

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2025)04-0076-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2025.04.018



孟鲁司特钠片微生物限度检查方法适用性研究

郑露¹, 周剑², 陈洁^{2△}

(1. 重庆医药高等专科学校, 重庆 401331; 2. 重庆市食品药品检验检测研究院·国家药品监督管理局麻醉精神药品质量监测重点实验室, 重庆 401121)

摘要:目的 建立孟鲁司特钠片的微生物限度检测方法。方法 按2020年版《中国药典(四部)》通则1105、1106要求,分别采用薄膜过滤法和稀释法及常规法对需氧菌总数及霉菌和酵母菌总数计数,控制菌(大肠埃希菌)检查采用常规法。结果 需氧菌总数检查用1:100(m/V)供试液,采用薄膜过滤法(500 mL/膜)。常规法中,样品对金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌有较强抑菌作用,阳性菌回收率均小于0.5;薄膜过滤法和稀释法中,样品对以上菌的回收率均大于0.5,对白色念珠菌、黑曲霉无明显抑菌作用,阳性菌回收率大于0.5;样品对控制菌无明显抑制作用。结论 需氧菌检查宜采用薄膜过滤法;霉菌和酵母菌总数计数及控制菌检查均可采用常规法。

关键词: 孟鲁司特钠片;微生物限度;薄膜过滤法;稀释法

Study on the Applicability of Microbial Limit Test for Montelukast Sodium Tablets

ZHENG Lu¹, ZHOU Jian², CHEN Jie²

(1. Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing, China 401331; 2. Chongqing Institute for Food and Drug Control · NMPA Key Laboratory of Quality Monitoring of Anaesthetic and Psychotropic Substances, Chongqing, China 401121)

Abstract: Objective To establish a microbial limit test method for Montelukast Sodium Tablets. **Methods** Based on the

第一作者: 郑露, 女, 硕士研究生, 工程师, 研究方向为食品药品微生物检验, (电子信箱)386557782@qq.com。

△通信作者: 陈洁, 女, 大学本科, 主管药师, 研究方向为药品微生物检验, (电子信箱)3288538@qq.com。

- cancer invasiveness [J]. Cancer Res, 2005, 65 (6) : 2125 - 2129.
- [8] ZHAO YG, ZHAO H, MIAO L, et al. The p53 - induced gene Ei24 is an essential component of the basal autophagy pathway[J]. J Biol Chem, 2012, 287(50):42053 - 42063.
- [9] YUAN L, WANG H, LIU Q, et al. Etoposide - induced protein 2.4 functions as a regulator of the calcium ATPase and protects pancreatic beta - cell survival[J]. J Biol Chem, 2018, 293(26) : 10128 - 10140.
- [10] TIAN Y, LI Z, HU W, et al. C. elegans screen identifies autophagy genes specific to multicellular organisms[J]. Cell, 2010, 141(6):1042 - 1055.
- [11] MOELLER A, ASK K, WARBURTON D, et al, The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2008, 40(3):362 - 382.
- [12] JACK CJ, JACKSON MI, JOHNSTON ID, et al, Serum indicators of free radical activity in IPF [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1996, 153(6):1918.
- [13] OLDHAM JM, MA SF, MARTINEZ FJ, et al. TOLLIP, MUC5B, and the Response to N - Acetylcysteine among Individuals with Idiopathic Pulmonary Fibrosis [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2015, 192(12):1475 - 1482.
- [14] MEI Q, LIU Z, ZUO H, et al. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: An Update on Pathogenesis [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 797292.
- [15] MOELLER A, ASK K, WARBURTON D, et al. The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2008, 40(3):362 - 382.
- [16] HADDADI GH, REZAEYAN A, MOSLEH - SHIRAZI MA, et al. Hesperidin as Radioprotector against Radiation - induced Lung Damage in Rat: A Histopathological Study [J]. J Med Phys, 2017, 42(1):25 - 32.
- [17] PEREZ - VARGAS JE, ZARCO N, SHIBAYAMA M, et al. Hesperidin prevents liver fibrosis in rats by decreasing the expression of nuclear factor - kappaB, transforming growth factor - beta and connective tissue growth factor [J]. Pharmacology, 2014, 94(1/2):80 - 89.
- [18] BONNANS C, CHOU J, WERB Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15(12):786 - 801.
- [19] WANG X, GAO JL, ZHAO MM, et al. Therapeutic effects of conditioned medium from bone marrow - derived mesenchymal stem cells on epithelial - mesenchymal transition in A549 cells [J]. Int J Mol Med, 2018, 41(2) : 659 - 668.
- [20] CHOI JM, DEVKOTA S, SUNG YH, et al. EI24 regulates epithelial - to - mesenchymal transition and tumor progression by suppressing TRAF2 - mediated NF - kappaB activity [J]. Oncotarget, 2013, 4(12):2383 - 2396.

(收稿日期: 2023 - 12 - 04; 修回日期: 2024 - 11 - 14)

requirements of general rules 1105 and 1106 of the *Chinese Pharmacopoeia* (2020 Edition, Volume IV), the total count of aerobic bacteria and the total count of molds and yeasts were tested by the membrane filtration + convention and dilution methods, respectively, the control bacteria (*Escherichia coli*) were tested by the conventional methods. **Results** The total count of aerobic bacteria was tested by a 1:100 (m/V) test solution and membrane filtration method (500 mL / membrane). In the conventional method, the samples had a strong antibacterial effect on *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis*, and the recovery ratio of positive bacteria was lower than 0.5. In both membrane filtration and dilution methods, the recovery rate of the above bacteria in the samples was greater than 0.5; samples had no significant antibacterial effect on *Candida albicans* and *Aspergillus niger*, and the recovery rate of positive bacteria was greater than 0.5. Samples had no significant inhibitory effect on the control bacteria. **Conclusion** Membrane filtration method is suitable for aerobic bacterial test; conventional methods can be used for mold and yeast counting and control bacteria test.

Key words: Montelukast Sodium Tablets; microbial limit; membrane filtration method; dilution method

孟鲁司特钠为白三烯受体拮抗剂,口服给药后可抑制白三烯产生的炎性反应,减缓流涕、鼻塞等不适,是治疗儿童过敏性鼻炎和哮喘的常用药^[1]。2020年版《中国药典(四部)》通则1105、1106^[2]规定,对其微生物限度检查时要有必要的方法适用性试验^[3]。而查询相关文献,未见对孟鲁司特钠的微生物检验方法的报道。鉴于此,本研究中进行了孟鲁司特钠微生物限度方法的适用性试验。现报道如下。

1 仪器、试剂与菌株

1.1 仪器

QUINTIX612-1CN型电子天平(梅特勒托利多仪器<上海>有限公司,精度为0.01 g);SHH-250LD型生化培养箱(重庆四达实验仪器公司);HVA-110型高压蒸汽灭菌器(日本Hirayama公司);HFsafe-1200型生物安全柜(上海力申科学仪器有限公司)。

1.2 试剂

孟鲁司特钠片(某厂,批号分别为MOE21001, MOE21002, MOE21003,规格均为每片10 mg);胰酪大豆胨液体培养基(批号为211009)、胰酪大豆胨琼脂培养基(批号为2208012)、沙氏葡萄糖琼脂培养基(批号为220221)、沙氏葡萄糖液体培养基(批号为201013)、麦康凯液体培养基(批号为220217)、麦康凯琼脂培养基(批号为201229)、0.1%蛋白胨水溶液(批号为2106032)、pH 7.0氯化钠-蛋白胨缓冲液(批号为220314),均购自北京三药科技有限公司。

1.3 试验菌株

金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003]、铜绿假单胞菌[CMCC(B)101043]、枯草芽孢杆菌[CMCC(B)63501]、白色念珠菌[CMCC(F)98001]、黑曲霉[CMCC(F)98003]、大肠埃希菌[CMCC(B)44102],均购自中国食品药品检定研究院。

2 方法与结果

2.1 需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数计数方法学验证

2.1.1 溶液制备

菌液:35℃条件下培养金黄色葡萄球菌、枯草芽孢

杆菌、铜绿假单胞菌24 h,25℃条件下培养白色念珠菌48 h。取液体培养物各适量,分别用0.9%无菌氯化钠溶液稀释为含菌 $10^3 \sim 10^4$ cfu/mL菌悬液,作活菌计数备用。25℃条件下培养黑曲霉6 d,取培养物适量,加入含0.05%聚山梨酯80的0.9%无菌氯化钠溶液,洗脱孢子,吸出悬液(用管口带有薄的无菌棉花或纱布过滤菌丝的无菌毛细吸管)至无菌试管内,用0.9%无菌氯化钠溶液制成含菌 $10^3 \sim 10^4$ cfu/mL的孢子悬液。

供试液:取样品10 g,加pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至100 mL,混匀,作为1:10供试液。

2.1.2 试验方法

试验组:方法1^[4-7],取1:10供试液9.9 mL,加入0.1 mL含菌 $10^3 \sim 10^4$ cfu/mL的菌悬液,使每1 mL供试液含菌量不大于100 cfu,混匀,静置5 min^[4-7],取上清液1 mL,加入平皿中,立即倒入琼脂培养基,凝固后置规定温度(需氧菌35℃、3 d,霉菌和酵母菌25℃、5 d;下同)培养,计数。方法2,取1:10供试液10 mL,加pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至100 mL,混匀,制成1:100供试液,静置5 min,取上清液1 mL,置100 mL 0.1%无菌蛋白胨水溶液,经薄膜滤过,用0.1%无菌蛋白胨水溶液冲洗5次(每次100 mL),在最后一次冲洗液中加入含菌量不大于100 cfu的试验菌,将膜贴于平板,置规定温度培养,计数。

菌液组:以稀释液代替供试液,同试验组操作,置规定温度培养,计数。

供试液对照组:取供试液适量,分别按试验组方法1,2制备,以稀释液替代菌液同试验组操作,置规定温度培养。

稀释剂对照组:取稀释液100 mL,加入适宜浓度的菌悬液以达到试验组含菌浓度,静置5 min,取上层液体,同供试液对照组操作。

阴性对照组:取稀释液替代供试液和菌液,同试验组操作。

回收率计算:根据不同组含菌数计算,公式为,回收率=(试验组含菌数-供试液对照组含菌数)/菌液

组含菌数(各试验菌回收率应在 0.5~2 范围内)。供试液对照组、阴性对照组同;2.2 项同。

2.1.3 结果

结果见表 1 和表 2(两表中“/”均为未检出)。

表 1 需氧菌总数回收率试验结果

Tab.1 Results of recovery test for total count of aerobic bacterial

菌种名称	批号	方法	含菌量(cfu)			试验组 回收率	阴性对照组	
			试验组	菌液组	供试液对照组		含菌量(cfu)	回收率
金黄色葡萄球菌	MOE21001	方法1	0	78	0	0	/	/
		方法2	60	70	0	0.86	67	0.96
	MOE21002	方法1	0	76	0	0	/	/
		方法2	64	72	0	0.89	70	0.97
	MOE21003	方法1	0	83	0	0	/	/
		方法2	66	75	0	0.88	71	0.95
铜绿假单胞菌	MOE21001	方法1	22	65	0	0.34	/	/
		方法2	55	61	0	0.90	58	0.95
	MOE21002	方法1	24	69	0	0.35	/	/
		方法2	56	63	0	0.89	59	0.94
	MOE21003	方法1	23	66	0	0.35	/	/
		方法2	54	59	0	0.92	57	0.97
枯草芽孢杆菌	MOE21001	方法1	0	63	0	0	/	/
		方法2	57	61	0	0.93	58	0.95
	MOE21002	方法1	0	66	0	0	/	/
		方法2	55	60	0	0.92	56	0.93
	MOE21003	方法1	0	67	0	0	/	/
		方法2	58	64	0	0.91	60	0.94
白色念珠菌	MOE21001	方法1	62	66	0	0.94	/	/
		方法2	56	60	0	0.93	58	0.97
	MOE21002	方法1	62	67	0	0.93	/	/
		方法2	67	73	0	0.92	68	0.93
	MOE21003	方法1	62	65	0	0.95	/	/
		方法2	52	57	0	0.91	54	0.95
黑曲霉	MOE21001	方法1	60	63	0	0.95	/	/
		方法2	53	57	0	0.93	54	0.95
	MOE21002	方法1	54	59	0	0.92	/	/
		方法2	52	54	0	0.96	53	0.98
	MOE21003	方法1	52	55	0	0.95	/	/
		方法2	53	58	0	0.91	56	0.97

2.2 控制菌大肠埃希菌方法适用性试验

2.2.1 菌液制备

35℃条件下以胰酪大豆胨液体培养基培养大肠埃希菌 24 h,取培养物适量,用 0.9% 无菌氯化钠溶液稀释为每 1 mL 含菌不大于 100 cfu 的菌悬液。

2.2.2 试验方法

试验组:取 2.1.1 项下 1:10 供试液 10 mL 与大肠埃希菌菌悬液 1 mL,同时置 100 mL 胰酪大豆胨液体培养基中,按 2020 年版《中国药典(四部)》通则 1106 微生物

限度检查法(控制菌检查:大肠埃希菌检查方法)检查。

菌液组、供试液对照组、阴性对照组:取稀释液,分别替代菌液、供试液及同时替代,后续均同试验组操作。

2.2.3 结果

结果见表 3(“-”为无菌生长;“+”为试验菌生长良好)。

表 2 霉菌、酵母菌总数回收率试验结果

Tab.2 Results of recovery test for total count of molds and yeasts

菌种名称	批号	方法	含菌量(cfu)			试验组 回收率	阴性对照组	
			试验组	菌液组	供试液对照组		含菌量(cfu)	回收率
白色念珠菌	MOE21001	方法1	62	66	0	0.94	/	/
		方法2	56	62	0	0.9	57	0.92
	MOE21002	方法1	61	64	0	0.95	/	/
		方法2	54	58	0	0.93	56	0.97
	MOE21003	方法1	54	59	0	0.92	/	/
		方法2	53	56	0	0.95	54	0.96
黑曲霉	MOE21001	方法1	55	60	0	0.92	/	/
		方法2	53	57	0	0.93	54	0.95
	MOE21002	方法1	56	59	0	0.95	/	/
		方法2	49	53	0	0.92	50	0.94
	MOE21003	方法1	51	56	0	0.91	/	/
		方法2	47	52	0	0.9	48	0.92

表 3 大肠埃希菌检测验证试验结果

Tab.3 Results of verification test of Escherichia coli test

样品批号	试验组	菌液组	供试液对照组	阴性对照组
MOE21001	+(18 h)	+(18 h)	-	-
MOE21002	+(18 h)	+(18 h)	-	-
MOE21003	+(18 h)	+(18 h)	-	-

3 讨论

本研究结果显示,孟鲁司特钠对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌有较强抑制作用,对铜绿假单胞菌有一定抑制作用,因此,在检测该药品的需氧菌总数时不宜采用常规法。而方法 2 对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌和黑曲霉的回收率均大于 0.85,因此在检测该种药品需氧菌总数时应采用方法 2+薄膜过滤法。孟鲁司特钠对白色念珠菌和黑曲霉无抑菌作用或作用较弱,2 种方法的回收率均在 0.90 以上,因此在检测该种药品霉菌、酵母菌总数时应采用常规法。采用常规法检测时未见孟鲁司特钠对控制菌(大肠埃希菌)有抑菌作用,可检测得出正确结论。

查阅相关文献可知,对于有抑菌作用的样品,还可采用离心集菌^[8]的方式消除抑菌作用。但采用该方法存在损耗样品中微生物的可能性^[9],且在 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液中呈混悬状态,影响结果观察。因此,在对样品的预处理中,采用静置^[10]后取上清液的方法