

## 《中国药典》2020 年版硝酸甘油片质量标准增修订建议\*

李梓莹, 杨梅, 李玮玲, 伍良涌, 董顺玲

(广州市药品检验所, 广州 510160)

**摘要 目的:**针对《中国药典》2020 年版二部硝酸甘油片质量标准中色谱条件不能有效分离 4 个已知杂质及游离硝酸根与辅料未能分离的问题,对该质量标准提出增修订建议。**方法:**采用高效液相色谱法,通过梯度洗脱的方法检查有关物质,同时通过另一色谱系统检查游离硝酸根的量。**结果:**按改进方法进行有关物质及游离硝酸根检查,11 批硝酸甘油片的 1-硝酸甘油及 2-硝酸甘油均小于 0.1%,1,2-二硝酸甘油及 1,3-二硝酸甘油均小于 0.5%,杂质总量均不过 2.4%,游离硝酸根均不过 6.3%。**结论:**本改进方法操作简单,实验结果准确可靠,为《中国药典》2020 年版二部中硝酸甘油片质量标准增修订提供了参考。

**关键词:**硝酸甘油;高效液相色谱法;游离硝酸根;有关物质;质量标准增修订

中图分类号:R 921.2 文献标识码:A 文章编号:1009-3656(2024)01-0018-07

doi:10.19778/j.chp.2024.01.003

## Updates and amendments of the quality standard of nitroglycerin tablets in the *Chinese Pharmacopoeia* 2020

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

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

**Abstract Objective:** To propose updates and amendments for the nitroglycerin tablets quality in the *Chinese pharmacopoeia* 2020 due to the failure of effective separation of 4 known impurities and nonseparation of free nitrate ion and excipients. **Methods:** Related substances were analyzed using gradient elution by HPLC, and free nitrate ion was determined on SAX column by different HPLC method. **Results:** Using the improved method to test the related substances and free nitrate ion of nitroglycerin tablets, the content of the maximum individual impurity were not more than 0.5%, the total content was not more than 2.4% and the content of free nitrate ion was not more than 6.3%. **Conclusion:** The improved method is accurate and feasible. It provided a reference for the updates and amendments of the quality standard of nitroglycerin tablets in the *Chinese Pharmacopoeia* 2020.

**Key words:** nitroglycerin; HPLC; free nitrate ion; related substance; updates and amendments of quality standard

硝酸甘油为硝酸酯类代表药物,主要作用为释放一氧化氮,舒张血管平滑肌,达到扩张血管的作用<sup>[1,3]</sup>,是心血管疾病应用于心绞痛的治疗<sup>[1]</sup>,为缓解心绞痛的首选药物<sup>[2,3]</sup>。在中性和弱酸性条件下相对稳定,在碱性条件下迅速降解<sup>[4]</sup>,主要降解产物有二硝酸甘油酯、一硝酸甘油酯及硝酸根离

子<sup>[5]</sup>。过量的游离硝酸根在体内可还原为亚硝酸盐与人体血液发生作用,形成高铁血红蛋白,使人缺氧中毒<sup>[6-7]</sup>。硝酸甘油片在各国药典均有收载,日本药局方 JP18<sup>[8]</sup>还对其进行游离硝酸根检查。本文经实验提出对《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)2020 年版硝酸甘油片质量标准增修订建议,

\* 基金项目:国家药典委员会标准修订研究课题(2020H028);广州市市场监督管理局科技项目(2022jk34)

第一作者简介:李梓莹,主管药师;研究方向:药品质量标准研究。Tel:13570938663;E-mail:754040754@qq.com

并以此对 11 批硝酸甘油片的有关物质及游离硝酸根进行检查。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 药品与试剂

硝酸甘油溶液对照品(中国食品药品检定研究院,批号 100236-202203,含量:1.019% (w/w)); $\text{NO}_3^-$ 标准溶液(中国计量科学院,批号:20052,浓度:1 000  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ); $\text{NO}_2^-$ 标准溶液(中国计量科学院,批号:20190515,浓度:1 000  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ );硝酸钾对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100519-200301,含量:100.0%);硝酸甘油片(信息见表 2);磷酸二氢钾(分析纯,广州化学试剂厂);磷酸(分析纯,广州化学试剂厂);乙腈(色谱纯,Merck);甲醇(色谱纯,Merck);水为超纯水。

### 1.2 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪;XPE56 微量分析天平,梅特勒托利多仪器有限公司(精度:0.001 mg)。

## 2 方法与结果

### 2.1 有关物质检查

#### 2.1.1 溶液制备

溶剂:甲醇-水(50:50)。

**2.1.1.1 供试品溶液** 取本品 20 片(不需研细),置 10 mL 量瓶中,加溶剂适量,超声约 3 min,振摇约 30 min,使硝酸甘油溶解,用溶剂稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液。

**2.1.1.2 对照溶液** 精密量取供试品溶液 1 mL,置 200 mL 量瓶中,用溶剂稀释至刻度,摇匀。

**2.1.1.3 灵敏度溶液** 精密量取对照溶液 1 mL,置 10 mL 量瓶中,用溶剂稀释至刻度,摇匀。

**2.1.1.4 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 量瓶中,加 0.5 mol·L<sup>-1</sup>的盐酸溶液 5 mL,置水浴中加热 30 min,放冷,用 0.5 mol·L<sup>-1</sup>氢氧化钠溶液调节溶液 pH 值至中性,用溶剂稀释至刻度,摇匀。

**2.1.1.5 空白辅料** 按处方比例(除硝酸甘油外)称取辅料,混匀,按供试品溶液同法处理。

#### 2.1.2 色谱条件

用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(4.6 mm × 250 mm,5  $\mu\text{m}$  或效能相当的色谱柱),以水为流动相 A,以甲醇为流动相 B;流速为每 min 1.0 mL;检测波长为 215 nm;按表 1 进行梯度洗脱,

进样体积 20  $\mu\text{L}$ 。

表 1 梯度洗脱表

Tab. 1 Gradient elution table

| 时间<br>(time)/min | 流动相<br>(mobile phase) A/% | 流动相<br>(mobile phase) B/% |
|------------------|---------------------------|---------------------------|
| 0                | 88                        | 12                        |
| 5                | 75                        | 25                        |
| 15               | 55                        | 45                        |
| 40               | 30                        | 70                        |
| 50               | 30                        | 70                        |
| 51               | 88                        | 12                        |
| 60               | 88                        | 12                        |

### 2.1.3 系统适用性要求

2-硝酸甘油、1-硝酸甘油、1,3-二硝酸甘油、1,2-二硝酸甘油、硝酸甘油依次出峰(见图 1),硝酸甘油峰的保留时间约为 22 ~ 35 min,2-硝酸甘油峰与 1-硝酸甘油峰(相对保留时间约为 0.15 ~ 0.21)之间的分离度和 1,3-二硝酸甘油峰与 1,2-二硝酸甘油峰(相对保留时间约为 0.43 ~ 0.54)之间的分离度均应符合要求。灵敏度溶液色谱图中,硝酸甘油峰的信噪比不小于 10。

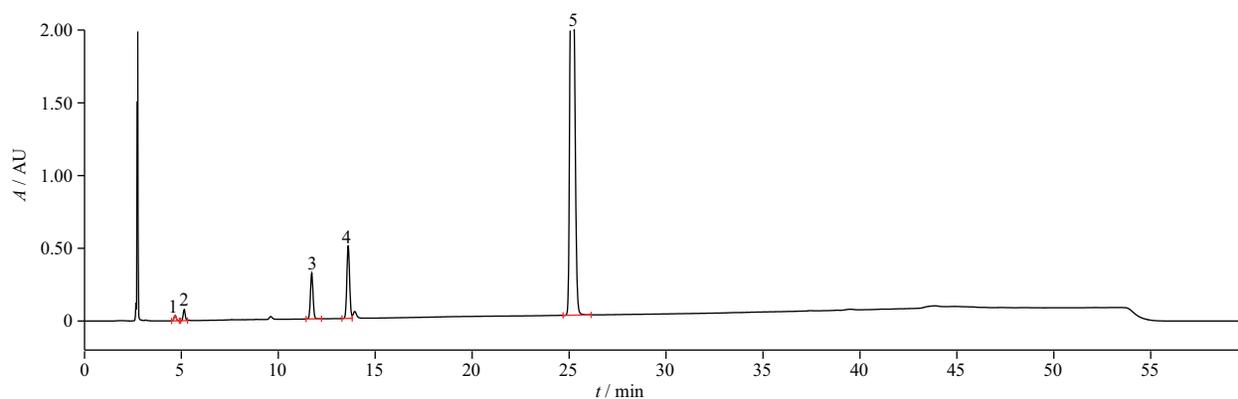
### 2.1.4 辅料干扰实验

按 4 个企业处方配制各自辅料溶液,分别进样,色谱图见图 2 ~ 3,A 厂家(新工艺)及 D 厂家辅料不干扰测定,A 厂家(旧工艺)、C 厂家及 B 厂家在 5.7 min 处均有一个较大峰,经确证为微晶纤维素(辅料)峰,可与其他杂质有效分离,不干扰测定。

### 2.1.5 方法学试验

**2.1.5.1 耐用性试验** 取系统适用性溶液分别选择三条不同品牌的色谱柱(Ecosil 120-5-C<sub>18</sub> AQ、Waters Symmetry C<sub>18</sub> 和岛津 Shim-pack GIST C<sub>18</sub>)进样,考察各杂质的分离度情况,结果均能满足测定要求。

**2.1.5.2 专属性试验** (采用 A 厂家,批号 20200310 旧工艺样品)对未破坏、酸破坏、碱破坏、氧化破坏、加热破坏和光照破坏样品溶液进样测定,色谱图见图 4。实验表明,样品溶液在酸性、光照条件下较稳定(杂质个数和杂质量未明显增加);在氧化、高温条件下均降解,主要产生杂质(1,2-二硝酸甘油和 1,3-二硝酸甘油);碱性条件下极不稳定,主成分硝酸甘油在碱性条件下降解,杂质和主成分峰可以有效分离,不干扰测定,本方法的专属性良好。



1. 2-硝酸甘油(2-nitroglycerin) 2. 1-硝酸甘油(1-nitroglycerin) 3. 1,3-二硝酸甘油(1,3-dinitroglycerin) 4. 1,2-二硝酸甘油(1,2-dinitroglycerin) 5. 硝酸甘油(nitroglycerin)

图1 有关物质系统适用性溶液色谱图

Fig. 1 Chromatogram of the suitability solution for the relevant substance system

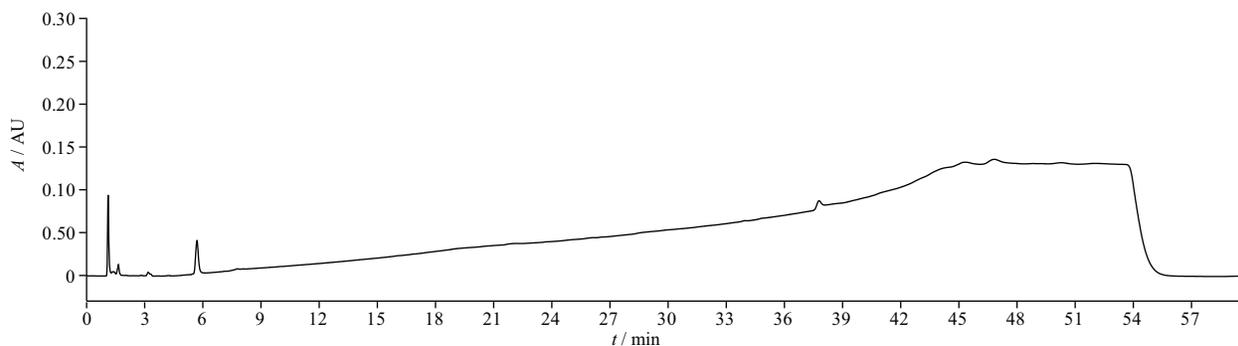


图2 辅料溶液色谱图(A厂家,旧工艺)

Fig. 2 Chromatogram of excipient solution(Manufacturer A, old craftsmanship)

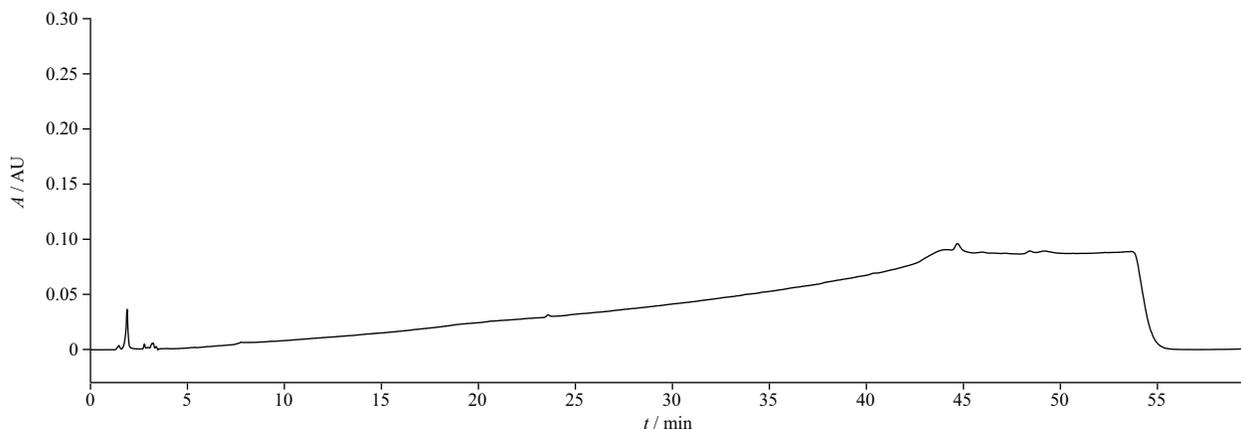


图3 辅料溶液色谱图(A厂家,新工艺)

Fig. 3 Chromatogram of excipient solution(Manufacturer A, new craftsmanship)

**2.1.5.3 精密度试验** 取对照品溶液连续进样6次,计算峰面积的RSD值,RSD=0.2% ( $n=6$ )。

**2.1.5.4 稳定性试验** 取供试品溶液分别在0、3、6、9、12、18、24 h进样测定,杂质个数和杂质质量没有明显变化,溶液在24 h内较稳定。

**2.1.5.5 定量限及检测限** 取硝酸甘油对照品溶

液稀释成适当浓度测定,按照  $S/N=10$  和  $S/N=3$  分别计算定量限及检测限,分别为  $0.21 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  (0.02%) 和  $0.07 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  (0.007%)。

**2.1.6 样品测定**

测定4个企业11批样品,测定结果见表2,(色谱柱采用Ecosil C<sub>18</sub>柱,250 mm × 4.6 mm, 5 μm)。

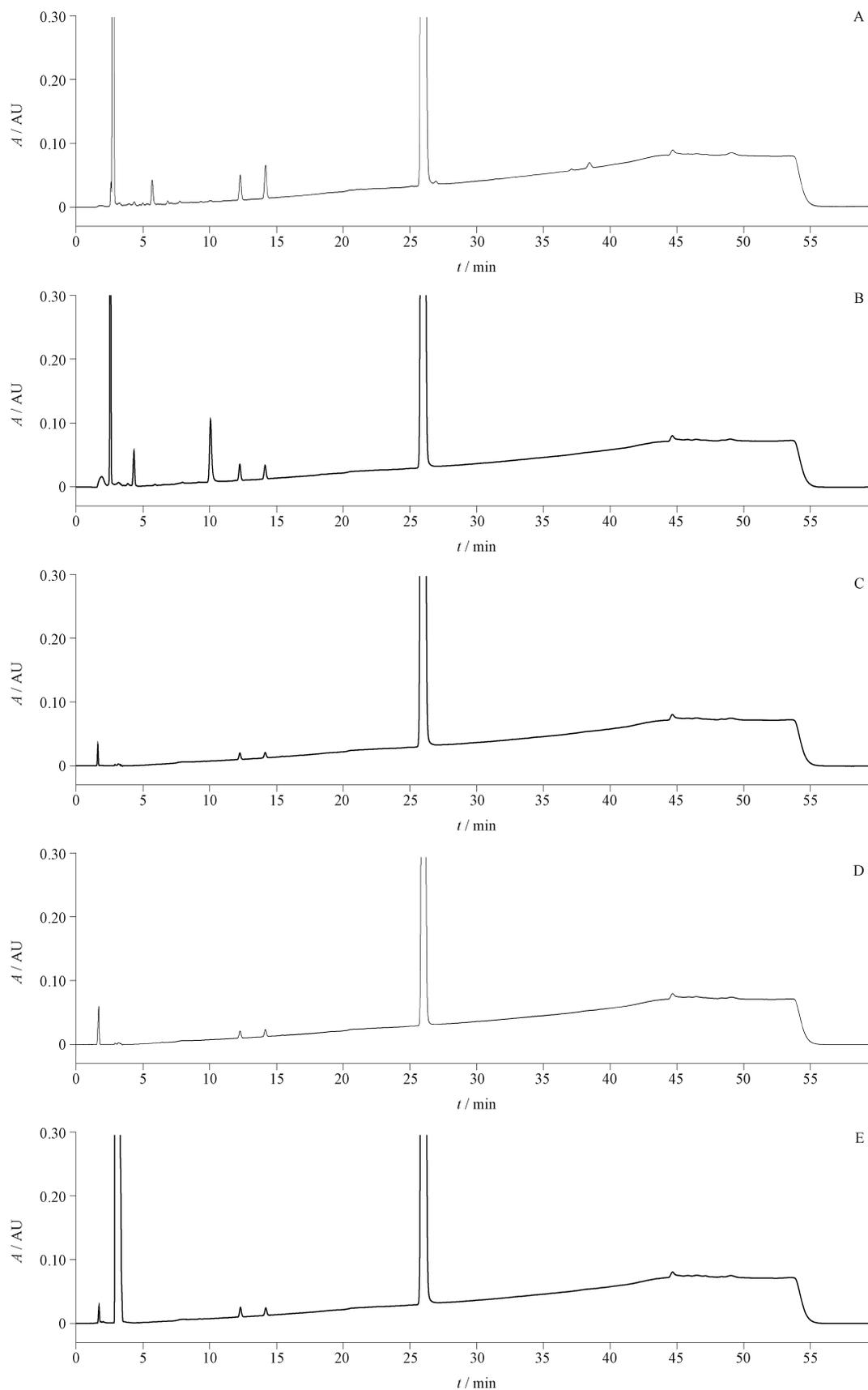


图4 酸破坏(A)、碱破坏(B)、光照破坏(C)、高温破坏(D)、氧化破坏(E)专属性色谱图

Fig. 4 Specificity chromatogram of acid damage(A), alkali damage(B), light damage(C), high temperature damage(D), oxidative damage(E)

表2 有关物质测定结果

Tab. 2 Related substance determination results

| 厂家<br>(manufacturer) | 批号<br>(batch) | 1-硝酸甘油<br>(1-nitroglycerin)/<br>% | 2-硝酸甘油<br>(2-nitroglycerin)/<br>% | 1,2-二硝酸甘油<br>(1,2-dinitroglycerin)/<br>% | 1,3-二硝酸甘油<br>(1,3-dinitroglycerin)/<br>% | 其他单个最大杂质<br>(other single maximum<br>impurities)/% | 杂质总量<br>(total impurities)/<br>% |
|----------------------|---------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--|--|--|----------------------------------|
| A                    | 20210704      | ND                                | ND                                | 0.048                                    | 0.04                                     | 0.1  | 0.2                              |
|                      | 20210705      | ND                                | 0.01                              | 0.049                                    | 0.014                                    | 0.1  | 0.3                              |
|                      | 20210706      | ND                                | 0.01                              | 0.049                                    | 0.04                                     | 0.1  | 0.2                              |
| B                    | 19051301      | 0.01                              | 0.01                              | 1.1                                      | 0.8                                      | 0.1  | 2.4                              |
|                      | 19050801      | 0.01                              | 0.01                              | 0.8                                      | 0.6                                      | 0.1  | 1.8                              |
| C                    | 180901        | ND                                | ND                                | 0.7                                      | 0.5                                      | 0.3  | 1.5                              |
|                      | 190201        | ND                                | 0.02                              | 0.5                                      | 0.4                                      | 0.1  | 1.2                              |
|                      | 200301        | ND                                | ND                                | 0.4                                      | 0.3                                      | 0.1  | 0.9                              |
| D                    | 200203        | 0.01                              | 0.01                              | 0.2                                      | 0.2                                      | 0.2  | 0.9                              |
|                      | 200223        | ND                                | 0.048                             | 0.1                                      | 0.2                                      | 0.1  | 0.7                              |
|                      | 200224        | ND                                | ND                                | 0.2                                      | 0.2                                      | 0.2  | 0.7                              |

注:ND 是指小于检出限溶液,即均小于 0.007%

## 2.2 游离硝酸根

### 2.2.1 溶液制备

溶剂:甲醇-水(50:50)。

2.2.1.1 空白辅料及供试品溶液 见有关物质项下。

2.2.1.2 对照品溶液 取硝酸钾对照品适量,精密称定,加水适量使溶解,用溶剂定量稀释制成每 1 mL 中约含硝酸钾 36  $\mu\text{g}$  的溶液。

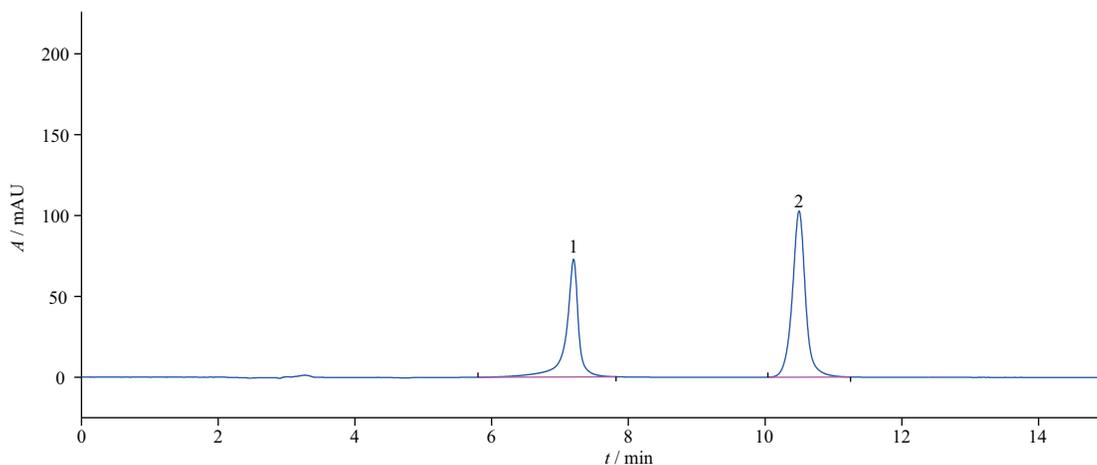
2.2.1.3 系统适用性溶液 分别取硝酸根和亚硝酸根标准溶液适量,用溶剂稀释制成每 1 mL 中各约含 36  $\mu\text{g}$  的混合溶液。

### 2.2.2 色谱条件

用季铵盐强阴离子为填充剂(Welch Ultimate XB-SAX 柱,4.6 mm  $\times$  250 mm,5  $\mu\text{m}$ ),以 35 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>磷酸二氢钾(用磷酸调节 pH 值至 3.0)-乙腈(90:10)为流动相,检测波长为 220 nm;进样体积 20  $\mu\text{L}$ 。

### 2.2.3 系统适用性要求

取系统适用性溶液,进样 20  $\mu\text{L}$ ,记录色谱图(见图 5),理论板数按硝酸根峰计算不低于 5 000,拖尾因子不大于 2.0,硝酸根与亚硝酸根峰之间的分离度应符合要求。



1. 亚硝酸根(nitrite) 2. 硝酸根(nitrate)

图5 系统适用性色谱图

Fig. 5 System suitability chromatogram

### 2.2.4 辅料干扰实验

按 4 个企业处方配制各自辅料溶液,分别进样,

均在硝酸根处出峰,由于本方法采用季铵盐强阴离子柱,仅阴离子得以保留,硝酸根极易存在,故认为

是辅料中存在硝酸根。经测定,4 个企业辅料中上述色谱峰的含量分别为 0.027%、0.037%、0.046%、0.039% (均小于 0.05%)。

### 2.2.5 回收率试验

按照限量量的 80%、100% 和 120% 进行加样回收试验,平均回收率为 100.1%,RSD% 为 0.9% ( $n=9$ )。

### 2.2.6 样品测定

测定 4 个企业 11 批样品,结果见表 3。

## 3 讨论

### 3.1 有关物质流动相的选择

参考《中国药典》2020 年版二部及 BP2022 年版硝酸甘油溶液<sup>[9]</sup>,实验购买 AccuStandard 品牌

对照品(供 HPLC 法使用):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。采用上述对照品及硝酸甘油对照品制备每 1 mL 约含硝酸甘油 1 mg 和四个已知杂质各 10  $\mu\text{g}$  的混合溶液[溶剂:甲醇-水(50:50)],进行相关考察。

《中国药典》2020 年版的色谱条件在一定程度上可以分离 1,2-二硝酸甘油和 1,3-二硝酸甘油(分离度大于 1.0),但无法有效分离 4 个已知杂质。BP 采用乙腈-水梯度洗脱可有效分离 4 个已知杂质,但该色谱条件用于硝酸甘油片有关物质检查时,主成分峰后未知杂质无法有效分离,经调节仍无法有效分离。

表 3 硝酸甘油片测定结果

Tab. 3 Results of nitroglycerin tablets

| 厂家<br>(manufacturer) | 批号<br>(batch) | 硝酸根(以硝酸钾计,相当于硝酸甘油标示量)<br>inorganic nitrates(calculated by potassium nitrate, equivalent to the labeled amount of nitroglycerin)/% |
|----------------------|---------------|---|
| A                    | 20210704      | 0.077   |
|                      | 20210705      | 0.063   |
|                      | 20210706      | 0.054   |
| B                    | 19051301      | 6.226   |
|                      | 19050801      | 3.422   |
| C                    | 180901        | 3.765   |
|                      | 190201        | 2.259   |
|                      | 200301        | 1.910   |
| D                    | 200203        | 0.174   |
|                      | 200223        | 0.164   |
|                      | 200224        | 0.141   |

综合考虑 4 个已知杂质的分离度及方法在制剂中的适用性,采用甲醇-水梯度洗脱,既可以使 4 个已知杂质得到有效分离,又能使硝酸甘油片有关物质供试品溶液主峰和主峰后杂质峰分离度符合要求。

### 3.2 关于有关物质限度

《中国药典》2020 年版二部限度为:单个杂质不得过 1.0%,杂质总量不得过 3.0%。结合本次收集到的样品的测定情况,建议把有关物质限度收窄为:1-硝酸甘油、2-硝酸甘油、1,2-二硝酸甘油、1,3-二硝酸甘油均不得过 0.5%,其他单个杂质不得过 0.5%,杂质总量不得过 2.0%。

### 3.3 硝酸根测定方法选择

目前硝酸根测定方法主要为比色法<sup>[8]</sup>和离子色谱法<sup>[10,11]</sup>,硝酸甘油对显色有干扰需反复抽提除

去,使比色法操作繁琐且异丙醚气味难闻、显色剂昂贵;而硝酸根为阴离子,离子色谱检测所用均为碱性系统,主成分在碱性条件下极不稳定,降解产生大量硝酸根,无法反映真实游离硝酸根的量。为确认辅料中存在的干扰峰,实验采用离子色谱考察辅料,检出与硝酸根峰保留时间一致的色谱峰,结果与现方法测定结果基本一致,进一步印证了辅料中确实含有硝酸根。

### 3.4 关于游离硝酸根限度

BP2022 硝酸甘油溶液的限度为:含硝酸根以硝酸钾计不得过硝酸甘油标示量的 0.5%。日本药局方 JP18 硝酸甘油片收载了硝酸根检查,限度为:含硝酸根以氮(N)计不得过硝酸甘油标示量 0.5% (折算为以硝酸钾计不得过硝酸甘油标示量的 3.6%)。建议参照日本药局方设定限度为:含硝酸

根以硝酸钾计不得过硝酸甘油标示量的 3.6%。

### 3.5 增订游离硝酸根的必要性

由于部分企业产品在贮存过程中不稳定,后续取部分样品同时进行有关物质、游离硝酸根及含量

的测定,结果见表4。样品含量均在限度范围,部分批次硝酸根超限但杂质总量未超限,存在有关物质合格但硝酸根超限的风险,故增订游离硝酸根检查是十分必要的。

表4 硝酸甘油片同时试验结果(%)

Tab.4 Simultaneous test results of nitroglycerin tablets

| 企业<br>(enterprise) | 批号<br>(batch) | 杂质总量<br>(total impurities) | 硝酸根(以硝酸钾计)<br>[inorganic nitrates( calculated by potassium nitrate )] | 含量<br>(assay) |
|--------------------|---------------|----------------------------|---|---------------|
| A                  | 20210705      | 0.2                        | 0.1   | 100.1         |
| B                  | 19050801      | 1.5                        | 4.1   | 99.9          |
| C                  | 180901        | 1.1                        | 2.5   | 102.8         |
|                    | 190201        | 1.8                        | 4.9   | 102.1         |
|                    | 200301        | 2.6                        | 6.7   | 99.8          |
| D                  | 200203        | 0.7                        | 0.2   | 97.5          |
| 限度(limit)/%        | 2.0           | 3.6                        | 90.0 ~ 110.0  |               |

### 参考文献

- [ 1 ] 杨青霞,王伶,刘富强. 硝酸甘油的药理作用及临床应用[J]. 药品评价,2006,3(3):214  
YANG QX, WANG L, LIU FQ. Pharmacological action and clinical application of nitroglycerin [J]. Drug Evaluat, 2006, 3(3):214.
- [ 2 ] 高凤彤,孙湛博,张晓雯. 硝酸甘油作用机制及耐药机制的研究进展[J]. 中国医疗前沿,2010,5(8):7.  
GAO FT, SUN ZB, ZHANG XW. Research progress in effects and drug-resistant mechanism of nitroglycerin [J]. Nat Med Front China, 2010, 5(8):7.
- [ 3 ] 赵振,柏凡,李静宇,等. 硝普钠与硝酸甘油治疗重症心力衰竭的效果比较[J]. 临床医学研究与实践,2023,8(16):50.  
ZHAO ZH, BAI F, LI JY. Comparison of effects of sodium nitroprusside and nitroglycerin in the treatment of severe heart failure [J]. Clin Med Res Prac, 2023, 8(16):50.
- [ 4 ] 伍良涌,潘锡强. 反相高效液相色谱法测定硝酸甘油溶液及其制剂的有关物质[J]. 临床合理用药杂志,2010,10(3)1.  
WU LY, PANXQ. Determination of related substances in nitroglycerin solution and its preparation by reversed phase high performance chromatography [J]. J Clin Rat Drug Use, 2010, 10(3)1.
- [ 5 ] 伍良涌,潘锡强,黎志芳. 中国药典2010年版硝酸甘油系列质量标准修订建议[J]. 药物分析杂志,2013,33(5):870.  
WU LY, PANXQ, LI ZHF. Some suggestions on revision of the quality standards of nitroglycerin in Chinese Pharmacopoeia Volume II (2010 Edition) [J]. Chin J Pharm Anal, 2013, 33(5):870.
- [ 6 ] 赵静,王娜,冯叙桥,等. 蔬菜中硝酸盐和亚硝酸盐检测方法的研究进展[J]. 食品科学,2014,35(8):42.  
ZHAO J, WANG N, FENG SQ. Research progress on detection methods for nitrate and nitrite in vegetables [J]. Food Sci, 2014, 35(8):42.
- [ 7 ] 廖德丰. 硝酸盐和亚硝酸盐的毒理学效应及检测技术研究进展[J]. 生物学教学,2013,38(12):4.  
LIAO DF. Advances in toxicological effects and detection technology of nitrate and nitrite [J]. Biol Teach, 2013, 38(12):4.
- [ 8 ] JP 18 [S]. 2023.
- [ 9 ] BP 2022 [S]. 2023.
- [ 10 ] 赵艳秋,汪甜,尹燕杰,等. 硝酸甘油片游离硝酸根离子的测定[J]. 海峡药学,2020,32(10):77.  
ZHAO YQ, WANG T, YIN YJ, et al. Determination of free nitrate ions in nitroglycerin tablets [J]. Strait Pharm, 2020, 32(10):77.
- [ 11 ] 赵艳秋,汪甜,尹燕杰,等. 硝酸甘油片有关物质的研究[J]. 中国药品标准, 2020,21(1):42.  
ZHAO YQ, WANG T, YIN YJ, et al. The research on related substances of nitroglycerin tablets[J]. Drug Stand China, 2020, 21(1):42.

(收稿日期:2023-08-21)