

中图分类号: R917; R978.7 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2026)03-0076-05  
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2026.03.014



# 液相色谱串联质谱法测定人血浆中巴洛沙韦酸浓度\*

何文娟<sup>1</sup>, 崔文彦<sup>2</sup>, 安雪松<sup>2</sup>, 张心慧<sup>2</sup>, 李梦豪<sup>2</sup>, 李德强<sup>1</sup>, 刘秀菊<sup>1△</sup>

(1. 河北医科大学第二医院, 河北 石家庄 050000; 2. 河北医科大学, 河北 石家庄 050017)

**摘要:**目的 建立测定人血浆中巴洛沙韦酸浓度的液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)法。方法 血浆样品经甲醇沉淀蛋白后,以度鲁特韦为内标。色谱柱为 Phenomenex Luna<sup>®</sup>-C<sub>8</sub>柱(50 mm×2.1 mm, 3 μm),流动相为甲醇-0.1%甲酸水溶液(梯度洗脱),流速为0.35 mL/min,柱温为25℃,进样量为10 μL,采用电喷雾电离离子源,正离子模式下进行多反应监测,用于分析的离子对质荷比(*m/z*)分别为484.20→247.20(巴洛沙韦酸)、420.00→277.10(度鲁特韦)。结果 巴洛沙韦酸的质量浓度在0.50~80.00 ng/mL范围内与待测物和内标峰面积比值的线性关系良好( $r=0.9993, n=8$ ),定量下限为0.50 ng/mL,日内、日间精密度的RSD分别为3.27%~5.87% ( $n=3$ )、0.62%~9.12% ( $n=3$ ),稳定性试验的RSD均小于5%,提取回收率为89.90%~96.94%,基质效应为100.76%~115.00%。结论 该方法操作简便、专属性强、准确度高、稳定性好,可用于测定人血浆中巴洛沙韦酸的浓度。

**关键词:**液相色谱串联质谱法;巴洛沙韦酸;血药浓度

## Concentration Determination of Baloxavir Acid in Human Plasma by LC-MS/MS Method

HE Wenjuan<sup>1</sup>, CUI Wenyan<sup>2</sup>, AN Xuesong<sup>2</sup>, ZHANG Xinhui<sup>2</sup>, LI Menghao<sup>2</sup>, LI Deqiang<sup>1</sup>, LIU Xiujia<sup>1△</sup>

(1. The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050000, China; 2. Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050017, China)

**Abstract: Objective** To establish a liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for determining the concentration of baloxavir acid in human plasma. **Methods** After protein precipitation with methanol, plasma samples were analyzed with dolutegravir as the internal standard. The chromatographic column was Phenomenex Luna<sup>®</sup>-C<sub>8</sub> column (50 mm×2.1 mm, 3 μm), the mobile phase was methanol-0.1% aqueous formic acid solution (gradient elution), the flow rate was 0.35 mL/min, the column temperature was 25℃, and the injection volume was 10 μL. Electrospray ionization was used with a positive ion mode for multiple reaction monitoring. The ion pairs for analysis with mass-to-charge ratios (*m/z*) of 484.20→247.20 (baloxavir acid) and 420.00→277.10 (dolutegravir) were adopted. **Results** The linear range of baloxavir acid was 0.50-80.00 ng/mL ( $r=0.9993, n=8$ ). The lower limit of quantification was 0.50 ng/mL. The RSDs of the intra-day and inter-day precision tests were in the ranges of 3.27%-5.87% ( $n=3$ ) and 0.62%-9.12% ( $n=3$ ), respectively. The RSD of the

\*基金项目:河北省卫生健康委员会医学科学研究课题计划项目[20211192]。

第一作者:何文娟,女,硕士研究生,主管药师,研究方向为药物评价与药物相互作用,(电子信箱)hebhewj@126.com。

△通信作者:刘秀菊,女,硕士研究生,主任药师,研究方向为临床药理学与药物评价,(电子信箱)liuxiujia1@163.com。

备。故最优提取工艺确定为加10倍量水,浸泡1.0 h,煎煮3次,每次1.5 h。

### 参考文献

- [1] 张锦兴,唐蕾,李卓亚,等.利尿消炎合剂的薄层色谱鉴别[J].中国现代药物应用,2013,7(8):15-16.
- [2] 周俊,李雪芹,唐蕾,等.复方透骨宽筋洗剂提取工艺优化[J].中国药业,2021,30(23):48-51.
- [3] 梁志云,陈观凤,张俊杰,等.复方新会陈皮含片药材提取工艺优选[J].蛇志,2023,35(1):33-37.
- [4] 田凤,李权,王艳萍,等.正交试验法优选中药百部总生物碱提取工艺[J].黑龙江中医药,2021,50(1):421-422.
- [5] 都日娜,乌日娜.黄柏的研究进展[J].中国民族医药杂志,2008,14(3):75-76.
- [6] 孙森凤,张颖颖,褚万春.黄柏药理作用的研究进展[J].山东化工,2017,46(14):99-100.
- [7] 马欣,成妍,马蓉丽.黄柏萃取物的抑菌活性及其正丁醇萃取物化学成分分析[J].现代食品科技,2021,37(4):96-101.
- [8] 李先宽,冯杉,郑艳超,等.黄柏与关黄柏的化学成分及生物活性研究进展[J].药物评价研究,2019,42(5):1033-1037.
- [9] 路舜,崔红倩,申远.黄柏与关黄柏化学成分及药理作用研究进展[J].新乡医学院学报,2023,40(5):478-482.
- [10] 李文裕,肖候兰.黄柏煎剂的抗炎和抗菌作用研究[J].中国中医药现代远程教育,2018,16(23):90-91.
- [11] 汤景霞.川黄柏抗炎活性部位的筛选研究[J].中国处方药,2016,14(2):30-31.
- [12] 陈阳峰,钟晓红.黄柏的药理作用及其活性成分提取[J].作物研究,2015,29(5):564-568.
- [13] 王爱丽,唐启令,杜兴,等.清热消炎合剂提取工艺的改进[J].中国医院药学杂志,2010,30(15):1317-1318.
- [14] 钟世顺,刘若轩,郭洁文,等.脉复生的半仿生提取工艺评价[J].广东化工,2016,43(16):101-103.
- [15] 王兰霞,白亚明,张伯崇,等.消癥片中小檗碱的HPLC测定及其在制剂加工过程中的动态分析[J].中成药,1994,16(3):13-14.

(收稿日期:2024-12-11;修回日期:2025-12-06)

stability test was lower than 5%. The extraction recovery rate was in the range of 89.90% - 96.94%, and the matrix effect was in the range of 100.76% - 115.00%. **Conclusion** This method is simple, highly specific, accurate, and stable, which can be used to determine the concentration of baloxavir acid in human plasma.

**Key words:** LC - MS / MS; baloxavir acid; blood drug concentration

甲型流感(简称甲流)病毒是对人类致病性最强的流感病毒, 寄主范围广泛, 且几乎每年都会在全球范围内季节性流行暴发。玛巴洛沙韦是一种新型抗流感病毒药物, 其活性成分代谢物巴洛沙韦酸是流感病毒聚合酶复合物酸性聚合酶(PA)蛋白亚基的小分子抑制剂, 通过影响PA蛋白的帽依赖性内切酶(CEN)活性, 阻断流感病毒的复制, 对甲流病毒、乙型流感病毒及对神经氨酸酶抑制剂耐药的毒株均有活性, 且耐受性良好<sup>[1]</sup>。美国食品和药物管理局(FDA)于2018年10月批准玛巴洛沙韦单剂量口服用于治疗12岁及以上、症状持续时间不超过48 h的急性、无并发症的流感患者<sup>[2]</sup>, 并于2021年4月在我国上市。随着每年流感季的到来, 玛巴洛沙韦的临床应用与相关研究也越来越广泛<sup>[3-4]</sup>。根据玛巴洛沙韦的FDA指南草案<sup>[5]</sup>, 巴洛沙韦酸是在药代动力学和生物等效性研究中需测量的指定分析物。为此, 本研究中建立了测定血浆中巴洛沙韦酸浓度的液相色谱串联质谱(LC - MS / MS)法, 为其临床疗效的提高及相关临床试验的开展提供参考。现报道如下。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

API 4000 Plus型液相色谱 - 三重四极杆质谱联用仪, 配有电喷雾离子化源和Analyst 1.6.1数据处理系统(加拿大AB Sciex公司); Prominence CBM - 20A型液相色谱仪, 配有二元梯度泵、在线脱气机、自动进样器和柱温箱(日本Shimadzu公司); Sartorius CPA225D型天平(德国Sartorius公司); XW - 80A涡旋仪(上海医科大学仪器厂); 离心机(美国Abbott Laboratories公司)。

### 1.2 试剂

巴洛沙韦酸对照品(批号为wkq23010413, 纯度 ≥ 98%), 度鲁特韦(内标, 批号为wkq23010601, 纯度 ≥ 98%), 均购自四川省维克奇生物科技有限公司; 甲酸(色谱纯, 上海阿拉丁生物科技股份有限公司); 甲醇(色谱纯, 赛默飞世尔科技 < 中国 > 有限公司); 蒸馏水(广州屈臣氏食品饮料有限公司); 空白血浆(河北省血液中心)。

## 2 方法与结果

### 2.1 试验条件

#### 2.1.1 色谱条件

色谱柱: Phenomenex Luna<sup>®</sup> - C<sub>8</sub>柱(50 mm × 2 mm, 3 μm); 流动相: 0.1% 甲酸水溶液(A) - 甲醇(B), 梯度

洗脱(0 ~ 1.0 min时 10%B, 1.0 ~ 1.5 min时 10%B → 80%B, 1.5 ~ 3.5 min时 80%B, 3.5 ~ 3.6 min时 80%B → 100%B, 3.6 ~ 5.0 min时 100%B, 5.0 ~ 5.01 min时 100%B → 10%B, 5.01 ~ 8.0 min时 10%B); 流速: 0.35 mL / min; 柱温: 25 °C; 进样量: 10 μL。

#### 2.1.2 质谱条件

检测模式: 电喷雾电离(ESI)离子源, 正离子模式, 多反应监测(MRM); 离子源温度: 600 °C; 碰撞气体: 氮气; 雾化器气体: 空气(零级); 幕气气压: 30 psi; 碰撞气压: 10 psi; 离子源气体1(GS1)气压: 40 psi; 离子源气体2(GS2)气压: 45 psi; 离子喷射电压: 2 500 V; 巴洛沙韦酸定量离子质荷比(*m/z*): 484.20 → 247.20; 内标度鲁特韦定量离子 *m/z*: 420.00 → 277.10; 碰撞能量: 10 eV。

### 2.2 溶液制备

系列标准曲线溶液: 精密称取巴洛沙韦酸对照品10 mg, 置25 mL容量瓶中, 用乙腈溶解并定容, 即得质量浓度为0.4 mg / mL的对照品贮备液, 于4 °C保存, 备用。取对照品贮备液适量, 平行8份, 用甲醇稀释为质量浓度分别为0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 80.0 ng / mL的系列标准曲线溶液。

内标工作液: 取度鲁特韦适量, 精密称定, 用乙腈溶解并定容, 即得质量浓度为20 ng / mL的内标工作液。

模拟血浆样品: 取系列标准曲线工作液各20 μL, 置同一1.5 mL离心管中, 加空白血浆180 μL, 涡旋30 s, 即得模拟血浆样品。

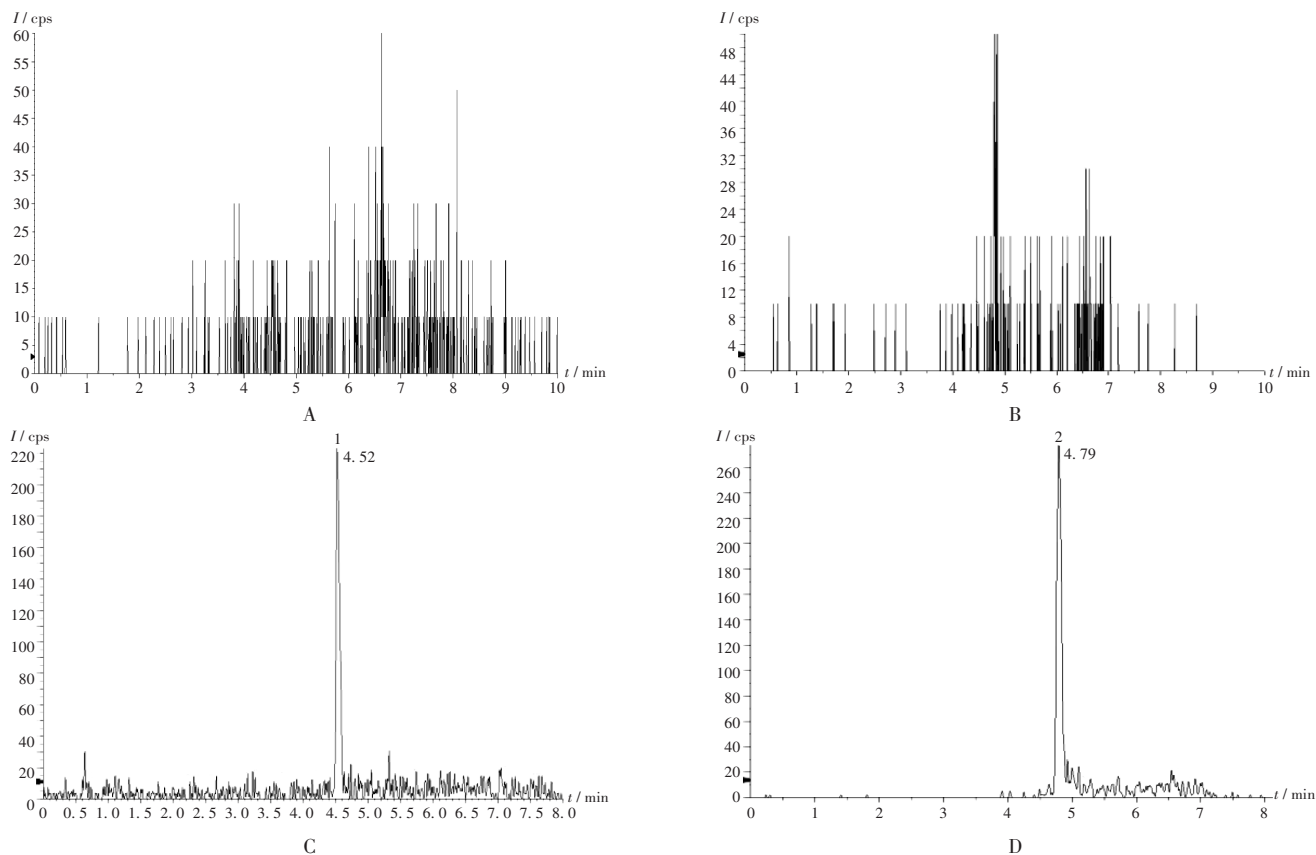
### 2.3 血浆样品前处理

取空白血浆样品200 μL, 加内标工作液20 μL, 涡旋, 混匀, 再加甲醇600 μL, 涡旋2 min, 离心(转速为10 800 r / min)10 min, 取上清液10 μL, 即得。

### 2.4 方法学考察

专属性试验: 取空白血浆200 μL, 除不加内标工作液外, 按2.3项下方法处理, 即得; 取2.2项下质量浓度为0.5 ng / mL的标准曲线溶液、内标工作液各20 μL, 分别加入空白血浆180 μL, 除不加内标工作液外, 按2.3项下方法处理, 即得。取上述3种溶液各适量, 按2.1项下试验条件进样测定, 记录色谱图。结果度鲁特韦和巴洛沙韦酸的保留时间分别为4.52 min和4.79 min, 且血浆内源性物质不干扰待测化合物与内标工作液的色谱峰。详见图1。

标准曲线建立与定量下限(LLOQ)确定: 取空白血



1. 度鲁特韦 2. 巴洛沙韦酸  
A - B. 空白血浆(分别监测度鲁特韦、巴洛沙韦酸) C. 空白血浆 + 度鲁特韦 D. 空白血浆 + 巴洛沙韦酸

图1 液相色谱串联质谱图

1. Dolutegravir 2. Baloxavir acid

A - B. Blank plasma (monitoring dolutegravir and baloxavir acid, respectively) C. Blank plasma + dolutegravir D. Blank plasma + baloxavir acid

Fig. 1 LC - MS / MS chromatograms

浆 180  $\mu\text{L}$ , 置离心管中, 分别加入 2.2 项下质量浓度分别为 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 80.0 ng/mL 的系列标准曲线溶液, 按 2.1 项下试验条件进样测定, 以信噪比 ( $S/N$ ) 为 10:1 的进样量为 LLOQ<sup>[6-8]</sup>, 以巴洛沙韦酸质量浓度 ( $X$ , ng/mL) 为横坐标、待测物与内标峰面积比值 ( $Y$ ) 为纵坐标, 按最小二乘法进行线性回归分析, 得回归方程  $Y = 0.2286X + 0.124$  ( $r = 0.9993, n = 8$ )。结果表明, 巴洛沙韦酸质量浓度在 0.50 ~ 80.0 ng/mL 范围内与待测物与内标峰面积比值的线性关系良好。巴洛沙韦酸的 LLOQ 为 0.50 ng/mL。

精密度试验: 分别取模拟血浆样品适量, 制备质量浓度分别为 1, 5, 60 ng/mL 的血浆样品, 按 2.1 项下试验条件, 分别于同 1 d 内连续进样测定 3 次或连续 3 d 进样测定 1 次, 记录峰面积。结果巴洛沙韦酸峰面积的  $RSD$  分别为 3.27% ~ 5.87% ( $n = 3$ ) 和 0.62% ~ 9.12% ( $n = 3$ ), 表明仪器精密度良好。

提取回收率与基质效应: 配制模拟血浆样品, 加低、中、高质量浓度分别为 1, 5, 60 ng/mL 的巴洛沙韦酸对照品溶液, 各 6 份, 按 2.3 项下方法处理, 按 2.1 项下试验条件

进样测定, 记录峰面积 ( $A$ )。取空白血浆 200  $\mu\text{L}$ , 加甲醇 600  $\mu\text{L}$  沉淀蛋白后, 取上清液 300  $\mu\text{L}$ , 分别加入上述低、中、高质量浓度的巴洛沙韦酸对照品溶液及内标工作液各 20  $\mu\text{L}$ , 混匀, 离心 (转速为 10 800 r/min) 10 min, 取上清液, 按 2.1 项下试验条件进样测定, 记录峰面积 ( $B$ )。另取甲醇 300  $\mu\text{L}$ , 分别加入上述低、中、高质量浓度的巴洛沙韦酸对照品溶液及内标工作液各 20  $\mu\text{L}$ , 混匀, 按 2.3 项下方法处理, 按 2.1 项下试验条件进样测定, 记录峰面积 ( $C$ )。计算提取回收率与基质效应, 提取回收率 (%) =  $A/B \times 100\%$ , 内标归一化基质效应 (%) =  $(B_{\text{待测}}/B_{\text{内标}})/(C_{\text{待测}}/C_{\text{内标}}) \times 100\%$ 。结果低、中、高质量浓度巴洛沙韦酸的提取回收率分别为 93.40%, 89.90%, 96.94%, 基质效应分别为 100.76%, 115.00%, 105.33%,  $RSD$  分别为 5.06%, 2.88%, 1.88%。

稳定性试验: 取巴洛沙韦酸对照品适量, 按 2.2 项下方法制备质量浓度分别为 10, 50, 600 ng/mL 的对照品溶液, 各平行 3 份, 分别置室温 4 h, -40  $^{\circ}\text{C}$  冷冻 3 d, -40  $^{\circ}\text{C}$  反复冻融 3 次, 按 2.1 项下试验条件进样测定, 记录峰面积。结果见表 1, 表明巴洛沙韦酸稳定性良好。

表1 稳定性试验结果(n=3)  
Tab. 1 Results of the stability test (n=3)

质量浓度	室温4h				-40℃冷冻3d				-40℃反复冻融3次			
	初始实测浓度 (ng/mL)	4h后实测浓度 (ng/mL)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)	初始实测浓度 (ng/mL)	3d后实测浓度 (ng/mL)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)	初始实测浓度 (ng/mL)	3次实测浓度 (ng/mL)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
1 ng/mL	0.96	0.96			0.96	0.93			0.96	0.95		
	0.96	0.96	0.9633	0.5994	0.96	0.96	0.9533	2.1837	0.95	0.96	0.9533	0.6057
	0.97	0.97			0.97	0.97			0.96	0.95		
5 ng/mL	4.77	4.74			4.77	4.74			4.63	4.62		
	4.69	4.69	4.7567	1.6057	4.69	4.56	4.7133	3.0105	4.76	4.54	4.5433	1.6520
	4.85	4.84			4.85	4.84			4.59	4.47		
60 ng/mL	58.65	58.36			58.65	58.23			57.21	57.12		
	56.32	56.96	57.5167	1.2913	56.32	56.55	57.0567	1.7864	57.70	56.96	57.6100	1.7193
	57.33	57.23			57.33	56.39			58.32	58.75		

### 3 讨论

甲流具有流行范围广、变异频繁、传染性强、季节性流行等特点<sup>[9]</sup>。单剂量玛巴洛沙韦治疗无并发症早期流感患者的有效性和安全性均较好<sup>[10]</sup>，且2023年至2024年的监测数据表明，我国大陆流行的季节性流感病毒总体上对神经氨酸酶抑制剂和巴洛沙韦敏感<sup>[11]</sup>。玛巴洛沙韦上市时间较短，虽全程只需口服1次，用药依从性优势明显<sup>[12-13]</sup>，但老年患者的身体功能减退、免疫力低下，且常合并多种基础疾病，服用抗流感病毒药物时多联用其他基础治疗或预防感染药物。同时，玛巴洛沙韦的半衰期长，虽便于老年患者用药，但一旦因合并用药相互作用，无法通过停药来减轻症状，故建立其血药浓度测定方法，可为后续研究其药物的相互作用提供方法支持。

巴洛沙韦酸在正、负离子模式扫描下均有响应，正离子模式下的响应值更高，故选择正离子扫描。巴洛沙韦酸的极性较小，不易洗脱，曾考察不同色谱柱(Waters C<sub>18</sub>柱、苯基柱、Phenomenex Luna<sup>®</sup> C<sub>8</sub>柱)与不同流动相(0.1%甲酸水溶液、0.2%甲酸水溶液、pH 3.5醋酸铵溶液、pH 3.0醋酸铵溶液、pH 3.5甲酸铵溶液、pH 3.0甲酸铵溶液、乙腈-0.1%甲酸水溶液)对色谱峰峰形的影响。结果显示，色谱柱为Phenomenex Luna<sup>®</sup> C<sub>8</sub>柱、流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液时的色谱峰峰形最佳，故选择色谱柱为Phenomenex Luna<sup>®</sup> C<sub>8</sub>柱，流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液。

综上所述，本研究中所建立的方法操作简便、专属性强、准确度高、稳定性好，可用于测定人血浆中巴洛沙韦酸浓度，为其血药浓度监测及药代动力学研究提供参考。

### 参考文献

[1] SHIRLEY M. Baloxavir marboxil: a review in acute uncomplicated influenza[J]. *Drugs*, 2020, 80(11): 1109-1118.

[2] Food and Drug Administration. Xofluza ( baloxavir marboxil ) tablets [EB / OL]. (2018 - 10 - 24)[2024 - 06 - 20]. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2018/210854s000lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/210854s000lbl.pdf).

[3] DUFRASNE F. Baloxavir marboxil: an original new drug against influenza[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2021, 15(1): 28.

[4] LOU Y, LIU L, YAO HP, et al. Clinical outcomes and plasma concentrations of baloxavir marboxil and favipiravir in COVID-19 patients: an exploratory randomized, controlled trial [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2021, 157: 105631.

[5] Food and Drug Administration. Draft Guidance on Baloxavir Marboxil [EB / OL]. (2019 - 09)[2024 - 06 - 20]. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/psg/PSG\\_210854.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/psg/PSG_210854.pdf).

[6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 467.

[7] 朱丽莎, 苏强, 唐春梅. 高效液相色谱法测定人血浆中伏立康唑浓度[J]. *中国药业*, 2024, 33(13): 56-58.

[8] 董维冲, 郭家良, 李亚前, 等. 超高效液相色谱法分析人血清中拉莫三嗪、奥卡西平及其代谢物浓度[J]. *中国临床药理学杂志*, 2022, 38(5): 453-456.

[9] DANANCHÉ C, SÁNCHEZ PICOT V, BÉNET T, et al. Burden of Influenza in Less Than 5 - Year - Old Children Admitted to Hospital with Pneumonia in Developing and Emerging Countries: A Descriptive, Multicenter Study [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2018, 98(6): 1805-1810.

[10] ISON MG, PORTSMOUTH S, YOSHIDA Y, et al. Early treatment with baloxavir marboxil in high - risk adolescent and adult outpatients with uncomplicated influenza (CAPSTONE-2): a randomised, placebo - controlled, phase 3 trial [J]. *Lancet Infect Dis*, 2020, 20(10): 1204-1214.

[11] 隗合江, 李希妍, 成艳辉, 等. 2023-2024 流感监测年度中国大陆流行的季节性流感病毒对神经氨酸酶抑制剂和巴洛沙韦的敏感性[J]. *病毒学报*, 2024, 40(6): 1255-1261.

[12] YANG TR. Baloxavir marboxil: the first cap - dependent endo-