

# 硝呋太尔制霉菌素阴道栓中制霉菌素的效价测定方法的改进研究

苏健, 何薛纯, 王恺\*

(江苏省南通市食品药品监督检验中心, 南通 226006)

**摘要:**目的 优化硝呋太尔制霉菌素阴道栓中制霉菌素效价测定方法, 使其检验方法准确可靠。方法 以啤酒酵母菌(ATCC-9763)作为实验菌株, 对抗生物微生物二剂量法测定制霉菌素效价进行试验设计, 抗生素高低剂量浓度为 $14\sim 28\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对硝呋太尔制霉菌素阴道栓中制霉菌素含量进行测定。结果 方法准确可靠, 精密密度RSD(相对标准偏差)和准确性均符合要求, 定量线性范围内平均回收率为100.3%, 可信限率符合规定。

**结论** 该法适用于硝呋太尔制霉菌素阴道栓中制霉菌素的含量测定。

**关键词:** 制霉菌素; 含量测定; 效价测定

## 0 引言

硝呋太尔制霉菌素阴道栓为江苏万高药业有限公司产品, 主要用于细菌性阴道病、念珠菌性外阴阴道病和阴道混合感染。该产品质量标准规定需测定制霉菌素含量, 因厂家的检测方法不稳定, 本文建立了新的方法, 按《中华人民共和国药典(2020年版)》抗生素效价测定法<sup>[1]</sup>、《药品微生物学检验手册》抗生素效价测定法<sup>[2]</sup>、《微生物学实验》抗生素效价的测定<sup>[3]</sup>、《生物制品质量控制分析方法验证技术评审一般原则》<sup>[4]</sup>对设计的方案予以考证<sup>[5-6]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器

抑菌圈测定仪, CAM-III B型, 波浦电脑系统上海工程有限公司; 电子分析天平, ME2002E, 奥豪斯仪器(常州)有限公司; 微生物培养箱, GNP-9270BS, 海门市恒昌仪器厂; 立式压力蒸汽灭菌器, YXQ-LS-50S II, 上海东亚压力容器制造有限公司; 恒温水浴锅, TW20, 优莱博技术北京有限公司; 电热恒温鼓风干燥箱, 101AB-1, 海门市恒昌仪器有限公司。

### 1.2 试剂与菌种

制霉菌素国家标准品(批号为130375-201802, 使用前不需要干燥处理, 含量以制霉菌素单位计, 5900单位

/mg, 中国食品药品检定研究院); 硝呋太尔制霉菌素阴道栓(批号为2304121, 2304131, 2304141, 2307141, 2307161, 江苏万高药业有限公司); 制霉菌素检定培养基, 批号为20210217, 青岛高科技生物技术有限公司(海博); 抗生素检定培养基5号, 批号为20230115, 青岛高科技生物技术有限公司(海博); 抗生素检定培养基IV号, 批号为20221013, 青岛高科技生物技术有限公司(海博); 灭菌的磷酸盐缓冲液(pH 6.0)均按《中华人民共和国药典》2020年版四部通则配制; 沙氏葡萄糖液体培养基(SDB), 批号为1236551, 美国BD公司; 啤酒酵母菌(ATCC-9763), 中国食品药品检定研究院。

### 1.3 方法

厂家采用2020年版中国药典四部通则1201抗生素效价测定法二剂量常规法, 本文拟通过改变菌层、培养温度和时间来优化厂家方法, 提高结果的准确性。

(1)培养基配制: 取沙氏葡萄糖液体培养基30 g加水1000 mL, 加热搅拌使其完全溶解, 搅匀分装, 以121 °C灭菌15 min; 取抗生素检定培养基IV号27 g加水1000 mL, 加热搅拌使其完全溶解, 搅匀分装, 以115 °C灭菌30 min; 取抗生素检定培养基5号70 g加水1000 mL, 加热搅拌使其完全溶解, 搅匀分装, 以115 °C灭菌30 min; 取制霉菌素检定培养基54.5 g加水1000 mL, 加热搅拌使其完全溶解, 搅匀分装, 以121 °C

第一作者: 苏健, 副主任药师, 研究方向为药品质量检定及质量标准。

\* 通信作者: 王恺, 工程师, 研究方向为食品药品质量检定及质量标准。E-mail: 18106299300@163.com

灭菌 15 min。

(2) 器具灭菌: 试验前将玻璃刻度吸管、牛津杯、抗生素效价检定培养皿、陶瓦盖等, 均放入干热灭菌箱中 250 °C 30 min 灭菌。

(3) 菌悬液制备: 取啤酒酵母菌(ATCC-9763)菌粉接种至 20 mL 沙氏葡萄糖液体培养基中在 30 °C 培养 24 h, 转接至抗生素检定培养基 5 号琼脂斜面在 30 °C 培养 24 h, 把啤酒酵母菌(ATCC-9763)的 V 号培养基培养物, 接种于 IV 号琼脂培养基的培养瓶中, 培养温度在 (30±1) °C, 培养时间 (20~24) h, 用灭菌水将表面菌苔洗出至含有无菌瓶中, 摇均, 待用。

(4) 线性范围: 称取制霉菌素标准品适量, 加二甲基甲酰胺使溶解稀释成含制霉菌素 700 U·mL<sup>-1</sup> 的储备液。以 21 U·mL<sup>-1</sup> 为对照浓度, 剂距为 1:0.8, 用 pH 6.0 磷酸盐缓冲液稀释成含制霉菌素 10.3、12.8、16.1、20.1、25.1、31.4、39.2、49.0 U·mL<sup>-1</sup> 的体系溶液, 按抗生素检定法一剂量法, 各浓度设一组, 每组 3 个双碟, 各双碟菌面上, 等角摆放 6 个牛津杯, 在各组牛津杯内间隔滴加对照浓度和体系浓度, 培养 20 h 后, 测量体系浓度的抑菌圈直径, 对照浓度抑菌圈直径符合范围要求 (16.2~17.9 mm), 以浓度对数 (lgC) 为 X 轴, 对照浓度与体系浓度的抑菌圈直径平均差值 ( $f_k$ ) 为 Y 轴 (mm) 进行线性回归。

(5) 溶液配制: 标准品溶液的制备。精密称取制霉菌素标准品 (相当于 14 万单位), 至 200 mL 量瓶中, 用二甲基甲酰胺使溶解, 并稀释加至刻线, 摇匀。精密吸取上述溶液 2.0 mL 两份, 分别至 50 mL 和 100 mL 容量瓶中, 分别加入二甲基甲酰胺 0.5 mL 和 3.0 mL, 使得测定溶液中二甲基甲酰胺的浓度为 5% (V/V) 再各加入灭菌磷酸盐缓冲液 (pH 6.0) 稀释至刻度, 摇匀, 即得每 1 mL 含 28 U·mL<sup>-1</sup> 和 14 U·mL<sup>-1</sup> 的高低浓度的标准品溶液。供试品溶液的制备。称取 20 粒的内容物 (相当于 14 万单位), 制备方法同标准品溶液。

(6) 双碟制备: 厂家。取直径约 90 mm, 高 16~17 mm 的无菌双碟, 取预制备灭菌的制霉菌素检定培养基适量加热至完全融化, 放冷至 48~50 °C, 加入啤酒酵母菌菌悬液适量, 混匀, 在每一个培养皿中各加入 15 mL, 均匀摊布平皿内, 水平放置在台面上冷却凝固后, 在每一个培养皿中以同样距离摆放牛津杯小管 4 只, 用陶土盖遮盖备用。改进法。取上述与厂家相同的双碟, 另外取制霉菌素检定培养基适量加热融化后, 放冷至 48~50 °C, 摇匀, 在每一个双碟中分别加入 18 mL, 使碟底内均匀摊布, 放置在水平台面上冷却凝固后 (作为底层), 再在上面加入 5 mL 含啤酒酵母菌菌悬液适量的 48~50 °C 制霉菌素检定培养基,

使碟底内均匀摊布, 30 min 后在每一个双碟中以等距离均匀安置不锈钢小管 4 个, 用陶瓦盖覆盖备用。

(7) 测定方法: 取上述四个浓度的各溶液, 分别滴装至每一个双碟的 4 个牛津杯小管中, 对角的 2 个牛津杯小管中分别滴装两个浓度的标准品溶液, 其余 2 个牛津杯小管中分别滴装两个浓度的供试品溶液, 厂家置 32 °C 下培养 24 h, 改进法置 30 °C 下培养 20 h 后, 测定抑菌圈直径。照生物检定统计法 (《中华人民共和国药典 (2020 年版四部)》通则 1431 中 2.2 法) 进行可靠性测验及效价计算。

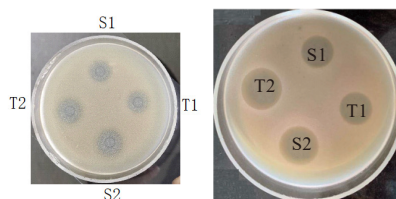
## 2 结果与分析

### 2.1 线性范围

回归方程为:  $Y=1.0253+0.1567X$ ,  $r=0.9996$ , 在 10.3~49.0 U·mL<sup>-1</sup> 的制霉菌素浓度范围内, 相关系数  $r$  符合规定,  $f_k$  (mm) 与浓度对数 lgC 线性关系良好。

### 2.2 专属性考察试验

厂家方法见图 1(左), 标准品和供试品的抑菌圈均出现边缘模糊不清、试验菌蔓延的现象, 对试验存在干扰, 该法不可靠。改进法见图 1(右), 结果表明: S1、S2、T1、T2 的抑菌圈边缘分明; 该改进法专属性符合要求。



注: S1—标准品低浓度溶液; S2—标准品高浓度溶液; T1—供试品低浓度溶液; T2—供试品高浓度溶液

图 1 厂家方法的抑菌圈图(左), 改进法的抑菌圈图(右)

### 2.3 准确性

按产品各成分比例制备不含制霉菌素样品的栓剂 9 组, 投放一定量的制霉菌素标准品, 按 1.3(5) 方法制备, 制备标准品和供试品高低浓度的系列溶液, 用两种方法来测定比较其回收率。厂家方法结果见表 1。实验结果表明: 平均回收率 65.1%, 偏离投入量。改进法结果见表 2, 试验表明: 平均回收率为 100.3%, RSD 为 1.4%, 符合规定。

### 2.4 精密度

取 9 份样品 (同一批号), 按改进法进行效价测定。结果见表 3, RSD 为 1.3%, 与药品质量标准分析方法一般原则的操作要求相符合。

### 2.5 样品测定

取 5 个批号的硝呋太尔制霉菌素阴道栓, 按改进方法对测定其含量, 结果见表 4。可信限率均符合《中华人民

共和国药典》2020年版四部抗生素微生物检定法规定的范围(应不得大于5%)。

表1 厂家方法回收率试验结果(n=9)

相当于标示量 100%	制霉菌素加入量 / mg	制霉菌素测得量 / mg	回收率 /%
80	12.21	7.96	65.2
80	11.98	7.43	62.0
80	11.87	8.49	71.5
100	15.05	8.49	56.4
100	15.01	8.91	59.4
100	14.79	9.75	65.9
120	18.05	12.47	69.1
120	18.23	12.23	67.1
120	17.98	12.46	69.3

表2 改进法回收率试验结果(n=9)

相当于 标示量 /100%	制霉菌素 加入量 / mg	制霉菌素 测得量 / mg	回收率 /%	回收率 平均值 / %	RSD/ %
80	12.11	12.05	99.5		
80	12.03	12.03	100.0		
80	11.56	12.01	103.9		
100	15.02	15.01	99.9		
100	15.12	15.03	99.4	100.3	1.4
100	14.86	14.98	100.8		
120	18.26	18.15	99.4		
120	18.01	18	99.9		
120	17.95	17.92	99.8		

表3 精密度试验结果

含量 /%	可信限率 /%	含量平均值 /%	RSD /%
100.6	3.2		
99.1	4.9		
102.6	4.0		
99.6	3.7		
100.5	4.2	100.7	1.3
101.1	3.5		
98.9	4.1		
101.7	4.3		
102.0	4.1		

表4 样品含量测定结果

批号	含量 /%	可信限率 /%
2304121	100.1	4.2
2304131	97.8	3.7
2304141	95.6	4.9
2307141	96.9	4.6
2307161	101.1	4.7

### 3 讨论与结论

在检验过程中, 抑菌圈模糊导致制霉菌素含量测定无法进行, 影响硝呋太尔制霉菌素阴道栓的生产销售环节, 本文通过查阅文献<sup>[7-10]</sup>, 结合长期的经验积累, 建立了新的实验方法。本研究根据硝呋太尔制霉菌素阴道栓的自身特点, 并结合检定菌的生长特性, 从培养基的加菌量、培养温度及时间、菌层由单层菌层变为底层加菌层等方面对现有方法进行改进, 建立了新的硝呋太尔制霉菌素阴道栓效价测定方法。因啤酒酵母菌的培养温度低, 培养时间长, 抑菌圈容易模糊, 通过增加底层和改变菌层厚度, 从培养基选择、菌悬液、培养时间等方面入手对现有测定方法优化, 严格控制培养时间, 由于制霉菌素的抑菌圈边缘的菌群只是被抑制, 超过最佳培养时间后, 制霉菌素的抑菌力降低, 抑菌圈边缘的菌群继续繁殖, 导致抑菌圈边缘模糊, 改进法中形成的抑菌圈边缘清晰, 提高了结果的准确性, 可供厂家在检验该产品含量测定时的技术参考。

### 参考文献

- [1] 国家食品药品监督管理局. 中华人民共和国药典2020年版四部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [2] 马绪荣, 苏德模. 药品微生物学检验手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [3] 蔡信之, 黄君红. 微生物学实验 [M]. 北京: 科学出版社, 2019.
- [4] 国家药品评审中心. 生物制品质量控制分析方法验证技术评审一般原则 [EB/OL]. (2022-12-26)[2025-02-12]. <https://www.cde.org.cn/zdzyz/domesticinfopage?zdzyzIdCODE=55d24be91d7699353dc65fe76639d21f>.
- [5] 沈振, 丁勃, 孟晓丽, 等. 管碟法测定制霉菌素效价的方法建立及应用 [J]. 中国抗生素杂志, 2023, 48(5): 532-537.
- [6] 李朋朋, 张聪, 杨绒娟, 等. 复方制霉菌素软膏中新霉素微生物检定法研究 [J]. 中国兽药杂志, 2024, 58(8): 21-27.
- [7] 梅芊, 郜继东, 刘英. 影响管碟法测定磷霉素效价中抑菌圈质量的因素分析 [J]. 中国抗生素杂志, 2021, 46(9): 868-872.
- [8] 任仲丽, 张秀花, 王静, 等. 管碟法测定抗生素效价影响因素与控制方法的研究进展 [J]. 中国当代医药, 2020, 27(25): 27-29+33.
- [9] 田胜利. 管碟法测定抗生素效价中的注意事项 [J]. 黑龙江医药, 2008, 21(3): 64.
- [10] 沈佳特. 制霉菌素及其片剂含量测定方法的改进 [J]. 药物分析杂志, 2013, 33(1): 26-29.