兽用中药、天然药物质量标准分析方法验证指导原则

一、概述

兽用中药、天然药物质量标准分析方法验证的目的是为了证明所采用的方法是否适合于相应检测的要求。中药、天然药物在建立质量标准、处方工艺等变更或改变原分析方法时，均需对分析方法进行验证。方法验证过程和结果均应记载在兽药标准起草说明或修订说明中。

需验证的分析项目有：鉴别试验、限量检查、含量测定以及中药、天然药物制剂中其他需控制成分（如残留物、添加剂等）的测定。另外，在中药制剂溶出度、释放度等检查中，其溶出量等检测方法也应作必要验证。

验证内容有：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、耐用性和系统适用性等。应视具体方法拟订验证的内容。附表中列出的分析项目和相应的验证内容可供参考。

二、方法验证的具体内容

**（一）**准确度

准确度系指用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。准确度应在规定的范围内测试。用于定量测定的分析方法均需做准确度验证。

1、测定方法的准确度

可用已知纯度的对照品做加样回收测定，即于已知被测成分含量的供试品中再精密加入一定量的已知纯度的被测成分对照品，依法测定。用实测值与供试品中含被测成分量之差，除以加入对照品量计算回收率。

回收率%=

式中：A为供试品所含被测成分量；

B为加入对照品量；

C为实测值。

在加样回收试验中，应注意对照品的加入量与供试品中被测成分含有量之和必须在标准曲线线性范围之内；应注意加入对照品的时间（供试品预处理前）；对照品的加入量要适当，过小则引起较大的相对误差，过大则干扰成分相对减少，真实性差。

2、数据要求

在规定范围内，取同一浓度的供试品，用6个测定结果进行评价；或设计3个不同浓度，每个浓度分别制备3份供试品溶液进行测定，用9个测定结果进行评价，一般中间浓度加入量与所取供试品含量之比控制在1:1左右。应报告供试品取样量、供试品中含有量、对照品加入量、测定结果和回收率(％)计算值，以及回收率(％)的相对标准偏差（RSD％）或可信限。

**（二）** 精密度

精密度系指在规定的测试条件下，同一个均匀供试品，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。

用于定量测定的分析方法均应考察方法的精密度。精密度包括重复性、中间精密度和重现性。

1、重复性

在相同操作条件下，由一个分析人员在较短的间隔时间内测定所得结果的精密度称为重复性。

在规定范围内，取同一浓度的供试品，用6个测定结果进行评价；或设计3个不同浓度，每个浓度各分别制备3份供试品溶液进行测定，用9个测定结果进行评价。

2、中间精密度

在同一个实验室，不同时间由不同分析人员用不同设备测定结果之间的精密度，称为中间精密度。

为考察随机变动因素对精密度的影响，应进行中间精密度试验。变动因素为不同日期、不同分析人员、不同设备等。

3、重现性

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。

当分析方法将被法定标准采用时，应进行重现性试验。例如，建立兽药典分析方法时应通过不同实验室的复核检验得出重现性结果，复核检验的目的、过程、重现性结果均应记载在起草说明中。应注意重现性试验用的样品本身的质量均匀性和贮存运输中的环境影响因素，以免影响重现性结果。

4、数据要求

均应报告标准偏差、相对标准偏差或可信限。

**（三）**专属性

1、意义与要求

专属性系指在其他成分可能存在下，采用的方法能正确测定出药材、饮片、药材提取物或制剂中被测成分的特性。鉴别、限量检查、含量测定等方法均应考察其专属性。如方法不够专属，应采用其他方法予以补充。

2、鉴别试验

鉴别应能与可能共存的物质或结构相似化合物区分。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，均不得干扰测定。显微鉴别、色谱及光谱鉴别等应附相应的代表性图像或图谱。

3、含量测定和限量检查

以不含被测成分的供试品(除去含待测成分药材或不含待测成分的模拟复方)试验说明方法的专属性。色谱法和其他分析方法，应附代表性图谱，并标明主成分在图中的位置，以空白对照（除去含待测成分药材或不含待测成分的模拟复方）试验说明方法的专属性。色谱法中的分离度应符合要求，必要时可采用二极管阵列检测和质谱检测，对色谱峰进行定性检查。

（四）检测限

检测限系指供试品中被测物能被检测出的最低量。确定检测限常用的方法如下。

1、直观法

用一系列已知浓度的供试品进行分析，试验出能被可靠地检测出的最低浓度或量。

可用于非仪器分析方法，也可用于仪器分析方法。

2、信噪比法

仅适用于能显示基线噪音的分析方法，即把已知低浓度供试品测出的信号与空白样品测出的信号进行比较，算出能被可靠地检测出的最低浓度或量。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、数据要求

应附测试图谱，说明测试过程和检测限结果。

（五）定量限

定量限系指供试品中被测成分能被定量测定的最低量，其测定结果应具一定准确度和精密度。用于限量检查的定量测定的分析方法均应确定定量限。

常用信噪比法确定定量限。一般以信噪比为10∶1时相应的浓度或注入仪器的量进行确定。

（六）线性

线性系指在设计的范围内，测试结果与供试品中被测物浓度直接呈正比关系的程度。

应在规定的范围内测定线性关系。可用一贮备液经精密稀释，或分别精密称样，制备一系列供试品的方法进行测定，至少制备5个浓度的供试品。以测得的响应信号作为被测物浓度的函数作图，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。

数据要求：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限浓度或量的区间。

范围应根据分析方法的具体应用和线性、准确度、精密度结果及要求确定。对于有毒的、具特殊功效或药理作用的成分，其范围应大于被限定含量的区间。溶出度或释放度中的溶出量测定，范围应为限度的±20％。

（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，为使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。典型的变动因素有：被测溶液的稳定性，样品提取次数、时间等。液相色谱法中典型的变动因素有：流动相的组成比例或pH值，不同厂牌或不同批号的同类型色谱柱，柱温，流速及检测波长等。气相色谱法变动因素有：不同厂牌或批号的色谱柱、固定相，不同类型的担体，柱温，进样口和检测器温度等。薄层色谱的变动因素有：不同厂牌的薄层板，点样方式及薄层展开时温度及相对湿度的变化等。

经试验，应说明小的变动能否通过设计的系统适用性试验，以确保方法有效。

（九）系统适用性试验

对一些仪器分析方法，在进行方法验证时，有必要将分析设备、电子仪器与实验操作、测试样品等一起当作完整的系统进行评估。系统适用性便是对整个系统进行评估的指标。系统适用性试验参数的设置需根据被验证方法类型而定。

色谱方法对分析设备、电子仪器的依赖程度较高，因此所有色谱方法均应进行该指标验证，并将系统适用性作为分析方法的组成部分。具体验证参数和方法参考《中国兽药典》有关规定。

三、方法再验证

在某些情况下，如原药提取工艺改变、制剂处方或工艺改变、分析方法改变等，均有必要对分析方法再次进行全面或部分指标的验证，以保证分析方法可靠，这一过程称为方法再验证。再验证原则：根据改变的程度进行相应的再验证。

当原药提取工艺或制剂工艺发生改变时，含量测定方法的专属性就需要再进行验证，以证明含量测定方法中发生的成分变化对主成份的测定无干扰。

当制剂的处方组成改变、辅料变更时，可能会影响鉴别的专属性、溶出度和含量测定的准确度，因此需要进行辅料对鉴别、对含量测定影响的方法再验证。

当质量标准中某一项目分析方法发生改变时，如采用高效液相色谱法测定含量时，检测波长发生改变，则需要重新提供检测限、专属性、准确度、精密度、线性等相应的方法学研究资料，证明修订后分析方法的合理性、可行性。

附表 检验项目和验证内容

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 项目  内容 | 鉴别 | 限量检查 | | 含量测定及  溶出量测定 |
| 定量 | 限度 |
| 准确性  重复性  中间精密度  重现性②  专属性③  检测限  定量限  线性  范围  耐用性  系统适用性试验 | −  −  −  +  +  +  −  −  −  +  + | +  +  +①  +  +  −  +  +  +  +  + | −  −  −  +  +  +  −  −  −  +  + | +  +  +①  +  +  −  −  +  +  +  + |

①已有重现性验证，不需验证中间精密度。

②重现性只有在该分析方法将被法定标准采用时做。

③如一种方法不够专属，可用其他分析方法予以补充。

上表中列举了在不同类型的分析方法验证中被认为是最重要的项目，“−”表示通常不需要验证的项目，“+”表示通常需要验证的项目，如遇特殊情况，仍应根据具体分析对象和情况而定。