

必读 | 方法验证、方法确认的区别与联系

生物医药工程智库 今天



无论什么方法，在使用之初，一般在下列情况下，要求对分析方法进行验证、确认（或称证实）或重新验证。那么，方法验证和确认究竟有什么区别及联系呢？相信很多小伙伴都是不了解的，即使了解也不能准确的给出具体的答案。不知道的小伙伴有福了，今天咱们就来具体的说说。

任何分析检测的目的都是为了获得稳定、可靠和准确的数据，方法验证在其中起着极为重要的作用。方法验证的结果可以用于判断分析结果的质量、可靠性和一致性，这是所有质量管理体系不可分割的一部分。

一般在下列情况下，要求对分析方法进行验证、确认（或称证实）或重新验证：

- （1）首次用于常规检测前；
- （2）转到另一个实验室时；
- （3）对于验证过的方法，其条件或方法参数发生变化时（例如，仪器性能参数发生改变或样品基质不同时），并且这种变化超出了方法的原适用范围。

对实验室有影响的法规和质量标准一般都要求进行方法验证。有的法规中直接使用“验证或确认”一词，并列出具体的参数，也有的法规用这样的陈述暗示验证要求——“检测方法应适合于预期用途。”



国内主要法规标准

国内第三方检测机构一般均非标准制修订机构，方法验证或确认的来源基本来自资质认定或实验室认可的要求，主要依据如下：

01、CNAS-CL01:2006

方法选择：实验室制定的或采用的方法如能满足预期用途并经过确认，也可使用。所选用的方法应通知客户。在引入检测或校准之前，实验室应证实能够正确地运用这些标准方法。如果标准方法发生了变化，应重新进行证实。

(1) 实验室应对非标准方法、实验室设计(制定)的方法、超出其预定范围使用的标准方法、扩充和修改过的标准方法进行确认，以证实该方法适用于预期的用途。确认应尽可能全面，以满足预定用途或应用领域的需要。实验室应记录所获得的结果、使用的确认程序以及该方法是否适合预期用途的声明。

按预期用途进行评价所确认的方法得到的值的范围和准确度，应与客户的需求紧密相关。这些值诸如：结果的不确定度、检出限、方法的选择性、线性、重复性限和/或复现性限、抵御外来影响的稳健度和/或抵御来自样品(或测试物)基体干扰的交互灵敏度。

02、实验室资质认定评审准则

实验室应确认能否正确使用所选用的新方法。如果方法发生了变化，应重新进行确认。实验室应确保使用标准的最新有效版本。

实验室自行制订的非标方法，经确认后，可以作为资质认定项目，但仅限特定委托方的检测。

03、司法鉴定机构资质认定评审准则

司法鉴定机构应当证实能否正确使用所选用的标准方法。标准方法发生变化应当重新进行证实。

司法鉴定机构自行制订的非标准方法，经省级以上司法行政机关指定的组织确认后，可以作为资质认定项目。

04、CNAS-CL02:2013

检验程序的确认：实验室应对以下来源的检验程序进行确认：

- a) 非标准方法；
- b) 实验室设计或制定的方法；

c) 超出预定范围使用的标准方法；

d) 修改过的确认方法。方法确认应尽可能全面，并通过客观证据（以性能特征形式）证实满足检验预期用途的特定要求。

（注：检验程序的性能特征宜包括：测量正确度、测量准确度、测量精密度（含测量重复性和测量中间精密度）、测量不确定度、分析特异性（含干扰物）、分析灵敏度、检出限和定量限、测量区间、诊断特异性和诊断灵敏度。）

05、CNAS-CL08:2013

鉴定机构应对非标准方法进行确认以证实该方法适用于预期的用途，并保存使用的确认程序、所获得的结果、以及该方法是否满足预期鉴定目的的评价等记录。

按预期用途对鉴定方法进行确认时，鉴定机构应有证据证明对影响结果的因素进行了评价。所确认的鉴定方法的值范围和准确度应与客户的需求紧密相关。

诸如：结果的不确定度、检出限、方法的选择性、线性、重复性限和/或复现性限、抵御外来影响的稳健度和/或抵御来自检材/样本基体干扰的交互灵敏度。

06、其他

CNAS-CL52:2014《CNAS-CL01<检测和校准实验室能力认可准则>应用要求》：在引入检测或校准方法之前，实验室应对其能否正确运用这些标准方法的能力进行验证，验证不仅需要识别相应的人员、设施和环境、设备等，还应通过试验证明结果的准确性和可靠性，如精密度、线性范围、检出限和定量限等方法特性指标，必要时应进行实验室间比对。

CNAS-CL10:2012《检测和校准实验室能力认可准则在化学检测领域的应用说明》：

方法的选择：实验室应对首次采用的检测方法进行技术能力的验证，如检出限、回收率、正确度和精密度等。如果在验证过程中发现标准方法中未能详述但影响检测结果的环节，应将详细操作步骤编制成作业指导书，作为标准方法的补充。当检测标准发生变更涉及到检测方法原理、仪器设施、操作方法时，需要通过技术验证重新证明正确运用新标准的能力。

方法确认：a) 任何对标准方法的偏离，都必须进行实验室确认，即使所采用的替代技术可能具有更好的分析性能。b) 实验室应通过试验方法的检出限、精密度、回收率、适用的浓度范围和样品基体等特性来对检测方法进行确认。

CNAS-CL09:2013要求：标准方法引入检测之前，实验室应证实能够正确地运用这些方法，并未清晰说明如何证实，而对非标方法的确认提供的参考资料，比如SN/T 3266-2012《食品微生物检验方法确认技术规范》；CNAS-CL18:2013规定标准方法必要时才进行技术验证；CNAS-CL44:2013和CNAS-CL56:2014仅规定非标准方法（包括实验室自制定方法）才需要确认；CNAS-CL55:2014仅规定：以软件方式、物理方式或采样方式等标准未明确的方法进行低辐照度试验时，实验室应对该方法进行确认。

除化学领域明确规定应对标准方法进行确认或验证外，其他领域仅要求对非标方法进行确认或验证，或者未做规定，而且对确认和验证是否有区别也未作说明。但是CNAS-CL52:2014是与CNAS-CL01:2006同步应用的，具有等同效力，因此其他领域如未对标准方法确认或验证进行规定的，应参考CNAS-CL52执行。



国外主要法规标准

01、美国FDA

cGMP（药品动态生产质量管理规范）和GLP（临床前研究实验室质量管理规范）等法规要求必须进行分析方法的验证。美国cGMPs提出了验证要求：

- （1）应用检测方法时，应建立并记录准确度、灵敏度、专属性以及重现性；
- （2）实验室的记录应包含用于样品检测的每个方法的声明。声明中应指明建立方法的数据位置，这些数据应能证明该检测方法在应用于产品检测时符合特定的准确度和可靠性标准要求。所有检测方法的适用性应在实际应用条件下得到证实；
- （3）如应用于检测的已确认方法有任何变更，应保存完整的变更记录。该记录中应包含变更原因以及相关数据，以证实方法变更后的样品检测结果至少能达到原方法相同的准确度和可靠性；

FDA GLP 法规21 CFR 第58 部分并未用到“验证”一词，但是依据58.113 中的要求，检查员需要检查验证研究记录：“应采用合适的分析方法进行检测”，其中“合适的”即意味着验证。并且FDA 的生物分

析方法验证指南中规定临床前毒理研究也属于验证范围；

FDA 关于生物利用度和生物等效性要求的法规21 CFR 320第29节中规定：用于体内生物利用度研究以检测体液或排泄物中活性药物成分或治疗成分检测的分析方法，或用于急性药理作用检测的方法，应证明其具有准确性和足够的灵敏度以及恰当的精密度，能满足体内的活性药物成分/治疗成分或其代谢产物的实际浓度的检测要求。

02、(PIC/S)

药品检查协定和药品监察检查合作计划PIC/S 的使命是“领导制定、实施和维护国际性的、统一的药品生产质量管理规范（GMP）标准以及药品领域检查工作质量体系”。

这一使命通过以下手段得以实施：制定和推广统一的GMP 标准和指导文件；培训主管部门、尤其是检查员；评审检查活动；以及促进主管部门和国际组织的合作和网络化。目前，约有50个政府组织参加了PIC/S，包括所有的欧盟成员国。许多新的成员国还没有按照PIC/S GMPs建立自己的GMP 法规。

PIC/S 的GMP 与欧盟的GMP 指令非常相似。两个文件都在第6.1.5 部分以相同的文字规定了分析方法验证的要求：分析方法应经过验证。申请上市许可的所有检测均应按照批准的方法进行。

在PIC/S 的实验室现场检查指南中包含检查员检查质量控制实验室时的一些提问。这些问题包括：

方法验证是不是验证总体计划的一部分？

有没有通用的方法验证SOP？

方法验证报告是否经过正式批准？

是否明确验证目的？

是否按ICH规定的参数对每一种方法进行完整的验证并记录？

是否规定了每种方法的接受限度并能符合该限度规定？

03、国际协调会议（ICH）

国际协调会议（ICH）发起于1990年，汇集了欧盟、日本和美国的监管机构和这三个地区的制药行业专家，一起讨论产品注册方面的科学和技术问题。

ICH 出版的指导原则，有些被成员国（如欧盟）写入法律，有些被国家权力机构（如美国FDA）推荐为指南。其中，最为重要的ICH 文件是活性药物成分的GMP 指南。在第12章中规定了方法验证的要

求：应对分析方法进行验证，所用方法收载于相关的药典或其他认可的标准参考文件中的除外。所有检测方法均应在实际使用条件下证实其适用性；实施分析验证的程度应能反映分析的目的以及活性药物成分的生产工艺状况；开始验证分析方法前，应考虑对分析设备进行适当的确认。

04、美国药典（USP）

美国药典（USP）为具体的应用制定方法，并针对FDA 监管的行业内不同的分析特点制定通则。根据联邦食品药品和化妆品法案501 部分的规定，USP 方法构成法定标准。USP 制定了两个与方法验证有关的通则。

通则<1225>是“法定方法的验证”。该通则中给出了用于新方法验证的各种参数。通则中的建议可以被药品实验室用作自行制定方法的验证。

通则<1226>是“法定方法的确认”。该通则用于实施药典和标准方法的实验室。这些内容也适用于实验室应用其他实验室验证过的方法。

05、ISO/IEC 17025

同CNAS-CL01:2006《检测和校准实验室能力认可准则》，以上国内外法规标准中多次出现验证、确认和证实三个术语，由于国内翻译问题，经常在标准中将确认和验证混用或等同。正确的翻译：Verification译成确认或证实，Validation译成验证，建议参考美国USP。

导致很多实验室认为方法确认或验证困难重重原因有四：

- （1）法规标准的翻译问题，导致理解存在偏差，比如CNAS-CL01:2006中5.4.2所描述的“证实”即与“确认”同义；
- （2）部分法规标准未作详细说明，比如《实验室资质认定评审准则》；
- （3）方法确认和方法验证定义不清，概念搞混；
- （4）国人缺乏研究心态，有点困难就逃避，懒惰之心严重。



验证和确认的定义

01、方法验证（Validation of method）

USP：方法验证是一个通过实验室研究来证明程序的性能参数符合期望的分析应用要求的过程。

ICH：分析方法验证的目的是显示分析方法适用于它所期望的应用目的。

FDA：方法验证是一个阐述分析方法适合于其使用目的的过程。

02、方法确认 (Verification of method)

USP<1225>：USP-NF所收载方法的使用者不需要验证这些方法的准确性和可靠性，但需要确认这些方法在实际使用条件下的适应性。

USP<1226>：确认包括所涉及方法的性能参数，如那些在<1225>中描述的，以建立恰当的、相应的数据，而不是重复验证的过程。

FDA：出现在USP中的方法被认为已验证，对于法定方法，厂家必须阐明该方法在实际使用情况下的状态。

总体来讲，方法验证是阐明方法适合于它使用目的的一个过程，方法确认是通过已验证的方法进行检测的条件确实适合于该已验证方法的过程。



方法验证参数和试验

01、方法验证的参数

USP<1225>规定实验室应采用试验方式进行方法验证：“应通过实验室的研究制定成一定的分析方法验证程序，证明方法的性能参数符合预期的分析应用要求。”不同国家和国际委员会的工作组都对方法验证所要求的试验作出了规定，这些在文献中都有阐述。不幸的是，一些定义在不同的组织间差异很大。为了达到标准化的目的，ICH 来自美国、欧洲和日本的行业和监管机构代表定义了分析方法验证的参数、要求和方法。

表1 典型化学分析方法验证参数的选择

		检出限	定量限	回收率	精密度	选择性	适用性	灵敏度
定性方	S	+	-	-	-	+	+	-

法	C	+	-	-	-	+	+	-
定量方法	S	+	+	-	+	+	+	+
	C	+	+	+	+	+	+	+

备注：“S”=筛选方法（Screening methods）；
“C”=确证方法（Confirmatory methods）
“+”=必选参数；

表2 国内外对方法验证参数的要求

参数	对相关参数做出要求的法规、标准
定量限	USP、ICH、ISO/IEC17025、Ch.P（2010版）、SN/T 3266-2012、《化矿金专业化学分析方法验证程序（试行）》（CNCA）、《食品化妆品专业化学分析方法验证程序》（CNCA）、《食品化妆品专业生物检测方法确认（验证）程序》（CNCA）、《化学分析方法验证程序》（征求意见稿，AQSIQ）、《化学药物质量控制分析方法验证技术指导原则》（CFDA）、《农药产品质量分析方法确认指南》（征求意见稿，农业部）
检测限/检出限	不含《农药产品质量分析方法确认指南》（征求意见稿，农业部），其他同定量限
准确度/正确度/回收率	同定量限
精密度 1 重复性 1 中间精密度 1 再现性（复现性、重现性）	同定量限； 不含USP，其他同定量限； ICH、《化学药物质量控制分析方法验证技术指导原则》（CFDA）； 同定量限。
专属性/选择性/特异性	同定量限；几个术语的定义存在相同或相近之处，USP、ICH称为专属性，ISO/IEC17025称为选择性，某些标准称为特异性，某些标准将选择性定义为包容性和排他性的组合。
耐用性/适用性/稳健性/稳定性	不含SN/T 3266-2012和《农药产品质量分析方法确认指南》（征求意见稿，农业部），其他同定量限；不同标准采用的术语存在差异，但其定义相同或相近
线性	同定量限
范围/测定范围	不含SN/T 3266-2012和《农药产品质量分析方法确认指南》（征求意见稿，农业部），其他同定量限
灵敏度	不含《化学药物质量控制分析方法验证技术指导原则》（CFDA）和《农药产品质量分析方法确认指南》（征求意见稿，农业部），其他同定量限

注：

(1) 依据GB/T 3358.2-2009《统计学词汇及符号第2部分：应用统计》(IDT ISO3534-2:2006) 和GB/T6379.1-2004《测量方法与结果的准确度(正确度与精密度)第1部分:总则与定义》(IDT ISO5725-1:1994) 中规定“准确度”的定义为正确度和精密度的组合，而国内目前部分标准中(包括上表) 的“准确度”仅等同GB/T 3358.2-2009中的“正确度”，所以上表的准确度与正确度同义，此差异主要是由于国内标准制订引用术语不严谨造成。

(2) 回收率是表示准确度/正确度的一项指标；

(3) 再现性亦称复现性、重现性；

(4) 由于重复性和再现性条件均为精密度的两种极端条件，因此引出中间精密度这一术语，具体定义见GB/T 3358.2-2009。

CNAS-CL01:2006和CNAS-CL10:2012对方法确认的具体参数描述已经与表1类似，但确认终究不是验证，因此一般要求对非标准方法参照表1进行验证，而标准方法的确认则适当采用简化程序。

至于每项参数的验证试验具体如何操作，可参考本文后的相关参考文献，这里不做过多阐述。

02、方法验证的步骤

某某个具体方法的有效性应通过实验加以证明，一般使用与常规分析的未知样品接近的样品或标准品进行验证试验。其准备和执行应按照验证计划进行，最好写成作业指导书。图1为方法验证的参考步骤。



图1 方法验证常规步骤

方法确认（证实）

ISO/IEC 17025 要求：“应优先使用以国际、区域或国家标准发布的方法。”，这些标准方法被认为已经得到验证。因此，许多技术人员错误地认为标准方法不需要在实验室中做任何进一步的验证、证实或试验即可投入使用。

US FDA CGMP 法规在21 CFR 211.194 (a)(2)中规定：“如果应用的方法收载于现行的美国药典或其他认可的标准方法中，或在批准的新药应用中有详细方法且未改变这一参考方法时，有指明方法和参考文献的声明即满足要求。所有检测方法的适用性应在实际应用条件下得到证实。”ISO/IEC 17025 在 5.4.2 中有类似的要求：“在引入检测或校准之前，实验室应证实能够正确地运用这些标准方法。如果标准方法发生了变化，应重新进行证实。”

这里明确了标准方法只要不发生变更，不需要进行验证，但实验室应确认其有能力成功运行该方法。当决定选择什么样的证实方式最好时，问题又来了。是否需要重做部分验证试验还是全部的验证试验都要重做，或者仅仅系统适用性试验或质控样品结果满意是否足够，这些都不清楚。

USP 在通则<1226>法定方法的确认中回答了这些问题，给出的建议适用于法定方法和标准方法的实施，关键的建议有：

- 1.通过系统适用性试验证明实验室和系统的性能
- 2.评价方法的临界性和复杂性
- 3.选择最重要的方法性能参数
- 4.根据方法的临界性和复杂性，重复1~3个最为重要的验证试验

ISO/IEC 17025在5.4.5.2中也给出相应的注解：用于确定某方法性能的技术应当是下列之一，或是其组合：

- 1.使用参考标准或标准物质（参考物质）进行校准；
- 2.与其他方法所得的结果进行比较；
- 3.实验室间比对；
- 4.对影响结果的因素作系统性评审；

根据对方法的理论原理和实践经验的科学理解，对所得结果不确定度进行的评定。

与内部制定方法的验证相同，标准方法的确认和评价也应该遵循文件化的程序，如确认计划或作业指导书。法定/标准方法的确认过程见图2。

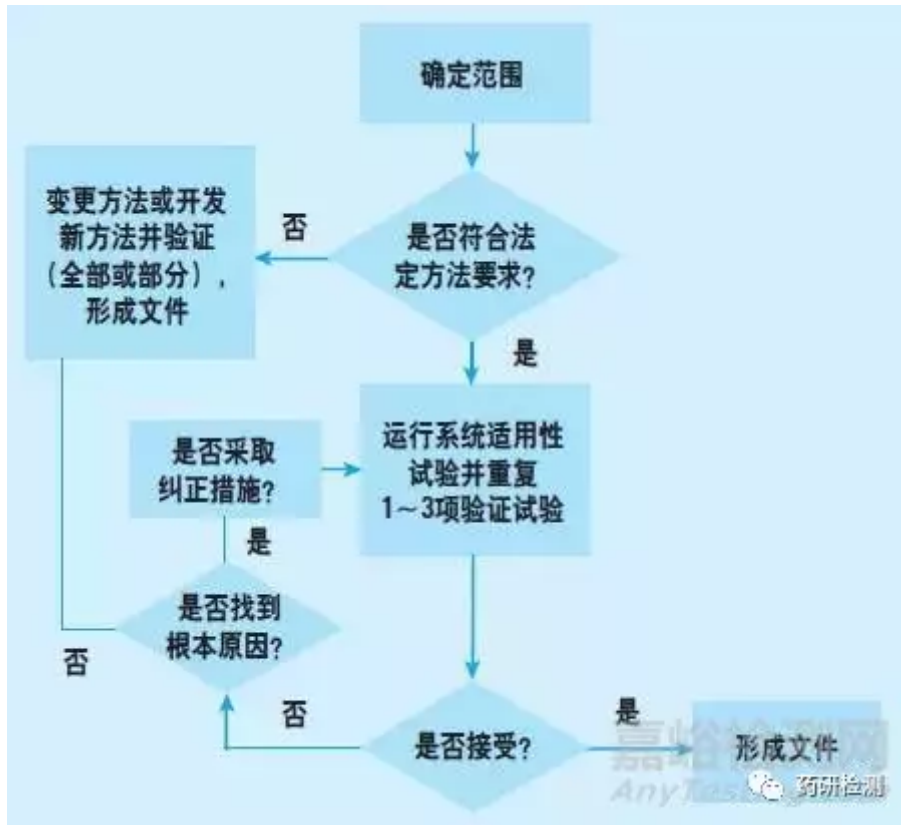


图2 方法确认的参考过程

那么，确认参数和试验该如何选择呢？参数和试验的选择与应用类型相关，图3为USP <1226>为特定应用推荐的确认试验。

例 #	应用	推荐的试验
1	对成品药或活性药物成分中主要药物成分的定量检测	精密度、专属性、线性
2	对成品药中药物的杂质或降解产物的定量测定	精密度、专属性、定量限
3	对成品药中药物的杂质或降解产物的限度检查	专属性、检测限

图3 USP <1226>为药物分析推荐的确认试验

例 #	应用	推荐的试验
1	鉴别	• 专属性
2	低浓度下的定量分析	• 准确度 • 精密度 • 专属性 • 定量限/检测限
3	被分析物高于或低于特定的低浓度（限度检查）	• 专属性 • 检测限
4	高浓度成分的定量分析	• 准确度 • 精密度 • 专属性

图4 AOAC 为特定的应用推荐的确认试验

相对于方法验证来说，方法确认类似于方法验证的简化版，且方式更灵活。但是实验室最终该如何做好方法验证或确认，还需要各实验室对相关法规标准及参考文献进行深入的研究，制定适合自身的作业指导书并严格执行，才能在应对认证认可和技术发展两个层面实现双提高。

最后，将方法验证、确认和转移简单总结如下：

表3 方法验证、确认和转移总结

内容	适用范围	目的	发起时机
方法验证	1、采用新的检测方法； 2、检测方法需变更的； 3、采用非法定方法/标准方法； 4、法规标准规定的其他需要验证的检测方法	证明采用的方法适合相应检测要求	1、建立方法时； 2、方法修订时； 3、非标方法批准采用前
方法确认	1、不需要进行验证的检测方法； 2、法定方法和标准方法，比如USP、Ch. P、国际标准、国家标准等方法	确认方法在本实验室条件下的适用性	在实验室批准使用该方法前
方法转移	将方法由A实验室转移到B实验室	确认采用的方法在B实验室条件下的适用性	在B实验室批准使用该方法前

转自：嘉峪检测网

今日推荐资源

设备验证方案


ISPE制药工程基准指南系列--无菌生产设施

清洁验证的风险评估报告

「博普智库」

专注化学人人资源获取与学习成长的平台

100000份行业资源等你来！

 博普智库

开始进阶吧！

 小程序