

羟基氯喹检测方法的进展研究

岳圣尧, 葛星爱, 才欣宇, 陈莹莹, 刘宇轩, 闵瑾雯, 钱 昆*, 方 芳*, 王司淇*

锦州医科大学, 辽宁 锦州

收稿日期: 2024年4月23日; 录用日期: 2024年5月25日; 发布日期: 2024年6月26日

摘 要

羟基氯喹被广泛认知为在治疗疟疾和系统性红斑狼疮过程中起重要作用。然而, 随着羟基氯喹(HCQ)的不受控使用, 其在环境中的含量的迅速增加可能对水生生物造成严重问题。研究表明, HCQ存在于正常海水生态系统中, 并证实了其在植被和地下水中的高持久性和生物积累, 为了对海水中羟基氯喹含量进行检测并对其进行作为污染物潜力的研究, 我们需要开发一种用于定量和监测HCQ的传感器。随着技术的发展, 人们使用了许多分析方法进行检测, 包括通过包括高效液相色谱法(HPLC)、电化学法、液相色谱-质谱法(LC-MS)、荧光和比色平台双模式光学检测等等。尽管如此, 这些分析方法显示出各种困难。所以研究出一种方法, 使其可以快速、灵敏、环保地检测出羟基氯喹成为了一个很值得研究的课题。

关键词

痕量检测, 羟基氯喹, 传感器, 抗生素, 环境保护

Progress Research on Hydroxychloroquine Detection Methods

Shengyao Yue, Xing'ai Ge, Xinyu Cai, Yingying Chen, Yuxuan Liu, Jinwen Min, Kun Qian*, Fang Fang*, Siqi Wang*

Jinzhou Medical University, Jinzhou Liaoning

Received: Apr. 23rd, 2024; accepted: May 25th, 2024; published: Jun. 26th, 2024

Abstract

Hydroxychloroquine is widely recognized as playing an important role in the treatment of malaria and systemic lupus erythematosus. However, with the uncontrolled use of hydroxychloroquine (HCQ), its rapid increase in levels in the environment may cause serious problems for aquatic life.

*通讯作者。

文章引用: 岳圣尧, 葛星爱, 才欣宇, 陈莹莹, 刘宇轩, 闵瑾雯, 钱昆, 方芳, 王司淇. 羟基氯喹检测方法的进展研究[J]. 环境保护前沿, 2024, 14(3): 569-574. DOI: 10.12677/aep.2024.143078

Research shows that HCQ exists in normal seawater ecosystems and confirms its high persistence and bioaccumulation in vegetation and groundwater. In order to detect the content of hydroxychloroquine in seawater and study its potential as a pollutant, we need Development of a sensor for quantification and monitoring of HCQ. With the development of technology, many analytical methods have been used for detection, including high-performance liquid chromatography (HPLC), electrochemical methods, and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), fluorescence and colorimetric platforms and pattern optical detection and more. Nonetheless, these analytical methods display various difficulties. Therefore, developing a method that can detect hydroxychloroquine quickly, sensitively, and environmentally friendly has become a worthy research topic.

Keywords

Trace Detection, Hydroxychloroquine, Sensor, Antibiotics, Environmental Protection

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

氯喹(CQ)和羟基氯喹(HCQ)是 4-氨基喹诺酮衍生物, HCQ 的化学结构与 CQ 有所不同, N-乙基侧链末端有一个羟基, 降低其毒性, 同时保持其功效。其化学结构式如图 1 所示。它对除疟疾以外的其他疾病的益处的认识可以追溯到 1894 年, 当时佩恩报告说奎宁对治疗皮肤狼疮有效[1]。如今它广泛用于治疗系统性红斑狼疮(SLE), 类风湿性关节炎(RA), 皮炎和干燥综合征[2] [3] [4]。临床上, HCQ 比 CQ 使用更频繁, 因为它与 CQ 活性相似, 毒性较小[5] [6]。CQ 和 HCQ 常口服给药, 也可静脉注射。CQ 和 HCQ 的常见不良反应包括胃肠道不适、轻度恶心和偶尔的胃痉挛并伴有轻度腹泻[7]。长期使用 CQ 或 HCQ 有报告指出会导致严重的视网膜病变和视力丧失[8] [9] [10]。

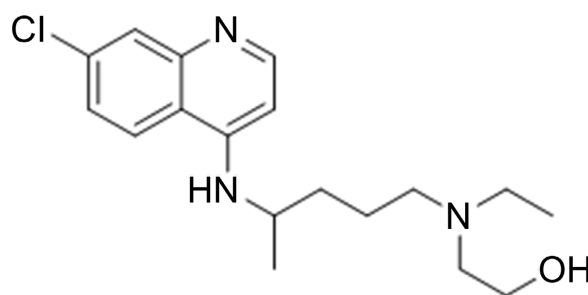


Figure 1. Hydroxychloroquine (HCQ) chemical structure

图 1. 羟基氯喹(HCQ)化学结构式

在 COVID-19 大流行的初始阶段, 它被广泛用作潜在的治疗方法, 导致其生产水平提高[11] [12] [13]。然而, HCQ 被不受控制的使用和释放到水系统, 可能会造成生物累积从而导致环境问题和公共卫生问题。最近的研究表明, HCQ 存在于正常海水生态系统中, 并且证实了其在植被和地下水中的高持久性和生物积累[14] [15] [16], 因此, 开发快速、简单、灵敏的方法来检测水样中的 HCQ 并对其作为污染物潜力进行研究至关重要。如果能有一个方法可以检测羟基氯喹的含量, 我们就可以防患于未然, 避免羟基氯喹对环境和生物造成不必要的损失。

本文开展羟基氯喹检测方法进展的研究重点关注分析方法本身，为判断羟基氯喹的污染物潜力提供一个方便快捷的实验方法。

2. 羟基氯喹的检测方法

随着科学技术的发展，检测羟基氯喹含量的方法和技术手段也越来越多。经过大量文献查阅，总结了近年来羟基氯喹检测的方法如表 1。

Table 1. Hydroxychloroquine detection method
表 1. 羟基氯喹检测方法

检测方法	线性范围	检测限	优缺点	引文
同步分光荧光测定	23.04~276.53 nM	3.50 nM	简单灵敏但仅限于特点药物	[17]
液相微萃取 - 气相色谱 - 质谱法	3.6~1236.6 mg/kg	2.4 µg/kg	高灵敏度但耗时需要专业仪器	[18]
高效液相色谱	-	0.34 µg/ml	创新，高准确性但耗时	[19] [20]
电化学检测	0.4~7.5 µM	0.04 µM	低成本，便携，稳定性未评估	[21]
荧光和比色平台双模式光学检测	0.24~5.17 µM, 18.0~240.0 nM	120 nM, 9.2 nM	快速，灵敏但检测限不低	[1] [22] [23] [24]

El Sharkasy 等人在 2022 年发表的这篇文章，描述了同步荧光光度法的开发和验证，用于同时测定药物制剂和生物液体(如人血浆)中的药物法维匹拉韦(FPV)和羟基氯喹(HCQ)。所提出的同步荧光分光光度法似乎是一种简单、灵敏且环保的方法，用于同时定量分析药物制剂和生物液体中的法匹拉韦和羟基氯喹。其优点包括灵敏度高、线性好、能够同时分析两种药物而无需任何预分离步骤。然而，其应用可能仅限于这些特定药物，并且生物样品中其他荧光化合物的潜在干扰需要进一步研究[17]。

2021 年，Bodur 等人的发表的这篇文章提出了一种新的分析方法——一种超声辅助喷雾细滴形成液相微萃取与气相色谱 - 质谱联用的方法(UA-SFDF-LPME-GC-MS)，用于测定尿液、血清和唾液等生物样品中药物硫酸羟基氯喹的痕量水平。他们利用统计分析方法系统地优化了各种提取参数，如溶剂、样品体积、氢氧化钠浓度、混合方法等。他们优化方法的一些关键优势包括：极低的检测限(0.7 µg/kg)和定量限(2.4 µg/kg)，与常规 GC-MS 分析相比，灵敏度提高约 440 倍。在较宽的浓度范围内(3.6~1236.6 µg/kg)具有良好的线性。使用微萃取最大限度地减少溶剂消耗。与之前报道的用于羟基氯喹分析的 HPLC 和电泳方法相比，这种 GC-MS 方法需要的样品量要少得多，并且在痕量水平上具有更高的灵敏度[18]。

2015 年，YingQu 等人研究了一种简单、精确、灵敏的高效液相色谱(HPLC)荧光检测法，检测 HCQ 的含量，该方法采用蛋白质沉淀样品前处理，在苯基柱上分离 HCQ、DHCQ 和 DCQ，用荧光检测器检测。标准曲线在 115~9217 nM 范围内呈线性。同工重现日内和日间精密度范围为 4.3%~10.3%。HCQ 的最低定量限为 115 nM。该方法简便、实用，已应用于常规监测 SLE 患者 HCQ 及其代谢物的全血暴露水平。其结果与 LC-MS/MS 和另一种 HPLC 方法相关性良好[20]。Xiong 等研究人员于 2021 年开发了一种准确且可重复的正相手性 HPLC 方法，使用 ChiralpakAD-H 柱来分析抗疟疾药物羟基氯喹(HCQ)的两种对映体。该方法实现了 HCQR 和 S 对映体的基线分离，这是以前方法的主要限制。首次实现的 HCQ 对映体的基线分离，能够对每种对映体进行定量分析。在等度洗脱流动相中不使用盐，简化了方法。通过实验证明了其方法的出色的特异性、准确性(RSD < 5%)和重现性。对映体的定量下限(0.20~0.34 µg/mL)。适用于血浆等生物样品中对映体的定量。提供了一个重要的分析工具来比较 HCQ 对映体对潜在

COVID-19 治疗的功效和毒性[19]。

在 2022 年, Carvalho 等人发表了关于用于检测羟基氯喹(HCQ)的 3D 打印电化学传感器的开发的文章。随着 HCQ 的广泛使用, HCQ 现在被认为是一种潜在的环境污染物, 这就表明需要简单的分析方法来监测它。Carvalho 等人关键的创新是通过 3D 打印技术制造整个电化学装置, 包括电化学电池和工作电极。工作电极使用含有炭黑的导电聚乳酸(PLA)丝进行 3D 打印。经过电化学预处理后, 这种 3D 打印电极在 Britton-Robinson 缓冲液中对 HCQ 氧化表现出优异的电化学活性。详细的电化学研究表明, HCQ 经历两个 pH 依赖性氧化过程, 分别涉及 1 个和 2 个电子。针对 HCQ 检测进行了方法优化, 提供 0.4~7.5 μM 的线性响应, 检测限为 0.04 μM 。此外, 传感器成功检测到自来水样品中添加的 HCQ, 回收率在 99%~112% 之间, 证明了其在环境监测中的适用性。3D 打印电化学传感器显示出低成本、便携性和简单样品基质中 HCQ 检测的良好性能等有前景的特性[21]。

2014 年, Ferraz 等人研究利用质量优化设计(QbD)理念, 在美国药典(USP)推荐方法的基础上, 优化了样品制备和分析条件, 建立了一种新的紫外分光光度测定羟氯喹硫酸盐含量的方法。优化后的新方法只需使用水作为溶剂, 无需超声波处理, 大大简化了操作。按照要求, 对该新方法进行了全面的验证, 评估了选择性、线性、检测限、定量限、精密度、准确度和稳健性等参数。结果表明, 在 200~700 nm 波长范围内, 新方法具有良好的线性($R^2 > 0.999$)、线性范围 18~27 μM 、较低的检测限(0.5 μM)和定量限(1.5 μM)、满意的精密度($\text{RSD} < 2\%$)和准确度(96%~102%)。同时, 对 pH、浓度、时间和波长等因素的改变, 新方法表现出很好的稳健性[1]。

2016 年, Amit Singh 等人研究了一种简单、灵敏、准确的紫外分光光度法, 用于定量测定原料药和制剂中的羟氯喹硫酸盐(HCQ)含量。该方法使用 0.1 NHCl 作为溶剂, 在 343 nm 波长下测定 HCQ 的吸光值。在 1~20 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度范围内, 吸光值与浓度呈良好线性关系, 相关系数为 0.9992。线性范围: 1~20 $\mu\text{g/mL}$ 。精密度 RSD 小于 1%。加样回收实验的回收率在 98.4%~100.25%之间该方法被成功应用于定量测定 HCQ 原料药和片剂制剂(Plaquenil)中的含量, 测定结果与标示值吻合良好。所建立的紫外分光光度测定方法操作简便、快速、重现性好、准确度高, 满足 ICH 验证要求, 可用于 HCQ 原料药和制剂的常规质量控制分析[22]。在 2024 年报道的研究中, Doğan 等人提出了两种光学、荧光和比色检测平台, 用于快速、灵敏地检测 HCQ。这些平台利用了高荧光染料硫磺素 T(ThT)和 Tel24G-四链体(G4) DNA 结构之间的相互作用, 以及带负电荷的柠檬酸盐封端的银纳米粒子(Cit-AgNP)的盐诱导聚集行为在 HCQ 存在的情况下。在荧光法中, HCQ 的添加导致 ThT + Tel24 探针的荧光信号显著且快速下降。在比色法中, HCQ 在 NaCl 存在下诱导 Cit-AgNP 聚集, 导致颜色从黄灰色变为无色。在优化条件下, 比色平台的线性范围为 18.0~240.0 nM, 检出限为 9.2 nM; 荧光平台的线性范围为 0.24~5.17 μM , 检出限为 120 nM。通过评估对其他结构相似的小分子的响应, 证明了所提出的光学方法对目标分析物的选择性。最后, 通过分析添加 HCQ 的人体尿液样本, 证实了两种检测系统的实际适用性[23] [24]。

3. 结语

通过查阅近几年的文献, 我们发现羟基氯喹的检测方法主要包括液相色谱法, 分光光度法以及电化学检测方法, 我们对其几种方法进行了对比分析。羟基氯喹检测方法中最早是使用液相色谱法进行检测, 其方法具有高准确性, 但此检测方法存在一定弊端, 需要相应的专业实验仪器和相应的实验技术且耗时, 不利于人们正常生活快速检测。随着技术发展, Ferraz 等人开始运用一种紫外 - 可见分光光度法去检测羟基氯喹, 该检测方法直观地将药物含量用荧光的方式展现出来, 但其检测限和检测范围不够低, 需要继续优良实验方法。荧光检测方法中值得一提的是由 ElSharkasy 等人提出的同步荧光光度法, 同时测定两种药物法维匹拉韦(FPV)和羟基氯喹(HCQ)的含量, 灵敏度高、线性好、且无需任何预分离步骤, 其局

限性在于只能测定特点药物,对其他药物组合的检测效果未知。近几年新的检测方法是2022年由Carvalho等人提出的电化学检测,使用3D打印技术检测羟基氯喹,为羟基氯喹的检测技术发展之路提供了一个新的研究思路,但其稳定性还需进一步考量。

4. 展望

羟基氯喹的检测方法的研究还有很大发展前景,研究一种方法怎样可以高效快速检测不同水基质中羟基氯喹的含量,帮助人们预防体内羟基氯喹含量过高导致的疾病,以及检测环境中羟基氯喹的含量判断其污染性。

基金项目

感谢大学生创新创业项目《纳微粒子构筑的柔性可穿戴式双酚A传感器》,编号:S202310160004和《限域合成的量子点MOF主客体功能材料在ROS方面的应用研究》,编号:S202210160001的支持。也感谢教育锦州医科大学教育改革研究课题(编号:YJ2022-018和YB2022042)对本研究的支持。

参考文献

- [1] Ferraz, L.R.M., Santos, F.L.A., Ferreira, P.A., *et al.* (2014) Quality by Design in the Development and Validation of Analytical Method by Ultraviolet-Visible Spectrophotometry for Quantification of Hydroxychloroquine Sulfate. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, **5**, 4666.
- [2] Carr, R.E., Henkind, P., Rothfield, N. and Siegel, I.M. (1968) Ocular Toxicity of Antimalarial Drugs. *American Journal of Ophthalmology*, **66**, 738-744. [https://doi.org/10.1016/0002-9394\(68\)91300-7](https://doi.org/10.1016/0002-9394(68)91300-7)
- [3] Xu, C., Zhu, L., Chan, T., Lu, X., Shen, W., Madigan, M.C., *et al.* (2016) Chloroquine and Hydroxychloroquine Are Novel Inhibitors of Human Organic Anion Transporting Polypeptide 1A2. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **105**, 884-890. <https://doi.org/10.1002/jps.24663>
- [4] Dongre, V.G., Ghugare, P.D., Karmuse, P., Singh, D., Jadhav, A. and Kumar, A. (2009) Identification and Characterization of Process Related Impurities in Chloroquine and Hydroxychloroquine by LC/IT/MS, LC/TOF/MS and NMR. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **49**, 873-879. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.01.013>
- [5] Koranda, F.C. (1981) Antimalarials. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **4**, 650-655. [https://doi.org/10.1016/s0190-9622\(81\)70065-3](https://doi.org/10.1016/s0190-9622(81)70065-3)
- [6] Mallhi, T.H., Ahmad, A., Butt, M.H., *et al.* (2020) Chloroquine and Hydroxychloroquine in COVID-19: Practice Implications for Healthcare Professionals. *Journal of College of Physicians and Surgeons Pakistan*, **30**, 124-128.
- [7] Akarsu, S. (2020) Hydroxychloroquine: From Pharmacological Profile to Neglected Adverse Reactions. *The Journal of Basic and Clinical Health Sciences*, **4**, 205-211. <https://doi.org/10.30621/jbachs.2020.1165>
- [8] Shearer, R.V. and Dubois, E.L. (1967) Ocular Changes Induced by Long-Term Hydroxychloroquine (Plaquenil) Therapy. *American Journal of Ophthalmology*, **64**, 245-252. [https://doi.org/10.1016/0002-9394\(67\)92518-4](https://doi.org/10.1016/0002-9394(67)92518-4)
- [9] Yusuf, I.H., Sharma, S., Luqmani, R. and Downes, S.M. (2017) Hydroxychloroquine Retinopathy. *Eye*, **31**, 828-845. <https://doi.org/10.1038/eye.2016.298>
- [10] Marmor, M.F., Kellner, U., Lai, T.Y.Y., Melles, R.B. and Mieler, W.F. (2016) Recommendations on Screening for Chloroquine and Hydroxychloroquine Retinopathy (2016 Revision). *Ophthalmology*, **123**, 1386-1394. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2016.01.058>
- [11] Chen, Z., Hu, J., Zhang, Z., *et al.* (2020) Efficacy of Hydroxychloroquine in Patients with COVID-19: Results of a Randomized Clinical Trial.
- [12] Elavarasi, A., Prasad, M., Seth, T., Sahoo, R.K., Madan, K., Nischal, N., *et al.* (2020) Chloroquine and Hydroxychloroquine for the Treatment of COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of General Internal Medicine*, **35**, 3308-3314. <https://doi.org/10.1007/s11606-020-06146-w>
- [13] Singh, A.K., Singh, A., Singh, R. and Misra, A. (2020) Hydroxychloroquine in Patients with COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, **14**, 589-596. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2020.05.017>
- [14] Farias, D.F., Souza, T., Souza, J.A.C.R., Vieira, L.R., Muniz, M.S., Martins, R.X., *et al.* (2020) COVID-19 Therapies in Brazil: Should We Be Concerned with the Impacts on Aquatic Wildlife? *Environmental Toxicology and Chemistry*, **39**, 2348-2350. <https://doi.org/10.1002/etc.4888>

-
- [15] Ben Ali, M., Hedfi, A., Almalki, M., Karachle, P.K. and Boufahja, F. (2021) Toxicity of Hydroxychloroquine, a Potential Treatment for COVID-19, on Free-Living Marine Nematodes. *Marine Pollution Bulletin*, **167**, Article ID: 112361. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112361>
- [16] Patel, M., Kumar, R., Kishor, K., Mlsna, T., Pittman, C.U. and Mohan, D. (2019) Pharmaceuticals of Emerging Concern in Aquatic Systems: Chemistry, Occurrence, Effects, and Removal Methods. *Chemical Reviews*, **119**, 3510-3673. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00299>
- [17] El Sharkasy, M.E., Tolba, M.M., Belal, F., Walash, M. and Aboshabana, R. (2022) Quantitative Analysis of Favipiravir and Hydroxychloroquine as FDA-Approved Drugs for Treatment of COVID-19 Using Synchronous Spectrofluorimetry: Application to Pharmaceutical Formulations and Biological Fluids. *Luminescence*, **37**, 953-964. <https://doi.org/10.1002/bio.4240>
- [18] Bodur, S., Erarpat, S., Günkara, Ö.T. and Bakırdere, S. (2021) Accurate and Sensitive Determination of Hydroxychloroquine Sulfate Used on COVID-19 Patients in Human Urine, Serum and Saliva Samples by GC-MS. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, **11**, 278-283. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2021.01.006>
- [19] Xiong, X., Wang, K., Tang, T., Fang, J. and Chen, Y. (2021) Development of a Chiral HPLC Method for the Separation and Quantification of Hydroxychloroquine Enantiomers. *Scientific Reports*, **11**, Article No. 8017. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87511-5>
- [20] Qu, Y., Noe, G., Breaud, A.R., Vidal, M., Clarke, W.A., Zahr, N., *et al.* (2015) Development and Validation of a Clinical HPLC Method for the Quantification of Hydroxychloroquine and Its Metabolites in Whole Blood. *Future Science OA*, **1**, FSO26. <https://doi.org/10.4155/fso.15.24>
- [21] Carvalho, M.S., Rocha, R.G., de Faria, L.V., Richter, E.M., Dantas, L.M.F., da Silva, I.S., *et al.* (2022) Additively Manufactured Electrodes for the Electrochemical Detection of Hydroxychloroquine. *Talanta*, **250**, Article ID: 123727. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123727>
- [22] Singh, A., Sharma, P.K., Gupta, R., *et al.* (2016) Development and Validation of UV-Spectrophotometric Method for the Estimation of Hydroxychloroquine Sulphate.
- [23] Ünal Taş, D. (2022) A New Method for Hydroxychloroquine Detection. Middle East Technical University.
- [24] Doğan, K., Ünal Taş, D., Persil Çetinkol, Ö. and Forough, M. (2024) Fluorometric and Colorimetric Platforms for Rapid and Sensitive Hydroxychloroquine Detection in Aqueous Samples. *Talanta*, **270**, Article ID: 125523. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.125523>