



团 体 标 准

T/COCIA 36—2024

口腔清洁护理用品 牙膏功效评价 清除牙菌斑功效实验室评价方法

Oral care and cleansing products—Efficacy evaluation of toothpaste—Laboratory
evaluation method for removing dental plaque

2024 - 07 - 15 发布

2024 - 07 - 15 实施

中国口腔清洁护理用品工业协会 发布

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由中国口腔清洁护理用品工业协会提出。

本文件由全国口腔护理用品标准化技术委员会牙膏分技术委员会（SAC/TC492/SC1）归口。

本文件起草单位：广州舒客实业有限公司、福建爱洁丽日化有限公司、深圳小阔科技有限公司、重庆登康口腔护理用品股份有限公司、江西诚志日化有限公司、广州中汉口腔用品有限公司、中山市多美化工有限公司、好来化工（中山）有限公司、完美（广东）日用品有限公司、杭州岛屿星晴生物技术有限公司、苏州清馨健康科技有限公司、浙江爱尚日用品有限公司、挪亚检测认证集团有限公司、广州雪洁生物科技有限公司、广药白云牙膏（广州）有限公司、西安交通大学口腔医院、山东华素健康护理品有限公司、上海华测品标检测技术有限公司、淮安纵横生物科技有限公司淮阴分公司、广州星际悦动股份有限公司。

本文件主要起草人：陈敏珊、李平、蔡丽萍、尹阔、邱琳、赵国盛、许海燕、钟锡基、孟庆瑞、何琪莹、林燕惜、丁贇、周燕萍、陶竞越、牛晨颖、李进、黄瑞哲、王熙红、程文雅、张秀英、邬凤娟、江本生、肖俊芳、韩金豆、唐文金、姜华。

本文件为首次发布。

口腔清洁护理用品 牙膏功效评价 清除牙菌斑功效实验室评价方法

1 范围

本文件规定了牙膏清除牙菌斑功效实验室评价方法。

本文件适用于牙膏体外清除牙菌斑功效的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和实验方法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

牙菌斑是口腔内多种微生物细胞与胞外多聚物基质组成的粘附、定植于牙齿表面的复杂三维结构，以生物膜的形式存在，是引起龋病和牙周疾病的主要因素，具有清除牙菌斑功效的牙膏可通过抑菌、酶解、表活分散等作用达到去除牙菌斑的效果。本评价方法以羟基磷灰石片（即HAP片）体外模拟牙齿，经变异链球菌、粘性放线菌和血链球菌在模拟口腔环境下建立牙菌斑生物膜模型，进一步配制牙膏浆液对牙菌斑生物膜进行处理，并通过结晶紫染色法测定生物膜量，最后比较不同组别HAP片的生物膜量评估牙膏的清除牙菌斑功效。

5 仪器和设备

- 5.1 二级生物安全柜。
- 5.2 电子天平（精确至 0.01 g）。
- 5.3 漩涡混匀仪。
- 5.4 多功能酶标仪。
- 5.5 微孔板震荡仪（最高转速 \geq 1500 rpm）。
- 5.6 高压蒸汽灭菌器。
- 5.7 拍打式均质器。
- 5.8 生化培养箱。

6 试剂与材料

6.1 试验用菌株

- 6.1.1 变异链球菌（ATCC25175）。
- 6.1.2 血链球菌（GDMCC1.1558）。
- 6.1.3 粘性放线菌（GDMCC1.381）。

注：若使用其它同种属等效菌株，需验证牙菌斑模型建立的可操作性、稳定性、重现性。

6.2 试剂

- 6.2.1 脑心浸出液肉汤（BHI 肉汤）。
- 6.2.2 人工唾液（ISO/TR10271-2020, pH7.4）。
- 6.2.3 蔗糖（C₁₂H₂₂O₁₁），分析纯。
- 6.2.4 猪胃黏蛋白。
- 6.2.5 生理盐水（0.9% NaCl 溶液）。
- 6.2.6 甲醇（CH₃OH），分析纯。
- 6.2.7 1%结晶紫，分析纯。
- 6.2.8 冰乙酸，分析纯。

6.3 耗材

- 6.3.1 羟基磷灰石片（HAP 片，直径 12mm~13mm，厚度 1.0mm~1.3mm）。
- 6.3.2 均质袋。
- 6.3.3 12 孔细胞培养板。
- 6.3.4 封板膜。
- 6.3.5 三角瓶。

7 处理步骤

7.1 羟基磷灰石片（HAP 片）准备

对HAP片进行高压蒸汽灭菌，灭菌条件：121℃，20 min。

7.2 菌株活化

将冻存的变异链球菌（ATCC25175）、血链球菌（GDMCC1.1558）和粘性放线菌（GDMCC1.381）接种至BHI肉汤，于生化培养箱中（37±1）℃有氧培养18-24 h进行活化，若放置于4℃，7天内的菌株，则需要活化1代以上，若是从冻存管中活化，则需要活化3代以上待菌株状态稳定后方可使用。

7.3 菌液配制

取活化好的变异链球菌（ATCC25175）、血链球菌（GDMCC1.1558）和粘性放线菌（GDMCC1.381）接种至BHI液体培养基中，取对数生长期的菌液，分别调整三种菌液在OD600 nm下的吸光值为0.45~0.55之间，并以1:1:1进行混合，用漩涡震荡仪混匀20 s备用。以上混合菌液需在接种前现配现用保证其活性。

7.4 培养液配制

按照BHI肉汤培养基的配制说明书称取一定量的BHI粉末于三角瓶中，加入相应体积的去离子水；加入一定体积的人工唾液于瓶中，使得人工唾液与BHI肉汤培养基的体积比为=1:3，再加入蔗糖和猪胃粘

蛋白，使得蔗糖的终浓度为0.5% (w/w)，猪胃黏蛋白的终浓度为0.25% (w/w)，最后对培养液进行高压蒸汽灭菌，灭菌条件：121℃，20 min。

7.5 牙菌斑造模及分组

将无菌HAP片放置于12孔板中，分为空白组、模型组和实验组，每组3个重复。其中模型组和实验组中加入1.8 mL 培养液（人工唾液：BHI肉汤=1:3，含0.5%蔗糖和0.25%的猪胃黏蛋白），并接入0.2 mL的混合菌液；空白组中加入2 mL培养液，于生化培养箱中（37±1）℃有氧培养24 h后，小心吸除孔内菌液并加入2 mL培养液，于（37±1）℃培养24 h即完成牙菌斑造模。

7.6 牙膏样品配制及处理

在无菌环境下精准称量10 g（可根据实际情况进行调整）牙膏样品于均质袋中，加入20 g生理盐水（牙膏：生理盐水=1:2），用拍打式均质器均质2 min至牙膏完全分散。

用镊子将步骤7.5中完成建模的HAP片小心夹取放置新的12孔板中，转移过程中保证HAP片没有上下翻转，实验组取1.5 mL牙膏浆液（避免吸到气泡）加入含有HAP片的孔板中，模型组和空白组取1.5 mL生理盐水加入含有HAP片的孔板中，贴上封板膜，于微孔板振荡器上1300 rpm震荡10 min。

7.7 洗涤

将处理后的HAP片放置于新的孔板中，加入1.5 mL生理盐水，贴上封板膜，1500 rpm洗涤2次，每次5 min。

7.8 甲醇固定

吸除生理盐水后向HAP片上加入0.5 mL甲醇固定5 min，固定完成后吸除多余的甲醇，于生物安全柜中风干2 min至无明显湿润。

7.9 结晶紫染色及洗去未结合的结晶紫

向HAP片上加入50 μL 1%的结晶紫染色液，染色5 min。

染色完成后向12孔板中加入2.5 mL生理盐水，于微孔板振荡仪中400 rpm震荡2 min洗去未结合的结晶紫染色液，重复4次。

7.10 乙酸脱色及生物膜量测试

取2.5 mL 33%的冰乙酸对HAP片进行脱色，于微孔板振荡仪上400 rpm震荡20 min，结束后每孔取100 μL (n=3) 于96孔中在570 nm处测各组的OD值，所测OD值即代表各组HAP片上的生物膜量。

8 数据处理及结果评价

若空白组、实验组、模型组生物膜量（OD_{570 nm}值）均符合正态分布，采用独立样本t检验分析显著性差异，双尾检验，检验水平 $\alpha=0.05$ 。若空白组、实验组和模型组生物膜量（OD_{570 nm}值）不符合正态分布，采用两独立样本秩和检验分析显著性差异，双尾检验，检验水平 $\alpha=0.05$ 。

空白组生物膜量小于模型组生物膜量，且具有统计学差异则表明牙菌斑模型成立，所有实验数据有效，否则数据无效，并分析原因重新开始实验。

基于牙菌斑模型成立，实验组生物膜量小于模型组生物膜量，且具有统计学差异则表明实验组样品具有清除牙菌斑功效。

牙膏清除牙菌斑效果的量化值以牙菌斑清除率 (Clearance, C) 表示, 并按公式 (1) 计算:

$$C = \frac{A_2 - A_1}{A_2 - A_0} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

式中:

C ——牙膏样品对牙菌斑的清除率;

A_0 ——空白组生物膜OD均值;

A_1 ——实验组生物膜OD均值;

A_2 ——模型组生物膜OD均值。



中国口腔清洁护理用品工业协会
团 体 标 准

口腔清洁护理用品 牙膏功效评价
清除牙菌斑功效实验室评价方法

T/COCIA 36— 2024

*

中国口腔清洁护理用品工业协会

地址：北京市西城区阜外大街乙 22 号

邮政编码： 100833

电话： (010) 68396721

网址： [http:// www.cocia.org](http://www.cocia.org)

Email: cocia@126.com

*

版权所有 侵权必究

印数： 100 册 定价： 60.00 元