

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)18-0082-05  
doi: 10.3969/j.issn.1006-4931.2024.18.019



# 硝酸甘油溶液及其制剂有关物质测定方法优化\*

杨梅, 李梓莹, 伍良涌, 李玮玲, 董顺玲

(广东省广州市药品检验所, 广东 广州 510160)

**摘要:**目的 优化硝酸甘油溶液及其制剂有关物质的测定方法。方法 更换现行标准 2020 年版《中国药典(二部)》高效液相色谱(HPLC)法中的流动相,采用梯度洗脱,并优化系统适用性溶液的制备方法。色谱柱为 Ecosil 120-5-C<sub>18</sub> AQ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为水-甲醇(梯度洗脱),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 215 nm,柱温为 30 °C,进样量为 20 μL。结果 硝酸甘油的定量限和检测限分别为 0.21 μg/mL 和 0.07 μg/mL。精密度、稳定性试验结果的 RSD 均小于 2.0%。优化 HPLC 条件后成功分离了硝酸甘油与已知杂质 2-硝酸甘油、1-硝酸甘油、1,3-二硝酸甘油、1,2-二硝酸甘油;明确了游离硝酸根扣除问题;参考 *British Pharmacopoeia* 2023 并结合样品测定情况,拟订除硝酸根外,4 个已知杂质均不得过 0.5%,其余单个最大杂质溶液不得过 0.1%、注射液和片剂不得过 0.5%,杂质总量溶液和注射液不得过 1.5%、片剂不得过 2.0%。结论 建立的方法准确、快速、专属性强,适用于硝酸甘油溶液及其制剂的有关物质检查,为加强本品的质量控制和进一步的质量标准修订提供参考。

**关键词:**硝酸甘油溶液;硝酸甘油注射液;硝酸甘油片;有关物质;高效液相色谱法;质量标准

## Optimization of Determination Method for Related Substances in Nitroglycerin Solution and Its Preparations

YANG Mei, LI Ziyang, WU Liangyong, LI Weiling, DONG Shunling

(Guangzhou Institute for Drug Control, Guangzhou, Guangdong, China 510160)

**Abstract: Objective** To optimize the determination method of related substances in nitroglycerin solution and its preparations. **Methods** The mobile phase in the high-performance liquid chromatography (HPLC) method of the current standard *Chinese Pharmacopoeia* (2020 Edition, Volume II) was replaced, the gradient elution method was adopted, and the preparation method of the system suitability solution was optimized. The chromatographic column was the Ecosil 120-5-C<sub>18</sub> AQ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was water-methanol (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 215 nm, the column temperature was 30 °C, and the injection volume was 20 μL. **Results** The limit of quantification and limit of detection of nitroglycerin were 0.21 μg/mL and 0.07 μg/mL respectively. The RSDs of precision and stability tests were both lower than 2.0%. After optimization of the HPLC conditions, the nitroglycerin was successfully separated from the known impurities such as 2-glycerol mononitrate, 1-glycerol mononitrate, 1,3-glycerol dinitrate, 1,2-glycerol dinitrate; the deduction of free nitrate ions was clarified; based on the *British Pharmacopoeia* 2023 and the content determination of related substances in samples, it was proposed that all four known impurities should be not over 0.5% except for the nitrate ion, the other single maximum impurity should be not over 0.1% in the solution and 0.5% in the injection and tablets, the total amount of impurities should be not over 1.5% in the solution and injection and 2.0% in the tablets. **Conclusion** The established method is accurate, rapid, and specific, which is suitable for the inspection of related substances in nitroglycerin solution and its preparations. This study provides a reference for strengthening the quality control and further revision of the quality standards of this product.

**Key words:** nitroglycerin solution; nitroglycerin injection; nitroglycerin tablets; related substances; HPLC; quality standard

\* 基金项目: 国家药典委员会国家药品标准提高课题[2020H029, 2020H030]。

第一作者: 杨梅, 女, 硕士研究生, 副主任药师, 研究方向为药品质量标准, (电子信箱)273779284@qq.com。

青岛医药卫生, 1998(9):26-27.

[8] 鲁 ZBZ0082010, 山东省食品药品监督管理局医疗机构制剂标准[S].

[9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.

[10] 刘莉, 李婷婷, 王欣, 等. 安神补心片的薄层色谱鉴别[J]. 中国药业, 2019, 28(19):43-45.

[11] 苟立平, 邓星, 罗莉娅, 等. 乌苓苁蓉合剂的薄层色谱鉴别研究[J]. 中药与临床, 2017, 8(6):43-45.

[12] 周峰, 江勋, 彭婷婷. 安神补脑胶囊中制何首乌和淫羊藿的薄层色谱鉴别[J]. 中国药业, 2021, 30(15):59-61.

[13] 黄懿, 欧阳波, 肖作奇, 等. 不同产地炒王不留行 HPLC 指纹图谱及含量测定研究[J]. 中南药学, 2017, 15(7):879-882.

[14] 潘涛, 欧阳波, 蔡需, 等. HPLC 法同时测定胎儿颗粒中 5 种成分含量[J]. 中国医药导报, 2019, 16(15):100-103.

(收稿日期: 2023-09-09; 修回日期: 2024-03-23)

硝酸甘油是硝酸酯类代表药物,可有效治疗心绞痛、急性心肌梗死、慢性心力衰竭<sup>[1-4]</sup>,临床常用剂型有片剂和注射液。其化学性质不稳定,易受温度、密封条件、pH等因素的影响而分解<sup>[5]</sup>,主要降解产物为二硝酸甘油酯、一硝酸甘油酯及硝酸根离子。硝酸甘油溶液及其制剂现行标准为2020年版《中国药典(二部)》<sup>[6]</sup>,其中收录了硝酸甘油溶液及其气雾剂、片剂、注射液; *British Pharmacopoeia* 2023(以下简称BP)<sup>[7-8]</sup>收录了硝酸甘油溶液和硝酸甘油片; *The Japanese Pharmacopoeia Eighteen Edition* (I)<sup>[9]</sup>仅收录了硝酸甘油片; *USP 43 - NF38*<sup>[10]</sup>收录了硝酸甘油溶液及其注射液、片剂。现行标准中,硝酸甘油及其制剂有关物质检查均采用高效液相色谱(HPLC)法,以乙腈-水(50:50, V/V)为流动相。由于降解产生的硝酸根离子在该色谱条件下基本无保留,多与辅料峰重叠,企业多将其归为辅料峰予以扣除,而企业提供的辅料同法制备的溶液色谱峰峰面积远小于含硝酸根色谱峰,故杂质扣除不合理;且该色谱条件仅能部分分离1,2-二硝酸甘油酯、1,3-二硝酸甘油酯(分离度1.0),无法有效分离已知杂质1,2-二硝酸甘油酯、1,3-二硝酸甘油酯、1-硝酸甘油酯、2-硝酸甘油酯。本研究中通过更换流动相,采用梯度洗脱方式和优化系统适用性溶液制备方法,硝酸甘油和4个已知杂质实现有效分离,并明确了硝酸根的扣除问题,增加了游离硝酸根的检查方法;参考BP<sup>[7-8]</sup>,结合样品测定结果,收紧了杂质限度,为硝酸甘油及其制剂的质量控制和质量标准修订提供参考。现报道如下。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

1260型高效液相色谱仪(美国Agilent公司); XPE56型微量分析天平(瑞士Mettler Toledo公司); Milli-Q® Reference A+型超纯水系统(美国Millipore公司); P300H型超声波清洗器(德国Elma Hans Schmidbauer GmbH & Co. KG公司)。

### 1.2 试剂

硝酸甘油溶液7批、硝酸甘油注射液10批、硝酸甘油片11批(企业A-J,见表1);硝酸甘油对照品(中国食品药品检定研究院,批号为100236-201702,含量0.963%);硝酸根离子对照品(中国计量科学研究院,批号为20052,质量浓度1 000 μg/mL);1-硝酸甘油、2-硝酸甘油、1,2-二硝酸甘油、1,3-二硝酸甘油对照品(美国AccuStandard公司,批号分别为220091122、219111017-01、220091132、221011273,含量分别为99.9%,99.6%,98.6%,98.9%);乙腈、甲醇为色谱纯,水为超纯水。

表1 样品信息

Tab. 1 Information of samples

样品	企业	批号	编号	样品	企业	批号	编号
硝酸甘油溶液	A	200415	A <sub>1</sub>	硝酸甘油片	F	20200329	F <sub>1</sub>
		190402	A <sub>2</sub>			20200330	F <sub>2</sub>
		190920	A <sub>3</sub>			20200331	F <sub>3</sub>
	B	20200301	B <sub>1</sub>		G	20210704	G <sub>1</sub>
20200302		B <sub>2</sub>	20210705			G <sub>2</sub>	
20200303		B <sub>3</sub>	20210706			G <sub>3</sub>	
20170413		B <sub>4</sub>	H		19051301	H <sub>1</sub>	
硝酸甘油注射液	C	191004			C <sub>1</sub>	19050801	H <sub>2</sub>
		191005	C <sub>2</sub>		I	180901	I <sub>1</sub>
		191101	C <sub>3</sub>			190201	I <sub>2</sub>
D	190407	D <sub>1</sub>	200301	I <sub>3</sub>			
	190614	D <sub>2</sub>	J	200203	J <sub>1</sub>		
	190907	D <sub>3</sub>		200223	J <sub>2</sub>		
E	2001162	E <sub>1</sub>		200224	J <sub>3</sub>		

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: Ecosil 120-5-C<sub>18</sub> AQ柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 水(A)-甲醇(B), 梯度洗脱(0~5 min时12%B → 25%B, 5~15 min时25%B → 45%B, 15~40 min时45%B → 70%B, 40~50 min时70%B, 50~60 min时70%B → 12%B); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 215 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 20 μL。

### 2.2 溶液制备

对照品溶液: 取硝酸甘油对照品适量, 加甲醇-水(1:1, V/V)稀释, 制成每1 mL含硝酸甘油5 μg的溶液, 即得。

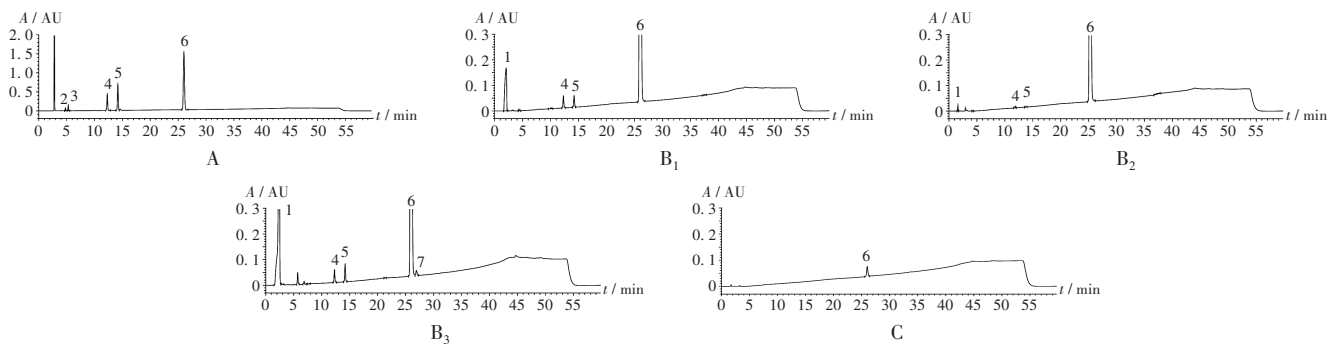
供试品溶液: 精密量取硝酸甘油溶液样品1 mL, 置100 mL容量瓶中, 加甲醇50 mL, 摇匀, 加水定容, 摇匀, 即得供试品溶液I。精密量取硝酸甘油注射液样品适量, 加甲醇-水(1:1, V/V)稀释, 制成每1 mL中含硝酸甘油1 mg的供试品溶液II。取硝酸甘油片样品20片, 置10 mL容量瓶中, 加甲醇-水(1:1, V/V)适量, 超声(功率1 580 W, 频率80 kHz)3 min, 振摇30 min, 使溶解, 加甲醇-水(1:1, V/V)定容, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液III。

对照溶液: 精密量取供试品溶液III 1 mL, 置200 mL容量瓶中, 加甲醇-水(1:1, V/V)定容, 摇匀, 即得。

系统适用性溶液: 取硝酸甘油溶液对照品适量(约相当于硝酸甘油10 mg), 置10 mL容量瓶, 加0.5 mol/L盐酸溶液5 mL, 100 °C水浴加热30 min, 放冷, 用0.5 mol/L氢氧化钠溶液调pH至7.0, 加甲醇-水(1:1, V/V)定容, 摇匀, 即得。

### 2.3 方法学考察

系统适用性试验: 分别取系统适用性溶液、对照溶



1. 硝酸根 2.2 - 硝酸甘油 3.1 - 硝酸甘油 4.1,3 - 二硝酸甘油 5.1,2 - 二硝酸甘油 6. 硝酸甘油 7. 未知杂质  
A. 系统适用性溶液 B<sub>1</sub> - B<sub>3</sub>. 供试品溶液 I - III (批号分别为 20200302, 20200331, 180901) C. 对照溶液

图1 系统适用性试验色谱图

1. Nitrate ion 2.2 - Glycerol mononitrate 3.1 - Glycerol mononitrate 4.1,3 - Glycerol dinitrate 5.1,2 - Glycerol dinitrate 6. Nitroglycerin  
7. Unknown impurities

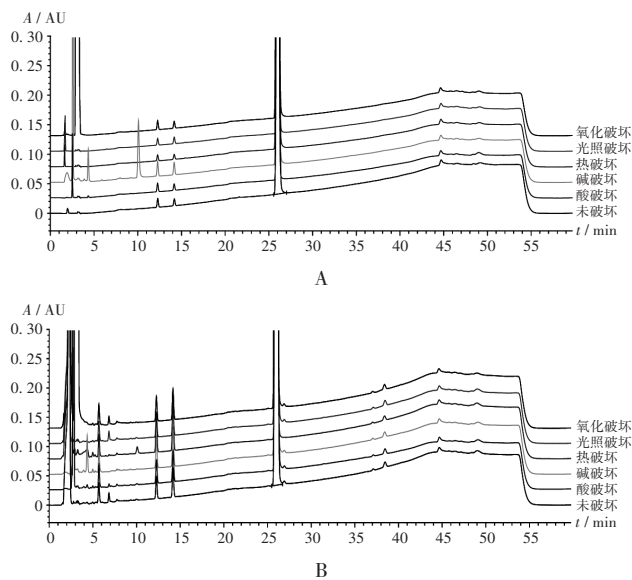
A. System suitability solution B<sub>1</sub> - B<sub>3</sub>. Test solution I - III (batch numbers: 20200302, 20200331, 180901) C. Reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms of system suitability test

液、供试品溶液Ⅲ适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果4个已知杂质峰理论板数均不低于3 000,分离度均大于1.5。详见图1。

破坏性试验:取硝酸甘油溶液样品(批号为200415)1 mL,置100 mL容量瓶中,平行6份,分别进行下列试验。1)未破坏。按2.2项下方法制备供试品溶液Ⅲ。2)酸破坏。加0.1 mol/L盐酸溶液1 mL,摇匀,室温放置1 h后,加0.1 mol/L氢氧化钠溶液1 mL中和。3)碱破坏。加0.1 mol/L氢氧化钠溶液1 mL,摇匀,室温放置3 min,加0.1 mol/L盐酸溶液1 mL中和。4)氧化破坏。加30%过氧化氢溶液1 mL,摇匀,室温放置1 h。5)热破坏。100℃水浴加热1 h。6)光照破坏。按2.2项下方法制备供试品溶液Ⅲ,取适量,置具塞石英比色皿中,密塞,置254 nm紫外灯下光照4 h[其中,2) - 5)中溶液均用甲醇-水(1:1, V/V)定容,摇匀]。取硝酸甘油片样品(批号为180901)适量,按2.2项下供试品溶液Ⅲ制备方法制备6份,同法进行破坏性试验。取上述溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果2种供试品溶液在酸性条件下较稳定(杂质个数和杂质含量均未明显增加);在氧化、光照、高温条件下均降解,主要产生3种杂质(1,2-二硝酸甘油、1,3-二硝酸甘油、硝酸根);碱性条件下极不稳定,主成分硝酸甘油降解迅速,杂质和主成分峰可有效分离,对测定结果无干扰。详见图2。

辅料干扰试验:1)硝酸甘油注射液。各企业提供的工艺中,其辅料均为无水乙醇,与硝酸甘油溶液的溶剂一致。照处方量配制辅料溶液,按2.2项下方法制备供试品溶液Ⅲ,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图(见图3),结果无水乙醇对测定无有干扰。2)硝酸甘油片。用4个生产企业(A, B, C, D)的处方配制各自的辅



A. 硝酸甘油溶液 B. 硝酸甘油片

图2 破坏性试验高效液相色谱图

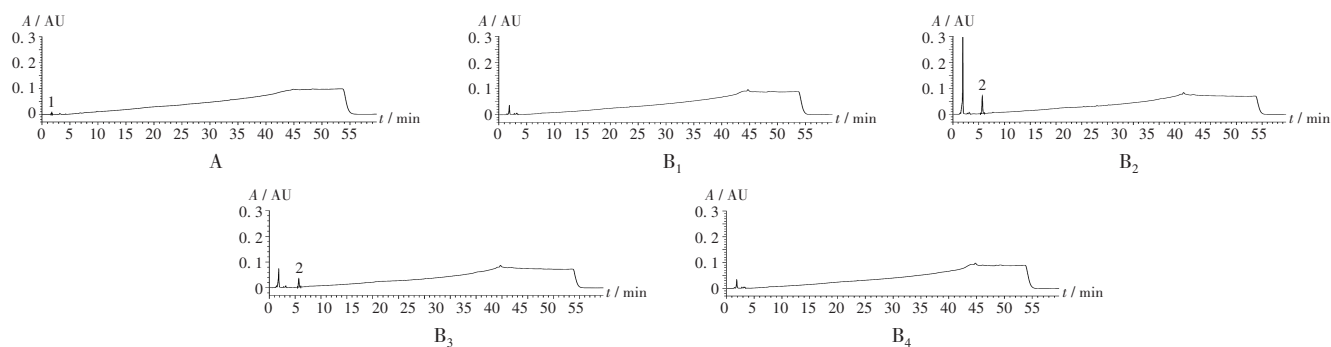
A. Nitroglycerin solution B. Nitroglycerin tablets

Fig. 2 HPLC chromatograms of destructive test

料溶液,按2.2项下方法制备供试品溶液Ⅲ,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图(见图3)。结果B、C企业样品在5.7 min处均有1个较大峰,经确证为微晶纤维素峰,辅料峰可与其他杂质有效分离,不干扰测定。

定量限与检测限考察:精密吸取对照品溶液适量,加甲醇-水(1:1, V/V)逐级稀释,按2.1项下色谱条件进样测定,以信噪比分别为3:1、10:1时硝酸甘油的质量浓度为检测限和定量限。结果分别为0.07 μg/mL和0.21 μg/mL。

精密度试验:精密吸取2.2项下对照品溶液适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录色谱图。结果硝酸甘油峰面积的RSD为0.20%(n=6),表明仪



1. 乙醇 2. 微晶纤维素  
A. 硝酸甘油注射液 B<sub>1</sub> - B<sub>4</sub>. 硝酸甘油片(分别来自企业G - J)

图3 辅料高效液相色谱图

1. Ethanol 2. Microcrystalline cellulose  
A. Nitroglycerin injection B<sub>1</sub> - B<sub>4</sub>. Nitroglycerin tablets (from enterprises G - J)

Fig. 3 HPLC chromatograms of excipients

器精密度良好。

稳定性试验:取3种供试品溶液各适量,室温放置0,3,6,9,12,18,24 h时按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果杂质个数和杂质含量RSD均小于2.0%(n=7),表明供试品溶液室温放置24 h内基本稳定。

耐用性试验:取系统适用性溶液适量,分别采用3个不同品牌的色谱柱(Ecosil 120-5-C<sub>18</sub> AQ柱、Waters Symmetry C<sub>18</sub>柱、Shim-pack GIST C<sub>18</sub>柱),考察杂质的分离度情况,结果4种已知杂质间的分离度均大于1.5。

#### 2.4 样品中有关物质含量测定

取10家企业的样品各适量,按2.2项下方法制备供试品溶液Ⅲ,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图,按不加校正因子的主成分自身对照法计算有关物质含量。结果见表2。

### 3 讨论

#### 3.1 流动相选择

BP收载硝酸甘油溶液未收载硝酸甘油注射液,溶液有关物质检查采用乙腈-水为流动相(梯度洗脱),可有效分离4个已知杂质;但按BP色谱条件测定,硝酸甘油片供试品溶液色谱图中,硝酸甘油主成分峰后的1个未知杂质峰无法有效分离,经调节梯度后仍无法有效分离。故改用甲醇-水(1:1,V/V),梯度洗脱,可有效分离硝酸甘油片中未知杂质。

#### 3.2 检测波长选择

硝酸甘油及4个已知杂质均为末端吸收,为保证基线的平稳和检测灵敏度,检测波长沿用2020年版《中国药典(二部)》中的215 nm。

#### 3.3 系统适用性溶液制备和已知杂质确证

本研究中的改进方法采用硝酸甘油对照品加酸在水浴中破坏产生4个已知杂质作为系统适用性溶液。该

表2 样品中有关物质测定结果(%)

Tab. 2 Results of content determination of related substances in samples (%)

编号	2-硝酸甘油	1-硝酸甘油	1,3-二硝酸甘油	1,2-硝酸甘油	其余单个最大杂质	杂质总量
A <sub>1</sub>	-	-	0.14	0.11	0.04	0.30
A <sub>2</sub>	-	-	0.10	0.08	0.04	0.24
A <sub>3</sub>	-	-	0.12	0.10	0.04	0.27
B <sub>1</sub>	-	-	0.33	0.33	0.13	0.93
B <sub>2</sub>	-	-	0.32	0.32	0.03	0.77
B <sub>3</sub>	-	-	0.36	0.37	0.04	0.86
B <sub>4</sub>	-	-	0.06	0.03	0.04	0.14
C <sub>1</sub>	-	-	0.10	0.11	0.16	0.60
C <sub>2</sub>	-	-	0.12	0.12	0.16	0.47
C <sub>3</sub>	-	-	0.12	0.11	0.13	0.41
D <sub>1</sub>	-	-	0.16	0.18	0.12	0.59
D <sub>2</sub>	-	-	0.06	0.05	0.15	0.33
D <sub>3</sub>	-	-	0.07	0.05	0.14	0.32
E <sub>1</sub>	-	-	0.13	0.08	0.03	0.30
F <sub>1</sub>	-	-	0.17	0.16	0.02	0.35
F <sub>2</sub>	-	-	0.07	0.03	0.02	0.12
F <sub>3</sub>	-	-	0.07	0.03	0.02	0.14
G <sub>1</sub>	-	-	0.05	0.04	0.06	0.22
G <sub>2</sub>	-	-	0.05	0.04	0.07	0.26
G <sub>3</sub>	-	-	0.05	0.04	0.06	0.24
H <sub>1</sub>	0.02	0.02	1.10	0.80	0.15	2.36
H <sub>2</sub>	-	-	0.80	0.58	0.15	1.84
I <sub>1</sub>	-	-	0.65	0.50	0.28	1.50
I <sub>2</sub>	0.02	0.02	0.48	0.36	0.13	1.23
I <sub>3</sub>	-	-	0.39	0.31	0.10	0.91
J <sub>1</sub>	-	-	0.17	0.21	0.20	0.89
J <sub>2</sub>	0.04	0.02	0.15	0.20	0.14	0.70
J <sub>3</sub>	-	-	0.15	0.20	0.15	0.69

注: - 为低于定量限。

Note: - indicates that the content is below the limit of quantification.