

国外食品安全 化学分析方法验证指南

岳振峰 主编

 中国质检出版社
中国标准出版社

国外食品安全 化学分析方法验证指南

岳振峰 主编

中国标准出版社

北京

图书在版编目(CIP)数据

国外食品安全化学分析方法验证指南 / 岳振峰主编.
—北京: 中国标准出版社, 2015. 4
ISBN 978-7-5066-7858-2

I. ①国… II. ①岳… III. ①食品分析—分析方法—指南
IV. ①TS207.3-62

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2015) 第 054111 号

中国标准出版社出版发行

北京市朝阳区和平里西街甲 2 号 (100029)

北京市西城区三里河北街 16 号 (100045)

网址: www.spc.net.cn

总编室: (010) 68533533 发行中心: (010) 51780238

读者服务部: (010) 68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

各地新华书店经销

*

开本 787×1092 1/16 印张 29.75 字数 662 千字

2015 年 4 月第一版 2015 年 4 月第一次印刷

*

定价 78.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 68510107

《国外食品安全化学分析方法验证指南》

编委会

主 编 岳振峰

副主编 杨振宇 梁 均 朱 坚

编写人员 (按姓氏笔画排序)

丁 涛 万志刚 王宏菊 邓晓军

叶 刚 华红慧 陈 波 肖陈贵

肖 锋 吴凤琪 吴 斌 汤志旭

张建莹 张 辉 张 毅 金 虹

易冰清 林 峰 赵凤娟 罗 耀

郭 平 倪昕路 康海宁 涂小珂

梁通雯 蒋沁婷 颜 治

前 言

生物性和化学性危害是引起食品安全问题的主要原因，已成为国际关注的热点和引起国际食品贸易纷争的焦点。食品化学分析方法作为食品安全分析方法体系的重要组成部分，由于具有准确、可靠等特点和优势而在食品安全分析领域广泛应用。一方面，食品安全分析方法的准确性和可靠性是食品安全分析工作本身的要求；另一方面，随着《食品安全法》的实施以及政府、企业和消费者对食品安全分析工作的了解，特别是媒体对食品安全问题的频频曝光，食品安全分析方法的准确性和可靠性越来越受到关注。本书旨在为我国正在蓬勃发展的数千家食品安全检测机构提供国外关于方法验证的先进指南和具体做法，为第三方实验室认可机构和实验室监管机构实施实验室认可和资质认定提供理论和实践依据。

本书结合作者多年来在食品安全检测领域的实践经验，对国际组织及欧洲、美国、日本等发达国家和地区以及区域组织等关于食品安全化学及放射性检测方法的验证和确认准则和指南文件进行了筛选和编译。全书共分两篇，包括食品安全分析方法（化学）验证指南和食品安全分析方法（放射性）验证指南。食品安全分析方法（化学）验证指南收集和编译了国际分析化学家协会、国际食品法典委员会、国际理论和应用化学联合会、欧盟、欧洲化学协会、北欧食品分析委员会、美国、日本、澳大利亚等关于化学方法的验证指南文件；食品安全分析方法（放射性）验证指南收集和编译了国际标准化组织和美国关于放射性分析方法的验证指南文件。

本书编译者多为国内食品安全检测机构的权威专家，长期工作在食品安全检测一线，熟悉标准方法的制修订和方法确认与验证工作。本书对于国外生物学分析方法验证和确认指南文件的选择突出权威性和实用性，并考虑读者人群的广泛性，行文充分遵循汉语表达习惯，避免晦涩难懂的直译，努力将本书编译为既尊重原文含义又符合中文阅读习惯的实用性强和专业权威的指导食品安全检测机构化学方法验证的参考性指南。

本书的编译得到国家质量监督检验检疫总局科技计划项目“食品安全分析方法性能评价体系研究”（2013IK197）以及公益性行业科研专项“双打”研究专项计划项目《“双打”中急需的出入境检验检疫技术方法研究》（2012104020）项目经费资助。

本书主要适用于从事食品安全分析、医学分析的各类检测机构的检测人员和管理人员，也可作为食品分析与食品安全检测专业的教材和参考书。

由于时间仓促和水平有限，本书中恐有不当和错误之处，恳请广大读者批评指正。

编者

2015年2月

目 录

第一篇 食品安全分析方法（化学）验证指南

如何满足 ISO 17025 方法验证的要求（国际分析化学家协会，AOAC）	2
AOAC 分析方法性能验证的协同研究程序指南	14
膳食补充物与植物性药物的化学方法的单一实验室 AOAC 验证指南	34
AOAC 标准方法性能指标指南	60
关于使用质谱（MS）鉴别、确证和测定残留物的指南 （国际食品法典委员会，CAC）	94
CAC 解决分析结果争议的指南	99
单一实验室分析方法确认一致性指南（国际理论和应用化学联合会）	102
分析测量中回收率信息应用一致性指南（国际理论和应用化学联合会）	119
食品和饲料中农药残留分析的方法确认和质量控制程序（欧盟）	131
欧盟委员会决议 2002/657/EC——执行欧盟委员会指令 96/23/EC 关于分析 方法性能和结果解释的委员会决议	166
关于 2002/657/ EC 决议的执行指南（欧盟）	193
欧盟关于食品中铅、镉、汞、无机锡、3-氯丙二醇和苯并（a）芘的抽样方 法及分析规定	200
兽药残留筛选方法验证指南初始验证和实验室间移植（欧盟）	208
分析方法的适用性——关于方法验证和相关专题的实验室指南 （欧洲化学协会）	225
北欧食品分析委员会方法同行验证（实验室间验证）手册	247
北欧国家方法验证委员会替代专有化学方法验证指南	258
美国食品药品监督管理局（FDA）工业指南 Q2（R1）分析方法的验证：正文与 方法论	269
美国环境保护署（EPA）方法灵活性与水分析方法批准指南	279
日本食品中农药残留等检测方法评价指南	345



日本药品分析方法验证程序	352
农用及兽用化学品有效成分分析方法验证指南（澳大利亚）	357
澳大利亚辅助药物的起始物料分析程序验证	362
澳大利亚国家测试机构协会（NATA）化学测试方法的确认和验证指南	368

第二篇 食品安全分析方法（放射性）验证指南

ISO 关于致电离辐射测量用特性限值测定的指南摘录	378
美国 MARLAP 关于方法验证的指南摘录	404
美国 EPA 关于放射性方法验证指南摘录	457
偏倚试验规程	463

第一篇

食品安全分析方法（化学）验证指南

如何满足 ISO 17025 方法验证的要求 (国际分析化学家协会, AOAC)

1 目的

本指南的目的是为了根据分析方法性能特点来定义完成方法验证所需的活动。

ISO 17025: 2005 中 5.4.2 说明: “在介绍测试或校准之前, 实验室需要确认它能够正确地执行标准方法。如果标准方法发生改变, 那么需要重新确认。”

该指南中, 确认等同于证实。

验证实验室能否准确执行标准方法需要实验室提供客观证据, 证明检测方法的性能参数与方法实际检测的基质相符。通常来讲, 关键的要求是准确度和精密度 (普遍采用重复性和再现性), 这反映在测量方法的不确定度中。客观证据是来自真实试验数据的准确度和精密度。

2 范围和方法

该指南的范围包括 AOAC 的正式方法, EPA、FDA、FSIS 的正式方法和 NADA 方法以及在微生物、食品及药学实验室使用的方法。

不同的行业可能在表述分析方法和分析参数的种类上有不同的术语, 该指南尽量采用 AOAC 普遍使用的术语。

不同的行业可能有特殊的要求, 特殊的联邦机构或客户对于方法验证可能有很特殊的标准。这种情况下客户或机构的要求将超出该指南的范围。

分析检验方法依照基于目的得出的方法种类进行分类。实验室能够识别正在核实的试验方法种类并找出需要核实的参数。

当证实一种方法时, 实验室就需要证明该方法能够达到验证研究中制定的某些特定性能指标和参数。这种验证研究必须包括所有相关的性能指标。主要的性能指标如线性关系将不会随实验室的不同而不同, 并且不需要进行证实。其他参数, 例如重复性, 对操作该方法的实验室是特定的, 需要进行证实。因此, 需要进行证实的性能指标是方法验证中的一部分性能指标。

该指南按照化学检测方法和微生物方法分别规定。

3 化学方法

3.1 化学方法的种类

化学分析方法能实现许多不同的目的，包括低浓度分析物的定量分析和物质鉴定。由于各种方法的存在，不同的分析方法采用不同的证实方法是合理的。为便于讨论，在下面列出了根据不同的测试目的分成的六种分析方法种类。对于每个种类的分析方法，只有相关的性能指标需要证实。该指南中的方法列举了所有需要被证实的性能参数并解释了为什么需要被证实。

六类化学分析方法是：

- (1) 确认分析方法，鉴别可能是什么物质或者确定检测出目标分析物。
- (2) 低浓度分析物的定量方法。
- (3) 极限分析方法，确定一个分析物是否高于或低于指定的低浓度，这个指定浓度接近于定量限。
- (4) 高浓度分析物的定量方法。
- (5) 限量分析方法，确定一个分析物是否高于或低于指定的高浓度，这个指定浓度远高于定量限。
- (6) 定性分析方法。

因为方法证实活动是方法验证活动的一部分，所以需要首先提交方法验证所必需的性能指标。表 1 列出了六类主要的化学测试方法需要验证的性能指标。如果一个性能指标不需要验证，那么也不用证实它。在表 1 中“是”表示这个性能指标必须验证，“否”表示这个性能指标无需验证。

表 1 六类主要化学分析方法所需验证性能指标

性能指标	方法验证中的性能指标					
	确认分析方法 1	低浓度分析物的定量方法 2	低浓度分析物的极限分析方法 3	高浓度分析物的定量方法 4	高浓度分析物的限量分析方法 5	定性分析方法 6
准确度	否	是	否	是	是	否
精密度	否	是	否	是	是	否
特异性	是	是	是	是	是	是
检出限	否	是	是	是/否	否	否
定量限	否	是	否	是/否	否	否
耐用性	否	是	否	是	否	否
线性/范围	否	是	否	是	否	否

六类化学分析方法的验证要求（表 2~表 5）：表 2~表 5 中，“是”表示这个性能

指标必须验证，“否”表示这个性能特征无需验证。

表 2 类别 1: 确认分析方法 (鉴别可能是什么物质或者确定检测出目标分析物)

性能指标	是否需要证实	证实活动	证实原因
特异性	否——试验样品与标准方法一致, 而且仪器的差别影响不大	不适用	如果样品含有相同的基质, 那么基于基本原理的特异性就不会有太大的影响。基本原理, 例如化学反应, 如 Ag 和 Cl 产生沉淀
	是——如果试验样品与标准方法不同	与验证要求相同	
	是——如果仪器差别影响特异性	证实活动只需解决实验室样品或仪器上的区别	仪器的差别能够影响其特异性

表 3 类别 2: 低浓度分析物的定量方法

性能指标	是否需要证实	验证活动	证实原因
准确度	是	如果验证方法的浓度范围比较窄 (小于一个数量级), 在一个浓度水平分析一个参考/标准/加标样品。否则, 在高、中、低每一浓度水平分析一个参考/标准/加标样品来证明方法的准确度	在一个比较窄的范围内, 准确度和精密度不会变化, 因此, 测定一个浓度的准确度就足够了。在一个比较大的范围内, 准确度和精密度会发生变化, 因此, 必须在不同浓度水平进行证实
精密度	是	执行一次重复性试验。如果这个方法包含的浓度范围大于一个数量级, 那么重复性试验必须包括低浓度、中浓度和高浓度	在一个比较窄的范围内, 准确度和精密度不会变化, 因此, 测定一个浓度的精密度就足够了。在一个比较大的范围内, 准确度和精密度会发生变化, 因此, 必须在不同浓度水平进行证实。分析人员之间的中间精密度被用于评判分析人员是否受过培训, 能否准确地执行该方法
特异性	否/是	见通用要求中的特异性	见通用要求中的特异性
检出限	是	在检出限浓度附近执行样品分析	LOD 很可能因基质或仪器不同而异
定量限	是	在定量限浓度附近执行样品分析	LOQ 很可能因基质或仪器不同而异

表 4 类别 3：低浓度分析物的极限分析方法

性能指标	是否需要证实	证实活动	证实原因
检出限	是	在检出限浓度附近执行样品分析	LOD 很可能因基质或仪器不同而异
定量限	是	在定量限浓度附近执行样品分析	LOQ 很可能因基质或仪器不同而异
特异性	否/是	见通用要求中的特异性	见通用要求中的特异性

表 5 类别 4：高浓度分析物的定量方法；类别 5：高浓度分析物的限量分析方法

性能指标	是否需要证实	证实活动	证实原因
准确度	是	如果是一个限量分析方法或者验证方法的浓度范围比较窄（小于一个数量级），在一个浓度水平分析一个参考/标准/加标样品。否则，在高、中、低每一个不同的浓度水平分析一个参考/标准/加标样品来证明方法的准确度	在一个比较窄的范围内，准确度和精密度不会变化，因此，测定一个浓度的准确度就足够了。在一个比较大的范围内，准确度和精密度会发生变化，因此，必须在不同浓度水平进行证实
精密度	是	执行一次重复性测试。如果方法的浓度范围大于一个数量级，那么重复性试验必须包括低浓度、中浓度和高浓度	在一个比较窄的范围内，准确度和精密度不会变化，因此，测定一个浓度的精密度就足够了。在一个比较大的范围内，准确度和精密度会发生变化，因此，必须在不同浓度水平进行证实。分析人员之间的中间精密度被用于评判分析人员是否受过培训，能否准确地执行该方法
特异性	否/是	见通用要求中的特异性	见通用要求中的特异性

定性分析用于根据样品对试验的反应鉴定一个特定元素或化合物。定性分析最重要的性能指标是在其他组分存在的情况下可靠地识别出被分析物。这被称为“特异性”。

方法验证包括确定与其他已知组分发生的任何交叉反应。无交叉反应证明该方法是特异的。如果样品与该方法的测试样品完全相同，不需要证实特异性。如果有任何基质成分对于实验室样品来说是独一无二的，那么该实验室需要证明该成分对特异性没有影响。

定性分析方法的精密度一般表示为假阳性/假阴性率，且需要在多个浓度水平进行测定。可以通过分析大量阴性样品和阳性添加样品来证实实验室正确操作定性方法的能力。例如，对于每个不同的样品基质，在三个浓度水平，重复分析两份样品。建议这三个浓度水平为空白（没有被分析物）、低浓度水平（接近方法分析范围的低端浓度）和高浓度水平（接近方法分析范围的高端浓度）。可以采用标准加入法获得正确的

浓度水平。所得假阳性/假阴性率与已验证的方法中的声明相符就表明该实验室有能力执行该方法。

3.2 在化学分析方法验证中采用测量不确定度

对被测变量的测量不确定度 (MU) 的评估可以作为精密度的一个指标, 测量不确定度是可以用来证实实验室能够有效地执行分析方法的手段之一。

当没有有效的验证数据时, MU 可能就成了唯一的确保方法有效的参数。

一个实验室的性能比较 (偏差和精密) 可以与协同研究的性能作对比, 协同研究采用了 ISO 技术规范 ISO/TS 21748 《测量不确定度评估中重复性、再现性和准确度评估的使用指南》。

其他指南, 包括使用 ISO/TS 21748 建议方法的实例, 将在 AOAC 网站公布。

4 微生物方法

验证所需要的性能指标和三类主要的微生物检验方法的证实列于表 6。

表 6 微生物试验方法: 验证研究中的性能指标

性能指标	鉴定	定量	定性 (P/A)	证实 (适用时)
相对准确度	是	是	否	否
基质影响	否	是	是	是
精密度	否	是	否	是
选择性	否	是	是	否
特异性	是	是	是	否
包容性	是	是	是	否
排他性	是	是	是	否
假阳性	否	是	是	否
假阴性	否	是	是	否
检出限	否	是	是	否
定量限	否	是	否	否
耐用性	是	是	是	否
线性/范围	否	是	否	否

4.1 证实指南

微生物方法的证实也需要处理下面的参数:

(1) 实验室持续达到方法性能指标的能力。

(2) 分析人员的表现: 你的分析人员能否以同等程度的精确度和精密度来执行该方法?

4.2 微生物的测量不确定度

测量不确定度是与测量结果关联的一个参数,用于表征合理赋予被测量的值的离散性,即结果的方差或标准偏差或分析结果的置信度。要使计算测量不确定度更可信,至少要有30个观察值来达到该方法总体精密度的95%的置信限。因此,期望每个性能指标都基于30个观察值并非是不合理的。测量不确定度通常需要所有对变异性的贡献率大于10%的因素的重复性和再现性,使用平方和的平方根来计算。例如, $U_c = \sqrt{RSD_1^2 + RSD_2^2}$ 中有两个关键因素。在最简单的测定中,当把所有影响结果可靠性的因素都考虑在内,则相对MU或相对 $U_c = 2 \times RSD_R$ (再现性的相对标准偏差)。

就这一点而言,验证数据可以对应地用于方法证实,因为验证研究给 RSD_R (再现性的相对标准偏差)和 RSD_r (重复性的相对标准偏差)提供了参考值。

例如一个平板计数的验证研究获得了下面的数据:

RSD_r : 7.7% (0.077) (同一分析人员内部);

RSD_R : 18.2% (0.182) (分析人员之间)。

计算合成不确定度:

平方和 = $(0.077)^2 + (0.182)^2 = 0.0371$

合成相对不确定度 = $\sqrt{0.0371} = 0.193 = 19.3\%$

扩展相对不确定度的计算(使用扩展系数 $k=2$ 或达到95%的置信度) = $2 \times 19.3\% = 38.6\%$

这一方法的测量不确定度是38.6%,可作为室内方法证实测定测量不确定度的参考值。

计算测量不确定度的试验数据能从以下方面获得:

- 能力验证(PT)计划;
- 参考样品;
- 加标回收率;
- 方法证实的重复性数据;
- 平行样品测试数据。

有关评估微生物方法中测量不确定度的其他信息可以在美国实验室认证协会的指南文件“G-108—评估微生物计数方法不确定度的指南”中找到。

4.3 微生物试验中分析人员的表现

只有受过充分的执行分析方法培训的分析人员才能参与方法证实。分析人员的培训和资格认证需要有书面的程序和完成记录。经过培训的分析人员需要接受持续的评估。

评估工具包括:

- (1) 盲样测试(已知阳性和已知阴性的样品)。
- (2) 观察现场试验。
- (3) 笔试,例如质量控制实践、计算、结果解释、质量方针和程序知识。
- (4) 平行计数精密度的日常检查:

①对于每一类型的基质，所有的分析人员完成大于或等于 15 个~30 个样品的平行计数，记录为 D_1 和 D_2 。

②将数据转化为对数 (lg)。

③确定范围的绝对值及其每对数据 ($D_1 - D_2$) 的 lg 值。

④计算每组数据的平均 \bar{R} ：

$$\bar{R} = \frac{\sum R_{lk}}{n}$$

⑤分析人员现在可以进行每天的平行测试。

⑥99%的精密标准： $R \leq 3.27\bar{R}$ 。

⑦将结果绘制在控制图上监控变化。

参考 SMEWW. 1998. 20th ed. (9-11)。

(5) 能力验证：

①实验室内部能力验证

内部控制“核查样品”或“加标样品”被用作：

- 实验室内每一个分析人员的分析性能和能力的持续评估；
- 证明外部能力验证计划未覆盖测试能力的手段；
- 检查培训需求。

②实验室间能力验证

来自外部的能力验证组织，例如 AOAC、FDA。

- 提供评估不同实验室执行分析方法的精密度和相对准确度的方法。
- 提供实验室间结果相对准确度和精密度的估计值。
- 可用于实验室间能力验证，但其本身设计并不是用于评估分析人员个体的能力。

5 通用要求（化学和微生物方法）

实验室必须有一个能够持续符合 ISO/IEC 17025：2005 标准的管理体系。

分析人员必须经过充分培训：

- 分析人员必须具有相应的知识、经验和培训经历来执行该程序。
- 分析人员必须能胜任实验室规定的职能：

——操作仪器；

——完成指定分析任务；

——理解分析方法。

- 培训必须有文件记录。

证实工作必须有计划、被批准，并做记录，且将最终报告保存在文件中，以证明该实验室能够充分地执行该方法。

证实文件应该包含：

- 描述需要证实的程序；
- 详细说明需要评估的分析性能指标；
- 建立用来确定程序是否适合执行的验收标准；

- 判断与参考方法存在的偏差。

对于所有类别方法的特异性，如果样品与已被验证方法的样品相同，且该方法基于基本原理，那么就不需要证实。如果样品含有相同的基质，基于基本原理的特异性将不会受到影响。基本原理是化学反应，例如 Ag 和 Cl 会发生沉淀反应。对于某些方法，特异性可能还受使用仪器的影响。在这种情况下，实验室应该评估仪器的不同是否影响特异性，如果有影响的话，需要证实特异性，例如，不同的分辨率和（或）检测系统的电感耦合等离子体发射分光光度计，可能会导致不同的干扰。

6 选择适合分析目的的方法

分析方法的评估是根据方法的性能指标进行的，例如准确度、精密度、特异性、灵敏度、检测能力和实用性。性能指标之间的平衡是方法选择的内在规律。然而，选用的任何一种方法必须满足常规功能的需求，而且必须在实验室工作人员的能力范围内。在采用为日常分析方法前，建议根据方法的有效版本进行不同程度的证实或验证。

实验室必须首先确保选择的方法适用于实验室的样品分析。如果实验室样品与已经验证方法的样品存在差异，就必须评估差异程度及其影响。差异的影响可能导致部分受到影响的性能指标需要验证或者方法需要完全验证。

7 已验证方法的偶然改变/偏差

由于许多原因，实验室可能不能精确地执行已验证方法。在这种情况下，可能需要方法证实来解决这些差异。许多不可预见的情况在表 7 中列出。如果表 7 中的情形确实发生了就必须进行等效研究，可能还有这个表中不包含的其他情况。

表 7 已验证方法的偶然改变

已验证方法的参数	与已验证方法的差异	所需的等效研究
a) 使用的仪器设备	a) 仪器设备过时或实验室没有，但实验室想采用现有的仪器设备	a) 需要进行设备等效衔接性试验来确定由可替代仪器设备所产生的数据与已验证方法中采用可重复方法所测定的结果相符合
b) 专用检测器	b) 实验室可能没有专用检测器，实验室打算使用现有的检测器	b) 等效研究需要对比两个监测器获得的数据，以确保这些数据与已验证方法中采用可重复方法所测定的结果相符合
c) 样品制备：偶尔在液氮中制备样品来防止被分析物损失	c) 如果实验室有生产型环境，那么可以在室温下快速处理样品	c) 衔接性试验比较这两个样品制备，来确保产生的数据与已验证方法中采用可重复方法所测定的结果相符合