

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)22-0081-04  
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.22.018



# 复方甲硝唑阴道栓检验方法探索性研究\*

牛龙青, 张秉华, 衷红梅, 杜亚俊, 周志云

(陕西省食品药品检验研究院, 陕西 西安 710065)

**摘要:**目的 评价国内市售复方甲硝唑阴道栓的质量标准,并对制剂的检验方法进行探索性研究。方法 按原国家食品药品监督管理局国家药品标准[WS-1001-(HD-1483)-2003],对2022年国家抽验样品(2家生产企业,7批产品)中有关物质、释放行为、微生物限度和样品含量进行法定检验,同时进行探索性研究(包括有关物质测定,释放度比较,微生物限度检查方法适用性试验等),综合评价产品质量及现行质量标准对产品质量的可控性。结果 按国家法定标准检验,所有样品均合格。探索性研究结果表明,样品杂质种类、个数与原料药相关,2家生产企业样品杂质检出情况(种类、个数)相近,且均检出已知杂质2-甲基-5-硝基咪唑;但其样品的释放行为存在较大差异,且8,24h平均释放度均较低;微生物限度试验结果均符合要求;含量测定中,国家法定标准选用的紫外-可见分光光度法与本研究中建立的高效液相色谱法试验结果基本一致。结论 目前复方甲硝唑阴道栓质量标准需进一步提高。抽验的2家生产企业均应对其处方工艺进行分析评估,同时对制剂体内生物利用度进行进一步考察。

**关键词:**复方甲硝唑阴道栓;质量评价;药品标准;有关物质;释放行为

## Exploratory Study on the Testing Method of Compound Metronidazole Vaginal Suppositories

NIU Longqing, ZHANG Binghua, ZHONG Hongmei, DU Yajun, ZHOU Zhiyun

(Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an, Shaanxi, China 710065)

**Abstract: Objective** To evaluate the quality standard of commercial Compound Metronidazole Vaginal Suppositories in China, and to conduct exploratory study on the testing method of formulations. **Methods** Samples were selected in 2022 (involving two manufacturing enterprises, seven batches of products) for national statutory testing in related substances, release behavior, microbial limit and metronidazole content based on the national drug standard of the former China Food and Drug Administration [WS-1001-(HD-1483)-2003]. At the same time, the exploratory studies were conducted (including determination of relevant substances, comparison of release rate, suitability test of microbial limit test). The quality of product and the controllability of current quality standard on product quality was comprehensively evaluated. **Results** According to the national statutory standard, all samples were qualified. Exploratory studies showed that the type and number of impurities in the sample were related to the active pharmaceutical ingredients (APIs), and the detection result of impurities (including type and number) in the samples from two manufacturing enterprises was similar, with known impurity of 2-methyl-5-nitroimidazole detected in both enterprises; while there were significant differences in the release behavior of the samples from the two manufacturing enterprises, and the average release rates at 8 h and 24 h were both low; the microbial limit tests of samples from the two manufacturing enterprises both met the requirements; the content determination by the ultraviolet-visible spectrophotometry method in the national statutory standard was basically consistent with that by the high-performance liquid chromatography (HPLC) method established in this study. **Conclusion** The current quality standard for Compound Metronidazole Vaginal Suppositories needs to be further improved. The selected two manufacturing enterprises should analyze and evaluate the prescription processes, and further investigate the *in vivo* bioavailability of the formulations.

**Key words:** Compound Metronidazole Vaginal Suppositories; quality evaluation; drug standard; related substance; release behavior

复方甲硝唑阴道栓适用于治疗滴虫性阴道炎、霉菌性阴道炎、细菌性阴道炎和老年性阴道炎、非特异性阴道炎及支原体感染、淋病双球菌感染等疾病。不良反应主要表现为胃肠道不适、中枢神经系统异常、过敏反应等。当前该药有国内批准文号3个,生产厂家2家,规格为0.45g或3g。现行的《美国药典》《日本药局方》及《中国药典》均收载甲硝唑原料,但均未收载复方甲硝唑阴道栓,各企业均执行原国家食品药品监督管理局国家药品标准[WS-1001-(HD-1483)-2003](下

文简称《标准》),但其自2003年批准至今(截至发稿时)无任何增、修订,已不能满足严格控制药品质量的要求。本研究中按此标准对复方甲硝唑阴道栓样品进行检验,评价该产品的质量现状,并针对发现的问题开展探索性研究,从有效性、安全性角度提出完善制剂质量控制标准的建议。现报道如下。

### 1 仪器、试药与菌株

#### 1.1 仪器

LC-2030 3D型高效液相色谱(HPLC)仪、UV2600型

\*基金项目:陕西省重点研发计划项目[2022SF-455]。

第一作者:牛龙青,女,硕士,主管药师,研究方向为药品检验、质量标准和复核,(电子信箱)1097377048@qq.com。

紫外-可见分光光度(UV)计(日本 Shimadzu 公司); Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); XPE205 型及 ME204 型电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司,精度为 0.01 mg 或 0.1 mg); RC1208D 型溶出度仪(天津市天大天发科技有限公司); MINI-Q IQ 7000 型高纯水机(美国 Millipore 公司); TOMY SX-500 型卧式矩形压力蒸汽灭菌器(上海华成医用核子仪器公司); MJ-250-11 型霉菌培养箱(上海齐欣科学仪器有限公司); BX53 型电子显微镜(日本 Olympus 公司); pH 酸度计(赛多利斯科技 <北京> 有限公司)。

### 1.2 试剂

7 批复方甲硝唑阴道栓样品,均为 2022 年国家抽检样品,涉及 2 家生产企业(企业 1 有 3 批,企业 2 有 4 批),均未提供原辅料;甲硝唑原料药共 5 批,分别来自 5 家企业;2-甲基-5-硝基咪唑对照品(中国食品药品检定研究院,批号为 100191-20180,含量 100.0%);甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

### 1.3 菌株

金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* [CMCC (B) 26003], 铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* [CMCC (B) 10104], 枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* [CMCC (B) 63501], 白色念珠菌 *Candida albicans* [CMCC (F) 98001], 黑曲霉 *Aspergillus niger* [CMCC (F) 98003], 均来自中国医学细菌菌种保藏管理中心。

## 2 方法与结果

### 2.1 法定检验

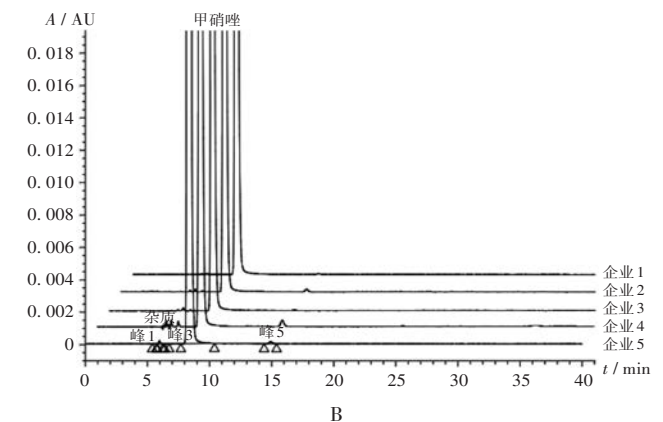
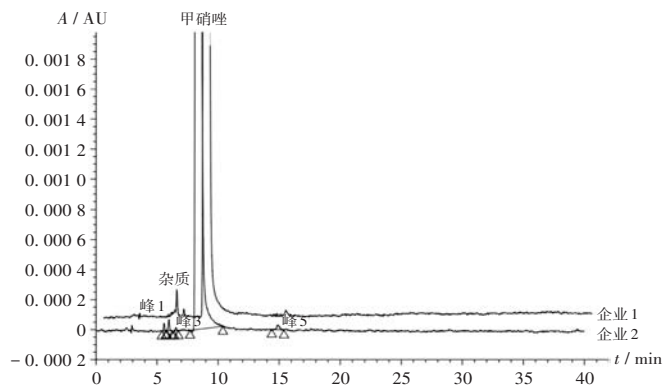
依据前述《标准》,主要检验项目包括性状、鉴别、质(重)量差异、融变时限、微生物限度和含量测定。结果 7 批样品各项目检测结果均合格。

### 2.2 探索性研究

#### 2.2.1 有关物质检测方法建立

参考文献[1-3],经预试验考察优化,确定样品有关物质测定条件为,色谱柱为 Welch Ultimate XB-C<sub>18</sub> 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-水(20:80, V/V);流速为 1.0 mL/min;检测波长为 315 nm;柱温为 30 °C;进样量为 20 μL。测定样品含量时<sup>[4-5]</sup>,将上述条件中检测波长改为 320 nm,进样量改为 10 μL,其余色谱条件不变。依法制备待测溶液,按拟订色谱条件进样测定,记录典型色谱图,详见图 1 和图 2。

按 2020 年版《中国药典(二部)》甲硝唑限度要求,对样品进行有关物质杂质分析,发现 7 批样品均检出甲硝唑已知杂质(2-甲基-5-硝基咪唑),同时检出个别其他单个杂质。2-甲基-5-硝基咪唑按外标法计算,检出范围为 0.002%~0.007%;其他单个最大杂质检出范围为 0.002 6%~0.039%,杂质总量检出范围为



A. 样品 B. 原料药

图 1 甲硝唑有关物质典型色谱图

A. Samples B. APIs

Fig. 1 Typical chromatograms of metronidazole-related substances

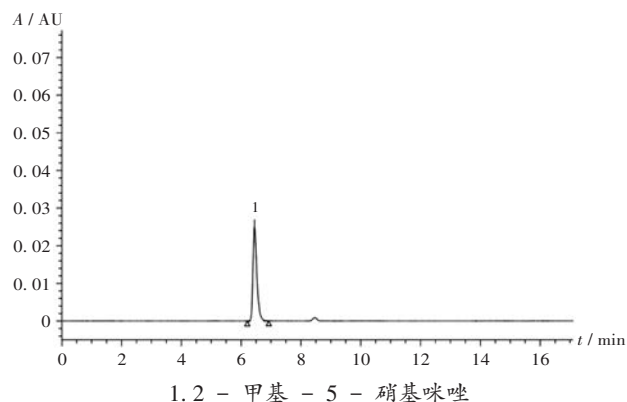


图 2 对照品溶液高效液相色谱图

1.2 - Methyl - 5 - nitroimidazole

Fig. 2 HPLC chromatograms of reference solution

0.004%~0.05%。各企业样品已知杂质、其他单个最大杂质和杂质总量分布较均匀,杂质水平无明显差异。企业 1 的 3 批样品有关物质考察结果显示,总杂质含量稍偏大,其中 1 批样品有关物质杂质考察结果出现离散现象,提示该生产企业的生产工艺可能存在潜在风险。

#### 2.2.2 体外释放试验

根据原国家食品药品监督管理总局药品审评中心(CDE)《局部作用常见阴道制剂(阴道片、阴道栓)仿制

药的评价技术要求(意见通知稿)》(简称《技术要求》),参考文献[6-9],建立样品释放度考察方法,选择2种方法对样品开展体外释放试验研究。2种介质的制备均采用篮法(栓剂专用溶出篮),取乙酸钠1.22 g,加水溶解,然后加入2 mol/L冰醋酸溶液20.5 mL,用水稀释至1 000 mL,摇匀,即得pH 4.0醋酸盐缓冲溶液(介质1);称取磷酸二氢钾0.68 g,加0.1 mol/L氢氧化钠溶液15.2 mL,用水稀释至100 mL,摇匀,即得pH 6.5磷酸盐缓冲溶液(介质2)。取介质1,2各900 mL,转速均为100 r/min,分别模拟正常阴道pH及疾病状态pH。不同介质下样品的释放曲线见图3。

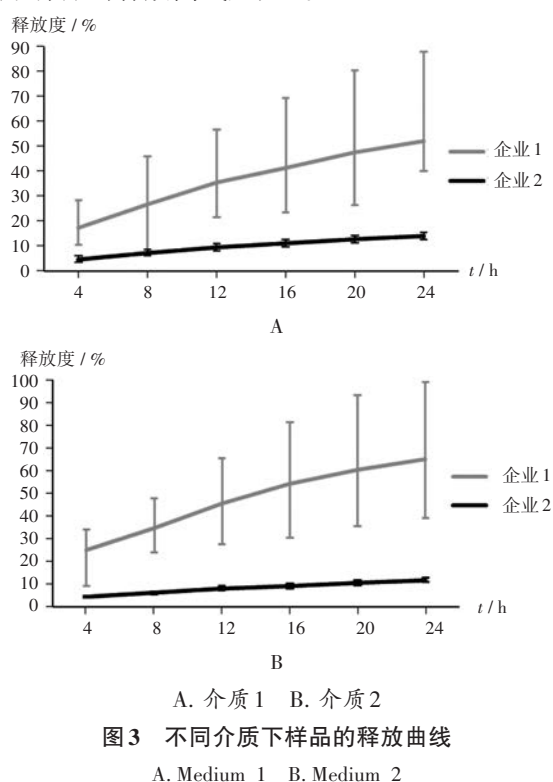


图3 不同介质下样品的释放曲线  
A. Medium 1 B. Medium 2

Fig. 3 Release profiles of samples under different media

可知,企业1在2种介质中的释放度均优于企业2样品。其中,企业1样品在介质1环境下,8 h及24 h平均释放度分别为27%,52%,在介质2环境下分别为35%和65%;企业2的4批样品在介质1环境下分别为7%和15%,介质2环境下分别为6%和12%(按药典要求保留有效值,下同)。考虑到人体胃部和阴道环境差异较大,阴道体液量较少且蠕动幅度和频率也远不如胃部,在转速100 r/min条件下,2家企业样品释放度仍明显过低。

此外,还用3种固体制剂体外释放模型<sup>[10-11]</sup>对样品释放度的考察结果进行了数学模型拟合<sup>[12-13]</sup>,拟合结果见表1。可见,不同批次样品用不同释放模型拟合的结果基本一致,Weibull分布和Riger-Peppas方程拟合结果较好, $R^2$ 多在0.99左右。

表1 样品释放度拟合结果

Tab. 1 Results of release rate fitting of samples

生产企业	样品序号	模型方程	拟合方程	$R^2$
企业1	1	Weibull分布	$M_t = 46.7265(1 - e^{-0.076t})$	0.9948
		Higuchi方程	$M_t = 5.2078t^{1/2} + 4.9333$	0.9736
		Riger-Peppas方程	$M_t = 6.2251t^{0.59}$	0.9943
	2	Weibull分布	$M_t = 29.7785(1 - e^{-0.099t})$	0.9863
		Higuchi方程	$M_t = 3.3476t^{1/2} + 8.8111$	0.9274
		Riger-Peppas方程	$M_t = 5.4766t^{0.51}$	0.9645
	3	Weibull分布	$M_t = 114.3986(1 - e^{-0.060t})$	0.9877
		Higuchi方程	$M_t = 12.09t^{1/2} + 18.989$	0.9919
		Riger-Peppas方程	$M_t = 11.6375t^{0.64}$	0.9992
企业2	1	Weibull分布	$M_t = 17.7450(1 - e^{-0.076t})$	0.9865
		Higuchi方程	$M_t = 1.9571t^{1/2} + 3.9556$	0.9846
		Riger-Peppas方程	$M_t = 2.4115t^{0.58}$	0.9991
	2	Weibull分布	$M_t = 15.0315(1 - e^{-0.079t})$	0.9776
		Higuchi方程	$M_t = 1.6571t^{1/2} + 3.5333$	0.9875
		Riger-Peppas方程	$M_t = 2.1516t^{0.57}$	0.9991
	3	Weibull分布	$M_t = 18.8316(1 - e^{-0.060t})$	0.9900
		Higuchi方程	$M_t = 1.9952t^{1/2} + 3.0444$	0.9902
		Riger-Peppas方程	$M_t = 1.8783t^{0.65}$	0.9994
	4	Weibull分布	$M_t = 15.1276(1 - e^{-0.079t})$	0.9931
		Higuchi方程	$M_t = 1.6905t^{1/2} + 3.4444$	0.9696
		Riger-Peppas方程	$M_t = 2.1134t^{0.58}$	0.9914

### 2.3 微生物限度检查方法适用性试验

依据2020年版《中国药典(四部)》附录“微生物限度检查标准”要求,样品的微生物检验指标为需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数,采用中和-薄膜过滤-分膜法,检验不同厂家样品两指标的回收比,公式为,回收比=(试验组菌落数-供试品对照组菌落数)/菌液对照组菌落数,比值在0.5~2.0范围内即为方法有效。控制菌栓剂为金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和白色念珠菌<sup>[14-16]</sup>。采用中和培养基稀释法进行了控制菌检查方法适用性试验,分别设立试验组、阳性组和阴性组,革兰染色镜检,前两组均应检出3种控制菌,阴性组应无任何菌落生长。

结果所有供试品中,需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数均符合规定,均未检出大肠埃希菌。

### 2.4 含量测定

采用建立的HPLC法和《标准》中的UV法分别测定各批样品含量,结果含量均值分别为99.8%和99.5%,基本一致。

## 3 讨论

### 3.1 杂质来源

将样品的检出杂质与5家甲硝唑原料生产企业的原料有关物质考察结果进行比较,发现杂质种类、个数

基本一致,说明样品生产过程中基本不会引入其他工艺杂质。根据《技术要求》,应重点研究制剂的降解产物,包括原料药的降解产物或原料药与辅料和/或内包材的反应产物,分析原料药降解途径,结合样品有关物质的考察结果,2家生产企业均检出已知杂质2-甲基-5-硝基咪唑和其他单个杂质,建议2家生产企业对样品的有关物质进行控制,以更好地控制制剂质量。

### 3.2 释放度考察

试验中发现,2家生产企业样品的释放度均过低。Riger-Peppas方程可用来描述固体制剂药物的释放机制,公式中释放指数( $n$ )是表征释放机制的特征参数,当 $n \leq 0.45$ 时,为Fick扩散;当 $0.45 < n < 0.89$ 时,药物释放机制为non-Fick扩散(Anomalous Transport),即为骨架溶蚀与药物扩散共同控制的释药机制;当 $n \geq 0.89$ 时,为骨架溶蚀机制。样品用Riger-Peppas方程拟合,各批次样品释放指数均在 $\geq 0.45 \sim < 0.89$ 范围内,拟合结果表明,样品属骨架溶蚀与药物扩散共同控制的释药机制。

### 3.3 含量测定方法考察

本研究中测定样品含量时发现,采用HPLC法测定的同一生产企业样品含量结果误差范围较大,分析原因可能是该法既是物质的分离方式,也是物质的检测方式,实际上是先将不同物质分离,然后将分离的单一物质进行紫外光谱检测分析,因此其灵敏度更高,试验结果干扰更小。此外,本研究中发现2种方法测得的生产企业1的样品含量结果均高于生产企业2,且前者2种方法测定结果的误差范围均小于后者,这与前者释放度均优于后者的考察结果一致,均提示生产企业2工艺生产可能存在一定问题。

### 3.4 小结

阴道炎是妇科常见的炎性反应疾病,其临床表现为阴道瘙痒、白带异常、泌尿系统刺激征。患者如不能得到及时有效的治疗,可加重病情,影响生殖功能。年轻和更年期妇女阴道上皮薄,细胞内糖原减少和雌激素缺乏,阴道pH约为7,抵抗力较弱,易造成感染。复方甲硝唑阴道栓可提高患者阴道壁的弹性,对阴道细胞有良好的保护作用,其主要成分甲硝唑能有效抑制细菌,杀死滴虫。老年阴道炎患者雌激素水平及阴道黏膜弹性下降,使用复方甲硝唑阴道栓治疗,既能治疗阴道炎,又能降低不良反应发生率,具有较高的应用价值。

复方甲硝唑阴道栓是我国治疗阴道炎特有的复方制剂,研究发现,影响制剂质量的因素主要有以下几方面:一是原料药质量(有关物质),原料药中杂质的量直接决定制剂中杂质的量;二是处方与生产工艺关系到制剂的释放(溶出)情况。药物的吸收取决于药物从制剂中的溶出或释放、在生理条件下的溶解及在作用部位的渗透,而

药物的溶出和溶解对吸收具有重要影响。释放度是活性药物成分在规定条件下从制剂中溶出的速率和程度,其可考察药品批间质量的一致性,并提示可能的体内生物利用度问题,考察结果显示,2家生产企业样品的释放度均严重过低,且存在较大的批间差异和批内差异,反映出2家生产企业生产工艺均存在不同程度的问题。

综上所述,目前复方甲硝唑阴道栓总体质量较好,但国内2家生产企业样品均存在不同程度的生产工艺问题,建议生产企业对复方甲硝唑阴道栓的处方进行更深入的研究,确定更合理的处方工艺,特别是对样品体内生物利用度进行进一步考察。此外,该制剂为复方制剂,但现行标准仅对甲硝唑含量等进行了相关控制,建议提高质量标准,进一步提高药品质量。

### 参考文献

- [1] 刘文文. 甲硝唑栓剂的质量标准研究[D]. 长春:吉林大学, 2019.
- [2] 陈美玲,许红霞,袁伟峰,等. 甲硝唑光降解杂质的研究及对药典有关物质方法的优化建议[J]. 药物分析杂志, 2022, 42(9):1667-1674.
- [3] 向东,杨志勇,何建武,等. 甲硝唑有关物质测定及杂质谱研究[J]. 药学导报, 2017, 36(3):308-311.
- [4] 王海红,骆瑛. 高效液相色谱法测定复方甲硝唑栓中甲硝唑及诺氟沙星的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(1):79-80.
- [5] 刘菲,张扬,沈君,等. 高效液相色谱法测定甲硝唑栓的含量[J]. 中国药品标准, 2001, 2(3):44-45.
- [6] 曾衍霖. 对生物利用度指导原则的意见[J]. 中国临床药理学杂志, 1993, 9(1):55-58.
- [7] 刘鸿琴,景永奎,魏玉武,等. 甲硝唑栓剂释放度及兔体内生物利用度的实验研究[J]. 中国医院药学杂志, 1986, 6(10):440-442.
- [8] 付莉娜. 难溶性药物体外溶出评价及溶出度方法的建立[D]. 杭州:浙江大学, 2014.
- [9] 何心,石春伟,张闯,等. 复方甲硝唑缓释栓的制备及体外释放度考察[J]. 中国药房, 2011, 22(9):834-836.
- [10] 叶玉杰,任德全,刘嵩,等. Origin软件拟合溶蚀型载体药物传输系统的Ritger-Peppas方程研究[J]. 亚太传统医药, 2014, 10(4):62-63.
- [11] 羊臻,王浩,侯惠民. 药剂学研究中常用的数学软件[J]. 中国医药工业杂志, 2006, 37(3):205-213.
- [12] 陈贤春,吴清,王玉蓉,等. 关于溶出曲线比较和评价方法[J]. 中国医院药学杂志, 2007, 27(5):662-664.
- [13] 林亚平,董芸. 药物释放研究中的数学模型及选择程序[J]. 贵阳中医学院学报, 1994, 16(3):8-9.
- [14] 陆蓓,凌明,赵建英. 几种栓剂的微生物限度检查法的验证[J]. 西北药学杂志, 2006, 21(3):121-122.
- [15] 陆蓓,凌明,赵建英. 栓剂的微生物限度检查法的验证[J]. 中国药事, 2006, 20(3):167-168.
- [16] 冯璐,曹敏,钮晓淑,等. 甲硝唑凝胶微生物限度检查方法适用性研究[J]. 中国药业, 2022, 31(18):69-72.

(收稿日期:2022-11-09;修回日期:2023-05-10)