

人体生物等效性试验中生物样品分析的关键问题研究

胡岚岚, 汤建林* (陆军军医大学第二附属医院国家药物临床试验机构, 重庆 400037)

摘要: 采用体内生物等效性试验的方法开展一致性评价是仿制药申请的基础, 生物等效性试验首选药动力学研究的方法, 而药动学中生物样品分析是最为重要的环节, 它将直接影响药品的安全性和有效性, 为生物等效性试验的结果做出关键性决定。目前我国生物样品分析质量还有很大提升空间, 基于此, 本文根据相关指导原则, 结合工作实际, 针对生物等效性试验中生物样品分析方法的建立、验证、测试、记录和注意事项等, 探讨生物等效性试验中生物样品分析的关键问题。

关键词: 生物等效性试验; 方法学; 生物样品分析

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2019)07-0894-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.07.025

引用本文: 胡岚岚, 汤建林. 人体生物等效性试验中生物样品分析的关键问题研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(7): 894-899.

Key Points of Bioanalysis in Bioequivalence Study

HU Lanlan, TANG Jianlin* (*National Drug Clinical Trial Institution, the Second Affiliated Hospital, Army Medical University, Chongqing 400037, China*)

ABSTRACT: To use bioequivalence study on consistency evaluation is the basis of the generic drug application. Pharmacokinetics is the optimal method used for evaluating bioequivalence. The most important aspect in pharmacokinetic is bioanalysis, which will directly affect the safety and effectiveness of drugs, and is also the key point for the results of bioequivalence study. Previous analytical results suggest that there is great room for improvement in data quality of bioanalysis carried out in our country. Thus, the aim of the study is to discuss the key points of method establishment, validation, testing, and recording in bioanalysis of bioequivalence based on the relevant guidelines and our actual work.

KEYWORDS: bioequivalence; methodology; bioanalysis

生产企业应采用体内生物等效性试验的方法开展一致性评价^[1]。人体生物等效性试验是仿制药申请的基础, 建立生物等效性的目的是证明仿制药品和某个参比药品生物等效, 在新药研发过程中起着桥接安全性和有效性的作用。一般是通过比较受试药品和参比药品的相对生物利用度(药物制剂吸收后在作用部位可利用的速度和程度)来判定两者的生物等效性, 通常意义上药动学是评价生物利用度优先考虑的方法。药动学通过研究给药后的生物基质(如全血、血浆、血清)中的药物浓度, 得到达峰浓度(C_{max})、药物浓度-时间曲线下面积(AUC)以及到达最大药物浓度的时间(t_{max})等重要参数, 经统计学比较后判断制剂间是否等效^[2]。而对于药代动力学来说, 准确测定生物基质中的药物浓度非常重要, 这些数据可被用于支持药品的安全性和有效性, 为生物等效性试验的结果做出关键性决定。因此, 只有建立一个合格的生物

样品分析方法才能获得可靠的结果^[3-4]。

鉴于体内生物样品存在采样量少、待测物浓度低、干扰物质多等特点, 在生物样品的分析过程中, 分析结果的准确性受样品采集、运输、储存与处理、测定方法和测定过程中诸多因素的影响^[5-7]。因此, 本文根据相关指导原则, 结合工作实际, 针对生物等效性试验中生物样品分析方法建立、验证、测试、记录和注意事项等方面进行探讨。

1 分析方法

1.1 分析方法建立前的准备

为保证所建生物样品测定方法在实际应用过程中的可靠性和规范性, 在方法建立之前对该试验的要求、难度、成本、工作量及时间应该有充分的估计与把握。因此, 在建立方法之前应当进行充分的软件与硬件条件的准备工作, 制定相应的工作计划和标准操作规程(standard operating

作者简介: 胡岚岚, 女, 硕士, 主管药师 Tel: (023)68755311
Tel: (023)68755311 E-mail: jltang6317@163.com

E-mail: 35341579@qq.com *通信作者: 汤建林, 男, 硕士, 主任药师

procedure, SOP)。

此外, 人员亦是影响试验结果的一个重要因素, 一个项目需有项目负责人、实验室负责人和质量保证负责人, 并配备实验人员。实验人员必须受过相应的教育或接受过专门的培训, 最好具有药物分析或分析化学专业背景, 项目负责人需具备 2 年以上生物样本分析工作经验, 熟练掌握实验室各类分析仪器的操作。在试验开始之前, 各类人员除需要取得药物临床试验管理规范培训证书外, 还要进行项目 SOP 培训等, 熟悉整个试验流程后才能开始进行试验。

1.1.1 文献查阅 分析方法条件的优化, 一般首先查阅国内外相关资料, 对国内外该药物或该类药物的生物样品分析方法(如仪器和检测器选择、流动相的选择、固定相的选择、线性、灵敏度、样品处理方法等)进行整理归类, 在整理归类过程中注意文献报道的可行性和合理性。然后在实际操作过程中对这些方法逐条进行细致的优化, 包括色谱柱温度、进样器温度这类看似不起眼的小问题, 都需要进行摸索, 找到最合适的条件以满足分析需求。

1.1.2 计量容器的校准和标准物质的准备 试验所需的容量玻璃仪器(如量瓶、移液管等)及其他仪器(如液相、质谱、天平、酸度计、移液器等)均需具备检定或校准证书, 以保证试验中用到的计量器具所测的值准确可靠, 这一点在实际操作过程中往往容易疏忽。关于试验用的对照标准物质, 首选中国食品药品检定研究院提供的标准品或对照品^[8], 若是从试剂公司购买或厂家提供的原料药尽量保证批次之间的一致性, 且需提供分析证书或质检报告, 以确认对照标准物质的稳定性、储存条件、失效日期、批号和纯度等。关于对照标准物质的保存, 尤其是已经开封的对照品, 应严格按照储存条件保存, 某些需要低温干燥的对照品, 为避免在冰箱中吸潮增重, 可将其置于干燥器后再放入冰箱, 这样可以保证结果的准确性。

1.2 分析方法建立

目前常用于生物等效性试验药物浓度测定的分析方法主要是色谱法, 包括气相色谱法(GC)、液相色谱法(LC)、液质联用法(LC-MS、LC-MS/MS)、气质联用法(GC-MS、GC-MS/MS)等^[9-14], 这些方法可满足大多数药物的检测需求; 其余的方法如免疫学方法(荧光免疫分析法、放射

免疫分析法、酶免疫分析法)和微生物学方法^[15-16], 多用于蛋白质多肽类和抗菌药物类物质的检测。在分析方法选择上, 可结合化合物的理化性质、药物在体内存在的状况及本单位的实际, 选择可行的、可连贯的、灵敏度高的方法, 这样不仅可简化样品处理过程, 还能够满足痕量检测, 适用于大样本量的快速分析。现如今液质联用技术已成为小分子化合物定量的首选, 质谱高灵敏特性所带来的缺陷就是仪器十分容易被样品污染, 根据以往经验, 在分析方法建立之前, 需要对质谱的质量数进行校准, 清洗仪器各部位如液相系统和锥孔等, 保证仪器状态能够满足测定需求再开始进行试验。在选定分析方法后, 建立项目时需开启工作站审计追踪系统(audit trail), 并设置三级权限管理(管理员-复核员-分析员), 这也是在 2015 年药物临床试验数据现场核查要点中明确规定的。

2 方法学验证

为了保证所建立方法的可行性和可靠性, 在试验样品分析之前需对建立的方法进行充分的方法学验证。目前国内可参考的指导原则有中国药典 2015 年版四部通则中《生物样品定量分析方法验证指导原则》, 这个原则参考了美国食品药品监督管理局(FDA)^[17]和欧洲药品管理局(EMA)^[18]关于生物分析方法的相关内容, 比 2005 年国家药品监督管理局颁布的《化学药物制剂人体生物利用度和生物等效性研究技术指导原则》中的方法学确证部分更具体、详尽, 比如在内容上更加细致地描述了验证的具体指标和可接受标准, 明确了基质效应、残留、稀释可靠性以及分析批的概念, 这说明方法合格性验证同样是随着科技进步而不断更新、完善的一个过程。一个生物分析方法的主要特征包括: 选择性、定量下限、校正范围(标准曲线性能)、准确度和精密度、基质效应、分析物在生物基质以及溶液中储存和处理过程中的稳定性等, 下面结合工作经验, 重点阐述方法验证中几个需要注意的关键点, 供验证生物样品分析方法时参考。

2.1 空白血浆

一般来说, 生物等效性试验常用的基质就是血浆。在选择血浆时, 至少需要 6 个不同来源的健康人血浆, 并且要记录每种血浆的来源和编号, 以便于溯源, 另外方法学建立和验证时应采用与试验样品相同的抗凝剂。目前空白血浆的来源主

要有 2 种方式, 一个是自行采集, 但需要注意的是需要通过伦理委员会批准才能够自行采集健康人血, 并且空白全血的采血方式应与临床试验相同, 此外空白生物基质还可按照国家相关规定采购或在医院按规定领取。

溶血血浆一般可自行配制或采购, 自行配制时通过抽拉挤压注射器或者冻融后使红细胞破碎造成溶血, 将溶血全血与正常空白血浆混合得到一定比例的溶血血浆(通常采用 2% 的溶血血浆)来进行方法学考察。高脂血浆基质也可自行配制或采购市售品, 自行配制时一般以不低于国内高脂血症临床诊断标准为依据, 使用脂肪乳注射液和正常空白血浆混合得到高脂血浆基质进行方法学考察^[19]。

2.2 标准曲线和质控样品配制

标准溶液配制称量时首先需考虑天平的感量, 如精密称定时: <10 mg 用百万分之一天平; 10~100 mg 用十万分之一天平; >100 mg 用万分之一天平。为了避免系统误差, 现有的指导原则推荐将标准曲线和质控样品的储备液分开配制, 通过比较标准曲线储备液与内标响应值的比值和质控储备液与内标响应值的比值的偏差来判断配制的误差。由于工作液大部分都是由高浓度的有机溶剂配制, 为了防止工作液的加入而造成生物基质变性, 使校正标样与用药后的实际样品不一致, 建议在校正标样的配制过程中加入的非基质溶液(即待测物工作液)不超过样品总体积的 5%^[20-21], 此外, 也可通过将待测物工作液先挥发干后再加入空白基质^[22], 这 2 种方法均可行。

在配制校正标样和质控样品时, 由于加入工作液的体积较小(一般只有几微升或十几微升), 为防止在加入及涡旋时造成损失, 可先在容器内(如 EP 管)加入工作液, 再加入空白基质后进行混匀, 见图 1。

此外, 若测定的分析物体内部预期浓度范围较宽, 用一条标准曲线定量时线性无法满足需求, 可将定量范围分成 2 段, 分段进行线性回归, 但是要保证每段至少 6 个浓度(不含空白样品和零浓度样品)来建立标准曲线。本实验室之前测定左乙拉西坦的人体生物等效性^[23], 由于线性范围较宽(0.5~128 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 用质谱检测时相关系数和校正标样回算浓度偏差始终无法满足测定需求, 后将线性范围分成 2 段: 0.5~8.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和

8.0~128.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 结果 2 条标准曲线的线性和浓度偏差均能满足测定需求。当线性范围较宽的时候, 推荐采用加权的方法对标准曲线进行计算^[24-25], 以使低浓度点计算得比较准确。

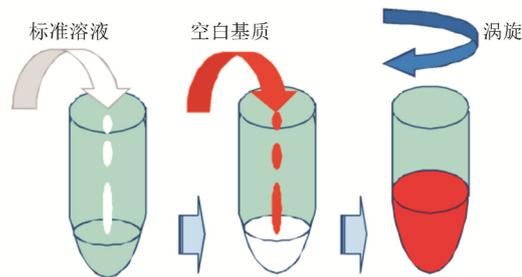


图 1 模拟生物样品的制备步骤

Fig. 1 Steps of the simulated biological sample preparation

2.3 定量下限

定量下限代表的是方法的灵敏度, 大家一贯的做法可能是在分析方法建立和稳定后, 取同一基质, 配制至少 5 份独立的质控样品, 连续进样后计算信噪比、准确度和相对标准偏差。这样做有一个缺点是与实际测试条件不一致, 没有考虑残留效应即携带效应的影响。因为在实际测定过程中, 样品均是未知浓度, 有可能定量下限样品会在一个高浓度样品或者一系列样品之后出现, 所以建议在方法学定量下限考察时考虑携带效应的影响, 这样灵敏度结果更准确一些。

2.4 稳定性

稳定性评价是为了确保样品从采集到检测过程中的每一步骤, 以及使用的储存条件, 都不影响待测物的精密度和准确度。稳定性包括溶剂的稳定性(待测物和内标在溶剂中的稳定性)和含药样品的稳定性。

因为分析物和内标物的储备液和工作液是整个分析过程的基础, 所以溶剂稳定性的考察至关重要。在测定过程中, 笔者发现以往采用 HPLC 联用紫外或荧光检测器时, 溶剂稳定性的考察可以一直采用 0 d 的待测物或内标溶液作为参比, 通过比较各时间段与 0 d 的结果来判断溶液的稳定性; 但是在高效液相色谱联用质谱时, 这样比较得出的结果偏差较大, 通过实验笔者发现因为质谱没有紫外或荧光的稳定性和重复性好, 在考察溶剂稳定性时必须加入仪器误差, 需采用新鲜配制的待测物或内标溶液作为参比, 即考察当天新鲜配制标准溶液与稳定性考察的样品进行比较, 才能得到准确的结果。

含药样品的稳定性考察内容较多,包括生物样品室温放置的稳定性、制备后生物样品稳定性、生物样本反复冻融稳定性、生物样本长期冻存稳定性以及样品离心分离前基质中待测物稳定性^[26-28]。在这些稳定性中,样品离心分离前基质中待测物稳定性是近年来的新要求,样品离心分离前基质中待测物稳定性即全血稳定性^[29-30],在做全血稳定性时需要在全血中加入一定浓度的待测物,为了模拟人体内温度的酶活性,最好将加入待测物的全血在 37℃ 孵化一定时间后,再通过离心取上层血浆进行预处理和分析,要注意的是应至少有 2 个浓度水平的全血样品检测浓度值在线性范围内。

2.5 系统适应性

系统适应性是在每天运行样品之前,需要做的一系列测试,保证系统运行正常,结果可靠。这个是分析检测时容易忽视的一步,有些没有进行系统适应性就开始试验,有些只是简单地进几针标准样观察一下出峰时间,没有系统评价待测物和内标的保留时间和面积比。一般来说批次的开始应有一系统适用性样品,一般待测物可选择标准曲线低浓度或中间浓度的无基质样品(溶剂中或流动相中),内标可选择进样浓度的无基质样品,连续进样待测物和内标的混合样品,考察系统稳定性,结果以待测物和内标保留时间的变异系数及待测物和内标的面积比的变异系数为评价指标。一般来说质谱需要每日考察系统适应性,紫外或荧光等稳定性好的检测器 1 周考察 1 次或依实际情况而定。

3 试验生物样品分析

在生物样本分析方法确证完成之后才能开始测定未知样品,依据笔者的经验,在测试前,需有一份完善的生物样品分析计划来说明未知样品该如何检测及可接受的标准。分析计划应包括受试者样品分析顺序,这里就需要提到分析批的概念,由于一个生物等效性试验样本量较大,样本从采集到检测的过程不可能在一天之内完成,所以可以将样品保存后分批测定。一个分析批包括空白样品和零浓度样品、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,这里要注意的是为了避免仪器误差和分析误差,建议将同一受试者的所有样品在

一个分析批中进行测定。此外分析计划中还需要有接受或拒绝一个分析批的标准、有检测异常点/离群值/复测点的判定原则以及重积分原则等,只有计划完善了,在实际测试过程中才能临危不乱。

在实际测定时,对异常值的判定按如下规定:异常值是指与预期有很大差距的科学实验的测定值。如果出现异常值,首先应对数据的来源进行调查,当能够找出该异常值是因人员或仪器故障等原因造成时,无论检验结论是否为异常值,都应直接排除该值,不能在后续的计算中使用;其次,可按照复测方法来进行异常值的筛选:包括将已经处理的样品重新进样和重新处理样品测定 2 种方式。

试验样品重新分析及报告值的选择也是整个试验中重要的环节,重新分析试验样品的理由可以在分析计划中列出:比如校正标样或质控样品的准确度或精密度不符合接受标准、进样不当或仪器功能异常、色谱不佳(如峰型差、峰丢失、柱效降低)等,这个可以由每个实验室在 SOP 中自行确定。笔者对重新分析后报告值的选择有如下规定:人体生物等效性试验通常不能接受由于药动学原因重新分析试验样品,因为这样会引起等效性结果的偏倚。若有符合 SOP 中列出的重新分析理由,则可进行复测,复测后结果无显著变化则保留第 1 次测定结果或以几次测定平均值作为该样品的测定结果;若复测结果与第 1 次测定结果偏差>15%,则需重新处理样品测定,舍弃之前的结果,以新处理样本的结果为准;若该异常值是因人员或仪器故障等原因造成时,无论检验结论是否为异常值,都应直接排除该值,不能在后续的计算中使用。

4 实验记录及总结报告撰写

2015 版“人体生物等效性/人体药代动力学试验数据现场核查要点”中明确表示:生物样本检测实验须有完整的原始记录,并要求核实记录的完整和原始性。实验记录是对试验过程中的发现和结果进行分析整理的过程,也是最原始的资料,是追溯实验数据最直接的证据。在进行临床试验时,一般将实验记录分成以下几个部分:实验设计或方案、实验时间、实验名称、实验环境(温度和湿度)、实验人员、实验材料、实验方法、实验过程、实验结果、结果分析和记录人。实验记录必须每日记录在实验记录本中,不允许隔天或

写在纸片上；对于用液相分析的原始数据，如果数量较多不方便手写，可将进样的名称、浓度、方法等从软件中拷贝出来，打印后贴在记录本中，这样每天进样的原始记录便一目了然；由于生物样品的建立和验证都不是一次就能成功的，所以即便是在试验过程中出现的阴性结果，也必须保留，如实记录下来，对于日后查找失败的原因以及发表科研文章都有好处。

关于人体生物等效性试验总结报告的撰写，应参考2016年国家药品监督管理局发布的《化学药品新注册分类申报资料要求(试行)的通告》^[31]，该通告的附件中有仿制药临床试验通用技术文件(CTD)的格式要求，其中包括临床试验项目汇总表、待测物和内标对照品的质检报告、方法学验证报告、生物样品分析计划、生物样品分析报告、生物等效性试验报告等格式内容。其中需要注意的是在方法学验证报告中，要求详细说明对照品称量、储备液和工作液的配制，以及标准曲线、质控样品等配制过程的操作步骤，并列表说明每步液体转移量，这个就要求大家在每次称量配制的过程中做好称量记录，并要标明该次称量的目的，在储备液稀释工作液时，尽量采用移液管进行转移，这样不仅可以方便记录每个步骤的转移量，还可以减少配制误差。

5 质量管理和数据管理

为了保证分析过程数据和结果的可靠性、可溯源性和真实性，应建立完善的质量管理体系。首先，应制订与项目相适应的SOP，其次，在试验的前、中、后期，质量控制人员应对实验人员、实验方案、实验室仪器设备及材料试剂、数据采集系统^[32]、分析方法、实验记录、总结报告等进行监督。质控人员应及时将监督内容和意见形成报告，项目负责人或实验室负责人应及时对监督报告做出反馈。

关于数据管理方面的质控，最重要的是纸质记录和电子记录，现在都要求用于生物样品分析数据管理和统计分析的计算机系统具有系统自动生成的稽查踪迹功能，只有经过授权的人员才允许记录和修改。原始数据的定量计算均是在分析软件中编辑好定量方法和自动积分方法等，由软件自动生成，应尽可能地始终使用同一个积分方法进行积分，当自动积分不适用而必需手动积分时，必须在原始记录中写明积分原因、自动积分

和手动积分2种结果，并由实验室负责人、项目负责人签字同意后方可修改。应按照“4”项下内容进行纸质记录，实验记录是最原始的资料，必须确保实验记录的完整、准确、清晰。

6 结语

目前我们国家的人体生物等效性试验生物分析还有待进一步的规范管理，生物样品分析测试数据仍需进一步提高质量，因此本文根据相关指导原则，结合自身工作实际，列举了人体生物等效性试验中生物样品分析的几个关键问题，希望能给同行提供借鉴参考。同时期望通过分析测试人员的共同努力，推动生物样品分析水平更上一层楼，为新药研发提供可靠的数据保障和支持。

REFERENCES

- [1] 国务院办公厅. 国务院办公厅关于开展仿制药质量和疗效一致性评价的意见[EB/OL]. 北京: 国务院办公厅, 2016-03-05 [2018-5-20]. http://www.gov.cn/zhengce/content/2016-03/05/content_5049364.htm.
- [2] 国家食品药品监管总局药品审评中心. 以药动学参数为终点评价指标的化学药物仿制药人体生物等效性研究技术指导原则[EB/OL]. 北京: 国家食品药品监管总局药品审评中心, 2015-11-27 [2018-5-20]. <http://www.cde.org.cn/zdyz.do?method=largePage&id=227>.
- [3] 中国药典. 四部[S]. 2015: 363-368.
- [4] ZHANG D, LIU M, WANG X L, et al. Key questions in bioanalysis in bioequivalence study [J]. Chin J New Drugs Clin Rem(中国新药与临床杂志), 2014, 33(3): 157-163.
- [5] WEI M J, LI K X. Bioanalysis performed according to regulations and guidelines [J]. Chin J Anal Pharm(药物分析杂志), 2014, 34(1): 12-16.
- [6] 朱雪萍. 体内药物分析的研究进展[J]. 中国实用医刊, 2011, 38(18): 114-115.
- [7] ROMAŃSKI M, GŁÓWKA F. Clinical bioanalysis of treosulfan and its epoxides: The importance of collected blood processing for valid pharmacokinetic results [J]. J Pharm Biomed Anal, 2018(153): 199-203.
- [8] 田华. 实验室药品标物应用与管理中常见问题分析及建议[J]. 中国计量, 2016(12): 46-47.
- [9] LI Q, CHEN J Z, GUO R C. Determination of ornidazole in plasma by HPLC and study on its pharmacokinetics and bioequivalence of domestic and imported tablets in 18 healthy volunteers [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2004, 21(2): 129-132.
- [10] SHAO R, LOU H G, RUAN Z R, et al. Determination of rosuvastatin in human plasma by UPLC-MS/MS and Its application to bioequivalence study [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther(中国临床药理学与治疗学), 2016, 21(2): 203-209.
- [11] FU W, REN X H, CHEN Q, et al. Pharmacokinetics and bioequivalence of trimebutine maleate sustained-release tablets with multiple dose administration [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(4): 462-466.
- [12] BHADORIYA A, DASANDI B, PARMAR D, et al.

- Quantitation of tadalafil in human plasma using a sensitive and rapid LC-MS/MS method for a bioequivalence study [J]. *J Pharm Anal*, 2018, 8(4): 271-276.
- [13] WANG Y, ZHOU Y B, TIAN J, et. al. Determination of isosorbide mononitrate in human plasma by gas chromatography with electron capture detector and study on the bioequivalence of Isosorbide Mononitrate tablets [J]. *J Pediatric Pharm*(儿科药理学杂志), 2009, 15(4): 39-41.
- [14] 毛姗. GC法测定人血浆中卵磷脂络合碘药物浓度及生物等效性的研究[J]. *中国实用医药*, 2015, 10(17): 140-141.
- [15] 宋耀虹, 冯涛, 林其燧. 生物素-链霉亲和素免疫学法测定地高辛的研究[J]. *生物化学与生物物理进展*, 1997, 24(6): 565-567.
- [16] 毛耀南, 钱南萍. 微生物法测定硫酸阿米卡星血药浓度[J]. *现代医药卫生*, 2007, 23(7): 1051-1052.
- [17] US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. Center for Veterinary Medicine. Guidance for industry: bioanalytical method validation [EB/OL]. New Hampshire, US Food and Drug Administration, 2001-05 [2018-5-20]. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf>.
- [18] European Medicines Agency. Guideline on validation of bioanalytical methods [EB/OL]. London, European Medicines Agency, 2011-07-21 [2018-5-20]. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf.
- [19] INGELSE B, BARROSO B, GRAY N, et al. European Bioanalysis Forum: recommendation on dealing with hemolyzed and hyperlipidemic matrices [J]. *Bioanalysis*, 2014, 6(23): 3113-3120.
- [20] WANG H Q, WANG M, LUO Z, et. al. Determination of plasma concentration by UPLC-MS/MS and bioequivalence of two finasteride preparations in human [J]. *Chin J New Drugs*(中国新药杂志), 2018, 27(4): 437-442.
- [21] CAI H L, DENG Y, FANG P F, et. al. A sensitive LC-MS/MS method for analysis of pericyazine in presence of 7-hydroxypericyazine and pericyazine sulphoxide in human plasma and its application to a comparative bioequivalence study in Chinese healthy volunteers [J]. *J Pharm Biomed Anal*. 2017(135): 67-74.
- [22] HU L L, TANG J L, ZHOU S W, et. al. Quantification of roxithromycin in human plasma by UPLC-MS/MS and its application in a pharmacokinetic study [J]. *China Measurement test*(中国测试), 2013, 39(6): 60-63.
- [23] HU L L, XU Y, ZHOU J, et. al. Quantification of levetiracetam in human plasma by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application in a pharmacokinetic study [J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2016, 36(4): 655-661.
- [24] JENJIRATTITHIGARN N, WORACHAT N, HORSUWAN S, et. al. Determination of plasma levetiracetam level by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) and its application in pharmacokinetics studies in neonates [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2018(1085): 13-20.
- [25] CHEN Z H, FENG S Y, NAN F, et. al. LC-MS/MS Determination of Tenofovir in Human Plasma and Its Bioequivalence [J]. *J Sichuan Univ (Med Sci Edi)* (四川大学学报: 医学版), 2018, 49(1): 107-112.
- [26] ZHANG C, WANG L, YANG Y, et. al. Validated LC-MS/MS method for the determination of sarpogrelate in human plasma: Application to a pharmacokinetic and bioequivalence study in Chinese volunteers [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 53(3): 546-551.
- [27] HUANG M, ZHANG Q Y, ZONG S L, et. al. Rapid determination of losartan in human plasma by LC-MS/MS and study on its bioequivalence [J]. *Pract Pharm Clin Rem*(实用药物与临床), 2017, 20(4): 443-446.
- [28] YU L, YANG L, SONG L, et. al. Study on the bioequivalence of Levonorgestrel tablets in healthy volunteers [J]. *West Chin J Pharm Sci*(华西药理学杂志), 2016, 31(4): 397-400.
- [29] BHADORIYA A, DASANDI B, PARMAR D, et. al. Quantitation of tadalafil in human plasma using a sensitive and rapid LC-MS/MS method for a bioequivalence study [J]. *J Pharm Anal*, 2018, 8(4): 271-276.
- [30] BHADORIYA A, RATHNAM S, DASANDI B, et. al. Sensitive and rapid determination of amantadine without derivatization in human plasma by LC-MS/MS for a bioequivalence study [J]. *J Pharm Anal*, 2018, 8(3): 202-207.
- [31] 国家食品药品监管总局. 总局关于发布化学药品新注册分类申报资料要求(试行)的通告[EB/OL]. 北京: 国家食品药品监管总局, 2016-05-04 [2018-05-20]. <http://www.samr.cfda.gov.cn/WS01/CL0087/151985.html>.
- [32] MAI L Y, CHEN X, AN J M, et al. Consideration on abbreviate new drug application in U.S.A. and its implication for China [J]. *Pharm Today*(今日药学), 2017, 27(10): 675-682.

收稿日期: 2018-07-06
(本文责编: 曹粤锋)