**总结报告**

LC-MS/MS法定量测定Beagle犬血浆中sbk002的方法学验证试验

专题编号： A2018030-BA01

**研究机构**

|  |  |
| --- | --- |
| 名称： | 苏州华测生物技术有限公司 |
| 地址： | 江苏省昆山市高新区元丰路166号 |
| 电话： | 0512-36801688 |

**委托单位**

|  |  |
| --- | --- |
| 名称： | 成都施贝康生物医药科技有限公司 |
| 地址： | 成都高新区（西区）西芯大道17号 |
| 电话： | 028-62532315 |

研究起止日期：2018-12-04 ~ 2019-01-19

# 签 字 页

徐振兴，M.S 日期

专题负责人

桂志胜 日期

QA

# GLP依从性声明

**GLP法规：**

本试验在苏州华测生物技术有限公司（研究机构）所完成的所有部份均遵守试验方案和研究机构的标准操作规程（SOPs），本试验遵从下列药物非临床研究质量管理规范（GLP）。

2017年9月1日生效的中国国家食品药品监督管理总局（原CFDA）《药物非临床研究质量管理规范》（局令第34号）。

试验过程中没有发生任何已知的可能影响数据完整性的事件。

徐振兴，M.S. 日期

专题负责人

# QA声明

专题负责人：徐振兴

标准品代号：sbk002-D

专题名称：LC-MS/MS法定量测定Beagle犬血浆中sbk002的方法学验证试验

专题编号：A2018030-BA01

依据2017年9月1日生效的原食品药品监督管理总局《药物非临床研究质量管理规范》（局令第34号），经济合作和发展组织OECD Principles of good laboratory practice(as revised in 1997)ENV/MC/CHEM(98)17，美国食品药品监督管理局Good laboratory practice for nonclinical laboratory studies(21CFR Part 58)，试验方案和标准操作规程（SOPs）进行检查，以及列出将检查报告汇报给专题负责人和机构负责人的日期。此外，本声明确认该总结报告准确反映了试验的原始数据。

| 检查内容 | 检查日期 | 汇报日期  （SD/机构负责人） |
| --- | --- | --- |
| 试验方案 | 2018-12-01 | 2018-12-01 |
| 分析检测样品配制 | 2018-12-05 | 2018-12-05 |
| 色谱分析 | 2018-12-05 | 2018-12-05 |
| 原始资料 | 2019-01-18 | 2019-01-18 |
| 总结报告 | 2019-01-18 | 2019-01-18 |

此外，质量保证部依据SOPs实施每季度的过程检查及每年的机构检查。

**QA：桂志胜**

**签名： 日期 ：**

缩略词表

|  |  |
| --- | --- |
| 英文缩写 | 中文名称 |
| BLOQ | 低于定量下限 |
| CV | 变异系数 |
| °C | 摄氏度 |
| GLP | 药药品非临床研究质量管理规范 |
| H | 小时 |
| ISR | 试验样品再分析 |
| L | 升 |
| LC-MS/MS | 液质联用仪 |
| LLOQ | 定量下限 |
| min | 分钟 |
| mL | 毫升 |
| mg | 毫克 |
| mg/mL | 毫克每毫升 |
| Mean | 平均值 |
| R2 | 回归系数 |
| SD | 标准偏差 |
| SOP | 标准操作规程 |
| µL | 微升 |
| µg/mL | 微克每毫升 |
| ULOQ | 定量上限 |

目录

[签 字 页 2](#_Toc535660049)

[GLP依从性声明 3](#_Toc535660050)

[QA声明 4](#_Toc535660051)

[缩略词表 5](#_Toc535660052)

[目录 6](#_Toc535660053)

[摘要 8](#_Toc535660054)

[1. 基本信息 10](#_Toc535660055)

[**1.1.** **专题名称及编号** 10](#_Toc535660056)

[**1.2.** **试验目的** 10](#_Toc535660057)

[**1.3.** **研究机构** 10](#_Toc535660058)

[**1.4.** **委托单位** 10](#_Toc535660059)

[**1.5.** **试验人员组成** 10](#_Toc535660060)

[**1.6.** **质量保证人员** 11](#_Toc535660061)

[**1.7.** **遵循的法规及技术指导原则** 11](#_Toc535660062)

[**1.8.** **质量保证** 11](#_Toc535660063)

[**1.9.** **试验关键日期** 11](#_Toc535660064)

[2. 验证参数说明 13](#_Toc535660065)

[3. 试验材料与方法 14](#_Toc535660067)

[**3.1.** **标准品** 14](#_Toc535660069)

[**3.2.** **内标** 14](#_Toc535660070)

[**3.3.** **主要试剂** 15](#_Toc535660071)

[**3.4.** **主要仪器** 15](#_Toc535660072)

[**3.5.** **分析方法** 16](#_Toc535660073)

[4. 方法学验证 16](#_Toc535660074)

[**4.1.** **系统适应性** 16](#_Toc535660075)

[**4.2.** **标准曲线** 16](#_Toc535660076)

[**4.3.** **准确度与精密度** 17](#_Toc535660077)

[**4.4.** **定量下限** 17](#_Toc535660078)

[**4.5.** **选择性** 17](#_Toc535660079)

[**4.6.** **系统残留** 18](#_Toc535660080)

[**4.7.** **提取回收率与基质效应** 18](#_Toc535660081)

[**4.8.** **溶血评价** 19](#_Toc535660082)

[**4.9.** **稀释回收率** 19](#_Toc535660083)

[**4.10.** **稳定性** 20](#_Toc535660084)

[**4.11.** **试验样品再分析** 21](#_Toc535660085)

[**4.12.** **批最大样品数** 21](#_Toc535660086)

[5. 数据采集和分析 21](#_Toc535660087)

[6. 统计分析 22](#_Toc535660092)

[7. 结果 22](#_Toc535660094)

[**7.1.** **系统适应性** 22](#_Toc535660099)

[**7.2.** **标准曲线** 22](#_Toc535660100)

[**7.3.** **准确度与精密度** 22](#_Toc535660101)

[**7.4.** **定量下限** 23](#_Toc535660102)

[**7.5.** **选择性** 23](#_Toc535660103)

[**7.6.** **系统残留** 23](#_Toc535660104)

[**7.7.** **提取回收率与基质效应** 23](#_Toc535660105)

[**7.8.** **溶血评价** 23](#_Toc535660106)

[**7.9.** **稀释回收率** 23](#_Toc535660107)

[**7.10.** **稳定性** 23](#_Toc535660108)

[**7.11.** **试验样品再分析ISR** 24](#_Toc535660109)

[**7.12.** **批最大样品数** 24](#_Toc535660110)

[8. 结论 25](#_Toc535660111)

[9. 试验方案、偏离和变更 25](#_Toc535660112)

[10. 资料保存 25](#_Toc535660113)

[**10.1.** **归档时间及档案保存时间** 25](#_Toc535660116)

[**10.2.** **归档内容** 25](#_Toc535660117)

[**10.3.** **保存场所与保存条件** 26](#_Toc535660118)

[11. 主要参考文献 26](#_Toc535660119)

[12. 附录项目 27](#_Toc535660128)

[附件一：附表 28](#_Toc535660129)

[附件二：附图 46](#_Toc535660130)

[附件三：偏离记录 49](#_Toc535660131)

[附件四：试验方案 50](#_Toc535660132)

摘要

**目的：**本试验的目的是建立LC-MS/MS法定量测定EDTA-K2抗凝、TCEP抗氧化的Beagle犬血浆中sbk002的浓度并对该方法的系统适应性、线性范围、准确度及精密度、定量下限、选择性、系统残留、提取回收率与基质效应、溶血评价、稀释回收率、稳定性、ISR重现性和批最大样品数进行全面方法学验证。

**方法：**血浆样品经过蛋白沉淀法处理后，以液相色谱分离、电喷雾（ESI）离子化、三重四极杆串联质谱检测sbk002。液质联用仪为Waters ACQUITY UPLC I-Class+Xevo TQ-S，色谱柱为Kinetex® 1.7 μm C18 100 Å 100 × 2.1 mm。具体分析方法见“LC-MS/MS法定量测定Beagle血浆中sbk002的方法（分析方法编号：sbk002-BA01）”。

**结果：** 该方法选择性良好，系统残留对定量下限无影响。

在标准曲线的线性范围（0.5 ~ 500.0 ng/mL）内，除超限样品外，其余样品准确度在91.00% ~ 108.22 %之间（LLOQ的准确度在92.00 % ~ 112.00 %之间），回归系数（R2）均大于0.99。批内准确度：各浓度QC样品准确度的平均值在86.79 % ~ 98.36 %之间（LLOQ的平均准确度在91.33 % ~ 103.00%之间）；批间准确度：各浓度QC样品准确度的平均值在90.11 % ~ 92.23 %之间（LLOQ的平均准确度为96.22 %）；批内精密度：各浓度QC样品的精密度（CV）在1.48 % ~ 3.50 %之间（LLOQ的CV在3.40 % ~ 10.61 %之间）；批间精密度：各浓度QC样品的CV在3.85 % ~ 5.47 %之间（LLOQ的CV为8.40 %）。定量下限样品平均准确度在91.33 % ~ 103.00 %之间，CV在3.40 % ~ 10.61 %之间。sbk002提取回收率的CV在2.04 % ~ 3.70 %之间，内标提取回收率的CV为1.44 %，sbk002相对回收率CV在1.89 % ~ 4.67 %之间；sbk002基质效应的CV在0.88 % ~ 3.16 %之间，内标基质效应的CV为1.37 %，sbk002归一化基质效应CV在1.09 % ~ 2.92 %之间。溶血样品（低浓度质控和高浓度质控）准确度分别为99.11 % 和97.73 %，CV分别为6.57 %和1.96 %。8倍定量上限样品稀释10倍平均稀释回收率为109.21 %，CV为3.67 %。全血样品冰盒放置4 h后与新鲜全血样品平均峰面积（中浓度质控）的比值为98.85 %。sbk002血浆样品（低浓度质控和高浓度质控）冰盒放置4 h的回收率分别为100.00 %和98.49 %；室温放置1 h的回收率分别为102.13 %和99.39 %；冻融循环三次的回收率分别100.27 % 和99.33 %；- 60 ℃以下放置36天的回收率分别为96.40 %和97.75 %；处理后2 ~ 8 ℃放置2天的回收率分别99.33 %和99.17 %。sbk002和内标储备液2 ~ 8 ℃放置36天后与新鲜储备液相比，sbk002平均偏差为-6.69 %，内标平均偏差为0.06 %。试验样品再分析（ISR）满足重现性要求的比例为100 %。最大样品数为90时，各浓度准确度的平均值在95.70 % ~ 98.92 %之间，CV在2.22 % ~ 3.86 %之间。

**结论：**本试验建立的LC-MS/MS方法在0.5 ~ 500.0 ng/mL 范围内线性良好，系统适应性、标准曲线、准确度与精密度、定量下限、选择性、系统残留、提取回收率与基质效应、溶血评价、稀释回收率均符合生物样品分析的要求。全血样品冰盒放置4 h 稳定；血浆样品冰盒放置4 h、室温放置1 h、冻融循环三次、-60 ℃以下放置36天、处理后2 ~ 8 ℃放置2天均稳定；sbk002和内标储备液2 ~ 8 ℃放置36天稳定；ISR可重现；一个分析批最大样品数为90。

综上所述， LC-MS/MS法定量测定Beagle犬血浆中sbk002的方法可用于EDTA-K2抗凝、TCEP抗氧化的Beagle犬血浆中sbk002浓度的检测。

# 基本信息

* 1. **专题名称及编号**

专题名称：LC-MS/MS法定量测定Beagle犬血浆中sbk002的方法学验证试验；

专题编号：A2018030-BA01。

* 1. **试验目的**

本试验的目的是建立LC-MS/MS法定量测定EDTA-K2抗凝、TCEP抗氧化的Beagle犬血浆中sbk002浓度并对该方法进行全面方法学验证。

* 1. **研究机构**

名称：苏州华测生物技术有限公司；

地址：江苏省昆山市高新区元丰路166号；

邮编：215300；

联系人：夏玉叶；

电话：0512-36801688；

传真：0512-36802288；

电子邮件：xiayuye@cti-cert.com。

* 1. **委托单位**

名称：成都施贝康生物医药科技有限公司；

地址：成都高新区（西区）西芯大道17号；

邮编：610000；

联系人：牟霞；

电话：028-62532315；

电子邮件：779061281@qq.com。

* 1. **试验人员组成**
     1. **专题负责人**

姓名：徐振兴；

地址：江苏省昆山市高新区元丰路166号；

电话：0512-36801688；

传真：0512-36802288；

电子邮件：xuzhenxing@cti-cert.com。

* + 1. **试验主要组成人员**

试验操作：周梦佳、吴津津、李应龙；

数据整理及统计分析：徐振兴、叶双双。

* 1. **质量保证人员**

姓名：何艳、桂志胜；

电话：0512-36801688；

电子邮件：cti-btc-qa.list@cti-cert.com。

* 1. **遵循的法规及技术指导原则**

本试验遵循的法规及技术指导原则为：

《药物非临床研究质量管理规范》（原CFDA，2017年09月）；

《药品注册管理办法》（原CFDA， 2007年10月）；

《药物非临床药代动力学研究技术指导原则》（原CFDA，2014年05月）；

《生物样品定量分析方法验证指导原则》（国家药典委员会，中华人民共和国药典2015年版）；

Guideline on bioanalytical method validation, European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use, EMEA/CHMP/EWP/ 192217/2009 (EMEA, 2011)；

Bioanalytical Method Validation Guidance for industry. (FDA，May 2018)；

本试验的实施除方案特殊说明外，均遵循本机构标准操作规程（Standard Operating Procedures：SOPs）。

* 1. **质量保证**

质量保证部门遵照《药物非临床研究质量管理规范》（2017年09月），美国食品药品监督管理局（FDA）（21CFR58，Good Laboratory Practice For Nonclinical Laboratory Studies），经济合作与发展组织OECD（OECD Principles of Good Laboratory Practice, ENV/MC/CHEM (98)17的GLP法规及本机构SOP对试验方案、方案变更、试验过程、原始数据和总结报告进行严格的监督、调查与审阅，以保证试验过程与试验结果的可信性。

* 1. **试验关键日期**

专题启动日期：2018-12-04；

测试开始日期：2018-12-05；

测试结束日期：2019-01-10；

专题结束日期：2019-01-19。

# 验证参数说明

|  |  |
| --- | --- |
| 分析方法 | LC-MS/MS法 |
| 分析方法编号 | sbk002-BA01 |
| 分析物 | sbk002 |
| 内标（IS） | Tolbutamide |
| 种属 | Beagle犬 |
| 基质 | Beagle犬空白血浆 |
| 抗凝剂 | EDTA-K2抗凝、TCEP抗氧化 |
| 标准曲线范围 | 0.5 ~ 500.0 ng/mL |
| 准确度与精密度 | 定量下限（LLOQ）：0.5 ng/mL；  低浓度质控（LQC）：1.5 ng/mL ；  中浓度质控（MQC）：25.0 ng/mL；  高浓度质控（HQC）： 375.0 ng/mL。 |
| 提取回收率与基质效应 | 6个不同来源的生物基质（LQC、MQC和HQC） |
| 选择性 | 6个不同来源的生物基质 |
| 溶血评价 | 溶血基质（LQC和HQC） |
| 稀释回收率 | 稀释因子10 |
| 全血样品冰盒稳定性 | 冰盒放置4 h |
| 血浆样品冰盒放置稳定性 | 冰盒放置4 h |
| 血浆样品室温放置稳定性 | 室温放置1 h |
| 血浆样品冻融循环稳定性 | 3次冻融循环 |
| 血浆样品长期冻存稳定性 | - 60 ℃以下放置36天 |
| 血浆样品处理后样品稳定性 | 处理后2 ~ 8 ℃放置2天 |
| 储备液稳定性 | 2 ~ 8 ℃放置36天 |
| 批最大样品数 | 90个 |



# 试验材料与方法

1. 1. **标准品**

名称/代号： sbk002-D；

含量：99.6 %；

性状：类白色结晶性粉末；

分子量：337.82 g/mol；

批号：180704；

有效期至：2020-08-07；

保存条件：15 ~ 25 ℃、密闭、遮光、干燥；

提供单位：成都施贝康生物医药科技有限公司；

生产厂家：成都施贝康生物医药科技有限公司；

防护措施：使用该供试品时按照《职业卫生与防护手册》来操作，包括穿防护衣、戴口罩、手套；

剩余标准品处理：退回委托方。

* 1. **内标**

名称/代号：Tolbutamide；

含量：99.8 %；

性状：白色粉末；

分子量：270.35 g/mol；

批号：SLBR5486V；

有效期至：2019-06-08；

保存条件：遮光、室温、密闭；

生产单位：Sigma-Aldrich；

防护措施：使用该供试品时按照《职业卫生与防护手册》来操作，包括穿防护衣、戴口罩、手套；

剩余标准品处理：退回委托方。

* 1. **主要试剂**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 试剂名称 | 试剂级别 | 货号 | 生产厂家 | 批号 |
| 灭菌注射用水 | / | / | 四川科伦药业股份有限公司 | M18080905-3、M18090606-1 |
| 甲醇 | HPLC | A452 | Fisher Scientific | 178511、185366 |
| 乙腈 | HPLC | A998 | Fisher Scientific | 184265、184266、184263 |
| 2-丙醇 | HPLC | A451 | Fisher Scientific | 179266、180734 |
| 甲酸 | LC/MS | A117 | Fisher Scientific | 182088 |
| 二甲基亚砜 | HPLC | D159 | Fisher Scientific | 173815TF |
| 0.01M PBS | / | BL601A | biosharp | 183666 |
| TCEP | / | T107252 | 阿拉丁 | D1803047 |

注：TCEP即Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride。

生物基质：EDTA-K2抗凝、TCEP抗氧化的Beagle犬空白血浆；来源：苏州华测生物技术有限公司自制；血液处理条件：2 ~ 8 ℃、4000 r/min条件下离心10 min，分离上层血浆；血浆保存条件：- 60 ℃以下保存。

* 1. **主要仪器**

| 名称 | 型号 | 生产厂家 |
| --- | --- | --- |
| 液质联用仪 | ACQUITY UPLC I-Class + Xevo TQ-S | Waters |
| 色谱柱 | Kinetex® 1.7 μm C18 100 Å  100 × 2.1 mm | Phenomenex |
| 分析天平 | XSE105DU | METTLER TOLEDO |
| 台式高速冷冻离心机 | 5810R/5804R | Eppendorf |
| 超声波清洗机 | SB-5200DT | 宁波新芝生物科技股份  有限公司 |
| 数显型1000MP微孔板摇床 | ENFO-980179 | Talboys |
| 漩涡振荡器 | LP Vortex Mixer | Thermo Scientific |
| 移液工作站 | SPB-096-0500-02 | APRICOT EDSIGNS |
| 医用低温箱 | MDF-U3386S | Sanyo |
| 大容量环境实验箱 | MPR-721R-PC | Panasonic |
| 恒温培养振荡器 | ZWY-110X50 | 上海智诚分析仪器制造  有限公司 |

* 1. **分析方法**

标准曲线样品、质控样品或其他验证样品加入内标工作液和蛋白沉淀剂进行蛋白沉淀，混匀并离心后吸取上清液，再对上清液进行稀释后，使用液质联用仪检测样品中sbk002的浓度。具体分析方法见“LC-MS/MS法定量测定Beagle犬血浆中sbk002的方法（分析方法编号：sbk002-BA01）”。sbk002储备液首次配制定日期义为试验第1天（D1）。

# 方法学验证

* 1. **系统适应性**

使用空白生物基质单独制备中浓度质控样品（MQC）一份并前处理，在每个分析批前连续进样8针。要求最后6次的sbk002与内标峰面积之比及保留时间的CV（变异系数，标准偏差/平均值×100 %）小于10 %。

* 1. **标准曲线**

使用混合空白生物基质新鲜配制含不同浓度分析物的标准曲线样品，每个浓度平行处理两份进行分析。在分析批的开始和最后各测一组标准曲线样品。应至少配制6 个浓度标准曲线样品，不包括空白基质样品（（不含分析物和内标的基质样品）和零浓度样品（含内标的基质样品）。

线性范围为0.5 ~ 500.0 ng/mL，浓度分别为：0.5、1.0、5.0、10.0、50.0、100.0、400.0和500.0 ng/mL。以待测物的浓度为横坐标，以待测物与内标的峰面积之比为纵坐标，用加权最小二乘法（W=1/X2）进行回归计算，求得直线回归方程，即为标准曲线，回归系数（R2）应大于0.98。

标准曲线样品的准确度（实测值与理论值的比值）应在85 % ~ 115 %之间（定量下限的准确度应在80 % ~ 120 %之间）。至少75 %标准曲线样品，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上述标准，应该拒绝这个标样（不能同时舍弃定量下限或定量上限的所有样品），并重新计算不含该标样的标准曲线，进行回归分析。在方法验证中，至少应该评价3个分析批的标准曲线。

同时测定几个分析物时，每个分析物都应有二条标准曲线。如果一个分析批对一个分析物可接受，但对另一个分析物不能接受，则可接受的分析物的数据可被使用，而被拒绝的分析物应重新提取并测定。

* 1. **准确度与精密度**

使用混合空白生物基质制备四个浓度的质控样品（LLOQ、LQC、MQC和HQC的浓度分别为0.5、1.5、25.0和375.0 ng/mL）并进行前处理，每一浓度平行制备6份样品，不同天重复测定三个独立分析批。以当批的标准曲线计算QC样品的浓度，并以此求算方法的精密度和准确度。质控样品应使用另行配制的储备液，与校正标样分开配制。

准确度描述该分析方法实测浓度与理论浓度的接近程度，以（实测浓度/理论浓度）× 100 % 表示。精密度描述分析物重复测定的接近程度，以变异系数（CV）表示。

批内准确度：各浓度准确度的平均值应在85 % ~ 115 %之间（LLOQ准确度的平均值应在80 % ~ 120 %之间），每一浓度至少5个QC样品的准确度应符合上述要求。

批间准确度：3个独立的分析批之间，各浓度准确度的平均值应在85 % ~ 115 %之间（LLOQ准确度的平均值应在80 % ~ 120 %之间）。

批内精密度：分析批内各浓度的QC样品的CV应在15 %以内（LLOQ的CV应在20 %以内）。

批间精密度：3个独立的分析批之间，各浓度的QC样品的CV应在15 %以内（LLOQ的CV应在20 %以内）。

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，但是明显存在失误的情况除外。

* 1. **定量下限**

在一个分析批内考察6份前处理后的LLOQ样品。至少5个LLOQ样品准确度应在80 % ~ 120 %之间，平均准确度应在80 % ~ 120 %之间，精密度CV（%）应在20 %以内。

* 1. **选择性**

选择性描述该分析方法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的能力。

空白基质样品（Matrix BLK）：将6个不同来源（均雄性）的空白生物基质进行前处理（用甲醇代替内标工作液）后，进样分析。要求空白样品在sbk002及内标保留时间处无干扰峰或干扰峰峰面积小于LLOQ样品峰面积的20 %和内标峰面积的5 %；

零浓度样品（Zero STD）：将6个不同来源（均雄性）的空白生物基质进行前处理后，进样分析。要求零浓度样品在sbk002保留时间处无干扰峰或干扰峰峰面积小于LLOQ样品峰面积的20 %；

sbk002样品：用6个不同来源（均雄性）的空白生物基质配制HQC样品进行前处理（用甲醇代替内标工作液）后，进样分析。要求sbk002样品在内标保留时间处无干扰峰或干扰峰峰面积小于内标峰面积的5 %。

* 1. **系统残留**

运行定量上限样品（ULOQ）后，再运行1个空白基质样品（Matrix BLK），考察3次。要求此空白基质样品（Carryover）应在sbk002及内标保留时间处无干扰峰或干扰峰峰面积分别小于等于LLOQ样品分析物峰面积的20 %和内标峰面积的5 %。

* 1. **提取回收率与基质效应**

**（1）配制方法：**

提取样品：分别用6个不同来源（均雄性）的生物基质，制备三个浓度的质控样品（R-LQC、R-MQC和R-HQC）并进行前处理，每一浓度平行制备6份。

基质样品：分别对来自6个不同来源（均雄性）的生物基质进行蛋白沉淀，提取完成后向空白基质提取物中加入sbk002和内标的溶液，获得三个浓度的基质样品（M-LQC、M-MQC和M-HQC）并完成处理，每一浓度平行制备6份。此基质样品与无基质样品的理论浓度一致。

无基质样品：用100 mM PBS代替生物基质，制备三个浓度的质控样品（N-LQC、N-MQC和N-HQC）并进行前处理，每一浓度平行制备6份。

**（2）计算公式：**

分析物提取回收率（Recovery %）=（提取样品中分析物峰面积）/（基质样品中分析物峰面积的平均值）×100 %；

内标提取回收率（Recovery %）=（提取样品中内标峰面积）/（基质样品中内标峰面积的平均值）×100 %；

相对回收率（Relative Recovery %）= （分析物提取回收率）/（内标提取回收率）×100 %。

分析物基质效应（Matrix effect %）=（基质样品中分析物峰面积）/（无基质样品中分析物峰面积的平均值）× 100 %；

内标基质效应（Matrix effect %）=（基质样品中内标峰面积）/（无基质样品中内标峰面积的平均值）× 100 %；

归一化基质效应（IS-normalised Matrix effect%）= （分析物基质效应 ）/（内标基质效应）×100 %。

**（3）接受标准：**

提取回收率接受标准：对于分析物，每个浓度6个样品的回收率的CV应在15 %以内；对于内标，所有样品回收率的CV应在15 %以内。相对回收率的CV应在15 %以内。

基质效应接受标准：对于分析物，每个浓度6个样品的基质效应的CV应在15 %以内；对于内标，所有样品基质效应的CV应在15 %以内。归一化基质效应的CV应在15 %以内。

* 1. **溶血评价**

将EDTA-K2抗凝、TCEP抗氧化的Beagle犬空白全血放入- 60 ℃以下冰箱中冻存至少30 min使红细胞破碎，取出全血室温融化后，4 ℃、4000 r/min条件下离心10 min，分离上层红色血浆。在空白基质中加入2 %此红色血浆，制得溶血生物基质。用此溶血生物基质制备两个浓度的质控样品（LQC和HQC）并进行前处理，每一浓度6样品。

要求每一浓度的至少5个溶血QC样品的准确度应在85 % ~ 115 %之间，每一浓度的溶血QC样品的CV应不大于15 %。

* 1. **稀释回收率**

使用混合空白生物基质制备8倍定量上限浓度的高浓度样品（8-ULOQ），再用空白生物基质将8-ULOQ稀释10倍，得稀释样品（Dilution）。平行制备6份稀释样品，按前处理方法处理后进样分析。

稀释回收率 = 实测浓度/理论浓度×100 %（实测浓度为回算浓度乘以稀释倍数）。

至少5个稀释样品的准确度应在85 % ~ 115 %之间，准确度的平均值应在85 % ~ 115 %之间，精密度（CV）应在15 %以内。

* 1. **稳定性**

稳定性验证应涵盖将来的实际样品在取得分析结果前的各种储存和分析条件。稳定性验证必须使用新鲜配制的标准曲线来计算回收率。如果某个稳定性测试不符合接受标准，（1）可以在2个不同的分析批中进行2次复测，如果复测仍然不能通过，需进行更短时间的稳定性考察；（2）也可以选择不做复测，而直接进行更短时间的稳定性考察。

* + 1. **全血样品稳定性**

考察sbk002全血样品冰盒稳定性。

具体操作方法：用新鲜采集的EDTA-K2抗凝、TCEP抗氧化的Beagle犬空白全血，制备中浓度的质控样品（MQC），轻柔混匀约10 min，冰盒放置4 h（n = 5），放置后全血样品与新鲜配制的全血样品均在4 ℃、4000 r/min条件下离心10 min，分离上层血浆，再按样品前处理方法处理后，进样考察稳定性。稳定性全血样品的平均峰面积与新鲜全血样品平均峰面积的比值在85 % ~ 115 %之间视为稳定。

* + 1. **血浆样品处理前稳定性**

考察sbk002血浆样品的稳定性，包括：血浆样品冰盒短期放置稳定性、室温短期放置稳定性、冻融循环稳定性和长期冻存稳定性。

具体操作方法：制备2个浓度的质控样品（LQC和HQC）。分别在冰盒放置4 h（n = 5）、室温放置1 h（n = 5）、冻融循环（室温融化后至少冻存12 h）三次（n = 5）、-60 ℃以下放置36天（n = 5），按样品前处理方法处理后，进样考察稳定性（以回收率表示）。

回收率 = 平均实测浓度 / 理论浓度 × 100 %，分析物的回收率在85 % ~ 115 %之间视为样品稳定。

* + 1. **血浆样品处理后稳定性**

考察sbk002血浆样品前处理后的稳定性。

具体操作方法：制备2个浓度的质控样品（LQC和HQC）并进行前处理，2 ~ 8 ℃放置2天（n = 5），进样考察稳定性（以回收率表示）。

回收率 = 平均实测浓度/理论浓度 × 100 %，分析物的回收率在85 % ~ 115 %之间视为样品稳定。

* + 1. **储备液稳定性**

考察sbk002和内标储备液在2 ~ 8 ℃条件下的稳定性。具体操作方法：将配制好的sbk002和内标储备液2 ~ 8 ℃放置36天后，配制新鲜的sbk002和内标储备液，按照“无基质样品”的配制方法，用放置后的储备液和新鲜配制的储备液分别配制质控样品MQC（n = 5），进样考察稳定性。两者的峰面积平均值的偏差在± 10 %之内视为稳定。

* 1. **试验样品再分析**

方法学验证中使用的标准曲线和质控样品可能无法完全模拟实际试验样品，因此，需要在试验样品测试结束后在另外一个分析批中重新分析试验样品，来评价试验样品测定的重现性。试验样品再分析（Incurred Sample Reanalysis，ISR）测定值仅作为试验样品再分析的重现性数据使用，不作为实际样品的复测数据。

ISR选择的样品为Cmax附近和消除相的样品，其样品数不低于待检测样品总数的10 %；如样品总数超出1000，则超出部分的重分析量不低于超出部分的5 %。至少2/3的ISR样品需满足：[(ISR测定值-首次测定值) / 两次测定值的平均值] × 100 % 的结果在 ± 20 % 内。

* 1. **批最大样品数**

选取合格的分析批中低、中、高三个质控浓度（1.5、25.0、375.0 ng/mL）的准确度和精密度样品反复进样5次，考察一个分析批所能承载的最大样品数。

各浓度准确度的平均值应在85 % ~ 115 %之间，精密度（CV）应在15 %以内。

# 数据采集和分析

设施内的所有原始数据根据试验方案和苏州华测生物技术有限公司的SOP手动收集或用数据采集系统收集。手动收集的数据转录到Excel表格中用来分析和报告。收集和报告电子数据的采集系统如下：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **系统** | **版本** | **用途** |
| Waters Unifi | 1.7.0.064 | LC-MS/MS检测浓度 |
| Microsoft Excel | 2010 | 计算均值、标准差、变异系数等 |

5. **统计分析**

数据经Microsoft Excel 2010录入和计算，并列表进行分析。



# 结果

本研究中sbk002检测分析合计9批，所有分析批均合格。试验结果见附表1。

4. 1. **系统适应性**

试验结果见附表2。

sbk002与其内标峰面积之比的CV在0.59 % ~ 2.21 % 之间；sbk002保留时间的CV在0.00 % ~ 0.14 %之间；内标保留时间的CV在0.00 % ~ 0.27 %之间。

* 1. **标准曲线**

试验结果见附表3和附图1。

在标准曲线的线性范围（0.5 ~ 500.0 ng/mL）内，除超限样品外，其余样品准确度在91.00% ~ 108.22 %之间（LLOQ的准确度在92.00 % ~ 112.00 %之间），回归系数（R2）均大于0.99。

* 1. **准确度与精密度**

试验结果见附表4和附表5。

批内准确度：各浓度QC样品准确度的平均值在86.79 % ~ 98.36 %之间（LLOQ的平均准确度在91.33 % ~ 103.00 %之间）；所有QC样品的准确度均在85 % ~ 115 %之间（LLOQ的准确度在80 % ~ 120 %之间）；批间准确度：各浓度QC样品准确度的平均值在90.11 % ~ 92.23 %之间（LLOQ的平均准确度为96.22 %）；批内精密度：各浓度QC样品的精密度（CV）在1.48 % ~ 3.50 %之间（LLOQ的CV在3.40 % ~ 10.61 %之间）；批间精密度：各浓度QC样品的CV在3.85 % ~ 5.47 %之间（LLOQ的CV为8.40 %）。

* 1. **定量下限**

试验结果见附表4、附表5和附图5。

定量下限样品平均准确度在91.33 % ~ 103.00 %之间，CV在3.40 % ~ 10.61 %之间。所有定量下限样品准确度均在80 % ~ 120 %之间。

* 1. **选择性**

试验结果见附表6、附图2 ~ 附图4。

空白基质样品（Matrix BLK）在sbk002及内标保留时间处均无干扰峰；

零浓度样品（Zero STD）在sbk002保留时间处无干扰峰；

sbk002样品在内标保留时间处无干扰峰。

* 1. **系统残留**

试验结果见附表7和附图6。

Carryover样品在sbk002及内标保留时间处均无干扰峰。

* 1. **提取回收率与基质效应**

试验结果见附表8 ~ 附表11。

sbk002提取回收率的CV在2.04 % ~ 3.70 %之间，内标提取回收率的CV为1.44 %，sbk002相对回收率CV在1.89 % ~ 4.67 %之间；sbk002基质效应的CV在0.88 % ~ 3.16 %%之间，内标基质效应的CV为1.37 %，sbk002归一化基质效应的CV在1.09 % ~ 2.92 %之间。

* 1. **溶血评价**

试验结果见附表12。

溶血样品（低浓度质控和高浓度质控）准确度分别为99.11 % 和97.73 %，CV分别为6.57 %和1.96 %。所有溶血样品的准确度均在85 % ~ 115 %之间。

* 1. **稀释回收率**

试验结果见附表13。

8倍定量上限样品稀释10倍平均稀释回收率为109.21 %，CV为3.67 %。所有稀释样品的准确度均在85 % ~ 115 %之间。

* 1. **稳定性**






  9. 1. **全血样品冰盒稳定性**

试验结果见附表14。

全血样品冰盒放置4 h后与新鲜全血样品平均峰面积（中浓度质控）的比值为98.85 %。

* + 1. **血浆样品处理前稳定性**

试验结果见附表15。

sbk002血浆样品（低浓度质控和高浓度质控）冰盒放置4 h的回收率分别为100.00 %和98.49 %；室温放置1 h的回收率分别为102.13 %和99.39 %；冻融循环三次的回收率分别100.27 % 和99.33 %；- 60 ℃以下放置36天的回收率分别为96.40 %和97.75 %。

* + 1. **血浆样品处理后稳定性**

试验结果见附表16。

sbk002血浆样品（低浓度质控和高浓度质控）处理后2 ~ 8 ℃放置2天的回收率分别99.33 %和99.17 %。

* + 1. **储备液稳定性**

试验结果见附表17。

sbk002和内标储备液在 2 ~ 8 ℃放置36天后与新鲜储备液的峰面积（按照“无基质样品”的配制方法配制MQC）的平均值进行比较，sbk002平均偏差为-6.69 %，内标平均偏差为0.06 %。

* 1. **试验样品再分析ISR**

试验样品再分析的血样来自专题“Beagle犬经口给予sbk002片及硫酸氢氯吡格雷片药代动力学试验（专题编号：A2018030-K01-01）”，试验结果见附表18。

药代样品总数为224个（不包括备份样品），ISR检测样品数为32个，其中32个 ISR样品满足重现性要求，通过率为100 %。

* 1. **批最大样品数**

试验结果见附表19。

最大样品数为90时，各浓度QC样品准确度的平均值在95.70 % ~ 98.92 %之间，CV在2.22 % ~ 3.86 %之间。

# 结论

本试验建立的LC-MS/MS方法在0.5 ~ 500.0 ng/mL范围内线性良好，系统适应性、标准曲线、准确度与精密度、定量下限、选择性、系统残留、提取回收率与基质效应、溶血评价、稀释回收率均符合生物样品分析的要求。全血样品冰盒放置4 h 稳定；血浆样品处理前冰盒放置4 h、处理前室温放置1 h、冻融循环三次、- 60 ℃以下放置36天、处理后2 ~ 8 ℃放置2天均稳定；sbk002和内标储备液2 ~ 8 ℃放置36天稳定； ISR可重现；一个分析批最大样品数为90。

综上所述， LC-MS/MS法定量测定Beagle犬血浆中sbk002的分析方法可用于EDTA-K2抗凝、TCEP抗氧化的Beagle犬血浆中sbk002浓度的检测。

# 试验方案、偏离和变更

本试验产生1个偏离试验方案的情况，该偏离属于试验日程的偏离，对专题的质量无影响，偏离记录见附件三。本专题未产生试验方案的变更，试验方案见附件四。

# 资料保存

2. 1. **归档时间及档案保存时间**

（1）试验结束后2周内，专题负责人确保所有研究资料移交至档案室归档。

（2）本研究如用于注册申报，其档案保存期为药物上市后至少五年；本研究如不用于注册申报，其档案保存期为试验报告批准日后至少五年。

* 1. **归档内容**

**包括但不限于以下内容：**

* 专题负责人任命书
* 试验方案
* 与试验有关的各种书面文件或报告
* 试验原始资料（包括电子资料）
* 总结报告及相关资料
* 其它资料
  1. **保存场所与保存条件**

保存场所：苏州华测生物技术有限公司档案管理部；

保存条件：常规；

联系人：武丽；

联系电话：0512-36801688。

# 主要参考文献

[1] 魏敏吉, 李可欣. 符合法规和指南要求的生物样本分析[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(1): 12

[2] 陈笑燕, 詹燕, 钟大放. 生物样品定量分析方法验证中试验样品再分析的意义和对策[J]. 中国药学杂志, 2014, 13(49): 1176

[3] 刘斌, 张印兵, 岑小波. 生物分析方法验证在药物非临床安全性评价中的应用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(3): 480

[4] 张人杰, 柴逸峰, 朱臻宇, 沈晓航. LC-MS/MS 生物分析中试验样品再分析失败后的调查和解决方案[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(4): 559-564

[5] 魏敏吉, 赵明. 创新药物药代动力学研究与评价[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2008: 269-283, 411-459



# 附录项目

**附件一：附表**

**附表1 分析批汇总表**

**附表2 系统适应性**

**附表3 标准曲线**

**附表4 准确度**

**附表5 精密度**

**附表6 选择性**

**附表7 系统残留**

**附表8 sbk002提取回收率及基质效应**

**附表9 内标提取回收率及基质效应**

**附表10 相对回收率**

**附表11 归一化基质效应**

**附表12 溶血评价**

**附表13 稀释回收率**

**附表14 全血样品冰盒稳定性**

**附表15 血浆样品处理前稳定性**

**附表16 血浆样品处理后稳定性**

**附表17 储备液稳定性**

**附表18 试验样品再分析**

**附表19 最大样品数**

**附件二：附图**

**附图1 LC-MS/MS法定量测定Beagle犬血浆中sbk002的典型标准曲线**

**附图2 Matrix BLK样品中sbk002和内标色谱图**

**附图3 Zero STD样品中sbk002和内标色谱图**

**附图4 sbk002样品中sbk002和内标色谱图**

**附图5 STD1样品中sbk002和内标色谱图**

**附图6 Carryover样品中sbk002和内标色谱图**

**附件三：偏离记录**

**附件四：试验方案**

附件一：附表

**专题名称：LC-MS/MS法定量测定Beagle犬血浆中sbk002的方法学验证试验**

专题编号：A2018030-BA01

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 附表1 分析批汇总表 | | | | | |
| 分析批 | 前处理日期 | 进样日期 | 验证内容 | 是否通过 | 备注 |
| A2018030-BA01\_Run01 | 2018-12-05 | 2018-12-05 | 1、准确度与精密度 2、系统残留 | 是 | NA |
| A2018030-BA01\_Run02 | 2018-12-06 | 2018-12-06 | 1、准确度与精密度 2、系统残留 | 是 | NA |
| A2018030-BA01\_Run03 | 2018-12-10 | 2018-12-10 | 1、准确度与精密度 2、系统残留 | 是 | NA |
| A2018030-BA01\_Run04 | 2018-12-10 | 2018-12-10 | 1、批最大样本数（90个样品） | 是 | NA |
| A2018030-BA01\_Run05 | 2018-12-12 | 2018-12-12 | 1、全血样品冰盒放置4 h稳定性 2、血浆样品冰盒放置4 h稳定性 3、血浆样品室温放置1 h稳定性 4、血浆样品冻融循环3次稳定性 5、血浆样品处理后2 ~ 8 ℃放置2天稳定性 | 是 | NA |
| A2018030-BA01\_Run06 | 2018-12-14 | 2018-12-14 | 1、稀释回收率 2、溶血评价 3、选择性 | 是 | Selectivity-Matrix BLK-3 未通过 |
| A2018030-BA01\_Run07 | 2018-12-16 | 2018-12-16 | 1、选择性 2、提取回收率与基质效应 | 是 | NA |
| A2018030-BA01\_Run08 | 2019-01-01 | 2019-01-01 | 1、试验样品再分析 | 是 | NA |
| A2018030-BA01\_Run09 | 2019-01-10 | 2019-01-10 | 1、血浆样品- 60 ℃以下放置36天 2、储备液2 ~ 8 ℃放置36天 | 是 | NA |

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 附表2 系统适应性 | | | | | |
| 分析批 | sbk002峰面积 /内标峰面积 CV | | sbk002 保留时间 CV | | 内标 保留时间 CV |
| A2018030-BA01\_Run01 | 1.52% | 0.14% | | 0.27% | |
| A2018030-BA01\_Run02 | 1.89% | 0.00% | | 0.00% | |
| A2018030-BA01\_Run03 | 1.72% | 0.00% | | 0.00% | |
| A2018030-BA01\_Run04 | 0.75% | 0.12% | | 0.00% | |
| A2018030-BA01\_Run05 | 0.59% | 0.00% | | 0.00% | |
| A2018030-BA01\_Run06 | 2.21% | 0.00% | | 0.00% | |
| A2018030-BA01\_Run07 | 1.84% | 0.00% | | 0.00% | |
| A2018030-BA01\_Run08 | 1.64% | 0.00% | | 0.00% | |
| A2018030-BA01\_Run09 | 1.94% | 0.00% | | 0.00% | |

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 附表3-1 标准曲线样品浓度（ng/mL） | | | | | | | | | |
| 理论浓度 分析批 | 0.5 | 1.0 | 5.0 | 10.0 | 50.0 | 100.0 | 400.0 | 500.0 | R2 |
| A2018030-BA01\_Run01 | 0.51 | 1.06 | 5.03 | 9.95 | 51.80 | 102.96 | 410.45 | 508.71 | 0.9999 |
| 0.49 | 0.94 | 4.86 | 9.70 | 48.63 | 98.59 | 388.89 | 507.00 |
| A2018030-BA01\_Run02 | 0.49 | 1.05 | 4.81 | 10.78 | 63.22\* | 96.03 | 394.83 | 495.04 | 0.9985 |
| 0.50 | 0.98 | 4.88 | 10.79 | 49.80 | 97.78 | 402.91 | 489.37 |
| A2018030-BA01\_Run03 | 0.49 | 0.98 | 5.27 | 10.50 | 50.01 | 102.36 | 414.70 | 525.12 | 0.9997 |
| 0.51 | 1.03 | 4.56 | 9.33 | 47.88 | 97.59 | 398.16 | 501.01 |
| A2018030-BA01\_Run04 | 0.50 | 0.97 | 5.40 | 10.39 | 50.53 | 102.40 | 414.65 | 535.59 | 0.9992 |
| 0.52 | 0.96 | 4.66 | 9.62 | 45.73 | 97.38 | 392.98 | 504.26 |
| A2018030-BA01\_Run05 | 0.49 | 1.02 | 4.92 | 9.85 | 50.57 | 102.24 | 410.64 | 517.67 | 0.9995 |
| 0.52 | 0.94 | 4.85 | 9.53 | 49.83 | 99.91 | 403.47 | 508.57 |
| A2018030-BA01\_Run06 | 0.56 | 0.98 | 4.80 | 9.90 | 49.76 | 101.47 | 424.10 | 541.08 | 0.9982 |
| 0.46 | 0.96 | 4.73 | 9.60 | 47.52 | 100.52 | 403.77 | 522.40 |
| A2018030-BA01\_Run07 | 0.53 | 0.98 | 4.99 | 10.06 | 50.28 | 100.63 | 399.17 | 517.11 | 0.9992 |
| 0.50 | 0.91 | 4.96 | 9.89 | 49.72 | 99.31 | 415.71 | 499.22 |
| A2018030-BA01\_Run08 | 0.52 | 1.04 | 4.92 | 9.86 | 50.25 | 99.37 | 420.20 | 517.73 | 0.9996 |
| 0.48 | 0.97 | 4.80 | 9.93 | 48.89 | 98.43 | 406.01 | 502.35 |
| A2018030-BA01\_Run09 | 0.55 | 0.95 | 4.83 | 9.75 | 49.85 | 98.72 | 412.60 | 519.71 | 0.9992 |
| 0.46 | 1.01 | 4.85 | 9.81 | 50.66 | 99.46 | 405.94 | 522.51 |
| 注：“\*”表示超出标准曲线接受范围，不纳入统计。 | | | | | | | | | |

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 附表3-2 标准曲线样品准确度（%） | | | | | | | | |
| 理论浓度  （ng/mL） 分析批 | 0.5 | 1.0 | 5.0 | 10.0 | 50.0 | 100.0 | 400.0 | 500.0 |
| A2018030-BA01\_Run01 | 102.00 | 106.00 | 100.60 | 99.50 | 103.60 | 102.96 | 102.61 | 101.74 |
| 98.00 | 94.00 | 97.20 | 97.00 | 97.26 | 98.59 | 97.22 | 101.40 |
| A2018030-BA01\_Run02 | 98.00 | 105.00 | 96.20 | 107.80 | 126.44\* | 96.03 | 98.71 | 99.01 |
| 100.00 | 98.00 | 97.60 | 107.90 | 99.60 | 97.78 | 100.73 | 97.87 |
| A2018030-BA01\_Run03 | 98.00 | 98.00 | 105.40 | 105.00 | 100.02 | 102.36 | 103.68 | 105.02 |
| 102.00 | 103.00 | 91.20 | 93.30 | 95.76 | 97.59 | 99.54 | 100.20 |
| A2018030-BA01\_Run04 | 100.00 | 97.00 | 108.00 | 103.90 | 101.06 | 102.40 | 103.66 | 107.12 |
| 104.00 | 96.00 | 93.20 | 96.20 | 91.46 | 97.38 | 98.25 | 100.85 |
| A2018030-BA01\_Run05 | 98.00 | 102.00 | 98.40 | 98.50 | 101.14 | 102.24 | 102.66 | 103.53 |
| 104.00 | 94.00 | 97.00 | 95.30 | 99.66 | 99.91 | 100.87 | 101.71 |
| A2018030-BA01\_Run06 | 112.00 | 98.00 | 96.00 | 99.00 | 99.52 | 101.47 | 106.03 | 108.22 |
| 92.00 | 96.00 | 94.60 | 96.00 | 95.04 | 100.52 | 100.94 | 104.48 |
| A2018030-BA01\_Run07 | 106.00 | 98.00 | 99.80 | 100.60 | 100.56 | 100.63 | 99.79 | 103.42 |
| 100.00 | 91.00 | 99.20 | 98.90 | 99.44 | 99.31 | 103.93 | 99.84 |
| A2018030-BA01\_Run08 | 104.00 | 104.00 | 98.40 | 98.60 | 100.50 | 99.37 | 105.05 | 103.55 |
| 96.00 | 97.00 | 96.00 | 99.30 | 97.78 | 98.43 | 101.50 | 100.47 |
| A2018030-BA01\_Run09 | 110.00 | 95.00 | 96.60 | 97.50 | 99.70 | 98.72 | 103.15 | 103.94 |
| 92.00 | 101.00 | 97.00 | 98.10 | 101.32 | 99.46 | 101.49 | 104.50 |
| 注：“\*”表示超出标准曲线接受范围，不纳入统计。 | | | | | | | | |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 附表4 准确度 | | | | |
| 理论浓度 （ng/mL） | 准确度（%） | | | 批间准确度 |
| A2018030\_BA01 \_Run01 | A2018030\_BA01 \_Run02 | A2018030-BA01 \_Run03 | Mean（%） |
| 0.5 | 92.00 | 90.00 | 102.00 | 96.22 |
| 96.00 | 94.00 | 106.00 |
| 108.00 | 92.00 | 100.00 |
| 86.00 | 98.00 | 112.00 |
| 82.00 | 98.00 | 102.00 |
| 84.00 | 94.00 | 96.00 |
| Mean（%） | 91.33 | 94.33 | 103.00 |
| 1.5 | 82.67 | 90.67 | 95.33 | 90.27 |
| 89.33 | 90.67 | 96.67 |
| 89.33 | 92.67 | 93.33 |
| 86.00 | 87.33 | 93.33 |
| 85.33 | 87.33 | 94.67 |
| 90.67 | 134.67\* | 89.33 |
| Mean（%） | 87.22 | 89.73 | 93.78 |
| 25.0 | 88.60 | 89.80 | 96.24 | 90.11 |
| 87.84 | 91.56 | 94.00 |
| 85.60 | 89.08 | 95.04 |
| 86.24 | 89.68 | 95.96 |
| 84.60 | 87.44 | 92.08 |
| 87.88 | 89.40 | 90.96 |
| Mean（%） | 86.79 | 89.49 | 94.05 |
| 375.0 | 87.48 | 92.07 | 102.64 | 92.23 |
| 89.65 | 89.73 | 96.66 |
| 89.19 | 88.10 | 99.05 |
| 84.06 | 90.45 | 98.52 |
| 85.85 | 91.11 | 97.55 |
| 90.17 | 92.16 | 95.74 |
| Mean（%） | 87.73 | 90.60 | 98.36 |
| 注：“\*”表示异常数据，不纳入统计。 | | | | |

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 附表5 精密度 | | | | | | |
| 理论浓度 （ng/mL） | 实测浓度（ng/mL） | | | 批间精密度 | | |
| A2018030  -BA01\_Run01 | A2018030  -BA01\_Run02 | A2018030  -BA01\_Run03 | Mean （ng/mL） | SD （ng/mL） | CV （%） |
| 0.5 | 0.46 | 0.45 | 0.51 | 0.48 | 0.04 | 8.40 |
| 0.48 | 0.47 | 0.53 |
| 0.54 | 0.46 | 0.50 |
| 0.43 | 0.49 | 0.56 |
| 0.41 | 0.49 | 0.51 |
| 0.42 | 0.47 | 0.48 |
| Mean | 0.46 | 0.47 | 0.52 | / | / | / |
| SD | 0.05 | 0.02 | 0.03 |
| CV | 10.61% | 3.40% | 5.32% |
| 1.5 | 1.24 | 1.36 | 1.43 | 1.35 | 0.06 | 4.21 |
| 1.34 | 1.36 | 1.45 |
| 1.34 | 1.39 | 1.40 |
| 1.29 | 1.31 | 1.40 |
| 1.28 | 1.31 | 1.42 |
| 1.36 | 2.02\* | 1.34 |
| Mean | 1.31 | 1.35 | 1.41 | / | / | / |
| SD | 0.05 | 0.04 | 0.04 |
| CV | 3.50% | 2.61% | 2.69% |
| 25.0 | 22.15 | 22.45 | 24.06 | 22.53 | 0.87 | 3.85 |
| 21.96 | 22.89 | 23.50 |
| 21.40 | 22.27 | 23.76 |
| 21.56 | 22.42 | 23.99 |
| 21.15 | 21.86 | 23.02 |
| 21.97 | 22.35 | 22.74 |
| Mean | 21.70 | 22.37 | 23.51 | / | / | / |
| SD | 0.39 | 0.33 | 0.53 |
| CV | 1.79% | 1.48% | 2.27% |
| 375.0 | 328.06 | 345.28 | 384.90 | 345.87 | 18.92 | 5.47 |
| 336.20 | 336.47 | 362.49 |
| 334.46 | 330.36 | 371.43 |
| 315.21 | 339.19 | 369.46 |
| 321.92 | 341.66 | 365.83 |
| 338.13 | 345.61 | 359.03 |
| Mean | 329.00 | 339.76 | 368.86 | / | / | / |
| SD | 9.01 | 5.79 | 9.06 |
| CV | 2.74% | 1.71% | 2.46% |
| 注：“\*”表示异常数据，不纳入统计。 | | | | | | |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 附表6 选择性 | | | |
| 分析批 | 样品 | sbk002峰面积 | 内标峰面积 |
| A2018030-BA01\_Run06 | Selectivity-Matrix BLK-1 | BLOQ | BLOQ |
| Selectivity-Matrix BLK-2 | BLOQ | BLOQ |
| Selectivity-Matrix BLK-3 | 42859\* | BLOQ |
| Selectivity-Matrix BLK-4 | BLOQ | BLOQ |
| Selectivity-Matrix BLK-5 | BLOQ | BLOQ |
| Selectivity-Matrix BLK-6 | BLOQ | BLOQ |
| Selectivity-Zero STD-1 | BLOQ | 1308731 |
| Selectivity-Zero STD-2 | BLOQ | 1385913 |
| Selectivity-Zero STD-3 | BLOQ | 1281092 |
| Selectivity-Zero STD-4 | BLOQ | 1374280 |
| Selectivity-Zero STD-5 | BLOQ | 1305055 |
| Selectivity-Zero STD-6 | BLOQ | 1371272 |
| Selectivity-sbk002-HQC-1 | 32336829 | BLOQ |
| Selectivity-sbk002-HQC-2 | 31416351 | BLOQ |
| Selectivity-sbk002-HQC-3 | 31590949 | BLOQ |
| Selectivity-sbk002-HQC-4 | 31833597 | BLOQ |
| Selectivity-sbk002-HQC-5 | 31700285 | BLOQ |
| Selectivity-sbk002-HQC-6 | 29460662 | BLOQ |
| A2018030-BA01\_Run07 | Selectivity-Matrix Blank-1 | BLOQ | BLOQ |
| Selectivity-Matrix Blank-2 | BLOQ | BLOQ |
| Selectivity-Matrix Blank-3 | BLOQ | BLOQ |
| 注：\*表示A2018030-BA01\_Run06中Selectivity-Matrix BLK-3为异常结果，于A2018030-BA01\_Run07中以对应动物空白血浆作为空白生物基质前处理三个平行样品，进样分析。 | | | |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 附表7 系统残留 | | | |
| 分析批 | 样品 | sbk002峰面积 | 内标峰面积 |
| A2018030-BA01\_Run01 | Carryover-1 | BLOQ | BLOQ |
| Carryover-2 | BLOQ | BLOQ |
| A2018030-BA01\_Run02 | Carryover-1 | BLOQ | BLOQ |
| Carryover-2 | BLOQ | BLOQ |
| A2018030-BA01\_Run03 | Carryover-1 | BLOQ | BLOQ |
| Carryover-2 | BLOQ | BLOQ |

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 附表8 sbk002提取回收率及基质效应 | | | | | |
| 理论浓度 （ ng/mL） | 提取样品 峰面积 | 基质样品 峰面积 | 无基质样品 峰面积 | 提取回收率 (%) | 基质效应 (%) |
| 1.5 | 135901 | 142610 | 140130 | 97.20 | 99.47 |
| 148420 | 139239 | 137957 | 106.15 | 97.12 |
| 141048 | 146244 | 147625 | 100.88 | 102.01 |
| 135970 | 137298 | 141058 | 97.25 | 95.77 |
| 137183 | 140141 | 146863 | 98.12 | 97.75 |
| 134868 | 133379 | 146559 | 96.46 | 93.03 |
| Mean | | | | 99.34 | 97.53 |
| SD | | | | 3.68 | 3.08 |
| CV | | | | 3.70 | 3.16 |
| 25.0 | 2144922 | 2161264 | 2199322 | 99.59 | 98.11 |
| 2192084 | 2139085 | 2171433 | 101.78 | 97.10 |
| 2213745 | 2138264 | 2185822 | 102.78 | 97.06 |
| 2297634 | 2152804 | 2201838 | 106.68 | 97.72 |
| 2235829 | 2143292 | 2226939 | 103.81 | 97.29 |
| 2249235 | 2188029 | 2232532 | 104.43 | 99.32 |
| Mean | | | | 103.18 | 97.77 |
| SD | | | | 2.42 | 0.86 |
| CV | | | | 2.34 | 0.88 |
| 375.0 | 34833726 | 33142606 | 33963481 | 105.63 | 97.55 |
| 33309888 | 32281700 | 33671420 | 101.01 | 95.02 |
| 34887284 | 32951022 | 33971793 | 105.79 | 96.99 |
| 34381068 | 33447109 | 33991507 | 104.26 | 98.45 |
| 34897671 | 33055371 | 33383376 | 105.82 | 97.30 |
| 33601750 | 32989260 | 34861133 | 101.89 | 97.10 |
| Mean | | | | 104.07 | 97.07 |
| SD | | | | 2.13 | 1.13 |
| CV | | | | 2.04 | 1.17 |

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 附表9 内标提取回收率及基质效应 | | | | | |
| sbk002理论浓度 （ ng/mL） | 提取样品 峰面积 | 基质样品 峰面积 | 无基质样品 峰面积 | 提取回收率 (%) | 基质效应 (%) |
| 1.5 | 2175308 | 2019364 | 2178266 | 106.27 | 95.08 |
| 2121394 | 2039072 | 2104405 | 103.64 | 96.01 |
| 2201325 | 2080116 | 2116788 | 107.54 | 97.94 |
| 2142798 | 2085283 | 2119394 | 104.68 | 98.18 |
| 2130644 | 2042942 | 2089563 | 104.09 | 96.19 |
| 2199515 | 2014700 | 2134704 | 107.46 | 94.86 |
| 25.0 | 2159180 | 2031487 | 2057181 | 106.44 | 96.99 |
| 2161943 | 2018660 | 2070751 | 106.58 | 96.38 |
| 2133785 | 2004386 | 2120096 | 105.19 | 95.70 |
| 2215910 | 2058235 | 2097959 | 109.24 | 98.27 |
| 2159303 | 2032177 | 2087111 | 106.45 | 97.02 |
| 2153468 | 2026024 | 2134185 | 106.16 | 96.73 |
| 375.0 | 2224156 | 2062431 | 2053346 | 109.12 | 99.43 |
| 2145960 | 2020438 | 2034052 | 105.29 | 97.41 |
| 2164468 | 2051112 | 2079158 | 106.20 | 98.89 |
| 2187045 | 2007373 | 2131113 | 107.30 | 96.78 |
| 2135616 | 2037076 | 2047774 | 104.78 | 98.21 |
| 2158239 | 2050676 | 2099630 | 105.89 | 98.87 |
| Mean | | | | 106.24 | 97.16 |
| SD | | | | 1.53 | 1.33 |
| CV | | | | 1.44 | 1.37 |

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 附表10 相对回收率 | | | | | | |
| 理论浓度 （ng/mL） | sbk002 提取回收率(%) | 内标 提取回收率(%) | 相对 回收率(%) | Mean (%) | SD (%) | CV (%) |
| 1.5 | 97.20 | 106.27 | 91.46 | 94.10 | 4.40 | 4.67 |
| 106.15 | 103.64 | 102.42 |
| 100.88 | 107.54 | 93.80 |
| 97.25 | 104.68 | 92.90 |
| 98.12 | 104.09 | 94.26 |
| 96.46 | 107.46 | 89.77 |
| 25.0 | 99.59 | 106.44 | 93.56 | 96.72 | 1.83 | 1.89 |
| 101.78 | 106.58 | 95.50 |
| 102.78 | 105.19 | 97.71 |
| 106.68 | 109.24 | 97.66 |
| 103.81 | 106.45 | 97.52 |
| 104.43 | 106.16 | 98.37 |
| 375.0 | 105.63 | 109.12 | 96.80 | 97.79 | 2.04 | 2.09 |
| 101.01 | 105.29 | 95.93 |
| 105.79 | 106.20 | 99.62 |
| 104.26 | 107.30 | 97.16 |
| 105.82 | 104.78 | 100.99 |
| 101.89 | 105.89 | 96.22 |

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 附表11 归一化基质效应 | | | | | | |
| 理论浓度 （ ng/mL） | sbk002 基质效应(%) | 内标 基质效应(%) | 归一化 基质效应(%) | Mean (%) | SD (%) | CV （%） |
| 1.5 | 99.47 | 95.08 | 104.62 | 101.19 | 2.96 | 2.92 |
| 97.12 | 96.01 | 101.16 |
| 102.01 | 97.94 | 104.15 |
| 95.77 | 98.18 | 97.54 |
| 97.75 | 96.19 | 101.62 |
| 93.03 | 94.86 | 98.07 |
| 25.0 | 98.11 | 96.99 | 101.15 | 100.96 | 1.10 | 1.09 |
| 97.10 | 96.38 | 100.75 |
| 97.06 | 95.70 | 101.43 |
| 97.72 | 98.27 | 99.45 |
| 97.29 | 97.02 | 100.28 |
| 99.32 | 96.73 | 102.68 |
| 375.0 | 97.55 | 99.43 | 98.11 | 98.79 | 1.52 | 1.54 |
| 95.02 | 97.41 | 97.55 |
| 96.99 | 98.89 | 98.08 |
| 98.45 | 96.78 | 101.73 |
| 97.30 | 98.21 | 99.07 |
| 97.10 | 98.87 | 98.21 |

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 附表12 溶血评价 | | | | | |
| 理论浓度 （ng/mL） | 实测浓度 （ng/mL） | 准确度 （%） | Mean (%) | SD (%) | CV (%) |
| 1.5 | 1.35 | 90.00 | 99.11 | 6.51 | 6.57 |
| 1.51 | 100.67 |
| 1.54 | 102.67 |
| 1.52 | 101.33 |
| 1.39 | 92.67 |
| 1.61 | 107.33 |
| 375.0 | 371.57 | 99.09 | 97.73 | 1.92 | 1.96 |
| 360.35 | 96.09 |
| 375.19 | 100.05 |
| 363.42 | 96.91 |
| 371.21 | 98.99 |
| 357.11 | 95.23 |

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 附表13 稀释回收率 | | | | | | |
| 8-ULOQ 理论浓度 （ng/mL） | Dilution 实测浓度 （ng/mL） | 8-ULOQ浓度 （ng/mL） | 回收率 （%） | Mean (%) | SD (%) | CV (%) |
| 4000.0 | 461.61 | 4616.10 | 115.40 | 109.21 | 4.01 | 3.67 |
| 443.97 | 4439.70 | 110.99 |
| 425.33 | 4253.30 | 106.33 |
| 438.86 | 4388.60 | 109.72 |
| 436.47 | 4364.70 | 109.12 |
| 414.81 | 4148.10 | 103.70 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 附表14 全血样品冰盒稳定性 | | |
| 条件 | sbk002 峰面积 | sbk002 平均峰面积 |
| 新鲜配制 | 5955824 | 5984790 |
| 5937006 |
| 5972344 |
| 6031533 |
| 6027242 |
| 冰盒放置4h | 5931708 | 5915797 |
| 5891871 |
| 5919563 |
| 5932328 |
| 5903517 |
| 冰盒放置4 h全血样品平均峰面积/ 新鲜全血样品平均峰面积(%) | 98.85 |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 附表15 血浆样品处理前稳定性 | | | | |
| 条件 | 理论浓度 （ng/mL） | 实测浓度 （ng/mL） | 平均实测浓度 （ng/mL） | 回收率（%） |
| 冰盒 放置4 h | 1.5 | 1.49 | 1.50 | 100.00 |
| 1.53 |
| 1.52 |
| 1.44 |
| 1.52 |
| 375.0 | 376.00 | 369.32 | 98.49 |
| 367.60 |
| 365.26 |
| 371.32 |
| 366.44 |
| 室温 放置1 h | 1.5 | 1.52 | 1.53 | 102.13 |
| 1.54 |
| 1.53 |
| 1.56 |
| 1.51 |
| 375.0 | 369.84 | 372.71 | 99.39 |
| 366.39 |
| 370.60 |
| 380.05 |
| 376.69 |
| 冻融循环 三次 | 1.5 | 1.51 | 1.50 | 100.27 |
| 1.52 |
| 1.52 |
| 1.51 |
| 1.46 |
| 375.0 | 372.26 | 372.47 | 99.33 |
| 370.05 |
| 372.12 |
| 371.86 |
| 376.07 |
| -60 ℃以下 放置36天 | 1.5 | 1.47 | 1.45 | 96.40 |
| 1.41 |
| 1.48 |
| 1.47 |
| 1.40 |
| 375.0 | 364.29 | 366.56 | 97.75 |
| 374.18 |
| 367.62 |
| 368.83 |
| 357.87 |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 附表16 血浆样品处理后稳定性 | | | | |
| 条件 | 理论浓度 （ng/mL） | 实测浓度 （ng/mL） | 平均实测浓度 （ng/mL） | 回收率（%） |
| 2 ~ 8 ℃ 放置2天 | 1.5 | 1.52 | 1.49 | 99.33 |
| 1.49 |
| 1.48 |
| 1.49 |
| 1.47 |
| 375.0 | 372.55 | 371.91 | 99.17 |
| 369.93 |
| 376.38 |
| 370.89 |
| 369.78 |

| 附表17 储备液稳定性 | | | | | |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 条件 | sbk002 峰面积 | 内标 峰面积 | sbk002 平均峰面积 | 平均内标 峰面积 | |
| 新鲜配制 | 1163538 | 1820414 | 1264011 | 1804559 | |
| 1279323 | 1750018 |
| 1432984 | 1820109 |
| 1241691 | 1808293 |
| 1202518 | 1823960 |
| 储备液 2 ~ 8 ℃ 放置36天 | 1136855 | 1852754 | 1179398 | 1805555 | |
| 1142210 | 1759977 |
| 1120060 | 1798517 |
| 1206148 | 1819058 |
| 1291715 | 1797470 |
| 平均偏差（%） | | -6.69 | 0.06 | |
| 注：本表中平均偏差 = (放置后储备液的峰面积的平均值-新鲜配制的储备液的峰面积的平均值)/新鲜配制的储备液的峰面积的平均值。 | | | | | |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 附表18 试验样品再分析 | | | | |
| 样品名称 | 首次测定值 （ng/mL） | ISR测定值 （ng/mL） | 平均值 （ng/mL） | 差异性 （%） |
| D1-1M001-45min | 7.77 | 7.45 | 7.61 | -4.20 |
| D1-1M002-45min | 10.72 | 10.57 | 10.65 | -1.41 |
| D1-1M003-45min | 63.42 | 58.69 | 61.06 | -7.75 |
| D1-1M004-45min | 52.83 | 48.08 | 50.46 | -9.41 |
| D1-2M001-45min | 21.83 | 20.10 | 20.97 | -8.25 |
| D1-2M002-45min | 26.19 | 24.86 | 25.53 | -5.21 |
| D1-2M003-45min | 50.88 | 50.62 | 50.75 | -0.51 |
| D1-2M004-45min | 105.08 | 104.56 | 104.82 | -0.50 |
| D1-1M001-10h | 2.55 | 2.33 | 2.44 | -9.02 |
| D1-1M002-10h | 1.25 | 1.14 | 1.20 | -9.21 |
| D1-1M003-10h | 3.02 | 2.81 | 2.92 | -7.20 |
| D1-1M004-10h | 2.46 | 2.36 | 2.41 | -4.15 |
| D1-2M001-10h | 2.99 | 2.85 | 2.92 | -4.79 |
| D1-2M002-10h | 3.02 | 2.84 | 2.93 | -6.14 |
| D1-2M003-10h | 3.61 | 3.67 | 3.64 | 1.65 |
| D1-2M004-10h | 2.40 | 2.29 | 2.35 | -4.69 |
| D15-1M001-45min | 39.20 | 37.52 | 38.36 | -4.38 |
| D15-1M002-45min | 36.08 | 34.11 | 35.10 | -5.61 |
| D15-1M003-45min | 25.43 | 23.13 | 24.28 | -9.47 |
| D15-1M004-45min | 19.58 | 19.32 | 19.45 | -1.34 |
| D15-2M001-45min | 35.12 | 32.77 | 33.95 | -6.92 |
| D15-2M002-45min | 38.29 | 38.58 | 38.44 | 0.75 |
| D15-2M003-45min | 30.31 | 28.65 | 29.48 | -5.63 |
| D15-2M004-45min | 49.51 | 48.65 | 49.08 | -1.75 |
| D15-1M001-10h | 2.02 | 1.95 | 1.99 | -3.53 |
| D15-1M002-10h | 1.53 | 1.50 | 1.52 | -1.98 |
| D15-1M003-10h | 2.11 | 2.11 | 2.11 | 0.00 |
| D15-1M004-10h | 2.16 | 2.04 | 2.10 | -5.71 |
| D15-2M001-10h | 3.40 | 3.16 | 3.28 | -7.32 |
| D15-2M002-10h | 2.09 | 2.14 | 2.12 | 2.36 |
| D15-2M003-10h | 3.65 | 3.77 | 3.71 | 3.23 |
| D15-2M004-10h | 4.14 | 3.99 | 4.07 | -3.69 |
| ISR样品总数 | 32 | 通过方案要求样品数 | | 32 |
| ISR合格率 | | 100% | | |
| 注：首次测定进样日期2018-12-19、2018-12-20、2018-12-21、2018-12-23；ISR测定进样日期2019-01-01；100 % ISR样品符合方案要求。 | | | | |
|
|

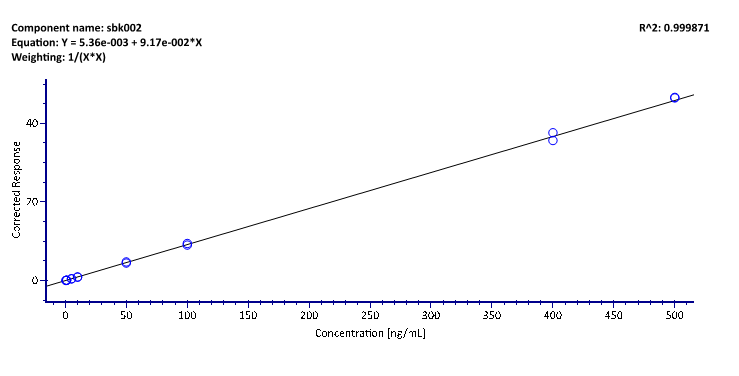
|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 附表19-1 最大样品数-实测浓度 | | | | | | |
| 理论浓度 （ng/mL） | 样品名称 | 实测浓度（ng/mL） | | | | |
| 1.5 | AP-LQC-1 | 1.57 | 1.47 | 1.53 | 1.53 | 1.43 |
| AP-LQC-2 | 1.54 | 1.40 | 1.50 | 1.42 | 1.42 |
| AP-LQC-3 | 1.46 | 1.56 | 1.42 | 1.54 | 1.50 |
| AP-LQC-4 | 1.45 | 1.48 | 1.41 | 1.41 | 1.45 |
| AP-LQC-5 | 1.42 | 1.38 | 1.50 | 1.46 | 1.39 |
| AP-LQC-6 | 1.42 | 1.44 | 1.38 | 1.41 | 1.40 |
| 25.0 | AP-MQC-1 | 25.26 | 24.65 | 24.06 | 24.60 | 23.91 |
| AP-MQC-2 | 24.27 | 24.03 | 24.20 | 24.21 | 23.95 |
| AP-MQC-3 | 23.62 | 23.39 | 23.72 | 23.16 | 23.31 |
| AP-MQC-4 | 24.59 | 24.39 | 23.89 | 24.82 | 24.43 |
| AP-MQC-5 | 23.86 | 23.62 | 23.66 | 23.53 | 23.46 |
| AP-MQC-6 | 23.24 | 23.76 | 23.45 | 23.63 | 23.09 |
| 375.0 | AP-HQC-1 | 390.38 | 393.46 | 384.64 | 382.72 | 385.11 |
| AP-HQC-2 | 365.77 | 368.08 | 370.05 | 364.28 | 367.14 |
| AP-HQC-3 | 374.48 | 378.12 | 373.02 | 375.32 | 371.52 |
| AP-HQC-4 | 371.00 | 372.34 | 363.10 | 374.32 | 366.85 |
| AP-HQC-5 | 363.74 | 370.07 | 361.71 | 367.42 | 363.99 |
| AP-HQC-6 | 364.25 | 364.53 | 359.53 | 363.83 | 357.71 |

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 附表19-2 最大样品数-准确度 | | | | | | | | | |
| 理论浓度 （ng/mL） | 样品名称 | 准确度（%） | | | | | Mean （%） | SD （%） | CV (%) |
| 1.5 | AP-LQC-1 | 104.67 | 98.00 | 102.00 | 102.00 | 95.33 | 97.09 | 3.74 | 3.86 |
| AP-LQC-2 | 102.67 | 93.33 | 100.00 | 94.67 | 94.67 |
| AP-LQC-3 | 97.33 | 104.00 | 94.67 | 102.67 | 100.00 |
| AP-LQC-4 | 96.67 | 98.67 | 94.00 | 94.00 | 96.67 |
| AP-LQC-5 | 94.67 | 92.00 | 100.00 | 97.33 | 92.67 |
| AP-LQC-6 | 94.67 | 96.00 | 92.00 | 94.00 | 93.33 |
| 25.0 | AP-MQC-1 | 101.04 | 98.60 | 96.24 | 98.40 | 95.64 | 95.70 | 2.13 | 2.22 |
| AP-MQC-2 | 97.08 | 96.12 | 96.80 | 96.84 | 95.80 |
| AP-MQC-3 | 94.48 | 93.56 | 94.88 | 92.64 | 93.24 |
| AP-MQC-4 | 98.36 | 97.56 | 95.56 | 99.28 | 97.72 |
| AP-MQC-5 | 95.44 | 94.48 | 94.64 | 94.12 | 93.84 |
| AP-MQC-6 | 92.96 | 95.04 | 93.80 | 94.52 | 92.36 |
| 375.0 | AP-HQC-1 | 104.10 | 104.92 | 102.57 | 102.06 | 102.70 | 98.92 | 2.39 | 2.41 |
| AP-HQC-2 | 97.54 | 98.15 | 98.68 | 97.14 | 97.90 |
| AP-HQC-3 | 99.86 | 100.83 | 99.47 | 100.09 | 99.07 |
| AP-HQC-4 | 98.93 | 99.29 | 96.83 | 99.82 | 97.83 |
| AP-HQC-5 | 97.00 | 98.69 | 96.46 | 97.98 | 97.06 |
| AP-HQC-6 | 97.13 | 97.21 | 95.87 | 97.02 | 95.39 |

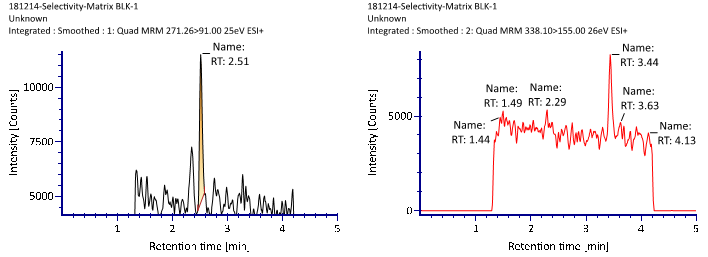
附件二：附图

**专题名称：LC-MS/MS法定量测定Beagle犬血浆中sbk002的方法学验证试验**

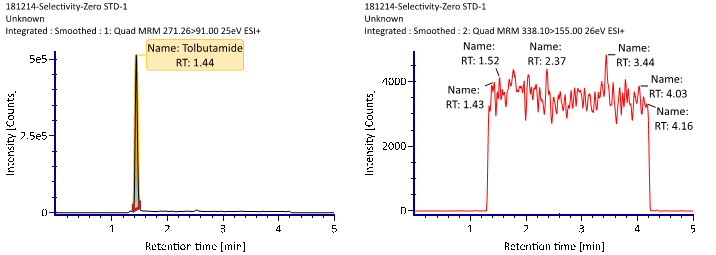
专题编号：A2018030-BA01



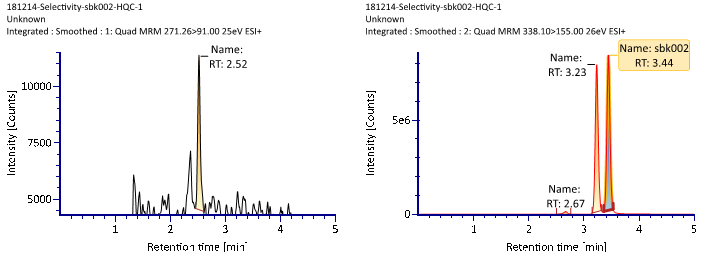
附图1 LC-MS/MS法定量测定Beagle犬血浆中sbk002的典型标准曲线



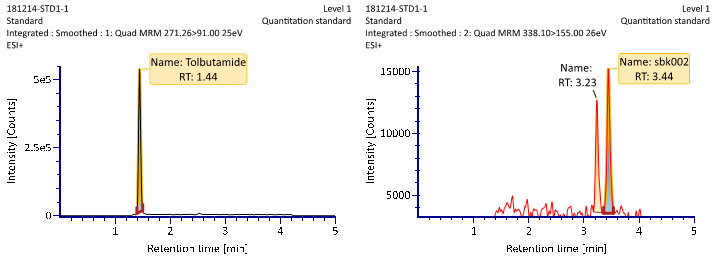
附图2 Matrix BLK样品中sbk002和内标色谱图



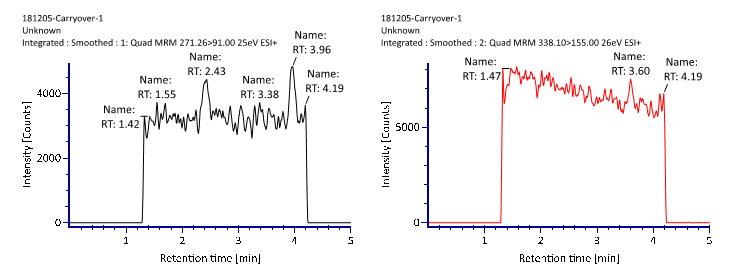
附图3 Zero STD样品中sbk002和内标色谱图



附图4 sbk002样品中sbk002和内标色谱图



附图5 STD1样品中sbk002和内标色谱图



附图6 Carryover样品中sbk002和内标色谱图

附件三：偏离记录

**专题名称：LC-MS/MS法定量测定Beagle犬血浆中sbk002的方法学验证试验**

专题编号：A2018030-BA01

附件四：试验方案

**专题名称：LC-MS/MS法定量测定Beagle犬血浆中sbk002的方法学验证试验**

专题编号：A2018030-BA01