

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2025)02-0073-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2025.02.016



2种人工唾液抑菌剂用量筛选与抑菌效力研究

卢锦华, 苏畅, 赵万钧

(深圳南粤药业有限公司, 广东 深圳 518110)

摘要:目的 探讨人工唾液中抑菌剂苯甲酸钠和山梨酸的合理用量。方法 根据2020年版《中国药典(四部)》通则1121抑菌效力检查法,以金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、白色念珠菌和黑曲霉为试验菌株,进行菌落计数方法适用性试验,建立人工唾液抑菌效力检查方法。以抑菌剂的组合及添加量为考察因素,抑菌效力为评价指标,采用2因素4水平制备16份处方样品,筛选抑菌剂的合理添加量。结果 苯甲酸钠0.1%和山梨酸0.075%联合使用对人工唾液中各种微生物生长繁殖均有良好抑制作用,且为最低有效剂量,故作为该人工唾液产品的抑菌剂配比用量。结论 所筛选的抑菌剂用量可为后期工业化生产提供依据。

关键词:人工唾液;抑菌效力;剂量筛选;苯甲酸钠;山梨酸

Dosage Screening and Antibacterial Efficacy of Two Bacteriostatic Agents in Artificial Saliva

LU Jinhua, SU Chang, ZHAO Wanjun

(Shenzhen Nanyue Pharmaceutical Co., Ltd., Shenzhen, Guangdong, China 518110)

Abstract: Objective To investigate the rational addition dosage of bacteriostatic agents sodium benzoate and sorbic acid in artificial saliva. **Methods** Based on the general rule 1121 antibacterial efficacy test of the *Chinese Pharmacopoeia* (2020 Edition, Volume IV), a suitability test for colony counting method was conducted with *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, and *Aspergillus niger* as test strains to establish a method for testing the antibacterial efficacy of artificial saliva. With the combination and addition dosage of bacteriostatic agents as the investigation factors, and with antibacterial efficacy as the evaluation indicator, 16 prescription samples were prepared based on two factors and four levels to screen for the rational addition dosage of bacteriostatic agents. **Results** The combination of 0.1% sodium benzoate and 0.075% sorbic acid exhibited a good inhibitory effect on the growth and reproduction of various microorganisms in artificial saliva, which was the lowest effective dosage and chosen as the rational addition dosage of bacteriostatic agents for this artificial saliva product. **Conclusion** The screened bacteriostatic agent dosage can provide a basis for later industrial production.

Key words: artificial saliva; antibacterial efficacy; dosage screening; sodium benzoate; sorbic acid

人工唾液属3.2类新药,用于缓解由肖格伦氏综合征(干燥综合征)引起的口腔干燥症,以及由于头颈部放射线照射导致唾液腺损害引起的口腔干燥症。人工唾液是通过科学的方法人为配制的一种化学成分类似于人唾液的溶液^[1-4]。国内在此产品开发前也有相关研究,临床常用于口眼干燥症的治疗^[5-6],可用于检测接触人口的物体所使用耐唾沫测试的基础性研究,基于日本帝人株式会社Saliveht® Aerosol的处方及工艺的该

款产品填补了国内同类产品的空白^[7-8]。Saliveht® Aerosol采用苯甲酸钠和山梨酸作为抑菌剂,说明书和相关资料中并无抑菌剂具体用量的说明。苯甲酸钠和山梨酸为常用的口服制剂抑菌剂,目前国内外对人工唾液的抑菌效力研究报道甚少,对其中抑菌剂合理添加量及复配抑菌效果更是鲜有报道。为此,本研究中采用正交试验法考察这两种抑菌剂质量分数及配比对抑菌效力的影响,以确定人工唾液抑菌剂用量。现报道如下。

第一作者:卢锦华,男,硕士研究生,研究方向为药物制剂生产工艺,(电子信箱)2349612@qq.com。

究进展[J].食品工业科技,2023,44(1):420-428.

[7] 梁杉,王琨,刘佩瑶,等.山药多糖结构、生物活性及其机制研究进展[J].食品科学,2022,43(23):296-304.

[8] 尹倩薇,涂沛楠,谢保城.尿囊素的药理作用机制研究进展[J].现代药物与临床,2022,37(12):2897-2901.

[9] 樊靓,汤尚文,余海忠,等.山药中尿囊素研究进展[J].现代农业科技,2015(3):308.

[10] 季宇彬.中药有效成分药理与应用[M].北京:人民卫生出版社,2011:6.

[11] 乔宇,廖李,汪兰,等.不同山药品种尿囊素含量的

测定[J].湖北农业科学,2014,53(22):5528-5530.

[12] 汤属凌,兰海娟,邹慧龙.复方尿囊素乳膏中尿囊素的含量测定[J].药物鉴定,2008,17(1):22-23.

[13] 丁志军,李小兰,付志媛.高效液相色谱法测定复方尿囊素乳膏中尿囊素的含量[J].药品评价,2021,18(17):1050-1052.

[14] 杨恩慈,王晓园,李志梅,等.温州产山药中尿囊素及重金属含量的测定[J].中医药导报,2023,29(2):54-58.

[15] 陈玉龙,荀英,孙晓,等.高效液相色谱法测定小儿生血糖浆中尿囊素含量[J].中国药业,2022,31(17):58-60.

(收稿日期:2023-12-23;修回日期:2024-09-07)

1 材料与amp;方法

1.1 材料

仪器:ME204型电子分析天平(瑞士Mettler Toledo公司,精度为0.1 mg);DHP-9272型电热恒温培养箱,LRH-250型生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);LX-150L型电热压力灭菌器(合肥华泰医疗设备有限公司);SX-BHC-1000B2型生物安全柜(苏州苏信环境科技有限公司)。

试剂:氯化钠(批号为01210902)、氯化钾(批号为02210902)、氯化钙(批号为03210533)、氯化镁(批号为04201102),均购自天津海光药业有限公司;羟丙甲纤维素(美国Down公司,批号为D180j15u002);山梨酸(湖南尔康制药有限公司,批号为10370210801);苯甲酸钠(武汉有机实业有限公司,批号为C02202107002)。

培养基和稀释液:胰酪大豆蛋白胨液体培养基(批号为220314)、胰酪大豆蛋白胨琼脂培养基(批号为220406)、沙氏葡萄糖琼脂培养基(批号为210929)、沙氏葡萄糖液体培养基(批号为210430),均购自北京陆桥生物技术有限公司;pH 7.0氯化钠蛋白胨缓冲液(笔者自制)。

菌种:金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003]、铜绿假单胞菌[CMCC(B)10104]、大肠埃希菌[CMCC(B)44102]、白色念珠菌[CMCC(F)98001]、黑曲霉菌[CMCC(F)98003],均购自中国食品药品检定研究院医学菌种保藏中心。

1.2 方法

1.2.1 溶液制备

人工唾液:取处方量氯化钠、氯化钾、氯化钙、氯化镁、羟丙甲纤维素及辅料,16组,分别按表1添加山梨酸、苯甲酸钠,制备16组样品各1 kg。

表1 人工唾液处方中抑菌剂添加量

Tab.1 Addition dosage of bacteriostatic agents in the prescription of artificial saliva

山梨酸 (m/m)	苯甲酸钠(m/m)			
	0	0.05%	0.1%	0.15%
0	处方1	处方2	处方3	处方4
0.05%	处方5	处方6	处方7	处方8
0.075%	处方9	处方10	处方11	处方12
0.1%	处方13	处方14	处方15	处方16

菌液:取铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、白色念珠菌各适量,洗脱琼脂表面的培养物,并将菌悬液移至无菌试管内,用0.9%无菌氯化钠溶液稀释并制成含菌数约为 1×10^8 cfu/mL的菌悬液^[9]。取黑曲霉的新鲜培养物,适量加入3~5 mL含0.05%聚山梨酯80的0.9%无菌氯化钠溶液,洗脱孢子,吸出孢子悬

液,至无菌试管内,加入适量含0.05%聚山梨酯80的0.9%无菌氯化钠溶液制成含孢子数 1×10^8 cfu/mL的孢子悬液。

供试液:分别于无菌条件下取样品10.0 g,加入90 mL pH 7.0的无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液中,将样品溶液混匀,作为1:10供试液。

1.2.2 计数方法适用性试验

采用平皿法。分组及处理如下。

菌液对照组:取pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液10 mL,共5份,分装到5根无菌试管中,分别接种1.2.1项下5种试验菌液0.1 mL,混匀,使稀释液中含菌量 ≤ 100 cfu,取1 mL,注入平皿,采用平皿计数法,测定其活菌数。

供试品对照组:分别移取1:10供试液1 mL,置平皿中,测定供试品本底的细菌、霉菌和酵母菌数。

阴性对照组:分别移取pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液1 mL,置平皿中,作为细菌、霉菌和酵母菌数测定的阴性对照组。

试验组:取1.2.1项下制备好1:10的供试液10 mL,共5份,分别置5支无菌试管中,分别加入1.2.1项下5种试验菌液,混匀,使稀释液中含菌量 ≤ 100 cfu/mL。注入平皿中,测定供试品的细菌数、霉菌和酵母菌数。

菌液菌落计数:取0.9%氯化钠溶液各50 mL,分别加入试验菌液适量,混匀,分别稀释至一定倍数,各取1 mL进行平皿计数。各稀释梯度平行制备2个平皿。上述各组已注入供试液的平皿,细菌计数加入胰酪大豆琼脂培养基20 mL,待凝固后置33℃条件下培养3 d;霉菌和酵母菌计数加入沙氏葡萄糖琼脂培养基20 mL,混匀,待凝固后,置25℃条件下培养5 d,观察结果。回收率(%) = (试验组菌落数 - 供试品对照组菌落数) / 菌液对照组菌落数 $\times 100\%$ 。

1.2.3 抑菌效力测定方法

供试品制备:参照2020年版《中国药典(四部)》通则1121抑菌效力检查法,根据2因素(苯甲酸钠、山梨酸)、4水平设计16个处方样品,并对样品进行抑菌效力测定。根据经过适用性试验的存活菌数测定方法(参照2020年版《中国药典(四部)》通则1105)测定14 d和28 d时样品的菌落数。

供试品接种:取样品5份,每份50 g,直接接种菌种,每瓶对应1种试验菌,1 g样品接种菌量 $10^5 \sim 10^6$ cfu,充分混合,置20~25℃条件下避光保存。

存活菌测定:按14 d和28 d时间间隔,分别从每个容器中取样品1 g,测定样品中的菌落数,测定细菌及真菌分别采用胰酪大豆琼脂培养基及沙氏葡萄糖琼脂培养基。

抑菌效力判定标准:按2020年版《中国药典(四部)》通则1121(口服制剂、口腔黏膜制剂)标准判定。

2 结果

结果见表2至表4。

表2 样品菌液计数结果

Tab. 2 Results of bacterial counting in samples

试验菌株	金黄色	铜绿假	大肠	白色	黑曲霉
	葡萄球菌	单胞菌	埃希菌	念珠菌	
稀释倍数	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ³	10 ⁴
平均含菌数(1/2 \bar{X} , cfu)	196/182/189	120/136/128	179/165/172	118/109/114	105/116/111
菌液浓度(cfu/g)	1.89 × 10 ⁶	1.28 × 10 ⁶	1.72 × 10 ⁶	1.14 × 10 ⁵	1.11 × 10 ⁶
菌数lg值	6.28	6.11	6.24	5.06	6.05

可见,不含抑菌剂的处方1, 14 d、28 d的菌落数无明显变化,说明无抑菌效力。处方2-4仅含苯甲酸钠,苯甲酸钠的质量分数依次递增,14 d时细菌、真菌的菌落数减少的lg值均小于标准规定值,均不符合规定。处方5, 9, 13中仅含山梨酸,山梨酸质量分数依次递增,14 d时细菌的菌落数减少的lg值均随抑菌剂的质量分数升高而增大,但是对真菌均无明显抑菌作用且真菌菌落数减少的lg值均小于0.68,不符合规定。使用单种抑菌剂时,山梨酸抑菌剂效力优于苯甲酸钠。处方6-16是苯甲酸钠和山梨酸联合使用,其中,处方11-12、处方15-16均可达到抑菌效果,但从安全性角度考虑,选择含防腐剂量最少的处方11(苯甲酸钠0.1%,山梨酸0.075%)作为最优处方。

3 讨论

苯甲酸钠和山梨酸钾均属酸性防腐剂^[10],防腐最佳的pH为2.5~4.0,当食品pH>4时,防腐效果逐渐

表4 不同处方不同时间各试验菌含量减少的lg值[lg(cfu/g)]

Tab. 4 Decreased logarithm of test bacterial count in samples with different prescriptions and at different time [lg(cfu/g)]

处方	金黄色葡萄球菌		铜绿假单胞菌		大肠埃希菌		白色念珠菌		黑曲霉	
	14 d	28 d	14 d	28 d	14 d	28 d	14 d	28 d	14 d	28 d
1	-0.01	-0.10	-0.01	0.02	-0.01	0.03	-0.01	-0.01	0.01	-0.01
2	0.11	0.10	0.03	-0.01	0.20	-0.10	0.00	0.02	0.07	-0.01
3	0.28	0.10	0.20	-0.02	0.21	0.01	0.13	0.01	0.02	0.03
4	1.20	-0.02	1.07	0.02	1.25	-0.10	0.23	-0.02	0.29	-0.02
5	0.45	-0.10	0.28	-0.12	0.18	-0.10	0.07	-0.01	0.04	0.02
6	0.92	-0.09	1.03	-0.11	0.88	0.02	0.19	-0.02	0.21	0.13
7	1.55	-0.10	1.43	-0.02	1.22	-0.02	0.41	-0.05	0.25	0.03
8	1.77	0.10	2.11	-0.03	1.69	0.06	0.59	-0.10	0.38	-0.02
9	2.06	-0.01	2.00	-0.04	1.92	-0.03	0.65	-0.03	0.59	-0.02
10	2.05	0.01	2.07	0.02	2.11	-0.03	0.55	0.01	0.70	-0.02
11	3.17	-0.03	3.18	0.07	3.12	0.01	1.12	-0.01	1.17	0.02
12	3.28	0.30	3.40	0.04	3.15	0.05	1.19	-0.02	1.08	0.04
13	2.48	0.10	1.88	0.08	2.84	-0.03	0.45	0.01	0.68	0.10
14	2.51	0.20	1.85	0.20	3.05	0.20	0.61	0.10	0.79	0.30
15	4.87	-0.11	3.43	0.60	3.28	0.20	1.22	0.10	1.22	0.10
16	5.28	-0.14	3.91	1.00	3.47	0.60	1.38	0.20	1.29	0.12

减弱^[11]。防腐剂发挥抑菌作用依赖于酸性条件下抑菌剂分子透过细胞膜,干扰细胞膜,抑制细胞内的呼吸酶,进而抑制微生物繁殖^[12]。苯甲酸钠的毒副作用较大,是山梨酸及其钾盐的5倍,而抑菌效果仅为山梨酸的1/5~1/10。虽然山梨酸钾能强抑制腐败菌和霉菌的生长,在空气中较稳定,在食品保鲜和饲料中的应用

表3 各处方样品菌数测定结果[cfu/g(lg值)]

Tab. 3 Results of bacterial counting in samples with different prescriptions [cfu/g(logarithm)]

处方	金黄色葡萄球菌		铜绿假单胞菌		大肠埃希菌		白色念珠菌		黑曲霉	
	14 d	28 d	14 d	28 d	14 d	28 d	14 d	28 d	14 d	28 d
1	1.95 × 10 ⁶ (6.29)	1.55 × 10 ⁶ (6.19)	1.32 × 10 ⁶ (6.12)	1.38 × 10 ⁶ (6.14)	1.78 × 10 ⁶ (6.25)	1.90 × 10 ⁶ (6.28)	1.17 × 10 ⁵ (5.07)	1.15 × 10 ⁵ (5.06)	1.10 × 10 ⁶ (6.04)	1.07 × 10 ⁶ (6.03)
2	1.48 × 10 ⁶ (6.17)	1.86 × 10 ⁶ (6.27)	1.20 × 10 ⁶ (6.08)	1.17 × 10 ⁶ (6.07)	1.10 × 10 ⁶ (6.04)	8.70 × 10 ⁵ (5.94)	1.15 × 10 ⁵ (5.06)	1.20 × 10 ⁵ (5.08)	9.50 × 10 ⁵ (5.98)	9.30 × 10 ⁵ (5.97)
3	1.00 × 10 ⁶ (6.00)	1.26 × 10 ⁶ (6.10)	8.10 × 10 ⁵ (5.91)	7.80 × 10 ⁵ (5.89)	1.07 × 10 ⁶ (6.03)	1.10 × 10 ⁶ (6.04)	0.85 × 10 ⁵ (4.93)	8.70 × 10 ⁴ (4.94)	1.07 × 10 ⁶ (6.03)	1.15 × 10 ⁶ (6.06)
4	1.20 × 10 ⁶ (5.08)	1.15 × 10 ⁵ (5.06)	1.10 × 10 ⁵ (5.04)	1.15 × 10 ⁵ (5.06)	9.80 × 10 ⁴ (4.99)	7.80 × 10 ⁴ (4.89)	6.80 × 10 ⁴ (4.83)	6.50 × 10 ⁴ (4.81)	5.80 × 10 ⁵ (5.76)	5.50 × 10 ⁵ (5.74)
5	6.80 × 10 ⁵ (5.83)	5.40 × 10 ⁵ (5.73)	6.80 × 10 ⁵ (5.83)	5.10 × 10 ⁵ (5.71)	1.15 × 10 ⁶ (6.06)	9.10 × 10 ⁵ (5.96)	9.80 × 10 ⁴ (4.99)	9.50 × 10 ⁴ (4.98)	1.02 × 10 ⁶ (6.01)	1.07 × 10 ⁶ (6.03)
6	2.30 × 10 ⁵ (5.36)	1.85 × 10 ⁵ (5.27)	1.20 × 10 ⁵ (5.08)	9.30 × 10 ⁴ (4.97)	2.30 × 10 ⁵ (5.36)	2.40 × 10 ⁵ (5.38)	7.40 × 10 ⁴ (4.87)	7.10 × 10 ⁴ (4.85)	6.90 × 10 ⁵ (5.84)	9.30 × 10 ⁵ (5.97)
7	5.40 × 10 ⁴ (4.73)	4.30 × 10 ⁴ (4.63)	4.80 × 10 ⁴ (4.68)	4.60 × 10 ⁴ (4.66)	1.05 × 10 ⁵ (5.02)	1.00 × 10 ⁵ (5.00)	4.50 × 10 ⁴ (4.65)	4.00 × 10 ⁴ (4.60)	6.30 × 10 ⁵ (5.80)	6.80 × 10 ⁵ (5.83)
8	3.20 × 10 ⁴ (4.51)	4.00 × 10 ⁴ (4.60)	1.00 × 10 ⁴ (4.00)	9.30 × 10 ³ (3.97)	3.55 × 10 ⁴ (4.55)	4.10 × 10 ⁴ (4.61)	2.95 × 10 ⁴ (4.47)	2.35 × 10 ⁴ (4.37)	4.70 × 10 ⁵ (5.67)	4.50 × 10 ⁵ (5.65)
9	1.65 × 10 ⁴ (4.22)	1.60 × 10 ⁴ (4.20)	1.30 × 10 ⁴ (4.11)	1.40 × 10 ⁴ (4.15)	2.10 × 10 ⁴ (4.32)	1.95 × 10 ⁴ (4.29)	2.60 × 10 ⁴ (4.41)	2.45 × 10 ⁴ (4.39)	2.90 × 10 ⁵ (5.46)	2.75 × 10 ⁵ (5.44)
10	1.70 × 10 ⁴ (4.23)	1.75 × 10 ⁴ (4.24)	1.10 × 10 ⁴ (4.04)	1.15 × 10 ⁴ (4.06)	1.35 × 10 ⁴ (4.13)	1.25 × 10 ⁴ (4.10)	3.20 × 10 ⁴ (4.51)	3.25 × 10 ⁴ (4.51)	2.25 × 10 ⁵ (5.35)	2.15 × 10 ⁵ (5.53)
11	1.30 × 10 ³ (3.11)	1.20 × 10 ³ (3.08)	8.50 × 10 ² (2.93)	1.00 × 10 ³ (3.00)	1.32 × 10 ³ (3.12)	1.35 × 10 ³ (3.13)	8.70 × 10 ³ (3.94)	8.50 × 10 ³ (3.93)	7.60 × 10 ⁴ (4.88)	7.90 × 10 ⁴ (4.90)
12	1.00 × 10 ³ (3.00)	2.00 × 10 ³ (3.30)	5.10 × 10 ² (2.71)	5.60 × 10 ² (2.75)	1.23 × 10 ³ (3.09)	1.10 × 10 ³ (3.04)	7.40 × 10 ³ (3.87)	7.10 × 10 ³ (3.85)	9.30 × 10 ⁴ (4.97)	1.02 × 10 ⁵ (5.01)
13	6.30 × 10 ³ (3.80)	7.90 × 10 ³ (3.90)	1.70 × 10 ⁴ (4.23)	2.05 × 10 ⁴ (4.31)	2.50 × 10 ³ (3.40)	2.35 × 10 ³ (3.37)	4.10 × 10 ⁴ (4.61)	4.20 × 10 ⁴ (4.62)	2.35 × 10 ⁵ (5.37)	2.95 × 10 ⁵ (5.47)
14	5.90 × 10 ³ (3.77)	9.30 × 10 ³ (3.97)	1.80 × 10 ⁴ (4.26)	2.90 × 10 ⁴ (4.46)	1.55 × 10 ³ (3.19)	2.45 × 10 ³ (3.39)	2.80 × 10 ⁴ (4.45)	3.55 × 10 ⁴ (4.55)	1.80 × 10 ⁵ (5.26)	3.60 × 10 ⁵ (5.56)
15	26(1.41)	20(1.30)	4.80 × 10 ² (2.68)	1.90 × 10 ³ (3.28)	9.10 × 10 ² (2.96)	1.45 × 10 ³ (3.16)	6.90 × 10 ³ (3.84)	8.70 × 10 ³ (3.94)	6.80 × 10 ⁴ (4.83)	8.50 × 10 ⁴ (4.93)
16	11(1.04)	8(0.90)	1.60 × 10 ² (2.20)	1.60 × 10 ³ (3.20)	5.90 × 10 ² (2.77)	2.35 × 10 ³ (3.37)	4.80 × 10 ³ (3.68)	7.60 × 10 ³ (3.88)	5.80 × 10 ⁴ (4.76)	7.60 × 10 ⁴ (4.88)