

## 9101 兽药质量标准分析方法验证指导原则

兽药质量标准分析方法验证（analytical method validation）的目的是证明采用建立的方法适合于相应检测要求。在建立兽药质量标准时，~~分析方法需经验证，在、变更兽药生产工艺或、制剂的组分变更、修订原分析方法进行时，需则质量标准对分析方法也需进行验证。方法验证理由、过程和结果均应记载在兽药质量标准起草说明或修订说明中。~~生物学测定方法存在更多的影响因素，因此本指导原则不涉及生物学测定方法验证的内容。

验证的分析项目有：鉴别试验、杂质测定（限量或定量分析）、~~检查，原料药或制剂中有效成分含量测定（包括特性参数和含量/效价测定，其中特性参数如：~~，以及制剂中其他成分（如防腐剂等）的测定。~~兽药溶出度、释放度等）检查中，其溶出量等的测试方法也应进行必要验证。~~

验证的指标有：专属性、准确度、精密度（包括重复性、中间精密度和重现性）、~~专属性~~、检测限、定量限、线性、范围和耐用性。在分析方法验证中，须采用标准物质进行试验。由于分析方法具有各自的特点，并随分析对象而变化，因此需要视具体方法拟订验证的指标。表 1 中列出的分析项目和相应的验证指标可供参考。

表 1 检验项目和验证指标

项目 内容指标	鉴别	杂质测定		含量测定	校正因子
		定量	限度	-特性参数 -含量或效价 测定 及溶出量测定	
专属性 <sup>①</sup>	+	+	+	+	+
准确度	-	+	-	+	±
精密度					
重复性	-	+	-	+	±
中间精密度	-	+ <sup>①</sup>	-	+ <sup>①</sup>	±
专属性 <sup>②</sup>	+	+	+	+	+
检测限	-	- <sup>③</sup>	+	-	-
定量限	-	+	-	-	±
线性	-	+	-	+	±
范围	-	+	-	+	±
耐用性	+	+	+	+	±

① 已有重现性验证，不需要验证中间精密度。

② 如一种方法不够专属，可用其他分析方法予以补充。

③ 视具体情况予以验证。

方法验证内容如下。

### 一、专属性

专属性系指在其他成分（如杂质、降解产物、辅料等）可能存在下，采用的分析方法能

正确测定出被测物的能力。鉴别反应、杂质检查和含量测定方法，均应考察其专属性。如方法专属性不强，应采用一种或多种不同原理的方法予以补充。

### 1. 鉴别反应

应能区分可能共存的物质或结构相似化合物。不含被测成分的供试品，以及结构相似或组分中的有关化合物，应均呈阴性反应。

### 2. 含量测定和杂质测定

采用的色谱法和其他分离方法，应附代表性图谱，以说明方法的专属性，并应标明**各成分**在图中的位置，色谱法中的分离度应符合要求。

在杂质对照品可获得的情况下，对于含量测定，试样中可加入杂质或辅料，考察测定结果是否受干扰，并可与未加杂质或辅料的试样比较测定结果。对于杂质检查，也可向试样中加入一定量的杂质，考察**各成分包括**杂质之间能否得到分离。

在杂质或降解产物不能获得的情况下，可将含有杂质或降解产物的试样进行测定，与另一个经验证**子**的方法或**兽药典**方法比较结果。也可用强光照射、高温、高湿、酸（碱）水解或氧化的**等**方法进行**强制加速**破坏，以研究可能**存在**的降解产物和降解途径对含量测定和杂质测定的影响。含量测定方法应对两种方法的结果，杂质检查应对检出的杂质个数，必要时可采用光电二极管阵列检测和质谱检测，进行峰纯度检查。

## 二、准确度

准确度系指用**所建立该**方法测定的结果与真实值或参考值接近的程度，一般用回收率（%）表示。准确度应在规定的**线性范围内试验测定**。准确度也可由所测定的精密度、线性和专属性推算出来。

在规定的范围内，取同一浓度（相当于 100% 浓度水平）的供试品，用至少 6 份样品的测定结果进行评价；或设计至少 3 种不同浓度，每种浓度分别制备至少 3 份供试品溶液进行测定，用至少 9 份样品的测定结果进行评价，且浓度的设定应考虑样品的浓度范围。两种方法的选定应考虑分析的目的和样品的浓度范围。

### 1. 含量测定方法的准确度

原料药可用**采用已知纯度的对照品或供试品**进行测定，或用**所测定本法所得**结果与已知准确度的另一个方法测定的结果进行比较。制剂可在处方量空白辅料中，加入已知量被测物对照品进行测定。如不能得到制剂辅料的全部组分，可向待测制剂中加入已知量的被测物**对照品**进行测定，或用所建立方法的测定结果与已知准确度的另一种方法测定结果进行比较。

~~准确度也可由所测定的精密度、线性和专属性推算出来。~~

### 2. 杂质定量测定的准确度

可向原料药或制剂**处方量空白辅料**中加入已知量杂质**对照品**进行测定。如不能得到杂质**或降解产物**对照品，可用所建立方法**测定的结果**与另一成熟的方法（如**兽药典标准方法**或**经过验证的方法**）的测定结果进行比较，~~如兽药典标准方法或经过验证的方法。在不能测得杂质或降解产物的校正因子或不能测得对主成分的相对校正因子的情况下，可用不加校正因子的主成分自身对照法计算杂质含量。应明确表明单个杂质和杂质总量相当于主成分的重量比（%）或面积比（%）。~~

### ~~3. 校正因子的准确度~~

~~对色谱方法而言，绝对（或定量）校正因子是指单位面积的色谱峰代表的供试品的量。供试品与所选定的参照物质的绝对校正因子之比，即为相对校正因子。相对校正因子计算法常应用于化学药物有关物质的测定。校正因子的表示方法很多，本指导原则中的校正因子是指气相色谱法和高效液相色谱法中的相对重量校正因子。~~

~~相对校正因子可采用替代物（对照品）和被替代物（待测物）标准曲线斜率比值进行比较获得；采用紫外吸收检测器时，可将替代物（对照品）和被替代物（待测物）在规定波长和溶剂条件下的吸收系数比值进行比较，计算获得。~~

### 3. 数据要求

~~在规定范围内，取同一浓度（相当于100%浓度水平）的供试品，用至少测定6份样品的结果进行评价；或设计3种不同浓度，每种浓度分别制备3份供试品溶液进行测定，用9份样品的测定结果进行评价。一般中间浓度加入量与所取供试品待测成分量之比控制在1±1左右，建议高、中、低浓度对照品加入量与所取供试品中待测成分里量之比控制在1.2±1, 1±1, 0.8±1左右。对于化学药应报告已知加入量的回收率（%），或测定结果平均值与真实值之差及其相对标准偏差或置信区间（置信度一般为95%）；对于校正因子，应报告测定方法、测定结果和RSD%或置信区间。样品中待测成分含量和回收率限度关系可参考表2。在基质复杂、组分含量低于0.01%及多成分等分析中，回收率限度可适当放宽。~~

表2 样品中待测成分含量和回收率限度

待测定成分含量			待测定成分质量分数	回收率限度（%）
（%）	（ppm 或 ppb）	（mg/g 或 μg/g）	（g/g）	
100%	—	1000mg/g	1.0	98~101
10%	100 000ppm	100mg/g	0.1	95~102
1%	10 000ppm	10mg/g	0.01	92~105
0.1%	1000ppm	1mg/g	0.001	90~108
0.01%	100ppm	100μg/g	0.0001	85~110
<del>0.001% (10μg/g (ppm))</del>	10ppm	10μg/g	0.000 01	80~115
<del>0.0001% (1μg/g)</del>	1ppm	1μg/g	0.000 001	75~120
<del>10μg/kg (ppb)</del>	10ppb	0.01μg/g	0.000 000 01	70~125

此表源自 AOAC 《Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals》。

### 三、精密度

精密度系指在规定的测试条件下，同一份均匀供试品，经多次取样测定所得结果之间的接近程度。精密度一般用偏差、标准偏差或相对标准偏差表示。

在相同条件下，由同一个分析人员测定所得结果的精密度称为重复性；在同一个实验室内的条件改变，如不同时间、由不同分析人员、用不同设备等测定结果之间的精密度，称为中间精密度；在不同实验室由不同分析人员测定结果之间的精密度，称为重现性。

含量测定和杂质的定量测定应考虑方法的精密度。

#### 1. 重复性

在规定范围内，取同一浓度（分析方法拟定的样品测定浓度，相当于100%浓度水平）

的供试品，用至少~~测定~~6份~~样品~~的~~测定~~结果进行评价；或设计至少3种不同浓度，每种浓度分别制备至少3份供试品溶液进行测定，用至少9份样品的测定结果进行评价。采用至少9份~~样品~~测定结果进行评价时，浓度的设定应考虑样品的浓度范围~~一般中间浓度加入量与所取供试品待测成分量之比控制在1+1左右，建议高、中、低浓度对照品加入量与所取供试品中待测成分里量之比控制在1.2+1, 1+1, 0.8+1左右。~~

## 2. 中间精密度

考察随机变动因素，如不同日期、不同分析人员、不同仪器对精密度的影响，应~~设计方~~~~案~~进行中间精密度试验。

## 3. 重现性

国家兽药质量标准采用的分析方法，应进行重现性试验，如通过不同实验室~~协同~~检验获得重现性结果。协同检验的目的、过程和重现性结果均应记载在起草说明中。应注意重现性试验~~所用样品本身的质量~~的一致性及其贮存运输中的环境对该一致性的影响，以免影响重现性结果。

## 4. 数据要求

均应报告~~偏差~~标准偏差、相对标准偏差或置信区间。样品中待测定成分含量和精密度RSD可接受范围参考表3（可接受范围可在给出数值0.5~2倍区间，计算公式，重现性： $RSD_r=C^{-0.15}$ ；重现性： $RSD_R=2C^{-0.15}$ ，其中C为待测定成分含量）。在基质复杂、组分含量低于0.01%及多成分等分析中，精密度~~限度接受范围~~可适当放宽。

表3 样品中待测定成分含量与精密度RSD可接受范围关系

待测定成分含量	待测定成分质量分数		重复性 (RSD <sub>r</sub> %)	重现性 (RSD <sub>R</sub> %)
(%)	(ppm 或 ppb)	(mg/g 或 μg/g)	(g/g)	
100%	—	1000mg/g	1.0	1
10%	100 000ppm	100mg/g	0.1	1.5
1%	10 000ppm	10mg/g	0.01	2
0.1%	1000ppm	1mg/g	0.001	3
0.01%	100ppm	100μg/g	0.0001	4
0.001% <del>10μg/g (ppm)</del>	10ppm	10μg/g	0.000 01	6
0.0001% <del>1μg/g</del>	1ppm	1μg/g	0.000 001	8
<del>10μg/kg (ppb)</del>	10ppb	0.01μg/g	0.000 000 01	15

此表源自 AOAC 《Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals》。

## 四、检测限

检测限系指试样中被测物能被检测出的最低量。~~兽药的鉴别试验和杂质检查方法，均应通过测试确定方法的检测限。~~检测限仅作为限度试验指标和定性鉴别的依据，没有定量意义。常用的方法如下。

### 1. 直观法

用已知浓度的被测物，试验出能被可靠地检测出的最低浓度或量。

### 2. 信噪比法

用于能显示基线噪声的分析方法,即把已知低浓度试样测出的信号与空白样品测出的信号进行比较,计算出能被可靠地检测出的被测物质最低浓度或量。一般以信噪比为 3:1 或 2:1 时相应浓度或注入仪器的量确定检测限。

### 3. 基于响应值标准偏差和标准曲线斜率法

按照  $LOD=3.3\delta/S$  公式计算。式中 LOD: 检测限;  $\delta$ : 响应值的偏差; S: 标准曲线的斜率。

$\delta$  可以通过下列方法测得: ①测定空白值的标准偏差; ②采用标准曲线的剩余标准偏差或截距的标准偏差来代替。

### 4. 数据要求

上述计算方法获得的检测限数据须用含量相近的样品进行验证。应附测试图谱,说明试验过程和检测限结果。

## 五、定量限

定量限系指试样中被测物能被定量测定的最低量,其测定结果应符合准确度和精密度要求。对微量或痕量药物分析、定量测定药物杂质和降解产物时,应确定方法的定量限。常用的方法如下。

### 1. 直观法

用已知浓度的被测物, 试验出能被可靠地定量测定的最低浓度或量。

### 2. 信噪比法

用于能显示基线噪声的分析方法,即把已知低浓度试样测出的信号与空白样品测出的信号进行比较,计算出能被可靠地定量的被测物质的最低浓度或量。一般以信噪比为 10:1 时相应浓度或注入仪器的量确定定量限。

### 3. 基于响应值标准偏差和标准曲线斜率法

按照  $LOQ=10\delta/S$  公式计算。式中 LOQ: 定量限;  $\delta$ : 响应值的偏差; S: 标准曲线的斜率。

$\delta$  可以通过下列方法测得: ①测定空白值的标准偏差; ②采用标准曲线的剩余标准偏差或截距的标准偏差来代替。

### 4. 数据要求

上述计算方法获得的定量限数据须用含量相近的样品进行验证。应附测试图谱,说明测试过程和定量限结果,包括准确度和精密度验证数据。

## 六、线性

线性系指在设计的范围内,线性试验结果测试响应值与试样中被测物浓度直接呈比例关系的能力程度。

应在设计规定的范围内测定线性关系。可用同一对照品贮备液经精密稀释,或分别精密称取对照品,制备一系列对照品溶液的方法进行测定,至少制备 5 个份不同浓度水平的对照品溶液。以测得的响应信号作为被测物浓度的函数对被测物的浓度作图,观察是否呈线性,再用最小二乘法进行线性回归。必要时,响应信号可经数学转换,再进行线性回归计算,或者可采用描述浓度-响应关系的非线性模型。

数据要求: 应列出回归方程、相关系数、残差平方和、和线性图(或其他数学模型)。

## 七、范围

范围系指分析方法能达到一定精密度和准确度、线性要求时的高低限浓度或量的区间。

范围应根据分析方法的具体应用及其线性、准确度、精密度的结果和要求确定。原料药和制剂含量测定，范围一般为测定浓度的80%~120%；制剂含量均匀度检查，范围一般为测定浓度的70%~130%，特殊剂型，如气雾剂和喷雾剂，范围可适当放宽；溶出度或释放度中的溶出量测定，范围一般为限度的±30%，如规定了限度范围，则应为下限的-20%至上限的+20%；杂质测定，范围应根据初步实际测定数据，拟订为规定限度的±20%。如果一个试验同时进行含量测定和纯度检查，且仅使用100%的对照品，线性范围应覆盖杂质的报告水平至规定含量的120%。~~与杂质检查同时进行，用峰面积归一化法进行计算，则线性范围应为杂质规定限度的-20%至含量限度（或上限）的+20%。~~

~~校正因子测定时，范围一般应根据其应用对象的测定范围确定。~~

## 八、耐用性

耐用性系指在测定条件有小的变动时，测定结果不受影响的承受程度，为所建立的方法用于常规检验提供依据。开始研究分析方法时，就应考虑其耐用性。如果测试条件要求苛刻，则应在方法中写明，并注明可以接受变动的范围，可以先采用均匀设计确定主要影响因素，再通过单因素分析等确定变动范围。典型的变动因素有被测溶液的稳定性、样品的提取次数、时间等。高效液相色谱法中典型的变动因素有流动相的组成和pH值、不同厂牌或不同批号的同类型色谱柱、柱温、流速等。气相色谱法变动因素有不同品牌或批号的色谱柱、固定相、不同类型的担体、载气流速、柱温、进样口和检测器温度等。

经试验，测定条件小的变动应能满足系统适用性试验的要求，以确保方法的可靠性。