

9012 生物样品定量分析方法验证 指导原则

一、范围

准确测定生物基质(如全血、血清、血浆、尿)中的药物浓度,对于药物和制剂研发非常重要。这些数据可被用于支持药品的安全性和有效性,或根据毒理学、药理学和生物等效性试验的结果做出关键性决定。因此,必须完整地验证和记录应用的生物分析方法,以获得可靠的结果。

本指导原则提供生物分析方法验证的要求,也涉及非临床或临床试验样品实际分析的基本要求,以及何时可以使用部分验证或交叉验证,来替代完整验证。本指导原则二和三主要针对色谱分析方法,四针对配体结合分析方法。

生物样品定量分析方法验证和试验样品分析应符合本指导原则的技术要求。应该在相应的生物样品分析中遵守 GLP 原则或 GCP 原则。

二、生物分析方法验证

(一)分析方法的完整验证

分析方法验证的主要目的是,证明特定方法对于测定在某种生物基质中分析物浓度的可靠性。此外,方法验证应采用与试验样品相同的抗凝剂。一般应对每个新分析方法和新分析物进行完整验证。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。

一个生物分析方法的主要特征包括:选择性、定量下限、响应函数和校正范围(标准曲线性能)、准确度、精密度、基质效应、分析物在生物基质以及溶液中储存和处理全过程中的稳定性。

有时可能需要测定多个分析物。这可能涉及两种不同的药物,也可能涉及一个母体药物及其代谢物,或一个药物的对映体或异构体。在这些情况下,验证和分析的原则适用于所有涉及的分析物。

对照标准物质

在方法验证中,含有分析物对照标准物质的溶液将被加入到空白生物基质中。此外,色谱方法通常使用适当的内标。

应该从可追溯的来源获得对照标准物质。应该科学论证对照标准物质的适用性。分析证书应该确认对照标准物质的纯度,并提供储存条件、失效日期和批号。对于内标,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。它们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。

1. 选择性

该分析方法应该能够区分目标分析物和内标与基质的内源性组分或样品中其他组分。应该使用至少 6 个受试者的适宜的空白基质来证明选择性(动物空白基质可以不同批次混

合),它们被分别分析并评价干扰。当干扰组分的响应低于分析物定量下限响应的 20%,并低于内标响应的 5%时,通常即可以接受。

应该考察药物代谢物、经样品预处理生成的分解产物以及可能的同服药物引起干扰的程度。在适当情况下,也应该评价代谢物在分析过程中回复转化为母体分析物的可能性。

2. 残留

应该在方法建立中考察残留并使之最小。残留可能不影响准确度和精密度。应通过在注射高浓度样品或校正标样后,注射空白样品来估计残留。高浓度样品之后在空白样品中的残留应不超过定量下限的 20%,并且不超过内标的 5%。如果残留不可避免,应考虑特殊措施,在方法验证时检验并在试验样品分析时应用这些措施,以确保不影响准确度和精密度。这可能包括在高浓度样品后注射空白样品,然后分析下一个试验样品。

3. 定量下限

定量下限是能够被可靠定量的样品中分析物的最低浓度,具有可接受的准确度和精密度。定量下限是标准曲线的最低点,应适用于预期的浓度和试验目的。

4. 标准曲线

应该在指定的浓度范围内评价仪器对分析物的响应,获得标准曲线。通过加入已知浓度的分析物(和内标)到空白基质中,制备各浓度的校正标样,其基质应该与目标试验样品基质相同。方法验证中研究的每种分析物和每一分析批,都应该有一条标准曲线。

在进行分析方法验证之前,最好应该了解预期的浓度范围。标准曲线范围应该尽量覆盖预期浓度范围,由定量下限和定量上限(校正标样的最高浓度)来决定。该范围应该足够描述分析物的药理学。

应该使用至少 6 个校正浓度水平,不包括空白样品(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)。每个校正标样可以被多次处理和分析。

应该使用简单且足够描述仪器对分析物浓度响应的关系式。空白和零浓度样品结果不应参与计算标准曲线参数。

应该提交标准曲线参数,测定校正标样后回算得出的浓度应一并提交。在方法验证中,至少应该评价 3 条标准曲线。

校正标样回算的浓度一般应该在标示值的 $\pm 15\%$ 以内,定量下限处应该在 $\pm 20\%$ 内。至少 75%校正标样,含最少 6 个有效浓度,应满足上述标准。如果某个校正标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评价,包括回归分析。

最好使用新鲜配制的样品建立标准曲线,但如果具有稳定性数据支持,也可以使用预先配制并储存的校正标样。

5. 准确度

分析方法的准确度描述该方法测得值与分析物标示浓度的接近程度,表示为:(测得值/真实值) $\times 100\%$ 。应采用加入已知

量分析物的样品来评估准确度, 即质控样品。质控样品的配制应与校正标样分开进行, 使用另行配制的储备液。

应该根据标准曲线分析质控样品, 将获得的浓度与标示浓度对比。准确度应报告为标示值的百分比。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。

为评价一个分析批中不同时间的任何趋势, 推荐以质控样品分析批来证明准确度, 其样品数不少于一个分析批预期的样品数。

批内准确度

为了验证批内准确度, 应取一个分析批的定量下限及低、中、高浓度质控样品, 每个浓度至少用 5 个样品。浓度水平覆盖标准曲线范围: 定量下限, 在不高于定量下限浓度 3 倍的低浓度质控样品, 标准曲线范围中部附近的中浓度质控样品, 以及标准曲线范围上限约 75% 处的高浓度质控样品。准确度均值一般应在质控样品标示值的 $\pm 15\%$ 之内, 定量下限准确度应在标示值的 $\pm 20\%$ 范围内。

批间准确度

通过至少 3 个分析批, 且至少两天进行, 每批用定量下限以及低、中、高浓度质控样品, 每个浓度至少 5 个测定值来评价。准确度均值一般应在质控样品标示值的 $\pm 15\%$ 范围内, 对于定量下限, 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。

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, 定义为测量值的相对标准差(变异系数)。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定量下限以及低、中、高浓度质控样品的精密度。

对于验证批内精密度, 至少需要一个分析批的 4 个浓度, 即定量下限以及低、中、高浓度, 每个浓度至少 5 个样品。对于质控样品, 批内变异系数一般不得超过 15%, 定量下限的变异系数不得超过 20%。

对于验证批间精密度, 至少需要 3 个分析批(至少 2 天)的定量下限以及低、中、高浓度, 每个浓度至少 5 个样品。对于质控样品, 批间变异系数一般不得超过 15%, 定量下限的变异系数不得超过 20%。

7. 稀释可靠性

样品稀释不应影响准确度和精密度。应该通过向基质中加入分析物至高于定量上限浓度, 并用空白基质稀释该样品(每个稀释因子至少 5 个测定值), 来证明稀释的可靠性。准确度和精密度应在 $\pm 15\%$ 之内, 稀释的可靠性应该覆盖试验样品所用的稀释倍数。

可以通过部分方法验证来评价稀释可靠性。如果能够证明其他基质不影响精密度和准确度, 也可以接受其使用。

8. 基质效应

当采用质谱方法时, 应该考察基质效应。使用至少 6 批

来自不同供体的空白基质, 不应使用合并的基质。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(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(分析物和内标的纯溶液)比值, 计算每一分析物和内标的基质因子。进一步通过分析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。从 6 批基质计算的内标归一化的基质因子的变异系数不得大于 15%。该测定应分别在低浓度和高浓度下进行。

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, 分别加入高浓度和低浓度(定量下限浓度 3 倍以内以及接近定量上限), 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%。

除正常基质外, 还应关注其他样品的基质效应, 例如溶血的或高血脂的血浆样品等。

9. 稳定性

必须在分析方法的每一步骤确保稳定性, 用于检查稳定性的条件, 例如样品基质、抗凝剂、容器材料、储存和分析条件, 都应该与实际试验样品的条件相似。用文献报道的数据证明稳定性是不够的。

采用低和高浓度质控样品(空白基质加入分析物至定量下限浓度 3 倍以内以及接近定量上限), 在预处理后以及在所评价的条件储存后立即分析。由新鲜制备的校正标样获得标准曲线, 根据标准曲线分析质控样品, 将测得浓度与标示浓度相比较, 每一浓度的均值与标示浓度的偏差应在 $\pm 15\%$ 范围内。

应通过适当稀释, 考虑到检测器的线性和测定范围, 检验储备液和工作溶液的稳定性。

稳定性检查应考察不同储存条件, 时间尺度应不小于试验样品储存的时间。

通常应该进行下列稳定性考察:

- 分析物和内标的储备液和工作溶液的稳定性;
 - 从冰箱储存条件到室温或样品处理温度, 基质中分析物的冷冻和融化稳定性;
 - 基质中分析物在冰箱储存的长期稳定性;
- 此外, 如果适用, 也应该进行下列考察:
- 处理过的样品在室温下或在试验过程储存条件下的稳定性;
 - 处理过的样品在自动进样器温度下的稳定性。

在多个分析物试验中, 特别是对于生物等效性试验, 应该关注每个分析物在含所有分析物基质中的稳定性。

应特别关注受试者采血时, 以及在储存前预处理的基质中分析物的稳定性, 以确保由分析方法获得的浓度反映受试者采样时刻的分析物浓度。可能需要根据分析物的结构, 按具体情况证明其稳定性。

(二) 部分验证

在对已被验证的分析方法进行小幅改变情况下, 根据改变的实质内容, 可能需要部分方法验证。可能的改变包括: 生物分析方法转移到另一个实验室, 改变仪器、校正浓度范围、样品体积, 其他基质或物种, 改变抗凝剂、样品处理步骤、储存条件等。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。

(三) 交叉验证

应用不同方法从一项或多项试验获得数据, 或者应用同一方法从不同试验地点获得数据时, 需要互相比对这些数据时, 需要进行分析方法的交叉验证。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两种分析方法测定。对于质控样品, 不同方法获得的平均准确度应在 $\pm 15\%$ 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 $\pm 20\%$ 范围内。

三、试验样品分析

在分析方法验证后, 可以进行试验样品或受试者样品分析。需要在试验样品分析开始前证实生物分析方法的效能。

应根据已验证的分析方法处理试验样品以及质控样品和校正标样, 以保证分析批被接受。

(一) 分析批

一个分析批包括空白样品和零浓度样品, 包括至少 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(校正标样、质控和试验样品)应按照它们将被分析的顺序, 在同一样品批中被处理和提取。一个分析批包括的样品在同一时间处理, 即没有时间间隔, 由同一分析者相继处理, 使用相同的试剂, 保持一致的条件。质控样品应该分散到整个批中, 以此保证整个分析批的准确度和精密度。

对于生物等效性试验, 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。

(二) 分析批的接受标准

应在分析试验计划或标准操作规程中, 规定接受或拒绝一个分析批的标准。在整个分析批包含多个部分批次的情况, 应该针对整个分析批, 也应该针对分析批中每一部分批次样品定义接受标准。应该使用下列接受标准:

校正标样测定回算浓度一般应在标示值的 $\pm 15\%$ 范围内, 定量下限应在 $\pm 20\%$ 范围内。不少于 6 个校正标样, 至少 75% 标样应符合这些标准。如果校正标样中有一个不符合标准, 则应该拒绝这个标样, 重新计算不含该标样的标准曲线, 并进行回归分析。

质控样品的准确度值应该在标示值的 $\pm 15\%$ 范围内。至少 67% 质控样品, 且每一浓度水平至少 50% 样品应符合这一标准。在不满足这些标准的情况下, 应该拒绝该分析批, 相应的试验样品应该重新提取和分析。

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物可以接受, 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。

如果使用多重校正标样, 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。

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。在生物等效性试验情况下, 这可能导致数据被拒绝。

(三) 校正范围

如果在试验样品分析开始前, 已知或预期试验样品中的分析物浓度范围窄, 则推荐缩窄标准曲线范围, 调整质控样品浓度, 或者适当加入质控样品新的浓度, 以充分反映试验样品的浓度。

如果看起来很多试验样品的分析物浓度高于定量上限, 在可能的情况下, 应该延伸标准曲线的范围, 加入额外浓度的质控样品或改变其浓度。

至少 2 个质控样品浓度应该落在试验样品的浓度范围内。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), 以确认响应函数并保证准确度和精密度。

(四) 试验样品的重新分析和报告值选择

应该在试验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以及选择报告值的标准。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。

重新分析试验样品可能基于下列理由:

- 由于校正标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;
- 内标的响应与校正标样和质控样品的内标响应差异显著;
- 进样不当或仪器功能异常;
- 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, 导致比其他分析批的定量下限高;
- 在给药前样品或安慰剂样品中测得可定量的分析物;
- 色谱不佳。

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。

在由于给药前样品阳性结果或者由于药动学原因进行重新分析的情况下, 应该提供重新分析样品的身份、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。

在仪器故障的情况下, 如果已经在方法验证时证明了重新进样的重现性和进样器内稳定性, 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。

(五) 色谱积分

应在标准操作规程中描述色谱的积分以及重新积分。任

何对该标准操作规程的偏离都应在分析报告中讨论。实验室应该记录色谱积分参数,在重新积分的情况下,记录原始和最终的积分数据,并在要求时提交。

(六)用于评价方法重现性的试验样品再分析

在方法验证中使用校正标样和质控样品可能无法模拟实际试验样品。例如,蛋白结合、已知和未知代谢物的回复转化、样品均一性或同服药物引起的差异,可能影响这些样品在处理和储存过程中分析物的准确度和精密度。因此,推荐通过在不同天后,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。检验的范围由分析物和试验样品决定,并应该基于对分析方法和分析物的深入理解。建议获得 c_{\max} 附近和消除相样品的结果,一般应该重新分析 10% 样品,如果样品总数超过 1000,则超出部分重新分析 5% 样品。

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的浓度之间的差异应在两者均值的 $\pm 20\%$ 范围内。

试验样品再分析显示偏差结果的情况下,应该进行考察,采取足够的步骤优化分析方法。

至少在下列情形下,应该进行试验样品的再分析:

- 毒理学试验,每个物种一次
- 所有关键性的生物等效性试验
- 首次用于人体的药物试验
- 首次用于患者的药物试验
- 首次用于肝或肾功能不全患者的药物试验

对于动物试验,可能仅需要在早期关键性试验中进行实际样品的再分析,例如涉及给药剂量和测得浓度关系的试验。

四、配体结合分析

配体结合分析主要用于大分子药物。前述的验证原则以及对试验样品分析的考虑一般也适用。但是由于大分子固有的特点和结构复杂性,使其难以被提取,所以常常在无预先分离的情况下测定分析物。此外,方法的检测终点并不直接来自分析物的响应,而来自与其他结合试剂产生的间接信号。配体结合分析中,每个校正标样、质控样品以及待测样品一般都采用复孔分析。如无特殊说明,本节以双孔分析为原则。

(一)方法验证前的考量

1. 标准品选择

生物大分子具有不均一性,其中成分的效价与免疫反应可能存在差异。因此应对标准品进行充分表征。应尽量使用纯度最高的标准品。用于配制校正标样和质控样品的标准品应尽量与临床和非临床试验使用的受试品批号相同。标准品批号变更时,应尽量对其进行表征和生物分析评价,以确保方法性能不变。

2. 基质选择

一般不推荐使用经碳吸附、免疫吸附等方法提取过的基

质,或透析血清、蛋白缓冲液等替代实际样品基质建立分析方法。但在某些情况下,复杂生物基质中可能存在高浓度与分析物结构相关的内源性物质,其高度干扰导致根本无法测定分析物。在无其他可选定量策略的前提下,可允许使用替代基质建立分析方法。但应对使用替代基质建立方法的必要性加以证明。

可采用替代基质建立标准曲线,但质控样品必须用实际样品基质配制,应通过计算准确度来证明基质效应的消除。

3. 最低需求稀释度的确定

分析方法建立与验证过程中,可能需要对基质进行必要的稀释,以降低其产生的高背景信号。在此情况下,应考察最低需求稀释度。它是指分析方法中为提高信噪比、减少基质干扰、优化准确度与精密度而必须使用缓冲液对生物样品进行稀释的最小倍数。应使用与试验样品相同的基质来配制加药样品来确定最低需求稀释度。

4. 试剂

方法的关键试剂,如结合蛋白、适配子、抗体或偶联抗体、酶等,对分析结果会产生直接影响,因此须确保质量。如果在方法验证或样品分析过程中,关键试剂批次发生改变,须确认方法性能不因此改变,从而确保不同批次结果的一致性。

无论是关键试剂,还是缓冲液、稀释液、酸化剂等非关键试剂,都应对维持其稳定性的保障条件进行记录,以确保方法性能长期不变。

(二)方法验证

1. 完整验证

(1)标准曲线与定量范围

标准曲线反映了分析物浓度与仪器响应值之间的关系。在配体结合分析方法中,标准曲线的响应函数是间接测得的,一般呈非线性,常为 S 型曲线。

应使用至少 6 个有效校正标样浓度建立标准曲线。校正标样应在预期定量范围对数坐标上近似等距离分布。除校正标样外,可使用锚定点辅助曲线拟合。

验证过程中,须至少对 6 个独立的分析批进行测定,结果以列表形式报告,以确定标准曲线回归模型整体的稳健性。拟合时,一条标曲允许排除由于明确或不明原因产生失误的浓度点。排除后应至少有 75% 的校正标样回算浓度在标示值的 $\pm 20\%$ (定量下限与定量上限在 $\pm 25\%$) 范围内。定量下限与定量上限之间的浓度范围为标准曲线的定量范围。锚定点校正样品是处于定量范围之外的标样点,用于辅助拟合配体结合分析的非线性回归标准曲线,因其在定量范围之外,可不遵循上述接受标准。

(2)特异性

特异性是指在样品中存在相关干扰物质的情况下,分析方法能够准确、专一地测定分析物的能力。结构相关物质或预期合用药物应不影响方法对分析物的测定。如在方法建立与验证阶段无法获取结构相关物质,特异性评价可在最初方

法验证完成后补充进行。应采用未曾暴露于分析物的基质配制高浓度与低浓度质控样品,加入递增浓度的相关干扰物质或预期合用药物进行特异性考察。未加入分析物的基质也应同时被测量。要求至少 80% 以上的质控样品准确度在 $\pm 20\%$ 范围内(如果在定量下限水平,则在 $\pm 25\%$ 范围内),且未加入分析物的基质的测量值应低于定量下限。

(3) 选择性

方法的选择性是指基质中存在非相关物质的情况下,准确测定分析物的能力。由于生物大分子样品一般不经提取,基质中存在的非相关物质可能会干扰分析物的测定。应通过向至少 10 个不同来源的基质加入定量下限和定量上限水平的分析物来考察选择性,也应同时测量未加入分析物的基质。选择性考察要求至少 80% 以上的样品准确度在 $\pm 20\%$ 范围内(如果在定量下限水平,则在 $\pm 25\%$ 范围内),且未加入分析物的基质的测量值应低于定量下限。如果干扰具有浓度依赖性,则须测定发生干扰的最低浓度。在此情况下,可能需要在方法验证之前调整定量下限。根据项目需要,可能需要针对病人群体基质或特殊基质(如溶血基质或高血脂基质)考察选择性。

(4) 精密度与准确度

应选择至少 5 个浓度的质控样品进行准确度、精密度以及方法总误差考察。包括定量下限浓度、低浓度质控(定量下限浓度的 3 倍以内)、中浓度质控(标准曲线中段)、高浓度质控(定量上限浓度 75% 以上)以及定量上限浓度质控。低、中、高浓度质控标示值不得与校正标样浓度标示值相同。质控样品应经过冷冻,并与试验样品采用相同的方法进行处理。不建议采用新鲜配制的质控样品进行精密度与准确度考察。批间考察应在数日内进行至少 6 个独立的分析批测定。每批内应包含至少 3 套质控样品(每套含至少 5 个浓度的质控样品)。对于批内和批间准确度,各浓度质控样品的平均浓度应在标示值的 $\pm 20\%$ (定量下限和定量上限为 $\pm 25\%$) 范围内。批内和批间精密度均不应超过 20%(定量下限和定量上限为 25%)。此外,方法总误差(即%相对偏差绝对值与%变异系数之和)不应超过 30%(定量下限和定量上限为 40%)。

(5) 稀释线性

在标准曲线定量范围不能覆盖预期样品浓度的情况下,应使用质控样品进行方法的稀释线性考察,即评价样品浓度超过分析方法的定量上限时,用空白基质将样品浓度稀释至定量范围内后,方法能否准确测定。进行稀释实验的另一目的是考察方法是否存在“前带”或“钩状”效应,即高浓度分析物引起的信号抑制。

稀释线性考察中,稀释至定量范围内的每个 QC 样品经稀释度校正后的回算浓度应在标示值的 $\pm 20\%$ 范围内,且所有 QC 样品回算终浓度的精密度不超过 20%。

(6) 平行性

为发现可能存在的基质效应,或代谢物的亲和性差异,

在可获得真实试验样品的情况下,应考虑对标准曲线和系列稀释的试验样品之间进行平行性考察。应选取高浓度试验样品(最好采用超出定量上限的样品),用空白基质将其稀释到至少 3 个不同浓度后进行测定,系列稀释样品间的精密度不应超过 30%。如果存在样品稀释非线性的情况(即非平行性),则应按事先的规定予以报告。如果在方法验证期间无法获取真实试验样品,则应在获得真实试验样品后尽快进行平行性考察。

(7) 样品稳定性

应使用低、高浓度质控样品考察分析物的稳定性。稳定性考察应包括室温或样品处理温度下的短期稳定性,以及冻-融稳定性。此外,如果试验样品需要长期冻存,则应在可能冻存样品的每个温度下进行长期稳定性考察。每一浓度质控样品应有 67% 以上的样品浓度在标示值的 $\pm 20\%$ 范围内。

(8) 商品化试剂盒

商品化试剂盒可以用来进行试验样品分析,但使用前必须按本指导原则的要求对其进行验证。

2. 部分验证和交叉验证

在二、(二)和二、(三)中叙述的关于验证的各项内容都适用于配体结合分析。

(三) 试验样品分析

1. 分析批

配体结合分析中最常使用微孔板,一个微孔板通常为一个分析批。每个微孔板应包含一套独立的标准曲线和质控样品,以校准板间差异。在使用某些平台时,单个样品载体的通量可能有限,此时允许一个分析批包含多个载体。可在该分析批的首个与末个载体各设置一套标准曲线,同时在每一载体上设置质控样品。所有样品均应复孔测定。

2. 试验样品分析的接受标准

对于每个分析批,除锚定点外,标准曲线须有 75% 以上的校正标样(至少 6 个)回算浓度在标示值的 $\pm 20\%$ (定量下限和定量上限为 $\pm 25\%$) 范围内。

每块板应含有至少 2 套 3 水平(低、中、高浓度)的复设质控样品。在试验样品测试过程的验证中,质控样品的复设数量应与试验样品分析一致。每块板至少 67% 的质控样品应符合准确度在 $\pm 20\%$ 范围以内,精密度不超过 20% 的标准,且每一浓度水平的质控样品中至少 50% 符合上述标准。

3. 实际样品再分析

在 3.6 节中关于实际样品再分析的所有论述均适用于配体结合分析。再分析样品的接受标准为初测浓度与复测浓度都在二者均值的 $\pm 30\%$ 范围内,再分析样品中至少 67% 以上应符合该接受标准。

五、试验报告

(一) 方法验证报告

如果方法验证报告提供了足够详细的信息,则可以引用主要分析步骤的标准操作规程标题,否则应该在报告后面附上这些标准操作规程的内容。

全部源数据应该以其原始格式保存, 并根据要求提供。

应该记录任何对验证计划的偏离。

方法验证报告应该包括至少下列信息:

- 验证结果概要;
- 所用分析方法的细节, 如果参考了已有方法, 给出分析方法的来源;
- 摘要叙述分析步骤(分析物, 内标, 样品预处理、提取和分析);
- 对照标准品(来源, 批号, 分析证书, 稳定性和储存条件);
- 校正标样和质控样品(基质, 抗凝剂, 预处理, 制备日期和储存条件);
- 分析批的接受标准;
- 分析批: 所有分析批列表, 包括校正范围、响应函数、回算浓度、准确度; 所有接受分析批的质控样品结果列表; 储备液、工作溶液、质控在所用储存条件下的稳定性数据; 选择性、定量下限、残留、基质效应和稀释考察数据;
- 方法验证中得到的意外结果, 充分说明采取措施的理由;

- 对方法或对标准操作规程的偏离。

所有测定及每个计算浓度都必须出现在验证报告中。

(二) 样品分析报告

样品分析报告应该引用该试验样品分析的方法验证报告, 还应包括对试验样品的详细描述。

全部源数据应该以其原始格式保存, 并根据要求提供。

应该在分析报告中讨论任何对试验计划、分析步骤或标准操作规程的偏离。

分析报告应至少包括下列信息:

- 对照标准品;
- 校正标样和质控样品的储存条件;
- 简要叙述分析批的接受标准, 引用特定的试验计划或标准操作规程;
- 样品踪迹(接收日期和内容, 接收时样品状态, 储存地点和条件);
- 试验样品分析: 所有分析批和试验样品列表, 包括分析日期和结果; 所有接受的分析批的标准曲线结果列表; 所有分析批的质控结果列表, 落在接受标准之外的数值应该清楚标出;
- 失败的分析批数目和日期;
- 对方法或标准操作规程的偏离;
- 重新分析结果。

试验样品再分析的结果可以在方法验证报告、样品分析报告或者在单独的报告中提供。

对于生物等效性试验等, 应在样品分析报告之后按规定附上受试者分析批的全部色谱图, 包括相应的质控样品和校正标样的色谱图。

9013 缓释、控释和迟释制剂指导原则

缓释、控释制剂与普通制剂比较, 药物治疗作用持久毒副作用低、用药次数减少。由于设计要求, 药物可缓慢释放进入体内, 血药浓度“峰谷”波动小, 可避免超过治疗血药浓度范围的毒副作用, 又能保持在有效浓度范围(治疗窗)之内以维持疗效。缓释、控释制剂也包括眼用、鼻腔耳道、阴道、直肠、口腔或牙用、透皮或皮下、肌肉注射皮下植入等, 使药物缓慢释放吸收, 避免肝门静脉系统“首过效应”的制剂。迟释制剂系指在给药后不立即释放药物的制剂, 如避免药物在胃内灭活或对胃的刺激, 而延迟肠内释放或在结肠定位释放的制剂, 也包括在某种条件下自然释放的脉冲制剂。

缓释、控释、迟释制剂的释药原理主要有控制溶出扩散、溶蚀或扩散与溶出相结合, 也可利用渗透压或离子交换机制。释放过程可以用不同方程进行曲线拟合, 如一级方程、Higuchi 方程、零级方程等。缓释与控释的主要别在于缓释制剂是按时间变化先多后少地非恒速释放, 控释制剂是按零级速率规律释放, 即其释药是不受时间影响的恒速释放, 可以得到更为平稳的血药浓度, “峰谷”波动更小, 直至基本吸收完全。通常缓释、控释制剂中所含的药物量比相应单剂量的普通制剂多, 工艺也较复杂为了既能获得可靠的治疗效果又不致引起突然释放(突释)所带来毒副作用的危险性, 必须在设计、试制、生产等环节避免或减少突释。缓释、控释、迟释制剂体外、体内释放行为应符合临床要求, 且不受或少受生理与食物因素的影响。所以应有一个能反映体内基本情况的体外释放实验方法和控制指标, 以有效控制制剂质量, 保证制剂安全性与有效性。

本指导原则的缓释、控释、迟释制剂以口服为重点, 可供其他给药途径参考。

一、缓释、控释、迟释制剂的定义

1. 缓释制剂

系指在规定的释放介质中, 按要求缓慢地非恒速释放药物, 与相应的普通制剂比较, 给药频率比普通制剂减少一或有所减少, 且能显著增加患者依从性的制剂。

2. 控释制剂

系指在规定的释放介质中, 按要求缓慢地恒速释放药物, 与相应的普通制剂比较, 给药频率比普通制剂减少一或有所减少, 血药浓度比缓释制剂更加平稳, 且能显著增加患者依从性的制剂。

3. 迟释制剂

迟释制剂系指在给药后不立即释放药物的制剂, 包括溶制剂、结肠定位制剂和脉冲制剂等。

肠溶制剂系指在规定的酸性介质中不释放或几乎不释药物, 而在要求的时间内, 于 pH 6.8 磷酸盐缓冲液中中大