

如何理解分析方法验证中的专属性

原创 雨化田 药事纵横 今天

摘要

分析方法专属性的验证中，有信号响应的组分，可以以分离度来评估干扰，那么无信号响应的组分如辅料、缓冲盐等该如何评估其对测定结果的干扰，本文结合USP1200相关理念，将无信号响应组分与测定结果的影响关联起来，目的是提醒分析同行在进行分析方法开发初期就应该关注该问题，不足和缺陷之处望同行批评指正。

一、名词解释

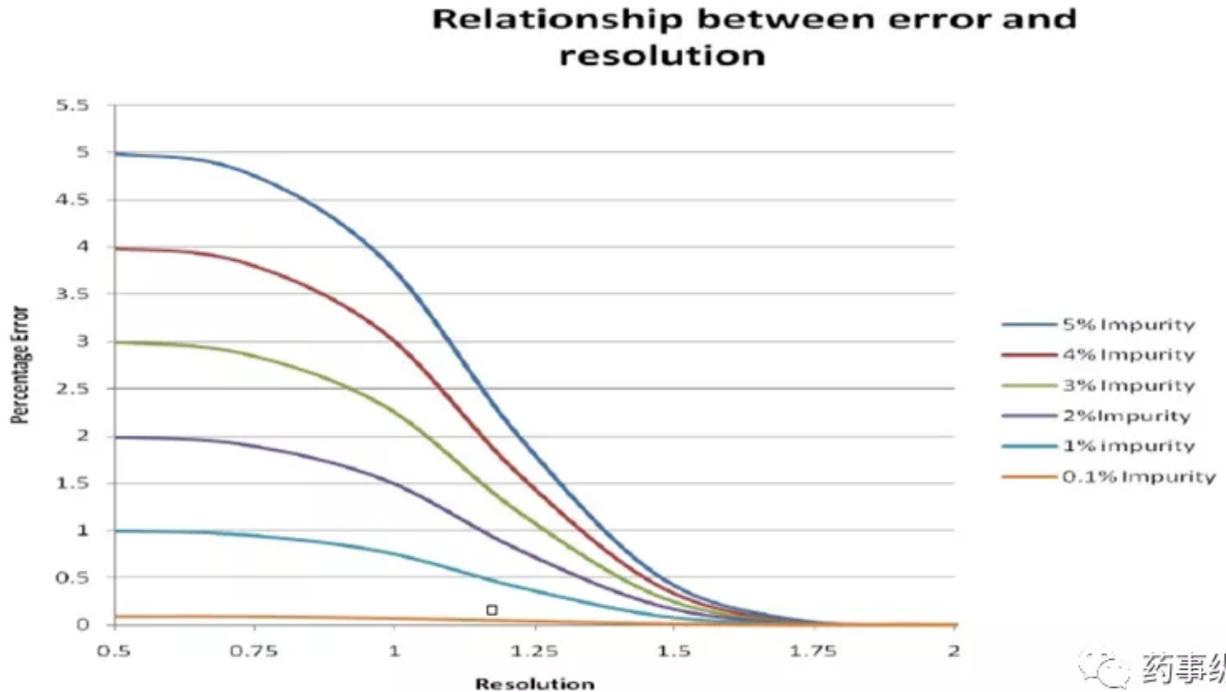
专属性：系指在其他成分（如杂质、降解产物、辅料等）存在下，采用的分析方法能正确测定被测物的能力（属于准确度的一个组成部分）。

基质效应：指的是样品中除分析物以外的组分对测定结果的影响，包括有信号响应组分和无信号响应组分。

二、基质效应的类别

2.1有信号响应的组分：

对于有信号响应的组分，其误差量可以通过精度误差与分辨率之间的非线性对应关系来控制。当峰之间的分离度为NLT1.5时，对于大多数的情况，误差将被控制在可接受的水平。



根据2020版《中国药典》9101项下相关规定，在杂质对照品可获得的情况下，对于含量测定，试样中可加入杂质或辅料，考察测定结果是否受干扰，并可与未加杂质或辅料的试样比较测定结果。对于杂质检查，也可向试样中加入一定量的杂质，考察各成分包括杂质之间能否得到分离。在杂质或降解产物不能获得的情况下，可将含有杂质或降解产物的试样进行测定，与另一个经验证了的方法或药典方法比较结果。也可用强光照射、高温、高湿、酸（碱）水解或氧化的方法进行加速破坏，以研究可能存在的降解产物和降解途径对含量测定和杂质测定的影响。含量测定方法应对两种方法的结果，杂质检查应对检出的杂质个数，必要时可采用光二极管阵列检测和质谱检测，进行峰纯度检查。

2.2、无信号响应的组分：

对于如何评估无信号响应组分对测定结果的影响，通常有以下两种方式

1) 标准曲线法 (USP1200)

When applied to an Assay procedure, the bias caused by nonspecific detection of components is NMT one-third the bias allowed in the Precision–Accuracy study. The spiked solution is prepared with interference levels that are higher than expected in order to exaggerate the response. An example for a drug substance follows

当应用于分析程序时，由非特异性检测组分引起的偏差为NMT，即“精密度—准确度”研究允许的偏差的三分之一，加标溶液的干扰水平要高于预期水平，以夸大响应。原料药示例如下：

Spiked standard solution(s): Contains the drug substance at the same concentration as the Standard solution and each specified impurity at 10 times the specified value and unspecified impurities at 1.0%

加标标准溶液：包含与标准溶液浓度相同的原料药，每种规定的杂质含量为规定值的10倍，未规定的杂质含量为1.0%

Samples: Standard solution and Spiked standard solution(s) Analysis: Analyze the results, and determine the difference between the drug substance response from the Standard solution and Spiked standard solution. Using the calibration curve, calculate the percentage difference in the Assay concentration so obtained

样品：标准溶液和加标溶液分析：分析结果，并确定标准溶液和尖峰标准溶液对药物的反应之间的差异。使用校准曲线，计算得出的测定浓度的百分比差异

Acceptance criteria: NMT 1%

可接受标准：不得超过1%

When applied to an impurity procedure, the level of bias is NMT one-third the precision value determined in the Precision study.

当应用于杂质检测，偏差不得超过精密度要求的1/3。

Spiked standard solution(s): Contains each specified impurity at 10 times the specified value and unspecified impurities at 1.0%

加标标准溶液：每种规定的杂质含量为规定值的10倍，未规定的杂质含量为1.0%

Samples: Standard solution and Spiked standard solution(s)

样品：标准溶液和加标标准溶液

Analysis: Analyze the results, and determine the difference between the impurity concentration from the Standardsolution and Spiked standard solution using the calibration curve.

分析：评估采用两种不同的校正曲线测定结果的差异

Acceptance criteria: NMT 1% (assuming a 0.1% impurity limit)

可接受标准：不得过1%（如果是0.1%的杂质限度）

2) 响应值法：在溶剂中目标分析物响应值计作B，样品基质中添加相同含量目标分析物的响应值计作A。基质效应(%) = $B/A * 100\%$ ，可接受标准可参照标准曲线法。

三、基质效应产生的途径及原因

1) 被分析物引入：以生物样本为例，内源性组分，经前处理后仍存在于提取液中。包括离子颗粒物成分(电解质、盐类)、强极性化合物(酚类、色素)和各种有机化合物(糖类、胺类、尿素、脂类、肽

类及其分析目标物的同类物及其代谢物)。

2) 由样品处理过程引入：流动相、稀释剂及过滤设备等引入的无机离子、缓冲溶液、有机酸、离子对试剂、增塑剂、表面活性剂等。

3) 检测设备：质谱设备 (ESI、APCI、EI等) 由于非目标分析物与目标物共同流出喷雾针，对电荷产生竞争，它们将产生的雾滴牢牢吸在一起，阻止其分裂成更小的微滴，改变了带电雾滴的表面张力，从而导致目标物的离子化效率降低或增强，引起响应降低或增高，便产生了基质抑制效应或基质增强效应 (如基质中含有P=O、-O-CO-NH-、OH、R-NH-、-N=、-NH-CO-NH- 等基团)。气相设备如进样口、色谱柱等，基质成分与目标分析物分子竞争进样口或柱头的金属离子、硅烷基及其他活性位点，从而掩蔽了这些活性位点，使得目标分析物与活性位点接触诱导的吸附。液相设备通常不会引入基质效应。

四、如何避免基质效应

1) 选择合适的样品制备方法：合适的样品制备方法就是净化待测组分，去除产生干扰的基质，常用的样品处理方法包括蛋白沉淀、液液萃取和固体萃取等，但在处理过程中应注意净化过程对待测组分带来的损失，兼顾基质效应及提取回收率。

2) 选择适当的溶剂：稀释剂优先考虑流动相系统，如需加助溶剂，最后控制在5%以内。对照品与供试品溶液配制方式尽量相同，如有差异应尽量控制在2%以内。液相色谱紫外检测器引起基质效应的主要原因就是溶剂选择不当所致。以某冻干粉为例，采用纯水为稀释剂，导致其中两个主要成分出现裂缝现象，导致定位不准，回收率下降如图1所示：

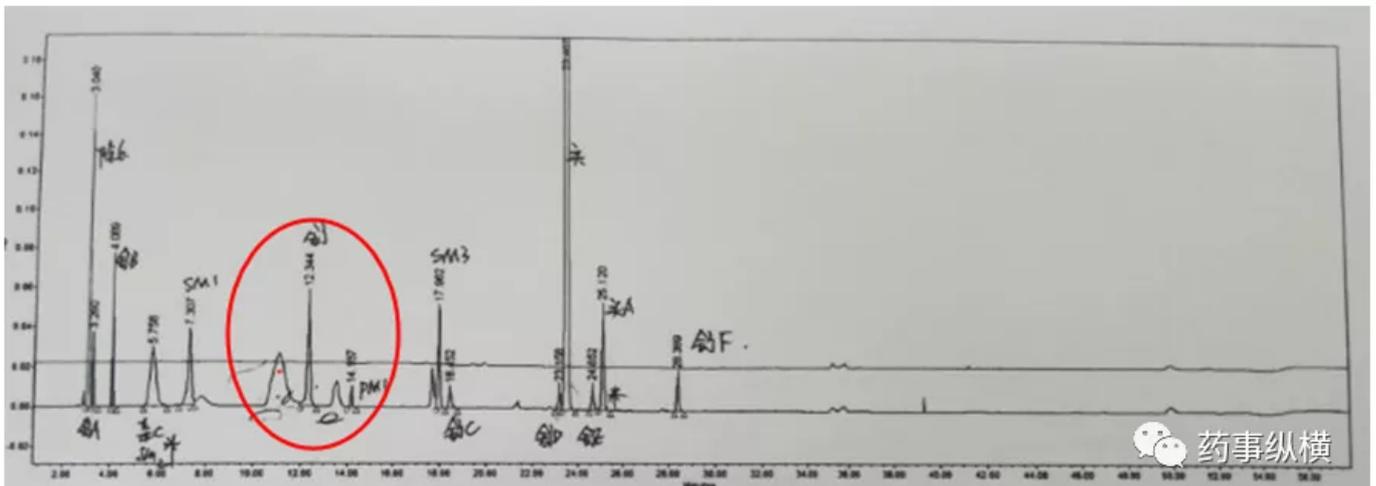


图1

更换稀释剂为流动相系统，助溶剂控制在5%以内 (因部分杂质流动相溶解性较差)，有问题的峰型明显改善，回收率明显提高，方法验证顺利通过。

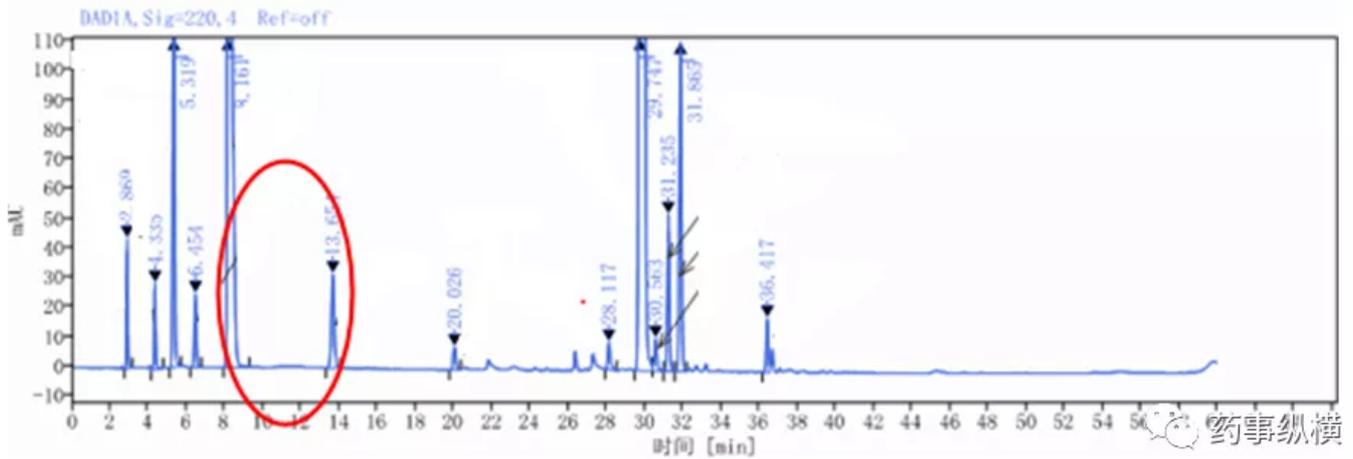


图2

3) 控制供试品浓度：对于杂质的检测，供试品浓度应控制在满载不超载的水平，在确保检测能力的前提下，减小进样量。

4) 净化流动相：采用补集小柱，净化流动相。液相色谱紫外检测器引起基质效应的另一主要原因就是流动相不干净，导致色谱峰峰型较差，回收率不合格，尤其是在梯度变化处更为明显，果断添加补集小柱。

5) 选择合适的检测器：对于质谱分析来说，消除基质效应还可以通过改变离子源的方式。目前用于定量的离子源主要是电喷雾离子源（ESI）和大气压化学离子源（APCI），通常ESI对于基质效应的敏感程度要高于APCI。

6) 内标法：在样品中加入内标物是药物分析中一种有效消除基质效应的方法，在分析测定样品中目标分析物时，加入一种内标物质消除基质效应对分析结果产生的影响，以提高分析结果的准确度。

7) 标准加入法：标准加入法是在对照品和样品中同时加入基质，两者是在同等基质效应影响下采集，故可以相互抵消基质效应的影响。该方式在残留溶剂测定中经常用到，2020版《中国药典》通则0521中有这样的描述“当采用顶空进样时，由于供试品和对照品处于不完全相同的基质中，故可采用标准溶液加入法，以消除基质效应的影响；当标准溶液加入法与其他定量方法结果不一致时，应以标准加入法结果为准。在质谱检测中，该方式也常被采用，如对照品配制过程加入空白辅料等。

8) 校正因子法：校正因子校准法消除基质效应实际上是利用溶剂标准曲线校正基质匹配标准曲线获得校正因子，建立统计模型。如APIC清洁验证指南（原料2014）规定在杂质定量测试中，回收率 $\geq 90\%$ 时一般认为是可以接受的。在清洁验证中，如果回收率 $\geq 90\%$ ，在M残留量真值计算中不需要考虑回收率；如果回收率 $< 90\%$ ，则需要在M计算时加以考虑（参见公式4），如果回收率 $< 50\%$ ，则该方法不适用。 $M = MRES/R$ ，M:清洁后设备上残留物的数据真值，MRES测得残留量R:回收率除以100（例如，对于75%即为75/100=0.75）。

五、参考文献

[1] 1200 Requirements for Compendial Validation PF Online 39(6)