

人用药品注册技术要求国际协调会

ICH 协调指导原则

生物样品分析方法验证

M10

草案

2019 年 2 月 26 日授权

公开征求意见中

在 ICH 进程第 2 阶段，ICH 大会将相应 ICH 专家工作组已达成共识的文本或指导原则草案递交给 ICH 区域监管机构，用以按照相应国家或地区的程序，征求内部和外部意见。

M10

指导原则进程

编码	进程	日期
M10	ICH 大会成员第二阶段授权 发布征求意见稿（2019 年 1 月 15 日版）	2019 年 2 月 26 日

法律声明：本指导原则受版权保护，在 ICH 版权已得到认可的情况下，除 ICH 标识外，可在公共许可的前提下使用、复制、引用、改编、调整、翻译或传播，在任何情形下需在文件中承认 ICH 版权。如需要修改或翻译，必须进行合理的处理，明确注明或以其他方式标注对原文或基于原文进行的更改。任何暗示 ICH 授权或支持对原版文件的改写、调整或翻译行为必须避免。

本文件按现有状态提供，不做任何形式的保证。任何情况下，ICH 或原版文件作者不会对任何由使用本文件造成的索赔、伤害或其他责任负责。

上述许可不适用于第三方提供的内容。因此，对版权归属第三方的文件，必须从该版权持有者处获得复制许可。

ICH 协调指导原则
生物样品分析方法验证

M10

ICH 共识指导原则

目录

1. 引言.....	6
1.1 目的.....	6
1.2 背景.....	6
1.3 范围.....	6
2. 一般原则.....	7
2.1 方法开发.....	7
2.2 方法验证.....	8
2.2.1 完整验证.....	8
2.2.2 部分验证.....	9
2.2.3 交叉验证.....	9
3. 色谱法.....	10
3.1 对照标准品.....	10
3.2 验证.....	11
3.2.1 选择性.....	11
3.2.2 特异性.....	12
3.2.3 基质效应.....	12
3.2.4 校准曲线和范围.....	13
3.2.5 准确度和精密度.....	14
3.2.6 残留.....	15
3.2.7 稀释完整性.....	16
3.2.8 稳定性.....	16
3.2.9 重进样重现性.....	19
3.3 试验样品分析.....	19
3.3.1 分析批.....	20

3.3.2	分析批接受标准	20
3.3.3	校正范围	22
3.3.4	试验样品重分析	22
3.3.5	试验样品重进样	24
3.3.6	色谱图积分	24
4.	配体结合分析	24
4.1	主要试剂	24
4.1.1	标准品	24
4.1.2	关键试剂	25
4.2	方法学验证	25
4.2.1	特异性	26
4.2.2	选择性	26
4.2.3	校准曲线和范围	27
4.2.4	准确度和精密度	28
4.2.5	残留	29
4.2.6	稀释线性和钩状效应	29
4.2.7	稳定性	30
4.3	试验样品分析	31
4.3.1	分析批	31
4.3.2	分析批接受标准	32
4.3.3	校正范围	32
4.3.4	试验样品重分析	33
5.	已测样品再分析 (ISR)	34
6.	部分验证和交叉验证	36
6.1	部分验证	36
6.2	交叉验证	38
7.	其他考虑事项	38
7.1	待测物为内源性物质	38
7.1.1	质控样品	40
7.1.2	校准曲线	40
7.1.3	选择性、回收率和基质效应	40
7.1.4	平行性	41
7.1.5	准确度和精密度	41
7.1.6	稳定性	42
7.2	平行性	42
7.3	回收率	42

7.4 最低稀释度	43
7.5 商品化和诊断试剂盒.....	43
7.6 新技术或替代技术	44
7.6.1 干基质方法.....	44
8. 文档.....	45
8.1 摘要信息	45
8.2 方法验证和生物分析报告文档	46
9. 术语.....	50

1. 引言

1.1 目的

本指导原则旨在为化学药物和生物药物定量生物分析方法验证及其在试验样品分析中的应用提供建议，以提高化学药物和生物药物研发和注册申请中生物分析方法验证支持性数据的质量和一致性。

生物分析方法验证旨在证明所采用的生物分析方法适用于预期目的。也可采用本指导原则以外的方法进行验证，但需要提供适当的科学依据。当采用的验证方法明显不同时，建议咨询监管机构。

1.2 背景

生物基质中化学药物和生物药物及其代谢物的浓度测定是药物开发过程中的重要内容。关键的非临床毒代动力学（TK）/药代动力学（PK）研究以及包括生物利用度比较/生物等效性研究（BA/BE）等的临床试验结果，可用于药品安全性和有效性监管决策。因此，必须对所使用的生物分析方法进行充分验证和记录，以确保用于支持注册申请的结果可靠。

1.3 范围

本指导原则描述了用于注册申请提交的生物样品分析所需的方法验证。适用于支持监管决策关键的非临床 TK/PK 研究和各期临床试验生物样品（如全血、血浆、血清、其他体液或组织）中化学药物和生物药物及其代谢物浓度检测方法的验证。注册申请研究资料中涉及的主要基质应进行完整的方法验证。如有必要，应对其他基质进行部分验证。非临床和临床研究中需检测的待测物以及支持监管决策所需提交的研究类型见其他 ICH 和地区法规文件。

除用于注册申请、药品安全有效性评估或说明书内容研究（如探索性研究）外，申请

人可自行决定定量分析方法验证的程度。

本指导原则适用于配体结合分析法（LBAs）和色谱法[例如液相色谱（LC）或气相色谱（GC），通常与质谱（MS）检测联用，有时与其他检测器联用]的定量分析。

生物分析也必须符合药物非临床试验质量管理规范（GLP）或药物临床试验质量管理规范（GCP）相关要求。

本指导原则不适用于生物标志物和免疫原性分析方法。

2. 一般原则

2.1 方法开发

生物分析方法开发的目的是确定方法的设计、操作条件、局限性和适用性以达到预期目的，并确保分析方法已被优化，可用于验证。

在生物分析方法开发之前，申请人应充分了解目标待测物（例如确定药物的物理化学性质、体外和体内代谢以及蛋白结合），并考虑可能适用的先前分析方法的各个方面。

方法开发涉及优化待测物提取和检测的相关过程和条件，包括优化以下参数以确保该方法适合于验证：

- 标准品/对照品
- 关键试剂
- 校准曲线
- 质控样品（QCs）

- 选择性和特异性
- 灵敏度
- 准确度
- 精密度
- 回收率
- 待测物基质稳定性
- 最低稀释度

虽然生物分析方法开发不需要保存大量的记录或注释，但应记录操作过程的变更以及任何问题及其解决方案，以便为已验证的方法在正式研究试验样品分析之前或期间发生的变更提供依据。

方法开发一旦完成，需经过方法验证证明该优化的方法适用于试验样品分析。

2.2 方法验证

2.2.1 完整验证

为确保分析性能的可接受性和分析结果的可靠性，必须对生物分析方法进行验证。生物分析方法是用于测定生物样品中待测物浓度的一系列操作步骤。为了对临床和关键的非临床研究中的待测物进行定量，建立生物分析方法时，应对其进行完整验证。药物开发过程中采用文献报道的分析方法和商业试剂盒用于生物样品分析时，也应进行完整验证。通常情况下仅需测定一个待测物，但有时需检测多个待测物，可能涉及两种不同的药物，母

药及其代谢物，或药物的对映异构体或光学异构体。此时，验证和分析的原则适用于所有目标待测物。

色谱法验证应包括以下内容：选择性、特异性（如适用）、基质效应、校准曲线（响应函数）、范围[定量下限（LLOQ）至定量上限（ULOQ）]、准确度、精密度、残留、稀释完整性、稳定性和重进样重现性。

对于 LBAs 法，应验证以下内容：特异性、选择性、校准曲线（响应函数）、范围（定量下限至定量上限）、准确度、精密度、残留（如有必要）、稀释线性、平行性（如必要，在样分析期间进行）和稳定性。

用于分析方法验证的基质应与试验样品相同，包括抗凝剂和添加剂。在难以获得与试验样品相同基质（例如，稀有基质，如组织、脑脊液、胆汁）的情况下，可以使用合适的替代基质用于分析方法验证，并证明其科学合理性。

应采用研究方案、研究计划、报告或标准操作规程（SOP）的形式，事先详细规定生物分析方法的具体内容。

2.2.2 部分验证

可以通过部分验证来评估对完整验证过的分析方法所做的修改。部分验证的内容可以从至少一项准确度和精密度到几乎完整验证（参见第 6.1 节）。部分验证的内容应根据方法变更的范围和性质来确定。

2.2.3 交叉验证

如果同一研究或不同研究的数据采用不同方法获得，或者同一研究中的数据在不同实验室采用相同方法获得，则需要对这些数据进行比较，应对所使用的分析方法进行交叉验证（参见第 6.2 节）。

3. 色谱法

3.1 对照标准品

在方法验证和试验样品分析过程中，将空白基质中加入含有目标待测物对照标准品的溶液，以制备校正标样、质控和稳定性样品。校正标样和质控样品应采用不同的储备液制备。但是，如果样品储备液的准确度和稳定性得到验证，校正标样和质控样品可采用相同的储备液制备。应在所有校正标样、质控样品和试验样品处理过程中加入适宜的内标（IS）。若不添加内标，应提供相应的支持性证据。

对照标准品的性质至关重要，其质量会影响分析结果，从而影响研究数据，因此要确保其质量（纯度、规格、鉴别）和内标的适用性。方法验证和试验样品分析过程中使用的对照标准品的来源应可靠并可追溯，并且其化学形式应与待测物相同。如果无法获得与待测物相同的对照标准品，也可以使用质量可控的其他化学形式的物质（例如盐或水合物）。

适合的对照标准品包括药典标准品、商业化标准品或经充分验证的内部或外部非商业组织制备的标准品。应提供分析证书（CoA）或同等的其他材料来证明对照标准品的质量，应包含有关纯度、储存条件、重新标定/失效日期和批号的相关信息。

内标不需要提供分析证书，只要证明其适用性即可，例如能够证明该物质本身或其相关的任何杂质对于待测物的检测不会产生干扰。

生物分析方法中使用质谱进行检测时，建议使用稳定同位素标记的待测物作为内标。同位素内标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。应检测是否存在未标记待测物，如果存在，则必须在方法验证期间评估其潜在影响。

储备液和工作液应当使用分析证书所标明的稳定期内（即有效期或早期开发前的重新标定日期）的对照标准品制备。

3.2 验证

3.2.1 选择性

选择性是分析方法在空白生物基质中存在潜在干扰物质（非特异性干扰）的情况下区分和测定待测物的能力。

应使用至少 6 个个体来源/批次（非溶血和非高脂）的空白基质（不含待测物或内标的基质样品）证明选择性。在不同来源的基质难以获得的情况下，可以使用更少来源的基质。同时还应评估内标的选择性。

选择性的评估应证明空白样品中待测物或内标的保留时间处没有干扰组分引起的显著响应。干扰组分的响应应不高于待测物定量下限响应的 20%，并且不高于每个基质定量下限样品中内标响应的 5%。

高脂基质选择性的评价应使用至少一种来源的高脂基质。用于验证的基质应尽可能代表实际的试验样品。应尽量从甘油三酯水平异常高的受试者中获得。如果难以获得，虽然不能完全代表实际试验样品，也可以使用加入甘油三酯的基质。如果药物影响脂质代谢或预期的患者是高脂血症群体，则不建议使用加入甘油三酯制备的高脂基质。高脂基质的选择性验证对于临床前研究来说不是必需的，除非药物影响脂质代谢或者在特定的高脂血症动物中应用。

溶血基质选择性的评价应使用至少一种来源的溶血基质，可通过向基质中添加溶血全血（至少 2% V/V）获得，以形成明显可检测的溶血样品。

3.2.2 特异性

特异性是生物分析方法检测和区分待测物与其他物质的能力，包括相关物质（例如与待测物结构相似的物质、代谢物、异构体、杂质、样品制备过程中形成的降解产物，或预期目标适应症患者的合并用药）。

如果生物基质中预计存在相关物质，则应在方法验证期间或者在给药前试验样品中评估其影响。当采用 LC-MS 方法时，特异性的考察包括比较待测物与潜在干扰相关物质的分子量以及将相关物质与待测物色谱分离。

干扰组分的响应不应超过待测物定量下限响应的 20%，并不高于定量下限样品内标响应的 5%。

在分析检测过程中（包括提取过程或进入离子源以后），还应评估代谢物反向转化为母体待测物的可能性（即，潜在不稳定的代谢产物，如酯待测物到酯/酸性代谢物、不稳定的 N-氧化物或葡萄糖苷酸代谢物、内酯环结构）。在早期尚未对新的代谢物进行研究时，这种评估通常无法实现。但建议考虑以上情形，并在必要时进行部分验证。如存在上述情况，则应该在生物样品分析报告中评估反向转化程度，并讨论对研究结果的影响。

3.2.3 基质效应

基质效应是指由于生物基质中的干扰物质和经常未识别的成分引起的待测物响应的改变。在方法验证过程中，需要考察不同来源/批次间的基质效应。

基质效应应通过分析至少 3 个重复的低和高浓度质控样品进行评估，每个重复使用至少 6 个不同来源/批次的基质制备。准确度应在标示浓度的 $\pm 15\%$ 以内，并且所有单个来源/

批次基质的精密度（变异系数百分比，%CV）不应大于 15%。如果基质难以获得，可以允许使用更少来源/批次的基质。

基质效应也应在相关的患者群体或特殊人群（例如肝功能不全或肾功能不全患者）中评估。当预计研究中会出现溶血或高脂基质时，建议在方法验证期间根据具体情况使用溶血或高脂基质进行额外的基质效应考察。

3.2.4 校准曲线和范围

校准曲线用于描述待测物的标示浓度与分析响应之间的关系。通过在空白基质中加入已知浓度待测物制备校正标样，涵盖相应的浓度范围并组成校准曲线。配制校正标样的基质应与试验样品基质相同。校准曲线的浓度范围由定量下限（LLOQ，校正标样的最低浓度）和定量上限（ULOQ，校正标样的最高浓度）来决定。在方法验证和每一分析批中，每个待测物都应随行一条校准曲线。

应使用空白样品、零浓度样品（仅添加内标的空白样品）和至少 6 个浓度水平的校正标样（包括定量下限和定量上限）制备校准曲线。

应使用简单的回归模型来充分描述浓度-响应关系。回归模型的选择应该有书面的操作规程指导。应在方法验证期间确定回归模型、数据加权和转换方案。空白样品和零浓度样品不应该包含在校准曲线回归方程当中。校正标样可以重复分析，在这种情况下，所有可接受的重复数据都应纳入校准曲线回归分析。

报告中应包括校准曲线参数（线性拟合时的斜率和截距）、校正标样的回算浓度和计算的平均准确度。应提交在验证过程中所有可接受的校准曲线，其中包括不同天内考察的至少 3 个独立批的校准曲线。校正标样的回算浓度应在定量下限标示浓度的 $\pm 20\%$ 以内，

其他水平应在标示值的 $\pm 15\%$ 以内。至少有 75%的校正标样且至少 6 个浓度水平应符合上述标准。

在使用重复测定的情况下，对于每个浓度水平，至少 50%的校正标样应满足接受标准（LLOQ $\pm 20\%$ ，其他浓度 $\pm 15\%$ ）。不符合接受标准，则应拒绝该校正标样，并重新拟合去除该点后的校准曲线，包括回归分析。对于准确度和精密度考察的批次，如果分析批定量下限或定量上限校正标样的所有重复数据都不合格，则应拒绝该批次结果，确定分析批失败的可能原因，并在必要时修改方法。如果下一个验证批次也失败，则应在重新启动验证之前修改该方法。

应至少在一次评估中采用新鲜配制的校正标样制备校准曲线。随后，可在规定的稳定时间内使用冷冻的校正标样。

3.2.5 准确度和精密度

3.2.5.1 质控样品制备

质控样品旨在模拟样品，通过将已知浓度的待测物加入到空白基质中制备，在与预期试验样品相同的条件下储存，并分析以评估分析方法的有效性。

校正标样和质控样品应采用不同的储备液制备，以避免出现与方法分析性能无关的偏差。如果储备液的准确度和稳定性已得到验证，则可使用相同的储备液制备校正标样和质控样品。如果不存在干扰或基质效应，也可以使用单一来源的空白基质，详见 3.2.3。

在方法验证过程中，应制备在校准曲线范围内至少 4 个浓度水平的质控样品：
LLOQ、在 LLOQ 浓度三倍以内（低浓度质控）、约为校准曲线范围的 30-50%（中浓度质控）和至少 ULOQ 的 75%（高浓度质控）。

3.2.5.2 准确度和精密度

准确度和精密度应通过分析批内和批间的质控样品来确定。应使用同一批次的数据考察准确度和精密度。

批内准确度和精密度应通过在每一分析批，对每个浓度水平的质控样品进行至少 5 样品分析来评估。批间准确度和精密度需要通过对每个浓度水平质控在至少两天内考察的至少 3 个分析批结果进行评价。为了能够评估一个分析批内随时间变化的任何趋势，建议至少在一个分析批中证明质控样品的准确度和精密度，该分析批的大小应与试验样品预期分析批大小相当。所有方法验证数据以及准确度和精密度的结果都应提交，包括不符合接受标准的单个质控样品，已被记录的明显错误情况除外。同时还要提交每个分析批的批内准确度和精密度数据。如果所有分析批的批内准确度和精密度均未满足标准，应计算每个浓度水平质控样品的批内准确度和精密度的总体估计值。批间（中间）精密度和准确度应结合所有批次的数据进行计算。

用于这些考察的分析批中，至少一个分析批的校准曲线应采用新鲜配制的校正标样制备。如果其他分析批未使用新鲜配制的校准曲线，则需证明冻存校正标样的稳定性。

除 LLOQ 外，每个浓度水平质控样品的总体准确度应在标示值的 $\pm 15\%$ 以内，LLOQ 的准确度应在标示值的 $\pm 20\%$ 以内。除 LLOQ 外，每个浓度水平质控样品的精密度（% CV）不应超过 15%，LLOQ 的精密度不应超过 20%。

3.2.6 残留

残留是指前一个样品残留在分析仪器上的残留物而引起的测定浓度的变化。

在方法开发过程中应当评估并尽量减少残留。在验证期间，通过在 ULOQ 样品之后分析空白样品来考察残留。在 ULOQ 之后的空白样品中的残留应不超过 LLOQ 样品中待测物响应的 20% 和内标响应的 5%。如果残留不可避免，则试验样品不能随机进样，应考虑具体措施，在方法验证时检验并在试验样品分析时应用，以确保残留不影响准确度和精密度。包括在分析预期高浓度样品之后，下一个试验样品之前，进样空白样品。

3.2.7 稀释完整性

稀释完整性是在必要时对样品稀释过程的评估，以确保不会对待测物浓度的准确度和精密度造成影响，应使用与质控样品来源相同的空白基质进行样品稀释。

稀释质控样品的浓度应大于 ULOQ，采用空白基质对样品进行稀释，每个稀释因子至少 5 个测定值，以确保检测浓度在校准曲线范围内被准确测量。试验样品分析过程中所用稀释因子应该介于方法学验证的稀释因子范围内。稀释质控的平均准确度应在标示值的 $\pm 15\%$ 之内，精密度(%CV)不应超过 15%。

在试验基质难以获得时，在证明不影响精密度和准确度的情况下可以使用替代基质。

3.2.8 稳定性

应进行稳定性考察，以确保样品在制备、处理和分析过程中采取的每一步操作以及使用的储存条件不会影响待测物的浓度。

用于稳定性试验的储存和分析条件，如样品储存时间和温度、样品基质、抗凝剂和容器材料等，都应与实际试验样品相同。文献报道的数据不足以证明稳定性结果。稳定性考察中质控样品的储存时间不能比试验样品短。

采用低浓度和高浓度稳定性质控样品考察试验基质中待测物的稳定性。低浓度和高浓度稳定性质控样品应分别在零时和考察条件下放置后进行评价。每个浓度水平/储存条件/时间点应至少制备三个稳定性质控样品。

由新鲜制备的校正标样获得校准曲线，根据校准曲线分析稳定性质控样品，同批次随行检测新鲜制备的质控样品或稳定性已被证明的质控样品。每一浓度的均值应在标示浓度的 $\pm 15\%$ 范围内。

如果试验样品的浓度持续高于校准曲线的 ULOQ，则应调高稳定性质控样品的浓度，以反映这些较高浓度样品的稳定性结果。由于溶解度的限制，这种情况在非临床研究中很难出现。

如果试验样品中存在多种待测物（例如使用固定复方进行的研究或由于特定药物治疗方案），则应使用含有所有待测物的基质进行待测物在基质中稳定性的考察。

通常应该进行下列稳定性考察：

1) 储备液和工作液稳定性

应根据分析试验样品期间使用的储存条件，确定待测物和内标储备液和工作液的稳定性，采用溶液的最低和最高浓度进行考察。考虑到检测器的线性和检测范围，应通过适当稀释，通过检测器的响应来考察储备液和工作液的稳定性。如果稳定性随浓度而变化，则需要考察所有浓度储备液和工作液的稳定性。如果稳定同位素标记内标在与待测物相同的储存条件下不发生同位素交换，则内标不需要进行额外的稳定性考察。如果对照标准品过期或已超过重新标定日期，之前使用该批对照标准品配制的储备液的稳定性由储备液的有效期或重新标定日期决定。仅为了延长对照标准品的使用效期而将其配制成储备液或工作液的常规做法是不被接受的。

2) 冻融稳定性

为了评估从冷冻储存条件中反复取出样品的影响，应在多次冷冻和解冻循环后考察待测物的稳定性。应采用与试验样品相同的处理过程对低和高浓度稳定性质控样品进行解冻和分析。稳定性质控样品应在解冻循环之间保持至少 12 小时的冷冻。用于冻融稳定性考察的质控样品应使用新鲜制备的校准曲线和质控样品或已证明稳定的质控样品进行评估。经验证的冷冻/解冻循环次数应不少于试验样品所经历的冻融循环次数，但至少应进行三次循环。

3) 生物样品前处理过程中的稳定性（短期稳定性）

应设计考察生物样品前处理过程中的稳定性试验，以覆盖试验样品的实验室处理条件。

低浓度和高浓度稳定性质控样品应采用与试验样品相同的方式解冻，并在前处理过程中保持相同的温度和至少相同的持续时间。

前处理过程中的总时间应该是一致的；不接受额外延长暴露于前处理条件下的时间（即不接受累加每次冻融考察的时间）。

4) 处理后样品稳定性

应考察处理后样品稳定性，包括分析完成（在自动进样器/仪器中）前的时间。如：

- 处理后样品在试验样品（干提取物或在进样阶段）分析时储存条件下的稳定性。
- 在进样器或自动进样器温度下，仪器处理后样品的仪器/自动进样器稳定性。

5) 长期稳定性

应考察储存在冰箱中的基质中待测物的长期稳定性。低和高浓度稳定性质控样品应在

与试验样品相同的冰箱储存条件下保存至少相同的持续时间。

对于化学药物，可以接受将一个温度（例如-20℃）的稳定性外推到较低温度（例如-70℃）。

对于生物药物，可以采用括号法，例如，在-70℃和-20℃条件下的稳定性已经被证明的情况下，若试验样品储存温度在此范围之内，则不必额外考察试验样品储存温度下的长期稳定性。

此外，如果适用，也应该进行下列考察：

6) 全血稳定性

样品从受试者采集之后到储存之前，应该充分关注样品基质（全血）中待测物的稳定性，以确保通过分析方法获得的浓度能够反映样品采集时受试者血液中待测物的浓度。

如果使用的基质是血浆或血清，则应在方法开发（例如在全血中使用探索性方法）或方法验证期间考察全血中待测物的稳定性。结果应在方法验证报告中提供。

3.2.9 重进样重现性

方法的重现性通过重复测定质控样品来考察，通常包含在精密度和准确度考察中。但如果样品可以重新进样（例如在仪器中断或其他原因如设备故障的情况下），应当考察重进样重现性并将其纳入方法验证报告或在生物样品分析报告中提交。

3.3 试验样品分析

需方法验证完成之后再行进行试验样品分析，部分验证内容可以在后续阶段完成（如长期稳定性）。提交注册申请时生物分析方法验证应已全部完成。根据已验证的分析方法处理试验样品、质控样品和校正标样。如果考察系统适用性，则应参照预先规定的具体研究计

划、方案或 SOP 进行。系统适用性包括设备调节和仪器性能，采用独立于当前批次校正标样和质控的样品进行考察，受试者样品不能用于考察系统适用性。同时应监测试验样品中内标响应，以确定是否存在系统性内标变异。有关内容请参考表 1。

3.3.1 分析批

一个分析批由空白样品（不含待测物和内标的处理后样品）、零浓度样品（含内标的处理基质）、至少 6 个浓度水平的校正标样、至少 3 个浓度水平质控样品（低、中、高浓度双样品，或至少试验样品总数的 5%，两者中取数目更多者）以及待分析的试验样品。质控样品应该分散到整个分析批中，以保证整个分析批的准确度和精密度。确保质控样品始终能覆盖试验样品。

校正标样和质控样品应使用单独配制的储备液分别制备，除非储备液的准确度和稳定性已得到验证。所有样品（校正标样、质控样品和试验样品）应按照拟分析顺序在同一处理批中处理和提取。同一处理批试验样品和质控样品在固定时间段内由同一组分析人员在使用相同试剂、保证相同条件的情况下统一处理。应避免在同一分析批检测的样品在多个单独处理批中处理。以上情况无法避免时，例如由于进样器稳定性限制，则每个处理批应包括低、中、高浓度质控样品。

接受标准应在 SOP 或研究计划中预先规定，应对整个分析批和分析批中的单独处理批（如适用）进行定义。对于比较性 BA/BE 研究，建议每例受试者的全部样品在同一分析批中检测，以减少结果的变异。

应评估和报告试验样品分析过程中发生的任何残留影响（见 3.2.6）。如检测到残留，应减轻其对测定浓度的影响（例如试验样品的非随机化、在预期高浓度样品后进样空白样品）或在生物样品分析报告中证明汇报浓度的有效性。

3.3.2 分析批接受标准

应在方案、研究计划或 SOP 中规定接受或拒绝分析批的标准。若一个分析批包含多个处理批，则整个分析批及单独处理批均应满足接受标准。即使分析批中一个处理批因不满足接受标准被拒绝，分析批也存在满足接受标准的可能。

除 LLOQ 外，校正标样的回算浓度应在标示值的 $\pm 15\%$ 以内，LLOQ 应在 $\pm 20\%$ 范围内。至少 75%且不少于 6 个浓度水平的校正标样应满足该标准。如果采用的校正标样浓度超过 6 个且其中一个不满足标准，则应该拒绝该校正标样，重新计算不含该点的校准曲线并进行新的回归分析。

如果拒绝的校正标样是 LLOQ，则该分析批新的 LLOQ 是校准曲线下一个可接受的最低浓度校正标样；新的 LLOQ 应满足其原来的接受标准（即 $\pm 15\%$ ）。如果最高浓度校正标样被拒绝，则该分析批的 ULOQ 是校准曲线下一个可接受的最高浓度校正标样。重新拟合后的校准曲线范围应覆盖至少 3 个浓度水平（低、中、高）的质控样品。对于重新拟合校准曲线范围以外的试验样品应重新进行分析。如果使用多样品校正标样，结果且仅有一个 LLOQ 或 ULOQ 标样不满足接受标准，则校正范围不变。

质控样品的准确度值应该在标示值的 $\pm 15\%$ 范围内。至少 2/3 且每一浓度水平至少 50% 的质控样品应满足这一标准，若不满足，则应拒绝该分析批。相应的试验样品应该重新处理和分析。如果批次失败是由可归结的技术原因引起的，则样品可以重新进样。

含有稀释复测样品的分析批应包含稀释质控，以验证试验样品分析过程中稀释方法的准确度和精密度。稀释质控的浓度应大于需稀释试验样品（或 ULOQ）的浓度，并采用相同的稀释因子进行稀释。稀释质控的批内接受标准仅影响稀释试验样品的接受情况，不影响分析批的结果。

在同时检测多个待测物的情况下，每个待测物都要有一条校准曲线。如果一个分析批中一个待测物的结果可以接受，而另一个待测物的结果被拒绝，则可以采用接受待测物的

数据，被拒绝的待测物应重新处理和分析。

报告中应包含接受批的校正标样和质控样品的回算浓度。对于所有接受分析批，应计算每个浓度水平质控样品的总体（批间）准确度和精密度，并在分析报告中提交（参见第 8 节和表 1）。若总体平均准确度或精密度不满足 15% 的接受标准，则应进行调查以确认出现偏差的原因。在比较 BA/BE 研究中出现这种情况，可能会导致结果被拒绝。

3.3.3 校正范围

如果在试验样品分析开始前，已知或预测试验样品中的待测物浓度范围较窄，建议缩窄校准曲线范围、调整质控样品浓度或适当添加不同浓度新的质控样品，以充分反映试验样品的浓度。

在预期的治疗剂量下，如果在样品分析开始后，出现试验样品向校准曲线一端非预期聚集的情况，应停止分析，在继续进行试验样品分析之前，缩窄校准曲线范围（即部分验证）、调整现有质控样品浓度，或者在发现范围内增加额外浓度的质控样品。在优化校准曲线范围或质控浓度之前已分析过的样品，没有必要进行重新分析。

以上要求同样适用于大量试验样品的分析浓度高于 ULOQ 的情况。如果可能，应调整校准曲线范围，并增加质控样品或调整浓度。如无法调整校准曲线范围或浓度超过 ULOQ 的样品数量不多，则应采用经验证的稀释方法对样品进行稀释。

至少 2 个质控样品浓度水平应在试验样品的浓度范围内。如果校准曲线范围被调整，则应重新验证生物分析方法（部分验证），以验证响应函数并确保准确度和精密度。

3.3.4 试验样品重分析

试验样品分析开始前，应该在方案、研究计划或 SOP 中预先规定重新分析试验样品的理由、重复次数以及报告值的选择标准。

应在生物样品分析报告中提供并讨论重分析样品的数量（以及占样品总数的百分比）。

试验样品重分析可能基于下列理由：

- 由于校正标样的准确度和/或质控样品的准确度和精密度不满足接受标准，导致分析批被拒绝；
- 内标响应与校正标样和质控样品的内标响应差异显著（在 SOP 中预先规定）；
- 测得的浓度高于 ULOQ；
- 测得的浓度低于调整后的 LLOQ，而该批校准曲线中最低浓度校正标样已被拒绝，导致 LLOQ 比其他分析批高；
- 进样不当或设备故障；
- 稀释后的试验样品浓度低于 LLOQ；
- 在给药前样品、对照或安慰剂样品中测得可定量的待测物；
- 色谱图不佳（SOP 中预先规定）。

对于比较 BA/BE 研究，通常不接受由于药动学原因（例如样品浓度与预期曲线不符）重分析试验样品，因为这样可能会影响研究结果。

应在生物样品分析报告中提供包含所有重分析样品的初始值、重分析原因、重分析结果、采用结果及理由的汇总表。在首次分析结果无法报告的情况下，认为单次重分析是足够的（例如浓度高于 ULOQ 或仪器故障）。在需要对检测结果进行确认情况下（例如给药前

样品具有可测量浓度), 如果样品体积足够, 则可以进行重复测定。

受试者的安全性应优先于试验中的任何其他方面。因此, 可能还有其他情况, 需要因调查目的重新分析特定的试验样品。

3.3.5 试验样品重进样

如果已经在方法验证时证明了重进样重现性或在生物样品分析报告中提供了重进样重现性的结果, 在仪器故障的情况下, 则可以将已经处理的样品重新进样分析。仅仅因为校正标样或质控样品失败, 而没有任何确定的分析原因, 就重新进样一个完整的分析批或个别校正标样或质控样品是不可接受的。

3.3.6 色谱图积分

在研究计划、方案或 SOP 中应规定色谱图积分以及重积分的要求。任何与规定要求不符的偏离都应在生物样品分析报告中讨论, 此外, 报告中还应提供需要重积分色谱图列表, 包括所有手动积分情况以及重积分的理由。应保留原始和重积分色谱图以及初始和重复积分结果以供参考, 并在比较 BA/BE 研究的生物样品分析报告中提交。

4. 配体结合分析

4.1 主要试剂

4.1.1 标准品

标准品应进行充分表征并提供充足的证明性文件(例如, 检验分析证书和来源)。生物药物具有高度复杂的结构, 其与用于生物样品分析的结合试剂的反应活性可能会受到药品生产工艺的变化而发生影响。因此用于制备校正标样和质控的标准品批号应尽可能与非临床试验和临床试验中使用的批号保持一致。如果用于生物样品分析的标准品批号发生变化, 则应在使用前进行验证, 以确保方法学的性能符合接受标准。

4.1.2 关键试剂

关键试剂，包括结合试剂（例如结合蛋白、适配子、抗体或偶联抗体）和含酶试剂。由于这些试剂对分析结果有直接影响，因此必须确保质量。关键试剂通过与待测物结合，发生相互作用以产生与待测物浓度相关的仪器响应。因此应在分析方法中对关键试剂进行鉴定和规定。

无论是自制还是购买商品化试剂，都应该在方法开发的早期阶段评估关键试剂的可靠性。关键试剂的数据表应至少包括试剂标识、来源、批次/批号，纯度（如适用）、浓度（如适用）和稳定性/储存条件（参考表 1）。也有可能需要提供额外的特征数据。

关键试剂生命周期管理程序可以确保关键试剂的原始批次和新批次试剂具有一致性，是十分必要的。试剂性能应通过生物分析方法来评估。一般关键试剂的微小变化不会影响分析性能，而重大变化可能会显著影响其性能。如果变化较小（例如，其中一种试剂来源发生变化），则进行一个对比性的准确度和精密度分析批验证即可。但如果变化较大，则有必要进行额外的验证试验。理想情况下，直接对新试剂和旧试剂的分析结果进行比较即可。重大变化包括但不限于以下方面：抗体生产工艺的改变，额外从动物来源采集血样用于制备多克隆抗体和新克隆、新来源的单克隆抗体。

应记录复验日期和验证参数，以支持延长使用或更换关键试剂。试剂的稳定性试验应基于生物分析方法中试剂的性能表现和储存条件的一般指导原则，考察时间可延长至超过供应商提供的效期范围。同时应记录性能参数，以提供支持关键试剂延长或更换的数据。

4.2 方法学验证

当使用配体结合分析时，每个试验样品可使用单孔或多孔的方式进行分析。分析方式应在方案，研究计划或 SOP 中进行规定。方法学开发和验证采用的分析方式应与试验样品分析时保持一致。如果采用多孔方式，可以采用复孔响应的平均值来计算样品浓度或分别

计算每个孔的浓度值，再取复孔浓度平均值的方法计算结果。数据评估应基于可报告的浓度值。

4.2.1 特异性

特异性可采用在空白基质样品中添加试验样品中最大浓度的预期相关干扰物质来考察。

应考察加入最大浓度相关干扰物质时，目标待测物在 LLOQ 和 ULOQ 水平的准确度。添加相关干扰物质的空白样品的响应应低于 LLOQ。目标待测物在相关干扰物质存在的情况下，准确度不应超过标示值的 $\pm 25\%$ 。

当存在非特异性的情况下，应在空白基质中添加递增浓度的相关干扰物质，考察目标待测物在 LLOQ 和 ULOQ 水平的准确度，来评估相关干扰物质对分析方法的影响。存在干扰时，需确定相关干扰物质最低浓度。在生物样品分析过程中，应采取适当措施避免，例如，可能需要相应地调整 LLOQ/ULOQ 或考虑新方法。

在方法学开发和早期分析验证期间，这些“相关干扰物质”通常不可获得。可以在最初的方法学验证完成后，再补充特异性验证。

4.2.2 选择性

选择性是指在样品基质中存在其他“不相关物质”（非特异性干扰）时，分析方法检测和区分目标待测物的能力。基质中可能含有干扰目标待测物检测的非特异性成分，如降解酶，异嗜性抗体或类风湿因子。

应评估低浓度水平的选择性，因为在很多的案例中低浓度水平的分析会存在选择性的问题。但也建议在较高的待测物浓度水平下评估选择性。因此，选择性应通过向至少 10 个个体来源的空白基质中，分别添加 LLOQ 和高浓度质控水平的目标待测物来考察。至少 80% 以上个体来源的空白样品的响应应低于 LLOQ 的响应。

至少 80% 以上个体来源的目标待测物标样样品的准确度应在 LLOQ 标示值的 $\pm 25\%$ 范围内，在高浓度水平质控标示值的 $\pm 20\%$ 范围内。

应评估高脂血样品和溶血样品中的选择性（参考第 3.2.1 节）。对于高脂血样品和溶血样品，可以使用单一来源的基质分析一个批次来评估选择性。有时，选择性应在相关患者的样品中进行评估。在这种情况下，至少需要使用 5 名患者个体来源的基质。

4.2.3 校准曲线和范围

校准曲线反映了待测物浓度与分析平台响应值之间的关系。校准曲线由已知浓度的待测物加入基质中制备得到的构成一定浓度范围的校正标样组成。校正标样应用与试验样品相同的生物基质制备。定量范围由最低浓度的校正标样 LLOQ 和最高浓度的校正标样 ULOQ 来定义。在方法学验证期间，每一个待测物的每一个分析批都应有一条校准曲线。

校准曲线应至少由 6 个浓度水平的校正标样建立，包括 LLOQ 和 ULOQ，加上一个空白样品。空白样品不应参与校准曲线参数的计算。可以使用浓度低于 LLOQ 和高于 ULOQ 的锚定点校正样品来改善曲线的拟合。如果在上下渐近线附近有数据点，校准曲线的响应和浓度之间的关系通常由四参数或五参数逻辑模型来进行拟合，但是如果有合理的理由，也可采用其他合理的模型进行拟合。

应该在不同天内评估至少 6 个独立批次的校准曲线，以考查批与批之间的差异。

每个校正标样回算浓度的准确度和精密度应满足：LLOQ 和 ULOQ 水平的校正标样准确度和精密度在标示值的 $\pm 25\%$ 范围内，其他所有浓度水平的校正标样准确度和精密度在标示值的 $\pm 20\%$ 范围内。在不包括锚定点校正样品的情况下，应至少有 75%，且至少 6 个浓度水平的校正标样（包括 LLOQ 和 ULOQ）符合上述标准。锚定点校正样品因超出校准曲线的定量范围不需要满足上述标准。

建议校准曲线采用新鲜配制的校正标样。如果不使用新鲜配制的校正标样，则可在规定的稳定时间内使用冻存的校准标样。

4.2.4 准确度和精密度

4.2.4.1 质控样品的制备

质控样品旨在模拟试验样品，通过在基质中加入已知量的待测物来制备，并储存于试验样品预期的储存条件下，经分析来评估分析方法学的有效性。

用于制备质控样品的稀释系列应完全独立于用于制备校正标样的稀释系列。在准确度已验证或已知的情况下，则可使用同一份储备液来制备。在校准曲线线性范围内质控样品应至少制备 5 个浓度水平：LLOQ、LLOQ 的三倍以内（低浓度质控）、校准曲线定量范围几何平均值附近（中浓度质控）、ULOQ 的 75%以上（高浓度质控）以及 ULOQ。

4.2.4.2 准确度和精密度评估

准确度和精密度应通过分析每一个分析批内（批内）和不同分析批间（批间）的质控样品来确定。准确度和精密度应使用同样的分析批和数据来进行评估。

准确度和精密度应通过在 2 天或 2 天以上的至少 6 个分析批中，对每一个质控浓度水平（LLOQ、低、中、高、ULOQ）下至少重复分析 3 次来确定。报告的方法学验证数据和准确度和精密度的测定应包括所有可获得的结果，但错误明显且记录在案的情况除外。应报告每个分析批批内准确度和精密度数据。如果所有的分析批均不符合批内准确度或精密度的接受标准，则应计算每一个浓度水平质控的批内准确度和精密度的总体估计值。分析批之间（批间）精密度和准确度应结合所有分析批的数据来计算。

除 LLOQ 和 ULOQ（应在标示值的 $\pm 25\%$ 范围内）外，每个浓度水平下的批内和批间总

体准确度应在标示值的±20%范围内。除 LLOQ 和 ULOQ（不应超过标示值的 25%）外，每一浓度水平质控的批内和批间精密度均不应超过标示值的 20%。

此外，还应基于准确度和精密度评估总误差[即准确度（%）和精密度（%）误差绝对值的总和]。总误差不应超过 30%（LLOQ 和 ULOQ 不应超过 40%）。

4.2.5 残留

配体结合分析一般不评估残留的问题。但是，如果分析平台有出现残留的趋势，应通过在 ULOQ 的校正标样之后放置空白样品来考察潜在的残留。空白样品的响应应低于 LLOQ。

4.2.6 稀释线性和钩状效应

由于很多配体结合分析的分析范围狭窄，因此试验样品的浓度可能需要稀释后才能落到定量范围内。评估稀释线性的目的是确定：(i) 测量浓度在校准曲线范围内不受稀释的影响，以及 (ii) 高于校准曲线 ULOQ 的样品浓度的准确性不受钩状效应（即由高浓度待测物引起的信号抑制）的影响，从而产生错误的结果。

应使用与试验样品相同的基质来制备稀释用质控样品。

稀释线性采用稀释质控来验证，即在基质中加入高于 ULOQ 浓度的待测物，分析未稀释的样品（用于钩状效应），同时用空白基质稀释该样品（至少 3 个不同稀释因子）至校准曲线浓度范围内。对于每一个被测稀释因子，应采用与试验样品分析一致的复孔数进行至少 3 个分析批的分析。通过稀释质控样品验证是否存在响应抑制现象（钩状效应），如果观察到该现象，那么应该采取措施消除试验样品分析过程中的响应抑制。

经稀释因子校正后，每个稀释质控终浓度的准确度应在标示值的±20%范围内，所有稀释质控经稀释因子校正后终浓度的精密度不应超过 20%。

在试验样品分析过程中应用的稀释因子应该落在经验证合格的稀释因子范围内。

4.2.7 稳定性

应进行稳定性评估，以确保样品制备、处理和分析过程中的每一步骤以及储存条件不会影响到待测物的浓度。

稳定性试验的储存和分析条件，如样品储存时间和温度、样品基质、抗凝剂和容器材料，都应反映实际试验样品条件。仅用参考文献报道的数据证明稳定性是不够的。应在储存时间等于或大于试验样品储存时间的稳定性质控样品上进行储存期限的验证。

使用低浓度和高浓度的稳定性质控样品评估待测物在基质中的稳定性。低和高浓度的稳定性质控样品分别在零时和一定储存条件储存后进行评估。每个浓度水平/储存条件/时间点，应至少制备并分析三份稳定性质控样品。

由新鲜制备的校正标样获得校准曲线，根据校准曲线分析稳定性质控样品，同批次随行检测新鲜制备的质控样品或稳定性已被证明的质控样品。尽管使用新鲜制备的校正标样和质控样品是首选的方式，但对于大分子，在某些情况下，可能需要将其冷冻过夜。在这种情况下，应提供有效的数据证明冻融稳定性。每个浓度水平的质控样品浓度的平均值与标示值的偏差应在 $\pm 20\%$ 范围内。

在校正范围狭窄的情况下，许多配体结合分析可能需要对样品进行稀释，试验样品的浓度可能始终高于校准曲线的 ULOQ。如果是这种情况，应考虑稀释样品，调整稳定性质控样品的浓度来表示实际样品浓度范围。

如第 3.2.8 节所述，稳定性的验证应包括室温下（短期）稳定性或样品处理温度条件下的稳定性和冻融稳定性。此外，应验证长期冻存稳定性。

对于化学药物，将一种温度（例如 -20°C ）下的稳定性外推至更低温度（例如 -70°C ）是

可接受的。

对于生物药物，可以采用括号法，例如在-70°C 和-20°C 下证明稳定性的情况下，则没有必要研究试验样品在这两点温度之间储存的稳定性。

4.3 试验样品分析

可以在验证完成后进行试验样品的分析，但是可以理解，一些参数可能在稍后的阶段中完成（例如，长期稳定性）。至将数据提交给监管机构时，生物分析方法学验证应该已经完成。试验样品、质控样品和校正标样的处理应与经过验证的分析方法保持一致。关于记录，请参阅表 1。

4.3.1 分析批

一个分析批包括一个空白样品，至少 6 个浓度水平的校正标样，至少 3 个水平的质控样品（低、中和高）各两套（或至少占试验样品总数的 5%，取较多者），以及待分析试验样品。空白样品不应纳入校准曲线参数的计算中。质控样品应分散在分析批中，且能够覆盖所有试验样品，以确保整个分析批准确度和精密度符合要求。

大多数情况下，配体结合分析中使用微孔板。一个分析批可包括一个或多个板。通常，每块板包含一套独立的校准曲线和质控样品。如果每块板包含独立的校准标样和质控样品，那么需单独评估每块板是否符合接受标准。但是，对于某些分析平台，样品容量可能是有限的。这种情况下，可以在第一块和最后一块板上各放置一套校正标样，但质控样品应分散在每块板上。至少在每块板的试验样品开始（之前）和结束（之后）均应放置质控样品。每块板上的质控样品及每条校准曲线均应符合接受标准（参见第 4.3.2 节）。计算浓度时，应整合所有校正标样进行一次回归分析。如果整合的校准曲线不符合接受标准，则整个分析批失败。

4.3.2 分析批接受标准

在方案、研究计划或 SOP 中应明确定义接受或拒绝分析批的标准。如果分析批包含多个批次，则整个分析批和各个批次均应符合接受标准。即使分析批中的一个批次因不符合接受标准而被拒绝，分析批也有可能满足接受标准。

校正标样除 LLOQ 和 ULOQ 水平外的所有浓度水平的回算浓度应在标示值的 $\pm 20\%$ 以内，LLOQ 和 ULOQ 水平的回算浓度应在标示值的 $\pm 25\%$ 以内。至少 75%的校正标样且至少 6 个浓度水平，应符合上述接受标准。上述要求不适用于锚定点校正标样。如果设置超过 6 个校正标样，且其中一个校正标样不符合接受标准，则应拒绝该校正标样，应剔除该校正标样后对校准曲线进行重新评估并再次进行回归分析。

如果校正标样的 LLOQ 不符合要求被拒绝，则此分析批新的定量下限为校准曲线可接受的次低浓度的校正标样。如果校准标样的 ULOQ 不符合要求被拒绝，则该分析批新的定量上限为校准曲线可接受的次高浓度的校正标样。修订后的定量下限和定量上限校正标样将保持原来的接受标准(即 $\leq 20\%$)。修订后的校准曲线校正范围必须涵盖所有质控样品(低、中、高)。超出修订后校准曲线校正范围的试验样品应重新进行分析。

每个分析批应至少包含 3 个浓度水平质控样品(低、中、高)。在试验样品分析过程中，校正标样和质控样品应与试验样品的复孔数保持一致。至少 2/3 的质控样品以及在每个浓度水平下 50%的质控样品的准确度应在标示值的 20%以内。如果接受标准与上述标准不同，则应在 SOP 或方案中预先说明。

应计算所有可接受分析批中每个浓度水平质控样品总体的平均准确度和精密度，并在分析报告中进行报告。如果总体平均准确度和精密度超过 20%，应进行额外的研究以分析导致该偏差的原因。在比较 BA/BE 研究中，这种情况可能会导致数据被拒绝。

4.3.3 校正范围

试验样品分析中，至少 2 个水平的质控样品应落入试验样品测定的浓度范围内。在预期的治疗剂量下，如果试验样品开始分析后，发现试验样品的结果聚集在校准曲线一端，那么应停止检测分析，在继续进行试验样品分析之前，可采取下列方法优化检测方法：缩小标准校准范围（即部分验证），更改现有的质控浓度，或者在原校准曲线范围内增加额外浓度水平的质控样品。在优化校准曲线范围或质控浓度之前，不需重新分析已分析的试验样品。

4.3.4 试验样品重分析

在开始分析试验样品之前，应在方案、研究计划或 SOP 中预先规定重分析生物样品的可能原因、重分析的数量和接受标准以及重分析后选择报告值的标准。

应在生物分析报告中报告并讨论重分析的样品数量（以及占样品总数的百分比）。

试验样品重分析可能原因有：

- 由于校正标样的准确度和/或质控样品的精密度和准确度不符合接受标准，因而拒绝该分析批；

- 检测浓度高于 ULOQ；

- 因校准曲线 LLOQ 被拒绝，调整后的校准曲线的定量下限高于其他分析批，导致检测浓度低于调整后的定量下限；

- 设备发生故障；

- 稀释样品浓度低于 LLOQ；

- 给药前样品、对照或安慰剂样品中检测到可定量的目标待测物；

- 如果生物样品为复孔检测，由于一个孔的结果未能达到预定义的接受标准（例如，复孔间差异较大，其中一个孔的浓度高于 ULOQ 或低于 LLOQ）而获得不可报告的值。

对于比较 BA/BE 研究，不可接受由于 PK 原因（例如样品浓度不符合预期情况）对试验样品进行的重分析，因为这样可能导致研究结果发生偏离。

生物分析报告中应报告重分析样品，并提供初始值、重分析的原因、重分析的结果、最终接受的值以及接受的理由。此外，报告中应提供由于各种原因而重分析的样品汇总表。如果在第一次分析时，产生了不可报告结果，那么单样品重分析是足够的（例如，浓度高于 ULOQ 或复孔间的差异过大）。样品的重分析的复孔数应与最初分析时的孔数一致。在某些需要确认检测结果的情况下（例如，给药前样品检测到可测量浓度），在样品体积允许时需要多样品测定。

临床试验受试者的安全应优先于试验的任何方面。因此，当出现需要进一步调查研究特殊情况时，可能需要重新分析试验样品。

5. 已测样品再分析（ISR）

试验样品可能与方法学验证过程中使用的校正标样和质控样品（通过加入空白基质制备）不同。蛋白结合的差异、已知和未知代谢物的反向转化、样品均一性、合并用药或试验样品含有的独特生物成分，均可能影响试验样品分析过程中待测物的准确度和精密度。

因此，ISR 是生物分析方法学验证的必要组成部分。它旨在确认样品待测物浓度结果的可靠性，并可通过随行质控样品的准确度和精密度来说明。

至少在下列情形下应该进行试验样品的再分析（ISR）：

- 对于临床前研究，一般而言，每一物种的主要非临床 TK 研究均需进行 ISR。而在 PK 研究中而非 TK 研究中进行 ISR 也是可接受的，只要相应的研究为关键研究，并将用于监

管决策；

- 所有关键性的比较 BA/BE 研究；
- 首次用于人体的临床试验；
- 用于患者的关键性早期临床试验（每个患者群体进行一次）；
- 首次或关键性的用于肝和/或肾功能不全患者的临床试验。

通过使用相同的生物分析方法在不同日期且独立的分析批（即与初测批次不同），重复分析给定研究中的一组样品来考察 ISR。

应基于对分析方法和待测物的深入了解，来选择 ISR 进行的范围。但是，如果试验样品总数少于 1000 个，那么至少应对 10% 的样品进行再分析；如果样品总数大于 1000，则 ISR 应评估前 1000 个样品中的 10%（100）加上超过 1000 个样品的样品数量的 5%。ISR 试验样品选择的客观标准应该在方案、研究计划或 SOP 中提前规定。虽然应该从给药研究人群中尽可能随机地选择受试者，但是应充分覆盖整个 PK 曲线，这是非常重要的。因此，建议在最大浓度（C_{max}）附近和消除相选择部分样品用于 ISR。此外，所选的样品应能代表整个研究。

样品不应合并，因为合并可能会限制异常结果的发现。ISR 样品和质控样品应采用与初次分析相同的方式制备。ISR 应在待测物的稳定期内进行，但不能与初次分析在同一天进行。

原始测得的浓度与再分析测得的浓度差值与两者平均值的百分比应使用下列公式计算：

$$\% \text{ 差值} = (\text{再测试值} - \text{原始测得值}) / \text{平均值} \times 100$$

对于色谱方法，至少 2/3 的百分比差值应该 $\leq 20\%$ 。对于配体结合方法，至少 2/3 的百分比差值应该 $\leq 30\%$ 。

如果 ISR 总体结果不符合接受标准，则应进行调查并纠正原因。应该有一个 SOP 指导如何启动并进行调查。如果经调查未能确定失败的原因，则生物分析报告中也应提供 ISR 失败对研究有效性的潜在影响。

如果 ISR 符合接受标准，但在多个样品的结果之间显示出较大或系统差异，这可能表明存在分析问题，建议进行进一步的调查。

值得关注的趋势包括：

- 同一受试者的所有样品均失败；
- 同一分析批的所有样品均失败；

ISR 评估的所有情况都应记录，以便改进和进行调查。与原始值有很大差异的个别样品（例如， $> 50\%$ ，“异常值”）不应进行重新分析，也不需要进行调查。ISR 样品的数据不应取代原始试验样品的数据。

6. 部分验证和交叉验证

6.1 部分验证

部分验证评估是对已经完整验证的生物分析方法的修改。部分验证的范围可以从简单的一个批次内准确度和精密度验证到几乎进行完整验证。如果在一台设备条件下进行了稳定性考察，则不一定需要在另一台设备条件下重复考察。

对于色谱方法，属于此类别的典型生物分析方法修改或变更包括但不限于以下情况：

- 分析地点改变，但使用相同的方法（例如实验室之间的生物分析方法转移）；

- 分析方法的改变（例如，检测系统、平台的改变）；
- 样品处理过程发生改变；
- 样品体积的改变（例如，儿科样品体积较少）；
- 校准浓度范围的变化；
- 生物样品中抗凝剂的变化（例如，肝素变为乙二胺四乙酸 EDTA，但不包括平衡离子的变化）；
- 同一物种的一种基质变为另一种基质（例如，从人血浆变为血清或脑脊液）或物种不同，但基质相同（例如，从大鼠血浆变为小鼠血浆）；
- 储存条件的变化。

对于配体结合分析，属于此类别的典型生物分析方法修改或变更包括但不限于以下情况：

- 配体结合分析关键试剂的变化（例如，批次间变化）；
- 最低要求稀释度（MRD）的变化；
- 储存条件的变化；
- 校准浓度范围的变化；
- 分析方法的变化（例如检测系统、平台的变化）。
- 分析地点改变，但使用相同的方法（例如实验室之间的生物分析方法转移）；
- 样品制备的变化；

如果检测的参数符合完整验证的接受标准，则可接受部分验证。如果这些标准不满足，

则需要进行额外的调查和验证。

6.2 交叉验证

在以下情况下需要进行交叉验证来比较数据：

- 在一项研究中，数据从不同的完整验证的方法中获得；
- 在多项研究中，数据从不同的完整验证的方法中获得，这些数据将被合并或进行比较以支持特殊给药方案，或有关安全性、有效性及标签的监管决策；
- 在一项研究中，数据从不同的实验室采用相同生物分析方法获得。

通常不需要交叉验证对采用相同的已完整验证的方法获得的不同实验室多项研究的数据进行比较。

如果可能，应在分析试验样品之前进行交叉验证。

交叉验证应通过两种检测或在两个实验室对同一套质控样品（低、中、高三个浓度）平行三次以及涵盖样品浓度范围的试验样品（如果可能， $n \geq 30$ ）进行评估。

可以通过 Bland-Altman 图或 Deming 回归评估偏差。也可以使用适合于评估两种分析之间一致性的其他方法（例如，一致性相关系数）。或者可以通过对每种方法分析测得的样品结果绘制血浆浓度-时间曲线，以评估偏差。如果在方法之间观察到不成比例的偏差，则应评估对临床数据的影响。

强烈反对使用多种生物分析方法开展一项比较 BA/BE 研究。

7. 其他考虑事项

7.1 待测物为内源性物质

对于同时也为内源性物质的待测物，如果分析方法不能区分药物部分和相应内源性部分，则会影响待测物测定的准确度。

内源性物质含量可能受年龄、性别、昼夜变化、疾病或药物副作用的影响。应尽可能使用具有足够信噪比（即，对于所需的 LLOQ 而言，内源性物质含量足够低，例如小于 LLOQ 的 20%）的空白基质制备校正标样和质控样品，因为用于制备校正标样和质控样品的生物基质应与试验样品相同（即实际生物基质），且无基质效应以及在引起干扰的水平上不含内源性待测物。

若无法获得无干扰的真实生物基质，有 4 种方法计算校正标样、质控样品以及后续试验样品中内源性待测物的浓度：i) 标准加入法，ii) 背景扣除法，iii) 替代基质（简化基质、人造基质或经净化的基质）法和 iv) 替代待测物法。

1) 标准加入法：

将试验样品等分。所有等分试样（除了 1 个），分别加入不同已知量的待测物标准品，建立每个试验样品的校准曲线。用此特定试验样品制备的校准曲线的 X 轴的负载距则为试验样品浓度

2) 背景扣除法：

从添加标准品的浓度中减去待测物在合并/代表性基质中的内源性背景浓度，随后使用减后的浓度建立校准曲线。

3) 替代基质法：

采用替代基质代替试验样品基质。替代基质的复杂程度差别很大，可能为简单的缓冲液或者为模拟真实基质的人造基质、甚至为经净化的基质。

4) 替代待测物法：

使用同位素标记的待测物作为替代标准品，建立校准曲线来测定内源性待测物。使用该方法的前提是假设待测物除分子量之外，目标待测物和替代待测物的物理化学性质相

同。但是，同位素标准品的保留时间和质谱灵敏度可能与待测物不同。因此，采用该方法前，标记与非标记待测物质谱响应（即，响应因子）的比值在整个校正范围内应该接近并且一致。如果响应因子不符合相应要求，则应整合到校准曲线回归方程中。

待测物同时也为内源性物质的分析方法的验证应考虑以下几点。

7.1.1 质控样品

生物基质中待测物的内源性浓度应在质控样品制备前（如，通过重复分析）进行评估。应使用内源性待测物含量最低的基质做为空白基质。质控样品的浓度应考虑生物基质中的内源性物质浓度（即添加物），并代表预期的试验浓度。

用于验证的质控样品应是在实际生物基质中不加和添加已知量目标待测物的的等分试样。在添加目标待测物的标样品中，加入量与内源性含量应具有统计学差异。

7.1.2 校准曲线

在替代基质和替代待测物法中，这些替代物仅能用于制备校正标样。

在标准加入和背景扣除法中，使用与试验样品相同的生物基质和待测物制备校正标样。然而，在加入标准品前，通过稀释空白基质而降低背景浓度（如，背景扣除法中需要更低的 LLOQ），将使试验样品和校正标样中基质组成不一致，从而导致回收率和基质效应不同。

7.1.3 选择性、回收率和基质效应

由于不存在无干扰的空白基质，因此评估选择性变得很复杂。色谱法中，峰纯度应作为方法学验证的一部分，采用具有区分力的检测系统[例如，串联质谱（MS / MS）]对几个供体的基质进行分析，也可考虑使用具有科学根据的其他方法。

对于标准加入和背景扣除法，由于试验样品和校正标样使用相同的生物基质和待测物，

二者具有相同的回收率和基质效应。对于替代基质和替代待测物法，试验样品和校正标样的回收率和基质效应可能不相同。

- 如果采用替代基质法，需证明替代基质和原始基质具有相似的基质效应和提取回收率。采用添加待测物的质控样品进行考察，以替代基质校准曲线计算质控样品浓度。对于色谱法，其理论浓度和回算浓度的差异应在±15%以内，LBA法应在±20%以内。
- 若采用替代待测物法，需证明替代物和内源性目标待测物间具有相似的基质效应和回收率。色谱法应在±15%以内，LBA法应在±20%以内。

由于生物基质的成分可能影响方法学的性能，因此，有必要考察不同供体的基质，标准加入法除外，因为该方法的每个样品使用其各自的校准曲线进行分析。

7.1.4 平行性

在替代基质和替代待测物法中，应采用标准加入法、加标回收率或稀释线性评估平行性。

7.1.5 准确度和精密度

若采用替代基质或替代待测物法，准确度和精密度考察中应使用替代校准曲线分析质控样品。有时需使用替代基质稀释质控样品。应使用来自不同供体的实际生物基质重复这些试验以考察基质的变异性。分析未加标的质控样品将得到平均内源性背景浓度，对于这些质控样品仅能确定精密度而无法确定准确度。

空白样品中内源性物质的浓度可通过从加标样品中观测的总浓度中测定并减去。建议使用如下公式计算准确度：

$$\text{准确度(\%)} = 100 \times \frac{(\text{加标样品中测得浓度} - \text{内源性浓度})}{\text{标示浓度}}$$

7.1.6 稳定性

为了尽可能地模拟试验样品，稳定性试验应使用不添加和添加目标待测物的实际生物基质考察稳定性。但是，若校准曲线使用替代基质，那么替代基质中待测物的稳定性也应被证明，因为这可能与实际生物基质的稳定性不同。

7.2 平行性

平行性是指校准曲线和系列稀释试验样品间的平行关系，用来确定稀释对待测物测定的影响。虽然 PK 分析检测中很少缺乏平行性，但 LBA 法的平行性应根据具体情况进行评估，例如，在试验样品分析中怀疑由基质中成分引起的干扰（如内源性结合蛋白的存在）。生物样品分析报告应包括平行性考察的结果或不考察的理由。由于试验样品很难获得，在方法学开发和验证阶段很少评估平行性，且平行性主要与试验样品相关（即，一个分析方法可能对特定人群的样品具有平行性，而对另一人群的样品可能缺乏这种平行性），所以应在试验样品检测期间考察平行性。应使用空白基质对高浓度的试验样品（最好接近 C_{\max} ）稀释至少 3 个系列浓度。每个稀释系列样品间的精密度不应超过 30%。然而，若采用不超过 30% 的接受标准时，应需仔细分析数据，因为结果符合标准仍可能具有非平行性的趋势。在样品非线性稀释的情况下（即，以非平行方式），应提前定义报告结果的规程。

7.3 回收率

若采用提取方法处理样品，应评估回收率（提取效率）。回收率报告为经过样品提取和处理步骤的待测物已知量的百分比。回收率通过比较处理过的加标样品中待测物响应和处理过的空白基质中加入待测物的响应值来确定。待测物的回收率不需要为 100%，但待测物和内标（如果使用）的回收率应一致。建议在多个浓度下比较提取样品的分析结果以进行

回收率考察，通常设置三个浓度（低、中、高）。

7.4 最低稀释度

最低稀释度是用缓冲液对样品稀释的稀释因子，以减少使用 LBA 法分析时的背景信号或基质干扰。包括校正标样和质控样品在内的所有样品，最低稀释度应相同，且应在方法开发过程中测定。如果在方法建立后改变最低稀释度，则需进行部分验证。应在分析方法验证报告中定义最低稀释度。

7.5 商品化和诊断试剂盒

商品化或诊断试剂盒（以下称试剂盒）有时与新药或治疗性生物制品共同研发，用于患者的即时诊断。本节中的建议不适用于即时诊断试剂盒研发（如配套或附赠诊断试剂盒）。关于即时诊断试剂盒研发的监管要求，请参考相关指导原则。

新药研发过程中，如果申请人改变试剂盒用途（而非开发新的检测方法）或采用“仅用于研究”的试剂盒测定化学或生物药物浓度，则应验证以确保试剂盒符合本指南中描述的药物研发标准。

试剂盒检测验证的注意事项包括但不限于以下内容：

- 若试剂盒中的对照品与受试者样品的不同，应进行试验评估试剂盒试剂检测性能的差异。应在试验样品检测机构实际条件下进行特异性、准确度、精密度和稳定性考察。若修改试剂盒操作说明则应进行完整验证。
- 使用稀疏校正标样（例如：一点或两点校准曲线）的试剂盒应包括内控验证试验，以建立在校正范围内具有足够数量标样的校准曲线。
- 实际质控样品浓度应已知。以范围表示的质控样品浓度不足以用于定量。在这种情况下，应制备和使用已知浓度的质控样品，而非仅使用试剂盒提供的质控样品。

- 应使用与试验样品相同的基质制备校正标样和质控样品。使用与试验样品不同的基质制备校正标样和质控样品的试剂盒应予以说明，且应进行适当试验。
- 如果在一项研究中使用了多个批次的试剂盒，则应考虑不同批次间试剂盒任何关键试剂的变异性和可比性。
- 如果应用需使用多个分析板的试剂盒时，应在每个分析板上制备足够的质控样品，以确保检测的准确度。应建立针对各个分析板和整个分析批的接受标准。

7.6 新技术或替代技术

若从药物研发开始一种新的或替代分析技术被作为唯一的生物分析技术使用时，不需要与现有技术进行交叉验证。

使用两种不同的生物分析技术开发同一药物可能使产生的数据难以说明。当一个平台测定的浓度与另一个平台不同时，可能会出现这种情况。因此，当一个新的或替代的分析平台正在取代以前用于药物研发的平台时，需充分了解潜在的差异。之前平台/技术生成的数据应与新的或替代平台/技术获得的数据进行交叉验证。鼓励在药物研发早期就寻求监管机构的反馈意见。不建议在比较 BA/BE 研究中使用两种方法或技术。

在规范的生物分析中新技术的使用应以接受标准为依据，这些接受标准是基于方法开发预先建立并在方法验证中被验证的。

7.6.1 干基质方法

干基质方法（DMM）是一种采样方法，它具有减少药物分析微量采样技术中全血采样体积、便于收集、储存和运输等优势。在支持注册申请的研究中使用干基质法前，除了进行 LC/MS 或 LBA 的典型方法学验证之外，对这一采样方法还需进一步验证，例如：

- 血细胞比容（特别是将全血滴入卡片）

- 样品均匀性（特别是对于采集卡/设备上的样品打孔取样）

- 样品复原

- 用于 ISR 的 DMM 样品采集
 - 应注意确保为 ISR 保留足够的可再测定样品体积或样品数量。

 - 应该以多次打孔对样品进行评估，或者采取一式两份的样品。

在临床或非临床研究中，除了采用典型的液体方法（例如液体血浆样品）之外还使用 DMM 时，应进行两种方法的交叉验证（参见第 6.2 节）。有关非临床毒代动力学研究，请参阅 ICH S3A Q&A 第 4.1 节。鼓励早期药物研发阶段从监管机构获得适当的反馈。

8. 文档

通用和具体 SOP 以及保持良好的记录对于分析方法的正确验证是不可或缺的。应对生物分析方法验证中获得的数据进行记录，并可用于数据稽查和检查。表 1 列出了提交给监管机构的推荐文档以及检查时在分析现场可供查阅的文档。该文档可以保存在分析现场或其他可靠的地方，随时可供查阅。

重新开展研究的所有必要的相关文档应保存在安全的环境中。相关文档包括但不限于源数据、方案和报告、支持试验过程、操作和环境问题的记录以及所有相关各方之间的通信记录。

无论何种文档形式（即纸质或电子形式），均应在事件发生时记录，随后的更改不应掩盖原始数据。应详细记录更改或重新处理数据的原因，并保留原始记录。如适用，应保留生物危险区域分析数据的誊录副本或拷贝。

8.1 摘要信息

摘要信息应包括 eCTD 第 2.6.4/2.7.1 节或报告中的以下内容：

- 应包括每项研究使用的分析方法概要。应提供方案号、检测类型、分析方法识别代码、生物分析报告代码、方法生效日期及相关的验证报告代码。
- 应提供每种待测物所有相关的方法验证报告的汇总表，包括部分验证和交叉验证报告。该表应包括分析方法识别代码、分析类型、采用新分析方法或增加额外验证项目的原因（例如为了降低定量下限）。对方法所做的更改应明确标识。
- 当分析方法在不同文件（分析方法、验证报告和生物样品分析报告）中有不同的代码时，应该提供多个识别代码交叉参考的汇总表。
- 方案中方法变更的讨论（即，方法演变、修订原因、独特方面）。
- 比较 BA /BE 研究中，监管机构对分析检测机构现场核查的清单包括日期和检查结果（如适用）。

8.2 方法验证和生物分析报告文档

方法验证和生物样品分析报告中建议包括的文档，请参阅表 1。

附件

表 1: 文档和报告

项目	分析现场文档	验证报告*	生物样品分析报告*
色谱系统适用性	<ul style="list-style-type: none"> 用于适用性测试的日期、时间、所用样品 	<ul style="list-style-type: none"> 不适用 	<ul style="list-style-type: none"> 不适用
方法修订概述	<ul style="list-style-type: none"> 历史/修订(例如: 修订原因、支持性数据特有方面, 如适用) 	<ul style="list-style-type: none"> 不适用 	<ul style="list-style-type: none"> 不适用
对照品	<ul style="list-style-type: none"> 分析证书 (CoA) 或确保质量的同等证明性文件 (包括纯度)、稳定性/有效期/重测日期、批号和生产商或来源 接收、使用和储存条件的日志记录 如果过期, 重新认证的 CoA, 或附有重测日期的测定和鉴别结果 	<ul style="list-style-type: none"> 分析证书 (CoA) 副本或同等证明性文件包括批号、数量、来源、质量 (包括纯度)、储存条件和有效期/重测日期或包括此信息的表格 如果过期, 使用时对照品的质量和稳定性以及重测日期和重测结果。 	<ul style="list-style-type: none"> 分析证书 (CoA) 副本或同等证明性文件, 包括批号、数量、来源、质量 (包括纯度)、储存条件和有效期/重测日期或包括上述信息的表格 如果过期, 使用时对照品的质量和稳定性以及重测日期和重测结果
内标	<ul style="list-style-type: none"> 内标质量或适用性证明 接收、使用和储存条件的日志记录 	<ul style="list-style-type: none"> 试剂或对照品名称 来源 	<ul style="list-style-type: none"> 试剂或对照品名称 来源
关键试剂	<ul style="list-style-type: none"> 试剂名称 批号 来源 浓度 (如适用) 重测日期 (有效期) 储存条件 	<ul style="list-style-type: none"> 试剂名称 批号 来源 重测日期 (有效期) 储存条件 	<ul style="list-style-type: none"> 试剂名称 批号 来源 重测日期 (有效期) 储存条件
储备液	<ul style="list-style-type: none"> 储备液配制和使用记录 储存地点和条件 	<ul style="list-style-type: none"> 储备液在稳定期内使用标识 储备液稳定性 储存条件 	<ul style="list-style-type: none"> 储备液在稳定期内使用标识 储备液稳定性[†] 储存条件[†]
空白基质	<ul style="list-style-type: none"> 基质描述、批号、接收日期、储存条件和来源/供应商的相关记录 	<ul style="list-style-type: none"> 描述、批号、接收日期 	<ul style="list-style-type: none"> 描述、批号、接收日期^{††}

续

续表: 文档和报告

项目	分析现场资料	验证报告*	生物样品分析报告*
校正标样和质控样品	<ul style="list-style-type: none"> 制备记录和制备日期 储存记录 (例如: 存入/取出日期、分析人、温度和冰箱) 	<ul style="list-style-type: none"> 制备描述, 包括所用基质 批号、制备日期和稳定性时间 储存条件 (温度、日期、时长等) 	<ul style="list-style-type: none"> 制备描述[†] 制备日期和稳定性时间 储存条件[†]
SOPs	分析相关 SOPs, 例如: <ul style="list-style-type: none"> 方法/过程 (验证/分析) 接受标准 (例如: 分析批、校准曲线、质控) 仪器 复测 ISR SOP 修改记录 (变更内容、日期、原因等) 	<ul style="list-style-type: none"> 测定过程的详细描述 	<ul style="list-style-type: none"> 分析过程相关 SOP / 分析方案的清单
样品追踪	<ul style="list-style-type: none"> 试验样品接收及接收条件 样品运输和接收记录。样品库存清单和缺失原因。 存储位置 (例如: 在冰箱中的存储位置) 质控、校正标样和试验样品的追踪日志 质控、校正标样和试验样品冰箱的进出日志 	不适用	<ul style="list-style-type: none"> 收货日期、样品数量及比较 BA /BE 研究中受试者 ID。 样品接收时的条件 分析现场的储存条件和位置 储存: 从样品收集到分析的整个时长 计划储存条件的任何偏离清单及其潜在影响

续

续表: 资料和报告

项目	分析现场资料	方法学验证报告*	生物样品分析报告*
分析	<ul style="list-style-type: none"> 色谱系统适用性检查的文档和数据 仪器使用日志, 包括每 	<ul style="list-style-type: none"> 所有分析批 (包括失败批) 和分析日期总结表 BA/BE 研究中每一批 	<ul style="list-style-type: none"> 所有分析批、状态 (接受和失败)、失败原因和分析日期总结表。

	批的分析日期 <ul style="list-style-type: none"> • 样品提取日志，包括每批校正标样、质控以及试验样品的处理文档，包括处理日期 • 每一分析批中质控的标识、校正标样的批次和试验样品 • 仪器设定和维护文档 • 实验室信息管理系统 (LIMS) • 验证信息，文档和数据包括以下内容： <ul style="list-style-type: none"> ○ 选择性、(基质效应)、专属性(干扰)、灵敏度、精密度和准确度、残留、稀释、回收率、基质效应 ○ 室温、冻融、长期、处理和储备液稳定性 ○ 交叉/部分验证(如适用) 	次使用的仪器 ID† <ul style="list-style-type: none"> • 所有精密度和准确度可接受批次校正标样浓度及响应函数结果(校准曲线参数)汇总表 • 批内、批间准确度和精密结果汇总表。不符合要求的结果应明确标出 • LBA 方法的总体误差 • 有关选择性(基质效应)、专属性(干扰)、稀释线和灵敏度(LLOQ)、残留、回收率的数据。室温、冻融、长期、处理、储备液稳定性 • 部分/交叉验证(如适用) • 附加额外的验证报告(如有) 	<ul style="list-style-type: none"> • BA/BE 研究中每一批次使用的仪器 ID† • 所有精密度和准确度可接受批校正标样浓度及响应函数结果(校准曲线参数)汇总表 • 所有可接受批次的质控测定结果及其批间准确度和精密度总结表 • 分析批重新进样情况总结表:重新进样批次的分析结果、重新进样原因 • 建议提供质控样品趋势分析图表 • 试验样品浓度测定结果表 • 对于比较 BA /BE 研究,包括失败批在内的每一分析批内标响应图
--	--	---	--

续

续表：文档和报告

项目	分析现场文件	验证报告*	生物分析报告*
色谱图和重积分	<ul style="list-style-type: none"> • 电子稽查轨迹: • 接受和失败批的原始和重新积分的 100% 电子色谱图 • 重积分的原因 • 所有批次(包括接受批和失败批)重积分模式汇总表,包括校准曲线、回归系数、加权函数、待测物和内标响应、保留时间、响应比值、积分类型 	<ul style="list-style-type: none"> • 代表性色谱图(原始和重积分) • 重积分的原因 • 比较 BA /BE 研究,接受和失败批次原始和重积分 100% 色谱图 • 色谱图可补充提交 • 比较 BA /BE 研究,接受和失败批次汇总表,包括校准曲线、回归系数、加权函数、待测物和内标响应、保留时间、稀释因子(如适用) 	<ul style="list-style-type: none"> • 比较 BA /BE 研究, 100% 色谱图 • 色谱图可补充提交 • 比较 BA /BE 研究, 原始和重积分的色谱图以及初始和重积分结果 • 对于其他研究,从申请资料中随机选择 5% 受试者的色谱图 • 重积分的原因 • 手动重积分色谱图鉴别及讨论 • 需要时,重积分的 SOP • 比较 BA /BE 研究,接受和失败批次汇总表,包括校准曲线、回归系数、加权函数、待测物和内标响应、保留时间、稀释因子(如适用)
过程偏离	<ul style="list-style-type: none"> • 偏离/意外事件的实时记录 • 意外事件的调查 • 影响评估 	<ul style="list-style-type: none"> • 偏离描述 • 对研究结果的影响 • 重要调查的描述及支持性数据 	<ul style="list-style-type: none"> • 偏离描述 • 对研究结果的影响 • 重要调查的描述及支持性数据
复测	<ul style="list-style-type: none"> • 开展重分析/复测 SOP(明确重分析原因等)。 • 保留 100% 复测/重分析数据 • 复测原因的实时记录 	<ul style="list-style-type: none"> • 不适用 	<ul style="list-style-type: none"> • 总结表:样品 ID、复测原因、原始值和复测值、报告值的选取依据、分析批 ID • 复测的 SOP(如需要)

续

续表：文档和报告

项目	分析现场资料	验证报告*	生物样品分析报告*
ISR	<ul style="list-style-type: none"> • ISR SOP • ISR 数据:分析批 ID、分析批汇总表、色谱图或其他电子仪器数据文件 • ISR 失败调查记录(如有) 	<ul style="list-style-type: none"> • 不适用 	<ul style="list-style-type: none"> • ISR 数据表格(原始和再分析结果和分析批 ID、百分差异、通过百分比) • ISR 失败调查††(如有) • ISR SOP††(如需要)
交流	<ul style="list-style-type: none"> • 与研究/检测有关的参与方[申请人、合同研究组织(CRO)和顾问]之间的交流情 	<ul style="list-style-type: none"> • 不适用 	<ul style="list-style-type: none"> • 不适用

	况		
审计和检查	• 审计和检查报告	• 不适用	• 不适用

*申请人应在分析现场保存数据，以支持在方法验证和生物样品分析报告中提交的汇总数据。

申请时应提交方法学验证报告和生物分析样品报告。

†可以从验证报告中附加或链接。

‡在验证报告或生物样品分析报告中提交均可。

9. 术语

准确度：

在规定条件下（或采用特定方法）的测得值与标示值或已知真实值的接近程度。本指导原则中准确度以标示值的相对误差百分比表示。

$$\text{准确度}(\%) = (\text{测得值} - \text{标示值} / \text{标示值}) \times 100\%$$

分析：

从样品处理/稀释到在分析仪器测定的一系列分析过程。

待测物：

待测定的特定化学成分，包括生物基质中的原形药物、生物分子或其衍生物、或代谢物

分析过程：

分析过程指分析方法的实施，应详细描述执行每项分析所需的步骤。

分析批（也称为“批”）：

一组完整的试验样品，包括一定数量的校正标样和质控样品。多个分析批可在一天完成，或一个分析批也可在几天内完成。

锚定校正标样/锚定点：

配制浓度低于校准曲线 LLOQ 或高于校准曲线 ULOQ 的样品，并与校准曲线样品同时分析，以优化配体结合分析中的曲线拟合。

处理批（用于生物分析）：

一个处理批包括质控样品和试验样品，其在固定的时间段内处理，并且由同一组分析员在相同条件下使用相同的试剂处理。

批（对照标准品和试剂）：

在一个过程或一系列过程产生的一定数量的样品,以预期这些样品在规定限度内是均匀的。也称为“Lot”。

生物药:

采用生物技术(如治疗性蛋白质)生产的药品。也指大分子药物。

生物基质:

生物基质例如包括但不限于全血、血清、血浆和尿液。

结合试剂:

在基于配体结合的生物分析方法中直接与待测物结合的试剂。

空白样品:

未添加待测物和内标的生物基质样品。

校准曲线:

在给定范围内仪器响应(例如峰面积、峰高或信号)与样品中待测物浓度(量)之间的关系。也称为标准曲线。

校正范围:

分析过程的校正范围是样品中待测物的上限和下限浓度(含量)之间的间隔(包括这些浓度),已经被证明,在校正范围内分析过程的精密度、准确度和响应函数符合要求。

校正标样:

加入或加标已知量待测物的基质。校正标样用于建立校准曲线。

残留:

在一个样品中出现前一个样品的待测物信号。

化学药物:

化学合成药物。也指小分子药物。

关键试剂：

配体结合法的关键试剂包括结合试剂（例如抗体、结合蛋白、肽类）和含有酶成分并对测定结果有直接影响的试剂。

交叉验证：

比较两种分析方法或不同实验室的同一分析方法以证明所报告的数据具有可比性。

稀释完整性：

评估样品稀释过程以确定稀释不会影响待测物的测定浓度。

稀释线性：

配体结合法中表明可准确测定超过校准曲线 ULOQ 浓度样品的参数，同时无钩状效应或前带效应影响，且在校正范围内的测定浓度不受稀释影响。

完整验证：

建立所有方法学验证参数，确保应用到样品分析时方法的完整性。

钩状效应：

某一待测物由于浓度过高而抑制响应。在配体结合法中，液相反应步骤中结合试剂与待测物温育，可能产生钩状效应。也称为前带。

试验样品：

从受试者或动物获得的样品。

试验样品再分析（ISR）：

不同天后在另一个独立分析批中对部分试验样品重新分析，以确定原始结果是否可重现。

干扰物质：

基质中存在的可能影响待测物检测的物质。

内标 (IS)：

结构类似物或稳定同位素标记化合物，以已知并固定浓度加入到校正标样、质控样品和试验样品用于目标待测物定量。

配体结合试验 (LBA)：

使用能特异性结合待测物的试剂来分析目标待测物的一种方法。使用如酶、放射性同位素、荧光团或发色团标记的试剂检测待测物。采用微量滴定板、试管、皿等进行反应。

定量下限 (LLOQ)：

能定量测定且符合预定的精密度和准确度要求的待测物的最低量。

基质效应：

由于样品中存在非目标待测物或其他干扰物质，导致响应直接或间接改变或干扰。

方法：

样品分析中所有过程的全面描述。

最低稀释度 (MRD)：

配体结合法中，用缓冲溶液稀释生物样品的初始稀释因子。MRD 不一定是最终的稀释度，但对于所有样品包括校正标样和质控样品，MRD 应一致。然而，样品可能需要进一步稀释。

标示浓度：

理论或预期浓度。

平行性：

平行性指系列稀释的实际样品响应曲线与校准曲线平行。平行性是能检测潜在的基质效应的性能特征。

部分验证：

对已完整验证的分析方法变更的评估。

精密度：

一系列测量值的一致程度（即离散程度）。精密度用变异系数（CV）或相对标准偏差（RSD）表示。

精密度（%）=（标准差/平均值）×100

处理后样品：

经过各种操作（例如，提取、稀释、浓缩）得到的终样品。

质量控制样品（QC）：

加入已知量待测物的样品，用于监测生物分析方法的性能，并评估单个处理批或分析批中未知样品结果的完整性和有效性。

回收率：分析过程的提取效率，报告为样品提取和处理过程中获得待测物已知量的百分比。

重现性：

重复测定结果的一致程度。

响应函数：

充分描述仪器响应（例如，峰面积比或峰高比或信号）与样品中待测物浓度（含量）之间关系的函数。响应函数在给定范围内定义。另请参阅校准曲线。

选择性：

分析方法在生物基质中存在干扰物质（非特异性干扰）的情况下区分和测定待测物的能力。

灵敏度：

符合准确度和精密度要求可测定的待测物的最低浓度（即 LLOQ）。

特异性：

分析方法检测和区分待测物与其他物质的能力，包括有关物质（例如待测物结构类似物、代谢物、异构体、杂质或合并用药等）。

稳定性：

在特定条件下和给定时间间隔内，待测物在特定基质中的化学稳定性。

标准曲线：

在给定范围内样品的仪器响应（如，峰面积、峰高或信号）与待测物浓度（含量）之间的关系。也称为校准曲线。

标准操作规程（SOP）：

详细的书面说明以实现特定功能的一致性。

替代基质：

难获得（例如组织、脑脊液、胆汁）或具有内源性干扰物质基质的替代基质。

系统适用性：

分析批之前，通过分析一系列对照标准品来确定仪器性能（如，灵敏度和色谱保留时间）。

总误差：

准确度（%）和精密度（%）误差的绝对值之和。总误差以误差百分比（%）表示。

定量上限 (ULOQ):

分析方法中待测物的定量上限,是指样品中能够定量测定且符合预先定义的精密度和准确度要求的待测物的最高量。

验证:

证明分析方法适用于其预期目的。

工作溶液:

采用适当溶剂稀释储备液制备的非基质溶液。主要用于添加到基质中以制备校正标样和质控样品。

零浓度样品:

加入内标的空白样品。