

杂质类定量分析方法验证中的统计学评价*

朱容蝶^{1,2}, 耿颖¹, 谭德讲^{1**}, 杨化新¹, 何兰¹, 刘万卉²

(1. 中国食品药品检定研究院, 北京 102629; 2. 烟台大学, 烟台 264003)

摘要 目的: 通过马来酸依那普利原料药中杂质依那普利的定量检测方法, 论证杂质类定量分析方法验证的科学性和严谨性, 为今后验证研究提供评价参考依据。方法: 对欧洲药典中原料药依那普利拉中杂质限度检查分析方法优化后, 通过析因设计进行试验, 在原有方法验证性能参数的基础上, 引入更多的统计参数以评价方法是否满足预期应用。结果: 专属性: 马来酸与依那普利拉分离度 $19.0 > 1.5$, 依那普利拉与依那普利分离度为 $30.9 > 4.0$, 专属性符合要求。线性: $0.5 \sim 12.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的浓度范围内呈线性, 线性方程为 $Y = 139.86 + 38\,982.17X$ ($r = 0.999\,8$, $r > 0.999$)。检测下限 (LOD) 为 $0.29 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 定量下限 (LOQ) 为 $0.76 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。准确度: $2.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以上的各浓度水平的偏倚均不超过 2.0%, 95% 的偏倚置信区间不超过 3.3%。精密度: $2.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以上的各浓度水平的重复性精密度均不超过 1.03%; 中间精密度均不超过 2.5%, 中间精度的置信上限不超过 5.0%。方法综合能力评价: 方法在浓度范围为 $2.0 \sim 9.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内, 方法最大的总变异值不超过 2.65%; 95% 预测区间在 98.0%~106.0% 范围内; 95%/90% 容忍区间在 95.0%~108.0% 范围内; 相对于该杂质 0.3% 的质量标准限度, 满足其定量检测用途。结论: 新建的方法经验证适于其预期用途: 能满足对原料药马来酸依那普利中依那普利拉杂质在限度标准为 0.3% 的定量检测所需; 新的验证试验设计可获得更多科学可靠的统计评价指标, 这些指标使得方法验证的结论更加科学、可靠和直观, 并且能够从整体把握方法的适用性; 新提供的方法变异容忍区间和预测区间, 对今后评估方法验证和转移是否成功提供了判断依据; 本文所采用的方法验证试验设计和性能参数, 可为今后更科学严谨地进行杂质类定量分析方法验证工作提供参考。

关键词: 方法验证; 有关物质; 准确度; 精密度; 线性; 范围; 专属性

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2019)02-0215-08

doi: 10.16155/j.0254-1793.2019.02.05

Statistical evaluation of method validation for quantitative analysis of impurities*

ZHU Rong-die^{1,2}, GENG Ying¹, TAN De-jiang^{1**}, YANG Hua-xin¹, HE Lan¹, LIU Wan-hui²

(1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China; 2. Yantai University, Yantai 264003, China)

Abstract Objective: To demonstrate the accuracy and rigor of the quantitative analysis method of the impurities by using enalaprilat in the raw material of enalapril maleate, and to provide reference for future confirmation research.

* 国家“重大新药创制”科技重大专项(2015ZX09303001)

** 通信作者 Tel:(010)53851581; E-mail: tandj@nifdc.org.cn

第一作者 朱容蝶 Tel: 18811714736; E-mail: rongdiezhu@163.com

耿颖 Tel:(010)53851603; E-mail: gengying@nifdc.org.cn

Methods: After optimizing the impurity limit analysis method of the drug substance enalapril maleate in the European Pharmacopoeia, the test was carried out by factorial design, and based on the validation of the performance parameters of the original method, more statistical parameter evaluation methods were introduced to evaluate whether they met the intended use. **Results:** Specificity: The separation degree of maleic acid and enalaprilat was $19.0 > 1.5$, the separation of enalaprilat and enalapril was $30.9 > 4.0$, and the specificity met the requirements. Linearity: The concentration range of $0.5\text{--}12.0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ was linear, and the linear equation was $Y=139.86+38\ 982.17X$ ($r=0.999\ 8$, $r>0.999$). LOD was $0.29\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; LOQ was $0.76\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Accuracy: The bias of each concentration level above $2.0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ was not more than 2.0%, and the 95% confidence interval was less than 3.3%. Precision: The repeatability precision of each concentration level above $2.0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ was not more than 1.03%; the intermediate precision was less than 2.5%, and the upper limit of the intermediate precision was not more than 5%. Method comprehensive ability evaluation: The method had a concentration range of $2.0\text{--}9.0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, and the maximum total variability value of the method was not more than 2.65%; 95% prediction interval was in the range of 98.0%–106.0%; 95%/90% tolerance range was in the range of 95.0%–108.0%; Relative to 0.3% quality standards of the impurity, the method met its quantitative detection purposes. **Conclusion:** The newly established method has been validated to be suitable for its intended use—it can meet the quantitative detection requirement of 0.3% of the enalaprilat impurity of the raw material drug enalapril maleate. The new validation experimental design can obtain more scientific and reliable statistical evaluation indicators, which make the conclusions of the method validation more scientific, reliable and intuitive, and can grasp the applicability of the method from the whole; the newly provided method variability tolerance interval and prediction interval provide a basis for judging whether the evaluation method verification and transfer are successful in the future; the experimental design and performance parameters of the method validation used in this paper can provide reference for the scientific and rigorous validation of the quantitative analysis method of impurities in the future.

Keywords: method validation; related substances; accuracy; precision; linear; range; specificity

分析方法验证 (method validation) 是确保药品质量不可或缺的重要一步, 各国药典和与药品相关的权威组织中均制定了相关的指导原则^[1-7], 但仍存在一些问题, 主要包括如何选择合理的方法性能参数、如何获得科学可靠的方法验证参数和如何确定方法满足预期用途的限度标准。本文通过对马来酸依那普利原料药中的杂质依那普利拉进行定量测定方法的验证, 探索杂质类定量分析方法验证时如何科学地解决上述 3 个问题。

依那普利是临床上常用的血管紧张素转换酶抑制剂, 用于各种原发性高血压、肾性高血压、充血性心力衰竭。原料药主要以马来酸依那普利的形式存在, 原料存在的主要杂质为依那普利拉 (杂质 I) 和依那普利双酮 (杂质 II), 其中主要是杂质 I。目前《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》) 对于马来酸依那普利原料药中的杂质通过液相色谱法进行限

度检查, 其可以同时检出马来酸、依那普利拉、依那普利和依那普利双酮, 但此方法仅能对杂质 I 进行限度检查, 无法用于定量测定。

本文拟以欧洲药典的方法为基础, 对其进行色谱条件优化, 并参照文献 [4-5] 和本专栏《定量理化分析方法满足预期用途的判断标准探讨》《方法验证性能参数的获取和评价新方式探讨》的论述对其进行杂质定量测定方法的验证, 以为杂质 I 提供可靠的定量检测方法, 同时为该类方法的验证提供更加科学全面的验证参数。

1 仪器和试剂

1.1 仪器

XP205DR 电子天平 (METTLER TOLEDO); 2 台岛津 LC20A 液相色谱仪 (SHIMADZU); Mili-QIntegrals 超纯水系统 (EIXT Technology Inside); 酸度计 (METTLER TOLEDO); KQ-300DV 型数控超声波清

洗仪(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂和试药

对照品:马来酸依那普利(批号 100705-201604,含量 99.9%)、依那普利拉(杂质 I)(批号 2016-784,含量 88.1%),中国食品药品检定研究院。

样品:马来酸依那普利原料(批号 5113-6-015,浙江华海药业股份有限公司)。

试剂:磷酸(分析纯,批号 20171026,太仓泸试剂有限公司);磷酸二氢钾(分析纯,批号 20161208,国药集团化学试剂有限公司);乙腈(色谱级,批号 171011, Cleman Chemical);甲醇(色谱级,批号 163201, Fisher Chemical)。

2 流动相及其他溶液的配制

2.1 流动相及溶剂

缓冲液:称取磷酸二氢钾 5.4 g,加水制成 1 000 mL,用磷酸调节 pH 至 3.0;溶剂 1:缓冲液-乙腈-甲醇(1:2:2);溶剂 2:溶剂 1-缓冲液(8:92);流动相 A:溶剂 1-缓冲液(1:9);流动相 B:乙腈。

2.2 供试品储备液

精密称取马来酸依那普利原料适量,置 50 mL 量瓶中,加甲醇 10 mL,加溶剂 2 稀释至刻度,制成 $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的供试品储备液。

2.3 对照品溶液

精密称取依那普利拉对照品适量,置 20 mL 量瓶中,加甲醇 2 mL,加溶剂 2 稀释至刻度,制成 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液。

分别精密量取对照品储备液 1、2 和 3 mL 至 100 mL 量瓶中,加溶剂 2 稀释至刻度,分别制成质量浓度为 10、20 和 $30 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。

2.4 混合对照品溶液

精密称取马来酸依那普利对照品和依那普利拉对照品至 10 mL 量瓶中,加甲醇 2 mL,加溶剂 2 稀释至刻度。精密量取 1 mL 至 100 mL 量瓶中,加溶剂 2 稀释至刻度,制成 $20 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

3 色谱条件及测定法

3.1 色谱条件

采用 Shiseido C_{18} 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),柱温 65 $^{\circ}\text{C}$,进样器温度 4 $^{\circ}\text{C}$,进样量 20 μL ,流动相同“2.1”项,梯度洗脱,洗脱顺序见表 1,流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长 210 nm。

表 1 梯度洗脱程序

Tab. 1 Gradient elution program

时间 (time)/min	流动相 A (solvent A)/%	流动相 B (solvent B)/%
0~16	90	10
16~17	90~80	10~20
17~40	80	20
40~41	80~90	20~10
41~45	10	90

3.2 测定法

精密称取马来酸依那普利适量,加甲醇 2 mL,加溶剂 2 稀释至刻度,制成每 1 mL 中约含 2 mg 的溶液,作为供试品溶液,精密量取 20 μL ,注入液相色谱仪,记录色谱图;另取依那普利拉对照品适量,精密称定,加甲醇 6 mL,加溶剂 2 制成每 1 mL 约含 $6 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液,同法测定,按外标法计算含量,依那普利拉的含量不大于 0.3%。

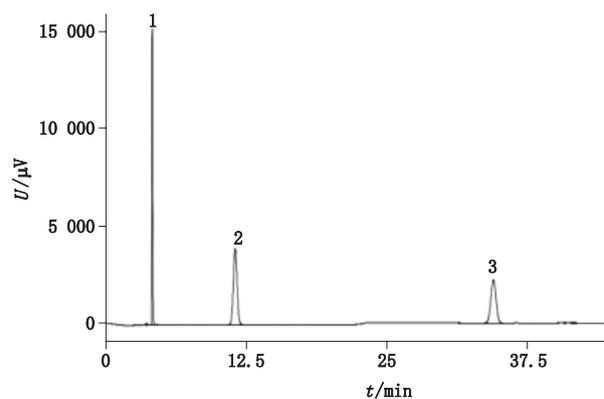
4 统计分析软件

本文所用统计软件包括 JMP 和理化方法验证统计软件(PCMV)。

5 方法验证及结果

5.1 系统适用性试验

取“2.4”项下的混合对照品溶液,按照“3.1”的色谱条件进样,获得的色谱图见图 1,出峰顺序为马来酸、依那普利拉和依那普利。依那普利峰的拖尾因子为 $1.0 < 2.0$,马来酸与依那普利拉分离度 $19.0 > 1.5$,依那普利拉与依那普利分离度为 $30.9 > 4.0$,依那普利拉理论塔板数不低于 5 000。



1. 马来酸(maleic acid) 2. 依那普利拉(enalaprilat) 3. 依那普利(enalapril)

图 1 马来酸依那普利色谱图

Fig. 1 Enalapril maleate chromatogram

5.2 专属性

取“2.4”项下的混合对照品溶液,按照“3.1”的色谱条件,进样,获得的色谱图如图1所示,马来酸与依那普利拉分离度 $19.0 > 1.5$,依那普利拉与依那普利分离度为 $30.9 > 4.0$,方法的专属性良好。

5.3 线性、检测下限与定量下限和范围

5.3.1 实验设计

在浓度范围为其质量限度标准(0.3%)的8.0%(预实验确定的LOD)~200.0%内设置9个浓度点,0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,每个浓度独立制备3份。

5.3.2 操作步骤

精密量取“2.3”项下 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液0.5、1和2 mL, $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液2、4、5 mL, $30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液1、2和4 mL,分别置10 mL量瓶中,加溶剂2稀释至刻度,制成约0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液,每个浓度独立制备3份,进样测定,试验结果见表2。

表2 线性试验的原始数据

Tab. 2 Raw data for linear tests

浓度 (concentration) / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	峰面积 (peak area) / $\mu\text{V} \cdot \text{min}$		
	1	2	3
0.508 8	20 017	20 134	19 660
1.018	39 588	40 874	40 828
2.035	78 874	80 755	79 338
3.053	117 199	118 559	117 949
4.070	158 621	158 865	158 018
6.105	236 090	237 829	240 870
8.140	311 048	313 005	319 856
10.18	390 147	397 490	401 424
12.21	478 194	480 625	474 252

5.3.3 线性数据分析

线性方程:以浓度 X 为横坐标,峰面积 Y 为纵坐标,得浓度-峰面积的最小二乘回归图,见图2。线性方程:

$$Y = 139.86 + 38\,982.17X \quad r = 0.999\,8$$

截距估计值:截距为 -139.86 ,截距的标准误为 867.04 , t 比为 -0.16 ,概率 $> |t|$ 值为 $0.87 > 0.5$,统计上显示截距与0没有显著性差异,由此确定依那普利拉杂质可通过外标法确定其含量。

回归线的标准误为 $2\,695.87$ 。

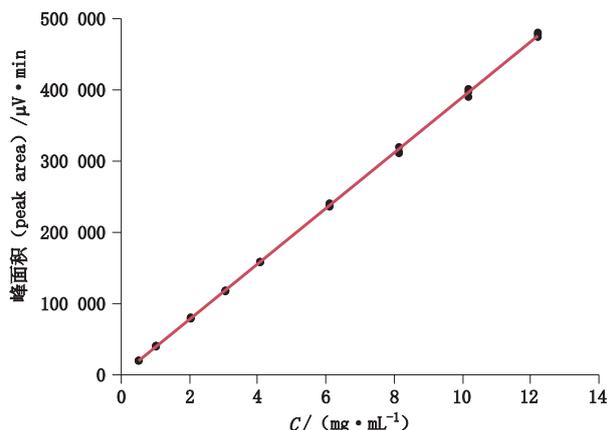


图2 浓度-峰面积的最小二乘回归图

Fig. 2 Least squares regression of concentration-peak area

5.3.4 检测下限与定量下限

基于“5.3.3”项的回归方程,采用线性95%的预测区间确定分析方法的检测下限与定量下限分别为:

$$\text{LOD} = (t_{1-\alpha; N-2} + t_{1-\beta; N-2}) \frac{s_y}{b} \sqrt{1 + \frac{1}{N} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} = 0.29$$

$$\text{LOQ} = 10 \frac{s_y}{b} \sqrt{1 + \frac{1}{N} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} = 0.76$$

5.3.5 线性范围

该分析方法在 $0.5 \sim 12.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的浓度范围内均满足线性要求。

5.4 准确度和精密度

5.4.1 实验设计

(1)对影响此方法的因素进行风险分析,确定本方法的主要影响因素:仪器、分析人员以及每个分析人员的独立操作次数(时间);(2)通过预实验,确定偏倚约为10%,变异约为5%,将 α 设为5%,效能设为90%时,通过JMP软件求得所需的样本量,即实验次数不少于5次;(3)以上述2个条件为基础,将3个主要因素均设置2个水平,采用3因素全析因设计,确定8个实验条件(见表4),满足参数计算的样本量需求;(4)浓度范围选择:以加标浓度为其质量限度标准(0.3%)的8.0%(预实验确定的LOD)~150.0%为参考,设置7个浓度点:0.5、1、2、4、6、8、9 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

5.4.2 操作步骤

精密量取“2.3”项下 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶

液 0.5、1、2 mL, 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液 2、4 mL, 30 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液 2、3 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 分别加“2.2”项下的供试品储备液 1 mL, 加溶剂 2 稀释至刻度, 制成加样浓度约为 0.5、1、2、4、6、8、9 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 每个浓度独立制备 3 份。按照“3.1”项下的色谱条件进样。结果汇总于表 4。

表 4 8 次试验的结果汇总

Tab. 4 Summary of results of 8 trials

试验模式 (test mode)	试验 1(test 1)	试验 2(test 2)	试验 3(test 3)	试验 4(test 4)	试验 5(test 5)	试验 6(test 6)	试验 7(test 7)	试验 8(test 8)
	E1/A1/R1	E1/A1/R2	E1/A2/R1	E1/A2/R2	E2/A2/R1	E2/A2/R2	E2/A1/R1	E2/A1/R2
0.5	104.71	106.17	107.96	103.09	94.47	108.86	111.27	103.67
0.5	102.84	101.55	109.63	104.02	89.62	109.00	105.33	89.88
0.5	104.19	105.20	106.20	100.56	92.33	106.10	104.17	108.36
1.0	110.52	102.38	100.92	103.52	99.01	100.83	103.91	96.49
1.0	111.71	101.63	103.00	105.38	97.50	102.46	102.23	95.68
1.0	108.65	101.76	104.45	102.09	100.31	100.68	102.90	104.43
2.0	103.35	101.13	104.91	99.29	100.45	101.45	105.19	99.80
2.0	101.27	101.32	103.83	102.88	97.94	101.27	103.83	100.32
2.0	103.27	100.45	105.59	101.52	100.02	100.51	104.07	100.68
4.0	102.44	101.25	100.89	103.44	103.37	97.53	100.07	100.01
4.0	103.29	101.23	99.98	102.97	99.92	99.16	100.58	100.15
4.0	103.34	102.09	100.56	103.60	109.56	98.54	100.09	99.88
6.0	101.53	101.75	101.52	99.70	99.90	101.71	101.28	100.62
6.0	101.47	100.94	100.14	100.19	101.48	101.24	100.80	100.72
6.0	102.30	100.81	101.15	96.79	100.00	101.09	100.50	100.36
8.0	103.26	99.53	101.26	100.26	98.77	98.54	99.05	99.15
8.0	101.09	101.07	100.60	100.32	99.07	100.70	100.14	99.86
8.0	103.15	98.68	100.58	100.87	99.31	99.87	99.69	100.00
9.0	100.57	99.91	102.20	100.46	99.52	101.24	101.21	100.21
9.0	102.35	100.15	101.40	100.74	101.00	100.63	101.21	101.35
9.0	102.49	100.20	101.34	101.07	100.01	101.24	101.11	100.96

注 (note): 1. 第 1 列为浓度列, 单位为 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (The first column is the concentration column in $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); 2. A 表示“分析人员”, E 表示“仪器”, R 表示“操作”; 1、2 表示两个水平 (A represents “analyst”, E represents “instrument”, R represents “run”; 1, 2 represents two levels)

5.4.3 结果分析

5.4.3.1 精密度 通过对每个浓度进行方差成分分析, 可获得该分析方法在不同浓度下的重复性, 中间

精密度及其精密度上限值。设 $\alpha = 0.05$, 精密度结果表见表 5。

5.4.3.2 准确度 通过对每个浓度下真实值 (100%)

表 5 不同浓度下的重复性、中间精密度和精密度的置信上限汇总表

Tab. 5 Summary of repeatability, intermediate precision, and confidence upper limits for precision at different concentrations

浓度 (concentration) / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	重复性 (repeatability) / %	中间精密度 (intermediate precision) / %	中间精密度置信 上限 (intermediate precision confidence limit) / %
0.5	4.01	6.15	9.97
1.0	2.10	3.97	6.68
2.0	1.03	2.08	3.53
4.0	1.78	2.47	3.90
6.0	0.82	1.09	1.70
8.0	0.79	1.25	2.05
9.0	0.56	0.77	1.21
平均 (average) / %	1.58	2.54	4.15

与回收率结果的差值获得方法在该浓度下的偏倚值, 以及获得其置信区间。设 $\alpha = 0.05$ 时的结果分析表见表 6。

表 6 不同浓度下与准确度相关的参数汇总表

Tab. 6 Summary of parameters related to accuracy at different concentrations

浓度 (concentration) / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	均值 (average) / %	偏倚 (bias) / %	偏倚的置信区间 (biased confidence interval) / %
0.5	103.30	3.30	-0.19~6.79
1.0	102.60	2.60	0.20~5.00
2.0	101.85	1.85	0.57~3.12
4.0	101.41	1.41	0.08~2.75
6.0	100.75	0.75	0.17~1.33
8.0	100.20	0.20	-0.52~0.92
9.0	100.94	0.94	0.53~1.35

5.4.3.3 方法能力的综合评价 对于准确度与精密度的联合判定, 引入新的统计评价参数, 方法变异、方法能力指数 (MCI)、方法误判率、方法分级、预测区间和容忍区间。假定杂质的质量标准在 90.0%~110.0% 时能满足产品检测的需求, 则分析结果见表 7。图 3 和图 4 为在不同浓度下的预测区间或容忍区间与质量标准的关系图。从表 7、图 3 和图 4 可以看出, 此分析方法在 2.0~9.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 方法的准确度与精密度能满足产品检测需求。

表 7 不同浓度水平下的方法能力评价表

Tab. 7 Method capability evaluation table at different concentration levels

浓度 (concentration) / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	方法总变异 (method variability) / %	95%/90% 容忍区间 (95%/90% tolerance interval) / %	95% 预测区间 (95% prediction interval) / %	方法能力指数 (MCI)	方法误判率 (method misjudgment)	方法级别 (method level)
0.5	6.17	86.96~119.64	92.83~113.77	0.54	1.05e-01	V
1.0	4.43	91.36~113.84	95.40~109.80	0.75	2.40e-02	IV
2.0	2.65	95.87~107.82	98.02~105.68	1.26	1.65e-04	III
4.0	2.44	95.17~107.66	97.41~105.42	1.36	4.23e-05	II
6.0	1.14	98.05~103.45	99.02~102.48	2.92	0.00e+00	I
8.0	1.10	96.82~103.58	98.04~102.36	3.04	0.00e+00	I
9.0	1.12	99.01~102.87	99.70~102.18	2.96	0.00e+00	I

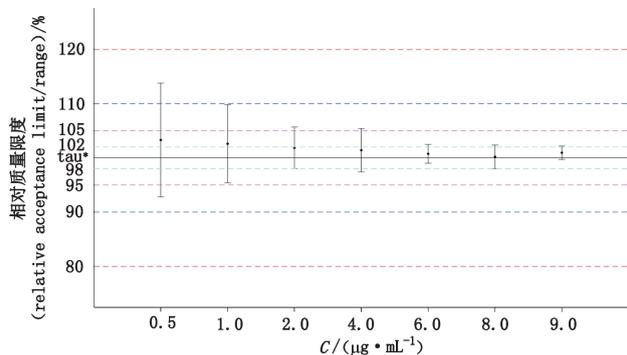
5.5 方法适用范围

在准确度、精密度、LOQ 和线性满足前提下的方法适用浓度范围为 2.0~9.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

5.6 溶液的稳定性试验

一次进样需运行 45 min, 为保证在方法验证期间, 所配制溶液的稳定性, 考察了供试品溶液在 60 h 内的稳定性。

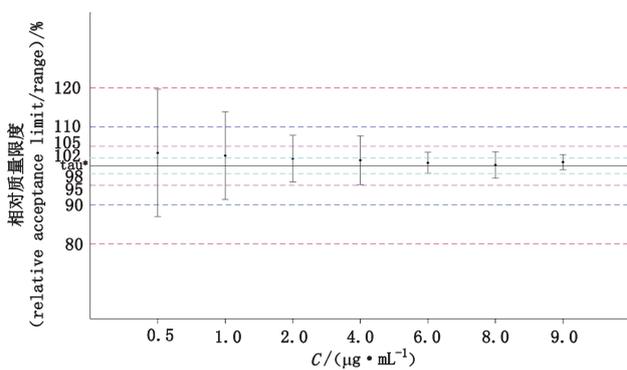
精密量取“2.1”供试品储备液 1 mL 至 10 mL 量瓶中, 加溶剂 2 稀释至刻度, 在 0、5、10、20、30、40、50、60 h 按照“3”项色谱条件进样, 获得依那普利和依那普利拉的峰面积。从表中可以看出, 随着所配制溶液放置时间的延长, 依那普利拉逐渐增多, 依那普利减少。在 40 h 内, 依那普利拉峰面积的 RSD=0.72%, 溶液维持稳定。



* 目标值 (target value)

图3 预测区间图

Fig. 3 Prediction interval map



* 目标值 (target value)

图4 容忍区间图

Fig. 4 Tolerance interval map

6 讨论和结论

6.1 马来酸依那普利原料药中依那普利拉杂质定量测定的检测方法

2015年版《中国药典》中对马来酸依那普利原料药中依那普利拉杂质进行的是限度检查,该方法的系统适用性试验在主成分和杂质组分均为 $20.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时满足药典要求。但在进行实际产品检测时,由于试验时按 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度进样(高于系统适用性浓度 100 倍),导致马来酸峰与依那普利拉峰出现一定程度重合(图 5),使含量计算存在被低估的风险。

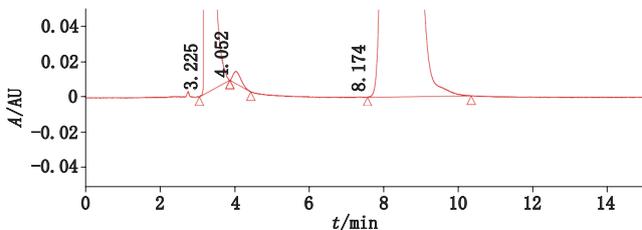


图5 试验浓度下色谱峰分布

Fig. 5 Peak distribution at the test concentration

为使马来酸峰与依那普利拉峰能完全分开,保证能够准确定量依那普利拉峰,作者以欧洲药典^[8]中原料药依那普利拉的杂质进行限度测定方法的色谱条件为基础进行优化,综合考虑峰形、马来酸峰与依那普利峰的分度以及分析时间等因素,最终确定的色谱条件。

该方法的缺点是无法检测到马来酸依那普利中的杂质依那普利双酮,但本实验主要用于对杂质类定量分析方法性能参数的评估探讨,故不影响此目的的阐述。

6.2 LOD 和 LOQ 的确定

目前 ICH Q2(R1)指南和专著给出的确定 LOD 与 LOQ 的方法可以归为 4 类:1)可视化的评估;2)基于空白分布;3)基于线性;4)基于分析方法的精密度。国内最常应用的是基于空白分布中信噪比法来确定 LOD 与 LOQ。本文所计算 LOD 的方法是基于 USP<1210>^[5]提出的线性 95% 的预测区间来确定,此方法不仅考虑了 I 类错误与 II 类错误,同时将实验测定的变异性(不确定度)考虑在内,因此更加的可靠和科学。按照<1210>的阐述,该方法所得 LOD 可作为最小 LOQ 使用,但为保证 LOQ 更加可靠,本实验将 LOQ 用 10 替代计算公式中的 $(t_{1-\alpha; n-2} + t_{1-\alpha; n-2})$ 。

6.3 准确度和精密度的获取和描述

目前国内有关方法验证的文章中通常对方法准确度的评价仅提供偏倚及其置信区间,无法从整体体现方法的变异。系统精密度和重复性的验证,通过对某一对照品溶液连续进样 6 针来确定仪器精密度,将同一供试品溶液平行制备 6 份来确定方法的重复性。该方法节省时间成本,但是不能够正确表明方法在不同浓度下的变异性。本文中有 8 个实验条件,每个实验条件下对每个浓度独立制备 3 份溶液,通过方差成分分析可以同时确定中间精密度与重复性。同理对于重复性和仪器精密度也可以按照本文的方法确定^[9]。本文的试验设计充分考虑了不同浓度下该方法的变异,从整体把握方法的适用性及其适用范围。

为了更充分表达所获准确度和精密度,本文所采用的设计,还能有效地计算出准确度置信区间和精密度置信上限,从而为技术人员和监管者更好地把握所得参数的可靠性提供依据。

6.4 方法能力综合评价参数及其比单独使用准确度和精密度评价的优势

目前 ICH 指南、《中国药典》和欧洲官方实验

室^[10]都使用准确度和精密度单独的标准进行方法验证的判定。这里的限度标准多通过经验确定出,主观性较大,且没有与所检测产品的质量标准直接联系。

本次新增方法变异、预测区间和容忍区间、方法能力指数等综合评价方法满足其预期用途的参数(有关其详细含义请参见参见 USP<1210>^[5]和本专栏《定量理化分析类方法满足预期用途的判断标准探讨》),是对准确度和精密度进行合成后衍生出的新参数,这些参数是对方法整体评价更全面的把握。此外,将各浓度下计算的容忍区间和预测区间按浓度-质量标准限度进行构图(见表7和图3和图4),可更清晰和直观地了解方法在不同浓度下的判断,具有科学、直观的优势。本方法对依那普利拉杂质的检测,在 LOQ 0.8~2.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的范围,只可确保标示量的 $\pm 20\%$ 的变异内检测准确,在 2.0~9.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度范围,其容忍区间均包含于 $\pm 10\%$ 以内,且对产品质量限度标准为 6.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度周围,该方法的变异容忍区小于 $\pm 5\%$,方法能力指数达到 1.02,因方法变异产生的误判率为 0.2%;故认为是一个非常可靠的定量检测方法。

本次方法验证所获预测区间和容忍区间不仅可用于新方法进行方法验证,也为后续方法的转移和验证判定提供依据,即方法转移或确认时,进行一次实验所获得的结果应分布于预测区间内,所有试验结果的 90% 应处于容忍区间内。

6.5 结论

该方法满足对马来酸依那普利原料药中依那普利拉杂质进行定量检测的要求。

在专属性方面,依那普利拉峰与马来酸峰和依那普利峰间的分离度分别为 19.0 和 30.9。

在线性、LOD 和范围方面:在 0.5~1.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的浓度范围内呈线性相关,线性方程为 $Y=139.86+$

$38\ 982.17X$, $r=0.999\ 8$; 残差标准误为 2 693.44,且残差呈随机分布,截距与零无显著差异;由此确定杂质依那普利拉可通过外标法确定其含量;基于线性 95% 的预测区间确定的 LOQ 为 0.76 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

在综合能力评价方面:2.0~9.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的浓度范围内,方法的预测区间与容忍区间均分布于限度标准的 90.0%~110% 内,在产品质量标准限度 6.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 周围,方法可达到 III 级方法,因方法产生的误判率仅为 0.2%。

溶液稳定性:在 40 h 内溶液维持稳定。

参考文献

- [1] ICH Harmonised Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology Q2 (R1) [S]. 2005
- [2] 中华人民共和国药典 2015 年版. 四部 [S]. 2015: 374 (9101) ChP 2015. Vol IV [S]. 2015: 374 (9101)
- [3] USP 41-NF 36 [S]. 2018: 6785 (<1032> Design and Development of Biological Assay)
- [4] USP 41-NF 36 [S]. 2018: 6803 (<1033> Biological Assay Validation)
- [5] USP 41-NF 36 [S]. 2018: 7623 (<1210> Statistical Tools for Procedure Validation)
- [6] USP 41-NF 36 [S]. 2018: 7665 (<1225> Validation of Compendial Procedure)
- [7] Food and Drug Administration of the United States of America (USA-FDA): Analytical Procedures and Methods validation for Drugs and Biologics Guidance for industry [S]. 2015.
- [8] EP. 9. 5 [S]. 2018: 2349
- [9] JOACHIM E. Method Validation in Pharmaceutical Analysis [M]. Darmstadt: Wiley-Vch, 2005: 30
- [10] OMCL Network of the Council of Europe. Evaluation and Reporting of the Results Annex 2A. PA/PH/OMCL (14) 89R [EB/OL]. [2018-12-11]. <https://www.edqm.eu/en/quality-management-guidelines-86.html>

(本文于 2018 年 12 月 13 日收到)