将冷凝器的一端放入加有几滴指示剂的 10 mL 5%的氢氧化钠溶液中。蒸馏，直到获得 40 mL～50 mL 的馏出物。

把馏出物转移到另一个圆底烧瓶中，用 20 mL 水清洗球形瓶 2 次，并加水到 100 mL。将烧瓶连接蒸馏装置除去乙醇，蒸馏除去约 50 mL 的馏出物（减少一半的体积）。

让烧瓶完全冷却。用 10%的硫酸酸化、蒸馏，将馏出物收集到浸没于冰水浴中的含 1 mL水的 10 mL 带磨口玻璃塞的烧瓶中。当总体积达到 10 mL 时停止蒸馏。

1.4.2 衍生化

将 1 mL 馏出物、0.5 mL 乙腈、0.2 mL 缓冲液和 30 μL 衍生剂混合并混合均匀，放置 5 min。

1.4.3 色谱分析

按照设定条件进样 20 μL，叠氮酸衍生物的保留时间约为 11 min，检出限：0.01 mg/L。

注：有时其他的未衍生化物质可能与叠氮酸结果相似，有必要采用以下方法确证阳性结果：直接进样 20 μL馏出物，若叠氮酸衍生物的峰消失，说明叠氮酸的存在。

1.5 计算

为了确定叠氮化钠的浓度，将样品响应值与衍生化后的标准样品比较。在分析时应考虑葡萄酒样品的稀释因子。

2 比色测定法

2.1 原理

叠氮钠非常不稳定，可通过重蒸馏分离，去除乙醇、乙酸和二氧化硫。与氯化铁结合形成有色复合物(在 465 nm 处有最大吸收值)后可通过比色来测定其含量。

2.2 仪器

2.2.1 简单的蒸馏装置，由 500 mL 带磨口玻璃颈的烧瓶和终端插入指定试管的冷凝器组成。

2.2.2 分光光度计，带光程为 1 cm 比色皿。

2.3 试剂

2.3.1 1 mol/L NaOH 溶液。

2.3.2 1 mol/L 硫酸。

2.3.3 3%(V/V)的过氧化氢，其强度在使用前必须用 0.02 mol/L 的高锰酸钾溶解调整；p mL高锰酸钾相当于 1 mL 3 %的氢氧化钠溶液。

2.3.4 含 20 g/L Fe^{3+} 的氯化铁溶液(称取大于或等于 96.6 g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$，该盐易吸湿；控制溶液中 Fe^{3+} 的浓度，如有需要，可调整至 20 g/L±0.5 g/L)

2.3.5 叠氮钠储备液：1g NaN_3溶于 1L 蒸馏水中。

2.3.6 200 mg/L 的叠氮钠溶液：通过稀释 1 g/L 的溶液而得。

2.4 步骤

a) 取 200 mL 葡萄酒于 500 mL 带磨口玻璃颈的烧瓶中，蒸馏，采用置于冰水浴中的容量瓶(体积为 50 mL，装有 5 mL 水)接收馏出物，当总容积达到约 50 mL 时停止蒸馏。

b) 取馏出物定量转移到另一个 50 mL 的带塞烧瓶中，并用 20 mL 水将 50 mL 烧瓶清洗两次。

用 1 mol/L 氢氧化钠溶液将液体调成中性(使用 pH 试纸)。

用 10 mL 1 mol/L 的硫酸酸化，混合，然后添加 3%的过氧化氢溶液氧化二氧化硫。

如果葡萄酒中含有 S(mg/L)的二氧化硫，且 p mL 为氧化 1 mL 3%过氧化氢溶液所需的 0.02 mol/L 高锰酸钾溶液的体积，那么对 200 mL 葡萄酒而言添加的过氧化氢溶液体积

可用如下公式计算：

$$\frac{S}{5\times 3.2p}=\frac{S}{16p}\ \mathrm{mL}$$

添加蒸馏水使溶液体积增加到约 200 mL。

采用置于冰水浴中的容量瓶（体积为 50 mL，装有 5 mL 水）收集馏出物，在接近刻度线时停止蒸馏，置于室温下并调整体积到 50 mL。

c）精确添加 0.5 mL 氯化铁溶液，混匀并置于 1 cm 比色皿中，直接在 465 nm 下进行测量（最久延迟不超过 5 min）；采用 50 mL 水添加 0.5 mL 氯化铁溶液作为空白进行仪器调零。

d）标准曲线的绘制

分别将 1 mL、2 mL、3 mL、4 mL 和 5 mL 200 mg/L 的叠氮化钠溶液置于 5 个 50 mL 的容量瓶中，用蒸馏水调节容量瓶溶液体积为 50 mL，添加 0.5 mL 氯化铁溶液，测定 465 nm 下的吸光度。

上述溶液包含 4 mg/L、8 mg/L、12 mg/L、16 mg/L、20 mg/L 的叠氮钠。对应葡萄酒中的浓度分别为 1 mg/L、2 mg/L、3 mg/L、4 mg/L 和 5 mg/L。

典型的吸光度对应浓度的变化曲线是一条过原点的直线。

2.5 计算

将测到的样品吸光度值绘点至标准曲线，查值计算得到葡萄酒中叠氮钠浓度值（mg/L）。

参考文献

[1] Searin S. J. & Waldo R. A. ,J. Liquid. Chrom. ,1982,5(4),597-604.

[2] Battaglia R. & Mitiska J. ,Z. Lebensm. Unters. Forsch. ,1986,182,501-502.

[3] Clermont S. & Chretien D. ,F. V. ,O. I. V. ,1977,n° 627.

方法 OIV-MA-AS4-03 **方法类型Ⅳ**

定量 PCR 技术对葡萄酒中野生酵母计数

(Oeno 414-2011)

【使用者注意】

苯酚:所有与苯酚有关的处理程序都必须在通风橱中进行、并戴手套操作,所有苯酚污染物残留都必须收集在合适容器中。

SYBR Green 染料:显示出非零诱变性,但又低于溴化乙啶的诱变性。必须遵守使用注意事项。

1 适用范围

该方法描述了一种适用于散装或瓶装葡萄酒中布鲁塞尔酒香酵母的计数方法,即实时定量 PCR 计数方法(定量聚合酶链反应)。用于酒精发酵过程中葡萄酒及葡萄汁的计数分析尚未确定。

2 定义

该方法计数的微生物为布鲁塞尔酒香酵母,它含有目标基因的一个拷贝。

3 原理

PCR 技术扩增,即通过多个重复的酶促反应,用两个引物鉴定目标 DNA(脱氧核糖核酸)。该过程包括一个重复的三步循环:

热变性 DNA;引物的杂交;聚合,在 Taq(水生栖热菌)聚合酶的的作用下进行。

不同于传统的 PCR 技术,定量 PCR 技术可以通过使用荧光基团来进行 DNA 扩增过程中 DNA 的定量化。

目前,该物种的两个特定区域已被用作目标基因。一个区域是 26 S 核糖体 RNA(核糖核酸)的编码基因,另一个是 RAD4 基因。和 FISH 方法一样,PCR 技术特定针对布鲁塞尔酒香酵母,且具有成本低廉的优势。

定量 PCR 技术的独特之处在于可以读数,在每个扩增周期后,随着 DNA 扩增的进行,荧光强度呈指数增长。许多荧光技术已被引入该应用。SYBR® Green 荧光基团* 被认为适用于布鲁塞尔酒香酵母。

该试剂在插入自身的非特异性双链 DNA 的核苷酸中时会发出强荧光。而在无结合时仅发出微弱荧光。利用该技术,在扩增结束时会产生一条合并曲线,以证实该反应的特异性。

内标

为了验证 DNA 提取和扩增阶段,可采用内标方法(Lip4 *Yarrowia lipolytica*)。

* SYBR® Green 荧光基团。

4 试剂和产品

所有塑料耗材必须先经过高压蒸汽处理来灭活 DNA 酶(脱氧核糖核酸酶),必须采用 Tris-HCl 和 TE(Tris EDTA,乙二胺四乙酸)缓冲溶液、醋酸铵和超纯水。所有水溶液都必须使用超纯水制备。一些溶液需经高压蒸汽灭菌。如有可能,使用无菌超纯水制备不经高压蒸汽处理的溶液,此时无需在无菌条件下进行操作。

PVPP(聚乙烯聚吡咯烷酮)(如:ISP Polyclar Super R 或 Sigma P6755-100G)。

室温溶液:10 m mol/L pH8 的 Tris-HCl 缓冲溶液,溶液 I(10 m mol/L pH 8 的 Tris-HCl,1 m mol/L EDTA,100 mmol/L NaCl,1% SDS(十二烷基磺酸钠),2%聚氧乙烯醚类-100),高压蒸汽处理的 TE(10 mmol/L pH8 的 Tris-HCl,1 m mol/L EDTA),4 mol/L 的醋酸铵,纯乙醇,每块定量 PCR 板准备 1 个经高压蒸汽灭菌的超纯水水瓶(20 mL),4℃溶液:pH8 的饱和苯酚:氯仿:IAA(异戊醇)=24∶25∶1 和 1 μg/μL Rnase(核糖核酸酶),-20℃的悬浮液:内标,SYBR Green(如 iQ SBYR Green Supermix Bio-Rad 170-8884),引物:4 μmol/L的 Brett rad3、Brett rad4、YAL-F 和 YAL-R 各一。

干浴,37℃。所有与苯酚有关的处理程序都必须在通风橱中进行、并戴手套操作,所有苯酚污染物残留都必须收集在合适容器中。

PCR 试剂	规格
4.1 醋酸铵	>98%
4.2 苯酚∶氯仿∶异戊醇(24∶25∶1)	超纯
4.3 蛋白酶 K	1215 U/mg 蛋白(16.6 ng/mL)
4.4 SDS	>99%超纯
4.5 Tris base	>99.8%超纯
4.6 BSA	分子生物学级别
4.7 pH 8 饱和苯酚	
4.8 PVPP 360kDa	
4.9 RNase A	70 U/mg 溶液
4.10 TEpH8	超纯
4.11 引物 25nmol	

5 仪器和器具

塑料耗材:2 mL 带旋盖微管,1.5 mL 和 1.7 mL 的微管,白色(10 μL)、黄色(200 μL)和蓝色(1 000 μL)移液枪吸头,微量移液器 P20、P200、P1000、P5000,96 孔 PCR 板和光学薄膜,无粉手套。

玻璃珠(φ 500 μm)。

高压蒸汽灭菌的瓶子(20 mL)(用于盛装超纯无菌水,每块定量 PCR 板一个)。

15 mL 和 50 mL 离心管。

设备：自动移液枪（P20、P200、P1000、P5000）；微管离心机；裂解细胞的自动搅拌器（如：GenieDisruptor）；带有荧光光谱仪（检测实时 PCR 反应产生荧光的光学系统）的 PCR 仪；磁力搅拌器；定时器；37℃干浴；高压灭菌锅；100 mL 容量瓶；50 mL 容量瓶；10 mL 容量瓶；100 mL 烧杯；50 mL 烧杯；10 mL 烧杯；磁力搅拌棒。

6 制样（样品制备）

6.1 样品计数

样品直接移入到瓶中进行检测或移入到预先灭好菌的样品瓶中。

当酵母数量不超过 5×10^{6} CFU/mL 时，该方法测得的酵母数（包括 K1 和 L2056）不会受到干扰。至今没有数据显示酵母数量大于该值，因此避免了在酒精发酵过程中测量葡萄酒。

注：当用标准微生物法对酵母菌进行计数时（在琼脂培养基中生长，目测密度），结果用 CFU/mL（菌落形成单位）表示。相反的，用实时 PCR 分析方法计数得到的结果用 GU/mL（基因单位）表示。

6.2 内标的制备

将耶氏酵母属菌株（*Yarrowia*）在 28℃的液体 YPD（酵母蛋白胨葡萄糖培养基）培养到 OD_{600} 值（600 nm 处的光学密度）为 1（约需 48h）。

在估测 OD_{600} 后，用等渗盐水将其稀释到 1.0×10^{6} CFU/mL（1OD=1.0×10^{7} CFU/mL）。

将 110 μL 含 1.0×10^{6} CFU/mL 培养物的样品转移到 1.7 mL 的微管中，添加 110 μL40％的甘油，得到的酵母数量为 5.0×10^{5} CFU/mL。混匀并在－80℃下储存。每管可以用于 5 个葡萄酒样品的检测。

6.3 溶液的制备

100 mL pH 8 10 m mol/L 的 Tris-HCl：称取 0.121 g 的三氨基甲烷（如：Trizma base）并用 80 mL 超纯水溶解。用 HCl 调节 pH。加水到 100 mL。高压蒸汽灭菌。

100 mL TE：称取 0.121 g 三氨基甲烷并用 80 mL 水溶解，用 HCl 调节 pH。添加 37.2 mg EDTA，调节 pH 到 8（有助于 EDTA 溶解）后加水到 100 mL。高压蒸汽灭菌。

100 mL 溶液Ⅰ：制备 50 mL TE 2×并添加 10 mL 1 mol/L NaCl、10 mL 10％ SDS（轻微加热溶解）和 2g Triton×100，然后加水到 50 mL。

4 mol/L 醋酸铵：将 15.4 g 醋酸溶解在 50 mL 超纯水中。

100 mL 苯酚：氯仿：IAA（25∶24∶1）：添加 48 mL 氯仿和 2 mL 异戊醇到 50 mL 用 pH8 TE 饱和的苯酚溶液中，4℃储存。

1 μg/μL 的 RNase A：用超纯水将 70U/mg 的 RNase A 溶液（如：Sigma，R4642－50MG，－20℃储存）稀释。RNase 储备液的浓度必须标注在试管和批处理的规格单上。稀释的溶液可在不超过 4℃下保存 3 周左右。

4 μmol/L Brett 引物：将 100 μmol/L 的引物储备液（已置于供应商提供的微管中）、4 μmol/L的 Brett rad3（GTTCACACAATCCCCTCGATCAAC ）和 4 μmol/L Brett rad4（TGC-CAACTGCCGAATGTTCTC）混合到 1 mL 超纯水中。在－20℃下可储存约 1 年。

4 μmol/L YAL 引物：将 100 μmol/L 的引物储备液（已置于供应商提供的微管中）、4 μmol/L的 YAL-F（ACGCATCTGATCCCTACCAAGG）和 4 μmol/L YAL-R（CATCCT-

GTCGCTCTTCCAGGTT)混合到 1 mL 超纯水中。在-20℃下可储存约 1 年。

7 步骤

用于分析的样品：摇晃瓶子混匀样品。

针对具塞瓶：用 70%酒精对瓶颈消毒，用点燃的 70%酒精棉球螺旋消毒拔出瓶塞。

移取 15 mL～20 mL 的葡萄酒样品到 30 mL 的一次性无菌塑料瓶中。

7.1 细胞分离

该步骤必须采取双管。

操作程序必须在封闭的适宜生物安全柜中进行。

取 1 mL 葡萄酒样品并转移到 2 mL 具螺旋盖微管中。

添加浓度为 5.0×10^5 CFU/mL 的内标 20 μL。

9 300 *g* 下离心 30 s。

轻微倾斜微管倒去上清液。

将沉淀悬浮在 1 mL 10 m mol/L pH 8 的 Tris-HCl 中。

9 300 *g* 下离心 30 s，除去上清液。

稍微漩涡振荡使沉淀悬浮在残留液体中，-20℃可保存 3 个月。

一管将用于 DNA 抽提，另一管在-20℃下储存至获得已确认结果。

7.2 DNA 的提取

从新鲜或冷冻的沉淀中提取。一次操作不要超过 24 份样品。

通过称重添加 0.3 g 200 μm～500 μm 的玻璃珠，添加质量分数为 1%的 PVPP。

添加 200 μL 溶液 I。

添加 200 μL 的苯酚：氯仿：IAA(24：25：1)。

用自动搅拌器将细胞破碎(如：Genie 破碎器)4 次，每次 80 s，每次破碎后冷冻 80 s 左右(置于-20℃冷冻格)。

添加 200 μL 的 TE。

15 700*g* 离心 5 min。

小心收集 400 μL 的上层水相到 1.7 mL 的微管中。如果两相仍为混合，则重复上面的离心步骤。

添加 1 mL 的无水乙醇并倒转微管混合 4～5 次，室温下可保存数小时。

15 700*g* 离心 5 min 并轻微倾斜微管倒去上清液。

将沉淀悬浮在 400 μLTE 和 30 μL1 μg/μL RNase 中。

在 37℃下温育 5 min(然后回调到 48℃)。

添加 10 μL 4 mol/L 的醋酸铵和 1 mL 的无水乙醇，倒置混合。

15 700 *g* 离心 5 min。

倾斜微管倒去上清液，用滤纸吸去残留的液滴。

将沉淀干燥(将开盖微管放入 48℃的恒温金属浴中约 1 h)。

添加 25μL 的 TE 到沉淀中，漩涡振荡并在 4℃下放置 1 h～18 h(帮助 DNA 溶解)。用自动搅拌器混匀(-20℃下可保存数周)。

7.3 定量 PCR

对每一葡萄酒样品，采用添加 Brett rad3/4 引物的 2 孔以及带有 YAL 引物的 2 个内标孔。在每个平板中，用 TE 作为用来进行最终操作的每对引物的阴性对照。同时，用－20℃下储存的布鲁塞尔酒香酵母 DNA 作为阳性对照。制备阳性对照时，添加 5 μL 储备液(4.5 UG/mL)使终反应体积达到 25 μL。

PCR 扩增项目见表 1。

表 1

循环数	时间/s	温度/℃
1	180	95
40	30	95
	10	64.6
拟合曲线是在温度以每 10 s 下降 0.5℃的速率降到 90℃后建立的。		

Brett 引物孔数＝YAL 引物孔数＝2×样品数＋2

表 2 显示了样品数与所需孔数、各混合液的成分数量的函数关系。

表 2

样品数	孔数	超纯水/μL	SYBR Green 超混合液/μL	4 μmol/L 引物混合液/μL
1	4	26.3	65.6	13.1
2	6	36.8	91.9	18.4
3	8	47.3	118.1	23.6
4	10	57.8	144.4	28.9
5	12	68.3	170.6	34.1
6	14	78.8	196.9	39.4
7	16	89.3	223.1	44.6
8	18	99.8	249.4	49.9
9	20	110.3	275.6	55.1
10	22	120.8	301.9	60.4
11	24	131.3	328.1	65.6
12	26	141.8	354.4	70.9
13	28	152.3	380.6	76.1
14	30	162.8	406.9	81.4
15	32	173.3	433.1	86.6
16	34	183.8	459.4	91.9
17	36	194.3	485.6	97.1
18	38	204.8	511.9	102.4
19	40	215.3	538.1	107.6
20	42	225.8	564.4	112.9
21	44	236.3	590.6	118.1
22	46	246.8	616.9	123.4
23	48	257.3	643.1	128.6

将 4 μmol/L Brett 引物和 4 μmol/L 的 YAL 引物从冰箱中取出。

取出 SYBR Green 试剂(如果短时间内使用保存在 4℃,否则保存在－20℃)。

制备 Brett 混合物和 YAL 混合物。按上表中根据样品数量准备所对应的量。

将 20 μL 混合物加入到每孔的底部。

添加 5 μL 均质后的 DNA 溶液到自动搅拌器中(或采用 5 μL 水作为阴性对照)。

调整光学薄膜并装上平板。

7.4 结果的读取

取下板并直接放入处理袋中(不要打开它)。

将基线设置成 100。

分析(按下面的顺序进行):

阴性对照不会产生信号。如果观察到 C_t 值小于 37,重复操作,更换所有的溶液;

Brett 阳性对照:C_t值必须接近 25,熔点为 82.5℃(±0.5℃);

YAL 内标:如果获得 C_t 值,则检测产物的熔点(84℃±0.5℃)。如果产物不符,那么 Brett 信号的缺失不能被解释;

样品:检查布鲁塞尔酒香酵母产物的 T_m 值(82℃±0.5℃)。只要 T_m 值可接受,则检测扩增指数。然后记录 C_t 值并将它们标绘在标准曲线上。

注:C_t值是指目标序列的荧光值达到其阈值所需的时间。因此,它是扣除背景噪音后出现荧光信号所需的最少 PCR 循环次数。

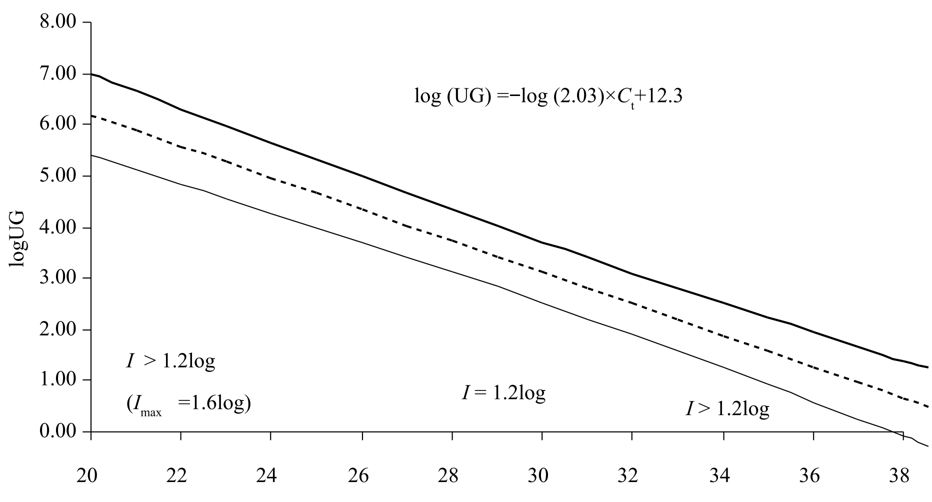


图 1

8 计算(结果)

5 株布鲁塞尔酒香酵母以 3.1×10^5 到 3 CFU/mL 的不同浓度在 14 种葡萄酒(3 种白葡萄酒,2 种桃红葡萄酒,9 种酚类物质含量差异较大的红葡萄酒)中培养。在 1%的 PVPP 存在下提取 DNA。

不同组合的葡萄酒和菌株中获得的一系列结果建立标准曲线。

从标准曲线中获得的结果的单位是 GU/mL(遗传单位/mL)。

$$\log GU = -\log(2.03) \times C_t + 12.34$$

9 方法特性:实验室内部验证参数

9.1 线性、重复性和再现性

6 点校准曲线是葡萄酒中 L02I1 菌株在浓度范围为 0 CFU/mL～2×10^5 CFU/mL 时 4 次重复得到的。该浓度范围的选择是依据正常水平下葡萄酒中布鲁塞尔酒香酵母的数目确定。测定所得的 log GU 和理论上的 log GU 的关系用回归分析来描述。回归系数、斜率和截距如下表所示。回归模型在 $\alpha=1\%$的风险和经过验证的选择线性域可接受,此时无模型误差。

将该方法的精确度和传统培养方法所获得结果相比较。3 位操作者制备的 DNA 提取自葡萄酒中培养的两种不同浓度水平的 L02I1 菌株:1.9×10^4(高)或 1.9×10^2(低)CFU/mL。每一提取的 DNA 需要经过 4 次重复 PCR。代表重复性(S_r)和再现性(S_R)的标准偏差从两种浓度水平的 log GU 值中计算获得(表 3)。对定量 PCR 而言,S_r 和 S_R在低浓度水平下相似,但在高浓度水平下 S_R要比 S_r 大很多。两种标准偏差均为传统微生物学方法的两倍。这是由于定量 PCR 技术操作步骤更多造成的。

表 3

参数	数值
回归方程	
浓度范围/(CFU/mL)	0－ 2×10^5
斜率(±SD)	0.957(0.044)
截距(±SD)	－0.049(0.142)
回归模型	$F_{观测值}>F(1.18)$:限于线性模型
模型误差	$F_{观测值}<F(4.18)$:无模型误差

精确度	
定量 PCR 方法 S_r(低浓度/高浓度)	0.26/0.25
微生物学方法 S_r(低浓度/高浓度)	0.17/0.04
定量 PCR 方法 S_R(低浓度/高浓度)	0.29/0.41
微生物学方法 S_R(低浓度/高浓度)	0.17/0.04
准确度	
43 个样品的平均值(D)	2.39(定量 PCR 方法)/2.25(微生物学方法)
$S_R D$	1.18
等值检验 $W=D/S_R D$	0.11<3 准确度可接受

9.2 检出限(LOD)和定量限(LOQ)[4]

LOD 和 LOQ 指示的是方法的灵敏度。LOD 是该方法所能检测出的最低数量,LOQ

是能精确定量的最小数量。在食品分析中，这些参数可以从背景中计算出来。然而，定量PCR不存在背景，因此，我们用两种其他的方法来测定LOD和LOQ值。第一种方法是用线性验证试验中获得的斜率、截距和标准误差来计算，采用该方法LOD和LOQ分别为3 GU/mL和31 GU/mL。第二种方法的LD是从10次独立实验所获得的阴性结果的菌数水平中得出的。分析接种5种菌株的14种葡萄酒的数据可以得出96%含有101 CFU/mL～250 CFU/mL的样品(48/50)显示阳性信号，当含量为26 CFU/mL～100 CFU/mL则有83%(49/59)为阳性，如果是5 CFU/mL～25 CFU/mL则65%(44/68)为阳性。因此，这种方法所得的检出限在26 CFU/mL～100 CFU/mL范围。通过对每个PCR实验进行系统重复试验，从经验公式$(1-p)^2$证实LOD值为5 CFU/mL。在菌数为5 CFU/mL时，88%的样品为阳性，当菌数为25 CFU/mL时样品阳性增加到97%。

参考文献

[1] Phister T. G., Mills D. A., 2003. Real-time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 7430-7434.

[2] Cocolin L., Rantsiou K., Iacu min L., Zironi R., Comi G., 2003. Molecular detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis Brettanomyces/Dekkera anomalus in spoiled wines*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 1347-1355.

[3] Ibeas J. I., Lozano I., Perdigones F., Jimenez J., 1996. Detection of *Dekkera-Brettanomyces* strains in sherry by a nested PCR method. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 998-1003.

[4] Tessonnière H., Vidal S., Barnavon L., Alexandre H., Remize F., 2009. Design and performance testing of a real-time PCR assay for sensitive and reliable direct quantification of *Brettanomyces in wine*. *International Journal of Food Microbiology*, 129: 237-243.

第 5 章 其他检验

方法 OIV-MA-AS5-01　　　　方法类型Ⅳ

强化葡萄汁和强化甜葡萄酒的区别

1 方法原理

1.1 筛选方法

OIV 国际葡萄酒酿酒法规定义的强化甜葡萄酒要求发酵自然产生的酒精不低于 4%；而强化葡萄汁则含不高于 1%。因此，可以通过气相色谱鉴定其发酵副产品而加以区分。本方法仅适用于生产强化葡萄汁的酒精为中性的情况。

1.2 采用薄层色谱法进行柠苹酸的科学调查

柠苹酸作为强化甜葡萄酒的特征物质，可采用离子色谱柱将糖分离去除后，用薄层层析法进行鉴别。

2 筛查方法

2.1 仪器

气相色谱仪：火焰离子化检测器，3 m 不锈钢柱，内径 2 mm；

固定相：Carbowax 20 M，20%。

载体：硅藻土载体 CHROMOSORB W60 目～80 目。

色谱条件：

温度：进样器：210℃；

检测器：250℃；

柱箱：70℃恒温 6 min；然后程序升温，6℃/min；

上限温度：170℃；

也可采用其他类型柱子。相关示例在下述程序中给出。

2.2 实验方法

2.2.1 样品制备

按照下列条件进行分离：向 25 mL 的样品(强化葡萄汁或强化甜葡萄酒酒)中加入 7 mL 乙醇和 15 g 硫酸铵$(NH_4)_2SO_4$，搅拌，静置分层。

2.2.2 色谱仪

提取有机相，进样 2 μL，按照上述条件进行色谱分析。通过确认酒精发酵的次级产品峰而鉴定强化甜葡萄酒。

3 用薄层层析法测定柠苹酸

3.1 仪器

3.1.1 长度约 300 mm、内径 10 mm～11 mm，配有流量调节器（活塞）的玻璃柱。

3.1.2 旋转蒸发仪。

3.1.3 烘箱，100℃。

3.1.4 色谱展开缸。

3.1.5 微量注射器或移液器。

3.2 试剂

3.2.1 甲酸溶液，4 mol/L，每升含甲酸 150.9 mL（$\rho_{20\,℃}$ =1.227 g/mL）。

3.2.2 含纤维素粉末层的色谱板（如 MN 300）（20 cm×20 cm）。

3.2.3 溶剂：

含有 1 g/L 的溴酚蓝的异丙醇	5 体积
1，8-桉叶素	5 体积
甲酸（$\rho_{20\,℃}$ =1.227 g/mL）	2 体积

用蒸馏水定容，静置 24 h 后使用

3.2.4 标准溶液

制备水溶液

柠苹酸	0.25 g/L
乳酸	0.5 g/L
柠檬酸	0.5 g/L
酒石酸	1.0 g/L
苹果酸	1.0 g/L

3.3 步骤

3.3.1 离子交换柱的制备

请参阅 OIV-MA-AS313-05A 酒石酸。

3.3.2 有机酸柠苹酸的分离

有机酸在离子交换剂上的固定请参阅 OIV-MA-AS313-05A 酒石酸进行操作。

然后用 4 mol/L 的甲酸溶液（100 mL）洗脱被固定的酸，用 100 mL 容量瓶收集洗脱液。在 40℃旋转蒸发器中浓缩干燥洗脱液，用 1 mL 蒸馏水复溶残余物。

3.3.3 色谱测定

将纤维素板放在 100℃烘箱中烘 2 h 活化。将 10 μL 样品溶液、10 μL 柠苹酸及其他有机酸标准溶液加在纤维素板的约 2 cm 宽的起始线上。将板放入色谱缸中 45 min。待溶剂展开并迁移到 15 cm 高处。

3.3.4 色谱展开

将色谱板置于室温下，空气吹干，直到溶剂中的甲酸挥发完全。在蓝色的背景中出现黄色斑点，说明有酸的存在。

通过对样品液、柠苹酸及其他有机酸标准溶液的斑点进行比较，可以检测柠苹酸是否存在于分析样品中。

参 考 文 献

Method of Screening：

[1] HARVALIA A.，F. V.，O. I. V.，1980，n° 728 bis.

[2] Chromatography ofcitramalic acid：

[3] Dimotaki-Kourakou V.，Ann. Fals. Exp. Chim.，1960，53，149.

[4] Dimotaki-Kourakou V.，C. R. Ac. Sci.，Paris 1962，254，4030.

[5] Carles J.，Lamazou-Betbeder M. & PECH M.，C. R. Ac. Sci.，Paris 1958，246，2160.

[6] Castino M.，Riv. Vit. Enol.，1967，6，247.

[7] Kourakou V.，F. V.，O. I. V.，1977，n° 642.

[8] Junge Ch F. V.，O. I. V.，1978，n° 679.

[9] Rouen J.，F. V.，O. I. V.，1979，n° 691.

第 2 部分

分析证书

OIV-MA-B1-01

分析方法应用原则

对于葡萄酒的质量控制可以通过如下两种方式进行：

a）通过感官评价，

b）对葡萄酒中的主要特征成分进行测定。

本书中没有涉及葡萄酒的感官评价方法，但在实际葡萄酒质量控制中感官评价是必要的，各国依据具体情况采用适合的感官评价体系进行评价。

葡萄酒中的主要特征成分的测定主要涉及以下三种类型：

1. 葡萄酒商业交易基础：葡萄酒基本指标的检测（1 号证书）；

2. 葡萄酒贸易要求：葡萄酒质量与特征指标的检测（2 号证书）；

除去 1，2 号证书要求的内容，其他的指标的检测，可以通过合同等形式进行体现或要求。

3. 其他特定指标检测（3 号证书）；

依据 2 号证书可以免除经营者的相关责任。

依据 3 号证书可以免除进口商的相关责任。

葡萄酒行业内或消费者对涉及公共健康问题的指标提出质疑时，不仅 OIV 和监管部门可以要求其进行相关检测，其他利益相关方也可以要求进行检测。

对于受到多方关注的公共健康问题，通过启动紧急程序，将其提交到特殊问题处理专家组。

涉及的相关分析测定，推荐使用本著作中的检测方法。

OIV-MA-B1-02

分析证书

1号证书

——颜色；
——透明度；
—— 20℃的比重；
—— 20℃的酒精含量；
——总干浸出物(g/L)；
——糖(g/L)；
——总二氧化硫(mg/L)；
——pH；
——总酸度(毫克当量/L)；
——挥发性酸度(毫克当量/L)；
——锦葵素葡萄糖苷测试；
——汽泡酒的二氧化碳压力测量；
——甜葡萄酒中强化甜葡萄酒和强化葡萄汁的区分。

2号证书

除1号证书中的项目外,需加入以下项目：
——灰和碱性灰(g/L)；
——钾(g/L)；
——铁(mg/L)；
——铜(mg/L)；
——游离二氧化硫(mg/L)；
——山梨酸(mg/L)；
——苹果乳酸发酵验证；
——柠檬酸(mg/L)；
——酒石酸(g/L)；
——福林-肖卡指数；
——色彩指数。
以下检测可选：
——过量的钠(mg/L)；
——钙、镁(mg/L)；
——硫酸盐(mg/L)；
——发酵试验；
——人工色素试验。

第 3 部分

各种物质最大可接受限量

OIV-MA-C1-01

葡萄酒中各种物质最大可接受限量

(2011 年发布)

- 柠檬酸:1 g/L。
- 挥发性酸度:20 毫克当量 g/L。某些加强陈年葡萄酒(由政府控制并符合特殊立法的葡萄酒)挥发性酸度可能会超过此限。
- 砷:0.2 mg/L。
- 硼:80 mg/L(以硼酸表示)。

溴:1 mg/L(来自某些咸水底土葡萄园的葡萄酒例外,可能超过此限)。

镉:0.01 mg/L。

铜(434-2011 OENO):1 mg/L,产自未发酵或轻微发酵葡萄汁的力娇酒则为 2 mg/L。

二甘醇:定量限≤10 mg/L。

二葡萄糖苷:15 mg/L(采用本书定量方法测定葡萄糖苷)。

银:<0.1 mg/L。

总二氧化硫:(oneo 9/98):

最多含 4 g/L 还原性物质的红葡萄酒:150 mg/L。

最多含 4 g/L 还原性物质的白葡萄酒和桃红葡萄酒:200 mg/L。

含超过 4 g/L 的还原性物质的红葡萄酒、桃红葡萄酒和白葡萄酒:300 mg/L。

特殊情况下,一些甜白葡萄酒:400 mg/L。

乙二醇/乙烯乙二醇:≤10 mg/L

氟化物:1 mg/L(来自符合国内法处理的葡萄园的葡萄酒除外,在该情况下,冰晶石氟化物水平不得超过 3 mg/L)。

甲醇:(OENO 19/2004 号):

红葡萄酒 400 mg/L。

白葡萄酒和桃红葡萄酒 250 mg/L。

赭曲霉毒素 A(CST 1/2002):2 μg/L(适用于 2005 年收获葡萄酒)。

铅(13/06 OENO):0.15 mg/L,适用于 2007 年开始制造的葡萄酒。

丙烷-1,2-二醇/丙二醇(20/2003 OENO):

静态葡萄酒:150 mg/L。

起泡葡萄酒:300 mg/L。

过量的钠(12/2007 OENO):80 mg/L。

硫酸盐 1 g/L(以硫酸钾计):

但该限量可提高到:

$$\left.\begin{array}{l}\text{装入桶中经历至少 2 年成熟期的葡萄酒}\\\text{甜葡萄酒}\\\text{产自添加酒精或可饮用酒精到葡萄汁或葡萄酒的葡萄酒}\end{array}\right\}1.5\ \text{g/L}$$

加入浓缩葡萄汁的葡萄酒
自然甜型葡萄酒 　2.0 g/L

——过滤后的葡萄酒　2.5 g/L

- 锌:5 mg/L

第 4 部分

建　议

OIV-MA-D1-01

葡萄糖酸

(决议 oeno 4/91)

葡萄酒和葡萄汁中经常含有葡萄糖酸。

葡萄酒中的葡萄糖酸主要源自于成熟度良好的葡萄原料,其含量为 200 mg/L～300 mg/L。

如果葡萄酒中存在高含量的葡萄糖酸(贵腐葡萄酒的特征成分),并不能说明葡萄在收获时感染了灰霉病而导致葡萄酒的质量不好,还需要用其他合适的方法进行证实。只有合适的葡萄酒酿造工艺才能保证葡萄酒的质量。

人为添加葡萄糖酸目前尚未发现,暂不需要考虑。

OIV-MA-D1-02

过度压榨葡萄酒的特点

(决议 oeno 5/91)

注意

基于诸多关于“过度压榨”对葡萄酒特性影响的讨论以及大量实验的基础之上，专家们一致认为葡萄酒的特性主要取决于葡萄品种。由于酿酒葡萄品种的多样性，因此不可能对所有相关的品种进行详细的描述与说明。同时也需要考虑到不同压榨方式与酿造工艺对葡萄酒的特性的影响，例如发酵前的浸渍作用。过度压榨对葡萄酒质量造成的影响以及如何定义过度压榨还需要进一步的研究与探讨。

OIV-MA-D1-03

葡萄酒中钠离子和氯离子浓度

(决议 Oeno 6/91)

注意

葡萄酒中氯离子和钠离子的浓度主要取决于葡萄栽培的地理条件、地质背景以及气候条件。通常情况下,二者的含量都较低。

采用靠近海岸的葡萄园中所酿造的葡萄酒中钠离子与氯离子的含量会增加。

如果葡萄园靠近海边,所酿造的葡萄酒中这些元素的含量会增加。这是因为干旱的土地被含盐的海水灌溉,形成咸水土壤,导致氯离子/钠离子的摩尔比会有显著的变化,甚至到1,就好像在葡萄酒中加了盐(NaCl)一样。

如果葡萄酒中含有过量的钠,除非在特殊情况下,通常含量不超过 60 mg/L。

考虑到上述因素,实验室和官方监控部门在处理氯和/或钠离子含量较高的葡萄酒时,判定为不合格之前可能需要向葡萄酒原产国提出询问。

第 5 部分

实验室质量控制

OIV-MA-AS1-05

有效性原则

(决议 Oeno7/98)

OIV 认为,除了《国际葡萄酒和葡萄汁分析方法大全》中所列出的方法外,还存在其他自动化程度高的通用分析方法。这些方法经济实惠,具有重要的商业意义,其核心是为葡萄酒生产与市场提供全面高效的分析检测服务。更重要的是,这些方法不仅使用了现代分析检测手段,同时还适应了分析检测技术的发展。

为了使实验室能够应用这些方法,并确保与《国际葡萄酒和葡萄汁分析方法大全》所述方法关联,OIV 决定针对与《概述》中所述的参考方法不同的替代方法、通用方法,制定一套实验室评价和确认方案。

本原则将适用于葡萄酒和葡萄汁分析的特定情况,其来源于现行国际标准,并允许实验室用以下两种方式评价和确认替代方法。

OIV-MA-AS1-07

实验室间比对实验

比对实验的目的是为分析方法的精密度提供量化指标，以实验的重复性 r 和再现性 R 表示。

重复性：指相同的样品用同一分析方法，在同等条件下（同一实验员，在同一实验室内，使用相同的仪器设备，并在短期内）所得到的独立测试结果，在规定的概率水平内两个独立测试结果的最大绝对偏差值。

再现性：指相同的样品用同一分析方法，在不同条件下（指不同实验员，不同仪器设备，不同实验室和/或不同时间）得到的独立测试结果，在规定的概率水平内两个独立测试结果的最大绝对偏差值。

术语“独立结果”是指完全按照标准方法对单个样品进行测试所得到的数值。除非特别注明，“置信概率”一般为 95%。

【总则】

• 用作实验的方法必须为标准化方法，即从现有方法中选择对于以后使用而言最通用的方法。

• 其实验方案必须清晰明确。

• 至少 10 个实验室参与比对。

• 试验样品必须是具有批次均一性的样品。

• 被测物质浓度必须包含常见的浓度。

• 参与比对实验的人员必须有专业技术和经验。

• 参比实验室每次比对实验必须是由同一实验室的同一实验员进行的。

• 严格按照方法进行实验，任何不同于实验方法的操作必须记录下来。

• 试验数据必须在相同条件下测定，如相同型号的仪器等。

• 试验数据必须独立且连续测定。

• 所有实验室的结果必须用相同的单位，保留相同位数的有效数字。

• 必须采用没有离群值的五个重复实验的数据。根据 Grubbs 检验法，若有一个实验数据偏离，则需要进行额外的三次测试。

【统计模型】

本文中的统计学方法均为单因素（如：浓度，样品）分析。如果有若干因素，必须对每个因素单独进行统计评价。如果在重复性（r）或再现性（R）和浓度（x）之间建立了线性关系（$y=bx$ 或 $y=a+bx$），则可根据 x 求得 r 或 R 的回归值。

假设下面给出的随机变量值符合正态分布。

步骤如下：

（1）每个实验室根据 Grubbs 检验法消除离群值。离群值是指与其他实验值的偏差太大，不能被视为随机误差的结果，前提是假设造成这种偏差的原因不详。

(2)通过 Bartlett 检验法和 Cochran 检验法比较总体方差，来检查是否所有实验室都达到相同的精确度。剔除那些具有统计偏差值的实验室。

(3)通过方差分析查找剩余实验室的系统误差，并利用 Dixon 检验法确定极端离群值。剔除那些得到显著离群值的实验室。

(4)利用剩余的数据，计算出可重复性 r 和它的标准偏差 S_r 以及再现性 R 和它的标准偏差 S_R。

注释

常见符号：

m	实验室的个数
$i(i=1,2\cdots m)$	实验室编号
n_i	从第 i 实验室得到的试验结果个数
$N=\sum_{i=1}^{m} n_i$	所有实验室的试验结果总个数
$x(i=1,2\cdots n_i)$	第 i 个实验室的试验结果数值
$\overline{x_i}=\frac{1}{n_i}\sum_{i=1}^{n_i} x_i$	第 i 个实验室的试验结果的平均值
$\overline{\overline{x}}=\frac{1}{N}\sum_{i=1}^{m}\sum_{i=1}^{n_i} x_i$	总平均值
$S_i=\sqrt{\frac{1}{n_i-1}\sum_{i=1}^{n_i}(x_i-\overline{x}_i)^2}$	第 i 个实验室的标准偏差

① 单个实验室实验结果离群值的检定

测得 5 个实验数据 x_i 后，利用 Grubbs 检验法判断离群值。

检验零假设，该假设规定与平均值绝对偏差最大的实验值不是离群观测值。

计算 $PG=\frac{|x_i^*-\overline{x}_i|}{s_i}$

x_i^* 被怀疑是离群值的测定值(可疑值)。

将 PG 值与表 1 中对应的临界值($P=95\%$时)进行比较：

如果 PG 值小于临界值，则 x_i^* 不是离群值，可用于计算 S_i。

如果 PG 值大于临界值，则 x_i^* 可能是离群值，须重新追加 3 次测试。

计算 8 次试验结果，利用 Grubbs 法判断 x_i^* 是否为离群值

PG 值大于对应的临界值($P=99\%$时)，则 x_i^* 是离群值，计算 S_i 时，须剔除 x_i^*

② 实验室间的差异比较——Bartlett 检验

Bartlett 检验法可以检测显著方差和不显著方差。它旨在检验所有实验室方差一致性的零假设，而不是检验存在于某些实验室方差不相等情况的备择假设。

每个实验室至少测得 5 个实验值。

测试的统计学数据计算：

$$PB=\frac{1}{C}\left[(N-m)\ln S_r^{\,2}-\sum_{i=1}^{m} f_i\ln S_i^{\,2}\right]$$

$$C=\frac{\sum_{i=1}^{m}\frac{1}{f_i}-\frac{1}{N-m}}{3(m-1)}+1$$

$$S_r^2=\frac{\sum_{i=1}^{m}f_iS_i^2}{N-m}$$

式中，$f_i=n_i-1$，为 S_i 的 n 自由度。

将 PB 值与表 2 中 $m-1$ 自由度对应的 x^2 的值进行比较。如果 PB 值大于表中数值，则方差之间存在差异。

Cochran 检验法用于确认某个实验室的方差是否大于其他实验室的方差。

检验统计量的计算：

$$PC=\frac{S_{i\max}^2}{\sum_{i=1}^{m}S_i{}^2}$$

比较 PC 值与表 3 中 $P=99\%$时对应的 m 和 n 值。如果 PC 值大于表中数值，则该方差明显大于其他实验室的方差。

如果利用 Bartlett 检验或 Cochran 检验得到显著结果，则剔除异常值方差并重新进行统计检验量的计算。

在没有适用于同时检验多个离群值的统计学方法情况下，可以重复运用上述方法进行检验，但应谨慎使用。

若某些实验室的方差彼此之间差异显著，必须调查原因并判断这些实验室得到的检测值是否应该被剔除。如果需要剔除，协调员必须考虑余下实验室的检测值的代表性。

如果统计分析表明存在明显的差异，说明各实验室的实验精密度不同。这可能是由于操作不当或实验方法描述不够清晰或描述不当。

③ 系统误差

实验室的系统误差常用 Fischer 法或 Dixon 检验法确定。.

R.A.Fischer 方差分析

此检验法适用于剩余的具有相同方差的实验室得到的实验值的分析。

本检验法用于确定这些实验室的平均值的扩展是否比以实验室间得到的偏差（$S_Z{}^2$）或者实验室内得到的偏差（$S_I{}^2$）表示的单独测试值大得多。

检验统计量的计算：

$$PF=\frac{S_Z{}^2}{S_I{}^2}$$

$$S_Z{}^2=\frac{1}{m-1}\sum_{i=1}^{m}n_i(\overline{x_i}-\overline{\overline{x}})^2$$

$$S_I{}^2=\frac{1}{N-m}\sum_{i=1}^{m}\sum_{i=1}^{n_i}(x_i-\overline{x}_i)^2$$

将 PF 值与表 4（F 分布）中自由度为 $f_i=f_Z=m-1$ 和 $f_2=f_1=N-m$ 时所对应的值进行比较。若 PF 大于表中数值，可以推断均值存在差异，也就是存在系统误差。

Dixon 检验法

本法用于确认某个实验室的平均值大于或小于其他实验室的平均值。

将数据序列 $Z(h)$，$h=1,2,3\cdots H$，按照递增顺序排列。

计算检验统计量：

3～7　　$Q_{10}=\dfrac{Z(2)-Z(1)}{Z(H)-Z(1)}$ 或 $\dfrac{Z(H)-(H-1)}{Z(H)-Z(1)}$

8～12　　$Q_{11}=\dfrac{Z(2)-Z(1)}{Z(H-1)-Z(1)}$ 或 $\dfrac{Z(H)-Z(H-1)}{Z(H)-Z(2)}$

13 以上　　$Q_{22}=\dfrac{Z(3)-Z(1)}{Z(H-2)-Z(1)}$ 或 $\dfrac{Z(H)-Z(H-2)}{Z(H)-Z(3)}$

将 Q 值的最大值与表 5 中的临界值进行比较：

a）如果 Q 值的最大值大于表中 $P=95\%$时对应的值，则认定该平均值为离群值(异常值)。

b）如果在 Fischer 方差分析或 Dixon 检验中得到显著性结果，则剔除极值并用余下数据重新计算。关于检验方法的重复运用，详见 B 部分的解释。

c）如果出现系统误差，则相关的实验值不能用于后续计算，并且必须查明引起系统误差的原因。

④ 计算可重复性(r)与再现性(R)

利用剔除了离群值的剩余数据，计算分析方法的特征参数重复性标准偏差 S_r 及可重复性(r)，重现性标准偏差 S_R 及重现性 R。

$$S_r=\sqrt{\frac{1}{N-m}\sum_{i=1}^{m}f_iS_i{}^2}\qquad r=S_r\times 2\sqrt{2}$$

$$S_R=\sqrt{\frac{1}{a}\left[S_Z^2+(a-1)S_I^2\right]}\quad R=S_R\times 2\sqrt{2}$$

$$a=\frac{1}{m-1}\left[\left(N-\sum_{i=1}^{m}\frac{n_i^2}{N}\right)\right]$$

若实验室间平均值相同，则 S_r 和 S_R 相同，或者 r 和 R 相同。如果实验室间平均值不同，即使出于实际考虑允许差异存在，仍需要标明 S_r 和 S_R，以及 r 和 R。

表 1　Grubbs 检验法的临界值表

n_i	$P=95\%$	$P=99\%$
3	1.155	1.155
4	1.481	1.496
5	1.715	1.764
6	1.887	1.973
7	2.020	2.139
8	2.126	2.274
9	2.215	2.387
10	2.290	2.482
11	2.355	2.564
12	2.412	2.636

表 2　Bartlett 检验法的临界值表($P=95\%$)

$f(m-1)$	X^2	$f(m-1)$	X^2
1	3.84	21	32.7
2	5.99	22	33.9
3	7.81	23	35.2
4	9.49	24	36.4
5	11.07	25	37.7
6	12.59	26	38.9
7	14.07	27	40.1
8	15.51	28	41.3
9	16.92	29	42.6
10	18.31	30	43.8
11	19.68	35	49.8
12	21.03	40	55.8
13	22.36	50	67.5
14	23.69	60	79.1
15	25.00	70	90.5
16	26.30	80	101.9
17	27.59	90	113.1
18	28.87	100	124.3
19	30.14		
20	31.41		

表 3　Cochran 检验法的临界值表

m	$n_i=2$		$n_i=3$		$n_i=4$		$n_i=5$		$n_i=6$	
	99%	95%	99%	95%	99%	95%	99%	95%	99%	95%
2	—	—	0.995	0.975	0.979	0.939	0.959	0.906	0.937	0.877
3	0.993	0.967	0.942	0.871	0.883	0.798	0.834	0.746	0.793	0.707
4	0.968	0.906	0.864	0.768	0.781	0.684	0.721	0.629	0.676	0.590
5	0.928	0.841	0.788	0.684	0.696	0.598	0.633	0.544	0.588	0.506
6	0.883	0.781	0.722	0.616	0.626	0.532	0.564	0.480	0.520	0.445
7	0.838	0.727	0.664	0.561	0.568	0.480	0.508	0.431	0.466	0.397
8	0.794	0.680	0.615	0.516	0.521	0.438	0.463	0.391	0.423	0.360
9	0.754	0.638	0.573	0.478	0.481	0.403	0.425	0.358	0.387	0.329

表 3(续)

m	$n_i=2$		$n_i=3$		$n_i=4$		$n_i=5$		$n_i=6$	
	99%	95%	99%	95%	99%	95%	99%	95%	99%	95%
10	0.718	0.602	0.536	0.445	0.447	0.373	0.393	0.331	0.357	0.303
11	0.684	0.570	0.504	0.417	0.418	0.348	0.366	0.308	0.332	0.281
12	0.653	0.541	0.475	0.392	0.392	0.326	0.343	0.288	0.310	0.262
13	0.624	0.515	0.450	0.371	0.369	0.307	0.322	0.271	0.291	0.246
14	0.599	0.492	0.427	0.352	0.349	0.291	0.304	0.255	0.274	0.232
15	0.575	0.471	0.407	0.335	0.332	0.276	0.288	0.242	0.259	0.220
16	0.553	0.452	0.388	0.319	0.316	0.262	0.274	0.230	0.246	0.208
17	0.532	0.434	0.372	0.305	0.301	0.250	0.261	0.219	0.234	0.198
18	0.514	0.418	0.356	0.293	0.288	0.240	0.249	0.209	0.223	0.189
19	0.496	0.403	0.343	0.281	0.276	0.230	0.238	0.200	0.214	0.181
20	0.480	0.389	0.330	0.270	0.265	0.220	0.229	0.192	0.205	0.174
21	0.465	0.377	0.318	0.261	0.255	0.212	0.220	0.185	0.197	0.167
22	0.450	0.365	0.307	0.252	0.246	0.204	0.212	0.178	0.189	0.160
23	0.437	0.354	0.297	0.243	0.238	0.197	0.204	0.172	0.182	0.155
24	0.425	0.343	0.287	0.235	0.230	0.191	0.197	0.166	0.176	0.149
25	0.413	0.334	0.278	0.228	0.222	0.185	0.190	0.160	0.170	0.144
26	0.402	0.325	0.270	0.221	0.215	0.179	0.184	0.155	0.164	0.140
27	0.391	0.316	0.262	0.215	0.209	0.173	0.179	0.150	0.159	0.135
28	0.382	0.308	0.255	0.209	0.202	0.168	0.173	0.146	0.154	0.131
29	0.372	0.300	0.248	0.203	0.196	0.164	0.168	0.142	0.150	0.127
30	0.363	0.293	0.241	0.198	0.191	0.159	0.164	0.138	0.145	0.124
31	0.355	0.286	0.235	0.193	0.186	0.155	0.159	0.134	0.141	0.120
32	0.347	0.280	0.229	0.188	0.181	0.151	0.155	0.131	0.138	0.117
33	0.339	0.273	0.224	0.184	0.177	0.147	0.151	0.127	0.134	0.114
34	0.332	0.267	0.218	0.179	0.172	0.144	0.147	0.124	0.131	0.111
35	0.325	0.262	0.213	0.175	0.168	0.140	0.144	0.121	0.127	0.108
36	0.318	0.256	0.208	0.172	0.165	0.137	0.140	0.119	0.124	0.106
37	0.312	0.251	0.204	0.168	0.161	0.134	0.137	0.116	0.121	0.103
38	0.306	0.246	0.200	0.164	0.157	0.131	0.134	0.113	0.119	0.101
39	0.300	0.242	0.196	0.161	0.154	0.129	0.131	0.111	0.116	0.099
40	0.294	0.237	0.192	0.158	0.151	0.126	0.128	0.108	0.114	0.097

表 4　F 检验法的临界值表(P=99%)

f_2	f_1														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	4 052	4 999	5 403	5 625	5 764	5 859	5 928	5 981	6 023	6 056	6 083	6 106	6 126	6 143	6 157
2	98.5	99.0	99.2	99.3	99.3	99.3	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4
3	34.1	30.8	29.4	28.7	28.2	27.9	27.7	27.5	27.3	27.2	27.1	27.1	27.0	26.9	26.9
4	21.2	18.0	16.7	16.0	15.5	15.2	15.0	14.8	14.7	14.5	14.5	14.4	14.3	14.2	14.2
5	16.3	13.3	12.1	11.4	11.0	10.7	10.5	10.3	10.2	10.1	9.96	9.89	9.82	9.77	9.72
6	13.7	10.9	9.78	9.15	8.75	8.47	8.26	8.10	7.98	7.87	7.79	7.72	7.66	7.60	7.56
7	12.2	9.55	8.45	7.85	7.46	7.19	6.99	6.84	6.72	6.62	6.54	6.47	6.41	6.36	6.31
8	11.3	8.65	7.59	7.01	6.63	6.37	6.18	6.03	5.91	5.81	5.73	5.67	5.61	5.56	5.52
9	10.6	8.02	6.99	6.42	6.06	5.80	5.61	5.47	5.35	5.26	5.18	5.11	5.05	5.01	4.96
10	10.0	7.56	6.55	5.99	5.64	5.39	5.20	5.06	4.94	4.85	4.77	4.71	4.65	4.60	4.56
11	9.64	7.20	6.21	5.67	5.31	5.07	4.88	4.74	4.63	4.54	4.46	4.39	4.34	4.29	4.25
12	9.33	6.93	5.95	5.41	5.06	4.82	4.64	4.50	4.39	4.30	4.22	4.16	4.10	4.05	4.01
13	9.07	6.70	5.74	5.21	4.86	4.62	4.44	4.30	4.19	4.10	4.02	3.96	3.90	3.86	3.82
14	8.86	6.51	5.56	5.04	4.69	4.46	4.28	4.14	4.03	3.94	3.86	3.80	3.75	3.70	3.66
15	8.68	6.36	5.42	4.89	4.56	4.32	4.14	4.00	3.89	3.80	3.73	3.67	3.61	3.56	3.52
16	8.53	6.23	5.29	4.77	4.44	4.20	4.03	3.89	3.78	3.69	3.62	3.55	3.50	3.45	3.41
17	8.40	6.11	5.18	4.67	4.34	4.10	3.93	3.79	3.68	3.59	3.52	3.46	3.40	3.35	3.31
18	8.29	6.01	5.09	4.58	4.25	4.01	3.84	3.71	3.60	3.51	3.43	3.37	3.32	3.27	3.23
19	8.18	5.93	5.01	4.50	4.17	3.94	3.77	3.63	3.52	3.43	3.36	3.30	3.24	3.19	3.15
20	8.10	5.85	4.94	4.43	4.10	3.87	3.70	3.56	3.46	3.37	3.29	3.23	3.18	3.13	3.09
21	8.02	5.78	4.87	4.37	4.04	3.81	3.64	3.51	3.40	3.31	3.24	3.17	3.12	3.07	3.03
22	7.95	5.72	4.82	4.31	3.99	3.76	3.59	3.45	3.35	3.26	3.18	3.12	3.07	3.02	2.98
23	7.88	5.66	4.76	4.26	3.94	3.71	3.54	3.41	3.30	3.21	3.14	3.07	3.02	2.97	2.93
24	7.82	5.61	4.72	4.22	3.90	3.67	3.50	3.36	3.26	3.17	3.09	3.03	2.98	2.93	2.89
25	7.77	5.57	4.68	4.18	3.85	3.63	3.46	3.32	3.22	3.13	3.06	2.99	2.94	2.89	2.85
26	7.72	5.53	4.64	4.14	3.82	3.59	3.42	3.29	3.18	3.09	3.02	2.96	2.90	2.86	2.81
27	7.68	5.49	4.60	4.11	3.78	3.56	3.39	3.26	3.15	3.06	2.99	2.93	2.87	2.82	2.78
28	7.64	5.45	4.57	4.07	3.75	3.53	3.36	3.23	3.12	3.03	2.96	2.90	2.84	2.79	2.75
29	7.60	5.42	4.54	4.04	3.73	3.50	3.33	3.20	3.09	3.00	2.93	2.87	2.81	2.77	2.73
30	7.56	5.39	4.51	4.02	3.70	3.47	3.30	3.17	3.07	2.98	2.91	2.84	2.79	2.74	2.70
40	7.31	5.18	4.31	3.83	3.51	3.29	3.12	2.99	2.89	2.80	2.73	2.66	2.61	2.56	2.52
50	7.17	5.06	4.20	3.72	3.41	3.19	3.02	2.89	2.78	2.70	2.62	2.56	2.51	2.46	2.42
60	7.07	4.98	4.13	3.65	3.34	3.12	2.95	2.82	2.72	2.63	2.56	2.50	2.44	2.39	2.35
70	7.01	4.92	4.07	3.60	3.29	3.07	2.91	2.78	2.67	2.59	2.51	2.45	2.40	2.35	2.31
80	6.96	4.88	4.04	3.56	3.25	3.04	2.87	2.74	2.64	2.55	2.48	2.42	2.36	2.31	2.27
90	6.92	4.85	4.01	3.53	3.23	3.01	2.84	2.72	2.61	2.52	2.45	2.39	2.33	2.29	2.24
100	6.89	4.82	3.98	3.51	3.21	2.99	2.82	2.69	2.59	2.50	2.43	2.37	2.31	2.27	2.22
200	6.75	4.71	3.88	3.41	3.11	2.89	2.73	2.60	2.50	2.41	2.34	2.27	2.22	2.17	2.13
500	6.69	4.65	3.82	3.36	3.05	2.84	2.68	2.55	2.44	2.36	2.29	2.22	2.17	2.12	2.07
□	6.63	4.61	3.78	3.32	3.02	2.80	2.64	2.51	2.41	2.32	2.25	2.18	2.13	2.08	2.04

表 4(续)

f_2	f_1														
	16	17	18	19	20	30	40	50	60	70	80	100	200	500	□
1	6 169	6 182	6 192	6 201	6 209	6 261	6 287	6 303	6 313	6 320	6 326	6 335	6 350	6 361	6 366
2	99.4	99.4	99.4	99.4	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.3	99.5	99.5
3	26.8	26.8	26.8	26.7	26.7	26.5	26.4	26.4	26.3	26.3	26.3	26.2	26.2	26.1	26.1
4	14.2	14.1	14.1	14.0	14.0	13.8	13.7	13.7	13.7	13.6	13.6	13.6	13.5	13.5	13.5
5	9.68	9.64	9.61	9.58	9.55	9.38	9.29	9.24	9.20	9.18	9.16	9.13	9.08	9.04	9.02
6	7.52	7.48	7.45	7.42	7.40	7.23	7.14	7.09	7.06	7.03	7.01	6.99	6.93	6.90	6.88
7	6.28	6.24	6.21	6.18	6.16	5.99	5.91	5.86	5.82	5.80	5.78	5.75	5.70	5.67	5.65
8	5.48	5.44	5.41	5.38	5.36	5.20	5.12	5.07	5.03	5.01	4.99	4.96	4.91	4.88	4.86
9	4.92	4.89	4.86	4.83	4.81	4.65	4.57	4.52	4.48	4.46	4.44	4.41	4.36	4.33	4.31
10	4.52	4.49	4.46	4.43	4.41	4.25	4.17	4.12	4.08	4.06	4.04	4.01	3.96	3.93	3.91
11	4.21	4.18	4.15	4.12	4.10	3.94	3.86	3.81	3.77	3.75	3.73	3.70	3.65	3.62	3.60
12	3.97	3.94	3.91	3.88	3.86	3.70	3.62	3.57	3.54	3.51	3.49	3.47	3.41	3.38	3.36
13	3.78	3.74	3.72	3.69	3.66	3.51	3.42	3.37	3.34	3.32	3.30	3.27	3.22	3.19	3.17
14	3.62	3.59	3.56	3.53	3.51	3.35	3.27	3.22	3.18	3.16	3.14	3.11	3.06	3.03	3.00
15	3.49	3.45	3.42	3.40	3.37	3.21	3.13	3.08	3.05	3.02	3.00	2.98	2.92	2.89	2.87
16	3.37	3.34	3.31	3.28	3.26	3.10	3.02	2.97	2.93	2.91	2.89	2.86	2.81	2.78	2.75
17	3.27	3.24	3.21	3.19	3.16	3.00	2.92	2.87	2.83	2.81	2.79	2.76	2.71	2.68	2.65
18	3.19	3.16	3.13	3.10	3.08	2.92	2.84	2.78	2.75	2.72	2.70	2.68	2.62	2.59	2.57
19	3.12	3.08	3.05	3.03	3.00	2.84	2.76	2.71	2.67	2.65	2.63	2.60	2.55	2.51	2.49
20	3.05	3.02	2.99	2.96	2.94	2.78	2.69	2.64	2.61	2.58	2.56	2.54	2.48	2.44	2.42
21	2.99	2.96	2.93	2.90	2.88	2.72	2.64	2.58	2.55	2.52	2.50	2.48	2.42	2.38	2.36
22	2.94	2.91	2.88	2.85	2.83	2.67	2.58	2.53	2.50	2.47	2.45	2.42	2.36	2.33	2.31
23	2.89	2.86	2.83	2.80	2.78	2.62	2.54	2.48	2.45	2.42	2.40	2.37	2.32	2.28	2.26
24	2.85	2.82	2.79	2.76	2.74	2.58	2.49	2.44	2.40	2.38	2.36	2.33	2.27	2.24	2.21
25	2.81	2.78	2.75	2.72	2.70	2.54	2.45	2.40	2.36	2.34	2.32	2.29	2.23	2.19	2.17
26	2.78	2.75	2.72	2.69	2.66	2.50	2.42	2.36	2.33	2.30	2.28	2.25	2.19	2.16	2.13
27	2.75	2.71	2.68	2.66	2.63	2.47	2.38	2.33	2.29	2.27	2.25	2.22	2.16	2.12	2.10
28	2.72	2.68	2.65	2.63	2.60	2.44	2.35	2.30	2.26	2.24	2.22	2.19	2.13	2.09	2.06
29	2.69	2.66	2.63	2.60	2.57	2.41	2.33	2.27	2.23	2.21	2.19	2.16	2.10	2.06	2.03
30	2.66	2.63	2.60	2.57	2.55	2.39	2.30	2.25	2.21	2.18	2.16	2.13	2.07	2.03	2.01
40	2.48	2.45	2.42	2.39	2.37	2.20	2.11	2.06	2.02	1.99	1.97	1.94	1.87	1.85	1.80
50	2.38	2.35	2.32	2.29	2.27	2.10	2.01	1.95	1.91	1.88	1.86	1.82	1.76	1.71	1.68
60	2.31	2.28	2.25	2.22	2.20	2.03	1.94	1.88	1.84	1.81	1.78	1.75	1.68	1.63	1.60
70	2.27	2.23	2.20	2.18	2.15	1.98	1.89	1.83	1.78	1.75	1.73	1.70	1.62	1.57	1.54
80	2.23	2.20	2.17	2.14	2.12	1.94	1.85	1.79	1.75	1.71	1.69	1.65	1.58	1.53	1.49
90	2.21	2.17	2.14	2.11	2.09	1.92	1.82	1.76	1.72	1.68	1.66	1.62	1.55	1.50	1.46
100	2.19	2.15	2.12	2.09	2.07	1.89	1.80	1.74	1.69	1.66	1.63	1.60	1.52	1.47	1.43
200	2.09	2.06	2.03	2.00	1.97	1.79	1.69	1.63	1.58	1.55	1.52	1.48	1.39	1.33	1.28
500	2.04	2.00	1.97	1.94	1.92	1.74	1.63	1.56	1.52	1.48	1.45	1.41	1.31	1.23	1.16
□	2.00	1.97	1.93	1.90	1.88	1.70	1.59	1.52	1.47	1.43	1.40	1.36	1.25	1.15	1.00

表 5 Dixon 检验法的临界值

检验标准	m	临界值 95%	临界值 99%
$Q_{10}=\frac{Z(2)-Z(1)}{Z(H)-Z(1)}$或$Q_{10}=\frac{Z(H)-Z(H-1)}{Z(H)-Z(1)}$，取数值较大者	3	0.970	0.994
	4	0.829	0.926
	5	0.710	0.821
	6	0.628	0.740
	7	0.569	0.680
	8	0.608	0.717
	9	0.564	0.672
	10	0.530	0.635
	11	0.502	0.605
	12	0.479	0.579
$Q_{22}=\frac{Z(3)-Z(1)}{Z(H-2)-Z(1)}$或$Q_{22}=\frac{Z(H)-Z(H-2)}{Z(H)-Z(3)}$，取数值较大者	13	0.611	0.697
	14	0.586	0.670
	15	0.565	0.647
	16	0.546	0.627
	17	0.529	0.610
	18	0.514	0.594
	19	0.501	0.580
	20	0.489	0.567
	21	0.478	0.555
	22	0.468	0.544
	23	0.459	0.535
	24	0.451	0.526
	25	0.443	0.517
	26	0.436	0.510
	27	0.429	0.502
	28	0.423	0.495
	29	0.417	0.489
	30	0.412	0.483
	31	0.407	0.477
	32	0.402	0.472
	33	0.397	0.467
	34	0.393	0.462
	35	0.388	0.458
	36	0.384	0.454
	37	0.381	0.450
	38	0.377	0.446
	39	0.374	0.442
	40	0.371	0.438

表 6 比对试验结果分析

实验室编号	分析									样品			
	独立值 x_1												
	1	2	3	4	5	6	7	8		n_1	x_1	s_1	s_1^2
1	548	556	558	553	542					5	551	6.47	41.8
2	300	299	304	308	300					5	302	3.83	14.7
3	567	558	563	532*	560	560	563	567		7	563	3.51	12.3
4	557	550	555	560	551					5	555	4.16	17.3
5	569	575	565	560	572					5	568	5.89	34.7
6	550	546	549	557	588	570	576	568		8	563	14.92	222.6
7	557	560	560	552	547					5	555	5.63	31.7
8	548	543	560	551	548					5	550	6.28	39.5
9	558	563	551	555	560					5	556	5.63	31.7
10	554	559	551	545	557					5	553	5.5	30.2

统计数据：

实验室内：$s_1=\pm$ 5.37，$f_1=34$

实验室间：$s_z=\pm$ 13.97，$f_z=7$

$s_r=\pm$ 5.37　$r=15$　$s_R=\pm$ 7.78　$R=22$

Bartlett 检验：$PB=3.16<15.51$（95%；$f=8$）

方差分析：$PF=6.76>3.21$（99%；$f_1=7$；$f_2=34$）

参考文献

[1] AFNOR，norme NFX06041，*Fidélitè des méthodes d'essai. Déter mination de la répétabilité et de la reproductibilité par essais interlaboratoires.*

[2] DAVIES O. L.，GOLDSMITH P. l.，*Statistical Methods in Research and Production*，Oliver and Boyd，Edinburgh，1972.

[3] GOETSCH F. H.，KRÖNERT W.，OLSCHIMKE D.，OTTO U.，VIERKÖTTER S.，*Meth. An.*，1978，No 667.

[4] GOTTSCHALK G.，KAISER K. E.，*Einführung in die Varianzanalyse und Ringversuche*，B1 Hoschultaschenbücher，Band 775，1976.

[5] GRAF，HENNING，WILRICH，*Statistische Methoden bei textilen Untersuchungen*，Springer Verlag，Berlin，Heidelberg，New York，1974.

[6] GRUBBS F. E.，*Sample Criteria for Testing Outlying Observations*，The Annals of Mathematical Statistics，1950，vol. 21，p 2758.

[7] GRUBBS F. E.，*Procedures for Detecting Outlying Observations in Samples*，Technometrics，1969，vol. 11，No 1，p 121.

[8] GRUBBS F. E. and BECK G. , *Extension of Sample Sizes and Percentage Points for Significance Tests of Outlying Observations*, *Technometrics*, 1972, vol. 14, No 4, p 847854.

[9] ISO, norme 5725.

[10] KAISER R. , GOTTSCHALK G. , *Elementare Tests zur Beurteilung von Messdaten*, BI Hochschultaschenbücher, Band 774, 1972.

[11] LIENERT G. A. , *Verteilungsfreie Verfahren in der Biostatistik*, Band I, Verlag Anton Haine, Meisenheim am Glan, 1973.

[12] NALIMOV V. V. , *The Application of Mathematical Statistics to Chemical Analysis*, Pergamon Press, Oxford, London, Paris, Frankfurt, 1963.

[13] SACHS L. , *Statistische Auswertungsmethoden*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1968.

OIV-MA-AS1-08

方法的可靠性

(决议 Oeno 5/99)

由比对实验得到的关于分析方法可靠性的数据,适用于以下情况:

1) 验证利用标准方法测得的实验结果;

2) 评价超出标准限量的分析结果;

3) 比较两个或以上实验室得到的实验结果,并将这些结果与参考值进行比较。

4) 评价利用非标准方法测得的结果。

1. 验证利用标准方法测得的实验结果的可接受性

分析结果的有效性取决于以下几点:

- 实验室应按照质量管理体系执行全部分析工作。质量管理体系包括实验室管理、岗位职责、操作规程等;
- 作为质量管理体系的一部分,实验室应根据内部质量管理程序运行;
- 获得的检测结果应符合内部质量管理程序所规定的可接受性标准。

内部质量管理程序应根据国际认可标准来建立,如 IUPAC 的《分析实验室内部质量控制协作指南》。

内部质量管理意味着要进行标准物质分析。标准品应由用于待检测的样本模板组成,并含有适当的已知浓度的待测分析物质,该物质与样品中的目标物质相似。标准物质应尽可能经国际承认的组织认可。

然而,许多类型的分析并没有法定标准物质。在这种情况下一方面可以使用多个实验室在能力验证中使用的样品,并将实验结果的平均值作为待测物质的指定值。另一方面也可以利用模拟溶液(已知组分)作标准物质或者利用加标回收法加入已知剂量的待测物质到样品(该样品不包含待测物质)中制备成为标准品。

通过在一系列样品中加入标准物质并对试样和标准物质进行平行分析比对来进行质量控制。质量控制不仅能对检测方法的正确实施进行验证,同时它应该独立于分析校准和实验方案之外,并以对二者进行验证为目标。

系列样品是指在可重复条件下测试的大量样品。实验室内部质量控制有助于保证不确定度保持在适当水平以下。

如果分析结果被认为是正态总体的一部分,则只有 0.3%左右的结果是在 $m \pm 3s$ 范围以外的(平均值为 m,标准偏差为 s)。当获得异常值(超出 $m \pm 3s$ 范围)时,则认为该体系不符合统计学要求,是不可靠的数据。

质量控制是利用 Shewhart 控制图的图形呈现。如图 1 所示,由标准品测得的数值置于垂直轴上,样品序列号置于水平轴。该图还包含代表平均值 m,警戒限 $m \pm 2s$ 和处置界限 $m \pm 3s$的水平线。

为了对标准偏差进行评估,应对对照样进行分析,其应包含至少 12 次试验,并且成对地进行分析。每个样品的分析对应该在重复条件下进行分析,并且是随机插入样品序列的。在不同日期进行重复测定,以反映不同样品序列之间的合理变化。这些变化有多种起因:反

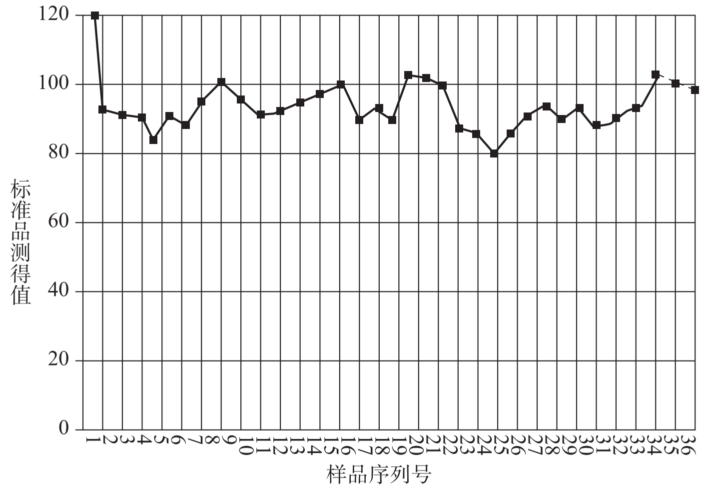


图 1　SHEWHART 控制图

应物成分的更改，仪器的重新校准，甚至是操作人员的不同。利用 Grubbs 检验法消除异常值后，计算标准偏差用以构建 Shewhart 图。将此标准偏差与标准方法的标准偏差进行比较。如果未达到标准方法规定的精度水平，应对其原因进行调查。

应该通过重复指定的程序，对实验室的精密度范围进行定期校订。

建立质量控制图后，用曲线图表示每个系列质控物所得的结果。

如有下列情况，则该系列被认为脱离统计学控制：

a）出现偏离处置界限的数值；

b）当前数值以及之前的数值在处置界限之内但在警戒限之外；

c）9 个连续值位于平均值的同一侧。

实验室对“脱离控制”作出的措施是：摒除该系列结果，并进行测试以确定原因，然后采取措施以纠正这种情况。

Shewhart 控制图也可以绘制成表示相同样品的成对分析之间的差异的图形，特别是没有标准品的情况。在这种情况下，可用曲线图表示相同样品两次分析之间的绝对误差。图中低限是 0，警戒限是 $1.128S_w$，处置界限是 $3.686S_w$，S_w指此系列的标准偏差。

这种类型的图形只用于说明可重复性。它应该不超过该方法已发布的重复性限量值。

在缺少质控样的情况下，有时需要通过比较获得的结果与其他实验室用相同样品得到的结果来验证结果未超出对照法的重现性限量值。

每个实验室均进行两个平行测试，并使用下面的公式进行计算：

$$C_rD_{95}(\bar{y}_1-\bar{y}_2)=\sqrt[2]{R^2-\frac{r^2}{2}}$$

其中，C_rD_{95}——临界差值（置信度 $P=0.95$）；

$\bar{y}_1$——实验室 1 所得的两个结果的平均值；

$\bar{y}_2$——实验室 2 所得的两个结果的平均值；

R——标准方法的再现性；

r——标准方法的可重复性。

如果超过临界值，须寻找潜在原因并在一个月内重复测试。

2. 评估超过法定限量值的分析结果

当检测结果超出法定上限时，应按照下列程序操作：

a）对于单个结果（超出法定限量值时），须在可重复性条件下进行第二次测试。如果无法在重复性条件下进行第二次测试，则须在重复的条件下进行双重分析并用所得数据评价临界差值；

b）须确定在重复条件下所得结果的平均值与法定限量值之间的绝对差值。若差值大于临界距离，则此样品不符合标准。

用下列公式计算临界差值：

$$C_r D_{95}(\bar{y}-m_0)=\frac{1}{2\sqrt{2}}\sqrt[2]{R^2-r^2\ \frac{n-1}{n}}$$

其中：$\bar{y}$——所得结果的平均值；

m_0——限量值；

n——测试次数；

R——再现性；

r——可重复性。

换言之，这一最大界限表示所得结果的算术平均值不应大于 $m_0+C_r D_{95}(y-m_0)$

若这一界限为最小界限，所得结果的算术平均值不应小于

$$m_0-C_r D_{95}(y-m_0)$$

3. 比较两个或两个以上实验室所得结果，并比较实验结果与参考值

为了判断两个实验室测得的结果是否一致，可计算两个结果的绝对差，并和临界差值进行比较：

$$C_r D_{95}(\bar{y}_1-\bar{y}_2)=\sqrt[2]{R^2-r^2\left(1-\frac{1}{2n_1}-\frac{1}{2n_2}\right)}$$

其中：$\bar{y}_1$——实验室 1 两次测定值的平均值；

$\bar{y}_2$——实验室 2 两次测定值的平均值；

n_1——实验室 1 的样品数；

n_2——实验室 2 的样品数；

R——标准方法的再现性；

r——标准方法的可重复性。

如果结果是两次测试的平均值，则方程式可以简化为：

$$C_r D_{95}(\bar{y}_1-\bar{y}_2)=\sqrt[2]{R^2-\frac{r^2}{2}}$$

如果数据为单个结果，则临界差值就是 R。若没有超出临界差值，则说明两个实验室的结果是一致的。

比较多个实验室所得结果与参考值：

假设 p 个实验室进行了 n_1 次测定，单个实验室的平均值是 y_i，总平均值是：

$$\bar{y}=\frac{1}{p}\sum\bar{y}_i$$

将所有实验室的平均值与参考值进行比较。使用下列公式计算，如果绝对差超过临界

差值，则断定所得结果与参考值不一致：

$$C_rD_{95}(\bar{y}-m_0)=\frac{1}{\sqrt[2]{2p}}\sqrt[2]{R^2-r^2\left(1-\frac{1}{p}\sum\frac{1}{n_1}\right)}$$

C_rD_{95} 为临界差值，按第 2 点的标准方法计算。

例如，参考值可能由标准物质测得，或者来源于同一或不同实验室用不同方法测得的结果。

4. 利用未经验证的方法所得分析结果的评估

可以通过与第二个实验室进行比较为未经验证的方法设定一个临时再现性值。

$$R_{pov}=\sqrt[2]{(\bar{y}_1-\bar{y}_2)^2+\frac{r^2}{2}}$$

其中：$\bar{y}_1$——实验室 1 所得的两个结果的平均值；

$\bar{y}_2$——实验室 2 所得的两个结果的平均值；

r——标准方法的可重复性。

临时的再现性可用来计算临界差值。如果临时再现性少于可重复性的 2 倍，应该设定为 $2r$。一个大于 3 倍再现性值，或大于用 Horwitz 方程计算所得值两倍的可重复性值，是不可用的。

Horwitz 方程：

$$RSD_R\%=2^{1-0.5\log_{10}^{c}}$$

$RSD_R\%$ 为再现性的标准差（用平均值的百分数表示）；c 为浓度，用十进制的小数表示（例如，10 g/100 g=0.1）。

该方程是由 3000 多次协作研究的经验所得，这些协作研究包括各种不同的检测物质、基质和检测技术。在缺乏其他信息的情况下，RSD_R 值少于或等于用 Horwitz 方程算出的 RSD_R 值（见表 1）仍然是可接受的。

表 1　利用 Horwitz 方程计算得到的 RSD_R 值

浓度	RSD_R/%
10^{-9}	45
10^{-8}	32
10^{-7}	23
10^{-6}	16
10^{-5}	11
10^{-4}	8
10^{-3}	5.6
10^{-2}	4
10^{-1}	2.8
1	2

如果利用未经验证的方法所得的结果接近法定限量，利用如下方法确定检测限（上限）：

$$S=m_0+\{(R_{rout}/R_{ref})-1\}\times C_rD_{95}$$

对于下限：

$$S=m_0-\{(R_{rout}/R_{ref})-1\}\times C_rD_{95}$$

其中：S——判定限量；

m_0——法定限量；

R_{rout}——未经验证方法的临时再现性；

R_{ref}——标准方法的再现性；

C_rD_{95}——临界差值，按标准方法的第 2 点来计算。

如果结果超过了检测限，则应该替换为利用标准方法获得的最终结果。

非 95％概率水平的临界差值

这个临界差值可以由 95％概率水平下的临界差值乘以表 2 中的相应系数得到。

表 2　用于计算 95％概率水平以外的临界差值的乘法系数

概率水平 P	乘法系数
90	0.82
95	1.00
98	1.16
99	1.29
99.5	1.40

参考文献

[1] "Harmonized Guidelines for Internal Quality Control in Analytical Chemistry Laboratories". IUPAC. Pure and App. Chem. Vol 67，n° 4，649-666，1995.

[2] "Shewhart Control Charts" ISO 8258.1991.

[3] "Precision of test methods-Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by inter-laboratory tests". ISO 5725，1994.

[4] "Draft Commission Regulation of establishing rules for the application of reference and routine methods for the analysis and quality evaluation of milk and milk products". Commission of the European Communities，1995.

[5] "Harmonized protocols for the adoption of standardized analytical methods and for the presentation of their performance characteristics". IUPAC. Pure an App. Chem.，Vol. 62，n° 1，149-162. 1990.

OIV-MA-AS1-09

实验室间比对计划的设计、实施和解释方案

(决议 Oeno 6/2000)

【前言】

经过多次的会议和研讨后,来自 27 个组织的代表都一致接受了“合作研究的设计,实施和解释权协议”,并刊登于 Pure & Appl. Chem. 1995 年,第 60 期,855-864 页。许多机构组织已接受并起用了该协议。结合到实际使用经验和分析方法与采样 Codex 专业委员会的建议(联合国粮农组织(FAO)/世界卫生组织(WHO)食品标准项目,第 18 次报告会议,1992 年 11 月 9 日~13 日;联合国粮农组织,意大利罗马,ALINORM 93/23,条款 34~39),需要对原协议进行三处小修订,包括是(1)删除“双水平设计”,因为其产生的相互作用项依赖于水平选择,而且如果其达到统计学显著水平,则无法解释其相互作用的物理意义;(2)扩大“材料”的定义;(3)异常值去除标准从 1%变为 2.5%。

修订后的草案转载如下。为了提高可读性,还做了一些编辑性的小修改。“多实验室研究命名法”的词汇和定义,(1994 年推荐规范)[发表于 Pure Appl Chem.,1994 年,第 66 期,1903-1911 页],以及修改后更适用于分析化学的国际标准化组织 ISO 的适当条款。

【协议】

1　前期工作

方法性能的(协作)研究需要进行大量的工作,并且只能对已经进行了充分的前期测试的实验方法进行研究。这样的实验室内部测试应该包括如下信息:

1.1　精密度的预评估

对实验室内部所有浓度范围(至少包括最高限量和最低限量)的分析结果的总标准偏差进行评价,并且特别注意标准值或者规范值。

注 1:与 ISO 的可重复性标准偏差(3.3 节)相比,实验室内总标准偏差能更好地衡量不精确性。该标准偏差是关于方法性能研究的最大的实验室内精密度变量,它至少包含了不同时期的变异性,最好还包括了不同校准曲线的变异性,同时它也包含了批次内变异性以及批次间的变异性。由此,它可以作为一个衡量实验室内再现性的量度。除非数值在可接受范围内,否则它不能用于预期实验室间标准偏差(再现性标准偏差)。在本协议中,术语“精确度”不能从最小研究中评估得到。

注 2:实验室内总标准偏差也可从耐用性试验中评估得出,耐用性试验指出实验因素控制的严格程度以及这些因素的允许范围。这些实验确定的范围应该纳入方法描述中。

1.2　系统误差(偏离)

对目标物质所有浓度范围(至少包括最高限量和最低限量)的分析结果的系统误差的评价,并且特别强调标准值或者规范值。

应该注明利用该方法检测相关标准物质所得结果。

1.3　回收率

向原材料、萃取物、消化物或者其他经过处理的溶液中加标后的回收率。

1.4 适用性

适用于在考虑基质效应的基础之上，鉴定和测量样品中可能存在的待测物的物理和化学形态。

1.5 干扰

一定量的其他成分的物质在基质中的存在会影响检测结果。

1.6 方法比较

该方法测定的实验结果与利用该方法测定的其他实验(目的类似)结果进行比对。

1.7 校准程序

指定的校准程序和空白校正程序不得引入重要偏差到结果中。

1.8 方法描述

方法描述必须清楚明白。

1.9 有效数字

主办实验室应该基于测量仪器输出的结果来指明报告多少位有效数字。

注：利用计算器或者计算机对报告数据进行统计计算时，在得到最终报告平均值和标准偏差前，都不能进行四舍五入或者截断运算。最终，标准偏差取 2 位有效数字，并且平均值和相对标准偏差均进行调整以适应标准偏差的有效数字位数。例如，据报道如果标准偏差 $S_R=0.012$，均数 c 应报告为 0.147，不是 0.147 3 或 0.15，相对标准偏差报告为 8.2%(符号定义见 Appendix L)。如果标准偏差必须由人工计算，在中间结果转换过程中，保留的平方数的有效数字位数应该是最终结果数据有效数字位数的 2 倍再加 1。

2 方法性能研究的设计

2.1 材料数量

对于一种类型的物质，至少使用 5 份材料(测试样本)，只有涉及单个基质的单水平规格时，才可以将最少测试样本数量降低到 3。对于该设计参数，双水平设计的两个部分以及每个实验室盲样重复测试的两部分都算作一份样本。

注 1：材料是指方法性能参数适用的“分析物/基质/浓度”构成的组合。该参数决定了方法的适用范围。为了能应用到多种不同物质中，应该选择足够数量的基质和水平，包括潜在的干扰和典型用法的浓度。

注 2：2 个或以上盲样或者统计学上的公开重复样本算作一份材料(它们不是独立的)。

注 3：单一双水平的配对分析(Youden 对)若作为一对试验进行统计学测试，则算作一份样品，若作为单独的受试样本进行分析统计和报告，则它们是两种材料。此外，Youden 对可用于计算室内标准偏差，S_r：

$S_r=\sqrt{(\sum d_i^2)/2n}$(平行样品、盲样或者开放性样品)

$S_r=\sqrt{(\sum(d_i^2)/2(n-1)}$(Youden 对)

其中，d_i 为每个实验室单个水平的两个独立值之差；n 为实验室数量。在这种特殊情况下，室间标准差 S_R 仅仅是由单个水平的独立部分计算所得的两个 S_R 的平均值，其仅被用于检验计算。

注 4：空白对照或阴性对照可以是一个独立于常规分析目的之外的材料，例如，在微量分析中经常需要检测非常低浓度的物质(接近定量限)，空白可以用来进行“检测限”。但如果空白只用作是分析序

列中的一个参照(例如,干酪中的脂肪),它就不被看作是一种对照材料。

2.2　实验室数量

每种分析材料至少需要 8 家实验室出具结果报告;只有当不可能达到 8 家时(例如设备很昂贵或非常专业的实验室要求),才考虑减少实验室数量,但是最少需要 5 家。如果是国际性研究,实验室应来自不同的国家。如果分析方法需要使用专业的仪器设备,研究应该包括全部可利用的实验室。在这种情况下,n 作为分母来计算标准偏差,而不是"$n-1$"。同最初参与的实验室一样,随后进入该领域的实验室应该进行能力验证。

2.3　重复测试数量

重复性准确度参数必须利用下述设计(按照合理顺序大致排列)之一进行评估:

2.3.1　双水平设计

出于设计和统计分析考虑,每个水平仅由单一材料构成,采用两种几乎完全相同,只在分析物浓度方面有轻微差异(例如,<1%~5%)的测试样本。每个实验室都必须对每个测试样本分析一次,且只能进行一次。

注:构成用于双水平研究分析的一对测试样本必须满足的统计标准是:每个水平的两部分的再现性标准偏差必须相等。

2.3.2　盲样重复测试与双水平分析相结合

在同一个研究中,一些材料采用双水平进行测试,另外的材料采用盲样重复测试(每个提交的测试样本都有一个单独值)。

2.3.3　盲样重复测试

对于每个材料,采用盲样重复测试;当不能对数据审查时(例如系统自动输入、计算和结果输出),也可使用非盲样重复测试。

2.3.4　已知样重复测试

对于每个材料,只有当前述设计不适用时,才能采用已知样重复测试(相同测试样品的试验部分进行 2 个或更多分析)。

2.3.5　独立分析

在这项研究中,仅采用每份样品中单独测试部分(即,不能进行复合分析),但是需要通过质量控制参数或其他独立于方法性能研究获得的实验室内数据计算可重复性参数以校正缺陷。

3　统计分析(详见附录流程图 A.4.1)

必须执行下列统计程序对数据进行统计学分析并报告结果。此外,不排除执行附加的程序。

3.1　有效数据

仅有效数据才能报告并进行统计处理(检验)。有效数据是实验室正常情况下的分析测试结果,它们不受到方法差异、仪器故障、期间意外事件或书写、打印和计算错误等因素影响。

3.2　单因素方差分析

必须对每个材料(测试样品)分别进行单因素方差分析和异常值处理以评估方差分量、

可重复性以及再现性参数。

3.3 初始估计

除去离群值后，仅利用有效数据计算平均值 c（为实验室均值的平均值）、重复性相对标准偏差 RSD_r 和再现性相对标准偏差 RSD_R。

3.4 离群值处理

需要上报的估算的精密度参数是基于初始有效数据得出的，这些数据可根据 1994 年发布的离群值消除程序除去离群值后获得。这个程序实际上是通过连续执行 Cochran 和 Grubbs 检验而组成的（在 2.5％概率水平，单尾检验为 Cochran 检验和双尾检验为 Grubbs 检验），直到不再标记出离群值或者提供有效数据的实验室数量较初始数量下降了 22.2％。

3.4.1 Cochran 检验

首先应用 Cochran 离群值检测法（在 2.5％概率水平，单尾检验），去掉临界值超出附录 A.3.1 中对应值（对应的实验室数量和重复测试次数）的实验室。

3.4.2 Grubbs 检验

应用单一值 Grubbs 检验，去除产生离群值的实验室。如果未标记出实验室，继续应用对值 Grubbs 检验（双尾检验）—2 个数值在同一端和一端一个数值。两种 Grubbs 检验均在 2.5％的概率水平下进行检验。去除临界值超出附录 A.3.3 对应列值的实验室。当应用该检验法去除的实验室数量达到原始实验室数量的 22.2％（2 of 9）时，则停止去除。

注：应用 Grubbs 检验法一次性检验所有实验室针对一种材料得到的一系列重复测试平均值，而不是检验由重复测试得到的个体数值。因为这些数值的总体分布是多峰的，不符合高斯分布，即，它们与总体平均值的差异不是独立的。

3.4.3 最终评估

运用前述程序除去产生离群值的实验室后，按照 3.3 重新计算这些参数。如果按顺序进行 Cochran—Grubbs 顺序检验判断没有离群值，则停止检验。否则，再应用 Cochran—Grubbs 检验来除去所有标记出的离群值，直到标记不出离群值或者超过初始实验室数量的 22.2％（2/9）的实验室在下轮检验中将被去除。详见流程图 A.3.4。

4 最终报告

发布的最终报告应该包括所有有效数据。其他信息和参数应以下列类似格式（对应于报告项目）来报告：

[x]国际水平的方法性能测试，在[年份]由[组织方]组织[y 和 z]实验室参加，每个实验室进行[k]次重复实验，得到下列统计结果：

方法性能参数表格

分析物；结果[单位]

材料[描述，按照平均值数量级递增顺序从表头垂直排列并描述]

除去产生离群值的实验室后剩余的实验室数量

产生离群值的实验室数量

产生离群值的实验室的编号或名称

可接受结果的数目

平均值

真实值或可接受值(如果已知)
重复性标准偏差(S_r)
重复性相对标准偏差(RSD_r)
重复性限量 $r(2.8\times S_r)$
再现性标准偏差(S_R)
再现性相对标准偏差(RSD_R)
再现性限量 $R(2.8\times S_R)$

4.1 符号

报告和出版物中使用的符号见附录1(A.1.)。

4.2 定义

研究报告和出版物中使用的定义见附录2(A.2.)。

4.3 其他参数

4.3.1 回收率

作为实验方法或者实验室偏差控制方法的加标回收率计算方法如下:

$$回收率=\frac{分析物检测总量-分析物初始含量}{分析物添加量}\times 100$$

分析物可以以浓度或者数量表达,其单位必须保持一致。当对分析物进行定量检测时,使用的检测方法应始终保持一致。

报告的分析结果应该是未经回收率修正的。回收率应该单独报告。

4.3.2 当 S_r 是负数时

根据定义,在方法性能研究中 S_R 大于或者等于 S_r;偶然情况下,S_r 的估算值会大于 S_R 的估算值(重复测试的平均值大于实验室平均值范围,则计算出的 $S_L{}^2$ 为负数),这时应设定 $S_L=0$ 和 $S_R=S_r$。

附　录　A

A.1　参数

通常采用下列参数对方法进行评价。

平均值(实验室平均值)	x
标准偏差	s(估算)
重复性标准偏差	S_r
“纯粹”实验室间标准偏差	S_L
再现性标准偏差	S_R
方差	S^2(带下标 r,L 或 R)

$$S_R{}^2 = S_L{}^2 + S_r{}^2$$

相对标准偏差	RSD(带下标 r,L 或 R)
最大容许偏差	

(由 ISO 5725:1986 定义,见附录 A.2.4 和 A.2.5)

重复性限量　　$r=(2.8\times S_r)$

再现性限量　　$R=(2.8\times S_R)$

每个实验室重复测试的次数	k(一般性)
每 i 个实验室平均重复测试的次数	k(对于均衡设计)
实验室数量	L
材料(测试样品)的数量	m
一个指定试验的总的次数	n(=kL,用于均衡设计)
一个指定研究的总的次数	N(=kLm,用于整体均衡设计)

注:如果使用其他的符号,应充分解释它们与被推荐符号的关系。

A.2　定义

使用下列定义。前三个定义是采用 IUPAC(国际纯粹与应用化学联合会)文件“多实验室研究的命名法”(1994 年发布)。后 2 个定义收集自 ISO 3534-1:1993。假定所有测试结果是独立的,即利用一种不受到任何以前结果干扰的方式从相同或相似的测试对象获得的结果。精密度的数量测度严格取决于规定的条件。重复性和再现性条件是设定的极端条件。

A.2.1　方法性能研究

参与室间研究的实验室均应遵守相同的书面协议,并采用同样的测试方法来定量分析相同的检验项目(测试样品、材料)。报告的结果用于评估方法特性。这些方法特性一般是实验室内部和室间精密度,如有必要和可能,还包括其他相关特性如:系统误差、回收率、内部质量控制参数、灵敏度、检测限和适用性。

A.2.2　实验室水平测试

实验室水平测试是一种实验室内研究,它包括了一组实验室利用各自选定的方法对一个或多个均衡的、稳定的测试项目进行的一次或多次分析和测量。为了对实验室性能

进行评估或改进，通常将报告的结果与其他实验室的结果或者已知或指定的标准值进行对比。

A.2.3　材料认证研究

多实验室研究为检测项目的量值（浓度或者性能）指定了标准值（真实值），通常带有一定的不确定度。

A.2.4　重复性限（r）

当同一实验室内的同一实验人员在短期内用相同的仪器设备和相同的实验方法，对特定的检测项目进行两次独立测定所得的平均值处于最终报告（4.0）规定的平均值范围内时，这两次独立测量结果的绝对偏差应该小于或等于可重复性限量（r）[$=2.8\times S$]。重复性限量可以利用线性内插法由报告中的 S_r 获得。

注：再现性限量可以通过内插法扩展应用其他测试项目上，这些测试项目的平均值不同于用来评估原始参数的平均值（通常在运用这些定义的时候都会出现这样的情况）。重复性限量和再现性限量是专门应用于 95％置信水平，通过 $2.8\times S_r$[或者 S_R]得到。这个统计概念一般应用于定位测量（如中值）和其他置信水平下（如 99％）的可重复性（以及再现性）的临界差值。

A.2.5　再现性限（R）

不同实验室，不同实验人员采用相同的实验方法，利用不同的仪器设备对特定的试验项目进行两次独立测定所得的平均值处于最终报告（4）中规定的平均值范围内时，获得的两次测量结果的绝对偏差应该小于或等于再现性限量（R）[$=2.8\ \times S_R$]。再现性限量可以利用线性内插法由报告中的 S_R 推断得出。

注 1：室间测试结果有可能用相对值（例如，测得的平均值的百分数）来代替绝对值表示 r 和 R。

注 2：当最后结果是多个数值的平均值时，即 k 大于 1 时，R 的数值应该经过以下公式校正后，再用来比较两个实验室之间的分析结果。

$$R'=R^2+r^2(1-[l/k])^{1/2}$$

如果 S_R 和 RSD_R 是用于质量控制的参数，构成 S_R 和 RSD_R 最终值的重复测试结果也应进行类似的校正。

注 3：可重复性限量 r 可被视为一个数值，在此数值内，同一实验室的两个测试结果在 95％的概率水平下是一致的。再现性限量 R 可以视为一个数值，在此数值内，不同实验室的两个独立测试结果在 95％的概率水平下是一致的。

注 4：通过一个有计划有组织的方法性能研究来评估 S_R；利用实验室内日常工作的质控图来评估 S_r。在缺少质控图的情况下，实验室内的精密度可近似估算为 S_R 的一半（Pure and Appl. Chem.，62，149-162（1990），Sec. L3，Note）。

A.2.6　单因素方差分析

单因素方差分析是用于评估室内和室间由于材料差异带来的变异程度。单水平和单水平一拆分设计的计算实例可见 ISO 5725：1986。

A.3　临界值

A.3.1　在 2.5％（单尾一检验）拒绝水平上的 Cochran 最大方差比的临界值，以总方差中的最高方差的百分比表达；r 是重复测试次数。

表 A.1

实验室编号	$r=2$	$r=3$	$r=4$	$r=5$	$r=6$
4	94.3	81.0	72.5	65.4	62.5
5	88.6	72.6	64.6	58.1	53.9
6	83.2	65.8	58.3	52.2	47.3
7	78.2	60.2	52.2	47.3	42.3
8	73.6	55.6	47.4	43.0	38.5
9	69.3	51.8	43.3	39.3	35.3
10	65.5	48.6	39.9	36.2	32.6
11	62.2	45.8	37.2	33.6	30.3
12	59.2	43.1	35.0	31.3	28.3
13	56.4	40.5	33.2	29.2	26.5
14	53.8	38.3	31.5	27.3	25.0
15	51.5	36.4	29.9	25.7	23.7
16	49.5	34.7	28.4	24.4	22.0
17	47.8	33.2	27.1	23.3	21.2
18	46.0	31.8	25.9	22.4	20.4
19	44.3	30.5	24.8	21.5	19.5
20	42.8	29.3	23.8	20.7	18.7
21	41.5	28.2	22.9	19.9	18.0
22	40.3	27.2	22.0	19.2	17.3
23	39.1	26.3	21.2	18.5	16.6
24	37.9	25.5	20.5	17.8	16.0
25	36.7	24.8	19.9	17.2	15.5
26	35.5	24.1	19.3	16.6	15.0
27	34.5	23.4	18.7	16.1	14.5
28	33.7	22.7	18.1	15.7	14.1
29	33.1	22.1	17.5	15.3	13.7
30	32.5	21.6	16.9	14.9	13.3
35	29.3	19.5	15.3	12.9	11.6
40	26.0	17.0	13.5	11.6	10.2
50	21.6	14.3	11.4	9.7	8.6

表 A.1 和 A.2 是 R. Albert 采用计算机模拟对每个数值进行约 7 000 次循环运算，并

对数据进行平滑处理后得到的。尽管严格来说表 A.1 只适用于均衡设计(所有实验室的重复测试数目相同),但是当仅有几个偏差时,它也能应用到没有太多误差的非均衡设计中。

A.3.2　Cochran 最大方差离群值比例的计算:

计算出每个实验室的内部方差,将最大的内部方差除以所有室内方差的总和,然后乘以 100 即得 Cochran 统计数值。如果该数值超过 Cochran 表中对应的临界值(对应指定的重复实验次数和实验室个数),表明存在离群值。

A.3.3　在 2.5%(双尾)、1.25%(单尾)拒绝水平上的 Grubbs 极端变量离群值检验的临界值,表示为由去除可疑值引起的标准偏差降低百分比。

表 A.2

实验室编号	一个最高或最低值	两个最高或最低值	一个最高和最低值
4	86.1	98.9	99.1
5	73.5	90.9	92.7
6	64.0	81.3	84.0
7	57.0	73.1	76.2
8	51.4	66.5	69.6
9	46.8	61.0	64.1
10	42.8	56.4	59.5
11	39.3	52.5	55.5
12	36.3	49.1	52.1
13	33.8	46.1	49.1
14	31.7	43.5	46.5
15	29.9	41.2	44.1
16	28.3	39.2	42.0
17	26.9	37.4	40.1
18	25.7	35.9	38.4
19	24.6	34.5	36.9
20	23.6	33.2	35.4
21	22.7	31.9	34.0
22	21.9	30.7	32.8
23	21.2	29.7	31.8

表 A.2(续)

实验室编号	一个最高或最低值	两个最高或最低值	一个最高和最低值
24	20.5	28.8	30.8
25	19.8	28.0	29.8
6	19.1	27.1	28.9
27	18.4	26.2	28.1
28	17.8	25.4	27.3
29	17.4	24.7	26.6
30	17.1	24.1	26.0
40	13.3	19.1	20.5
50	11.1	16.2	17.3

A.3.4 Grubbs 检验值的计算：

为了计算单个 Grubbs 检验统计数值，首先计算每个实验室的平均值，然后计算这些平均值的标准偏差 M(指定为原始值 s)。去除平均值序列中的最大值并计算剩余值的标准偏差(S_H)；去除平均值序列中的最小值并计算剩余值的标准偏差(S_L)。两个标准偏差(S_H 和 S_L)减少的百分比分别按照下式计算：

$$100\times[1-(S_L/s)]$$

$$100\times[1-(S_H/s)]$$

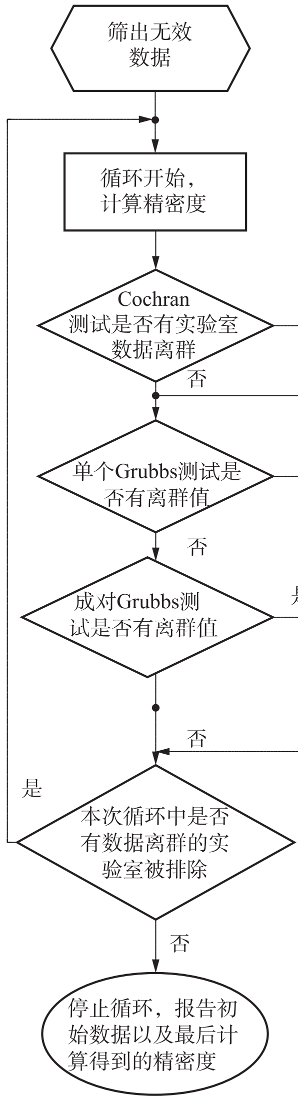
两个百分比变化值中较高者即为单个 Grubbs 测试统计数值。如果它超过了表 A.2 第 2 列中对应的临界值(对应用于计算原始值 S 的实验室平均值的个数)，就说明在 $P=2.5\%$ 概率水平(双尾)，存在离群值。

为了计算成对的 Grubbs 测试统计数值，除去均值序列中的 2 个最高值后计算剩余均值的标准偏差(S_H)；除去均值序列中的 2 个最低值后计算剩余均值的标准偏差(S_L)，并按照上述方法计算两个标准偏差减少的百分比。将两个百分比标准偏差变化较大的值与表A.2第 3 列中对应的临界值进行比较，再进行下述操作：

(1)如果超过了表中对应值，则删除对应的 2 个最大(或最小)平均值。再重新开始一次循环，从 Cochran 极端方差测试开始，然后依次进行单个 Grubbs 极端值测试和成对的 Grubbs 极端值测试。

(2)如果没有超过临界值，计算除去 1 个最高值和 1 个最低值后的标准偏差百分比的变化，然后与表 A.2 最后一列的对应值进行比较。如果超过表值，就除去均值中的高一低均值对。再从 Cochran 测试开始进行新一轮测试，直到无离群值检出。在所有情况下，当超过 22.2%(2/9)的平均值被去除时即停止离群值检测。

A.4　离群值去除流程图



离群值去除流程图

参 考 文 献

[1] Horwitz, W. (1988) Protocol for the design, conduct, and interpretation of method performance studies. Pure & Appl. Chem. 60, 855-864.

[2] Pocklington, W. D. (1990) Harmonized protocol for the adoption of standardized analytical methods and for the presentation of their performance characteristics. Pure and Appl. Chem. 62, 149-162.

[3] International Organization for Standardization. International Standard 5725-1986. Under revision in 6 parts; individual parts may be available from National Standards member bodies.

OIV-MA-AS1-10

分析方法的检出限和定量限评估

(决议 Oeno7/2000)

1 目的

建立方法的检测限和定量限

注:所建议的计算程序是根据仪器响应而设计检出限和定量限的。对于给定的方法中,这些值的最后计算结果必须考虑样品制备过程中的因素。

2 定义

检出限:在可接受的不确定度下,分析物能被检出的最小浓度或最小比例,但是在所描述的实验方法中的条件下,该浓度或比例不用于定量。

定量限(低限):在可接受的不确定水平下,在方法描述的实验条件下,分析物能被定量到的最小浓度或最小比例。

3 制定决策的逻辑图

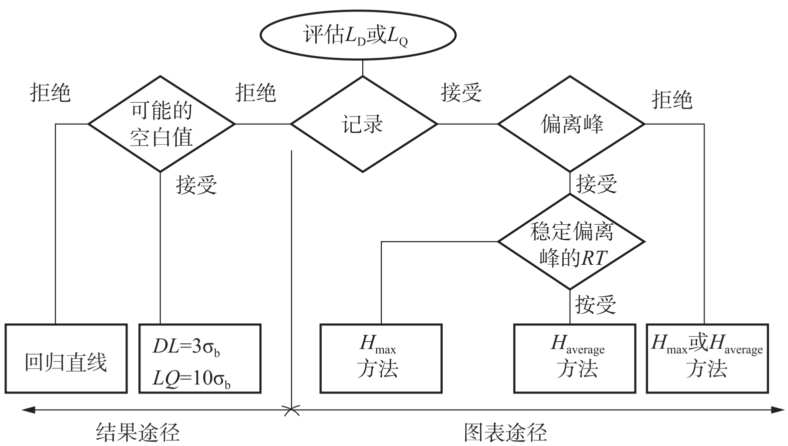


图 1

4 方法学

4.1 “结果”途径

当分析方法没有记录图时,只有数值(例如:比色法)、检出限(L_D)和定量限(L_Q)应采用以下两种方法中的其中一种来评估。

4.1.1 方法 1

直接读取包含除用于测试的物质之外的其他所有组分的独立分析样品(空白)的 n 个测定值(分析物的量或响应)。

$$L_D = m_{blank} + 3S_{blank}$$
$$L_Q = m_{blank} + 10S_{blank}$$

其中 m_{blank} 和 S_{blank} 为 n 个测定值的平均值和标准偏差。

注：乘法因子 3 对应的是出现含有该物质的 0.13%的概率，而实际上，这种物质是不存在的。因子 10 对应的是出现该物质 0.5%的概率。

4.1.2　方法 2

采用线性回归方程：$Y=a+bX$

检出限是指能与空白对照样区分开的物质最小浓度，其中会有 0.13%的可能性导致保留样品无法被检出，换言之，检出限是指，在 0.13%的误差水平下，在进行统计测试中，比 0 值的响应更明显时的值。因此：

$$Y_{\text{DL}}=\text{a}+3S_{\text{a}}$$

$$X_{\text{DL}}=(a+3S_{\text{a}})/b$$

S_{a} 是回归直线起始点在纵坐标上的标准偏差。其逻辑与 L_{Q} 相同，其中乘法因子是 10（风险是 0.5%）。

4.2　图表途径

对于生成图片的分析方法（即色谱法），检出限的评估是以给定样品的空白分析记录的本底噪音为基础的。

$$L_{\text{D}}=3\times h\times R\text{（相关风险概率低于 0.13\%）}$$

$$L_{\text{Q}}=10\times h\times R\text{（相关风险概率低于 0.5\%）}$$

其中 h 是信号窗口对应于保留时间两边 10 倍半峰高度范围的平均值或最高峰值，是一个稳定的函数。R 是以物质的数量/高度来表达的数量/信号反馈因子。

4.2.1　h_{max} 方法

——提高基线噪音到最大值（见图 2）；

——围绕着产品的保留时间（RT）；

——在保留时间（RT）的任何一边画出了半峰宽度（$W1/2$）的 10 倍范围窗口；

——画 2 条平行线，一条要经过最高峰的顶端，另一条经过最底端；

——估计高度 h_{max}；

——计算响应因子（R 因素）；

——$L_{\text{Dmax}}=3\times h_{\text{max}}\times R$；

——$L_{\text{Qmax}}=10\times h_{\text{max}}\times R$。

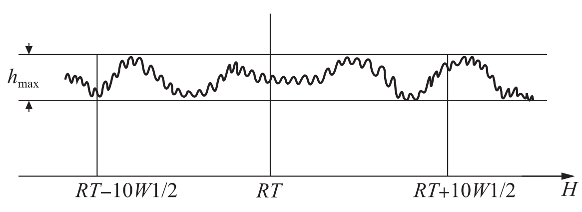


图 2

4.2.2　h_{average} 方法

——提高基线噪音到最大值（见图 3）；

——以样品的保留时间为中心；

——在保留时间的任意一边画出最高峰值一半高度（$W1/2$）的 10 倍范围的窗口；

——划分成 20 等份（x）；

——每个区域划 2 条平行线，一条经过最高峰值，另一条经过最低峰值；
——测量高度，y；
——计算平均值（$y = h_{\text{average}}$）；
——计算响应因子（R 因素）；
——$L_{\text{Doverage}} = 3 \times h_{\text{average}} \times R$；
——$L_{\text{Qaverage}} = 10 \times h_{\text{average}} \times R$。

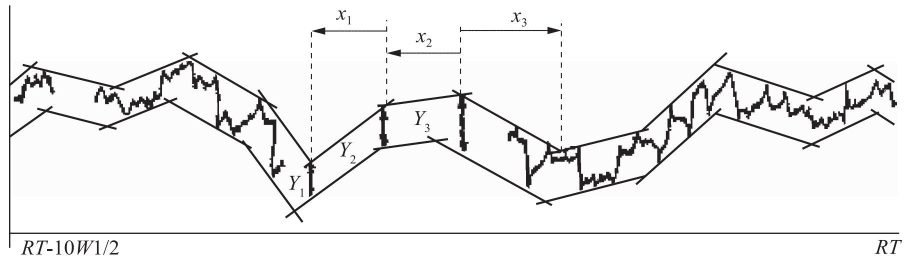


图 3

这些评估可以通过注入与计算限量接近浓度的溶质来进行验证（图 3 和图 4）。

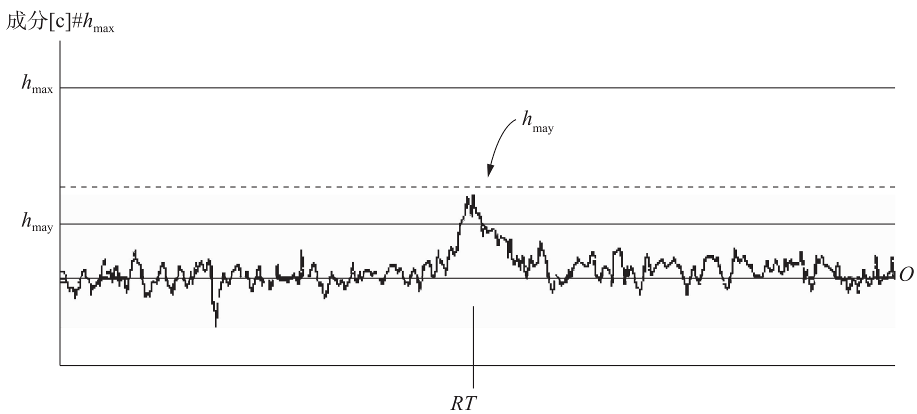


图 4　验证计算限量，成分浓度接近 H_{average}

注：虚线表示实际的注入数值。不过，这里列举该图作为一个例子，因此在最终文本中可以删去。

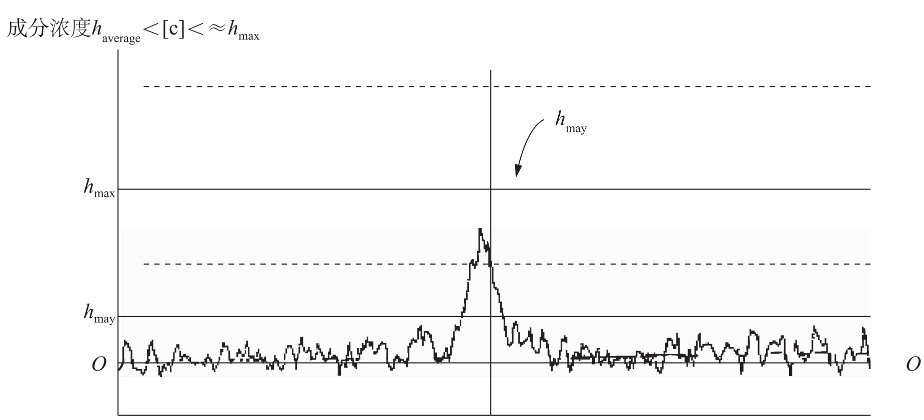


图 5　验证限量计算，成分浓度在 H_{average} 和 H_{max} 之间

注：虚线表示实际的注入数值。不过，这里列举该图作为一个例子，因此在最终文本中可以删去。

OIV-MA-AS1-11

分析化学实验室内部质量控制的协调性原则

(决议 Oeno 19/2002)

1　前言

1.1　基本观点

本文建立了分析化学实验室实施内部质量控制的指南(IQC)。IQC 是为了确保实验数据达到预期目的而采取的协调措施之一。实际上,目标适用性是实验中所得到的准确度与要求的准确度相比较来决定的。因此,IQC 包括如下的常规程序:使分析化学家可以接受的一组或一个结果,或者不可接受的结果再进行重复分析。由此可知,IQC 是分析数据质量的重要决定因素,被有资质的机构所认可。

内部质量控制是,加入到分析序列中并进行重复分析。质控材料应尽可能具有代表性,重点考虑基质组成、物理状态和分析物的浓度范围。当质控材料与测试材料都以相同方式处理时,它们可以用来描述在某一特定时间和较长时间间隔的分析方法的性能。

内部质量控制是检查所有程序(包括校准)正确实施与否的最后一道关卡,是分析协议和所有其他的质量控制的保证措施,是良好的分析实践的基础。因此,IQC 有必须具有可追溯性。当然 IQC 也需要尽可能地保证独立性,特别是校准,因为它与测试相关。

理想的情况是质控材料和那些用以校准的方法是可追溯到合适的认可参考材料或被认可的参考方法。当不可能实现时,质控材料应至少可追溯到一种保证纯度的材料或其他特征的材料。这两种可追溯性不能发生在分析程序太晚的阶段。例如,如果质控材料和校准标准是来源于单一的分析储备溶液,那么内部质量控制不会发现任何因为储备溶液配制阶段所产生的错误源。

在一种或多种典型的分析情况中,很多相似的测试材料将会被放在一起,同质控材料一起被分析。这样的一组材料是指在本文档中提及的分析“试验”(也称“组”、“系列”和“批次”),这些试验会在高度一致的条件下进行分析。在理想状态下,即试剂批次、仪器设置、分析人员和实验室环境,在分析运行期间应保持不变。因此系统错误在运行期间也应保持不变,描述随机误差的参数的值也保持不变。对这些误差的监测是很有意义,也是 IQC 的基本内容之一。

试验是在可重复的条件下进行即随机测量误差在“较短”一段时间内会经常出现。在实际试验中可能需要足够的时间才能出现微小的系统变化,例如,试剂可能降解、仪器漂移,可能会需要轻微调整仪器的设置,或实验室的温度可能会上升。然而,但这些系统的影响已被并入重复性偏差中,如将组成试验的材料进行无规排序可以将漂移的影响转化为随机误差。

1.2　文件的适用范围

本文件包括了 IQC(内部质量控制程序)在多个领域的协调应用,特别是临床生物化学、地球化学和环境研究,以及卫生和食品分析等。这些不同领域分析都具有共同的范围。分析化学包含非常广泛的应用范围,对应的内部质量控制的基本原则就是应包含在上述范围内。此现行文件提供了可适用于绝大多数案例的指导方针。此方针也有必要排

除一些在分析领域中个别受限制的环节。此外，某些环节还会结合内部分析质量控制和质量保证实施的其他方面。这种结合是没有危害的，但必须明确哪些是内部质量控制基本要素。

为了协调融合以及提供 IQC 的基本指南，本文件删除了某些类型的分析试验。主要是以下信息。

a）抽样质量控制：虽然分析结果质量相当于样品的质量，但抽样质量控制是一个独立的课题，在诸多领域没有得到充分的发展。而且，在不少的例子中，分析实验室并没有对抽样活动与质量进行管控。

b）在线分析和连续监控：在这种分析中，重复测量是无法实现的，因此本文件中的内部质量控制在此处不适用。

c）多元的内部质量控制：内部质量控制的多元法仍然是研究的主题，在本体系中并没有被有效的建立。目前的文件是将多组分分析数据认作是一连串单变量的内部质量控制测试。对于该类数据进行整理分析的时候必须谨慎，以免频繁的对数据进行不合理的弃用。

d）法规和合同要求。

e）质量保证措施，比如分析之前或者分析期间检查仪器的稳定性，校准波长、校准天平、测试色谱柱的分辨率，但不包括问题诊断。其现有的作用是被当作分析控制的一部分，及内部质量控制测试的有效性和其他方面的方法。

1.3 内部质量控制和不确定度

分析化学最重要的先决条件是认识到“目的适用性”，同时准确度标准也是有效使用分析数据所必需的。这个标准是通过考虑参考数据的预期用途来得出的，虽然很少有可能预测分析结果的所有潜在的未来应用方向。因此，为了防止不恰当的数据表达，不确定度声明需附带于分析结果中，或者向任何需要使用数据的人开放。

严格来说，分析结果无法单独解释，除非它在一个给定的置信区间内伴随着相关的不确定度分析。举一个简单的例子来说明这个原则。假设某食品按照法定要求不得包含大于 10 μg/g的某物质。一制造商分析所得一批货物中该组分的结果为 9 μg/g。如果该结果的不确定度的一半为(不考虑抽样误差)0.1 μg/g，(即真实结果偏低，很可能在 8.9 μg/g～9.1 μg/g 的范围内)，那么它很可能被判定为不超标。如果不确定度是 2 μg/g，那么结果可能就超标了。因此，数据的解释和使用必须要与不确定度相联系起来。

若分析的结果有定义性目的或者需要进行解释，则应该附上相关的不确定度。如果达不到这一要求，那么通过数据得出的结果也是有局限性的。此外，因为数据的质量会有偏差，所以不确定度的测量应作为常规例行程序在不同实验室之间测试。内部质量控制包括：检查所要求的测定过程中得到的不确定度。

2 定义

2.1 国际定义

质量保证：为保证产品和服务能够满足一定质量要求而采取的必要的计划和系统性措施。

真实度：从大量的测试结果中获得的平均值和接受参考值之间的一致程度。

精密度：规定条件下独立测试结果之间的一致程度。

偏差：测试的预期结果和一个被认可的参考值之间的差异。

准确度：测试结果与被测量对象的真实数值之间的一致程度。

注 1：准确度只是一个定性的概念。

注 2：精密度不等同于准确度。

误差：测量值与真实值之差。

重复试验条件：独立的测试结果在短期内使用相同的方法，在同一实验室，由同一人采用同一设备对同一项目进行测试得到的。

不确定度测量：与测试结果相关的参数，描述了测量中合理数值的离散度。

注 1：例如，参数可能是一种标准偏差（或其倍数关系），或规定的置信区间的一半。

注 2：测量组分的不确定度，通常来说包括许多组分。其中一些组分可以通过一系列结果测量值的统计学分布来评估并且通过实验标准偏差来表达。另一些组分同样可通过经验值等评估的标准偏差来表示。

注 3：据了解测量结果是评价测量价值和所有组分不确定度的最优方法，包括来自系统影响等对离散度有关联的组分，例如校正参考标准等。

可追溯性：测量结果或者标准值的性质，通过一条全都具有指定不确定度的对照物组成的连续关联链，以此能关联到规定的参比物。该参比物通常是国家或者国际标准。

标准物质：材料（物质）的属性是充分均匀，并且建立用于校准的仪器，测量方法的评价，或对相应材料进行属性赋值。

有证标准物质：是附有证书的标准参考物质，是在可追溯程序的控制下获得的具有专业机构认证的标准物质，其在置信水平上都有一个不确定度。

2.2　本文件中术语的定义

内部质量控制：一套由实验室人员执行的程序，用于连续监测操作和测量结果，以决定结果是否可靠。

质控：用于内部质量控制的材料，并使用测量待测材料所用的同一个或者部分相同的程序进行测试。

序列（分析序列）：在重复条件下进行的一组测量。

目的适用性：测量程序产生的数据允许用户在技术上和管理上能做出正确的专业性决策的程度。

分析系统：用于保证分析数据的质量，包括设备、试剂、程序、测试材料、人员、环境和质量保证措施等的应用范围。

3　质量保证与内部质量控制

3.1　质量保证

质量保证是所有可靠分析测试的前提，对人员的培训和管理，实验室的环境、安全性、储藏条件、样品的完整性和鉴定、记录的保存、仪器的维护和校准、正确使用技术验证和记录方法等均有一定的要求。这些方面任何一部分的疏忽，都可能会导致最终数据质量的损坏。近年来这些做法已经被编成法典并被普遍认可。然而，仅仅是这样并不能保证会得到合理的数据，还需要有行之有效的内部质量控制。

3.2 分析方法的选择

分析方法首先要满足基质和目标分析物的分析范围。还要有文件来描述在适当的条件下作出评估的方法。

分析方法只有在特定环境中实施时，才能给出可靠的实验数据。因此要将环境因素汇总到“分析系统”中，并对分析数据的准确度负责。为此，监测分析系统是非常重要的。这也是实验室实施内部质量控制的目标。

3.3 内部质量控制和水平测试

水平测试是定期评估个体实验室和多家团体实验室能力表现的一种方式，主要通过参加者采用典型材料进行独立操作，再汇总分散数据来评估。尽管如此，但参加能力验证测试并不能代替内部质量控制措施，反之亦然。

能力水平测试被认为是一种检查分析误差的常规程序，但不经常使用。能力水平测试能鼓励参加者去设置有效的质量控制系统。只有那些具备良好内部质量控制体系的实验室在能力水平测试中表现更佳。

4 内部质量控制程序

4.1 引言

内部质量控制包含了一些操作步骤，保证分析数据的误差被控制在合理的范围内。内部质量控制的实施要借助两个方法，分别是通过分析参考物质来监测真实性和统计学控制，以及通过重复性实验来监测其精密度。

内部质量控制的基本途径包含同时分析参考物质和被测物。控制分析结果是决定测试数据是否可接受的基础，应该注意以下 2 个关键点。

a）对结果的解释必须依据文件、准则和统计学原则。

b）控制分析试验的结果首先应被用作反映分析体系的表现，其次才是作为个别测试结果出现误差的指示。控制测定中精确度发生的明显变化可用于指示反映当前测试材料的数据变化，但不可基于此变化而对数据进行纠正。

4.2 总体方法——统计控制

内部质量控制分析结果的解释为主要依赖于与操作稳定性一致的统计控制的概念。其意味着内部质量控制结果可从含有平均值(μ)和方差(σ^2)的正态分布函数中独立、随机的产生。

这些限制使只有 0.27%的结果(x)落在了 $\mu\pm3\sigma$ 的界限之外，当出现极端结果时，它们就被看作是失控了，并且意味着分析系统开始出现不同的运行表现。同样也意味着系统产生的数据是不准确的，因此不可信。在进一步分析之前，需要对分析系统进行调查和纠错。分析系统的实施可由 Shewhart 控制表(见附录 1)来图像化监控。另一个等同的数字控制方法也是可采用的，即通过比较 $z=(x-\mu)/$和标准正态偏差来表达。

4.3 内部质量控制和目的适用性

大部分质量控制的程序是基于描述常规分析系统的统计参数术语。控制限度是基于这些参数的估计值，而不是来源于目的适用性。控制限度肯定比目的适用性要求低。

当进行所谓的特别分析时，统计控制概念不适用。分析中测试材料可能是不熟悉或很少遇见的，批量测试通常也仅由少数此类测试材料组成。在这种情况下，没有用于制作控制表的统计数据。因此，分析化学者不得不使用目的适用性标准、历史数据或与测试材料感官特性的一致性来判断结果是否可接受。

另外一个办法也是可行的，就是需要建立针对目的适用性设置的定量标准方法。但该方法在内部质量控制中应用较少。例如，在环境研究中，低于痕量分析物浓度的10%的相对不确定度是很少见的。在食品分析中，Horwitz 曲线有时被用作目的适用性标准。这样的标准是为临床分析定义的。然而，对这些领域给出指导是不实际的，目前学术界也没有提出适合于特定应用的更先进的一般性的原则。

4.4　误差的本质

分析错误的两种主要来源是随机误差和系统误差，它们分别会引起不准确和偏差的出现。这种归类错误的重要性在于能够解释数据误差的不同的来源和补救方式以及导致的后果。

随机误差决定了测量的精密度，会引起测量值（潜在平均值）的随机正负误差。系统误差包括了多次测定潜在平均值与真实值的偏差。出于内部质量控制目的，应认真考虑两种水平的系统误差。

a）持续偏差长时间内影响了分析系统和所有数据（对于一个给定的材料测试而言）。这样的偏差，在系统误差很小时，也许在长时间运行的分析系统中才能被发现，如果其在允许界限内是可被容忍的。

b）批次效应可通过在特定批次测试时分析系统中的偏差作例子阐述。当影响很显著时，将作为失控情况而被内部质量控制鉴别出来。

传统上划分随机误差和系统误差是取决于该系统的观察时间长短。批次影响（不明来源）在长时间内观察是随机特征的偏差。此外，如果在短时间内观察，其相同的变量被视为影响特殊批次试验的偏差。

在文中，用于内部质量控制的统计模型如下。给出测量值公式：

$$x=\text{真实值}+\text{持续偏差}+\text{批影响}+\text{随机误差}(+\text{粗略误差})$$

不包括粗差的方差 $x(\sigma_x^2)$ 公式如下：

$$\sigma_x{}^2=\sigma_0{}^2+\sigma_1{}^2$$

其中：σ_0^2——随机误差的方差；

σ_1^2——批效应的方差。

注：当有必要的时候，模型可以涵盖到分析系统的其他功能。

真实值方差和持续误差变量都是零，控制分析系统完全由 σ_0^2、σ_1^2 和持续偏差来表述。当分析系统不服从此表述时，则意味有重大误差。

5　内部质量控制和批次试验中的精密度

5.1　精密度和重复性

批次试验准确度的控制限量是通过重复测量实验材料而得到的，客观上是为了保证成对结果的差异具有一致性或比试验室用于内部质量控制（IQC）的随机误差低（σ_0）。

这样的测试可警示使用者有可能出现不太好的批次内准确度，并且提供额外信息来帮助解释控制图。该方法在“特别”分析中尤其有用，关注只集中于单组批次试验，并且来自控制材料的信息不太可能令人满意。

一般而言，所有的待分析物会全部或随机挑选一部分进行重复分析。来自重复分析结果 x_1，x_2 之间的绝对误差 $|d|=|x_1-x_2|$ ，会超出随机误差 σ_0 的控制上限。然而，如果平行测试的分析物浓度范围很广，则不能假设 σ_0。

内部质量控制的重复性必须尽可能反应批次试验中偏差的全部范围。在同一个批次实验中，它们不能被相邻分析，否则它们将只显示出分析变量中的最小可能测量。最好在每批样品中随机进行重复检测。而且，内部质量控制要求重复试验应有测试材料的相应部分的完整独立的分析。仪器重复测量单个测试溶液是无效的，因为没有来自于测试材料的初步化学处理的变化。

注：此处不考虑来自内部质量控制或者重复实验的标准误差 σ_r：即相对于统计结果而言通常情况下此值很小，一般采用如下公式进行估算：$S_r=\sqrt{\sum d^2/2n}$

5.2 重复数据的释义

5.2.1 狭窄的浓度范围

在最简单的情况中，所用测试材料的批次实验包含的分析物的浓度范围比较小，以至需应用批次内的总体的标准偏差 σ。

参数值必须预先评估，从而得到一个控制限量。绝对偏差 d 95%的上限是 $2\sqrt{2}\sigma_0$，并且平均来说只有 3‰的结果有可能超过 $3\sqrt{2}\sigma_0$。一组重复试验的结果(n)可以通过几种方法来解释。

例如，标准偏差

$$Z_d=d/\sqrt{2}\sigma_0$$

应该有一个伴随零值平均值和单一标准偏差的正态分布。一组 N 个结果的总和将会有一个$\sqrt{n}$标准偏差，只有 3‰会产生一个值 $\left|\sum Z_d\right|>3\sqrt{n}$ 。同样，来自一组平行试验的 n 个 Z_d值结合形成 $\sum Z_d{}^2$ ，并且结果可由带有 n 个自由度(x_n^2)的卡方分布来表达。在应用该统计时需谨慎，因为它对边沿数据敏感。

5.2.2 宽浓度范围

如果测试材料的批次实验包括的分析物浓度比较广泛，就不能设定普通的精度标准值 σ_0了。在此例中，普通的精度标准值 σ_0应体现与浓度的函数关系。一种特殊材料的浓度值取为$(x_1+x_2)/2$，那么精度标准值 σ_0的适当值应依据其函数关系提前估算。

6 内部质量控制中的质控材料

6.1 前言

质控材料是会加入到测试材料中进行相同的试验处理的物质。一种质控材料必须包括具有合适浓度的分析物，并分配到测试材料中。质控材料必须有代表性的，为了具备充分的代表性，一种控制材料必须含有大量组分中的相同基质，包括会对准确度有一定影响的微量组分。同样，它应该具有类似的物理形态，例如像处于粉碎的状态等。质控材料还有其他的

必要特性：它在试验期间必须要能保持稳定性；也必须能分成有效的相同几部分来进行分析；数量也要求满足整个试验期间甚至后期的使用。

内部质量控制材料在使用时都结合控制图，包含连续偏差和批效应(见附录 1)。连续偏差是既定数值偏离了中心线的显著偏差。当系统在统计控制下运行，批试验的偏差变量在标准偏差中是可以预见的，并且标准偏差被用来界定距离真实数值合适范围的处置限和警界限。

6.2　有证标准物质的作用

有证标准物质在第二部分有明确的定义(也就是具有不确定度和可追溯性的说明)，在过去，有证标准物质只被用作参考，并不在常规检测中使用。现代许多的方法是将有证标准物质作为耗材，也适用于内部质量控制。

有证标准物质的应用需注意以下几点。

a) 尽管可利用有证标准物质的范围越来越广，但是大多数分析没有特别符合的有证标准物质可采用。

b) 尽管有证标准物质的成本与分析总成本没有太多关联，但是一家实验室去储存每一种相关联的标准物质也是不可能的。

c) 标准物质不适用不稳定的分析物或基质。

d) 有证标准物质不一定要在长时间段后为内部质量控制提供支持。

e) 必须了解，并不是所有的有证标准物质的质量都一致。当有证标准物质的证书信息不明确时要特别注意。

在应用有证标准物质时，如果上述情况都不适用于单独个体实验室或群组实验室来准备自己的标准物质和布置可追溯性分析浓度。这样的材料有时候被指定为“内部标准物质”。准备“内部标准物质”的注意事项列表在 6.3 部分中。并不是所有方法能应用于全部的分析条件。

注：此处有证标准物质不具有可追溯性，只有涉及参考方法或者一批试剂供应商的时候可能是有必要的。

6.3　质控材料的准备

6.3.1　通过分析指定一个真实值

原则上，一个工作值只需通过认真的分析可以被指定为一个稳定的标准物质。然而，为了避免指定值的偏差，有必要提前注意。这就需要做些独立的检查，如多家实验室来分析材料，使用的方法也要基于不同的物理-化学的原则。缺少对控制材料独立验证已经是内部质量控制系统的一个弱点。

在控制材料中设置一个可追溯指定值的办法之一就是要进行含有候选材料的批次实验分析，并通过重复和随机化来选择匹配的有证标准物质。有证标准物质必须既能适用于基质组成，又能适用于分析物浓度。有证标准物质是在适当的分析方法下，直接用来校准质控材料分析程序的。如果该测量中有少量易变化的分析成分，还必须考虑指定值的不确定度。

6.3.2　能力测试中的验证材料

能力测试中的验证材料构成了控制材料的重要来源。很多实验室已经采用多种方法来分析这些材料。当结果没有显示明显的偏差或异常的分布时，实验室指定带有不确度

的结果是有效的。这些可利用材料的范围是有限的，但是能力验证的组织者要能确保其稳定性。

6.3.3 通过配方来设置真实值

在常见的例子中，一种控制材料是通过混合已知纯度数量的组分来制备。例如，在实例中，当质控材料是一种溶液时这种方式将是最令人满意的。配方中经常遇见的问题是如何使固态质控材料变成满意的物理状态或确保分析基质的物理分散度好。此外，充分均匀的混合也是必须的。

6.3.4 加标质控材料

“加标方法”是通过结合配方与分析方法来制造质控材料的。当测试材料完全不含分析物时，该方法可行。在经过大量分析检查确保背景水平足够低时，该材料被加入已知量的分析物。该方法准备的指定材料与测试材料的基质相同，分析物浓度也是可知的，所以分析物浓度的不确定度只受测定误差的影响。但要确保添加分析物的种类、结合态和物理形态都与天然成分物保持一致有困难，而且彻底混合均匀有难度。

6.3.5 回收率检查

如果无法使用质控材料，那么可以采用回收率来检查偏差。特别是当分析物或基质不稳定或实施特别分析时。已知数量的分析物的测试材料同原始材料一起被分析。

回收率由于基质具有代表性，并且多数材料可用通过检测得到定量响应，因此被广泛应用。然而回收率检查的方法也有缺点，包括添加分析物的种类、结合态和物理分散度有限制。并且当回收率不好时，也可能因为测试材料中的真正分析物没有产生对应的响应。

响应与回收率作为内部质量控制的方法，必须要与标准添加法区别开来，后者是一种测量程序：一种单一的响应添加不能用来完成测量和内部质量控制的双重作用。

6.4 空白测定

空白测定几乎是分析过程的必须部分，同时会影响内部质量控制。最简单的就是“试剂空白”，即除了不添加测试部分外，其他所有分析步骤都执行。这种空白的设置不仅仅用来测试试剂纯度，例如，该方法能检测出来源于分析系统中的任何污染，包括玻璃器皿和空气环境污染，因此更好地被描述为“程序空白”。在一些事例中，如有一种模拟的测试材料可用，则空白测定的效果会更好。该模拟物可能是真实的测试材料或替代物(例如无尘滤纸用于代替植物材料)。如果有一种包含零浓度的分析物基质，就是最好的空白类型，即“背景空白”。

平行实验中一组不一致的空白意味着出现零散的污染，根据内部质量控制要求也会剔除其相应的检测结果。当分析方法中描述要减去空白值时，控制材料的结果在内部质量控制使用前一定要减去空白值。

6.5 追溯加标与回收率核对

用于响应实验和回收率检查的试剂追溯问题必须要注意。当有证标准物质不可用时，追溯制度经常要用来管理制造商提供的分析物批次。在这些情况中，使用试剂前要进行鉴定和检查纯度。更进一步的预防就是标准曲线和响应实验不能用于跟踪追溯相同的分析液的储备部分或相同的分析者。如果这样的追溯制度存在，那么内部质量控制系统就不会检测到响应误差的来源了。

7 建议

下述的建议代表了内部质量控制的整合方法，适用于多种分析和应用领域。实验室质量系统的管理者可将这些建议调整应用到自身的独特实验要求中。

这些调整适应在内部质量控制中得以实施，例如，通过调整平行实验中的样品重复数和控制材料，或者列入任何在特殊应用领域中适用的措施。最终选择的程序和相伴随的制定规则必须编入内部质量控制中，并且和分析系统方案相区别。

质量控制的实际方法是由实施测量的频率，以及每次批实验的规模和特点来决定，由此而制定下列建议。控制表的使用和决策制度详细见附录 1。

在每次批实验的顺序选择中，不同种类的材料应尽可能被随机分析。如果随机选择失败，会导致低估不同组分的错误。

7.1 低频率测定相似材料的实验($n<20$)

该情况实验中分析物浓度范围相对较小，所以一个普通的标准偏差可以被假设。至少在每次实验中，要插入一个质控。使用单次测试数据或者它们的平均值在合适的控制图中作图。至少随机选择一半的测试材料重复分析。至少插入一个空白值。

7.2 高频率测定相似材料的实验($n>20$)

再次假设一个共同的标准偏差。估计在测试材料中十分之一处插入质控。如果批规模有可能变化，更容易来标准化每个批次实验插入的质控的固定数目和绘制控制图上的平均值的方法。否则就绘制个别值。至少重复分析 5 个随机选择的测试材料。在每十个测试材料中插入一个空白测定。

7.3 浓度范围较大相似材料的实验

这里我们不能假设标准偏差的单一值是可用的。

按前文推荐，在测试总样本中插入质控材料。至少保持两种水平的分析物，一种接近典型测试材料的中间水平，另一种几乎接近上限或下限。在独立的控制图中输入这两种控制材料的值。至少重复分析 5 次。在每十个测试材料中插入一个空白测定。

7.4 特别分析

这里，统计控制的概念并不可行。假设平行实验中的材料是单一的类型，也就是说与错误的一般性结论是非常相似的。

对所有的测试材料实施重复分析。利用不同浓度的合适的分析物实施加标，或回收率测试，或使用配方控制材料。执行空白测定。当没有控制限量可采用时，对比与适用目的或者其他设定标准的偏差和精确度。

8 总结

内部质量控制是确保实验室数据符合目的的必要手段。如果得到正确实施，质量控制方法能监测到批实验数据质量的多个方面。在批次实验中当分析系统的性能超出了可接受的范围，产生的数据将被拒绝，当分析系统实施补救措施后，分析能重复。

必须强调一点，即使是正确执行，内部质量控制也不是万无一失的。明显容易犯两种错误，受控的实验偶尔也会被拒，以及失控的实验偶尔也会被接受。更重要的是，内部质量控

制通常不能发现零星粗差或分析系统中的短期干扰，而这都会影响实验结果。而且，基于内部质量控制的指导只适用于在分析方法的范围内的试验材料的验证。尽管有这些限制，专业经验和专注程度能在一定的程度上减少上述误差，内部质量控制得以正确实施是实验室发布合适质量数据的保证。

最后，必须认识到实施任何质量系统如果敷衍了事，就不能保证产生可靠的数据。对于反馈、补救措施和人员激励的合适程序，必须要形成文件并实施。换而言之，实验室内部必须要承诺对质量保持真诚的态度，以保证实验室内部质量控制项目的成功实施，即内部质量控制必须是全面质量管理系统的一部分。

附　录　A
休哈特(Shewhart)控制图

A.1　前言

很多讲述质量控制程序、应用统计文章和许多 ISO 标准都有关于休哈特(Shewhart)理论、架构和解释的详细的论述,其中包括几个 ISO 标准。有很多文献描述了控制图在临床化学上的应用。Westgard 和他的同伴制定了这些控制表的解释规定,同时也详细研究了结果的作用。该附录中,只提及了简单的休哈特控制图。

在内部质量控制中,当通过连续平行实验得到控制材料的浓度分布在垂直于平行数量时,才能得到休哈特控制图。如果平行中特别控制材料的分析次数大于 1,或者单独结果 x 以及平均值 $\bar{x}$ 就能用来形成控制表。该表格是来于描述随机变量的正态分布 $N(\mu,\sigma^2)$,个体单独数和平均值选取的是不同的。控制目标的选择界限是 $\mu\pm2\sigma$ 和 $\mu\pm3\sigma$。对于一个数据控制体系而言,平均有 1/20 的数据落在 $\mu\pm2\sigma$ 界限范围外,称之为警戒线;只有 3‰的数据落在 $\mu\pm3\sigma$ 界限范围外,称为执行线。实际上,参数 μ 和 σ 的 $\bar{x}$ 和 S 值来组成控制表。持续偏差是由平均值和制定数值的显著差异来说明。

A.2　参数 μ 和 σ 的评估

控制分析系统描述了随机变量的两种来源,批实验内部的特征用变量 σ_0^2 表达,之间用变量 σ_1^2 表达。这两种变量在数量上是有可比性的。在控制表中用于描述个体数值的标准偏差 σ_x 可用公式表示为:

$$\sigma_x=(\sigma_0^2+\sigma_1^2)^{1/2}$$

标准偏差 $\bar{x}$ 可用公式表示为:

$$\sigma_{\bar{x}}=(\sigma_0^2/n+\sigma_1^2)^{1/2}$$

式中:n 代表了控制测量次数,从中能够计算出平均值。n 在批测量中是不变的,否则就无法界定控制限。如果每批实验的重复数量不能被保证,就必须使用个体数值表。再者,该公式意味着 σ_x 或 $\sigma_{\bar{x}}$ 必须要谨慎评估。如果只根据一个重复实验结果来评估,将会导致控制界限太狭窄。

因此,评估必须包括批实验之间的变量。如果,假设初始批实验次数为 n,则平均值由 $\bar{x}_i=\sum_{j=1}^{n}x_{ij}/n(i=1,\cdots m)$ 表达。n 是批实验次数。

因此,μ 的计算值是:$\bar{x}=\sum_i\bar{x}_i/m$

$\sigma_{\bar{x}}$ 的计算值是:$S_x=\sqrt{\dfrac{\sum_i(\bar{x}_i-\bar{x})^2}{m-1}}$

如果没有预先设定批实验次数 n,可通过单一变量分析分别对 σ_0 和 σ_1 进行评估。它们的平方与组内和组间的 MSw 和 MSb 有关,则 ${\sigma_0}^2$ 由 MSw 来计算,${\sigma_1}^2$ 由(MSb-MSw)/n 来计算。

在实际中往往需要初拟一个控制表,收集小批次平行实验的数据来建立,也许没有代表性,用于评估标准偏差也是很易变的,除非使用大量观察数据。而且,在初拟时期,失去控制的情况更有可能发生,同时产生越线的数据。这些数据可能超出适宜的误差范围。因此建议重新计算平均值,再运行一段时间。一个能避免出线影响的办法是在计算中采用 Dixon's Q 或者 Grubbs' 后排除这些数据,然后使用这些经典统计法。或者,这些稳健统计方法能应用到这些数据中检测。

A.3 控制表的解释

这些简单的规定可应用于单个结果或平均值的控制表中。

单控制表。如果下列任何情况发生,都是属于分析系统中的失控状态。

a) 当前分布值落在执行限外。

b) 当前值和前一个值落在警戒限外,但是在执行限内。

c) 有 9 次连续分布值落在平均值线范围的同侧。

双控制表。当两种不同的质控在每个平行中使用时,就需要同时考虑控制表。提高类型 1 的错误(拒绝一个好的平行数据),但是减少类型 2 的错误(接受一个有瑕疵的平行数据)。如果下列任何情况发生,都是属于分析系统中的失控状态。

a) 至少有一个分布值落在执行限外。

b) 两个分布值都落在警戒限外。

c) 当前值和前一个值同时落在警戒限外。

d) 当前值和前一个值有 4 次连续落在平均值线范围的同侧。

e) 有 9 次连续分布值落在平均值同侧。

控制图的有关要求详见 Westgard 规则。

分析化学家应该对失控的分析作出反应,停止当前的诊断分析测试,找出结果被拒后的补救措施,重新分析测试材料。

参考文献

[1] "Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method Performance Studies", Edited W Horwitz, Pure Appl. Chem., 1988, 60, 855 864. (Revision in press).

[2] "The International Harmonised Protocol for the Proficiency Testing of (Chemical) Analytical Laboratories", Edited M Thompson and R Wood, Pure Appl. Chem., 1993, 65, 2123-2144. (Also published in J. AOAC International, 1993, 76, 926-940.

[3] "IFCC approved recommendations on quality control in clinical chemistry. Part 4: internal quality control", J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 1980, 18, 534-541.

[4] S Z Cekan, S B Sufi and E W Wilson, "Internal quality control for assays of reproductive hormones: Guidelines for laboratories". WHO, Geneva, 1993.

[5] M Thompson, "Control procedures in geochemical analysis", in R J Howarth (Ed), "Statistics and data analysis ingeochemical prospecting", Elsevier, Amsterdam, 1983.

[6] M Thompson, "Data quality in applied geochemistry: the requirements and how to achieve them", J. Geochem. Explor., 1992, 44, 3-22.

[7] Health and Safety Executive,"Analytical quality in workplace air monitoring",London,1991.
[8] "A protocol for analytical quality assurance in public analysts' laboratories",Association of Public Analysts,342 Coleford Road,Sheffield S9 5PH,UK,1986.
[9] "Method evaluation,quality control,proficiency testing"(AMIQAS PC Program),National Institute of Occupational Health,Denmark,1993.
[10] ISO 8402:1994."Quality assurance and quality management-vocabulary".
[11] ISO 3534-1:1993(E/F)."Statistics,vocabulary and symbols-Part 1:Probability and general statistical terms".
[12] ISO Guide 30:1992."Terms and definitions used in connections with reference materials"
[13] "International vocabulary for basic andgeneral terms in metrology" ,2nd Edition,1993,ISO,Geneva.
[14] "Guide to the expression of uncertainty in measurement",ISO,Geneva,1993.
[15] M Thompson and P J Lowthian,Analyst,1993,118,1495-1500.
[16] W Horwitz,L R Kamps and K W Boyer,J. Assoc. Off. Anal. Chem. ,1980,63,1344.
[17] D Tonks,Clin. Chem. ,1963,9,217-223.
[18] G C Fraser,P H Petersen,C Ricos and R Haeckel,"Proposed quality specifications for the imprecision and inaccuracy of analytical systems for clinical chemistry",Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. ,1992,30,311-317.
[19] M Thompson,Analyst,1988,113,1579-1587.
[20] ISO Guide 33:1989,"Uses of Certified Reference Materials",Geneva.
[21] W A Shewhart,"Economic control of quality in manufactured product",Van Nostrand,New York,1931.
[22] ISO 8258:1991."Shewhart control charts".
[23] ISO 7873:1993"Control charts for arithmetic means with warning limits".
[24] ISO 7870:1993."Control charts-generalguide and introduction".
[25] ISO 7966:1993."Acceptance control charts".
[26] S Levey and E R Jennings,Am. J. Clin. Pathol. ,1950,20,1059-1066.
[27] A B J Nix,R J Rowlands,K W Kemp,D W Wilson and K Griffiths,Stat. Med. ,1987,6,425-440.
[28] J O Westgard,P L Barry and M R Hunt,Clin. Chem. ,1981,27,493-501.
[29] C A Parvin,Clin. Chem. ,1992,38,358-363.
[30] J Bishop and A B J Nix,Clin. Chem. ,1993,39,1638-1649.
[31] W Horwitz,Pure Appl. Chem. ,(in press).
[32] Analytical Methods Co mmittee,Analyst,1989,114,1693-1697.
[33] Analytical Methods Co mmittee,Analyst,1989,114,1699-1702.

Technical report from the Symposium on the 'Harmonisation of quality assurance systems for Analysis Laboratories,Washington DC,USA,22-23 July 1993 sponsored by IUPAC,ISO et AOAC International

Prepared for publication by MICHAEL THOMPSON[1] and ROGER WOOD[2]

[1] Department of Chemistry,Birkbeck College(University of London),London WC1H OPP,UK

[2] MAFF Food Science Laboratory,Norwich Research Park,Colney,Norwich NR4 7UQ,UK

1991-95 workgroup :

Chairman :M. Parkany(Switzerland);Membres :T. Anglov(Denmark);K. Bergknut(Norway and sweden);P. De Bième(Belgium);K.-G. von Boroviczény(Germany);J. M. Christensen(Denmark);T. D. Geary(South Australia);R. Greenhalgh(Canada);A. J. Head(United Kingdom);P. T. Holland(New Zealand);W. Horwitz(USA). A. Kallner(Sweden;J. Kristiansen(Denmark);S. H. H. Olrichs(Netherlands);N. Palmer(USA). M. Thompson(United Kingdom);M. J. Vernengo(Argentina);R. Wood(United Kingdom).

OIV-MA-AS1-12

分析方法评价实用指南

（决议 10/2005）

1 目的

本指南旨在帮助酒类实验室完成所采用标准方法的认证、内部质量控制和不确定度评价方面的系列分析。

2 前言和适用范围

国际标准 ISO 17025 中关于“检测和校准实验室能力的通用要求”指出：认证实验室在采用和变更分析方法时必须对所得的结果进行确认。应此要求，实验室必须完成以下步骤：第一步，明确客户对参数的要求，以确保所用方法符合这些要求。第二步，对非标准的、改进的或实验室建立的方法进行初步确认。一旦该方法被采用，实验室必须用监测和溯源的方法对所得结果的质量进行监控。最后，必须评估所得结果的不确定度。

为了满足这些要求，实验室会收集大量的国际标准和指南作为参考，但实际上这些标准和指南的应用需要非常慎重。由于这些文本主要针对校准和检测各种不同的实验室，为保持普遍适用性，需要假定读者已经熟练掌握了数据统计处理时所用到的数学定律。

本指南是以国际标准体系为基础而制定的，指南严格遵照其中的相关要求，考虑到酒类实验室对葡萄汁或葡萄酒样品实施常规性分析的特性，确定了合适的应用范围并选择适宜的工具。如果读者希望在某些方面进行更详细的研究，可以参考本指南每章中指向的国际标准。

为满足 ISO 17025 标准的要求，作者选择将不同的方法得到的试验结果结合起来，以保证应用过程的连续性。这些方法所用的数学原理一般是相似的。

各章节的应用实例来自于酒类实验室所使用的工具。

需要重点指出的是，本指南并非面面俱到，只是想以尽可能清晰、适用的方式说明 ISO 17025标准，以及一个常规实验室要满足的基本要求。每个实验室都可以用他们认为更有效或更适用的其他方式来完善或替代这些方法。

最后，值得注意的是，所述方法及其应用，以及对其所得结果的解释都必须经过精确的分析。只有在同样的条件下，它们的相关性才能得到保证。实验室可以运用这些方法提高其分析质量。

3 术语

本文给出的下述定义均源自所列出文献目录中的规范性引用。

分析物

分析方法的目标物。

空白

针对不含基质（即试剂空白）或不含分析物的基质（即基质空白）的测试。

偏差

预测值与可接受参考值之间的差值。

不确定度概算

不确定度来源及其相关标准不确定度的列表建立是为了评价与某个测量结果相关的综合标准不确定度。

计量(针对仪器测量)

根据被测量的响应值,在测量仪器上指示每个参照物质(或某些主要参考物质)标记的位置。

注:不要混淆“计量”和“校准”。

重复性条件

在同一实验室,由同一操作员使用相同的设备,按相同的测试方法,在短时间内对同一被测对象独立进行的测试条件。

再现性条件(实验室内)

在同一实验室,由同一或不同操作员使用不同的设备,按相同的测试方法,在不同时间对同一被测对象独立进行的测试条件。

实验标准偏差

对同一被测对象的 n 次测量,可用数量 s 表征结果的离差,计算公式如下:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

式中 x_i 表示第 i 次测量的结果,$\bar{x}$ 表示 n 次测量结果的算术平均值。

重复性标准偏差

在同一实验室,由同一操作员使用相同的仪器进行多次重复试验,即重复性条件下所得测试结果的标准差。

实验室内再现性标准偏差(或实验室内部总变异性)

在同一实验室,由不同操作员或使用不同的仪器,采用相同的测试方法,特别是在不同日期进行重复试验,即在再现性条件下,所得测试结果的标准差。

随机误差

测量结果与再现性条件下对同一测量进行无限次测试所得结果的平均值之间的差值。

测量误差

测试结果与被测量真值之间的差值。

系统误差

在再现性条件下,对同一测量进行无数次测试,所得结果的平均值与被测量真值之间的差值。

注:误差是一个非常理论化的概念,它所要求的值在现实中无法获得,尤其是被测量的真实值。从原则上讲,误差是不可知的。

数学期望值

对同一测量的 n 次测量,如果 n 趋向于无限大时,x 的平均值趋向于期望值 $E(x)$。

$$E(x) = \lim_{n \to \infty} \frac{\sum_{i=1}^{n} x_i}{n}$$

校准

在规定条件下进行的一组操作过程，用以确定测量仪器或系统的标示值，或者由实物量具或标准物质所代表的量值，与对标准物进行测量所得的响应值之间的关系。

分析方法的内部评价

以标准化和/或公认方法为基础，对分析方法进行实验室内部的统计研究，以证明在其适用范围内，符合事先设定的能力标准。

在指南框架内，方法评价以实验室内部研究为基础，包括与标准方法的比较。

精密度

在规定条件下，独立测试结果之间的接近程度。

注1：精密度仅决定于随机误差的分散性，与真实值或期望值没有任何关系。

注2：精密度的测量用测试结果的标准偏差表示。

注3：所谓"独立测试结果"是指，所得结果不受先前相同或类似测试物结果的影响。精密度的定量测量取决于所规定的条件，而重复性和再现性条件是既定的极端条件。

(可测量的)量

可定性区别和定量测定的现象、物体或物质的属性。

测量的不确定度

与测量结果相关的参数，可表征被测量的所有数值的分散性。

标准不确定度〔$u(x_i)$〕

以标准偏差表示的测量结果的不确定度。

准确度

由大量的测试结果所得的平均值与可接受的参考值之间的接近程度。

注：测量准确度一般用偏差表示。

检测限

测试物中分析物能被检测出的最小量，不同于空白值(在一个指定概率下)，不一定要被量化。在实际测量中，需考虑两种风险：

——α风险：即某物质存在于测试物中，但其测试值却显示数量为零。

——β风险：即测试物中不含某物质，但其测试值却显示数量不为零。

定量限

在变异性明确(即给定变异系数)的方法所述的试验条件下，测试物中被分析物能被定量检出的最小量。

线性

在一定范围内，用某种分析方法检测实验室样品时，仪器响应或结果与被测物的量成比例关系的特性。

这个比例关系由一个预先给定的数学公式表达。所谓线性限是指在已知置信水平(一般为1%)，采用一个线性校准模型得到的目标分析物浓度的试验限。

测试物

用所述的分析方法实施测量的材料或物质。

标准物质

具有一种或多种足够均匀的特性的材料或物质，其特性已经过充分验证可以用来校准

仪器、评估测量方法和给其他物质赋值。

有证标准物质

附有证书的标准物质，其一种或多种特性的值已通过建立溯源性的程序进行确定，使之可溯源到准确复现的用于表示该特性值的计量单位，而且每个标准值都附有给定置信水平的不确定度。

基质

测试物质中除了分析物以外的所有成分。

分析方法

描述对被测物进行分析的方法和过程的书面语言，即：范围、原理或反应、定义、试剂、仪器、程序、结果表达、精密度、测试报告。

警告："检测方法"和"测定方法"有时被作为"分析方法"的同义词使用，但这两种表述都不恰当。

定量分析方法

能够测量实验测试物中分析物数量的分析方法。

标准分析方法（Ⅰ型或Ⅱ型方法）

对于被测分析物能够给出可接受的参考值的方法。

未分级的替代性分析方法

实验室采用的常规分析方法，但不是标准方法。

注：替代分析方法可以是标准方法的简化版本。

测量

以测定量值为主体的操作过程。

注意：这些操作是可以自动完成的。

被测量

测量对象的特定量。

平均值

对于同一被测量的 n 次测量，其平均值如下式计算得到：

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^{n} x_i}{n}$$

式中，x_i 是第 i 次测量的结果。

测量结果

经过测量所得的被测量的值。

灵敏度

分析方法信号值的变化与分析物量值变化之间的比值。

分析物量的变化一般通过配制不同的标准溶液或在基质中添加分析物得到。

注 1：应避免将方法的灵敏度当作其对低含量分析物检测的能力。

注 2：如果分析物的量发生微小变化，信号值也随之发生明显变化，则称这个方法是灵敏的。

测量信号

代表被测物的量，并在功能上与其相关联。

专属性

分析方法的特性,即只对待测分析物的检测发生响应,它确保测量信号仅来自于分析物。

公差

在给定的水平内,由实验室确定的标准值的偏差,在其范围内标准物质的测量值是可接受的。

量值

一个特定量的大小一般表示为一单位量乘以一个数。

量的真实值

与指定特定量的定义一致的值。

注 1:真实值是理想状态下测量所获得的值。

注 2:从本质上讲,任何真实值都是不可测定的。

可接受的标准值

用于比较的约定标准值,它可以是:

a) 基于科学原理的理论值或规定值;

b) 基于一些国家或国际组织的实验研究而指定或认可的值;

c) 基于由科学家或工程组主持的协作实验工作而一致同意或认可的值;

在本指南特定框架下,测试物的可接受标准值(或传统上称作真实值),可由采用标准方法重复测量所得值的算术平均值而来。

方差

标准偏差的平方。

4 总则

4.1 研究方法

当实验室开发一个新的替代方法时,实施程序包括几个步骤。第一步是方法验证,只在初始阶段进行一次,或定期进行。第二步是质量控制,所有在这两个步骤中所采集到的全部数据用于评价方法的质量。第三步定期评价反映了所评价方法测量结果的质量指标。所有这些步骤都是相互关联的,它们组成一个整体,用于评估和控制测量误差。见图 1。

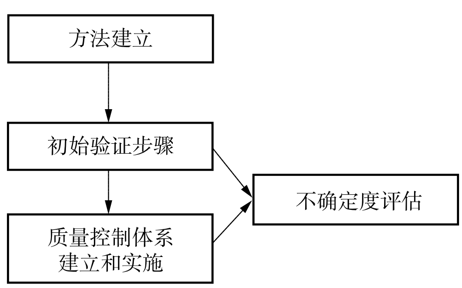


图 1 建立研究方法的流程图

4.2 测量误差的定义

采用所研究的方法进行任何测量所给出的结果,都伴有测量误差,它决定于所得结果和被

测量的真值之间的差别。事实上，被测量的真值是不可得到的，通常使用可接受值来代替它。

测量误差包括两个组成部分：

$$\text{真值}=\text{分析结果}+\overbrace{\text{系统误差}+\text{随机误差}}^{\text{测量误差}}$$

实际上，系统误差导致了测定值与真值的偏差，随机误差存在于方法应用有关的所有误差中。

这些误差可用图形方式表示如下：

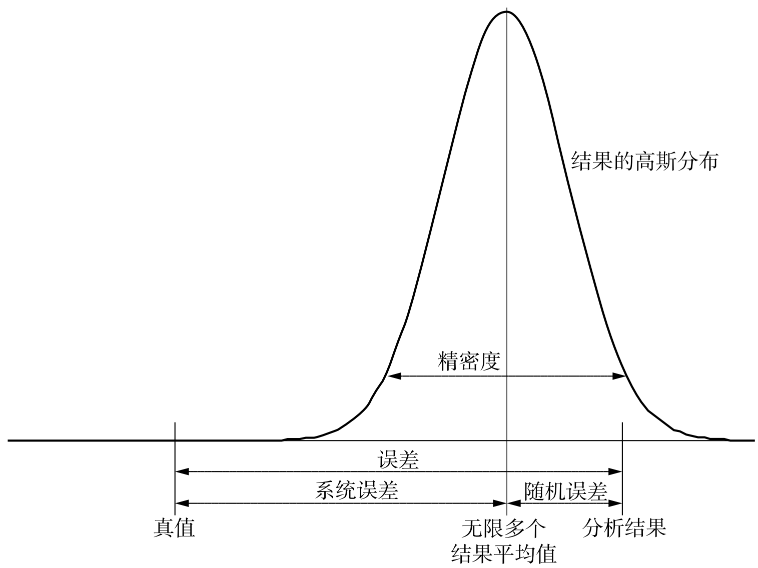


图 2

方法验证和质量控制手段都可用于评估系统误差和随机误差，并可对其随时间变化的情况进行监控。

5　方法验证

5.1　方法学

方法验证包括 3 个步骤，每个步骤都有具体的目标。为达到这些目标，实验室需要有验证方法。有时，针对一个指定的目标有多种方法以适应不同的情况。实验室需要选择最合适的方法用于方法验证。详见表 1。

表 1

步骤	目标	验证方法
应用范围	——确定分析模型 ——确定分析范围	检测限和定量限 稳定性研究

表 1(续)

步骤	目标	验证方法
系统误差或偏差	——可分析范围内的线性响应 ——方法特异性 ——方法准确度	线性研究 特异性研究 与参考方法的比对 与标准物质的比对 实验室间比对
随机误差	——方法精密度	重复性研究 实验室内再现性研究

5.2 第一部分:方法的适用范围

5.2.1 分析基质的定义

基质包含测试材料中除了分析物以外的所有成分。如果这些成分可能影响测量结果,则实验室应确定适于这些基质的方法。

例如,酒类中,某个参数的测定会受到不同基质(如葡萄酒、葡萄汁、甜葡萄酒等)的影响。

当对基质效应存在疑问时,可以进行更加深入的研究,并把它作为特异性研究的一部分。

5.2.2 检测限和定量限

本步骤不适用于那些下限不趋于 0 的方法,如葡萄酒的酒精度、总酸度、pH 等。

5.2.2.1 规范性定义

检测限是分析物能被检测到的最低量,但不必量化为一个精确值。检测限是一个极限测试参数。

定量限是在一种方法条件下分析物能被准确检测到的最低量。

5.2.2.2 参考文献

NF V03-110 标准,相对于标准方法的替代方法的实验室内部验证程序。

方法 Ŕ OIV 的国际纲领,分析方法的检测限和定量限的评估。

5.2.2.3 应用

实际上,定量限通常比检测限更具相关性,按照惯例,后者是前者的 1/3。

评价检测限和定量限的方法一般有几种:

——空白检测;

——线性研究方法;

——图解法。

上述方法适用于不同的情况,在每种情况下,都只是使用数学方法给出参考值结果。因

此，无论是用上述方法中的任何一种，还是凭经验估计，应尽可能地用相应的核查程序对所获得的值进行检查。

5.2.2.4　程序

5.2.2.4.1　空白检测

5.2.2.4.1.1　适用范围

本方法适用于空白分析所得结果其标准偏差不为零的情况。实验者自行判断是否使用试剂空白或基质空白。

有时候，由于某些与不可控信号处理过程有关的原因，空白无法测量或不能提供一个可记录的变化(标准偏差为 0)，实验可在一个分析物浓度非常低的、接近空白的情况下进行。

5.2.2.4.1.2　基本方法和计算

对近似于空白的测试物进行 n 次分析，n 等于或大于 10。

——计算所得结果 x_i 的平均值：

$$\bar{x}_{\text{blank}} = \frac{\sum_{i=1}^{n} x_i}{n}$$

——计算所得结果 x_i 的标准偏差：

$$S_{\text{blank}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x}_{\text{blank}})^2}{n-1}}$$

——根据这些结果，可定义检测限，通常用下式表示：

$$L_{\text{d}} = \bar{x}_{\text{blank}} + (3 \times S_{\text{blank}})$$

——根据这些结果，可定义定量限，通常用下式表示：

$$L_{\text{q}} = \bar{x}_{\text{blank}} + (10 \times S_{\text{blank}})$$

例：表 2 所列结果是游离二氧化硫常规测定方法检测限的评估。

表 2

测试物编号	X/(mg/L)
1	0
2	1
3	0
4	1.5
5	0
6	1
7	0.5
8	0
9	0
10	0.5
11	0
12	0

计算值如下：

$$q=12$$

$$M_{\text{blank}}=0.375$$

$$S_{\text{blank}}=0.528\ \text{mg/L}$$

$$DL=1.96\ \text{mg/L}$$

$$QL=5.65\ \text{mg/L}$$

5.2.2.4.2　线性研究方法

5.2.2.4.2.1　适用范围

线性研究方法可以适用于所有情况，并且在不涉及背景噪音时是有必要的。

注：当标准物质的线性范围极宽，其测量结果的标准偏差可变时，该统计方法可能出现偏差，给出不理想的结果。这种情况下，线性研究局限于一个较低的值，如果值几乎趋于零，分布更均匀，也将导致更多相关的评估。

5.2.2.4.2.2　基本方法和计算

用线性研究中所得结果计算校正函数的参数 $y=a+bx$。

线性研究的数据恢复(参见第 5.3.1 章的线性研究)为：

—回归直线的斜率：

$$b=\frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i-M_x)(y_i-M_y)}{\sum_{i=1}^{n}(x_i-M_x)^2}$$

—剩余标准偏差：

$$S_{\text{res}}=\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{n}(y_{i,j}-\hat{y}_{i,j})^2}{pn-2}}$$

—截距点的标准偏差(须计算)：

$$S_{\text{a}}=S_{\text{res}}\sqrt{\left(\frac{1}{np}+\frac{M_x^2}{\sum_{i=1}^{n}p(x_i-M_x)^2}\right)}$$

检测限 DL 和定量限 QL 的估算按下列公式计算：

$DL=\dfrac{3\times S_{\text{a}}}{b}$估算检测限

$QL=\dfrac{10\times S_{\text{a}}}{b}$估算定量限

例：毛细管电泳测定山梨酸方法的检测限和定量限的估算，其线性范围在 1 mg/L～20 mg/L 之间。

表 3

X_{ref}	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4
1	1.9	0.8	0.5	1.5
2	2.4	2	2.5	2.1

表 3(续)

X_{ref}	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4
3	4	2.8	3.5	4
4	5.3	4.5	4.7	4.5
5	5.3	5.3	5.2	5.3
10	11.6	10.88	12.1	10.5
15	16	15.2	15.5	16.1
20	19.7	20.4	19.5	20.1

标准物质数：$n=8$

重复次数：$p=4$

线性 $y=a+bx$，$b=0.9972$，$a=0.51102$

剩余标准偏差：$S_{res}=0.588$

截距点处的标准偏差：$S_a=0.1597$

估算检测限 $DL=0.48$ mg/L

估算定量限 $QL=1.6$ mg/L

5.2.2.4.3　基于背景噪音记录的谱图方法

5.2.2.4.3.1　适用范围

本法可用于带有背景噪音的谱图记录(如气相色谱等)的分析方法，其检测限的估算是基于背景噪音的研究。

5.2.2.4.3.2　基本方法和计算

在连续几天的时间内，实施 3 个系列的测试，每个系列分别 3 次进样，记录一定数量的试剂空白。

测定下列值：

• h_{max}：在两个采集点间所观察到的信号在 Y 轴上的最大振幅变化，不包括漂移，两个采集点间的距离等于分析物的响应值半峰宽的 20 倍，其中点为所研究化合物的保留时间。

• R：数量/信号响应因子，以高度计。

检测限 DL 和定量限 QL 按照下列公式计算：

$$DL=3h_{max}R \qquad QL=10h_{max}R$$

5.2.2.4.4　检查预定的定量限

本方法可用于验证通过统计或经验所得的定量值。

5.2.2.4.4.1　适用范围

本法可被用来检查一个给定的定量限是否可以接受。它要求实验室至少找到 10 个已知分析物含量的测试物，且分析物的含量与估计的定量限在一个水平上。

当方法具有特定信号、对基质效应不敏感时，测试物可以是合成的溶液，其标准值可由公式计算而得。

在其他情况下，被用作测试物的葡萄酒(或葡萄汁)由标准方法测试所得的测量值与所

研究的限量相等。此时，标准方法的定量限一定低于这个值。

5.2.2.4.4.2　基本方法和计算

分析 n 个独立测试物，其允许值等于被检查的定量限。n 不小于 10。

——计算 n 次测量的平均值：

$$\bar{x}_{LQ} \quad \frac{\sum_{i=1}^{n} x_i}{n}$$

——计算 n 次测量的标准偏差：

$$S_{LQ} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x}_{LQ})^2}{n-1}}$$

式中 x_i 为第 i 个测试物的测量结果。

必须满足下列两个条件：

a）被测量的平均值 $\bar{x}_{LQ}$ 需与预定的定量限 QL 相同：

如果 $\frac{|QL-\bar{x}_{QL}|}{\frac{S_{QL}}{\sqrt{n}}} < 10$，则定量限 QL 认为是有效的。

注：10 是一个与 QL 限值有关的惯常值。

b）定量限为非零值。

如果 $5S_{QL} < QL$，则定量限为非零值。

数值 5 是对应于标准偏差扩展的近似值，考虑了α风险和β风险，以确保 QL 为非零值。这相当于校正 QL 的变异系数小于 20％。

注 1：需记住检测限是由定量限除以 3 得到的。

注 2：应进行校正以确保 S_{LQ} 值不要太大（否则会引起人为的阳性测试），并在所考虑的水平上，随着结果变化，有效地对应于一个合理的标准偏差。实验室负责对 S_{LQ} 值进行关键性评价。

例：检查酶法测定苹果酸的定量限。

估算定量限为：0.1 g/L

表 4

葡萄酒	值
1	0.1
2	0.1
3	0.09
4	0.1
5	0.09
6	0.08
7	0.08
8	0.09
9	0.09
10	0.08

平均值：0.090

标准偏差：0.008

第一个条件：$\dfrac{|LQ-\bar{x}_{QL}|}{\dfrac{S_{QL}}{\sqrt{n}}}=3.87<10$ 定量限 0.1 有效。

第二个条件：$5S_{LQ}=0.04<0.1$ 定量限不为 0。

5.2.3　稳定性

5.2.3.1　定义

稳定性是指方法在应用过程中，试验条件可能发生轻微的变化，而其所得结果保持相近的能力。

5.2.3.2　检测

如果对操作参数的变化所造成的影响存在任何疑问，实验室可采用科学的实验程序，在实际情况下可能发生的变化范围内，测试这些有争议的操作参数。通常这些测试一般很难实施。

5.3　第二部分：系统误差研究

5.3.1　线性研究

5.3.1.1　规范性定义

所谓方法的线性，是指（在一定范围内）方法所提供信息值或结果与测试物中分析物的量成比例的能力。

5.3.1.2　参考文献

NF V03-110 标准　相对于标准方法的替代方法的实验室内部验证程序

ISO 11095 标准　用标准材料进行线性校准

ISO 8466-1 标准水质　分析方法的校准与评价以及性能特征的估计

5.3.1.3　应用

线性研究可以用来确定和验证一个线性动态范围。

当实验室具备稳定的标准物质，且明确获知其认可值（理论上这些值的不确定度等于 0）时，便可进行此项研究。这些标准物质可以作为内标，用校准物质、葡萄酒或葡萄汁进行标定；它们的量一般由外标或认证外标通过标准方法进行至少 3 次重复试验，取其平均值给出。

最后一种情况，也仅在此情况下，该研究使方法具有可追溯性，所使用的实验程序可被视为校准。

在任何情况下，确保标准物质的基质与方法兼容。

最后，计算必须使用最终的测量结果而不是仪器信号指示值。

以下推荐两种方法：

——ISO 11095 的方法，其原理是通过 Fischer 试验来对残差和试验误差进行比较。首先，该方法的有效范围相对较窄（在此范围内能改变被测量的因素不超过 10 个）。此外，当在此实验条件导致再现性误差较低时，试验变得极为苛刻。另一方面，在实验条件较差的情况下，测试容易出现阳性结果，失去其相关性。该方法要求在整个研究范围内，要有一定数量的测量以达到良好的均匀性。

——ISO 8466 的方法，其原理是应用相同的数据对由线性回归产生的残差和由多项式

回归(如 2 阶方程式)产生的残差进行比较。如果多项式模型给出的残差明显较低,则可以得出非线性的结论。若实验范围的一端有高分散风险时,特别适合使用该方法,因此,也适合分析方法的溯源。在整个范围内没有必要进行数量均匀的测量,甚至建议在范围的边界处增加测量次数。

5.3.1.4　ISO 11095 方法

5.3.1.4.1　基本方法

可取的做法是使用 n 种标准物质。n 必须大于 3,但不必超过 10。在再现性条件下,标准物质测量 p 次,p 应大于 3,通常建议为 5。标准物质的可接受的值应是有规律地分布在研究的范围内。所有标准物质的测量次数必须相同。

注意再现性条件必须使用尽可能多的可变性,以及测试显示的非线性过度方式中的风险。

结果列表如下:

表 5

标准物质	可接受标准值物质	测量值				
		平行样 1	…	平行样 j	…	平行样 p
1	x_1	y_{11}	…	y_{1j}	…	y_{1p}
…	…	…	…	…	…	…
i	x_i	y_{i1}	…	y_{ij}	…	y_{ip}
…	…	…	…	…	…	…
n	x_n	y_{n1}	…	y_{nj}	…	y_{np}

5.3.1.4.2　计算和结果

5.3.1.4.2.1　确定回归模型

——计算和测试模型如下:

$$y_{ij}=a+b\cdot x_i+\varepsilon_{ij}$$

其中:y_{ij}——第 i 个标准物质的第 j 个平行样;

x_i——第 i 个标准物质的可接受值;

b——回归直线的斜率;

a——回归直线的截距点;

$a+b\cdot x_i$——第 i 个标准物质的期望值;ε_{ij} 为第 i 个标准物质的测量值 y_{ij} 和期望值之间的差值。

5.3.1.4.2.2　参数估算

回归直线的参数由下列公式得到:

——第 i 个标准物质的 p 次测量的平均值:

$$y_i=\frac{1}{p}\sum_{j=1}^{p}y_{ij}$$

——n 种标准物质的可接受值的平均值:

$$M_x=\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}x_i$$

——所有测量值的平均值

$$M_y = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} y_i$$

——估算斜率 b：

$$b = \frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - M_x)(y_i - M_y)}{\sum_{i=1}^{n}(x_i - M_x)^2}$$

——估算截点 a：$a = M_y - b \times M_x$

——第 i 个标准物质的回归值：$\hat{y}_i = a + b \times x_i$

——残差 e_{ij}：$e_{ij} = y_{ij} - \hat{y}_i$

5.3.1.4.2.3　图表

结果可以用图表的方式表达和分析，实际应用的图表有 2 种类型。

——第一种，图形以测量值对应于标准物质的可接受值表示，同时绘制由计算而得的交叉线。

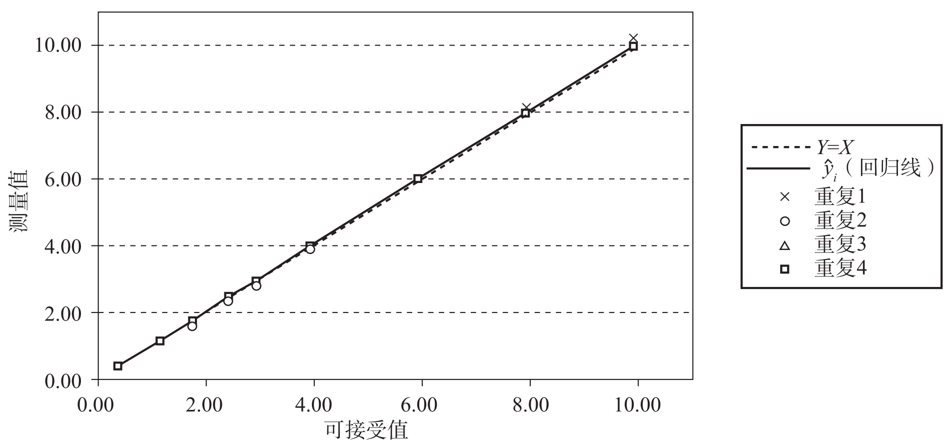


图 3

——第二种，图形以残差对应于标准物质的估计值($\hat{y}$)的交叉线来表示。

该图恰当地表示了对方法线性假设的偏差，即：如果残差均匀分布在正负值范围之间，则该线性动态范围有效。

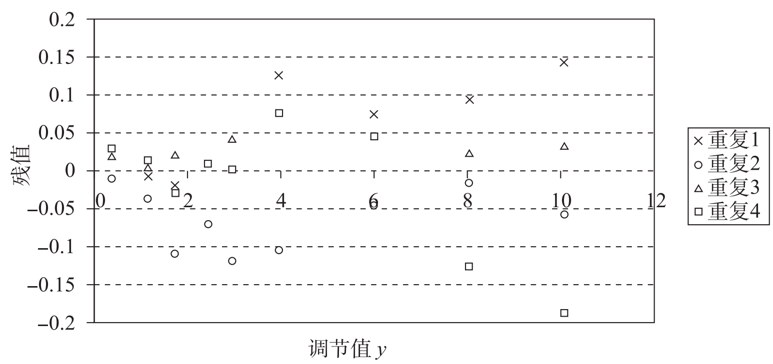


图 4

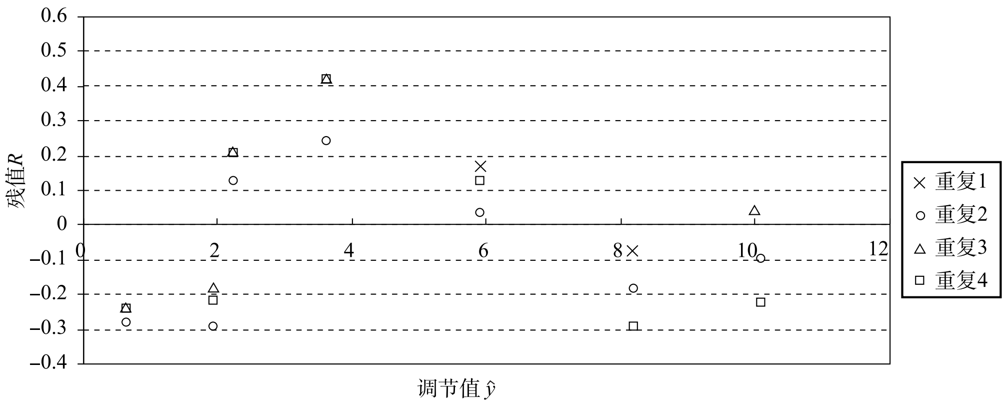


图 5

如果对线性回归存在质疑，除了图形分析外，Fischer-Snedecor 检验（F 检验）可以用来对“线性动态范围是无效的”的假设进行测试。

5.3.1.4.2.4　线性假设测试

首先应确定几个与校准相关的误差值：可通过实验过程中收集到的数据来估算这些误差，然后在这些结果的基础上进行统计测试，以验证线性动态范围的非有效性假设，这就是 F 检验。

5.3.1.4.2.4.1　校准误差的定义

该误差以标准偏差表示，结果等于平方和与自由度之比的平方根。

残差

残差相当于由测量值与回归线所示值之间的误差。

残差的平方和为：

$$Q_{\text{res}} = \sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{p}(y_{ij} - \hat{y}_i)^2$$

自由度为 $np-2$。

剩余标准偏差按以下公式估算得出：

$$S_{\text{res}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{p}(y_{ij} - \hat{y}_i)^2}{np-2}}$$

实验误差

实验误差相当于实验再现性标准偏差。

实验误差的平方和如下：

$$Q_{\text{exp}} = \sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{p}(y_{ij} - y_i)^2$$

自由度为 $np-n$。

实验的标准偏差（再现性）按以下公式估算得出：

$$S_{\text{exp}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{p}(y_{ij} - y_i)^2}{np-n}}$$

注：该量值有时也标示为 S_R。

调整误差

调整误差的值是残差减实验误差。

调整误差的平方和为：

$$Q_{def}=Q_{res}-Q_{exp}$$

或

$$Q_{def}=\sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{p}(y_{ij}-\hat{y}_i)^2-\sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{p}(y_{ij}-y_i)^2$$

自由度为 $n-2$。

调整误差的标准偏差按以下公式估算得出：

$$S_{def}=\sqrt{\frac{Q_{res}-Q_{exp}}{n-2}}$$

或

$$S_{def}=\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{p}(y_{ij}-\hat{y}_i)^2-\sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{p}(y_{ij}-y_i)^2}{n-2}}$$

5.3.1.4.2.4.2　Fischer-Snedecor 检验

比值 $F_{obs}=\frac{S_{def}{}^2}{S_{exp}{}^2}$ 遵守 Fischer-Snedecor 法则，其自由度为 $n-2,np-n$。

实验计算值 F_{obs} 与 Snedecor 表查得的临界值 $F_{1-\alpha}(n-2,np-n)$ 比较。实际情况中 α 值一般为 5%。

如果 $F_{obs}\geqslant F_{1-\alpha}$，则线性动态范围无效的假设成立(误差风险为 5%)。

如果 $F_{obs}<F_{1-\alpha}$，则线性动态范围无效的假设不成立。

例如：毛细管电泳法测定酒石酸的线性研究使用了 9 种标准物质。这些酒石酸合成溶液可以用已知浓度的标准物进行滴定。

表 6

参考物	$T_{i(ref)}$	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4
1	0.38	0.41	0.37	0.4	0.41
2	1.15	1.15	1.12	1.16	1.17
3	1.72	1.72	1.63	1.76	1.71
4	2.41	2.45	2.37	2.45	2.45
5	2.91	2.95	2.83	2.99	2.95
6	3.91	4.09	3.86	4.04	4.04
7	5.91	6.07	5.95	6.04	6.04
8	7.91	8.12	8.01	8.05	7.9
9	9.91	10.2	10	10.09	9.87

回归直线：

$y=a+b\times x$

$b=1.015\ 65$

$a=-\ 0.007\ 98$

校准误差：

剩余标准偏差 $S_{res}=0.071\ 61$

实验再现性标准偏差 $S_{exp}=0.075\ 36$

调整标准偏差 $S_{def}=0.054\ 8$

解释：Fischer-Snedecor 检验

$$F_{obs}=0.53<F_{1-\alpha}=2.37$$

线性动态范围无效的假设不成立

5.3.1.5 ISO 8466 的方法

5.3.1.5.1 基本方法

建议选择 n 种标准物质。n 必须大于 3，但不必超过 10。标准物质应在再现性条件下测量多次。在研究范围的中心位置测量次数可以适当减少（最小为 2），但在范围两端则测量次数必须要较大，一般建议其最小值为 4。标准物质的可接受值需有规律地分布在所研究的范围内。

注：使用最大数的潜存变化源的再现性条件是非常重要的。

结果列表如下：

表 7

标准物质	标准物质的可接受值	测量值				
		样 1	样 2	样 j	…	样 p
1	x_1	y_{11}	y_{12}	y_{1j}	…	y_{1p}
…	…	…	…	…	…	
i	x_i	y_{i1}	y_{i2}			
…	…	…	…	…	…	
N	x_n	y_{n1}	…	y_{nj}	…	y_{np}

5.3.1.5.2 计算和结果

5.3.1.5.2.1 线性回归模型的定义

用上述计算得出线性回归模型。

然后，用 § 5.3.1.4.2.4.1 中的公式计算线性模型 Sres 的标准偏差的残差。

5.3.1.5.2.2 多项式回归模型定义

下面是 2 阶多项式模型的计算，旨在测定 2 阶多项式的回归模型参数，使其可以应用于实验程序的数据处理。

$$y=ax^2+bx+c$$

最终是要测定参数 a、b 和 c。这种测定一般可以使用电子表格和统计软件计算得出。

这些参数的估算公式如下：

$$a=\frac{\sum_i x_i^2 y_i\left(N\sum_i x_i^2-\left[\sum_i xi\right]^2\right)-\sum_i x_i^3\left(N\sum_i x_i y_i-\sum_i x_i\sum_i y_i\right)+\sum_i x_i^2\left(\sum_i x_i y_i\sum_i x_i-\sum_i y_i\sum_i x_i^2\right)}{\sum_i x_i^4\left(N\sum_i x_i^2-\left[\sum_i xi\right]^2\right)-\sum_i x_i^3\left(N\sum_i x_i^3-\sum_i x_i^2\sum_i x_i\right)+\sum_i x_i^2\left(\sum_i x_i\sum_i x_i^3-\left[\sum_i x_i^2\right]^2\right)}$$

$$b=\frac{\sum_i x_i^4\left(N\sum_i x_i y_i-\sum_i x_i\sum_i y_i\right)-\sum_i x_i^2 y_i\left(N\sum_i x_i^3-\sum_i x_i^2\sum_i x_i\right)+\sum_i x_i^2\left(\sum_i y_i\sum_i x_i^3-\sum_i x_i y_i\sum_i x_i^2\right)}{\sum_i x_i^4\left(N\sum_i x_i^2-\left[\sum_i xi\right]^2\right)-\sum_i x_i^3\left(N\sum_i x_i^3-\sum_i x_i^2\sum_i x_i\right)+\sum_i x_i^2\left(\sum_i x_i\sum_i x_i^3-\left[\sum_i x_i^2\right]^2\right)}$$

$$c=\frac{\sum_i x_i^4\left(\sum_i x_i^2\sum_i y_i-\sum_i x_i\sum_i x_i y_i\right)-\sum_i x_i^3\left(\sum_i x_i^3\sum_i y_i-\sum_i x_i^2\sum_i x_i y_i\right)+\sum_i x_i^2 y_i\left(\sum_i x_i\sum_i x_i^3-\left[\sum_i x_i^2\right]^2\right)}{\sum_i x_i^4\left(N\sum_i x_i^2-\left[\sum_i xi\right]^2\right)-\sum_i x_i^3\left(N\sum_i x_i^3-\sum_i x_i^2\sum_i x_i\right)+\sum_i x_i^2\left(\sum_i x_i\sum_i x_i^3-\left[\sum_i x_i^2\right]^2\right)}$$

模型一旦建立，则可计算下列值：

—第 i 个标准物质的回归值：

$$\hat{y}'_i=a\,x^2+bx+c$$

剩余 $e_{ij}e'_{ij}=y_{ij}-\hat{y}'_i$

多项式模型的剩余标准偏差

$$S'_{\text{res}}=\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{p}(y_{ij}-\hat{y}'_i)^2}{np-2}}$$

5.3.1.5.2.3　剩余标准偏差的比较

计算

$$DS^2=(N-2)S_{\text{res}}^2-(N-3)S'^2_{\text{res}}$$

则

$$PG=\frac{DS^2}{S'^2_{\text{res}}}$$

在置信水平为 1－α、自由度为 1 和（N－3）的条件下，将 PG 值与 Fischer-Snedecor 表中所示的临界值 $F_{1-\alpha}$进行比较。

注：一般情况下，α 风险为 5％。比较乐观的情况下，风险为 10％更实际。

如果 $PG\leqslant F_{1-\alpha}$，非线性校准函数不会导致优化调整。例如，校准函数是线性的。

如果 $PG>F_{1-\alpha}$，那么工作范围须尽可能窄，以获得线性校准功能；否则，分析样本的信息值须通过非线性校准函数进行估算。

例：理论情况

表 8

参考物	$T_{i(ref)}$	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4
1	35	22.6	19.6	21.6	18.4
2	62	49.6	49.8	53	
3	90	105.2	103.5		
4	130	149	149.8		
5	205	203.1	202.5	197.3	
6	330	297.5	298.6	307.1	294.2

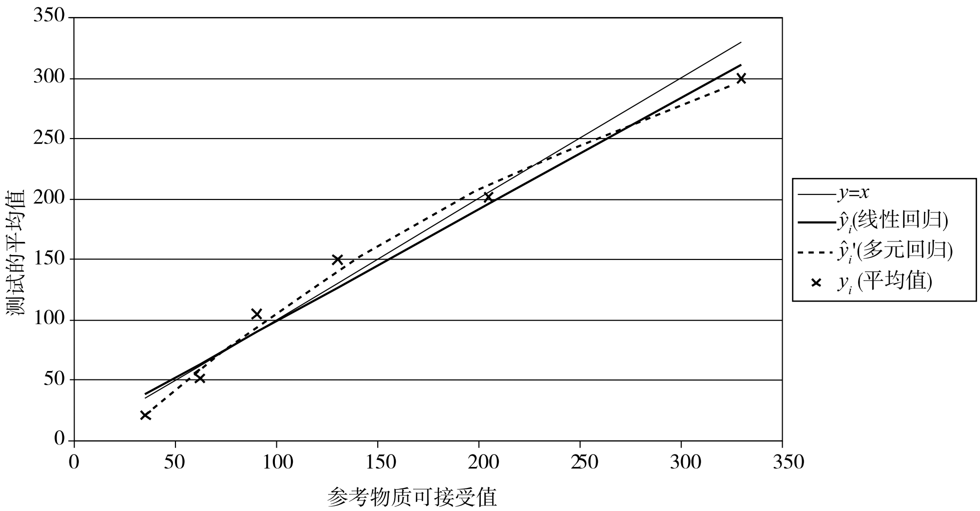


图 6

线性回归方程

$y=1.48x-0.0015$

$S_{res}=13.625$

多项式回归方程

$y=-0.0015x^2+1.485x-27.2701$

$S'_{res}=7.407$

Fischer's 检验

$PG=10.534>F(5\%)=10.128$

当 $PG>F$ 时，线性校准函数不能保留。

5.3.2 特异性

5.3.2.1 规范性定义

方法的特异性是指该方法只适于测定某种特定化合物的能力。

5.3.2.2 应用

如果对测试方法的特异性有怀疑，实验室可以通过设计实验程序来检验。这里建议两种补充试验方法，适用于酿酒领域遇到的大部分情况。

——第一种方法是加标实验，可用于核查方法对所有分析物的测定。

——第二种方法核查其他成分对测量结果的影响。

5.3.2.3　程序

5.3.2.3.1　加标实验

5.3.2.3.1.1　适用范围

该实验可用于核查方法对所有分析物的测定。

实验程序是基于对所测定的化合物标准添加，仅适用于方法对基体效应不敏感的情况。

5.3.2.3.1.2　基本方法

其重点在于添加前后分析物添加量的显著差别。

在 n 种测试物中进行不同的加标试验。测试物中待分析物的初始浓度和添加浓度的选择要在所覆盖浓度范围内，测试物还必须包括常规分析中要求的各种基质，建议使用至少 10 种测试物。

结果列表见表 9：

表 9

测试物	添加前量 (x)	添加量 (v)	添加后量 (w)	检出量 (r)
1	x_1	v_1	w_1	$r_1=w_1-x_1$
…	…	…	…	…
i	x_i	v_i	w_i	$r_i=w_i-x_i$
…	…	…	…	…
n	X_n	V_n	w_n	$r_p=w_n-x_n$

注 1：必须添加纯的标准溶液。建议按相同的次序在被测试物中添加标准溶液。最高浓度的被测试物必须要稀释到方法适用的浓度范围内。

注 2：为避免系统误差，建议使用独立标准溶液配制加标物。

注 3：多次平行测试可以提高 x 值和 w 值的质量。

5.3.2.3.1.3　计算与结果

特异性的测试原理在于研究回归直线 $r=a+b.v$，验证斜率 b 是否为 1，截距 a 是否为 0.

5.3.2.3.1.3.1　回归直线 $r=a+b.v$ 的研究

回归直线的有关参数可由以下方程得到：

—— 添加量的平均值 $\bar{v}$：$\bar{v}=\frac{\sum_{i=1}^{n} v_i}{n}$

—— 检出值的平均值 $\bar{r}$：$\bar{r}=\frac{\sum_{i=1}^{n} r_i}{n}$

——估算斜率 b：

$$b=\frac{\sum_{i=1}^{n}(v_i-\bar{v})(r_i-\bar{r})}{\sum_{i=1}^{n}(v_i-\bar{v})^2}$$

——估算截距 a：　　$a=\bar{r}-b.\bar{v}$

——第 i 个参考物质的回归值 $\hat{y}_i$：$\hat{r}_i=a+b\times v_i$

——剩余标准偏差：$S_{res}=\sqrt{\dfrac{\sum_{i=1}^{n}(r_i-\hat{r}_i)^2}{n-2}}$

—— 斜率的标准偏差：$S_b=S_{res}\sqrt{\dfrac{1}{\sum_{i=1}^{n}(v_i-\bar{v})^2}}$

——截距的标准差：

$$S_a=S_{res}\sqrt{\frac{1}{n}+\frac{\bar{v}^2}{\sum_{i=1}^{n}(v_i-\bar{v})^2}}$$

5.3.2.3.1.3.2　结果分析

结果分析的目的是在可接受特异性的情况下，排除干扰得出结论。若 $r=a+bv$ 与直线 $y=x$ 重合，则结论正确。

为证明这点，需做两个检验：

—检验交叉线的斜率 b 等于 1 的假设是否成立。

—检验截距 a 是否为 0 的假设是否成立。

这些假设可用 t 检验进行检验，误差风险一般为 1%。但有时风险为 5%更实际。

定义 $T_{critical,bilateral}$[自由度，1%]为 t 分布的双向变量，其相关条件为一定的自由度(dof)下误差风险为 1%。

步骤 1：计算

将斜率为 1 时的标准值进行比较计算：

$$T_{obs}=\frac{|b-1|}{S_b}$$

将截距为 0 时的标准值进行比较计算：

$$T'_{obs}=\frac{|a|}{S_a}$$

计算 t 分布的临界值：$T_{critical,bilateral}[p-2;1\%]$

步骤 2：说明

➢ 如果 T_{obs} 小于 $T_{critical}$，则回归直线的斜率等于 1。

➢ 如果 T'_{obs} 小于 $T_{critical}$，则回归直线的截距等于 0。

➢ 如果这两个条件都符合，则拟合曲线为 $y=x$，方法具有特异性。

注 1：由以上结果可以计算平均重叠率，从而使特异性得以量化。它不能用来“校正”结果，因为如果检测到显著性偏差存在，则替代方法不可能得到 100%的验证。

注 2：由于实验原理以直线方程的计算，则至少应该包含三个添加水平，应恰当选择每个水平的添加量，以便取得最佳分布。

5.3.2.3.1.3.3　重叠线图

特异性实例

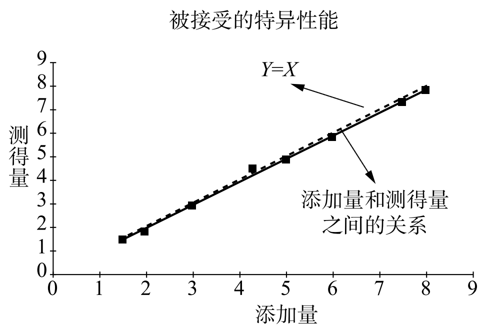


图 7

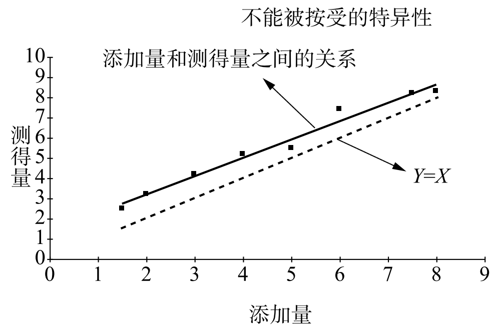


图 8

5.3.2.3.2　其他成分对测量结果的影响研究

5.3.2.3.2.1　适用范围

如果实验室怀疑除了分析物以外,其他化合物存在相互作用,可以制定实验方案来测定各种化合物对检测结果的影响。这里建议的实验方案称为预实验。实验室借助其掌握的分析技术知识和经验,能初步判定在葡萄酒中可能存在的化合物以及它们对分析结果产生的影响。

5.3.2.3.2.2　基本方法和计算

对 n 个葡萄酒平行样重复分析,研究目标化合物添加前后对被测试物分析结果的影响,样品数 n 值至少等于 10。

先计算标准品添加前的两次重复实验结果 x_i,x'_i 的平均值 M_{x_i},然后计算添加后的两次重复实验结果 y_i 和 y'_i 的平均值 M_{y_i},最后计算 M_{x_i} 和 M_{y_i} 的差值 d_i。

实验结果如表 10 所示:

表 10

样品	x 添加后		y 添加后		均值		差值
	重复 1	重复 2	重复 1	重复 2	x	y	d
1	x_1	x'_1	y_1	y'_1	M_{x_1}	M_{y_1}	$d_1=M_{x_1}-M_{y_1}$
…	…	…	…	…	…	…	…
i	x_i	x'_i	y_i	y'_i	M_{x_i}	M_{y_i}	$d_i=M_{x_i}-M_{y_i}$
…	…	…	…	…	…	…	…
n	x_n	x'_n	y_n	y'_n	M_{x_n}	M_{y_n}	$d_n=M_{x_n}-M_{y_n}$

添加前结果平均值 M_x:

$$M_x=\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}M_{x_i}$$

添加后结果平均值 M_y:

$$M_y = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} M_{y_i}$$

计算差值平均值 M_d

$$M_d = \sum_{i=1}^{n} \frac{d_i}{n} = M_y - M_x$$

计算标准偏差差值 S_d：

$$S_d = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(d_i - M_d)^2}{n-1}}$$

计算 Z-score：

$$Z_{\text{score}} = \frac{|M_d|}{S_d}$$

5.3.2.3.2.3　说明

a）如果 $Z_{\text{score}} \leqslant 2$，则添加物对分析结果几乎没有影响，其误差风险为 5%。

b）如果 $Z_{\text{score}} \geqslant 2$，则添加物对分析结果有影响，其误差风险为 5%。

注：上述关于 Z_{score} 的解释是基于 95% 置信区间考虑的，变异服从正态分布规律。

例：傅里叶变换红外光谱（FTIR）测定葡萄酒中的果糖、葡萄糖含量时，样品中可能存在成分之间的相互作用。

表 11

酒样	添加前		添加 250 mg/L 山梨酸钾		添加 1 g/L 水杨酸		差值	
	水杨酸	样 1	样 2	样 1	样 2	样 1	样 2	山梨酸
1	6.2	6.2	6.5	6.3	5.3	5.5	0.2	−0.8
2	1.2	1.2	1.3	1.2	0.5	0.6	0.05	−0.65
3	0.5	0.6	0.5	0.5	0.2	0.3	−0.05	−0.3
4	4.3	4.2	4.1	4.3	3.8	3.9	−0.05	−0.4
5	12.5	12.6	12.5	12.7	11.5	11.4	0.05	−1.1
6	5.3	5.3	5.4	5.3	4.2	4.3	0.05	−1.05
7	2.5	2.5	2.6	2.5	1.5	1.4	0.05	−1.05
8	1.2	1.3	1.2	1.1	0.5	0.4	−0.1	−0.8
9	0.8	0.8	0.9	0.8	0.2	0.3	0.05	−0.55
10	0.6	0.6	0.5	0.6	0.1	0	−0.05	−0.55

山梨酸 $M_d = 0.02$

$S_d = 0.086$

$Z_{\text{score}} = 0.23 < 2$

水杨酸 $M_d = -0.725$

$S_d = 0.282$

$Z_{score} = 2.57 > 2$

总之，山梨酸钾的存在并不影响傅里叶变换红外光谱对葡萄酒中的果糖、葡萄糖含量测定。此外，鉴于水杨酸对结果测定有影响，为使测定结果在有效范围之内，样品不能含有水杨酸。

5.3.3　方法准确度研究

5.3.3.1　步骤

5.3.3.1.1　定义

一系列实验结果的平均值与可接受参考值之间的相关性。

5.3.3.1.2　基本原理

当参考值是由认证机构给出的，准确度研究可认为与结果数据可追溯性相关。特别适用于下述两种情况：

——有证标准品的可追溯性：在这种情况下，准确度研究可以和线性以及校准研究一起进行，实验方案如该研究所述。

——认可实验室间比对分析链的可追溯性。

其他情况，即使用的材料物质未经过认证，这在常规酒类实验室最为普遍。这类情况常使用下列比对：

——与标准方法比对。

——与未认可实验室比对分析链的结果比较。

——与内部参考物质或外部未认证参考物质比对。

5.3.3.1.3　参考文献

NF V03-110 实验间替代方法和参考方法评价程序

NF V03-115 检验参考方法使用指南

ISO 11095 参考方法的线性校正

ISO 8466-1 水的质量-分析方法和校正的评价

ISO 57025 测试方法和结果的准确度

5.3.3.2　替代方法与 OIV 标准方法的比对

5.3.3.2.1　适用范围

本方法适用于实验室采用的 OIV 标准方法或可追溯的、经确认的方法，且这些检验方法的性能已经确认并能满足客户需求。

研究比对这两种方法的准确度，首先要确保被验证方法的重复性已经过确认，并使之与标准方法进行比对。进行重复性比对的方法详见重复性章节。

5.3.3.2.2　与标准方法相对比的替代方法准确度

5.3.3.2.2.1　定义

准确度可定义为标准方法与替代方法所获得的值之间的一致程度，与两个方法的精密度误差无关。

5.3.3.2.2.2　适用范围

作为标准方法的替代方法，其准确度有一定的应用领域，两种方法的重复性是恒定的。

实际上，可将分析范围划分为几个部分或“水平范围”（2～5 个），在这些部分或“水平范围”内，认为方法的重复性相对恒定。

5.3.3.2.2.3　基本方法和计算

对于每一个水平范围，准确度都基于 n 种被测试物，其中分析物的浓度要包含在所讨论的水平范围。为得到好的结果，至少要用到 10 种测试材料。

在重复性条件下，每种被测试物分别用两种方法进行平行分析。

计算替代方法的两次测量 x_i 和 x'_i 的平均值 M_{x_i} 以及标准方法的两次测量 y_i 和 y'_i 的平均值 M_{y_i}，然后计算 M_{x_i} 和 M_{y_i} 的差值 d_i。

实验结果如表 12：

表 12

测试材料	X：可选择方法		Y：参考方法		平均值		方差
	重复 1	重复 2	重复 1	重复 2	x	y	d
1	x_1	x'_1	y_1	y'_1	Mx_1	My_1	$d_1 = Mx_1 - My_1$
—	…	…	…	…	…	…	…
i	x_i	x'_i	y_i	y'_i	Mx_i	My_i	$d_i = Mx_i - My_i$
—	…	…	…	…	…	…	…
n	x_n	x'_n	y_n	y'_n	Mx_n	My_n	$d_n = Mx_n - My_n$

计算如下：

——替代方法的平均值 M_x：

$$M_x = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} Mx_i$$

——标准方法的平均值 M_y：

$$M_y = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} My_i$$

——计算差值的平均值 M_d

$$M_d = \sum_{i=1}^{n}\frac{d_i}{n} = Mx - My$$

计算差值的标准方差 S_d：

$$S_d = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(d_i - M_d)^2}{n-1}}$$

——计算 Z_{score}：

$$Z_{\text{score}} = \frac{|M_d|}{S_d}$$

5.3.3.2.2.4　说明

——如果 $Z_{\text{score}} \leqslant 2.0$，在所考虑的水平范围内，一个方法相对于另一个方法的准确度较好，误差风险 $\alpha = 5\%$。

——如果 $Z_{\text{score}} > 2.0$，在可考虑的水平范围内，相对于参考方法，替代方法不准确，误差风险 $\alpha = 5\%$。

注：上述关于 Z_{score} 的证明可能假设其变异在 95% 的置信区间内，符合正态分布。

例如：用 FTIR 定量检测葡萄糖和果糖相对于酶联法的准确度研究。第一个水平范围包括从 0 g/L～5 g/L，第二个水平范围从 5 g/L～20 g/L。

表 13

葡萄酒	FTIR 1	IRTF2	Enz 1	Enz 2	d_i
1	0	0.3	0.3	0.2	−0.1
2	0.2	0.3	0.1	0.1	0.2
3	0.6	0.9	0.0	0.0	0.7
4	0.7	1	0.8	0.7	0.1
5	1.2	1.6	1.1	1.3	0.2
6	1.3	1.4	1.3	1.3	0.0
7	2.1	2	1.9	2.1	0.0
8	2.4	0	1.1	1.2	0.1
9	2.8	2.5	2.0	2.6	0.3
10	3.5	4.2	3.7	3.8	0.1
11	4.4	4.1	4.1	4.4	0.0
12	4.8	5.4	5.5	5.0	−0.2

$M_d = 0.13$

$S_d = 0.23$

$Z_{score} = 0.55 < 2$

表 14

葡萄酒	FTIR 1	IRTF2	Enz 1	Enz 2	d_i
1	5.1	5.4	5.1	5.1	0.1
2	5.3	5.7	5.3	6.0	−0.2
3	7.7	7.6	7.2	7.0	0.6
4	8.6	8.6	8.3	8.5	0.2
5	9.8	9.9	9.1	9.3	0.6
6	9.9	9.8	9.8	10.2	−0.1
7	11.5	11.9	13.3	13.0	−1.4
8	11.9	12.1	11.2	11.4	0.7
9	12.4	12.5	11.4	12.1	0.7
10	16	15.8	15.1	15.7	0.5
11	17.7	18.1	17.9	18.3	−0.2
12	20.5	20.1	20.0	19.1	0.7

$M_d = 0.19$

$S_d = 0.63$

$Z_{score}=0.30<2$

从两个水平范围看，$Z_{score}<2$，则可以认为，用 FTIR 法与酶联法相比，定量测定葡萄糖和果糖的方法也是准确的。

5.3.3.3　实验室间测试比对

5.3.3.3.1　适用范围

实验室间测试比对有两种类型：

1.协同研究涉及一个单一的方法。实施这些研究的目的，为了对新方法进行初步的验证，主要是为了确定实验室间重复性的标准偏差 SR_{inter}（方法）。同时，也可以得到平均值。

2.实验室间比对分析，或称为能力测试。实施这些测试是为了验证实验室采用的方法，也是为了常规的质量控制（详见§5.3.3.3）。比对分析结果包括平均值 m、标准实验室间重复性和方法偏差 SR_{inter}。

通过参与分析链或者参与合作研究，实验室可以利用结果进行方法准确度研究。首先，确认其有效性，并进行常规质量控制。

如果实验室间测试在认证机构的框架内实施，那么这种比对可以用于方法的追溯性研究。

5.3.3.3.2　基本方案和方法

为了获得足够的比对，建议在实验过程中使用至少 5 种被测试物。

对于每种测试材料，可以得到两个结果：

——具有显著性意义的所有实验室结果的平均值 m；

——实验室间重复性的标准方差 $S_{R\text{-}inter}$。

实验室在可重复的条件下，对被测物进行 p 次平行分析，p 至少等于 2。

另外，实验室必须确认，实验室内变异性（实验室内重复性）必须低于分析链规定的实验室间变异性（实验间重复性）。

对每种被测物，实验室都要计算 Z_{score}，如下式所示：

$$Z_{score}=\frac{|m_{lab}-m|}{S_{R-inter}}$$

结果如表 15 所示：

表 15

被检测物	重复 1	…	重复 j	…	重复 p	实验室平均值	分析链平均值	标准偏差	Z_{score}
1	x_{11}	…	x_{1j}	…	x_{1p}	$m_{lab1}=\frac{\sum_{j=1}^{p}x_{1j}}{p}$	m_1	$S_{R\text{-}inter(1)}$	$Z_{score1}=\frac{\lvert m_{lab1}-m_1\rvert}{S_{R\text{-}inter(1)}}$
…	…	…	…	…	…	…	…	…	…
i	x_{i1}	…	x_{ij}	…	x_{ip}	$m_{labi}=\frac{\sum_{j=1}^{p}x_{ij}}{p}$	m_i	$S_{R\text{-}inter(i)}$	$Z_{scorei}=\frac{\lvert m_{labi}-m_i\rvert}{S_{R\text{-}inter(i)}}$
…	…	…	…	…	…	…	…	…	…
n	x_{n1}	…	x_{nj}	…	x_{np}	$m_{labn}=\frac{\sum_{j=1}^{p}x_{nj}}{p}$	m_n	$S_{R\text{-}inte(n)}$	$Z_{scoren}=\frac{\lvert m_{labn}-m_n\rvert}{S_{R\text{-}inter(n)}}$

5.3.3.3.3 说明

如果所有 Z_{score} 值低于 2，则可以认为所研究方法的结果与实验室获得的结果一致。

注：上述关于 Z_{score} 的说明可能假设其变异在 95% 的置信区间内，符合正态分布。

例：由实验室间分析得到的两个样本的游离二氧化硫参数结果如下。

表 16

样品	x_1	x_2	x_3	x_4	实验室均值	分析链均值	标准偏差	Z_{score}
1	34	34	33	34	33.75	32	6	0.29<2
2	26	27	26	26	26.25	24	4	0.56<2

可以看出，这两个样本的分析链比对结果是令人满意的。

5.3.3.4 与参考物质比对

5.3.3.4.1 适用范围

对一个指定的参数，在没有标准方法（或者其他任何方法）的情况下，参数也没有经过分析链处理，只能是将待验证方法的结果与可接受的内部或外部参考值进行比对。

参考物质可以是用 A 级玻璃器皿和/或校准计量器具制备的合成溶液。

对有证参考物质来说，能使比对结果具有可追溯性，使测量和线性研究同时进行。

5.3.3.4.2 基本方法和计算

在一个给定的水平范围内，设立 n 个参考物质，可以认为重复性试验的结果接近一个常数，n 值必须至少等于 10。

重复分析每个参考物质。

用替代方式进行 2 次测量，得结果 x_i 和 x'_i，计算其平均值 Mx_i。

定义 T_i 为第 i 种参考物质的可接受值。

结果报告如表 17 所示：

表 17

参考物质	x：替代方法			T：参考物质的可接受值	差值 d
	重复 1	重复 2	平均值 x		
1	x_1	x'_1	Mx_1	T_1	$d_1 = Mx_1 - T_1$
…			…	…	…
i	x_i	x'_i	Mx_i	T_i	$d_i = Mx_i - T_i$
…			…	…	…
n	x_n	x'_n	Mx_n	T_n	$d_n = Mx_n - T_n$

替代方法结果的平均值 M_x：

$$M_x = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} Mx_i$$

参考物质可接受平均值 M_T：

$$M_T = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} T_i$$

计算平均差值 M_d：

$$M_d = \sum_{i=1}^{n} \frac{d_i}{n} = M_x - M_T$$

计算差值的标准偏差 S_d：

$$S_d = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (d_i - M_d)^2}{n-1}}$$

计算 Z-score：

$$Z_{score} = \frac{|M_d|}{S_d}$$

5.3.3.4.3 说明

——如果 $Z_{score} \leqslant 2.0$，那么在所讨论的水平范围内，相对于参考物质的可接受值，替代方法的准确度是良好的。

——如果 $Z_{score} > 2.0$，那么在所讨论的水平范围内，相对于参考物质的可接受值，替代方法的准确度较差。

注：上述关于 Z_{score} 的说明可能假设其变异在95%的置信区间内，符合正态分布。

例：尚无标准方法对气相色谱-质谱法（GC-MS）测定4-乙基苯酚的分析结果进行比对，其结果与参考物质可接受值进行比对，参考物质为由可追溯设备配制的合成溶液组成。

表 18

测试设备	$T_{i(ref)}$	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	M_y	d_i
1	4.62	6.2	6.56	4.9	5.7	5.8	1.2
2	12.3	15.1	10.94	12.3	11.6	12.5	0.2
3	24.6	24.5	18	25.7	27.8	24.0	−0.6
4	46.2	48.2	52.95	46.8	35	45.7	−0.5
5	77	80.72	81.36	83.2	74.5	79.9	2.9
6	92.4	97.6	89	94.5	99.5	95.2	2.8
7	123.2	126.6	129.9	119.6	126.9	125.8	2.6
8	246.4	254.1	250.9	243.9	240.4	247.3	0.9
9	385	375.8	366.9	380.4	386.9	377.5	−7.5
10	462	467.5	454.5	433.3	457.3	453.2	−8.9

$M_d = -0.7$

$S_d = 4.16$

$Z_{score} = 0.16$

由上述结果可知，与参考物质的可接受值相比，气相色谱-质谱法测定4-乙基苯酚的分析结果可以认为是准确的。

5.4 第三部分:随机误差研究

5.4.1 总则

随机误差可通过精密度研究近似地得到。计算精密度的方法,适用于各种实验室条件,包括重复性和重现性试验条件,以及测量的极端条件。

精密度研究是测量不确定度研究的基本内容之一。

5.4.2 参考文献

——标准 ISO 5725,测量方法和结果准确性;

——标准 NF V-110,标准方法之替代方法的实验室内部验证程序。

5.4.3 方法精密度

5.4.3.1 定义

在特定条件下,各独立测试结果之间的一致程度。

注1:精确度仅决定于随机误差的分散性,与真实值和规定值无关。

注2:测量精密度的表达基于测试结果的标准偏差。

注3:所谓"独立的测试结果"是指,所得结果不受相同或相似材料的先前结果的影响。精密度的定量测量,完全取决于所规定的条件。重复性和重现性条件是特定的极端条件。

实际上,精密度涉及重复性和重现性的所有试验条件。

5.4.3.2 适用范围

从重复性和重现性的一般理论情况到特定情况,方法和计算详述如下。此详尽方法可适用于大部分实验条件下的精密度研究。

精密度研究可以先验于每一个定量方法。

多数情况下,在方法的有效范围内,精密度不是恒定的。此时,最好的做法是设置几个部分或"水平范围",在其范围内,我们有理由认为精密度是相对恒定的。同时,精密度计算会在每个水平范围内重复进行。

5.4.3.3 一般理论情况

5.4.3.3.1 基本方法和计算

5.4.3.3.1.1 几种受试物的计算

在一段相当长的时间内对 n 种物质进行多个平行分析,p_i 是第 i 种受试物的备份数。受试物的性质在整个分析期间必须保持不变。

对每一个备份,可以重复 K 次测量(此处我们不考虑重复次数 K 随受试物的不同而改变的情况,否则使计算更为复杂)。

总的重复数必须大于10,并分布于所有的受试物。

结果报告如表19所示($K=2$ 的情况):

表19

重复数测试材料	1		…		j		p_1		p_i		p_n	
1	x_{11}	x'_{11}	…	…	x_{1j}	x'_{1j}	x_{1p1}	x'_{1p1}				
…												
i	x_{i1}	x'_{i1}	…	…	x_{ij}	x'_{ij}	…	…	x_{ipi}	x'_{ipi}		
…												
n	x_{n1}	x'_{n1}	…	…	x_{nj}	x'_{nj}	…	…	…	…	x_{npn}	x'_{npn}

这种情况下，总的变异标准偏差（或精密度的标准偏差 S_v）可由下式得到：

$$S_v=\sqrt{Var(\bar{x}_{ij})+\left(1-\frac{1}{k}\right)Var(\text{répet})}$$

其中：$Var(\bar{x}_{ij})$为所有受试物重复平均值的方差。$Var(\text{répet})$为所有平行样的重复性方差。

——如果受试物的每个平行样进行双平行测试（$K=2$），则表达式为：

$$S_v=\sqrt{Var(\bar{x}_{ij})+\frac{Var(\text{repeat})}{2}}$$

——当受试物的每个平行样只进行一次测量（$K=1$）时，重复性的方差为零，则表达式为：

$$S_v=\sqrt{Var(\bar{x}_{ij})}$$

——$Var(\bar{x}_{ij})_d$ 的计算

两个平行样 x_{ij} 和 x'_{ij} 的平均值为：

$$\bar{x}_{ij}=\frac{x_{ij}+x'_{ij}}{2}$$

对于每种受试物，n 个平行样的平均值计算如下：

$$M_{xi}=\frac{\sum_{j=1}^{p_i}\bar{x}_{ij}}{p_i}$$

n 次不同测量数是 p_i 的合计：

$$N=\sum_{i=1}^{n}p_i$$

则方差 $Var(\bar{x}_{ij})$可由下列公式所得：

$$Var(x_{ij})=\frac{\sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{p_i}(\bar{x}_{ij}-M_{x_i})^2}{N-n}$$

注：方差也可用每种受试物的变异性方差计算：$Var_i(x_j)$。如下述关系式（它与上式密切相关）所示：

$$Var(x_{ij})=\frac{\sum_{i=1}^{n}(p_i-1)\cdot Var_i(x_j)}{N-n}$$

——$Var(repent)$的计算

n 种受试物一式双份，用传统的重复性等式计算重复性方差。根据“重复性”章节所讨论的重复性计算方式，当 $K=2$ 时，重复性的方差为：

$$Var(repeat)=\frac{\sum_{i=1}^{p}\sum_{j=1}^{n_i}w_{ij}^2}{2N}\text{，其中 }w_{ij}=x_{ij}-x'_{ij}$$

根据下式计算精确度 v：

$$v=2\sqrt{2}\cdot S_v=2.8\cdot S_v$$

在 95％概率下，精密度 v 的值是指在规定的条件下，由方法所得的两个值之间的差异小于或等于 v。

注 1：这些结果的应用和解释基于假设：在 95%置信水平下，方差符合正态分布规律。

注 2：也可测定在 99%置信水平的精密度，其公式为：$v=2.58\sqrt{2}\cdot S_v=3.65\cdot S_v$。

5.4.3.3.1.2 用一个受试物计算

在这种情况下，计算更简单。建议将受试物制成 p 个测量平行样，如有必要，对每个平行样进行重复测量。p 至少等于 10。

在下列计算中，每个平行样进行了两次测量。

——方差 $Var(\bar{x}_{ij})$ 由下列等式所得：

$$Var(\bar{x}_{ij}) = \frac{\sum_{i=1}^{p}(\bar{x}_i - M_x)^2}{p-1}$$

其中：p 为平行样的数量；M_x 为所有平行样的平均值；$\bar{x}_i$ 为平行样 i 的两次平行测量的平均值。

——方差 $Var(repeat)$ 言由下列等式所得：

$$Var(repeat) = \frac{\sum_{i=1}^{p} w_i^{\,2}}{2p}$$

其中，w_i 为平行样 i 的两次平行测试值的差值。

5.4.3.4 重复性

5.4.3.4.1 定义

重复性是对同一葡萄酒在同一实验室由同一操作者使用相同的设备，在较短时间内，在相同的条件下用相同的方法所获得的相对独立的分析结果之间的一致程度。

这些试验条件被称为重复性条件。

重复性值 r 是在上述规定的重复性条件下，95%的置信水平内，所获得的同一分析下的两个结果的绝对差值。

重复性标准偏差 S_r 是重复性条件下所得结果的标准偏差。它是重复性条件下所得结果的分布参数。

5.4.3.4.2 适用范围

在具备重复性条件下，重复性研究可以毫无困难地应用到每一个定量方法。

多数情况下，在方法的整个有效范围内重复性不是恒定不变的。因此，最好的做法是确定几个部分或“水平范围”，这样，我们可以有理由认为重复性是相对恒定的。对每一个水平范围都要重复计算重复性。

5.4.3.4.3 基本方法和计算

5.4.3.4.3.1 一般情况

受试物数量随着平行样的数量而改变。实际上，我们认为所有受试物的测定次数必须大于 20。对于不同的受试物，没必要保持重复性条件不变，但同一种材料的所有平行样必须在可重复性条件下进行测试。

重复性是精确度计算的特殊情况，$S_v=\sqrt{Var(\bar{x}_{ij})+\frac{Var(repeat)}{2}}$。$Var(repeat)$ 为 0（每个平行样仅做一次测量），其计算与 $Var(x_{ij})$ 的计算相同：

$$S_v = \sqrt{Var(\overline{x}_{ij})} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{p_i}(\overline{x}_{ij} - M_{x_i})^2}{N-n}}$$

r 值是指置信水平为 95%时，重复性条件下所得的两个值之间的差值低于或等于 r。

5.4.3.4.3.2　适用于只有一个平行样的特定情况

实际上，自动分析系统最常见的情况是受试物的分析只有一个平行样。为了达到要求的 20 次测量，至少需要 10 个受试物，同一个受试物在重复性条件下进行两次平行测试。

这种精密度情况下，S_r 的计算可以简化为：

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{q} w_i{}^2}{2p}}$$

其中：S_r——重复性标准偏差；

p——进行双平行分析的受试物数量；

w_i——双平行样之间的绝对差值。

根据下列公式计算重复性 r 值：

$$r = 2.8\ S_r$$

例：对于所讨论的游离二氧化硫的替代检测方法，测量范围为 0 mg/L～50 mg/L，测试者要选择至少 10 个样品，其浓度值正常分布见表 20。

表 20

样品号	x_i/(mg/L)	x'_i/(mg/L)	W_i(绝对值)
1	14	14	0
2	25	24	1
3	10	10	0
4	2	3	1
5	35	35	0
6	19	19	0
7	23	23	0
8	27	27	0
9	44	45	1
10	30	30	0
11	8	8	0
12	48	46	2

根据上述表中所给出的值，得到下列结果：

Q=12

S_r=0.54 mg/L

R=1.5 mg/L

该结果可表述为，在 95%的置信水平下，该研究方法所得的结果重现率低于 1.5 mg/L。

5.4.3.4.4　重复性比较

5.4.3.4.4.1　方法重复性的测定

要评估一个方法的性能,可以将其与参考方法进行重复性比较。

令 $S_{r\text{-}alt}$ 为替代方法的重复性标准偏差,$S_{r\text{-}ref.}$ 为参考方法的重复性标准偏差。

这两者之间,比较是直接的。如果替代方法的重复性值低于或等于参考方法,则结果为阳性。如果较高,实验室必须确保结果符合相关方法所能接受的规定。对于后一种情况,也可应用 Fischer-Snedecor 测试去验证替代方法所得值是否明显高于参考方法。

5.4.3.4.4.2　Fischer-Snedecor 检验

计算比值:

$$F_{obs}=\frac{S_{r\text{-}alt}^{2}}{S_{r\text{-}ref}^{2}}$$

风险因子 α 等于 0.05 的 Snedecor 临界值对应于置信水平为 1α 的 Fischer 变量,其 $v_1=n(x)-n,v_2=n(z)-m$,自由度为:$F(N(x)-n,N(y)-m,1-\alpha)$。将 p 种受试物进行替代方法测试、q 种受试物进行参考方法测试,在只有一个水平样的情况下,Fischer 变量的自由度 $v_1=p,v_2=Q$,即:$F(p,Q,1-\alpha)$。

检验说明:

1) 若 $F_{obs}>F_{1-\alpha}$,替代方法的重复性值明显高于标准方法。

2) 若 $F_{obs}<F_{1-\alpha}$,则表明替代方法的重复性值没有明显高于标准方法。

例:游离二氧化硫检测方法的重复性标准偏差为:

$$S_r=0.54\ \text{mg/L}$$

实验室采用 OIV 标准方法测试相同的样品,所得重复性标准偏差值为:

$$S_{ref}=0.39\ \text{mg/L}$$

$$F_{obs}=\frac{0.54^2}{0.39^2}=\frac{0.29}{0.15}=1.93$$

$v_2=12$

$v_1=12$

$F_{1-\alpha}=2.69>1.93$

所得 F_{obs} 值低于 $F_{1-\alpha}$ 值。我们不能说替代方法的重复性值明显高于参考方法。

5.4.3.5　实验室内重现性

5.4.3.5.1　定义

实验室内重现性是指在同一实验室内,相同或不同操作人员,在不同的时间,使用不同的工作曲线,对同一被检测的葡萄酒进行检测时,其分析结果趋于一致的程度。

5.4.3.5.2　适用范围

如果分析时间在合理限定周期内,并且随着时间的推移至少能在一个受试物上保持稳定,则重现性研究可以应用在定量方法上。

在许多情况下,重现性不能在方法的整个有效范围内保持恒定。这时,最好确定几个部分或者“水平范围”,在这些部分或“水平范围”内,可以认为重现性是相对恒定的。对于每个水平范围都要重复进行重现性计算。

5.4.3.5.3　基本操作程序和计算

实验室选择一个或多个稳定的试验物，在至少一个月的时间内，有规律地应用该方法，记录所得结果(X_{ij}为受试物 i 之平行样 j 的结果)。每种测试材料最少要有 5 个平行样本，总的平行样本量不得少于 10 个。每个平行样可进行两次测试。

精密度计算完全适用于重现性计算，如果是双样测试，则需整合 $Var(repeat)$。

按下式计算重现性 R：

$$R=2.8\ S_R$$

R 是指在 95%置信水平，依据重现性条件所得的两个数值之间的差异小于或等于 R。

例：用水蒸气蒸馏法，在 256 nm 处读取吸收值，测定葡萄酒中山梨酸的重现性研究。

将两种山梨酸含量不同的葡萄酒保存 3 个月，在此期间内定期测定山梨酸含量，每次测量须进行重复性测试。

表 21

平行样	测试材料 1		测试材料 2	
	x_1	x_2	x_1	x_2
1	122	125	140	139
2	123	120	138	137
3	132	130	139	141
4	121	115	143	142
5	130	135	139	139
6	135	142	135	138
7	137	135	139	139
8	130	125	145	145
9	123	130	138	137
10	112	115	135	134
11	131	128	146	146
12			137	138
13			146	147
14			145	148
15			130	128

$n=2$

$p_1=11$

$p_2=15$

$n=26$

$Var(x_{ij})=37.8$

$Var(repet)=5.01$

$S_R=6.35$

$R=17.8$

6 分析方法的质量控制(IQC)

6.1 参考文献

——决议 OIV(Eno19/2002)：分析实验室内部质量质控协调性建议；

——分析化学质量指南 2002 版；

——NF V03-115 标准：参考物质的应用指南。

6.2 总则

分析结果会受到两种误差的影响：系统误差和随机误差，前者转化为偏差。对于系列分析来说，则可定义为另一种误差，它源于系统误差和随机误差：即系列效应，可由系列测量体系的偏差举例说明。

设计 IQC 旨在监控这三种误差。

6.3 参考物质

IQC 主要基于对参考物质测量结果的应用。因此，为了得到一个有效的系统基础，参考物质的选择和制备是关键，必须加以控制。

参考物质由两个参数决定：

——基质；

——参考值的分配。

葡萄酒分析可能会遇到几种情况，汇总于表 22 中：

表 22

项目	基质		
参考值	合成溶液 利用合成溶液可非常容易地制定参考物质。合成溶液不适用于没有特定信号的方法，而且对基质效应非常敏感	天然基质（如葡萄酒） 天然基质，最初可制定出最主要的参考物质，这是由于它可以为实验方法非完全专一地抵抗基质效应带来的任何风险	添加物质的葡萄酒 掺杂的葡萄酒是一种带有人工合成添加物的葡萄酒
理论值	溶液的制作必须要符合兼容的规律。要引起注意的是得到的理论值有一定的误差。这个应用可被用作测定实验方法的精密度，而且基于它的精确性，也适用于参考值的校准	不适用	该方法适用于检测完全没有被测物的葡萄酒底物，这类型的原料适用于非葡萄酒产物的酿酒添加剂。如果添加的物质是葡萄酒原有的组成成分，那么被测物也不再是天然葡萄酒。添加物质必须根据度量衡学规则来进行，其结果有一定的误差 该方法可用于监控实验方法的精密度，而且它也具有一定的精确性。适用于对基质效应敏感的非葡萄酒组成成分的检测，但不适用于葡萄酒组成成分的检测

表 22(续)

项目	基质		
实验值	实验值　机构提供的溶液必须有质量保证书。参考值会有一定置信范围的误差,可以通过与实验值的比较,对实验方法的精密度进行测定。如果参考物质的供应机构经核准后存在问题,则可由此追溯。对基质效应敏感的方法不适用。	在多个实验室进行的分析链上,葡萄酒的实验值已被确定下来。可靠机构打算使用实验值已被确定的葡萄酒样品。然而,事实上,已确定实验值的葡萄酒已被添加物质或化学稳定剂,即基质已受影响 这可以用于测定实验方法的精密度和通过实验值的比较对精确度的确定。若分析链是可信任的,有一定的可信度。可被用于对基质效应敏感的方法	实际上,这包括了被一些机构推荐的添加物质与/或加入化学稳定剂的符合条件的葡萄酒样品。这些物质都不能称为天然的基质。参考值一般在分析链中产生 可以用于测定实验方法的精密度和检查与外标准相比的准确度。供应机构是否经核准后供应参考物,得到实验值一定是可疑值。不可被用于对基质效应敏感的方法
采用参考方法获得的值	如果合成溶液不是从标准物中获得的,那么参考值就不能通过利用参考方法分析该合成溶液来确定。必须进行不低于 3 次的测量。选定的值就是这 3 个结果得出的,并在可重复性方法得出的区间内。如果必要的话,操作者可用溶液的理论值来检查结果的一致性 可以用于测定实验方法的精密度和检查与参考方法相比的准确度。不可用于对基质效应敏感的方法	运用参考方法进行 3 次的测量,选定的值就是这 3 个结果得出的,并在可重复性方法得出的区间内 可以用于测定实验方法的精密度和检查与参考方法相比的准确度。可被用于对基质效应敏感的方法	运用参考方法进行 3 次的测量,选定的值就是这 3 个结果得出的,并在可重复性方法得出的区间内 可以用于测定实验方法的精密度和检查与参考方法相比的准确度。适用于对基质效应敏感的非葡萄酒组成成分的检测,但不适用于葡萄酒组成成分的检测
数值选定的方法以仪器值作为参考值不能控制精度。必须要提出另外可行的方法	参考值是通过选定的方法测量出来。要进行超过 10 次的平行测量,而且要检查确定这些数值的偏差低于可重现值;最极端的值去掉,一直到两个值之间。要保证从超过 10 次平行测量中得到的值的一致性,这一系列数据需使用在之前确定出的可控原料来检测,并将其置于连续数据中的始末 只能用于测定实验方法的精密度,而精确度必须采用另外可行方法	参考值是通过选定的方法测量出来。要进行超过 10 次的平行测量,而且要检查这些低于可重现值的差异性;最极端的值去掉,一直到两个值之间。要保证从超过 10 次平行测量中得到的值的一致性,这一系列数据需使用在之前确定出的可控物质来检测,并将其置于这系列数据中的始末。获得的数值也可以与经过参考方法测量出来的值进行比较(3 次平行测量)。这两个值的偏差必须低于可行方法与参考方法相比得出的合适的准确度 特别在实验方法中产生的随机误差对每一样品有专一性,尤其是由于非专一性的标准信号。这误差经常是最小和低于不确定性,但如果此测量方法用单一的数值校准后,可以产生系统的误差。只能用于测定实验方法的精密度,而精确度必须采用另外可行方法。很明显这就是 FTIR 情况	参考值是通过选定的方法测量出来。要进行超过 10 次的平行测量,而且要检查确定这些数值的偏差低于可重现值;最极端的值去掉,一直到两个值之间。要保证从超过 10 次平行测量中得到的值的一致性,这一系列数据需使用在之前确定出的可控物质来检测,并将其置于这系列数据中的始末 只能用于测定实验方法的精密度,而精确度必须采用另外可行方法。适用于对基质效应敏感的非葡萄酒组成成分的检测,但不适用于葡萄酒组成成分的检测

6.4　分析系列的核查

6.4.1　定义

分析系列是在重复性条件下所进行的一系列测试。

对于以分析系列为主要分析方法的实验室，必须进行核查以确保在分析系列中，测量仪器及其稳定性的即时调节是正确的。

可以采用两种补充方法：

——使用参考物质（常被称为“质控物”）；

——使用内标，特别适于分离方法。

6.4.2　用参考物质核查准确度

系统误差可以用参考物质进行核查，其参考值由核查方法以外的其他方法确定。

参考物质的测量值与容许限有关，测量值在容许限内认为是有效的。实验室对每个分析体系和参数都制定了容许限。对实验室来说，这些值是特定的。

选择合适的参考物质，以使其参考值对应于给定参数的检出值水平。如果测量的范围较大，测量不确定度在整个范围内不是恒定的，则应使用几种控制物，以覆盖不同的范围水平。

6.4.3　系列精密度

当分析系列很长时，分析体系很有可能会发生漂移。这种情况下，必须使用相同的参考物质置于该系列中，定期检查系列精密度。可以使用与准确度测试相同的参考物质。

对于系列中相同的参考物质，其测量值的变异应低于置信水平为 95％时计算所得的重复性值 r。

注：对于 99％的置信水平，S_r 的值采用 3.65。

6.4.4　内标

对某些分离方法可以在分析样品中加入内标物。

在这种情况下，内标应该和已知测量不确定度的校准物质一起加入。

内标可以用于检查系列的准确度和精密度。应当指出的是漂移对内标和分析物是一致的。由于分析物的浓度是由内标的信号值来计算的，那么，漂移影响可以消除。

如果内标存在于规定的公差值内，则该系列需要验证。

6.5　分析系统的核查

6.5.1　定义

这关系到系列核查的另一核查。但与前者不同，它是将长时间范围内所得值进行汇总，并/或将这些值与其他分析系统的所得值相比较。

这种核查将形成两种应用：

—用于监控分析系统稳定性的 Shewhart 图

—分析系统的内外比较

6.5.2　Shewhart 质控图

Shewhart 质控图是用于监控测量体系漂移的图形统计工具，实际上，是在重现性条件下，定期地对稳定的参考物质进行分析。

6.5.2.1　数据采集

在足够长的一段时间内，以规定的时间间隔测量稳定的参考物质。记录这些测量，并在控制图上标注。事实上，测量是在重现性条件下进行的，可用于计算重现性和评估测量不确定度。

所选参考物质的分析参数值必须在有效的测量范围内。

在分析系列中，进行参考物质的测试，如果可能，将其作为例行程序，并且每次分析选择在系列中的不同位置进行。实际上，完全可以用分析系列中的控制物质测量录入到控制图中。

6.5.2.2 结果表述和限量确定

在所述范围水平上，将各个结果与参考物质的可接受值以及所讨论参数的重现性标准偏差进行比较。

在 Shewhart 质控图中可确定两种限量，即与单个结果相关的限量及与平均值相关的限量。

由单个结果确定的限量，常常基于实验室重现性条件下，所述水平范围内的标准偏差值。有两种限量：

——警报限：$\pm 2.S_R$

——处置限：$\pm 3.S_R$

由计算出的平均值定义的限量，随着测量次数的增加而变小。

——此限量为处置限：$\pm \frac{3.S_R}{\sqrt{n}}$。$n$ 为图中所示的测量次数。

注：为便于理解，由计算出的平均值定义的警报限很少在控制图上重现，其值为$\pm \frac{2.S_R}{\sqrt{n}}$。

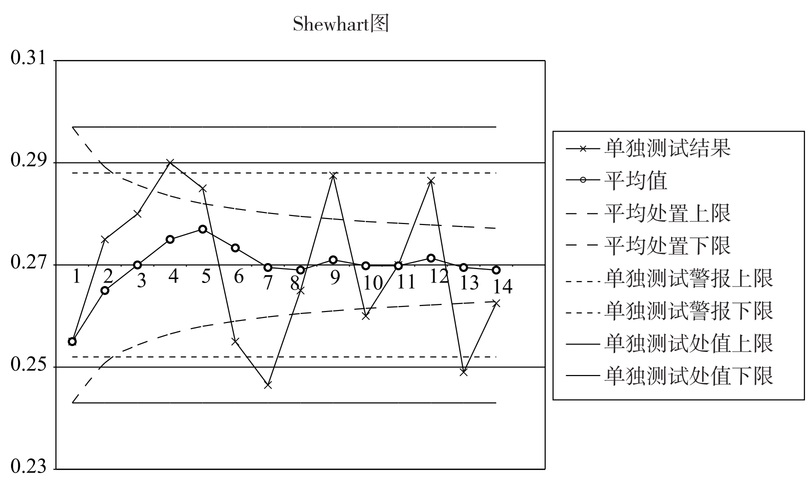


图 9

6.5.2.3 Shewhart 质控图的应用

下面所示为最常使用的操作标准。这些采用的标准，是由实验室准确定义的。

出现下列情况时，需对方法（或仪器）采取校正措施：

a）如果结果超出了处置限之外；

b）如果连续两个结果超出了结果警报限之外；

c）除此之外，如果在下列三种情况下控制图的后续分析表明方法出现了漂移：

——9 个连续结果点位于结果标准值曲线的同一侧；

——连续 6 个结果点上升或下降；

——2/3 的点位于警报限和处置限之间。

d）如果 n 个记录结果的算数平均值超出了其中一个累计平均值的处置限（突出结果的系统偏差）。

注：一旦实施了方法校正措施，则必须修正从 $n=1$ 开始时的控制图。

6.5.3　分析系统的内部比较

实验室中，对于一个指定的参数可能有几种分析方法，为了进行结果比对，往往会对相同的受试物采用不同的方法测量。如果两种方法所得结果的差异，低于在验证过程中 95％的置信水平下计算所得的差值的标准偏差的两倍，则可认为其结果是令人满意的。

注：假设变异在 95％的置信水平，符合正态分布规律。

6.5.4　分析系统的外部比较

6.5.4.1　实验室间比对分析

测试和计算详见“实验室间分析链的比对”章节。

除了通过 Z_{score} 模型检查准确性外，还可以更详细地分析结果，尤其是与平均值相关的实验室数据分布点。对于几个连续的分析链，如果结果均系统地分布在平均值的同一边，即使 Z_{score} 低于临界值，实验室都可实施校正措施。

注：对于 Z_{score}，可以假设其变异在 95％置信水平，符合正态分布规律。

如果外部比较链符合认可要求，则说明该比较工作具有可追溯性。

6.5.4.2　与外部参考物质比较

定期测量外部参考物质，也可用于监控系统误差（偏差）的发生。

通过测量外部参考物质，接受或拒绝与容许限相关的值。这些限量的确定要综合考虑受控方法的不确定度和参考物质的参考值。

6.5.4.2.1　参考物质的标准不确定度

这些物质的参考值对应于相应的置信区间。实验室必须检测该值特性，减少它们对参考值 S_{ref} 的标准不确定度的影响。必须区分下列几种：

——不确定度 a 以置信区间 95％的形式（扩展不确定度）表示。这意味着采取了通常的规定。因此，a 构成了“扩展不确定度”，且对应于所提供材料参考值的不确定度的标准偏差 S_{ref} 的 2 倍。

$$S_{ref}=\frac{a}{2}$$

——认证，或另一个规定，给出限量 $\pm a$，但不规定置信水平。这种情况是采用了矩形分布，在区间 $ref\pm a$ 内被测量 X 的值同样有可能为非特定值。

$$S_{ref}=\frac{a}{\sqrt{3}}$$

——指定限量为 $\pm a$ 的玻璃器皿。这是三角分布的框架。

$$S_{ref}=\frac{a}{\sqrt{6}}$$

6.5.4.2.2　定义参考物质测量中的有效限量

要得到外部参考物质值的标准不确定度 S_{ref}，则须测定实验室方法的标准不确定度 S_{method}。为测定其限量，必须考虑这两种来源的变异。

由实验室方法的扩展不确定度按下式计算 S_{method}：

$$S_{method}=\frac{\text{不确定度}}{2}$$

结果的有效性限量(置信水平为 95%)＝

$$\text{参考值}\pm 2\times\sqrt{S_{ref}^2+S_{method}^2}$$

例：用 pH 为 7 的缓冲溶液检定 pH 计。由 pH 溶液给定的置信区间为±0.01，即这个置信区间对应于置信水平 95%的扩展不确定度。另外，pH 计的扩展不确定度为 0.024。

限量为：$\pm 2\sqrt{\left(\frac{0.01}{2}\right)^2+\left(\frac{0.024}{2}\right)^2}$

即参考值的±0.026 在置信水平为 95%范围之内。

7　测量不确定度的评价

7.1　定义

与测量结果有关的参数，能合理反映分配到被测定量中的数值分布特征。

实际上，不确定度以标准偏差的形式表示，被称为标准不确定度 $u(x)$，或以扩展形式 $U=\pm k.u$表示(一般为 $k=2$)。

7.2　参考文献

——AFNOR ENV 13005：1999 不确定度的表达指南

——EURACHEM 2000 分析方法中的定量不确定度 EURACHEM 第二版 2000

——ISO 57025：1994 测试方法和结果的准确度

——ISO 21748：2004 评价测量不确定度中重复性，再现性和准确度的使用指南

——Perruchet C and Priel M.，Estimating uncertainty，AFNOR 不确定度评价，2000

7.3　适用范围

不确定度可提供两类信息，即：

一方面，对于实验室客户来说，要求解释分析结果时须考虑的潜在变化因子。但必须指出的是，该信息不能作为评估实验室的外部手段。

另外，它可作为评估实验室分析结果质量的内部动态的工具。只要评估是正常进行的，且是基于固定的、明确定义的方法，它就可以用于查看方法的改变是否引起正面或负面的变化(在评估完全基于实验室内部数据的情况下)。

本指南本身限定为酿酒实验室提供处理系列分析的实用方法。这些实验室有大量的具有显著统计规模的数据。

因此，大多数情况下，可用在验证和质控工作中所采集的数据，尤其是 Shewhart 质控表中的数据，来估算不确定度。这些数据可通过试验程序进行补充，特别是用于检测系统误差。

本参考系统阐述两种方法来确定不确定度：实验室内部方法和实验室外部方法。这两种方法所提供的值是明显不同。但是它们的重要性和阐释又不是相统一的。

——实验室内部方法提供的值是针对所研究的体系和实验室的因素。结果的不确定度是指实验室所研究方法的指标。它告诉客户基本情况：实验室所用方法的测得结果的离散程度怎样。

——实验室外部方法所用的值是实验室外部方法测试结果，它提供了该方法总的信息。

实验室所使用的两种方法可以共同使用。有趣的是我们将会看到用实验内部的方法所测得的值是否低于实验室外部方法所测得的值。

7.4　方法学

不确定度的评估包括下面三个基本的步骤。

——被测变量的定义和定量分析方法的描述

——对测量过程的评价分析

——不确定度的评估

7.4.1　被测变量的定义和定量分析方法的描述

首先必须明确以下内容：

——测量的目的；

——测量的量；

——如果被测变量是通过测得的量计算得到的，需要列出它们之间的数学公式；

——所有的测量条件。

理论上，上述这些内容应该包含在实验室质量控制体系当中。在某些特殊情况下，被测变量与测得的量之间的数学公式可能很复杂（如某些物理方法），所以没有必要也不可能详述。

7.4.2　对测量过程的评论分析

在进行不确定度评估时，需要对影响最终结果的误差来源进行确认，并对其一一进行估算，以剔除那些可以忽略的较小误差。

——由于对有问题的因素控制不好而产生漂移的严重程度；

——潜在问题出现的频率；

——测量过程的可检测性。

关键分析可采用如“5M”方法进行。

人员：

检测人的影响。

分析物：

样本效应（稳定性、均匀性、介质效应）和耗材（试剂、产品、溶液、参考物质）等。

硬件：

仪器效应（响应、灵敏度、整合模式等）和实验室设施（天平、玻璃器皿等）。

方法：

方法程序的应用效果（操作条件、操作的连续性等）。

环境：

环境条件（温度、压力、光线、震动、辐射、湿度等）。

7.4.3　标准不确定度的计算评估（实验室间方法）

7.4.3.1　原理

当实验室使用数量有限的方法分析大量系列的样品时，最适合采用基于实验室间再现

性的统计方法，该方法只计算误差的来源而不考虑实验室内部条件再现性的情况。

分析结果与真值的偏差来源于系统误差和随机误差。

$$分析结果=真值+系统误差+随机误差$$

不确定度说明了分析结果的离散程度。将其转化为一个标准偏差如下：

可变性(分析结果)=不确定度

可变性(真值)=0

可变性(系统误差) $=\sqrt{\sum S^2_{系统误差}}$

可变性(随机误差)=S_R(实验室间再现性标准偏差)

由于加上标准偏差的平方，估测的标准不确定度 $u(x)$通过以下方式计算：

$$u(x)=\sqrt{\sum u^2_{(系统误差)}+S_R{}^2}$$

在实验室间再现性条件下，不可整合的误差如系统误差，必须以标准偏差的形式同再现性标准偏差一起被考虑。因此实验室可以采取措施使采用的再现性的条件涵盖最大数量的误差来源，具体做法是：实验室可以采用稳定的测试材料，在相对足够长的时间内，变换所有可能的实验条件。通过这种方式，S_R 将最大限度地覆盖所有来源的误差(随机)，其中涉及通常相对复杂很难估测系统误差的估测也将会减少。

这里需要指出的是 EURACHEM/CITAC《定量分析的测量不确定度指南》中指出："通常情况下，ISO 指南要求所有明确而重要的系统效应都需要进行校正"。在一个可控的方法中，系统误差只是组成不确定度很小的一个部分。

表 23 给出了经典误差来源，以及在尽可能再现性条件下采用整合方式估测它们的范例。

表 23

误差来源	误差类型	备注	评估方法
抽样(样品的组成)	随机误差	抽样是 ISO 17025 标准中的其中一项规定。声明不进行抽样的实验室不包括由此不确定性评估带来的误差	可能包括抽样操作在实验室内重现性问题
二次抽样法(为实验抽取一些样品)	随机误差	当样品不均匀时，二次抽样法是非常重要的。这给葡萄酒检测带来较小的误差	若使用的受试物与常规测试物质相似，实验室内的重现性条件就包括二次抽样法
样品的稳定性	随机误差	取决于样品的储存条件。在样品储存时，实验室应特别注意葡萄酒中的二氧化硫和乙醇的损失	样品变化的可能性应包括在实验再现性的条件中，则不确定性的来源便可被全面的估计出来
仪器的测量	系统误差或随机误差 如果由长周期测量产生的误差是系统误差；如果在再现性条件下进行一定时间的有规律性的测量时，产生的误差即为随机误差	在使用某些绝对法应将误差带来的影响考虑在内	计量误差§ 7.4.2.4.1 如果测量方法被定期调整，再现性条件下应把其带来的影响考虑在内

表 23(续)

误差来源	误差类型	备注	评估方法
污染物或残留物的影响	随机误差	测量仪器的良好设计和清洁可减少由这方面带来的误差	只要在分析过程中的不同位置上使用参考物质时，再现性条件将该影响考虑在内
自动装置的精密度	随机误差	这种情况能被控制，尤其是在内部质量控制的框架里对质控进行定位的情况	只要在分析过程的不同位置上使用参考物质，在再现性条件下需将该影响考虑在内
反应物的纯度	随机误差	当在同一批试剂进行分析测量时，试剂的纯度在相关的测量方法中影响非常小。 某些绝对方法测量应将其带来的影响考虑在内	在再现性条件下使用不同批次的试剂，由试剂的纯度产生的误差应该整合起来
测量条件	随机误差	温度、湿度等的影响	在再现性条件下应特别考虑到测量条件带来的影响
基质效应	在不同的样品中是随机误差，在同一样品中是系统误差	没有特异性测量信号的测量方法应把这些影响考虑在内	如果这是主要的影响，可利用特异性的实验方案进行估计该影响带来的不确定性，见 7.4.2.4.3。该影响不被归入再现性条件
计量方法的影响	计量方法不变是系统误差； 计量方法定期更新是随机误差		如果计量方法是定期更新，带来的影响应列入到再现性条件中。如果使用的是同一个计量方法(在再现性条件的框架中，周期的长度需要确定)，为了估计出计量误差，执行一个实验方案是明智的，最好执行一个实验方案见 7.4.2.4.1
实验人员的影响	随机误差		利用所有经授权认可的实验人员，再现性条件应把带来的影响考虑在内
偏差	系统误差	实验室的质量管理必须将该偏差最小化	系统误差可通过被认可参考方法估算出来

7.4.3.2　实验室内再现性标准偏差的计算

再现性标准偏差 S_R 由“实验室内再现性”部分(见 5.4.3.5)所述方法计算。

计算基于几种受试物质。值得一提的是，S_R 与被测量的大小成正比时，从几种受试物质上采集的不同数据，不应简单组合：S_R 应以相对值表示(%)。

7.4.3.3　评估典型来源的系统误差不需要考虑再现性条件

7.4.3.3.1 计量误差(或校正误差)

如果没有定期进行仪器计量(或绝对法校正),则其结果不能包含于再现性数值,必须制定实验方案以便采用回归残差进行计量误差的评估。

7.4.3.3.1.1 程序

计量误差与方法的线性研究类似。

设参考物质数为 n,n 必须大于 3,但不超过 10。在实验室内部精度条件下,将参考物质测量 p 次,p 必须大于 3,一般建议为 5。参考物质的可接受值必须连续分布在所研究的数值范围内。所有参考物质的测量次数必须相同。

结果报告如表 24 所示:

表 24

参考物质	参考物质的可接受值	测量值				
		平行样 1	…	平行样 j	…	平行样 p
1	x_1	y_{11}	…	y_{1j}	…	y_{1p}
…	…	…	…	…	…	…
i	x_i	y_{i1}	…	y_{ij}	…	y_{ip}
…	…	….	…	…	…	…
n	x_n	y_{n1}	…	y_{nj}	…	y_{np}

7.4.3.3.1.2 计算和结果

计算线性回归模型:

$$y_{ij}=a+b\cdot x_i+\varepsilon_{ij}$$

其中:y_{ij}——第 i 种参考物质的第 j 个平行样;

x_i——第 i 种参考物质的可接受值;

b——直线回归方程斜率;

a——直线回归方程的截距;

$a+b\cdot x_i$——第 i 种参考物质的测量期望值;

ε_{ij}——y_{ij} 与第 i 种参考物质的测量期望值之间的差值。

直线回归方程的参数由下列公式所得:

——第 i 种参考物质 p 次测量的平均值:

$$y_i=\frac{1}{p}\sum_{j=1}^{p}y_{ij}$$

——n 种参考物质所有可接受值的平均值:$M_x=\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}x_i$

—— 全部测量的平均值:

$$M_y=\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}y_i$$

—— 估计斜率 b :

$$b = \frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - M_x)(y_i - M_y)}{\sum_{i=1}^{n}(x_i - M_x)^2}$$

——估计截距 a：$a = M_y - b \times M_x$

——与第 i 种参考物质的 $\hat{y}_i$ 的回归值：

$$\hat{y}_i = a + b \times x_i$$

——残差 e_{ij}：

$$e_{ij} = y_{ij} - \hat{y}_i$$

7.4.3.3.1.3　与计量线(或校正线)相关的标准不确定度的评估

如果由回归线带来的误差在整个范围内是不变的，则采用整体、单一的方法，通过计算总体剩余标准偏差来估算标准不确定度。

$$u(\text{gauging}) = S_{\text{res}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{p}(y_{ij} - \hat{y}_i)^2}{np - 2}}$$

如果由回归线带来的误差在整个范围内并非是不变的，则对于指定水平的标准不确定度，可通过相应的剩余标准偏差来评估。

$$u(\text{gauging}) = S_{\text{res},i} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^{p}(y_{ij} - \hat{y}_i)^2}{p - 1}}$$

注：只有当线性回归模型和计量(或校正)域通过验证(见§5.3.1)，才可运用这些标准偏差评估。

7.4.3.3.2　偏移误差

根据 EURACHEM 指南，即“分析测量中不确定度的量化”，ISO 指南一般要求对所有识别的明显系统影响采用修正。这同样适用于有质量控制系统的实验室的方法的偏离(见第6 章)，对于“受控”方法，偏离趋于 0。

实际上，下列两种情况之间是有区别的。

7.4.3.3.2.1　只用一种参考物质校正方法

用相同的参考物质永久性地修正偏离。

有证参考物质(CRM)保证了方法的计量溯源性。参考物质被规定了参考值和标准不确定度 u_{ref}。参考物质的标准不确定度与方法的复合不确定性 u_{com}一起，决定了实验室方法的总的标准不确定度 $u(x)$。

因此，经所讨论的参考物质修正后的总标准不确定度为：

$$u(x) = \sqrt{{u_{\text{ref}}}^2 + {u_{\text{comp}}}^2}$$

注 1：这种方法与用实验室间比对结果进行修正的方法相同。

注 2：注意用参考物质修正方法的偏离，它包含了参考值的不确定度和方法的不确定度，这不同于将参考物质通过其他手段(参见§6.5.4.2)用于方法校正。在第二种情况下，参考物质的不确定度不应用于方法的不确定度评估。

7.4.3.3.2.2　用多个参考物质校正方法(计量范围等)

除了计量外，没有特别的偏离校正方法。

很明显，每个测量仪器都会产生偏离不确定度。因此，存在一个总的理论偏离不确定

度，即由每个测量仪器的不确定度的综合而成。这种不确定度估计很小，通常被证明低到可以忽略不计的程度，特别是实验室监控了校准器的质量和参考值的不确定度时，尤其如此。

除了特定情况，此处的偏离不确定度可以忽略不计。

7.4.3.3.3　基质效应

对于特定的样品，基质效应引起的误差是重复性的，但对于不同的样品，则是随机的。在测量所要求的分析物时，这种误差与被测样品所含成分的相互作用有关。在方法中基质效应一般以非特异性信号的形式出现。

基质效应常常是不确定度的一个极小的组成部分，尤其是在分离方法中。而对于其他一些方法，包括红外技术，基质效应则是不确定度的一个重要组成部分。

例：傅立叶变换红外光谱法（FTIR）基质效应的评估

通过 FTIR 技术进行测量，并非每种成分都有一个特定的红外信号或红外光谱。要完全准确地评估测量的值，可通过统计学计量模型处理受到干扰的、非特异性的数据。这种模型整合葡萄酒中其他成分的影响，这种影响随着葡萄酒品种的不同而变化，并对结果产生误差。在常规分析工作之上，由测量人员实施特殊处理以减少基质效应，并使测量结果更为可靠，即综合化这些变化并不让其影响最终结果。然而，基质效应总是存在，成为 FTIR 法不确定度的重要部分的误差来源。

严格地讲，要评价基质效应误差，一方面，可在再现性条件下，通过大量测量来自多个参考物质（至少 10 个）的 FTIR 的手段来比较所得；另一方面将参考物质的真实值与天然葡萄酒的基质比较。从标准偏差的差异得到测量的可变性[假设预先修正了测量（偏差＝0）]。

这种理论上的方法并不能运用到实际中，因为真实值未知，但可通过实验的方法尽可能接近它。

——首先，FTIR 测定法必须通过一个测定至少 30 个样品数的参考方法来进行统计学上的校准（偏差＝0），这可以最大降低测量时的偏离。

——参考物质必须是天然葡萄酒，而且最好采用 10 种不同的参考物质，其测量值处于一个范围内，其不确定度可认为是恒定的。

——要得到一个可靠的参考值，可通过在再现性条件下，利用参考方法得出多个测量值的平均值即得。这种方法可降低参考值的不确定度：在参考方法中，如果所有的有效数据的不确定度均在再现性条件范围内波动。在再现性条件下，样品数量 p 的增加，使得不确定度和它们的平均值与的$\sqrt{p}$比值相关。由足够多的样品量得出的平均值会有较低的不确定度，与其他方法相比其不确定度甚至可以忽略不计。因此，这个平均值可以用作参考值。p 必须至少等于 5。

——在再现性条件下，用 FTIR 法平行测定多个参考物质得到结果。随着被测物数量 q 的增加，此法的精确度的变异（随机误差）会降低。这些测定结果平均值是由变异性的标准偏差去除$\sqrt{q}$来计算的。这样这个测量方法与基质效应产生相关的变异，其引起的随机误差就可以忽略不计。被测物数量 q 必须至少等于 5。

下面的例子是采用 FTIR 法测量乙酸得到的结果。参考值是在再现性条件下分别稳定测量出 7 个稳定样品的 5 个值得到。理论上讲，7 个样品数是不够的，下面给出的数据仅作为一个举例。

表 25

样品	参考方法						FTIR						差值
	1	2	3	4	5	参考方法均值	1	2	3	4	5	FTIR 方法均值	
1	0.30	0.32	0.31	0.30	0.31	0.308	0.30	0.31	0.31	0.30	0.30	0.305	−0.004
2	0.31	0.32	0.32	0.32	0.31	0.316	0.31	0.32	0.30	0.31	0.31	0.315	−0.006
3	0.38	0.39	0.39	0.38	0.38	0.384	0.37	0.37	0.37	0.37	0.36	0.37	−0.016
4	0.25	0.25	0.25	0.24	0.25	0.248	0.26	0.26	0.26	0.25	0.26	0.26	0.01
5	0.39	0.39	0.40	0.40	0.39	0.394	0.43	0.42	0.43	0.42	0.42	0.425	0.03
6	0.27	0.26	0.26	0.26	0.26	0.262	0.25	0.26	0.25	0.25	0.26	0.255	−0.008
7	0.37	0.37	0.37	0.37	0.36	0.368	0.37	0.36	0.36	0.35	0.36	0.365	−0.008

差值的计算法：差值＝FTIR 平均值－参考值平均值。

差值平均值 $M_d=0.000$ 说明 FTIR 法与参考方法相比得到了很好的调整

经计算，差值的标准偏差 $S_d=0.015$，这个标准偏差是用来评估此测定方法引起的变异，因此我们可以得到 $U_f=0.015$

注：应当注意的是 U_f 的值按这种方法很可能会被高估。如果实验者觉得在现行操作条件下 U_f 值过大，可增加参考方法或者 FTIR 法的样品数量。

再现性条件包含了所有其他显著的误差来源，因此 S_R 可计算得到：

$$S_R=0.017$$

因此，由 FTIR 法测定乙酸得到的结果的不确定度是：

$\pm 2\times\sqrt{0.015^2+0.017^2}$ 或 ± 0.045 g/L

7.4.3.3.4　样品影响

有时，用于评估不确定度的实验程序决定于合成的试验材料。在这种情况下，评估没有考虑样品的影响（均匀性）。但实验室必须考虑这种影响。

值得注意的是，在葡萄酒检测实验室中，如果试验所用样品量少且均一，这种样品造成影响常常可被忽略。

7.4.4　实验室间测试的标准不确定度的评估

7.4.4.1　原理

根据 5.4.3 所示原则，实验室方法所使用的数据，是由旨在计算实验室间再现性的标准偏差而进行的实验室间的测试所产生的。负责计算实验室测试结果的统计人员，通过 ISO 5725标准所描述的试验（Cochran 检验），能够识别“异常”结果。

对于实验室方法不确定度，标准 ISO 21748 所述的指导原则如下：

a）协同试验所得再现性标准偏差（实验室间的），是评估测量不确定度的有效基础。

b）未包括在协同实验中的影响因素应忽略不计或完全不予考虑。

实验室间试验有两种类型：

a）仅涉及一种检测方法的协同实验。这些实验作为一种新检测方法的初步确证实验，目的是明确实验室间测试的标准偏差 SR_{inter}（方法）。

b）多个实验室间比较或者能力测验等的实施都是为了验证实验室目前所采用的方法和其常规的质量控制(见 5.3.3.3)。测试所得数据应作为一个整体进行处理,同时要结合参与测试的实验室采用的所有分析方法。测试所得结果为实验室间的平均值 m,实验室间的标准偏差以及实验室内部方法再现性 SR_{inter}。

7.4.4.2　采用实验间标准偏差和实验室内部方法再现性标准偏差 SR_{inter}(方法)

实验室内部再现性标准偏差 SR_{inter}法包括实验室内部的变异以及与该法相关的实验间总体变异。

另外还需要考虑的是,与真值相比,分析方法会导致系统误差。

作为协同实验的一部分,这种偏差可通过采用有证参考物质进行评估(如在 7.4.3.3.2 中描述的情况一样),然后加到 SR_{inter}中。

7.4.4.3　采用实验间标准偏差和方法间再现性标准偏差 SR_{inter}

实验室内再现性标准偏差包括实验室内部的变化以及与此法相关的实验室室间变化。

实验室必须核实这些结果的准确性(见 5.3.3)。

由于多方法能力比对实验中已经将误差的准确性纳入了 SR_{inter}中,因此在不确定度估算时就不必考虑方法的准确性这部分。

7.4.4.4　不确定度估算的其他组成

只要实验间测试所采用的测试样品是实验室分析中所用常规样品的代表,并遵循一整套的分析程序(二次抽样、萃取、浓缩、稀释、蒸馏等),从实验间的角度来说,$S_{R\text{-inter}}$就代表了这种方法的标准不确定度 $u(x)$。

在实验室间测试中没有考虑的一些误差也应当进行评估,得到其复合标准不确定度,并将其整合到实验室间测试所得的复合标准不确定度中。

7.5　扩展不确定度的表达

实际上,以扩展形式表示的不确定度,对于在所讨论的范围内具有稳定的不确定度的方法,它是绝对不确定度;当不确定度随着测量数量的改变而变化时,则是相对不确定度。

绝对不确定度:$U=\pm 2\cdot u(x)$

相对不确定度(以%计):$U=\pm \dfrac{2\cdot u(x)}{\bar{x}}\cdot 100$

其中,平均值 $\bar{x}$ 代表再现性结果。

注:这种不确定度的表达式基于变异在 95%的置信水平上,服从正态分布规律的假设。

通过这些表达式,在 95%置信水平上可得到一个指定的不确定度值。

附　录　A
SNEDECOR 法则

本表格给出了在 $\alpha=0.05$、$P=0.950$ 风险条件下 v_1 和 v_2 对 F 的关系。

表 A.1　SNEDECOR 法则

v_1 / v_2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	v_1 / v_2
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5	241.9	1
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	2
3	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	3
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96	4
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	5
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	6
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	7
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	8
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	9
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	10
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85	11
12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	2.75	12
13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67	13
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	2.60	14
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54	15
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	16
17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45	17
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	18
19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38	19
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35	20
21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37	2.32	21
22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34	2.30	22
23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32	2.27	23
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30	2.25	24
25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28	2.24	25
26	4.23	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27	2.22	26
27	4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.37	2.31	2.25	2.20	27

表 A.1(续)

v_1 / v_2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	v_1 / v_2
28	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45	2.36	2.29	2.24	2.19	28
29	4.18	3.33	2.93	2.70	2.55	2.43	2.35	2.28	2.22	2.18	29
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16	30
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12	2.08	40
60	4.00	3.15	2.76	2.53	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04	1.99	60
120	3.92	3.07	2.68	2.45	2.29	2.17	2.09	2.02	1.96	1.91	120
∞	3.84	3.00	2.60	2.37	2.21	2.10	2.01	1.94	1.88	1.83	∞
v_2 / v_1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	v_2 / v_1

附　录　B
STUDENT 法则

本表格给出了 t 与 P 和 v 的关系。

表 B.1　STUDENT 法则

7.5.1.1. v	0.55	0.60	0.65	0.70	0.75	0.80	0.85	0.90	0.95	0.975	0.990	0.995	0.9995	P v
1	0.158	0.325	0.510	0.727	1.000	1.376	1.963	3.078	6.314	12.706	31.821	63.657	636.619	1
2	0.142	0.289	0.445	0.617	0.816	1.061	1.386	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	31.598	2
3	0.137	0.277	0.424	0.584	0.765	0.978	1.250	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	12.929	3
4	0.134	0.271	0.414	0.569	0.741	0.941	1.190	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	8.610	4
5	0.132	0.267	0.408	0.559	0.727	0.920	1.156	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	6.869	5
6	0.131	0.265	0.404	0.553	0.718	0.906	1.134	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	5.959	6
7	0.130	0.263	0.402	0.549	0.711	0.896	1.119	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	5.408	7
8	0.130	0.262	0.399	0.546	0.706	0.889	1.108	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	5.041	8
9	0.129	0.261	0.398	0.543	0.703	0.883	1.100	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	4.781	9
10	0.129	0.260	0.397	0.542	0.700	0.879	1.093	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	4.587	10
11	0.129	0.260	0.396	0.540	0.697	0.876	1.088	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	4.437	11
12	0.128	0.259	0.395	0.539	0.695	0.873	1.083	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	4.318	12
13	0.128	0.259	0.394	0.538	0.694	0.870	1.079	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	4.221	13
14	0.128	0.258	0.393	0.537	0.692	0.868	1.076	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	4.140	14
15	0.128	0.258	0.393	0.536	0.691	0.866	1.074	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	4.073	15
16	0.128	0.258	0.392	0.535	0.690	0.865	1.071	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	4.015	16
17	0.128	0.257	0.392	0.534	0.689	0.863	1.069	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.965	17
18	0.127	0.257	0.392	0.534	0.688	0.862	1.067	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.922	18
19	0.127	0.257	0.391	0.533	0.688	0.861	1.066	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.883	19
20	0.127	0.257	0.391	0.533	0.687	0.860	1.064	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.850	20
21	0.127	0.257	0.391	0.532	0.686	0.859	1.063	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.819	21
22	0.127	0.256	0.390	0.532	0.686	0.858	1.061	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.792	22
23	0.127	0.256	0.390	0.532	0.685	0.858	1.060	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.767	23
24	0.127	0.256	0.390	0.531	0.685	0.857	1.059	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.745	24
25	0.127	0.256	0.390	0.531	0.684	0.856	1.058	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.725	25
26	0.127	0.256	0.390	0.531	0.884	0.856	1.058	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.707	26
27	0.127	0.256	0.389	0.531	0.684	0.855	1.057	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.690	27

表 B.1(续)

7.5.1.1. v	0.55	0.60	0.65	0.70	0.75	0.80	0.85	0.90	0.95	0.975	0.990	0.995	0.9995	P v
28	0.127	0.256	0.389	0.530	0.683	0.855	1.056	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.674	28
29	0.127	0.256	0.389	0.530	0.683	0.854	1.055	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.659	29
30	0.127	0.256	0.389	0.530	0.683	0.854	1.055	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.646	30
40	0.126	0.255	0.388	0.529	0.681	0.851	1.050	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704	3.551	40
60	0.126	0.254	0.387	0.527	0.679	0.848	1.046	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660	3.460	60
120	0.126	0.254	0.386	0.526	0.677	0.845	1.041	1.289	1.658	1.980	2.358	2.617	3.373	120
∞	0.126	0.253	0.385	0.524	0.674	0.842	1.036	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576	3.291	∞
v P	0.55	0.60	0.65	0.70	0.75	0.80	0.85	0.90	0.95	0.975	0.990	0.995	0.9995	v P

参 考 文 献

[1] OIV,2001-Recueil des methods internationales d'analyse des vins and des moûts;OIV Ed. ,Paris.

[2] OIV, 2002-Recommandations harmonisées pour lecontrôle interne de qualité dans les laboratoires d'analyse;OIV resolution ceno 19/2002. ,Paris.

[3] Standard ISO 5725:1994-Exactitude(justesse and fidélité)des results and methods de mesure,classification index X 06-041-1.

[4] IUPAC,2002-Harmonized guidelines for single-laboratory validation of analysis methods; Pure Appl. Chem. ,Vol. 74;n°5,pp. 835-855.

[5] Standard ISO 11095:1996-Etalonnage linéaire utilisant des materials de référence,reference number ISO 11095:1996.

[6] Standard ISO 21748:2004-Lignes directrices relatives à l'utilisation d'estimation de la répétabilité,de la reproductibilité and de la justesse dans l'évaluation de l'incertitude de mesure,reference number ISO ISO/TS 21748:2004

[7] Standard AFNOR V03-110:1998-Procédure de validation intralaboratory d'une method alternative par rapport àune method de référence,classification index V03-110.

[8] Standard AFNOR V03-115:1996-Guide pour l'utilisation des materials de référence,classification index V03-115.

[9] Standard AFNOR X 07—001:1994-Vocabulaire international des termes fondamentaux and généraux de métrologie,classification index X07—001.

[10] Standard AFNOR ENV 13005:1999-Guide pour l'expression de l'incertitude de mesure.

[11] AFNOR,2003,-Métrologie dans l'entreprise,outil de la qualité 2ème édition,AFNOR 2003 edition.

[12] EURACHEM, 2000.-Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, EURACHEM second edition 2000.

[13] CITAC/EURACHEM,2000-Guide pour la qualité en chimie analytique,EURACHEM 2002 edition.

[14] Bouvier J. C., 2002-Calcul de l'incertitude de mesure-Guide pratique pour les laboratoires

d'analysenologique, Revue FranÇaise d'cenologie no. 197, Nov—Dec 2002, pp: 16—21.

[15] Snakkers G. and Cantagrel R., 2004 — Utilisation des données des circuits de comparaison interlaboratoires pour apprécier l'exactitude des results d'un laboratoire Estimation d'une incertitude de mesure-Bull OIV, Vol. 77 857—876, Jan-Feb 2004, pp: 48-83.

[16] Perruchet C. and Priel M, 2000-Estimer l'incertitude, AFNOR Editions.

[17] Neuilly (M.) and CETAMA, 1993 — Modélisation and estimation des errors de mesures, Lavoisier Ed, Paris.

OIV-MA-AS1-13

单个实验室分析方法评价协调性原则

（决议 Oeno 8/2005）

【概要】

在分析化学中，方法验证被广泛认为是质量管理体系中的一个重要组成部分。过去，国际标准化组织（ISO）、国际理论与应用化学联合会（IUPAC）以及美国分析化学家协会（AOAC）共同制定关于“分析方法研究的设计、实施与解释”[1]，“（化学）分析实验室的能力验证”[2]，“分析化学实验室内部质量控制”[3]以及“分析测量中回收率信息应用”[4]（分析方法重叠数据的使用）等协议和指南。IUPAC 批准了制定这些协议/指南的工作组编写的单一实验室分析方法验证的原则。这些指南提供了充分验证分析方法的意见和建议。

实验室质量控制体系协调国际研讨会上讨论了这些指南的草案，并由英国皇家化学学会发布了讨论会议纪要。

1999 年 11 月 4～5 日，由国际理论与应用化学联合会（IUPAC）、国际标准化组织（ISO）以及美国分析化学家协会（AOAC）发起，在匈牙利布达佩斯研讨会上确立了实验室质量体系。

1　简介

1.1　背景

在分析的各个领域所有可靠的分析方法都必须符合国家和国际法律法规。因此，国际上一致认为，实验室必须采取适当的措施来确保其有能力提供且确实提供了符合要求的检测数据。这些措施包括：

- 使用可行的分析方法；
- 使用内部质量控制措施；
- 参加能力验证计划，使用被认可的国际标准，通常是 ISO/IEC 17025。

值得注意的是，ISO/IEC 17025 认可包括测量方法的建立，以及符合包括上述列表中一系列其他技术和管理的要求。

方法验证是测量中的一个重要的组成部分，实验室应通过按照规定实施获得可靠的检测数据。由 IUPAC 测试实验室质量保证方案协调跨部门的工作小组，已在前面阐述了上述的其他方面要求，特别是方法的性能研究（比对试验）、能力验证、内部质量管理的协议和指南。

在某些行业，特别是食品检测方面，充分验证的检测方法已被立法。常用的经充分验证方法包括实验室间方法性能比对（也称为协作研究或比对试验）。按照国际公认的协议，尤其是国际协调协议和 ISO 程序，通过比对试验建立了经充分验证的方法。这些协议/标准规定了参加比对试验验证检测方法所需要最少数目实验室和检测物质。但是，它并不能完全提供所有的充分验证方法。

某些情况适宜使用单独实验室方法验证，这些情况包括：

- 比对试验前，确保检测方法的可行性。
- 验证分析方法的可靠性，或指出比对试验数据是无效的、不可取的。
- 确保按现有方法正确操作。

当一个方法在实验室内部评价，该实验室确定并同意对其客户认可很重要的这些方法应该被精确评估。然而，在许多情况下，这些性能指标需要靠有关规范来执行(如在食品行业中兽药和农药残留)。实验室需要按照法律法规的要求进行评价。

然而在一些分析检测领域，在确定的基质中，大部分的实验室会用相同的分析方法测定某些稳定的化合物成分。如有合适的协同研究方法可以提供给这些实验室，那么协同试验的验证方法其成本将是合理的。协同研究的方法大大降低了实验室的工作量，但在作为常规使用方法之前，必须进行大量的验证工作。实验室使用能够达到预期目的的协同研究，只要证明它能完成检测方法的性能特征。方法的准确度验证，其成本远小于完整的单个独立实验。通过联合协同实验的总检测成本和实验室验证性能指标研究比所有实验室单独用相同方法的检测更加有效。

1.2　现有的协议、标准和指南

许多的协议和指南已明确阐述了方法验证和不确定度的有关内容，特别是美国分析化学家协会(AOAC)、国际协调会议(ICH)和欧洲化学分析中心文件。

- AOAC 的统计学手册包括协同试验之前的独立实验室的操作指南；
- ICH 测试[15]和方法[16]，其指定了批准药品的评审所需的最少验证试验的文件；
- 分析方法适用性：实验室方法验证和相关主题指引(1998)；
- 定量分析方法的不确定度(2000)。

1997 年 12 月，联合国粮农组织/国际原子能机构的联合专家委员会开展了方法验证的磋商讨论，有关食品安全控制管理的分析方法验证也是适用的。

目前这些“指南”集中了以上文件的基本科学原则，这些原则已被国际广泛认可，更重要的是，指明了单个独立实验室方法验证的操作方法。

2　定义和术语

2.1　概要

这些文件中的术语基于 ISO 和 IUPAC 相应的规定。以下文件包含的相关定义：

a) 国际理论(化学)与应用化学联合会(IUPAC)：化学术语汇编，1987

b) 计量学中的基本和通用国际标准词汇，ISO 1993

2.2　仅在本指南中使用的定义

相对不确定度：不确定度用一个相对标准偏差来表示。

检测范围：检测分析方法的特定浓度范围。

3　方法验证、不确定度和质量保证

方法验证是利用一系列的测试来验证检测方法的假设以及建立并记录方法的性能指标，从而证明该方法是否适合特定的检测目的。方法验证的指标包括：适应性、选择性、标准曲线、真实性、精密度、回收率、操作范围、定量限、检出限、灵敏度和耐变性等。另外，还可加

上测量不确定度和适用性。

严格来讲，验证的过程应是针对“分析系统”而不是“分析方法”。“分析系统”应包含具体检测方案、规定的检测范围以及特定的检测物质。本文提及的“方法验证”指南整体上可作为分析系统指南。这些分析程序都可被称为“操作程序”。

本文中的方法验证与内部质量控制（IQC）及能力水平测试等持续性活动是截然不同的。方法验证只进行一次，或在使用此方法的工作期间偶然进行；通过验证可以知道方法在以后的应用中能提供何种结果。而内部质量控制是判断此方法在过去执行实施的情况。因此，IQC 可被视作 IUPAC 项目中的独立活动。

在方法验证中，方法的性能评估与实验结果的准确度有极大的联系。因此，我们可以说，方法验证是验证检测方法的不确定度。这些年来，方法验证的目的已成为描述上述列举的方法性能不同方面的特征，并且在相当程度上这些指南反映出模式。然而，依靠验证不确定度作为检测目的适用性和结果可靠性的指引，促使越来越多化学家们进行方法验证来评估不确定度。因此作为分析方法性能特征之一的方法不确定度主要在附录 A 中探讨，而附录 B 提供了一些其他方面未覆盖的相关程序指南。

4 方法验证的基本原则

4.1 验证的规范和范围

验证实验适用于一个确定的方案，基于某个目的测定一个特殊类型的测试材料的指定的分析物及其浓度范围。通常，验证应该在遍及分析物的浓度范围及其应用的测试材料上充分地检验方法的性能。上述特征的判断标准，必须在验证实验前确定。

4.2 实验假设

除了表明目的适用性以及验证数据的实用性的性能指标规定外，方法验证是一个对分析方法所依赖的任何假设的客观测试。例如，实验结果是通过简单的直线回归方程计算得到，即表示实验的结果不会出现严重的偏差，此方程中响应值与检测浓度成正比，实验数据的随机误差在预计范围内。在大多数情况下，随着方法逐渐成熟，对误差的假设都是通过在方法建立或者长时间内的经验累积确定的，因此是合理可靠的。尽管如此，良好的检测科学依赖于经过验证的假说。这就是为什么那么多的验证研究都是基于统计学假设测试，目的是提供基本的检查以使合理的假设在方法原理上不会有严重的缺陷。

这里还有一个重要的事项要注意。验证一个假设有错误总比证明一个假设正确要容易。因此，特定检测范围和基质的检测技术长时间成功应用（如气相色谱分析，或酸硝化），验证是否合理一般采取预实验来确认。相反的，如果没有经验，验证研究需要提供强有力证据证明在特定情况做的假设是合适。同时要考虑所有的检测细节。由此可见，验证研究在一定程度上取决于检测技术的熟练程度。

在以下的讨论中，我们假定实验操作技术熟练，显著性检验的目的在于验证在没有大量证据的情况下，实验的结果是否稳定。读者应当记住，对于不熟悉或不成熟的检测技术应当进行更严格的核查。

4.3 分析误差的来源

误差在来自测试中的不同环节以及不同级别的组织单位，其中描述误差常用的方式

如下：

- 随机测量误差(重现性)
- 操作偏差
- 实验偏差
- 方法偏差
- 基质变化的影响

尽管不同的来源不一定单独存在，但是上述在一定程度上提供了有用的检验方式，验证寻找指定的误差源头。

重现性包含同一个批次实验的任何一部分的检测变化，包括重量和体积的误差、被测物质的均匀度、试剂的差异，都很容易在重复性测试中出现。操作误差导致分析体系中日常的差异，例如：检测人员变化、试剂批次、仪器的重新校准以及实验环境(如温度变化)。在单一实验验证，对一系列合适物质进行单独的重复性检测，常用于指导设计实验，评估操作效果。引起实验室间的差异的因素如：校准标准的差异、对检测步骤的不同理解、仪器和试剂的变化或环境因素(如不同的气候条件)。比对实验(方法性能研究)和能力验证结果可以很清晰地看出实验室间的差异，也可通过后者结果比较方法间的差异。

注 1：严格意义上的制样不确定度，从整体样品制成实验室样品过程产生的不确定度不在本文考虑的范围。而由于从实验室样品中取样产生的不确定度是测量不确定度必须考虑的部分，因此都被自动包含于任何往后的分析过程中。

注 2：很多替代性分组或者“错误划分”都是合理的，可用于更深入地或者在不同情况下研究特定误差来源。例如，ISO 5725 中的统计模型大体综合了实验室和运行效应，而 ISO GUM 中不确定度估计程序非常适合用于评估单个可测量的干扰对结果的影响。

一般来说，操作因素与实验室影响对重现性的影响都是很重要的，在验证中不可被忽略。过去有一个忽略这一方面的倾向，尤其是当评估不确定度信息，但这样做使得实验数据不确定度太小。例如，协同实验因为实验方式等的不统一性，因为方法偏倚、基质变异引起的不确定度没有被估算，无法给出实验完整信息。单一实验室验证时有相当风险，实验室偏倚常常被忽视，而这部分常常是不确定度的最大来源。因此单个实验室内的验证一定要关注实验室偏倚。

除了以上所说的问题之外，验证的方法有它的应用限制，原因在于受试材料的差异性。如果测试时，由于受试物质性质多样，实验的结果将在设计范围内产生影响。当然，如果受试物质的性质不在验证的设计范围内，试验的误差将大幅增加。

同样需要注意的是，分析方法性能与分析物的浓度成一定比例的函数关系。在大多数情况下，所得到的结果离散性受分析物浓度影响，回收率也在分析物浓度较高或较低时有所不同，这样的情况非常常见。这些与结果相关的测量不确定度与这些影响以及与浓度依赖性相关因素有关。响应值与分析物浓度之间的关系可通过简单的关系来描述，绝大部分误差与分析物的浓度大小呈正比*。然而，由于方法的性能在分析物不同浓度有所差异，因此检验分析物浓度与其响应值之间的关系就尤为重要。通常通过检查浓度范围内的几个极端值或者选择几个水平。线性检查也能提供同样的信息。

* 若浓度低于检测限 10 倍，该规律可能不适用。

4.4 方法和实验室效应

单一的实验室进行方法验证时要考虑方法偏差和实验室偏差，这点非常重要。有部分实验室具有特殊的设施，在那里这些偏倚可以被忽略，但这种情况非常例外。(但是，如果只有一个实验室进行特定的分析，应从不同的角度考虑方法偏差和实验室偏差)。通常情况下，方法和实验室的影响已被列入不确定度评估，但它们往往比重复性误差更难以表述。在一般情况下，评估各自的不确定度需要收集实验室信息。这些信息一般最有用的来源是：

a) 从协作试验统计(在单一的实验室方法验证情况下许多不可用)；

b) 能力水平测试统计；

c) 有证参考物质的分析的结果。

实验室间协同比对实验可以直接评估实验室间的偏差。虽然协同实验设计在理论上有缺点，但这些差异评估对许多操作适用。因此，通过协同比对实验的重现性来验证单一实验室不确定度是很有意义的。如果单个实验室的结果是偏小的，不确定度可忽略。(或者，实际操作检测中发现的不确定度小于协同比对实验的，这类实验应该声明用特殊检测方法)如果无协同比对实验进行特殊方法/特殊材料的检测，对于检测浓度 c 大于 120 ppb 的，重现性标准偏差的评定应通过 Horwitz 方程 $\sigma_H = 0.02c^{0.8495}$ 计算得到，变量用质量分数表示。(Horwitz 评定常用一个因素的两个比对实验结果)。浓度低于 120 ppb 时 Horwitz 函数不适用，这时选择修正过的函数会更合适[21,25]。这些信息可以通过最少的改变用于单个实验室的情况。

实验室能力验证的统计数据有特别意义，因为可从大体上得到实验室和方法的合并偏倚程度，对于参加者，还可以提供在特定情况下的总误差的信息。检测结果的粗略标准偏差可能与协同比对实验重现性的标准偏差相似。例如，用单独实验室验证不确定度的基准。实际上，平行样测试统计可能难以评定，他们不能像协同比对实验那样可以得到系统的列表和公布，只对检测人员有用。当然，这些检测都必须选择合适的基质和浓度。参加平行样测试的检测人员在连续的有效测试中，测量其不确定度。然而，这是一个持续的活动，因此没有严格遵守单一实验室验证的规则(此为一次性事件)。

如果有有证参考物质，通过多次测试有证标准物质，单一的实验室测试可以评价实验室偏差和方法偏差，综合的偏差估计可通过比较平均结果和有证参考物质的参考值。

有证参考物质不是总能得到，其他物质也可以应用。剩余平行样材料有时会用于这些目的，进行物质的定值不确定度评价，但它们无疑提供了检查总体偏差的途径。具体来说，平行样检测的值通常是选择提供一个最小偏差估计，所以受试物质的偏差分析是一个可行的做法。尽管无法确定与这些技术相关的不确定度的来源，一个替代方法是使用加标和回收率信息来估计这些偏差。

目前验证中最少认可由于被测物的基质差异造成的影响。评估不确定度的组成理论上要求在单个分析过程中的受试材料具有代表性，可以评估它们个体偏差以及计算偏差变异(单个分析意味着较高水平偏差没有对变异系数造成影响。如果涉及一个较宽的浓度范围，将有浓度偏差)。如果代表物质是有证标准物质，偏差可以直接估计结果和参考值之间的差异，整个过程很简单。没有有证参考物质时，可谨慎采用重复测试特定标准品的范围来进行。目前很少有关于此类来源不确定度的定量信息，尽管在某些情况下，它们被怀疑量值很大。

5　验证研究的实施

详细的方法验证研究与操作步骤已在其他地方多处提及，此处不再重复。主要原则如下：

至关重要的是，验证研究要有代表性。即研究应尽可能提供该研究方法的实际研究样品数量、正常方法使用操作的影响以及浓度范围和样品种类等等。一个精密度实验中一个因素（如环境温度）随机变异具有代表性，如该因素的影响直接出现在观察方差，除非进一步优化方法是可取的，否则不需要额外的研究。

在方法验证中，“代表变异”意味着待研究问题的参数预期范围的值的分布适当。对连续性可检测变量参数，这可能是一个允许的范围，可以表示为不确定性或不确定度预期范围；对不连续变量参数，或不可预测的因素影响，如样本矩阵，对应于多种类型或允许存在的“因子水平”的一个代表性范围方法的正常应用。理想情况下，代表性不仅扩展了值的范围，而且包括它们的分布。不幸的是，涉及各个水平的很多因素的整体变化的研究往往是不经济的。然而，对于大多数实际的目的，基于预期范围的极端的或比预期更大的变化的测试是一个可接受的最低限度。

对于选择的变异因子，重要的是要确保尽可能获得大的效应。例如，日常变化（可能由再校准效果引起的）实质上是重复性的比较，相比之下，5 天中每天检测 2 个将比 2 天中每天检测 5 个提供更好的精度。在不同时间开展 10 个单独检测会更好，会接受足够的控制，尽管在每天的重复性中不会提供额外的信息。

显然，按计划进行显著性检验时，在这些效应成为不确定度实际重要因素（与不确定度的最大组成部分相比）之前，任何研究应有足够的把握检测出这些效应。

此外，下列因素也是重要的：

- 在已知因素或可疑因素相互作用时，重要的是要确保考虑该效应的交互作用。这可通过确保随机选择从不同水平的相互作用参数，或者通过仔细的系统设计获得交互作用或协方差信息来实现。
- 在开展总体偏差研究时，在常规试验中获得参考物质和其量值非常重要。

6　验证研究的范围

实验室对一个新的、修改或不熟悉的方法进行验证的范围取决于对现行方法熟悉程度和实验室的能力。不同情况下，建议确认和验证的范围措施如下。除非有特别规定，假定这些方法适用于日常使用。

6.1　使用一种“充分”验证过的方法

该方法已进行比对试验，所以实验室可以确认能够获得公开出版的方法性能特征（或能够满足检测需要）。实验室可进行精密度研究、偏差研究（包括基质变化研究），如有可能，也可开展相关线性研究。但如耐变性等测试可省略。

6.2　实验室采用一种“充分”验证过方法，但使用一种新的基质

需要进行比对实验，以便实验室能确认新的基质对系统不会带来新的误差来源。验证范围应与前述一致。

6.3 使用已确立但未经协作性研究的方法

需保证与前述相同的验证范围。

6.4 发表在科学文献且附有检测特性的方法

实验室应进行精确度和偏差的研究(包括基质变化的研究),以及特定特征耐变性和线性关系的研究。

6.5 已经发表在科学文献但无特定特征或仅为内部使用的方法

实验室应进行精确度和偏差的研究(包括基质变化的研究),以及耐变性和线性关系的研究。

6.6 基于经验的方法

经验方法是一种按下述步骤简单获得结果的定量检测。这不同于用于评估方法独立性大小的测量,如:样品中特殊分析物的浓度使得方法偏差为零,基质变化(在定义的范围内)不相关。实验偏差不能忽略,但可能难以对单个实验室试验进行评估。此外,标准品不太可能获得。在有比对实验数据时,实验室间的精度可通过特殊设计的耐变性研究和用 Horwitz 方程评定获得。

6.7 “专一地”检测方法

“特别”的检测方法有时有必要建立检测值的一般范围,不得超出范围和临界值。验证的效果有明确的限量。研究方法的偏差须同时考虑回收率、加标和平行样精密度。

6.8 工作人员和设备的变化

重要的例子包括:主要仪器的改变;新批次差异较大的试剂(例如多克隆抗体);实验室场所内的更改;新员工第一次使用的方法,或使用了终止一段时间的已验证方法。需要证明没有不良变化发生。至少要进行单个偏倚测试,对典型测试物质或控制材料的加入进行“之前或之后”的实验。一般来说,这些测试可以反映出这些变化对分析程序可能产生的影响。

7 建议

以下建议是关于单独实验室的方法验证:

在条件允许的情况下,实验室都应该使用在国际上已经经过多次试验的分析方法作为实验方法。

如果无上述方法,必须在为客户提供检测数据前对实验方法进行内部验证。

单独实验室的验证需要实验室根据选择合适的实验参数进行评估,如:适用范围、选择性、直线回归方程、准确度、精确度、浓度范围、定量限、检出限、灵敏度、客户要求和可行性。实验室应根据客户要求选择合适的检测方法。如果客户有要求,必须评估检测方法的特性是否符合要求。

附　录　A
方法的性能指标研究要求

方法的独立性能指标总体要求如下：

A.1　适用性

方法验证后要提供包含方法的所有性能特点的文件，信息如下：

• 确定被测物质及具体的性状（例如：总砷）；

• 检测浓度范围（例如：0～50 ppm）；

• 测试样品的基质范围（例如：海鲜）；

• 包括仪器、试剂、步骤（包括特定偏差范围，例如在 100℃±5℃加热 30 min±5 min，校准和质量控制程序，以及任何特殊的安全措施要求）在内的程序；

• 预期的应用及不确定度要求（例如：食品分析筛查的目的。结果 c 的标准不确定度 $u(c)$ 应小于 $0.1\times c$）。

A.2　选择性

选择性指存在干扰物时检测的准确度。理想情况下，选择性应该评价任何可能存在的干扰物质。尤其重要的是要根据化学原理，检查干扰物有无可能影响反应。例如，氨的比色试验可能受初级脂肪族胺类影响。实验方法应该排除所有潜在的干扰物质。一般情况下，应该选择可以忽略所有干扰物的方法。

在许多的分析中，选择性本质上是基于对干扰物试验显著性影响的定性评价，但是，这些对定量检测有用。特别是，一个定量测量的选择性系数 b_{an}/b_{int}，是对干扰物的定量测量。b_{an}是方法的灵敏度（校准方程的斜率），b_{int}为潜在干扰物产生的独立反应斜率。b_{int}由空白基质和一定浓度的潜在干扰物的空白样品所测得。如果无空白的基质，可用标准物质代替，不受基质干扰，b_{int}可通过简单的实验得到。但请注意，在没有被测物质时，较容易测得 b_{int}，因为被测物质的灵敏度容易受干扰物影响（基质效应）。

A.3　校正曲线和线性关系

除了校准物质的误差外，校准误差通常是（但不总是）总的不确定度评价的一小部分，通常可以“自上而下”安全地纳入各种类别的评价。例如，作为一个整体进行评价时，校准造成随机误差是其中小部分的偏差，而同样来源的系统误差同样作为整体评估成为实验方法偏差。虽然，有些校准性能对方法验证时有用，因为它影响了检测程序的优化发展策略。这类问题包括校准方程是不是线性相关的、有无穿过原点以及测试物质有无受基质影响。这里描述的步骤关系到校准方法的验证，比常规分析更加严格。例如，验证时，建立的校准方程应是线性方程并通过原点，可设计出更简单的校准策略用于常规检测（例如，两点重复设计）。这个简单的校准策略误差通常都会被用于验证更高水平的误差。

A.3.1　线性关系和截距

在合适的浓度范围内，浓度与响应值呈线性关系，该线性可通过线性回归产生的残差检测。

没有线性校正功能的任何曲线模式为失拟。显著性检验可以通过比较失拟方差是否由单纯误差造成。然而，由于除了某些分析校准类型导致的非线性外，还有失拟原因，因此显著性检验必须和剩余曲线连用。尽管当前相关系数作为精确度指标广泛应用，但用作线性检验具有误导性和不适合的，不应使用。

失拟检验中设计最为重要，因为它很容易将非线性与漂移混淆。如无独立评价，重复测量必须提供一个纯误差评估。如无特殊指引，以下情况可适用：

- 应该有 6 个或以上的校准样；
- 校准样均匀分布在有效浓度范围内；
- 该范围应覆盖 0～150%或 50%～150%可能的浓度范围，这取决于哪个更合适；
- 校准样至少重复两次，三次或更多尤佳，并且保持顺序的随机性。

计算简单的线性回归方程后，可计得残差。异方差性在分析校准相当常见，在统计模型中，加权回归是校准数据最好的方法。如果不使用加权回归，有可能会导致在回归方程中出现很大的误差。

失拟检验可用简单或加权回归实现。如果没有失拟显著性，截距明显不等于零的检验同样也可利用这些数据。

A.3.2　总体基质效应检测

如果校准样被配置成待测物的单一溶液，则在极大的程度上简化了校准。

若采用这种策略，必须验证评价总体基质不匹配可能产生的影响。对总体基质效应的检测可以通过添加被测物(也称为“标准添加”)到典型被测物制备的溶液中而实现。这种测试提供的最终稀释溶液应与正常步骤所得的相同，而且添加物的范围应该与标准规定的范围相同。如果校准值是符合线性的，可以比较正常的标准曲线和标准添加曲线的斜率。若两者无明显不同，意味着检测不到总体基质效应。如果校准曲线不符合线性，必须进行更加复杂的显著性检验，但是通常通过对相同浓度下的曲线进行目测比较就可以了。如果检测中没有显著不同，通常可以忽略基质变化的影响[第 A.13 节]。

A.3.3　最后校准程序

按指定步骤进行校准策略也可能需要分别验证，尽管涉及的误差有助于共同估计不确定度。这里的重点是，通过特定的线性设计评价的不确定度，将小于来自程序方案中更简单校准的不确定度。

A.4　正确度

A.4.1　正确度评估

正确度是测量结果与被测指标的可接受参考值之间的一致程度。正确度在定量方面表述为“偏倚”；较小的偏倚意味着更接近真实值。偏倚由采用方法比较标准物质与已知值物质所得。通常需要进行显著性验证。参考值的不确定度不可以忽略时，结果评定应考虑标准品的不确定度和统计变异性。

A.4.2　正确度实验的条件

检测系统的不同级别部分都存在偏倚。例如，操作偏倚、实验室偏倚和方法偏倚。重要的是要记住处理偏倚的各种方法。特别是：

- 一次同时对一系列标准品检测求得的平均值，可为方法、实验室以及特定检测批的检

测效果提供信息。将批次间的检测效果假定为随机的，批次间的检测结果变化将大于可观察到的结果分布，需要考虑对结果进行评估（例如，通过对测量偏倚和批次间标准偏差分别研究）。

• 对标准物质重复测试多次所得平均值，评估特定的实验室内的方法和实验室偏倚的综合效果（除了使用特定方法指定相应数值的实验室）。

A.4.3　正确度实验的参考值

A.4.3.1　有证标准物质（CRMs）

有证标准物质可追溯到已知不确定度的标准物质，因此在假设没有不匹配的基质时，可用于同时标定所有偏差（方法、实验室、实验室间的偏差）。实际上，有证标准物质可以用于正确度的验证。确保标准值的不确定度足够小来满足检测重要值的偏差。若不能达到，仍推荐使用有证标准物质，但必须进行其他检验。

典型的正确度实验可给出对于标准物质的平均响应值。在解释结果时，应同时考虑有证物质值的不确定度和实验室内统计偏差产生的不确定度。而后者是基于检测中、检测间，或者是实验室间标准偏差评定，根据实验目的、统计或材料而定。对于标准值的不确定度很小的情况，常使用合适的精密度条件，进行 Student's t 检验，若有必要和可行的话，一系列采用合适基质以及被测物浓度的有证标准物质都应进行检测。如果按此操作，标准值的不确定度小于分析结果，可非常安全的使用简单回归来评估结果。这样的偏差可被表示为浓度的函数，并可能出现非零截距（“过渡”或常数偏差）或者作为一个非单一斜率（“转动”或比例偏差）。若基质范围很大，应谨慎用于解释结果。

A.4.3.2　标准物质

若无有证标准物质，或除有证标准物质外，可使用具有充足的良好目标特性的物质（标准物质），切记无显著的偏差不能认为是没有偏差，任何物质的显著偏差要进行原因调查。标准物质的例子包括：标准物质生产商表征过的物质，但是其性能值没有附上不确定度声明，或是另有限制；该物质的生产商表征过的物质；经实验室测试过可用作于标准物质的物质；已循环使用或水平测试过程分发的物质，虽然这些物质的溯源性可能会出现问题，但使用它们远比完全没有进行偏差评定的物质好。这些物质的使用与有证标准物质大致相同，即使没有阐明不确定度，任何显著性检验都依赖于观测结果的精密度。

A.4.3.3　使用标准方法

标准方法原则上可用于验证另一个方法偏差的测试。当用于检查已建立并经验证、在实验室应用的标准方法的替代或修改方法时非常有用。这两种方法都是测定一系列标准物质的测试，相当均匀地覆盖了有效浓度范围。用合适的统计方法，比对结果的范围（例如，配对 t 检验法，检查方差齐性和正态性）可表明方法间的偏差。

A.4.3.4　加标/回收率的应用

缺少标准物质时，或用于标准物质研究，通过回收率可得知偏差。用原来样品和添加（加样）大量已知被测物的方法检测典型的测试材料。两个结果添加质量比例的差异被称为代替回收率，有时也称临界回收率。回收率明显不同于影响方法的综合偏差。严格来说，这里对回收率的研究只用于评定添加物对实验造成影响的偏差；类似的影响无需同样程度的用于原来被测物，其他的影响则可用于原来被测物。加标/回收率的研究中观测表明，高回收率并不能保证正确度，低回收率则一定是缺少正确度的表现。处理回收率数据的方法已

在其他地方详细阐述。

A.5 精密度

精密度是相同条件下的独立测试结果接近程度。它通常是特指标准偏差或相对标准偏差。精密度与偏差的区别是本质上的，但是取决于分析系统的层次。因此，从单个实验的角度，偏离标准曲线的被视为偏差。回顾实验员一年的工作，此操作偏差每日都不同，而且以一定的精密度随机变化。评估规定条件下的精密度应考虑这些可见变化。

对于单一实验室验证，有两个相关的条件：

a）重复性条件下的精确度，描述了单次实验内观察到的变化，期望值为 0，标准偏差为 σ_r。

b）重复实验中的精确度，描述不同条件下的变化，运行偏差δ_{run}期望值为 0，标准偏差为 σ_{run}。通常这些误差来源应用于单个检测结果，因此精密度 $\sigma_{tot}=(\sigma_r^2/n+\sigma_{run}^2)^{1/2}$，$n$ 是一系列重复测试结果的平均值。这两个精密度评定很容易从测试被测物质的平行样得到。单个方差分量可通过用单独分析方差计算得到。每个平行样测试必须单独进行检测。合成精密度 σ_{tot}可通过连续测试被检测物质直接评估，以及利用常见方程评估标准偏差。

注：常用符号 s 表示实验标准偏差，与标准偏差 σ 区别开。

精密度的值代表了相关测试条件。首先，实验的条件变化代表实验室如何正常操作常规方法。例如试剂批次、实验员、实验仪器的变化。第二，使用的测试材料在基质和（理想）粉碎状态应与常规操作一致。其次，实际被测物或基质适合的标准物质必须符合要求，但分析物的标准溶液则不然。注意有证标准物质和已有标准物质在很大程度上经常比典型测试材料更加均匀，来自这些测试的精密度可能会低估测试材料的偏差。

精密度经常随检测物质的浓度变化。假设：

a）被测物水平没有影响精密度，或者

b）标准偏差与被测物水平成比例，或线性相关。这些情况下，须验证被测物水平有没有大幅度变化（有无超过中间值的 30%）。最经济的实验方法是简单评估精密度水平和可检测范围，进行合理的方差统计。可用 F 检验法评估误差是否符合正态分布。

精密度的数据除了最小的重复性和进行批次操作条件外，可通过改变不同条件获得，由此可获得额外的信息。例如，评定实验结果和每个实验员的操作误差是很有意义的，一天内用一个或多个仪器测定精密度，可以改进检测方法。在研究中，须关注实验的设计，例如：不同的实验设计范围和统计分析技术。

A.6 回收率

评估回收率的方法与评估正确度（前述）的方法应结合进行。

A.7 范围

验证方法的验证范围是被测物的浓度区间。该范围不需要与校准曲线的有效范围相同。校准曲线涵盖浓度范围更加广泛，其余的验证（通常是更重要的不确定度部分）将覆盖更严格的范围。在实践中，大多数方法在一个或两个浓度水平上进行验证。验证的范围可能会从这些浓度刻度点合理外推。

当使用该方法集中在一个高于检测限浓度，且在临界水平附近，验证将是适当的。它不可能确定总体安全的结果外推适用于其他浓度的分析物，因为在很大程度上取决于个别的

分析系统。因此验证研究报告应该表明在标准临界值范围进行验证，采用专业判断，且评价不确定度有效。

当浓度范围接近零或检测极限时，假定绝对不确定度恒定或相对不确定度恒定是不正确的。在这种常见的情况下有用的近似方法是假定采用一个具有正截距的线性函数关系来表示不确定度 u 和浓度 c 之间的关系，用公式表示为：

$$u(c)=u_0+\theta c$$

θ 为远高于检测限的一些浓度下的估算相对不确定度。u_0 为零浓度下估算的不确定度，在某些情况下可估算为 $c_L/3$。在这种情况下把验证范围从零延伸到离上端验证点较小整数倍数的点是合理的。此处将取决于专业判断。

A.8　检出限

广义上的检出限是指可跟 0 浓度很好区分、从样品中检出待测物质的最小浓度。在分析系统中，检出限不需验证，不包括在验证范围内。

尽管看似简单，但是对“检出限”这一定义一直存在以下疑问：

- 关于该主题有不少的理论概念，每一个都提供不同的检测限定义。
- 虽然每种方法都取决于精密度评估或者是空白溶液，但还不清楚是否适用于重复性条件或其他条件的评定。
- 除非收集了大量的数据，检测受很大的随机变化影响。
- 检出限的评定往往因操作因素导致有所偏差。
- 统计推论有关检测限取决于当量浓度的假设，这至少在低浓度还是有疑问的。

对于方法验证的大多数目的，选择简单的定义，可对方法粗略地估算。但检出限作为评估建立的方法，不等同于作为完整的检测方法特性的概念或数值。例如文献或仪器使用手册中的“仪器的检出限”，仅用于调节稀释溶液，是远小于实际检出限的，不适用方法验证。

根据方法验证，精密度($\hat{\sigma}_0$)至少通过测定标准基质空白或低基质浓度样品中 6 个浓度的待测物进行计算得到，不删掉 0 值或阴性结果，检出限大约计算为 $3\hat{\sigma}_0$。请注意，使用推荐的最小数量自由度，其值不确定，易受二者之一的因素影响误差。我们需要更准确地估计(例如基于检测或其他的材料的支持)，应参考相关指引(例如，见参考文献[22]～[23])。

A.9　检测限和定量限

在可接受精密度条件下，结果表述浓度不能低于检测方法达到的浓度。有时精密度定义为相对标准偏差的 10% ，有时限量定义为固定倍数(通常是 2 倍)的检出限。当在某程度上检出高于此限量，这是浓度数值范围的人工二分法：检测低于指定限量，可能更加合适。因此在这里不建议验证这种限量的方法。用浓度函数表示测量的不确定度和比较实验室标准的适用性以满足实验室、客户或最终用户数据目的较为合适。

A.10　灵敏度

方法的灵敏度是校准函数的倾斜度。这通常是任意的，取决于仪器设备，它并不适用于验证。(确保质量控制程序是有效的，但需要测试仪器是否符合标准。)

A.11　耐变性

分析方法的耐变性是防止因为实验条件微小偏差导致检测结果的变化。实验参数的限

制应预先在方法程序中规定（虽然过去不常做过），这样的单独或组合的允许偏差，不会在结果中产生无意义的变化。（此处“有意义的变化”意味着，该方法不能在适用的不确定度约定限值条件下进行。）需要识别出方法中可能会影响结果的因素，它们对方法性能的影响可通过耐变性测试来评估。

测试方法耐变性，常通过程序的小改变来检查对结果的影响。方法的一些因素应考虑，但因为许多因素的影响可以忽略，因此一次可以改变一些因素。一个合理的检测基于 Youden 的变量设计。例如，可以制定利用 7 个变量因素组合成 8 种的方法，通过这 8 个检测结果观察这 7 个因素。单变量法也可行，每次只有一个变量发生。

耐变性测试的因素例子：仪器、操作、试剂品牌变化、试剂的浓度、溶液的 pH、反应温度、过程完成时间等。

A.12 适用性

适用性是检测方法是否符合标准，实验员和数据的最终用户是否意见一致，是否符合客户需要。例如数据中的误差导致的不正确决定一般不应该超过规定的小概率，但是它们不应小到导致最终用户的不必要支出。适用性标准可以根据附录中某些特征描述，但最终将表达成可接受的总不确定度。

A.13 基质效应

在许多领域，基质变化是分析方法中最重要却是最为人忽略的误差的来源之一。当我们规定了经验证的分析体系，其他的如测试物质的基质是相当大的变化范围。引用一个极端的例子，土壤成分可以是黏土、沙子、滑石粉、红土（主要是 Fe_2O_3 和 Al_2O_3）、泥煤等，或以上成分的混合物。容易使人想到在分析方法中每个类型将起到单一的基质效应，例如光谱测定法。如果我们没有所要研究的土壤类型的信息，因为这些可变的基质效应，在结果中将出现一个额外不确定的因素。

基质变化的不确定性能被量化分离，因为在验证过程中，它们没被考虑进去。通过收集具有代表性的基质信息，所有的被测物浓度都有合适的范围。根据实验步骤检测物质，结果评定中存在偏差。除非测试物质是有证标准物质，偏差的评定常用稀释或回收的方法来评估。用标准偏差评估不确定度。

注：这些评定是经重复检测所得的差异值。如果加标被应用，将为 $2\sigma_r^2$。如果需要进行严格的不确定度估算，这些方面需要扣除基质变化，以避免双重计算。

A.14 测量不确定度

常规测量不确定度的方法是利用方程或者数学模型计算不确定度。应当考虑各种随机误差，方法验证的过程是为了确保方程用于估算结果，是一种有效体现所有可识别和显著影响结果的表达。接下来，有一个前提，下面进一步阐述方程或“模型”被验证可以直接用来估计测量不确定度。这是通过以下基于“不确定度定律”原则建立：

$$u(y(x_1, x_2, \cdots)) = \sqrt{\sum_{i=1,n} c_i^2 u\ (x_i)^2}$$

其中，x_1，$x_2\cdots$是函数 $y(x_1, x_2, \cdots. x_n)$的几个独立变量，c_i 是灵敏度系数，评估为 $c_i = \partial y/\partial x_i$，$y$ 针对 x_i，$u(x_i)$和 $u(y)$的偏微分是标准不确定度。测量不确定度以标准偏差的形式表示。由于 $u(y(x_1, x_2, \cdots))$是一个估计几个单独不确定度的函数，它被称为合成标准不

确定度。

测量不确定度的估计方程 $y=f(x_1, x_2\cdots)$，用于计算结果，因此，我们有必要首先建立在 x_1, x_2 等的不确定度 $u(x_i)$，其次结合要求在验证中表示随机效应的其他条件，最后考虑任何其他的影响。上面讨论的精密度包含的统计模型为：

$$y=f(x_1, x_2\cdots)+\delta_{run}+e$$

其中，e 是特定结果的随机误差。因为精密度实验中δ_{run}和 e 是已知的，分别是标准偏差 σ_{run}和 σ_r。后面的参数(严格来说，或者估算为 S_{run}和 S_r)是与这些其他参数相关的不确定性。单个批次内结果取平均值，与这两项参数有关的合成不确定度(前述已给出)为 $S_{tot}=(S_r^{\,2}/n+S_{run}^{\,2})^{1/2}$。注意，此处的精密度随分析物水平变化，对于一个给定结果的不确定性估计必须采用适合该水平的精密度。不确定性评估的基础直接遵从统计模型假设并进行验证。该评估必须添加其他必要的参数考虑到(特别是)不均匀性和基质效应(见 A.13 部分)。最后，计算标准不确定度乘以一个"覆盖因子"k 来提供扩展不确定度，即"一个间隔将包含归因于被测对象的大比例的分布值"。统计模型已经建立好，正常分布，与评估相关的自由度数值高，k 一般选择等于 2。扩展不确定度对应于大约 95%的置信区间。

这里重点提示，在检验假设统计模型时，必须使用不完全检验。已经表明，这些检验不能证实任何影响同为零；他们只能显示小到不能检测与特定显著性检验相关不确定度的影响。一个特别重要的例子是显著的实验室偏差检验。显然，如果这只是用于确认正确性的检验，不论该方法实际上有无偏差，必须有一些残差不确定度。在一定程度上这些不确定度对于计算不确定度是重要的，看作为额外的补充。

对于一个不确定度的值，最简单的默认方式是表示物质的不确定度，再加上用于测试的统计不确定度。一个完整的讨论超出了本文的范围，参考文献提供进一步的细节。然而，重要的是要注意，尽管是直接从假设的统计模型评估不确定度是最小不确定度，也与一个分析结果有关，通常会被低估；同样，一个基于同样考虑的扩展不确定度，使用 $k=2$ 并不能提供足够的置信度。

ISO 指南建议，要提高置信度，必需应该增加 k 值而不是随意添加参数。实践经验表明，对于基于已验证的、但没有验证研究外的证据以提供额外置信度的统计模型，k 值应不小于 3。如有充分理由怀疑验证研究是否全面，应该按要求进一步提高 k 值。

附 录 B
关于验证研究中不确定度评定的其他注意事项

B.1 灵敏度分析

不确定度评定的表达式为：

$$u[y(x_1,x_2,\cdots)]=\sqrt{\sum_{i=1,n}c_i^{\,2}u\,(x_i)^2}$$

c_i 是灵敏度系数。通常在不确定度评定中发现给定的影响因子 x_i 具有已知的不确定度 $u(x_i)$，系数 c_i 不能够直接或者简单地从结果的方程中计算得到。通常非显著的影响不会包含在测量方程中，所以，或因为关系不足以引起修正。例如，溶液温度的影响 T_{sol}，在室温提取的过程基本不受影响。

要评价某效应带来的结果不确定度，可通过实验来确定系数。最简单的就是通过改变 x_i，观察其对结果的影响，在某程度上非常类似于基本的耐变性测试。在大多数情况下，起初至多选择两个 x_i 值而不是标称值，从所观察到的结果中计算近似的斜率。该斜率给出了一个 c_i 的近似值。进而确定 $c_i\cdot u(x_i)$（注意，这是显示显著性或是对结果的可能影响的实用方法）。

在实验中，观察到结果的变化对计算 c_i 很重要。但这难以提前预测。然而，在允许范围内 x_i 的影响量，或扩展不确定度的量，对结果的影响都是微不足道的，而在更大的范围内评价 c_i 更为重要。预测范围$\pm a$ 内的影响量（$\pm a$ 可能是允许范围，扩展不确定度区间或 95％置信区间）应用于灵敏度实验。在可能的情况下，至少 $4a$ 的变化，才能确保结果的可靠性。

B.2 判断

若发现结果明显的异常，则不可能得到可靠的不确定度评价。在这种情况下，ISO 指南明确指出必须进行不确定度评价。因此，如未对有潜在问题的不确定度进行评价，分析员应该做出自己最佳判断，推断出不确定度和其适用范围。参考文献提供了进一步不确定度评估应用判断指南。

参 考 文 献

[1] "Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method Performance Studies", W Horwitz, Pure Appl. Chem., 1988, 60, 855 864, revised W. Horwitz, Pure Appl. Chem., 1995, 67, 331-343.

[2] "The International Harmonised Protocol for the Proficiency Testing of (Chemical) Analytical Laboratories", M Thompson and R Wood, Pure Appl. Chem., 1993, 65, 2123-2144. (Also published in J. AOAC International, 1993, 76, 926-940.

[3] "Harmonised Guidelines For Internal Quality Control in Analytical Chemistry Laboratories", Michael Thompson and Roger Wood, J. Pure & Applied Chemistry, 1995, 67(4), 49-56.

[4] "Harmonised Guidelines for the Use of Recovery Information in Analytical Measurement", Michael Thompson, Stephen Ellison, Ales Fajgelj, Paul Willetts and Roger Wood, J. Pure & Applied Chemistry, 1999, 71(2), 337-348.

[5] "Council Directive 93/99/EEC on the Subject of Additional Measures Concerning the Official Control of Foodstuffs", O. J. , 1993, L290.

[6] "Procedural Manual of the Codex Alimentarius Co mmission, 10th Edition", FAO, Rome, 1997.

[7] "Precision of Test Methods", Geneva, 1994, ISO 5725, Previous editions were issued in 1981 and 1986.

[8] "Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement", ISO, Geneva, 1993.

[9] "Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement", EURACHEM Secretariat, Laboratory of the Government Chemist, Teddington, UK, 1995, EURACHEM Guide(under revision).

[10] "International vocabulary of basic andgeneral terms in metrology" ISO, Geneva 1993.

[11] "Validation of Chemical Analytical Methods", NMKL Secretariat, Finland, 1996, NMKL Procedure No. 4.

[12] "EURACHEM Guide: The fitness for purpose of analytical methods. A Laboratory Guide to method validation and related topics", LGC, Teddington 1996. Also available from the EURACHEM Secretariat and website.

[13] "Statistics manual of the AOAC", AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, Maryland, USA, 1975.

[14] "An Interlaboratory Analytical Method Validation Short Course developed by the AOAC INTERNATIONAL", AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, Maryland, USA, 1996.

[15] "Text on validation of analytical procedures" International Conference on Harmonisation. Federal Register, Vol. 60, March 1, 1995, pages 11260.

[16] "Validation of analytical procedures: Methodology" International Conference onHarmonisation. Federal Register, Vol. 62, No. 96, May 19, 1997, pages 27463－27467.

[17] "Validation of Methods", Inspectorate for Health Protection, Rijswijk, The Netherlands, Report 95-001.

[18] "A Protocol for Analytical Quality Assurance in Public Analysts' Laboratories", Association of Public Analysts, 342 Coleford Road, Sheffield S9 5PH, UK, 1986.

[19] "Validation of Analytical Methods for Food Control", Report of a Joint FAO/IAEA Expert Consultation, December 1997, FAO Food and Nutrition Paper No. 68, FAO, Rome, 1998.

[20] "Estimation and Expression of Measurement Uncertainty in Chemical Analysis", NMKL Secretariat, Finland, 1997, NMKL Procedure No. 5.

[21] M Thompson, PJLowthian, J AOAC Int, 1997, 80, 676-679.

[22] IUPAC reco mmendation: "Nomenclature in evaluation of analytical methods, including quantification and detection capabilities" Pure and Applied Chem. " 1995, 67 1699-1723.

[23] ISO 11843. "Capability of detection. "(Several parts). International Standards Organisation, Geneva.

[24] M. Thompson, Analyst, 2000, 125, 2020-2025.

[25] "Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing" M Thompson, Analyst, 2000, 125, 385-386.

[26] "How to combine proficiency test results with your own uncertainty estimate-the zeta score", Analytical Methods Co mmittee of the Royal Society of Chemistry, AMC Technical Briefs, editor M. Thompson, AMC Technical Brief No. 2, www. rsc. org/lap/rsccom/amc.

OIV-MA-AS1-14

测量不确定度的建议

(决议 oeno 9/2005)

【引言】

对于分析员而言,认识到不确定度与每个分析结果和不确定度评估的关系是很重要的。测量不确定度可能源自于一系列程序。食品实验室需要监管,条件允许时,可使用协同测试方法。并且,在方法投入常规使用之前,要验证其应用。因此,这些实验室可用很多分析数据来估算它们的测量不确定度。

【专业术语】

有关测量不确定度,普遍被接受的定义是:"与测量结果有关,表示测量得到的数值间分散程度的参数。"

注 1:该参数可能是一个标准偏差(或者是给定的多倍数),或一个规定的置信水平区间的半宽度。

注 2:总的来说,测量不确定度由很多部分组成。一些部分可能会从一系列测量结果的统计分布中得到评价,也可以用实验标准偏差来表示。其他部分也可以用标准偏差来表示。但它们通常是基于实验或其他信息的假设概率分布来评价。

注 3:一般认为,测量结果是被测量值以及包括系统影响产生在内的不确定度所有组成部分的最佳估计值。比如与更正和参考标准相关的组成部分有助于分散。

[人们普遍认为"测量不确定度"是国际组织和认证机构使用最为广泛的术语。然而食品法典委员会的分析和抽样方法分委员会认为,在很多情况下,"测量不确定度"术语在法律层面上会产生一些负面问题,所以,他们提出了可使用替代的等效术语"测量可靠性"。]

【建议】

以下是给政府的建议:

1. 对于 OIV 而言,应当使用术语"测量不确定度"或"测量可靠性"。

2. 与所有分析结果相关的"测量不确定度"或"测量可靠性"可以被评价,应按照用户(顾客)要求提供。

3. 分析的结果测量不确定度或"测量可靠性"在很多程序,特别是在国际标准化组织和欧洲分析化学中心描述的程序中可以评价。这些文件基于组成与组成方式、方法验证数据、内部质量控制数据和水平测试数据上推荐程序。如果有其他形式的数据,并能用于评估不确定度或可靠性,则不需要采用国际标准化组织的组成与组成方式来评估测量不确定度或测量可靠性。在大多数情况下,全部的不确定度可能会通过 IUPAC/ISO/AOAC INTERNATIONAL 或 ISO 5725 程序中的许多实验室和若干基质的实验室间(协同)研究确定。

参考文献

[1] "Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement", ISO, Geneva, 1993.

[2] EURACHEM/CITAC Guide Quantifying Uncertainty In Analytical Measurement (Second Edition), EURACHEM Secretariat, HAM, Berlin, 2000. This is available as a free download from http://www.vtt.fi/ket/eurachem.

[3] "Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method Performance Studies", ed. W. Horwitz, Pure Appl. Chem., 1995, 67, 331-343.

[4] "Precision of Test Methods", Geneva, 1994, ISO 5725, Previous editions were published in 1981 and 1986.

OIV-MA-AS1-15

回收率校正的建议

(决议 OIV-Oeno 392/2009)

针对报告分析结果中的回收,OIV 建议如下:

• 分析结果可以在适当和相关的回收校正基础上表述,并且在校正时明确指出。

• 如果结果已经校正了回收,则应指出考虑回收的方法。回收率只要有可能都会被引用。

• 当制定标准规定时,有必要指出,通过一致性检查,用于分析的方法得到的结果应声明是否基于回收校正基础。

第 6 部分

糖含量（精馏浓缩葡萄汁）特殊检测方法

方法 OIV-MA-F1-01　　方法类型Ⅳ

电 导 率

(Oeno 419A-2011)

1 原理

电导率的测定原理是将两个相互平行的铂电极放到被测溶液中，在铂电极的末端连接上惠斯通电桥，然后通过惠斯通电桥测定极间电导，由于电导率会随温度变化而变化，所以通常情况下采用 20℃的电导率表示。

2 试剂

只使用分析纯试剂。

2.1 实验室用纯净水

20℃下其电导率在 2 μS/cm 以下，例如 EN ISO 3696Ⅱ型水。

2.2 氯化钾参比溶液

把 KCl 固体在 105℃ 下干燥至恒重，称取 0.581 g 溶于去矿物质水(2.1)中。定容至 1 L。制得的 KCl 溶液在 20℃测得电导率为 1 000 μS/cm，溶液保存不能超过三个月。可使用商业用的氯化钾参比溶液。

3 仪器

3.1 电导率仪(使用范围：1 μS/cm～1 000 μS/cm)

3.2 水浴装置，使测试在 20℃(20℃± 2℃)的恒温环境下进行。

4 步骤

4.1 待测样品的准备

从总糖质量浓度为 25%±0.5%(白利糖度为 25°)的溶液中称取含糖量质量等于 2 500/P 的液体，加水至质量为 100 g。P＝精馏过的浓缩葡萄汁的总糖质量分数。

4.2 电导率测量

将待测样品置于在 20℃的恒温水浴中，使温度稳定在±0.1℃内；

测试前先用待测液清洗电导池两次；

测量待测液电导率并以 μS/cm 表示结果。

5 结果表示

精馏浓缩葡萄汁的电导测试结果以修约至整数位，温度为 20℃，单位为 μS/cm。

5.1 计算

如果仪器没有温度补偿装置，则根据表 1 进行结果校正。如果温度低于 20℃，则加校正数值；若温度高于 20℃，则减去校正数值。

6　方法特性

重复性限(r)

$$r=3\ \mu S/cm$$

再现性限(R)

$$R=16\ \mu S/cm$$

表 1　非 20℃条件下的电导率校正值(μS/cm)

电导率	温度/℃									
	20.2 19.8	20.4 19.6	20.6 19.4	20.8 19.2	21.0 19.0	21.2 18.8	21.4 18.6	21.6 18.4	21.8 18.2	22.0[a] 18.0[b]
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	0	0	1	1	1	1	1	2	2	2
100	0	1	1	2	2	3	3	3	4	4
150	1	1	2	3	3	4	5	5	6	7
200	1	2	3	3	4	5	6	7	8	9
250	1	2	3	4	6	7	8	9	10	11
300	1	3	4	5	7	8	9	11	12	13
350	1	3	5	6	8	9	11	12	14	15
400	2	3	5	7	9	11	12	14	16	18
450	2	3	6	8	10	12	14	16	18	20
500	2	4	7	9	11	13	15	18	20	22
550	2	5	7	10	12	14	17	19	22	24
600	3	5	8	11	13	16	18	21	24	26

[a]减去校正数值。

[b]加上校正数值。

方法 OIV-MA-F1-02 **方法类型Ⅳ**

高效液相色谱法测定羟甲基糠醛

(Oeno 419A-2011)

1 原理

高效液相色谱(HPLC):

利用反相色谱柱分离,检测波长 280 nm。

2 试剂

2.1 实验室用纯净水,质量标准为 EN ISO 3696。

2.2 甲醇,CH_3OH,使用前先蒸馏或色谱纯。

2.3 乙酸,CH_3COOH,($\rho_{20℃}=1.05$ g/mL)。

2.4 流动相:水(2.1)-甲醇(2.2)-乙酸(2.3)混合溶液,体积比为 40∶9∶1,使用前用薄膜滤器(0.45 μm)先过滤。

流动相需当天配制,使用前先进行脱气处理。

2.5 羟甲基糠醛参比溶液,25 mg/L(m/V)。

在 100 mL 容量瓶中加入 25 mg(精确称量)羟甲基糠醛($C_6H_3O_6$),用甲醇(2.2)定容到刻度。后用甲醇(2.2)将以上溶液稀释 10 倍,最后用薄膜滤器(0.45 μm)过滤。

将所得溶液转移至棕色瓶中密封并在冰箱中保存,可保存 2~3 个月。

(参比溶液的浓度用于参考。)

3 设备

3.1 仪器

3.1.1 高效液相色谱,配备有:

a) 环形进样器,每次进样 5 μL 或 10 μL。

b) 分光光度检测器,检测波长为 280 nm。

c) 十八烷基键合硅胶色谱柱(比如 Bondapak C_{18}-Corasil,Waters Ass.)。

d) 使用记录器记录数据,如有需要,或使用积分器。

流动相速率:1.5 mL/min(以供参考)。

3.1.2 薄膜滤器,孔径 0.45 μm。

4 步骤

4.1 样品的制备

将蒸馏浓缩样品稀释至 40%(m/V)(准确称量 200 g 蒸馏浓缩葡萄汁加入到 500 mL 的容量瓶中,用水标定至刻度并摇匀),后用薄膜滤器(0.45 μm)过滤。

4.2 气相色谱测试

将 5 μL 或 10 μL 上述制得的样品进样到色谱中,再进样 5 μL 或 10 μL 的羟甲基糠醛

参比溶液(2.5)，记录色谱数据。

羟甲基糠醛的保留时间约为6 min～7 min。

所注射溶液体积及操作顺序仅供参考。色谱法测定含量还可以通过校正曲线法进行。

5　结果表示

蒸馏浓缩葡萄汁中羟甲基糠醛的浓度可用mg/kg(总糖量)来表示。

将浓度为40%(m/V)蒸馏浓缩葡萄汁溶液中的羟甲基糠醛的浓度设为c(mg/L)。

蒸馏浓缩葡萄汁中羟甲基糠醛的浓度[mg/kg(总糖量)]则表示为：

$$250 \times c/P$$

其中，P为蒸馏浓缩葡萄汁的总糖量的浓度分数(m/m)。

6　方法特性

重复性限$r=0.5$ mg/kg(总糖量)

再现性限$R=3.0$ mg/kg(总糖量)

OIV-MA-F1-03

方法类型Ⅳ

浓缩葡萄汁和葡萄糖液(或精馏浓缩葡萄汁)中的酒精度的检测方法

(Oeno 419A-2011)

1 前言

浓缩葡萄汁(CM)和葡萄糖液(或精馏浓缩葡萄汁)(RCM)是酒精含量低的黏性产品，为了确定它们的酒精度(ASV)，必须使用一种其性能(线性、可重复性、可再生性、特异性，以及检出限和定量限)满足测定1 %(V/V)以下酒精要求的方法。

2 应用领域

本方法适用于浓缩葡萄汁和葡萄糖。

3 基本原理

用氢氧化钙悬浊液将已知质量的浓缩葡萄汁或葡萄糖调至碱性后蒸馏。用电子密度计或比重天平测定密度法确定馏分的体积酒精浓度。

4 试剂

——2 mol/L 氢氧化钙悬浊液，分析纯：将1 L热水(60℃～70℃)小心倒入约120 g氧化钙中制得。

——消泡剂溶液：将2 mL浓有机硅消泡剂稀释于100 mL水中。

——实验室用纯水，符合EN ISO 3696质量指标。

5 仪器

——包括容量瓶在内的标准实验室仪器；

——分析天平，精确到0.1 g；

——可以采用任何满足下列测试要求的蒸馏装置或水蒸气蒸馏装置：

对一份按容量计酒精度为10%的乙醇一水混合物连续进行5次蒸馏。第5次的馏分，按容量计酒精度至少达到9.9%；也就是说，每次蒸馏的乙醇损失按容量计不得超过0.02%；

——电子密度仪或比重天平。

6 步骤

——倒转酒瓶数次使样品混合均匀；

——称取约200 g浓缩葡萄汁或精馏浓缩葡萄汁(误差在0.1 g以内)于500 mL的容量瓶里。记录该样品的质量(TS)，用去离子水定容到刻度线。该溶液以葡萄汁计算的浓度约为40%(m/V)。获取馏分；

——取 250 mL 40%的溶液到蒸馏烧瓶，再向烧瓶中加入约 10 mL 的氢氧化钙悬浊液、约5 mL消泡剂溶液和可用的暴沸调节物（如碎瓷片）；

——均匀加热至沸腾；

——将馏分收集至一个 100 mL 容量瓶（约 90 mL）；

——使置馏分冷却至室温，然后用去离子水定容。

ASV 的测定

——用电子密度计或比重天平进行测定。

7　计算

$$\text{获取的体积酒精度} = \frac{ASV\text{ 测量值} \times 200 \times MV}{TS}$$

其中，ASV 测量值为密度计给出的酒精含量，以体积分数计；TS 为浓缩葡萄汁或葡萄中的糖样品的质量；MV 为浓缩葡萄汁或精馏浓缩葡萄汁的密度，单位 g/mL。

结果均精确到两位小数且在 0.05%的误差内四舍五入。

8　方法特性

8.1　线性响应值

密度计对于低 ASV 值的线性度是本方法的重要参数之一。本实验配制了 10 种含水酒精溶液，体积分数在 0～5%的标准范围内。每份溶液都进行 3 次分析。

在该体积分数范围内，密度计有良好的线性响应，如图 1 的标准曲线所示。

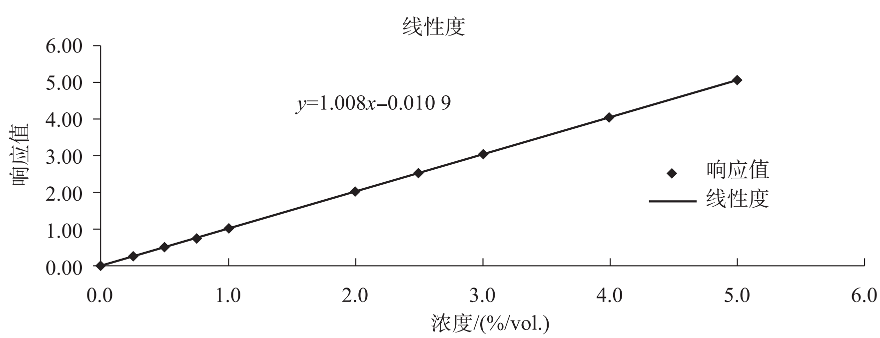


图 1　电子密度计在 0～5%体积浓度范围内对 *ASV* 测定的线性度

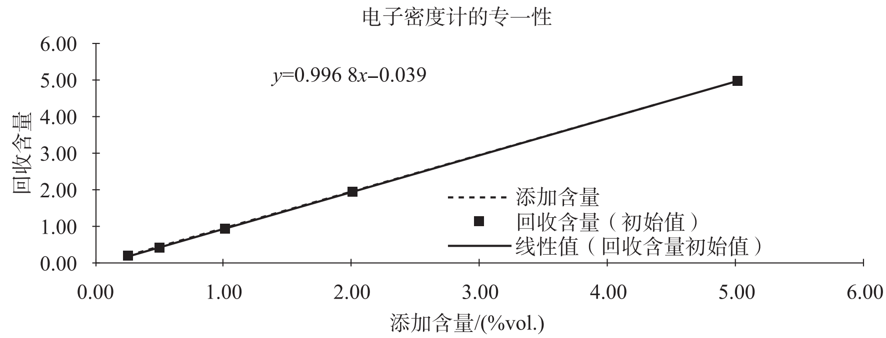
8.2　方法专一性

方法的第二个要点是含有少量酒精的黏稠葡萄汁的蒸馏。为了验证方法专一性，向浓缩葡萄汁和葡萄糖中加入已知量的乙醇（从 0.25% vol. ～5% vol.）。补充的测试样品按之前介绍的实验条件进行蒸馏，然后用电子密度计或比重天平分析馏分。

结果如表 1 所示，回收率很理想，在 88%～99%之间。如图 2 所示，方法具有专一性（斜率接近 1，截距接近 0）。

表 1　浓缩葡萄汁和葡萄中的糖的酒精浓度测定方法的回收率

测试样品	初始浓度/%vol.	添加浓度/%vol.	回收浓度/%vol.	回收率/%
CM 1	0.00	0.25	0.33	88
CM 1	0.00	1.00	0.98	98
葡萄中的糖(RCM)1	0.00	1.00	0.94	94
葡萄中的糖(RCM)1	0.00	2.00	1.97	99
CM 2	0.00	0.50	0.44	88
葡萄中的糖(RCM)2	0.00	5.00	4.94	99



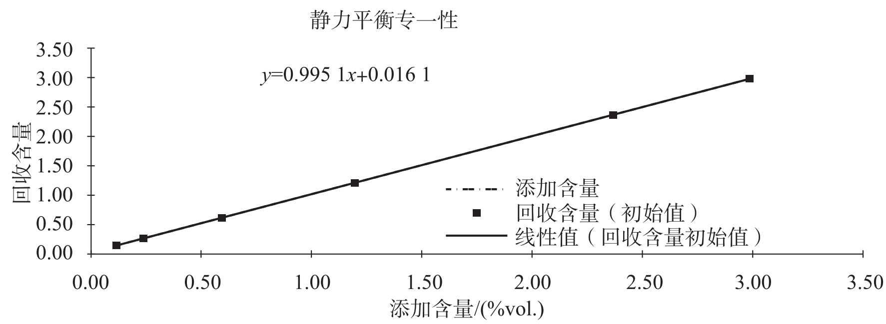


图 2　浓缩葡萄汁和葡萄糖酒精度浓度测定法的专一性

8.3　重复性

使用 20 份有或没有添加乙醇的浓缩葡萄汁或葡萄糖的试验样品来确定该方法的可重复性。每一份浓缩葡萄汁或精馏浓缩葡萄汁均分析 3 次，以保证相同实验条件。得到可重复性限如下：

表 2　浓缩葡萄汁和葡萄中的糖酒精浓度测定法的重复性

电子密度测试的重复性	计算值
标准偏差	0.009
CV 或 *RSD*/%	0.9%
r 限值	0.024% vol.
r 限值/%	3%

表 2(续)

比重天平的重复性	计算值
标准偏差	0.013
CV 或 *RSD*/%	1.7%
r 限值	0.038% vol.
r 限值/%	5.3%

8.4　重现性

在给定时间段内的不同日期，分 2 次测定相同的试验样品来确定该方法的重现性，结果由表 3 给出：

表 3　浓缩葡萄汁和葡萄中的糖酒精浓度测定法的重现性

电子密度测试的重现性	计算值
标准偏差 *CV* 或 *RSD* % *R* 限值 *R* 限值/%	0.043 3% 0.12% vol. 9%
比重天平的重现性	计算值
标准偏差 *CV* 或 *RSD* % *R* 限值 *R* 限值/%	0.026 3.4% 0.076% vol. 10.6%

8.5　检出限（*LOD*）和定量限（*LOQ*）

根据线性分析估算的 *LOD* 和 *LOQ* 如下：

LOD＝0.01%vol.　*LOQ*＝0.05%vol.

定量限是通过分析一份 *ASV* 为 0.05%vol. 的葡萄汁得出的。

8.6　不确定度

根据重现性标准偏差计算得到的不确定度为 0.10%vol.。

方法 OIV-MA-F1-04 **方法类型Ⅳ**

高效液相色谱法测定蔗糖

(Oeno 419A-2011)

1 原理

在高效液相色谱法检测中,蔗糖用烷基胺化的硅胶柱进行分离,再用折光仪进行检测。对比在同样测试条件下得到的外标基准物的折光度得出检测蔗糖浓度。

注:鉴定未发酵葡萄汁或红酒可使用氘核磁共振氢谱法,该方法在检测未发酵葡萄汁、蒸馏浓缩葡萄汁及葡萄酒的丰度章节已经提及。

色谱检测条件仅作参考。

2 试剂

2.1 符合 EN ISO 3696 标准的实验用纯净水。

2.2 乙腈,高效液相色谱纯。

2.3 蔗糖。

2.4 流动相:乙腈-水混合溶液 80∶20 体积比,使用前用 0.45 μm 滤膜进行过滤;流动相的组成仅作参考。

流动相使用前需经过脱气处理。

2.5 标准溶液:1.2 g/L 蔗糖水溶液,使用前用 0.45 μm 滤膜进行过滤。标准溶液浓度仅作参考。

3 仪器

3.1 高校液相色谱,配备包括:

a) 10 μL 进样器(仅作参考);

b) 检测器:视差折光仪或干涉折光仪;

c) 烷基胺键合硅胶柱,长 25 cm,内径 4 mm(仅作参考);

d) 填充相同固定相的保护柱(仅作参考);

e) 保护柱和分析柱柱温保持在 30℃;

f) 记录器,如果有必要,外加积分器;

g) 流动相流速控制在 1 mL/min(仅作参考)。

3.2 膜过滤(0.45 μm)设备

4 检测过程

4.1 样品制备

溶液样品为稀释至 40%(m/V)的蒸馏浓缩葡萄汁(详见总酸度附录 H),用前用 0.45 μm 滤膜进行过滤。

4.2 色谱检测

依次注入 10 μL 标准溶液和 4.1 节中制备的样品。

按顺序重复以上操作。

记录检测谱图。

蔗糖在该色谱柱中保留时间约为 10 min。

注入样品体积和顺序仅作参考，也可以用校正曲线进行色谱检测。

5 计算

以两次进样的平均值来进行计算。

以 c 作该稀释至 40%(m/V)蒸馏浓缩葡萄汁中蔗糖的浓度，单位为 g/L。

每千克蒸馏浓缩葡萄汁中的蔗糖含量(g/kg)为 $2.5\times c$。

6 结果的表达

蔗糖浓度以 g/kg 为单位，保留小数点后 1 位数。

7 方法特征

重复性限(r)：

r=1.1 g/kg 葡萄原汁

方法 OIV-MA-F1-05　　方法类型Ⅳ

总　酸

(Oeno 419A-2011)

1 定义

精馏浓缩葡萄汁的总酸度指的是用标准碱溶液滴定至 pH 7 时测得的可滴定总酸。二氧化碳不计入总酸度中。

2 方法原理

采用电位滴定或用溴百里香酚兰作指示剂，对比标准终点颜色。

3 试剂

3.1 缓冲溶液：

3.1.1 pH7.0

磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	107.3 g
1 mol/L 氢氧化钠(NaOH)溶液	500 mL
加水至	1 000 mL

3.1.2 pH4.0

苯二甲酸氢钾($C_8H_5KO_4$)溶液 0.05 mol/L，20 ℃下每升溶液含 10.211 g 苯二甲酸氢钾。

注：可使用 SI 标识的商业用缓冲溶液：

例如：在 25℃下，pH1.679±0.01

在 25℃下，pH4.005 ± 0.01

在 25℃下 pH7.000 ± 0.01

3.2 0.1 M 氢氧化钠(NaOH)溶液。

3.3 4 g/L 溴麝香草酚蓝作指示剂溶液：

溴百里香酚兰($C_{27}H_{28}Br_2O_5S$)	4 g
96%(V/V)中性乙醇	200 mL
溶解并加入：	
不含 CO_2 的水	200 mL
足够的 1 mol/L 氢氧化钠溶液使颜色变成蓝绿色(pH 7)，大约	7.5 mL
加水至	1 000 mL

4 仪器

4.1 具有 pH 分度尺的电位计和电极：

提示：玻璃电极必须保存在蒸馏水中。甘汞/饱和氯化钾电极必须保存在饱和氯化钾溶液中。最常用的是复合电极，应该保存在蒸馏水中。

4.2 100 mL 锥形瓶。

5　实验过程

5.1　样品准备

准确称量200 g的精馏浓缩葡萄汁，加水500 mL至刻度线，摇匀。

5.2　电位滴定

5.2.1　仪器调零

所有测试开始前仪器必须根据说明书调零。

5.2.2　pH计校正

pH计必须在20℃用SI(国际单位制)标识的标准缓冲溶液校准。所选择的pH必须在葡萄汁可能包含的范围内。如果该pH计不能校准很低的pH，那么可使用与葡萄汁接近的pH值的SI标识的缓冲溶液进行验证。

5.2.3　测量方法

在锥形瓶中，加入50 mL按5.1准备的样品。

加入10 mL蒸馏水，用滴管加入0.1 mol/L氢氧化钠溶液直到pH=7(20 ℃)。注意要边搅拌溶液边缓慢滴加氢氧化钠溶液。加入氢氧化钠溶液的体积记录为n mL。

5.3　在指示剂溴麝香草酚蓝存在下滴定

5.3.1　初步测试：终点颜色的确定

在锥形瓶中加入25 mL煮沸过的蒸馏水、1 mL溴麝香草酚蓝溶液和50 mL样品溶液。

加入1 mol/L的氢氧化钠溶液直到颜色变成蓝绿色。

然后加入5 mL pH为7的缓冲溶液。

5.3.2　测试

在锥形瓶中加入30 mL煮沸过的蒸馏水、1 mL溴麝香草酚蓝溶液和50 mL 5.1中制备的样品溶液。

加入1 mol/L氢氧化钠溶液直到颜色和预滴定测试中溶液的最终颜色一样。

加入的0.1 mol/L氢氧化钠溶液体积记录为n mL。

6　结果表示

计算方法：

——若总酸度以“毫当量/kg”精馏浓缩葡萄汁表示，则：$A=5\times n$

——若总酸度以“毫当量/kg”总糖量表示，则：$A=(500\times n)/P$

其中，P为总糖量的质量浓度，用%表示。

结果精确至小数点后一位。

7　方法特性

重复性限$r=0.4$ meq/kg总糖量

再现性限$R=2.4$ meq/kg总糖量

pH

(Oeno 419A-2011)

1 原理

测量浸没于溶液中的两个电极之间的电势差。其中一个电极的电势为溶液 pH 的函数,而另一个电极具有已知的固定电势,作为参比电极使用。

2 试剂

2.1 缓冲溶液

2.1.1 酒石酸氢钾的饱和溶液,20℃下每升溶液中含有至少 5.7 g 酒石酸氢钾($C_4H_5KO_6$)。(溶液每 200 mL 加入 0.1 g 百里酚,最长能保存两个月。)

pH、温度:

20℃时为 3.57;

25℃时为 3.56;

30℃时为 3.55。

2.1.2 邻苯二甲酸氢钾溶液,0.05 mol/L,20℃下每升溶液中含有 10.211 g 邻苯二甲酸氢钾($C_8H_5KO_4$)(最长能保存两个月)。

pH、温度:

15℃时为 3.999;

20℃时为 4.003;

25℃时为 4.008;

30℃时为 4.015。

2.1.3 含有以下物质的溶液:

磷酸二氢钾,KH_2PO_4 3.402 g

磷酸氢二钾,K_2HPO_4 4.354 g

加水标定至 1 000 mL(最长能保存两个月)。

pH、温度:

15℃时为 6.90;

20℃时为 6.88;

25℃时为 6.86;

30℃时为 6.85。

注:可使用 SI(国际单位制)标识商用缓冲溶液。

例如:25℃时 pH 为 1.679±0.01;

25℃时 pH 为 4.005±0.01;

25℃时 pH 为 7.000±0.01。

3 设备

3.1 校正过的精确到 0.01 单位的 pH 计

3.2 电极：

3.2.1 玻璃电极。

3.2.2 甘汞-饱和氯化钾参比电极。

3.2.3 也可使用组合电极。

4 步骤

4.1 分析样品的准备

将蒸馏浓缩葡萄汁用水稀释至总糖浓度为 25%± 0.5%(m/m)(25 ° 糖度)。

用 p 表示在蒸馏浓缩葡萄汁中总葡萄糖的百分含量(m/m)，称取 2 500/P 蒸馏浓缩葡萄汁，用水加至 100 g。

稀释用水的电导率必须低于 2 μS/cm。

4.2 仪器的调零

每次测量之前都需要根据仪器的说明进行调零操作。

4.3 pH 计的校准

pH 计必须在 20℃用 SI(国际单位制)标识的缓冲溶液进行校准。校正选用的 pH 必须包含葡萄汁的 pH 范围。如果选用的 pH 计的校正范围不能达到足够低的 pH，需要使用符合国际单位制规定且 pH 接近葡萄汁的标准溶液进行校正。

4.4 测量

将电极浸入要测量的样品中，样品温度应该在 20℃～25℃之间，尽可能接近 20℃。

直接读出 pH 值。

每个样品至少平行测量两次。

最后的结果取两次测量的平均值。

5 结果的表达

浓度为 25%(m/m)(25 ° 糖度)蒸馏浓缩葡萄汁的 pH 值保留小数点后两位。

6 方法特性

重复性限 r=0.07

再现性限 R=0.07

方法 OIV-MA-F1-07　　　　方法类型Ⅳ

二 氧 化 硫

(Oeno 419 B-2011)

1　定义

葡萄果汁中游离态二氧化硫以两种形式存在：H_2SO_3 和 HSO_3^-。

在温度与 pH 作用下，二者电离平衡方程式如下：

$$H_2SO_3 \rightleftharpoons H^+ + HSO_3^-$$

H_2SO_3代表分子态的二氧化硫。

二氧化硫总量指葡萄汁中各种形式的二氧化硫的总量，包括游离态和结合态。

2　材料

二氧化硫总量通过从预先稀释的精馏浓缩葡萄汁中在高温(约 100℃)条件下提取。

2.1　试剂

2.1.1　85%磷酸浓度为(ρ_{20}=1.71 g/mL)。

2.1.2　过氧化氢溶液 9.1 g H_2O_2/L。

2.1.3　指示剂：

甲基红	100 mg
甲基蓝	50 mg
50 %(V/V)酒精	100 mL

2.1.4　氢氧化钠溶液(NaOH)，0.01 mol/L。

2.2　仪器

2.2.1　使用的仪器必须遵循下图，尤其是冷凝器部分。

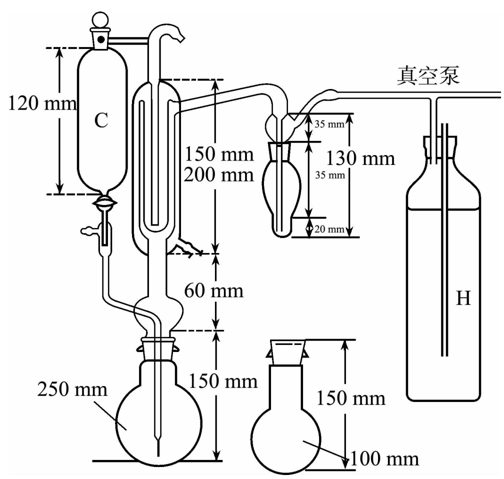


图 1

图 1 尺寸以 mm 为单位。组成冷凝器的四个同心管的内径分别为 45 mm，34 mm，27 和 10 mm。

通进气泡发生器 B 的进气管末端是一个半径为 1 cm 的圆球，其最大水平圆周上有 20 个半径为 0.2 mm 的孔。或者，进气管的末端可以是能产生很多微小气泡的烧结玻璃板，从而保证了气相和液相间的良好接触。

通过仪器的气流速度大约为 40 L/h。示意图右边的瓶子是为了限制水泵抽水产生的压降至 20 cm～30 cm 水柱。为了调节适合的真空度，必须在气泡发生器与瓶子间安装一个具有半毛细管的流量计。

2.2.2 微量滴定管。

3 步骤

3.1 对于精馏浓缩葡萄汁，使用在 5.1 节"总酸度"里通过稀释样品制备得到的 40 %(m/V)溶液。在夹带器的 250 mL 烧瓶 A 中加入 50 mL 稀释溶液和 5 mL 磷酸(2.1.1)，并把烧瓶连接到夹带器中。

3.2 在气泡发生器 B 中加入 2 mL～3 mL 过氧化氢溶液，用 0.01 mol/L 氢氧化钠溶液中和。在 A 烧瓶中加入葡萄汁，用 4 cm～5 cm 的火焰直接接触烧瓶底将葡萄汁煮沸。不要把烧瓶放在金属盘子上，应该将其放在一个中间有半径大约为 30 mm 的圆盘上。这是为了防止因过热而使样品中被提取出来的物质挂在烧瓶壁上。

保持沸腾并通入空气(或氮气)。在 15 min 内所有的二氧化硫都会被挟带出来并被氧化。用 0.01 mol/L 氢氧化钠溶液(2.1.4)滴定生成的硫酸。

滴定使用的碱溶液体积记录为 n mL。

4 计算

以"mg/kg 总糖量"(50 mL(3.1)中制备的待测液)为单位的二氧化硫总量的计算式为：

$$(1600\times n)/P$$

其中，P 为总糖量的浓度分数(m/m)。

5 结果表示

二氧化硫总量以"mg/kg 总糖量"表示。

6 方法特性

重复性限(r)

50 mL 测试样品＜50 mg/L；$r=1\times250/P$ mg/kg 总糖量

再现性限(R)

50 mL 测试样品＜50 mg/L；$R=9\times250/P$ mg/kg 总糖量

色　度

(Oeno 419A-2011)

1　方法原理

把精馏浓缩葡萄汁稀释至 25 %(m/m)(25°糖度)后，于 425 nm 波长下测试 1 cm 光程的吸光度。

2　仪器

2.1　测试范围 300 nm～700 nm 的紫外分光光度计。

2.2　光路为 1 cm 的玻璃吸收池。

2.3　孔径为 0.45 μm 的滤膜器。

3　实验过程

3.1　样品准备

使用在 pH 章节 ，3.1 部分制备的 25 %(m/m)(25°糖度)的葡萄汁溶液，使用孔径为 0.45 μm的滤膜过滤。

3.2　吸光度测定

利用水为空白溶液，加在 1 cm 的吸收池里，425 nm 下空白调零。

在 1 cm 的吸收池里，在 425 nm 下测定 3.1 部分制备的 25 %(m/m)(25°糖度)的葡萄汁溶液的吸光度。

4　结果表示

425 nm 波长下测定的 25 %(m/m)(25°糖度)的葡萄汁溶液的吸光度应保留两位小数。

重复性限(r)

r=0.01 AU(25°糖度)

方法 OIV-MA-F1-09 **方法类型 I**

总阳离子

(Oeno 419B/2012)

1 原理

测试样品用强酸性阳离子交换剂处理。阳离子全部与 H^+ 离子发生交换。阳离子总量通过流出液的总酸度和测试样品的酸度的差值来确定。

2 仪器

2.1 内径 10 mm～11 mm，长度约 300 mm 的玻璃管，和玻璃管粗细适合的排水塞。

2.2 精确到 0.1 单位的 pH 计。

2.3 电极：

——玻璃电极，保存于蒸馏水中；

——甘汞/饱和氯化钾参比电极，保存于饱和氯化钾溶液中；

——也可使用组合电极，保存于蒸馏水中。

3 试剂

3.1 H^+ 型强酸性离子交换树脂，在水中浸泡过夜预溶胀。

3.2 氢氧化钠溶液，0.1 mol/L。

3.3 pH 试纸。

3.4 使用的水为实验室纯净水，20℃下电导率低于 2 μS/cm，例如 EN ISO 3696 Ⅱ级水。

4 步骤

pH 计必须根据 OIV MA AS313-15 方法进行校准。

4.1 样品的准备

使用稀释至 40%(m/V)的蒸馏浓缩葡萄汁溶液。向 200 g 蒸馏浓缩葡萄汁中加水至 500 mL，搅拌均匀。

4.2 蒸馏浓缩葡萄汁的总酸度

在 20 ℃下用 0.1 mol/L 的氢氧化钠溶液滴定 100 mL 蒸馏浓缩葡萄汁至 pH 到 7。缓慢滴加碱性溶液，同时不停摇匀溶液。用 n_1 mL 表示消耗的 0.1 mol/L NaOH 溶液的体积。

4.3 离子交换柱的制备

将 10 mL 浸泡软化的 H^+ 型离子交换树脂倒入玻璃管内。用蒸馏水冲洗玻璃管，使用 pH 试纸测定流出液的 pH，直到所有酸性物质被去除。

4.4 阳离子交换

使 100 mL(4.1 所述的)蒸馏浓缩葡萄汁以每秒 1 滴的速度流过交换柱。收集流出液至烧杯中。在 20 ℃下用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液滴定流出液的酸度(包括清洗液)至 pH 为

7。缓慢滴加碱性溶液，同时摇匀溶液。用 n_2 表示消耗的 0.1 mol/L NaOH 溶液的体积。

5 结果表述

阳离子总量用 mg/kg 葡萄糖作单位，精确到小数点后 1 位。

5.1 计算

——蒸馏浓缩葡萄汁的总酸度(mg/kg)：

——$A=2.5\ n_1$

——流出液酸度(mg/kg 蒸馏浓缩葡萄汁)：

$E=2.5\ n_2$

——阳离子总量(mg/kg 总糖)：

$$[(n_2-n_1)/(P)]\times 250$$

式中，P 为总糖的百分浓度(m/m)

5.2 重复性限

$r=0.3$

方法 OIV-MA-F1-10　　　　**方法类型　Ⅳ**

电热原子吸收光谱法测定铅含量

（Oeno 419B/2012）

在制备用于铅含量检测的葡萄中的糖样品（浓缩葡萄汁和 MCR 蒸馏浓缩葡萄汁）的步骤中详细介绍了重金属。仪器和检测软件根据测试实验室有所不同。本方法只给出基本的校正和测量准则，以供参考。

1　警告

安全措施-操作者在使用酸的时候必须注意保护眼睛和手。酸类物质的取用必须在通风橱中进行。

2　范围

该方法具体描述了使用电热原子吸收光谱（ETAAS）检测蒸馏浓缩葡萄汁中铅的含量，测定范围为 10 μg/kg～200 μg/kg。

3　引用标准

ISO 3696　分析实验室用水　规格和检测方法

4　原理

在 ETAAS 方法中，样品注入温度达 2 800℃的石墨炉中。随着程序升温，样品基质干燥并发生热分解和裂解。大多数元素在 ETAAS 中样品峰高度与其浓度成正比。当然，在大多数情况下，峰面积和浓度成正比更合理。

5　试剂与溶液

除非有其他说明，使用的试剂均为经认证无铅的分析纯试剂。

5.1　去离子超纯水，电阻在 18 MΩ · cm 以上，符合 ISO 3696 标准。

5.2　60%以上浓硝酸（普通纯度级别）。

5.3　磷酸二氢铵（$NH_4H_2PO_4$）。

5.4　基体改进剂：6%的 $NH_4H_2PO_4$ 溶液。称取 3 g $NH_4H_2PO_4$ 于 50 mL 容量瓶中，完全溶解后加去矿物质水至刻度线。

5.5　六水合硝酸镁（$Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$）。

5.6　0.5%浓度硝酸镁溶液（冷藏保存）。

将 0.5 g 硝酸镁置于 100 mL 容量瓶中，溶解后加水至刻度线。将配制好的溶液冷藏，有效期为 15 d～20 d。

5.7　认证的铅储备液（1 000 mg/L）。

5.8　10 mg/L 浓度的铅离子溶液。

移取 1 mL 储备液(5.7)与 10 mL 硝酸(5.2)于 100 mL 容量瓶中,加超纯水(5.1)至刻度线。

5.9 100 μ g/L 浓度的铅离子溶液:将 1 mL 铅离子溶液(5.8)与 10 mL 硝酸(5.2)混合于 100 mL 容量瓶中,加水(5.1)至刻度线。

5.10 聚乙二醇辛基苯基醚 Triton X-100[1%(*V*/*V*)]。

5.11 空白检测:10%硝酸。

校正准备

校正溶液的数量取决于精度要求,至少需要 5 瓶标准溶液。实验结果精度可以通过测试质控样来确定。.

需要强调的是,校正曲线的线性通常都有局限性的。

标准溶液的校正一般通过扣除空白的吸收。用测得的吸光度和分析物的浓度并作出校正曲线和求出校准函数。

根据仪器的不同型号,有可能可以通过自动进样器将从 100 μg/L 溶液中抽取一定量的溶液分别配成 0 μg/L～100 μg/L 浓度的标准溶液(例如,0 μg/L、10 μg/L、25 μg/L、50 μg/L 和 100 μg/L)。也有仪器需要单独配制不同浓度的标准溶液。

注:当测试样品中铅浓度超过 100 μg/L 时需要更小的取样量。

6 仪器与设备

6.1 原子吸收光谱:配备电热喷雾器、使用制造商推荐的电流值的铅空心阴极灯、背景噪声自动校正装置和电脑读入系统或高速图形记录器。电热原子吸收光谱使用时需要进行背景噪音校正。最小可接受技术规格由氘确定。如果背景噪音强度较高,最好用塞曼效应背噪校正。为了提高分析物的信噪比,推荐使用石墨炉作为热解平台。

注:可以在波长 217.0 nm 进行铅的检测。这一波长下检测的灵敏性比 283.3 nm 要高 2 倍。但是,由于噪音和干涉效应也相对严重,有必要使用塞曼效应背噪校正系统。

6.2 能精确到 0.1 mg 的精密天平。

6.3 A 级带刻度吸量管:0.5 mL、1 mL、5 mL。

6.4 A 级容量瓶:50 mL 和 100 mL。

注:要与样品接触的仪器需在 10%的硝酸(5.2)中浸泡超过 12 h,然后用去离子水(5.1)多次冲洗干净。

7 取样

在 50 mL 容量瓶中加入 10 g 样品(精确至 0.1 mg)、5 mL 硝酸和 0.5 mL 聚乙二醇辛基苯基醚[1%(*V*/*V*)]。摇匀后,用去离子水定容至 50 mL,摇匀。

8 步骤

根据仪器生产商的说明,设定仪器参数和调节电热喷雾器,以获得最佳的背景噪音校正效果。按照同样的方式校准采样器。根据生产商的推荐,根据分析的元素和样品体积,确定电热喷雾器的最佳参数范围,以获得最理想的测量范围。将仪器基线调零,通过执行程序升温程序空烧石墨原子化器确认原子化系统的零点稳定。石墨炉温度可以设定如下:

表 1

阶段	温度/℃	校正时间/s	升温（斜坡）/（℃/s）	气体类型	气体流速/（L/min）	读数
1	130	15	10	氩气	0.2	否
2	350	5	25	氩气	0.2	否
3	500	5	50	氩气	0.2	否
4	750	10	100	氩气	0.2	否
5	1900	3	0	氩气	停止	是
6	2500	3	0	氩气	0.2	否
7	100	10	0	氩气	0.2	否

如果使用自动进样器，注入预设好体积的溶液。加入一定体积的基体改进剂，按仪器相应程度的增加顺序原子化空白溶液（5.11）、标准溶液和待测样品溶液。如果测试样品的峰高（或峰面积）比标准溶液中最高浓度的样品要强，则需稀释样品以获得较低浓度。

外标法

以下采样程序作为外标法测定样品（μL）中铅含量的参考：

表 2

项目	空白测试	样品	标准 1 10 μg/L	标准 2 25 μg/L	标准 3 50 μg/L	标准 4 100 μg/L
空白（10%HNO_3）	5.0					
稀释剂（10%HNO）			4.5	3.7	2.5	0
样品		5.0				
储备液（100 μg/L）Pb			0.5	1.3	2.5	5.0
6%$NH_4H_2PO_4$	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
0.5%$Mg(NO_3)_2$	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
总体积	11.0	11.0	11.0	11.0	11.0	11.0

每个溶液至少原子化两次，如果两次结果的重现性符合实验室的质量控制系统，则计算读数平均值。如有必要，可以尝试将基线调零。

标准加入法

只要校正曲线在吸光率范围内呈线性，可以用标准加入法减少基准和样品间的光谱干扰。

将相同体积的测试样品置于三个容器（例如，自动取样杯）中。加入少量标准溶液至其中两个容器中，分别使容器中液体的浓度为原始样品的两倍到三倍高，加入同样质量的水到第三个容器中，小心地将溶液搅拌均匀。测试三个混合溶液的吸光度，并以加入浓度为 X 轴，吸光度为 Y 轴绘出曲线。用同样的方法测定空白溶液中分析物的浓度作为空白。

以下采样程序作为标准加入法测定样品（μL）中铅含量的参考：

表 3

项目	空白测试	样品	标准加入 125 μg/L	标准加入 250 μg/L
空白(HNO_3 10%)	5.0			
稀释剂(HNO,10%)	2.5	2.5	1.2	0
样品		5.0	5.0	5.0
储备液 (Pb 100 μg/L)			1.3	2.5
$NH_4H_2PO_4$ 6 %	1.0	1.0	1.0	1.0
$Mg(NO_3)_2$ 0.5%	2.0	2.0	2.0	2.0
总体积	10.5	10.5	10.5	10.5

9 计算

仪器软件绘制出标准曲线图(吸光度对铅离子 μg/L 浓度的函数)。软件算出样品的铅离子浓度,如果在样品制备和测试过程中有稀释,注意换算。

10 精度参数

对于铅浓度低于 150 μg/kg:

重复性限 r=15 μg/kg

再现性限 R=25 μg/kg

参 考 文 献

[1] Laboratoire SCL33. Déter mination du plomb dans le vin par atomic absorption spectrometry(four-graphite). Manuel d'instructions,2010.

[2] Laboratoire SCL33. Détermination du plomb dans les aliments solides par atomic absorption spectrometry (four-graphite). Manuel d'instructions,2010.

[3] Rodriguez Garcia J. C. Desarrollo de metodologías para la deter minación demetales en miel mediante ETAAS y estudio quimiométrico de su empleo como bioindicador. Universidad de Santiago de Compostela, Facultad de Ciencias,Campus de Lugo,2006.

方法 OIV-MA-F1-11　　　　**方法类型Ⅳ**

电感耦合等离子体质谱法测定铅含量

（Oeno 419B/2012）

蒸馏浓缩葡萄汁中铅的含量测定可以应用方法 OIV/OENO344/2010（ICP-MS 用于多种元素分析）进行，将方法进行修正，在第 5（样品制备）后加入以下内容：

样品制备

本方法亦可用于蒸馏浓缩葡萄汁的铅测定。为此，先要对样品进行矿化处理，一般推荐将样品在密闭容器中进行微波消解，给出如下处理步骤作为参考：

将 1 g 葡萄汁、2 mL 硝酸（3.4）和 8 mL 水（3.1）加入微波消解罐，并将消解罐按照以下条件进行消解：

步骤	斜坡	温度/℃	保持时间/min
1	20 min	200	20

当样品已经消解完成，将其转移到 50 mL 塑料管（4.6）中，用水（3.1）稀释至 30 g 并摇匀。

Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis

ISBN 978-7-5066-7831-5

9 787506 678315 >

策划编辑：孙海军

责任编辑：曹锐金

装帧设计：武守友

定价：160.00元