

HPLC 测定氟比洛芬凝胶贴膏中有关物质

白杰, 金美娜, 陆晔辉, 刘跃, 朱静娟*

云南白药集团无锡药业有限公司, 江苏 无锡 214142

摘要:目的 建立 HPLC 法测定氟比洛芬凝胶贴膏中有关物质。方法 使用 Agilent Zorbax XDB-C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相 A 为乙酸水溶液 (5:60), 流动相 B 为乙腈, 梯度洗脱; 柱温为 30 °C; 检测波长为 254 nm; 体积流量为 1.0 mL/min; 进样体积为 20 μL。采用加校正因子的主成分自身对照法计算氟比洛芬凝胶贴膏样品中降解杂质氟比洛芬甘油酯 (杂质 A) 和氟比洛芬薄荷酯 (杂质 B)。结果 杂质 A、B 分别在 0.01~5.40、0.10~16.20 μg/mL 线性关系良好。平均回收率分别为 98.9%、97.9%, RSD 值分别为 1.0%、2.2%。结果均符合限度要求。结论 本方法操作简单, 试剂易得, 重现性好, 能够有效分离并定量氟比洛芬凝胶贴膏中杂质 A、B。

关键词: 氟比洛芬凝胶贴膏; 氟比洛芬; 氟比洛芬甘油酯; 氟比洛芬薄荷酯; 高效液相色谱

中图分类号: R284 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2024)12-3094-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.12.012

Determination of related substances in Flurbiprofen Gel Plaster by HPLC

BAI Jie, JIN Meina, LU Yehui, LIU Yue, ZHU Jingjuan

Yunnan Baiyao Group Wuxi Pharmaceutical Co., Ltd., Wuxi 214142, China

Abstract: Objective To develop an HPLC method for determination of related substances in Flurbiprofen Gel Plaster by HPLC. **Methods** Agilent Zorbax XDB-C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used, mobile phase A was acetic acid aqueous solution (5:60), mobile phase B was acetonitrile, with gradient elution. The column temperature was 30 °C, detection wavelength was set at 254 nm, flow rate was 1.0 mL/min, and injection volume was 20 μL. Determination of the degradation impurities flurbiprofen glycerol ester (impurity A) and flurbiprofen menthyl ester (impurity B) in Flurbiprofen Gel Plaster were calculate by principal component self-comparison method with a correction factor. **Results** The linear range of impurity A and B was 0.01 — 5.40 and 0.10 — 16.20 μg/mL. The average recovery was 98.9% and 97.9%, with RSD 1.0% and 2.2%. The results met the limit requirements. **Conclusion** The method is simple to operate, easy to obtain reagents, and has good reproducibility, and can effectively separate and quantify impurities A and B in Flurbiprofen Gel Plaster.

Key words: Flurbiprofen Gel Plaster; flurbiprofen; flurbiprofen glycerol ester; flurbiprofen menthyl ester; HPLC

氟比洛芬凝胶贴膏是由日本三笠制药株式会社开发的一种外用凝胶贴膏剂, 主要成分为非甾体抗炎药氟比洛芬。它通过抑制前列腺素的合成发挥抗炎、镇痛作用, 在临床上广泛用于膝骨关节炎、肌腱炎和腱鞘炎、外伤所致的肿胀和疼痛等疾病的治疗^[1-3]。凝胶贴膏相较于传统贴剂有更好的依从性、安全性和有效性^[4-6], 但也存在辅料或其他添加剂数量更多、部分辅料惰性较差的缺点, 在制备和贮藏过程中更易产生杂质, 因此对于其质量控制提出了更高的要求。当前氟比洛芬原料药在《欧洲药

典》(EP11.0)、《中国药典》(2020 年版)、《日本药典》(JP18)、《美国药典》(USP-NF) 中均有收载, 均采用 HPLC 法进行质量控制, 但均未收载氟比洛芬凝胶贴膏。在实际检测过程中发现, 原料药的检测方法无法有效控制凝胶贴膏制剂中生成的降解杂质氟比洛芬甘油酯 (杂质 A) 和氟比洛芬薄荷酯 (杂质 B), 其结构见图 1。杂质 A、B 均无法获得对照品, 采用外标法进行定量检测的方式不易实现。在没有能够有效检测出氟比洛芬凝胶贴膏中有关物质的分析方法的情况下, 可以采用加校正因子

收稿日期: 2024-06-30

作者简介: 白杰, 男, 药师, 硕士, 主要从事药物质量分析研究。E-mail: 1371082519@qq.com

*通信作者: 朱静娟, 女, 药师, 硕士。E-mail: 2724291814@qq.com

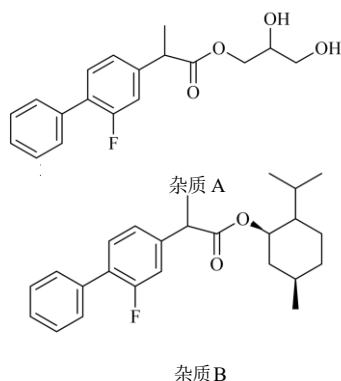


图 1 氟比洛芬甘油酯(杂质 A)、氟比洛芬薄荷酯(杂质 B)的结构式

Fig. 1 Structures of flurbiprofen glycerol ester (impurity A) and flurbiprofen menthyl ester (impurity B)

的主成分自身对照法进行定量^[7-9]。本方法操作简单,试剂易得,重现性好,能够有效分离并定量氟比洛芬凝胶贴膏中杂质 A、B,对于氟比洛芬凝胶贴膏的质量控制有重要意义。

1 仪器与试剂

Agilent 1260 液相色谱仪(安捷伦);KH-250B 超声波清洗器(南京科尔仪器设备有限公司);MS205DU 电子天平(Mettler Toledo 公司);Seven Compact 型酸度计。

氟比洛芬对照品(中国食品药品检定研究院,批号 100725-202203,质量分数 99.9%);杂质 A(批号 PB0027152-003-01,质量分数 94.0%);杂质 B(批号 PB0027649-002-01,质量分数 97.6%)均购自 PharmaBlock Sciences 公司。氟比洛芬凝胶贴膏,规格 40 mg/贴,购自日本三笠制药株式会社,批号 208231-02、209221-02、210041-05;空白制剂为自制。水为纯化水,甲醇、乙腈为色谱纯,冰乙酸为色谱纯(阿拉丁试剂公司),其他均为分析纯试剂。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Agilent Zorbax XDB-C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相 A 为乙酸水溶液(5:60),流动相 B 为乙腈,梯度洗脱(0~10 min 45% B; 18~28 min 45%→100% B; 18~28 min 100% B; 28~31 min, 100%→45% B; 31~35 min 45% B);柱温为 30 ℃;检测波长为 254 nm;体积流量为 1.0 mL/min;进样体积为 20 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 取氟比洛芬对照品 15 mg,精

密称定,置 25 mL 量瓶中,加 80%甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀。再取 3 mL,置 100 mL 量瓶中加 80%甲醇稀释至刻度,摇匀,作为氟比洛芬对照品溶液(18 μg/mL)。分别取杂质 A、B 对照品各 22.5 mg,精密称定,置 25 mL 量瓶中,加 80%甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀。再取 2.5 mL 置 25 mL 量瓶中,加 80%甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得氟比洛芬杂质 A、B 对照品溶液(90 μg/mL)。

2.2.2 系统适用性溶液 取上述对照品溶液适量,加稀释剂甲醇-水(80:20)溶解并稀释成含杂质 A、B 和氟比洛芬 0.3、0.4、0.2 mg/mL 的混合溶液。

2.2.3 供试品溶液 取氟比洛芬凝胶贴膏 1 贴,除去离型膜,剪碎,精密称定 3.0 g(相当于氟比洛芬 9 mg),置 50 mL 锥形瓶中,加入稀释剂甲醇-水(80:20)50 mL,称定质量,超声处理 1 h(功率 250 W、频率 40 kHz),冷却,补足减失的质量,混匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 对照溶液 精密量取供试品溶液 0.1 mL,置 50 mL 量瓶中,加稀释剂至刻度,混匀,即得。

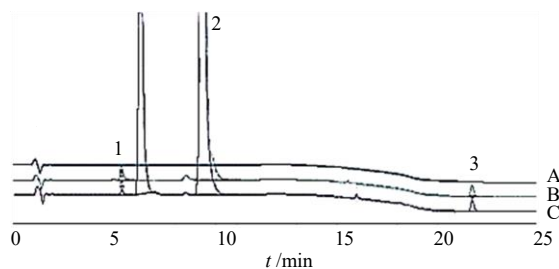
2.2.5 空白制剂溶液 按照 2.2.3 供试品溶液的制备项下方法制备空白贴剂溶液。

2.3 系统适用性

取空白辅料溶液、系统适用性溶液、供试品溶液各 20 μL,注入色谱仪,结果见图 2。可见氟比洛芬、杂质 A、B 的保留时间分别为 9.3、5.3、22.6 min,结果表明样品中其他成分对杂质 A、B 的测定无干扰。

2.4 专属性试验

取氟比洛芬凝胶贴膏 1 片,除去覆盖的离型膜,剪碎精密称定 3.0 g(约相当于氟比洛芬 9 mg),置



1-杂质 A, 2-氟比洛芬, 3-杂质 B。

1-impurity A, 2-flurbiprofen, 3-impurity B.

图 2 空白溶液(A)、系统适用性溶液(B)和供试品溶液(C)的 HPLC 谱图

Fig. 2 HPLC Chromatograms of blank solution (A), system suitability solution (B), and test solution (C)

锥形瓶中, 平行制备 5 份。酸破坏: 先加 80% 甲醇 3 mL, 再加 1 mol/L HCl 溶液 1 mL, 放置室温 2 h 后加 1 mol/L NaOH 溶液 1 mL 中和, 加 80% 甲醇 45 mL 超声提取 1 h, 滤过, 即得。碱破坏: 先加 80% 甲醇 3 mL, 再加 1 mol/L NaOH 溶液 1 mL, 放置室温 2 h 后加 1 mol/L HCl 溶液 1 mL 中和, 加 80% 甲醇 45 mL 超声提取 1 h, 滤过, 即得。氧化破坏: 先加 80% 甲醇 3 mL, 再加 10% H₂O₂ 溶液 2 mL, 常温放置 4 h 后加 80% 甲醇 45 mL 超声提取 1 h, 滤过, 即得。高温破坏: 加 80% 甲醇 50 mL 超声提取 1 h, 80 °C 水浴 5 h 后取出, 放至室温, 滤过, 即得。光照破坏: 加 80% 甲醇 50 mL 超声提取 1 h, 置光照 (5 000±500) lx 稳定箱中 7 d 后取出, 滤过, 即得。分别取上述各溶液进样检测, 结果见图 3。在上述破坏条件下, 质量平衡均在 90%~110%, 且主峰与杂质峰均较好地分离, 主峰质量分数均能达到要求, 破坏产生的杂质峰未对实验产生干扰。

2.5 线性关系和校正因子测定

氟比洛芬线性贮备液: 精密量取 18 µg/mL 氟比洛芬对照品溶液适量, 置于 10 mL 量瓶中, 用稀释剂甲醇-水 (80:20) 溶解并稀释制成 0.2、2.7、3.6、0.45、5.4 µg/mL 的线性溶液。分别精密量取杂

质 A、B 对照品溶液适量, 置 25 mL 量瓶中, 得杂质 A 系列线性质量浓度为 0.01、1.8、3.6、4.32、5.4 µg/mL, 杂质 B 系列线性质量浓度为 0.1、5.4、10.8、12.96、16.20 µg/mL。取氟比洛芬和杂质 A、杂质 B 线性溶液, 进样测定, 记录色谱图。以质量浓度对峰面积计算回归方程, 并以标准曲线法对校正因子进行了测定, 分别以氟比洛芬线性回归方程的斜率与杂质 A、B 回归方程的斜率之比计算校正因子(*f*), 结果见表 1。

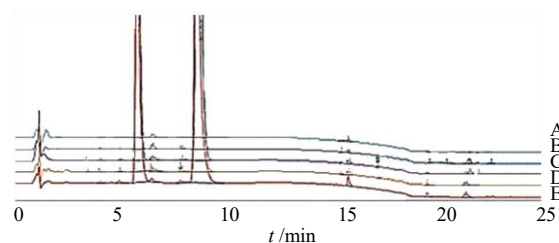


图 3 酸破坏 (A)、碱破坏 (B)、氧化破坏 (C)、高温破坏 (D) 和光照破坏 (E) 的样品 HPLC 谱图

Fig. 3 HPLC Chromatograms of acid damage sample (A), alkali damage sample (B), oxidation damage sample (C), high temperature damage sample (D), and light damage sample (E)

表 1 线性关系和校正因子

Table 1 Linear relationships and correction factor

成分	回归方程	<i>r</i>	<i>f</i>	线性范围/(µg·mL ⁻¹)
氟比洛芬	$Y=72.750 X+2.737$	0.995 7		0.20~5.40
杂质 A	$Y=56.095 X+0.395$	0.999 9	1.3	0.01~5.40
杂质 B	$Y=52.840 X+0.112$	0.999 9	1.4	0.10~16.20

2.6 检测限和定量限

精密量取杂质 A、B 线性溶液, 用稀释液溶解并逐步稀释, 进行测定, 记录色谱图, 计算各色谱峰信噪比 (S/N), 结果杂质 A 的检测限 (S/N=3) 和定量限 (S/N=10) 分别为 0.003、0.01 µg/mL, 杂质 B 的检测限和定量限分别为 0.01、0.09 µg/mL。

2.7 准确度试验

精密称取杂质 A 线性储备溶液 (1.8 mg/mL) 25 mL, 置 100 mL 量瓶中, 用稀释剂甲醇-水 (80:20) 稀释至刻度, 摇匀, 即得杂质 A 对照品贮备液 (质量浓度约为 450 µg/mL)。精密称取杂质 B 线性储备溶液 (0.9 mg/mL) 20 mL, 置 100 mL 量瓶中, 用稀释剂甲醇-水 (80:20) 稀释至刻度, 摇匀, 即

得杂质 B 对照品贮备液 (质量浓度约为 180 µg/mL)。分别精密称取氟比洛芬凝胶贴膏 (批号 208231-02) 约 1.5 g, 置 50 mL 量瓶中, 分别加入杂质 A、B 对照品贮备液 (相当于加入各杂质标准限度的 50%、100%、150% 水平), 用稀释剂甲醇-水 (80:20) 稀释至刻度, 摇匀, 作为回收率测试溶液。每个质量浓度水平同法配制 3 份, 进样测定, 计算回收率, 结果显示杂质 A、B 的平均回收率分别为 98.9%、97.9%, RSD 值分别为 1.0%、2.2%。

2.8 精密度试验

2.8.1 进样精密度 取供试品溶液 (批号 208231-02) 连续进样 6 针, 测定杂质 A、B 峰面积, 结果显示, 杂质 A、B 峰面积的 RSD 值分别为 1.6%、

2.1%。

2.8.2 中间精密度 不同实验人员在不同时间, 取供试品溶液(批号 208231-02)连续进样 6 针, 测定杂质 A、B 峰面积, 结果显示, 杂质 A、B 峰面积的 RSD 值分别为 2.8%、3.2%。

2.9 稳定性试验

将供试品溶液(批号 208231-02)在室温下放置 0、2、4、6、10、12、24 h 后进样检测, 记录色谱图。结果显示, 每个时间点的杂质峰面积与初始的结果相比变化均在 $\pm 2.0\%$ 以内, 杂质 A、B 峰面积的 RSD 值分别为 1.3%、0.73%, 表明样品溶液的稳定性良好。

2.10 耐用性试验

分别改变色谱条件, 通过观察系统适用性溶液、供试品溶液色谱图中主峰与各杂质峰以及各杂质峰间的分离度, 考察方法的耐用性。结果显示, 改变柱温($\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$)、更换同型号不同批号色谱柱, 主峰与各杂质峰分离度均满足要求, 且各条件下杂质含量与未变条件比较变化率在 $\pm 0.1\%$, 对结果无显著影响。

2.11 样品测定

经上述分析方法验证, 确定该检测方法适用于检测氟比洛芬凝胶贴膏中有关物质, 故采用加校正因子的主成分自身对照法计算 3 批氟比洛芬凝胶贴膏样品中杂质 A、B。分别取供试品溶液、对照溶液, 进样测定, 采用加校正因子的主成分自身对照法计算 3 批氟比洛芬凝胶贴膏样品中杂质 A、B 的质量分数, 结果见表 2。

表 2 氟比洛芬凝胶贴膏中杂质 A、B 测定结果 ($n=3$)

Table 2 Determination of impurity A and B in Flurbiprofen Gel Plaster ($n=3$)

批号	杂质 A/%	杂质 B/%
208231-02	0.66	1.72
209221-02	0.55	1.63
210041-05	0.51	1.59

3 讨论

目前氟比洛芬凝胶贴膏暂无法定的有关物质测定方法,《中国药典》2020 年版中仅规定了氟比洛芬原料药中有关物质测定方法^[10], 但上述方法无法有效满足氟比洛芬凝胶贴膏中有关物质的检测需求, 在采用《中国药典》2020 年版中有关物质方法进行氟比洛芬凝胶贴膏样品检测后, 发现其有部

分降解杂质未检出。因此在综合考虑了各杂质的检测方法后, 对《中国药典》2020 年版中有关物质方法进行了变更和优化。依据多批次近效期氟比洛芬凝胶贴膏的测定结果确定质量标准: 杂质 A 的限度为 2.0%、杂质 B 限度为 4.0%, 本次测定所检测的氟比洛芬凝胶贴膏中杂质的量均符合此限度要求。

3.1 检测波长的选择

对氟比洛芬和杂质 A、B 进行全波长扫描, 确定杂质 A 最大吸收波长在 246 nm 左右, 杂质 B 最大吸收波长在 254 nm 左右, 氟比洛芬最大吸收波长在 246 nm 左右。《中国药典》2020 年版中方法选用 254 nm 作为检测波长。因此, 本方法使用 254 nm 作为检测波长比较合理。

3.2 洗脱程序的优化

采用《中国药典》(2020 年版)等度方法测定, 但由于杂质 B 极性较小, 因此未检出。为提高检测效率和检测能力, 将等度方法改为梯度方法, 时间延长, 前 10 min 仍沿用《中国药典》(2020 年版)方法的流动相比比例, 此后增加梯度以便检测杂质 B。且使用优化后的方法检测, 各杂质间均能较好地分离。图 3 显示了不同方法下杂质混合溶液分离度、出峰情况, 实验结果表明拟定的方法能更好地分离测定各杂质。

3.3 有关物质定量方式选择

氟比洛芬杂质 A、B 均无法定对照品, 对照品较难获得, 因此使用外标法对其进行定量检测的难度较大, 后续检测较为困难。采用校正因子法进行测定可以减少杂质对照品的使用, 并减少后续检测的难度^[14-17]。在部分使用标准曲线法对校正因子进行了测定, 结果显示杂质 A、B 的校正因子分别为 1.3、1.4, 均超出 0.9~1.1^[11]。因此需使用加校正因子的主成分自身对照法进行定量检测。

3.4 样品前处理方式的选择

氟比洛芬和杂质 A、B 在甲醇中溶解度均比较高^[10], 贴膏剂常用的提取方式为超声提取。为避免超声过程导致的提取溶剂挥发, 本制剂样品使用 80%甲醇并进行超声提取, 考察不同的提取时间点, 确定了最佳提取时间。此外, 稳定性研究显示高温会使杂质生成速度增加, 因此在超声提取过程中控制温度, 以增加结果准确度, 经验证此方法回收率符合要求。

3.5 降解杂质产生原因和控制建议

经稳定性考察发现, 杂质 A、B 在制剂中的含

量随时间增长的速度较快,在加速条件下放置6个月,杂质A、B的质量分数分别为1.63%、2.11%。因此杂质A、B均需要按照特殊杂质进行控制^[11-12]。对氟比洛芬原研制剂的进一步研究确认,杂质A、B是氟比洛芬分别与含醇羟基的辅料甘油和薄荷醇酯化而形成的,长期贮存即会生成,在高温条件下会加速生成。氟比洛芬凝胶贴膏作为已上市产品,难以通过变更处方工艺的方式减少杂质生成,因此控制储藏条件以减小杂质生成更适宜,建议在冷藏条件下储存,可以明显降低杂质产生量。

本研究针对氟比洛芬凝胶贴膏中的两种降解杂质A、B建立高效液相色谱法进行定量分析,并通过对氟比洛芬和杂质A、B的回归方程斜率的计算,确定了杂质A、B相对于氟比洛芬的校正因子。采用加校正因子的主成分自身对照法,可以在不具备杂质A、B对照品的条件下,对氟比洛芬凝胶贴膏进行定量分析,定量结果准确,对进一步建立氟比洛芬相关制剂中有关物质的定量检测方法具有一定的参考借鉴意义。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 吴紫阳,程吟楚,易湛苗,等. 氟比洛芬凝胶贴膏治疗膝骨关节炎的药品临床综合评价 [J]. 中国医药, 2023, 18(2): 260-264.
- [2] 程小桂,扶忠超,潘文天,等. 不同运动方式联合氟比洛芬凝胶贴膏在膝骨关节炎中的应用效果比较 [J].

中国当代医药, 2023, 30(11): 76-80.

- [3] 张虎,冯志军. 弹力绷带结合氟比洛芬凝胶贴膏治疗急性踝关节扭伤疗效观察 [J]. 临床合理用药杂志, 2020, 13(4): 151-153.
- [4] 田如新,王强,石雷,等. 氟比洛芬凝胶贴膏辅助美洛昔康治疗骨关节炎的疗效研究 [J]. 中国处方药, 2022, 20(5): 88-90.
- [5] 王天兵,姜保国,杨惠林,等. 氟比洛芬巴布膏治疗骨科急性慢性疼痛的多中心临床研究 [J]. 中日友好医院学报, 2013, 27(1): 18-20.
- [6] 曹璐,雍素云,张鹏,等. 帕瑞昔布钠与氟比洛芬酯用于外科手术超前镇痛疗效和安全性的 Meta 分析 [J]. 临床药物治疗杂志, 2022, 20(3): 73-80.
- [7] 魏凯,李欣. 加校正因子的主成分自身对照法测定马来酸依那普利片有关物质 [J]. 中国药品标准, 2021, 22(1): 26-31.
- [8] 肖亭,王晨,姚尚辰,等. HPLC 校正因子法在药物分析中的应用 [J]. 药学学报, 2020, 55(12): 2854-2861.
- [9] 朱莉娜,吴兆伟,吴斌,等. HPLC 校正因子法测定尼可地尔片的有关物质 [J]. 中国药事, 2023, 37(7): 808-816.
- [10] 中国药典 [S]. 二部. 2020: 575.
- [11] 余振喜,庾莉菊,黄海伟,等. 浅谈 HPLC 法测定有关物质时已知杂质的计算方法 [J]. 中国药品标准, 2010, 11(4): 278.
- [12] 韦日伟,王昆,吴先富,等. 药物中有关物质检测方法的研究进展及应用 [J]. 中国药师, 2015, 18(5): 851-855.

【责任编辑 解学星】