

人用药品注册技术要求国际协调会

ICH 三方协调指导原则

分析方法验证：正文和方法学

Q2 (R1)

现行第 4 阶段版本

最初指导原则起于 1994 年 10 月 27 日

(方法学补充指导原则完成于 1996 年 11 月 6 日，于 2005 年 11 月合并)

按照 ICH 进程，本指导原则由相应的 ICH 专家组制定，并已经各管理部门讨论。在 ICH 进程第四阶段，最终方案被推荐给欧盟、日本和美国的药品管理机构采纳。

Q2 (R1)

文件历程

原编码	历程	日期	新编码 2005年11月
-----	----	----	-----------------

主指导原则：分析方法的验证正文

Q2	指导委员会批准作为第二阶段草案发布，对外征求意见。	1993年10月26日	Q2
Q1E	指导委员会批准作为第四阶段草案推荐给 ICH 三方的法规机构采纳。	1994年10月27日	Q2

分析方法验证指导原则：主指导原则的补充

Q2B	指导委员会批准作为第二阶段草案发布，对外征求意见。	1995年11月29日	在 Q2(R1)中
Q2B	指导委员会批准作为第四阶段草案推荐给 ICH 三方的法规机构采纳。	1996年11月06日	在 Q2(R1)中

现行第四阶段版本

Q2A 和 Q2B	最初的指导原则现在更名为 Q2(R1)因为指导原则 Q2B 方法学已经合并到最初的指导原则中。新标题“分析方法验证：正文和方法学”	2005年11月	Q2(R1)
-----------	---	----------	--------

目 录

部分 1: 分析方法的验证正文.....	3
1.介绍.....	3
2.2. 需验证的分析方法类型.....	3
表.....	4
术语.....	5
部分 2:	
分析方法的验证: 方法学.....	8
介绍.....	8
1.专属性.....	8
1.1 鉴别.....	8
1.2 含量测定和杂质检查	9
2.线性.....	10
3.范围.....	10
4.准确性.....	11
4.1.含量测定.....	11
4.2.杂质(定量)	11
4.3 申报数据.....	12
5.精密度.....	12
5.1.重复性.....	12
5.2.中间精密度.....	12
5.3.重现性.....	12
5.4.申报数据.....	12
6.检测限度.....	12
6.1. 根据直观评价.....	12
6.2.根据信噪比.....	12
6.3.根据响应和斜率的标准偏差.....	13
6.4 申报数据.....	13
7.定量限度.....	13
7.1. 根据直观评价.....	13
7.2. 根据信噪比.....	13
7.3 根据响应值的标准偏差和斜率.....	14
7.4 申报数据.....	14

8.耐用性.....	14
9.9. 系统适用性试验.....	15

部分 1:

分析方法的验证正文

本指导原则于 1994 年 10 月 27 日 ICH 指导委员会上进入 ICH 第四阶段，被推荐给 ICH 三方管理部门采纳。

1 介绍

本文件是讨论药物在欧盟、日本、美国注册申请时，递交的分析方法验证所需考虑的参数，它并不寻求涵盖到世界上其他地区注册或出口所要求的测试。另外，本文汇集了项目及其定义，但不对如何完成验证进行指导。希望通过这些项目和定义，使通常存在于三方各种不同的条例、不同的管理者间的差异容易沟通。

分析方法的验证是为了证明该分析方法与其预期目的的相适应。本文以表格形式汇总了适用于鉴别，杂质控制及含量测定方法的各个项目。其他一些分析方法将会在日后增加。

2 需验证的分析方法类型

分析方法的验证讨论了四种最常见的类型：

- 鉴别试验；
- 杂质的定量试验；
- 杂质控制的限度试验；
- 原料药或制剂中活性成分以及制剂中选定组分的定量试验。

虽然许多其他分析方法，（如制剂的溶出度试验或原料药粒度检查）没有在分析方法验证的初始文本中提及，但这些方法的验证和本文所列内容同等重要，可能在以后的文件中提出。

本文件讨论的试验类型简述如下：

- 鉴别试验旨在确证样品中的一种被测物的特性。通常将样品的性质（如光谱、色谱行为、化学反应性等）与参比对照品的性质进行比对。
- 杂质检查是指样品中杂质的定量检测或限度检测。两种检测均是为了准确反映样品的纯度。定量试验所需验证项目与限度试验相比是不同的。

• 含量测定是指测定样品中被分析物的含量。本文件中含量测定是指原料药中主要成分的定量的测定。类似的验证项目也适用于制剂中的活性组分或其他指定成分的定量测定，以及与其它分析方法（如溶出度）相关的定量分析。

应清楚了解分析方法的目的，因为这将决定需要评价哪些验证项目。应进行评价的典型的验证项目如下：

- 准确度
- 精密度
 - 重复性
 - 中间精密度
- 专属性
- 检测限度
- 定量限度
- 线性
- 范围

各验证项目的定义见后面的术语表。上表中列举了在不同类型分析方法验证中被认为是最总要的参数。对所列举的分析方法来说，表中列的应属典型的参数，但偶有例外，仍应根据具体情况而定。值得一提的是表中没有列出耐用性（Robustness），但在分析方法研究过程的适当阶段，应予以考虑。

下列情况需要重新验证：

- 原料药合成方法的改变；
- 成品组分发生改变
- 分析方法的改变

要求重新验证的程度应根据改变的情况而定。某些其他的改变可能也要求验证。

表

分析方法的类型	鉴别	杂质检查		含量分析,溶出度（仅指测定）,含量/效价
		定量	限度检测	
项目				
准确度	-	+	-	+
精密度				
重复性	-	+	-	+
中间精密度	-	+(1)	-	+(1)
专属性 (2)	+	+	+	+

检测限度	-	-(3)	+	-
定量限度	-	+	-	-
线性	-	+	-	+
范围	-	+	-	+

注意：

-表示此项特征通常不用评价；

+表示此项特征通常要评价；

(1)假如已评价重现性（见术语表），可不需再评价中间精密度；

(2)缺乏专属性的分析方法，应由其他分析方法来作补充；

(3)有些情况下需要。

3 术语

1 分析方法（Analytical procedure）

分析方法是指进行分析的方式。应详细描述进行每个分析试验所必需的步骤。它包括但不局限于：样品、参比对照品、试剂的配制，仪器的使用，标准曲线的绘制，计算公式的运用等。

2 专属性（Specificity）

专属性是指可能存在某些组分（如杂质、降解物、基质等）时，对被分析物准确可靠测定的能力。

一种分析方法缺乏专属性时，可由其他辅助的分析方法作补充。

专属性有以下含义：

鉴别：确证被分析物符合其特性。

纯度检查：确保采用的分析方法可检出被分析物中的杂质的准确含量，如有关物质，重金属，溶剂残留量等。

含量测定（含量或效价）：提供样品中被分析物的含量或效价的准确结果。

3 准确性（Accuracy）

分析方法的准确性指的是真实值或认可的参考值与测量值之间的相近程度。

准确性有时也称真实度。

4 精密度（Precision）

分析方法的精密度指的是规定条件下对均质样品多次取样进行一系列检测结果接近程度（离散程度）。精密度可以从三个层次考虑：重复性，中间精密度。重现性。

精密度考察应使用均质的、可信的样品。如果得不到，可用人为配制的样品或样品溶液进行研究。

分析方法的精密度通常以多次测量结果的变异性、标准偏差或变异系数来表达。

4.1 重复性 (Repeatability)

重复性是指在同样的操作条件下，在较短时间间隔的精密度：也称为间隙测量精密度 (Intra-assay precision)。

4.2 中间精密度 (Intermediate Precision)

中间精密度是指实验室内部条件改变，如不同日，不同试验分析者，不同仪器等情况下的精密度。

4.3 重现性 (Reproducibility)

重现性是指不同试验室之间的精密度（合作研究，通常用于方法学的标准化）。

5 检测限度 (Detection limit)

某一分析方法的检测限度是样品中的被分析物分析物能够被检测到的最低量，但不一定要准确定量。

6 定量限度 (Quantitation limit)

某一分析方法的定量限度是指在合适的准确性和精密度下，能够定量测定样品中被分析物的最低量。它是样品中含量的最低量，能够定量测定样品中被分析物的最低量。它是样品中含量低的化合物定量测定的参数，特别适用于杂质和/或降解产物的测定。

7 线性 (Linearity)

分析方法的线性是指在给定的范围内检测结果与样品中被分析物的浓度（量）成比例关系的能力。

8 范围 (Range)

分析方法的范围是样品中被分析物的较高浓度（量）和较低浓度（量）之间的一个区间。并已证实在此区间内，该方法具有合适的准确性、精密度和线性。

9 耐用性（Robustness）

分析方法的耐用性是指在试验参数被故意地发生细小改变时，检测不受影响的能力，用于说明正常使用时的柔韧性。

部分 2:

分析方法的验证：方法学

于 1996 年 11 月 6 日经 ICH 指导委员会批准通过作为四阶段草案，并于 2005 年 11 月并入主指导原则中，推荐给 ICH 的三方法机构采用。

介 绍

部分 I 阐述了分析方法验证中应考虑的项目，本文件是对部分 I 的补充，其目的是对每一种分析方法的各种验证项目提供指导和建议。在某些情况下（如专属性验证）为了确保原料药和制剂的质量，应对综合起来的几个分析方法的总体能力进行研究。此外文件对注册申报中必须要递交的资料做了指导。

验证中的所有相关数据和验证项目的计算公式都应申报并进行讨论。

指导原则中未提到的方法，也可应用和采纳。申报者的责任应是选择最适合他们产品的验证方法和方案。但要切记，分析方法验证的主要目的是证明其适合于预期目的。对于生物技术产品和生物制品，由于它们的复杂特性，在某些情况下，其分析方法也许与本文件中提到的方法不同。

在整个方法学验证研究过程中，必须使用已鉴定并标示纯度的参比物，其纯度要求取决于预期用途。

与部分 I 一样，为清楚起见，本文件在各独立的章节中考虑了不同的验证内容，这些章节的排列反映了建立和评估一种分析方法的过程。

事实上在进行实验设计时，通常可以同时考虑几个验证项目，以了解分析方法分析能力的合理性和总体情况，如：同时考察专属性、线性、范围、准确性和精密度。

1 专属性

在鉴别、杂质测定和含量测定的方法学验证中应进行专属性研究，用于证明专属性的方法取决于分析方法的预期目的。

一般一种分析方法不太可能对某一特定的被分析物具有专属性（完全识别），在此情况下，建议采用两种或两种以上的分析方法以达到能识别的水平。

1.1 鉴别

合适的辨别试验应能区别出可能存在的几个结构相似的化合物。可以通过与已知参比物比较，从含有被分析物的样品中得到的正结果和从不含被分析物中得到负结果来确定。此外鉴别试验也可以取与被测物结构相似或相关的物质来试验得不到正反应来证实。在选择这些可能会产生干扰的物质时，应考虑是否能对可能发生的干扰有科学的判断能力。

1.2 含量测定和杂质检查

在色谱方法中，应用典型的色谱图来证明专属性，并在图上恰当地标出每一种成分，其他分离技术也应如此。

在色谱方法中，应在一定程度上考察临界分离。对临界分离，可用两个洗脱程度最接近的化合物的分离度来证明其专属性。

当用非专属性方法测定含量时，可用其他辅助性的分析方法来证实整体的专属性。如：用滴定法来测定出厂原料药的含量，可结合使用合适的杂质检查方法。

下述方法均适用于含量测定和杂质检查：

1.2.1 可以得到杂质

对含量测定来说，专属性应提供被分析物在杂质和（或）赋形剂存在时能被识别的证明。实际操作中可以在纯物质（原料或制剂）中加入一定量的杂质或辅料，与未加杂质或辅料的样品测定结果相比较，以证明其含量测定结果不受这些物质的影响。

对杂质检查来说，通过在原料药或制剂中加入一定量的杂质，证明各杂质能逐个分离，并也能与样品中其他组分分离。

1.2.2 无法得到杂质

如果杂质或降解产物的对照品不能得到，专属性可以通过将含一定量的杂质或降解产物的样品测定结果与另一种成熟的方法测定结果比较，如药典方法或经验证的其他方法（与该方法不相关的方法）进行比较来证实。必要时，应包括对放置在强力破坏试验条件下，如：光，热，湿，酸碱水解及氧化情况下的样品的测定。

- 对于含量测定，需要比较两种方法的结果。
- 对于杂质检查，要比较杂质的概况。

峰的纯度试验是很有用的，它显示被测物色谱峰是单个还是多个成分（如二极管阵列、质谱）。

2 线性

线性关系应在分析方法的“范围”（见第 3 节）内进行评价。可用所建议的分析方法，直接对原料药（用标准储备溶液稀释）和/或对分别称取的制剂组分混匀物进行测定，以证明其线性。后者可在“范围”的验证中进行研究。

线性关系应以信号对被分析物的浓度或含量作图，根据图形是否呈线性进行评价。如果有线性关系，可用适当的统计方法估算试验结果，如，最小二乘法。在某些情况下，为使分析结果和样品浓度呈线性关系，在回归分析前应对测试数据进行数学转换。由线性回归估算所得到的数据本身，又有助于证明线性程度的好坏。

上报资料中应含相关系数、y 轴上的截距、回归线的斜率、剩余方差。还应包括数据图表。另外，分析实测值与回归线的偏差也有助于对线性作评价。

一些分析方法，如免疫测定法，在任何转换后，均不能证明呈线性，在这种情况下，分析的响应值应用样品中被分析物的浓度（含量）的适当函数来表示。

为建立线性，建议至少用 5 个浓度。若用其他方法应经验证。

3 范围

特定的范围一般是从线性研究中得到的，并取决于分析方法的预期应用。确定范围的方法是：样品中含有被分析物的量，无论在范围内或在范围末端，该分析方法均能获得良好的线性、精密度和准确性。

应该考虑下述最小的规定范围：

*对原料药或成品的含量测定：一般应在测试浓度的 80~120%；

*对含量均匀度检查：应在测试浓度的 70~130%，超出此范围，应有正当理由，主要是根据剂型的特点（如：计量型的吸入剂）。

*对于溶出度测试：应为规定范围的±20%，例如，如果是控释制剂，规定 1 小时后达到 20%，24 小时后为 90% 以上，它的合理范围应为标示量的 0~110%。

*对于杂质检查：应为杂质报告水平至规定限度的 120%。对已知有异常功效的、有毒的或有意外药理作用的杂质，其检测限度和定量限度，应与该杂质必须被限制的水平相当。

注意：在研制阶段进行杂质检查方法验证时，有必要将范围建立在建议的限度周围。

*如果用一个试验同时进行含量测定和纯度检查，且仅适用 100% 的标准品，线性范围应覆盖杂质的报告水平至规范中规定含量的 120%。

4 准确性

应在分析方法规定的范围内建立准确性。

4.1 含量测定

4.1.1 原料药

下列几种方法可用于验证准确性：

- a) 用该分析方法去测定已知纯度的被分析物（如：参比物质）
- b) 将建议采用的分析方法的结果与另一种成熟的分析方法的结果比较，后者的准确度是已知的（与该方法不相关的方法，见 1.2 节）。
- c) 准确性可以在精密度，线性和专属性建立后，推论而得。

4.1.2 制剂

下列几种方法可用于验证准确性：

- a) 用该分析方法去测定按处方量制成的混合物，其中加入了已知量的被分析原料药。
- b) 在不能获得制剂所有组分的情况下，可以将已知量的被分析物加入到制剂中，或者将测得结果与另一种已鉴定的分析方法分析的结果进行比较，后者的准确度是已知的（与该方法不相关的方法，见 1.2 节）
- c) 准确性可以在精密度、线性和专属性建立后推论而得。

4.2 杂质（定量）

准确性应使用在样品（原料药/制剂）中加入已知量杂质的方式来评价。

在不能获得含有确定杂质和/或降解产物的样品情况下，可以考虑与其它不同的方法（见 1.2 节）测得的结果比较。可以使用原料药的响应因子。

应明确如何测定单个或总的杂质量，如：用相对于主要被分析物所占的重量百分比或面积百分比来表示。

4.3 申报数据

准确性的评价需要对涵盖所规定的线性范围的至少 3 种浓度的不少于 9 次的测定（如：按完整分析步骤对 3 中浓度分别测定 3 次）。

准确性应通过在样品中加入已知量的被分析物测得的百分回收率或平均值与实测值的差异及其置信区间来报告。

5 精密度

含量测定和杂质定量测定方法的验证，均包括对精密度的考察。

5.1 重复性

重复性的验证方法：

（1）在方法规定线性范围内至少测定 9 次（如：3 种浓度/每种重复测定 3 次）；或（2）至少用 100%的试验浓度测定 6 次。

5.2 中间精密度

中间精密度的考察程度应根据分析方法预期使用的环境而定，申请者应确定随机事件对分析方法精密度的影响。需研究的典型变异包括：日期、分析者、仪器等。没有必要逐个考察每个因素。鼓励使用试验设计（矩阵）。

5.3 重现性

重现性通过试验室之间的试验来评价。当分析方法需要标准化时，如收载到药典中的方法，则应考虑重现性。申请上市的文档中不需要这些试验数据。

5.4 申报数据

每一种精密度研究都必须报告标准差、相对标准差（变异系数）和置信区间。

6 检测限度

根据分析方法是采用非仪器分析还是仪器分析，可用几种方法来确定检测限度，除了下面所列的方法外其他的方法也可能被接受。

6.1 根据直观评价

直观评价可以用于非仪器分析方法，也可用于仪器分析方法。

检测限度的测定是通过对一系列已知浓度分析物的样品进行分析，并以能准确测得被分析物的最小量来建立。

6.2 根据信噪比

该方法仅适用于出现基线噪音的分析方法。

信噪比的测定是通过比较含已知低浓度被分析物的样品与空白样品的测试信号，确定被分析物可被准确地检测的最小浓度。一般可接受的检测限度是信噪比为 3:1 或 2:1。

6.3 根据响应值的标准偏差和斜率

检测限度 (DL) 表示为: $DL = 3.3\sigma / S$

σ = 响应值的标准差

S = 校正曲线的斜率;

斜率 S 可以从被分析物的校正曲线来估算。 σ 的值可由多种途径估算如:

6.3.1 根据空白的标准差

通过几份空白样品的分析，测出分析背景响应值的大小，然后计算这些响应值的标准偏差。

6.3.2 根据校正曲线

在包含 DL 的范围内，通过对含被分析物的一组样品的分析，建立标准曲线。回归线的剩余标准偏差或回归线 y-轴截距标准偏差都可作为标准偏差。

6.4 申报数据

必须同时提供检测限度和测定限度的方法。如果 DL 是根据直观评估或信噪比得来的，应提供相关的一些色谱图。

如通过计算或外推法得到检测限度的估算值，可另取一系列接近或等于检测限度样品进行逐个分析，以验证这一估算值。

7 定量限度

根据检测方法是用非仪器分析还是仪器分析，可用几种方法来评价定量检测限度。除了下面列出的方法外，其他方法也是可以接受的。

7.1 根据直观评价

直观评价既可用于非仪器的分析方法，也可用于仪器分析方法。

一般通过对一系列含有已知浓度被分析物的样品分析，在准确度和精密度都符合要求的情况下，被分析物能被定量测得的最小量即为定量限度。

7.2 根据信噪比

该方法仅适用于出现基线噪音的分析方法。

信噪比的测定是通过比较一系列含有已知低浓度被分析物的样品与空白样品的测定信号，以其中被测物能够准确定量的最小浓度为定量限。一般取信噪比为 10:1.

7.3 根据响应值的标准偏差和斜率

定量限度 (QL) 表示为: $QL = 10\sigma / S$

σ = 响应值的标准偏差

S = 校正曲线的斜率;

斜率 S 可从被分析物的校正曲线估算。 σ 值的估算可由多种途径得到。

如:

7.3.1 根据空白的标准偏差

分析几份空白样品，得出分析背景响应的大小，然后计算这些响应的标准偏差。

7.3.2 根据校正曲线

通过对几份含有 QL 水平被分析物的样品的测试，建立校正曲线。回归线的剩余标准偏差或回归线的 y-轴截距标准偏差都可作为标准偏差。

7.4 申报数据

应提供定量限度及其测定方法。

应通过分析一系列接近或等于定量限度的样品来验证这一限度。

8 耐用性

在研制阶段，根据所研究的分析方法的类型，应考虑对分析方法的耐用性进行评估，该评估应能表明在对方法参数进行有意地改变后，分析方法依然可靠。

如果测量结果对分析条件的变化是敏感的，那么该分析条件就应适当控制或在方法中预先注明。通过耐用性评估，建立了一系列的系统适用性参数（如分离度试验），以确保在任何时候使用该分析方法都是有效的。

典型变化的例子:

--供分析用溶液的稳定性;

--提取时间。

在液相色谱条件下的典型变化例子:

--流动相 pH 值变化的影响。

- 流动相组分变化的影响；
- 不同柱子（不同的批号和/或供应商）；
- 温度；
- 流速；

在气相色谱条件下的典型变化例子：

- 不同柱子（不同的批号/或供应商）；
- 温度；
- 流速；

9 系统适用性试验

系统适用性试验是许多分析方法的必要组成部分。该试验是把分析设备、电子仪器、实验操作和被分析样品作为一个整体来进行评估。系统适用性试验参数是根据被验证的方法类型，对某一特定方法而建立的。进一步信息可参考药典。