

运用统计学方法对能力验证定性样品的 均匀性和稳定性进行评价

顾文佳*, 张懿翔, 许超, 葛宇, 曲勤凤

(上海市质量监督检验技术研究院, 上海 200233)

摘要: **目的** 使用统计方法客观评价定性能力验证样品的均匀性和稳定性。**方法** 使用荧光 PCR 法分别检测每组样品中牛、羊、鸭源性成分, 对阳性结果的 C_t 值进行单因素方差分析, 评定样品的均匀性。采用线性回归方法, 评定样品的稳定性。**结果** $F < F_{0.05}(9, 10) = 3.02$ 且 $P > 0.05$, 各组样品间无显著性差异, 样品是均匀的。线性回归分析结果直线斜率无统计学差异, 即样品在检测期间保持稳定。**结论** 运用统计学方法对动物成分能力验证样品的均匀性和稳定性进行定量分析, 能够更科学地对能力验证样品的均匀性和稳定性进行统计学推断。

关键词: 能力验证; 均匀性和稳定性; 动物成分

Evaluation of the homogeneity and stability of qualitative samples in the proficiency test with statistical methods

GU Wen-Jia*, ZHANG Yi-Xiang, XU Chao, GE Yu, QU Qin-Feng

(Shanghai Institute of Quality Inspection and Technical Research, Shanghai 200233 China)

ABSTRACT: Objective To objectively evaluate the homogeneity and stability of qualitative samples by statistical methods. **Methods** The beef, lamb and duck-derived components were detected separately by real-time PCR. The values in positive results were analyzed by one-way ANOVA method to evaluating the homogeneity of samples. The stability of samples was evaluated by the linear regression method. **Results** $F < F_{0.05}(9, 10) = 3.02$ and $P > 0.05$. There was no significant difference between groups and the samples were homogenous. There was no statistical difference in the linear slope of the linear regression analysis, which indicated that the sample remained stable during the test. **Conclusion** The homogeneity and stability of the samples used in proficiency tests of animal-derived materials detection can be deduced more precisely through statistical methods.

KEY WORDS: proficiency testing; homogeneity and stability; animal-derived ingredients

1 引言

根据《上海市检验检测条例》《检验检测机构资质认

定管理办法》相关要求, 上海市质量技术监督局委托上海市质量监督检验技术研究院开展和实施 2018 年上海市检验检测机构肉制品中牛羊鸭源性成分能力验证工作。本次

基金项目: 上海市质量技术监督局 2018 年检验检测机构能力验证项目(JLXH-2018-01)

Fund: Supported by Shanghai Municipal Bureau of Quality and Technical Supervision (JLXH-2018-01)

*通讯作者: 顾文佳, 高级工程师, 主要研究方向为食品微生物和转基因检测。E-mail: guwj@sqi.org.cn

*Corresponding author: GU Wen-Jia, Senior Engineer, Shanghai Institute of Quality Inspection and Technical Research, No. 381, Cangwu Road, Shanghai 200233, China. E-mail: guwj@sqi.org.cn

能力验证向各参加实验室发放 3 份肉糜样品, 实验室采用 PCR 技术, 对每份样品中的牛、羊、鸭源性成分分别进行检测, 提供定性分析结果, 最终 3 份样品的检测结果(阳性/阴性)中任一结果不满意, 即为结果不满意^[1]。

能力验证过程中样品的均匀性和稳定性对能力验证的结果起到至关重要的作用和影响, 因此在能力验证活动实施之前, 制样者需要对样品的均匀性和稳定性进行充分的检测, 提供足够的证据来证明所制样品具备一定的均匀性和稳定性, 满足能力验证活动期间检测和补测的样品需求, 以及相应储存运输条件下样品的持续稳定性^[2-4]。

然而在能力验证活动的相关指南中, 并未对定性结果的样品提出样品均匀性和稳定性的评价方法和要求^[3]。转基因大豆^[5]、动物成分检测^[1,6]和致病菌检测^[7]的能力验证中采用了检测结果与指定值一致的评价方式, 这样的分析数据仅是定性评价, 无法对能力验证样品的均匀性和稳定性进行统计学推断。

本研究借鉴生物标准物质均匀性和稳定性检测方法^[8,9], 运用统计学方法对动物成分能力验证样品的均匀性和稳定性进行定量分析, 以期更科学地对能力验证样品的均匀性和稳定性进行统计学推断。

2 材料与方法

2.1 仪器设备、主要材料试剂

新鲜猪肉、牛肉、羊肉和鸭肉购自市场。

DP304 动物组织基因组 DNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]; RR390 PCR 预混液 Premix Ex Taq™ [宝日医生物技术(北京)有限公司]; 探针引物合成(上海英潍捷基公司)。

7500 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司); DS-11 超微量分光光度计(美国 DeNovix 公司); 5415R 离心机(德国 Eppendorf 公司)。

2.2 样品制备

本次能力验证采用新鲜猪肉、牛肉、羊肉和鸭肉作为试样, 基质为猪肉, 分别掺入一种或多种牛、羊、鸭肉成分, 含量为 0.1%~5%(质量比), 详见表 1。肉糜混匀后分装至 5 mL 冻存管, 每管约 4 g, 每组 100 份样品。在-20 °C 保存。随机挑选 3 组样品, 每组一管, 向参加实验室发样^[1]。

表 1 能力验证样品配方
Table 1 Content of proficiency test samples

	牛/%	羊/%	鸭/%
第一组	5	1	0
第二组	1	1	1
第三组	0	0.1	0
第四组	0	0	1

2.3 样品验证

2.3.1 样品均匀性和稳定性检验的依据

参照 CNAS-GL003: 2018《能力验证样品均匀性和稳定性评价指南》的规定, 使用荧光 PCR 方法分别检测每组样品中牛、羊、鸭源性成分, 通过检测 Ct 值, 并进行统计学分析, 评价样品的均匀性和稳定性^[3,8,9]。

2.3.2 样品均匀性检验的检测方法

在 4 组样品中每组抽取 10 份样品, 每份分别取样 50 mg 测试 2 次, 按照 DNA 提取试剂盒使用说明提取 DNA, 使用 SN/T 2051-2008(2012)《食品、化妆品和饲料中牛羊猪源性成分检测方法 实时 PCR 法》^[10]、SN/T 2727-2010《饲料中禽源性成分检测方法 实时荧光 PCR 方法》^[11]分别检测牛、羊、鸭源性成分。所有测试由同一人在同一实验室、同批次试剂、使用同一设备、同一方法进行。

2.3.3 样品均匀性的统计学方法

将各组阳性结果 Ct 值进行单因素方差分析。统计软件为 SPSS 22.0。

抽取 i 个样品, 每个样品测试 j 次, $\bar{x}_i$ 每个样品测试平均值, $\bar{\bar{x}}$ 样品测试的总平均值, N 测试总次数, f 自由度。

样品间平方和: $SS_1 = \sum_{i=1}^m n_i (\bar{x} - \bar{\bar{x}})^2$ 均方: $MS_1 = \frac{SS_1}{f_2}$

样品内平方和: $SS_2 = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_i} (x_{ij} - \bar{x}_i)^2$ 均方: $MS_2 = \frac{SS_2}{f_2}$

统计量: $F = \frac{MS_1}{MS_2}$

2.3.4 样品均匀性检验的评价原则

若各组检测结果与预期添加一致, 且经统计, 各组 $F <$ 自由度为(n_1, n_2)及给定显著性水平(通常 $\alpha=0.05$)临界值 $F_{\alpha}(n_1, n_2)$ 且 $P>0.05$, 则表明样品组内和组间无显著性差异, 样品是均匀的^[3,8,9]。

2.3.5 样品稳定性检验的检测方法

储存稳定性^[1]: 样品制备后储存于-20 °C, 样品分别于 0、15、30、60、100 d 再检测, 每个时间点每组抽取 4 份样品, 每份分别取样 50 mg 测试 2 次, 使用荧光 PCR 方法分别检测牛、羊、鸭源性成分, 其中牛、羊源性成分增加 12S RNA 作为内参基因, 通过检测 ΔCt 值进行统计分析^[12]。

运输稳定性: 考虑到夏天运输途中温度可能会上升, 每组随机抽取样品分别在 25 °C 条件下放置 3 d, 检测方法同上。

2.3.6 样品稳定性的统计学方法

将检测阳性结果 Ct 值或 ΔCt 值(Y)与各个时间点(X)拟合直线, 进行线性回归分析。 B_0, β_1 为回归系数。

$Y = \beta_0 + \beta_1 X$

2.3.7 样品稳定性检验的评价原则

对回归系数 β_1 采用 t -检验进行统计推断, 判断样本的

稳定性: 若 $|t| < t_{n-2}^{0.95}$, 且 $P>0.05$, 则表明斜率不显著, 没有观察到不稳定性。

3 结果与分析

3.1 样品均匀性检测结果

此次制备的能力验证样品, 4 组中各随机抽取 10 个样品, 分别检测牛、羊、鸭源性成分, 通过检测 Ct 值判定样品结果, 各组检测结果与预期添加一致^[1]。对 4 组样品中 7 个阳性结果的 Ct 值应用单因素方差分析检测样品的均匀性, 计算得各组的 F 值均小于 $F_{0.05}(9,10)=3.02$, 且 P 值均大于 0.05, 说明各组样品的差异没有统计学意义, 即样品

是均匀的。详见表 2。

3.2 样品稳定性检测结果

本次能力验证的样品经定期存放后取样检测, 前后 2 次检测结果一致即判定样品稳定。经检验, 从 0~100 d 中选取 5 个时间点, 同时, 测试样品在 25 °C 条件下放置 3 d 后检测。使用其中 7 个阳性指标的 Ct 值或 ΔCt 值与各个时间点拟合直线, 进行线性回归分析。其中 $n=4$, 取置信概率 0.95, 查 t 分布表得 $t_{0.95}^2=4.303$, 经计算, $|t| < t_{n-2}^{0.95}$, 且 $P>0.05$ 。表明样品在-20 °C 条件下储存和 25 °C 时运输不会对结果产生影响, 样品是稳定的。结果说明时间变化、温度变化前后的样品是稳定的(表 3)。

表 2 各组均匀性检测结果($n=10$)
Table 2 Results of homogeneity tests($n=10$).

分组及 指标	样品 Ct 值(均数±标准差)										F	P
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
第一组 牛成分	30.32±0.01	31.35±1.41	32.11±0.76	31.05±0.12	31.39±2.10	30.26±0.15	30.76±0.08	30.2±0.33	31.74±1.10	30.77±0.77	1.239	0.369
第一组 羊成分	27.91±0.09	28.7±0.34	29.97±0.21	28.83±0.31	29.28±1.31	28.35±0.22	28.96±0.12	28.48±0.11	28.3±0.13	29.07±1.66	1.515	0.263
第二组 牛成分	27.52±0.41	28.66±0.00	28.73±0.46	29.22±0.00	28.39±0.16	28.48±0.48	28.75±0.15	28.28±0.07	28.69±0.01	28.76±1.07	1.408	0.300
第二组 羊成分	27.13±0.23	28.04±1.35	27.17±0.23	27.83±0.01	26.94±0.09	26.89±0.24	26.85±0.24	26.34±0	26.47±0.12	26.95±0.43	1.912	0.163
第二组 鸭成分	22.95±0.05	22.69±0.02	24.87±3.69	24.24±0.26	23.63±0.00	23.86±1.52	25.68±1.00	24.13±0.39	24.25±0	24.51±0.3	2.12	0.128
第三组 羊成分	32.02±0.20	31.62±0.07	32.28±0.29	31.84±0.02	31.89±0.01	32.39±0.37	32.47±0.15	32.14±1.03	32.01±0.01	32.01±0.08	0.607	0.766
第四组 鸭成分	26.76±0.21	28.16±0.14	25.89±0.00	24.94±0.08	24.93±0.00	25.88±0.10	25.22±0.00	25.44±0.06	25.09±0.18	26.97±10.27	2.049	0.139

表 3 各组稳定性检测结果
Table 3 Results of stability tests.

分组及指标	β_1	SD	$s(\beta_1)$	t	P
第一组牛成分	0.057	0.030	0.194	1.916	0.058
第一组羊成分	-0.042	0.030	-0.142	-1.387	0.169
第二组牛成分	-0.056	0.039	-0.146	-1.418	0.159
第二组羊成分	-0.015	0.020	-0.075	-0.733	0.465
第二组鸭成分	0.053	0.110	0.058	0.484	0.630
第三组羊成分	-0.050	0.026	-0.193	-1.909	0.059
第四组鸭成分	0.061	0.090	0.081	0.683	0.497

4 结论与讨论

本研究尝试使用统计学方法定量评价能力验证样品

的均匀性和稳定性, 并做出统计推断^[12-15]。通过定性结果检测判断样品的均匀性和稳定性, 会因为随机取样而无法获得样品整体的情况, 无法做出统计推断。如果样品基质分布不够均匀、或者目标值接近检出限都有可能造成误判, 导致能力验证结果出现假阴性。

本研究参照标准物质的均匀性和稳定性检测方法^[3,8,9], 引入单因素方差检测样本的均匀性, 线性回归方法检测样本的稳定性。在均匀性的统计分析中可以看出, 虽然各组数据的 F 均小于 $F_{0.05}(9,10)=3.02$ 且 $P>0.05$, 表明样品组内和组间无显著性差异, 样品是均匀的。但是第 3 组羊源性成分均匀性检验 F 值仅为 0.607, 即样品组内误差大于组间误差。出现的原因一是由于添加值偏小, 目标成分接近方法检出限, 导致检测结果之间误差较大; 二是因为样品的取样量偏小导致检测结果重复性差^[16,17]。这种情况下容易导致能力验证结果出现假阴性。在今后的工作中, 制样

者应充分考虑使用统计方法检测样品均匀性的必要性。

在稳定性的检测过程中, 因为不是同一时间操作, DNA 的提取效率、PCR 的扩增效率不同都会对结果 C_t 值产生影响, 从而影响稳定性的统计分析^[4,8]。本研究借鉴了肉制品定量检测的方法, 使用 12S RNA 作为内参基因, 将检测外源目标基因与内参基因 C_t 值做差得到的 ΔC_t 值进行统计分析^[12], 尽量将人为操作误差降低。

参考文献

- [1] 顾文佳, 许超, 陆壹, 等. 上海市肉制品中动物源性成分检测能力验证研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(7): 1987–1993
Gu WJ, Xu C, Lu Y, *et al.* Study on the detection capability verification of animal-derived components in meat products in Shanghai [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(7): 1987–1993.
- [2] 马捷, 关淑君, 茅祖兴. 能力验证及其结果处理与评价[M]. 北京: 中国质检出版社, 2016.
Ma J, Guan SJ, Mao ZX. Results analysis and assessment for proficiency tests [M]. Beijing: China Zhijian Publishing House, 2016.
- [3] CNAS-GL003: 2018 能力验证样品均匀性和稳定性评价指南[S]
CNAS-GL003: 2018 Guidance on evaluating the homogeneity and stability of samples used for proficiency testing [S].
- [4] 周云龙. 转基因生物标准物质研制与应用[M]. 北京: 中国质检出版社, 2014.
Zhou YL. Development and application of transgenic reference material [M]. Beijing: China Zhijian Publishing House, 2014.
- [5] 张明, 马树才, 王冬妍, 等. 大豆粉中转基因成分检测能力验证研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(6): 1915–1920.
Zhang M, Ma SC, Wang DY, *et al.* Analysis on proficiency test for detecting genetically modified component in soybeans flour [J]. J Food Saf Qual, 2013, 4(6): 1915–1920.
- [6] 张明, 王冬妍, 杨文奇, 等. 牛羊肉中猪源性成分检测能力验证研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(5): 1605–1610.
Zhang M, Wang DY, Yang WQ, *et al.* Analysis on proficiency test of identification of porcine-derived materials in beef and mutton [J]. J Food Saf Qual, 2013, 4(5): 1605–1610.
- [7] 张莉萍, 罗建波, 李月欢, 等. 化妆品微生物检验能力验证样品制备及性能测试[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, (9): 1363–1365.
Zhang LP, Luo JB, Li YH, *et al.* Preparation technology and the properties of proficiency testing sample for microorganism detection in cosmetics [J]. Chin J Health Lab Technol, 2015, (9): 1363–1365.
- [8] CNAS-GL017: 2018 标准物质 标准样品定值的一般原则和统计方法[S]
CNAS-GL017: 2018 Reference materials-General and statistical principles for certification [S].
- [9] JJF 1343-2012 标准物质定值的通用原则及统计学原理[S]
JJF 1343-2012 General and statistical principals for characterizations of reference materials [S]
- [10] SN/T 2051-2008(2012) 食品、化妆品和饲料中牛羊猪源性成分检测方法 实时 PCR 法[S]
SN/T 2051-2008(2012) Determination of bovine, ovine, porcine-derived materials in food, cosmetic and feed-Real-time PCR method [S].
- [11] SN/T 2727-2010 饲料中禽源性成分检测方法 实时荧光 PCR 方法[S]
SN/T 2727-2010 Determination of poultry derived materials in feedstuff-Real-time fluorescent PCR method [S].
- [12] 顾文佳, 徐琼, 张奕南, 等. 应用荧光聚合酶链式反应检测冷冻羊肉卷中羊肉的含量[J]. 肉类研究, 2016, 30(7): 26–29.
Gu WJ, Xu Q, Zhang YN, *et al.* Application of Real-Time fluorescence polymerase chain reaction (PCR) for quantitative detection of lamb in frozen lamb rolls [J]. Meat Res, 2016, 30(7): 26–29.
- [13] 金献忠, 郑曙昭, 丘寅. 能力验证样品均匀性和稳定性检验的统计方法[J]. 现代测量与实验室管理, 2003, 11(4): 35–37.
Jin XZ, Zheng SZ, Qiu Y. Statistical methods of homogeneity and stability testing for samples of proficiency testing [J]. Adv Measur Lab Manag, 2003, 11(4): 35–37.
- [14] 张红艳, 王贤, 华震宇, 等. 简析能力验证样品均匀性和稳定性检验的方法[J]. 现代科学仪器, 2017, (1): 10–12, 17.
Zhang HY, Wang X, Hua ZY, *et al.* Analysis on testing methods of homogeneity and stability of samples for proficiency testing [J]. Mod Sci Instrum, 2017, (1): 10–12, 17.
- [15] 吕岩, 张耀武. 浅议如何利用统计学技术进行能力验证样品均匀性、稳定性评价[J]. 中国西部科技, 2010, 9(30): 50–51.
Lv Y, Zhang YW. Discussion on the evaluation of sample homogeneity, stability using of statistical techniques [J]. Sci Technol West China, 2010, 9(30): 50–51.
- [16] 瞿洪仁, 骆海朋, 申静云, 等. 食品检测用单核细胞增生李斯特氏菌标准物质的研制[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(1): 73–78.
Qu HR, Luo HP, Shen JY, *et al.* Preparation of listeria monocytogenes reference material for food analysis [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(1): 73–78.
- [17] 林硕. 能力验证物品制备中均匀性检验出现 F 远小于 1 现象的探讨[C]. 第三届中国能力验证与标准样品论坛论文集, 2012: 145–148.
Lin S. Discussion of the phenomenon F less than one in homogeneity tests of samples prepared for proficiency tests [C]. The assembly documents of the third seminar of proficiency tests and reference materials, 2012: 145–148.

(责任编辑: 陈雨薇)

作者简介



顾文佳, 高级工程师, 主要研究方向为食品微生物和转基因检测。
E-mail: guwj@sqi.org.cn