



中华人民共和国国家标准

GB/T 23182—2025

代替 GB/T 23182—2008

饲料质量安全检测方法建立、确认、验证和 实验室内部质量控制实施指南

Guideline for method development, validation & verification and
internal quality control in feed quality and safety detection

2025-08-29 发布

2026-03-01 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件代替 GB/T 23182—2008《饲料中兽药及其他化学物检测实验规程》，与 GB/T 23182—2008 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 更改了范围(见第 1 章,2008 年版的第 1 章)；
- b) 删除了“饲料采样”(见 2008 年版的第 4 章)；
- c) 将“饲料中兽药及其他化学物的检测”更改为“方法建立”和“方法确认”(见第 4 章和第 5 章,2008 年版的第 5 章)；
- d) 将“检出兽药及其他化学物的确证”更改为“方法验证”(见第 6 章,2008 年版的第 6 章)；
- e) 增加了“实验室内部质量控制”(见第 7 章)；
- f) 删除了“结果计算和表述”和“试验报告撰写”(见 2008 年版的第 7 章和第 8 章)。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)提出并归口。

本文件起草单位：中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所、全国畜牧总站、中国农业大学、上海市动物疫病预防控制中心、山东省畜产品质量安全中心。

本文件主要起草人：常碧影、田双喜、樊霞、张凤枰、粟胜兰、赵恩泽、李俊玲、黄士新、程林丽、刘晓露、商军、索德成。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——2008 年首次发布为 GB/T 23182—2008；

——本次为第一次修订。

饲料质量安全检测方法建立、确认、验证和 实验室内部质量控制实施指南

1 范围

本文件提供了饲料质量安全检测化学分析方法建立、确认、验证和实验室内部质量控制的指导和
建议。

本文件适用于饲料和饲料添加剂质量安全检测化学分析方法的建立、确认、验证和实验室内部质量
控制。

本文件不适用于生物学分析方法。

2 规范性引用文件



下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文
件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于
本文件。

GB 5009.295—2023 食品安全国家标准 化学分析方法验证通则

GB 13078 饲料卫生标准

GB/T 32465—2015 化学分析方法验证确认和内部质量控制要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

定性方法 **qualitative method**

根据物质的化学、生物或物理性质对其进行鉴定的分析方法。

[来源：GB/T 27417—2017, 3.5]

3.2

定量方法 **quantitative method**

测定被分析物的质量或质量分数的分析方法。

注：用适当单位的数值表示。

[来源：GB/T 27417—2017, 3.6, 有修改]

3.3

确证方法 **confirmatory method**

能提供目标物全部或部分信息，依据这些信息可以明确定性，在必要时在关注的浓度水平上进行定
量的方法。

[来源：GB/T 27417—2017, 3.7]

3.4

筛选方法 **screening method**

具有高效处理大量样品的能力，用于检测一种物质或一组物质在所关注的浓度水平上是否存在的

方法。

注：这些方法用于筛选大量样品可能的阳性结果，并用来避免假阴性结果。此类方法所获得的检测结果通常为定性结果或半定量结果。

[来源：GB/T 27417—2017,3.8]

3.5

灵敏度 sensitivity

分析方法对单位浓度或单位量待测物变化所产生的响应量的变化程度。

3.6

正确度 trueness

无穷多次重复测量值的平均值与一个参考量值间的一致程度。

[来源：ISO/IEC 指南 99:2007,2.14]

3.7

准确度 accuracy

样品中待测物测定值(结果)与被测量真值或约定真值间的一致程度。

3.8

基质效应 matrix effects

样品基质中的一种或多种成分对目标分析物检测结果的影响。

注：相比于试剂中目标分析物检测结果，基质效应可能会造成目标分析物响应信号增强或减弱。

[来源：GB/T 32467—2015,9.29]

3.9

线性范围 linear range

被测物浓度与仪器响应值呈线性关系并且能满足定量要求(精密度和准确度)的浓度范围。

3.10

检出限 limit of detection; LOD

分析方法在给定的置信度内从样品背景信号中检出被测物的最低量(或最低浓度),但不一定准确定量。

3.11

定量限 limit of quantification; LOQ

分析方法在满足定量要求(精密度及准确度)的前提下,能定量测出样品中被测物的最低量(或最低浓度)。

3.12

回收率 recovery

已知确切含量样品中的待测物或添加到空白样品中的测试物测定值占其真实值的百分比。

3.13

精密度 precision

分析方法重复测定同一样品所得测定值间的一致程度。

3.14

相对标准偏差 relative standard deviation; RSD

变异系数 coefficient of variation; CV

多次测定值的标准差(SD)与算术平均值的百分比。

3.15

重复性 repeatability

在重复性条件下,相互独立的测试结果之间的一致程度。

3.16

重复性条件 **repeatability conditions**

在同一实验室,由同一操作者使用相同设备和试剂,按相同的测试方法,并在短时间内从同一被测对象取得相互独立结果的条件。

3.17

再现性 **reproducibility**

在再现性条件下,测试结果之间的一致程度。

3.18

再现性条件 **reproducibility conditions**

在不同的实验室,由不同的操作者使用不同的设备和试剂,按相同的测试方法,从同一被测对象取得测试结果的条件。

3.19

最低限量 **minimum limit**

对某一定量特性规定和要求的物质限值。

[来源:GB/T 27417—2017,3.9,有修改]

3.20

方法选择性 **method selectivity**

方法能够区分目标分析物和样品中其他成分(如其他待测物、基质成分、其他可能的干扰物)的程度。

[来源:GB/T 32467—2015,9.14]

3.21

方法稳健性 **method ruggedness****方法耐用性** **method robustness**

分析方法对实验室一般不刻意控制或不能完全保持完全一致的微小条件变化的敏感性。

[来源:GB/T 32467—2015,9.15]

3.22

方法确认 **method validation**

实验室通过试验,提供客观有效证据证明特定检测方法满足预期的用途。

3.23

实验室内方法确认 **in-house method validation**

在一个实验室内,在合理的时间间隔内,用一种方法在预定的条件下,对相同或不同样品进行的分析试验,以证明特定检测方法满足预期的用途。

[来源:GB/T 27417—2017,3.3]

3.24

实验室间方法确认 **interlaboratory method validation**

在两个或多个实验室间依照预定的条件对相同的方法对相同的样品的测定,以证明特定检测方法满足预期用途。

[来源:GB/T 27417—2017,3.4]

3.25

方法验证 **method verification**

实验室通过核查,提供客观有效证据证明满足检测方法规定的要求。

[来源:GB/T 27417—2017,3.2]

3.26

内部质量控制 internalqualitycontrol; IQC

建立并确认系列质量控制程序,通过实施此程序,对检测操作和检测结果实施连续监控的过程,判断对外发布的检测结果是否足够可靠。

[来源:GB/T 32467—2015,9.1,有修改]

4 方法建立

4.1 总则

所建立的饲料质量安全检测化学分析方法需考虑但不限于下列几点:

- 与饲料原料目录、饲料添加剂品种目录和饲料添加剂安全使用规范,以及饲料卫生标准等强制性标准相协调;
- 方法具有科学性、合理性和实用性;
- 方法内容完整、表述准确,易于理解,可操作性强,便于实施;
- 检测结果准确、稳定、可靠,且能实现量值溯源;
- 方法相关技术文件和数据资料完整。

4.2 方法建立

4.2.1 概述

饲料质量安全检测化学分析方法建立前,全面了解并分析下述情况:

- 待测物的功效和/或风险,有关法律法规和相关标准是否有待测物的允许使用量范围、限量或禁用规定;
- 待测物在饲料中的存在状态(游离/结合),待测物的化学结构、理化性质、对光热等的稳定性和可能的量值范围;
- 饲料基质对待测物的影响,是否存在待测物的类似物和/或干扰物;
- 国内外相关标准方法和文献方法查询、分析和比较;
- 确定拟建立方法的类型、适用范围和方法建立及验证的完整技术路线。

4.2.2 前期准备

4.2.2.1 了解待测物在饲料中的营养价值、功能、作用或对动物健康危害与环境的潜在风险;了解国内外相关法律法规规定、限量规定、强制性标准要求和监测要求。

4.2.2.2 调研国内外相关方法标准,了解其适用范围、待测物、方法、技术先进性或缺陷、应用情况等。

4.2.2.3 收集国内外相关文献资料,了解分析方法和相关测试手段的最新研究进展。

4.2.3 方案制定与试验准备

4.2.3.1 方案制定

在前期调研基础上制定工作方案,具体如下:

- 根据文献资料分析待测物的种类和性质,确定分析方法的类型(容量法、重量法、光谱法、色谱法、质谱法等);
- 根据方法原理确定方法的基本程序、试验步骤,以及各试验步骤需考察优化的试验条件和参数;
- 根据样品类型、待测物性质与含量范围、方法要求等,确定样品量、制备方法、粉碎粒度和样品

贮存条件(如是否需要特殊包装或避光、保存温度等)、贮存时间及空白样品等要求。

4.2.3.2 试验准备

准备试验所需的仪器设备、标准物质、标准样品、试剂、耗材、典型样品、空白样品等。

4.2.4 方案实施

4.2.4.1 总则

方案的具体实施步骤如下：

- 分析方法的基本程序和步骤分为前处理和测定两步,前处理包括消解/提取、净化/富集等,测定包括仪器配置、测定条件与重要参数确定、定性(待测物的识别和确定)和定量分析等；
- 分析方法制定顺序不一定与分析方法过程顺序一致,如液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法从测定部分开始,先确定质谱最佳工作参数和定性定量离子,再确定色谱分离条件,最后确定样品提取/净化条件；
- 每段研究均需分别考察确定可能影响该段试验效果的试验条件或重要仪器参数,并考察是否适用于范围中的所有样品类型。

4.2.4.2 消解/提取

4.2.4.2.1 容量法、光谱法、色谱法、质谱法等测定对象均为溶液中的待测物,溶解待测物的方法包括但不限于以下：

- 矿物质元素、蛋白质及其他有机物等多采用消解(酸解)、酶解或其他方式；
- 添加剂、真菌毒素、兽药残留、农药残留等有机物选用适当的溶剂,采用涡旋、振荡、超声、微波、加速溶剂萃取、固相分散萃取(QuEChERS)等方式提取。

4.2.4.2.2 选择消解/提取后确定具体条件,如试样用量、消解用酸/皂化用碱的种类、浓度和用量,消解/皂化的温度和时间,以及其他消解方式(如高压罐消解、微波消解)等试验条件与操作参数的研究和确定。

4.2.4.2.3 确定适宜的提取溶剂、提取方式、提取时间、提取次数等。

4.2.4.3 净化

以液液萃取(LLE)、固相萃取(SPE)、固相分散萃取(QuEChERS)等方法净化,需优化试验条件,包括但不限于：

- LLE 萃取溶剂、萃取次数；
- SPE 净化小柱类型、柱容量、柱活化平衡、试样溶液加载量、加载速度、淋洗液和洗脱液等；
- QuEChERS 吸附剂类型和用量、吸附剂组合、溶剂类型和用量、吸附时间等。

4.2.4.4 富集

采用氮吹、蒸发等浓缩方式,确定温度、复溶溶液等条件。



4.2.4.5 仪器设备和测试条件确定

4.2.4.5.1 仪器设备

4.2.4.5.1.1 除常规仪器设备和专用仪器设备(如凯氏定氮仪、脂肪测定仪、纤维测定仪、氨基酸测定仪等)外,常用光谱类和色谱质谱类仪器如下：

- 光谱类:紫外-可见光分光光度计、旋光仪、原子吸收光谱(AAS)仪、原子荧光光谱(AFS)仪、荧

光分光光度(FLS)计、电感耦合等离子体发射光谱(ICP-OES)仪和电感耦合等离子体发射质谱(ICP-MS)仪等；

——色谱质谱类：气相色谱(GC)仪、液相色谱(LC)仪、离子色谱(IC)仪、气相色谱质谱联用(GC-MS)仪、气相色谱-三重四级杆串联质谱(GC-MS/MS)仪和液相色谱-三重四级杆串联质谱(LC-MS/MS)仪等。

4.2.4.5.1.2 仪器设备选择主要依据待测物的理化性质和饲料质量安全检测要求，常量、微量和痕量元素测定采用光谱类仪器，有机物测定采用色谱质谱类仪器，易挥发或可衍生为易挥发物的测定采用气相色谱仪和气相色谱质谱联用仪，禁用物测定采用气相色谱质谱联用仪、气相色谱-三重四级杆串联质谱仪和液相色谱-三重四级杆串联质谱仪。

4.2.4.5.2 测试条件

仪器设备确定后，通过试验研究选择和确定测定条件和参数。

——光谱法：通过待测物的吸收或发射光谱特性定量，分光光度法、火焰光度法和原子吸收光谱法需给出待测元素的吸收波长或发射波长等参数；原子荧光光谱法需设定仪器参数灯电流、光电倍增管负高压、炉温、炉体高度、保护气流量等参数；电感耦合等离子体发射光谱法和电感耦合等离子体发射质谱法则需给出待测元素激发光波长、元素质量数、等离子气流速、载气流速、射频功率和雾化室温度等参数。

——色谱质谱法：气相色谱法需确定色谱柱类型、色谱柱温度、进样口温度和检测器参数、流动相速度等参数；液相色谱法需确定色谱柱类型(正相、反相)、色谱柱温度、检测器参数、耐受 pH、流动相组成和速度、洗脱方式等参数；气相色谱-质谱联用法需确定电子轰击电离(EI)或化学电离(CI)、全扫描或选择离子扫描(SIM)数据采集等参数；液相色谱-串联质谱法需确定电喷雾电离(ESI⁺或ESI⁻)、大气压化学电离(APCI)等电离模式，并确定全扫描、选择离子扫描(SIM)、选择反应检测(RSM)、多反应监测(MRM)等数据采集模式。

4.2.4.6 基质效应

4.2.4.6.1 评价

采用色谱-质谱联用技术测定时，需确认试样溶液中某些组分或共流出物是否会产生基质效应(ME)。通过柱后注射法、提取后添加法、相对响应值法或标准曲线法检验，即比较正常的标准(系列)溶液和用同类型空白试样提取液配制的标准(系列)溶液的相对响应值或标准曲线斜率来鉴别，如果相对响应值或标准曲线斜率差异大于±20%，则证明有基质效应存在。基质效应的评价方法如下。

——响应值比较法：基质效应(%) = 基质溶液中分析物峰面积/纯溶剂中分析物峰面积 × 100%。

当 ME 在 80%~120% 之间不存在基质效应；当 ME 低于 80% 时，则认为基质对目标化合物的响应产生抑制作用；当 ME 高于 120% 时，则认为基质对目标化合物的响应存在增强作用。

——曲线斜率比较法： $F = \text{基质匹配曲线斜率} / \text{纯溶剂曲线斜率}$ 。当 F 在 0.8~1.2 之间时不存在基质效应；当 F 低于 0.8 时，则认为基质对目标化合物的响应产生抑制作用；当 F 高于 1.2 时，则认为基质对目标化合物的响应存在增强作用。

4.2.4.6.2 消除

4.2.4.6.2.1 GC-MS 法、GC-MS/MS 法通过在标准系列溶液和试样溶液中加入保护剂或改用适当进样方法来消除；LC-MS/MS 法用基质匹配标准曲线校准定量和内标法来消除。

4.2.4.6.2.2 基质匹配标准曲线校准时，标准曲线符合 4.2.4.8.1 的要求。

4.2.4.6.2.3 内标法校准时，用待测物同位素内标或试样中不存在且与待测物不发生反应的其他化合

物作内标物。若内标物在上机测定前加入,需保证试样溶液和标准系列溶液同样的质量浓度;若在试样提取前添加,需保证试样溶液中内标物添加量在上机前达到与标准系列溶液中同样的质量浓度。

4.2.4.7 标准溶液和试样溶液稳定性试验

4.2.4.7.1 标准溶液

开展标准储备溶液和标准中间溶液中待测物的稳定性试验。配制标准溶液和首次浓度检测后,按表1储存标准储备溶液和标准中间溶液,并分别于1周、4周和8周后测定待测物的浓度,确定待测物降低10%的时间点,以及标准储备溶液和标准中间溶液的最佳储存条件和稳定时间。

表1 标准溶液待测物稳定性试验

储存条件	$\leq -18\text{ }^{\circ}\text{C}$	$2\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$	室温
避光	10份	10份	10份
光照	—	—	10份

4.2.4.7.2 试样溶液

根据待测物性质、试样溶液特性,研究确定试样溶液的贮存条件和稳定时间。在规定贮存条件和贮存时间内,试样溶液中待测物含量无显著差异。

4.2.4.8 测定

4.2.4.8.1 标准曲线的建立与校准

标准曲线的建立与校准步骤如下:

- 按照试剂空白、样品空白、标准曲线、试样的顺序进样测定;
- 标准曲线至少6个点均匀分布于线性范围内,其最低点需低于或等于方法定量限对应的浓度;
- 定量方法的线性回归方程相关系数不低于0.99,定性方法不低于0.98,各浓度点对线性方程响应的偏离不超过 $\pm 20\%$;
- 定量采用多点校准和单点校准,多点校准时,试样溶液中待测物的响应值需在标准曲线的线性范围之内,且对线性方程的偏离在 $\pm 20\%$ 之内;单点校准时试样溶液中待测物的检测响应值与校准标准溶液中该待测物的响应值相一致,相对偏差在 $\pm 30\%$ 之内。

4.2.4.8.2 定性

4.2.4.8.2.1 色谱

色谱识别需满足但不限于如下情况:

- 待测物的色谱峰保留时间大于死时间的2倍;
- 色谱峰峰形对称,各组分分离度需达1.5以上;
- 试样溶液中待测物的色谱峰保留时间与标准系列溶液质量浓度相当者保留时间一致,GC相对偏差在 $\pm 0.5\%$ 之内,HPLC相对偏差在 $\pm 2.5\%$ 之内,UPLC要求相差不超过0.1 min。随着仪器性能的提高,GC要求提高至相差不超过0.1 min,LC-MSⁿ要求提高至相差不超过0.2 min。

4.2.4.8.2.2 质谱

质谱定性分析包括质谱识别和选择离子识别。

a) 质谱识别

质谱仪提供的质谱图、同位素模型和/或选择离子信息对于待测物具有很强的特异性,但需考虑以下几点:

- 待测物参比谱图和试样在相同仪器、相同试验条件下获得;
- 避免因待分析物浓度过载、而使离子比发生变化;
- 仪器软件中的参比谱图是在同批分析中由无基质效应的标准溶液得出的;
- 对于全扫描测量,通过反褶积或其他算法,用手动或自动方式扣除背景,确保由色谱峰得到的质谱具有代表性,且在整个批次测试中使用统一的校正方法。

b) 选择离子识别

选择离子满足但不限于如下情况:

- 待测物在其分析的基质中和一定的浓度范围内有足够的选择性;
- 在测定和识别程序中尽可能使用待测物的分子离子,(去)质子化分子或加合物离子;
- 高质荷比的离子选择性较好,故不选择 $m/z < 100$ 的离子,也不选择只失去水分子或失去分子中相同部分的离子;
- 试样提取离子的色谱图与同批分析的、浓度相当的标准溶液、提取离子的色谱图具有相似的保留时间、峰形和响应比。来自待测物的不同选择性离子的色谱峰需完全重叠,如果一个离子的色谱图有明显的干扰不能用于识别;
- 不同类型和型号的质谱检测器选择性不同,识别置信度也不同。不同质谱技术的识别要求见表 2,作为识别的指导性标准;
- 用于识别的、试样选择离子相对强度(丰度)比需与相同分析序列、同样条件下测定的校准标准获得的选择离子的参比离子相对强度的平均值相匹配,差异不超过 $\pm 30\%$;
- 对于高分辨质谱仪,虽然其离子强度比也受提取离子色谱峰的信噪比、碎片离子产生方式以及基质的影响。但由于能得到更精确的质量测量值,没必要考虑试样选择离子相对强度与校准标准的匹配关系,作为识别的另一证据;
- 其他的质谱信息,如全扫描光谱的评估、同位素模型、加成离子、精确碎片离子质量,更多的子离子或精确的子离子质量等,进一步提高识别的置信度。

表 2 质谱识别要求

MS 检测器/特性		数据采集处理	识别要求	
分辨率	典型系统(示例)		最小离子数	其他
质谱分辨单元	单级质谱(MS) 四级杆、离子阱、飞行时间质谱(TOF)	全扫描,限制 m/z 范围,单离子检测(SIM)	3 个离子	1) 信噪比(S/N) $\geq 3^d$; 2) 待测物子离子和从色谱提取离子的色谱峰需完全重合; 3) 试样选择离子强度(丰度)比与同分析序列校准标准平均离子(丰度)比的差异需在 $\pm 30\%$ 之内
	串联质谱(MS/MS) 三重四级杆、离子阱、四级杆-离子阱(Q-离子阱)、四级杆-飞行时间质谱(Q-TOF)、四级杆-轨道阱(Q-轨道阱)	选择或多反应监测(SRM或MRM),母离子分离等于或好于单位质子分辨率	2 个子离子	

表 2 质谱识别要求 (续)

MS 检测器/特性		数据采集处理	识别要求	
分辨率	典型系统(示例)		最小离子数	其他
质谱测量 准确性	高分辨质谱 Q-TOF、Q-轨道阱	全扫描, 限制 m/z 范围, SIM, 选择母离子碎片离子有或没有、或两者结合	2 个离子 质量准确度 ^{a,b,c} $\leq 5 \times 10^{-6}$	1) $S/N \geq 3^d$; 2) 待测物所提取母离子和/或子离子的色谱峰需完全重叠
<p>^a 最好包括分子离子、(去)质子分子或加成离子。</p> <p>^b 至少包括 1 个碎片离子。</p> <p>^c $m/z < 200$ 者, $< 1 \times 10^{-6}$。</p> <p>^d 有噪声存在时, 信号需至少在 5 个序列扫描中出现。</p>				

4.2.4.8.3 定量

根据待测物、样品类型和方法要求, 采用外标法或内标法进行定量。

4.2.4.9 试验数据处理

除特殊要求外, 试样中待测物含量通常以质量分数 w 计, 数值以百分含量(%)或毫克每千克(mg/kg)或微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$)等表示, 并给出多点校准或单点校准的计算公式、公式中的符号说明, 以及测定结果表述说明和有效数字位数。有效数字的取舍遵循“四舍六入五留双”原则, 取其平均值报告结果。

5 方法确认

5.1 总则

实验室需在下述情况下需对方法进行确认或重新确认:

- 建立新的分析方法(标准方法或其他方法);
- 超出已经确认方法的预定范围(如增加新待测物或新的基质类型样品.....)时;
- 扩充或修改已经确认方法操作程序或更改的实验条件或测定参数(色谱类分析仪器参考条件调整范围见附录 A)超出调整范围时;
- 新建立的标准方法除了在建立标准的实验室进行确认外, 还需进行实验室间的方法确认。

5.2 拟考察的方法性能参数

拟考察的方法性能参数见表 3。

表 3 方法性能参数选择

方法性能参数	确证方法		筛选方法	
	定量法	定性法	定量法	定性法
检出限	√	√	√	
定量限	√		√	
灵敏度	√	√		
选择性/特异性	√	√	√	√
线性范围	√		√	
测定范围	√		√	
基质效应	√	√	√	
精密度	√		√	
正确度/准确度	√			
稳健度	√	√	√	√

[来源:GB/T 27417—2017,4.3.1]

方法性能考察需涵盖范围中规定的所有适用的饲料类型,如配合饲料、浓缩饲料、精料补充料、添加剂预混合饲料、饲料原料、饲料添加剂和混合型饲料添加剂,必要时需确定是动物源性或植物源性饲料原料等;如范围中对同一待分析物规定了两种或多种分析方法时,对每种方法分别完成上述参数的确认,并分别给出方法的检出限和定量限。

5.3 性能参数考察

5.3.1 灵敏度

试样空白的响应信号减去试剂空白信号后,其大小不大于定量限响应的 30%。灵敏度是标准曲线的斜率。

5.3.2 检出限和定量限

5.3.2.1 评估必要性

根据方法学要求,光谱法、色谱法、质谱法需要评估检出限(LOD)和定量限(LOQ)。当待测物浓度远大于 LOQ 时没必要评估 LOD 和 LOQ。当待测指标为 GB 13078 规定的卫生指标或强制性国家标准和相关法律法规等限定的参数时,需确定 LOD 或 LOQ。对于有限量值的目标分析物,定量限宜为限量值的 0.5 倍或以下。

5.3.2.2 检出限的确定

5.3.2.2.1 信噪比法:适用于光谱法、色谱法和质谱法,即以信噪比 3 : 1 的信号对应的待测物浓度作为检出限。

5.3.2.2.2 空白标准偏差法:适用于空白样品非零响应值的方法,以独立测试大于 20 次的空白平均值+3 倍标准偏差值作为检出限(LOD)。

5.3.2.2.3 逐级稀释法:按一定间隔对待测物进行逐级稀释、测定,当待测物刚好能检出的浓度即为估算检出限。

5.3.2.2.4 空白标准偏差法:适用于滴定法和分光光度法。滴定法用滴定管所产生的最小液滴体积来计算,分光光度法用扣除空白值后与 0.01 吸光度相对应的浓度值作为检出限。验证时,在空白样品中添加若干个不同浓度水平的标准溶液,每个浓度水平检测 10 次,记录检出结果(阳性或阴性),绘制样品检出的阳性率(%)或阴性率(%)对添加浓度的曲线,临界浓度即为方法检出限,对于禁用物的检出限,在 95%的置信水平下阳性样品检出几率需达到 95%以上。

5.3.2.3 定量限的确定

5.3.2.3.1 信噪比法:适用于光谱法、色谱法和质谱法,向空白样品基质中添加待测物,以信噪比 10:1 时的添加浓度作为定量限。

5.3.2.3.2 3 倍检出限法:适用于光谱法、色谱法和质谱法,以 3 倍检出限估算定量限。

5.3.2.3.3 空白标准偏差法:适用于空白样品非零响应值的方法,独立测试大于 10 次的空白平均值 10 倍标准偏差值作为定量限(LOQ)。

5.3.3 线性范围

线性范围的考察和要求见 4.2.4.8.1。

5.3.4 方法特异性

方法特异性检查采用但不限于以下方法:

- a) 分析一定数量的与方法适用范围相匹配的空白样品,检查待测物出现信号(峰)区域是否有干扰;
- b) 在空白样品中添加一定浓度的有可能干扰待测物定性和/或定量的物质进行分析,检查是否能有效识别这些干扰物质。

5.3.5 方法正确度

方法的测定范围需能覆盖方法的关注浓度;至少要验证测定方法的最低浓度和最高浓度的准确度和精密性;对于有限量值的目标分析物,还需验证限量值浓度的准确度和精密性。评价手段包括但不限于如下方法:

- a) 测定值与有证标准物质/标准样品或质量控制样品结果的比较:做 6 个平行试验,其测定结果的平均值与参考值偏差与表 4 的相对偏差要求一致;
- b) 与不同方法(如新方法 with 经典方法、原有标准方法的比较)测定结果进行统计学比较;
- c) 标准添加法,按方法确定的适用范围,选择典型空白试样,在每个空白试样中制备 3 个水平的待测物标准添加试样,一个添加水平相当于定量限,对于禁用或有最低限量规定的待测物,另两个添加水平在 2 倍~10 倍定量限的范围内选择,对于允许使用的待测物则在 2 倍~10 倍关注浓度的范围内选择。无法找到空白试样,则用低含量的试样作为“空白”,每类“空白”与 3 个添加水平的试样各做 6 平行测定,计算各类样品、3 个水平的测定结果平均值、添加回收率与批内变异系数。方法回收率保留 3 位有效数字,需与表 4 的回收率范围要求一致,方法重复性变异系数需与表 5 的要求一致。

注:在计算添加水平时,浓缩饲料、添加剂预混合饲料、饲料添加剂和混合型饲料添加剂的关注水平与配合饲料不同,浓缩饲料、添加剂预混合饲料、饲料添加剂和混合型饲料添加剂的关注水平根据实际添加比例再行计算。

表 4 方法正确度要求($n=6$)

待测物含量, 质量分数 w	相对偏差 ^a	回收率范围 ^b
$w \leq 1 \mu\text{g}/\text{kg}$	$-50\% \sim +20\%$	$50\% \sim 120\%$
$1 \mu\text{g}/\text{kg} < w \leq 10 \mu\text{g}/\text{kg}$	$-40\% \sim +20\%$	$60\% \sim 120\%$
$10 \mu\text{g}/\text{kg} < w \leq 100 \mu\text{g}/\text{kg}$	$-30\% \sim +20\%$	$70\% \sim 120\%$
$100 \mu\text{g}/\text{kg} < w \leq 1\ 000 \mu\text{g}/\text{kg} (1 \text{ g}/\text{kg})$	$-20\% \sim +10\%$	$80\% \sim 110\%$
$1 \text{ g}/\text{kg} < w < 1\ 000 \text{ g}/\text{kg}$	$-10\% \sim +5\%$	$90\% \sim 105\%$

^a 适用于采用有证标准物质/标准样品评价正确度时。
^b 适用于标准添加回收率评价正确度时。

[来源:GB 5009.295—2023, 4.1.5.1]

表 5 方法重复性相对标准偏差的要求

待测物质量分数 w	重复性相对标准偏差
$w \leq 1 \mu\text{g}/\text{kg}$	$\leq 30\%$
$1 \mu\text{g}/\text{kg} < w \leq 10 \mu\text{g}/\text{kg}$	$\leq 20\%$
$10 \mu\text{g}/\text{kg} < w \leq 100 \mu\text{g}/\text{kg}$	$\leq 15\%$
$100 \mu\text{g}/\text{kg} < w \leq 10 \text{ g}/\text{kg}$	$\leq 10\%$
$10 \text{ g}/\text{kg} < w \leq 100 \text{ g}/\text{kg}$	$\leq 5.0\%$
$w > 100 \text{ g}/\text{kg}$	$\leq 2.0\%$

[来源:GB 5009.295—2023, 4.1.6.1]

为初步考察方法的稳健性,由同实验室的其他实验人员或/和重复上述三水平的空白添加试验,计算回收率并计算方法的重现性。该重现性也需与表 5 中实验室内变异系数的要求一致。

5.3.6 方法稳健性/耐用性

按 GB 5009.295—2023 附录 B 方法稳健性试验方法执行。

5.3.7 方法适用性

考察方法的适用性包括但不限于:

- 从市场或生产企业直接采集适用范围中规定的饲料类型,每个类型再根据不同饲料产品的特点(如畜禽饲料、水产饲料、宠物饲料等)或含量水平选择 2 个~3 个实际样品,按建立的方法进行测定,列表给出试验结果与产品标示量数据;
- 若无标示有具体含量的样品,建议在已有实际样品的基础上进行添加回收率试验,考察添加回收率是否能达到预期的结果。

5.4 实验室间方法确认

新方法建立后,需由另外 3 家具备资质和能力的实验室,对方法的检出限、定量限、标准曲线等进行确认,通过对各类型典型样品的三水平添加回收试验(添加水平同 5.3.5),给出添加回收率、重复性相对标准偏差是否符合表 4 和表 5 的要求,给出方法实验室间确认报告。若实验室间方法确认使用相同的

试样或空白试样,其测定结果需与表 6 的再现性要求一致。

表 6 实验室间再现性要求

待测物含量(质量分数) w	再现性(实验室间)相对标准偏差
$w \leq 1 \mu\text{g}/\text{kg}$	$\leq 40\%$
$1 \mu\text{g}/\text{kg} < w \leq 10 \mu\text{g}/\text{kg}$	$\leq 30\%$
$10 \mu\text{g}/\text{kg} < w \leq 100 \mu\text{g}/\text{kg}$	$\leq 20\%$
$100 \mu\text{g}/\text{kg} < w \leq 10 \text{g}/\text{kg}$	$\leq 15\%$
$10 \text{g}/\text{kg} < w \leq 100 \text{g}/\text{kg}$	$\leq 10\%$
$w > 100 \text{g}/\text{kg}$	$\leq 5\%$

[来源:GB 5009.295—2023,4.1.6.2]

6 方法验证

6.1 实验室在下述情况下需对方法进行验证:

- 实验室首次引入标准方法时,需考察在现有设施设备、人员、试剂耗材和环境下,用该方法是否能得到令人满意的结果,即验证上述因素是否能满足标准的要求;
- 若实验室对标准方法(或已经过确认的其他方法)的操作程序或操作参数做了稍加修改,认为必要时。

6.2 对于方法验证中关键性能指标的选择取决于方法特性和样品基质特性,但至少进行添加回收率与精密度试验,结果需与表 4 与表 5 的要求一致;对于痕量分析,还需考察是否能达到方法预期的检出限与定量限。首次引入标准方法时,建议参加能力验证和实验室间的比对来验证。

7 实验室内部质量控制

按 GB/T 32465—2015 中第 9 章执行。

附录 A

(资料性)

色谱类分析仪器参考条件调整范围

A.1 LC/GC 色谱柱参数

调整范围如下：

- 柱长调整幅度为±70%，柱长 250 mm LC 柱调整为 75 mm ~425 mm；
- HPLC 柱内径调整幅度为±25% (3.9mm 内径的 LC, 用 3.0 mm、4.0 mm 或 4.6 mm 内径的色谱柱代替), GC 调整幅度为±50%；
- LC 柱填料粒度减小至 50% (3 μm 或 3.5 μm 填料代替 5 μm 填料)；
- GC 毛细管壁厚最大调整范围为 50%~100%；
- LC 柱温和 GC 柱箱温最大调整幅度为±10%；
- GC 程序升温: 温度调整幅度为±10%，对维持特定温度或从一个温度变为另一温度调整的最大限度为±20%。

A.2 流动相

调整范围如下：

- 组分的增减达该组分在流动相中占比的 30%；
- 高比例组分调整的绝对量在±10%的范围内；
- 低比例组分调整的绝对量在±2%的范围内；
- 调整后任何组分不降为 0；
- pH 调整幅度为±0.2 单位；
- LC 在能满足 pH±0.2 单位变化情况下, 缓冲液中盐的浓度在 10%的范围内变化；
- LC/GC 流动相调整幅度为±25%。

A.3 LC 紫外-可见光检测器

波长偏离在±3 nm 之内。

A.4 进样量

GC/LC 进样量减少至不影响检出限、定量限和精密度的量。在不影响峰形、分辨率、分离度、保留时间等的情况下, 进样量增加至方法指定进样体积的 2 倍。

注：见 GB/T 32465—2015 中附录 A。

参 考 文 献

- [1] GB/T 27417—2017 合格评定 化学分析方法确认和验证指南
 - [2] 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
 - [3] ISO/IEC Guide 99:2007 International vocabulary of metrology—Basic and general concepts and associated terms (VIM)
-