
生物制品生物活性/效价测定方法验证指导原则

一、前言

对药品质量控制分析方法进行验证的目的是证明采用的方法适合于相应检测要求。生物制品质量控制中生物活性/效价为反映生物制品有效性的关键质量属性，对相应的测定方法进行规范的验证是保障其适用性的前提。本指导原则从验证方案的制定、各验证指标的具体验证策略、验证结果的记录和方法的监控及再验证的角度阐述了生物活性/效价测定方法验证相关的要求，旨在对新建的或拟修订的生物制品生物活性/效价测定方法所开展的验证工作进行规范与指导。本指导原则中的生物活性/效价测定主要是指相对效价测定，该法系将供试品的生物反应与已知标准品产生的反应相比较，从而定量测定供试品相对于标准品的效价。

二、方法验证的基本要素

1. 验证方案

方法验证需根据验证方案来完成。验证方案不仅应包括验证设计、验证指标、合理的可接受标准和数据分析计划，还应涵盖不符合可接受标准时可采取的措施等。

1.1 验证设计

验证设计主要涉及样品的选择、实验变异来源的考量及试验重复策略等。应采用具有代表性的样品进行验证试验，并在验证方案中注明所需样品的类型及数量。实验变异的来源主要包括样品的制备、试验内和试验间的影响因素。试验内变异可能受方法开发阶段所确定的实验条件（温度、pH、孵育时间等）、实验设计（动物数量、稀释度组数、每个稀释组的重复数、稀释度间隔等）、试验过程、系统适用性和样品适用性要求、统计分析等因素的影响。而试验间变异主要受不同分析人员、不同试验时间、不同仪器设备和试剂批次等因素的影响。因此，一个设计良好的验证方案应综合考量试验内和试验间变异的来源。此外，每轮验证试验中标准品和供试品均应独立制备。验证中使用的重复策略应尽量反映影响效价测定结果的实验因素。

1.2 验证指标与可接受标准

由于相对效价测定方法各具特点，并随分析对象而变化，因此需视具体方法

拟订具体的验证指标，关于常见验证指标的具体讨论见本节“2.各验证指标的验证策略”项下。应根据测定方法特点和验证目的来确定各验证指标的可接受标准。在评估某些验证指标是否符合可接受标准时，除了判定验证结果是否符合预设标准外，还可通过等效性检验方法判定验证结果的置信区间是否也符合要求。同时还应分别建立试验有效性的可接受标准（系统适用性要求）和样品结果有效性的可接受标准（样品适用性要求），上述标准可根据方法开发的情况制定，但最终需根据验证的数据进行修正并在验证完成前确定。

1.3 数据分析计划

应按照验证方案中列出的数据分析计划对验证结果进行分析，包括对验证指标结果的绘图和统计学分析，以及判断它们是否符合可接受标准等。常规的统计学方法一般要求数据之间相互独立，并呈近似正态分布和方差齐性。而测得的相对效价在多数情况下服从近似对数正态分布，因此，为满足上述统计学要求，通常采用相对效价的对数转换值进行数据分析，本指导原则中对数转换的底数可取任一适用的底数，一般以无理数 e 或 10 为底。当无法满足上述统计学要求时，也可考虑采用其他适宜的替代方法进行数据分析。可在测定方法开发阶段通过对适量历史数据的分析而获知测得的相对效价的分布情况，若确定测得的相对效价为正态分布，则可直接采用测得值按下述统计方法进行数据处理，此时精密度一般用标准偏差（SD）或相对标准偏差（RSD，%）表示。

2.各验证指标的验证策略

常见的验证指标包括专属性、相对准确度、精密度、线性和范围，后四个指标的验证通常可进行合并设计。

2.1 专属性

2.1.1 定义

专属性系指在其它成分，如杂质、降解产物、基质等存在时，采用的测定方法不受这些成分的干扰能正确测定待测物的能力。专属性亦可指测定方法区分相关物质的能力，因此，对待测物中任何已存在的或新引入的相关物质均应加以研究。如方法专属性不强，应采用多种不同原理的方法予以补充。

2.1.2 评价方法

在杂质、降解产物或基质可获得的情况下，往平行稀释的标准品溶液中加入

潜在的干扰物，并与未加干扰物的标准品溶液比较测得的相对效价的结果，采用合适的等效性检验方法考察二者剂量反应曲线的相似性和效价测得结果的一致性。也可取基质或与待测物结构相似的产品相关产物或非相关物质进行试验，基质、产品相关产物或非相关物质应均呈阴性反应。

在杂质、降解产物或基质不能获得的情况下，也可用强光照射、高温、高湿等方式对供试品进行加速破坏，以研究可能存在的降解产物和降解途径对相对效价测定的影响。

2.2 相对准确度

2.2.1 定义

系指在规定的范围内，测得的相对效价与真实值或参考值接近的程度，一般用相对偏差（RB，%）或其他适宜指标表示。

2.2.2 评价方法

在规定范围内，取标准品或已知效价的供试品稀释至不同的目标效价水平，一般至少需要评估 3 个效价水平，但为了获得更可靠的结果，推荐评估 5 个效价水平，每个效价水平分别至少独立测定 3 次。以效价理论值的对数（横坐标）对其相应的效价测定值的对数（纵坐标）作直线回归。采用每个效价水平测定值的相对偏差和不同效价水平相对偏差的变化趋势或其他适宜指标来评价相对准确度，其中相对偏差的变化趋势可用直线回归方程的斜率进行评价。

相对偏差计算公式如下：

在每个效价水平上，测得的相对效价的 \ln 平均值的 $100(1-2\alpha)\%$ （通常取 $\alpha=0.05$ ，即 90%）置信区间（CI），可按下式计算：

式中，Average 为每个效价水平效价测定值的 \ln 平均值；

SD 为每个效价水平效价测定值的 \ln 标准偏差；

n 为每个效价水平效价测定值的个数；

t_{df} 为自由度为 df 时的 t 界值表查表值；

df 为自由度，等于每个效价水平测定值个数减 1。

再按下式计算每个效价水平上相对偏差的 $100(1-2\alpha)\%$ （通常取 $\alpha=0.05$ ，即 90%）置信区间（CI_{RB}）：

式中，LCI 为每个效价水平效价测定值的对数平均值的 90%置信下限；

UCI 为每个效价水平效价测定值的对数平均值的 90%置信上限。

2.2.3 数据要求

应报告每个效价水平效价测定值的相对偏差、直线回归方程的斜率或其他适宜的评价指标，上述指标均应符合验证方案中预先设定的可接受标准。必要时还应报告相对偏差或其他适宜指标的置信区间。

2.3 精密度

2.3.1 定义

精密度系指在规定的条件下，同一份均匀供试品，经多次取样测定所得结果之间的接近程度，包括重复性、中间精密度和重现性。由于相对效价测定方法的中间精密度包含重复性考察，因此，本指导原则中主要介绍中间精密度的评价方法，必要时还应进行不同实验室间的重现性考察。相对效价测定方法的精密度一般用几何标准偏差（GSD）或几何变异系数（GCV，%）表示，可采用下述方法或方差分析法（ANOVA）进行评价。

2.3.2 评价方法

在规定范围内，考察随机变动因素如不同日期、不同分析人员、不同仪器、不同关键试剂批次等对精密度的影响，实验设计同 2.2.2 项。以每个效价水平测得的相对效价的几何标准偏差或几何变异系数来评价中间精密度。

在每个效价水平上，测得的相对效价的几何标准偏差计算公式如下：

式中，SD 为每个效价水平效价测定值的对数标准偏差。

在每个效价水平上，测得的相对效价的几何变异系数计算公式如下：

对于 SD，仅需关注其 $100(1-\alpha)\%$ （通常取 $\alpha=0.05$ ，即 95%）的置信上限（ CI_{SD} ），其计算公式如下：

式中，n 为每个效价水平效价测定值的个数；

为自由度为 n-1 时的 χ^2 界值表查表值。

因此，在每个效价水平上 GSD 的 $100(1-\alpha)\%$ （通常取 $\alpha=0.05$ ，即 95%）的置信上限（ CI_{GSD} ）计算公式为：

在每个效价水平上 GCV 的 $100(1-\alpha)\%$ （通常取 $\alpha=0.05$ ，即 95%）的置信上限（ CI_{GCV} ）计算公式为：

2.3.3 数据要求

应报告每个效价水平效价测定值的几何标准偏差、几何变异系数或相应的置信区间，几何变异系数应符合验证方案中预先设定的可接受标准。采用方差分析法进行评价时，还可报告各效价水平合并计算后总的几何变异系数，并分析变异来源。

2.4 线性

2.4.1 定义

通常系指在设计的范围内，测得的相对效价与真实值或参考值之间的线性关系，为与相对准确度相关的稀释线性。

2.4.2 评价方法

在规定范围内，取标准品稀释至不同的目标效价水平，通常至少制备 3 个效价水平的标准品溶液，但推荐评估 5 个效价水平。以效价理论值的对数（横坐标）对其相应的效价测定值的对数（纵坐标）作图，采用最小二乘法进行线性回归。

2.4.3 数据要求

应列出线性图、直线回归方程、斜率、y 轴截距和相关系数。相关系数应符合验证方案中预先设定的可接受标准或直线回归方程的显著性检验应具有统计学意义。

2.5 范围

2.5.1 定义

系指测定方法能达到一定相对准确度、中间精密度和线性要求时的高低限相对效价水平或量的区间。

2.5.2 评价方法

该范围通常来源于稀释线性研究，评估的效价水平应至少涵盖产品效价质量

标准的范围。对于稳定性研究或其他特殊情况，可视具体情况适当扩大方法验证的范围。

2.5.3 数据要求

应报告相对准确度、中间精密度和线性符合要求时的相对效价水平或量的范围。

2.6 其他验证指标的考虑

由于通则 9101 介绍的其他验证指标如检测限和定量限与报告相对效价的生物检定方法无关，因此，上述指标在本指导原则均未涉及。此外，耐用性也未列入本指导原则的验证要求中，建议在测定方法开发阶段或预验证阶段进行该指标的考察，以确定测定方法的重要实验参数及相应的范围，并建立一系列的系统适用性要求。但对于一些关键因素如孵育时间、孵育温度、细胞代次和细胞数量等在验证时仍需进一步开展耐用性研究，尤其是当这些因素与验证中引入的其他因素有相互作用时。

3. 验证结果的记录

验证结果应记录在验证报告中。验证报告可包含原始数据和中间结果，一般应报告每个效价水平验证指标的测定值或各效价水平合并计算后的总体测定值。预验证的实验结果也可纳入验证报告中，这将有助于确定测定方法的最终实验条件。若验证结果均符合可接受标准，即可得出测定方法适用于其检测目的的结论；反之，当验证结果与验证方案规定的可接受标准有偏差时，应对验证失败的原因进行分析，并提出失败后的纠正措施，如优化方法的实验条件、修改方法的重复策略或视情况修正可接受标准等。

4. 方法的监控及再验证

相对效价测定方法经过验证后即可开始使用，但仍需对其性能进行持续的监控。最简单的监控方法即是对适宜的参数采用统计过程控制（SPC）图进行持续监控，如标准品的剂量反应曲线和质控品的效价测定值等。这些 SPC 图可用于识别相对效价测定方法早期的波动或漂移，若在 SPC 图中观察到任何变化趋势，即应对产生该趋势变化的原因进行调查。

由于药品生产工艺变更、制剂的组分变更或其他原因需对测定方法进行较大改动时，应根据方法修订的程度确定再验证的范围。相对效价测定方法的再验证

包括重新执行一次完整的验证或通过桥接实验来将原始测定方法过渡到修订方法。

三、方法验证实例

本节分别列举了一个基于细胞的体外生物学活性测定法和基于动物的体内生物学活性测定法的验证实例，以阐述不同生物活性测定方法的验证过程。需要说明的是，本节实例仅作为演示分析步骤和计算过程用，不同的测定方法可根据其具体特点选择与实例中不同的实验设计和制订不同的可接受标准。

(一)、体外生物学活性测定法

1. 实验设计及测定结果

以通则 3525 重组人粒细胞刺激因子（GCSF）生物学活性测定法（NFS-60 细胞/MTT 比色法）的验证为例，考察测定方法的相对准确度、中间精密度、线性和范围，四项指标的验证采用合并设计。取 GCSF 工作标准品，按说明书复溶后，用基础培养液稀释至每 1ml 中分别含 200IU 的标准品溶液及 128、160、200、250 和 312IU 的待测溶液，然后取标准品溶液和待测溶液在 96 孔细胞培养板中，做 2 倍系列稀释，共 8 个稀释度，每个稀释度做 2 孔，按通则 3525 进行试验。即 5 个待测溶液的相对效价水平分别为 64%、80%、100%、125%和 156%，在对数尺度上呈均匀间隔。每个效价水平由两名分析人员在不同日期使用 4 个细胞代次进行相对效价测定，每次试验每个效价水平每名分析人员采用每个细胞代次独立测定两份，每次以两份结果的几何均值作为报告值。测定结果见表 1。

表 1 GCSF 生物学活性测定法（NFS-60 细胞/MTT 比色法）测定结果

效价水平	时间 1				时间 2			
	人员 1		人员 2		人员 1		人员 2	
	代次 1	代次 2	代次 1	代次 2	代次 3	代次 4	代次 3	代次 4
64%	68.3%	72.0%	60.7%	64.1%	68.4%	75.2%	61.6%	66.1%
	68.5%	66.7%	64.7%	63.9%	71.3%	65.3%	65.3%	66.4%
80%	86.4%	93.6%	76.5%	80.4%	82.0%	85.4%	75.2%	87.5%
	85.3%	83.1%	81.5%	79.7%	87.0%	80.0%	83.2%	87.8%
100%	117.4%	109.2%	94.9%	95.1%	105.3%	107.9%	105.5%	91.3%
	101.7%	107.9%	95.4%	97.8%	99.5%	103.6%	102.8%	93.3%
125%	150.0%	143.2%	124.0%	122.6%	121.8%	123.3%	130.3%	120.9%
	134.2%	132.5%	120.8%	128.0%	122.4%	128.8%	135.1%	122.0%
156%	189.4%	184.7%	165.7%	157.6%	156.7%	174.5%	165.6%	161.4%
	173.5%	171.6%	160.2%	156.1%	162.7%	163.3%	167.0%	165.1%

2. 可接受标准及验证结果

2.1 相对准确度

2.1.1 可接受标准

每个效价水平相对效价测定值的相对偏差应在 $\pm 12\%$ 范围内；以效价理论值的对数（横坐标）对其相应的效价测定值的对数（纵坐标）作直线回归，回归方程的斜率应在 0.80~1.25 范围内。

2.1.2 验证结果

按“二、方法验证的基本要素”中 2.2.2 相对准确度评价方法项下计算公式计算每个效价水平相对效价测定值的相对偏差及其置信区间，结果见表 2。相对偏差均在 $\pm 12\%$ 范围内。以效价理论值的对数（横坐标）对其相应的效价测定值的对数（纵坐标）作直线回归，回归方程为 $y=1.0182x+0.0385$ 。斜率 1.0182 在 0.8~1.25 之间。

表 2 GCSF 不同效价水平相对效价测定值的相对偏差及置信区间

效价水平	试验次数	对数效价			效价			相对偏差		
		平均值	置信下限	置信上限	平均值	置信下限	置信上限	平均值	置信下限	置信上限
64%	8	-0.4052	-0.4360	-0.3745	66.7%	64.7%	68.8%	4.2%	1.0%	7.4%
80%	8	-0.1828	-0.2129	-0.1528	83.3%	80.8%	85.8%	4.1%	1.0%	7.3%
100%	8	0.0155	-0.0269	0.0579	101.6%	97.3%	106.0%	1.6%	-2.7%	6.0%
125%	8	0.2507	0.2109	0.2905	128.5%	123.5%	133.7%	2.1%	-1.2%	7.0%
156%	8	0.5125	0.4786	0.5464	167.0%	161.4%	172.7%	7.0%	3.4%	10.7%

注：表中对数转换的底数取 e，计算 90%置信区间时 $t_{0.05, 7}=1.89$ 。

2.2 中间精密度

2.2.1 可接受标准

每个效价水平相对效价测定值的几何变异系数(GCV, %)应不大于 20%。

2.2.2 验证结果

按“二、方法验证的基本要素”中 2.3.2 中间精密度评价方法项下计算公式计算每个效价水平相对效价测定值的几何标准偏差、几何变异系数及其置信上限，结果见表 3。每个效价水平相对效价测定值的几何变异系数均小于 20%。

表 3 GCSF 不同效价水平相对效价测定值的几何标准偏差、几何变异系数及置信上限

效价水平	试验次数	GSD	CI _{GSD}	GCV	CI _{GCV}
64%	8	1.047	1.086	4.7%	8.6%
80%	8	1.046	1.084	4.6%	8.4%
100%	8	1.065	1.121	6.5%	12.1%

125%	8	1.061	1.113	6.1%	11.3%
156%	8	1.052	1.095	5.2%	9.5%

注：表中反对数转换的底数取 e，计算 95%置信上限时 $\chi^2_{0.95, 7}=2.17$ 。

2.3 线性

2.3.1 可接受标准

以效价理论值的对数（横坐标）对其相应的效价测定值的对数（纵坐标）作图，采用最小二乘法进行线性回归。直线回归方程的相关系数应不低于 0.98。

2.3.2 验证结果

以效价理论值的对数（横坐标）对其相应的效价测定值的对数（纵坐标）作图，采用最小二乘法进行线性回归，结果如图 1 所示。拟合的直线回归方程为 $y=1.0182x+0.0385$ ，相关系数为 0.987。

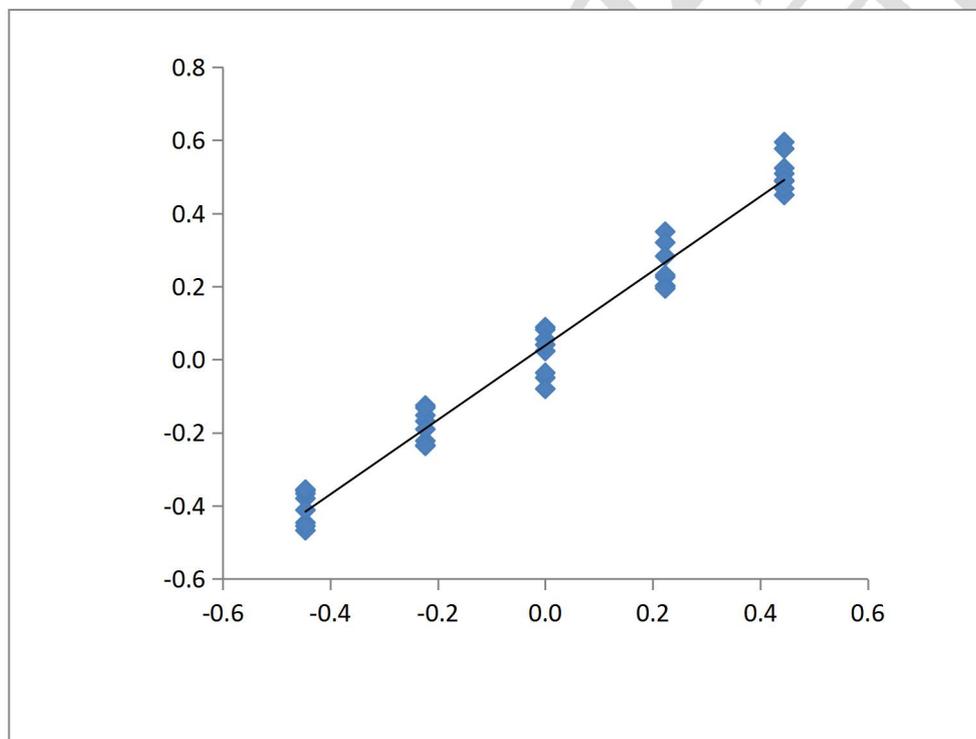


图 1 GCSF 效价理论值对数值与测定值对数值的直线回归方程

2.4 范围

2.4.1 可接受标准

报告相对准确度、中间精密度和线性符合要求时的效价水平范围，该范围应至少涵盖相对效价的质量标准范围（80%~150%）。

2.4.2 验证结果

本法中相对准确度、中间精密度和线性均符合要求的效价水平范围为 64%~

156%，涵盖了其质量标准范围。

(二)、体内生物学活性测定法

1. 实验设计及测定结果

以通则 1216 卵泡刺激素生物测定法的验证为例，考察测定方法的相对准确度、中间精密度、线性和范围，四项指标的验证采用合并设计。取尿促性素国家标准品，用制备的溶剂配成每 1ml 中分别含 5.6 单位的标准品溶液高剂量组及 4.48、5.6 和 7IU 的待测溶液高剂量组，然后采用高剂量组溶液依次制备中剂量组和低剂量组溶液，相邻剂量组的浓度比值为 1: 0.5，按通则 1216 进行试验。即 3 个待测溶液高剂量组的相对效价水平分别为 80%、100%和 125%，在对数尺度上呈均匀间隔。每个效价水平在不同日期独立测定 3 次，测定结果见表 4。

表 4 卵泡刺激素生物测定法测定结果

效价水平	测定 1	测定 2	测定 3
80%	95.5%	92.6%	75.8%
100%	109.6%	106.0%	99.0%
125%	116.8%	108.5%	122.3%

2. 验证结果及可接受标准

2.1 相对准确度

2.1.1 可接受标准

每个效价水平相对效价测定值的相对偏差应在 $\pm 20\%$ 范围内。

2.1.2 验证结果

按“二、方法验证的基本要素”中 2.2.2 相对准确度评价方法项下计算每个效价水平相对效价测定值的相对偏差，结果见表 5。相对偏差均在 $\pm 20\%$ 范围内。

表 5 卵泡刺激素生物测定法不同效价水平测定值的相对偏差

效价水平	试验次数	对数效价平均值	效价平均值	相对偏差
80%	3	-0.1333	87.5%	9.4%
100%	3	0.0466	104.8%	4.8%
125%	3	0.1461	115.7%	-7.4%

2.2 中间精密度

2.2.1 可接受标准

每个效价水平相对效价测定值的几何变异系数(GCV, %)应不大于 20%。

2.2.2 验证结果

按“二、方法验证的基本要素”中 2.3.2 中间精密度评价方法计算每个效价

水平相对效价测定值的几何标准偏差和几何变异系数，结果见表 6。每个效价水平测定值的几何变异系数均小于 20%。

表 6 卵泡刺激素不同效价水平测定值的几何标准偏差和几何变异系数

效价水平	试验次数	GSD	GCV
80%	3	1.134	13.4%
100%	3	1.053	5.3%
125%	3	1.062	6.2%

2.3 线性

2.3.1 可接受标准

以效价理论值的对数（横坐标）对其相应的效价测定值的对数（纵坐标）作图，采用最小二乘法进行线性回归。采用 F 检验进行直线回归方程的显著性检验，应具有统计学意义。

2.3.2 验证结果

以效价理论值的对数（横坐标）对其相应的效价测定值的对数（纵坐标）作图，采用最小二乘法进行线性回归，结果如图 2 所示。拟合的直线回归方程为 $y=1.1376x-0.0097$ ，相关系数为 0.84，采用 F 检验进行回归方程的显著性检验，直线呈显著回归（ $P=0.004$ ）。

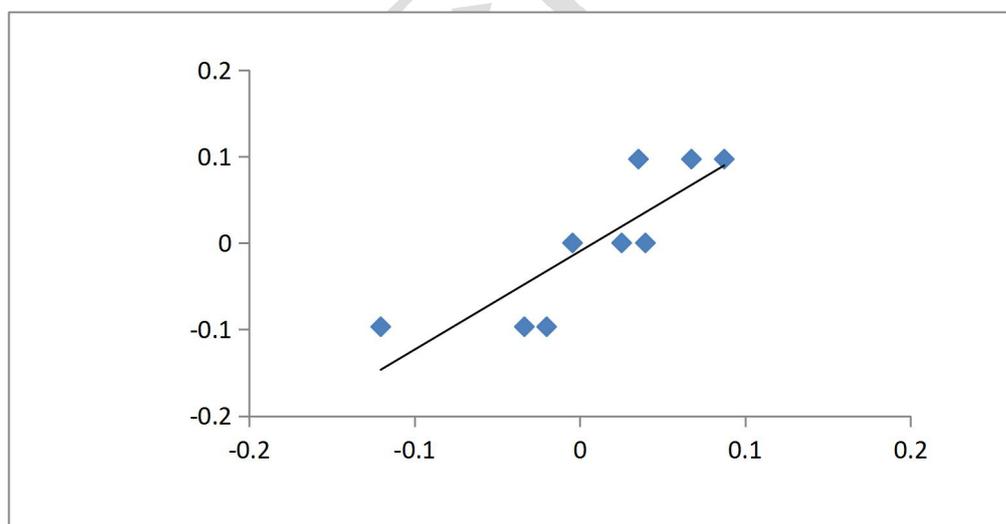


图 2 卵泡刺激素效价理论值对数值与测定值对数值的直线回归方程

2.4 范围

2.4.1 可接受标准

报告相对准确度、中间精密度和线性符合要求时的效价水平范围，该范围应至少涵盖相对效价的质量标准范围（80%~125%）。

2.4.2 验证结果

本法中相对准确度、中间精密度和线性均符合要求的效价水平范围为 80%~125%，涵盖了其质量标准范围。

四、统计学方法及术语

- 1.系统适用性 (System Suitability) 判断试验结果有效性的要求，考察试验体系是否能够按照试验方案的规定良好运行。
- 2.样品适用性 (Sample Suitability) 判断样品结果有效性的要求，主要通过供试品和标准品剂量反应曲线的相似性来评价。
- 3.等效性检验 (Equivalence Test) 一种通过比较两个量值的差异是否符合给定的置信区间可接受标准来判断两个量值是否等效的统计学方法。常用的等效性检验方法有双单侧 t 检验法 (Two One-Sided Test, TOST)。
- 4.对数正态分布 (Log Normal Distribution) 将随机变量取对数后呈正态分布。
- 5.相似性 (Algebraic Similarity) 在供试品和标准品具有同质性的前提下，供试品和标准品的剂量反应曲线在某种程度上呈代数相关，一般表现为剂量反应曲线平行。
- 6.置信区间 (Confidence Interval, CI) 在给定的置信水平下，由统计学方法计算出的包含参数真值的随机区间。
- 7.对数平均值 (Log Mean Value) 将随机变量取对数后求其平均值。
- 8.对数标准偏差 (Log Standard Deviation) 将随机变量取对数后求其标准差。
- 9.方差分析法 (Analysis of Variance, ANOVA) 通过分析研究不同来源的变异对总变异的贡献大小，从而确定各种因素对实验结果影响的大小。
- 10.统计过程控制 (Statistical Process Control, SPC) 用于监控过程中的漂移或变化趋势的一套统计学方法。

课题承担单位：上海市食品药品检验所

021-38839900-26104

协作单位：广东省药品检验所