

控制图法评定食品中菌落总数检测的不确定度

金萍, 结莉, 金晓红, 丁洪流*

(苏州市产品质量监督检验院, 苏州 215104)

摘要: **目的** 运用控制图法对食品中菌落总数项目进行不确定度评定。**方法** 依据 GB 4789.2-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验菌落总数测定》检测方法,在保证精密度的条件下进行菌落总数的测定,基于控制图法对积累的数据进行统计和分析。**结果** 通过建立测量值 X 与 $EWMA$ 的叠加图及 MR 图,表明测量结果仅受随机效应的影响,结果符合正态性和独立性假设,计算得到扩展不确定度结果 $U=0.10 \lg CFU/mL$ 。**结论** 控制图法评定菌落总数不确定度将不确定度评估与实验室内部质量控制工作相结合,简便且易于操作,适合实验室应用。

关键词: 菌落总数; 控制图法; 不确定度评定

Uncertainty evaluation for determination of total number of colonies in food by control chart method

JIN Ping, JIE Li, JIN Xiao-Hong, DING Hong-Liu*

(Suzhou Product Quality Supervision and Inspection Institute, Suzhou 215104, China)

ABSTRACT: Objective To evaluate the uncertainty for the determination of total number of bacterial colonies in food by using the control chart method. **Methods** According to GB 4789.2-2016 *National food safety standard-Food microbiology test total bacterial count determination*, the total number of colonies was determined under the condition of ensuring precision, and the accumulated data was statistically analyzed based on the control chart method. **Results** By establishing the superposition map and MR map of the measured value X and $EWMA$, it was showed that the measurement result was only affected by the random effect, and the result conformed to the assumption of normality and independence. The calculated extended uncertainty result was $0.10 \lg CFU/mL$. **Conclusion** The evaluation of total colony uncertainty by control chart method combines the evaluation of uncertainty with the quality control work in the laboratory, which is simple and easy to operate and suitable for the application in the laboratory.

KEY WORDS: total number of colonies; control charting method; uncertainty evaluation

1 引言

微生物测量相对于化学测量而言有其特殊性: 1)样本

代表性差; 2)样品中微生物分布不均; 3)测试结果无法溯源; 4)不复检等。因此引入“测量不确定度”加强测量准确度降低实验误差是十分有必要的。目前, 绝大多数的理化检验

基金项目: 江苏省重点研发计划-社会发展(BE2016664)、江苏省质监系统“352”人才项目

Fund: Supported by Jiangsu Province Key Research and Development Plan-Social Development (BE2016664) and Jiangsu Province Quality Supervision System “352” Talent Project

*通讯作者: 丁洪流, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测分析。E-mail: bobbie_1127@sina.com

*Corresponding author: DING Hong-Liu, Senior Engineer, Suzhou Product Quality Supervision and Inspection Institute, Building B, No.1368, Wuzhong Avenue, Wuzhong District, Suzhou City, 215104, China. E-mail: bobbie_1127@sina.com

实验室采用测量不确定度表示指南^[1](Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement, GUM)法进行不确定度的评估,这种方法评定过程中需要建立相应的模型,准确识别不确定因子分量,操作步骤较为繁琐,需要实验员具备丰富的经验,同时评定过程中容易遗漏或者重叠分量,难以掌握^[2-5]。本文按照 GB/T 27420-2018《合格评定生物样本测量不确定度评定与表示应用指南》^[6]中 Top-down 技术中控制图法进行不确定度的评定,控制图法将实验室日常的质量控制工作与不确定度评定有机的结合起来,大大的减少了工作量,具有很强的实用性^[7-12]。

本文依据 GB 4789.2-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》^[13]检测方法,对质控样品在期间精密度条件下按时间顺序进行菌落总数的测定,获得一系列的质控数据,对系列数据进行正态性和独立性检验分析,在确认测量系统及过程均受控的情况下,通过计算期间精密度标准差作为实验室获得的标准合成不确定度,并进一步获得扩展不确定度(U)。为其他实验室进行相关不确定评定提供参考。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

UHT 牛奶(苏州华润万家超市)。

平板计数琼脂(北京陆桥技术股份有限公司);大肠埃希氏菌标准菌株(ATCC8099,广东环凯微生物科技有限公司)。

2.2 仪器与设备

KB115 生化培养箱(德国 Binder 公司); SX-700 高压蒸汽灭菌器(美国 Tomy Seiko 公司); TYJ-2A 菌落计数器(上海华光仪器仪表厂)。

2.3 实验方法

2.3.1 质控样品制备

菌悬液制备:取大肠埃希氏菌标准菌株进行活化、传代培养,灭菌生理盐水洗下菌苔,作为初步菌悬液;用细菌比浊管将初步菌悬液进行 10 倍倍比稀释,获得所需菌液浓度。

质控样品制备:将上述制备获得的菌悬液添加至 1 L 的 UHT 牛奶中;混匀,使其菌含量在 $1 \times 10^3 \sim 9 \times 10^3$ CFU/mL,分装至 50 mL 灭菌离心管中,4 °C 保存,即为检测用质控样品;每日取一管进行检测。

2.3.2 数据采集

在期间精密度条件下,按照 GB 4789.2-2016 规定的方法对质控样品进行菌落总数的测定,每工作日测定 1 次,连续测定 1 个月,记录测定结果。

2.3.3 评定程序

评定步骤:1)用格拉布斯法(*Grubbs*)(具体过程参照

GB/T 4833-2008^[14])剔除 1 个月质控数据中的离群值,2)然后计算统计量 A^{2*} ,并根据 A^{2*} 判断质控数据的正态性和独立性,如 A^{2*} 均 < 1 则符合正态性和独立性的假设,3)其次建立测量值和指数加权移动平均值(exponential weighted moving average, EWMA)的叠加图和移动极差(moving range, MR)图,如所有结果均未超过两图的控制限,则说明测量系统的偏移及测量过程均受控,4)此时期期间精密度的(S_R')作为实验室获得的标准合成不确定度(u_c),并获得扩展不确定度(U)。

3 结果与分析

3.1 质控样品菌落总数测定结果

菌落总数检测结果以 Y 表示,由于食品中菌落总数的检测结果值发散性较大,故取其检测结果的对数值进行计算,对数值以 X 进行表示。将连续一个月的测定结果进行整理,数据见表 1。表 1 中 Y 为菌落总数检测结果数值。由表 1 可得 X 的 $X_{最大}=3.57$, $X_{最小}=3.38$; 组内平均值 $\bar{X}=3.49$, 标准偏差 $s=0.06$ 。

表 1 质控样品菌落总数测定结果

Table 1 Total bacterial colony count of quality control sample

序号	检测日期	结果 Y CFU/mL	$X(=\lg Y)$ lg CFU/mL	X 升序
1	2018-08-20	3200	3.51	3.38
2	2018-08-21	2800	3.45	3.40
3	2018-08-22	2800	3.45	3.41
4	2018-08-23	3000	3.48	3.45
5	2018-08-24	3700	3.57	3.45
6	2018-08-27	2500	3.40	3.46
7	2018-08-28	2600	3.41	3.48
8	2018-08-29	3300	3.52	3.48
9	2018-08-30	3200	3.51	3.48
10	2018-08-31	3600	3.56	3.51
11	2018-09-03	2900	3.46	3.51
12	2018-09-04	3000	3.48	3.51
13	2018-09-05	3000	3.48	3.52
14	2018-09-06	3200	3.51	3.53
15	2018-09-07	3500	3.54	3.54
16	2018-09-10	2400	3.38	3.54
17	2018-09-11	3400	3.53	3.56
18	2018-09-12	3700	3.57	3.56
19	2018-09-13	3500	3.54	3.57
20	2018-09-14	3600	3.56	3.57

3.2 离群值检验

通过格拉布斯(Grubbs)检验法进行离群值检验, 将 20 个测定值从小到大排列成 $X_1, X_2, X_3, \dots, X_{20}$, 设 X_1 或 X_{20} 为被检验的可疑值(即观察列中的最小值或最大值)。

计算统计量 G 值:

若可疑值出现在首项, 则: $G_1 = \frac{\bar{X} - X_1}{s}$; 若可疑值出

现在末项, 则: $G_{20} = \frac{X_{20} - \bar{X}}{s}$, 计算得 $G_1=1.83, G_{20}=1.33$ 。取 0.05, 查表(GB/T 4883-2008 表 A.2)^[14], 在 95%置信区间下 $G_{0.05,20}=2.56$ 。 $G_{20} < G_1 < G_{0.05,20}$, 表明 20 组数据均无离群值。

3.3 Anderson-Darling(A-D)正态性和独立性检验

通过 A^{2*} 值的统计判断, 明确符合正态性和独立性的假设, 期间精密度(S_R')作为实验室获得的标准合成不确定度(u_c), 乘以包含因子 2, 即可视为实验室获得的扩展不确定度 U 。具体计算步骤如下:

将所有测量结果 X_i 转变成相应的标准变量值 w_i , $w_i = \frac{X_i - \bar{X}}{s}$, 式中 i 为大小顺序(i 为从小到大的排列顺序), 进

行正态性检测时, s 为测量结果 X 的标准差; 当进行独立性检验时, s 为移动极差(MR)的标准差(S_R'), $S_R' = \overline{MR} / 1.128$, 其中 \overline{MR} 为 MR 的均值, $\overline{MR} = \sum_{i=1}^n MR_i / (n-1)$, 其中 MR_i 为后一个测量结果减去前一个测量结果的绝对值(按时间测量顺序排列), 第一个测量结果无 MR 值。

通过查表(GB/T 27407-2010 附录 B.2 p_i 数值表), 或者在 Excel 软件的函数公式 NORMSDIST(w_i)=NORMDIST(x, mean, std dev, cumulative)语句, 将 w_i 值转换成正态概率值 p_i 。

计算 A-D 统计量 A_i, A^2, A^{2*} :

$$A_i = (2 \times i - 1) [\ln p_i + \ln(1 - p_{n+1-i})]$$

$$A^2 = - \frac{\sum_{i=1}^n A_i}{n} - n$$

$$A^{2*} = A^2 \left(1 + \frac{0.75}{n} + \frac{2.25}{n^2} \right)$$

表 2 显示结果可计算获得: 计算获得正态性 $A^{2*}=0.37 < 1$, 独立性 $A^{2*}=0.74 < 1$, 接受表中数据 X 的正态性和独立性假设。

表 2 测定结果的 A_i 、EWMA 及 MR 值
Table 2 A_i , EWMA and MR values of the results were measured

时间 顺序	X(lgY) lg CFU/mL	X 升序	MR	正态性			独立性		
				W_i	p_i	A_i	W_i	p_i	A_i
1	3.51	3.38	/	-2.014	0.0220	-6.1668	-2.196	0.0141	-7.0967
2	3.45	3.40	0.06	-1.701	0.0445	-16.3873	-1.841	0.0328	-18.7478
3	3.45	3.41	0.00	-1.400	0.0808	-22.5516	-1.501	0.0667	-25.4424
4	3.48	3.45	0.03	-0.831	0.2029	-25.1220	-0.857	0.1958	-28.0863
5	3.57	3.45	0.09	-0.831	0.2029	-29.3475	-0.857	0.1958	-32.3874
6	3.40	3.46	0.17	-0.562	0.2871	-32.0522	-0.552	0.2905	-35.2446
7	3.41	3.48	0.02	-0.302	0.3815	-30.2964	-0.258	0.3984	-32.6692
8	3.52	3.48	0.10	-0.302	0.3815	-30.9220	-0.258	0.3984	-32.6745
9	3.51	3.48	0.01	-0.302	0.3815	-31.0023	-0.258	0.3984	-32.0532
10	3.56	3.51	0.05	0.194	0.5768	-26.7932	0.303	0.6191	-27.4486
11	3.46	3.51	0.09	0.194	0.5768	-29.6136	0.303	0.6191	-30.3379
12	3.48	3.51	0.01	0.194	0.5768	-23.7050	0.303	0.6191	-22.7164
13	3.48	3.52	0.00	0.430	0.6664	-22.1577	0.570	0.7158	-21.0631
14	3.51	3.53	0.03	0.659	0.7451	-20.9162	0.830	0.7966	-19.8584
15	3.54	3.54	0.04	0.882	0.8110	-15.8899	1.081	0.8602	-14.3171
16	3.38	3.54	0.16	0.882	0.8110	-13.5258	1.081	0.8602	-11.4210
17	3.53	3.56	0.15	1.098	0.8638	-12.3147	1.326	0.9076	-10.3894
18	3.57	3.56	0.04	1.098	0.8638	-8.0697	1.326	0.9076	-5.8112
19	3.54	3.57	0.02	1.308	0.9046	-5.3938	1.564	0.9411	-3.4801
20	3.56	3.57	0.01	1.308	0.9046	-4.7784	1.564	0.9411	-2.9197

$\bar{X}=3.49; s=0.06; \overline{MR}=0.06; S_R'=0.05$

3.4 建立测量值 X 与 EWMA 的叠加图及 MR 图

测量值图与 EWMA 的叠加图及 MR 图共同监控处于受控状态下的测量体系受随机因素的变化影响, 根据 GB/T 27407-2010^[15]规则绘制叠加图(图 1)和 MR 图(图 2)。

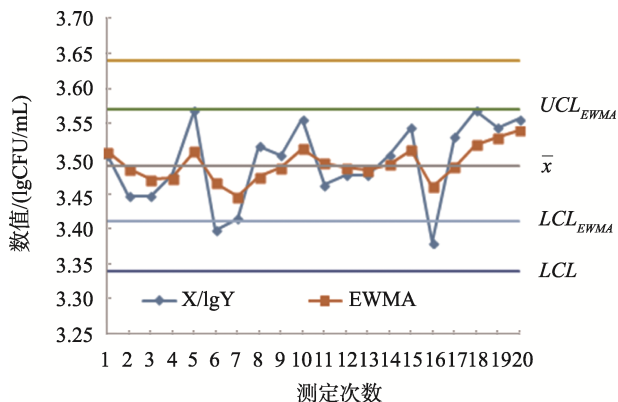


图 1 X、EWMA 叠加图

Fig.1 Overlay Diagram of X and EWMA

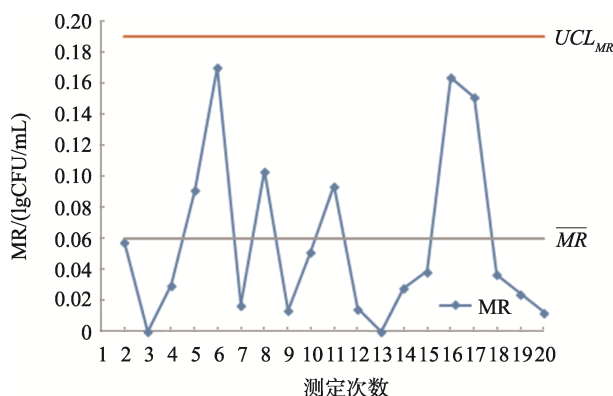


图 2 MR 图

Fig.2 Diagram of MR

a) 测量值 X 图

中心线 $\bar{X} = 3.49 \text{ lgCFU/mL}$, 上控制限 $UCL = \bar{X} + 2.66 \bar{MR} = 3.64 \text{ lgCFU/mL}$, 下控制限 $LCL = \bar{X} - 2.66 \bar{MR} = 3.34 \text{ lgCFU/mL}$ 。

b) EWMA 图

指数加权平均移动值(EWMA)计算公式:

$$EWMA_1 = X_1$$

$$EWMA_i = (1-\lambda) EWMA_{i-1} + \lambda X_i, \lambda\text{-权值, 取 } 0.4$$

中心线 $\bar{X} = 3.49 \text{ lgCFU/mL}$, 上控制限

$$UCL_{EWMA} = \bar{X} + 3S_R' \sqrt{\frac{\lambda}{2-\lambda}} = 3.57 \text{ lgCFU/mL}, \text{ 下控制限}$$

$$LCL_{EWMA} = \bar{X} - 3S_R' \sqrt{\frac{\lambda}{2-\lambda}} = 3.41 \text{ lgCFU/mL}。$$

c) MR 图

中心线 $\bar{MR} = 0.06 \text{ lgCFU/mL}$, 上控制限 $UCL_{MR} = 3.27 \times$

$\bar{MR} = 0.19 \text{ lgCFU/mL}$ 。

根据 GB/T 27411-2012^[16]失控规则, 所有的测量结果均为超出控制限, 表明测量结果仅受随机效应的影响, 说明测量结果是在偏移受控的期间精密条件下进行的, 则此时期精密度(S_R')作为实验室获得的标准合成不确定度(u_c)。

3.5 不确定度的计算

扩展不确定度 $U = k \times u_c$, 期间精密度(S_R')作为实验室获得的标准合成不确定度(u_c), 取包含因子 $k=2$, 扩展不确定度 $U = k \times u_c = 2 \times S_R' = 0.10 \text{ lgCFU/mL}$ 。

表达实例: 以第 12 次的测定结果为例, 测定结果为 3000 CFU/mL, 其对数值为 3.48, 根据所获得的不确定度, 其取值范围在 $3.48 \pm 0.10 \text{ lgCFU/mL}$ (即 3.38~3.58 lgCFU/mL), 取反对数则得平均值的取值区间为: 2399~3802 CFU/mL($k=2$)。

4 结论与讨论

目前的安全国家标准中, 菌落总数是一个定量指标, 通过测定结果与限量标准值的比较, 判定项目的合格与否, 但当测量结果与限量值相接近时, 直接判断其合格与否既不科学也有失公正, 对检验员而言也存在很大风险。在这种情况下就需要引入测量不确定。

不确定度评定中控制图法属于 A 类不确定度评定方法, 在明确符合正态性和独立性的假设时, 期间精密度(S_R')作为实验室获得的标准合成不确定度(u_c), 该方法相较于其他评定方法更为客观, 并具有统计学的严格性, 但要求有充分的重复次数, 适合于在各类检验实验室开展^[16]。

不确定度的评定在业界通常采用经典 GUM 法, 经典 GUM 法需要建立数学模型, 并对过程中各不确定度分量进行评定, 过程比较繁琐。而本次采用的控制图法基于实验室长期积累的数据, 现在的理化分析实验室在工作中已积累各个项目的众多数据, 因此, 采用控制图法评定测量不确定度比其他评定方法所得到的不确定度更客观, 操作性更强, 使用更便捷, 更有利于在化学分析实验室中广泛应用。

参考文献

[1] Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM) [Z].
 [2] 杨翠云, 周暹丽. GUM 法对食品中菌落总数测定的不确定度评定[J]. 实用预防医学, 2014, 21(4): 494-496.
 Yang CY, Zhou CL. Evaluation of uncertainty in determination of total number of colonies in food by GUM method [J]. Pract Prev Med, 2014, 21(4): 494-496.
 [3] 袁平, 吴春敏, 林仲, 等. 食品中菌落总数测定不确定度评定数学模型的建立[J]. 预防医学论坛, 2016, 22(7): 540-545.
 Yuan P, Wu CM, Ling C. Establishment of mathematical model of uncertainty evaluation for colony forming units(CFU)in foods [J]. Prev Med Trib, 2016, 22(7): 540-545.

- [4] 赵金利, 王成龙, 刘佳, 等. 液相色谱串联质谱法测定水果中甲氨基阿维菌素苯甲酸盐残留量的不确定度分析[J]. 轻工科技, 2018, 34(5): 46-49.
Zhao JL, Wang CL, Liu J, *et al.* Uncertainty analysis of determination of methaminoabectin benzoate residues in fruit by liquid chromatography series mass spectrometry [J]. Light Ind Technol, 2018, 34(5): 46-49.
- [5] 何晓玲. 食品中大肠菌群平板计数法不确定度的评定[J]. 质量技术监督研究, 2014, (4): 18-20.
He XL. Enumeration of coliforms plate counting method uncertainty [J]. Qual Tech Superv Res, 2014, (4): 18-20.
- [6] GB/T 27420-2018 合格评定 生物样本测量不确定度评定与表示应用指南[S].
GB/T 27420-2018 Guidelines for application of measurement uncertainty evaluation and presentation of conformity assessment biological samples [S].
- [7] 程刚, 赵峰, 胡炜, 等. Top-down 技术控制图法评定电感耦合等离子体质谱法测定菠菜中铜含量的不确定度[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(11): 4220-4224.
Cheng G, Zhao F, Hu W, *et al.* Uncertainty evaluation for determination of copper in spinach by inductively coupled plasma mass spectrometry based on Top-down control charting method [J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(11): 4220-4224.
- [8] 苏笑丰. 应用控制图评定原子吸收分光光度法测定水中铜的不确定度[J]. 上海预防医学, 2017, 29(4): 281-284.
Su XF. The uncertainty of the determination of copper in water by atomic absorption spectrophotometry was assessed by control chart [J]. Shanghai Prev Med, 2017, 29(4): 281-284.
- [9] 李丽, 李小佩, 王建新, 等. 移动差值控制图评估临床实验室肌钙蛋白不确定度[J]. 检验医学与临床, 2015, 12(9): 1218-1219.
Li L, Ling XP, Wang JX, *et al.* Evaluation on determination uncertainty of cTnI in clinical laboratory with mobile difference control chart [J]. Lab Med Clin, 2015, 12(9): 1218-1219.
- [10] 李泽, 白正伟, 王桂英. 利用控制图进行测试系统质量控制和不确定度评定[J]. 理化检验: 化学分册, 2017, 53(10): 1195-1199.
Li Z, Bai ZW, Wang GY. The control chart is used for quality control and uncertainty evaluation of the test system [J]. Phys Test Chem Anal B, 2017, 53(10): 1195-1199.
- [11] 柏赞刚. 环境监测 3 种不确定度评定方法的比较—以水中化学需氧量的测定为例[J]. 环境监控与预警, 2018, 10(1): 34-41.
Bai YG. Comparison of 3 uncertainty evaluation methods for environmental monitoring: Taking the determination of chemical oxygen demand in water as an example [J]. Environ Monitor Warn, 2018, 10(1): 34-41.
- [12] Hermine ZD, Fernand G, Brigitte E, *et al.* Validation, transfer and measurement uncertainty estimation of an HPLC-UV method for the quantification of artemisinin in hydro alcoholic extracts of *Artemisia annua* L [J]. J Pharmaceut Biomed, 2011, 50(1): 7-15.
- [13] GB 4789.2-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定[S].
GB 4789.2-2016 National food safety standard-Food microbiological examination-Aerobic plate count [S].
- [14] GB/T 4883-2008 数据的统计处理和解释正态样本离群值的判断和处理[S].
GB/T 4883-2008 Statistical processing of data and interpretation of normal sample outlier value judgment and processing [S].
- [15] GB/T 27407-2010 实验室质量控制 利用统计质量保证和控制图技术评价分析测量系统的性能[S].
GB/T 27407-2010 Laboratory quality control-Uses statistical quality assurance and control chart techniques to evaluate and analyze the performance of the measurement system [S].
- [16] GB/T 27411-2012 检测实验室中常用不确定度评定方法与表示[S].
GB/T 27411-2012 Evaluation methods and expressions of uncertainty are commonly used in testing laboratories [S].

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



金萍, 工程师, 主要研究方向为食源性微生物检测、成分鉴定等。
E-mail: 846493521@qq.com



丁洪流, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测分析。
E-mail: bobbie_1127@sina.com