

# Định lượng vitamin B<sub>6</sub> và cystin trong chế phẩm bằng sắc ký lỏng tương tác thân nước

Vũ Ngân Bình, Đặng Thị Ngọc Lan  
Đỗ Khắc Huy, Phạm Thị Thanh Hà\*  
Trường Đại học Dược Hà Nội

## Summary

*L-cystine and vitamin B<sub>6</sub> are combined in a tablet used in treatment of disorders related to hair, nail and skin. Vitamin B<sub>6</sub> is often quantified by UV spectroscopy while cystine, due to its high polarity and weak UV absorption ability, is usually derivatized into fluorescent form and then determined by fluorescent spectroscopy or HPLC. This research has developed and validated a method that simultaneously quantifies cystine and vitamin B<sub>6</sub> in a tablet by hydrophilic liquid chromatography. Phenomenex Silica column (4.6 x 250 mm; 5 μm) was used as stationary phase. Mobile phase was consisted of acetonitrile and ammonium acetate 50 mM, pH 5.5 with ratio 65:35 (v/v). The flowrate was 1.5 mL/min. Detection wavelength was set at 250 nm for cystine and 286 nm for vitamin B<sub>6</sub>. This method was validated according to ICH guidelines in following aspects: Selectivity, linearity, accuracy, precision. The method was then successfully applied in the quantification of the two active ingredients in Cystine B6 Bailleul tablet.*

**Keywords:** Pyridoxine, cystine, pharmaceutical preparations, HILIC, simultaneous determination.

## Đặt vấn đề

L-cystin (CYS) thường được kết hợp với vitamin B<sub>6</sub> (B<sub>6</sub>) trong điều trị các bệnh lý liên quan đến tóc, móng và da. Vitamin B<sub>6</sub> (pyridoxin hydrochloride) là một nhân tố giúp cho L-cystin thâm nhập vào vùng tạo chất sừng. Khi vào cơ thể, pyridoxin biến đổi thành pyridoxal phosphat và pyridoxamin phosphat. Hai chất này hoạt động như coenzym trong chuyển hoá protein, glucid và lipid. Hiện nay, ở Việt Nam có một số chế phẩm chứa đồng thời 2 thành phần hoạt chất CYS và B<sub>6</sub> với dạng viên nén bao phim. B<sub>6</sub> trong chế phẩm thường được định lượng bằng phương pháp quang phổ **UV-VIS** [1]. CYS hấp thụ **UV** kém nên việc định lượng ngay cả trong chế phẩm, cũng cần sử dụng các phương pháp phức tạp hơn như tạo dẫn xuất huỳnh quang [2] hoặc dùng phản ứng quang hoá [3]. Cho tới nay, chưa có phương pháp nào định lượng đồng thời trực tiếp 2 thành phần này trong chế phẩm. CYS và B<sub>6</sub> là những hợp chất phân cực, ít lưu giữ trên sắc ký lỏng pha đảo nên việc định lượng

bằng **HPLC** có thể sử dụng sắc ký tạo cặp ion, sắc ký pha thuận hoặc và sắc ký lỏng tương tác thân nước (hydrophilic interaction liquid chromatography - **HILIC**) [4]. Do **HILIC** sử dụng pha động phân cực và pha tĩnh phân cực nên nó có khả năng lưu giữ tốt các hợp chất phân cực [5]. Chính vì vậy, **HILIC** thích hợp trong việc phân tích cystin và vitamin B<sub>6</sub>.

## Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

### Đối tượng phân tích

Viên nén bao phim Cystine-B<sub>6</sub> Bailleul (Laboratories GALÉNIQUES VERNIN, France); số lô sản xuất: VE2393; số đăng kí: VN-15897-12; hạn dùng: 01/06/2022. Hàm lượng L-cystin: 500 mg, pyridoxin hydroclorid: 50 mg.

### Thiết bị, dụng cụ, hóa chất

**Thiết bị, dụng cụ:** Hệ thống máy HPLC Agilent 1200 series và phần mềm Chemstation; Cột Phenomenex (Luna 5u Silica (2) 250 x 4,6 mm; 5μm, 100A; S/No: 465453-14; P/No: 00G-4274-E0); Máy siêu âm Ultrasonic LC 60H (Đức); Cân phân tích A&D, Model GR-200, Nhật Bản, d = 0,1 mg; Máy đo pH (Eutech, Singapore).

**Hóa chất:** Chuẩn đối chiếu cystin (Sigma, 98,0%, C8755), pyridoxin hydroclorid

Chịu trách nhiệm: Phạm Thị Thanh Hà  
Email: thanhha.pham@hup.edu.vn  
Ngày nhận: 01/6/2021  
Ngày phản biện: 16/6/2021  
Ngày duyệt bài: 26/7/2021

(Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung ương, 99,56%, hàm ẩm 0,05%, 0306027); Acetonitril (Hãng Merck, HPLC grade), acid clohydric, natri hydroxyd, amoni acetat, acid formic, triethylamin, kali dihydrophosphat, acid phosphoric, natri acetat, natri citrat, acid citric (PA grade).

**Phương pháp nghiên cứu**

**Khảo sát quy trình xử lý mẫu:** Khảo sát dung môi pha mẫu (NaOH hoặc HCl), thể tích dung môi, thời gian siêu âm, thời gian lắc xoay mẫu thử.

**Khảo sát điều kiện sắc ký:** Sử dụng pha tĩnh silica trần, không dẫn xuất hoá; Các pha động được khảo sát là hỗn hợp của 65 - 70% acetonitril và các dung dịch acid, muối (acid formic 10 mM; acid phosphoric 10 mM; acid citric 5 - 20 mM; acid formic 10 mM và TEA 5 mM; acid phosphoric 10 mM và TEA 5 - 15 mM; muối kali dihydrophosphat 20 - 40 mM, đệm phosphat pH 2,5; 3,5; 5,0; natri acetat 20 mM; Natri citrat 5 - 20 mM, pH 2,5 - 5; natri citrat 10 mM và TEA 10 mM; amoni acetat 15 - 40 mM). Bước sóng phát hiện khảo sát trong khoảng 210 - 400 nm.

**Thẩm định phương pháp:** Theo hướng dẫn

của ICH Q2 (R1) với các tiêu chí sau: Độ phù hợp hệ thống, độ chọn lọc, đường chuẩn và khoảng tuyến tính, độ chính xác, độ đúng của phương pháp.

**Áp dụng phương pháp:** Trên phân tích đồng thời cystin và vitamin B6 trong chế phẩm.

**Kết quả và bàn luận**

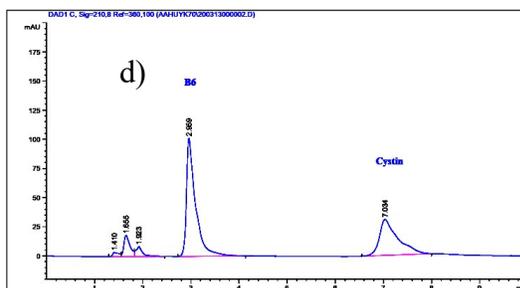
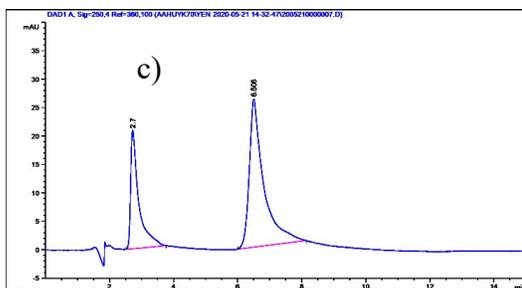
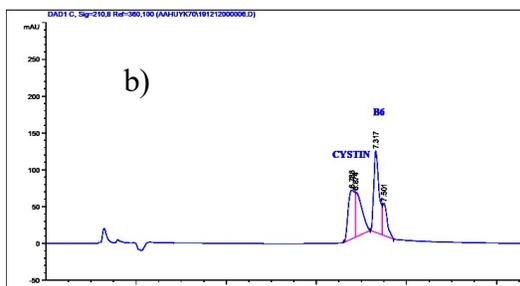
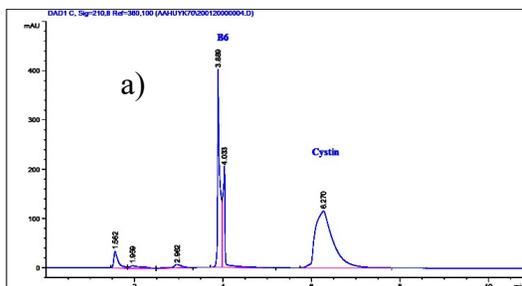
**Khảo sát quy trình xử lý mẫu thử**

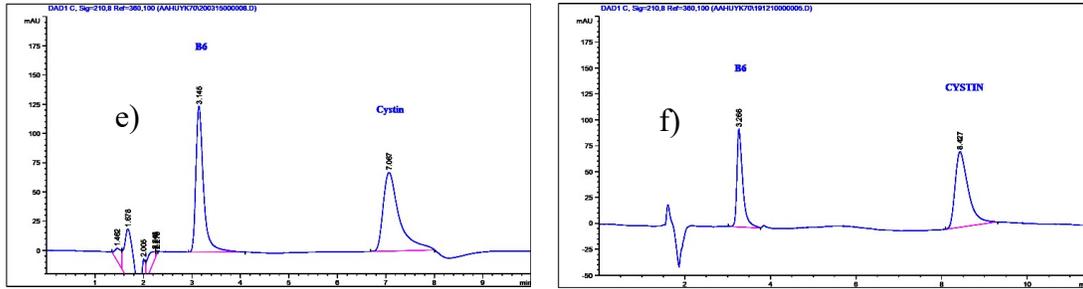
Sau khi khảo sát các thông số thể tích và dung môi pha mẫu, thời gian siêu âm và lắc xoay, chúng tôi đưa ra được quy trình xử lý mẫu như sau: Cạo lớp vỏ bao phim, nghiền mịn chế phẩm, cân chính xác lượng bột chế phẩm tương ứng với khoảng 40 mg CYS và 4 mg B<sub>6</sub> cho vào bình định mức 50 mL. Thêm dung dịch HCl 0,1 M. Siêu âm 5 phút. Sau đó lắc xoay 5 phút, định mức vừa đủ bằng dung dịch HCl 0,1 M. Pha loãng 2 lần bằng acetonitril rồi tiêm sắc ký.

**Khảo sát điều kiện sắc ký**

**Khảo sát thành phần pha động**

Dựa vào hình dáng pic của 2 chất phân tích (hình 1), lựa chọn pha động là amoni acetat để tiếp tục tiến hành khảo sát. Đây cũng là hệ đệm có khả năng tan tốt trong acetonitril, do đó cũng ít khả năng tủa lại với tỉ lệ acetonitril cao như trong **HILIC**.



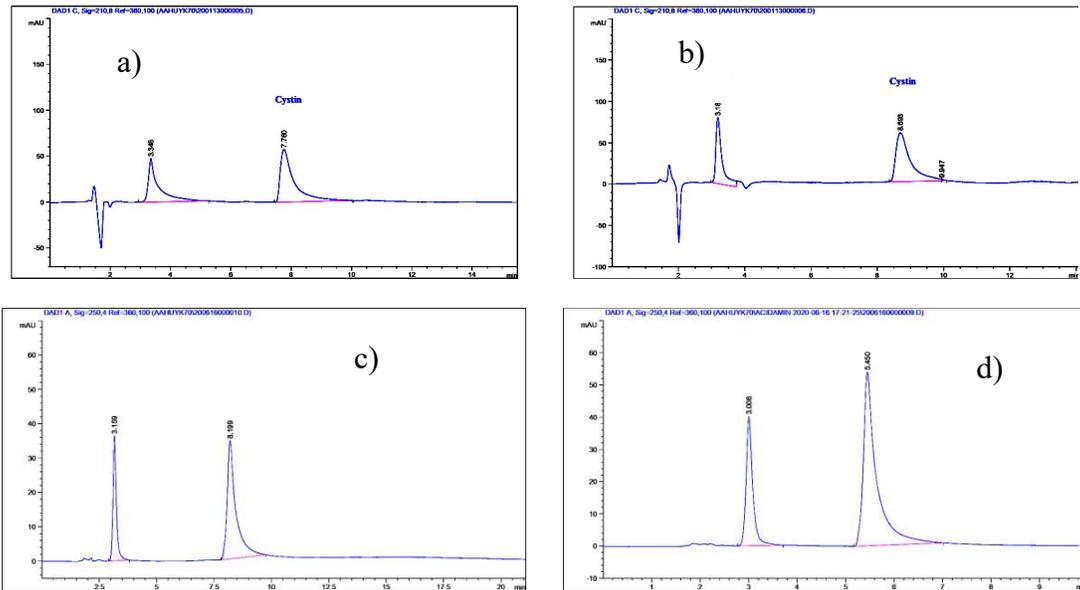


**Hình 1. Kết quả khảo sát thành phần pha động trên cột silica:**  
 a)  $H_3PO_4$  10 mM, b)  $HCOOH$  10 mM, c) Natri citrat 10 mM,  
 d)  $KH_2PO_4$  20 mM, e)  $CH_3COONa$  20 mM, f)  $CH_3COONH_4$  30 mM

**Khảo sát nồng độ muối amoni acetat và tỉ lệ pha động**

Khi tăng nồng độ dung dịch amoni acetat từ 15 lên 50 mM, pic B<sub>6</sub> và CYS đều cân xứng hơn

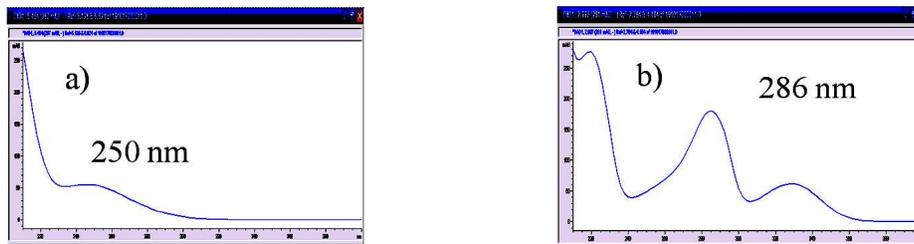
(hình 2a, 2b). Hỗn hợp pha động (acetonitril và amoni acetat 50 mM) ở tỉ lệ 65:35 (v/v) cũng cho pic cân xứng hơn nên được lựa chọn (hình 2c, 2d).



**Hình 2. Kết quả khảo sát nồng độ muối  $CH_3COONH_4$ :** a) 15 mM, b) 50 mM và tỉ lệ pha động acetonitril :  $CH_3COONH_4$  50 mM c) 70:30; d) 65:35

**Lựa chọn bước sóng phát hiện**

Theo phổ hấp thụ ở hình 3 là 250 nm với CYS và 286 nm với B<sub>6</sub>.



**Hình 3. Phổ hấp thụ UV của a) CYS và b) B<sub>6</sub>**

**Thẩm định phương pháp phân tích  
Độ phù hợp hệ thống**

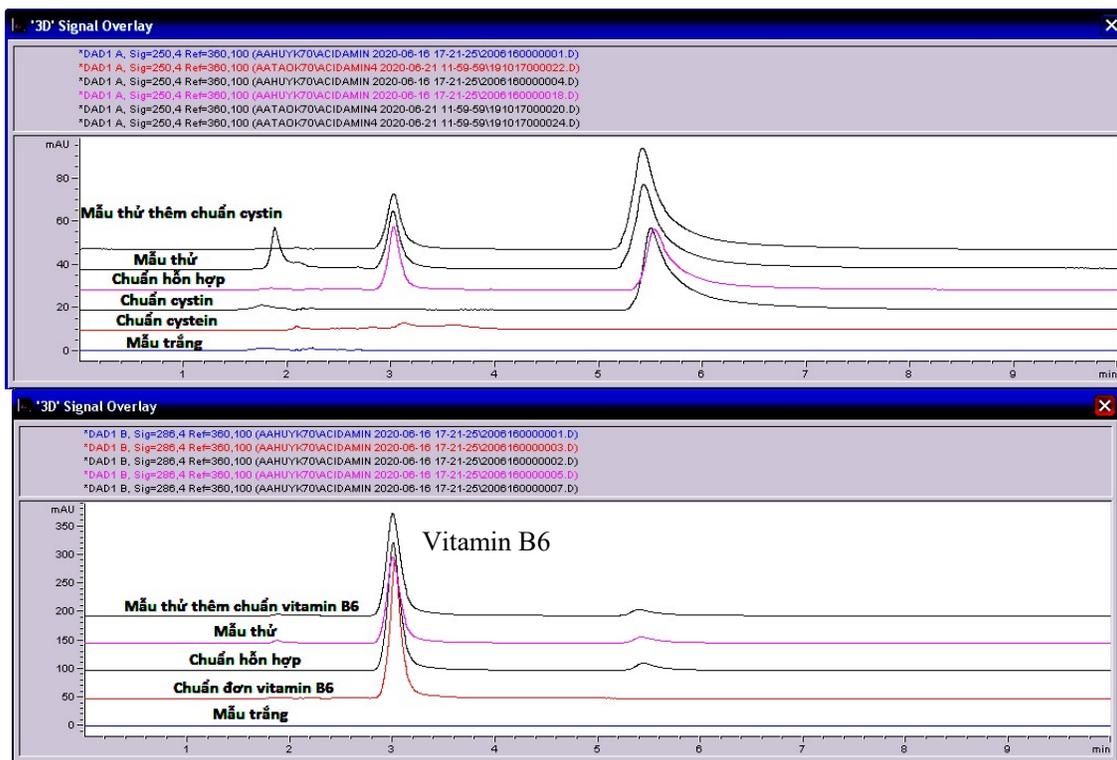
Chạy sắc ký 6 lần mẫu chuẩn hỗn hợp, thu được độ lệch chuẩn tương đối RSD(%) của thời gian lưu ( $t_R$ ) và diện tích pic ( $S_{pic}$ ) đều < 2%; cụ thể với  $t_R$  là 0,16 và 0,03%, của  $S_{pic}$  là 0,78 và 0,17%, tương ứng cho CYS và B<sub>6</sub>. Như vậy, phương pháp đã đạt tiêu chuẩn về độ ổn định hệ thống với hai chất CYS và B<sub>6</sub>.

**Độ chọn lọc**

Trên sắc ký đồ mẫu chuẩn xuất hiện pic CYS ở bước sóng 250 nm; B<sub>6</sub> ở bước sóng 286 nm.

Trên sắc ký đồ của mẫu trắng không có pic tại thời gian lưu của hai chất phân tích. Trên sắc ký đồ chuẩn hỗn hợp và mẫu thử thêm chuẩn có pic hai chất ứng với thời gian lưu với pic trong chuẩn đơn thành phần.

Trên sắc ký đồ mẫu thử có pic tương ứng với hai chất trong dung dịch chuẩn hỗn hợp. Hệ số chống phổ của CYS và B<sub>6</sub> so với pic trong sắc ký đồ chuẩn lần lượt là 999,995 và 999,944. Do vậy phương pháp đã khảo sát đạt tiêu chuẩn về độ chọn lọc



Hình 4. Kết quả độ chọn lọc ở bước sóng 250 nm (CYS) và 286 nm (B<sub>6</sub>)

**Đường chuẩn và khoảng tuyến tính**

Trong khoảng nồng độ khảo sát như ở bảng 1,

có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic của CYS và B<sub>6</sub>.

Bảng 1. Kết quả khảo sát đường chuẩn

CYS		B <sub>6</sub>	
Nồng độ (ppm)	Diện tích pic (mAU.s)	Nồng độ (ppm)	Diện tích pic (mAU.s)
203,1	263,5	24,5	953,2
304,7	677,7	36,7	1425,2
406,2	1001,9	49,0	2101,6
507,8	1258,8	61,2	2480,1
609,3	1581,8	73,4	2889,5
$y = 3,1685x - 330,34$		$y = 40,258x - 1,08$	
$r = 0,997$		$r = 0,995$	

### Độ chính xác của phương pháp

Độ chính xác trong ngày (RSD < 2%) và khác ngày (RSD < 3%) của phương pháp phân tích đều đạt yêu cầu và được thể hiện ở bảng 2.

**Bảng 2. Kết quả thẩm định độ chính xác**

Ngày		% HL CYS	% HL B <sub>6</sub>
1	TB <sub>1</sub> (n = 6)	101,8%	97,6%
	RSD <sub>1</sub> (%)	1,27%	1,54%
2	TB <sub>2</sub> (n = 6)	99,7%	96,4%
	RSD <sub>2</sub> (%)	1,68%	1,38%
<b>TB (n = 12)</b>		<b>100,7%</b>	<b>97,0%</b>
<b>RSD (%)</b>		<b>1,77%</b>	<b>1,56%</b>

### Độ đúng của phương pháp

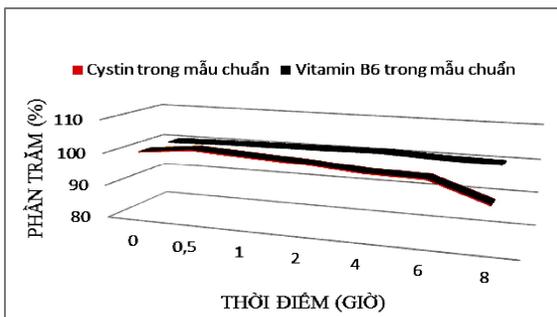
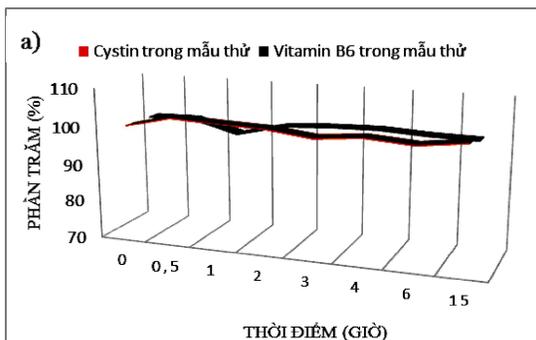
Chạy sắc ký các mẫu thử được thêm chuẩn với 3 mức nồng độ 80%, 100% và 125% so với nồng độ trong mẫu thử. Các giá trị % thu hồi đều nằm trong khoảng 98 - 102% ở mỗi mẫu khảo sát, các giá trị RSD (%) cũng nhỏ hơn 2% nên phương pháp đạt yêu cầu về độ đúng (bảng 3).

**Bảng 3. Kết quả thẩm định độ đúng**

Mức nồng độ thêm vào (% so với thử)	80%	100%	125%	
CYS	% thu hồi TB	100,0	101,2	98,9
	RSD (%)	0,91	0,98	0,32
B <sub>6</sub>	% thu hồi TB	101,2	100,8	100,6
	RSD (%)	1,38	0,87	1,61

### Đánh giá độ ổn định của mẫu

Chạy sắc ký mẫu thử ở các thời điểm 0 giờ, 0,5 giờ, 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ, 4 giờ, 6 giờ và 15 giờ; mẫu chuẩn ở thời điểm 0 giờ, 0,5 giờ, 1 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ và 8 giờ. Đối với vitamin B<sub>6</sub>, không có sự giảm đáng kể diện tích pic ở mẫu chuẩn sau 8 giờ, mẫu thử sau 15 giờ. Đối với cystin, từ 8 giờ bắt đầu có xu hướng giảm nồng độ trong mẫu chuẩn (giảm 7,4%). Tuy nhiên, với mẫu thử, nồng độ CYS không giảm sau 15 giờ, có thể trong thành phần viên nén đã được bổ sung chất ổn định để hàm lượng CYS không bị giảm như với dung dịch chuẩn. Do vậy, mẫu thử có thể được xử lý và phân tích trong ngày, còn dung dịch chuẩn cần được phân tích trong 6 tiếng để đảm bảo độ ổn định của CYS.



**Hình 5. Kết quả đánh giá độ ổn định của mẫu a) thử; b) chuẩn.**

### Ứng dụng phương pháp phân tích chế phẩm viên nén bao phim trên thị trường

Kết quả định lượng của CYS và vitamin B<sub>6</sub>

trong chế phẩm Cystine B<sub>6</sub> Bailleul được trình bày trong bảng 4.

**Bảng 4. Kết quả định lượng CYS và B<sub>6</sub> trong chế phẩm Cystine B<sub>6</sub> Bailleul**

STT	m <sub>thử</sub> (g)	Nồng độ mẫu thử (ppm)		Hàm lượng (%)	
		CYS	B <sub>6</sub>	CYS	B <sub>6</sub>
1	0,0514	414,7	39,2	103,3	97,7
2	0,0515	406,3	38,6	101,0	95,9
3	0,0515	402,8	39,9	100,1	99,2
<b>Trung bình</b>				<b>101,5</b>	<b>97,6</b>

Chế phẩm đạt yêu cầu về hàm lượng vitamin B<sub>6</sub> và cystin theo Dược điển Mỹ<sup>[6]</sup> và Dược điển Việt Nam V<sup>[1]</sup>.

### **Kết luận**

Nghiên cứu đã xây dựng và thẩm định phương pháp phân tích đồng thời cystin và vitamin B<sub>6</sub> trong chế phẩm bằng sắc kí lỏng tương tác thân nước với các điều kiện sắc kí: Pha tĩnh cột Phenomenex Silica (4,6 x 250 mm; 5 µm), Pha động: Hỗn hợp ACN : amoni acetat 50 mM có pH 5,5 = 65:35 (v/v); tốc độ dòng: 1,5 mL/phút; bước sóng phát hiện: 250 nm đối với cystin và 286 nm đối với vitamin B<sub>6</sub>; thể tích tiêm mẫu: 50 µL. Phương pháp này cũng đã được ứng dụng để định lượng chế phẩm viên nén bao phim Cystine B6 Bailleul đạt yêu cầu theo Dược điển Mỹ và Dược điển Việt Nam V.

### **Tài liệu tham khảo**

1. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam V*, tập I, NXB Y học, Hà Nội, tr. 812-814.
2. Ali A. Ensaf, B. Rezaei, S. Nouroozi (2009), "Flow injection spectrofluorimetric determination of Cystine and Cysteine", *Journal of Brazilian Chemistral Society*, 20 (2), pp. 288-293.
3. M. Ye. Blazheyevskiy National, N. Yu. Bondarenko, Yu. Yu. Serdiukova, V. D. Yaremenko (2020), "Determination of L -Cystine in tablets using the chemiluminescence method", *News of Pharmacy*, 1 (99), pp. 15-20.
4. Virgiliou C., Sampsonidis I., Gika H. G., et al. (2015), "Development and validation of a HILIC-MS/MS multitargeted method for metabolomics applications", *Electrophoresis*, 36 (18), pp. 2215-2225.
5. B. Buszewski, S. Noga (2012), "Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC): A powerful separation technique", *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 402 (1), pp. 231-247.
6. United States Pharmacopeial Convention (2017), *USP 40 - NF 35*, United States Pharmacopeial, USA, pp. 74.