

COVID-19研究经验：在兼容MS的硫酸羟氯喹分析条件下验证HPLC/UV方法的性能。

Margaret Maziarz

Waters Corporation



需要帮助？如需详细了解沃特世如何为您抗击新型冠状病毒肺炎(COVID-19)提供助力，请联系 [新型冠状病毒肺炎\(COVID-19\)疫情创新响应团队](#)

这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

硫酸羟氯喹（图1）是一种有效的抗疟药物，和许多小分子药物一样，本文将其作为新型冠状病毒的潜在治疗药物进行研究。虽然目前的临床证据似乎不支持对住院的SARS-CoV-2感染患者使用羟氯喹，但沃特世在COVID-19疫情早期就已经开始研究改进的分析方法。本应用简报介绍了一种用于硫酸羟氯喹分析的快速HPLC/UV方法，该方法采用兼容MS的条件。质谱分析(MS)有助于研究人员准确鉴定制剂过程或常规检测期间可能产生的新组分或未知组分。与硫酸羟氯喹片剂分析的现行USP专论方法(USP42-NF37)相比，新方法的分离度更高、拖尾更少且运行时间更短。无论羟氯喹对COVID-19的最终临床结果如何，这些分析进展对于羟氯喹分析都具有普适性。此外，这项工作可部分转移到其它小分子药物的分析中。

优势

- 使用ACQUITY Arc系统并且兼容MS条件的快速可靠的HPLC/UV方法
- 与USP方法相比，羟氯喹与氯喹峰的分离度更高，峰拖尾减少
- 利用ACQUITY QDa检测器采集的质谱数据快速准确地鉴定峰

简介

长期以来，羟氯喹(HCQ)一直用作抗疟疾的化学预防类药物，近来也开始用于慢性自身免疫性疾病的辅助治疗¹。早期的体外研究结果表明，该活性药物成分可能对SARS-CoV-2感染有抑制作用²。但目前的临床共识似乎不支持对COVID-19住院患者使用羟氯喹，而这些患者是临床研究的主要患者人群^{3,4,5}。无论如何，对于该药物在SARS-CoV-2感染过程中的早期应用或作为暴露前预防的使用仍存在一些疑问⁶。在COVID-19疫情初期，政府和制药公司积极开展羟氯喹的临床研究，同时，我们考察了新的分析方法，以支持药物开发和生产过程中对更快速、更高性能、MS兼容型方法的潜在需求。

本应用简报介绍了一种快速可靠的HPLC/UV方法用于分析硫酸羟氯喹，该方法既能够使用兼容MS的缓冲液，又能满足USP系统适应性要求⁷。

无论是否使用羟氯喹治疗COVID-19，这种新型分析方法总体上对于羟氯喹均适用，并有可能部分转移至类似的小分子药物。

Hydroxychloroquine sulfate

- $C_{18}H_{28}ClN_3O_5S$
- Monoisotopic mass: 433.14 Da
- Free base monoisotopic mass: 335.18 Da

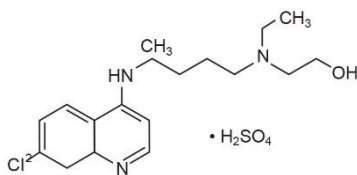


图1. 硫酸羟氯喹

结果与讨论

兼容MS的现代化方法与现行USP方法的硫酸羟氯喹片剂分析条件汇总于表1。

Parameter	New HPLC method with MS compatible conditions	USP monograph method ⁶
LC system	ACQUITY Arc	ACQUITY Arc
Detection	PDA (derived at 254 nm) and ACQUITY QDa	PDA (derived at 254 nm)
Column(s)	XSelect CSH C_{18} , 4.6 × 100 mm, 3.5 μ m	Symmetry C_{18} , 4.6 × 250 mm, 5 μ m
Column temp.	40 °C	30 °C
Injection volume	10 μ L	20 μ L
Flow rate	1.5 mL/min	1.0 mL/min
Mobile phase	Acetonitrile/10 mM ammonium formate (10/90) with 0.1% formic acid	Methanol/acetonitrile/water/phosphoric acid (100:100:800:2). Add 96 mg of sodium 1-pentanesulfonate in the resulting solution, filter
System suitability: standard and system suitability (SS) solution	• Standard solution: 0.05 mg/mL of hydroxychloroquine (HCQ) in water • SS solution: Chloroquine phosphate (CQ) and hydroxychloroquine sulfate (HCQ) at 0.05 mg/mL in water	• Standard solution: 0.05 mg/mL of hydroxychloroquine (HCQ) in mobile phase • SS solution: Chloroquine phosphate (CQ) and hydroxychloroquine sulfate (HCQ) at 0.05 mg/mL in mobile phase

表1. 硫酸羟氯喹分析的新HPLC方法和现行USP方法的条件

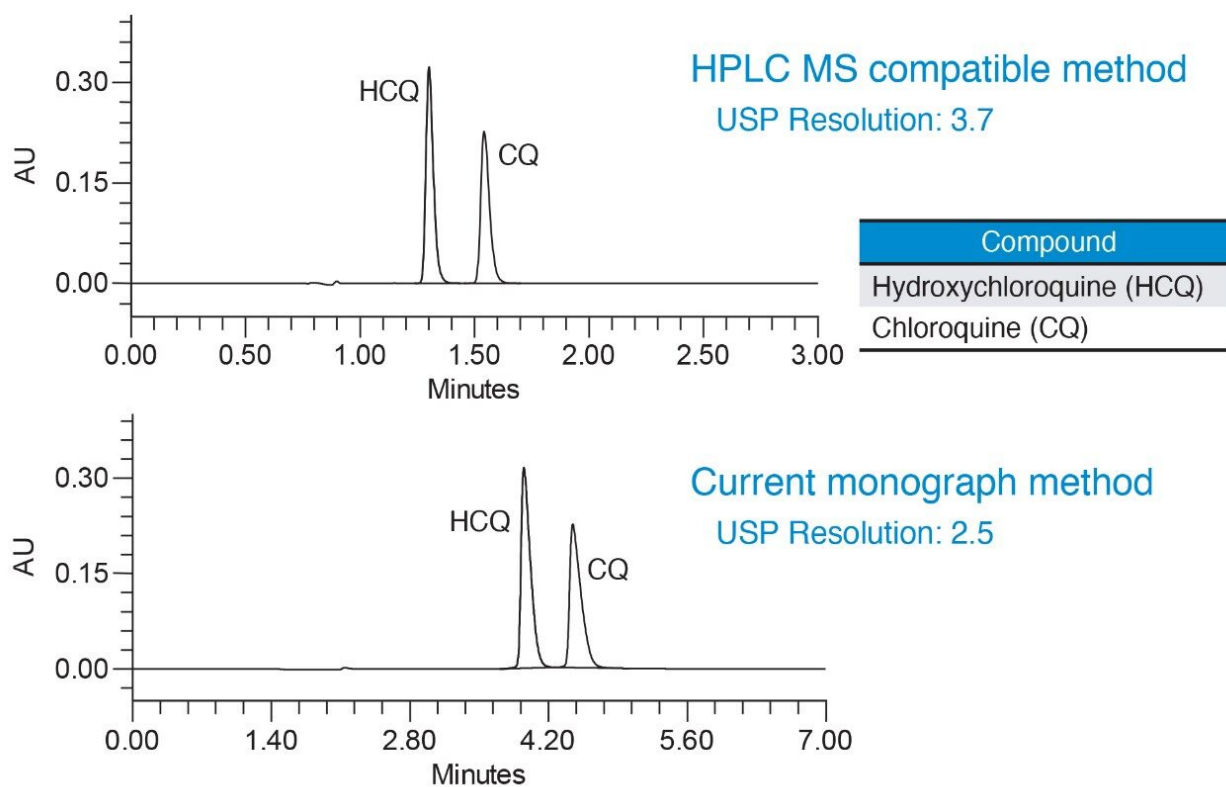


图2.使用新的HPLC方法和现行USP方法在254 nm的UV检测波长下分析系统适应性溶液

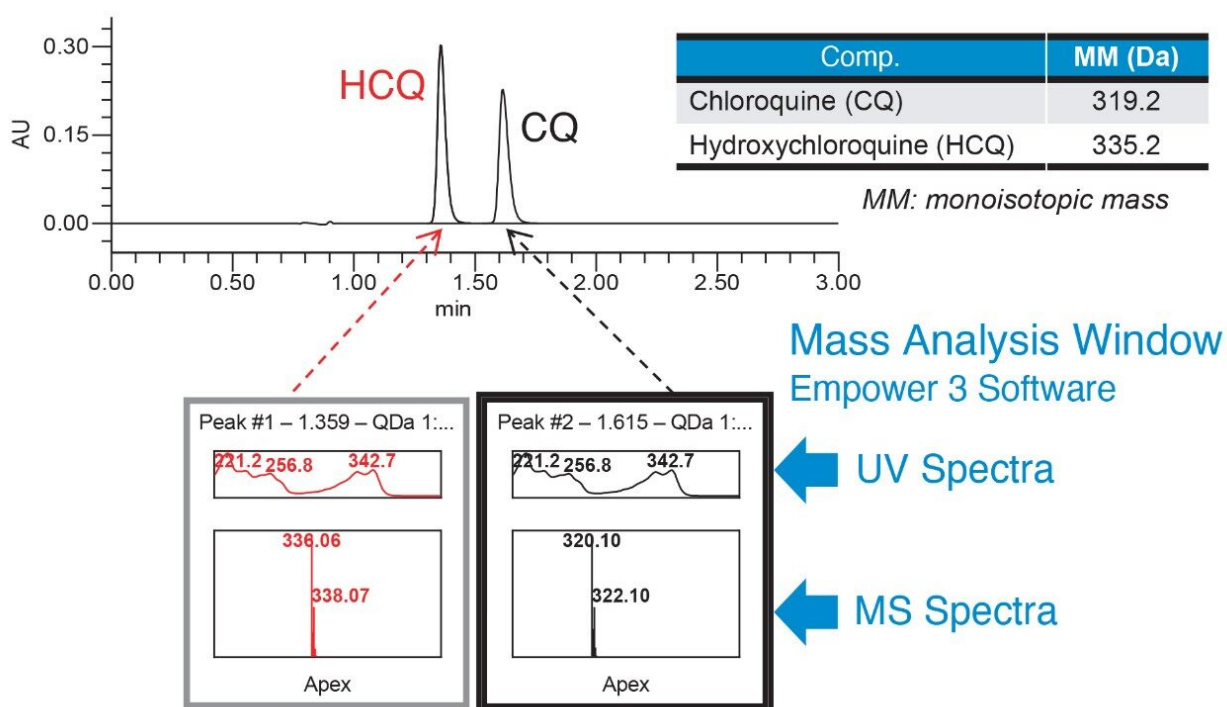


图3. Empower 3软件中用于峰鉴定结果确证的质谱分析窗口。使用新的HPLC方法与兼容MS的条件在254 nm的UV检测波长下进行分析。

根据现行USP专论中有关硫酸羟氯喹片剂的分析方法，按照系统适应性要求验证新HPLC方法的性能⁶。在MS兼容型新HPLC条件下运行方法的系统适应性结果成功满足USP标准（表2）。与USP方法相比，在新条件下运行时，羟氯喹与氯喹之间的分离度明显提升。标准溶液5次重复进样的峰面积和保留时间相对标准偏差均小于0.1%。此外，新方法还改善了羟氯喹和氯喹的USP拖尾因子。

Parameter	USP requirement ⁶	New HPLC method with MS compatible conditions	USP Method
Resolution between CQ and HCQ	Not less than (NLT) 1.8	3.7	2.5
Relative standard deviation (RSD) for replicate injections of HCQ standard	Not more than (NMT) 1.5%	- RSD of peak areas: 0.0% - RSD of retention times: 0.1%	- RSD of peak areas: 0.2% - RSD of retention times: 0.2%
Peak tailing for CQ	N/A	1.4	2.1
Peak tailing for HCQ	N/A	1.4	1.9

表2. 在新的HPLC条件和现行USP条件下运行方法得到的系统适应性结果

结论

本应用简报介绍了一种用于测定硫酸羟氯喹的MS兼容型方法。由于能够进行MS分析，因此本方法增加了羟氯喹表征和开发时可用的分析工具组合。MS分析无需进行单标即可实现化合物的定性鉴定。此外，相较于现行的USP专论方法，这种新方法的运行时间更短、分离度更高、峰拖尾减少。无论是否使用羟氯喹作为COVID-19的潜在治疗药物，对于有高时效要求的药物生产，分析速度的提升有可能非常关键。而且更稳定的分析性能可增强对关键质量控制环境的信心。

参考文献

1. Al-Bari, MA.Targeting endosomal acidification by chloroquine analogs as a promising strategy for the treatment of emerging viral diseases.*Pharmacol Res Perspect*.5(1):e00293 (2017).
2. Liu, J. et al.Hydroxychloroquine, a less toxic derivative of chloroquine, is effective in inhibiting SARS-CoV-2 infection in vitro.*Cell Discov*.6, 16 (2020).
3. Kupferschmidt, K. Big studies dim hopes for hydroxychloroquine.*Science*.368, 1166-1167 (2020).DOI: 10.1126/science.368.6496.1166
4. Who.int [Internet].世界卫生组织； c2020 [2020年7月9日引用].参考网站：<https://www.who.int/news-room/detail/04-07-2020-who-discontinues-hydroxychloroquine-and-lopinavir-ritonavir-treatment-arms-for-covid-19> <<https://www.who.int/news-room/detail/04-07-2020-who-discontinues-hydroxychloroquine-and-lopinavir-ritonavir-treatment-arms-for-covid-19>>
5. NIH.gov [Internet].Bethesda: U.S. Department of Health and Human Services; c2020.[2020年7月9日引用].参考网站：<https://www.nih.gov/news-events/news-releases/nih-halts-clinical-trial-hydroxychloroquine> <<https://www.nih.gov/news-events/news-releases/nih-halts-clinical-trial-hydroxychloroquine>>
6. Tropmedres.ac [Internet].Thailand: Mahidol University; c2020 [2020年7月9日引用].参考网站：<https://www.tropmedres.ac/covid-19/copcov> <<https://www.tropmedres.ac/covid-19/copcov>> .
7. USP Monograph, Hydroxychloroquine Sulfate Tablets, USP42-NF37, The United States Pharmacopeia Convention, official 23-March-2020.

特色产品

ACQUITY Arc系统 <<https://www.waters.com/134844390>>

ACQUITY QDa质谱检测器 <<https://www.waters.com/134761404>>

720006917ZH, 2020年5月

© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.