

# 离子色谱法检测泡菜中亚硝酸盐含量的 校准曲线线性性能评价

张林<sup>1</sup>, 郑海峰<sup>2</sup>, 罗陶<sup>1</sup>, 张华<sup>1</sup>, 郑卫东<sup>2\*</sup>

(1. 宜宾市南溪区公共检验检测中心, 宜宾 644100; 2. 四川省产品质量监督检验检疫院, 成都 610031)

**摘要:** **目的** 评价校准曲线线性性能。**方法** 以离子色谱法检测泡菜中亚硝酸盐的校准曲线制作为实验内容, 研究线性范围、工作范围, 并进行校准曲线的质量检验。**结果** 检验方法的工作范围决定于校准曲线线性范围和样品中目标组分的含量范围; 相关系数不能全面反映校准曲线的质量; 在使用校准曲线前, 还应进行曲线是否通过原点(有要求时)和拟合误差检验; 校准曲线上各浓度点应均匀布置, 并且第一个非零浓度点最好高于定量限。**结论** 根据检测工作的实际需要, 校准曲线的工作范围应在线性范围内灵活确定, 还应进行校准曲线质量检验。

**关键词:** 泡菜; 亚硝酸盐; 离子色谱; 校准曲线; 线性性能; 质量控制

## Linear performance evaluation on calibration curve of determination of nitrite in pickles by ion chromatography

ZHANG Lin<sup>1</sup>, ZHENG Hai-Feng<sup>2</sup>, LUO Tao<sup>1</sup>, ZHANG Hua<sup>1</sup>, ZHENG Wei-Dong<sup>2\*</sup>

(1. Public Testing Centre Nanxi Yibin, Yibin 644100, China; 2. Sichuan Provincial Product Quality Supervision and Testing Institution, Chengdu 610031, China)

**ABSTRACT: Objective** To evaluate the linearity of the calibration curve. **Methods** Based on experiments for calibration curve of determination of nitrite in pickles by ion chromatography, range of linear, range of working calibration, and quality of calibration curve were investigated. **Results** The working range of the test method depended on the linear range of the calibration curve and the content range of the target component in the sample. Correlation coefficient could not reflect overall the quality of calibration curve. Before using the calibration curve, it was also necessary to check whether the curve passed through the origin (if required) and the fitting error. All concentration points on the calibration curve should be evenly distributed, and the first non-zero concentration point should preferably be higher than the limit of quantitation. **Conclusion** According to the actual needs of testing, the working range of calibration curve should be determined flexibly within the linear range. Moreover, the quality of calibration curve should be investigated.

**KEY WORDS:** pickles; nitrite; ion chromatography; calibration curve; linear performance; quality control

基金项目: 四川省科学技术厅科技支撑计划(2010SZ0142)

Fund: Supported by Sichuan Provincial Science and Technology Department Science and Technology Supporting Project (2010SZ0142)

\*通讯作者: 郑卫东, 硕士, 教授级高级工程师, 主要研究方向为食品安全研究和实验室管理。E-mail: 542663298@qq.com

\*Corresponding author: ZHENG Wei-Dong, Master, Professor, Sichuan Provincial Product Quality Supervision and Testing Institution, No.16, Xingmao Street, Long Quan-Yi District, Chengdu 610100, China. E-mail: 542663298@qq.com

## 1 引言

在化学分析中,线性(linear)的定义为:用回归的方法描述目标分析物浓度或含量与响应信号的关系,当回归曲面是一超平面,且表达式为  $y=b_0+b_1x_1+b_2x_2+\dots+b_kx_k$  时,回归称为线性的,此时  $b_i$  称为  $y$  对  $x_i$  的偏回归系数 ( $i=1,2,\dots,k$ )<sup>[1]</sup>。而校准(calibration)的定义为:使用有证标准物质或已知准确含量的参考物质,确定目标分析物浓度与响应值的关系的一组操作<sup>[1]</sup>。确认方法的线性及校准性能是化学分析中重要的一个环节,不但是结果计量溯源性的有效途径,而且其质量是影响检测结果准确度<sup>[1]</sup>的最重要因素,某些分析结果的不确定度构成中,校准成为了最大的分量<sup>[2]</sup>。几乎所有发达国家有关实验室组织和权威机构,如美国分析化学家协会(Association of Official Analytical Chemists, AOAC)<sup>[3]</sup>、美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)<sup>[4]</sup>、欧洲分析化学中心(EURACHEM)<sup>[5]</sup>、澳大利亚国家检测机构协会(National Association of Testing Authorities, NATA)<sup>[6]</sup>等,都对方法的线性及校准有明确而仔细的要求。

在我国,中国国家认证认可监督管理委员会(Certification and Accreditation Administration, CNCA)<sup>[7]</sup>和中国合格评定国家认可委员会(China National Accreditation Service for Conformity Assessment, CNAS)<sup>[8]</sup>都要求,在进行方法验证/确认时,应研究线性及校准,CNAS还在化学分析领域的应用说明<sup>[9]</sup>中给出了补充要求,同时给出了进行方法确认可参考的国外文献。部分国家标准给出了满足这些要求的详细做法<sup>[2,10-12]</sup>,包括元素分析、色谱分析和报告定性结果等分析领域,给出了在方法验证/确认及建立和实施内部质量控制体系时,线性及校准方面应采取的措施。

本文以 GB 5009.33-2016<sup>[13]</sup>中离子色谱法检测泡菜中亚硝酸盐为例,按照上述标准的相关要求和做法,分别从方法的线性范围、工作范围,校准曲线质量检验 3 个方面进行了初步研究,以期用实例说明通过多种参数考察校准曲线质量的必要性。

## 2 材料与方法

### 2.1 仪器与试剂

ICS-1100 型离子色谱仪(配电导检测器和循环再生电解抑制器)、IonPac AG19 Analytical Column(4 mm×50 mm)保护柱、IonPac AS19 Analytical Column(4 mm×250 mm)分离柱、AERS 500(4 mm)型抑制器、淋洗液在线发生装置、Chromleon 7.0 色谱工作站(美国 Thermo 公司);0.22 μm 水系过滤器(天津津腾实验设备有限公司);UPT-II-20T 型超纯水装置(四川优普超纯科技有限公司)。

实验中用到 3 种亚硝酸盐标准储备液(以 NO<sup>2-</sup>计)、3 种亚硝酸盐标准储备液均为国家有证标准物质:编号 GSB 04-2839-2011,批号 188049-2,质量浓度 1000 μg/mL,扩展不确定度 0.7%( $k=2$ )(国家有色金属及电子材料分析测试中心(北京)检验认证有限公司);编号 GSB 05-1142-2000,批号 103412,标准值 100 mg/L,扩展不确定度 2%( $k=2$ )(环境保护部标准样品研究中心);编号 GBW(E)081223,证书号 H1808271/011,批号 180827,标准值 1.000 g/L,扩展不确定度 0.6%( $k=2$ ),(上海市计量测试技术研究院)。

### 2.2 试剂的配制

亚硝酸盐(NO<sup>2-</sup>)标准使用液由上述标准储备液用超纯水直接稀释配制。KOH 淋洗液由美国 Thermo 公司在线发生装置生成。

### 2.3 离子色谱测定条件

抑制电流 174 mA,流动相流速 1.0 mL/min,进样量 50 μL,柱温 35 °C,检测池温度 35 °C。梯度洗脱条件:6 mmol/L 30 min,70 mmol/L 5 min,6 mmol/L 5 min,淋洗时间 45 min。

### 2.4 校准曲线绘制

用上述 3 种标准储备液分别配制标准使用液,每条校准曲线配制 0~6.0 mg/L 的 6 个浓度点,每个浓度进样 1 次。以浓度与相应峰面积绘制校准曲线。

### 2.5 实验方法

依据 GB 5009.33-2016<sup>[13]</sup> 食品安全国家标准 食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定,其中的第一法--离子色谱法。校准曲线以保留时间定性,外标法定量。

## 3 结果与分析

### 3.1 方法的线性范围

按照方法线性范围(linear range)的定义<sup>[1,14]</sup>,设计了标准溶液浓度为(0~2.0)、(0~3.0)、(0~4.0)、(0~5.0)、(0~6.0) mg/L 共 5 个浓度范围。用仪器检测后,计算校准曲线的斜率( $b$ )、截距( $a$ )和相关系数( $r$ ),结果见表 1。

相关系数可用来衡量校准曲线的线性度<sup>[1,6,14]</sup>,AOAC 的一份指南<sup>[15]</sup>指出:较大的相关系数(如>0.99)说明校准曲线拟合度良好,而 GB/T 32467-2015<sup>[1]</sup>要求:微量分析领域校准曲线的相关系数应不小于 0.997。依据此,本研究采用后者作为评价校准曲线线性度的依据。表 1 表明:标准溶液在浓度(0~6)mg/L 范围内,5 条校准曲线的相关系数都满足要求,说明方法的线性范围较宽。考虑到实际检测时,样品中目标组分含量范围,故将方法的线性范围确定为>6 mg/L。

### 3.2 方法的工作范围

李晓惠等<sup>[16]</sup>检测得到泡菜中亚硝酸盐含量大致为(0.53~11.2) mg/kg, 而国家标准规定限量为 20 mg/kg, 邹华军等<sup>[17]</sup>检测泡菜中亚硝酸盐在发酵高峰期达到 50 mg/kg 以上。故日常检测中遇到的样品含量范围大致为(0~50) mg/kg, 多数样品的含量在(0.5~20) mg/kg 范围内。GB 5009.33-2016<sup>[13]</sup>中样品前处理程序规定取样量 5 g, 最后定容至 100 mL。样品经过前处理后被稀释了 20 倍, 处理液中的浓度变为约(0~2) mg/L, 多数情况下在(0.025~1) mg/L 范围内。国外权威机构的指南<sup>[6]</sup>要求: 校准曲线的浓度范围至少应覆盖到待测组分浓度的(0~150)%或(50~150)%。据此, 校准曲线的浓度范围可确定为(0~4) mg/L。按照有关规定, 方法的<sup>[1,6]</sup>工作范围为定量限到校准曲线的最高浓

度, 本文尚不知本方法的定量限, 故不能给出工作范围的下限。

### 3.3 校准曲线质量检验

大多数日常检测中, 只是依据校准曲线的相关系数判断其拟合质量, 这是不够的。国外权威机构的指南<sup>[6,15]</sup>都主张除相关系数外, 还应通过检验校准曲线是否通过原点(有要求时)、检验直线中每个点的拟合误差, 来评价校准曲线的质量。本研究在再现性条件下制作了 3 条校准曲线, 结果见表 2。

由于方法要求校准曲线需通过原点, 故使用相关标准<sup>[2,18]</sup>给出的  $t$  检验法, 对制作的校准曲线进行是否通过原点的检验, 结果见表 3。

表 1 6 条校准曲线的检测结果和相关系数  
Table 1 Determination results and correlation coefficients of 6 calibration curves

浓度和峰面积	STD1	STD2	STD3	STD4	STD5	STD6	$a$	$b$	$r$
(0~2)/(mg/L)	0	0.4	0.8	1.2	1.6	2	0.0062	0.1891	0.9991
峰面积/( $\mu\text{s} \cdot \text{min}$ )	0.0016	0.0893	0.1543	0.2386	0.3014	0.3869			
(0~3)/(mg/L)	0	0.6	1.2	1.8	2.4	3	-0.0023	0.1872	0.9995
峰面积/( $\mu\text{s} \cdot \text{min}$ )	0.0002	0.1033	0.2202	0.3467	0.444	0.5567			
(0~4)/(mg/L)	0	0.8	1.6	2.4	3.2	4	0.0013	0.1897	0.9995
峰面积/( $\mu\text{s} \cdot \text{min}$ )	0.0039	0.1561	0.307	0.4457	0.5991	0.7729			
(0~5)/(mg/L)	0	1	2	3	4	5	-0.0156	0.1867	0.9994
峰面积/( $\mu\text{s} \cdot \text{min}$ )	0.0005	0.1653	0.3461	0.5338	0.7306	0.9036			
(0~6)/(mg/L)	0	1.2	2.4	3.6	4.8	6	-0.0055	0.1838	0.9998
峰面积/( $\mu\text{s} \cdot \text{min}$ )	0.0003	0.2037	0.4269	0.6576	0.9169	1.0704			

表 2 3 条校准曲线的检测结果和相关系数  
Table 2 Determination results and correlation coefficients of 3 calibration curves

编号	浓度(y)/(mg/L)	0	0.8	1.6	2.4	3.2	4.0	截距	斜率	$r^2$
1	峰面积(x)/ ( $\mu\text{s} \cdot \text{min}$ )	0.0006	0.1778	0.3380	0.5203	0.7170	0.8656	0.0041	4.5725	0.9831
2		0.0003	0.1775	0.3435	0.5360	0.6902	0.8415	-0.03538	4.7170	0.9987
3		0.0136	0.1611	0.3418	0.5351	0.6886	0.8688	-0.0120	4.6275	0.9989

表 3 校准曲线是否通过原点的检验结果  
Table 3 Testing results of whether calibration curves pass the origin

编号	校准曲线	截距 $a$	$r^2$	$\bar{x}$	$S_{xx}$	$S_y$	$a$	$f$	$t$	$t_{\alpha}(f)$
1	$Y=4.5725X+0.0041$	0.0041	0.9831	0.4365	0.5364	0.2175	0.05	10	0.026	2.23
2	$Y=4.7170X-0.003538$	-0.03538	0.9987	0.4315	0.5041	0.0603	0.05	10	0.08	2.23
3	$Y=4.6275X-0.0120$	-0.0120	0.9989	0.4348	0.5238	0.0555	0.05	10	0.3	2.23

$t$  检验法评价结果准则: 如果计算的统计量  $t \leq t_{\alpha}(f)$ , 则应接受第 I 假设, 即直线的截距  $a$  与 0 没有显著性差异, 直线通过了原点。3 条校准曲线的统计量  $t$  都小于  $t_{\alpha}(f)$ , 说明都通过了原点。

使用标准<sup>[2,18]</sup>给出的方法, 检验直线每个点的拟合误差是否合理。直线各点的拟合误差计算公式为:

$$|d_i| = y_i - (a + bx_i)$$

式中:  $d_i$ —第  $i$  个浓度点的拟合误差;

$y_i$ —第  $i$  个点的标准溶液浓度;

$a+bx$ —拟合的回归方程。

用上述公式计算各点的拟合误差, 并用  $M=d_i/s_y$  计算  $M$  值。如果  $M \leq 1.5$ , 则拟合误差可接受, 反之拟合误差过大, 应废除此点结果并重做。3 条直线的拟合误差计算及检验结果见表 4。

检验表明, 3 条直线的每个点的  $M$  均  $\leq 1.5$ , 说明其拟合误差得到了很好的控制。由此可见 3 条直线都通过了上述 2 项检验, 所制作的校准曲线可用于样品检测。

## 4 讨论

### 4.1 方法线性范围和工作范围的关系

方法的线性范围是指校准曲线的线性性能满足要求的浓度范围。本例中浓度高点达到 6.0 mg/L, 其相关系数任然良好, 但就方法而言, 很难碰到如此高浓度范围的检测, 故

不用继续扩大浓度范围, 将线性范围确定为  $>6$  mg/L 即可。相关指南规定线性范围应覆盖样品含量的(0~150)%。按此要求, 本例中方法的工作范围应为(0~3) mg/L, 但考虑在实际检测中, 样品含量可能超出此范围, 所以将工作范围确定为(0~4) mg/L。

### 4.2 关于校准曲线布点的问题

有的规范要求应在工作范围内至少布 5 个点<sup>[3]</sup>, 有的要求布 5~10 个点<sup>[19]</sup>。本研究选择布 6 个点。一般情况下, 都要求均匀布点。也有人认为在低浓度范围内, 亦即定量限以下测不准, 故应多布点。然而, 文献<sup>[19]</sup>却认为: 在计算校准曲线的斜率时, 位于上端的浓度点比一系列低浓度点更可靠, 因此不能被忽略。为此, 本研究特地有意在低浓度范围内多布点, 制作校准曲线, 用此与表 4 中第 1 条校准曲线进行拟合误差比较, 结果见表 5。

表 5 中直线 1 是没有遵循均匀布点原则, 低浓度范围内多布了 3 个点的结果, 这 3 个点的相对拟合误差远高于直线 2, 且直线 1 多数点是负误差, 不像直线 2 那样正负误差基本相等, 说明直线 1 可能存在拟合的系统误差, 导致截距过大(直线 1:  $Y=5.3533X+0.063$ , 直线 2:  $Y=4.5725X+0.0041$ )、低浓度部分误差过大, 整条直线的拟合误差过大。此结果表明: 制作校准曲线时应当遵循两项原则, 一是均匀布点, 二是零点以后的第一个低浓度点应该高于定量限。

表 4 校准曲线拟合误差的检验结果

Table 4 Testing results of fitting errors

编号	参数	0	0.8	1.6	2.4	3.2	4.0
1	$d_i$	-0.0068	-0.0171	0.0504	0.0168	-0.0826	0.0379
	M	0.03	0.08	0.23	0.08	0.38	0.17
2	$d_i$	0.0340	-0.0019	0.0151	-0.0929	-0.0203	0.0660
	M	0.56	0.03	0.25	1.5	0.34	1.1
3	$d_i$	-0.0509	0.0665	0.0303	-0.0642	0.0255	-0.0084
	M	0.92	1.2	0.55	1.2	0.46	0.15

表 5 校准曲线不同布点方法的拟合误差比较

Table 5 Comparison of fitting errors among different concentration distribution

标液浓度/(mg/L)	直线 1					直线 2				
	0.01	0.05	0.1	3.0	4.0	0.8	1.6	2.4	3.2	4.0
信号/( $\mu\text{s} \cdot \text{min}$ )	0.0004	0.0069	0.0115	0.5144	0.7365	0.1778	0.3380	0.5203	0.7170	0.8656
拟合估计/(mg/L)	0.0624	0.0972	0.1219	2.814	4.003	0.8171	1.5496	2.3832	3.2826	3.9621
拟合误差/(mg/L)	-0.0524	-0.0472	-0.0219	0.1860	-0.003	-0.0171	0.0504	0.0168	-0.0826	0.0379
相对误差/%	-524.4	-94.5	-21.9	6.2	-0.08	-2.1	3.1	0.7	-2.6	0.9

### 4.3 关于校准曲线的质量问题

相关系数只能表明目标组分浓度与相应信号之间具有良好的线性相关,但不能充分说明校准曲线质量就能满足要求,必须进一步对其截距与零是否有显著性差异(要求通过原点时)和各个点的拟合误差进行检验。拟合误差的大小关系到截距和斜率的合理性,也影响到剩余误差的大小。

## 5 结论

根据检测工作的实际需要,校准曲线的工作范围应在线性范围内灵活确定,不能简单地视校准曲线的线性范围等同于工作范围。为确保校准曲线的质量,各浓度点应均匀布置且第一个非零浓度点高于定量限,在关注校准曲线相关系数的同时,还应检验各浓度点的拟合误差。当要求校准曲线通过原点时,应检验校准曲线是否过原点。

### 参考文献

- [1] GB/T 32467-2015 化学分析方法验证确认和内部质量控制 术语及定义[S].  
GB/T 32467-2015 Chemical analysis method validation and internal quality control-Terms and definitions [S].
- [2] GB/T 35657-2017 化学分析方法验证确认和内部质量控制实施指南 基于样品消解的金属组分分析 附录 I[S].  
GB/T 35657-2017 Guidelines for the validation and validation of chemical analytical methods and the implementation of internal quality control-Chemical analysis method validation and internal quality control implementation guidelines based on sample digestion of metal component analysis Appendix I [S].
- [3] AOAC. Single laboratory validation acceptance criteria (Chemistry methods) [Z].
- [4] Food and Drug Administration. Ora Laboratory Procedure No.: ORA-LAB.5.4.5. Methods. Method Verification and validation. 2012 [Z].
- [5] EURACHEM Guide The fitness for purpose of analytical methods A laboratory guide to method validation and related topics [Z].
- [6] National Association of Testing Authorities, Australia. Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods. 2012 [Z].
- [7] RB/T 214-2017 检验检测机构资质认定能力评价 检验检测机构通用要求[S].  
RB/T 214-2017 Evaluation of qualification recognition ability of inspection and testing institutions-General requirements for inspection and testing institutions [S].
- [8] CNAS-CL 01:2018 检测和校准实验室能力认可准则[S].  
CNAS-CL 01:2018 Accreditation criteria for testing and calibration laboratory capabilities [S].
- [9] CNAS-CL 01-A002:2018 检测和校准实验室能力认可准则在化学检测领域的应用说明[S].  
CNAS-CL 01-A002:2018 Application of the accreditation criteria for testing and calibration laboratories in the field of chemical testing [S].
- [10] GB/T 32465-2015 化学分析方法验证确认和内部质量控制要求[S].  
GB/T 32465-2015 Validation of chemical analytical methods and internal quality control requirements [S].
- [11] GB/T 35655-2017 化学分析方法验证确认和内部质量控制实施指南 色谱分析[S].  
GB/T 35655-2017 Guidelines for the validation and validation of chemical analytical methods and the implementation of internal quality control-Chromatographic analysis [S].
- [12] GB/T 35656-2017 化学分析方法验证确认和内部质量控制实施指南 报告定性结果的方法[S].  
GB/T 35656-2017 Guidelines for the validation and validation of chemical analytical methods and the implementation of internal quality control-Methods for reporting qualitative results [S].
- [13] GB 5009.33-2016 食品安全国家标准 食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定[S].  
GB 5009.33-2016 National food safety standard-Determination of nitrite and nitrate in food [S].
- [14] Irish National Accreditation Board. Guide to method validation for quantitative analysis in chemical testing laboratories.2012 [S].
- [15] AOACI. AOAC guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. 2002 [S].
- [16] 李晓慧, 马超, 彭莉. 泡菜中硝酸盐与亚硝酸盐的含量分析[J]. 中国果菜, 2016, 36(4): 27-29.  
Li XH, Ma C, Peng L. Analysis of several main nitrate and nitrite content in pickles [J]. China Fruit Veget, 2016, 36(4): 27-29.
- [17] 邹华军, 李鸣, 杨雪峰, 等. 传统泡菜与乳酸菌发酵泡菜亚硝酸盐和硝酸盐含量动态变化分析[J]. 现代预防医学, 2013, 40(20): 3732-3734, 3739.  
Zou HJ, Li M, Yang XF, et al. Dynamic analysis of the change in nitrite and nitrate contents in traditional pickles and lactic acid bacteria-fermented pickles [J]. Mod Prev Med, 2013, 40(20): 3732-3734, 3739.
- [18] GB 17378.2-2007 海洋监测规范 数据处理与分析质量控制[S].  
GB 17378.2-2007 Specification for marine monitoring-Data processing and analysis quality control [S].
- [19] Validation: an invisible component of measurement. Horwitz on validation [Z].

(责任编辑: 武英华)

### 作者简介



张林, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品检验检测质量控制。  
E-mail: 491341609@qq.com



郑卫东, 硕士, 教授级高级工程师, 主要研究方向为食品安全研究和实验室管理。  
E-mail: 542663298@qq.com