

(7023) 生物測定法之確效指引

1. 前言

生物學測定法（亦稱為生物測定法）是多數生物性與少數非生物性藥品製造與銷售過程中品質評定的一部分，亦通常用於評估藥物效價，有別於化學檢測法，在於其需要生物基質（例如：動物、活細胞或標靶受體之功能性複合物）。因仰賴生物所衍生的多重操作上與生物上之因素，生物測定法通常會比以化學為主的檢測有更大的變異性（variability）。

生物測定法是許多物理化學與生物測試之一，具有控制生物性藥物產品關鍵品質因素的程序與允收基準。如 ICH 指引之“生物技術/生物製劑的測試程序和允收基準（Q6B）”章節之第 2.1.2 小節所述，生物測定法可以測量生物體對產品的生物反應、細胞層次的生化或生理反應、免疫交互作用誘導的酵素反應速率或生物反應、或與配體/受體的結合。隨著新的生物藥物產品與新技術的出現，生物測定法的範圍可能再擴大。因此，本篇通則強調能提供彈性之確效方法，以採納新的生物測定法、新的生物藥物產品或結合兩者用於評估藥物效價。

優良製造規範規定評估藥品符合品質要求的測試方法，應有準確度與可信度等適當標準。測定法確效是一個過程，其係證明與紀

錄程序之功能特性，且方法滿足預期應用之要求，因而確定此測定法適合其預期用途。通則 3068 與相關文獻描述評估小分子藥物程序該使用的測定法功能特性（參數）。儘管對已確定特性的化學藥物產品的多種分析程序的確效參數評估直接易懂，然而某些類型的生物測定法的解釋與適用性仍未清楚地描述。本章節從測量活性而非從質量或其他物理化學測量的觀點講述生物測定法確效，目的是將生物測定法的功能特性與其實際應用相結合。

生物測定法性能的評估為一連續的過程，但應在開發完成時進行生物測定法確效。生物測定法確效是以描述確效研究目標與設計的規程為指引。本篇通則提供關於相對效價生物測定法（relative potency bioassays）的確效目標。相對效價生物測定法係將測試樣品的生物測定反應與指定標準品的生物測定反應相比，可提供測試樣品相對於標準品的生物活性定量測量。

本章節討論的確效參數包括：相對準確度、專一性、中間精密度（intermediate precision, IP）及範圍。實驗室可使用稀釋線性來確認方法的相對準確度與範圍。雖然耐變性並非確效所要求項目之一，但本篇通則建議在確效之前評估生物測定法的耐變性。此外，本篇通則描述確效設計（樣本選擇與重複性策略）、確效允收基準、數據分析與解釋，以及透過品質控制進行最終生物測定法效能監

測等方法。亦討論生物測定法確效結果之文件化，可參考已執行之預確效試驗以最佳化生物測定法的效能。在本篇通則的其他部分，”生物測定法”一詞應解釋為“相對效價生物測定法”。

2. 生物測定法確效之基本原則

生物測定法確效之目的是確認程序的操作特性，並使該程序符合其預期用途。通則 7024 更詳細地描述開發生物測定法所涉及的問題，且在生物測定法確效階段，這些問題應該已解決了。這些決定包括：鑑別測定法中組成物與執行生物測定法。標準品與一或數個測試樣品的多個稀釋度（濃度）構成重複組（亦稱為最小測試組），在每個樣品（測試物與標準品）的每個稀釋度同時含有測試生物基質（例如：一組動物或細胞）。一個測定執行定義為在合理預期具穩定準確度（真實性）與精密度之分析系統階段下執行工作。執行面上，一個測定執行通常由一個實驗室中單一分析員在短時間內（通常是一日內）使用一組設備執行的工作。一個分析是評估相似性，以及估計每個測試樣品相對於標準品的效價的一組數據。一個測定執行可包含多重分析、單一分析或部分分析。多重分析可合併以得到一個樣品的報告數值，並與產品規格進行比較。

在每個稀釋濃度的測定組中（例如：在無邊緣效應的 96 孔細胞培

養盤中含有 6 個樣品，每個樣品有 10 個系列稀釋濃度)，該稀釋濃度組（盤）構成統計區塊，此區塊應是分析與確效分析的元素（通則 7024）。測試樣品的統計區塊內重複性較不具有成本效益。

本章不再討論統計區塊；詳細的討論請見通則 7024。

標準品的活性（效價）最初指定值為 1.0 或 100%，測試樣品的效價可透過與標準品的濃度—反應曲線比對來計算。所得到無單位的測值，是測試樣品相對於標準品效價的相對效價。在某些情況下，標準品指定值是根據其他屬性，如蛋白質濃度而得之，在此情況，測試樣品的效價是相對效價乘以標準品的指定數值。平行線（parallel-line）或平行曲線（parallel-curve）（例如：四個參數的迴歸）的生物測定法是假設使用標準品與測試樣品產生的劑量—反應曲線具有相似（平行）曲線，僅能以其在對數劑量的層級位移區分之。對於斜率生物測定法，由標準品與測試樣品生成的曲線應該是線性的，且有共同的截距，只是斜率不同。有關如何評估平行現象的資訊可參考通則 7024 與通則 4041。

為了建立生物測定法的相對準確度與範圍，可利用標準品系列稀釋建構測試樣品確效來評估稀釋線性（指已知標準品與測試樣品相對效價的線性關係）。此外，確效研究應該能得到相對效價測定變異性的代表性估計值。雖然，在生物測定法開發過程中通常進

行耐變性的研究，這些研究的關鍵因素，例如：培養時間與溫度，以及以細胞為主的生物測定法所用的細胞的繼代數與細胞數等也可納入確效，特別是如果它們與確效過程中導入的其他因素有相互作用（例如：溫度敏感試劑，其敏感度因不同批次而有所改變）。由於生物測定法可能會受到不同次分析的各種變數，例如不同的分析者、儀器或試劑來源等執行間（inter-run）因素潛在影響，因此，生物測定法確效的設計應考量這些因素。這些變異元素加總對效價造成之變異性就定義為生物測定法的中間精密度。針對效價數值的變異性的適當研究包括：試驗內（intra-assay）與執行間）因子的影響，有助於實驗室確認適當的檢測策略並預測報告數值的先天變異性（報告數值可能為多次效價測定之平均值）。變異性的估計值亦可用來制定足以區分生物測定法所測樣品的差異大小（倍數差異）。（請參見 3.4. 以確效結果做生物測定法特性分析）。證明專一性（亦稱為選擇性）須證明沒有基質組成的影響，例如製造過程組成或降解產物，因此僅須定量目標分子。其他分析方法可以輔助生物測定法測量或鑑定樣品的其他組成。

2.1. 生物測定法確效步驟

生物測定法確效步驟應包括確效研究樣品的數量與類型；研究設計，包括執行間與執行中（intra-run）的因子、重複性策略、預

期確效的參數，及每個參數合理的目標允收基準；及數據分析建議方案。關於符合允收基準應注意，未能找到統計上之顯著效應，則不是生物測定法定義可接受性能的適當根據；而使用等效方法評估於確認允收基準則可能較為適宜。

此外，如系統適用性與相似性的分析、測定執行及樣品允收基準應在進行確效之前先行規定。且可視生物測定法發展的程度而定，這些允收基準可以是暫定，且可以由確效所得數據進行更新。分析、測定執行或採樣失敗可以根據確效方案界定的標準重新評估，並在充分的理由下，重新進行整體的確效評估，且可能需要額外的確效試驗方能支持方法的變更。

生物測定法確效方案應包括建議確效參數的目標允收基準。確效方案須規定未達目標允收基準時應採取的步驟，這可能限制生物測定法可測量的效價範圍或調整生物測定法程序重複性策略。

2.2. 生物測定法確效結果的文件化

生物測定法確效結果應記錄在生物測定法確效報告中。確效報告應提供方法適合使用結論的實證，或應指出校正措施（例如：增加重複性策略），以產生足夠可靠結果，證實方法的適用性。該報告可以包括原始數據與中間結果（例如：除了整體中間精密度，也應提供變異成分估計值）此將有助於各別審查者執行生物測定

法確效分析的再現性。如果情況允許，應在每個層級與整體上報告確效參數的估計值。若有偏離確效方案應記錄並說明原因。研究的結論應清楚地描述必要時附上參考的後續追蹤作法。後續追蹤作法可包括：系統或樣品適用性標準的修訂或生物測定法的重複性策略的調整。預確效實驗參考方法也可納為確效研究報告的一部分。預確效實驗可以包括耐變性實驗，如已鑑定的生物測定法參數與已建立的重要參數範圍，亦可包含鑑定實驗，如最終程序已完成常規操作中確認滿意的性能。在開發期間進行的預確效與鑑定實驗的結論有助於描述生物測定法程序的操作特徵。

2.3. 生物測定法確效的設計

生物學測定法確效應包括生物測定法中預定測試的具代表性材料的樣品，並且應有效的建立該程序的性能特徵（performance characteristics）。針對相對準確度，應使用測試樣品相對效價層級（level），這些效價應與生物測定法所測定的效價範圍一致。因此，具廣泛效價範圍的樣品可用於研究具有廣泛規格範圍的藥品或生物製劑，或本質上不穩定的產品，而較窄的範圍可用於較耐久的產品。至少需要測試三個層級，並建議使用五個以進行可靠性評估。如果滿足相對準確度與 IP 的確效標準，則選擇的效價層級將是生物測定法的組成範圍。範圍的限界將由未達到目標

允收基準的層級來產生。樣品可經處理使其落在日常操作中偵測得到的層級內以產生生物測定確效的樣品（即穩定性研究）。此外，樣品基質（例如：賦形劑、加工成分或組合成分）的影響可以透過使用多因素方法刻意改變這些影響因素與目標分析物以進行策略性地研究。通常會在開發期間，於產生釋出與穩定性數據之前，完成此操作。

生物測定法確效設計應考慮測量過程的所有面向。生物測定法測量變異的來源包括：樣品製備、執行中因子及執行間因子。生物測定法變異性的代表性估計需要考慮這些因素。在每次確效之測定執行時，測試樣品與標準品的製備應獨立進行。

確效所使用的重複性策略應反映可能影響效價測量的因素的訊息。執行中的變異性可能的影響因素，包括開發過程中設定的生物測定法操作因素（例如：溫度、pH 及培養時間等）；生物測定法設計（例如：動物數量、稀釋次數、每次稀釋重複次數及稀釋間距等）；分析接受度與樣品允收基準，以及統計分析等（主要試驗指標是每個樣本的相似性評估與參考樣本的效價估計）。操作限制與生物測定法設計（能產生測試材料報告數值的執行中與執行間分析方式）通常需在開發過程明確指定，並且可以成為生物測定法操作過程的一部分。IP 係透過獨立的測定執行來研究，

或許可使用改變那些可能會對實驗過程產生影響的因素之實驗設計。具有巢式或交叉設計結構的實驗，包括那些執行形式化之實驗設計法（design of experiments, DOE）可以揭示實驗過程中變異性的重要來源，以及確保得到長期變異性的代表性估計。在確效期間，不見得需使用能得到測試樣本報告數值的格式。一個結合了執行中與執行間的變異性來源的精心設計確效實驗，可提供生物測定法變異性的獨立組成因素的估計。這些組成因素可用於確定或預測生物測定法格式的變異性。

對確效數據的完整分析應包括：確效參數結果的圖形與統計總結，以及它們與標的允收基準的一致性。分析應遵循確效方案中所列的數據分析計畫的特定細節。多數情況下，應分析對數相對效價以滿足統計方法的假設（參見2.7.統計考量與2.7.1 尺規分析）。這些假設包括數據採樣分佈的常態性與確效觀測到結果範圍內變異性的同質性。可以使用像是箱形圖與概率圖之類的圖形技術來探索這些假設。可以收集適當大小的歷史結果的常態性統計檢測來研究常態性假設。當假設受到質疑時，應尋求其他分析方法。確效參數的信賴區間應使用此處所描述的方法計算之。

2.4. 生物測定法性能特徵的確效策略

生物測定法中應確認的參數是相對準確度、專一性、IP（含可重

複性)及範圍。通則 3068 與 ICH Q2 (R1) 中討論的其他參數，例如偵測極限 (detection limit) 與定量極限 (quantitation limit)，未在此討論，因為它們通常與報告相對效價的生物測定法無關。然而，這些可能與輔助測定的確效相關，像是用於估計反應者或偵測反應與體內 (in vivo) 效價分析。同樣地，線性不是生物測定法確效的一部分，除非它涉及相對準確度 (稀釋線性)。以下為解決生物測定法確效參數的策略。

2.4.1. 相對準確度

相對效價生物測定法的相對準確度是測量的相對效價與已知的相對效價之間的關係。生物測定法的相對準確度是指對數測量的相對效價與對數已知的相對效價之間的單位斜率 (unit slope) (斜率=1)。證明相對效價生物測定法的相對準確度最常用的方法是透過稀釋標準物或已知效價的測試樣品來建構目標效價。此類型的研究通常被稱為稀釋線性研究 (dilutional linearity study)。稀釋線性研究的結果應使用各個層級 (individual levels) 的估計相對偏差與跨越不同層級 (across levels) 的相對偏差趨勢進行評估。各個級別的相對偏差計算如下：

$$\text{相對偏差} = 100 \cdot (\text{測量效價} / \text{目標效價} - 1) \%$$

偏差的趨勢以對數測量效價與對數目標效價的估計斜率來測量，

而對數目標效價應當保持在目標允收基準。如果跨越不同層級的相對偏差沒有趨勢，則每個層級的估計相對偏差可以保持在確效方案中定義的預先指定的目標允收基準(參見 3. 生物測定法確效範例)。

專一性—對於與複雜基質相關的產物或中間物，專一性涉及證明基質組成或可預期存在的產物相關組成不會造成干擾。這可以透過在添加與不添加潛在干擾化合物的情況下平行稀釋標準品來評估。如果曲線相似且效價符合一個標準與標準間

(Standard-to-Standard) 相比的預期，則此生物測定法對化合物具有專一性。對於這些評估，可以使用適當的等效試驗來評估相似性與效價。

專一性也可是生物測定法區分不同但相關的生物藥物分子的能力。應該試著了解分子與其任何相關形式，以及將相關分子導入生物測定法的機會。

中間精密度—由於分析人員、儀器或試劑批次等因素是生物測定法潛在的影響因素，生物測定法確效的設計應包括針對這些因素的評估。生物測定法的 IP 定義為在單一實驗室內於各種正常測試條件下進行整體變異性的測量。IP 通常亦稱為執行間變異性。IP 測量生物測定法實施後隨時間變化的因素之影響。這

些影響通常是不可避免的，包括人員變動（新分析員）、新試劑批次等因素。

計畫使用多因子 DOE 確效時，首先可以圖形方式探索每個因子的影響，以確定其對效價變異性的重要貢獻。重要因素的鑑定應可找出試圖控制其影響的流程，例如進一步限制試驗內分析操作條件或執行間因子，像是分析人員、儀器及試劑批次等的策略性驗證程序（qualification procedures）。

確效研究因素對生物測定法的整體 IP 的貢獻，可以透過對確效結果進行變異成分分析來決定。變異成分分析最好使用能夠進行具有限制性最大概似估計法（restricted maximum likelihood estimation, REML）的混合模型分析的套裝統計軟體來執行。

變異成分分析產生變異成分估計值，例如： $\hat{\sigma}_{Intra}^2$ 與 $\hat{\sigma}_{inter}^2$ 對應於試驗內或執行間分析的變異性。這些可用於估計生物測定法的 IP，以及不同生物測定法形式（格式變異性）報告數值的變異性。以百分比幾何（geometric）變異係數（%GCV）表示的 IP 由下列公式提供，此個案使用分析中相對效價的自然對數（參見 2.7. 統計考量與 2.7.1 尺規分析）：

$$\text{Intermediate Precision} = 100 \cdot \left(e^{\sqrt{\sigma_{Inter}^2 + \sigma_{Intra}^2}} - 1 \right) \%$$

在 k 次測定執行中每次使用 n 個重複組進行測試的報告數值之

變異性（格式變異性）等於：

$$\text{Format Variability} = 100 \cdot \left(e^{\sqrt{\frac{\sigma_{Inter}^2}{k} + \frac{\sigma_{Intra}^2}{(nk)}}} - 1 \right) \%$$

該公式可用於決定適合於生物測定法的各種用途的測試形式

（例如：放行測試（release testing）與穩定性評估）。

範圍—生物測定法的範圍定義為已證明分析過程具有適當層級的相對準確度與 IP 的真實或已知效價。該範圍通常來自稀釋線性研究，並且最低限度應涵蓋產品規格範圍的效價。為了進行穩定性測試，以及儘量減少必須將測試樣品進行過高或過低稀釋或濃縮到生物測定法範圍內，更廣泛範圍內的確效生物測定法是有價值的。

2.5. 確效之目標允收基準

確效之目標允收基準的選擇，應能降低生物測定法測量做出決策所產生固有的風險，並在技術能力方面是合理的。當存在產品規格時，基於測量可能超出產品規格的風險來證明允收基準合理性。

製程能力（process capability, Cp）指數的考量可用於得知生物測定法的相對偏差（relative bias, RB）與 IP 的界限。本章使用以下 Cpm 指數：

$$Cpm = \frac{USL - LSL}{6 \cdot \sqrt{\sigma_{\text{Product}}^2 + RB^2 + \sigma_{\text{RA}}^2}}$$

其中 USL 與 LSL 是放行規格的上限與下限，RB 是生物測定法相對偏差程度的界限，而 $\sigma_{Product}^2$ 與 σ_{RA}^2 均是標的產品變異數（即批次間（lot-to-lot）變異性）與放行測定變異數（與其相關格式）。(參見 3. 生物測定法確效範例中決定 σ_{RA}^2 與 Cpm 之範例。)

該公式須先瞭解標的產品的變異性，或包含隨機選擇的批次來估計該特性以作為確效的一部分。由於在開發過程中對分析執行、製造歷程及最終規格的了解有限，因此該方法只能作為定義允收基準的指引。

選擇 Cpm 的界限是一個商業決策。Cpm 的函數係預期會超出規格限制的批次比例。某些實驗室要求製程能力的對應 Cpm 需大於或等於 1.3，相當於具規格範圍中心的批次效價超出規格限制的機率約 1 / 10,000。

當尚未確定產品的規格時，可以根據生物測定法的技術能力來制定相對偏差或 IP 的限制。例如，雖然化學分析與免疫分析通常能夠達到接近單位數百分比的變異係數（%CV）或百分比相對標準差（%RSD），但對生物測定法可以採取更寬鬆的限制，例如動物效價生物測定法操作上具有更大的變異性（以 %GCV 測量，可與 %CV 相比較；參見附錄）。在此情況下，確效目標可使用確效結果，建立預期會產生可靠產品測量值的分析格式，來描

繪方法特性。目標允收基準或使用特性的合理說明應納入確效方案中。

2.6. 分析的維持

一旦生物測定法得到確效，就可以施行。但是，隨時監控其施行狀況非常重要。透過維持標準品反應曲線的合適參數與測定 QC 樣品效價的統計過程控制（statistical process control, SPC）圖表是最容易實現的。這些圖表的目的是在鑑定生物測定法早期的轉變或偏移。如果在任一個 SPC 圖表中觀察到一個趨勢，則應找出此趨勢的原因。如果需要對生物測定法進行修改以解決問題，或者因其他原因（例如：主要技術變更）進行生物測定法重大修改，則應對修改後的生物測定法重新確效或透過使用等效試驗的允收基準的合格設計的橋接研究連結到原始生物測定法。

2.7. 統計考量

幾個統計考量因素與設計生物測定法確效與分析數據有關。這些涉及生物測定法測量的特性以及可用於總結與解釋生物測定法確效結果的統計工具。

2.7.1. 尺規分析

必須考量生物測定法確效的分析規模，尤其確效研究中樣品的相對效價數據，以便從研究中獲得可靠的結論。本章節假設已

經採用適當的方法將原始生物測定法反應數據轉變成相對效價

(通則 4041)。相對效價測量值通常近似於對數的常態分佈。

對數常態分佈的測量值是偏斜的，其特徵在於變異的異質性，其中標準差與反應程度成比例。本章概述的統計方法要求數據是對稱的，近似於常態分佈，但是某些流程要求在效價範圍內的測量值具變異的同質性。通常，經對數轉換後的效價分析會產生更接近能滿足這兩個要求的數據。只要在整個分析過程中保持一致的基數，對數轉換的基數就無關緊要了。因此，若使用自然對數（以 e 作為 $\log$ 基數）來轉換相對效價測量值，則使用基數 e 將匯總結果轉換回生物測定法尺規。

應評估效價測量值的分佈作為生物測定法開發的一部分（通則 7024）。如果經測定效價測量值是常態分佈，則可以使用通則 3068 中所描述之方法進行確效。

因為相對效價測量值的對數轉換結果（對於平行線分析），所以如果確效研究所選擇層級在對數尺規上間隔均勻則是有利的。

舉一個具有 0.50、0.71、1.00、1.41 及 2.00 等 5 個層級的範例來說，其所獲得的中間值即為兩個相鄰值的幾何平均值（geometric mean, GM）。因此，如 0.50 與 1.0 之間的中間值求法如下：

$$GM = \sqrt{0.50 \cdot 1.0} = 0.71$$

同樣地，確效的總結量測值會受對數常態量表的影響。應將預測反應紀錄為各個相對效價量測值的幾何平均值，並將變異性表示為%GCV。GCV 係以對數轉換的相對效價測量值的標準差 $S_{\log}$ 的反對數（anti-log）計算之。公式如下：

$$GCV = \text{antilog} \left(S_{\log} \right) - 1$$

變異性以 GCV 表示，而非對數常態分佈的 RSD，以保持使用對數轉換的連續性（參見附錄）。可從 GCV 計算得到的間隔與從對數轉換數據的平均值與標準偏差計算得到的間隔將會一致。

表 1 呈現幾何平均值(GM)與相關 RB 的計算範例，其中%GCV 係以 1.00 層級的測試樣品進行的一系列相對效價之量測。本範例使用 log 基數 e。

表 1 GM 與%GCV 的計算範例

相對效價 (RP) ¹	相對效價自然對數 ln RP	
1.1299	0.1221	
0.9261	-0.0768	
1.1299	0.1221	
1.0143	0.0142	
1.0027	0.0027	
1.0316	0.0311	

1.1321	0.1241	
1.0499	0.0487	
平均	0.0485	GM = 1.0497
		RB = 4.97%
SD	0.0715	%GCV = 7.4%
¹ 相對效價（relative potency, RP）是表 4 提供的八次執行測量的重複效價之幾何平均值。		

相對效價測量值的 GM 計算為平均對數相對效價測量值的反對數，並以相對偏差與目標效價的偏差百分比表示：

$$GM = e^{\text{Average}} = e^{0.0485} = 1.0497$$

$$RB = 100 \cdot \left(\frac{GM}{\text{Target}} - 1 \right) \% = 100 \cdot \left(\frac{1.0497}{1.00} - 1 \right) \% = 4.97\%$$

幾何百分比變異係數（%GCV）計算如下：

$$\%GCV = 100 \cdot (e^{SD} - 1) \% = 100 \cdot (e^{0.0715} - 1) \% = 7.4\%$$

請注意，此圖示計算的 %GCV 不等於在 1.00 層級範例中算出的生物測定法確效的 IP（8.5%）；參見表 6。此範例使用於執行中（within-run）重複的平均值，而確效範例中的 IP 表示各個重複的變異性。

使用信賴區間記錄確效結果——生物測定法確效參數的估計應將一點估計值與信賴區間一起呈現。點估計值是所得到的參數的數值，例如 GM 或 %GCV。信賴區間最常見的解釋是參數真實

值的可能範圍。前面的範例可定出平均對數相對效價 CI_{ln} 的

90%信賴區間，如下所示：

$$\begin{aligned} CI_{ln} &= \text{Average} \pm t_{df} \cdot SD/\sqrt{n} \\ &= 0.0485 \pm 1.89 \cdot 0.0715/\sqrt{8} = (0.0007, 0.0963) \end{aligned}$$

百分比相對偏差如下：

$$CI_{RB} = 100 \cdot \left(\frac{e^{0.0007}}{1.00} - 1 \right) \%, 100 \cdot \left(\frac{e^{0.0963}}{1.00} - 1 \right) \% = (0.07\%, 10.1\%)$$

統計常數 (1.89) 來自 t-表，其自由度 (degrees of freedom, df)

等於測量數減去 1 ($df = 8 - 1 = 7$)。可以使用變異成分的方法來

表示 IP 或格式變異性的信賴區間；本篇通則未涵蓋這些方法。

評估允收基準的一致性—將生物測定法確效結果與目標允收基

準進行比較，以證明生物測定法適用。建立確效參數與確效允

收基準一致性的過程不應與建立相對效價測量與產品規格的一

致性相混淆。產品規格應提供設置確效允收基準的過程。

通常的做法是將允收基準應用於估計的確效參數。然而，這並

未說明估計的確效參數的量測不確定度 (uncertainty)。解決方

案是將確效參數的信賴區間保持為允收基準。這是一種標準統

計方法，用於證明與期望的一致性，稱為等效試驗。不應將其

與顯著性檢定 (significance test) 相混淆，例如 t 測試，是試圖

與某個目標值 (例如：0%相對偏差) 建立差異。顯著性檢定之

P 值 > 0.05 (相當於其信賴區間涵蓋參數標的值) 顯示沒有足夠

的證據來推斷該參數與標的值不同。這與得出參數符合其標的值的結論不同。研究設計可能具有太少的重複，或者確效數據可能變化太大而無法發現與標的值有顯著的差異。另外，顯著性檢定可以檢測到與標的值小偏差，其具有可忽略的重要性。這些可能性方案如圖 1 所示：

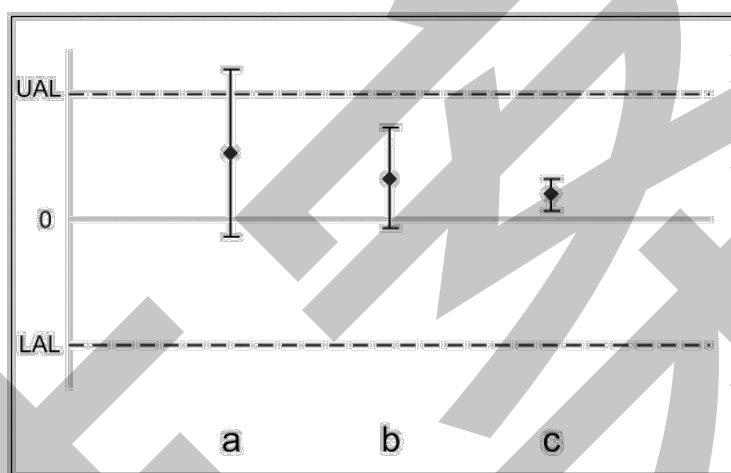


圖 1 使用信賴區間確定確效結果符合允收基準

實線水平線表示標的值（可能是 0%相對偏差），虛線表示下限（LAL）與上限（UAL）接受限值。在狀況 a 中，信賴區間包括標的值，因此結論顯示沒有足夠的證據來推斷與標的之差異（顯著性檢定方法）。然而，儘管點估計（實心菱形）落在可接受範圍內，但是其區間延伸到範圍之外，這表示真正的相對偏差可能在可接受的範圍之外。在狀況 b 中，其區間落在可接受範圍內，表示符合允收基準。狀況 c 中的區間也在可接受範圍內，但未涵蓋到標的值。因此，對於狀況 c，儘管點估計與標

的值的差異在統計上是顯著的，但是 c 是可接受的，因為其信賴區間落在標的可接受限度內。

例如，使用先前計算的 90%信賴區間，我們可以確定生物測定法在 1.00 層級上是否具有可接受的相對偏差，且標的允收基準不大於 + 12%。因為相對偏差百分比的 90%信賴區間（0.07%，10.1%）落在 $(100 * [(1 / 1.12) - 1]\%, 100 * [(1.12 / 1) - 1]\%) = (-11\%, 12\%)$ 區間內，所以結論顯示在 1.00 層級上存在可接受的相對偏差。必須注意的是在等效試驗中使用 90%信賴區間而非傳統的 95%信賴區間。此為常見的做法，並與藥物之生物等效試驗中使用的雙單側檢定（two one-sided tests, TOST）方法相同。

決策與確效測定執行次數的風險——統計分析的應用，包括評估確效參數與其允收基準的一致性與其風險。一個風險是參數不符合其允收基準，儘管與該參數相關的屬性是令人滿意的；另一風險，恰好相反，儘管參數確實不令人滿意，但參數符合其允收基準。與這些風險相關的考量因素是樣本數。

可以透過策略設計同時控制這兩種類型之風險，包括選擇確效測定之執行次數。具體而言，建立符合相對偏差允收基準所需的最小執行次數可由下列公式計算求得：

$$n \geq \frac{(t_{\alpha,df} + t_{\beta,df})^2 \hat{\sigma}_{IP}^2}{\theta^2}$$

其中 $t_{\alpha,df}$ 與 $t_{\beta,df}$ 是由學生-t 檢定而得的分佈點； α 與 β 是單側 I 型與 II 型誤差，表示在確效中得出錯誤結論之風險；df 是與研究設計相關的自由度（通常為 $n - 1$ ）； $\hat{\sigma}_{IP}^2$ 是 IP 的初步估計； θ 是可接受的偏差（標的允收基準）。

例如，如果相對偏差的允收基準是 $\pm 0.11 \log$ （即 $\theta = 0.11$ ），則生物測定法的變異性是

$$\hat{\sigma}_{IP} = 0.076 \log$$

$$\text{且 } \alpha = \beta = 0.05,$$

$$n \geq \frac{(1.89 + 2.36)^2 0.076^2}{0.11^2} \approx 8 \text{ runs}$$

須注意的是，此樣本量的計算是假設生物測定法中沒有內在偏差。一種比較保守的解決方法是在決定樣本量時包含了某些非零偏差。這樣會導致須更大的樣本量，以抵消偏差對確效結論的影響。在目前範例中，如果假設內部偏差等於 2%，則樣本量會增加到 10 次測定執行（10 runs）。亦須注意，該計算表示遞迴解決方案（因為自由度取決於 n ）需要統計軟體或採用反複運算方法的演算。

進一步注意， α 與 β 的選擇應從確效中得出錯誤結論的相應風險來證明。

使用混合效應模型建模確效結果—與生物測定法確效相關的許

多分析必須交待多種設計因素，諸如固定效應（例如：效價層級）與隨機效應（例如：分析人員、測定執行及重複性）。由固定與隨機效應組成的統計模型稱為混合效應模型，通常需要複雜的統計軟體進行分析。可以在變異數分析 (analysis of variance, ANOVA) 表或變異成分估計表中總結分析結果。分析的主要目標是估計關鍵參數，而不是確定效果的重要性。建模輸出提供參數估計以及它們的估計標準誤，可用於建立確效參數與其允收基準的一致性。因此，可獲得每個層級的平均相對偏差作為分析的一部分以及其相關的變異性。這些構成與如上所述的允收基準相比較的信賴區間。如果可以匯總各層級的變異數，則統計建模還可以透過組合確效中執行的層級之間的訊息來決定整體相對偏差和 IP。同樣地，混合效應模型可用於獲得確效研究因子的變異成分，並將結果與確效研究樣本與層級相結合。統計設計——統計設計，例如多因子 DOE 或嵌套 (nesting)，可用於生物測定法確效的組織分析與測定執行。將被認為會影響生物測定法反應的因素以及長期使用此流程會有變化的因素包括在設計中是有益的。使用這些設計方法，可以描述變異性的來源，並且可以開發用於管理生物測定法變異性的策略測試計畫。

表 2 為多因子 DOE 的範例，該 DOE 將多個分析人員、多個細胞培養樣品及多個試劑批次納入確效計劃。

表 2 具有 3 個因子的多因子 DOE 範例

執行次數	分析人員	細胞培養樣品	試劑批次
1	1	1	1
2	1	1	2
3	1	2	1
4	1	2	2
5	2	1	1
6	2	1	2
7	2	2	1
8	2	2	2

在該設計中，每個分析人員用兩批細胞樣品與兩個批次的試劑進行生物測定法。這是全因子設計的一個例子，因為所有因子組合都在確效研究中進行。為了減少研究中的測定執行次數，當已經確定了三個以上的因子時，可以採用部份因子設計。例如，如果一個分析人員在一次測定執行中進行四次分析是可行的，則可以採用分裂區單元設計 (split-unit design) 將分析人員們視為全試驗區因子 (whole-plot factor)，細胞製備樣品與試劑批次作為子試驗區因子 (sub-plot factors)。不同於篩選實驗，

確效設計應儘可能在多的層次中包含多的因子，以獲得 IP 的代表性估計。在可能的情況下，應在設計中使用兩個以上的因子層級。這可以較低結構化的方式實現，而不考慮嚴格的因子佈局。確效測定執行應儘可能隨機化，以減輕執行順序或時間的潛在影響。

圖 2 顯示使用嵌套確效的範例（複製巢式樣品反應盤，樣品反應盤巢式分析員）。

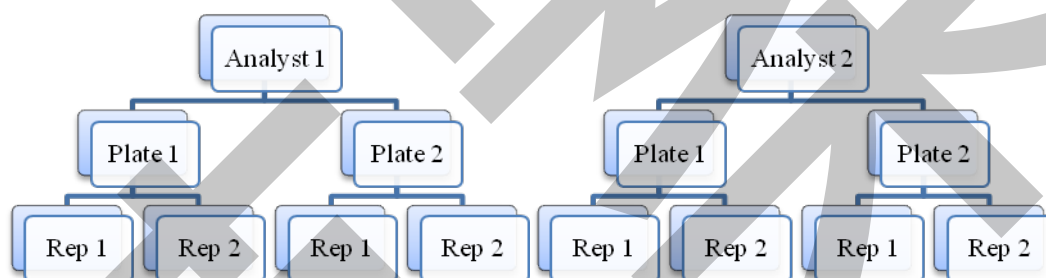


圖 2 使用兩個分析員的巢式設計範例

對於這兩種類型的設計以及兩者的組合，可以從確效結果估計變異性的組成。這些變異性成分可用於鑑別重要的變異性來源，並可用於獲得滿足流程精密度要求的生物測定法格式。應注意的是，在生物測定法開發過程中可能已經發現重要的變異性來源。在此情況下，確效應確認這些因素的影響與滿足精密度要求的分析方式。

有效數字—生物測定法報告結果中的有效數字與生物測定法的精密度有關。通常，%GCV 在 2%與 20%之間的生物測定法將支持兩個有效數字。有效數字的數量不應與小數位數混淆—報告值等於 1.2 與 0.12 具有相同數量（兩個）的有效數字。四捨五入的標準適用於對數尺規測量，其在對數尺規上具有恆定變化，而在原始尺規上則是成比例而非相加的變化（或通常用於銓釋的尺規）。須注意的是四捨五入是在一系列計算結束時進行，以報告最終測量並用於決策（例如：符合規範）。因此，如果最終測量值是來自多個測定的報告數值，則在確定報告數值之前不應進行四捨五入。同樣地，應使用適當數量的有效數字以說明規格。

3. 生物測定法確效範例

本章節將舉例說明原理。此生物測定法用於支持產品的規格範圍是 0.71~1.41。使用 2.5. 確效之目標允收基準所述的 Cpm，導出一個表，顯示對 RB 與 IP 的各種限制的超出規格（out of specification, OOS）結果的投射率。Cpm 根據使用三次獨立的生物測定法執行報告值的變異性來計算（參見上述關於格式變異性的討論）。假設產品變異性在計算中等於 0。實驗室可能希望包括標的產品變異性。標的產品變異性的估計可以從產品（例如：透過

相似的過程製造的一個產品)的數據獲得。

表 3 RB 與 IP 的各種限制的 OOS 的 Cpm 與概率

LSL~USL	IP (%)	RB (%)	Cpm	Prob (OOS) (%)
0.71~1.41	20	20	0.54	10.5
0.71~1.41	8	12	0.94	0.48
0.71~1.41	10	5	1.55	0.0003

以 IP 等於 8%，相對偏差等於 12% 為例做計算說明 (n = 3 次執行檢測)：

$$Cpm = \frac{\ln(1.41) - \ln(0.71)}{6 \cdot \sqrt{\frac{[\ln(1.08)]^2}{3} + [\ln 1.12]^2}} = 0.94$$

Prob (OOS) = $2 \cdot \Phi(-3 \times 0.94)$ = 0.0048 (0.48%)，其中 Φ 代表標準的常態累積分佈函數。

由表 3 得知，如果 IP ≤ 8% 且相對偏差 ≤ 12%，則預期有可接受的表現 (由於生物測定法的偏差與變異性而造成 OOS 結果的可能性小於 1%)。在 2.7. 統計考量、決策風險及確效測定執行次數所提供的樣本大小公式，可用於推導出與相對偏差等於 12% 的允收基準一致所需的測定執行次數 (使用 %GCV_{IP} = 8%；α = β = 0.05)：

$$n \geq \frac{(1.89+2.36)^2 \cdot [\ln(1.08)]^2}{[\ln(1.12)]^2} \approx 8 \text{ runs}$$

因此，如果真實相對偏差為零，則需執行 8 次測定才能有 95% 的機會通過相對偏差的標的允收基準。須注意，樣本大小的計算是假設每次確效測定執行中執行單一確效樣本。使用多個重複組合/或多個分析將提供有價值的訊息，允許對試驗內執行與組間執行變異性進行單獨估計，且將降低無法滿足確效允收基準的風險。

在確效過程研究 5 種層級的標的分析物：0.50、0.71、1.00、1.41 及 2.00。每個層級的 2 次測定執行結果由 2 名訓練有素的分析員使用 2 個批次媒介而產生。可以考量其他因素並使用部份因子佈局將其併入設計中。實驗室應努力設計確效，每個因子儘可能用很多層級，以便最佳模擬生物測定法的長期性能。在此範例中，每個分析師使用每個批次媒介在每個層級進行 2 次測定執行。測定執行包括生物測定法操作流程中所描述的標準品之完整系列稀釋，以及分析樣品的 2 個獨立系列稀釋。這樣每次測定執行可產生相對效價的重複性測量；所有相對效價觀測值請見表 4。須注意，由於共同的分析員與批次媒介 2 個效價估計值在每次測定執行中每一效價層級下並非獨立。

表 4 2 個分析員、2 個批次媒介及每個分析師與批次的組合的

每個層級各執行 2 次的生物測定法確效範例

媒介 批次/ 分析 員	1/1		1/2		2/1		2/2	
	1	2	1	2	1	2	1	2
0.5	0.5215	0.4532	0.5667	0.5054	0.5222	0.5179	0.5314	0.5112
0.5	0.5026	0.4497	0.5581	0.5350	0.5017	0.5077	0.5411	0.5488
0.71	0.7558	0.6689	0.6843	0.7050	0.6991	0.7463	0.6928	0.7400
0.71	0.7082	0.6182	0.8217	0.7143	0.6421	0.6877	0.7688	0.7399
1	1.1052	0.9774	1.1527	0.9901	1.0890	1.0314	1.1459	1.0273
1	1.1551	0.8774	1.1074	1.0391	0.9233	1.0318	1.1184	1.0730
1.41	1.5220	1.2811	1.5262	1.4476	1.4199	1.3471	1.4662	1.5035
1.41	1.5164	1.3285	1.5584	1.4184	1.4025	1.4255	1.5495	1.5422
2	2.3529	1.8883	2.3501	2.2906	2.2402	2.1364	2.3711	2.0420
2	2.2307	1.9813	2.4013	2.1725	2.0966	2.1497	2.1708	2.3126

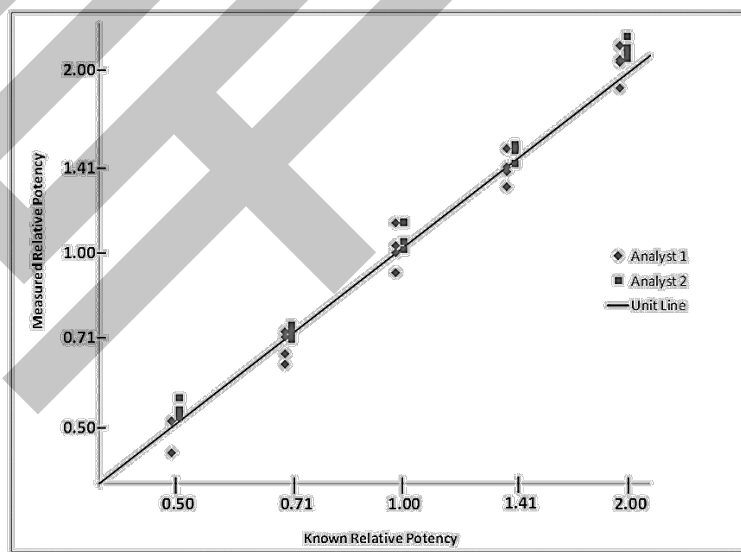


圖 3 確效結果與樣本層級之關係圖

圖表可用於揭示實驗結果中的不規則性。特別是，適當製備的圖表可以揭示確效結果與確效層級的不一致以及跨不同層級的變異異質性（參見 2.7. 統計考量中對數變換的討論）。圖 3 示例圖包括單位線（斜率等於 1 的線，穿過原點）。分析員 1 與分析員 2 的數據被刻意與預期的效價偏移，以提供清楚觀察與比較來自每個分析員的數據組。

可以透過以下步驟對確效數據進行正式分析：（1）在評估相對準確度或專一性之前，應對變異性（IP）進行評估，以便建立樣本層級變異數可以匯總假設的一致性；（2）相對準確度可以在不同的層級進行評估，也可以透過綜合分析進行評估，具體取決於各層級數據的合併程度。這些步驟使用範例確效數據以及計算的一些細節來演示，以供說明。須注意，以下各節中說明的計算僅適用於平衡數據組。缺乏相對效價測量的不平衡設計或數據組則應使用具有受限最大概似估計法的混合模型分析來分析。

3.1. 中間精密度

可以使用變異成分分析來分析每個層級的數據。對於平衡數據，
如在此範例中，可以從標準單向 ANOVA 確定變異成分。表 5
提供在單一層級（0.50）執行的計算範例。

表 5 在 0.5 層級的對數相對效價測量中執行的變異成分分析

來源	自由度	離均差 平方和	均方	預期均方
執行檢 測	7	0.055317	0.007902	Var (誤差) +
				2 Var (執行檢測)
誤差	8	0.006130	0.000766	Var (誤差)
校正總 和	15	0.061447		
變異成分估計值				
Var (執行檢測) = 0.003568				
Var (誤差) = 0.000766				

上面表格呈現標準的 ANOVA 分析。分析員與批次媒介兩個因素
並未納入分析，因為每個因素的層級（2 個層級）較少。此分析
中的因子「測定執行」代表統整分析員與批次媒介組合的測定執

行次數。預期均方是變異成分組成的線性組合，它源自每個來源的均方測量。估計變異成分透過求解每個組成的等式「預期均方 = 均方」。首先，誤差估計 $\text{Var}(\text{誤差})$ 的均方值，也就是組內執行組成的變異性為：

$$\text{Var}(\text{Error}) = \text{MS}(\text{Error}) = 0.000766$$

隨後，透過均方設置為預期均方的數學表達式來計算組間測定執行組成的變異性 $\text{Var}(\text{Run})$ ，然後求解 $\text{Var}(\text{Run})$ 的等式，如下所示：

$$\text{MS}(\text{Run}) = \text{Var}(\text{Error}) + 2 \times \text{Var}(\text{Run})$$

$$\begin{aligned} \text{Var}(\text{Run}) &= \frac{\text{MS}(\text{Run}) - \text{MS}(\text{Error})}{2} \\ &= \frac{0.007902 - 0.000766}{2} = 0.003568 \end{aligned}$$

將這些變異成分估計值組合起來，將生物測定法的總 IP 值設為 0.50：

$$\begin{aligned} \text{IP} &= 100 \times (e^{\sqrt{\text{Var}(\text{Run}) + \text{Var}(\text{Error})}} - 1) \% \\ &= 100 \times (e^{\sqrt{0.003568 + 0.000766}} - 1) \% = 6.8\% \end{aligned}$$

在每個確效層級進行相同的分析，並在表 6 中呈現。

表 6 每個確效層級與平均值的變異成分估計值和整體變異性

	層級					
組成	0.50	0.71	1.00	1.41	2.00	平均
Var (執行檢測)	0.003568	0.000648	0.003639	0.003135	0.002623	0.002723

Var (誤差)	0.000766	0.004303	0.002954	0.000577	0.002258	0.002172
整體	6.8%	7.3%	8.5%	6.3%	7.2%	7.2%

如果變異成分在不同層級上相似，則可以執行組合分析。傳統上，啟發式方法用於此評估。可以將最大變異數與最小變異數的比率保持為不大於 10（由於在確效中測定執行的次數有限，因此使用 10）。這裡執行間變異成分相關的比率為 $0.003639 / 0.000648 = 5.6$ 與執行中變異成分相關的比率為 $0.004303 / 0.000577 = 7.5$ ，符合 10 倍標準。如果該比率超過 10 並且如果這是由於測試層級中的某個極端值的過度變化，則該極端值將從進一步分析中刪除，並且該範圍將限於排除該層級。

可以使用能夠應用於混合效應模型確效結果的統計軟體來進行分析。該分析應考量設計中的任何不平衡、分析人員與批次媒介等隨機效應，以及層級等固定效應（請參見 2.7. 統計考量注意事項，使用混合效應模型建模確效結果）。可以分別為分析人員與批次媒介決定變異成分，以展現它們對生物測定法的整體變異性的貢獻。

在範例中，變異成分可以跨層級的平均呈現生物測定法的 IP。只有在確效中採用平衡設計（即每個層級有相同重複性策略）時，這種組合估計的方法才是準確的。此確效範例採用平衡設計，因此 IP 可報告為 7.2% GCV。

由於建議以一定程度的不確定性呈現確效結果，可以計算生物測定法 IP 的單側 95%信賴區間上限。文獻包含用於計算變異成分的信賴界限的方法。生物測定法範例的 IP 上限為 11.8% GCV。由於相對於整體研究設計的個體層級的數據有限，因此未在每個層級單獨計算信賴區間上限。

3.2. 相對準確度

此分析可以繼續評估每個層級的相對準確度。表 7 顯示對數尺規中確效結果的平均值與 90%信賴區間，以及相對應的效價與相對偏差。

表 7 各個層級的平均效價與相對偏差

層級	n ^a	對數效價		效價		相對偏差	
		平均值	(90% CI)	平均值	(90% CI)	平均值	(90% CI)
0.5	8	-0.6613	(-0.7034, -0.6192)	0.52	(0.49, 0.54)	3.23%	(-1.02, 7.67)
0.71	8	-0.3419	(-0.3773, -0.3064)	0.71	(0.69, 0.74)	0.06%	(-3.42, 3.67)
1.00 ^b	8	0.0485	(0.0006, 0.0964)	1.05	(1.00, 1.10)	4.97%	(0.06, 10.12)
1.41	8	0.3723	(0.3331, 0.4115)	1.45	(1.40, 1.51)	2.91%	(-1.04, 7.03)
2	8	0.7859	(0.7449, 0.8269)	2.19	(2.11, 2.29)	9.72%	(5.31, 14.32)

- ^a 對每次執行檢測的重複項目的平均值進行分析。
- ^b 計算方法請見章節 2.7. 統計考量與 2.7.1 尺規分析。

因為重複測量與一次執行檢測中共享 IP 因子（分析員、批次媒介以及在此例的執行檢測）相關聯，因此須針對每次執行檢測的重複項目的平均值進行分析（ $n = 8$ 次執行檢測）。可以使用相對偏差與層級的關係圖來檢查實驗結果中的模式，並建立與相對偏差的標的允收基準的一致性（12%）。

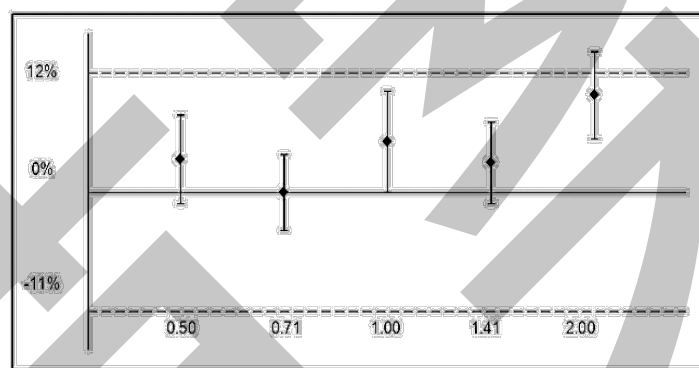


圖 4 相對偏差的 90%信賴區間與允收基準

（須注意，較低的允收基準等於 $100 \times [(1 / 1.12) - 1] = -11\%$ 。）

圖 4 顯示樣本層級的平均正偏差（即所有層級的平均相對偏差均為正）。這種一致性部分是由於各層級生物測定法結果缺乏獨立性。此外，各層級之間的相對偏差似乎沒有趨勢。後者表示具有不同測量的相對效價的樣品（例如：穩定性樣品）的比較是有偏差的，可能導致錯誤的結論。可以使用對數相對效價與對數層級的迴歸來執行趨勢分析。可以考慮在生物測定法確效方案的開發

期間導入關於該範圍內相對準確度趨勢的允收基準。

在確定不同層級之間無有意義的趨勢之後，繼續分析評估每個層級的相對準確度。生物測定法在 0.50~1.41 的層級上具有可接受的相對偏差，產生 90%信賴區間（相當於兩個單側 t-檢定）落在 -11%~12%相對偏差的可接受區域內。2.0 的 90%信賴區間落在可接受區域之外，表示相對偏差可能超過 12%。

可以利用能夠將混合效應模型應用於確效結果的統計軟體來執行組合分析。該分析準確的說明確效研究設計。該分析也適用於隨機效應，如分析人員、批次媒介及執行檢測（參見 2.7. 統計考量注意事項，使用混合效應模型建模確效結果）。

3.3. 範圍

從 IP 與相對準確度的評估得出的結論可用於建立生物測定法的範圍，以表明其表現令人滿意。基於 IP 等於 8% GCV 的允收基準（參見表 6）與相對偏差等於 12%（參見表 7），生物測定法的範圍為 0.50~1.41。在此範圍內，1.0 層級具有略高於 IP 的可接受估計值（8.5%相較於標的允收基準 $\leq 8.0\%$ ），這可能是由於小數據組導致的估計值的變異性。由於表 6 中的這一結果與其他結果，可得到整個範圍內都具有令人滿意 IP 的結論。

3.4. 以確效結果做生物測定法特性分析

當進行研究以估計生物測定法的特徵（特徵分析）時，變異成分估計值也可用於預測不同生物測定法格式的變異性，從而可確定具有所需精密度的格式。k 個獨立執行檢測的預測變異性，在一次執行檢測中有 n 個單獨稀釋系列的測試製劑，由以下格式變異性的公式提供：

$$\text{格式變異性} = 100 \times \left(e^{\sqrt{\frac{\text{Var (Run)}}{k} + \frac{\text{Var (Error)}}{nk}}} - 1 \right)$$

使用表 6 [Var (Run) = 0.002723 與 Var (Error) = 0.002172]

中的執行中與執行間變異成分的估計，如果生物測定法進行三次獨立執行檢測，則報告數值的預測變化（相對效價結果的幾何平均值）等於：

$$\text{格式變異性} = 100 \times \left(e^{\sqrt{\frac{0.002723}{3} + \frac{0.002172}{1 \cdot 3}}} - 1 \right) = 4.1\%$$

此計算可以擴展到包括執行檢測次數與最小組的各種組合（假設最小組中的樣本，稀釋與重複的數量保持不變），如表 8 所示。

表 8 執行檢測次數（k）與執行檢測中最小組數（n）不同組合的格式變異性

	執行檢測次數（k）			
重複次數(n)	1	2	3	6
1	7.2%	5.1%	4.1%	2.9%
2	6.4%	4.5%	3.6%	2.6%
3	6.0%	4.2%	3.4%	2.4%

6	5.7%	4.0%	3.3%	2.3%
---	------	------	------	------

顯然，減少報告數值（跨測定執行與最小組合的幾何平均效價）

變異性的最有效方法是增加生物測定法的獨立執行檢測次數。此

外，可以利用推導 IP 的變異成分的信賴界限來建立生物測定法

的格式變異性。

必須將顯著的變異性來源納入執行檢測中以有效減少變異數。對

生物測定法確效範例進行更全面的分析，將包括分析人員與批次

媒介作為統計模型中的因素。從這種分析中獲得的變異成分估計

值列於表 9 中。

表 9 與分析人員、批次媒介及執行檢測相關的變異成分之 REML 估計值

變異數	成分估計值
Var（批次媒介）	0.0000
Var（分析人員）	0.0014
Var（分析人員與批次媒介）	0.0000
Var（執行檢測（分析人員與批次媒介））	0.0019
Var（誤差）	0.0022

在生物測定法開發過程中，理想情況下應將分析人員鑑別為重要的

的生物測定法因子。儘管如此，實驗室可以選擇透過改進培訓或

透過使用多個分析人員對生物測定法的常規性能進行格式化分

析來解決分析人員與分析人員變異性的明顯貢獻。

執行中與執行間變異性的估計也可用於決定在生物測定法中區分測試的樣品的差異大小（倍數差異）。對於 k 次執行檢測，在每次執行檢測中使用 n 個最小組合，使用來自標準常態分佈的近似雙側臨界值（ $z = 2$ ）在生物測定法的相同測定執行中測試的兩個樣本的報告數值之間的臨界倍數差異是源自：

$$\text{臨界倍數差} = e^{2 \cdot \sqrt{\frac{\text{Var}(\text{Run})}{k} + \frac{\text{Var}(\text{Error})}{nk}}}$$

當樣品在不同的生物測定執行中進行測試時（例如：長期穩定性樣品），臨界倍數差異由以下公式求得（假設使用相同的格式測試兩個系列樣品）：

$$\text{臨界倍數差} = e^{2 \cdot \sqrt{2 \cdot \left[\frac{\text{Var}(\text{Run})}{k} + \frac{\text{Var}(\text{Error})}{nk} \right]}}$$

為了比較樣品，實驗室可以選擇具有合適精密度的設計（生物測定法格式）來檢測樣品之間實際上有意義的倍數差異。

3.5. 確認中間精密度與重新確效

由於執行的檢測次數較少，因此確效中的 IP 估計值具高度之不確定性。在實驗室獲得生物測定法的合適經驗後，可以透過分析對照樣品測量值，例如陽性對照的變異性，來確認或更新估計值。該分析可以用測試樣品相似的方法製備與測試對照樣品（即相同或相似的系列稀釋與重複性策略）。該評估應在進行足夠的測定

以獲得生物測定法中間精密度的替代估計值之後進行，包括實施與標準化測定方案相關的變化（例如：不同的分析人員、不同的關鍵試劑批次及不同批的細胞）。如果評估顯示結果差異很大，則應將生物測定法的報告 IP 修改為針對確效報告的修訂。

只要分析方法有進行實質性更改，就應重新確效生物測定法。此包括但不限於技術變化或數據讀出變化。重新確效可以包括完全重新測定的生物測定法確效或是橋接研究，來比較當前與修改的方法。

附錄：對數常態分佈變異數定位與分散的量測

常見統計流程的兩個假設，像是 ANOVA 或信賴區間估計，是（1）關於生物測定法反應的平均值變化是常態分佈的，並且（2）觀察到反應值的標準偏差在有興趣的反應範圍內是恆定的。這種反應具有「常態分佈」與「附加誤差結構」。如果不符合這兩個條件，使用常用的統計流程之前考慮轉換可能是有用的。

生物測定法反應的變化經常被發現是非常態的（偏態傾向更高數值），其標準偏差大約（或幾乎是）與平均值反應成比例。這種反應通常具有「乘法誤差結構」並且遵循「對數常態分佈」，其具有在有興趣的反應範圍內恆定的變異係數百分比（%CV）。在此情況下，將發現生物測定法反應的對數轉換近似常態，在反應範圍內

具有幾乎恆定的標準偏差。在對數變換之後，就滿足兩個假設，並且可以常用的統計流程分析對數變換後的反應值。以下討論假設生物測定法反應是對數常態分佈。

我們觀察到的生物測定法反應值 X 稱為「原始測量尺度」，並將對數變換反應 $Y = \log(X)$ 稱為「對數變換尺度」。雖然常見的統計流程可能僅適用於對數轉換量表，但我們可以透過估計定位測量（例如：平均值或中位數）、分散測量（例如：標準偏差）或信賴區間來總結生物測定法反應結果，用任一量測尺規皆可，只要註明使用的尺規。 $\%CV$ 在原始尺度上很有用，它在反應範圍內保持不變。基於同樣原因，標準偏差（SD）與對數變換尺度相關。基於對數變換（ Y ）尺度報告統計加總可能是有利的。然而，通常會呈現出將報告的測量值反向轉換為原始測量尺度（ X ）的資訊。

對於任何已知的 X 值，只有一個唯一值 $Y = \log(X)$ ，反之亦然。

同樣地，對於定位與分散的測量，在原始與對數變換的尺度上獲得的定位與分散的度量之間存在唯一的一對一對應關係。此外，正如 X 與 $Y = \log(X)$ 之間存在簡單關係一樣，存在相對簡單的關係，允許在每個尺度上的相應度量之間進行轉換，如下表 A-1 所示。在表中，「平均值」與「標準偏差」，無論它們出現在何處，都是指在對數變換（ Y ）標度上計算的度量。

表 A-1 定位與分散量測的比較

量測		量測尺度	
		對數變換 (V)	原始 (X)
定位		中間值 (平均值)	幾何平均值 (GM)
			$= \sqrt[n]{\prod_{i=1}^n X_i} = e^{\text{Average}}$
分散		標準差 (SD)	幾何標準差 (GSD) = e^{SD}
信賴區間 (k 為根據 t-分佈或大 樣本 z 估計 值適當常 數)	下 限	平均值 - $k \times \text{SD} / \sqrt{n}$	$\text{GM} / \text{GSD}^{k/\sqrt{n}}$
	上 限	平均值 + $k \times \text{SD} / \sqrt{n}$	$\text{GM} \times \text{GSD}^{k/\sqrt{n}}$
	範 圍	寬度 (上限 - 下限) $= 2 \times k \times \text{SD} / \sqrt{n}$	比例 (上限/下限) $= \text{GSD}^{2k/\sqrt{n}}$
變異係數 百 分 比 (%CV)		$\% \text{GCV} = 100 \times (\text{GSD} - 1)$	
			$\% \text{CV} = 100 \sqrt{e^{\text{SD}^2} - 1} \approx \% \text{GCV}$

幾何平均值 (GM) 不應該被誤解為原始尺度 (X) 變異量平均值的估計值，而是 X 的中位數的估計值。對於具有偏差誤差的變異

量，中位數是更合適的位置度量，例如對數常態分佈與對稱誤差分佈，其中中位數等於平均值。

同樣地，幾何標準差（GSD）不應該被誤解為原始尺度（X）變異量的標準差。然而，GSD 是獲得原始（X）尺度上的信賴區間的有用乘法因子，其對應於對數變換（Y）尺度上的信賴區間，如上表所示。GSD 為 1 對應於無變化（Y = 0 的 SD）。在未轉換（X）尺度上，上限與下限信賴度的比率將等於 $GSD^{2k/\sqrt{n}}$ ，如表 A-1 所示。

當%CV 低於 20%時，幾何變異係數（%GCV）近似於原始（X）尺度上的%CV。重要的是不要混淆這些不同的分散方式。%GCV 是與對數變換（Y）尺度相關的度量，%CV 是與原始（X）尺度相關的度量。視喜好的參考架構而定，任一或兩種測量可能都是有用的。