



隨身課堂

《药物分析》

分析方法物的验证

药学系 药学教研室 刘燕老师



学习目标



1. 掌握需验证的分析项目
2. 熟悉分析方法验证的八个指标
3. 了解需验证的情况



需验证的项目

- 鉴别试验
- 杂质检查
- 含量测定
- 防腐剂
- 溶出度、释放度

验证的内容

- 准确度
- 精密度
- 重复性
- 中间精密度
- 重现性
- 专属性
- 检测限
- 定量限
- 线性
- 范围
- 耐用性



分析方法验证的目的

证明采用的检测方法与检测要求是否相适应

需对分析方法验证的情况

(1) 建立药品质量标准时

(2) 药品生产工艺变更、制剂组分变更、原分析方法进修订时

需验证的项目 ? 和内容 ? (见下表)



项目 内容	鉴别	杂质检查		含量测定及溶出度测定
		定量	限量	
准确度	-	+	-	+
精密度				
重复性	-	+	-	+
中间精密度	-	+ ^①	-	+ ^①
专属性 ^②	+	+	+	+
检测限	-	- ^③	+	-
定量限	-	+	-	-
线性	-	+	-	+
范围	-	+	-	+
耐用性	+	+	+	+

注：① 已有重现性验证，不需验证中间精密度；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；“+”表示需要验证，“-”表示不需验证。



一、分析方法验证的内容



(一) 准确度

(五) 定量限

(二) 精密度

(六) 线性

(三) 专属性

(七) 范围

(四) 检测限

(八) 耐用性



(一) 准确度

1.定义 准确度系指用该方法测定结果与真实值或公认的参考值接近的程度，一般用回收率 (%) 表示。

$$\text{回收率 } (\%) = \frac{\text{实测值}}{\text{理论值}} \times 100\%$$



(一) 准确度



2. 验证方法

(1) 含量测定

1) 基质无 (原料药) / 可模拟 (制剂)

$$\text{回收率}(\%) = \frac{\text{测得量}}{\text{加入量}} \times 100$$

2) 基质不可模拟 (制剂、中药)

$$\text{回收率}(\%) = \frac{\text{测得量} - \text{本底值}}{\text{加入量}} \times 100$$

(2) 杂质检查——方法同2)



（一）准确度



2. 验证方法（其他方法）

- 可与已知准确度的另一方法的测定结果比较
——药典标准方法 / 经过验证的方法
- 也可由所测定的精密度、线性和专属性推算
——原料药含量HPLC测定法



(一) 准确度



3. 数据要求

- 9个测定结果 ($n=9$)
3水平×3样品
- 化药：
 - 1) 80、100、120%
 - 2) 1 : 0.8 ; 1 : 1 ; 1 : 1.2
- 中药: 1 : 0.5 ; 1 : 1 ; 1 : 1.5



(一) 准确度



3. 数据要求

样品中被测成分的含量水平与回收率限度要求的关系

含量水平	限度 (%)	含量水平	限度 (%)
100 %	98~101	0.01 %	85~110
10 %	95~102	10 $\mu\text{g/g}$ (ppm)	80~115
1 %	92~105	1 $\mu\text{g/g}$ (ppm)	75~120
0.1%	90~108	10 $\mu\text{g/kg}$ (ppb)	70~125



(二) 精密度

1. 定义：系指用该法测定同一均匀样品的多次（一组）测量值彼此接近的程度。它们越接近就越精密。在药物分析中，常用标准(偏)差(SD或S)；相对标准(偏)差(RSD)，也称变异系数(CV)，表示

偏差 (deviation , d)：测量值与平均值之差称为偏差。

$$d = x_i - \bar{x}$$

标准偏差 (standard deviation , S)：有限次测量，各测量值对平均值的偏离程度。

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$



(二) 精密度

- **相对标准偏差 (relative standard deviation , *RSD*)** : 标准偏差在平均值中占的百分数

$$RSD = \frac{S}{\bar{x}} \times 100\% \qquad S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$RSD = \frac{S}{\bar{X}} \times 100\% = \frac{1}{\bar{X}} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \times 100\%$$



(二) 精密度

- 2.准确度和精密度的关系
- 测量结果的好坏应从准确度和精密度两个方面衡量：
 - (1) 精密度是保证准确度的先决条件。精密度差，所测结果不可靠，就失去了衡量准确度的前提。
 - (2) 精密度好，不一定准确度高。只有在消除了系统误差的前提下，精密度好，准确度才会高。



(二) 精密度

3. 验证方法

- **重复性**——相同条件(同一实验室 / 相同环境:仪器、人员、批次) 连续测定所得结果的精密度
- **中间精密度**——同一实验室 / 不同环境[不同仪器、人员、分析批(时间)]
- **重现性(法定方法)**——不同实验室/ 不同环境
- **操作法**: 同准确度, 通常: $3(\text{水平}) \times 3(\text{样品}) = 9$
(数据)



(二) 精密度

4. 应用——定量分析

主成分含量测定

- 化药原料药/制剂——80%~120% (样品, $n=9$)
- 中药材 (饮片) /制剂——100% (样品, $n=6$)
50%~150% (样品, $n=9$)

杂质定量测定

- 实际样品 (100%水平, $n=6$)
- 标准添加 (50%~150%限度水平, $n=9$)



(二) 精密度

5. 数据要求

样品中被测成分的含量水平与精密度可接受限度要求的关系

含量水平	重复性 (<i>RSD</i> %)	重现性 (<i>RSD</i> %)	含量水平	重复性 (<i>RSD</i> %)	重现性 (<i>RSD</i> %)
100%	1	2	0.01%	4	8
10%	1.5	3	10 μ g/g	6	11
1%	2	4	1 μ g/g	8	16
0.1%	3	6	10 μ g/kg	15	32



(三) 专属性

是指在样品介质中有其他组分共存时该分析方法对供试物质准确而专属的测定能力。

专属性指可对多种化学成分产生不同响应，而主要成分的响应可与其它响应区分。

因此

专属性是复杂样品分析时相互干扰程度的量度。



(四) 检测限 (limit of detection, LOD)

检测限系指试样中被测物能被**检测**出的最低量。

(一) 直观评价

检测限的测定是通过对一系列已知浓度的被测物进行测定，试验出能被准确地检测出的**最低浓度或最小量**。

(二) 信噪比法

把已知**低浓度试样**测出的信号与**空白样品**测出信号进行比较一般以信噪比为**3:1**或**2:1**时的相应浓度或注入仪器的量确定检测限。

(三) 数据要求

应提供检测限度和测定检测限度的**方法**及相关的测试**图谱**



(五) 定量限 (limit of quantitation , LOQ)

定量限系指在具有一定准确度和精密度下，能够**定量**测定样品中被测物的最低量。

(一) 直观评价

一般通过对一系列含有已知浓度被测物的样品进行定量测试，在准确度和精密度都符合要求的情况下，来确定能被**定量**测得的**最小浓度**或量。

(二) 信噪比法

一般以信噪比**10:1**时相应的浓度或注入仪器的量进行确定，该方法适用于能显示出基线噪音的分析方法。

(三) 数据要求

应提供定量限和定量限的测定方法及相关的测试图谱。



(六) 线性

线性系指在设计的范围内，测试结果与试样中被测物浓度直接呈正比关系的程度。线性是在规定范围内对方法进行评价。

数据要求：至少用5个浓度的供试样品进行线性分析；应列出回归方程、相关系数和线性图。



(七) 范围

范围系指能达到一定**精密度、准确度和线性**，测试方法适用的高低浓度或量的区间。

- **原料药/制剂含量测定：80%~120%**
- **特殊元素含量测定：下限-20%~上限+20%**
- **制剂含量均匀度检查：70%~130%**
- **溶出度/释放度的溶出量测定：下限-20%~上限+20%**
- **杂质测定：限度 \pm 20%（如果杂质检查与含量测定同时进行，杂质限度-20%~含量上限+20%）**
- **校正因子测定：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。耐用性可用于说明分析方法正常使用时的可靠性。

如果测试结果对分析条件的变化是敏感的，那么该分析条件就应当进行适当的控制或在方法中注明。

如HPLC法典型因素：**流动相**的组成和pH及流速、不同厂牌或不同批号的同类型**色谱柱**、**柱温**等



二、分析验证的设计



验证内容选择的一般原则:

- **非定量分析方法** 如鉴别、杂质的限度检查法
——验证“专属性”，“**检测限**”和“耐用性”
- **常量定量分析方法** 如原料药或制剂的含量测定及含量均匀度、溶出度或释放度的测定方法
——除“检测限”和“**定量限**”外，其余均验证
- **微量定量分析方法** 如杂质的定量测定方法
——除“检测限”视情况而定外，其余均验证



项目 内容	鉴别	杂质检查		含量测定及溶 出度测定
		限量	定量	
准确度	-	-	+	+
精密度				
重复性	-	-	+	+
中间精密度	-	-	+ ^①	+ ^①
专属性 ^②	+	+	+	+
检测限	-	+	- ^③	-
定量限	-	-	+	-
线性	-	-	+	+
范围	-	-	+	+
耐用性	+	+	+	+

注：① 已有重现性验证，不需验证中间精密度；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；“+”表示需要验证，“-”表示不需验证。



检测（单项选择题）

1.用于原料药或成药中主药含量测定的分析方法不需要考虑 **A**

A.定量限和检测限

B.精密度

C.专属性

D.耐用性

E.线性与范围



检测（单项选择题）

- 2.用于原料药中杂质或成药中降解产物的定量测定的分析方法验证 **C**
不需要考虑的
- A.精密度
 - B.准确度
 - C.检测限
 - D.专属性
 - E.线性与范围



检测（单项选择题）

3. 回收率属于药物分析方法验证指标中的 **B**

A. 精密度

B. 准确度

C. 检测限

D. 专属性

E. 线性与范围

4. RSD表示 **D**

A. 回收率 B. 标准偏差 C. 误差度 D. 相对标准偏差 E. 变异系数



三、分析方法验证示例



——ChP2020收载的阿司匹林质量标准中的典型分析项目及片剂的定量测定项目为例：

(一) 阿司匹林化学鉴别

1. 专属性

- 通过空白溶剂试验考察专属性，空白试验应显阴性反应

2. 检测限

- 通过减少供试品取量试验确定方法检测限

3. 耐用性

- 通过改变供试品和试剂溶液的浓度与用量、加热温度及反应时间等条件验证



三、分析方法验证示例



(二) 阿司匹林特殊杂质检查

- 游离水杨酸/有关物质检查方法: RP-HPLC

- 验证内容:

- 准确度 ✓
- 精密度 ✓
- 专属性 ✓☆
- 检测限 ?
- 定量限 ✓
- 线性 ✓
- 范围 ✓
- 耐用性 ✓



三、分析方法验证示例



(三) 阿司匹林含量测定

酸碱滴定法

- 方法建立:

- 滴定曲线

- 验证内容:

- 准确度 ✓
- 专属性 ✓ (× 无意义)
- 定量限 ×
- 范围 ✓

- 终点指示

- 精密度 ✓
- 检测限 ×
- 线性 ✓
- 耐用性 ✓



三、分析方法验证示例



(四) 阿司匹林片含量测定

HPLC法

- 验证内容:

- 准确度 ✓

- 专属性 ✓

- 定量限 ×

- 范围 ✓

- 精密度 ✓

- 检测限 ×

- 线性 ✓

- 耐用性 ✓



三、分析方法验证示例



(五) 阿司匹林片溶出量测定

- 同片剂含量测定 (HPLC) , 在含量测定的基础上

补充验证内容:

- 准确度 ×
- 专属性 (溶出基质) ✓
- 定量限 ×
- 范围 (L-20%~120%) ?
- 精密度 ×
- 检测限 ×
- 线性 (L-20%~120%) ?
- 耐用性 (稳定性/基质) ✓





隨身課堂

《藥物分析》

分析方法物的验证

敬请关注下一节内容

分析样品的制备

