

微流控芯片非接触电导法测定异烟肼片中异烟肼的含量^Δ

童艳丽^{1*}, 冯汗志², 陈缙光²(1.广东省第二人民医院药学部, 广州 510317; 2.中山大学药学院, 广州 510006)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)09-1242-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.09.25

摘要 目的: 采用微流控芯片非接触电导法测定异烟肼片中异烟肼的含量。方法: 探讨缓冲溶液的种类、浓度、pH、添加剂种类和添加量、进样时间、分离电压等因素对分离检测的影响。结果: 优选缓冲体系为 1.86 mmol/L 柠檬酸-0.14 mmol/L 柠檬酸钠缓冲溶液(pH3.0), 不加添加剂, 进样时间为 20 s, 分离电压为 2.5 kV。优化条件下, 异烟肼检测质量浓度线性范围为 10~200 μg/mL ($r=0.999\ 3$); 定量限为 8.0 μg/mL, 检测限为 2.4 μg/mL; 精密度、稳定性、重复性试验的 RSD<2.0%; 加样回收率为 97.8%~102.9% (RSD=1.9%, $n=9$)。结论: 该方法快速简便, 适用于测定异烟肼片中异烟肼的含量。

关键词 微流控芯片; 非接触电导检测; 异烟肼; 异烟肼片; 含量测定

Content Determination of Isoniazid in Isoniazid Tablets by Microfluidic Chip with Contactless Conductivity Method

TONG Yanli¹, FENG Hanzhi², CHEN Zuanguang² (1. Dept. of Pharmacy, Guangdong NO.2 Provincial People's Hospital, Guangzhou 510317, China; 2. School of Pharmacy, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of isoniazid in Isoniazid tablet. METHODS: Microfluidic chip with contactless conductivity detection was adopted. The effects of electrophoresis parameters, such as the variety, concentration, pH, additive types and dosage, injection time and separation voltage on the separation detection were explored. RESULTS: The optimized buffer system was 1.86 mmol/L citrate-0.14 mmol/L sodium citrate buffer solution (pH3.0), no additive, the injection time was 20 s and the separation voltage was 2.5 kV. In the optimal conditions, the linear range of isoniazid was 10-200 μg/mL ($r=0.999\ 3$); the limits of quantification and detection were 8.0 μg/mL and 2.4 μg/mL; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2.0%; recovery was 97.8%-102.9% (RSD=1.9%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method

270 nm 和 275 nm 波长条件下, 检测结果没有显著性差异。因此, 确定本试验各检测波长分别为 325 nm (绿原酸和阿魏酸)、250 nm (栀子苷和甘草酸铵)、275 nm (龙胆苦苷和黄芩苷)。

3.2 流动相的选择

笔者曾考察了甲醇-0.4% 磷酸溶液、乙腈-0.2% 醋酸铵溶液、乙腈-0.4% 磷酸溶液 3 个不同体系的流动相, 研究发现乙腈-0.4% 磷酸溶液为流动相时, 各待测成分的分离度和峰型良好、基线较稳定, 因此最终选择乙腈-0.4% 磷酸溶液为本试验的流动相。

3.3 提取方法的选择

本试验进行了回流提取法和超声提取法的对比研究。结果表明, 两种方法都能够将有效成分提取完全, 但超声提取法提取时间较短(回流提取法提取 1 h 与超声提取法提取 30 min 所得的各成分含量没有明显差异), 因此选择超声提取法作为本试验的提取方法。

综上所述, 本方法简便、结果准确, 适用于茵胆平肝胶囊中绿原酸、栀子苷、龙胆苦苷、阿魏酸、黄芩苷、甘草

酸铵含量的同时测定。

参考文献

- [1] 常学文, 王红玲. 茵胆平肝胶囊治疗酒精性肝病湿热蕴结证 41 例[J]. 河南中医, 2015, 35(9): 2101-2103.
- [2] 王敏, 龚先琼. 茵胆平肝胶囊治疗酒精性肝病 18 例临床观察[J]. 湖南中医杂志, 2014, 30(11): 60-62.
- [3] 文晓丽, 朱诗塔, 潘浩. 肝病专科口服中成药应用分析[J]. 中国医院用药评价与分析, 2010, 10(11): 985-987.
- [4] 杨华升, 金瑞, 李秀惠. 茵胆平肝胶囊治疗慢性乙型肝炎疗效观察[J]. 传染病信息, 2006, 19(4): 199-200.
- [5] 汤秋华, 潘东扬. RP-HPLC 法测定茵胆平肝胶囊中黄芩苷的含量[J]. 海峡药学, 2002, 14(5): 52-54.
- [6] 陈庆辉. 高效液相色谱法测定茵胆平肝胶囊中龙胆苦苷的含量[J]. 海峡药学, 2004, 16(1): 52-54.
- [7] 林卫雄, 张旺山. HPLC 法测定茵胆平肝胶囊中绿原酸的含量[J]. 海峡药学, 2010, 22(4): 56-57.
- [8] 陈祯祯, 罗珍珠. HPLC 法同时测定茵胆平肝胶囊中栀子苷、龙胆苦苷、芍药苷的含量[J]. 中国药房, 2012, 23(36): 3442-3444.
- [9] 陈东鸿. 茵胆平肝胶囊的质量标准研究[J]. 中国药房, 2011, 22(7): 637-639.

(收稿日期: 2016-08-16 修回日期: 2016-12-11)

(编辑: 刘柳)

^Δ 基金项目: 广东省科技计划项目(No. 2014A020221098)

* 副主任药师, 硕士。研究方向: 药物分析、临床药学。电话: 020-89163249。E-mail: Tongh2008@126.com

is rapid and simple, and suitable for the content determination of isoniazid in Isoniazid tablet.

KEYWORDS Microfluidic chip; Contactless conductivity detection; Isoniazid; Isoniazid tablet; Content determination

异烟肼片是一种具有杀菌作用的合成抗菌药,是临床应用最多的抗结核药之一,近年也用于治疗 β -地中海贫血、麦粒肿、百日咳、许吉综合征、小舞蹈病、急性菌痢、寻常狼疮等的治疗^[1]。异烟肼的含量测定对药品质量控制、药动学研究等具有重要意义。目前文献报道的测定异烟肼含量的方法主要有高效液相色谱法^[2-3]、分光光度法^[4-5]、间接原子吸收光谱法^[6]、毛细管电泳法^[7]、化学发光法^[8]、荧光猝灭法^[9]和电化学法^[10-11]等。分光光度法、间接原子吸收光谱法、荧光猝灭法、化学发光法和电化学法等易受干扰,毛细管电泳法重现性略差,高效液相色谱法分析成本高、样品处理较烦琐、流动相多为有毒溶剂。微流控芯片是将采样、预处理、加试剂、反应、分离、检测等集成在微芯片上的一门新技术,具有分析速度快、样品处理简单、重复性好、成本低等特点,近年已用于药物分析^[12-13],但用于异烟肼含量测定尚未见报道。因此,笔者采用微流控芯片非接触电导法建立了测定异烟肼片中异烟肼含量的方法,以期为该制剂的质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

μ D-2013型微流控芯片分析仪,包括高压电源、非接触电导检测器和色谱工作站(中山大学药学院分析仪器研究所)^[14-15];聚甲基丙烯酸甲酯(Polymethyl methacrylate, PMMA)十字通道芯片(大连理工大学微系统研究中心,微通道上宽30 μ m,下宽100 μ m,深30 μ m);SHZ-D(III)型循环水式真空泵(巩义市英峪予华仪器厂);ME4001型十万分之一电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司)。

1.2 药品与试剂

异烟肼片(西南药业股份有限公司,批号:150304、150305、150306,规格:0.1 g/片);异烟肼对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100578-200401,纯度:99.8%);三羟甲基氨基甲烷(Tris)、2-(*N*-吗啡啉)乙磺酸(MES)均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为双蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 试验条件

缓冲体系:1.86 mmol/L 柠檬酸-0.14 mmol/L 柠檬酸钠缓冲溶液(pH=3.0);不加添加剂;进样时间:20 s;分离电压:2.5 kV;非接触电导检测器的激发电压:60 V(V_{p-p}),激发频率:60 kHz。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取异烟肼对照品0.010 0 g,置于10 mL量瓶中,加双蒸馏水溶解并定容,得质量浓度为1.00 mg/mL的对照品贮备液,于4 $^{\circ}$ C下保存备用,

临用时用缓冲溶液稀释成各质量浓度的对照品溶液。由于对照品溶液中所含的缓冲溶液配比与电泳介质的配比相同,因此可消除背景干扰。进样前经0.22 μ m的微孔滤膜滤过。

2.2.2 供试品溶液 取样品20片,在研钵中研细,取约0.120 g(约含异烟肼0.100 g),精密称定,置于100 mL量瓶中,加双蒸馏水溶解并定容,得供试品贮备液,于4 $^{\circ}$ C下保存备用。临用时用缓冲溶液稀释10倍,作为供试品溶液,使得供试品溶液中缓冲溶液配比与电泳介质中的相同,以消除背景干扰。进样前经0.22 μ m的微孔滤膜滤过。

2.3 缓冲溶液种类、浓度及pH的选择

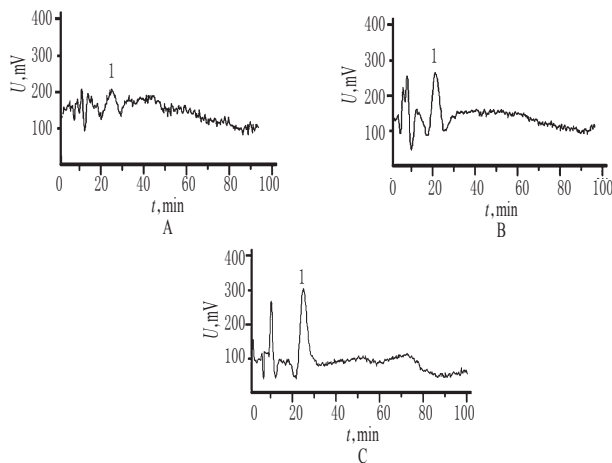
本研究考察了不同种类缓冲溶液对异烟肼分离检测的影响。在MES-Tris、Tris-硼酸、Tris-盐酸、硼酸-硼砂、硼酸-三乙胺、硼酸-乙二胺、硼酸-二乙胺缓冲溶液中异烟肼不出峰。在磷酸盐缓冲溶液中,电流较大,体系噪音大,基线漂移大,且峰形差,样品响应值较小;而在柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液中,电流相对较小,基线平直、噪音小,峰形好且样品响应值较大。本试验还考察了柠檬酸-柠檬酸钠浓度及pH对异烟肼分离的影响。最终优化选择1.86 mmol/L 柠檬酸-0.14 mmol/L 柠檬酸钠缓冲溶液(pH=3.0)作为本试验的缓冲体系。异烟肼在不同柠檬酸-柠檬酸钠浓度下的芯片毛细管电泳色谱图见图1。

缓冲溶液组分的浓度比与pH有关,对分离度也有较大影响。本试验考察了缓冲溶液不同pH及不同浓度对比对样品分离的影响。结果发现,在柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液的pH为3.0~4.0时样品出峰,且随着缓冲溶液pH降低,异烟肼峰形改善、信噪比提高;降低柠檬酸钠在缓冲溶液中的配比,当pH<3.0时,只有样品浓度>200 μ g/g的时候才出现微弱的响应。因此,优化选择pH为3.0。固定缓冲溶液pH=3.0,考察了柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液的浓度,发现在一定范围内降低缓冲溶液的浓度可以获得较好的信噪比,但同时考虑到缓冲溶液要有足够的缓冲能力,因此优化选择1.86 mmol/L 柠檬酸-0.14 mmol/L 柠檬酸钠(即柠檬酸根的总浓度为2 mmol/L)为本试验的缓冲体系。

2.4 线性关系考察

取“2.2.1”项下对照品贮备液适量,加缓冲溶液制备质量浓度分别为5、10、50、100、150、200、250 μ g/mL的系列对照品溶液。取上述系列对照品溶液各适量,按“2.1”项下试验条件进行测定,记录峰面积。以异烟肼质量浓度(x , μ g/mL)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得异烟肼回归方程为 $y=1\ 722.3x+3\ 020$ ($r=0.999\ 3$)。结果表明,异烟肼检测质量浓度线性范围为

10~200 μg/mL。



A.7.44 mmol/L 柠檬酸-0.56 mmol/L 柠檬酸钠; B.3.72 mmol/L 柠檬酸-0.28 mmol/L 柠檬酸钠; C.1.86 mmol/L 柠檬酸-0.14 mmol/L 柠檬酸钠; 1.异烟肼

A.7.44 mmol/L citrate-0.56 mmol/L sodium citrate; B.3.72 mmol/L citrate-0.28 mmol/L sodium citrate; C.1.86 mmol/L citrate-1.14 mmol/L sodium citrate; 1.isoniazid

图1 异烟肼在不同柠檬酸-柠檬酸钠浓度下的芯片毛细管电泳色谱图

Fig 1 Microchip capillary electropherograms of isoniazid in different concentration of citrate-sodium citrate

2.5 定量限与检测限考察

按“2.2.1”项下方法制备质量浓度为10.0 μg/mL的对照品贮备液,倍比稀释,按“2.1”项下试验条件进行测定,记录峰面积。当信噪比为10:1时,得定量限(LOQ);当信噪比为3:1时,得检测限(LOD)。结果,异烟肼的LOQ为8.0 μg/mL,LOD为2.4 μg/mL。

2.6 精密度试验

取“2.2.1”项下对照品贮备液适量,加缓冲溶液稀释成质量浓度为50 μg/mL的对照品溶液。取上述溶液适量,按“2.1”项下试验条件进行测定,记录峰面积。结果,异烟肼峰面积的RSD=1.8% (n=6),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:150304)适量,分别于4℃下放置0、2、4、6、8、12 h时按“2.1”项下试验条件进行测定,记录峰面积。结果,异烟肼峰面积的RSD=1.5% (n=6),表明供试品溶液在4℃下放置12 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验

精密称取同一批样品(批号:150304)适量,共6份,精密称定,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下试验条件进行测定,记录峰面积。结果,异烟肼峰面积的RSD=1.8% (n=6),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

精密称取样品(批号:150304)适量,共9份,分别置于10 mL量瓶中,分别加入低、中、高质量的异烟肼对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下试验条件进行测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表1。

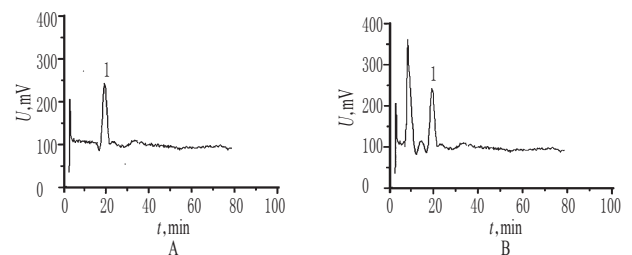
表1 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 1 Results of recovery tests (n=9)

取样量, mg	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
120	1.00	1.20	2.209	100.8		
120	1.00	1.20	2.205	100.4		
120	1.00	1.20	2.173	97.8		
120	1.00	1.00	2.027	102.7		
120	1.00	1.00	2.007	100.7	100.2	1.9
120	1.00	1.00	1.987	98.7		
120	1.00	0.80	1.823	102.9		
120	1.00	0.80	1.797	99.6		
120	1.00	0.80	1.783	97.9		

2.10 样品含量测定

取“2.2”项下供试品溶液和对照品溶液(对照品贮备液经缓冲溶液适当稀释)适量,按“2.1”项下试验条件进行测定,记录电泳图,详见图2。



A.对照品; B.供试品; 1.异烟肼

A.reference substance; B.test samples; 1.isoniazid

图2 芯片毛细管电泳色谱图

Fig 2 Microchip capillary electropherograms

取3批样品各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下试验条件进行测定,记录峰面积,代入回归方程,计算出异烟肼的质量浓度,从而取得质量分数,结果见表2。

表2 样品含量测定结果(n=3)

Tab 2 Results of content determination of samples (n=3)

样品批号	质量浓度, μg/mL	质量分数, %	平均质量分数, %	RSD, %
150304	99.81	99.81	98.71	1.2
	97.50	97.50		
	98.81	98.81		
150305	98.50	98.50	97.40	1.2
	97.50	97.50		
	96.21	96.21		
150306	93.32	99.32	98.28	1.5
	99.10	99.10		
	99.42	99.42		

3 讨论

3.1 添加剂的考察

一般情况下,为改善电泳的分离效果,可向缓冲溶液中加入添加剂,从而通过影响电渗流、迁移率和控制焦耳热等改善分离情况及提高灵敏度。本试验中考察了甲醇、乙醇、十二烷基硫酸钠(SDS)、 β -环糊精(β -CD)等几种添加剂对样品检测分离的影响。结果表明,在加入5%~10%甲醇、5%~10%乙醇时,随着加入量的增大,基线越不稳定,峰形变差,灵敏度降低;加入0.25~2 mmol/L SDS后,随着添加量增加,基线噪音虽然随之降低,但灵敏度也下降且分离度下降;加入1~4 mmol/L β -CD,出现峰形拖尾、出峰时间延后等情况。综合上述检测效果,选择缓冲溶液中不加添加剂。

3.2 进样时间的考察

在电压恒定的情况下,进样时间长短决定了进样量的多少。本试验考察了5.0~20.0 s对样品分离和检测的影响。结果显示,随着进样时间的延长,峰型及体系噪音等因素并未发生明显变化,而样品响应值明显变大;超过20 s后有拖尾现象,故本试验优化选择进样时间为20 s。

3.3 分离电压

笔者考察了1.0~3.0 kV的分离电压对样品分离检测的影响。结果发现,较低的分电压会使样品出峰时间延长,且出现拖尾现象;分离电压过高,电流增大,因焦耳热效应,基线噪音也随之增加,信噪比下降。综合考虑峰形、响应值、噪音等因素,优化选择分离电压为2.5 kV。

综上所述,本方法快速简便,适用于测定异烟肼片中异烟肼的含量。

参考文献

- [1] 容露萍,陶涛,苏颖.异烟肼的临床新用途[J].广东药学,2005,15(6):38-39.
- [2] 苑广信,张丽华,孙晶波,等.HPLC法同时测定异烟肼片中异烟肼及杂质异烟酸的含量[J].中国药房,2010,21(1):76-77.
- [3] 张亮,钱智磊,陆磊,等.高效液相色谱法同时测定人血浆

中异烟肼、乙酰异烟肼和吡嗪酰胺的浓度[J].药学与临床研究,2014,22(2):112-114.

- [4] 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].分析实验室,2012,31(12):13-15.
- [5] 时惠敏,崔晓鸽,胡春霞,等. Fe^{3+} -水合红菲绕啉二磺酸钠分光光度法测定异烟肼[J].河南师范大学学报,2015,43(6):76-80.
- [6] 盛若虹.间接原子吸收光谱法测定异烟肼的含量[J].光谱实验室,2010,27(1):331-334.
- [7] 王金利,章竹君,吴柯,等.毛细管电泳-化学发光法测定人血清中的异烟肼[J].分析实验室,2009,28(6):17-20.
- [8] 慕苗,张琰图,齐广才,等.纳米金催化Luminol- H_2O_2 化学发光体系对异烟肼的测定[J].分析测试学报,2010,29(2):157-160.
- [9] 孙绪兵,何柏陈,翟好英,等.荧光猝灭法测定药物中异烟肼含量[J].分析实验室,2014,33(5):586-588.
- [10] 刘冉彤,郑笑晨,金君,等.多壁碳纳米管-石墨烯复合膜修饰电极电化学检测异烟肼[J].江西师范大学学报(自然科学版),2014,38(5):476-480.
- [11] 王婉君,马伟,孙登明,等.异烟肼与牛血清白蛋白相互作用的光谱和电化学研究[J].分析科学学报,2016,32(3):340-344.
- [12] 李永冲,蔡自由,王充,等.微流控芯片对盐酸利多卡因注射液中盐酸利多卡因的测定[J].分析测试学报,2010,29(8):864-866.
- [13] 蔡亚梅,洪战英,朱臻宇,等.微流控芯片技术在药物活性研究中的应用进展[J].药物分析杂志,2013,33(11):2013-2018.
- [14] 陈缙光,王立世,莫金垣.微全分析系统专用微型电源的研制[J].高等学校化学学报,2004,25(增刊):26-27.
- [15] Chen ZG, Li QW, Li OL, et al. A thin cover glass chip for contactless conductivity detection in microchip capillary electrophoresis [J]. *Talanta*, 2007, 71(5): 1944-1950.

(收稿日期:2016-04-23 修回日期:2016-12-20)

(编辑:刘柳)

《中国药房》杂志——《化学文摘》(CA)收录期刊,欢迎投稿、订阅