

· 研究报告 ·

## 硝酸甘油软膏的无菌检查方法学验证

檀巧婷, 严佳, 钟桂香, 宋洪涛 (南京军区福州总医院药学科, 福建 福州 350025)

**[摘要]** **目的** 建立硝酸甘油软膏的无菌检查方法, 并对方法进行验证。**方法** 取预热至 45 °C 的供试品 10 支 (15 g/支), 每支称取 1 g, 加至含溶化的司盘 80、聚山梨酯 80 无菌混合物和无菌玻璃珠的锥形瓶中, 振摇混匀后, 加入 45 °C 的 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨水缓冲液至 100 ml, 使供试品充分乳化。按薄膜过滤法, 细菌、真菌每膜用 300 ml pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗, 消除抑菌活性。**结果** 经方法验证, 硝酸甘油软膏供试品组、阴性对照组均无菌生长, 试验组各滤器中试验菌与相应对照组比较均生长良好, 说明供试品在该检验量和检验条件下无抑菌作用或其抑菌作用可以忽略不计。**结论** 薄膜过滤法有效可行, 可用于硝酸甘油软膏的无菌检查。

**[关键词]** 硝酸甘油软膏; 无菌检查; 方法学验证

**[中图分类号]** R943

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1006-0111(2015)03-0253-02

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2015.03.016

## Validation for sterility test method of nitroglycerin ointment

TAN Qiaoting, YAN Jia, ZHONG Guixiang, SONG Hongtao (Department of Pharmacy, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Region, Fuzhou 350025, China)

**[Abstract]** **Objective** To establish and validate a method of sterility test for nitroglycerin ointment and validate this method. **Methods** Ten nitroglycerin ointments of 1 g were preheated oven to 45 °C for sample, and added to conical flask which containing melted span 80, polysorbate 80 sterile mixture and sterile glass beads, and were shake after mixing, the sample fully emulsified by adding to 100 ml 45 °C pH 7.0 sterile sodium chloride-peptone water buffer. According to the method of membrane filtration, bacteria and fungus in each membrane with 300 ml pH 7.0 sterile sodium chloride-peptone water buffer flush, the bacteriostatic activity was eliminated. **Results** By the method validation, nitroglycerin ointment sample group, negative control group were sterile growth, and test group in each filter of the test bacteria compared with control groups were growing well, so the samples had no inhibitory effect or the antimicrobial effect would not take into account. **Conclusion** Membrane filtration was reliable, which could be used for sterility test for nitroglycerin ointment.

**[Key words]** nitroglycerin ointment; sterility test; validation of the method

硝酸甘油软膏主要成分为硝酸甘油, 能直接松弛平滑肌, 对胆碱能及肾上腺素能神经支配的平滑肌均有作用, 以松弛血管平滑肌作用最强, 尤其是小血管平滑肌。据文献报道<sup>[1-4]</sup>, 硝酸甘油软膏对于治疗肛裂、痔疮等具有较好的疗效。我科自制的硝酸甘油软膏, 主要用于治疗肛裂及缓解与肛裂有关的症状, 也可用于痔疮治疗, 是一种血管扩张类药物, 按照《中国药典》2010年版附录规定, 用于烧伤或严重创伤的软膏剂应进行无菌检查, 并对方法进行验证, 以保证该方法的可靠性。因此, 笔者按规定对硝酸甘油软膏无菌检查方法进行研究, 并进行验证。

### 1 仪器与材料

**1.1 仪器** GHP-9160 型隔水式电热恒温培养箱 (上海一恒科技有限公司)、DHG-9145A 型电热恒温鼓风干燥箱 (上海一恒科技有限公司)、SW-CJ-1B 型净化工作台 (苏州净化设备厂)、MJPS-150 型霉菌培养箱 (上海精宏实验设备有限公司)、WJ-6 无菌检测仪 (天津市罗根科技有限公司)、LDZX-40KBS 型立式压力蒸汽灭菌器 (上海申安医疗器械厂)。

**1.2 试验菌种** 试验用菌分别是: 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) [CMCC (B) 26003] (第 3 代); 生孢梭菌 (*Clostridium sporogenes*) [CMCC (B) 64941] (第 4 代); 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) [CMCC (B) 63501] (第 3 代); 白念珠菌 (*Candida albicans*) [CMCC (F) 98001] (第 4 代); 黑曲霉 (*Aspergillus niger*) [CMCC (F) 98003] (第 3 代);

**[作者简介]** 檀巧婷, 药师, 研究方向: 药物分析, Tel: (0591) 22859963; E-mail: tqt-010@163.com

**[通讯作者]** 宋洪涛, 博士, 主任药师, 博士生导师, Tel: (0591) 22859459; E-mail: sohott@vip.163.com

铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) [CMCC (F)10104] (第 3 代), 均由福建省食品药品检验所提供。

**1.3 培养基及稀释液** 本次试验所用到的营养肉汤培养基 (批号 120417)、营养琼脂培养基 (批号 121224)、玫瑰红钠琼脂培养基 (批号 130221)、改良马丁培养基 (批号 1211282)、胆盐乳糖培养基 (批号 1204192)、甘露醇氯化钠琼脂培养基 (批号 111201)、溴化十六烷基三甲胺琼脂培养基 (批号 131124) 和 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 (批号 1212132) 均由北京三药科技开发公司提供。

**1.4 样品** 硝酸甘油软膏 (规格 15 g : 30 mg), 由南京军区福州总医院药学科制剂室提供。

## 2 方法与结果

### 2.1 菌液制备

**2.1.1** 接种金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌的新鲜培养物至营养肉汤培养基中, 接种生孢梭菌的新鲜培养物至硫乙醇酸盐流体培养基中, 经 30~35 °C 培养 18~24 h 后, 分别取上述培养物 1 ml+9 ml 0.9% 无菌氯化钠溶液, 10 倍稀释至  $10^{-6} \sim 10^{-7}$ , 细菌数为 50~100 CFU/ml, 做活菌计数备用。

**2.1.2** 接种白念珠菌的新鲜培养物至改良马丁培养基中, 经 23~28 °C 培养 24~48 h 后, 取白念珠菌液体培养物 1 ml+9 ml 0.9% 无菌氯化钠溶液, 10 倍稀释至  $10^{-4} \sim 10^{-7}$ , 细菌数为 50~100 CFU/ml, 做活菌计数备用。

**2.1.3** 接种黑曲霉的新鲜培养物至改良马丁琼脂斜面培养基中, 经 23~28 °C 培养 5~7 d 后, 取黑曲霉斜面培养物, 加 3~5 ml 0.9% 无菌氯化钠溶液将孢子洗脱, 吸出孢子悬液 1 ml+9 ml 0.9% 无菌氯化钠溶液, 10 倍稀释至  $10^{-4} \sim 10^{-7}$ , 细菌数为 50~100 CFU/ml, 做活菌计数备用。

**2.2 供试液制备** 取预热至 45 °C 的供试品 10 支, 每支称取 1 g, 加至含溶化的 (温度不超过 45 °C) 5 g 司盘 80、10 g 聚山梨酯 80 无菌混合物和无菌玻璃珠的锥形瓶中, 剧烈振摇, 混匀后, 慢慢加入 45 °C 的 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨水缓冲液至 100 ml, 边加边振摇, 使供试品充分乳化。

**2.3 供试液取样量** 每株验证菌检验量为 10 支。

**2.4 方法验证实验 (薄膜过滤法)** 金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、生孢梭菌、白念珠菌、黑曲霉菌: 取制备好的供试液注入滤筒中, 按薄膜过滤法过滤, 用 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲

液约 300 ml 冲洗, 每次 100 ml, 分次振摇冲洗, 在最后一次冲洗液中加入小于 100 CFU 的试验菌, 过滤, 将培养基 100 ml 加至滤筒中; 另一个滤筒加入同体积培养基及等量的试验菌, 作为阳性对照, 并做阴性对照, 按规定温度培养 3~5 d, 逐日观察。各试验菌同法操作。实验结果见表 1。

表 1 无菌检查验证试验结果

菌株	试验组 (t/d)					阳性对照组 (t/d)				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
金黄色葡萄球菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
铜绿假单胞菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
枯草芽孢杆菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
生孢梭菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
白念珠菌	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
黑曲霉	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
阴性对照组	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
供试品组	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注: 试验菌均生长良好

## 3 讨论

**3.1** 在检验量为 10 支, 每支取 1 g, 每片膜冲洗量为 100 ml×3 次的条件下, 样品对金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、生孢梭菌、白念珠菌、黑曲霉无抑菌作用。

**3.2** 硝酸甘油软膏在含供试品各管中的试验菌均生长良好, 并且与阳性对照试管内的培养结果相似, 则供试品的检验量在该条件下无抑菌活性或抑菌活性消除, 可采用薄膜过滤法进行无菌检查。

**3.3** 硝酸甘油软膏为淡黄色半固体状外用制剂, 是以凡士林为油脂性基质, 因此本文采用稀释剂稀释、保温至 45 °C 振摇混匀, 并加入司盘 80、聚山梨酯 80, 增加供试品分散性, 使供试品充分乳化均匀, 避免油性基质等细小颗粒在薄膜过滤过程中堵塞滤膜<sup>[5]</sup>。

## 【参考文献】

- [1] 山院飞, 冯六泉, 张晓元, 等. 硝酸甘油软膏联合创灼膏治疗肛裂疗效观察[J]. 人民军医, 2011, 54(3): 209-210.
- [2] 徐毅. 硝酸甘油软膏加扩肛与单纯扩肛治疗 96 例对照观察[J]. 结直肠肛门外科, 2012, 18(3): 182-183.
- [3] 张倩, 林银花, 王娟, 等. 硝酸甘油软膏的制备与质量控制[J]. 医药导报, 2010, 29(6): 768-770.
- [4] 孔婵. 复方硝酸甘油软膏和九华膏治疗早期肛裂的疗效对比[J]. 西部医学, 2009, 21(9): 1540-1541.
- [5] 吴鑫, 陈希, 鄢雷娜. 盐酸特比萘芬乳膏微生物限度检查法的方法学研究[J]. 中国药事, 2013, 27(1): 48-64.

[收稿日期] 2014-04-23 [修回日期] 2014-09-24

[本文编辑] 顾文华