

以氘代利伐沙班为内标物的 UHPLC-MS/MS 法测定 Beagle 犬血浆中利伐沙班及其药动学研究

杜加秋, 董福霞, 蔡邱华(瀚晖制药有限公司, 杭州 311400)

摘要: 目的 建立测定 Beagle 犬血浆中利伐沙班浓度的 UHPLC-MS/MS 法。方法 以甲基叔丁基醚-二氯甲烷(2:1)沉淀蛋白处理血浆样品, 氘代利伐沙班(利伐沙班-d₄)为内标, 采用 Thermo BDS Hypersil C₁₈ 色谱柱(100 mm×4.6 mm, 2.4 μm); 流动相: A 相为甲醇溶液(含 0.015 mol·L⁻¹ 甲酸铵和 0.1% 甲酸); B 相为水-甲醇(90:10)溶液(含 0.015 mol·L⁻¹ 甲酸铵和 0.1% 甲酸), 梯度洗脱。质谱条件为电喷雾离子源, 正离子模式检测, 扫描方式为多反应离子监测。用于定量检测的离子反应分别为 [M+H]⁺ m/z 436@30 eV→m/z 144.900(利伐沙班)和 [M+H]⁺ m/z 440@24 eV→m/z 144.900(利伐沙班-d₄)。结果 血浆利伐沙班浓度在 0.5~400 ng·mL⁻¹ 内线性关系良好($r=0.996$), 定量下限为 0.5 ng·mL⁻¹, 批内、批间精密性均 <13%, 提取回收率 89.4%~96.5%, 基质效应 94.7%~97.2%。血浆样品冻存(-80 °C)33 d 稳定性良好, 反复冻融 3 次及提取后室温放置 12 h 条件下, 样品浓度均无显著变化。将本法应用于 Beagle 犬口服给予利伐沙班片后的药动学考察, 主要药动学参数如下: T_{max} (2.11±1.133)h, C_{max} (179.3±50.65)ng·mL⁻¹, $t_{1/2}$ (10.05±4.34)h, AUC_{0-t} (1161.6±339.74)h·ng·mL⁻¹。结论 试验结果表明本法操作简单, 灵敏度高, 重复性良好, 结果准确可靠, 可用于测定 Beagle 犬血浆中利伐沙班浓度和其体内的药动学研究。

关键词: UHPLC-MS/MS; 利伐沙班; 血药浓度; 药动学; Beagle 犬

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2020)15-1867-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.15.012

引用本文: 杜加秋, 董福霞, 蔡邱华. 以氘代利伐沙班为内标物的 UPLC-MS/MS 法测定 Beagle 犬血浆中利伐沙班及其药动学研究[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(15): 1867-1871.

Determination of Rivaroxaban in Beagle Dog Plasma by UHPLC-MS/MS with Deuterium Substituted Rivaroxaban as Internal Standard and Its Application in Pharmacokinetics Studies

DU Jiaqiu, DONG Fuxia, CAI Qiuhua(Hanhui Pharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou 311400, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an UPLC-MS/MS method for the determination of rivaroxaban in Beagle dog plasma. **METHODS** The plasma samples were treated with protein precipitated by methyl tert-butyl ether-dichloromethane (2:1), the deuterium substituted rivaroxaban(rivaroxaban-d₄) was selected as internal standard. The chromatographic separation was performed with a Thermo BDS Hypersil C₁₈ column (100 mm×4.6 mm, 2.4 μm) and gradient mobile phase (mobile phase A was methanol solution containing 0.015 mol·L⁻¹ ammonium formate and 0.1% formic acid; mobile phase B was water-methanol (90:10) solution containing 0.015 mol·L⁻¹ ammonium formate and 0.1% formic acid.). Mass spectrometry conditions were ESI⁺ with multiple reaction monitoring(MRM) mode. The ion reactions used for quantitative detection were [M+H]⁺ m/z 436@30 eV→ m/z 144.900 (rivaroxaban) and [M+H]⁺ m/z 440@24eV→m/z 144.900 (rivaroxaban-d₄). **RESULTS** Good linearity was obtained for rivaroxaban in the range of 0.5–400 ng·mL⁻¹($r=0.996$), the lower quantification of current method was 0.5 ng·mL⁻¹ for rivaroxaban. The intra- and inter-batch precision were <13%. The absolute recoveries ranged from 89.4% to 96.5% and the matrix effects were 94.7%–97.2%. The plasma samples were stored frozen (-80 °C) for 33 d with good stability. After three freeze-thaw cycles of the samples and at room temperature for 12 h after extraction, the change in samples concentration were not obvious. It was applied in dog pharmacokinetic study after oral administration of rivaroxaban tablets. The main pharmacokinetic parameters were as follows: T_{max} (2.11±1.133)h, C_{max} (179.3±50.65)ng·mL⁻¹, $t_{1/2}$ (10.05±4.34)h, AUC_{0-t} (1161.6±339.74)h·ng·mL⁻¹. **CONCLUSION** The trial results show that the method is simple in operation, high in sensitivity, good in reproducibility, accurate and reliable, and can be used to determine the concentration of rivaroxaban in Beagle dog plasma and *in vivo* pharmacokinetic studies in Beagle dog.

KEYWORDS: UHPLC-MS/MS; rivaroxaban; drug concentration; pharmacokinetics; Beagle dog

利伐沙班是一种高选择性、直接抑制因子 Xa 的口服抗凝血药物^[1], 临床用于治疗膝或髋关节置

换手术后减少深静脉血栓和肺栓塞的发生风险, 以及减少非瓣膜性心房纤维性颤动患者的卒中风险

作者简介: 杜加秋, 男, 硕士, 高级工程师

Tel: (0571)81689188

E-mail: Jiaqiu.Du@hanhui-pharma.com

险^[2-4]。利伐沙班较其他传统抗凝药物使用更方便、生物利用度高、无须监测。因检测为痕量检验,而血浆样品内成分众多,考虑了前处理步骤较多、便于追踪待测目标等因素,其中 UHPLC-MS/MS 具备专属性强,检出限低等特点^[5-7]。前期文献报道测定血浆中利伐沙班的含量采用盐酸苯海拉明,盐酸氨溴索、艾瑞昔布作为内标物^[5,8-9],这些内标物与利伐沙班为不同化合物,相当于引进了其他杂质。而氘代利伐沙班(利伐沙班-d₄)具有与待测物相接近的物理与化学性质,可显著降低血浆中的基质效应。本研究建立了以利伐沙班-d₄为内标物的 UHPLC-MS/MS,用于测定 Beagle 血浆中利伐沙班浓度,并获得其药动学参数。

1 仪器与试剂

Thermo TSQ Quantum ULtra(EMR)三重四级杆质谱仪、ULTimate 3 000 超高效液相色谱仪、数据处理系统为 LCQUANTM 2.9QF1,均来自 Thermo Scientific™; 5810R 低温离心机(Eppendorf); Wasp 自动封口机(KBiosystem); H1659 离心机(湖南湘仪); SELMA 自动吸样仪(CyBio); VX-2500 型自动震荡仪(美国 VWR); Mix Mate 自动涡旋仪(Eppendorf); XPR10 百万分之一电子天平(德国梅特勒公司); BS 21S 十万分之一电子天平(德国赛多利斯股份公司); Explores 系列超纯水机(上海橙黄仪器公司)。

甲醇、乙腈、甲基叔丁基醚为色谱纯(TEDIA),甲酸、甲酸铵和二氯甲烷均为分析纯试剂(国药集团); 自制去离子水; 利伐沙班对照品(浙江海正药业股份有限公司,批号: P1701; 含量: 99.8%); 利伐沙班-d₄对照品(TCL,批号: 1375-066A1; 含量: 99.4%); 利伐沙班片(拜耳医药保健有限公司,批号: BXH9521; 规格: 每片 10 mg)。

Beagle 犬,普通级,12 只,♀♂各半,体质量 10~13 kg,由上海甲干科技有限公司提供,生产许可证号: SCXK(沪)2015-0005; 实验动物合格证号: 0250288。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与质谱条件

色谱条件: Thermo BDS Hypersil C₁₈ 色谱柱(100 mm×4.6 mm, 2.4 μm),流动相 A 相为甲醇溶液(含 0.015 mol·L⁻¹ 甲酸铵和 0.1%甲酸),B 相为水-甲醇(90:10)溶液(含 0.015 mol·L⁻¹ 甲酸铵和 0.1%甲酸),梯度洗脱:0~1 min,55%A;1.5~3.5 min,95%A;3.6~5 min,55%A。流速为 0.65 mL·min⁻¹,

进样量 3 μL,柱温 40 °C。

质谱条件:电喷雾正离子化(ESI+)测定利伐沙班; 喷口电压 4 000 V,吹扫气压力 0.5 psi,鞘气压力 40 psi,辅助气压力 10 psi,毛细管温度 350 °C,碰撞气氩气压 1.2 mTorr。用于定量的离子反应:利伐沙班选择性反应监测[M+H]⁺ m/z 436@30eV→m/z 144.900; 内标利伐沙班-d₄选择性反应监测[M+H]⁺ m/z 440@24eV→m/z 144.900。2.3 min 切入质谱,3.5 min 切出质谱。

2.2 对照品溶液配制

2.2.1 利伐沙班对照品溶液 精密称定利伐沙班对照品 10.00 mg,置 100 mL 量瓶中,以乙腈为溶剂溶解,并稀释至刻度,摇匀作为储备液(100 μg·mL⁻¹)。再分别定量稀释配制成浓度分别为 5,10,30,50,100,300,1 000,2 500,4 000 ng·mL⁻¹ 系列溶液,作为利伐沙班对照品溶液。

2.2.2 利伐沙班质控溶液 精密称定利伐沙班对照品 10.00 mg,置 100 mL 量瓶中,以乙腈为溶剂溶解,并稀释至刻度,摇匀作为储备液(100 μg·mL⁻¹)。精密移取储备液,定量稀释制成 12,400,1 600 ng·mL⁻¹,作为利伐沙班质控溶液。

2.2.3 利伐沙班-d₄ 内标溶液 精密称取利伐沙班-d₄ 2.00 mg,置 100 mL 量瓶中,以乙腈为溶剂溶解,并稀释至刻度,摇匀作为储备液(20 μg·mL⁻¹),再定量稀释至 300 ng·mL⁻¹,作为利伐沙班-d₄ 血浆样品测定用的内标溶液。

2.3 血浆样品处理方法

2.3.1 含药血浆处理 自-80 °C低温冰箱中取出 Beagle 犬的含药血浆样品,室温解冻后,精密吸取血浆 200 μL 置 96 孔板中,精密加入乙腈 20 μL 和内标溶液 20 μL(300 ng·mL⁻¹),涡旋混匀 5 min,精密加入提取剂(甲基叔丁基醚:二氯甲烷=2:1)800 μL,自动封口机锡 1 箔纸封口,涡旋混匀 20 min 后,4 000 r·min⁻¹ 冷冻离心 10 min。定量吸取上清液 100 μL 至另一干净 96 孔板中,氮气吹干,精密加入 200 μL 初始比例流动相溶液(流动相 A-B 比例为 55:45),涡旋混匀后取上清液 3 μL,测定血浆中利伐沙班的浓度。空白血浆除未加入内标外,其余样品处理方法相同。

2.3.2 血浆标准曲线样品的配制与处理 精密吸取“2.2.1”项下各浓度利伐沙班对照品溶液 20 μL,分别置于 96 孔板中,各精密加入空白血浆 200 μL,涡旋混匀,后将有机溶剂吹干后复溶,分别配成

利伐沙班 0.5, 1, 3, 5, 10, 30, 100, 250, 400 ng·mL⁻¹ 系列血浆标准样本, 后续处理过程同“2.3.1”项下要求。

2.3.3 血浆质控样品的配制与处理 精密吸取“2.2.2”项下各浓度利伐沙班质控溶液 20 μL, 分别置于 96 孔板中, 各精密加入空白血浆 200 μL, 涡旋混匀, 后将有机溶剂吹干后复溶, 配制利伐沙班浓度分别为 1.2, 40, 160 ng·mL⁻¹ 的系列血浆质控样本, 后续处理过程同“2.3.1”项下要求。

2.4 分析方法验证

2.4.1 专属性 使用来自 6 只 Beagle 犬的空白血浆 200 μL, 精密加入乙腈 40 μL, 按“2.3.1”项下血浆样品处理方法以及“2.1”项下色谱条件进行处理, 图 1 结果显示, 利伐沙班和利伐沙班氘代物保留时间均在 3 min 左右, 空白血浆及空白溶剂均无杂质峰干扰分析物和内标的准确测定; 内标及分析物间不存在影响测定准确度的干扰。通过对来自 6 个不同个体的空白血浆进行测定, 表明血浆中内源性杂质不干扰样品测定。

2.4.2 标准曲线和线性范围 按照“2.3.2”项下配制处理并测定血浆标准曲线样品, 记录色谱图、分析物峰面积 A_s 和内标峰面积 A_i 。以利伐沙班浓度(c)为横坐标, 利伐沙班和内标物峰面积之比 R 为纵坐标, 采用加权($1/c^2$)最小二乘法进行回归^[10], 得回归方程 $R=0.02191c+0.001251$, $r=0.9961$ 。结果表明, 犬血浆中利伐沙班浓度在 0.5~400 ng·mL⁻¹ 内线性关系良好。

2.4.3 精密度和准确度 按“2.3.2”项下方法配制处理标准曲线最低点浓度血浆样本(LOQ), 同时按“2.3.3”项下方法配制处理低、中、高 3 种浓度的血浆质控样本, 每个浓度每批平行制备 6 个样本, 连续制备并测定 3 批, 每批随行一条标准曲线。记录色谱图(典型图谱见图 1), 分析物峰面积(A_s)和内标峰面积(A_i)。计算 A_s 和 A_i 的比值 $f(f=A_s/A_i)$, 将 f 值代入随行标准曲线, 求得实测浓度及其准确度(A_c)。批内和批间精密度的分别用批内($n=6$)和 3 批间($n=18$)的浓度实测值的 RSD 值表示。考察结果见表 1, 结果表明该方法的批内和批间精密度和准确度良好。

2.4.4 基质效应考察 按“2.3.1”项下处理 6 种不同来源的空白血浆, 制备空白基质。精密量取高、中、低浓度利伐沙班质控溶液 20 μL, 照“2.3.3”项下用空白血浆的提取液制备利伐沙班浓度分别为 1.2, 40, 160 ng·mL⁻¹ 样本, 以上浓度

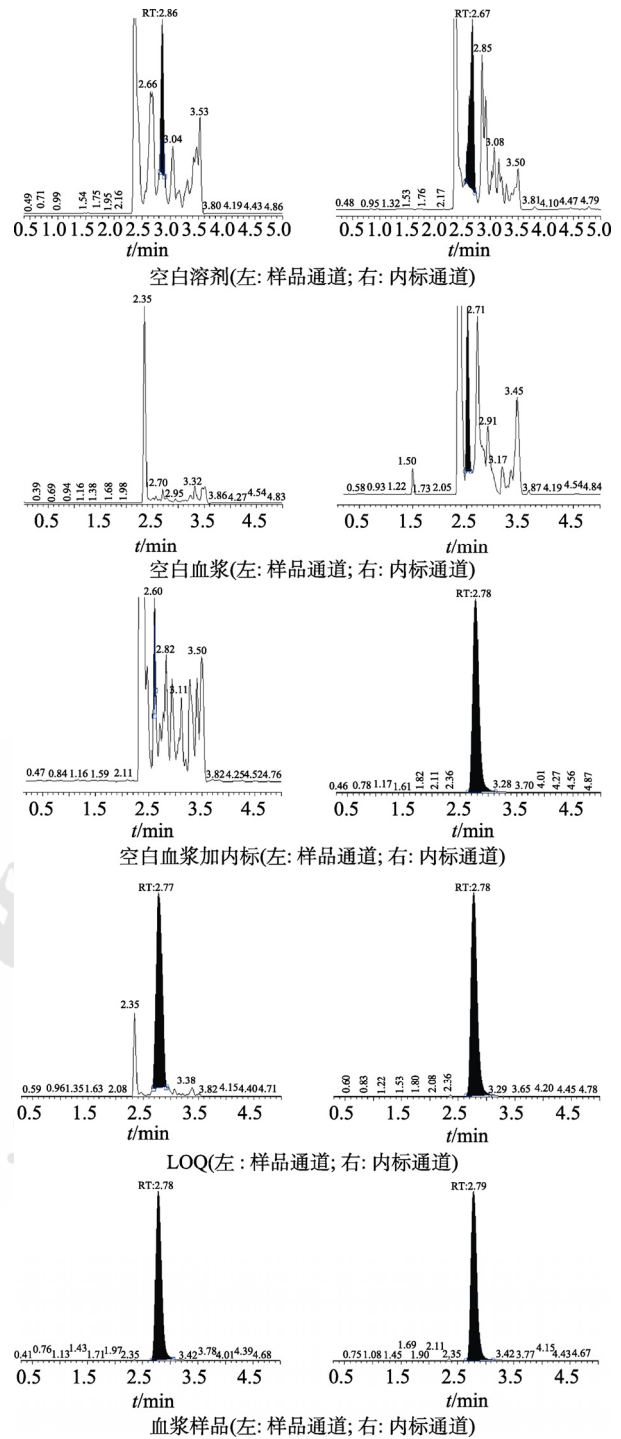


图 1 UPLC-MS/MS 典型色谱图

Fig. 1 Typical chromatograms of UPLC-MS/MS

表 1 比格犬血浆中利伐沙班的批内与批间准确度与精密度结果

Tab. 1 Results of intra and inter batch accuracy and precision determination for rivaroxaban in Beagle dogs' plasma

| 浓度/ng·mL ⁻¹ | 准确度/% | 精密度 | |
|------------------------|-------|-------------|--------------|
| | | 批内($n=6$) | 批间($n=18$) |
| 0.5 | 110.5 | 5.4 | 12.8 |
| 1.2 | 111.2 | 5.2 | 11.7 |
| 40 | 93.2 | 6.8 | 9.2 |
| 160 | 94.9 | 7.1 | 8.4 |

采用不同来源的空白血浆平行制备 6 份,与相同浓度的利伐沙班对照品溶液直接测定获得的峰面积比值,计算基质效应。结果显示,低、中、高浓度利伐沙班在血浆的基质效应分别为 94.7%, 95.6%, 97.2%, RSD 分别为 9.3%, 4.6%和 4.1%。这说明,在当前的分析条件下,不同来源的血浆基质对利伐沙班的测定没有影响。

2.4.5 提取回收率 取低、中、高浓度的质控样品($n=6$),按照“2.3.3”项下方法制备并测定;未提取样品:配制浓度分别为 1.2, 40, 160 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对照品溶液(流动相 A-B 比例为 55:45),取空白血浆,按“2.3.1”项下方法处理至氮气吹干,分别以上述 3 种浓度的溶液(200 μL)进行复溶,并测定。将提取样品与相同浓度未经提取样品的峰面积比较,计算利伐沙班的提取回收率。结果显示,低、中、高浓度样品的平均提取回收率分别为 89.4%, 93.2%, 96.5%,符合生物样本分析的要求。

2.4.6 血浆样品的稳定性考察 取低、中、高浓度的质控样品各 6 份进行稳定性考察:长期稳定性,将样品在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻 33 d;冻融稳定性,样品在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和室温放置,反复冻、融 3 次,每次间隔 12 h;萃取后样品稳定性,将处理好的样品室温放置 24 h 测定,以当天标准曲线分别计算利伐沙班浓度,血浆样品经上述条件处理,实测值与加入量无明显变化,说明利伐沙班在各条件下放置稳定良好,结果见表 2。

表 2 Beagle 犬血浆样品的稳定性考察结果

Tab. 2 Stability result of rivaroxaban in Beagle dog plasma

| 考察项目 | 1.2 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ | | 40 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ | | 160 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ | | |
|---|--|-----------|--|-----------|--|-----------|-------|
| | 测定值/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ | 准确 度/% | 测定值/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ | 准确 度/% | 测定值/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ | 准确 度/% | |
| 冷冻 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, 33 d | 平均值 | 1.316 | 109.7 | 41.86 | 104.7 | 156.0 | 97.5 |
| | SD | 0.11 | 7.8 | 2.8 | 5.6 | 9.1 | 7.4 |
| | RSD/% | 8.0 | 7.1 | 6.7 | 5.4 | 5.8 | 7.6 |
| 室温 12 h | 平均值 | 1.305 | 108.7 | 41.45 | 103.6 | 164.5 | 102.8 |
| | SD | 0.087 | 4.7 | 1.47 | 3.1 | 7.3 | 5.3 |
| | RSD/% | 6.7 | 4.3 | 3.5 | 3.0 | 4.4 | 5.2 |
| 冻融循环 1 | 平均值 | 1.152 | 96.0 | 42.45 | 106.1 | 156.6 | 97.9 |
| | SD | 0.061 | 5.1 | 0.51 | 4.7 | 3.2 | 4.8 |
| | RSD/% | 5.3 | 5.3 | 1.2 | 4.4 | 2.0 | 4.9 |
| 冻融循环 2 | 平均值 | 1.326 | 110.5 | 39.35 | 98.4 | 162.3 | 101.5 |
| | SD | 0.125 2 | 6.8 | 1.6 | 3.7 | 4.8 | 6.1 |
| | RSD/% | 9.4 | 6.2 | 4.1 | 3.8 | 3.0 | 6.0 |
| 冻融循环 3 | 平均值 | 1.108 | 92.4 | 40.43 | 101.1 | 163.5 | 102.2 |
| | SD | 0.073 76 | 6.2 | 2.1 | 5.1 | 3.6 | 3.2 |
| | RSD/% | 6.7 | 6.7 | 5.2 | 5.0 | 2.2 | 3.1 |
| 萃取后样品 2~8 $^{\circ}\text{C}$, 24 h | 平均值 | 1.308 | 109.0 | 41.14 | 102.9 | 158.1 | 98.8 |
| | SD | 0.084 | 6.2 | 3.2 | 4.7 | 3.3 | 4.3 |
| | RSD/% | 6.4 | 5.7 | 7.8 | 4.6 | 2.1 | 4.4 |

2.4.7 分析系统残留 在进样标准曲线定量上限样品后设置进样空白样品,记录色谱图,考察分析物的系统残留。考察结果显示,其色谱图中利伐沙班、 D_4 利伐沙班保留时间附近均无明显干扰峰存在。这表明,在选定的 UPLC-MS/MS 条件下,系统的残留效应在可接受范围内,不影响测定准确度。

2.5 药动学研究

12 只比格犬,雌雄各半,体质量(10.0 ± 1.0)kg。禁食过夜 12 h,分别给予 1 片(每片 10 mg)利伐沙班片,在口服给药前及给药后 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 5, 6, 8, 12, 16, 24 h 分别于前肢静脉取血 2 mL ^[5],收集于肝素化的离心管内,3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,分离血浆 $>300\text{ }\mu\text{L}$, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存。测定时按“2.3.1”项下方法处理后进样分析,药-时曲线见图 2。数据通过 Winnonlin 软件计算,主要药动学参数见表 3。

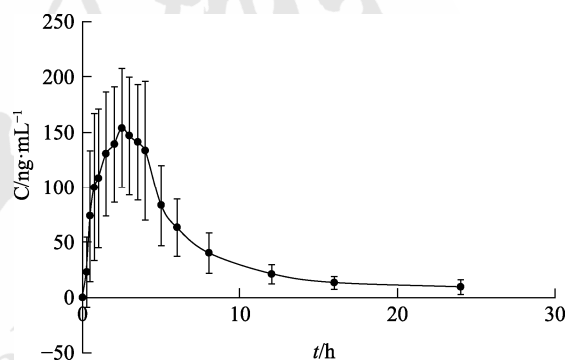


图 2 利伐沙班的平均药时曲线($n=12$)

Fig. 2 Mean drug concentration-time curve of rivaroxaban ($n=12$)

表 3 利伐沙班片在 Beagle 犬内的主要药动学参数($\bar{x}\pm s$, $n=12$)

Tab. 3 Main pharmacokinetic parameters of rivaroxaban in Beagle dogs($\bar{x}\pm s$, $n=12$)

| 参数 | 结果 |
|--|-----------------------|
| T_{\max}/h | 2.11 ± 1.13 |
| $t_{1/2}/\text{h}$ | 10.05 ± 4.34 |
| $C_{\max}/\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ | 179.3 ± 50.65 |
| $AUC_{0-4}/\text{h}\cdot\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ | $1\ 161.6\pm 339.74$ |
| $AUC_{0-\infty}/\text{h}\cdot\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ | $1\ 209.92\pm 336.67$ |
| AUC 外推比/% | 4.26 ± 4.15 |
| MRT | 7.97 ± 2.06 |

3 讨论

本研究建立并验证了以利伐沙班- d_4 作为内标物测定 Beagle 犬血浆中利伐沙班的 UPLC-MS/MS

方法,与先前报道的测定利伐沙班的 LC-MS/MS 方法^[5]相比,具有一些改进之处。本研究采用利伐沙班-d₄ 作为内标物,其与分析物物理化学性质非常接近,使得方法的稳定性和准确度更加良好,可显著降低复杂生物样本中的基质效应。为获得较高的质谱响应、良好的峰形,采用梯度洗脱的方法检测利伐沙班,样品分离度高,峰形好,检测灵敏度高,干扰小。本方法的灵敏度可达到 0.5 ng·mL⁻¹,比前期报道灵敏度提升了 40 倍。本研究建立的 UPLC-MS/MS 测定血浆中利伐沙班的方法,操作简便快速,灵敏度高,专属性强,回收率及精密度均符合药理学试验检测的要求。

本研究以上方法检测利伐沙班片在 Beagle 犬体内的药-时曲线数,获得体内药动学参数。结果显示 $T_{\max}=(2.11\pm 1.13)\text{h}$,与文献报道较接近,但个体间达峰时间差异较大, $C_{\max} (179.3\pm 50.65)\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, $t_{1/2}(10.05\pm 4.34)\text{h}$, $AUC_{0-t}(1\ 161.6\pm 339.74)\text{h}\cdot\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

REFERENCES

- [1] PERZBORN E, ROEHRIG S, STRAUB A, et al. Rivaroxaban: a new oral factor Xa inhibitor [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(3): 376-381.
- [2] INVESTIGATORS T E P. Oral rivaroxaban for the treatment of symptomatic pulmonary embolism [J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(14): 1287-1297.
- [3] ZHANG X Q, YIN X S, WANG X Y, et al. Progress in the prevention and treatment of thromboembolic diseases by rivaroxaban [J]. *Chin J New Drugs(中国新药杂志)*, 2020, 29(7): 744-748.
- [4] ZHANG Q Q, SUN X C, ZHOU X F et al. Analysis on effect of anticoagulants in treatment of elderly patients with non-valvular atrial fibrillation [J]. *Chongqing Med(重庆医学)*, 2016, 2(45): 486-489.
- [5] WANG X Y, YANG H Y, FAN J H, et al. Determination of rivaroxaban in beagle dog plasma by LC-MS/MS and its pharmacokinetics [J]. *Chin J Pharm(中国医药工业杂志)*, 2014, 45(12): 1163-1165.
- [6] KOROSTELEV M, BIHAN K, FERREOL L, et al. Simultaneous determination of rivaroxaban and dabigatran levels in human plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014(100): 230-235.
- [7] WEINZ C, SCHWARZ T, KUBITZA D, et al. Metabolism and excretion of rivaroxaban, an oral, direct factor Xa inhibitor, in rats, dogs, and humans [J]. *Drug Metab Dispos: Biol Fate Chem*, 2009, 37(5): 1056-1064.
- [8] CHENG L, CHEN J. Determination of rivaroxaban in Beagle dog plasma by LC-MS/MS and its pharmacokinetics [J]. *Chin Hosp Pharm J(中国医院药学杂志)*, 2014, 34(19): 1653-1656.
- [9] CUI W N, WANG S M, YANG X L, et al. Determination of rivaroxaban in rat plasma by LC-MS/MS and its pharmacokinetics [J]. *Chin J Pharm(中国医药工业杂志)*, 2015, 46(7): 722-725.
- [10] 钟大放. 以加权最小二乘法建立生物分析标准曲线的若干问题[J]. *药物分析杂志*, 1996, 16(5): 343-346.

收稿日期: 2019-12-20

(本文责编: 蔡珊珊)