

Fe³⁺-水合红菲绕啉二磺酸钠分光光度法测定异烟肼

时惠敏^{1a}, 崔晓鸽^{1b}, 胡春霞^{1a}, 冯素玲²

(1. 郑州澍青医学高等专科学校 a. 基础医学部; b. 药学系, 郑州 450064;

2. 河南师范大学 化学化工学院, 河南 新乡 453007)

摘 要: 基于异烟肼分子结构中的酰肼基具有较强的还原性, 可将 Fe³⁺ 还原为 Fe²⁺, 选择水合红菲绕啉二磺酸钠作为 Fe²⁺ 的显色剂, 建立了可见分光光度法测定异烟肼的新方法. 在最佳实验条件下, 异烟肼的浓度在 0.04~3.2 μg·mL⁻¹ 范围内符合比尔定律, 表观摩尔吸光系数 $\epsilon = 1.14 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, 检测限为 0.033 μg·mL⁻¹. 方法可用于异烟肼片剂和尿样中异烟肼含量的测定.

关键词: 烟肼; Fe³⁺; 水合红菲绕啉二磺酸钠; 分光光度法

中图分类号: O657.3

文献标志码: A

异烟肼, 又名异烟酰肼, 雷米封, 是一种高效、低毒、价廉的一线抗结核药物, 常和其他抗结核病药联合使用, 以增强疗效和克服耐药菌. 然而, 人体内高浓度的异烟肼会导致癫痫、肝功能衰竭甚至死亡^[1]. 因此, 建立一种简单、灵敏、快速的测定异烟肼的方法具有重要意义.

目前, 已报道的测定异烟肼的方法主要有分光光度法^[2-6]、荧光光谱法^[7-8]、电化学分析法^[9-10]、化学发光法^[11]、毛细管电泳法^[12-13]、流动注射分析法^[14]、高效液相色谱法^[15-16]等. 然而, 上述方法有的灵敏度不高^[3-9, 11-14], 有的相对标准偏差较大^[2, 11], 有的尚未进行生物样品分析^[2, 6-8, 10], 有的反应时间较长、反应温度较高^[6], 有的仪器昂贵、分析成本较高^[15, 16], 存在一定不足. 我们根据异烟肼分子结构中的酰肼基具有较强的还原性, 能将 Fe³⁺ 还原为 Fe²⁺, 然后与水合红菲绕啉二磺酸钠作用生成红色配合物, 其吸光度与异烟肼浓度在一定范围内呈正比, 从而建立了间接测定异烟肼的新方法. 该法具有灵敏度高、仪器易于普及, 操作简便等特点, 可用于异烟肼片剂和尿样中异烟肼含量的测定.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Gold spectrumlab 54 紫外可见分光光度计(上海棱光技术有限公司); 752N 型紫外-可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司).

异烟肼(上海华硕精细化学品有限公司), 配制成 1.0 g·L⁻¹ 的标准储备液, 避光保存, 用时稀释至 40 μg·mL⁻¹ 的工作液; FeCl₃ (天津科密欧化学试剂公司) 溶液: 5.56×10⁻³ mol·L⁻¹; 水合红菲绕啉二磺酸钠(Sigma 公司): 1.69×10⁻³ mol·L⁻¹. 其余试剂均为分析纯.

1.2 实验方法

在 10 mL 容量瓶中, 依次加入 1.20 mL 5.56×10⁻³ mol·L⁻¹ 的 FeCl₃ 溶液, 一定量的异烟肼, 1.60 mL 1.69×10⁻³ mol·L⁻¹ 的水合红菲绕啉二磺酸钠, 用蒸馏水稀释至刻度, 摇匀. 以试剂空白为参比, 使用 1 cm 的比色皿在 544 nm 处测定溶液的吸光度.

收稿日期: 2015-03-20; 修回日期: 2015-08-18.

基金项目: 国家自然科学基金(21405034); 郑州澍青医学高等专科学校科研课题(13002).

第1作者简介: 时惠敏(1980-), 女, 河南荥阳人, 郑州澍青医学高等专科学校讲师, 主要从事光分析化学研究.

通信作者: 冯素玲(1963-), E-mail: slfeng@htu.cn.

2 结果与讨论

2.1 吸收光谱

按照实验方法配制相应溶液,以蒸馏水为参比,扫描得 Fe³⁺ 和水合红菲绕啉二磺酸钠混合溶液(图 1 曲线 1)与 FeCl₃—异烟肼—水合红菲绕啉二磺酸钠反应体系(图 1 曲线 2)的吸收光谱曲线.两曲线在 544 nm 处吸光度相差较大.为消除干扰,实验中以试剂空白为参比,在 544 nm 处测定反应产物的吸光度.推测体系可能的反应机理是异烟肼分子结构中的酰肼基具有较强的还原性,可将 Fe³⁺ 还原为 Fe²⁺,而水合红菲绕啉二磺酸钠为邻菲罗啉类化合物,其 1、10 位上的 N 原子电子云密度较大,可与 Fe²⁺ 配位形成红色配合物.

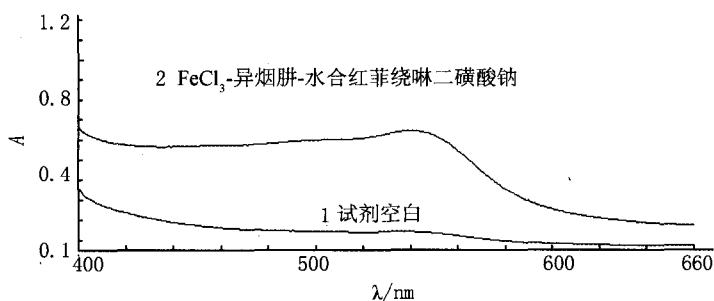


图1 吸收光谱

2.2 试剂加入顺序

试验了三种试剂加入顺序对吸光度的影响.结果表明,当顺序为 FeCl₃—异烟肼—水合红菲绕啉二磺酸钠时,体系的灵敏度最高,约为 FeCl₃—水合红菲绕啉二磺酸钠—异烟肼顺序灵敏度的 6 倍,异烟肼—水合红菲绕啉二磺酸钠—FeCl₃ 顺序灵敏度的 2 倍.故实验以 FeCl₃—异烟肼—水合红菲绕啉二磺酸钠的顺序加入试剂.这一顺序也说明体系中 FeCl₃ 与异烟肼先作用,生成的 Fe²⁺ 再与水合红菲绕啉二磺酸钠配位显色.与选择的顺序相比,FeCl₃—水合红菲绕啉二磺酸钠—异烟肼顺序的灵敏度最低,原因是 FeCl₃ 与水合红菲绕啉二磺酸钠先混合,Fe³⁺ 会与水合红菲绕啉二磺酸钠形成配合物,不利于 Fe³⁺ 与异烟肼的反应,导致异烟肼反应不完全,灵敏度低.而异烟肼—水合红菲绕啉二磺酸钠—FeCl₃ 灵敏度较高,是因为异烟肼和水合红菲绕啉二磺酸钠混合后,二者并不发生反应,当继续加入 Fe³⁺ 后,可能是与水合红菲绕啉二磺酸钠相比,异烟肼更易与 Fe³⁺ 反应,生成的 Fe²⁺ 较多,所以灵敏度稍高.

2.3 FeCl₃ 浓度的影响

按分析步骤,固定异烟肼和水合红菲绕啉二磺酸钠的浓度不变,实验 FeCl₃ 的浓度对体系吸光度的影响(图 2).结果表明,随着 FeCl₃ 浓度的增大,溶液的吸光度逐渐增大,当浓度为 $6.67 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时吸光度最大,表明 Fe²⁺ 与水合红菲绕啉二磺酸钠作用生成的红色配合物的量最多;若继续增大其浓度,吸光度降低,原因可能是较多的 Fe³⁺ 和 Fe²⁺ 竞争与水合红菲绕啉二磺酸钠结合,使生成的红色配合物的量减少所致.因此,实验选择 FeCl₃ 的浓度为 $6.67 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

2.4 水合红菲绕啉二磺酸钠浓度的影响

固定异烟肼和 FeCl₃ 的浓度不变,考察水合红菲绕啉二磺酸钠的浓度对体系吸光度的影响(图 3).结果发现,随着水合红菲绕啉二磺酸钠浓度的增加,溶液的吸光度逐渐增大,当浓度为 $2.54 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \sim 3.38 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,吸光度较大且基本稳定.实验选择水合红菲绕啉二磺酸钠的浓度为 $2.70 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

2.5 酸度的影响

保持其他条件不变,考察了 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的醋酸、盐酸和硫酸对 FeCl₃—异烟肼—水合红菲绕啉二磺酸钠体系吸光度的影响(图 4).结果表明,三种酸的加入使体系的吸光度均有不同程度的下降,且加入量越多,吸光度降低越明显.这是因为异烟肼的还原电位随着酸度的升高而降低,导致异烟肼将 Fe³⁺ 还原为 Fe²⁺ 的能力降低,进而与水合红菲绕啉二磺酸钠反应生成的红色配合物的量减少所致.其中,影响程度以硫酸最为

明显,盐酸次之,醋酸最小.原因可能是硫酸为二元强酸,而醋酸为弱酸,在物质的量浓度相同的条件下,硫酸中游离 H^+ 的浓度最高,而醋酸中游离 H^+ 的浓度最低.为使异烟肼与 Fe^{3+} 之间的氧化还原反应进行完全,实验中未加入任何酸.

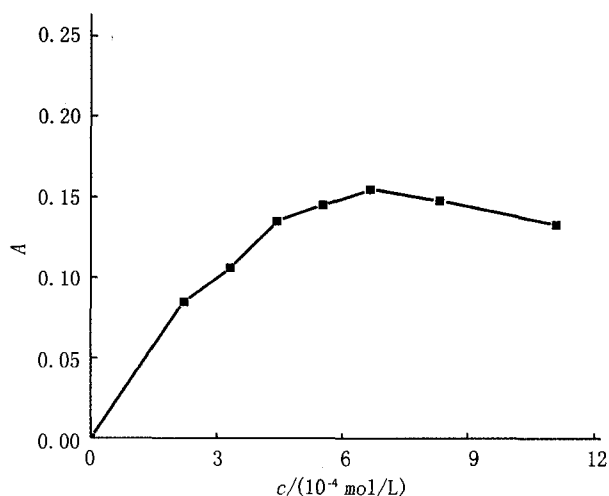


图2 FeCl_3 浓度对吸光度的影响

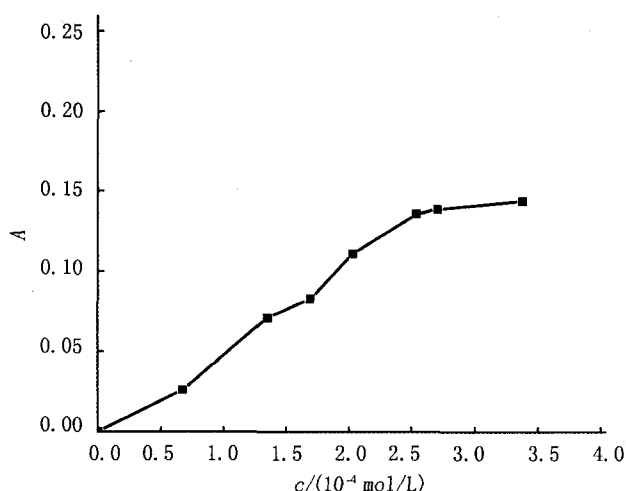


图3 水合红非绕啉二磺酸钠浓度对吸光度的影响

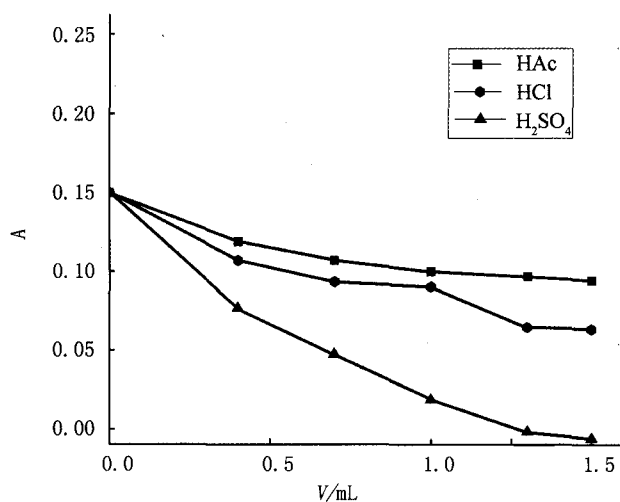


图4 酸对吸光度的影响

2.6 反应时间及体系的稳定性

在室温及最佳反应条件下, FeCl_3 、异烟肼、水合红非绕啉二磺酸钠三者反应迅速, 三种溶液混合后, 吸光度即达到最大, 并在 1.5 h 内基本保持稳定 ($\text{RSD} < 2.9\%$).

2.7 共存物质的影响

按照实验方法, 固定异烟肼的质量浓度为 $2.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 控制测量误差在 $\pm 5\%$ 之内, 考察了常见共存物质对测定的影响. 结果表明, 830 倍的葡萄糖、蔗糖, 415 倍的 KCl 、 NaNO_3 , 250 倍的 NaCl 、 K_2SO_4 , 200 倍的淀粉, 40 倍的柠檬酸, 12 倍的甘氨酸、谷氨酸、亮氨酸、精氨酸, 10 倍的苯丙氨酸、脯氨酸等不干扰异烟肼的测定.

2.8 工作曲线、检测限和精密度

按照实验方法, 配制异烟肼的标准系列溶液. 以吸光度为纵坐标, 异烟肼的质量浓度为横坐标绘制工作曲线. 结果表明, 吸光度与异烟肼的质量浓度在 $0.04 \sim 3.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内呈线性关系, 线性回归方程 $A = 0.01686 + 0.08291\rho(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$, 相关系数 $r = 0.9978$, 摩尔吸光系数 $\epsilon = 1.14 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, 检测限 ($3\sigma/k$) 为 $0.033 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. 平行测定 11 份试样, 其相对标准偏差为 3.1% . 将本法与异烟肼

的其他光分析法进行比较(表 1),结果表明,该法灵敏度较高.

表 1 本法与其他光度分析法的比较

分析方法	检测限或表观摩尔吸光系数	参考文献
可见分光光度法	0.037 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	[3]
可见分光光度法	0.048 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	[4]
可见分光光度法	0.98 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	[5]
可见分光光度法	$1.8 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	[6]
荧光猝灭法	40.2 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	[7]
荧光光谱法	34.3 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	[8]
可见分光光度法	$0.033 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; $1.14 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	本法

2.9 样品分析

取异烟肼 10 片(50 mg/片),精密称重,研细,准确称取相当于 1 片异烟肼的质量,溶解、定容至 50 mL 容量瓶中,过滤,取续滤液稀释后备用.按照实验方法进行测定,并与药典法^[15]进行对照,结果见表 2.回收率测定见表 3.取适量尿液稀释后进行加标回收实验,测定结果见表 4.

表 2 样品测定(n=5)

样品	标示量/(mg/片)	本法/(mg/片)	RSD/%	药典法/(mg/片)
1	50	49.12	1.7	49.20
2	50	48.94	0.76	49.06

表 3 回收率测定(n=5)

样品	样品含量	本法	加标量	测得值	回收率/%	RSD/%
	$\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	$\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	$\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	$\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$		
1	0.80	0.78	0.80	1.62	105.0	0.95
2	1.20	1.17	1.20	2.42	104.2	0.46

表 4 尿样中异烟肼的回收率测定(n=5)

样品	加标量 $\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	测得值 $\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	回收率/%	RSD/%
尿样 1	1.60	1.66	103.8	1.7
尿样 2	1.60	1.59	99.4	1.2

3 结 论

利用水合红菲绕啉二磺酸钠为探针,建立了测定药物和尿液中异烟肼含量的新方法.实验表明,异烟肼可还原 Fe³⁺ 为 Fe²⁺,Fe²⁺ 与水合红菲绕啉二磺酸钠反应生成的红色配合物的吸光度与异烟肼的含量在一定范围内呈正比.方法简便易行,用于实际样品的测定,结果满意.

参 考 文 献

[1] Agrawal S, Singh I, Kaur K J, et al. Comparative bioavailability of rifampicin, isoniazid and pyrazinamide from a four drug fixed dose combination with separate formulations at the same dose levels[J]. Int J Pharm,2004,276:41-49.

[2] 陈亚红,张建夫,田丰收,等. 酶催化光度法测定异烟肼[J]. 分析试验室,2010,29:57-60.

[3] Zhang H, Wu L L, Li Q M, et al. Determination of isoniazid among pharmaceutical samples and the patients' saliva samples by using potassium ferricyanide as spectroscopic probe reagent[J]. Anal Chim Acta,2008,628(1):67-72.

[4] Zhang H, Zhang Y, Wei X J, et al. A novel spectrophotometric method for the determination of isoniazid using Cu(II) as spectroscopic probe ion[J]. Chin J Chem,2009,27:518-522.

[5] Zargar B, Hatamie A. Localized surface plasmon resonance of gold nanoparticles as colorimetric probes for determination of Isoniazid in pharmacological formulation[J]. Spectrochim Acta A,2013,106:185-189.

[6] 张保军,乔月纯,王爱军,等. 磷钼蓝分光光度法测定药物中异烟肼[J]. 分析试验室,2012,31:13-15.

[7] 孙绪兵,何柏陈,翟好英. 荧光猝灭法测定药物中异烟肼含量[J]. 分析试验室,2014,33:586-588.

[8] Rui A S L, Jose L F C L, Joao L M S. Fluorimetric determination of isoniazid by oxidation with cerium(IV) in a multicommutated flow

- system[J]. *Anal Chim Acta*, 2000, 419: 17-23.
- [9] Cheemalapati S, Chen S M, Ali Ajmal M, et al. Enhanced electrocatalytic oxidation of isoniazid at electrochemically modified rhodium electrode for biological and pharmaceutical analysis[J]. *Colloid Surface B*, 2014, 121: 444-450.
- [10] Azad U P, Prajapati N, Ganesan V. Selective determination of isoniazid using bentonite clay modified electrodes[J]. *Bioelectrochemistry*, 2015, 101: 120-125.
- [11] Wu B W, Wang Z H, Xue Z H, et al. A novel molecularly imprinted electrochemiluminescence sensor for isoniazid detection[J]. *Analyt*, 2012, 137: 3644-3652.
- [12] Liu Y, Fu Z F, Wang L. Capillary electrophoresis analysis of isoniazid using luminol-periodate potassium chemiluminescence system[J]. *Luminescence*, 2012, 26(6): 397-402.
- [13] Zhang X F, Xuan Y L, Sun A M, et al. Simultaneous determination of isoniazid and p-aminosalicylic acid by capillary electrophoresis using chemiluminescence detection[J]. *Luminescence*, 2009, 24(4): 243-249.
- [14] Oliveira P R de, Oliveira M M, Zarbin A J G, et al. Flow injection amperometric determination of isoniazid using a screen-printed carbon electrode modified with silver hexacyanoferrates nanoparticles[J]. *Sensors Actuators: B Chemical*, 2012, 171/172: 795-802.
- [15] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010. 294-295.
- [16] Hemanth Kumar A K, Sudha V, Ramachandran Geetha. Simple and rapid method for simultaneous determination of isoniazid and acetyl isoniazid in urine by HPLC[J]. *Asian J Biomed Pharmaceut Sci*, 2014, 4: 46-50.

Spectrophotometric Determination of Isoniazid Using Fe^{3+} - Bathophenanthroline Disulphonic Acid Disodium

SHI Huimin^{1a}, CUI Xiaoge^{1b}, HU Chunxia^{1a}, FENG Suling²

(1. a Department of Basic Medical Sciences; b Department of Pharmacy, Zhengzhou Shuqing Medical College, Zhengzhou 450064, China;
2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: Based on the strong reducibility of hydrazide group, isoniazid can reduce Fe^{3+} to Fe^{2+} , and a novel visible spectrophotometry method for the determination of isoniazid has been established by using bathophenanthroline disulphonic acid disodium as spectroscopic probe. Under the optimum conditions, Beer's law is obeyed in the range of $0.04-3.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ for isoniazid and the apparent molar absorption coefficient is $1.14 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. The detection limit is $0.033 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. This method has been successfully applied to the determination of isoniazid in isoniazid tablet and urine samples.

Keywords: isoniazid; Fe^{3+} ; bathophenanthroline disulphonic acid disodium; spectrophotometry