论文

基于与铁氰化钾和 Zn^{2+} 作用共振光散射法测定异烟肼

覃明丽^①, 谭克俊^{①*}, 李华春^①, 何琳^②^① 发光与实时分析教育部重点实验室; 西南大学化学化工学院, 重庆 400715^② 西南大学药学院, 重庆 400715

*通讯作者, E-mail: tankj@swu.edu.cn

谨以本文祝贺西南大学药学院成立五周年

收稿日期: 2010-11-01; 接受日期: 2010-12-24

doi: 10.1360/032010-801

摘要 在酸性介质中, 异烟肼能将铁氰酸根离子还原成亚铁氰酸根离子, 后者与硫酸锌反应生成 $\text{K}_2\text{Zn}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_2$ 粒子引起体系的共振光散射信号显著增强. 在 345 nm 处增强的散射信号强度 ΔI_{RLS} 与异烟肼的浓度在 0.01~1.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内呈线性关系, 据此建立了一种检测异烟肼含量的共振光散射(RLS)分析方法. 线性回归方程为 $\Delta I_{\text{RLS}} = 136.1 + 4239c$ (c , $\mu\text{g/mL}$), 相关系数 (r) 为 0.9984, 检测限(3σ)为 3.8 ng/mL. 该方法已成功用于异烟肼片剂及血清样品的测定. 此外, 文中还结合吸收光谱, 动态光散射, 扫描电子显微镜等表征手段对反应机理和 RLS 信号强度增强的原因进行了探讨.

关键词
共振光散射
异烟肼
铁氰化钾
硫酸锌

1 引言

异烟肼(isoniazid)是第一批合成抗结核药物, 已有 50 多年的使用历史^[1]. 虽然在使用过程中结核杆菌已经产生了耐药性, 但多数医生仍认为异烟肼是治疗结核病的不可或缺的主药之一. 然而, 血液中异烟肼浓度过高会引起癫痫、药物性肝损害、过敏性休克等不良反应^[2]. 因此, 研究异烟肼的分析测定方法是很有必要的. 目前检测异烟肼的方法有滴定法^[3], 分光光度法^[4-8], 荧光法^[9], 高效液相色谱法^[10], 气相色谱法^[11], 高效液相色谱-质谱联用法^[12, 13], 毛细管电泳法^[14], 化学发光法^[15-18], 电化学方法^[19-21]等, 这些方法中有的繁琐费时(如滴定法); 有的仪器昂贵(如高效液相色谱-质谱联用法); 有的灵敏度不够高, 方法前处理和操作也不简便. 所以进一步发展灵敏度高, 简便快速的分析测定方法, 对于深入研究异烟肼

的药理作用及临床痕量分析都具有非常重要的意义.

共振光散射法是近年发展起来的一种简便、快速、灵敏度高的光谱分析技术^[22], 已在核酸^[23, 24]、蛋白质^[25]、小分子药物分析^[26]等领域广泛应用.

异烟肼分子中的酰肼基具有较强的还原性, 可与氧化性的物质发生氧化还原反应. 具有氧化性的铁氰化钾^[27], 常被用作电化学探针^[28], 在化学发光分析法中也广泛应用^[29]. 本文基于铁氰化钾与异烟肼反应生成亚铁氰化钾, 再与 Zn^{2+} 作用生成 $\text{K}_2\text{Zn}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_2$ 粒子^[30]引起体系共振光散射信号强度显著增强, 且增强的散射信号强度与异烟肼的浓度在一定范围内成正比, 建立了一种测定异烟肼的新方法.

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

F-2500 型荧光分光光度计(日本日立公司),

UV-3600 型紫外可见分光光度计(日本日立公司), S-4800 扫描电子显微镜(日本日立公司), Zetasizer Nano ZS 型 Zeta 电位和粒度分析仪(马尔文仪器有限公司), QL-901 漩涡混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司), PHS-3C 型酸度计(成都方舟科技开发公司)。

异烟肼(Sigma)配制成 1.0 mg/mL 的储备液并在 4 °C 冰箱中避光保存, 用时稀释成 10.0 $\mu\text{g/mL}$ 的工作溶液。铁氰化钾(重庆川东化工有限公司化学试剂厂)配制成 1.0 mmol/L 的工作溶液。硫酸锌(湖南湘中地质实验研究所)配制成 10.0 mmol/L 的工作溶液。实验中用 Britton-Robinson (BR) 缓冲溶液(浓度均为 0.04 mol/L 的 H_3PO_4 , H_3BO_3 和 CH_3COOH 与 0.2 mol/L NaOH 按照一定比例混合, 配成不同 pH 值的缓冲溶液, 用酸度计校正 pH 值)控制溶液的酸度。实验所用水均为超纯水(18.2 M Ω), 试剂均为分析纯。

2.2 实验方法

在 10 mL 比色管中依次加入 0.5 mL 的 BR 缓冲溶液, 0.5 mL 1.0 mmol/L 的 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 溶液, 0.5 mL 10.0 mmol/L 的 ZnSO_4 溶液, 适量的异烟肼溶液, 用超纯水稀释定容到 5 mL, 每加入一种溶液都进行漩涡混匀, 溶液配制好放置 40 min 后于 F-2500 荧光分光光度计上在 220~700 nm 波长范围内同步扫描激发和发射单色器获得散射光谱。

3 结果与讨论

3.1 光谱特征

体系的 RLS 光谱如图 1 所示。从图 1 可知, 各单组份和单组份的不完全组合体系的 RLS 信号强度均很弱, 少量的异烟肼加入 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ - ZnSO_4 体系中后 RLS 信号显著增强, 最大峰位于 345 nm 处。且 RLS 信号强度随异烟肼浓度的增大而成比例增强, 据此可用于痕量异烟肼的测定。图 2 为体系的吸收光谱与 RLS 光谱的比较, 从图中可知 RLS 峰位于它的吸收带中, 且 RLS 光谱与吸收光谱之间存在较好的对应关系, 存在吸收与散射的共振过程, 产生了共振增强效应使 RLS 光谱信号增强^[31]。

3.2 反应机理

为探讨加入异烟肼后体系的 RLS 信号强度显著

图 1 体系的 RLS 光谱图。1, Isoniazid; 2, $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$; 3, ZnSO_4 ; 4, $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ - ZnSO_4 ; 5, $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ -isoniazid; 6, ZnSO_4 -isoniazid; 7~12, $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ - ZnSO_4 -isoniazid。实验条件: pH 3.29; $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 浓度 0.1 mmol/L; ZnSO_4 浓度 1.0 mmol/L; 异烟肼浓度分别为 1, 5, 6: 2.0; 7~12: 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 $\mu\text{g/mL}$; 反应时间: 40 min

图 2 吸收光谱与 RLS 光谱比较。1, 吸收光谱; 2, RLS 光谱。实验条件: pH 3.29; $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 浓度 0.1 mmol/L; ZnSO_4 浓度 1.0 mmol/L; 异烟肼浓度 0.8 $\mu\text{g/mL}$; 反应时间, 40 min

增强的原因, 我们对溶液作了动态光散射表征, 测定了溶液中粒子的水合直径随异烟肼加入前后的变化, 如图 3 所示。随着异烟肼浓度的增大, 溶液中粒子的水合直径逐渐增大, 且水合直径的大小与异烟肼的浓度在 0~0.8 $\mu\text{g/mL}$ 范围内呈较好的线性关系, 线性拟合方程为: $D = 625.8 + 999.5c$ (c , $\mu\text{g/mL}$), 相关系数(r)为 0.9963。进一步作了扫描电子显微镜成像 (SEM) 表征, 如图 4 所示。结果表明加入异烟肼前溶液中几乎没有粒子存在, 而加入异烟肼后溶液中有大量形状不规则的粒子生成。说明共振光散射增强源于这些颗粒的生成。

在酸性介质中, 铁氰酸根离子被具有较强还原

图 3 异烟肼的浓度对溶液中粒子水合直径的影响. 实验条件: pH 3.29; $K_3[Fe(CN)_6]$ 浓度 0.1 mmol/L; $ZnSO_4$ 浓度 1.0 mmol/L; 反应时间: 40 min

图 4 异烟肼与 $K_3[Fe(CN)_6]$ - $ZnSO_4$ 反应前后的扫描电子显微镜图. 实验条件: pH 3.29; $K_3[Fe(CN)_6]$ 浓度 0.1 mmol/L; $ZnSO_4$ 浓度 1.0 mmol/L; 异烟肼浓度分别为(a) 0; (b) 0.8 μg/mL; 反应时间: 40 min

性的异烟肼还原成亚铁氰酸根离子, 然后再与锌离子反应生成 $K_2Zn_3[Fe(CN)_6]_2$ 粒子^[30], 而异烟肼自身被氧化成异烟酸^[8]. 基于电子转移数相等的原则, 铁氰酸根与异烟肼反应的化学计量比为 4:1. 推测反应机理如图 5 所示.

3.3 条件优化

图 6 显示 pH 对体系 RLS 信号有影响. pH 值在 2.56~4.10 之间变化时, 体系的 RLS 信号强度变化较小. 随着 pH 值的进一步增大, $ZnSO_4$ 开始发生水解不利于反应的进行^[30], 体系的 RLS 信号强度降低. 实验选择 pH 3.29 的 BR 缓冲溶液控制体系的酸度.

图 5 反应机理

图 6 酸度的影响. 实验条件: $K_3[Fe(CN)_6]$ 浓度 0.1 mmol/L; $ZnSO_4$ 浓度 1.0 mmol/L; 异烟肼浓度 0.5 μg/mL; 反应时间: 40 min; λ : 345nm

通过对 $K_3[Fe(CN)_6]$, $ZnSO_4$ 的浓度进行优化. 实验结果表明 $K_3[Fe(CN)_6]$ 的最佳浓度为 0.1 mmol/L, $ZnSO_4$ 的最佳浓度为 1.0 mmol/L.

室温下, 体系的 RLS 信号强度在反应 40 min 后达到稳定, 并且在 200 min 之内保持稳定(误差 5% 以内).

用加入 NaCl 的方法考察离子强度对 RLS 信号强度的影响. 当体系中 NaCl 的浓度在 $0 \sim 2.0 \times 10^{-2}$ mol/L 范围, RLS 信号强度基本不变. 实验结果表明离子强度对 RLS 信号强度影响较小, 实验中不加 NaCl 控制离子强度.

3.4 共存物质的影响及分析参数

在优化的实验条件下, 考察了常见的共存物质对测定异烟肼的影响, 结果见表 1. 从表中可知, 糖类, 氨基酸几乎不造成干扰; 除 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 外, 大多数常见的金属离子在测试浓度水平不干扰; 表面活性剂, 人血清白蛋白及具有还原性的物质如抗坏血酸等允许量较小. 但在对异烟肼片剂进行质量检定分析时, 上述物质不干扰. 进行血清样品分析前先除去蛋白质以消除干扰.

在优化的实验条件下, 测定了不同浓度的异烟肼所对应的 ΔI_{RLS} 值并进行线性拟合, 其线性回归方程为 $\Delta I_{RLS} = 136.1 + 4239c$ (c , μg/mL), 相关系数(r)为 0.9984, 线性范围为 0.01~1.0 μg/mL, 检测限(3σ)为 3.8 ng/mL.

3.5 样品测定

将不同批号的异烟肼片剂各 20 片称重后研细混

表1 共存物质的影响

共存物质	允许浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	相对误差 (%)	共存物质	允许浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	相对误差 (%)
K^+ (Cl^-)	2000	-2.9	L-赖氨酸	112	2.5
Mg^{2+} (Cl^-)	100	-0.9	L-苏氨酸	112	-7.3
Ca^{2+} (Cl^-)	200	0.3	D-丙氨酸	56	-8.7
Al^{3+} (SO_4^{2-})	200	-3.5	L-甘氨酸	56	-6.6
Ba^{2+} (Cl^-)	100	9.6	L-亮氨酸	56	2.7
Cu^{2+} (SO_4^{2-})	1	4.5	L-组氨酸	56	0.8
Fe^{3+} (Cl^-)	1	3.2	L-谷氨酸	28	-1.7
CO_3^{2-} (Na^+)	100	-3.1	DL-色氨酸	28	-6.6
PO_3^{3-} (Na^+)	100	-3.7	乳糖	100*	-5.9
NO_3^- (Na^+)	100	-4.5	麦芽糖	100*	-9.2
I^- (K^+)	1	1.8	葡萄糖	100*	0.7
抗坏血酸	1	6.6	蔗糖	100*	-8.3
柠檬酸	475	1.7	淀粉	25*	-7.8
十二烷基磺酸钠	0.2	-5.2	糊精	25*	-6.0
十六烷基三甲基溴化铵	0.2	-9.7	人血清白蛋白	2*	-7.9

*单位为 $\mu\text{g/mL}$. $c_{\text{isoniazid}}$ 0.5 $\mu\text{g/mL}$, pH 3.29

匀, 精密称取适量(约相当于异烟肼 0.2 g), 溶解后定容到 100 mL, 过滤并将一定量的滤液逐级稀释到所需工作浓度, 取适量按照本方法进行测定. 与药典方法^[3]比较, 结果见表 2.

取人血清样品(由西南大学校医院提供)1.0 mL, 加入 2.0 mol/L 三氯乙酸 0.25 mL, 混匀后离心分离 10 min, 使血清中的蛋白质沉淀完全^[32], 取上层清液加水稀释 10 倍后, 用本方法测定, 并用标准加入法测定回收率, 结果见表 3. 从表中的结果可以看出, 该方法具有较好的精密度(RSD 为 2.4%~6.4%)和回收

表2 药片中异烟肼的测定结果

样品	标示量 (g/片)	测得值 (g/片)	RSD ($n=5$, %)	药典方法 (g/片)
65070702*	0.1	0.092	1.3	0.096
090801*	0.1	0.100	4.7	0.097
091101*	0.1	0.094	2.7	0.096

*太极集团西南药业股份有限公司

表3 血清样品中异烟肼的测定结果

血清	加入量 ($\mu\text{g/mL}$)	测得值 ($\mu\text{g/mL}$)	回收率 (%)	RSD ($n=5$, %)
1*	0.200	0.195	97.5	6.4
2*	0.400	0.395	98.8	2.9
3*	0.600	0.542	90.3	2.4

*实际测得值为 0 $\mu\text{g/mL}$

率(90.3%~98.8%), 能用于血清样品中痕量异烟肼的测定.

4 结论

本文基于异烟肼将铁氰化钾还原成亚铁氰化钾后与 Zn^{2+} 反应生成 $K_2Zn_3[Fe(CN)_6]_2$ 粒子, 建立了一种新的测定异烟肼的共振光散射分析方法. 该方法简便、灵敏度高, 可用于异烟肼的临床分析及药物质量检定.

致谢 本工作得到国家自然科学基金(20877063)资助, 特此致谢.

参考文献

- 1 尤启冬. 药物化学. 北京: 化学工业出版社, 2006: 425
- 2 王玲飞. 异烟肼不良反应文献分析. 中国药物与临床, 2007, 7: 466-467
- 3 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2005 年版). 北京: 化学工业出版社, 2005: 217
- 4 Nagaraja P, Srinivasa Murthy KC, Yathirajan HS. Spectrophotometric determination of isoniazid with sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulphonate and cetyltrimethyl ammonium bromide. *Talanta*, 1996, 43: 1075-1080

- 5 Benetton SA, Kedor-Hackmann ERM, Santoro MRM, Borges M. Visible spectrophotometric and first-derivative UV spectrophotometric determination of rifampicin and isoniazid in pharmaceutical preparations. *Talanta*, 1998, 47: 639–643
- 6 Safavi A, Karimi MA, Hormozi Nezhad MR, Kamali R, Saghir N. Sensitive indirect spectrophotometric determination of isoniazid. *Spectrochim Acta, Part A*, 2004, 60: 765–769
- 7 Zhang H, Wu LL, Li QM, Du XZ. Determination of isoniazid among pharmaceutical samples and the patients' saliva samples by using potassium ferricyanide as spectroscopic probe reagent. *Anal Chim Acta*, 2008, 628: 67–72
- 8 Safavi A, Bagheri M. Design of an optical sensor for indirect determination of isoniazid. *Spectrochim Acta, Part A*, 2008, 70: 735–739
- 9 Lapa RAS, Lima JLFC, Santos JLM. Fluorimetric determination of isoniazid by oxidation with cerium(IV) in a multicommutated flow system. *Anal Chim Acta*, 2000, 419: 17–23
- 10 Zhou ZM, Zhao DY, Wang J, Zhao WJ, Yang MM. Study of cloud point extraction and high-performance liquid chromatographic determination of isoniazid based on the formation of isonicotinylhydrazone. *J Chromatogr A*, 2009, 1216: 30–35
- 11 Khuhawar MY, Zardari LA. Ethyl chloroformate as a derivatizing reagent for the gas chromatographic determination of isoniazid and hydrazine in pharmaceutical preparations. *Anal Sci*, 2008, 24: 1493–1496
- 12 Ng KY, Zhou HY, Zhang YL, Hybertson B, Randolph T, Christians U. Quantification of isoniazid and acetylisoniazid in rat plasma and alveolar macrophages by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with on-line extraction. *J Chromatogr B*, 2007, 847: 188–198
- 13 Huang LS, Marzan F, Jayewardene AL, Lizak PS, Li XH, Aweeka FT. Development and validation of a hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of isoniazid in human plasma. *J Chromatogr B*, 2009, 877: 285–290
- 14 Zhang XF, Xuan YL, Sun AM, Lv Y, Hou XD. Simultaneous determination of isoniazid and *p*-aminosalicylic acid by capillary electrophoresis using chemiluminescence detection. *Luminescence*, 2009, 24: 243–249
- 15 Xi J, Shi BA, Ai XP, He ZK. Chemiluminescence detection of isoniazid using $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ -isoniazid-Ce(IV) system. *J Pharm and Biomed Anal*, 2004, 36: 237–241
- 16 Du JX, Lu JR. Flow injection chemiluminescence determination of isoniazid using the lucigenin-periodate system. *Luminescence*, 2006, 21: 26–30
- 17 Xiong Y, Zhou HJ, Zhang ZJ, He DY, He C. Flow-injection chemiluminescence sensor for determination of isoniazid in urine sample based on molecularly imprinted polymer. *Spectrochim Acta, Part A*, 2007, 66: 341–346
- 18 Haghighi B, Bozorgzadeh S. Flow injection chemiluminescence determination of isoniazid using luminol and silver nanoparticles. *Microchem J*, 2010, 95: 192–197
- 19 瞿万云, 王宏, 吴康兵. 异烟肼在多壁碳纳米管修饰电极上的电化学行为及电化学测定. *分析化学*, 2005, 33: 1431–1434
- 20 Yang GJ, Wang CX, Zhang R, Wang CY, Qu QS, Hu XY. Poly(amidosulfonic acid) modified glassy carbon electrode for determination of isoniazid in pharmaceuticals. *Bioelectrochemistry*, 2008, 73: 37–42
- 21 Shahrokhian S, Asadian E. Simultaneous voltammetric determination of ascorbic acid, acetaminophen and isoniazid using thionine immobilized multi-walled carbon nanotube modified carbon paste electrode. *Electrochim Acta*, 2010, 55: 666–672
- 22 Pasternack RF, Collings PJ. Resonance light scattering: A new technique for studying chromophore aggregation. *Science*, 1995, 269: 935–939
- 23 Huang CZ, Li KA, Tong SY. Determination of nucleic acids by a resonance light-scattering technique with $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ -tetrakis 4-(trimethylammonium)phenyl porphine. *Anal Chem*, 1996, 68: 2259–2263
- 24 Huang CZ, Li KA, Tong SY. Determination of nanograms of nucleic acids by their enhancement effect on the resonance light scattering of the cobalt(II) 4-(5-chloro-2-pyridyl)azo-1,3-diaminobenzene complex. *Anal Chem*, 1997, 69: 514–520
- 25 梁文婷, 黄承志, 马璐. 多金属氧化物立方纳米晶体的可控合成及其与肌蛋白的特异性相互作用. *中国科学 B 辑: 化学*, 2009, 39: 495–500
- 26 Liu ZD, Huang CZ, Li YF, Long YF. Enhanced plasmon resonance light scattering signals of colloidal gold resulted from its interactions with organic small molecules using captopril as an example. *Anal Chim Acta*, 2006, 577: 244–249
- 27 Sant BR, Sant SB. Quantitative oxidations by potassium ferricyanide. *Talanta*, 1960, 3: 261–271
- 28 Niranjana E, Kumara Swamy BE, Raghavendra Naik P, Sherigara BS, Jayadevappa H. Electrochemical investigations of potassium ferricyanide and dopamine by sodium dodecyl sulphate modified carbon paste electrode: A cyclic voltammetric study. *J Electroanal Chem*, 2009, 631: 1–9
- 29 Wang ZP, Zhang ZJ, Zhang X, Fu ZF. Flow-injection inhibition chemiluminescence determination of indapamide based on luminol-ferricyanide reaction. *J Pharm Biomed Anal*, 2004, 35: 1–7
- 30 Sant BR. Direct titration of potassium ferricyanide with hydrazine sulphate in presence of zinc sulphate determination of hydrazine. *Anal*

Chim Acta, 1958, 19: 205–208

- 31 唐晓玲, 刘忠芳, 刘绍璞, 胡小莉. 苯海拉明与赤藓红相互作用的吸收、荧光和共振瑞利散射光谱及其分析应用. 中国科学 B 辑: 化学, 2007, 37: 68–75
- 32 中华人民共和国卫生部医政司. 全国临床检验操作规程, 第二版. 南京: 东南大学出版社, 1997: 19

Determination of isoniazid by resonance light scattering technique based on the interaction with $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ and Zn^{2+}

QIN MingLi¹, TAN KeJun¹, LI HuaChun¹ & HE Lin²

¹ Key Laboratory on Luminescence and Real-Time Analysis, Ministry of Education; College of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China

² College of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: In acidic medium, a novel resonance light scattering (RLS) analytical method of isoniazid is developed based on RLS signal enhancement due to the interaction of Zn^{2+} and ferrocyanide ion derived from ferricyanide ion by isoniazid. The enhanced RLS intensity at 345nm is proportional to the content of isoniazid in a range of 0.01–1.0 $\mu\text{g/mL}$. The linear regression equation is $\Delta I_{\text{RLS}} = 136.1 + 4239c$ (c , $\mu\text{g/mL}$). The correlation coefficient (r) is 0.9984. The limit of detection (3σ) is 3.8 ng/mL . This method has been successfully applied to the determination of isoniazid in pharmaceutical and serum samples. In this work, the reaction mechanism and the reasons of scattering enhanced have been also investigated by using absorption spectra, dynamic light scattering and SEM.

Keywords: resonance light scattering, isoniazid, potassium ferricyanide, zinc sulfate