



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111184749 B

(45) 授权公告日 2023. 10. 03

(21) 申请号 202010095646.8

A61K 35/745 (2015.01)

(22) 申请日 2020.02.17

A61K 35/741 (2015.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61P 27/16 (2006.01)

申请公布号 CN 111184749 A

A61F 11/00 (2022.01)

(43) 申请公布日 2020.05.22

(56) 对比文件

(73) 专利权人 上海城建职业学院

CN 101014351 A, 2007.08.08

地址 201415 上海市奉贤区南亭公路2080号

CN 108004189 A, 2018.05.08

WO 2019180748 A1, 2019.09.26

(72) 发明人 王春华 尚胜美 韦德祥 左迪

曲瑞丹 唐鹤宸 王文纨

郝小燕;赵卫;曹虹;龙敏;张文炳;黄胜和. 益生菌对肠道致病菌肠粘附抑制作用. 中国公共卫生. 2010, (12), 全文.

(74) 专利代理机构 南京苏高专利商标事务所

(普通合伙) 32204

杨隽,潘喜华,郑勇英,董妙珠,肖萍,叶于薇,仲伟鉴. 益生菌制剂的保健功能评价. 上海预防医学杂志. 2000, (02), 全文.

专利代理师 柏尚春

审查员 张希兰

(51) Int. Cl.

A61M 31/00 (2006.01)

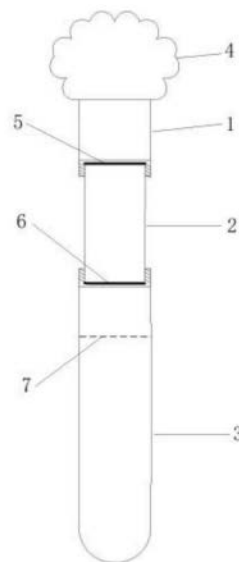
权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54) 发明名称

一种益生菌菌剂、棉签及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种益生菌菌剂、棉签及其制备方法和应用。所述益生菌菌剂包含表皮葡萄球菌和棒状双歧杆菌,所述棉签包含所述益生菌菌剂和干冰。该益生菌菌剂和棉签制备方法简单,菌剂制备成粉末形式,可以有效保持菌剂的活菌数;该棉签采用分体设计,益生菌菌粉和干冰分隔保存,临用现混,有效保留了益生菌菌剂的活性,使用方便,可灵活调整用药剂量。该棉签采用耳道给药,干冰升华可使益生菌深入耳道深处,使益生菌在更深处定植,作用更直接有效,起效迅速。



1. 一种益生菌棉签,其特征在于,所述益生菌棉签包含益生菌菌剂、干冰、纤维、柱体、第一内衬覆膜、第二内衬覆膜和栅板,所述柱体分为上柱体(1)、中柱体(2)和下柱体(3),均为中空结构,上柱体(1)和中柱体(2)、中柱体(2)和下柱体(3)通过螺纹旋转结合;上柱体(1)上端缠绕有纤维(4);中柱体(2)内盛有所述益生菌菌剂,所述益生菌菌剂被中柱体(2)上端设置的第一内衬覆膜(5)和下端设置的第二内衬覆膜(6)密封于中柱体(2)中;下柱体(3)内盛有干冰,下柱体(3)上端设置有栅板(7);所述益生菌棉签含有1~10%的益生菌菌剂和90~99%的干冰;所述益生菌菌剂由表皮葡萄球菌和棒状双歧杆菌组成,表皮葡萄球菌为表皮葡萄球菌CGMCC 1.4260,棒状双歧杆菌为棒状双歧杆菌CGMCC 1.2279,所述棒状双歧杆菌的活菌数为总菌数的60~80%,表皮葡萄球菌的活菌数为总菌数的20~40%,所述益生菌菌剂的总菌数不低于 10^7 cfu。

2. 根据权利要求1所述的益生菌棉签,其特征在于,所述栅板的孔径不超过1mm。

3. 一种权利要求1-2任一所述的益生菌棉签的制备方法,包括以下步骤:

- (1) 分别对权利要求1中的表皮葡萄球菌和棒状双歧杆菌进行培养;
- (2) 分别将上述益生菌冻干获得相应益生菌冻干粉;
- (3) 分别将步骤(2)制备的益生菌冻干粉粉碎、过筛;
- (4) 将步骤(3)过筛后的各个益生菌菌粉混合,制备得到益生菌菌剂;
- (5) 将步骤(4)制备的益生菌菌剂灌装入棉签中柱体,进行密封;
- (6) 将纤维缠绕在棉签上柱体上端,在下柱体装入干冰和栅板,各柱体组合即得。

4. 根据权利要求3所述的益生菌棉签的制备方法,其特征在于,步骤(3)中过筛目数为80目。

5. 一种权利要求1-2任一所述的益生菌棉签在制备治疗耳道疾病产品中的应用。

一种益生菌菌剂、棉签及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种益生菌菌剂、棉签及其制备方法和应用,尤其涉及一种可制备为治疗耳道疾病药物的益生菌菌剂及其制备方法和应用,还涉及一种可用于治疗耳道疾病的棉签及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 正常菌群存在于宿主与外界相通的部位,外耳道存在着大量正常菌群,它们之间相互制约,维持耳道皮肤的酸性环境(pH3-5),发挥营养、拮抗、免疫等生理作用。在对老人耳道菌群结果分析表明,听力正常的老年人与老年性耳聋患者相比,老年性耳聋患者的微生态菌群的数量更少,这也是引发炎症的原因之一,科学观点认为,正常菌群对耳道健康和功能都有一定的影响。

[0003] 耳道炎症是在儿童中普遍多发性疾病,从儿童耳炎患者耳道中分离发现, G^+ 球菌是主要致病菌,由于其对青霉素及红霉素均有较高的耐药性,使得抗生素治疗成为两难的选择。临床CSOM抗生素(急性发作时全身应用抗生素)的应用大多为经验性用药,无循证医学证据,特别是中耳乳突粘膜下血管瘢痕纤维化,必须大量用药才能达到有效浓度,但是大量长期用药不仅使致病菌产生了耐药性,有益菌和中性菌也被破坏,所以CSOM治疗效果并不理想,而大剂量或长期使用广谱抗生素及机体免疫功能下降等,使耳道菌群失衡,又会引发炎症的发生,从而恶性循环。另一方面,大剂量使用抗生素可损害第八对脑神经,从而引发大量的耳科疾病,包括眩晕、平衡失调和耳鸣等。这些对耳科器官具有毒性的药物也称为耳毒性药物,主要包括氨基糖苷类抗生素、大环内脂类抗生素、酰胺醇类抗生素等。抗生素类药物滥用物除了肝肾毒性,还会引发耳部疾病,重则导致失聪。

发明内容

[0004] 发明目的:本发明的第一目的是提供一种易于保存和使用方便的益生菌菌剂;第二目的是提供一种作用更直接和显著的益生菌棉签;第三目的是提供一种所述益生菌菌剂、棉签的制备方法;第四目的是提供所述益生菌菌剂在制备治疗耳道疾病药物中的应用;第五目的是提供所述益生菌棉签在治疗耳部疾病中的应用。

[0005] 技术方案:本发明的益生菌菌剂包含表皮葡萄球菌和棒状双歧杆菌。

[0006] 优选,所述棒状双歧杆菌的活菌数为总菌数的60~80%,表皮葡萄球菌的活菌数为总菌数的20~40%。

[0007] 优选,所述益生菌菌剂的总菌数不低于 10^7 cfu。

[0008] 其中,表皮葡萄球菌的活菌数为 $10^7 \sim 10^{11}$ cfu,棒状双歧杆菌的活菌数为 $10^7 \sim 10^{11}$ cfu。

[0009] 益生菌定植在人体内,通过调节宿主粘膜与系统免疫功能或通过调节菌群平衡保证微生态平衡。益生菌在粘膜表面定植,包括吸附在表面和膜受体上,降解粘性蛋白并利用这种内源性营养保持数量稳定,这样可以起到更好的代谢和免疫调节作用。另外,黏附的益

生菌与粘膜表面发生相互作用,可以有效地刺激免疫反应,并通过竞争排斥作用,把病原菌从耳道上皮排斥出去。益生菌可通过免疫调节、竞争抑制、重建菌群屏障等恢复耳道健康,减缓外耳道炎症。

[0010] 本发明的表皮葡萄球菌和棒状双歧杆菌均为人体表面优势菌种,对人体安全无害,可长期使用。

[0011] 本发明的益生菌棉签包含益生菌菌剂、干冰、纤维、柱体、内衬覆膜和栅板,所述柱体分为上柱体、中柱体和下柱体,均为中空结构,上柱体和中柱体、中柱体和下柱体通过螺纹旋转结合;上柱体上端缠绕有纤维;中柱体内盛有所述益生菌菌剂,所述益生菌菌剂被中柱体上端设置的内衬覆膜和下端设置的内衬覆膜密封于中柱体中;下柱体内盛有干冰,下柱体上端设置有栅板。

[0012] 优选,以质量分数计所述益生菌棉签含有1~10%的所述益生菌菌剂和90~99%的干冰。

[0013] 优选,所述栅板的孔径不超过1mm。

[0014] 本发明采用“以菌治菌”的方法,通过益生菌菌剂增加有益菌群,抑制拮抗有害菌,对于耳科炎症的防治和愈后康复都有一定的疗效。本发明通过特定装置,利用干冰颗粒升华作用,将益生菌带入耳道深处,干冰升华形成的气雾有助于益生菌气溶胶的形成和迁移,干冰本身所带来的清凉感也有助于皮肤的降温,给患者带来舒适感。干冰挥发从耳道逸出,不增加耳道内的废物积累。家用和商用的干冰颗粒制作机已较为普遍,干冰的获得也较为容易。

[0015] 内衬覆膜为纸塑复合膜、铝塑复合膜或特种纸,隔气隔水,当气体压力达到一定压力,也可自行破裂,利于气体逸出。益生菌棉签平时采用冷冻保存,若因意外断电或其他原因储藏环境变化,干冰也能冲破内衬覆膜,从上柱体释放出来,不至于炸开。

[0016] 本发明的益生菌棉签采用分体设计,分开储存各组分,可临用现混,也可预装好干冰,将组合包贮藏于冷冻室。有效保留了益生菌菌剂的活性,还可以灵活调整剂量,使用方便。

[0017] 本发明的益生菌滴剂的制备方法,包括以下步骤:

[0018] (1) 益生菌培养;

[0019] (2) 益生菌冻干;

[0020] (3) 将步骤(2)制备的益生菌冻干粉粉碎、过筛;

[0021] (4) 将步骤(3)过筛后的各益生菌菌粉混合,制备得到益生菌菌剂;

[0022] (5) 将步骤(4)制备的益生菌菌剂灌装入棉签中柱体,进行密封;

[0023] (6) 将纤维缠绕在棉签上柱体上端,在下柱体装入干冰和栅板,各柱体组合即得。

[0024] 优选,步骤(3)中过筛目数为80目。

[0025] 经过80目筛分,所得益生菌菌粉的粒度利于各菌粉之间均匀混合,并且该粒度更利于益生菌黏附定植,发挥疗效。

[0026] 本发明的益生菌菌剂在制备治疗耳道疾病药物中的应用。

[0027] 本发明的益生菌棉签在治疗耳道疾病中的应用。

[0028] 所述耳道疾病为耳道菌群失衡导致的耳鸣、耳涨、耳痛,以及外耳道炎症、中耳道炎症等疾病。

[0029] 有益效果:与现有技术相比,本发明具有如下显著优点:

[0030] (1) 益生菌菌剂所含菌种安全可靠,可长期使用,菌剂制备成粉末形式利于储藏,货架期稳定;

[0031] (2) 棉签采用分体设计,分开储存各组分,可临用现混,也可预装好组合包装,方式灵活,可有效保留益生菌菌剂的活性,还可灵活调整剂量,使用方便;

[0032] (3) 制备方法简便易行,原材料易得;

[0033] (4) 采用耳道给药,可使益生菌在耳道上有效定植,起效迅速,作用更直接有效,所用菌株活菌数更少,治疗效果更显著。

附图说明

[0034] 图1为本发明的结构示意图;

[0035] 图2为大鼠鼓膜的电耳镜图,其中图2(A)为大鼠正常鼓膜的电耳镜图,图2(B)为模型组大鼠的电耳镜图,图2(C)为模型组大鼠使用本发明的益生菌棉签后的鼓膜电耳镜图。

具体实施方式

[0036] 下面结合实施例对本发明的技术方案作进一步说明。

[0037] 实验材料:

[0038] 表皮葡萄球菌为表皮葡萄球菌CGMCC 1.4260,棒状双歧杆菌为棒状双歧杆菌CGMCC 1.2279,菌株均购于中国普通微生物菌种保藏管理中心;培养基为MARS培养基,购于青岛海博;脱脂棉购于国药集团,干冰颗粒购于上海冰夏干冰销售配送公司。

[0039] 实验设备:

[0040] MIR-253升华培养箱(日本Sanyo公司),GFL002恒温水浴箱(德国GFL公司),GL10MA冷冻离心机(盐城凯特公司),TF-SFD冷冻冻干机(上海田枫实业)。

[0041] 实施例1:益生菌棉签

[0042] 如图1所示,益生菌棉签包含益生菌菌剂、干冰、纤维、柱体、内衬覆膜和栅板,所述柱体分为上柱体1、中柱体2和下柱体3,均为中空结构,柱体可以是木制、竹制或塑料制品,上柱体1和中柱体2、中柱体2和下柱体3通过螺纹旋转结合;上柱体1上端缠绕有纤维4,纤维4可缠绕成半山形、圆柱形或圆锥形,表面为凹凸螺纹状,纤维4可以是棉纤维、丝棉混合物、无纺布或竹纤维;中柱体2内盛有所述益生菌菌剂,所述益生菌菌剂被中柱体2上端设置的内衬覆膜5和下端设置的内衬覆膜6密封于中柱体2中,内衬覆膜5和6均为纸塑复合膜、铝塑复合膜或特种纸;下柱体3内盛有干冰,下柱体3上端设置有栅板7,栅板7孔径不超过1mm,材质为塑料、化纤纤维、棉纤维、丝棉混合物、无纺布或竹纤维。

[0043] 使用时,首先将内衬覆膜5揭开,接着将上柱体1和中柱体2旋紧、倒置,使益生菌菌剂接触纤维4,然后将内衬覆膜6揭开,最后将下柱体3和中柱体2旋紧,将棉签伸入耳道即可。

[0044] 栅板可以阻隔干冰与益生菌菌剂,避免大面积接触引起益生菌吸湿失活,干冰升华形成的气雾透过栅板,将益生菌带入耳道深处进行定植,从而发挥作用。

[0045] 内衬覆膜可以隔气隔水,当气体压力达到一定压力,也可自行破裂,利于气体逸出。

[0046] 实施例2: 益生菌棉签的制备

[0047] (1) 益生菌的培养: 选用二次活化的益生菌接种到培养基中进行培养20~50小时, 所述益生菌为表皮葡萄球菌和棒状双歧杆菌, 接种量为5%~10%;

[0048] (2) 益生菌的冻干: 将培养后的益生菌使用离心的方法收集菌体, 冻干, 水分低于5%, 冻干粉在-18℃冰箱中备用;

[0049] (3) 将益生菌冻干粉在低温下粉碎、过80目筛;

[0050] (4) 将各益生菌菌粉按如下总菌数占比进行混合, 即得益生菌菌剂;

[0051]	益生菌	总菌数占比 (%)
	表皮葡萄球菌	40
	棒状双歧杆菌	60

[0052] (5) 将步骤(4) 制备的益生菌菌剂灌装入棉签中柱体, 进行密封;

[0053] (6) 将纤维缠绕在棉签上柱体上端, 在下柱体按照如下质量分数装入干冰和栅板, 各柱体组合即得。

[0054]	组分	质量分数 (%)
	益生菌菌剂	10
	干冰	90

[0055] 实施例3

[0056] 与实施例2的区别在于益生菌菌剂和益生菌棉签组成分别如下:

[0057] (1) 益生菌菌剂

[0058]	益生菌	总菌数占比 (%)
	表皮葡萄球菌	20
	棒状双歧杆菌	80

[0059] (2) 益生菌棉签

[0060]	组分	质量分数 (%)
	益生菌菌剂	1
	干冰	99

[0061] 实施例4

[0062] 与实施例2的区别在于益生菌菌剂和益生菌棉签组成分别如下:

[0063] (1) 益生菌菌剂

[0064]	益生菌	总菌数占比 (%)
	表皮葡萄球菌	30
	棒状双歧杆菌	70

[0065] (2) 益生菌棉签

[0066]	组分	质量分数 (%)
	益生菌菌剂	5
	干冰	95

[0067] 对比例1

[0068] 与实施例2的区别在于益生菌菌剂组成如下:

[0069]	益生菌	总菌数占比 (%)
	表皮葡萄球菌	50
	棒状双歧杆菌	50

[0070] 对比例2

[0071] 与实施例2的区别在于益生菌菌剂组成如下：

[0072]	益生菌	总菌数占比 (%)
	表皮葡萄球菌	10
	棒状双歧杆菌	90

[0073] 对比例3

[0074] 与实施例2的区别在于益生菌棉签组成如下：

[0075]	组分	质量份数 (%)
[0076]	益生菌菌剂	15
	干冰	85

[0077] 对比例4

[0078] 与实施例2的区别在于益生菌棉签组成如下：

[0079]	组分	质量分数 (%)
	益生菌菌剂	0.5
	干冰	99.5

[0080] 实施例5: 益生菌棉签对耳肿胀的效果评价

[0081] (1) 实验材料

[0082] 阿斯匹林(江苏平光制药有限公司, 25mg/片); 二甲苯(AR(沪试)); 实验仪器: 电子天平PL6001E。

[0083] 昆明种小鼠(18-22g) 90只, 随机分为9组, 每组10只, 分别为对照组、阿司匹林组和益生菌棉签组。

[0084] (2) 实验方法

[0085] 取昆明小鼠20只, 随机分为空白组10只、模型组10只。模型组吸取20 μ L的二甲苯均匀涂布于各鼠右耳上、下两面, 左耳不涂作对照。涂布30min后, 模型组取10只小鼠处死, 沿耳廓基线剪下两耳, 采用6mm直径打孔器于左右耳对称部位打下耳片。用精密电子天平称取各鼠耳质量, 并计算鼠耳肿胀程度(肿胀程度=右耳质量-左耳质量)。每组另取10只行摘眼球取血, 将血放入4 $^{\circ}$ C, 3500r/min环境离心, 15min后取血清检测TNF- α , 判定造模方法是否成功。

[0086] 造模判定有效后, 取90只大鼠, 按大鼠体重计算给药量进行不同组别给药, 对照组(等量生理盐水, 每天一次, 右耳给药)、阿斯匹林组(0.2g/kg, 每天一次, 经口给药)和益生菌棉签组(益生菌10⁸cfu/支棉签, 实施例2~4及对比例1~4的益生菌棉签, 每天早晚各一次, 右耳给药), 连续7d, 于最后一次给药30min后, 将二甲苯20 μ L滴于小鼠右耳, 左耳作为对比, 15min后将动物拉颈处死, 沿左右耳廓相同部位等面积打孔后, 称重, 以两耳片重量之差值作为肿胀程度指标, 结果见表1。

[0087] 表1小鼠耳肿胀评价

序号	组别	左右耳质量差 (mg)
1	对照组	6.07±1.25
2	阿司匹林组	3.31±0.76
[0088] 3	实施例2	4.01±1.12
4	实施例3	3.91±0.99
5	实施例4	3.98±1.21
6	对比例1	4.89±1.10
[0089] 7	对比例2	4.93±0.87
8	对比例3	5.11±0.94
9	对比例4	5.25±1.31

[0090] 由表1可见,与对照组相比,本发明的益生菌棉签对小鼠的急性炎症耳肿胀有明显的抑制作用,其治疗效果与阿司匹林相当;与对比例相比,本发明的益生菌棉签治疗效果更优,因此本发明的益生菌棉签的组分和配比是经过筛选得到的优选方案。

[0091] 实施例6:益生菌棉签对分泌性中耳炎的效果评价

[0092] (1)实验材料

[0093] 内毒素(E.Coli:0111:B)Sigma公司,头孢克洛(施华洛公司,0.25g/片),磷酸盐缓冲液(AR,上海国药集团),水合氯醛(AR,上海国药集团)。

[0094] 选择健康SD雄性大鼠(海海军军医大学实验动物中心提供)体重250-300g。将实验动物按体重从小到大编号,随机分组,每个区组10只大鼠,共10组,分为益生菌棉签组、头孢克洛组、对照组和模型组。

[0095] (2)实验方法

[0096] 通过经鼓膜向大鼠听泡内注射内毒素(E.coli:0111:B)建立分泌性中耳炎动物模型建立SOM大鼠模型。内毒素以磷酸盐缓冲液(PBS,pH=7.4)稀释成200ng/mL备用。以10%水合氯醛(300mg/kg)腹腔内注射麻醉动物。右耳鼓膜前下象限无菌注射50 μ L内毒素溶液(200ng/mL),48小时后电耳镜检查鼓膜。

[0097] 造模48小时后,经电耳镜检查,大鼠的鼓膜充血、浑浊、鼓室积液、光锥消失,证实造模成功。按大鼠体重计算给药量进行不同组别给药,对照组和模型组(等量生理盐水,每天一次,右耳给药),头孢克洛组(0.01g/100g,每天一次,经口给药),益生菌棉签组(10^8 cfu/支棉签,实施例2~4及对比例1~4的益生菌棉签,每天早晚各一次,右耳给药),连续给药7天。7天后,经电耳镜检查大鼠的鼓膜,结果见图2;然后全部大鼠经心脏穿刺抽血后立即断头,解剖听泡,10%甲醛固定后,5%硝酸水溶液脱钙,以脱水后石蜡包埋切片,常规染色光镜检查,结果见表2。

[0098] 表2各组中右耳耳粘膜中性粒细胞计数的比较(μ m, $x \pm s$)

序号	组别	中性粒细胞计数
1	对照组	3.05±0.48
2	模型组	17.55±2.15
3	头孢克洛组	14.21±2.98
4	实施例2	12.87±3.07
5	实施例3	11.98±1.86
6	实施例4	12.11±2.02
7	对比例1	15.20±2.27
8	对比例2	14.48±2.66
9	对比例3	14.77±2.79
10	对比例4	15.01±1.76

[0101] 由图2可见,与模型组相比,本发明的益生菌棉签可减轻SOM大鼠中耳黏膜间质水肿,减轻中耳黏膜组织炎症反应。

[0102] 由表2可见,与模型组相比,经本发明的益生菌棉签治疗后,中性粒细胞数量明显减少,可减轻SOM大鼠中耳黏膜间质水肿,减轻中耳黏膜组织炎症反应,其治疗效果与头孢克洛相当;与对比例相比,本发明的益生菌棉签治疗效果更优,因此本发明的益生菌棉签的组分和配比是经过筛选得到的优选方案。

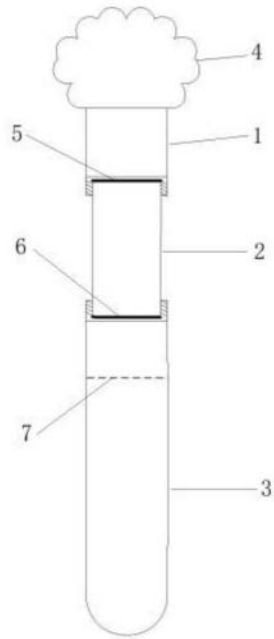
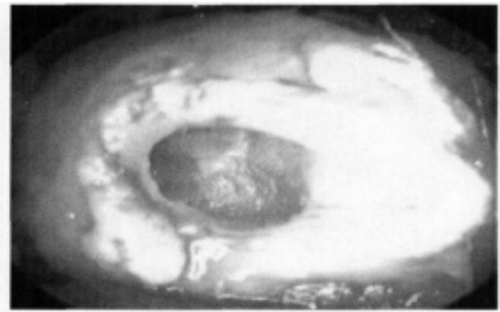


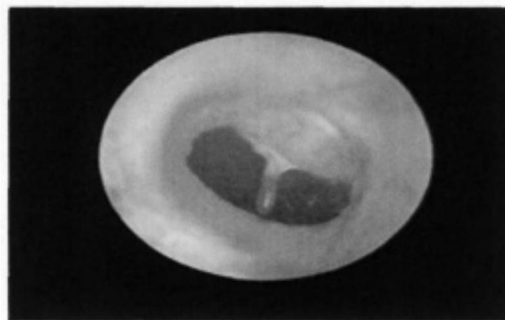
图1



A



B



C

图2