

指导原则编号：

【	H	】	G	P	T	5	-	1
---	---	---	---	---	---	---	---	---

化学药物非临床药代动力学研究 技术指导原则

二〇〇五年三月

目 录

一、概述.....	1
二、基本原则.....	2
三、试验设计.....	2
(一) 总体要求.....	2
(二) 生物样本的药物测定方法.....	3
(三) 研究项目.....	4
四、数据处理与分析.....	9
五、结果与评价.....	9
六、常见问题与处理思路.....	10
七、参考文献.....	13
八、附录(生物样品的分析方法).....	15
九、著者.....	21

化学药物非临床药代动力学研究技术指导原则

一、概述

非临床药代动力学研究是通过动物体内、外和人体外的研究方法，揭示药物在体内的动态变化规律，获得药物的基本药代动力学参数，阐明药物的吸收、分布、代谢和排泄的过程和特点。

非临床药代动力学研究在新药研究开发的评价过程中起着重要作用。在药效学和毒理学评价中，药物或活性代谢物浓度数据及其相关药代动力学参数是产生、决定或阐明药效或毒性大小的基础，可提供药物对靶器官效应（药效或毒性）的依据；在药物制剂学研究中，非临床药代动力学研究结果是评价药物制剂特性和质量的重要依据；在临床研究中，非临床药代动力学研究结果能为设计和优化临床研究给药方案提供有关参考信息。

本指导原则是供药物研究开发机构进行化学药品新药的非临床药代动力学研究的参考，而不是新药申报的条框要求。研究者可根据不同药物的特点，参考本指导原则，科学合理地进行试验设计，并对试验结果进行综合评价。

本指导原则的主要内容包括进行非临床药代动力学研究的基本原则、试验设计的总体要求、生物样品的药物分析方法、研究项目（血药浓度-时间曲线、吸收、分布、排泄、血浆蛋白结合、生物转化、对药物代谢酶活性的影响）、数据处理与分析、结果与评价等，并对研究中的一些常见问题及处理思路进行了分析。

二、基本原则

进行非临床药代动力学研究，要遵循以下基本原则：

- (一) 试验目的明确
- (二) 试验设计合理
- (三) 分析方法可靠
- (四) 所得参数全面，满足评价要求
- (五) 对试验结果进行综合分析与评价
- (六) 具体问题具体分析

三、试验设计

(一) 总体要求

1、受试物

应提供受试物的名称、剂型、批号、来源、纯度、保存条件及配制方法。使用的受试物及剂型应尽量与药效学或毒理学研究的一致，并附研制单位的质检报告。

2、试验动物

一般采用成年和健康的动物。常用动物有小鼠、大鼠、兔、豚鼠、犬、小型猪和猴等。动物选择的一般原则如下：

2.1 首选动物：尽可能与药效学和毒理学研究一致。

2.2 尽量在清醒状态下试验，动力学研究最好从同一动物多次采样。

2.3 创新性的药物应选用两种或两种以上的动物，其中一种为啮齿类动物；另一种为非啮齿类动物（如犬、小型猪或猴等）。其他药物，可选用一种动物，建议首选非啮齿类动物。

2.4 经口给药不宜选用兔等食草类动物。

3、剂量选择

动物体内药代动力学研究应设置至少三个剂量组，其高剂量最好接近最大耐受剂量，中、小剂量根据动物有效剂量的上下限范围选取。主要考察在所试剂量范围内，药物的体内动力学过程是属于线性还是非线性，以利于解释药效学和毒理学研究中的发现，并为新药的进一步开发和研究提供信息。

4、给药途径

所用的给药途径和方式，应尽可能与临床用药一致。

(二) 生物样品的药物分析方法

生物样品的药物分析方法包括色谱法、放射性核素标记法、免疫学和微生物学方法。应根据受试物的性质，选择特异性好、灵敏度高的测定方法。色谱法包括高效液相色谱法（HPLC）、气相色谱法（GC）和色谱-质谱联用法（如 LC-MS，LC-MS/MS，GC-MS，GC-MS/MS 方法）。在需要同时测定生物样品中多种化合物的情况下，LC-MS/MS 和 GC-MS/MS 联用法在特异性、灵敏度和分析速度方面有更多的优点。

对于前体药物或有活性（药效学或毒理学活性）代谢产物的药物，建立方法时应考虑能同时测定原形药和代谢物，以考察物质平衡（Mass Balance），阐明药物在体内的转归。在这方面，放射性核素标记法和色谱-质谱联用法具有明显优点。

应用放射性核素标记法测定血药浓度可配合色谱法，以保证良好的检测特异性。如某些药物难以用上述的检测方法，可选用免疫学或生物学方

法，但要保证其可靠性。

放射免疫法和酶标免疫法具有一定特异性，灵敏度高，但原形药与其代谢产物或内源性物质常有交叉反应，需提供证据说明其特异性。

生物学方法（如微生物法）常能反映药效学本质，但一般特异性较差，应尽可能用特异性高的方法（如色谱法）进行平行检查。

生物样品测定的关键是方法学的确证（**Validation**）。方法学确证是整个药代动力学研究的基础。所有药代动力学研究结果，都依赖于生物样品的测定，只有可靠的方法才能得出可靠的结果。通过准确度、精密度、特异性、灵敏度、重现性、稳定性等研究建立了测定方法，得到了标准曲线后，在检测过程中还应进行方法学质控，制备随行标准曲线并对质控样品进行测定，以确保检测方法的可靠性。

本指导原则提供了生物样品分析方法的基本要求（见附录），研究时可根据药物特点及分析方法的具体类型进行选择。

（三）研究项目

1、血药浓度-时间曲线

1.1 受试动物数：以血药浓度-时间曲线的每个采样点不少于 5 个数据为限计算所需动物数。最好从同一动物个体多次取样。如由多只动物的数据共同构成一条血药浓度-时间曲线，应相应增加动物数，以反映个体差异对试验结果的影响。建议受试动物采用雌雄各半，如发现动力学存在明显的性别差异，应增加动物数以便认识受试物的药代动力学的性别差异。对于单一性别用药，可选择与临床用药一致的性别。

1.2 采样点：采样点的确定对药代动力学研究结果有重大影响，若采

样点过少或选择不当，得到的血药浓度-时间曲线可能与药物在体内的真实情况产生较大差异。给药前需要采血作为空白样品。为获得给药后的一个完整的血药浓度-时间曲线，采样时间点的设计应兼顾药物的吸收相、平衡相（峰浓度附近）和消除相。一般在吸收相至少需要 2~3 个采样点，对于吸收快的血管外给药的药物，应尽量避免第一个点是峰浓度（ C_{max} ）；在 C_{max} 附近至少需要 3 个采样点；消除相需要 4~6 个采样点。整个采样时间至少应持续到 3~5 个半衰期，或持续到血药浓度为 C_{max} 的 1/10~1/20。为保证最佳采样点，建议在正式试验前，选择 2~3 只动物进行预试验，然后根据预试验的结果，审核并修正原设计的采样点。

1.3 口服给药：一般在给药前应禁食 12 小时以上，以排除食物对药物吸收的影响。另外在试验中应注意根据具体情况统一给药后禁食时间，以避免由此带来的数据波动及食物的影响。

1.4 药代动力学参数：根据试验中测得的各受试动物的血药浓度-时间数据，求得受试物的主要药代动力学参数。静脉注射给药，应提供 $t_{1/2}$ （消除半衰期）、 V_d （表观分布容积）、 AUC （血药浓度-时间曲线下面积）、 CL （清除率）等参数值；血管外给药，除提供上述参数外，尚应提供 C_{max} 和 T_{max} （达峰时间）等参数，以反映药物吸收的规律。另外，提供统计矩参数，如： MRT （平均滞留时间）、 $AUC_{(0-t)}$ 和 $AUC_{(0-\infty)}$ 等，对于描述药物药代动力学特征也是有意义的。

1.5 应提供的数据

1.5.1 单次给药

各个（和各组）受试动物的血药浓度-时间数据及曲线和其平均值、标

准差及曲线。

各个（和各组）受试动物的主要药代动力学参数及平均值、标准差。

对受试物单次给药非临床药代动力学的规律和特点进行讨论和评价。

1.5.2 多次给药

各个（和各组）受试动物首次给药后的血药浓度-时间数据及曲线和主要药代动力学参数。

各个（和各组）受试动物的3次稳态谷浓度数据及平均值、标准差。

各个（和各组）受试动物血药浓度达稳态后末次给药的血药浓度-时间数据和曲线，及其平均值、标准差和曲线。

比较首次与末次给药的血药浓度-时间曲线和有关参数。

各个（和各组）平均稳态血药浓度及标准差。

2、吸收

对于经口给药的新药，应进行整体动物试验，尽可能同时进行血管内给药的试验，提供绝对生物利用度。如有必要，可进行在体或离体肠道吸收试验以阐述药物吸收特性。

对于其他血管外给药的药物及某些改变剂型的药物，应根据立题目的，尽可能提供绝对生物利用度。

3、分布

选用大鼠或小鼠做组织分布试验较为方便。选择一个剂量（一般以有效剂量为宜）给药后，至少测定药物在心、肝、脾、肺、肾、胃肠道、生殖腺、脑、体脂、骨骼肌等组织的浓度，以了解药物在体内的主要分布组织。特别注意药物浓度高、蓄积时间长的组织和器官，以及在药效或毒性

靶器官的分布（如对造血系统有影响的药物，应考察在骨髓的分布）。参考血药浓度-时间曲线的变化趋势，选择至少 3 个时间点分别代表吸收相、平衡相和消除相的药物分布。若某组织的药物浓度较高，应增加观测点，进一步研究该组织中药物消除的情况。每个时间点，至少应有 5 个动物的数据。

进行组织分布试验，必须注意取样的代表性和一致性。

同位素标记物的组织分布试验，应提供标记药物的放化纯度、标记率（比活性）、标记位置、给药剂量等参数；提供放射性测定所采用的详细方法，如分析仪器、本底计数、计数效率、校正因子、样品制备过程等；提供采用放射性示踪生物学试验的详细过程，以及在生物样品测定时对放射性衰变所进行的校正方程等。尽可能提供给药后不同时相的整体放射自显影图像。

4、排泄

4.1 尿和粪的药物排泄：一般采用小鼠或大鼠，将动物放入代谢笼内，选定一个有效剂量给药后，按一定的时间间隔分段收集尿或粪的全部样品，测定药物浓度。粪样品凉干后称重（不同动物粪便干湿不同），按一定比例制成匀浆，记录总体积，取部分样品进行药物含量测定。计算药物经此途径排泄的速率及排泄量，直至收集到的样品测定不到药物为止。每个时间点至少有 5 只动物的试验数据。

应采取给药前尿及粪样，并参考预试验的结果，设计给药后收集样品的时间点，包括药物从尿或粪中开始排泄、排泄高峰及排泄基本结束的全过程。

4.2 胆汁排泄：一般用大鼠在乙醚麻醉下作胆管插管引流，待动物清醒后给药，并以合适的时间间隔分段收集胆汁，进行药物测定。

4.3 记录药物自粪、尿、胆汁排出的速度及总排出量（占总给药量的百分比），提供物质平衡的数据。

5、与血浆蛋白的结合

研究药物与血浆蛋白结合试验可采用多种方法，如平衡透析法、超过滤法、分配平衡法、凝胶过滤法、光谱法等。根据药物的理化性质及试验室条件，可选择使用一种方法进行至少 3 个浓度（包括有效浓度）的血浆蛋白结合试验，每个浓度至少重复试验三次，以了解药物的血浆蛋白结合率是否有浓度依赖性。

一般情况下，只有游离型药物才能通过脂膜向组织扩散，被肾小管滤过或被肝脏代谢，因此药物与蛋白的结合会明显影响药物分布与消除的动力学过程，并降低药物在靶部位的作用强度。建议根据药理毒理研究所采用的动物种属，进行动物与人血浆蛋白结合率比较试验，以预测和解释动物与人在药效和毒性反应方面的相关性。

对蛋白结合率高于 90% 以上的药物，建议开展体外药物竞争结合试验，即选择临床上有可能合并使用的高蛋白结合率药物，考察对所研究药物蛋白结合率的影响。

6、生物转化

对于创新性的药物，尚需了解在体内的生物转化情况，包括转化类型、主要转化途径及其可能涉及的代谢酶。对于新的前体药物，除对其代谢途径和主要活性代谢物结构进行研究外，尚应对原形药和活性代谢物进行系统

的药代动力学研究。而对主要在体内以代谢消除为主的药物(原形药排泄<50%),生物转化研究则可分为两个阶段:临床前可先采用色谱方法或放射性核素标记方法分析和分离可能存在的代谢产物,并用色谱-质谱联用等方法初步推测其结构。如果 II 期临床研究提示其在有效性和安全性方面有开发前景,在申报生产前进一步研究并阐明主要代谢产物的可能代谢途径、结构及代谢酶。但当多种迹象提示可能存在有较强活性的代谢产物时,应尽早开展活性代谢产物的研究,以确定开展代谢产物动力学试验的必要性。

7、对药物代谢酶活性的影响

对于创新性的药物,应观察药物对药物代谢酶,特别是细胞色素 P450 同工酶的诱导或抑制作用。在临床前阶段可以用底物法观察对动物和人肝微粒体 P450 酶的抑制作用,比较种属差异。药物对酶的诱导作用可观察整体动物多次给药后的肝 P450 酶或在药物反复作用后的肝细胞(最好是人肝细胞)P450 酶活性的变化,以了解该药物是否存在潜在的代谢性相互作用。

四、数据处理与分析

应有效整合各项试验数据,选择科学合理的数据处理及统计方法。如用计算机处理数据,应注明所用程序的名称、版本和来源,并对其可靠性进行确认。

五、结果与评价

对所获取的数据应进行科学和全面的分析与评价,综合论述药物在动物体内的药代动力学特点,包括药物吸收、分布和消除的特点;经尿、粪和胆汁的排泄情况;与血浆蛋白结合的程度;药物在体内蓄积的程度及主要蓄积的器官或组织;如为创新性的药物,还应阐明其在体内的生物转化、

消除过程及物质平衡情况。

在评价的过程中注意进行综合评价，分析药代动力学特点与药物的制剂选择、有效性和安全性的关系，为药物的整体评价和临床研究提供更多有价值的信息。

六、常见问题与处理思路

（一）药代动力学与制剂研究

药代动力学主要研究药物在体内的动态过程。药物的理化性质与上述过程密切相关，同时剂型特征、制剂所使用的辅料、制备工艺等也是重要的影响因素。因此在进行制剂研究时，可结合药代动力学研究结果，利用或避开药物的某些性质。

一般来说影响吸收过程的因素包括药物的物理化学性质和/或制剂因素、生理因素等。药物的理化性质包括溶解度、油水分配系数、酸碱度、粒度、晶型、渗透性以及药物在胃肠道中的稳定性等，制剂因素包括剂型、辅料和制备工艺以及不同剂型制剂的给药途径等。

新的给药系统在不断发展，如脂质体、纳米给药系统、透皮给药系统、局部定位给药系统、脉冲给药系统等。研究者可根据不同的用药需要，结合药物及其制剂的特点，制订合理、可行的药代动力学研究方案。

（二）关于多次给药

对于临床需长期给药且有蓄积倾向的药物，应考虑进行多次给药的药代动力学研究。

多次给药试验时，一般可选用一个剂量(有效剂量)。根据单次给药药代动力学试验结果求得的消除半衰期，并参考药效学数据，确定药物剂量、

给药间隔和给药天数。

以下情况可考虑进行多次给药后特定组织的药物浓度研究：

- 1、药物/代谢物在组织中的半衰期明显超过其血浆消除半衰期，并超过毒性研究给药间隔的两倍；
- 2、在短期毒性研究、单次给药的组织分布研究或其他药理学研究中观察到未预料的，而且对安全性评价有重要意义的组织病理学改变；
- 3、定位靶向释放的药物。

（三）关于体外药代动力学研究

随着新药研究水平的不断提高，一些新的体外药代动力学研究手段也逐渐成熟，如体外吸收模型（Caco-2 细胞模型）、体外肝系统研究等。在进行药代动力学研究时，除了体内研究外，还可配合体外研究，如观察动物和人肝等组织匀浆、细胞悬液、微粒体或灌流器官对药物的代谢作用。采用体外方法研究代谢途径和动力学特点比较方便，节省动物，可以获得更多的信息，例如分析代谢模式、代谢酶对药物作用的动力学参数、药物及其代谢物与蛋白、DNA 等靶分子的亲和力等。这些信息对于补充说明体内的研究结果，进一步阐明药理和毒理作用机制是有价值的。

（四）关于动物选择

由于动物药代动力学研究是联系动物研究与人体研究的重要桥梁，动物选择的恰当与否是该研究价值大小的关键。应尽量选择适宜的动物来进行研究，如口服给药的动物不宜选择食草类动物或与人胃肠道情况差异较大的动物，以免由于吸收的差异造成试验结果不能充分提示临床。对于创新性的药物，可利用体外药代动力学手段预先对动物种属进行筛选，以选

择药物动力学特点与人体最接近的动物，提高试验结果的临床预测价值。由此也可为毒性试验选择合适的动物种属提供依据，并对毒性试验与人体的相关性做出判断。

（五）关于改变酸根、晶型的药物

对于改变酸根、晶型的药物，应根据药物的特点、改变的具体情况和立题依据，考虑是否应进行与改变前药物比较的药代动力学研究，考察其生物利用度的变化。

（六）关于手性药物

对映异构体具有几乎相同的物理性质（旋光性除外）和化学性质（在手性环境中除外），通常需要特殊的手性技术对它们进行鉴定、表征、分离和测定，但生物系统常常很容易区分它们，并可能导致不同的药代动力学性质（吸收、分布、代谢、排泄），以及药理学、毒理学效应的量或质的区别。

为评价单一对映体或对映体混合物的药代动力学，研究者应在药物开发前期，建立适用于体内样品对映体选择性分析的定量方法，为后期研究对映体之间的相互转化以及各自的吸收、分布、代谢和排泄提供方法学基础。

如果外消旋体已经上市，研究者希望开发单一对映体，则应测定该对映体转化为另一对映体的程度是否显著，以及该对映体单独用药是否与其作为外消旋体组分时的药代动力学性质一致。

为监测对映异构体在体内的相互转化和处置，应获得单一对映体在动物体内的药代动力学曲线，并与其后在临床 I 期试验中获得的药代动力学

曲线相比较。

（七）关于复方药物

对于新的复方制剂，应通过复方与单药药代动力学的比较，研究其相互作用，以考察组方的合理性。

（八）药代动力学与毒代动力学

毒代动力学研究通常结合毒性研究进行，将获得的药代动力学资料作为毒性研究的组成部分，以评价全身暴露的结果。药代动力学和毒代动力学研究的目的不同，但两者又是相互联系的，其分析方法是相同的，技术可以共享或相互借鉴。已获取的药代动力学参数可以为毒代和毒性试验给药方案的设计提供参考。三个剂量的药代动力学试验中，最高剂量采用接近动物最大耐受量所得到的动力学参数，对毒代动力学试验设计有直接的参考价值。药物组织分布研究结果可为评价药物毒性靶器官提供依据。药物与血浆蛋白结合试验的结果也是估算血药浓度与毒性反应关系的依据，因为毒性反应与血中游离药物-时间曲线下面积的相关性优于总的药-时曲线下面积。生物转化研究所提供的代谢产物资料有助于判断可能引起毒性反应的成分和毒代动力学研究应检测的成分。

毒代动力学研究技术指导原则将另行制订。

（九）关于缓控释制剂

缓控释制剂的药代动力学研究技术指导原则将另行制订。

七、参考文献

1、中华人民共和国卫生部药政局.《新药（西药）临床前研究指导原则汇编》.1993年7月.第39页~42页

- 2、郑筱萸.《化学药品和治疗用生物制品研究指导原则（试行）》. 中国医药科技出版社, 2002 年 5 月. 第 57~62 页
- 3、ICH. S3B: Pharmacokinetics: guidance for repeated dose tissue distribution studies. 1994
- 4、EMA. 3BS11A: Pharmacokinetics and metabolic studies in the safety evaluation of new medicinal products in animals. <http://pharmacos.edura.org>. 1994.4
- 5、秦伯益主编.《新药评价概论》(第二版). 人民卫生出版社. 1998 年 12 月
- 6、FDA. FDA's policy statement for the development of new stereoisomeric drugs. <http://www.fda.gov/cder/guidance/stereo.htm>. 1992.5.1
- 7、国家药典委员会. 药物制剂人体生物利用度和生物等效性试验指导原则,《中华人民共和国药典 2005 年版附录增修订内容汇编（二部）》. 2003 年 7 月
- 8、FDA. Guidance for industry: Bioanalytical method validation, U.S. Department of Health and Human Services. 2001.5
- 9、Shah VP, Midha KK, Findlay JWA, et al. Bioanalytical method validation—A revisit with a decade of progress. *Pharmaceutical Research*, 17: 1551-1557. 2000
- 10、USP 25. 2002

八、附录

生物样品分析方法的基本要求

1、基本概念

生物样品分析方法的基本参数包括：（1）准确度，（2）精密度，（3）特异性，（4）灵敏度，（5）重现性，（6）稳定性。现将相关的概念介绍如下：

准确度：在确定的分析条件下，测得值与真实值的接近程度。

精密度：在确定的分析条件下，相同介质中相同浓度样品的一系列测量值的分散程度。

特异性：分析方法测量和区分共存组分中分析物的能力。这些共存组分可能包括代谢物、杂质、分解产物、介质组分等。

灵敏度：生物样品分析方法的灵敏度通过标准曲线来表征，主要包括定量下限和浓度-响应函数。

重现性：不同试验室间测定结果的分散程度，以及相同条件下分析方法在间隔一段短时间后测定结果的分散程度。

稳定性：一种分析物在确定条件下，一定时间内在给定介质中的化学稳定性。

标准曲线：试验响应值与分析物浓度间的关系。应采用适当的加权和统计检验，用简单的数学模型来最适当地描述。标准曲线应是连续的和可重现的，应以回归计算结果的百分偏差最小为基础。

提取回收率：分析过程的提取效率，以样品提取和处理过程前后分析物含量百分比表示。

定量范围：包括定量上限（ULOQ）和定量下限（LLOQ）的浓度范围，

在此范围内采用浓度-响应关系能进行可靠的、可重复的定量，其准确度和精密度可以接受。

生物介质：一种生物来源物质，能够以可重复的方式采集和处理。例如全血、血浆、血清、尿、粪、各种组织等。

介质效应：由于样品中存在干扰物质，对响应造成的直接或间接的影响。

分析批：包括待测样品、适当数目的标准样品和质控样品的完整系列。一天内可以完成几个分析批，一个分析批也可以持续几天完成。

标准样品：在生物介质中加入已知量分析物配制的样品，用于建立标准曲线，计算质控样品和未知样品中分析物浓度。

质控样品：即 QC 样品，系指在生物介质中加入已知量分析物配制的样品，用于监测生物分析方法的重复性和评价每一分析批中未知样品分析结果的完整性和正确性。

2、生物样品分析方法的建立和确证

由于生物样品取样量少、药物浓度低、内源性物质（如无机盐、脂质、蛋白质、代谢物）及个体差异等多种因素影响生物样品测定，所以必须根据待测物的结构、生物介质和预期的浓度范围，建立适宜的生物样品分析方法，并对方法进行确证。

分析方法确证分为全面确证和部分确证两种情况。对于首次建立的生物样品分析方法、新的药物或新增代谢物定量分析，应进行全面方法确证。在其他情况下可以考虑进行部分方法确证，如生物样品分析方法在试验室间的转移、定量浓度范围改变、生物介质改变、稀少生物介质、证实复方给药后分析方法的特异性等。

应考察方法的每一步骤,确定从样品采集到分析测试的全过程中,环境、介质、材料或操作上的可能改变对测定结果的影响。

(1) 特异性

必须证明所测定的物质是预期的分析物,内源性物质和其他代谢物不得干扰样品的测定。对于色谱法至少要考察 6 个不同个体空白生物样品色谱图、空白生物样品外加对照物质色谱图(注明浓度)及用药后的生物样品色谱图。对于以软电离质谱为基础的检测方法(LC-MS、LC-MS/MS 等),应注意考察分析过程中的介质效应,如离子抑制等。

(2) 标准曲线与定量范围

根据所测定物质的浓度与响应的相关性,用回归分析方法(如用加权最小二乘法)获得标准曲线。标准曲线高低浓度范围为定量范围,在定量范围内浓度测定结果应达到试验要求的精密度和准确度。

用至少 5 个浓度建立标准曲线,应使用与待测样品相同的生物介质,定量范围要能覆盖全部待测浓度,不允许将定量范围外推求算未知样品的浓度。建立标准曲线时应随行空白生物样品,但计算时不包括该点。

(3) 精密度与准确度

要求选择 3 个浓度的质控样品同时进行方法的精密度和准确度考察。低浓度选择在定量下限附近,其浓度在定量下限的 3 倍以内;高浓度接近于标准曲线的上限;中间选一个浓度。每一浓度每批至少测定 5 个样品,为获得批间精密度,应至少连续 3 个分析批合格。

精密度用质控样品的批内和批间相对标准差(RSD)表示,相对标准差一般应小于 15%,在定量下限附近相对标准差应小于 20%。

准确度一般应在 85%~115%范围内,在定量下限附近应在 80%~120%范围内。

(4) 定量下限

定量下限是标准曲线上的最低浓度点,要求至少能满足测定 3~5 个半衰期时样品中的药物浓度,或 $C_{\max}$ 的 1/10~1/20 时的药物浓度,其准确度应在真实浓度的 80%~120%范围内, RSD 应小于 20%。应由至少 5 个标准样品测试结果证明。

(5) 样品稳定性

根据具体情况,对含药生物样品在室温、冰冻或冻融条件下以及不同存放时间进行稳定性考察,以确定生物样品的存放条件和时间。还应注意储备液的稳定性以及样品处理后的溶液中分析物的稳定性。

(6) 提取回收率

应考察高、中、低 3 个浓度的提取回收率,其结果应精密和可重现。

(7) 微生物学和免疫学分析

上述分析方法确证的很多参数和原则也适用于微生物学或免疫学分析,但在方法确证中应考虑到它们的一些特殊之处。微生物学或免疫学分析的标准曲线本质上是非线性的,所以尽可能采用比化学分析更多的浓度点来建立标准曲线。结果的准确度是关键的因素,如果重复测定能够改善准确度,则应在方法确证和未知样品测定中采用同样的步骤。

3、生物样品分析方法的应用

应在生物样品分析方法确证完成之后开始测试未知样品。推荐由独立的人员配制不同浓度的标准样品对分析方法进行考核。

每个未知样品一般测定一次，必要时可进行复测。药代动力学比较试验中，来自同一个体的生物样品最好在同一分析批中测定。

每个分析批应建立标准曲线（组织分布试验时，可视具体情况而定），随行测定高、中、低 3 个浓度的质控样品，每个浓度至少双样本，并应均匀分布在未知样品测试顺序中。当一个分析批中未知样品数目较多时，应增加各浓度质控样品数，使质控样品数大于未知样品总数的 5%。质控样品测定结果的偏差一般应小于 15%，低浓度点偏差一般应小于 20%，最多允许 1/3 质控样品的结果超限，但不能在同一浓度中出现。如质控样品测定结果不符合上述要求，则该分析批样品测试结果作废。

浓度高于定量上限的样品，应采用相应的空白介质稀释后重新测定。对于浓度低于定量下限的样品，在进行药代动力学分析时，在达到 C_{max} 以前取样的样品应以零值计算，在达到 C_{max} 以后取样的样品应以无法定量（Not detectable, ND）计算，以减小零值对 AUC 计算的影响。

4、分析数据的记录与保存

分析方法的有效性应通过试验证明。在分析报告中，应提供成功完成这些试验工作的相关资料。建立一般性和特殊性标准操作规程，保存完整的试验记录是分析方法有效性的基本要素。生物分析方法建立中产生的数据和 QC 样品测试结果应全部记录并妥善保存，必要时接受检查。

提供给药品注册管理部门的材料应当包括：（1）综合信息；（2）方法建立的数据；（3）在日常样品分析中的基本资料；（4）其他相关信息。

（1）综合信息

项目编号，分析方法编号，分析方法类型，分析方法确证简化的理由，

以及相应的项目计划编号、标题等。

（2）方法建立的数据

分析方法的详细描述；该方法所用对照品（被测药物、代谢物、内标物）的纯度和来源；稳定性试验描述及相关数据；描述测定选择性、准确度、精密度、回收率、定量限、标准曲线的试验并给出获得的主要数据；列出批内、批间精密度和准确度的详细结果。根据具体情况提供代表性的色谱图或质谱图并加以说明。此外，尚需对所建立的方法学在实际分析过程中的优缺点进行评价。

（3）在日常样品分析中的基本资料

所用样品（受试物、代谢物、内标物）的纯度和来源。样品处理和保存的情况，样品编号、采集日期、运输前的保存、运输情况、分析前的保存。信息应包括日期、时间、样品所处条件，以及任何偏离试验计划的情况。样品分析批的综合信息，包括分析批编号、分析日期、分析方法、分析人员、开始和结束时间、主要设备和材料的变化，以及任何可能偏离分析方法建立时的情况。

用于计算结果的回归方程，分析样品时标准曲线列表，各分析批质控样品测定结果综合列表并计算批内和批间精密度、准确度，各分析批包括的未知样品，浓度计算结果。

提供 20%受试物样品测试的色谱图或其他原始数据的复印件，包括相应分析批的标准曲线和质控样品的色谱图或其他原始数据的复印件。

注明缺失样品的原因，重复测试的结果。应对舍弃任何分析数据和选择所报告的数据说明理由。

(4) 其他相关信息

缩略语列表，参考文献列表，标准操作规程列表。

九、著者

《化学药物非临床药代动力学研究技术指导原则》课题研究组