

广东省仿制药质量和疗效一致性评价生物等效性试验 生物样品分析规范（试行）

2017-09-19

文件编号：SWFXGF-2017-01

1. 目的

为加强广东省仿制药质量和疗效一致性评价生物等效性试验（以下简称 BE 试验）生物样品分析实验室的管理，确保生物样品分析数据的可靠性和准确性，制定本规范。

2. 参考文件

《中国药典》2015 版四部通则 9012《生物样品定量分析方法验证指导原则》

《药物临床试验质量管理规范》（2003 年 9 月）

《I 期临床试验管理指导原则（试行）》（2011 年 12 月 2 日）

《药物临床试验生物样品分析实验室管理指南（试行）》（2011 年 12 月 2 日）

《药物临床试验数据现场核查要点》（2015 年 11 月 10 日）

《化学药品新注册分类申报资料要求（试行）》（2016 年 5 月 4 日）

《临床试验数据管理工作技术指南》（2016 年 7 月 29 日）

CNAS-CL01:2006《检测和校准实验室能力认可准则》（ISO/IEC 17025:2005）
（2006 年 7 月 1 日）

3. 范围

本规范适用于广东省仿制药质量和疗效一致性评价生物等效性试验广东地区分析实验室的样品管理、方法的建立、验证和分析方案的制订、药物分析和总结报告等全过程。

4. 分析实验室

4.1 人员

样品分析实验室应建立完善的组织管理体系，任命实验室负责人、项目负责人和质量保证负责人，并配备相应的实验人员。独立的实验室应建立质量保证部门。

4.1.1 实验室负责人

实验室负责人应具备相关专业本科以上学历，熟悉业务，能有效组织、指导和开展实验室业务工作，职责包括：

- (1) 全面负责实验室的建设，确保实验室具有满足工作要求的各项条件。
- (2) 组织制定和修改管理制度、技术规范 and 标准操作规程；定期审阅所有管理制度、技术规范 and 标准操作规程文件，确保所有文件适时更新。
- (3) 制定主计划表，掌握各项分析工作的进展。
- (4) 确保质量保证工作的开展。
- (5) 建立有效的沟通交流机制，以保证与申办者、药物临床试验机构及研究者之间可以及时、有效地沟通。
- (6) 建立完善的教育培训和考核制度。
- (7) 在每项实验开始前，指定项目负责人，试验过程中确需更换项目负责人时，应记录更换的原因和时间，并保留相关记录。
- (8) 审查、批准实验方案、标准操作规程、结果或报告。

(9) 指定专人负责档案资料与生物样品的管理。

4.1.2 质量保证负责人

质量保证部门应配备与其开展的工作相适应的人员。质量保证人员应独立于其所监督的工作。质量保证部门负责人的主要职责为：

(1) 负责质量保证部门的工作安排和运行；

(2) 审核分析实验方案、实验记录、结果或报告；

(3) 根据每项工作的内容和持续时间制订监督计划并实施监督，详细记录监督的内容、发现的问题、采取的措施等，并向实验室负责人和项目负责人报告；

(4) 检查实验室环境、设施、仪器设备和档案管理；

(5) 参与标准操作规程的制订和审核，并保存标准操作规程的副本。

4.1.3 项目负责人

项目负责人具体负责临床试验生物样品的分析工作，具备相应专业本科或以上学历，两年以上生物样品相关分析工作经验，能够独立进行生物样品分析方法的建立和验证，并对所承担项目的分析方法、分析结果和分析报告负直接责任。

项目负责人的主要职责包括：

(1) 组织制订该项目的实验方案；

(2) 全面负责该项目的运行管理、组织实施；

(3) 组织建立并验证分析方法，撰写验证分析报告；

(4) 确保所有参与该项目的实验人员明确各自所承担的工作，并掌握和执行相关的标准操作规程；

(5) 掌握工作进展，确保实验记录及时、完整、准确和清晰；

(6) 确保实验中偏离方案的情况及采取的措施均有详细记录；

(7) 整理、分析实验数据和结果，撰写分析报告；

(8) 及时处理质量保证部门的报告。

4.1.4 实验室工作人员应符合以下要求：

(1) 具备严谨的科学作风和良好的职业道德以及相应的学历，经过专业培训与考核，并保存个人的培训与考核记录，具备相应的经验和能力并取得上岗资格；

(2) 熟悉本规范要求，掌握并严格执行相关的标准操作规程；

(3) 对所承担的检测技术工作和检测数据负责，及时、完整、准确和清晰地进行实验记录，对实验中发生的可能影响实验结果的任何情况应及时报告给项目负责人；

(4) 对涉及保密的技术资料、受试者信息等履行其保密责任；

(5) 根据工作岗位的需要着装，保持工作环境正常有序，遵守健康检查制度，确保实验样品不受污染。

4.2 设备

4.2.1 实验室应配有与分析工作相适应的仪器设备，仪器的量程、精度、分辨率等应符合相应技术指标的要求。放置地点合理。

4.2.2 仪器设备应有明显的状态标识，标注仪器正常、使用中、维修、停用、报废等状态。

4.2.3 仪器设备应有专人管理，由专业技术人员按照相关要求定期进行校正、维护。仪器具有安装验证、操作验证以及性能验证报告；对不合格、待修、待检和报废的仪器，应及时联系相关技术人员进行处理并确保维修报废记录存档。

4.2.4 根据仪器设备的性能要求定期进行性能验证，确保仪器设备处于良好的状态。仪器定期性能验证的文件应存档。

4.2.5 设备操作人员应经过培训，考核合格后方可上岗，并严格执行相关标准操作规程。

4.3 材料

4.3.1 标准物质

标准物质应可追溯来源，并能证明其符合标准物质的要求。标准物质应能提供相应的分析证书或说明书，以确定标准物质的纯度储存条件、失效日期、批号。标准物质接收时应先进行验收，验收合格后再使用，并记录标准物质的储存、分发、使用情况。

对于内标物，只要能证明其适用性即可，例如显示该物质本身或其相关的任何杂质不产生干扰。当在生物分析方法中使用质谱检测时，推荐尽可能使用稳定同位素标记的内标。内标物必须具有足够高的同位素纯度，并且不发生同位素交换反应，以避免结果的偏差。

4.3.2 试剂

应有专人负责试剂、标准物质等的管理，有采购、验收、储存、分发、使用、处理的记录；试剂验收合格后方可使用。应记录试剂、标准物质的称量、溶液配制；配制的溶液应贴有标签，标明品名、浓度、贮存条件、配制日期、有效期及配制人员名字等必要的信息；应按照规定处理医疗废物和过期的化学试剂、含化学试剂的废物。

4.3.3 空白生物基质

分析方法验证应采用与试验样品相同的基质（包括抗凝剂等）。当难于获得相同的基质时，可以采用适当基质替代，但要说明理由。空白生物基质可按照国家相关规定采购或通过伦理委员会批准后采集。空白全血的采血方式应与临床试

验相同，并使用相同的抗凝剂。空白生物基质也应按照生物样品的管理要求进行管理，记录其来源、采集或采购数量、保存、使用和废弃情况等。

可使用配制或采购的溶血血浆进行特殊基质的考察，一般采用 2%或一系列比例的溶血血浆。使用注射器反复抽拉挤压或者冻融后使血细胞破碎造成溶血，将溶血全血与正常空白血浆混合得到一定比例的溶血血浆。应注意溶血对生物样品稳定性和基质效应的影响。

高脂血浆基质可采用正常空白血浆配制，也可采购市售品，但均需说明来源和组成或配制过程。一般以不低于国内高脂血症临床诊断标准为依据配制高脂血浆，使用脂肪乳注射液和正常空白血浆混合配制。应注意高脂对生物样品稳定性和基质效应的影响。

4.3.4 试验样品管理

实验室试验样品的管理应符合临床试验方案和相关 SOP 要求，并有专人负责管理生物样品。样本容器的标识应有足够的信息量，易于识别和具有唯一性（如编号），标识应清晰，不易损坏或脱落。生物样品管理轨迹应可溯源，有完整的样品生命周期记录。

(1) 接收生物样品时，应核对样品的基本信息（如项目名称、基质类型等），需记录样品的接收时间、转运方式和条件、数量、装量、外观状态（如是否有破损、溢漏或颜色变化等）和标识情况等，确认样品是否符合检测要求。

(2) 实验室应保证其完整性和活性不受影响，应监控试验样品的保存环境，确保其符合样品保存要求，做好记录。建议待测样品和备份样品应分别保存在不同冰箱。

(3) 生物样品保存以样本长期冻存稳定时间为限；超过保存期后，在取得申办者书面同意后，按相关规定进行销毁处理。

(4) 所有接触样品的人员都应对样品在实验室期间的安全、保密、完整性负责。

4.4 设施

4.4.1 实验场所应符合国家相关规定，布局合理，实验室面积应与其开展的分析工作相适应，根据实验需要合理划分功能区域。

4.4.2 具备保存生物样品的设施；具有监测生物样品保存条件的设施；应具有安全保障设施并能有效隔离避免相互干扰和交叉污染，洁净区与污染区分离。具备不同实验用品的储存设施，确保实验材料、试剂、标准物质等的储存符合相关要求；危险化学品、归属于麻醉药品和精神药品的物质、放射性物质的保管设施应符合《危险化学品安全管理条例》、《麻醉药品和精神药品管理条例》、《放射性药品管理办法》的相关规定。实验室环境应符合实验要求并有监控设施。

4.4.3 应具备保管实验资料的场所和设施；应具有适宜的温度和湿度及相应记录，应配备防盗、防火、防水、防虫害等必要设施。

4.5 质量管理

4.5.1 应建立完善的质量管理体系，对分析工作的全过程进行质量控制，以确保数据和结果的可溯源性、可靠性和真实性。

4.5.2 实验室应制订与实验工作相适应的标准操作规程（SOP）。标准操作规程的副本放置应方便使用。根据需要对标准操作规程进行定期和不定期修订与废止，将相关信息记录在案并及时更新版本和版本序列号。记录标准操作规程的

制订、修改、分发、学习培训、归档情况等。需要撤销的标准操作规程需归档保管并有作废标记，保证现行所用的标准操作规程为最新版本。

4.5.3 质量保证部门应制订计划，对实验人员、实验室设施、仪器设备、计算机系统、实验材料和试剂、实验方案、分析方法、实验记录、分析报告，以及质量控制程序等进行监督。在分析方法验证和样品分析前，质量负责人负责制定项目的质量控制计划，并按照计划实施，质控过程应有相应记录，并生成质控报告。若偏离方案或违背实验室规定的应采取适当措施及时纠正，若存在隐患的应采取预防措施。质量负责人应确保问题的及时纠正和预防措施的实施。建议实验室参与外部验证方案（如实验室间质量评价），以证明其检测能力。

4.5.4 质量保证人员应及时将监督内容和意见形成监督报告，项目负责人或实验室负责人应及时对监督报告做出反馈。实验室应积极配合申报方质量保证部门的监督、第三方的监督。

4.6 数据管理

应该重视实验数据的管理，建立相应的管理体系。包括数据管理规范和数据格式的规范。

4.6.1 纸质记录

应使用专用的记录本或记录纸及时、规范地记录实验过程及数据，确保实验记录的完整、准确、清晰。操作人应签名，并注明日期。记录需要修改时，应保持原记录清晰可辨，注明修改理由，修改者签名，并注明日期。

4.6.2 电子记录

用于生物样品分析数据管理和统计分析的计算机系统应经过验证，并具有系统自动生成的稽查踪迹（AuditTrail）功能。源计算机（采集原始数据的计算机）

和工作站的稽查功能需开启。直接或间接参与数据接收、采集、处理、报告和存储的计算机系统均应进行访问授权控制，有严格的权限控制（Access Control）密码管理制度，对数据管理系统中不同人员或角色授予不同的权限，只有经过授权的人员才允许操作（记录、修改等），并应采取适当的方法来监控和防止未获得授权的人的操作。数据采集软件应有电子签名功能。

实验室应建立有效的备份措施防止硬件或软件故障导致数据丢失，定期备份并妥善保存系统的源数据文件。应记录系统备份期间检测到的错误以及所采用的纠正措施，并报告实验室责任人。计算机系统升级时应及时保存原有数据，防止数据丢失或更改。

5. 分析方法的建立

5.1 药物分析方法的摸索

通过检索国内外已报道相关药物在生物基质中的分析方法、定量浓度范围等相关信息，结合本实验室硬件设备，确定分析仪器和分析方法。

5.2 样品处理方法的摸索

根据药物理化性质探索生物样品的处理方法，如液-液萃取或蛋白沉淀法等，选择的处理方法应稳定、尽可能减小基质效应并能满足分析需要的定量下限等优点。

6. 分析方法验证方案的制定

分析验证方案应明确实验人员的分工和操作安排，并对其进行版本控制。在验证方案实施前，应对相应实验操作人员进行培训。验证方案修订时应确保实验人员充分了解修订内容。分析验证方案应至少包括项目基本信息、实验人员、标

准物质信息、仪器和试剂、分析方法、验证项目、接受标准和结果计算方法等，其中应对特殊情况的处理有明确说明和定义，例如内标响应异常是指同位素标记内标响应值在标准曲线样内标响均值的 50%~150%范围外。

7. 分析方法的完整验证

分析方法验证包括专属性，定量下限，线性范围，准确度，精密度，基质效应，提取回收率、生物基质和储备液中分析物和内标的稳定性、稀释因子、系统耐用性等。首次开发和实施的生物分析方法；新的化学实体分析方法；已验证方法追加分析多个分析物（不同药物、母体药物及其代谢产物、药物及其对映体或异构体）。生物分析方法的完整验证（Full Validation）包括以上所有考察项目。

7.1 专属性

该分析方法应该能够区分目标分析物、内标、基质（如全血、血浆、尿）的内源性组分或样品中其他组分（如制剂辅料）。

应该使用至少 6 个不同来源的适宜的空白正常基质来证明选择性，当干扰组分的响应低于分析物 LLOQ 响应的 20%，并低于内标响应的 5%时，即可以接受。

应考察药物代谢物、经预处理生成的分解产物及同用药物的干扰程度。考察同用药物的干扰程度，是向至少 6 个不同来源的空白基质中添加同用药物至临床可能的最高浓度水平（如 C_{max} ），接受标准同专属性考察的接受标准。在适当情况下，也应该评价代谢物在分析过程中转化为母体分析物的可能性。在新化学实体的早期研究中，代谢产物未被发现，因此很难对该指标进行评价。可在后期的深入试验中获得易发生转化的代谢产物（如易酯化的酸性代谢物、氮氧化物、葡萄糖醛酸化代谢物和内酯环代谢物等），补充部分验证。若代谢物难以获得，可

应用已测样品再分析（Incurred Sample Reproducibility）评价代谢产物的回复转化。若无法避免该转化，必须详细报告转化情况和产生的影响。

7.2 携带效应（Carry-over）

应该在方法建立中考察残留并使之最小。应根据药物特性在方法验证方案中设计残留效应考察方法，一般在定量上限（ULOQ）后，进空白样品进行考察。残留的峰面积低于待测物 LLOQ 响应的 20%，并低于内标响应的 5%，即可以接受。残留可能不影响准确度和精密度。如果残留看起来不可避免，则应考虑特殊措施，如改变洗针液成分和比例，或在可能的高浓度样品后注射空白样品，然后分析下一个试验样品。

7.3 定量下限

定量下限（LLOQ）是能够被可靠定量的样品中分析物标准曲线的最低浓度，具有可接受的准确度和精密度，至少 5 个测定样品分析来确定准确度。LLOQ 通常为标准曲线的最低点，应适用于预期的浓度水平和试验要求。

7.4 标准曲线

应该获得仪器对分析物的响应水平，并且应该在适当的浓度范围内进行标准曲线评价。通过加入已知浓度的分析物（和内标）到空白基质中，获得各浓度的标准曲线样进行预处理，其基质应该与目标试验样品基质相同。方法验证中每种分析物和每一分析批，都应该有一条校正曲线。

用于配制标准曲线和质控样品储备液的标准物质应分别称量。二者的准确度应接近。评价标准曲线和质控样品储备液浓度接近程度的参考方法：将标准曲线和质控样品的储备液分别稀释至相当于中浓度质控样品浓度的溶液，加入内标后，

连续进样。评价标准为：二者连续进样，各自与内标比值的变异应小于 5%；二者的偏差小于 5%。若整个试验样品测定过程中多次称量和配制储备液，应分别提供每次称量的上述比较结果。

校正曲线范围应该覆盖预期浓度范围，即 LLOQ（标准曲线样的最低浓度）至 ULOQ（定量上限，标准曲线样的最高浓度）的范围。该范围应足够描述分析物的药动学特征。一般建议 LLOQ 不高于预期血药浓度峰值 C_{max} 的 10%，ULOQ 应当至少为预期血药浓度峰值 C_{max} 的两倍。应当使用至少 6 个校正浓度水平，标准曲线应有空白样品（不含分析物和内标的处理过的基质样品）和零浓度样品（含内标的处理过的基质），空白样品和零浓度样品不参与标准曲线的拟合计算。

建议每个分析批采用双标准曲线拟合方式，即标准曲线样平行处理 2 份。若无特殊原因，每条标准曲线应从低浓度至高浓度依次进样。标准曲线样的计算浓度偏差，LLOQ 应在 $\pm 20\%$ 以内，其余应在标示值的 $\pm 15\%$ 以内。应该使用简单且足够描述仪器对分析物浓度响应的方程式，最少 6 个标准曲线样参与标准曲线的拟合，至少 75% 的标准曲线样应满足上述标准，如果某个标准曲线样结果不符合这些标准，应该拒绝这一标样，不含这一标样的标准曲线应被重新进行回归分析和评价；两份标准曲线样应同时拟合得到一条标准曲线用于该分析批的定量。一般以待测物峰面积 AS 和内标峰面积 AIS 的比值 f ($f=AS/AIS$) 为 y ，待测物浓度为 x ，取适当的权重（如 $1/x^2$ ）采用加权最小二乘法进行线性回归，拟合标准曲线方程（校正方程），相关系数 r 的平方 (r^2) 建议不小于 0.9900。

在方法验证中，至少应该评价 3 条标准曲线。最好使用新鲜配制的标准曲线样建立标准曲线，但如果有稳定性数据支持，也可以使用预先配制并储存的标准曲线样。每个标准曲线样可以被多次处理和分析。应该提交标准曲线参数（包括

权重、斜率、截距、相关系数 r 或 r^2 ），测定标准曲线样后回算得出的浓度及相应偏差应一并提交。

7.5 准确度

分析方法的准确度描述该方法测得值与分析物真实浓度的接近程度。应采用加入已知量分析物的样品（即 QC 样品）来评估准确度，并应该根据标准曲线分析 QC 样品，将计算值与标示值对比，表示为即标示值的百分比，表示为（测得值-真实值）/真实值 $\times 100\%$ ，即计算值与标示值的偏差表示。

在方法验证时，应通过至少 4 个浓度水平，包括 LLOQ、LQC、MQC 和 HQC，每个浓度至少 5 个测定样品分析来确定准确度。浓度水平应在校正曲线范围内：在 LLOQ 浓度 3 倍之内的低浓度 QC（LQC），标准曲线的中间浓度 QC（MQC），以及校正曲线范围上限约 75%处的高浓度 QC（HQC）。应通过单一分析批（批内准确度）和不同分析批（批间准确度）获得质控样品值来评价准确度。

（1）批内准确度

为了验证批内准确度，应取一个分析批的 LLOQ、低、中、高浓度 QC 水平，每个浓度至少用 5 个样品，每个浓度水平所有样品偏差的均值在 $\pm 15\%$ 之内，LLOQ 应在 $\pm 20\%$ 以内。若有质控样品响应异常，应在统计计算中剔除，剔除后该浓度水平的 QC 样仍应满足至少 5 个测定值的要求。

（2）批间准确度

通过至少两个不同天的 3 个分析批，每批在 LLOQ、低、中、高浓度 QC 样品的每个浓度至少 5 个测定值来评价。计算所有有效分析批的 QC 样品标示值的偏差应在 $\pm 15\%$ 范围内，LLOQ 应在标示值的 $\pm 20\%$ 范围内。

报告的准确度和精密度的验证数据应该包括所有获得的测定结果，但是已经记录明显失误的情况除外。

为评价一个分析批中不同时间的任何趋势，应在方法验证阶段确定分析批大小（batch size），建议以不少于一个分析批预期样品数的 QC 样品数进行批内准确度考察。原则上，未知样品的分析批不应大于方法验证分析批。

7.6 精密度

分析方法的精密度描述分析物重复测定的接近程度。精密度用相对标准差（变异系数，%CV 或 %RSD）表示。应使用与证明准确度相同分析批样品的结果，获得在同一批内和不同批间 LLOQ 以及低、中、高浓度 QC 样的精密度，每个浓度至少 5 个样品，批内变异系数值不得超过 15%，LLOQ 不得超过 20%。对于验证批间精密度，至少需要两个不同天的 3 个分析批。

报告的准确度和精密度的验证数据应该包括所有获得的测定结果，但是已经记录明显失误的情况除外。

7.7 基质效应

当使用质谱方法时，应该考察基质效应。使用至少 6 批来自不同个体的空白基质，不应使用合并的基质，分别在低、中、高浓度下进行。如果基质难以获得，则使用少于 6 批基质，但应该说明理由。

对于每批基质，应该通过计算基质存在下的峰面积 A_{mx} （由空白基质提取后加入分析物和内标测得），与不含基质的相应峰面积的平均值 $A_{sol, mean}$ （分析物和内标的纯溶液）比值，分别计算每一分析物和内标的基质因子（Matrix factor, MF）：

$$MF(\%) = A_{mx} / A_{sol, mean} \times 100\%$$

内标纯溶液的峰面积均值是指所有纯溶液的内标峰面积均值。若低、中、高浓度的变异系数值 $\leq 15\%$ ，则认为基质效应可以接受。

待测物的基质因子除以内标的基质因子，计算经内标归一化的基质因子（ISnorm-MF）：

$$\text{MFIS-n}(\%) = \text{MFdrug} / \text{MFIS} \times 100\%$$

MFIS-n 的变异系数应 $\leq 15\%$ ，则认为基质效应可以接受。如果不能适用上述方式，例如采用在线样品预处理的情况，则应该通过分析至少 6 批基质，分别加入高、中、低浓度待测物来获得批间响应的变异。其验证报告应包括分析物和内标的峰面积，以及每一样品的计算浓度。这些浓度计算值的总体变异系数不得大于 15%。

必要时考察待测物在特殊基质中的基质效应，如溶血血浆、高脂血浆等，基质效应考察方法和接受标准与正常基质相同。

7.8 稳定性

稳定性评价是为了确保样品采集、分离、预处理、运输、和检测的每一步骤，以及使用的储存条件，都不影响分析物的精密度和准确度。稳定性评价包括待测物和内标在溶剂、生物基质及预处理等过程中的稳定性考察。文献报道的数据不可以用于证明稳定性，但可以作为稳定性实验设计的参考依据。

7.8.1 溶剂稳定性

待测物和内标在溶剂中的稳定性，指储备液和工作液在储存和使用条件下的稳定性（长期和短期稳定性），以待测物和内标的峰面积比值作为评价指标。如有必要，不同材质的承装容器（如玻璃瓶或聚丙烯离心管）对待测物和内标稳定性的影响也应进行考察。待测物或内标储备液和工作液稳定性考察，采用新鲜配

制或稳定期内的待测物或内标溶液作为参比，储备液一般要稀释至ULOQ和LLOQ浓度，得到参比溶液的待测物与内标峰面积比值记为 f_0 (AS/AIS)；保存储备液或工作液也参照参比样进行稀释并用新鲜或稳定期内的内标工作液进行预处理，得到的比值记为 f_x ，通常认为 f_x 与 f_0 的偏差在 $\pm 10\%$ 以内时可认为待测物储备液或工作液在该条件下稳定。内标溶剂稳定性的评价则以 f'_0 ($f'=1/f_0$, AIS/AS)为指标，方法与待测物溶剂稳定性考察方法相同，但是选用新鲜或稳定期内的待测物溶液作为参比，得到 f'_x ，通常认为 f'_x 与 f'_0 的偏差在 $\pm 10\%$ 以内可认为内标储备液或工作液在该条件下稳定。可以在方法验证方案中根据待测物或内标的特性制定接受标准。

7.8.2 全血稳定性

应考察待测物在全血中的稳定性，以支持临床全血样本采集、运输和储存条件，应根据实验室的相关SOP或分析验证方案中规定的方法进行考察，建议至少考察全血在室温条件下的稳定性。例如，采用新鲜的空白全血配制成低、中、高质控浓度的全血质控样品。取新鲜空白全血，加入药物工作液配制成低、高浓度的全血质控样品，轻轻反复颠倒混匀，然后置于 37°C 水浴中孵育，根据药物性质考察孵育时间。检测时将全血质控样品离心后取上层血浆进行预处理和分析，以0时刻(T_0)检测浓度值或峰面积比值作为对照，根据方案中规定的偏差范围(如 $\pm 20\%$)判断全血在该条件下的稳定性。若使用检测浓度作为评价指标，应至少有两个浓度水平的全血样品检测浓度值在线性范围内，若不足两个浓度水平，则应重新选择全血稳定性考察浓度以满足上述要求。

7.8.3 检测基质稳定性

待测物在检测基质中的稳定性考察，应至少考察以下几种条件：

(1) 从冷库储存条件到室温，基质中分析物反复冻融的稳定性：QC 样品解冻后的样品在同样条件下重新冷冻。在每一循环，样品都应被冷冻 12 小时以上，然后解冻。反复冻融稳定性的循环次数一般不少于 3 次，应等于或超过试验样品的冷冻/融化循环次数。

(2) 基质中分析物在室温实验台上的稳定性；

(3) 基质中分析物储存的长期稳定性；

(4) 处理过的样品（如干燥提取物或沉淀上清液）在室温下或试验过程中的稳定性，如果适用；

(5) 处理过的样品在自动进样器中的稳定性。

稳定性检查应考察不同储存条件，时间范围应不小于试验样品储存的时间。在多个分析物试验中，应该关注每个分析物在所有分析物基质中的稳定性。

用于稳定性考察的 QC 样品（简称稳定性样品）应视为未知样品进行检测，即需要随行新鲜或稳定期内的标准曲线和 QC 样品。根据校正曲线计算稳定性样品的浓度，若计算浓度与标示浓度的偏差应在 $\pm 15\%$ 以内则认为稳定性样品稳定。

7.9 稀释可靠性

若血浆样品浓度高于定量上限时，应采用的空白血浆稀释后重新测定，应预考察稀释数倍的稀释可靠性。每个稀释浓度至少 5 个测定值。准确度和精密度应在 $\pm 15\%$ 以内。稀释可靠性所选的稀释倍数应该覆盖试验样品所用的稀释倍数。可通过部分方法验证来评价稀释可靠性。需考察稀释样品的批内准确度和精密度。

7.10 提取回收率

配制低、中、高浓度的对照样和生物基质 QC 样品进行回收率考察。对照样采用基质效应样，QC 样品进行预处理，每个浓度平行处理至少 5 份，进样分析并

记录色谱图，对照样中分析物的峰面积记为 S，QC 样品中药物的峰面积记为 C，最后，将上述 C 和 S 代入下式即可分别求得分析物的提取回收率（R%）。内标的提取回收率计算方法与药物相同。

$$R(\%)=C/S\times 100\%$$

低、中、高质控样品的提取回收率应尽量均一、精确和可重现。

7.11 系统耐用性

建议考察系统条件的变化对待测物和内标的影响，例如色谱柱、流动相、柱温、人员变动等，建议考察不同因素变化时精密度与准确度值，接受标准同精密度与准确度验证标准。

7.12 方法部分验证

部分验证（Partial Validation）适用于以下情况（不局限于此）：分析方法转移至另一实验室、改变仪器设备、校正浓度范围、样品体积、其他基质、改变抗凝剂、样品处理步骤和储存条件。应报告所有的改变，并对重新验证或部分验证的范围说明理由。

7.13 方法交叉验证

交叉验证（Cross Validation）适用于应用同一方法从不同试验地点获得数据，或者应用不同方法从一项或多项试验获得数据。如果可能，应在试验样品被分析之前进行交叉验证，同一系列质控样品或试验样品应被所在所有试验地点、应用的所有分析方法测定比较。对于质控样品，不同方法获得的平均准确度应在±15%范围内。如果放宽，应该说明理由。对于试验样品，至少 67%样品测得的两组数值差异应在两者均值的±20%范围内。当需要测定多个分析物时（如两种不

同的药物，或者一个母体药物及其代谢物，或一个药物的对映体或异构体等），生物分析方法验证和未知样品分析的原则适用于所有涉及的分析物。

8. 测量不确定度

根据检测的具体需要参照实验室相关文件（如 SOP）对方法测量不确定度（Uncertainty of measurement）进行评估。

9. 试验生物样品分析

9.1 样品分析方案的制定

需要在试验样品分析开始前制定生物样品分析方案，确保样品分析过程中相关人员充分理解方案并具有相应操作能力。如果试验样品分析开始前，已知或预期试验样品中分析物浓度范围窄，则推荐缩窄标准曲线范围，调整 QC 浓度，或者适当加入 QC 样品新的浓度，以充分反映试验样品的浓度。如果看起来很多样品分析物浓度高于定量上限，在可能的情况下，应该延伸标准曲线范围，加入额外浓度的 QC 样品或改变其浓度。如果标准曲线范围被改变，则生物分析方法应被重新验证（部分验证），以确认相应函数并保证准确度和精密度。当样品分析方案进行修订，发生变更时，应做好版本控制并及时培训相关人员，确定其知悉变更内容。

分析方案中要明确说明是否采用盲法检、生物样品预处理过程、分析批组成、标曲和 QC 的分布方法及进样顺序、分析批接受标准，ISR、低于定量下限的检测结果的表述；说明样品分析过程中发生的任何与方法验证所采用条件不同的情况的处理原则；说明是否进行部分方法验证。尤其要详细说明检测异常点/离群值/复测点等的判定原则。规定复测方法和复测结果的接受标准，即重分析的条件和报告数据的原则等。说明样品分析过程及数据的质量保证措施。

9.2 样品分析批

9.2.1 标准曲线和质控样品

一个分析批包括空白样品、零值质控样品、至少 6 个浓度水平的标准曲线样，至少 3 个水平的 QC 样品（低、中、高浓度，若该分析批含有稀释的待测样本，应添加稀释质控样（DilutionQC, DQC），双重样品或至少试验样品总数的 5%，两者中取数目更多者）以及被分析的试验样品。所有样品（标准曲线样、QC 和试验样品）应在同一样品批中被处理和提取。质控样品应该分散到整个批中，以保证整个分析批的准确度和精密度。分析批中应有考察残留的样品。至少两个质控浓度应该落在试验样品浓度范围内。

9.2.2 试验样品

建议一名受试者的全部样品在同一分析批中分析，以减少结果的变异。

9.2.3 分析批接受标准

应在样品分析方案或标准操作规程中，规定接受或拒绝一个分析批的标准。一个分析批若同时满足以下标准方可认为结果有效：

(1) 除 LLOQ 外，标准曲线样计算浓度应在标示值的 $\pm 15\%$ 范围内，LLOQ 应在 $\pm 20\%$ 范围内。如果标准曲线样中有一个不符合这一标准，则应该拒绝这个标样，重新计算不含该标样的校正曲线，并应再进行回归分析。至少 75%标准曲线样和至少 6 个有效浓度满足上述标准。如果使用多重标准曲线样（例如“双标曲”），其中仅一个定量下限或定量上限标样不合格，则校正范围不变。线性标准曲线相关系数的 r^2 不小于 0.9900。

(2) QC 样品的准确度应在标示值的 $\pm 15\%$ 范围内。至少 67%质控样品且每个浓度水平至少 50% 样品符合上述标准，例如 6 个 QC 样品中至少 4 个满足要求。

在不满足上述标准的情况下，应该拒绝该分析批，相应的试验样品应该重新分析。在同时测定几个分析物的情况下，对每个分析物都要有一条标准曲线。如果一个分析批对于一个分析可以接受而对于另一个分析物不能接受，则接受的分析物数据可以被使用，但应该重新提取和分析样品，测定被拒绝的分析物。

所有接受的分析批，每个浓度质控样品的平均准确度和精密度应该列表，并在分析报告中给出。如果总平均准确度和精密度超过 15%，则需要进行额外的考察，说明该偏差的理由。对于生物等效性试验，这可能导致数据被拒绝。

9.3 试验样品重新分析

应该在试验样品分析计划或标准操作规程中预先确定重新分析试验样品的理由、重分析方法（例如采用双样）以及选择报告值的标准。应该提供重新分析样品的编号、初始值、重新分析的理由、重新分析获得值、最终接受值以及接受理由。对于生物等效性试验，通常不能接受由于药动学理由重新分析试验样品。重新分析试验样品可能基于以下原因：

(1) 由于标准曲线样或质控样品的准确度或精密度不符合接受标准，导致一个分析批被拒绝；

(2) 内标的响应与标准曲线样和质控样品的内标响应差异显著，根据分析方案或标准操作规程中相关规定对响应异常进行判断。

(3) 进样不当或仪器功能异常。在仪器故障的情况下，如果已经在方法验证时证明了自动进样器内稳定性，则可以将已经处理的样品重新进样。但对于拒绝的分析批，则需要重新处理样品。

(4) 测得的浓度高于定量上限，或低于该分析批的定量下限，且该批的最低浓度标样从标准曲线中被拒绝，导致比其它分析批的定量下限高；

(5) 在给药前样品或安慰剂样品中测得可定量的分析物；

(6) 色谱不佳。

10. 用于评价方法重现性的试验样品再分析（ISR）

10.1 ISR 定义

在方法验证中使用标准曲线样和质控样品可能无法模拟实际试验样品。样品处理和储存过程中无法避免的诸多差异均可能影响方法的准确度和精密度，例如蛋白结合、已知或未知代谢物的回复转化、样品均一性和同服药物等差异。因此，推荐通过在已测分析批检测数天后，在另外一个分析批中重新分析试验样品，来评价实际样品测定的准确度，称为评价方法重现性的试验样品再分析（Incurred Sample Reanalysis, ISR）。生物等效性临床实验样品应进行 ISR 验证。

10.2 ISR 抽样

ISR 样品比例的确定应基于对分析方法和分析物的深入理解。建议选取每例受试者每一个周期的 C_{max} 附近和消除相各取至少 1 个样品进行重分析，ISR 样品量不得少于试验样品总数的 10%。

10.3 ISR 接受标准

对于至少 67% 的重复测试，原始分析测得的浓度和重新分析测得浓度之间的差异应在两者均值的 $\pm 20\%$ 以内。已测样品再分析差异显著时，首先应对分析方法中可能存在的问题进行分析，采取足够的步骤优化分析方法。

11. 色谱积分

建立自动积分方法，至少在同一个分析批内采用相同的积分方法，应尽可能的始终使用同一个积分方法进行积分。尽量不采用手动积分，当自动积分不适用

而必需手动积分时，必须在原始记录中写明积分原因、自动积分和手动积分两种结果，并由项目负责人、实验室负责人签字同意。

12. 报告

12.1 概述

一般情况下，报告包括分析方法验证报告和试验样品分析报告。实验室应有相关文件支持报告的编制、审核、批准和修改程序。报告应具有唯一性标识（如编号）并进行版本控制，并在报告的每一页上标注。报告应至少包括：

- (1) 标题。
- (2) 实验的起止日期。
- (3) 申报者和实验室名称、地址和负责人。
- (4) 依从性声明。
- (5) 质量保证工作情况。
- (6) 项目负责人、分析人员和质量保证人员的签字。
- (7) 目录。
- (8) 缩略语表。
- (9) 结果总结或摘要。

(10) 简介：说明目标待测物及确定依据，内标物选择依据，检测方法（如色谱等），分析技术的确定依据以及原始数据和资料的保存情况。

(11) 实验材料：包括标准物质、试剂、空白基质的详细信息（来源、批次、分析证明、储存条件及稳定性），使用的仪器和分析条件（如液相条件、质谱条件等），详细描述标准曲线、质控和储备液、工作液的配制过程。

(12) 色谱图的积分方法，表格中数据的计算、统计以及小数点保留的方法。

(13) 数据备份情况。

12.2 分析方法验证报告

分析方法验证报告是对分析方法验证过程的总结，应包括方法验证的所有数据。全部源数据应以原始格式保存。根据要求说明对验证方案的偏离。分析方法验证报告除上述报告所需包含的基本内容外，还应包含以下信息：

(1) 方法验证方案的编号和版本。

(2) 分析步骤具体描述（分析物、内标、样品预处理、提取和分析）。

(3) 分析批的接受标准。

(4) 所有分析验证方案中要求的验证项目对应的结果汇总。

(5) 所有分析批分析结果列表，无论接受与否均予以记录，同时记录不予接受理由；

(6) 所有接受的分析批标准曲线结果列表，包括线性范围、斜率、截距、相关系数（ r 或 r^2 ）、回算浓度和准确度；

(7) 所有接受的分析批 QC 样品结果列表，包括批内和批间准确度和精密度。清晰标识接受标准以外的数值；

(8) 所有测定结果和计算浓度必须出现在验证报告中。表格形式参见《化学药品新注册分类申报资料要求（试行）》。

(9) 验证过程中得到的意外结果，对采取对应措施的理由进行充分说明；

(10) 对方案或者标准操作规程的偏离（描述偏离详情、对试验的影响及支持数据）。

(11) 报告中附图：待测物和内标的子离子扫描图（若适用）；空白基质图谱；特异性研究结果图谱；最低定量下限图谱；代表性的患者用药后图谱；标准曲线图。

(12) 参考文献。提供有关样品检测方法选择的支持性背景文献资料。（例如，根据化合物特点，应采用最适宜的检测方法；如认为待测物低于定量限无法检测，应提供近期的、充分的研究资料加以证明。）

(13) 全部的色谱图应作为报告附件提交。图谱上的文件编码/检测样品编码与受试者生物样品编码的对应关系能够追溯。所有纸质谱图包括完整信息（进样时间、峰高/峰面积、计算值等）。

12.3 试验样品分析报告

试验样品分析报告应当包括对试验样品的详细描述和对试验样品分析的方法验证报告的引用。全部源数据应该以其原始格式保存，并根据要求提供。任何对分析计划、分析步骤和标准操作规程的偏离均应列出并说明其对结果的影响。样品分析报告除报告基本元素外还应包括以下信息：

(1) 样品分析方案的编号和版本，版本变化情况。

(2) 符合方案要求的受试者样品情况。

(3) 样品采集。包括样品采集地点、情况和编号方法。

(4) 样品储存。分析单位样品接收情况（包括交接、运输和保存情况）和处置情况。

(5) 分析步骤具体描述（分析物、内标、样品预处理、提取和分析）。

(6) 分析批的接受标准。

(7) 所有分析批试验样品列表, 包括分析日期和结果, 尤其是重新分析样品, 要注明重新分析原因和次数, 在试验报告中应该提供重新分析的样品数目以及占样品总数的比例。漏检样品及原因。

(8) 对分析方案或者标准操作规程的偏离;

(9) 所有分析批分析结果列表, 无论接受与否均予以记录, 同时记录不予接受理由。

(10) 所有接受的分析批标准曲线结果列表, 包括线性范围、斜率、截距、相关系数 (r 或 r^2)、回算浓度和准确度;

(11) 所有接受的分析批质控样品结果列表, 包括批内和批间准确度和精密度。清晰标识接受标准以外的数值;

(12) 所有接受的分析批, 每个浓度质控样品的平均准确度和精密度应该列表, 并在分析报告中给出。如果总平均准确度和精密度超过 15%, 则需要进行额外的考察, 说明该偏差的理由。对于生物等效性试验, 这可能导致数据被拒绝。

(13) 方法重现性评价的样品重新分析试验样品再分析的结果可以独立于方法验证报告和样品分析报告, 单独提供。

(14) 特殊情况说明。

(15) 样品分析的全部图谱作为报告附件提交, 包括标准曲线样和质控样品的色谱图。图谱上的文件编码/检测样品编码与受试者生物样品编码的对应关系能够追溯。所有纸质谱图包括完整信息 (进样时间、峰高/峰面积、计算值等)。