

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.09.010

烟酰胺片含量及有关物质测定方法改进

李志远, 刘屹, 左文松

(云南省食品药品监督检验研究院, 云南 昆明 650106)

摘要:目的 建立测定烟酰胺片含量及有关物质的高效液相色谱(HPLC)法。方法 色谱柱采用 Ultimate XB-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-pH 6.0的0.05 mol/L醋酸铵溶液(10:90), 柱温为30℃, 流速为1.0 mL/min, 进样量为20 μL, 检测器为PDA。结果 按新建HPLC法测定73批样品的含量, 与2015年版《中国药典(二部)》紫外分光光度(UV)法测定结果无显著差异($t=0.79$, $P>0.05$)。按2015年版《中国药典(二部)》薄层色谱(TLC)法检测, 均未检出烟酸及其他杂质; 按新建HPLC法测定, 均检出烟酸杂质, 大部分样品检出其他杂质。结论 所建立的方法简便、准确、可靠, 可用于烟酰胺片含量及有关物质测定, 同时能高效、快捷地区分样品间杂质谱的差异, 并能对各杂质进行定量。

关键词: 烟酰胺片; 高效液相色谱法; 烟酰胺; 有关物质; 含量测定; 中国药典

中图分类号: R927.2; R977.2

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)09-0035-04

Improvement of Determination Method of Nicotinamide Content and Related Substances in Nicotinamide Tablets

LI Zhiyuan, LIU Yi, ZUO Wensong

(Yunnan Institute for Food and Drug Control, Kunming, Yunnan, China 650106)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the content determination of nicotinamide and related substances in Nicotinamide Tablets.

Methods The chromatographic column was Ultimate XB-C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol-0.05 mol/L ammonium acetate with pH of 6.0(10:90), the column temperature was 30℃, the flow rate was 1.0 mL/min, the sample size was 20 μL, the detector was PDA. **Results** According to the newly established HPLC method, the content of 73 batches of samples was determined, and the results were not significantly different from that determined by the UV method in the Chinese Pharmacopoeia (Volume II, 2015 edition) ($t=0.79$, $P>0.05$). The 73 batches of samples were tested according to the TLC method in Chinese Pharmacopoeia (Volume II, 2015 edition), no niacin and other impurities were detected. According to the newly established HPLC method, nicotinic acid impurities were detected, and the other impurities were detected in most of the samples. **Conclusion** The established HPLC method is simple, accurate and reliable. It can be used for the content determination of nicotinamide and related substances in Nicotinamide Tablets. It can also efficiently and quickly distinguish the difference of impurity mass spectra among the samples, and quantify each impurity.

Key words: Nicotinamide Tablets; HPLC; nicotinamide; related substances; content determination; Chinese Pharmacopoeia

烟酰胺片(Nicotinamide Tablets)系吡啶衍生物3-吡啶甲酰胺,属于水溶性B族维生素类药物,在体内与核糖、磷酸、腺嘌呤形成烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(辅酶I)和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(辅酶II),为脂质代谢、组织呼吸的氧化作用和糖原分解所必需,缺乏时会影响细胞的正常呼吸和代谢,进而引起糙皮病;胃肠道易吸收,吸收后分布到全身组织,半衰期($t_{1/2}$)约为45 min,经肝脏代谢,治疗量仅少量以原形自尿排出,但过量服用时排泄量增加。烟酰胺与异烟肼有拮抗作用,长期服用异烟肼时应适当补充烟酰胺;烟酰胺无扩张血管作用,可用于高血压患者。2015年版《中国药典(二部)》收载有薄层色谱(TLC)法测定其有关物质,紫外分光光度(UV)法测定含量^[1-2]。高效液相色谱(HPLC)法测定其含量和有关物质也有文献^[3-6]报道。本研究中选择2种不同的方法测定烟酰胺片的含量及有关物质,为该药的质量控制提供更加简便、准确、高效的评价方法^[7-9]。现报道如下。

1 仪器与试剂

仪器:LC-20A型高效液相色谱仪(PDA检测器,

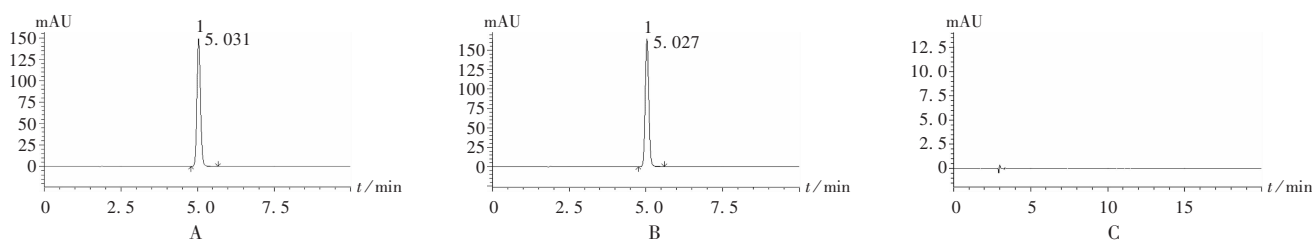
日本岛津公司);BP-221S型电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司);UE06SFD(6 L)型超声波提取仪(德国Wiggins仪器公司);UV-2550型紫外可见分光光度计(日本岛津公司);DELTA320型酸度计(梅特勒-托利多集团公司)。

试剂:烟酰胺片(广州康和药业有限公司5批,天津力生制药股份有限公司36批,上海信谊药厂有限公司委托上海信谊黄河制药有限公司32批);烟酰胺对照品(批号为100115-200703)、烟酸对照品(批号为100434-201102)均购于中国食品药品检定研究院;N-羟甲基烟酰胺(批号为1001062150)、3-氰基吡啶(批号为13082202)均购于Sigma-Aldrich公司;甲醇为色谱纯;盐酸为分析纯,水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Ultimate XB-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-0.05 mol/L醋酸铵溶液(pH 6.0)(20:80);检测波长:262 nm;柱温:30℃;流速:1.0 mL/min;



1. 烟酰胺

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 空白辅料溶液

图1 系统适用性用试验高效液相色谱图

进样量:20 μL 。

2.2 含量测定

2.2.1 溶液制备

称取烟酰胺对照品适量,精密称定,加流动相适量,超声 10 min 溶解,并稀释制成质量浓度为 250 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品贮备溶液。称取烟酰胺片细粉适量,精密称定,加流动相适量,超声 10 min 溶解,并稀释制成质量浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。取烟酰胺片处方项下的辅料适量,加流动相适量,按供试品溶液制备方法制备,即得空白辅料溶液。

2.2.2 方法学考察

系统适用性试验:取 2.2.1 项下 3 种溶液,各精密量取 20 μL ,按拟订色谱条件进样测定,记录色谱图。结果空白辅料溶液无干扰。详见图 1。

线性关系考察:精密量取对照品贮备溶液,加流动相制成 250,100,50,25,10 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,按拟订色谱条件注入液相色谱仪,记录峰面积,以对照品质量浓度 (X , $\mu\text{g/mL}$) 为横坐标、峰面积 (Y) 为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程 $Y=25446X+45667$, $r=0.9998$ ($n=5$)。结果表明,烟酰胺质量浓度在 10~250 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取 2.2.1 项下对照品溶液(质量浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$),连续进样 5 次,记录图峰面积。结果的 RSD 为 0.03% ($n=5$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:称取样品(天津力生制药股份有限公司,批号为 1305004)细粉适量,精密称定,依法制备供试品溶液,分别于 0,2,4,6,9,12,18,24 h 时进样,记录峰面积。结果的 RSD 为 0.63% ($n=8$),表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

重复性试验:取样品(天津力生制药股份有限公司,批号为 1305004)细粉适量(约相当于烟酰胺 50 mg) 6 份,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定,记录峰面积,计算含量。结果烟酰胺平均含量为 97.72%, RSD 为 0.87% ($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取样品(天津力生制药股份有限公

司,批号为 1305004)10 片,精密称定,研细,精密称取适量(约相当于烟酰胺 50 mg),置 100 mL 容量瓶中,加流动相适量,超声 10 min 溶解,并稀释至刻度,摇匀,滤过,并精密量取续滤液 10 mL 置 50 mL 容量瓶中,稀释至刻度,得 100 $\mu\text{g/mL}$ 的供试品贮备溶液。精密量取供试品贮备溶液与 2.1 项下对照品溶液(质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$)适量,用流动相稀释成 80%,100%,120% 回收率试验溶液,摇匀,即得。取上述溶液各 20 μL ,按拟订色谱条件试验,记录峰面积,计算回收率。结果见表 1。

表1 烟酰胺加样回收试验结果($n=9$)

样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
1201.50	808.50	2000.14	98.78		
1200.00	808.50	1999.93	98.94		
1220.00	808.50	2000.26	96.51		
1195.52	1347.50	2516.24	98.01		
1190.06	1347.50	2523.15	98.93	98.42	0.85
1205.28	1347.50	2529.07	98.24		
1196.45	1886.50	3071.82	99.41		
1205.62	1886.50	3068.92	98.77		
1204.57	1886.50	3057.50	98.22		

定量限确定:按照信噪比(S/N)=10 时,记录色谱图,计算得烟酰胺的定量限为 1.08 ng。

2.2.3 样品含量测定

取不同厂家不同批号烟酰胺片 73 批,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件及 2015 年版《中国药典(二部)》该品种项下方法(UV 法)测定并计算。结果见表 2,两组数据比较无显著差异($t=0.79$, $P>0.05$)。

2.3 有关物质测定

2.3.1 系统分离度试验

精密称取烟酰胺对照品、烟酸对照品、N-羟甲基烟酰胺、3-氰基吡啶,加甲醇-水(2:8)制成 50 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液,精密量取其续滤液 20 μL ,按拟订色谱条件注入液相色谱仪,测定,记录色谱图,烟酰胺与其他各杂质分离良好。色谱图见图 2。

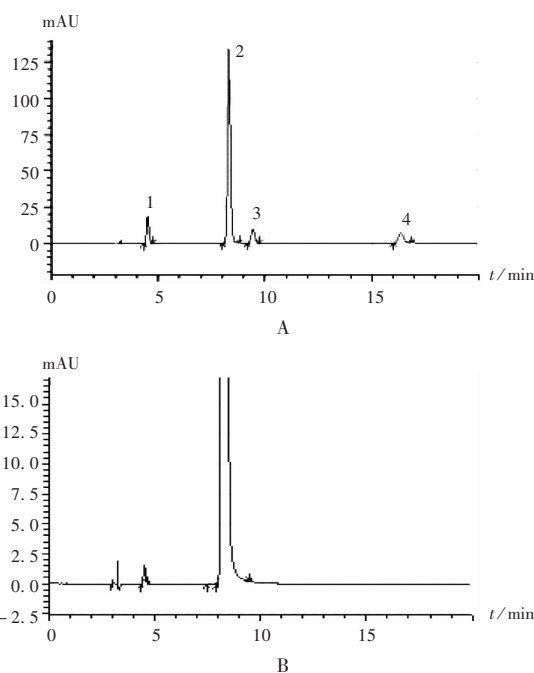
2.3.2 破坏试验

称取样品(天津力生制药股份有限公司,批号为

表2 《中国药典》UV法与HPLC法测定结果(标示量的百分含量,%)

编号	UV法	HPLC法	编号	UV法	HPLC法	编号	UV法	HPLC法
1	98.31	100.38	26	98.08	97.17	51	99.62	100.80
2	98.04	100.47	27	98.02	96.33	52	99.38	98.10
3	99.92	95.86	28	95.43	95.68	53	98.40	98.09
4	99.58	99.03	29	97.05	95.82	54	97.39	97.38
5	99.13	100.48	30	95.14	96.43	55	100.53	101.33
6	98.34	97.64	31	97.00	96.46	56	97.60	97.32
7	97.02	96.69	32	97.03	98.22	57	97.88	99.37
8	100.48	99.74	33	98.47	98.21	58	96.92	97.62
9	98.69	95.83	34	98.52	98.38	59	95.47	97.39
10	97.90	98.01	35	97.54	97.91	60	99.10	101.46
11	96.28	94.24	36	96.46	97.19	61	97.36	99.20
12	97.76	97.35	37	97.13	99.10	62	95.23	99.63
13	95.13	95.42	38	96.52	96.41	63	97.51	98.21
14	98.58	98.90	39	95.44	95.32	64	96.04	97.36
15	96.19	96.66	40	95.52	96.44	65	99.33	99.60
16	98.02	99.72	41	95.61	96.03	66	97.54	100.28
17	97.36	97.13	42	98.69	97.48	67	98.29	97.37
18	95.81	95.19	43	98.47	99.61	68	98.50	99.02
19	97.47	95.90	44	99.53	99.34	69	98.61	97.56
20	97.89	97.11	45	100.60	101.10	70	100.35	100.90
21	97.11	95.14	46	98.49	98.38	71	98.03	100.14
22	97.04	95.40	47	98.03	99.09	72	98.75	98.37
23	97.42	96.64	48	100.22	10.61	73	96.33	98.29
24	97.03	96.93	49	99.51	97.83			
25	94.12	96.82	50	98.90	99.24			

1305004)粉末适量(约相当于烟酰胺25 mg),精密称定,置50 mL容量瓶中,分别在酸(0.1 mol/L HCL)、碱(0.1 mol/L NaOH)、高温(100℃水浴5 h)、氧化(加3% H₂O₂溶液5 mL,室温放置2 d)、光照(4 500 lx)条件下分别进行破坏性试验。取破坏性试验样品适量,精密称定,依法制备供试品溶液,精密量取适量,按拟订色谱条件注入液相色谱仪,依法测定,记录色谱图,计算含量。



1. 烟酸 2. 烟酰胺 3. N-羟甲基烟酰胺 4. 3-氰基吡啶
A. 系统分离度试验用混合对照品溶液 B. 供试品溶液

图2 系统分离度试验高效液相色谱图

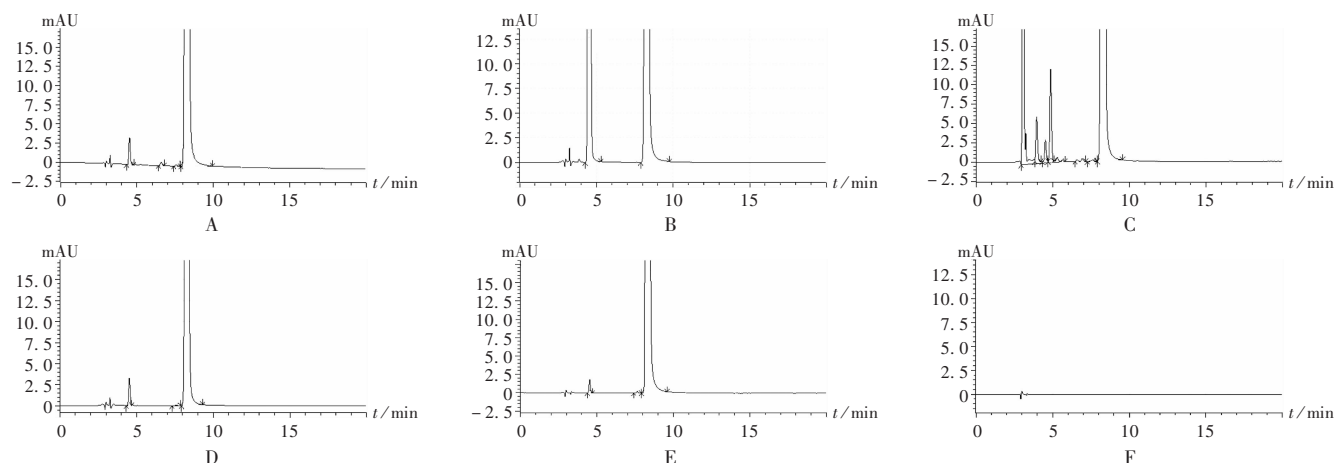
结果见表3及图3。可见,烟酰胺在光照条件下最稳定,酸性条件、氧化条件和高温条件下次之,碱性条件下最不稳定。

表3 各破坏条件下烟酰胺片总杂质含量变化情况(%)

条件	破坏前	破坏后	升幅
酸破坏	0.11	0.27	0.16
碱破坏	0.11	44.04	43.93
氧化破坏	0.11	1.45	1.34
高温破坏	0.11	0.45	0.33
光照破坏	0.11	0.12	0.01

2.3.3 辅料干扰试验

由烟酰胺片制剂工艺可知,所用辅料主要为淀粉、微晶纤维素、羧甲基淀粉钠、硬脂酸镁。称取上述辅料适



A. 酸破坏 B. 碱破坏 C. 氧化破坏 D. 高温破坏 E. 光照破坏 F. 空白

图3 破坏试验高效液相色谱图

量,参照工艺配方加 10% 甲醇水制得供试品溶液,精密量取 20 μ L,注入液相色谱仪,依法测定,记录色谱图。结果辅料基本无干扰。

2.3.4 检出限与定量限确定

以信噪比(S/N)=3 时为检出限,以 $S/N=10$ 时为定量限,各组分的检出限及定量限确定结果见表 4。

表 4 检出限与定量限确定结果(ng)

物质	检出限	定量限	物质	检出限	定量限
烟酸	0.21	0.52	烟酰胺	0.36	1.08
N-羟甲基烟酰胺	0.50	1.00	3-氨基吡啶	0.98	2.94

2.3.5 耐用性试验

其他色谱条件不变,改变流速分别为 0.8, 1.0, 1.2 mL/min;改变流动相 pH 分别为 5.8, 6.0, 6.2;改变柱温为 25, 30, 35 $^{\circ}$ C;改变色谱柱为 UItimate XB-C₁₈ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), Kromasil 100-5 C₁₈ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), AlltimaTMC₁₈ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)。依法测定,结果显示,各杂质峰之间的分离度良好,保留时间有改变,说明方法耐用性好。

2.3.6 样品有关物质测定

取不同厂家不同批号的 73 批烟酰胺片,精密称取适量(相当于烟酰胺 25 mg)置 50 mL 容量瓶中,加甲醇-水(2:8)溶解并定容至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。精密量取供试品溶液 1 mL 置 100 mL 容量瓶中,加甲醇-水(1:9)溶解并定容至刻度,即得自身对照溶液。取上述溶液各 20 μ L 照拟订色谱条件及 2015 年版《中国药典(二部)》该品种项下有关物质含量测定方法进样测定。采用药典方法(TLC 法),73 批样品的供试品溶液中均未见杂质斑点;采用新建的 HPLC 法均能检出烟酸,绝大部分样品检出其他杂质。表明新建 HPLC 法不但能有高效、快捷地区分样品间杂质谱的差异,还能对各杂质进行定量。结果见表 5。

3 讨论

3.1 《中国药典》UV 法与 HPLC 法测定含量比较

2 种方法测定的结果无显著性差异;但现行质量标准中 UV 法测定步骤烦琐,且其试验过程中水浴加热温度对含量测定结果影响较大;新建 HPLC 法操作简单、易行、准确,可降低试验过程控制不当带来的误差,可作为烟酰胺片含量测定的方法之一。

3.2 TLC 法与 HPLC 法杂质检查结果比较

因受检出限的限制,样品均未检出烟酸及其他杂质,未能有效考察样品间杂质的差异,对控制和区分药品的内在质量不利。采用新建的 HPLC 法均能检出烟酸,绝大部分样品检出其他杂质,能高效、快捷地区分样品间杂质谱的差异,还能对各杂质进行定量。

表 5 73 批样品 HPLC 法有关物质检测结果(%)

编号	烟酸 杂质	其他 杂质	编号	烟酸 杂质	其他 杂质	编号	烟酸 杂质	其他 杂质
1	0.03	0.11	26	0.11	0.01	51	0.09	-
2	0.02	0.07	27	0.13	0.01	52	0.09	-
3	0.02	0.09	28	0.10	0.01	53	0.03	-
4	0.03	0.07	29	0.12	0.01	54	0.09	-
5	0.02	0.09	30	0.10	0.01	55	0.06	-
6	0.13	0.01	31	0.08	0.01	56	0.10	0.01
7	0.09	0.02	32	0.08	0.02	57	0.03	-
8	0.08	0.03	33	0.09	0.01	58	0.04	-
9	0.12	0.02	34	0.08	0.01	59	0.04	-
10	0.08	0.02	35	0.13	-	60	0.09	-
11	0.11	0.01	36	0.09	0.02	61	0.03	-
12	0.09	0.01	37	0.13	0.01	62	0.09	-
13	0.09	0.01	38	0.09	0.01	63	0.11	0.01
14	0.11	0.02	39	0.13	0.01	64	0.08	-
15	0.09	0.02	40	0.09	0.01	65	0.10	-
16	0.08	0.02	41	0.14	0.03	66	0.09	0.01
17	0.13	0.01	42	0.03	-	67	0.12	-
18	0.09	0.01	43	0.03	-	68	0.04	-
19	0.08	0.01	44	0.08	-	69	0.04	-
20	0.10	0.01	45	0.09	-	70	0.08	-
21	0.11	0.02	46	0.09	-	71	0.03	-
22	0.09	0.01	47	0.03	-	72	0.12	-
23	0.08	0.01	48	0.04	0.01	73	0.08	-
24	0.13	0.01	49	0.09	-			
25	0.10	0.01	50	0.08	0.01			

注:“-”为未检出。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 1178-1179.
- [2] European Directorate for Quality Medicines. European Pharmacopeia 8.0[M]. Strasbourg: European Directorate Health Care, 2014: 2845.
- [3] 谢友亮. 高效液相色谱法测定烟酰胺片的含量及有关物质[J]. 中国药师, 2009, 12(7): 912-913.
- [4] 文丽丽, 张力升, 吕文军. 紫外分光光度法测定烟酸片含量[J]. 哈尔滨医药, 2012, 32(1): 14-15.
- [5] 闫龙宝, 王浩, 刘小力, 等. HPLC 法测定含乳饮料中烟酸和烟酰胺[J]. 中国食品添加剂, 2008(3): 151-153.
- [6] 余穗颖. 生产烟酰胺新工艺技术[J]. 化工设计, 2000, 10(5): 13.
- [7] 姜宜飞, 李友顺, 单炜力. 烟酰胺原料高效液相色谱分析方法研究[J]. 农药分析, 2008, 29(9): 15-17.
- [8] 杜碧莹. 高效液相色谱法测定注射用己酮可可碱中有关物质[J]. 中国药业, 2015, 24(21): 123-125.
- [9] 李红莉, 赫晓军, 曹凤习, 等. 高效液相色谱法测定阿替洛尔片的含量[J]. 中国药业, 2007, 16(15): 23-24.

(收稿日期: 2018-08-03)