

中图分类号: R927.2; R977.2\*2 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2025)01-0078-05  
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2025.01.016



# 高效液相色谱法测定烟酰胺注射液含量及检测有关物质\*

谭菊英, 蒋 洁, 刘庄蔚, 何 虹, 杨欣智, 朱健萍, 邓 鸣, 赵 庄<sup>△</sup>

(广西壮族自治区药品检验研究院, 广西南宁 530021)

**摘要:** **目的** 建立测定烟酰胺注射液含量及检测有关物质的高效液相色谱(HPLC)法。**方法** 色谱柱为 Waters Xselect HSS T<sub>3</sub> 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为稀醋酸(12 g 冰醋酸用水稀释至 100 mL)5 mL, 加水 900 mL, 加稀氨溶液(25.0% ~ 30.0% 浓氨水 0.7 g, 用水稀释至 100 mL)30 mL、乙腈 15 mL, 用水稀释至 1 000 mL, 再加四氢呋喃 5 mL; 流速为 0.4, 1.2 mL/min; 检测波长为 264 nm; 柱温为 30 °C; 进样量为 10 μL。**结果** 含量测定中, 烟酰胺的质量浓度在 60.42 ~ 140.98 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好( $r = 0.999\ 7, n = 5$ ); 精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均低于 2.0%; 回收率为 100.11%, RSD 为 0.76% ( $n = 9$ ); 3 批样品含量分别为 100.61%, 100.77%, 99.60%。有关物质检测中, 烟酰胺与杂质、各杂质间均能有效分离, 辅料不干扰测定, 供试品溶液在 24 h 内稳定性良好; 烟酸(杂质 A)、3-氰基吡啶、2-吡啶甲酰胺、4-吡啶甲酰胺、N-氧化烟酰胺在各自质量浓度范围内与峰面积线性关系均良好( $r > 0.999\ 7, n = 7$ ); 回收率分别为 102.20%, 102.00%, 101.76%, 101.96%, 102.14%, RSD 分别为 0.99%, 0.76%, 0.76%, 0.80%, 1.03% ( $n = 9$ ); 检测限分别为 0.26, 1.12, 0.78, 0.63, 0.13 ng; 定量限分别为 0.86, 3.74, 2.59, 2.09, 0.43 ng; 3 批样品中均仅检出杂质 A, 含量分别为 0.24%, 0.41%, 0.061%。**结论** 该方法准确度高、灵敏度好, 可用于烟酰胺注射液的含量测定及有关物质检测。

**关键词:** 高效液相色谱法; 烟酰胺注射液; 含量测定; 有关物质检测

## Content Determination of Nicotinamide Injection and Detection of Related Substances by HPLC

TAN Juying, JIANG Jie, LIU Zhuangwei, HE Hong, YANG Xinzhi, ZHU Jianping, DENG Ming, ZHAO Zhuang  
(Guangxi Institute for Drug Control, Nanning, Guangxi, China 530021)

**Abstract:** **Objective** To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the content determination of Nicotinamide Injection and detection of related substances. **Methods** The chromatographic column was a Waters Xselect HSS T<sub>3</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); the mobile phase consisted of 5 mL of dilute acetic acid (12 g of glacial acetic acid diluted to 100 mL with water), 900 mL of water, 30 mL of dilute ammonia solution (0.7 g of 25.0% - 30.0% concentrated ammonia solution, diluted to 100 mL with water), 15 mL of acetonitrile, diluted to 1 000 mL with water, and 5 mL of tetrahydrofuran; the flow rate was 0.4 mL/min and 1.2 mL/min; the detection wavelength was 264 nm; the column temperature was 30 °C; the injection volume was 10 μL. **Results** In the content determination, the linear range of nicotinamide was 60.42 - 140.98 μg/mL ( $r = 0.999\ 7, n = 5$ ). The RSDs of precision, stability, and repeatability test results were all lower than 2.0%. The recovery rate of nicotinamide was 100.11% with an RSD of 0.76% ( $n = 9$ ). The contents of nicotinamide in the three batches of samples were 100.61%, 100.77%, and 99.60%, respectively. In the detection of related substances, nicotinamide could be effectively separated from impurities and impurities could also be well separated from each other, and excipients did not interfere with the determination. The stability of the test solution was good within 24 h. Nicotinamide (impurities A), 3-cyanopyridine, Pyridine-2-carboxamide, isonicotinamide, and nicotinamide-N-oxide had a good linear relationship with peak area within their respective mass concentration ranges ( $r > 0.999\ 7, n = 7$ ). The recovery rates were 102.20%, 102.00%, 101.76%, 101.96%, and 102.14%, with RSDs of 0.99%, 0.76%, 0.76%, 0.80%, and 1.03% ( $n = 9$ ), respectively. The limits of detection were 0.26, 1.12, 0.78, 0.63, and 0.13 ng, respectively. The limits of quantification were 0.86, 3.74, 2.59, 2.09, and 0.43 ng, respectively. Only impurity A was detected in all three batches of samples, with contents of 0.24%, 0.41%, and 0.061%, respectively. **Conclusion** This method has high accuracy and good sensitivity, which can be used for the content determination and detection of related substance in Nicotinamide Injection.

**Key words:** HPLC; Nicotinamide Injection; content determination; detection of related substance

烟酰胺是烟酸的酰胺化合物, 为吡啶衍生物 3-吡啶甲酰胺, 属水溶性 B 族维生素类药物, 为辅酶 I 和辅酶 II 的组成部分, 参与体内的代谢过程, 为脂类代谢、

组织呼吸的氧化作用和糖原分解所必需, 具有抗氧化、抗炎、代谢调控作用, 可用于治疗皮肤病、肿瘤等<sup>[1-3]</sup>。目前, 烟酰胺常用剂型为注射剂、片剂, 现行质量标准

\*基金项目: 广西壮族自治区药品监督管理局药品安全科研项目[桂药监办函[2020]108号]。

第一作者: 谭菊英, 女, 硕士, 副主任药师, 研究方向为药物分析, (电子信箱)595075307@qq.com。

<sup>△</sup>通信作者: 赵庄, 女, 大学本科, 主任药师, 研究方向为药物分析, (电子信箱)549858047@qq.com。

均收载于2020年版《中国药典(二部)》<sup>[4]</sup>,但该标准难以有效控制产品质量。烟酰胺类药品被列入第二批国家重点监控药品<sup>[5]</sup>、国家重点药品监控处方<sup>[6]</sup>,药品不良反应较多,使用过程中需密切监测<sup>[3]</sup>。为更好地控制产品质量,保障用药安全,本研究中参考文献<sup>[7-14]</sup>,建立了测定烟酰胺注射液的含量和检测有关物质的高效液相色谱(HPLC)法。现报道如下。

## 1 仪器与试药

### 1.1 仪器

LC-20AT型HPLC仪(日本Shimadzu公司),配有二极管阵列检测器、四元泵等;XS205型电子分析天平(瑞士Mettler Toledo公司,精度为0.01 mg);9983型超声仪(宁波海曙科生超声设备有限公司,功率为300 W,频率为40 kHz)。

### 1.2 试药

烟酰胺对照品(批号为100115-202005,含量为99.9%),烟酸(杂质A)对照品(批号为100434-201603,含量为99.8%),3-氰基吡啶(杂质B)对照品(批号为190100-201501,含量为99.7%),均购自中国食品药品检定研究院;2-吡啶甲酰胺(杂质C)对照品(CATO,批号为0408-RA-0004,含量为99.5%);4-吡啶甲酰胺(杂质D)对照品(批号为23070161,含量为99.9%),N-氧代烟酰胺(杂质E)对照品(批号为23070164,含量为99.9%),均购自坛墨质检-标准物质中心;烟酰胺注射液(A厂,批号为YX6210202, YX6200702,质量浓度为50 mg/mL;B厂,批号为12230207,质量浓度为100 mg/mL);乙腈、四氢呋喃均为色谱纯,水为纯化水,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Waters Xselect HSS T<sub>3</sub>柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:稀醋酸[取12 g冰醋酸(含量99.0%~100.5%),用水稀释至100 mL]5 mL,加水900 mL,再加稀氨溶液(25.0%~30.0%浓氨水0.7 g用水稀释至100 mL)30 mL与乙腈15 mL,用水稀释至1 000 mL,再加四氢呋喃5 mL,摇匀;流速:0.4 mL/min(0~10 min), 1.2 mL/min(10~24 min), 0.4 mL/min(24~29 min);检测波长:264 nm;柱温:30 °C;进样量:10 μL。

### 2.2 溶液制备

取烟酰胺对照品10.08 mg,精密称定,置10 mL容量瓶中,加流动相约7 mL,超声使溶解,冷却至室温,用流动相定容,摇匀,作为烟酰胺对照品贮备液;精密量取烟酰胺对照品贮备液1 mL,置10 mL容量瓶中,用流动相定容,摇匀,即得含量测定用对照品溶液(烟酰胺质量浓度约为0.1 mg/mL)。

分别取烟酰胺及杂质A、B、C、D、E对照品10.09、9.97、10.05、9.98、9.94、9.99 mg,精密称定,分别置10 mL

容量瓶中,加流动相约7 mL,超声使溶解,冷却至室温,用流动相定容,摇匀,即得各单一对照品贮备液;精密量取各单一对照品贮备液5 mL,置同一50 mL容量瓶中,用流动相定容,摇匀,即得混合对照品贮备液;精密量取混合对照品贮备液1 mL,置20 mL容量瓶中,用流动相定容,摇匀,即得有关物质检测用对照品溶液(质量浓度为5 μg/mL)。

取烟酰胺对照品9.98 mg,精密称定,置10 mL容量瓶中,精密加入混合对照品贮备液1 mL,加流动相约6 mL,超声使溶解,冷却至室温,用流动相定容,摇匀,即得系统适用性溶液(烟酰胺、杂质对照品质量浓度分别为1 μg/mL、10 μg/mL)。

精密量取烟酰胺注射液1 mL(质量浓度为50 mg/mL),置50 mL容量瓶中(若质量浓度为100 mg/mL则置100 mL容量瓶中),用流动相定容,摇匀,精密量取1 mL,置10 mL容量瓶中,用流动相定容,摇匀,即得含量测定用供试品溶液(质量浓度为0.1 mg/mL)。

精密量取烟酰胺注射液1 mL(质量浓度为50 mg/mL),置50 mL容量瓶中(若质量浓度为100 mg/mL则置100 mL容量瓶中),用流动相定容,摇匀,即得有关物质检测用供试品溶液(质量浓度为1 mg/mL)。

取不含烟酰胺的辅料水溶液,按有关物质检测用供试品溶液制备方法制备空白辅料溶液。

### 2.3 方法学考察

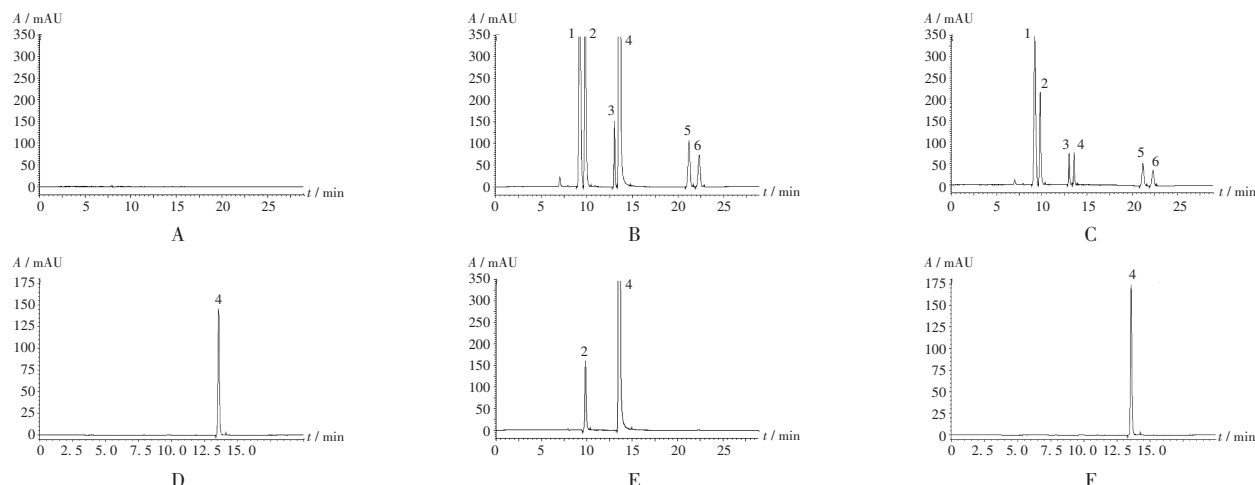
专属性试验:取空白辅料溶液、系统适用性溶液、有关物质检测用供试品溶液及对照品溶液、含量测定用对照品溶液及供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,结果溶剂和空白辅料溶液对测定无干扰,各物质间的分离度均能达到要求。色谱图见图1。

破坏性试验:取样品(批号为YX6210202)分别进行未破坏、高温破坏(100 °C水浴加热3 h)、日光照射破坏[(5 000±500)lx下放置240 h]、紫外光照射破坏[254 nm波长、照射(3 000±500)lx下放置240 h]、酸破坏(取样品1 mL,加1 mol/L盐酸溶液1 mL,室温放置1.5 h,加1 mol/L氢氧化钠溶液1 mL调pH至中性)、碱破坏(取样品1 mL,加1 mol/L氢氧化钠溶液1 mL,放置1.5 h,加1 mol/L盐酸溶液1 mL调pH至中性)、氧化破坏(取样品1 mL,加10%过氧化氢溶液1 mL,室温放置2 h)试验,按2.2项下方法制备有关物质检测用供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示,碱破坏条件下杂质A明显增加(峰面积为10 014 375);氧化破坏条件下生成杂质E;与未破坏供试液(峰面积为50 294)比较,酸破坏条件下杂质A增加(峰面积为72 975),其余条件下杂质A的变化不明显(峰面积为48 984~59 891),且未破坏出其他明显杂质;烟酰胺与各杂质均能有效分离。详见图2。为更好地观察破坏性试验产物,破坏性试验色谱图实际延长记

录至90 min,结果主峰后均无破坏性试验产物产生。

线性关系考察:精密量取2.2项下烟酰胺对照品贮备液0.6,0.8,1.0,1.2,1.4 mL,分别置10 mL容量瓶中,用流动相定容,摇匀,作为含量测定用线性对照品溶液;精密量取2.2项下有关物质混合对照品贮备液

0.10,0.25,0.50,0.75,1.00,1.25,1.50 mL,分别置10 mL容量瓶中,用流动相定容,摇匀,作为有关物质检测用线性对照品溶液。取2种线性对照品溶液各适量,分别按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,以质量浓度( $X, \mu\text{g/mL}$ )为横坐标、峰面积( $Y$ )为纵坐标进行线性



1. 杂质E 2. 杂质A 3. 杂质D 4. 烟酰胺 5. 杂质C 6. 杂质B

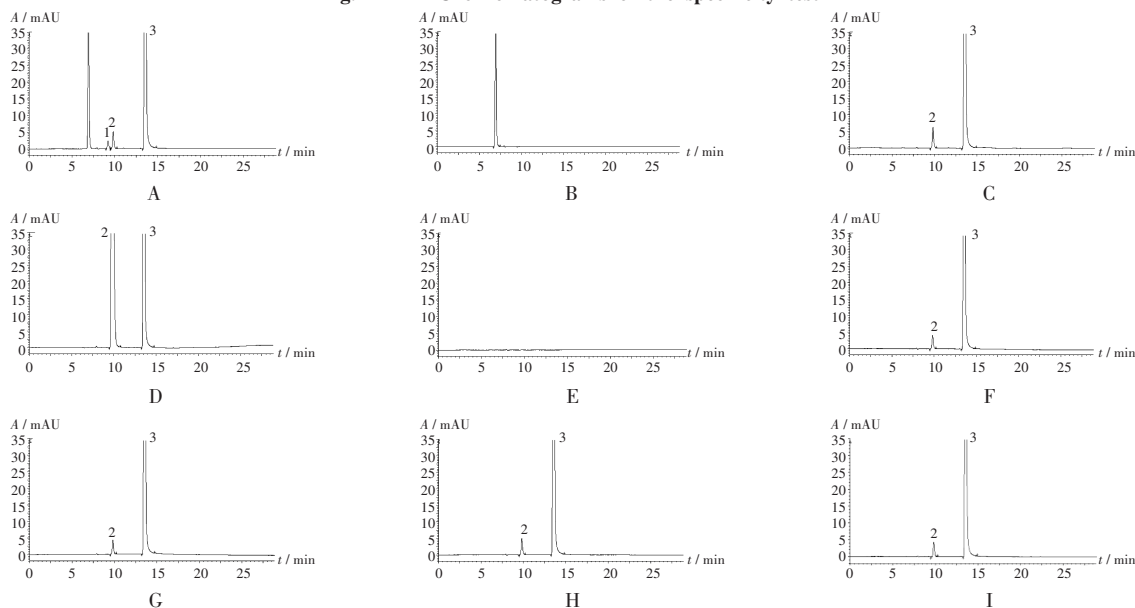
A. 空白辅料溶液 B. 系统适用性溶液 C - D. 对照品溶液(分别为有关物质检测、含量测定用) E - F. 供试品溶液(分别为有关物质检测、含量测定用)

图1 专属性试验高效液相色谱图

1. Impurity E 2. Impurity A 3. Impurity D 4. Niacinamide 5. Impurity C 6. Impurity B

A. Blank excipient solution B. System suitability solution C - D. Reference solution (for detection of related substance and content determination, respectively) E - F. Test solution (for detection of related substance and content determination, respectively)

Fig. 1 HPLC chromatograms of the specificity test



1. 杂质E 2. 杂质A 3. 烟酰胺

A. 氧化破坏 B. 氧化破坏空白 C. 酸破坏 D. 碱破坏 E. 酸碱破坏空白 F. 日光照射破坏 G. 紫外光照射破坏 H. 高温破坏 I. 未破坏

图2 破坏性试验高效液相色谱图

1. Impurity E 2. Impurity A 3. Niacinamide

A. Oxidative destruction B. Blank of oxidative destruction C. Acid destruction D. Alkali destruction E. Blank of acid - alkali destruction F. Sunlight destruction G. Ultraviolet destruction H. High temperature destruction I. Undestruction

Fig. 2 HPLC chromatograms of the destructive test

表 1 方法学考察结果  
Tab. 1 Results of the methodology investigation

| 成分        | 回归方程                    | <i>r</i> | 线性范围<br>(μg / mL) | 校正因子 | 检测限<br>(ng) | 定量限<br>(ng) | 精密度试验的<br><i>RSD</i> (%, <i>n</i> = 6) | 重复性试验(%, <i>n</i> = 6) |            | 稳定性试验的<br><i>RSD</i> (%, <i>n</i> = 8) |
|-----------|-------------------------|----------|-------------------|------|-------------|-------------|----------------------------------------|------------------------|------------|----------------------------------------|
|           |                         |          |                   |      |             |             |                                        | 含量                     | <i>RSD</i> |                                        |
| 杂质 A      | $Y = 44\,594X + 592.0$  | 1.000 0  | 0.995 ~ 14.925    | 0.25 | 0.26        | 0.86        | 0.21                                   | 0.24                   | 1.24       | 0.59                                   |
| 杂质 B      | $Y = 11\,448X - 633.9$  | 0.999 9  | 1.002 ~ 15.030    | 0.98 | 1.12        | 3.74        | 3.91                                   |                        |            | 1.27                                   |
| 杂质 C      | $Y = 16\,025X - 1\,617$ | 0.999 9  | 0.993 ~ 14.895    | 0.70 | 0.78        | 2.59        | 1.65                                   |                        |            | 1.15                                   |
| 杂质 D      | $Y = 10\,348X - 740.7$  | 1.000 0  | 0.993 ~ 14.895    | 1.08 | 0.63        | 2.09        | 0.80                                   |                        |            | 1.17                                   |
| 杂质 E      | $Y = 99\,615X - 6\,221$ | 1.000 0  | 0.998 ~ 14.970    | 0.11 | 0.13        | 0.43        | 0.13                                   |                        |            | 0.38                                   |
| 烟酰胺       | $Y = 11\,172X - 295.2$  | 0.999 9  | 1.008 ~ 15.120    | 1.00 | 0.57        | 1.91        | 1.58                                   |                        |            |                                        |
| 烟酰胺(含量测定) | $Y = 12\,214X - 26.03$  | 0.999 7  | 60.42 ~ 140.98    |      |             |             | 0.17                                   | 100.60                 | 0.66       | 0.15                                   |

回归。结果见表 1,表明各成分在各自质量浓度范围内与峰面积线性关系良好。

检测限与定量限确定:取有关物质检测用线性对照品溶液适量,用流动相逐级稀释,按 2.1 项下色谱条件进样测定,分别以信噪比(*S* / *N*)为 3:1 和 10:1 计算检测限和定量限。结果见表 1。

精密度试验:取 2.2 项下含量测定用对照品溶液及有关物质检测用混合对照品溶液,分别按 2.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录峰面积。结果见表 1,表明仪器精密度良好。

重复性试验:取样品(批号为 YX6210202)适量,按 2.2 项下方法平行制备含量测定用及有关物质检测用供试品溶液各 6 份,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果有关物质检测用供试品溶液中仅检出杂质 A,表明方法重复性良好。详见表 1。

加样回收试验<sup>[15]</sup>:取烟酰胺对照品 40, 50, 60 mg,精密称定,各 3 份,分别置 50 mL 容量瓶中,加水 1 mL,按 2.2 项下方法制备含量测定回收率供试品溶液;精密量取样品(批号为 YX6210202)0.5 mL,共 9 份,分别置 25 mL 容量瓶中,精密加入 2.2 项下有关物质混合对照品贮备液 0.50, 1.25, 2.50 mL,各 3 份,按 2.2 项下方法制备有关物质回收率供试品溶液。取上述 2 种溶液各适量,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算回收率。结果见表 2,表明方法准确度良好。

表 2 加样回收试验结果(*n* = 9)

Tab. 2 Results of the recovery test (*n* = 9)

| 成分        | 平均回收率(%) | <i>RSD</i> (%) | 成分   | 平均回收率(%) | <i>RSD</i> (%) |
|-----------|----------|----------------|------|----------|----------------|
| 烟酰胺(含量测定) | 100.11   | 0.76           | 杂质 C | 101.76   | 0.76           |
| 杂质 A      | 102.20   | 0.99           | 杂质 D | 101.96   | 0.80           |
| 杂质 B      | 102.00   | 0.76           | 杂质 E | 102.14   | 1.03           |

稳定性试验:取 2.2 项下含量测定用供试品溶液及 2.3 项下有关物质回收率供试品溶液各适量,分别于 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24 h 时按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果有关物质供试品溶液无新杂质生成,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。详见表 1。

## 2.4 样品含量测定

取 3 批样品(批号分别为 YX6210202, YX6200702, 12230207),按 2.2 项下方法制备含量测定用、有关物质检测用供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,按外标法计算烟酰胺及杂质的含量。结果 3 批样品中有关物质均仅检出杂质 A,含量分别为 0.24%, 0.41%, 0.061%; 烟酰胺含量分别为 100.61%, 100.77%, 99.60%。

## 3 讨论

### 3.1 流动相选择

本次测定的物质中,杂质 A 和杂质 E、杂质 D 和烟酰胺、杂质 B 和杂质 C 为 3 对难分离物质对。尝试使用 2 个流动相系统:1)取稀醋酸 5 mL,加水 900 mL,再加稀氨溶液 30 mL 与乙腈 15 mL,用水稀释至 1 000 mL,作为流动相(pH 为 4.3),等度洗脱,流速为 1.0 mL / min,结果杂质 D 和烟酰胺、杂质 B 和杂质 C 分离良好,杂质 A 和杂质 E 的色谱峰完全重叠,无法分开;曾尝试调流动相 pH 至 3.3, 2.8,将流动相中乙腈更换为甲醇并调 pH 至 3.3, 2.8,结果杂质 A 和杂质 E 的色谱峰仍完全重叠,无法分开;尝试在流动相中加四氢呋喃 10 mL,结果 6 个物质保留时间均提前,杂质 A 和杂质 E 的分离度良好,但杂质 D 和烟酰胺无法达到基线分离,杂质 B 和杂质 C 的分离度下降;尝试减少四氢呋喃用量,在不同难分离物质对的分离度之间平衡,经多次探索,确定四氢呋喃用量为 5 mL。2)色谱柱为 Alltima C<sub>18</sub> 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为 0.005 mol / L 庚烷磺酸钠溶液(用 20% 磷酸溶液调 pH 至 2.5) - 乙腈(90:10, V / V)为流动相,等度洗脱,流速为 1.0 mL / min,结果各物质在 6 min 内全部出峰,杂质 A 和杂质 E 完全分离,杂质 D 和烟酰胺无法分离;经多次探索,如改变庚烷磺酸钠溶液浓度、pH、乙腈变换为甲醇、不同流动相比比例、加四氢呋喃、改变流速等,均只能使杂质 A 和杂质 E 良好分离,其余物质均无法分离。故最终选择 2.1 项下流动相。

### 3.2 检测波长选择

采用二极管阵列检测器记录各物质对照品溶液色