

# 【臺灣藥學聯合學術研討會】

符合FDA規範之分析方法確效作業實務研討

# 背景介紹

- 為提升國內製藥品質、避免藥品在製造過程中可能產生之交叉污染，以及在生產過程中誤用不當原/物料之情形，政府在**1982**年開始推動**GMP(Good Manufacturing Practice, GMP)**藥品優良製造規範。
- 為確保及提升藥物品質，政府已全面實施藥品優良製造規範**(GMP)**，對於與分析藥物品質有關的分析方法，也另有「分析確效作業指導手冊」規範。優良成熟的製造技術及品質管制，可決定所生產的藥物品質，而品管檢驗更需要可靠有效的量測技術；因此一個具有可靠性的分析檢測方法，是整個藥物製程確效及維持藥物品質的基礎。

# FDA 對分析方法確效的定義

Analytical method validation is the process of demonstrating that an analytical procedure is suitable for its **intended purpose**. The methodology and objective of the analytical procedures should be clearly defined and understood before initiating validation studies. This understanding is obtained from scientifically-based method development and optimization studies.

分析方法的確效，其主要的目的在於確認該方法是否確實達到適用於所期望檢測之目的，因此分析方法的確效是由實驗室經研究後所建立之程序，且顯示此方法符合欲分析應用需求時的特徵。所以為確保分析數據之準確性及可靠度，應建立合適的分析方法。

*~Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics  
Guidance for Industry July 2015*

# FDA 在審核送件時常發現的問題

- Analytical methods that applicants use for the characterization or analysis of drug products should be validated by the applicant to determine if these methods are suitable for such use. However, **applicants have failed to appropriately validate their analytical methods**, which has led to incorrect results and incorrect conclusions about the drug product quality because the analytical methods were not specific, accurate, or precise. This failure has contributed to FDA's refusal to approve the ANDAs.

*Good ANDA submission practices January by FDA 2018*

# FDA 建議的參考資料

- ICH Q2 (R1) Validation of analytical procedures: Text and Methodology (1995)
- FDA Q2B Validation of analytical procedures: Methodology (1996)
- FDA Analytical procedures and methods validation for drugs and biologics (2015)
- USP <1225> Validation of Compendial Methods
- USP <1226> Verification of Compendial Procedures

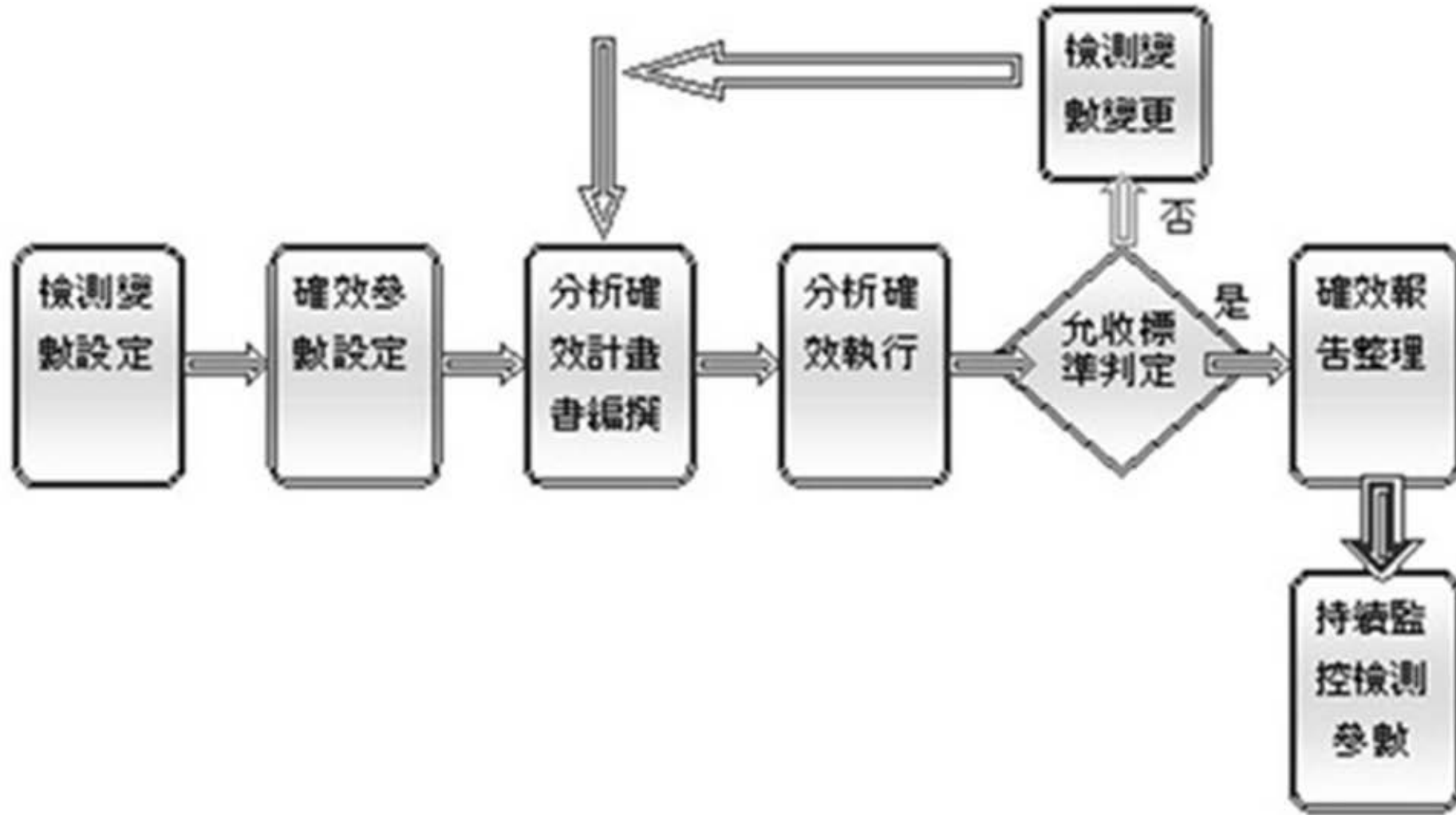
# 確效計畫書 Validation Protocol

Validation data must be generated under a **protocol** approved by the sponsor following current good manufacturing practices with the description of methodology of each validation characteristic and predetermined and justified acceptance criteria, using qualified instrumentation.

執行分析方法確效前，應針對欲執行的方法規劃實驗設計，寫成計畫書以利實驗進行。計畫書中應詳細說明確效目的、確效項目、實驗內容、執行步驟、評估標準設定，並由執行分析方法確效單位之品質負責主管審核，待通過後才能進行試驗；當分析方法確效執行完畢後，也應有一份完整的試驗執行結果報告，並由單位之品保負責主管審核通過後才算完成。

*~Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics  
Guidance for Industry July 2015*

# 分析確效流程



# 分析方法確效之種類及所需代表性特性

- 一般分析方法可分為二大類，第一為法定分析方法(Compendial Analytical Procedure)，例如USP/NF、BP收載的分析方法就屬於此類；第二為替代分析方法 (Alternative Analytical Procedure)，屬於非藥典方法 (Non-compendial)，例如廠內自行開發之分析方法。以下為常用於藥物分析且需要執行確效的方法：
  - 1. 鑑別試驗(Identification tests)；
  - 2. 雜質(不純物)含量之定量試驗與雜質之管制限度試驗(Quantitative test and limit tests for impurities)；
  - 3. 在原料藥或成品之檢品中，有效成分的定量試驗(Assays)；
  - 4. 其他，如溶離度試驗(Dissolution tests)、粒徑分析(Particle size determination for drug substances)等方法。
- 此外，在原料藥製程中的重要中間體及設備清潔確效分析 (Cleaning verification) 等，其所使用之分析方法確效也與前文所提的試驗同等重要。



# Validation Characteristics

Although not all of the validation characteristics are applicable for all types of tests, typical validation characteristics are:

1. 準確度(Accuracy) ;
2. 精密度(Precision) ;
3. 專一性(Specificity) ;
4. 檢測極限(Detection Limit, DL) ;
5. 定量極限(Quantitation Limit, QL) ;
6. 線性(Linearity) ;
7. 範圍(Range) ;
8. 耐變性(Robustness) ;
9. 苛酷試驗(Force Degradation) ;
10. 溶液安定性(Sample Solution Stability) ;
11. 系統適應性 (System Suitability) °

If a procedure is a validated quantitative analytical procedure that can detect changes in a quality attribute(s) of the drug substance and drug product during storage, it is considered a stability indicating test.

# 確效特性的選擇

在美國藥典(USP)和國際一致化聯合會(ICH, International Conference Harmonization)對分析方法確效的指引中，提到常用的不同種類分析方法及其代表性特性的選擇，可參考表一中的項目。

分析方法 類型	鑑別試驗	雜質試驗		含量測定(溶離度/效價)
		定量	限度	
特性				
準確度	—	+	—	+
精密度-可重複性	—	+	—	+
精密度-中間精密	—	+	—	+
專一性	+	+	+	+
檢測極限	—	—	+	—
定量極限	—	+	—	—
線性	—	+	—	+
範圍	—	+	—	+

【表一 USP 和 ICH 對於不同種類分析方法及其代表性特性的選擇】 ↗

此次研討主要介紹藥品GMP規範下的分析方法確效之執行，並以藥廠最被廣泛使用的HPLC層析設備作為範例，說明如何執行分析方法的確效。



# 系統適應性 (System Suitability)

- 定義：依美國藥典(USP) 對系統適用性的定義，系統適用性試驗為進行GC(氣體層析)與HPLC分析時不可缺少的一部分，可用來證明層析系統的解析度和再現性足以作為分析使用。可用以下幾點表示：
  - 拖尾因素(Tailing factor T)；
  - 理論板數(Theoretical plate number N)；
  - 解析度(Resolution R)；
  - 容量因素(Capacity K')。
- 方法：取已配置目標濃度之標準品，重複注射進入分析儀器中，藉由儀器之設定或由分析者自行計算所得到之上述各參數值，再與評估標準比對，以判定是否合乎系統適用性。
- 結果評估：一般建議重複注射樣品進入分析儀器中約5~6次，計算每次層析峰訊號值，其相對標準偏差RSD (Related Standard Deviation) $\leq 2\%$ 。

# 專一性 (Specificity)

- 定義：專一性是指當可能存在之成分(干擾物)存在時，能明確的評估標的(有效成分)分析物的能力；這些成分包括雜質、分解物，以及基質等。
- 方法：配置空白溶液與檢品溶液，在相同條件下分別進行分析，並將檢品溶液之結果與空白溶液做比較，被分析物之層析峰不得受到其他物質層析峰的干擾，且其解析度至少應大於**1.5**。
- 若有不純物且可取得時，可於成品或原料藥中加入已知量的不純物，證明這些不純物與其他成分，或個別不純物中可以被適當的分離。若不純物無法取得時，則可將含有雜質或分解產物的樣品，用藥典的方法或另一個已經確效的分析方法比較其結果。必要時，可將樣品經苛酷試驗處理後，獲得的不純物再進行分析。
- 另外，可使用HPLC處理數據的軟體(偵測器為Photodiode Array)，計算Peak purity輔助證明層析峰之純度。
- 結果評估：建議列出空白溶液與檢品溶液之層析圖，並標示標的待測物及不純物之波峰，被分析物之層析峰與其他物質層析峰之間的解析度至少應大於**1.5**，且須附上有效成分波峰的純度證明。

# 準確度(Accuracy)

定義：準確度是用來表現檢測值，與公認真值或公認對照值之接近程度，亦可稱為真實度。分析方法的準確度是以檢測結果與真正值的接近程度來表示。一般可在待測樣品或已知成份的賦型劑中，添加已知量的待測物標準品，測試添加標準品之百分回收率；通常以相對樣品回收率來表示。

- 方法：
  - (1)原料藥
    - 將分析方法應用於已知純度的標的分析物(例如：對照標準品)；
    - 將探討中的分析方法與另一個已知準確度的分析方法分別做測定，並將所得的分析結果加以比較；
    - 當精密度、線性及專一性都已確立後，進而推斷準確性；
    - 直接配製三種不同原料藥濃度，與標準品比較，並計算其百分比回收率。
  - (2)成品
    - 將已知量的標的分析物加到製品的組成物中(通常為空白處方或賦形劑)，製成組合的混合物，再用分析方法分析此混合物。
  - (3)不純物
    - 已知不純物可獲得時，於藥品原料或成品中加入已知量的不純物；
    - 如果無法取得不純物時，可使用藥典方法或另一個已經確效的分析方法比較。未知不純物的準確度可用標的物來替代。
- 一般建議準確度濃度範圍的選擇為80%、100%、120%，或是在50~150%之間選擇三個濃度(濃度100%是指分析方法建立時，欲分析物的目標濃度，記住要涵蓋limit)；此三個樣品濃度進入儀器分析時，每個濃度至少需重複注射3次，可得至少9個數據以供計算準確度。
- 結果評估：一般評估標準的訂定，原料藥的百分回收率要求比製劑嚴格，而不純物因為含量較低，可放寬要求標準。原料藥在每一個濃度的平均百分回收率應在 $100\pm 1.5\%$ ，9份測試溶液的平均百分回收率應在 $100\pm 1.5\%$ 、 $RSD\leq 1.5\%$ ；製劑成品在每一個濃度的平均百分回收率應在 $100\pm 2.0\%$ ，9份測試溶液的平均百分回收率應在 $100\pm 2.0\%$ 、 $RSD\leq 2.0\%$ 。

# 精密度(Precision)

定義：精密度是用來表現從同一均質檢品多重取樣，在規定條件下所得的一系列量測值之間的接近程度；可用來評估分析方法重複試驗後，所得到的數據之再現性。ICH將精密度分為：

**(1)可重複性(Repeatability)**：指在間隔一段時間後，同樣的操作情況下所產生的再現性，又可分成(i)注射可重複性，指儀器本身的再現性，一般作法為配製100%目標濃度的分析標準品，將此分析物重複注射至少6次，計算這些訊號的相對標準差及可接受的評估標準，通常建議 $RSD \leq 1 \sim 2\%$ ；對於不純物或濃度較低的分析物， $RSD \leq 10 \sim 20\%$ 的範圍是可被接受的。(ii)分析可重複性，評估在正常情況下，分析人員按照分析方法執行所得結果的再現性。

**(2)中間精密度(Intermediate precision)**：針對實驗室每日實際發生的變異情況而定(同一個實驗室、同一個分析方法)，在不同分析日期、不同分析人員和不同分析設備的情況下所產生的差異性。

**(3)再現性(Reproducibility)**：指在不同的實驗室進行同一種分析工作所得量測結果之精密度。

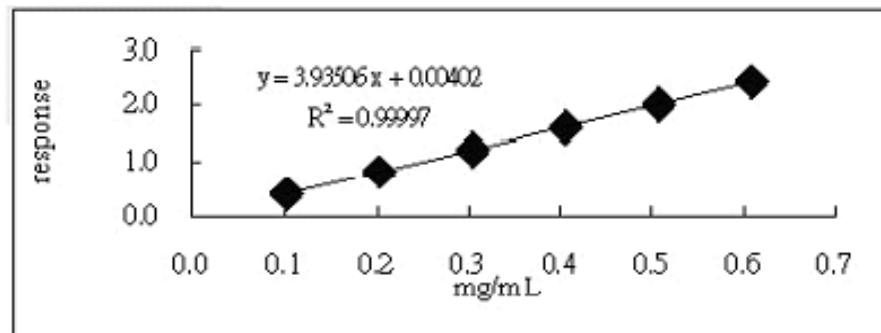
結果評估：一般用相對標準偏差(Related Standard Deviation, RSD)表示。一般  $RSD \leq 2.0\%$  for Repeatability and  $3.0\%$  for Intermediate precision or Reproducibility. 而不純物分析則會依量的多少而定RSD的標準。

# 線性(Linearity)

- 定義：線性是指在標的分析物一定濃度的範圍內，由該分析方法所得之試驗結果與標的分析物的濃度成正比。
- 方法：
  - (1)建議至少做5個不同濃度之測試，以評估線性區間範圍；
  - (2)有效成分分析方法(Active Component Assay Method)，濃度範圍應含待測物於樣品中實際含量70~130%；
  - (3)不純物測試時，不純物含量以面積(%)表示，檢測濃度則須從定量極限到待測物於樣品中已知含量濃度的至少120%之間；
  - (4)利用稀釋法配製不同濃度之標準品；
  - (5)利用統計法評估線性。
- 結果評估：5個不同濃度之標準品，每個濃度至少重複分析2次，測試所得之大小訊號對不同濃度作圖，畫出線性曲線，計算(i)回歸線(Regression Line)；(ii)相關係數；(iii)Y軸截距，線性的判定係數( $R^2$ )至少 $\geq 0.999$ ，Y軸截距須儘量接近原點。線性作圖如圖二及表二所示。



# 線性座圖



【圖二 測試所得之訊號對不同濃度作圖】 ↵

X (mg/mL)	Y (response)
0.102	0.402
0.203	0.805
0.305	1.208
0.407	1.609
0.509	1.998
0.610	2.407

【表二 X 為減量線濃度，Y 為訊號值】 ↵

- (1) Intercept 0.004
- (2) Limit of Linearity 0.102~ 0.610 m g/mL
- (3) Slope 3.935
- (4) Correlation coefficient 0.999 (r)

# 範圍(Range)

定義：範圍是指在使用該方法分析檢品中的標的分析物，其濃度上限與下限之間距，所得結果具有適當的準確度、精密度及線性關係。

結果評估：從準確度、精密度及線性的結果來決定範圍。

# 定量極限(Quantitation Limit, QL)

- 定義：最低定量濃度是指在使用該方法時，檢品中的標的分析物可被量測出的最低量，而且其結果具有適當的準確度與精密度。
- 方法：
  - (1)稀釋一系列濃度的樣品做偵測，直到濃度被稀釋到被偵測濃度之訊號(S)對雜訊(N)的比值 $\geq 10$ 的最小濃度，此即為定量極限；
  - (2)測量空白樣品的訊號和測定含定量極限濃度範圍的檢量線，計算出標準偏差(SD)，再代入下列公式可算出定量極限濃度。

$$QL = 10 * \delta / S$$

QL：定量極限濃度

$\delta$ ：訊號標準偏差

S：校正曲線線性斜率

# 檢測極限(Detection Limit, DL)

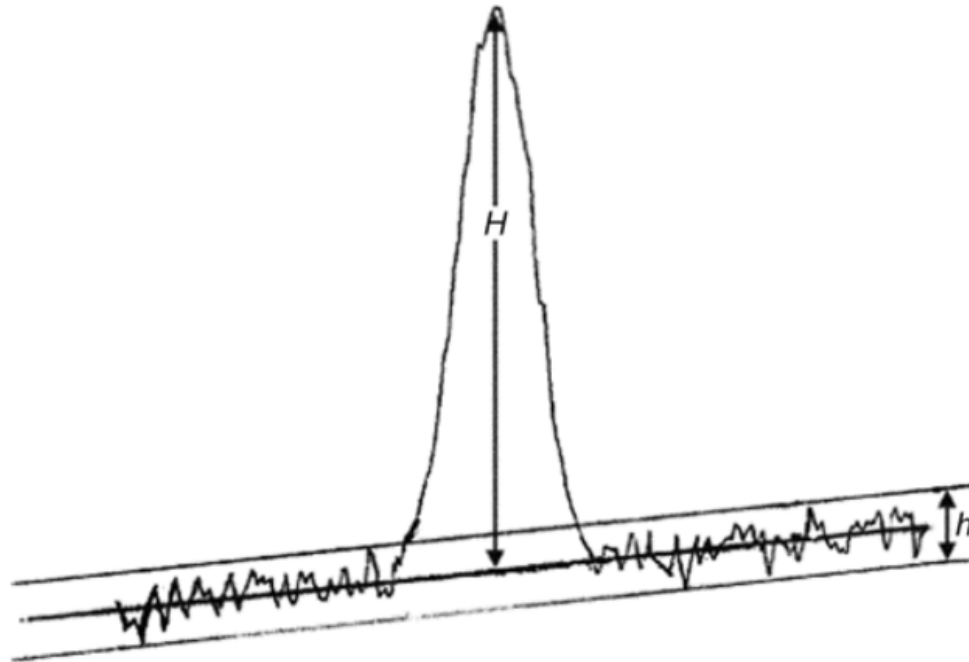
- 定義：檢測極限是指在使用該方法時，檢品中的標的分析物可被檢測出的最低量，但未必能定量出標的分析物之正確值。
- 方法：
  - (1)稀釋一系列濃度的樣品進行偵測，直到濃度被稀釋到被偵測濃度之訊號(S)對雜訊(N)的比值 $\geq 3$ 的最小濃度，此即為檢測極限；
  - (2)測量空白樣品的訊號和測定含檢測極限濃度範圍的檢量線，計算出標準偏差(SD)，再代入下列公式可算出檢測極限濃度。
$$DL = 3.3 * \delta / S$$

DL：檢測極限濃度  
 $\delta$ ：訊號標準偏差  
S：校正曲線線性斜率

# S/N 的計算

$$S/N \text{ ratio} = 2H/h$$

where  $H$  is the height of the peak measured from the peak apex to a baseline extrapolated over a distance  $\geq 5$  times the peak width at its half-height; and  $h$  is the difference between the largest and smallest noise values observed over a distance  $\geq 5$  times the width at the half-height of the peak and, if possible, situated equally around the peak of interest



Noise and chromatographic peak, components of the S/N ratio

# 耐變性(Robustness)

- 定義：耐變性是指該分析方法不受參數以小幅度變異所影響之能力的表現，為該方法在正常使用時之可靠性指標。
- 在分析方法開發之階段中，應考慮是否要評估該分析方法之耐變性，評估之內容則與方法本身之類型有關。
- 方法：以HPLC為例，故意改變分析條件的幅度，其改變項目如下：
  - (1)管柱種類：不同批次或不同廠商；
  - (2)移動相溶劑比例改變；
  - (3)移動相pH值改變；
  - (4)移動相流速改變；
  - (5)管柱溫度改變。
- 結果評估：先確認有效成分之百分回收率是否介於原設定之正常範圍，待測物在層析圖中的波峰是否具對稱狀，與其他波峰的解析度是否符合評估標準；另外，滯留時間、理論板數、再現性等也須評估是否在合理範圍內。

# 溶液安定性(Sample Solution Stability)

- 定義：評估待測物在依據分析方法製備成溶液後，待測物在此溶液中能維持合理濃度的時間。
- 一般在實驗室的操作條件下(溫度/光線)，溶液通常須具有**24小時**的安定性。另外，也須考慮實際進行分析的時間(如將樣品放置在自動取樣器上進行隔夜的分析)，調整溶液安定性試驗的設計，以證明根據此分析方法所配製的溶液，具有足夠的安定時間，可在正常操作速度下完成檢測。
- 方法：依據分析方法製備樣品(**100%**目標濃度)，進行**0**小時分析，接著放置一段時間後，例如**24**小時後再進行分析樣品濃度，或視實際操作狀況增加分析檢測點數，再計算放置後之回收率。結果評估：建議原料藥或成品之濃度差異不得超過**±2.0%**，含量較低之不純物，其濃度差異可放寬標準至**±15%**。

# 其他相關確效

- Verification for compendial analytical procedures USP <1226>

As an example, an assessment of specificity is a key parameter in verifying that a compendial procedure is suitable for use in assaying drug substances and drug products. For instance, acceptable specificity for a chromatographic method may be verified by conformance with system suitability resolution requirements. A more thorough assessment of the matrix effects may be required to demonstrate suitability of the procedure for the particular drug substance or product. Other analytical performance characteristics such as an assessment of the limit of detection or quantitation and precision for impurities procedures may be useful to demonstrate the suitability of the compendial procedure under actual conditions of use.

- Re-validation

- Method transfer USP <1224>



# 結語

- 分析方法的確效，應以分析方法欲進行的目的 (intended use) 並參考USP、ICH或其他公證單位所建議的分析代表性特性(分析參數)，以及評估實際操作時的狀況，進而設計一套符合法規要求的確效計畫。
- 對於確效所產生的文件、實驗數據、層析圖譜、或任何紀錄都應與保存；執行方法確效後，需整理成結果報告，確效報告應列出實驗項目、實驗方法、數據計算、實驗設計、評估標準及結果，另外附上實驗數據及結果等資料，經執行確效單位之負責人審核通過後，即完成方法確效；對於未通過之結果，應書面說明解釋偏離之原因，並由權責單位審查。