

欧洲药典质量标准的起草 技术指南

Technical Guide for the Elaboration of Monographs

European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare

4th 2005

译者序

欧洲药品质量管理局 (European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 简称 EDQM & HealthCare) 创立于 1964 年, 原来的名称是 "European Pharmacopoeia Secretariat", 隶属于 1949 年创立的欧洲理事会 (Council of Europe, Directorate General II Social Cohesion)。1996 年更名为 EDQM。

2006 年, EDQM 新的办公楼和实验室竣工, 2007 年 1 月起 EDQM 更名为 EDQM & HealthCare, 位于法国 Strasbourg, Strasbourg 同时也是欧洲理事会和欧洲议会 (Parliament of Europe) 的总部。

EDQM 最主要的职责就是《欧洲药典》的起草、出版以及欧洲药典标准物质的制备和发放。欧洲药典委员会现有 37 个成员国, 其中包括 24 个欧盟国家, 包括 WHO 在内的 20 个国家为观察员, 我国于 1994 年成为 EDQM 的观察员。1969 年发行第一版《欧洲药典》(Vol.I)。第六版《欧洲药典》将于 2008 年 1 月 1 日生效。欧洲药典已经成为最具影响力的药典之一。受世界卫生组织资助, 我有幸于 2004 年对 EDQM 进行了短期访问, 并结识了时任欧洲药品质量管理局局长的 Agnes Artiges 博士及其他的 EDQM 官员和专家。2005 年 9 月, Artiges 博士率团来华参加 "首届中欧药典论坛" 并访问了中国药品生物制品检定所, 同年获得 Artiges 博士的授权翻译了 "欧洲药典标准物质指导原则 Guideline for Establishment Of European Pharmacopoeia Reference Standard" 并在《中国药品标准杂志》发表。

2005 年, EDQM 出版了 "欧洲药典质量标准的起草技术指南" 第 4 版, 这是欧洲药典委员会颁布的关于欧洲药典质量标准起草的技术规范和指导原则。由 EDQM 组织欧洲各国药品专家起草, 内容详实, 条理清晰, 科学性强且具有可参考性和操作性, 是质量标准起草的重要参考工具书, 涉及药品命名、杂质命名、对照品建立、标准体例。按照鉴别、检查、含量测定等药品检测项目的顺序进行排列。对国内药品标准起草、复核单位和人员以及药品检验的相关技术人员, 规范药品标准, 起草科学的药品质量标准有很好的借鉴和参考作用。

因此, 我于 2006 年获得 Artiges 博士的授权, 对本书进行翻译并出版, 供国内药品研发及药品检验相关技术人员参考。

本书并无附录, 正文中的附录均指《欧洲药典》中的附录, 比如: 附录 5.11 "各论中的性状" (General chapter 5.11 Characters section in monographs) 就是指《欧洲药典》的附录 5.11。请读者在阅读时注意。

我的两位同事, 中国国家药典委员会委员张启明教授和施亚琴博士的参与, 使得翻译工作能够顺利开展, 他们对本指南的翻译工作提供了很专业的建议, 包括对一些专业术语的用词等细节都进行了反复的斟酌, 对他们的帮助表示诚挚的谢意。

最后, 我特别感谢世界卫生组织国际药典委员、美国药典会委员和中国药典会资深委员、中国药品生物制品检定所的金少鸿教授。感谢金少鸿教授对本书翻译工作的支持和指导。

1 绪论

1.1 本指南的目的

本文件为(欧洲药典质量标准,亦称各论 monographs)的起草指南,同时也是与药欧洲药典的用户,尤其是药品生产企业\药品注册管理机构以及官方药品检验机构(简称 OMCL)交流各论起草原则的一种途径.因为各论起草的原则及指南应与药品注册管理机构执行的原则一致,所以本指南也可作为起草注册申请用质量标准的指导原则.

需要注意的是,起草的药品质量标准将作为强制执行标准,所以必须符合欧洲药典编纂委员会成员国的注册要求.因此,各论中检查和含量测定项下的测定方法必须按照起草时的条件进行方法学验证.

1.2 测定方法

药典原料药质量标准中选定的鉴别试验\纯度检查和含量测定方法应该是(欧洲药典)已经收载或者采用的方法.本指南中供各论起草单位参考的不仅包括(欧洲药典)附录中的检测方法,还包括已经颁布的类似药物的质量标准.上述考虑目的是保证药典内容的合理性\一致性及协调性,而且只有检测方法适用于指定用途时,上述原则才适用.尽管如此,还是应该致力于建立能显著改善灵敏度\精密度\准确度和选择性(专属性)的新方法.

必须按照本指南方法学验证及其相关章节所述的要求,对各论中的方法进行分析方法的验证.应向 EDMQ 提供保密的或者需要向用户提供的验证报告.

应有两个以上的实验室对各论中的测定方法进行确认,应向 EDMQ 提供经过确认的实验报告,以便保证未来的可溯源性.

任何分析方法的说明应包含所有能影响实验结果的因素,这些对保证有经验的分析人员在不需要预先准备研究背景的情况下,按照公认的实验室规范进行分析工作是非常必要的关键因素.应避免对相似方法描述的不一致.

如果一个分析方法将(或者可能)作为通用的步骤,或者该试验步骤需要较长的文字叙述并且会被多次使用,建议在药典附录中收载该分析方法,在各论中注明试验方法参见附录即可.应使用指定的样品量并按照药典方法进行分析,只有在供试品的数量有限\具有毒性作用或者价格原因等情况下,才可采取减少供试品用量的方法.

1.3 仪器

如果分析方法所采用的食品在欧洲药典委员会成员国不容易获得,按照药典中的描述,试验人员必须能够胜任该仪器的装配工作.

1.4 供试品数量

在规定鉴别\检查和含量测定用所需的供试品\试剂和溶剂的数量(质量和体积)时,欧洲药典规定同时还要给出称量的具体精密度,详见凡例.因此,在起草药典正文时需要考虑上述规定.

作为减少分析用溶液配制误差的指南,表给出了相对不确定度的估计值,供标准起草人参考.

为避免使用极少量或者说不必要的大量溶剂,制备稀释溶剂时,尤其是用于分光光度法的稀释溶液,经常会规定稀释步骤.当然,并不是所有稀释过程(通常为步或 3 步稀释)引入的随机误差都相

同.如果稀释程序对用途至关重要,应根据相对误差(允许误差除以标示体积)从常用玻璃仪器中选用适当的移液管和容量瓶并制定最优的稀释方法(按照常用公式:每步稀释的相对误差平方之和的平方根作为对照溶液稀释的相对误差的估计).

根据文献中玻璃仪器的容量公差限度标准,在给定的稀释比条件下,表 2 给出了最佳的稀释次数和稀释效果.相关指南详见表 2(需要注意的是,这些因素当中不包括计数误差).

表 1 制备分析用供试品溶液的相对不确定度

溶液浓度	溶液制备	相对不确定度 (%)		
		称量	体积	总不确定度
10g/100ml	10g/100ml	<0.01	0.05	0.05
	1g/100ml	0.02	0.12	0.12
	0.5g/50ml	0.04	0.17	0.17
	0.25g/25ml	0.08	0.23	0.24
	0.1g/10ml	0.02	0.50	0.54
1g/1000ml	1g/1000ml	0.02	0.05	0.05
	0.5g/500ml	0.04	0.07	0.08
	0.25g/25ml	0.08	0.23	0.24
	100mg/100ml	0.2	0.12	0.23
	50mg/50ml	0.4	0.17	0.43
	10mg/10ml	2.0	0.50	2.06
0.1g/1000ml	100g/1000ml	0.2	0.05	0.21
	50g/500ml	0.4	0.07	0.41
	25g/250ml	0.8	0.08	0.80
	10g/100ml	2.0	0.12	2.0
	5g/50ml	4.0	0.17	4.0
	1g/10ml	20.0	0.50	20.0
0.01g/1000ml	10g/1000ml	2.0	0.05	2.0
	5mg/500ml	4.0	0.07	4.0
	1mg/100ml	20.0	0.12	20.0

假定称量的不确定度为 0.2mg,以此计算相对不确定度.

*译者注.按照 1g/1000ml 计算溶液制备应为 0.25mg/250ml.

表 2 采用玻璃仪器进行溶液稀释的相对误差 (移液管 P/容量瓶 F)

稀释比例	稀释步骤	第一步稀释		第二步稀释		相对误差 (%)
		移液管	容量瓶	移液管	容量瓶	
1/2	1	25	50			0.16
1/2.5	1	20	50			0.18
1/5	1	20	100			0.17

1/10	1	25	250			0.13
1/12.5	1	20	250			0.16
1/30	1	15	500			0.20
1/50	1	20	1000			0.15
1/100	2*	25	250	25	250	0.18
1/125	2	20	250	25	250	0.20
1/160	2	25	1000	25	100	0.19
1/200	2	25	500	25	100	0.18
1/250	2	20	250	25	500	0.20
1/400	2	25	250	25	1000	0.18
1/500	2	20	500	25	500	0.20
1/1000	2	20	1000	25	500	0.20

摘自:R.B.Lam,T.L.Isenhour.通过玻璃仪器的选择降低标准溶液制备过程中的相对误差. Analytical Chemistry, 1980, 53, 1158-1161.

译者注.根据稀释比例,稀释步骤应为 2 步稀释.

1.5 试剂

当试剂的一个或多个性质对其用途有决定作用时,必须明确该试剂的质量,必要时还可以规定适当的方法对试剂的适用性进行检测.通常采用分析纯试剂,给出试剂的名称\化学文摘号和分子式已经足够.

如果限度检查中所需的试剂\试液\滴定液和标准溶液已经在(欧洲药典)的试剂和试液中收载,就可以使用药典收载的试剂和试液.如果偶尔使用一次的简单试液或溶液,在各论中应给出配制方法.

应当避免使用公认的剧毒试剂(致癌物),尤其是那些难于控制毒性的物质,比如在接触细粉状试剂或显色剂时.避免使用在欧洲药典委员会的一个或多个成员国禁止或限制使用的物质.

1.6 商品名称

在起草的各论中应采用脚注的形式给出色谱柱或薄层板的商品名称,当试剂的商品名称有助于分析人员的工作时也应脚注形式给出(比如只能从某个供应商获得的检测试剂盒子或试剂).在正式发行的药典文本中不出现商品名称.但是,在药典收载该各论后,以在 EDQM 网站的数据库中找到相关色谱柱\薄层板和试剂的商品名称.

1.7 标准物质

关于标准物质的政策和指导原则详见附录 5.12 Reference standards(已于 2006 年 3 月正式生效,译者注).EDQM 负责对照品候选原料的采购\标准物质的建立\保存和监测.许多标准物质,尤其是用于杂质控制的标准物质的数量有限.在药液药典论坛发表各论草案前,应当向 EDQM 提供足量的标准物质候选原料,EDQM 将根据获得的标准物质原料的数量情况,制定标准物质使用的最佳方案(比如混合标准物质替代单个标准物质的供应).EDQM 的目标是在各论草案被讨论通过的同时,提交标准物质报告供委员会审核.如果不能同时提供,在标准颁布后最短时间

内提供标准物质.

从第五版(欧洲药典)开始,改变了红外标准图谱的建立原则,此前,如果仅供红外鉴别,药典委员会的选择是建立标准红外图谱.目前的原则是,除获得化学对照品有实际困难等特殊情况下,用化学对照品替代标准图谱.

因为许多标准物质的数量有限,尤其是杂质,药品标准中配制溶液所需的杂质称样量必须保持最小.

2 药用物质的药典质量标准

药典质量标准是根据成员国批准的该药物用物质的质量标准而制定的.当一个各论的起草被纳入工作计划后,为确定上述物质的生产企业,EDQM 将进行问询并将收到的所有数据作为药典各论起草的参考.在欧洲药典论坛发表标准草案之前,应邀请有关各方参加各论的起草工作,因为对于有关各方确认各论草案而言,3 个月公示期通常太短.

在起草任何各论前,收集该物质的尽可能多的资料是必需的.

对于确定如下问题是特别必要的;

—该物质是天然产物\合成化合物还是半合成物质;

—该物质是单一化合物还是混合物

—详细的制备方法

—是否有不同的晶型,因为,晶型参数的不同会影响物质的性质;

—对映异构体\消旋体或者其他对映异构体的混合物;

—是否有不同的结晶水

—是否可以获得不同的化合物形式(酸\碱\盐等).

必须参考药典或者与起草各论相关的其他文件,确定类似的药物是否已有标准或者已经建立了质量标准.如果已有类似药物的各论或标准草案,除非有足够的理由(比如分析技术的进步)对已有标准进行修订,否则,应确保准备起草的各论遵循相同的原则.

各论中所述的物质可能是特别类似的一组化合物的一种,辅料更是如此,比如聚乙二醇.起草的主要物质的各论应明确阐明该类物质的共同属性,该各论能用于该类似物质中单个物质的鉴别.欧洲药典收载的所有活性物质和辅料都符合药用物质(2034)总论中的规定.

如有世界卫生组织制定的国际非专利名称(INN),应采用 INN 名称;以阴离子\阳离子\水合物\二水合物或无水物(如果已经有水合物存在)等进行适当的补充.以往的情况是,除非已知有两种水合结构或者有公共完全方面的需要(比如,高水分能导致处方错误),在名称中并不注明水合度.阴离子和阳离子应以“一价”\二价或三价表明离子的化合价.

如果批准的药品中使用的物质在成员国只供兽药用,应在名称中注明“供兽药用”.

2.1 定义

必须以最大可能的准确度确定化合物的结构并建立下列参数:

—结构式;

—分子式和相对分子量;

—化学名

此项提供了如下特别信息:

- 存在异构体的可能性,以便确定标准所用为何种异构体,否则应注明本品为异构体的混合物.如果是光学异构体,仅考虑旋光的方向是不够的.用 R/S 系统或其他适当的系统(如碳水化合物和氨基酸)命名该物质不对称中心的绝对构型
 - 确定水合或溶剂化状态,以便将结晶水和溶剂含量固定的物质与溶剂含量不同的物质,明确地区分开来.对于前一种物质,规定其水分或溶剂的含量范围,对于后一种物质,只给出水分和溶剂的最大限度.如果一种物质既有无水物或非溶剂化形式,又有水分或溶剂含量不同的水合物或溶剂化物,如果所有这些物质都被使用,应将上述各物质作为独立的各论分别起草.
 - 一些化合物,特别是那些来源于天然产物以及经发酵的产物可能不容易将某些有关物质分离(比如奎宁的盐).这些物质按如下原则处理:
 - 当获得的物质很纯并且可以采用物理化学的方法进行含量测定,作为化学药品处理.
 - 伴随有一定比例的有关物质,只给出主要成分的精确定义(如:新霉素).
 - 多种组分的混合物,有时难于定义,总体的描述也许就足够了(如:制霉菌素)
- 如有可能,必须给出物质的来源(获得该物质的生物体的名称和种属),如果适用的话,各论中应注明该物质为半合成物质并且是发酵产品的衍生物[阐明符合总论“药用物质(2034)”规定的用途]

2.1.1 化合物

在治疗过程中,有时会用到组成比例明确或不明确的化合物(比如茶碱-乙二胺),甚至混合物.在这种情况下,需要精确地指明化合物或混合物中的各个组分并给出化学结构式和组分间的比例关系.

2.1.2 含量

各论中描述的物质不会是完全纯的物质,只是所含的杂质量有限.因此,含量是定义项下的重要内容.该物质的含量必须符合规定的含量限度.制定含量限度必须考虑含量测定方法的精密度以及该物质可接受的纯度.含量限度通常表述为按干燥品计或按无水物计;根据残留溶剂对药品含量进行校正的方法已被广泛理解并接受.(见总论“药用物质(2034)).

对于非专属性的含量测定方法(如滴定法),除另有原因外,含量限度通常为 90.0%-101.0%.对于采用分离技术(如液相或气相色谱法)的专属性含量测定方法,含量限度的上限一般为 102.0%;考虑到杂质的情况,含量的下限将可能低于 98.0%.

在制定活性物质含量限度时,应考虑如下因素:

- 制备工艺,工艺决定了物质的合理纯度;
- 分析方法的准确度和再现性
- 当分离技术既用于有关物质检查又用于含量测定时,制定含量的限度需要考虑杂质的最大允许含量以及分析的误差;
- 贮藏期间允许的药物降解程度的评价
- 数批(最少 3 批)产品的足够数量的实验数据,如可能,数据应来自不同来源\不同时间生产的产

品.

如果待测物质只含有不影响含量测定的杂质,或者只含有极低比例的影响含量测定的杂质,可以直接使用含量测定的结果.然后表述如下:按 XXX(纯物质的化学定义)计,本品的含量应不低于 X%并不得超过 Y%(最小为 100.5%,通常只稍高出一).物质的含量经常以无溶剂物计或无溶剂无水物计.总论“药用物质(2034)”中给出了按无溶剂物计的含 量计算规定,该规则也适用于那些未给出残留溶剂检查的各论中物质的含量测定.

如果待测物质含有相对较高比例的杂质(几个百分点),测定时作为活性组分计入含量,应采用适当的文字表述(比如,以奎宁的.....盐计,奎宁.....盐占总生物碱的含量为 X%).

特殊情况下,含量只以部分分子或元素计(比如,轻质碳酸镁中氧化镁的含量测定或者硬脂酸镁中镁的含量测定).

微生物法抗生素含量测定,活性组分的含量以国际单位计(IU),如有国际单位,只给出最小值.见“

2.5 含量测定”

2.2 性状

正如凡例中的定义,性状项下的叙述不是严格意义上的解释,也不能认为是分析测定的要求.性状项下文字的主要内容可理解如下:

2.2.1 外观

一般包含物质的颜色和物理状态.无限定条件下,不能使用“白色”一词,因为,以一种标准的白色物料为对照,很少有药物表现为真正的白色.当然,并不表示需要进行这样的比较.但是,经验表明,一些药典的用户坚持将颜色的比较作为采购合同的一部分.因此,以“白色或类白色”替代“白色”.在正确颜色的叙述中,以主要颜色或主要颜色组合来表述.

颜色:用到下列术语

Black 黑色	Grey 灰色
Blue 蓝色	Orange 橙色
Brown 棕色	Pink 粉色
Colourless 无色	Red 红色
White/almost white 类白	Violet 紫罗兰色
Green 绿色	Yellow 黄色

可能用到的复合颜色

English 英文	French 法文
Greenish-blue 绿蓝色	Bleu-vert
Bluish-green 蓝绿色	Vert-bleu
Violet-red 紫红色	Rouge-violet
Reddish-violet 红紫色	Violet-rouge
Brownish-red 红棕色	Rouge-brun

在英文中,主色合成词中第二位的颜色,法文中的主色为合成词中第一位的颜色.应避免使用柠

柠檬黄\牛皮色\鲑鱼肉色等颜色;标准词典给出了与上述颜色等同的光谱颜色(如:牛皮色用“暗黄色”表述).还会用到下列形容词:淡\微\荧光的\浓\浅\暗晦\深暗.

需要指出的是,上述规定的颜色和颜色组合也适用于酸/碱度检查或滴定法含量测定中指示剂颜色变化的描述.

2.2.2 味道

不需考虑药用物质的味觉感受情况

2.2.3 Odour 气味

一般地,不对气味的描述进行规定.特别是对于吸入后引起毒害作用的物质,没有气味的表述参考.其他情况下,对气味的描述必须合理.

2.2.4 Solubility 溶解度

对药用物质溶解度进行评价的推荐方法见附录 5.11 “各论中的性状”。报告溶解度的术语详见凡例。选择的溶剂一般限于水、乙醇和脂溶性溶剂。不对氯仿和乙醚中的溶解度进行叙述。特殊情况下,同一药用物质的不同样本间的溶解度会有显著不同,尽管各样本的组分符合药典限度规定。因此,对于溶解度受溶剂影响的物质,应给出一个溶解度范围,比如:“略溶至溶解等”。对于脂肪油等物质,实践中经常将其他溶剂中和溶解性或混溶性一并加以描述。有些情况下,注明该物质在碱性溶液或酸性溶液中溶解度可能是有帮助的,特别是在上述溶剂中很难溶解的物质,可能需要注明特殊的溶剂,比如:二甲基甲酰胺或二甲基亚砜。没有必要给出该物质在药典检测中用到的所有溶剂的溶解度。

2.2.5 稳定性因素

应给出暴露在空气、光和水气导致药用物质不稳定的证据,比如:硫酸毒扁豆碱暴露于空气和光照后会变红色。任何在性状项下的上述稳定性信息应与药典品种的其他表述分开并单独给出。

2.2.6 引湿性

附录 5.11 “各论中的性状”给出了测定物质吸收空气中水分趋势的一种推荐的实用方法(不是真正引湿性的测定)。一些物质具有引湿性或者潮解性,在分析的称量过程中会造成困难。在此情况下,附录 5.11 中用本术语给了分析人员在处理该物质时需要注意的事项。

当性状项下注明该物质具有引湿性或者潮解性,需要在密封条件下贮藏。

2.2.7 固态性质

固态性质包括结晶性、多晶型、固体密度、固体粒径、比表面积。固态性质,特别是多晶型和伪多晶型,对药物以及药品的生物利用度可能会有影响。应参考附录 5.9 “多晶型”中的内容。附录 5.11 中给出了推荐的结晶性检查方法。

具有功能的辅料的固态性质应按照附录 5.11 中的规定处理(如下)。

药典中关于多晶型的阐述是提醒用户,在制剂研发过程中需要考察这一现象。当已知该物质存在多晶型现象时,应作为独立的内容给出这一信息(该物质具有多晶型)。

当已知存在多晶型时,应区分两种情况:

通常,各论不排斥任何可能的药物晶型。也有例外,如果该物质仅用于固体制剂,从生物利用度的角度,某个晶型更有优势或者更安全/有效,各论中限定收载的药物应为该晶型。对多晶型进行鉴别的技术手段在鉴别中收载。

2.2.8 其他特性

其他的物理特性作为信息可能是有用的,但是,在鉴别和检查项下又不能完全准确定义,可能

在性状项下进行阐述。熔点就经常采用这一原则，因为不能足够准确地报告一个熔点范围（如果有准确的熔点，可能就归在鉴别项下了）。当有可能发生分解时，必须指明。其他与报告相关的一般性状，都列在性状项下，包括在特殊中的旋光方向；对于放射性物质，注明放射核素的半衰期以及射线类型。

2.2.9 溶液的稳定性

如果已经该物质在溶液中有可能快速降解，应作为注意事项给出这一信息。

2.3 鉴别

2.3.1 一般鉴别

各论中鉴别项目的目的就是为待测物质的真伪鉴定提供确证信息。按照药典方法进行的鉴别试验的适用范围非常有限，不同于未知物质的结构确证或者未知混合物的组分测定。不要将物质鉴别的任务与纯度评价或者药物规格测定混淆，尽管三者之间最终是相互补充的。

遵循上述原则，将鉴别项下的物理和（或）化学试验和反应综合起来，就保证了鉴别方法具有可能好的专属性。鉴别试验的专属性应保证结构类似的活性物质和辅料能被区分开来。鉴别试验也不能太灵敏，比如应避免由允许限度内的杂质引起的错误的反应，除了将待检样本与市场中的其他药物能够区分外，鉴别试验不需要更多的试验要求。在制定鉴别试验时，还需要考虑完成试验操作所需的时间。

一般地，只给出一套鉴别试验方法。为了使药典用户能在复杂的仪器方法和其他方法之间进行选择，在合理的情况下，也可能会给了两套鉴别方法。通常，医院和（或）社区药店使用药物时可在两套鉴别方法中进行选择。各论中会给出“第一鉴别法”和“第二鉴别法”的小标题。如果能证明所用的物质或药品能溯源到完全符合药典标准的某个批次的产品，就可以用“第二鉴别法”中的试验替代“第一鉴别法”。

有些各论中的纯度检查方法在经过适当的修订后，也可能适用于鉴别用途。可以采用“照检查项下方法”的格式对鉴别试验进行表述。当药物与类似相关物质之间的区别取决于药物的性质，而药物的这些性质又是药物纯度或药物组分间比例控制的参数时，特别适用于上述格式，比如不同水合物的水分、不同异构体的旋光度、链长度不同的同系高聚物的黏度。即使鉴别项下包括需要参见其他项下的方法，各论中鉴别项下的试验已能完全满足鉴别需要。

不应孤立地对待各论中的原料药（辅料），当考察一个鉴别系列方法时，不管是否是药典各论中的药品的（辅料），希望在检测该药物或辅料的类似物质时，能利用系列鉴别方法中几个鉴别试验的组合，成功地将一个物质与上述物质中的其他物质区分开来。对鉴别项下的方法必须进行验证。

对于药典中性质类似的品种，为了能将每个物质与其他类似物质区分开来，有时需要增加非专属性但具有区分力的鉴别试验法。

下文例举出了一些鉴别方法及其相关的具体指导原则

2.3.1.1 需要复杂仪器设备的鉴别方法

分光光度分析法 比如记录药物的红外或核磁共振光谱

色谱方法 包括气象色谱法（GC）或液相色谱法（LC）

2.3.1.2 其他方法

测定药物的物理常数，比如熔点、凝点、沸点、比旋度、紫外光谱、吸收系数、相对密度、折光系数和黏度。

化学反应，比如颜色或沉淀反应（包括衍生物或降解产物的形成，可能随后对反应产物进行物

理学检查)、化学参数的测定(皂化值、酯化值、羟值和碘值)。

薄层色谱法

2.3.2 红外吸收光谱

通常认为红外光谱是一种令人满意的用于鉴别非电离有机物质(不是有机酸或碱的盐)的独立方法。该方法必须使用标准物质或标准图谱。目前更倾向于使用标准物质而不是标准图谱。只有在提供标准物质有困难的情况下,才会使用标准图谱。

通过红外光谱的比较,可容易的将有机物质的有机盐和该有机物质的某些无机酸盐(比如磷酸盐或者硫酸盐)区分开来。但是,如果样品是硫酸盐,需要将红外图谱的记录范围从常规的 $4000\text{cm}^{-1}\sim 600\text{cm}^{-1}$ 扩大到 $4000\text{cm}^{-1}\sim 400\text{cm}^{-1}$ 。

除非在建立标准时发现了为了获得满意的图谱需要特别的制样方法,否则药典正文项下不对制样方法进行规定(压片、卤化盐夹片法、糊法等)。

某些情况下,如果单独红外光谱不能满足下列鉴别项目的确定要求,就需要在红外光谱的基础上增加其他试验。

2.3.2.1 有机酸(碱)的盐

对于组成一个有机物质的某些离子或基团,如果在附录的鉴别项下有多个试验方法,通常只需采用其中一个方法即可。

2.3.2.2 化学有关物质

当待测样品中存在的有关物质使红外光谱与标准图谱有差异时,红外鉴别不能满足明确地进行物质鉴别的要求。在此情况下,除红外光谱测定外,还应增加熔点或采用标准物质的薄层色谱试验。

2.3.2.3 多晶型

药典附录允许重结晶后进行光谱测定。当各论中阐明该药物具有多晶型时,除非红外鉴别的目的就是控制药物的晶型,确定供试品是否与标准物质的晶型一致,否则,会在正文中给出重结晶的条件。如果控制药物的晶型,正文会规定“记录红外光谱前不得进行重结晶处理”。

例外的情况就是,当正文中规定了药物的指定晶型而红外光谱又不足以表现晶型的特征时,就需要增加其他的试验。

2.3.2.4 光学异构体

为了确定特定的异构体或消旋体,需要增加比旋度或则旋光度测定。

2.3.3 紫外-可见吸收光谱

本方法常用于非专属性的鉴别用途,除非吸收光谱表现出几个最大和最小吸光值,或者表现出特别强或特别弱的吸收区等现象,才能像红外光谱一样具有专属性。紫外-可见吸收光谱鉴别一般不采用标准物质。因此,一个物质的紫外光谱极少能独立成为鉴别的判断依据。

供试品溶液的浓度应适当,使样品在 1cm 吸收池的吸光度值为 $0.5\sim 1.5$ 。

必须规定扫描的波长范围,一般不应扩展到截止吸收波长或者溶剂可能有干扰的波长范围。最大和最小吸收波长用整数表示,当给出较宽的吸收峰(谷)范围时,允许有 $\pm 2\text{nm}$ 的变动,当有必要给出肩峰的吸收波长时,可以用“大约 xxnm ”表示。

考虑到吸光物质浓度的变化以及实验误差,吸收系数也可用一个范围来表示(通常是 $\pm 5\%$ 的

变动范围)。需要注意的是仪器的允许误差为 ± 0.01 ，因此，由于仪器允许误差引起的相对百分变动值与该物质的绝对吸光值有关。另外，具有紫外-可见吸收的物质的含量随着允许的所含水分（或其他溶剂）；量值的变化而变化；当水分或其他溶剂的含量不超过 1%或者其含量符合严格的限度规定，就可以按原样准确计算该物质的吸收系数并设定相应的下肚。当吸收光谱中有一个以上的最大吸收波长时，可以用相对吸光值来取代单个波长的吸收系数，如果吸光值的比值不超过 5，就可以不用考虑样品中溶剂的影响，即不用对样品的吸光值进行校正。为了避免可能影响样品吸光值的杂质的引入，必须非常认真的选择溶剂以及在紫外-可见吸收光谱方面的溶剂纯度。

在某些情况下，可以通过一定波长范围内的紫外-可见吸收光谱进行药品鉴别，仪器的分辨率是获得预期特征图谱的关键因素（比如芳香族物质的图谱可反映精细结构）。在某些情况下，正文中会规定最小的分辨率。为了测定这一参数，需要改变狭缝的宽度，直到获得预期的满意图谱为止。与此相关的分辨率就可以根据实验结果测定，即按照附录 2.2.25 中的规定，测定 0.02%（V/V）甲苯的正己烷溶液的吸光度比值。各论中会给出最小的比值并保留两位有效数字。表 3 所示的狭缝宽度与吸光度比值的预期关系仅供参考。

表 3 分光光度计的分辨率与狭缝宽度的关系

狭缝宽度 (nm)	$\lambda_{\max}269\text{nm}/\lambda_{\max}266\text{nm}$	狭缝宽度 (nm)	$\lambda_{\max}269\text{nm}/\lambda_{\max}266\text{nm}$
0.25	2.3	2.0	1.4
0.5	2.2	3.0	1.1
1.0	2.0	4.0	1.0

2.3.4 熔点、凝点和沸点

只有当这些物理常数被明确规定，并且测定时没有分解或者伴随的分解没有达到使熔点极端依赖于实际操作模式的程度时，才具有鉴别物质的价值。还必须考虑可能存在的多晶型现象；即使熔点只在性状项下给出，也必须给出不同晶型间熔点的差别。有一种情况例外，当规定某种晶型为药用晶型时，可以通过测定熔点帮助排除不期望的晶型。

然而，应当注意观察到的熔点可能只是表观熔点：在熔点测定过程中可能发生多晶型间的固-固转化，所测得的结果只是最终晶型的熔点。

单独的熔点测定或者附加的化学反应都不足以完成对一个药物进行鉴别。但是，增加薄层色谱法等其他的鉴别试验，往往可以提供足够的鉴别证据。药典规定毛细管法的测定结果是药物颗粒的最终熔点。千万不要与熔程（距）混淆，尽管有时候熔点和熔程都给出一定的温度范围。

2.3.5 比旋度

当药典收载的药物具有光学活性并且存在对应异构体时，在鉴别项下会进行旋光度检测或参见光学纯度检查项下的试验。如果既有消旋体（或消旋混合物）也有对应异构体可供药用时，检查项下将进行旋光度检查，并在鉴别项下标明参见检查项下。当只有消旋体可供药用时，如果手性物质的比旋度已知，并且旋光度测定能够提供消旋体的特征参数时，在检查项下进行旋光度测定。

2.3.6 薄层色谱法

本鉴别方法需要使用对照品,结合原位的化学反应,也就是在薄层展开后用适当的显色剂进行显色,可以增强 TLC 鉴别法的专属性。TLC 中的显色反应在试管中是不能重现的。

在有关物质检查中,保证关键化合物对的分离是非常重要的,尽管这种分离在鉴别试验中只起到很小的作用。鉴别项下并不要求关键化合物对的分离,在检查项下才要求关键化合物对的分离度。但是,在方法的建立和验证阶段,必须证明该方法具有将待测药物与其相似物质分离的能力。

为了确证所用薄层色谱板符合使用要求,在试剂项下会规定分离度试验。试验的目的是建立质量控制体系,供 TLC 用户需要时进行检验。显然,这种通用程序并不适用于所有的 TLC 分离系统,尽管为了保证药品的鉴别试验,可能仍然需要对色谱条件的分离能力进行规定。如果出于保证鉴别试验准确的目的,在鉴别项下会规定分离度要求。

如果适用的话,纯度检查项下的 TLC 系统更适于作为鉴别方法。用于鉴别试验的供试品溶液和对照品溶液的浓度应适当降低,使点样量在 5~20ug。有时可能需要将某个通用检测系统变更为更有区分力的检测系统。

关于色谱方法的详细技术指导原则将在有关物质检查中讨论。

2.3.7 气相色谱法和液相色谱法

TLC 鉴别项下的基本原则经过必要的修订后可适用于本试验方法。气相和液相色谱法很少用于鉴别试验,如有应用也是借用检查或含量测定项下的色谱条件。只有没有适当的替代方法的情况下,才会采用气相和液相色谱鉴别方法,往往并不单独将气相和液相色谱法作为鉴别方法。

2.3.8 化学反应鉴别

化学鉴别反应一般都是药典附录中收载的常用化学基团鉴别反应。当附录 2.3.1 中某个离子或基团有多个鉴别反应时,药典各论中一般只需要选择其中一个化学反应作为鉴别试验即可。需要注意试验中可能影响鉴别反应的试剂或溶液的量。检查项下的反应也同样适用这一原则,应在各论中详细给出。

避免使用气味或者味道作为鉴别项下的判断标准。

选择每个化学反应应能对药物分子的不同基团进行鉴别。

同系物间的区别如下:

缩合度差异;

碳链的长度(比如脂肪酸)

进行碘值皂化值测定时,需要参考适当的纯度检测结果。

2.4 检查

2.4.1 一般检查项目

检查项目主要是对化合物中的杂质进行限度检查。附录 5.10 “药用物质中杂质控制”详细阐述了检查的相关规定。

基于保护公众健康的角度,保证药物的适当纯度时药典收载的药品质量标准的基本职责,除为了生产合格药品之外,对药品生产企业强制提出过多不必要的要求并不是药典的目的。

从公开透明的角度,如有可能应在检查项下给出如下信息:需要通过实验进行控制的杂质,根

据杂质的类型和性质,给出规定的杂质的下限度(比如百分含量,ppm等)。正文中规定的强限制度标准可能来源于检测条件也可能时基于试验的回收率数据。

2.4.2 检查项目的名称

如果有可能,应在检查项下给出杂质的类别或杂志的名称(如草酸、钾、铜或氯化物等)。对于非专属性的限度检查项目,可根据《欧洲药典》的标准术语选择一个比较通用的名称(比如溶液的颜色或澄清度、pH、酸度或碱度、重金属等)或类似的名称。个别情况下,也可将检测项目的名称与采用的试验方法联系起来(比如吸光度、比旋度),如有可能,应避免采用这种命名方式。

2.4.3 供试品溶液

待测样品的溶液在药典中统称为“供试品溶液”,供试品溶液配置后可用于一个或多个检查项目,有时还用于鉴别试验。

如果需要,还可以按照不同方法配制多个供试品溶液,正文中用 S1,S2.....表示,每个供试品溶液至少要用于两个检查项目。

对于不溶性的物质,可以采用提取或者萃取的方式制备供试品溶液。

根据待测物质的溶解性及其可能的杂质性质,选择制备供试品溶液所需的溶剂。这些溶剂可能是:

I 水(常用)

如果二氧化碳的存在会影响检测的结果,比如 pH 或酸度或碱度检查(参看相关部分),需要采用不含二氧化碳的水为溶剂。

如果供试品溶液用于钡、钙和硫酸盐检查,需要采用蒸馏水为溶剂。

如果供试品溶液需要考虑上述两种情况,那么需要用不含二氧化碳的蒸馏水为溶剂。

I 酸或碱的稀溶液

I 极少被使用的溶剂时乙醇、四氢呋喃等,与水溶液相比,用这些溶剂制备的供试品溶液用途较窄。

选用的溶剂和供试品溶液浓度取决于样品的溶解性以及检测的目的。必须尽可能选用指定的检查项下的专用溶剂,按照检查项下规定的方法,直接使用溶剂或者使用经过适当稀释后的上述专用溶剂进行供试品溶液的配制。一般的供试品溶液浓度为 20~50g/L,但可能较低浓度(比如 10g/l)或较高浓度(100g/l 或更高浓度的其他特殊情况)的供试品溶液。配制的供试品溶液的量必须满足检查项下的试验要求。如果需要对供试品溶液进行过滤,必须考虑过滤引起的样品损失,当过滤后的不溶物用于其他检测项目时,在正文中应明确规定。

如果从供试品溶液取一部分、该溶液可完成几个试验项目,只有在具有充足的检测成本方面的原因(产品价格昂贵或者产品属于管制药品)的情况下,才可以考虑采用上述方法,并且需要在正文中明确规定。

根据指定的不同检验项目,供试品溶液的浓度也有不同的精密度要求:

I 用于“溶液的颜色或澄清度检查”、“pH”和某些鉴别试验的供试品溶液,允许有 5~10% 的偏差;

- I 对于多数限度检查项目, 2%左右的浓度偏差是允许的;
- I 比旋度、吸收系数、各种化学参数的测定等某些检查项目, 以及需要通过计算获得最终结果的检测项目, 对供试品溶液的浓度有更高的精密度要求。

大多数精确检测的检查项目对所需的供试品溶液浓度的精密度, 在正文中都有明确的规定。

因此, 对供试品溶液有如下规定:

- I 按照规定的精密度, 量取规定的供试品(参见凡例);
- I 当供试品溶液的浓度必须精确到 1%以内时, 量取的体积数保留一位小数(比如 10.0ml、25.0ml 等), 当供试品溶液的精密度要求较低时, 可不保留小数(比如 10ml、25ml 等)。

2.4.4 溶液的颜色和澄清度检查

通过在规定溶剂中, 对待测药物不溶性杂质或有色杂质的检查, 达到评价药物总体纯度的目的。

“溶液的颜色和澄清度检查”对用于注射用制剂的原料特别重要也是必检项目。除上述用途外, 此项检查只是提供一些药物总体纯度的帮助信息。

药典中此项检查项目包括两个试验:

- I 溶液的澄清度(附录 2.2.1);
- I 溶液的颜色(附录 2.2.2)

两个试验都采用同样的溶液。通常是供试品溶液, 但也有可能采用不同的溶液。也有可能采用其他适当的溶剂。

通常采用水为溶剂, 根据样品的溶解性, 也有可能采用其他适当的溶剂。

当采用有机溶剂制备供试品溶液时, 可能需要确保所用溶剂符合试验要求, 尤其是药品标准对此项检查有非常严格的要求时。

供试品溶液的浓度越高, 标准限度就越严格。对于非常纯的物质或者用于大剂量制剂的原料, 供试品溶液的浓度范围为 50~100g/l; 对于纯度不高的物质或者给药剂量较小的原料, 供试品溶液的浓度为 10~20g/l。

2.4.4.1 溶液的澄清度检查

本试验主要用于无色物质或者溶液略有颜色的物质, 将供试品溶液与浊度标准溶液相比, 判断该样品是否符合规定。

试验所需的供试品溶液体积取决于比浊用玻璃管的直径大小, 药典附录中规定比浊用玻璃管的直径范围为 15~25mm, 相应的体积范围为 7~20ml。因此, 需要根据比浊用玻璃管的体积确定供试品溶液的量。

大多数标准中对此项检查的要求是: 供试品溶液必须澄清(药典用术语), 但是, 当该原料不用于液体制剂时, 药典可能会允许供试品溶液有一定程度的浊度。

2.4.4.2 溶液的颜色检查

本试验用于基本无色的物质, 通过限定供试品溶液的颜色色调, 对样品中的有色或可能的有色降解产物进行质量控制。药典附录(2.2.2)规定了两种方法:

- I 第一法只需要 2ml 供试品溶液, 但除了供试品溶液颜色较深的样品外药典标准中很少采用这一方法。

I 第二法对溶液色调的区分力更好，因此更为常用，在试验中需要较大体积的供试品溶液。两种方法的检测结果不需要一致，因此，在质量标准中要规定检查方法。

当供试品溶液的颜色浅于 B9 标准比色液时，标准中对溶液颜色的规定为“无色”。当供试品溶液的颜色深浅随样本不同有变化时，可能需要采用同一色调两个或更多色号的标准比色液，或者更甚只给出颜色的程度而不要规定实际的颜色。

对供注射剂用的原料药(辅料)以及供试品溶液较深的原料药(辅料)，特别是预期使用第一法进行颜色检查的样品，应倾向于采用分光光度计在适当波长条件下(通常为 400~500nm)测定供试品溶液，其吸光度值应不得超过规定限度。在正文中必须明确规定供试品溶液的浓度和限定的吸光度值。试验条件和限度规定必须基于 400~450nm 范围内的吸收光谱以及对适当样品(如有必要，应包括经过贮藏的以及已有降解的样品)的测定结果。

2.4.5 pH、酸度/碱度检查

本试验允许原料药(辅料)在制备方法、纯化过程或者降解过程(比如由于保存不当导致致)中引入一定限度的酸性或碱性杂质。本试验还可用于确认某些盐的化学计量组成。

在药典中采用两种方法对解离型杂质进行检测：第一种方法是采用指示剂或电化学方法半定量滴定试验确定限度值，也就是酸碱度检查；第二种方法是 pH 测定。

如果物料具有缓冲性质，应进行 pH 测定，否则推荐采用滴定方法检测。

可以根据物料缓冲能力的估计，确定在药典质量标准中选用酸碱度检查还是 pH 测定。

最后分别采用 0.01M 盐酸和 0.01M 氢氧化钠以及 pH 计，对纯度较高的供试品配制的规定浓度(10~50g/l)的水溶液(如果需要也可以提取或萃取)进行测定并获得滴定曲线。

滴定曲线的拐点是供试品溶液的真正 pH，对于纯物质，其供试品溶液的 pH 是与 pH 轴的截距。供试品溶液的缓冲容量就是 pH 的总变化量 (ΔpH)，在 10ml 供试品溶液中加入 0.01M 盐酸溶液 0.25ml，在另一份 10ml 供试品溶液中加入 0.01M 氢氧化钠溶液 0.25ml，两份供试品溶液 pH 的变化量之和就是供试品溶液的缓冲容量。 ΔpH 越大，表明供试品溶液的缓冲容量越小。对于不很纯的样品可进行滴定曲线的平行位移。这样在从曲线上读出 ΔpH 前，供试品溶液的真实 pH 就在 pH 轴上。

按照下列程序，根据供试品溶液 ΔpH 的大小，决定选用哪种方法进行解离型杂质的限度检查。

根据大多数指示剂对 2 个 pH 单位变化的颜色变化情况，将药物分为如下 4 类。

A 类	$\Delta\text{pH} > 4$	采用两个适当的指示剂进行酸碱度检查
B 类	$4 > \Delta\text{pH} > 2$	采用一个适当的指示剂进行酸碱度检查
C 类	$2 > \Delta\text{pH} > 0.2$	pH 测定法
D 类	$\Delta\text{pH} < 0.2$	无法对解离型杂质进行合理的控制。含有多个酸(碱)性基团或同时含有多个酸、碱性基团的，以盐的形式作为药物的样品属于此类，对于这类药物，当限度足够严格时，才可以通过 pH 测定法保证组分正确比例

显然，通过改变供试品溶液的浓度，上表中按照缓冲性质分类的供试品，其缓冲性质可能会有一定程度的改变，因为，滴定曲线的性状也会有变化。当然，除非由于供试品在水中的溶解度

低,不得以浓度更低的稀释溶液作为供试品溶液,否则配制的溶液浓度不应超过上述规定的供试品溶液的浓度范围。

在某些情况下,由于供试品溶液的颜色或其他因素的干扰,不能采用指示剂进行酸碱度控制,就需要采用电化学的方法进行,另外,当定量加入酸或碱引起了供试品的分解或沉淀反应,可能就不需要考虑供试品溶液的缓冲容量,选用 pH 检查。

当由于上述特殊原因,对于缓冲容量的供试品溶液。必须进行 pH 检查时,供试品溶液需用不含二氧化碳的水配制。相反地,对于缓冲容量足够大的供试品溶液,就不需要采用不含二氧化碳的水配制,因为二氧化碳对 pH 的影响极少会超过 0.1 个 pH 单位,所以不会影响测定的精密度。标准规定进行酸度检查时,当 10ml 供试品溶液中加入的 0.01M 氢氧化钠溶液体积不得超过 0.1ml 时,供试品溶液必须采用不含二氧化碳的水配制,当用于解离型杂质检查时,供试品溶液的配制过程中必须关注上述因素。

2.4.6 旋光度检查

尽管有时也用于鉴别,旋光度检查主要还是用于药物的纯度检查;

- I 通过计算旋光系数可对具有光学活性的物质(液体或固体物质的溶液)进行纯度的评价。
- I 如果 589.3nm 波长处的旋光系数足够灵敏,可以通过旋光度测定控制非光学活性物质(消旋体或外消旋混合物)中的光学活性杂质的含量。在此情况下,旋光度范围应为 $+0.10^{\circ}$ ~ -0.10° (确定药物是否是真正的外消旋体)。液体物质或供试品溶液的旋光度测定应在正文规定的条件下进行。

因为比旋度对于光学活性物质中对映异构体杂质的控制灵敏度不够,所以通常采用的手性物质分离方法更适宜光学活性杂质的控制。

旋光度检查不适用于颜色深的供试品溶液或有乳光的溶液,对于有乳光的溶液通过适当的过滤才可能进行旋光度检查。

在进行旋光度检查时需要考虑如下因素:

- I 溶剂。根据供试品的溶解性和样品在该溶剂中的旋光度值,确定配制供试品溶液的溶剂。如果需要使用有机溶剂,必须规定溶剂的纯度特别是溶剂中的水分限度。
- I 试品溶液的浓度。供试品溶液的浓度必须保证旋光度读数的稳定和可靠。
- I 试品的用量 必须保证足够的相对精密度(一般不超过 1%),供试品溶液的体积也必须精密(应保留一位小数)。
- I 检测所需的溶液体积取决于所用的仪器,但是,通常很少超过 25.0ml。
- I 在计算旋光度或比旋度时,要考虑供试品的水合度(结晶水)或溶剂化程度。
- I 旋光计的读数应准确至 0.01° 。取 5 次测定结果的平均值作为最终结果。
- I 进行旋光度检查时(很少超过 2°),测定结果保留两位小数。
- I 比旋度结果保留两位或三位有效数字。比旋度小于 10° 时,保留两位有效数字,比旋度超过 10° 时,保留三位有效数字。
- I 消旋体或外消旋混合物的含量限度。

2.4.7 吸收光谱(紫外—可见光谱法)

对电磁波的吸收也可用于纯度检查,考察特定杂质的含量。通常适用的情况是,杂质在给定波长范围内有吸收,主成分无吸收。这样就可以对供试品溶液进行吸光度检查。也可按照下列方法进行试验。

- I 如果规定最大吸收波长或最大吸收波长范围,可直接对供试品溶液进行测定。
- I 在进行化学反应或显色反应后,杂质在规定波长处有吸收,而主成分无吸收,正文中给出规定波长处的最大吸光值。

进行紫外吸光度检查时,建议检测波长不低于 230nm。

重要的是要规定操作条件的精密度,特别是供试品溶液需要经过连续稀释过程时。

2.4.8 有关物质

关于杂质控制的原则,在附录 5.10 “药用物质中的杂质控制”以及总论(2034)“药用物质”中进行了详细论述。应按照上述原则起草各论。凡用于各成员国已批准药品的各论中的原料药或辅料,当可以从生产单位获得必需的资料和样品(主成分和杂质)时,应对上述药用物质中的所有杂质进行适当的质量控制。如果特殊的合成工艺路线生产的药用物质,没有提供所需的资料 and 样品,就说明该药用物质不需要对这些杂质进行控制。

除另有规定外,总论(2034)“药用物质”中关于有关物质的规定,适用于所有各论中的活性物质。下列情况为总论中的特例:

一生物制品和生物技术产品、多肽、低聚核苷酸、放射药品、发酵产品以及动(植)物来源的初级产品的半合成物质。

如果总论(2034)中的规定不适用于某些其他物质。在各论中应有如下表述:

“总论(2034)“药用物质”中有关物质项下表 2034.-1 的限度规定,不适用于本品。”

各论中应规定下列杂质的限度:

- I 单个指定杂质;
- I 未指定杂质(此前称为任意其他杂质),通常的限度为鉴定水平;
- I 总杂质。

需要控制的杂质包括:中间体和合成副产物、天然产物中的共存物和降解产物。有机化学药物各论中对有机杂质的控制称为“有关物质”或者不同的名称但功能相同的试验。如有无机杂质,一般在其他项下进行。对残留溶剂有特定的规定[参见下文及附录 5.4 药用物质中残留溶剂的控制(2034)]。

液相色谱法是控制有机杂质的最常用也是首选的分析方法。有些情况下,可能采用气相色谱法或毛细管电泳法(CE)更合适。尽管有许多各论采用 TLC 法进行有关物质检查,未来 TLC 法将只用于不能被 LC 或 GC 控制的特殊杂质的质量控制。不满足上述条件的现在有 TLC 法将在有适当的 LC 或 GC 替代方法后逐步取消。

因为不同的生产企业采用不同的合成路线和精制工艺,所以各论通常必需包含不同的杂质限度控制标准。一般的做法是采用一个通用的 LC 方法进行杂质检查,如果需要控制特殊的杂质,增加 LC、GC、CE、TLC 或其他的方法。然而。某些情况下。采用一个通用方法对不同工艺的药物进行杂质控制变得越来越不可行。在此情况下,需要有多通用方法,每个通用方法

控制的杂质应明确并参见正文所附的杂质。

正文中包含了一系列杂质项下的指定杂质。指定杂质是指获得批准的药品所用的原料或辅料中,当前批次物料中存在的并且正文中规定了各杂质限度的杂质。如果可行,正文中应对其他杂质(超出鉴定限度)给出可接受的限度,并给出超过报告限度的所有杂质总含量的限度(不是指定杂质的含量。而是所有杂质的含量)。

指定杂质的含最限度应同时考虑如下因素:

1.杂质界定数据。如有可能,杂质的限度应不超过其界定水平;杂质的界定资料由生产企业提供,在药典标准起草过程中或者药典论坛征求意见阶段,由有关管理机构对限度与界定资料的一致性以及批准的质量标准进行审核。

2.批分析数据。根据正常生产工艺制定的可接受限度,在药典标准起草过程中,生产企业至少提供3批典型批次的分析数据,并由有关管理机构进行审核。

分离技术 药典中纯度检查项下所用的分离技术通常用于一个或多个生产工艺或降解途径的药品中杂质的质量控制。但是,检查项下的试验条件,特别是检测系统,没有必要缩小其检测能力范围。色谱纯度检查通常是最好的手段,也可以提供新生产工艺中有机杂质或意外污染物的通用筛查方法。增加色谱纯度检查或者其他色谱或非色谱试验可能更好。

正如鉴别部分所述,用于纯度检查的色谱系统,如果适当、也可用于鉴别试验。

当采用色谱技术进行有关物质检查时,在药典论坛中将公布质量标准及其典型的色谱图。

当没有单个杂质对照品或者药品中可能会检出很多个杂质时,正文中将提供杂质对照品的典型色谱图。

正文应提供可靠的方法确定色谱图中所有指定杂质的位置。如果非指定杂质的检测需要校正因子,对于非指定杂质的鉴别是必需的。可采用下列手段进行杂质定位:

—采用每个杂质的对照品;

—含有几个或所有指定杂质的混合杂质对照品,并附典型图谱

从药典角度考虑,采用相对保留时间确定杂质位置不够好,特别是对于梯度洗脱的色谱方法。

当采用含有多个杂质的标准物质时,应向 EDQM 提供每个指定杂质的样品,供建立标准物质时使用。

对于分离技术的总体考虑如下:

- I 通常供试品溶液的浓度较高并载样量大,因为只要对杂质检查没有干扰,主峰的对称性或主斑点的形状不是杂质检查的关键参数。当采用外标法进行杂质定量时,主峰的峰面积或响应不需要在检测器的线性范围内。
- I 有关物质检查的通用方法中,在纯度检查前不应对供试品进行化学修饰(比如衍生化等),因为,化学修饰会改变杂质的性质和检出。
- I 同样地,在杂质检查前应避免提取(萃取)游离碱或酸的操作。

2.4.8.1 薄层色谱法

只有当 LC 或 CE 方法不适宜指定杂质的控制时(通常是由于缺乏适当的检测系统),才会采用 TLC 法进行有关物质检查。

在药典附录试剂部分。有商品化的预制板可以购买;在标准草案中用脚标标识预制板的商品名称,当标准通过后,EDQM 的数据库“Knowledge”项下可获得相关信息。在试剂部分,除了可采用的担体外(担体的类型、黏合剂类型等),还给出了适当的试验步骤。正文必须给出薄层板的类型以及系统适用性要求。通常,当系统适用性试中所需的关键物质不易获得单个对照品时,可能会要求提供含有这些物质的供试品或者将上述适用性物质加入到供试品中作为系统适用性试验用对照品。色谱系统参数允许的变动范围详见附录 2.2.46 色谱分离技术。

如果需要进行任何预处理操作,或者为了获得满意的分离结果,需要在不饱和条件下进行色谱分离试验,在正文中应明确指出(尤其是采用反相薄层板时)。

如果在规定色谱条件下,杂质与自身稀释溶液的色谱行为相近,供试品溶液的一个或者多个稀释溶液可作为对照溶液。要求对照溶液主斑点与杂质斑点的比移值(R_f)必须尽可能接近,将不同物质在迁移过程中的扩散引入的误差降到最低。否则,应采用含有指定杂质的对照品溶液。可能还需要指导试验人员舍弃不需要计入杂质的处于起始线的斑点--通常是供试品中不迁移的对离子。

只有正文中规定使用适宜的设备时,才可以将各杂质的斑点的响应进行加和。除非理论的杂质总量高到不可接受的程度,如果不对杂质的数量进行规定,不推荐对杂质的浓度或含量进行限定。也可通过对杂质规定两个或多个限度替代上述情况,只允许规定数量的杂质具有较高含量,其他杂质的含量低于规定的低水平。比如,检查项下可能会规定任何单个杂质含量不得超过 1%自身稀释对照溶液,并且只允许一个杂质的含量超过 0.25%

或者规定任何单个杂质含量不得超过 1%的自身稀释对照溶液,只允许一个杂质的含量超过 0.5%并且超过 0.25%的杂质斑点不超过 4 个。

2.4.8.2 液相色谱法

确定一个适当的色谱系统通常是药典起草高效液相色谱法(HPLC)纯度检查方法时要面对的一个主要问题。但是,LC 系统更加复杂,由于多种固定相填料的存在。特别是化学键合反相填料,不仅不同品牌间填料的差异,甚至是同一品牌不同批次填料间的差异,都会影响色谱系统的分离能力。药典标准起草期间,被证明适用的固定相或色谱柱的商品名称会用脚标标识,一旦标准被通过,就会将相关信息转移到 EDQM 网站的数据库“Knowledge”中。

方法学验证方面的要求见下文“3.分析方法的验证”,应考查下列因素:

- I 专属性;
- I 检测限;
- I 定量限;
- I 精密度;
- I 单个杂质的响应因子;
- I 线性(有关物质检查的线性范围)。

在描述色谱系统时,必须给出色谱柱的规格(柱长和内径)、固定相的详细性质包括固定相的制备方法、预处理步骤、流动相组成、流速以及洗脱程序、柱温(如果不同于室温或特别需要柱温箱)、进样方法(如果重要)、进样体积和检测方法。色谱系统参数允许的变动范围详见附录

2.2.46 色谱分离技术。

当发现只有某种类型的固定相才能满足分离度要求,就需要对固定相进行全面的描述,比如正文中应包括如下信息:颗粒类型(无定型或球形)、粒径、比表面积(m^2/g)和孔极(nm)、当采用反相色谱柱时应给出含碳量(百分含量)以及固定相是否经过封端处理或者残留硅醇基的去活化处理(对于碱性供试品,这种处理特别重要,因为碱性物质在反相色谱柱上会有拖尾的风险)。为了尽量减少色谱峰的畸变,如有可能应采用流动相配制供试品及对照溶液。

出于简便和再现性的目的,优先选择等度洗脱方式并且在室温条件下进行色谱分离($18\sim 22^\circ\text{C}$)。当其他温度更有优势时,应给出柱温条件($\geq 30^\circ\text{C}$)。当采用梯度洗脱程序时,必须明确给出流动相组成、平衡条件、梯度条件(线性或阶梯式)等所有必要的技术参数。

因为多数活性药用物质可通过多个合成工艺制备,需要控制的潜在杂质数量可能会很庞大,给分离这些杂质的分析方法带来了巨大的挑战。等度液相色谱法的选择性可能不够大,因此对梯度洗脱方法的需求正不断增加。因此,在转移方法时清醒地意识到不同仪器间死体积的显著差异这一潜在缺陷是重要的。

在考虑液相梯度洗脱程序时,一个需要重点关注的参数就是溶剂混合室与柱前之间管路中的体积。这个体积有时又被称为死体积、 V_D (其他的名称还包括(有效系统迟滞体积、死体积和迟滞体积)。不同色谱泵系统之间死体积的显著差异会导致色谱峰保留时间的差异。泵系统的配置包括毛细管、溶剂混合室和进样器定量环的规格决定了死体积的大小;对于某个色谱系统而言,死体积是固定的。对于保留能力差的物质,死体积的差异对保留时间的影响最大。因此,设计的梯度洗脱方法应使待测物质不在梯度的起始阶段出峰,如果保留较差的组分在等度洗脱阶段出峰,保留能力强的物质在梯度洗脱阶段出峰,这样的梯度系统是最好的。这样就可以将死体积对保留行为的影响降低,此外,起始阶段采用等度洗脱减少不同梯度泵系统的死体积间的差异。

不管是高压梯度泵系统还是低压梯度泵系统。看起来两种系统的死体积要求是一样的(都是小于1.0)。但是,系统的死体积必须通过试验确定。如果测得的死体积小于1ml,不同仪器之间保留时间或者相对保留时间的差异就小。

总之,如有可能应尽量采用等度洗脱的液相方法,如果必须采用梯度洗脱,应注意如下内容:

- 应详细给出所用固定相的特性;
- 梯度洗脱前应有一个等度洗脱程序,使保留能力差的物质出峰;
- 梯度洗脱程序应使物质不在梯度开始时或梯度程序短时间内出峰;
- 建立方法时所采用的泵系统的死体积应不超过1.0ml。

如果建立色谱方法时采用的泵系统死体积大于1.0ml,在起始阶段采用适当的等度洗脱是必需的。

在方法学验证过程中,应考察不同类型的色谱柱,在药典论坛中公布的药品标准中应采用脚标对具有相应分离能力的色谱填料的名称进行标识。

2.4.8.2.1 系统适用性要求

在试验方法中应给出一个或多个系统适用性要求。也可采用附录 2.2.46 色谱分离技术中的要

求。

分离能力

当色谱方法用于含量测定和有关物质检查时，制定方法的分离能力标准是必要的。下列参数中的大多数都要求关键物质对的分离或部分分离，用于考察方法专属性的系统适用性参数如下：

--一般分离度 按照附录 2.2.29 中的公式计算两个出峰时间接近的色谱峰的分离度，两个色谱峰一般选择主成分或一个潜在杂质。但是，当两个色谱峰的保留时间差异非常大时，比如分离度大于 5.0，分离度作为色谱系统的分离能力的价值就很小，在此条件下

应采用其他杂质或者与主成分相关的物质作为物质对进行研究，使主成分与杂质间的分离度较小。峰高和峰谷的高度比也可用于分离度计算，但是。当峰高峰谷高度差异过大时，将降低此项标准的价值。

--峰-谷比 当两个相邻色谱峰不能完全分离时，比如分离度小于 1.5，可采用此方法进行分离度考察

--原位降解 如果供试品溶液在中等破坏条件下在合理的较短时间能发生降解反应，产生降解产物。这个降解产物可用于分离度测定或者峰-谷比计算。

--含有杂质或加入杂质的主成分色谱图也可用此法作为色谱系统的评价标准。当与主成分相邻的杂质难以分离并获得足够的量作为对照品时，可采用本法。在此种情况下，可随系统适用性对照品附典型色谱图或者在正文有关物质下给出相关的典型色谱图。

使用加入杂质或者含有杂质的主成分作为对照品，需要采购足量的物料。在将来用减压相同特性的物料取代系统适用性试验用物质。

当使用加入杂质的化学对照品或含有杂质的主成分对照品时，分离度、峰-谷比等用于确定色谱系统性能的指标也同样适用。当采用梯度洗脱方法时。对每一步关键梯度程序建立系统适用性要求为好。

正文中给出的保留时间或相对保留时间仅用于色谱峰的鉴别，并不能替代系统适用性要求。

2.4.8.2.2 杂质的定量

对于指定杂质、非指定杂质和总杂质的含量需要进行定量分析。最通用的方法是外标法，归一法不常用。当规定杂质总量的限度值时，应规定不计入杂质的色谱峰指标比如峰面积或峰高。通常以报告限度作为是否计入杂质的标准[参见附录(2034)“药用物质”]。经常使用供试品溶液的稀释溶液的主峰面积或峰高作为是否将色谱峰计入杂质的判断标准。

外标法 除非检测器对指定杂质(或特殊的非指定杂质)的响应与供试品溶液的稀释溶液有显著差异，一般使用供试品溶液的稀释溶液(主成分自身对照法)作为对照溶液。当杂质与主成分的响应因子差异显著时可能会采用下列方法：

--杂质对照品溶液作为对照溶液(首选)；

--含有定量杂质的主成分溶液作为对照溶液。

当采用供试品溶液的稀释溶液作为对照溶液，主成分与杂质的响应值的差别超过 20%时，正文中应给出校正因子。

归一化法 采用归一化法进行定量时，要求所有的物质都出峰并且被检出、各物质的响应因子

相同、在测定条件下检测器的响应在线性范围内。这些条件必须经过验证。

2.4.8.3 气相色谱法

尽管关键的影响因素不同,但是在 GC 法纯度检查试验中确定适当的色谱系统时,也会遇到与 LC 法相似的困难。药典方法必须给出详细的色潜参数,还需要说明的是为了获得规定的分离能力,也可以对色谱参数进行一些改变。

涂布的固定液的组成(包括浓度)、惰性载体(包括粒径以及前处理条件)等固定相的性质也必须用通用名称给出,但更详细的商品名称等记录的信息可用于随后发表的药典论坛。

在描述色谱系统时,与 LC 法相同的参数或术语必须作必要的变更,比如用程序升温替代洗脱程序以及进样口和检测温度等参数。应避免使用填充柱,色潜系统参数允许的变动范围详见附录 2.2.46 色谱分离技术。

出于简便和再现性目标,等温操作条件更好。通常采用内标法或者面积归一化法进行定量。关于如何确定杂质峰进行总杂质含量计算的判断标准与 LC 方法相同。

2.4.8.4 毛细管电泳法

毛细管电泳方法正越来越多地用于许多极性显著不同的杂质分离和质量控制。也适用于手性药物中的手性异构体杂质控制。当采用熔融石英毛细管进行毛细管电泳法的有关物质检查时,应避免不同固定相所引起的分离能力的改变,这种现象在反相液相色谱法中会遇到。

为了解决运行过程中产生的焦耳热以及获得满意的检测再现性,需要采用恒温(冷却)装置保持柱温在规定范围内;如果没有冷却装置,应降低加载的电压。

由于毛细管体积和直径的限制,使得进样体积和检测光程严重影响了该方法的检测限(灵敏度),即使采用样品浓缩技术也不能解决这一缺陷。对于杂质控制或含量测定,为了获得好的精密度,推荐使用内标法定量。关于毛细管电泳的其他指导原则与前述的 LC 方法类似。

对于手性药物的分析,在缓冲液中要加入手性试剂。对于手性试剂,特别是环糊精衍生物,应在正文或试剂项下进行详细的叙述。因为许多环糊精衍生物

都是随机取代,给出精确的或者平均的取代程度和取代位置是关键。在方法学验证中应采用多批环糊精衍生物进行考察。

正文中应阐明的试验参数:

- I 仪器参数 电压、电极、温度、毛细管规格(直径和有效长度—进样端到检测口的距离);
- I 毛细管内壁的涂布材料(如有);
- I 缓冲液 pH、摩尔浓度、组分;
- I 供试品溶液配制用溶剂;
- I 分离 电极方向、电压、电流;
- I 进样 进样时间、进样电压/进样压差;
- I 检测器 波长、仪器;
- I 温度
- I 供试品溶液有效期;
- I 为稳定迁移时间和色谱峰分离度所需的冲洗(平衡)程序(时间、试剂、压差);

- I 新毛细管的预处理方法；
- I 测定前的毛细管预处理方法；
- I 每次测定间的冲洗程序。
- I 在质量标准被药典收载后，需要转移到 EDQM 数据库的脚标信息如下：
- I 如果采用内壁涂布有固定液的毛细管，标准起草过程中证明适用的毛细管商品名；
- I 对于手性分离，标准起草过程中证明适用的环糊精或其他手性试剂的商品名。

为了减小电渗流(EOF)信号，如有可能应尽量采用注射用水或毛细管电泳运行用缓冲液作为溶剂配制供试品溶液。

2.4.9 易炭化物

自从引入可提供更多有机杂质信息的色谱方法后，此项非专属性的检查方法的价值已经彻底降低了。易炭化物的主要优势是高灵敏度，另一方面，如果需要的话，实践证明在易炭化物检查法条件下能产生颜色的杂质，与溶液颜色检查项下简单水溶液或醇制溶液相当，这样易炭化物和溶液颜色检查可合并进行，避免了不必要的重复试验。

在标准起草阶段，如果本方法可以将其他检查方法不检出或未列入控制的杂质检出，就需要进行易炭化物检查，如果适当，还可在最终标准中收载。

2.4.10 外来阳离子或阴离子

因为在药物合成过程中会广泛使用到无机强酸和强碱，外来阴离子或阳离子的含量可以表征该药物的纯化程度。通过本项检查还可以反映是否有相关物质的污染发生。另一方面，通常可以采用水洗的方法将离子杂质从水溶性差的药物中分离出来，但不会将有机杂质除去，因此，外来阳离子和阴离子的检查不能取代有机药物的有关物质检查，但是当存在水溶性有机杂质时，离子核查是有关物质检查的有益补充。对于无机药物，因为这类物质通常通过其他无机物质制备而成，所以必须考虑更广范围内的外来离子检查。

当考虑在有机药物引入外来阴离子检查项目时，即使理论上可能存在多个阴离子时，通常检查一种离子，比如氯化物、硫酸盐或者不常见的硝酸盐就足够了，然后进行含量最高的阴离子检查。

由于某些阳离子具有毒性或者催化活性，必须对这些离子进行严格的限度检查。详见下文的重金属检查。对于有机物质，除非有特殊原因需要对存在的阳离子进行单个限度检查或以一组组分的形式进行控制外，通用的方法是通过硫酸灰分(见下文)测定进行阳离子控制。

2.4.11 重金属

通用的重金属检查方法是指在 pH3.5 条件下，通过硫离子(S^{2-})或其他试剂与铅、铜、银、汞、镉、铋、铊、金、铂、钯、钒、砷、锑、锡、钼 (Pharmaeuropa, Vol.1, 第 249 页)等重金属离子反应生成黑色硫化物沉淀。通常以硫代乙酰胺作为沉淀剂(显色剂)，但也允许以硫化钠替代硫代乙酰胺，前提是用户需要使用监测溶液证明硫化钠的稳定性。

通过与含有已知量铅的对照溶液的比较进行样品的重金属检查。尽管本方法对不同重金属的灵敏度不同，但总的“重金属”含量是以铅含量计。

药典提供了 7 种不同的检查方法：

- I 方法 A 和方法 B 都是基于将待测样品溶解在水中或其他有机溶剂中,直接作为供试品溶液使用。这两种方法适用于能够在试验条件下溶解的物质。如果溶液足够澄清并且无色(如有颜色不超过 6 号标准比色液),可在供试品溶液中直接加入显色剂并与对照溶液比较;否则,应规定加入显色剂后用滤膜过滤,比较滤膜上的色斑。只有待测物既不干扰硫化物显色剂(硫代乙酰胺)也不会与金属离子络合从而掩盖金属离子真实含量的情况下,才可采用方法 A 或方法 B;必须通过各论项下方法验证中的回收率试验来确认。即使采用硫化钠作为显色剂,虽然按照一般方法中的规定,在方法建立时,对试液的适用性进行考察时需要配制监测溶液,在采用重金属检测 A 法和方法 B 时不需要配制监测溶液。
- I 方法 E 适用于较低浓度的重金属检测(每 30ml 溶液中的铅含量为 $2\mu\text{g}$)。需要配制监测溶液。
- I 方法 C、方法 D、方法 F 和方法 G 都需要消化处理。当方法 A 和方法 B 不适用时(比如样本溶解性差、有络合物特性、采用硫代乙酰胺试剂时,样本会干扰硫化铅沉淀的形成),才采用其他方法。方法 C 和方法 D 的耐用性差,因为在消化过程中汞、铅和砷等重金属会有不同程度的损失(挥发)。目前更倾向于使用方法 F 和方法 G,也就是所谓的“湿法”消化。方法 F 耗时较长;方法 G 因为采用微波辅助消化,更为快速和方便。上述 4 种方法(C、D、F 和 G)都需要配制监测溶液。

在日常工作中,除非规定采用过滤的操作,方法 A、方法 B、方法 C 方法 D、方法 F 和方法 G 不适用于低于 5×10^{-6} 的重金属检查。对于更低浓度的重金属检查,可采用方法 E,该方法最低可以检测 0.5×10^{-6} 浓度的重金属。为了确保低于 0.5×10^{-6} 浓度重金属离子的含量限度检查,需要借助于对指定金属离子的检测方法,通常采用原子分光光度法。

需要进行重金属检查的条件:

每日摄入量 $>0.5\text{g}$,治疗时间 <30 天	需要进行重金属检查,限度 20×10^{-6}
每日摄入量 $>0.5\text{g}$,治疗时间 >30 天	需要进行重金属检查,限度 10×10^{-6}
每日摄入量 $<0.5\text{g}$,治疗时间 >30 天	需要进行重金属检查,注射用原料药的限度为 10×10^{-6} ,其他用途的原料药限度为 20×10^{-6}
每日摄入量 $<0.5\text{g}$,治疗时间 <30 天	不需要进行重金属检查

如果已知在活性物质或辅料的合成过程中使用了金属催化剂,需要对这些金属催化剂的残留进行检查。根据其毒性、给药途径和生产工艺,决定质量控制的限度。

2.4.12 干燥失重

药品质量标准中一般给出的是干燥失重的上限。如果该药物(辅料)是水合物(或溶剂化产物),会同时给出干燥失重的上限和下限。除非在各论项下明确规定干燥的时间,干燥是指干燥至恒重。当质量标准中给出干燥时间时,必须提供适当的方法学验证数据。当标准中给出一个干燥温度时,可以理解为允许干燥温度有 $\pm 5^\circ\text{C}$ 的变动范围。当干燥温度高于 105°C 时,如有必要,应在各论中给出更大的温度允许范围。

附录中规定了 5 种标准的干燥条件,采用了下列经典的表述方式,可参见各论项下的干燥方法:

- ① 在干燥器中”(在室温及大气压条件下,采用 P_2O_5 为干燥剂);

- ② 减压干燥” (在室温及 1.5~2.5KPa 气压条件下, 采用 P_2O_5 为干燥剂);
- ③ “在规定温度条件下的减压干燥” (在各论项下规定的温度范围内及 1.5~2.5KPa 气压条件下, 采用 P_2O_5 为干燥剂);
- ④ “在规定温度条件下的干燥” [规定的温度通常为 105°C(为与日本药局方和美国药典协调一致), 允许的温度范围为 $\pm 2^\circ\text{C}$];
- ⑤ “高真空条件下的干燥” (在各论项下规定的温度以及 $\leq 0.1\text{KPa}$ 条件下, 采用 P_2O_5 为干燥剂)。

如果各论项下采用其他干燥方法, 应给出详细的干燥条件和方法。

干燥失重值的限度低于 10%时, 应给出两位有效数字。当干燥失重值的限度为 10%或更高时, 应给出三位有效数字。选择的样品量应能使干燥前后的重量差异为 5~50mg, 样品重量采用四位有效数字表示。

采用半微量试验进行干燥失重检查, 应规定样品的称样量及其相应的准确度。

当药品在 105°C 足够稳定时, 优先采用方法④, 如果样品热不稳定, 通常采用方法②或方法③。

不管怎样, 必须牢记的一点是: 有机溶剂并不总是容易除去 (比如秋水仙碱中的有机溶剂)。

2.4.13 热重法(附录 2.2.34)

当样品量受到限制, 比如为减少药物对分析人员的暴露量或者样品非常昂贵 (比如硫酸长春新碱及硫酸长春碱)时, 可采用热重法测定药品的干燥失重值。

2.4.14 半微量水分测定 (卡尔费休氏法--附录 2.5.12)

目前已有商品化的不含吡啶的卡氏试剂替代碘硫试剂(含吡啶的卡氏试剂)必须对卡氏试剂的化学计量反应和不受干扰的情况进行确认 (对有问题的样品, 卡氏试剂的供应商可能会提供相关的技术数据)。

应采用脚注方式给出标准起草过程中使用的卡氏试剂的商品名称; 在药品被《欧洲药典》收载后, 这些信息会转移到 EDQM 的数据库中。

水分的限度低于 10%时, 应给出两位有效数字, 当限度为 10%或更高时, 应给出三位有效数字。当水分低于 0.5%时, 不推荐使用半微量法测定。选择的样品量应能消耗约 1ml 的滴定液, 样品重量用三位有效数字表示。

2.4.15 微量水分测定(附录 2.5.32)

因为几乎所有的实验室都采用直接可用的商品化试剂, 所以在附录的测定方法中没有给出电解液(阳极电解液和阴极电解液)的详细组成。

应采用两位有效数字表述限度。选择的样品量中应有 10 μg ~10mg 水, 只有当药物中的水分非常低或者由于药物的价格昂贵限制了样品的使用时, 才考虑 10 μg 的水分定量规定。应采用三位有效数字表述称样量。

2.4.16 气相色谱法测定水分

气相色谱法也可用于药物中的水分测定。

2.4.17 共沸蒸馏(附录 2.2.13)

本法主要用于植物药的水分测定。适用于可蒸馏出 2~3ml 水的样品。

2.4.18 硫酸灰分

本法通常用于测定有机药物中的外来阳离子总量以及在试验条件下自身具有挥发性的无机药物中的外来阳离子总量。由于测定结果的高偏倚(变异)性,此项检测对大多数与无机酸(碱)成盐的有机药物的纯度分析只有很小的价值。

除有特殊理由外,硫酸灰分的限度一般为 0.1%。供试品的称样量应保证按照限度规定,剩余残渣的量不低于 1.0mg,规定的称样量应有适当的精密度(1.0g)。

2.4.19 不挥发物

本检测项下的液体样品的称样量,按照规定的限度要求,至少应使剩余残渣的重量至少为 1.0mg。液体药物的称样量或体积一般为 10~100g (ml)。

2.4.20 残留溶剂

附录 5.4.残留溶剂以及总论《药用物质》(2034)提供了对残留溶剂的测定方法和限度规定并遵循人用药品注册技术要求国际协调会(ICH)指导原则。

如果在已批准的产品中可能存在第一类溶剂残留,各论中应规定对第一类溶剂的残留进行检测。

因为也可按照附录 5.4 中的方法 2 进行限度设定,这样制剂中各组分的第二类残留溶剂都已被涵盖,因此,各论中不对第二类溶剂的残留量进行规定。

如果在已批准的产品中可能存在高于 0.5%的第三类溶剂的残留,应对第三类溶剂的残留进行控制。

2.5 含量测定

除下列情况外,各论中应包括含量测定内容:

- 所有可预见的杂质都可以被检出并有足够精密的限度规定;
- 已进行了与含量测定类似的某些定量检测,并且具有足够的精密度(比旋度、吸收系数.....);
- 已经建立了脂肪或脂肪油中脂肪酸组分(附录 2.4.22)或固醇类组分等有关物质的测定方法;
- 通常是乙醇和水等非活性物质,建立的检测项目已经能够完全控制该物质的质量。

在某些情况下,可能需要进行多个含量测定:

- 供试品含有组成不固定的两部分物质,因此,只对两个组分中的一个进行含量测定不能准确地对供试品进行完整的测定(比如氨茶碱中的茶碱和乙二胺);
- 定量测定的结果不能完全反映药物的治疗活性,就需要进行生物活性测定。

对于定义(组成)确切的盐,仅测定其中一个具有药理活性的离子组分,通常就够了。只有在极少数情况下需要测定组成药物的所有离子,在任何情况下对任意一个离子采用两种方法进行测定都是多余的,即使这两种方法的原理不同。

当鉴别和纯度检查试验已经能够全面反应药物的质量时,会寻求一个非专属但精密的含量测定方法,而不是选择专属但精密度差的含量测定方法。

每个拟定的含量测定方法,都必须按照本书“3.分析方法的验证”中为不同分析技术制定的程序进行方法学验证。

2.5.1 紫外-可见分光光度法

可直接在紫外-可见光波长范围内对供试品溶液进行分光光度法含量测定、或者在样品溶液经

过适当的化学反应后，利用紫外-可见分光光度法进行样品的含量测定，尽管这样会降低方法的精密度。也常采用其他的方法进行分光光度法含量测定。

2.5.1.1 直接测定法

本法不具有专属性，但具有可接受的方法学精密度，测定中往往不需要对照品：在指定的最大吸收波长处测定供试品溶液的吸光值，然后根据各论中给出的药物的吸收系数，计算供试品的含量。

药物的吸收系数必须经过确认：

--对于新药，生产企业必须提供验证数据，以支持该药物的吸收系数作为“真值”使用。提供的资料应包括用于测定吸光值的药物的纯度。可以采用多种方法比如分离技术、绝对方法、相关杂质的响应因子等方法确证给出吸光值的药物纯度。

采用对照品法，可通过供试品溶液与对照品溶液吸光值的比较，计算供试品中的主成分含量。详细的测定方法，参见“紫外分光光度法”（附录 2.2.25）

2.5.1.2 经过颜色反应后的测定

本法是通过与对照品的比较，确定供试品中主成分含量，由于操作的原因测定结果的精密度可能较差。

2.5.2 容量分析

含量测定用供试品的取样量应满足如下条件：采用自动滴定时，最终滴定液的消耗体积不超过 10ml，最好是 7~8ml，这样可采用标准滴定时进行容量分析。当采用回滴法时，开始加入的滴定液的体积必须适当，使得含量测定结果的计算不是基于一个较小的体积差值。

如果需要，除在附录中已经规定外，也可在各论中注明进行空白滴定试验。

各论中含量测定项下可以规定采用电位法或指示剂法指示滴定终点，电位滴定法几乎适用于所有的滴定并且是首选方法。当各论项下规定采用电位滴定法时，只要对操作人员有帮助，应给出适用于该滴定反应的电极组合。除采用电流法（附录 2.2.19）等其他的终点确定方法外，应给出滴定反应的拐点最及确定终点的拐点位置。不管采用何种滴定方法，必须具有适当的再现性以及确定的化学计量反应关系。当采用指示剂法时，只有在与药典试剂和试液附录中的颜色变化不同时，才在正文中规定指示剂的颜色和变化情况。

有机碱的卤化盐以及某些季铵盐物质的传统滴定方法一直是以冰醋酸为溶剂的非水滴定方法，加入适量醋酸汞，采用高氯酸的冰醋酸溶液作为滴定剂。建议避免使用汞盐，如果有可能应采用其他方法。推荐考虑下列滴定方法：

- a. 以醇类为溶剂的碱金属滴定法。在进行碱金属滴定时，建议在滴定前加入 0.01M 的盐酸 5ml，确定两次突跃间消耗的滴定剂体积数。
- b. 高氯酸滴定，用无水醋酸溶解供试品，然后加入醋酸或者醋酐与无水甲酸的混合物。
- c. 银量法。

方法 b 和方法 c 通常适用于季铵盐的滴定。

2.5.3 色谱法

含量测定项下的色谱方法可能以药典规范为基础，药典色谱方法通常限于液相色谱（LC）和

气相色谱(GC)。有关物质项下 LC 和 GC 方法的大多数指导原则也适用于含量测定方法的建立。LC 法推荐使用外标法, GC 法推荐使用内标法。含量测定的色谱方法需要使用化学对照品, 化学对照品必须对物质的量进行赋值(参见附录标准物质)。

当起草人(机构)已经完成了色谱方法的建立和方法学验证后, 就需要评价该方法的再现性(参见验证)。

2.5.4 经硫酸消解的氮测定法(半微量定氮法)

任何采用本法进行含量测定的药物, 在测定其消解产物后, 要确定消化的时间。

可按照下述方法测定其消解产物。按照附录项下的规定, 称量几份规定数量的供试品及试剂。改变从反应混合物变清亮后, 继续加热至沸腾并保持沸腾状态的时何, 一般最长为 120min。通过绘制氮含量测定结果与沸腾时间的关系曲线, 可能确定消解所需的最短时间。当需要的消解时间超过 30min 时, 正文中应给出消解的时间。

2.6 贮藏

尽管药典正文中在“贮藏”标题下给出了说明, 但这部分内容不是药典对药品的要求。为保证药典收载的物料在贮藏期间的质量, 可在此项下给出适当的信息。

贮藏项下的术语参见“附录 I 凡例”和“附录 3.2 容器”。值得注意的是“密闭容器”并不意味着该包装可以防止气态物质的交换(溢出或吸收), 要达到这一目的需要采用“密封的容器”。一个“严封的容器”同时也是具有防破坏功能的“安全包装”, 反过来, 安全的包装并不意味着一定是严封的包装。

应要求药品生产企业提供稳定性数据。考虑到正文中需要给出的贮藏指南, 应考察药品(辅料)暴露于空气、不同湿度、不同温度和日光下等条件的稳定性情况。

必须申明的是, 附录“5.1 各论中的性状”给出的引湿性方法并不用于贮藏条件的确定。只是给出了表征物质引湿性特征的一个快速的方法, 有助于分析人员在实验条件下检测该药物(辅料)时正确的处理有关注意事项。

2.7 标签

考虑到药品的标签需要服从国际协议、区域性(国家间联盟)以及国家的法规, 因此,《欧洲药典》正文标签项下的信息并不是详尽无遗: 标签的内容包含了强制性内容(申请《欧洲药典》收载的必须内容)以及其他的仅作为建议的内容。总之, 对于原料药(活性成分), 药典正文中标签项下的内容仅限于向用户正确地解释正文中的其他检测项目及要求。当一个起始物料必须符合额外的无菌等要求时, 该物料的标签项下必须注明该要求, 如果适当的话, 包装容器的材料也应适合该物料的用途。另外, 如果正文允许添加某些稳定剂或者其他添加剂时, 必须在标签中注明相关信息。

2.8 杂质

有机化学药物的正文项下应有杂质的内容, 也就是按照规定的方法需要进行控制的杂质, 并在有关物质中对其限度进行了规定。药典中的杂质分为指定杂质和检出的其他杂质, 正文中的所有指定杂质都包括在杂质项下。另外, 提供检出的其他杂质(正文检查项下需要检查的杂质, 其含量超过鉴定限度, 但属于当前生产批次产品中的未知杂质)的信息也有帮助作用。

杂质项下给出了每个杂质的化学结构和化学命名(酸或碱的形式)。杂质按照字母顺序(杂质 A、杂质 B、杂质 c、杂质 D 等)。当认为杂质的别名(曾用名)有助于理解时,在括号中会给出杂质的别名,但情况不多见。

杂质项下也可能会给出需要控制的给定杂质的信息,比如,当这个杂质不是有关物质检查项下控制的杂质或者有多个有关物质检查方法时。

2.9 与功能相关的性状

药典中的辅料可能在正文中有“与功能相关的性状(FRC)”的内容。这是一种引入得标准段落,属于非强制执行的内容。与每个 FRC 相关的用途或作用也应阐明。FRC 可能会以下列方式给出:

- I 简单给出名称;
- I 给出《欧洲药典》附录项下的名称或者推荐的方法;
- I 给出名称、推荐的方法和限度;
- I 给出名称、推荐的方法、推荐的限度和推荐的可接受标准。

3 分析方法的验证

本节叙述的是《欧洲药典》各论项下检测方法的方法学验证程序。需要验证的检测方法包括鉴别试验、杂质控制用仪器或非仪器检测方法以及含量测定方法。根据检测的类型以及所采用的技术,不同检测方法的验证要求也不相同。本节关于分析方法的验证内容和要求,已于 1994 年被 ICH 批准,ICH《分析方法(步骤)的验证》以外的扩展内容包含了“药品注册申请的相关验证要求”以及“采用不同分析技术对药品分析方法进行验证的专门指导原则”等相对多的有用信息。

3.1. 定义和术语

由人用药品注册技术要求国际协调会(ICH)于 1994 年批准并发布。

3.1.1 介绍

本文是关于分析方法(步骤)验证过程中相关项目的讨论,分析方法(步骤)的验证也是在欧盟、日本和美国提交新药注册申请资料的一部分内容。本文并不谋求涵盖在全球其他地区药品注册、出口等项事宜中可能要求的试验项目。实际本文的内容作为一个名词和术语集、名词和术语的定义使用,并不提供如何完成验证的指导意见。这些术语和定义旨在为欧盟、日本和美国间业已存在的各种官方标准和法规之间的差异提供桥梁和联系。

验证分析方法(步骤)的目的就是证明该分析方法适用于药典项下的用途。后面的表格总结了鉴别、杂质控制和含量测定方法的验证项目。其他分析方法(步骤)的验证可能组要在本文的基础上增加新的验证项目。

3.1.2 需要验证的分析方法(步骤)的类型

关于分析方法(步骤)验证的讨论课分为四个常见的分析方法(步骤):

- I 鉴别试验
- I 杂质的定量检查试验
- I 杂质的限度检查

I 原料药、制剂或者药品组分样品中选定的活性成分的定量检测

尽管还有药品的溶出度试验、原料药的粒径分布测定等许多其他分析方法（步骤），在本文的分析方法（步骤）验证中没有进行论述。但是这些分析方法（步骤）的验证与本书所列的程序验证同样重要，可能需要在今后的文件中进行讨论。

本文考虑的需要进行方法学验证的检测项目如下：

鉴别实验的目的是确保供试品中某个成分的鉴定。通常是通过供试品与对照品的特性（比如光谱、色谱行为或者化学反应等）的比较达到鉴别的目的。

杂质的检查既可以时供试品中的杂质的定量测定，也可以是限度检查项目。不管何种检测都是要准确的反映供试品的纯度特性。定量试验和限度检查的验证要求是不同的。

含量测定方法的目的是测定给定样品中的待测物质的量。在本文中，含量测定表示的是原料中主要成分的定量。这些验证项目检测也同样适用于制剂中活性成分或其他选定组分的含量测定方法的验证。同样的验证项目也可能适用于与含量测定相关的其他分析方法（步骤）（比如溶出度测定）。

3.1.3 验证项目及其要求

应深刻领会分析方法（步骤）的目的，因为这将需要对需要进行评价的验证项目提供指导，典型的验证项目如下：

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

在附件的词汇表中对这些验证的项目进行了定义。表中所列的验证项目被认为是各种分析方法的方法学验证中最重要的项目。应当将这个表作为分析方法的通用验证参考资料，特殊情况下，需要根据具体情况进行方法学验证。应当注意的是，表中并未列出方法的耐用性，但是在建立分析方法的适当阶段应当考虑方法的耐用性问题。

在下列情况下，可能还需要进行方法的再验证：

- I 药物合成工艺的变更；
- I 成品中组分的变更；
- I 分析方法的变更。

方法再验证的程度由变更的性质决定。其他的变更也可能需要进行验证。

项目	分析方法的类型			
	鉴别	杂质检查		含量测定
		定量检测	限度检查	溶出度测定 (含量/效价测定)
准确度	-	+	-	+
精密度				
重复性		+	-	+
中间精密度		+*	-	+*
专属性**	+	+	+	+
检测限	-	-***	+	-
定量限	-	+	-	-
线性	-	+	-	+
范围	-	+	-	+

- 表示通常不对此项进行考察
- + 表示通常需要对此项进行考察
- * 已经进行了再现性考察后，就不需要再进行中间精密度考察
- ** 缺少专属性的分析方法，可以采用其他的支持性分析方法进行补充。
- *** 在某些情况下可能需要进行考察的项目

3.1.4 术语

分析方法（步骤）：是指进行分析的方式和步骤。分析方法应给出完成每个分析试验所需的详细步骤。可能包括供试品、对照品和试剂的配制和制备；仪器的使用说明；标准曲线的绘制；计算公式的使用等信息，当然，分析方法的内容不仅限于上述信息。

专属性：是指在其他潜在组分存在的情况下，能够明确的对待测组分进行评价（测定）的能力。共存的组分通常可能包括杂质、降解产物、基质等。

自身缺少专属性的分析方法，可能提供其他支持性分析方法对该方法的专属性进行补充。

专属性的定义具有下列含意：

鉴别--保证待测物质的鉴定。

纯度检查--保证所有的分析方法能获得待测组分的有关物质、重金属、残留溶剂等杂质的准确含量。

含量测定（效价）--提供准确的结果，对供试品中待测组分的含量（效价）能进行准确的描述。

准确度：一个分析方法的准确度反映了观测值与公认的真值或者参考值之间的接近程度。

有时也将准确度定义为正确度。

精密度：一个分析方法的精密度是指在规定测定条件下，对来自同一性质均匀的样本多次

取样的一系列测定值之间接近程度（离散度）的描述。可在三种水平上对精密度考察，即重复性、中间精密度和再现性。

应采用性质均匀、权威的样本进行精密度考察。但是，如果不能获得性质均匀的样本也可以采用人工制备的样品或样品溶液。

分析方法的精密度通常用一系列测量结果的方差、标准差（偏差）或者变异系数（相对标准偏差）表示。

重复性：在相同操作条件下、在较短的时间间隔内测定方法的精密度。重复性也被称为实验室内含量测定的精密度。

中间精密度：表征的是实验室内的变异性，即不同时间、不同分析人员、不同仪器设备等变动因素对测定结果的影响。

再现性：表征的是实验室间的精密度（协作研究，通常各实验室都采用同样的、标准的试验方法）。

检测限：一个分析方法的检测限是指样品中待测物质能被检出的最低量，在这个水平上不能对待测物进行准确定量。

定量限：一个分析方法的定量限是指样品中待测物质能被定量测定的最低量，测定结果具有适当的精密度和准确度。定量限是表征样品中低含量待测物进行定量测定的一个参数，专门用于杂质和/或降解产物的测定。

线性：一个分析方法的线性是指测定结果与样品中待测物的浓度（量）直接呈正比关系的能力。

范围：一个分析方法的范围是指待测物浓度高低限度区间内，分析方法具有适当的精密度、准确度和线性水平。

耐用性：一个分析方法的耐用性是度量测定方法在专门对方法的参数进行小的变更后，保持原有分析能力不受参数变动影响的能力。表明了正常测定条件下方法的可靠程度。

3.2 方法学

ICH 文件。1996 年被 ICH 批准并发布

3.2.1 介绍

本文是对已有文件的补充，原文已对分析方法验证过程中应当考虑的项目进行了论述。本文的目的是对如何考虑每个分析方法的验证项目提供一些指导和推荐意见。在某些情况下（比如证明方法的专属性），为了保证原料药或制剂产品的质量，可能需要对几个分析方法的组合进行总体的评价。此外，文件还对新药申请中应该提交的数据提供了指导意见。

验证期间收集的所有相关数据以及用于计算验证项目的计算公式都应当提交并进行适当的讨论。

也可以采用本指导原则以外的验证方法，并且能被欧洲药典委员会接受。选择最适合其药品的验证程序和方案是申请者的义务和职责。当然，重要的是要牢记一个分析方法的验证的目的就是证明该方法适用于使用目的。由于生物制品和生物技术产品的复杂性，在某些情况下，对这些产品的分析方法的验证程序和要求可能会有别于本文件的内容。

在整个验证研究过程中，应使用经过充分质量研究并附有纯度信息的参考物质。对参考物质的纯度要求由其用途决定。

为了与已有文件内容保持一致并利于理解，本文件将不同的验证项目分成不同的节进行论述。

这些节的编排可能反映了建立和评价一个分析方法的过程。

在实际工作中,可以对实验工作进行充分的设计,使得可以同时考察多个适当的验证项目,提供分析方法科学的、综合的能力情况,比如:专属性、线性、范围、准确度和精密度。

3.2.2 专属性

在鉴别试验、杂质检查和含量测定方法的方法学验证中,都应进行方法专属性的考察。用于证明分析方法专属性的程序和步骤取决于分析方法的用途和目的。

并不总是能证明一个分析方法对于特定物质的测定具有专属性(完全的区分能力)。在此种情况下,推荐联合使用两种或更多分析方法,获得对待测物质所需的分离能力。

3.2.2.1 鉴别

一个适当的鉴别试验应具有区分主成分与结构相近的潜在有关杂质的能力。可以通过含有该物质的样品的正结果(可能会与已知参考物质进行比较)与不含该物质的样品的阴性结果的比较,来确认鉴别试验的区分能力。此外,鉴别试验也可能用于那些结构类似或相关的物质的分析,确认这些相关物质没有正反应。选择这些潜在的干扰物质,应以敏锐的科学判断为基础,并考虑可能发生的干扰情况。

3.2.2.2 含量测定和杂质检查

对于色谱测定方法,应以典型色谱图证实方法的专属性,并将各组分进行适当的标识。采用其他分离技术时也应进行类似的考虑。

应在适当的水平上对色谱的关键分离情况进行考察。可以采用两个保留时间最接近的组分的分离度来证实关键分离的专属性。

当采用非专属性含量测定方法时,应采用其他的分析方法证明测定方法的总体专属性。比如,采用滴定法进行原料药的含量测定,可以在标准中将含量测定和一个适当的杂质检查方法一起使用,保证方法的总体专属性。

含量测定和杂质检查方法的要求基本相同。

当有杂质对照品时:

- u 对于含量测定方法,应证明在杂质和/或辅料存在的情况下,分析方法能将待测组分与干扰组分区分开来;实际工作中,可以在纯物质(原料或制剂)中加入一定量的杂质和/或辅料,作为供试品进行分析,通过与不含杂质(辅料)的供试品含量的比较,证明含量测定结果不受这些物质的干扰。
- u 对于杂质检查方法,可以在纯物质(原料或制剂)中加入一定量的杂质,证明主成分能与这些杂质和/或样品中的其他组分获得分离。对于区分能力较差的分析方法,一个可以接受的替代的证明方法,就是证明该方法仍能以一定的准确度和精密度测定这些杂质的含量。

当没有杂质对照品时:

当不能获得杂质或降解产物的对照品时,可以将含有杂质或降解产物的供试品分别采用拟定方法与药典方法或经过验证的方法等其他经过充分研究的分析方法进行测定,通过测定结果的比较来证明方法的专属性。如适用,应包括在光照、加热、湿度、酸/碱解和氧化等影响因素条件下贮藏的供试品。

n 对于含量测定,应进行两种测定结果的比较。

n 对于杂质检查,应进行检出杂质情况的比较。

峰纯度检查也可能有助于表明待测组分的色谱峰中不含有多个组分(比如二极管阵列、质谱方法)。

3.2.3 线性

应在分析方法的测定范围内(参见本书 3.2.4)考察其线性。可以通过采用拟定的测定方法,直接测定原料药含量(对照品贮备溶液的稀释)和/或药品组分的合成混合物的各组分的含量,来证明分析方法的线性。在范围的考察过程中可对后一种证明方法进行研究。

应通过对代表待测物含量或浓度变化的信号曲线的评价来建立方法的线性。如果有线性关系,应采用适当的统计学方法对测定结果进行评价,比如,可通过最小二乘法计算线性回归系数。在有些情况下,为了获得含量测定结果与样品浓度间的线性关系,在进行回归分析前,可能需对测定数据进行某种形式的数学转换。来自回归曲线上的数据本身可能有助于对线性程度的数学评价。应提供回归曲线的相关系数、y 轴的截距、斜率、残差平方和等参数,还应包括回归曲线的数据。此外,对实际数据点与回归曲线上数据点之间的偏差进行分析,有助于线性的评价。

免疫测定法等一些分析方法,不管进行何种形式的数学转换,也不能证明线性关系。在这种情况下,可用适当的函数,表述供试品中待测物质的浓度(量)与分析响应值之间的关系。

为了建立线性,推荐至少采用 5 个不同浓度的供试品,也可采用其他经过论证的方法进行线性考察。

3.2.4 范围

分析方法的范围通常来源于线性研究并且取决于所采用的分析方法。可通过对含有分析方法规定范围或极端含量的供试品的测定,确认方法的范围,如果分析方法能够提供可接受的线性、准确度和精密度,证明方法的范围符合规定。

在方法的范围考察中,应至少考虑下列情况:

- U 原料药或制剂成品的含量测定 80%-120%检测浓度的范围。
- U 单个杂质的测定从定量限或者单个杂质的 50%的规定限度-120%的规定限度。
- U 已知不具有强烈作用或不会产生毒性或不期望的药理作用的杂质,其检测/定量限应与杂质必须控制的水平相一致。

注:在方法建立阶段,对杂质检查方法的验证中,可能需要考虑建议(可能)的限度范围。

- I 如果采用同一个分析方法进行含量测定和纯度检查,并且只采用了相当于 100%标示含量的对照品,测定方法的线性范围应涵盖从定量限或者单个杂质的 50%的规定限度~120%的规定含量限度。
- I 含量均匀度测定:除非根据制剂(比如定量吸入制剂)的特性,需要更宽的测定范围外,应覆盖 70%~130%的测定浓度范围。
- I 溶出度检查:±20%的规定范围,比如某控释制剂规定 1h 后的释放度为 20%,24h 的释放度为 90%,那么,验证的范围将是标示量的 0~110%的范围。

3.2.5 准确度

应在分析方法规定的测定范围内,建立方法的准确度。

3.2.5.1 含量测定

原料药

可采用下列方法进行方法准确度的评价:

采用待评价的分析方法,对纯度已知的物质(比如参考物质)进行测定;

将拟定分析方法的测定结果与其他规定了准确度的可靠的分析方法(独立的测定方法)的测定结果进行比较;

在进行精密度、线性和专属性考察时，可以同时测定方法的准确度。

制剂

可采用下列方法进行方法准确度的评价：

采用待评价的分析方法，对已经加入已知量待测原料的制剂组分的合成混合样品进行测定；当不能获得所有制剂组分的样品时，也可在制剂中加入已知量的待测物质或者将拟定分析方法的测定结果与其他规定了准确度的可靠的分析方法(独立的测定方法)的测定结果进行比较；在进行精密度、线性和专属性考察时，可以同时测定方法的准确度。

3.2.5.2 杂质(定量)

应在原料药或制剂的样品中加入已知量的杂质，然后通过上述样品的测定来评价分析方法的准确度。

当不能够获得某些杂质和/或降解产物的样品时，如果与独立测定方法的结果一致，也可采用原料药的响应因子进行准确度评价。

3.2.5.3 推荐的数据

在规定范围内，至少用 3 个不同浓度的样品的 9 次测定结果进行准确度评价，比如制备 3 个样品，每个样品各测定 3 次。

3.2.6 精密度

含量测定以及杂质的定量检查方法的验证中都包括精密度的考察。

3.2.6.1 重复性

应采用下列方法对重复性进行评价：

在规定范围内，至少用 9 次测定结果进行重复性评价，比如制备 3 个不同浓度的样品，各测定 3 次。或将被测物浓度当作 100%，用至少测定 6 次的结果进行重复性评价。

3.2.6.2 中间精密度

应根据所用测定方法的环境，建立不同程度的中间精密度考察方法。申请者应建立随机变动因素对精密度影响的评价系统。应对日期、分析人员、设备等变动因素的影响进行探究。并不需要对这些影响因素进行单独研究。鼓励设计方案进行中间精密度试验。

3.2.6.3 再现性

通过实验室间测定结果的比较，对方法的再现性进行评价。再现性考察中应考虑分析方法的标准化，比如药典中的标准测定法。这些数据并不是上市授权文件的一部分

3.2.6.4 推荐的数据

应在每个类型的精密度考察报告中给出标准偏差、相对标准偏差(变异系数)和置信区间。

3.2.7 检测限

根据测定方法是仪器分析方法还是非仪器分析方法，可以采用多种方法确定方法的检测限。下列方法之外的方法也可能被接受。

3.2.7.1 目视法

对于非仪器分析方法，可用目视法确定检测限，但也可能需要采用仪器方法进行检测限的确定。

3.2.7.2 信噪比法

本法适用于能显示基线噪音的分析方法,将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,确定信噪比,并且计算出能被可靠地检测出的最低浓度。一般可接受的信噪比为 3 : 1 或 2 : 1.

3.2.7.3 根据响应值的标准偏差和斜率

检测限可用下列公式表示

$$DL=3.3\delta/S$$

式中 δ 为响应值的标准偏差;S 为标准曲线的斜率。

通过待测物质的标准曲线可对斜率 S 进行估计。可以通过下列方法对 δ 值进行估计;

空白样品标准偏差法;

可通过对适当数量的空白样品的分析以及这些空白样品响应值的标准偏差,对分析方法的背景响应的程度进行测定。

标准曲线法

应采用含有检测限水平;量待测物质的样品,对待定的标准曲线进行研究。回归曲线的剩余标准偏差或者回归曲线 Y 轴截距地标准偏差可作为响应值的标准偏差进行计算。

3.2.7.4 推荐的数据

应给出检测限以及测定检测限的方法。

当通过计算或外推法估计检测限时,需要通过独立的其他检测方法,对适当数量的含有检测限或接近检测限水平待测物的样本分析,来对估计值进行验证。

3.2.8 检测限

根据测定方法是仪器分析方法还是非仪器分析方法,可以采用多种方法确定方法的检测限。下列方法之外的方法也可能被接受。

3.2.8.1 目视法

对于非仪器分析方法,可用目视法确定定量限,但也可能需要采用仪器方法进行定量限的确定。

3.2.8.2 信噪比法

本法适用于能显示基线噪音的分析方法,将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,确定信噪比,并且计算出能被可靠地定量检测出的最低浓度。一般可接受的信噪比为 10 : 1.

3.2.8.3 根据响应值的标准偏差和斜率

定量限可用下列公式表示

$$DL=10\delta/S$$

式中 δ 为响应值的标准偏差;S 为标准曲线的斜率。

通过待测物质的标准曲线可对斜率 S 进行估计。可以通过下列方法对 δ 值进行估计;

空白样品标准偏差法;

可通过对适当数量的空白样品的分析以及这些空白样品响应值的标准偏差,对分析方法的背景响应的程度进行测定。

标准曲线法

应采用含有定量限水平量待测物质的样品,对待定的标准曲线进行研究。回归曲线的剩余标准偏差或者回归曲线 Y 轴截距地标准偏差可作为响应值的标准偏差进行计算。

3.2.8.4 推荐的数据

应给出定量限以及测定定量限的方法。

当通过计算或外推法估计定量限时,需要通过独立的其他检测方法,对适当数量的含有定量限或接近定量限水平待测物的样本分析,来对估计值进行验证。

3.2.9 耐用性

在分析方法的建立阶段,根据所研究的测定方法的类型,应考虑方法的耐用性考察。在对方法的参数进行变动后,分析方法应能继续显示分析的可靠性。

如果检测容易受分析条件变动的影响,应对分析条件进行适当的控制或者在操作程序中予以预防性提示声明。一套方法学耐用性考察应包括一系列已经建立的系统适用性参数(比如分离度试验等)的考察,确保测定方法在使用时的有效性。

典型的变动因素包括:

- I 供试品溶液的稳定性;
- I 不同的仪器;
- I 不同的分析人员。
- I 当采用液相色谱方法时,典型的变动因素包括:
 - I 流动相 pH 变动的影响;
 - I 流动相组成变动的影响;
 - I 不同的色谱柱(不同的批次和/或供应商);
 - I 柱温;
 - I 流速。

当采用气相色谱法时,典型的变动因素包括:

- I 不同的色谱柱(不同的批次和/或供应商);
- I 温度(柱温、进样口和检测器温度);
- I 载气流速。

3.2.10 系统适用性试验

系统适用性试验是许多分析方法不可或缺的组成部分。该试验基于这样一种概念:仪器、电子设备、分析操作和待测样品构成了可以进行这种评价的一个完整系统。需要为特定分析方法建立的系统适用性试验参数取决于需要进行验证的分析方法的类型。更多有关信息请参见《欧洲药典》。

3.3 药典所用方法的特殊应用

下列所述的几点内容,对所用特殊分析技术的方法学验证具有重要意义。这些指导原则将《欧洲药典》的一般方法与前文所述的 ICH 文件中的验证要求有机地联系起来。

3.3.1 旋光度(附录 2.2.7)

3.3.1.1 介绍

为了获得尽可能高的旋光度，应对溶剂进行选择。应对旋光度测定用供试品溶液至少每 2h 检测一次，考察溶液的稳定性。如果需要，可能需要在质量标准中注明供试品溶液临用前现制。在特殊情况下，可能需要注明在测定旋光度前，需要一定的平衡时间。

如有可能，尽量采用钠光谱的 D 线进行旋光度测定。

3.3.1.2 鉴别

当待测物是一个对映异构体时，可用比旋度进行鉴别。

当比旋度仅用于鉴别目的时，可能不需要按照干燥品或无溶剂物计算比旋度值。鉴别项下规定的限度，应考虑符合质量标准的不同来源的药品含量和纯度的变动情况。如果比旋度还用于对映异构体的纯度控制，鉴别项下也许应有如下文字：应符合比旋度检查项下的规定。

3.3.1.3 检查

比旋度也可能用于确认一个对映异构体的光学纯度。与液相色谱法的手性分析相比，这种方法的灵敏度低。如果一个对映异构体的质量控制采用比旋度测定法，就必须证明在检测条件下，该对映异构体应有足够高的光学活性并能被检出。比旋度结果以无水物或无溶剂物计。如有可能，应报告潜在杂质对比旋度测定的影响情况。比旋度限度的制定应考虑到允许的杂质含量。在缺少有关物质的旋光信息以及不能获得足量有关物质的情况下，比旋度的限度一律规定为符合质量标准的药品的平均比旋度的 $\pm 5\%$ 。如有可能应考察不同来源的样品的比旋度。对接近有效期终点的样品进行比旋度检查也是有价值的，据此可以获得正常贮藏条件下放置时间对比旋度的影响。

旋光度测定可用于确认药物的消旋特性。在这种情况下，旋光度的限度一般规定为 $-0.1^\circ \sim +0.1^\circ$ 。

如有可能，应证明在测定条件下，对映异构体有足够的光学活性并能被检出。

特殊情况下，旋光度检查可用于一个对映异构体光学纯度的确认，比如在甲基多巴中加入三氯化铝 (Al_2O_3)，由于复合物的形成而增强了旋光性。

3.3.1.4 含量测定

特殊情况下，旋光度可用于药品的含量测定，比如盐酸乙胺丁醇。当用于含量测定时，需要使用光学纯度已知的对照品。

3.3.2 紫外分光光度法(附录 2.2.25)

在所有紫外分光光度法含量测定中，必须证明所用溶剂及其质量、溶液的 pH 等操作条件的适用性。

在通常情况下，紫外分光光度法是一种具有有限区分能力的方法。一阶导数和二阶导数光谱技术的应用可能会增加方法的区分能力。

3.3.2.1 鉴别

紫外分光光度法很少单独用于鉴别。当该方法作为鉴别项下的一个试验时，必须通过待测物与相似物的光谱比较，证实方法对此类物质的区分能力。与吸光度指标相比，采用不同波长处吸光度的比值作为鉴别指标更有区分能力。

3.3.2.2 限度检查

紫外分光光度法用于限度检查,需要证明在适当的波长处,需要控制的有关物质对测定的吸光度值足够的贡献。必须建立受控的有关物质浓度与相应的吸光度值之间的关系。

3.3.2.3 含量测定

当紫外分光光度法用于含量测定时,必须考察已知杂质对吸光度值的贡献(影响)。不鼓励使用吸收系数法进行含量测定。如果规定了吸收系数,必须使用纯度已知的样品进行实验室间比对,对吸收系数值进行考察。应采用多种技术包括分离技术和绝对法,对样品的纯度进行估计。

3.3.3 非仪器法限度检查

3.3.3.1 溶液的性状(溶液的澄清度与颜色附录 2.2.1 和附录 2.2.2)

这些简单的目视检查项目就是将供试品溶液的颜色(浊度)与一系列标准溶液进行比较。一般情况下,供试品溶液应澄清、无色。这些检查项目的就是对药品纯度分析提供总体的评价标准。当允许供试品溶液具有一定的颜色(或浊度)时,通常对杂质以及杂质含量与相应的标准比色液(标准比浊液)的关系是未知的。方法的验证是基于对生产企业提供的批分析数据的检查。当然,当知道杂质会导致供试品溶液浑浊或有颜色时,可以通过目视检查法与其他更为复杂的分析技术的测定结果的比较,对目视法进行方学验证。

3.3.3.2 酸/碱度

本方法对药品的纯度分析提供了一个总体的评价标准。这是一种非专属的方法,用于解离型杂质的控制。如何恰当地使用该检查项目详见前文所述内容。

3.3.3.3 阴/阳离子的限度检查(附录 2.4)

这些是简单而快速的检查方法,但需要通过回收率试验和/或其他更为复杂的方法比较,表明该方法的适用性。

硫酸灰分(附录 2.4.14):硫酸灰分检查用于有机药品中阳离子总体测定,但显然不适用于酸性有机药品的无机盐中阳离子的检查。硫酸灰分的限度一般为 0.1%,此重量分析法用于控制药品中外来阳离子的含量,在一定水平上反映了药品的质量。可以认为该方法已经过全面研究,方法可靠,不需要进行进一步的验证。

重金属(附录 2.4.8):必须对有毒性的元素制定适当的低的限度,许多这些有毒元素通过重金属检查(比如铅、铜、银、汞、镉和钡)来控制。

重金属检查的依据是这些重金属离子生成硫化物沉淀,然后与制备的铅标准溶液进行目视比较。

药典附录 2, 4.8 项下给出了 5 种不同的测定方法,本指南在前文中也进行了论述,重金属的限度一般规定为 10ppm 或者 20ppm。也可能会设定更低的限度,在这种情况下就需要采用限度检查 E 法。不管怎样,重要的是要选择适当的测定法进行待测物的重金属检查,并且在拟定限度含量的重金属条件下,该测定法的响应得到确认。

按照拟定的重金属检查方法,对供试品及加入限度含量铅的供试品进行试验。供试品溶液中生成的棕色浑浊必须浅于标准铅溶液,而加入铅的供试品溶液,与标准铅溶液相比,不得更浅。必须注意的是,有些测定法要求对供试品进行炽灼,这样就有损失部分重金属的风险,比如汞、以氯化物存在的铅。如果很有可能出现这种情况,应采用原子吸收分光光度法或其他适当的仪

器分析技术进行重金属检查。

当已知在合成工艺中使用了催化剂时，比如把、镍或铷，特殊的量热法或仪器分析方法(比如原子吸收分光光度法、电感耦合等离子体荧光光度法等)可能更适宜于重金属含量的限度控制。无论是颜色还是沉淀反应，根据颜色或浊度的目视比较，还对各种阳离子和阴离子的限度检查进行了论述。测定方法必须满足下列条件：

在预期浓度(限度规定浓度)条件下，供试品溶液的颜色或沉淀可见。

在供试品溶液和对照溶液中加入离子后的回收率相同(通过目视检查法，如有可能可进行吸光度测定)。

通过在适当的可见范围波长处的吸光度测定，测定法对预期浓度范围内的离子浓度变化(50%、100%和 150%的预期浓度)有足够的区分力。

预期浓度(限度)条件下的回收率试验进行 6 次并计算试验的重复性(标准偏差)。回收率应不低于 80%；重复性，即相对标准偏差应不超过 $\pm 20\%$ 。

当条件适当时，鼓励在回收率试验中采用原子吸收分光光度法(进行阳离子测定)或采用离子色谱法(对阴离子进行测定)等其他方法，与拟定限度检查法进行适当的测定结果的比较。两种方法的测定结果应接近。

3.3.4 原子吸收分光光度法(附录 22.2.23)

原子光谱只适用于药品中作为杂质存在的特定元素含量的测定。对于原子吸收分光光度法，下列的验证要求是必要的。

3.3.4.1 专属性

原则上，采用适当的光源和波长对元素含量进行测定的本技术只有专属性，因为原子以不连续的线光谱形式发射或吸收辐射。但是，由于光学和/或化学因素原子吸收分光光度法可能会遇到干扰。因此，重要的是要确定干扰的性质，如有可能，在实施验证程序前，通过适当的方法减少这些干扰因素对测定的影响。

如果采用直接标准曲线法，这些干扰因素可能会导致测定的系统误差或者降低方法的灵敏度。

原子分光光度法最重要的误差来源于标准曲线的操作以及基质的干扰相关。(必须注意避免记忆效应)。

3.3.4.2 标准曲线

制备水溶性对照品溶液，并对分布在标准曲线范围内的不同浓度水平的对照品溶液进行分析。必须制备的不同浓度水平对照品溶液的数量取决于所用的标准曲线方法，为证明标准曲线符合直线回归模型，应至少配制 4 份不同浓度的对照品溶液。抛物回归模型也要求至少配制 4 份对照品溶液。首选的对照品溶液浓度水平是在标准曲线范围内平均分布。

一般地，在每个浓度水平上，推荐至少测定 5 次。

通常通过目视检查就可以发现标准曲线的问题。但是，单独这些曲线不能作为标准曲线程序适用性的证据。

a) 将测得的吸光度值为纵坐标，相应的浓度为横坐标，绘制标准曲线并给出回归方程及置信区间。测定的数据点应与拟合曲线相适配。

b) 残差, 即测定值与标准曲线上的估计值之间的差, 绘制该参数与浓度的关系, 当建立了适当的标准曲线时, 残差应随机分布在 x 轴附近。

当检测信号的变异随着浓度增加而增大时, 原子分光光度法经常发生这种情况。通过残差-浓度曲线还是单侧 t-检验, 都可以表明这种情况, 采用加权的标准曲线模型可以进行最精密的估计。将数据带入线性和二次加权方程, 找到最适合的关系曲线。

对于加权模型, 可以绘制加权残差, 即残差与加权系数的乘积与浓度的关系曲线。

a) 将测得的吸光度值为纵坐标, 相应的浓度为横坐标, 绘制标准曲线并给出回归方程及置信区间。测定的数据点应与拟合曲线相适配。

b) 残差, 即测定值与标准曲线上的估计值之间的差, 绘制该参数与浓度的关系。当建立了适当的标准曲线时, 残差应随机分布在 x 轴附近。

必须证明测定的数据与模型能够准确地匹配。采用线性回归模型意味着已经对标准曲线的线性进行个考察。

3.3.4.3 基质效应

当以水溶性对照品溶液为标样进行测定, 对标准曲线方程进行估计时, 必须确保供试品溶液和水溶性对照品溶液具有相近的灵敏度。当采用线性回归模式时, 可通过标准加入法与水溶性标样标准曲线的截距的比较, 来确定标样与供试品溶液间的检测灵敏度的差异。对两种线性回归的截距估计值的精密程度, 取决于测定数据点的数量及其在拟合曲线上的分布情况。因此, 两种回归曲线的建立过程中应有足够的数据点(至少应多于 5 个点), 这些标样的浓度应主要分布在标准曲线的测定范围内。

采用 t-检验法, 对标准加入法和水溶性标样法的标准曲线的截距进行比较, 考察两条回归直线的截距是否具有显著性差异。如果两种方法的截距间有显著性差异, 应采用方法 II 即标准加入法, 如果两种方法间没有显著性差异, 可以采用方法 I 即直接标准曲线法。

3.3.4.4 检测限和定量限

为了对检测限和定量限进行估计, 需要制备具有代表性的空白溶液并对其进行测定。基质空白为首选, 因为该溶液中除了待测物质外, 含有供试溶液中的所有组分。但是, 当不能获得基质空白时, 可以按照供试品溶液制备的相同步骤, 制备含有供试品中所含全部试剂的试剂空白溶液。

验证程序的其他方面内容已在前文进行了论述。

3.3.5 分离技术

色谱方法

薄层色谱法(TLC)、气相色谱法(GC)和液相色谱法(LC)等不同的色谱方法可用于活性药物成分的鉴别、有关物质限度检查以及含量测定等质量标准项下的测定。必须按上文所述的原则对采用的色谱方法进行方法学验证, 此外, 还必须考虑不同色谱方法的技术特点。

3.3.5.1 薄层色谱法(附录 2.2.27)

该色谱技术在药典中广泛应用于药品的鉴别(对照品法)以及杂质的限度检查项下可采用对照品法也可不使用对照品。当采用 TLC 法对杂质进行定量检测时, 必须使用适当的仪器方法。

多数情况下以硅胶为固定相,有时也采用反相固定相(硅烷化的硅胶)的或纤维素作为固定相。不管 TLC 法用于鉴别还是有关物质检查,都需要关注下列几点共同的事项:

专属性--对于 TLC 法鉴别试验,被认可的共识是:方法的专属性不能单独通过该技术获得,但可以期望该色谱方法的良好区分能力,必须结合其他的试验或检测来共同保证 TLC 方法的专属性。对于限度检查试验,当不能达到方法的专属性要求时,必须采用其他的一个或多个实验方法,对未能获得分离的杂质行控制。必须证明 TLC 方法的区分能力,对于鉴别试验,可以采用根据颜色能够区分待测类似物的显色剂,来提高 TLC 法鉴别试验的区分能力。

固定相—必须证明可采用不同来源的同一类型的薄层色谱板进行该试验。如有可能,应避免出现只有特定类型或品牌的薄层色谱板才能满足试验分度要求的情况。

系统适用性试验—进行该项试验的目的就是确认保留性质接近的两个物质能够在该试验条件下获得分离,两个物质就及其类似物(关键物质对)。必须证明所选物质对的分离度能够保证色谱系统的适用性。系统适用性判断标准是进行有关物质检查的必要条件。

当采用 TLC 法进行有关物质检查时,还需要提供下列参数的相关资料:

检测--除非采用对照品进行已知杂质的限度检查,否则必须避免在有关物质检查中使用指定的显色剂。

检测限—当采用定量的仪器进行分析时,应提供所用方法的检测限计算方法。当采用目视检查法时,必须证明规定限度的杂质(自身对照)斑点能被检出。

响应因子—如果有已知杂质的杂质对照品,应给出测定条件下的各杂质响应因子的接近程度(与主成分的相对响应因子)。对于限度检查,可通过目视法比较各杂质检测限条件下的响应差异(斑点颜色深浅)。

当采用 TLC 法进行仪器定量分析时,应提供定量限、线性、范围和重复性的数据。

3.3.5.2 液相色谱(附录 2.2.29)

本色谱技术常用于主成分中杂质含量的限度检查(可采用外标法,常用的方法是自身对照稀释对照法)、主成分的含易测定(外标法),有时鉴别项下也会交叉引用检查或含量测定项下的色谱法作为主成分的鉴别方法。需要在下列内容中对液相色谱技术的特点进行关注。

3.3.5.2.1 鉴别

专属性—对于鉴别试验,所用的液相色谱方法可能不具有专属性,但可以预采用该技术可获得良好的区分能力,这一点是被接受的共识。必须连同其他的试验方法来共同保证鉴别方法的专属性。必须用保留时间、相对保留时间或主成分以及相似物质的质量分配系数来证明方法的区分能力。应提供相似类型的多种固定相的相关信息。

3.3.5.2.2 限度检查

专属性

分离技术对物质对的区分能力,必须证明主成分与已知杂质及其潜在杂质的良好分离,如有可能,还应证明杂质之间良好分离。还可用质谱检测器来确保色谱鉴别方法的专属性。不能与主成分分离的一个或多个杂质,必须用其他方法进行控制。应提供相似类型的多种固定相的相关信息。

检测系统对物质对的区分能力，必须对选择的检测器或者检测条件的合理性进行说明(比如采用紫外检测器检测波长的改变)，同时还要用质谱检测器确保该方法的专属性。

响应因子—证明主成分与已知杂质的响应因子接近是必要的（紫外检测器的检测波长下的响应，但也适用于差示折光检测器、电导检测器等检测系统）。如果一个已知杂质与主成分的响应因子之比大于 1.2 或者小于 0.8，当拟定的杂质限度为 0.1%或更高时，可能需要采用校正因子或者对每个杂质进行外标法测定(杂质对照品法)。

检测限和定量限--必须使用外标法来确定杂质的检测限和定量限，也就是以供试品溶液的释溶液或已知杂质对照溶液作为对照溶液。当杂质的色谱峰与主成分峰接近，特别是杂质峰在主成分之后出峰时，应测定这个杂质的检测限和定量限。可采用既可以计算检测限也可计算定量限的一种方法进行计算。

稳定性--应提供对照品溶液和对照品溶液在使用期间的稳定性证明数据。

回收率—当测定中有提取步骤时，应使用已知杂质以及可以获得的杂质，在优化的条件下进行回收率试验并报告试验结果。应证明回收率数据与可接受的测定精密度要求一致。

衍生化反应--当采用柱前或柱后衍生化处理操作时，重要的是要建立理想的反应条件(反应时间和温度)，并且要考察衍生物在正常测定条件下的稳定性。

系统适用性试验--正如 TLC 法中所述，只有在杂质的检测限和规定的限度接近时才要求计算信噪比(S/N)。

3.3.5.2.3 含量测定

专属性--如果干扰测定的杂质含量低并且已经用其他的试验进行了杂质含量的控制，提供方法的专属性更好，但不是必须提供的资料。

系统适用性试验--见 TLC 项下所述。

必须按照上述线性、重复性和再现性要求对限度检查和含量测定方法进行验证。

3.3.5. 3 气相色谱法(附录 2.2.28)

3.3.5. 3.1 鉴别

专属性--相关内容已在液相色谱法中进行了论述。

3.3.5.3.2 限度检查

专属性—参见液相色谱法。

响应因子(参见液相色谱法)—必须提供各杂质与主成分对响应因子。在使用 ECD 或 NPD 等选择性检测器时，这一点尤其重要。

检测限和定量限--参见液相色谱法。

稳定性--参见液相色谱法。

衍生化处理--参见液相色谱法。

内标--必须证明在采用的色谱条件下，内标物的色谱峰不干扰主成分及其杂质峰的测定。

回收率参数--参见液相色谱法

3.3.5.3.3 系统适用性试验

为保证试验的顺利进行，应提供操作人员必须遵守的详细色谱条件参数或判断标准。

通常在系统适用性项下要求测定检测限浓度或更高浓度样品溶液的信噪比 (S/N)。

主成分与相邻杂质峰或内标物的分离度要求。当对称因子超出了附录(2.2.29)规定的 0.8~1.2 的范围时, 给出可接受的对称因子范围也是有益的。当使用填充柱并且需要控制的杂质紧随主成分出峰时, 给出对称因子的范围特别重要。如有可能, 推荐使用性质类似的色谱柱进行确认试验。

顶空进样技术--这种进样技术适用于高挥发性的物质。重要的是要证明进样瓶预热的温度和时间能够达到平衡状态。还应证明是否具有基质效应。

还应通过多次顶空提取 (每次进样后, 平衡被破坏, 再次进样前要对进样瓶进行再平衡)。获得良好的平衡条件的前提是待测物色谱峰面积的对数值与提取的次数呈线性回归系数为 1.0。

可以通过标准加入法消除基质效应。

3.3.5.3.4 含量测定

专属性—参见液相色谱法。

系统适用性试验—参见薄层色谱法。

限度检查和含量测定应按照验证 B 部分的要求进行线性、重复性和再现性考察。

3.3.5.3.5 残留溶剂进行鉴别和控制的测定方法 (附录 2.4.24)

应按照上述要求 (附录 5.1.3) 对供试品测定的样品制备方法以及气相色谱系统进行验证, 并且要特别关注下列因素:

- I 专属性;
- I 检测限和定量限;
- I 回收率;
- I 重复性;
- I 线性 (定量检测)。

3.3.6 半微量水分测定 (附录 2.5.12)

因为有多种商品化的卡尔费休可供选择, 所以通过标准加入法等验证程序确保所用试剂的适用性是很重要的。

标准加入法

在拟定的操作条下对供试品中的水分(mH_2O)进行测定, 然后在密闭条件下加入水分已知的标准甲醇溶液适量并测定加入后的水分。至少重复这一测定 5 次。

根据水分的累积测定结果, 与加入的已知水分量, 获得直线回归方程, 计算方程的斜率 b、与纵坐标的截距 a、标准曲线外推后与横坐标的相交点距原点的数值 d。

斜率 b 的数值在 0.975~1.025 之间 (偏差为 $\pm 2.5\%$) 是可以接受的。百分误差 e_1 和 e_2 的绝对值应不超过 2.5%。

$$e_1 = \frac{a - mH_2O}{mH_2O} \times 100$$

$$e_2 = \frac{d - mH_2O}{mH_2O} \times 100$$

计算每次标准加入操作的回收率。标准加入法的平均回收率在 97.5%~102.5 之间是可以被接受的。

3.3.7 容量滴定法 (附录 2.5.11, 附录 2.2.19, 附录 2.2.20)

当建立一个新的含量测定用容量分析方法时,推荐在规定的测定条件下,按照随机原则,对至少 7 份不同重量的供试品进行滴定,滴定终点消耗的滴定液体积应为所用滴定管体积的 20%~90%,然后对数据进行统计学处理,必须满足多个评价指标的要求才能获得对滴定方法的认可。

供试品称重的天平读数、终点时消耗的滴定液体积的读数的相对偏差不得超过观察值的 0.5%。通过线性回归方程对依赖于供试品重量 “ m_i ” 的滴定终点体积 “ V_i ” 进行评价,获得线性回归方程并用斜率 “ b_{obs} ”、外推法获得截距 “ a_{obs} ” 以及精密度 (标准偏差,用 $sdv(V)$ 表示)。第一个判断标准--成比例的系统误差(偏倚)

考虑到标准滴定液的滴定度,对于电位滴定法。计算获得的斜率 “ b_{obs} ” 与理论值 (给定的滴

$$\left(\frac{b_{obs} - b_{theor}}{b_{theor}} \right) \times 100 \quad b_{theor} = \frac{Z}{MrCr}$$

定常数) “ b_{theor} ” 之间的相对偏差应不得超过 0.3%,如果是采用指示剂法。测定值与理论值相对偏差不得超过 0.5%。

M_r , 为相对分子量; Z 为化学反应的计量系数; C_r 为滴定液的摩尔浓度。

第二个判断标准—额外的系统误差〔偏倚〕

对于电位滴定法,外推法获得的截距 “ a_{obs} ” 应不得超过预期或目标滴定体积的 0.4%,指示

$$\left[\frac{a_{obs}}{V_T} \right] \times 100$$

剂法获得的截距 “ a_{obs} ” 应不得超过预期或目标滴定体积的 0.6%。当滴定速度过快 (电位滴定法) 或者使用了不恰当的指示剂(指示剂法),测定结果可能不满足上述指标。

式中, a_{obs} 为线性方程外推至消耗的滴定液体积为零时所得截距; V_T 为预期或目标滴定体积。

第三个判断标准—精密度(统计学误差)

对于电位滴定法,标准偏差 $sdv(V)$ 的估计值应不得超过各论项下规定滴定方法平均体积的 0.3% (指示剂法时, $sdv(V)$ 的估计值应不得超过 0.5%)

$$\left[\frac{sdv(V)}{V_T} \right] \times 100$$

式中, $sdv(V)$ 是标准偏差的估计值。

$$Sdv(V) = \sqrt{\frac{Sdd}{n-2}}$$

$$Sdd = \sum (V_i - a_{obs} - b_{obs} m_i)$$

式中, V_i 为消耗的滴定液体积数; m_i 为供试品的称样量; n 为滴定的次数。

第四个判断标准--偏相对偏差

一些滴定方法可能不能满足第一个以及第二个判断标准，但是与目标滴定体积相比，表现出比较小并可接受的偏倚(对于 10ml 滴定管。消耗的体积为 8ml±1ml)。因此，不能满足上述的第一个和第二个判断标准，可计算目标滴定体积的相对准确度。

$$\left(\frac{a_{\text{obs}}}{V_T} + \frac{b_{\text{obs}} - b_{\text{theor}}}{b_{\text{theor}}} \right) \times 100$$

但是，当建立的容量滴定方法经过了充分的研究，就有足移的理由确认滴定的重复性和准确度(至少平行滴定 6 份)不超过表 4 所列的限度值以及决策图表中(表 5)的限度。

容量滴定	含量限度 (%)	重复性 (RSD)	相对准确度 (%)
酸/碱滴定	±1.0	0.33	±0.67
非水滴定	±1.0	0.33	±0.67
碱的共轭酸	±1.0	0.33	±0.67
氧化还原法	±1.5	0.5	±1.0
银量法	±1.5	0.5	±1.0
络合滴定法	±2.0	0.67	±1.33

表中所给数据仅作为指导性建议，更严格的限度规定也可能被证明是合适的。只有在证明药品中的杂质含量较低时才可以采用容量滴定方法，否则应引入其他的含量测定方法。

重复性

RSD($n=6$)

相对准确度

$$\Delta \bar{x} = \frac{\bar{x} - x_{theory}}{x_{theory}}$$

