



# ĐỊNH LƯỢNG NICOTINAMID VÀ XÁC ĐỊNH GIỚI HẠN TẠP CHẤT LIÊN QUAN TRONG VIÊN SỦI VITAMIN PP 250MG/OPC BẰNG CÁC PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ

## Quantify nicotinamide and determine the limit of the degraded impurities in vitamin PP 250 mg/OPC effervescent tablet by chromatographic methods

Trần Thị Thu Hiền<sup>1\*</sup>, Võ Thị Bạch Huệ<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Khoa Dược, Trường Đại học Lạc Hồng, Đồng Nai

**TÓM TẮT.** Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao tạo cặp ion pha đảo (RP-IPC) được sử dụng để định lượng nicotinamid trong viên sủi vitamin PP 250 mg (công ty dược phẩm OPC). Điều kiện sắc ký để định lượng nicotinamid là cột: C18 (250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m); tốc độ dòng: 1 ml/phút; nhiệt độ cột: 25 °C; thể tích tiêm: 20  $\mu$ l; đầu dò: DAD 254 nm; kỹ thuật rửa giải đẳng dòng với pha động: methanol – natri heptansulfonat 0,005 M (3 : 7). Quy trình đạt độ đặc hiệu, khoảng nồng độ tuyến tính từ 23,99 – 55,97  $\mu$ g/ml, phương trình hồi quy  $\hat{y} = 23,717x$ , hệ số tương quan  $R^2$  0,9998, độ chính xác cao (RSD% < 2,0%), độ đúng đạt yêu cầu (tỷ lệ phục hồi 99,99% – 101,70%) và độ thô với RSD < 2%.

Tạp chất liên quan trong viên được xác định bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi cloroform – ethanol – acid formic (10 : 8 : 2), nồng độ giới hạn phát hiện là 0,098 mg/ml.

**TỪ KHOẢ:** Nicotinamid, sắc ký lỏng hiệu năng cao, tạo cặp ion pha đảo, sắc ký lớp mỏng

**ABSTRACT.** The HPLC method for reverse-phase ion pairs was used to quantify nicotinamide in vitamin PP 250 mg/OPC effervescent tablet. Chromatographic conditions for quantifying nicotinamide are C<sub>18</sub> column (250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m); flow rate: 1 ml/min; column temperature: 25 °C; injection volume: 20  $\mu$ l; detector: DAD 254 nm; isocratic mode with mobile phase: methanol - sodium heptansulfonate 0,005 M (3 : 7). Linear concentration from 23,99 – 55,97  $\mu$ g/ml with linear equation  $\hat{y} = 23,717x$  ( $R^2$  0,9998), precision with RSD < 2%, accuracy has recovery rate from 99,99% - 101,70% and roughness with RSD < 2%.

The degraded impurities in the effervescent tablet were determined by TLC with mobile phase: chloroform – ethanol – formic acid (10 : 8 : 2), limit of detection was 0,098 mg/ml.

**KEYWORDS:** Nicotinamide, HPLC, RP-IPC, TLC

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nicotinamid là một vitamin cần được cung cấp cho cơ thể, mặc dù chỉ cần một lượng rất nhỏ nhưng rất cần thiết để phát triển và duy trì các hoạt động bình thường.

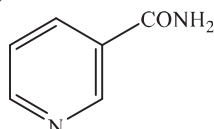
Hai dạng bào chế chứa nicotinamid thường gặp là viên nén và bột pha tiêm có một số khó khăn trong việc dùng thuốc đối với một số đối tượng đặc biệt như người lớn tuổi và trẻ em, vì lý do trên công ty dược phẩm OPC đã tiến hành nghiên cứu công thức bào chế dạng viên sủi vitamin PP. Tuy nhiên hiện nay Dược điển chưa có chuyên luận viên sủi vitamin PP [2, 6, 7]. Vì vậy, đề tài được tiến hành với mục tiêu định lượng nicotinamid trong viên sủi bằng phương pháp HPLC tạo cặp ion pha đảo [3, 7] và xác định tạp chất liên quan bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng [2, 6].

### 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1 Đối tượng nghiên cứu, dung môi, hóa chất

##### Đối tượng nghiên cứu

Viên sủi vitamin PP 250 mg/OPC. Ngày sản xuất: tháng 7/2017. Nơi sản xuất: công ty cổ phần dược phẩm OPC. Thành phẩm đang nghiên cứu.



**Hình 1.** Cấu trúc của nicotinamid

Các tên gọi khác: vitamin B3, vitamin PP, niacinamid.

Chất đối chiếu: Nicotinamid (99,70%), số lô QT054 111116 do Viện Kiểm Nghiệm Thuốc TPHCM cung cấp.

Placebo: Ngày sản xuất: tháng 7/2017. Nơi sản xuất: công ty cổ phần dược phẩm OPC.

##### Dung môi, hóa chất

Dung môi, hóa chất dùng định lượng: methanol, natri heptansulfonat, nước cất dùng cho HPLC.

Dung môi dùng cho xác định tạp chất liên quan: methanol, chloroform, ethanol tuyệt đối, etyl acetat, dietyl ete, acid formic, acid acetic đạt tiêu chuẩn phân tích.

#### 2.2 Thiết bị và điều kiện phân tích

##### Thiết bị

Cân phân tích Sartorius Practum 224-1S (Đức), Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao Agilent 1260 đầu dò DAD (Mỹ).

##### Điều kiện sắc ký định lượng

Pha động: methanol – natri heptansulfonat 0,005 M (3 : 7); cột: C18 (250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m); tốc độ dòng: 1 ml/phút; nhiệt độ cột: 25 °C; thể tích tiêm: 20  $\mu$ l; đầu dò: DAD 254 nm.

Mức chất lượng chấp nhận khi khảo sát điều kiện sắc ký:

- Thời gian lưu: RSD  $\leq$  2%
- Diện tích pic: RSD  $\leq$  2%

Received: April, 19th, 2019

Accepted: July, 25th, 2019

\*Corresponding Author

Email: hientran2369@gmail.com

- Hệ số đối xứng:  $0,8 \leq As \leq 1,5$

- Số đĩa lý thuyết:  $N > 2000$

Điều kiện định lượng: Hàm lượng hoạt chất nicotinamid trong 1 viên so với hàm lượng trên nhãn: 90 – 110%.

#### Xác định tạp chất liên quan

Bản mỏng: Silica gel F<sub>254</sub>.

Dung môi khai triển: cloroform – ethanol – acid formic (10 : 8 : 2).

Cách tiến hành: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 5  $\mu$ l mỗi dung dịch, Triển khai bản mỏng đến khi dung môi đi được khoảng 10 cm, lấy bản mỏng ra, để khô trong không khí. Quan sát dưới ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 245 nm.

Giới hạn cho phép: bất kỳ vết phụ nào trên sắc ký đồ thu được của dung dịch thử cũng không được đậm hơn vết trên sắc ký đồ thu được từ dung dịch đối chiếu (0,25%).

### 2.3 Chuẩn bị mẫu

#### Định lượng nicotinamid

Mẫu chuẩn nicotinamid có nồng độ 40  $\mu$ g/ml trong nước, được lọc qua màng lọc 0,45  $\mu$ m.

Mẫu thử: nghiền mịn 20 viên, lấy 1 lượng thuốc tương ứng với 50 mg nicotinamid cho vào bình định mức 50 ml, thêm nước cất lắc đều cho tan, định mức đến vạch, lắc đều. Hút chính xác 2,0 ml dung dịch trên cho vào bình định mức 50 ml, định mức đến vạch, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45  $\mu$ m. Dung dịch thu được có nồng độ khoảng 40  $\mu$ g/ml.

Mẫu placebo: chuẩn bị như mẫu thử.

Mẫu trắng: nước cất 2 lần.

#### Xác định giới hạn tạp chất liên quan

Dung dịch thử: hòa tan một lượng bột viên có chứa 0,1 g nicotinamid với 15 ml ethanol tuyệt đối, siêu âm trong 15 phút, lọc, làm bốc hơi trên cách thủy tới khô và hòa tan cần với 1 ml ethanol tuyệt đối.

Dung dịch đối chiếu: pha loãng 400 lần dung dịch thử với ethanol tuyệt đối.

Dung dịch chuẩn nicotinamid: hòa tan 0,1 g nicotinamid với 15 ml ethanol tuyệt đối, làm bốc hơi trên cách thủy tới khô và hòa tan cần với 1 ml ethanol tuyệt đối.

Dung dịch placebo: chuẩn bị như dung dịch thử.

### 2.4 Thẩm định phương pháp

#### Định lượng nicotinamid

Sau khi thẩm dò các điều kiện sắc ký (cột phân tích, pha động, kỹ thuật rửa giải ...) với mục đích đạt các điều kiện sắc ký và hàm lượng định lượng. Tiến hành thẩm định tính tương thích hệ thống, độ đặc hiệu, tính tuyến tính, độ đúng, độ chính xác của phương pháp định lượng nicotinamid và xác định tạp chất liên quan theo hướng dẫn của ICH và phụ lục 8 của Sổ tay hướng dẫn đăng ký thuốc [4, 5].

#### Xác định giới hạn tạp chất liên quan

Sau khi khảo sát hệ pha động tiến hành thẩm định tính đặc hiệu, LOD và độ lặp lại theo Sổ tay hướng dẫn đăng ký thuốc [5].

## 3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

### 3.1 Định lượng nicotinamid

#### Tính tương thích hệ thống

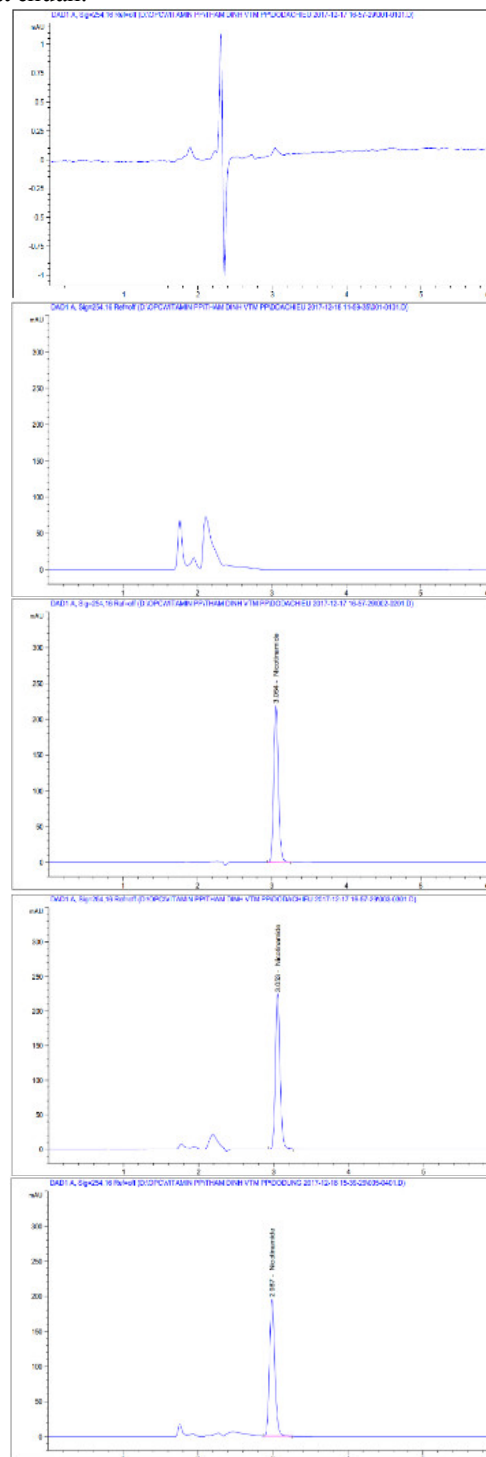
Tiến hành sắc ký 6 lần mẫu chuẩn 100%. Giá trị RSD của các thông số sắc ký đều < 2%, hệ số đối xứng  $0,8 \leq As \leq 1,2$ , số đĩa lý thuyết  $N > 2000$  nên quy trình định lượng nicotinamid đạt tính tương thích của hệ thống.

**Bảng 1.** Kết quả của tính tương thích hệ thống

Thông số	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAu*s)	As	N
TB	3,053	958,85733	0,85	11322
SD	0,0005	0,896	0,005	42,188
RSD%	0,018	0,093	0,610	0,373

#### Độ đặc hiệu

Sắc ký đồ của mẫu trắng và mẫu placebo không xuất hiện pic ở trong khoảng thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của chất chuẩn.



**Hình 2.** Sắc ký đồ của mẫu trắng, mẫu placebo, mẫu chuẩn nicotinamid, mẫu thử, mẫu placebo thêm chuẩn. (Theo thứ tự từ trên xuống)

Sắc ký đồ của mẫu thử và mẫu placebo thêm chuẩn có thời gian lưu tương tự với pic của chất chuẩn nicotinamid trong sắc ký đồ mẫu chuẩn.

Vậy quy trình định lượng nicotinamid có tính đặc hiệu.

**Bảng 2.** Thông số sắc ký của độ đặc hiệu

Mẫu	T <sub>R</sub> (phút)	Diện tích pic (mAU*s)	Purity	A <sub>s</sub>	N
Chuẩn	3,054	958,42609	999,983	0,84	11271
Thử	3,053	975,34753	999,981	0,85	11356
Placebo thêm chuẩn	2,987	958,10785	-	0,84	11311

**Độ lặp lại và độ chính xác trung gian**

Hai kiểm nghiệm viên, mỗi người phân tích 6 mẫu thử một cách độc lập vào hai ngày khác nhau. Kết quả được trình bày trong bảng 3.

**Bảng 3.** Độ lặp lại và độ chính xác trung gian

Giá trị	KNV 1	KNV 2	Cả 2 KNV
Trung bình	101,76%	100,88%	101,32%
RSD	1,04 %	0,60%	0,82%

Sử dụng F-Test để so sánh hai phương sai cho thấy:  $F_m = 1,32 < F_{it} = 5,05$ . Vậy không có sự khác biệt giữa hai phương sai của KNV1 và KNV2.

**Tính tuyến tính**

Nồng độ nicotinamid tuyến tính trong khoảng nồng độ từ 23,99 – 55,97 µg/ml với phương trình đường tuyến tính  $\hat{y} = 23,717x$ ; hệ số tương quan  $r^2 = 0,9998$ .

**Bảng 4.** Kết quả sự tương quan giữa diện tích pic và nồng độ nicotinamid

Nồng độ (%)	Nồng độ (µg/ml)	Diện tích pic (mAU*s)
60	23,99	580,50787
80	31,98	762,79810
100	39,98	958,85733
120	47,98	1142,48535
140	55,97	1338,88757

**Độ đúng**

Tiến hành sắc ký 9 mẫu placebo thêm chuẩn ở 3 nồng độ, kết quả cho thấy tỷ lệ hồi phục trong khoảng 98% - 102%.

**Bảng 5.** Kết quả của độ đúng

Mẫu	STT	Lượng chuẩn thêm vào (µg)	Diện tích pic placebo thêm chuẩn (mAU*s)	Lượng hoạt chất tìm lại (µg)	Tỷ lệ hồi phục (%)
70%	1	27,99	682,63055	28,46	101,70
	2	27,99	680,52582	28,37	101,39
	3	27,99	681,32013	28,40	101,51
Trung bình 101,53%					
RSD (%) 0,15					
100%	1	39,98	960,36139	40,04	100,16
	2	39,98	962,20789	40,12	100,35
	3	39,98	958,83844	39,98	99,99
Trung bình 100,17%					
RSD (%) 0,18					
130%	1	51,97	1263,74402	52,69	101,38
	2	51,97	1264,80322	52,74	101,47
	3	51,97	1262,75671	52,65	101,30
Trung bình 101,38%					
RSD (%) 0,08					

**Độ thô**

Kết quả thay đổi tốc độ dòng và nhiệt độ cột cho các pic đều đạt yêu cầu, như vậy quy trình đạt yêu cầu về độ thô.

**Bảng 6.** Các yếu tố ảnh hưởng đến sắc ký

Yếu tố	Giá trị	Tên mẫu	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU*s)	A <sub>s</sub>	N
Tốc độ dòng (ml/phút)	0,8	St	4,513	1187,42615	0,87	10467
		Sa	4,522	1236,01965	0,88	10495
	1	St	3,623	941,02350	0,82	8320
		Sa	3,624	986,52972	0,86	8691
	1,2	St	3,001	788,00488	0,91	7755
		Sa	3,017	822,56268	0,90	7861
Nhiệt độ (°C)	20	St	3,676	948,86719	0,90	8368
		Sa	3,713	985,51398	0,90	8273
	25	St	3,623	941,02350	0,82	8320
		Sa	3,624	986,52972	0,86	8691
	30	St	3,611	943,30682	0,87	9343
		Sa	3,567	988,26093	0,87	9685

**Ứng dụng**

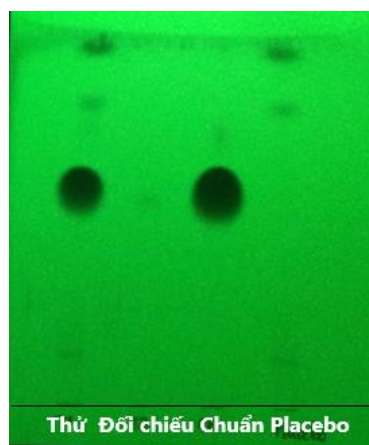
Quy trình định lượng nicotinamid xây dựng cho viên sủi vitamin PP được ứng dụng cho một số chế phẩm khác trên thị trường dạng viên nén cho kết quả định lượng nằm trong giới hạn cho phép.

**3.2 Xác định giới hạn tạp chất liên quan**

**Tính đặc hiệu**

Sắc ký đồ mẫu thử có 3 vết có Rs lần lượt là 3; 3,2 và 4,2 chứng tỏ các vết tách nhau hoàn toàn. Trong đó 1 vết có R<sub>f</sub> = 0,56 trùng với vết của mẫu chuẩn nicotinamid, 2 vết có R<sub>f</sub> = 0,8 và 0,9 trùng với 2 vết của mẫu placebo, và không xuất hiện bất kỳ vết phụ nào.

Vậy viên sủi vitamin PP đạt yêu cầu về giới hạn tạp chất liên quan.



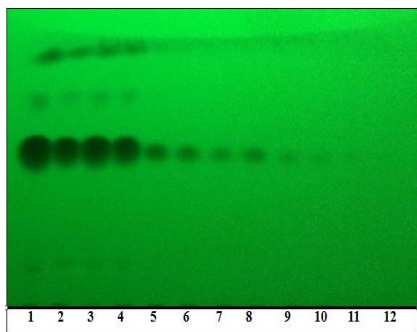
**Hình 3.** Xác định tạp chất liên quan trong viên sủi vitamin PP với pha động chloroform – ethanol – acid formic (10 : 8 : 2).

**Giới hạn phát hiện (LOD)**

Tiến hành pha loãng nồng độ mẫu thử bằng ethanol tuyệt đối, mẫu thử sau có nồng độ giảm một nửa so với nồng độ trước theo Bảng 7.

STT	1	2	3	4	5	6
Nồng độ (mg/ml)	100	50	25	12,5	6,25	3,125
STT	7	8	9	10	11	12
Nồng độ (mg/ml)	1,563	0,782	0,391	0,196	0,098	0,049

Ở mẫu thử 11 tương ứng với nồng độ 0,098 mg/ml, vết hoạt chất còn quan sát được rõ bằng mắt thường, vậy giới hạn phát hiện của chế phẩm viên sủi vitamin PP 250 mg/OPC là 0,098 mg/ml.



**Hình 4.** Sắc ký đồ xác định giới hạn phát hiện hoạt chất nicotinamid trong viên sủi vitamin PP 250 mg

#### Độ lặp lại

Tiến hành thẩm định độ lặp lại bằng cách chuẩn bị 6 mẫu thử ở mức nồng độ thấp nhất còn phát hiện được (0,098 mg/ml) lên bản mỏng cho kết quả như hình 5.



**Hình 5.** Thẩm định độ lặp lại giới hạn phát hiện

#### 4. KẾT LUẬN

Bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao tạo cặp ion pha đảo với đầu dò dây diod quang, đề tài đã xây dựng được quy trình định lượng nicotinamid trong viên sủi vitamin PP đạt các điều kiện sắc ký. Tìm được hệ pha động để xác định tạp chất liên quan bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng. Các quy trình đã được thẩm định đạt tất cả các chỉ tiêu theo quy định của ICH và Sổ tay đăng ký thuốc.

#### 5. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Abdul Rafiq Khan, K.M.K., Shahnaz Perveen, Naeem Butt. Determination of nicotinamide and 4-aminobenzoic acid in pharmaceutical preparation by LC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2002**, 29, 723 - 727.
- [2] Bộ Y tế, Dược điển Việt Nam, NXB Y học, **2018**, tập 2, 677 – 678.
- [3] D. Ivanovic, A.P., D. Radulovic, M. Medenica. Reversed-phase ion-pair HPLC determination of some water-soluble vitamins in pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **1999**, 18, 999 - 1004.
- [4] International Conference on Harmonization, Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology, < <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/validation-of-analytical-procedures-text-and-methodology.html> >
- [5] Quyết định của Cục quản lý dược, Bộ Y tế số 07/QĐ-QLD ngày 11/01/2013 về việc ban hành Sổ tay hướng dẫn đăng ký thuốc, phụ lục 8, 29-39.
- [6] Saji Thomas, A.B., Kalsang Tharpa, Ashutosh Agarwal. Quantification of potential impurities by a stability indicating UV-HPLC method in niacinamide active pharmaceutical ingredient. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2012**, 60, 86 - 90.
- [7] The British Pharmacopoeia, Nicotinamide Tablets, **2016**, 3, 907 – 908.
- [8] The United States Pharmacopoeia 38 – National Formulary 33, Niacinamide, **2015**, 4545 – 4546.