文章编号:1000-5404(2005)09-0907-03

论著

SZ植物消毒剂对悬液中细菌和病毒的灭活作用

许 斌,李 莉,徐 焰,李亚斐 (第三军医大学军事预防医学院流行病学教研室,重庆 400038)

提 要: 目的 测定SZ植物消毒剂的主要成分含量,观察悬液中微生物的灭活效果。**方法** 采用分光光度计法测定SZ植物消毒剂中的熊果酸含量;以活菌计数、噬菌斑计数和细胞感染试验为主要指标,进行中和剂选择试验、杀菌效果观察试验及病毒灭活试验。**结果** SZ植物消毒剂中熊果酸含量为436.43 μg/ml,在室内存放1年后,含量下降8.07%;SZ植物消毒剂的原液作用5 min,5倍稀释液作用10 min,可使悬液中的金色葡萄球菌和大肠杆菌能达到100%灭活;原液及5倍稀释液作用20 min,对悬液中白色念珠菌能分别达到90.97%和51.10%的灭活;1:5稀释的消毒剂消毒3 min能100%灭活f2噬菌体,对PV的灭活达到9.00 log。**结论** SZ植物消毒剂是以熊果酸为主要成分的天然消毒剂,含量稳定。其对细菌繁殖体和病毒有良好的灭活作用。

关键词: 植物消毒剂;病毒;细菌;灭活
中图法分类号: R187.1; R979.7 **文献标识码**: A

Disinfection efficacy of SZ herbal disinfectant on bacterium and virus in suspension

XU Bin, LI Li, XU Yan, LI Ya-fei (Department of Epidemiology, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To determine the main components of SZ herbal disinfectant and to observe its inactivation efficiency on microorganism in suspension. **Methods** The spectrophotometer examination, neutralizer screening trial, bacteria count trial, phage plaque count trial and cells infection test had been used to determine contents of ursolic acid in SZ herbal disinfectant and the disinfection efficacy. **Results** The ursolic acid contents in original SZ disinfectant reached 436.43 μg/ml and decreased by 8.07% after a year of deposit. Treated by disinfectant for 5 min and 1:5 dilution solution for 10 min, the *Staphylococcus aureus* (SA) and *Escherichia coli* (EC) in suspension could be killed with the efficiency of 100%. Treated with SZ disinfectant and the dilution solution (1:50) respectively, the Candida albicans could be killed with the efficiency of 90.97% and 51.10%. Treated with the dilution solution for 3 min, the f2 bacteriophage and PV could be reduced by 100% and 9.00 log. **Conclusion** With the main component of ursolic acid, the SZ herbal disinfectant is a kind of natural disinfectant. It has a satisfactory inactivation efficacy on bacterial vegetative form and virus.

Key words: herbal disinfectant; virus; bacterium; inactivation

随着卫生水平的提高和环境保护意识的加强,人们对消毒剂种类的选择有了明显的要求。具有绿色概念、生物安全和环保特点的植物型消毒剂受到国内外消费者的青睐。因此研究和开发此类消毒剂必定会有明显的社会效益和经济效益。许多天然植物具有抑菌和杀菌的作用。山楂为蔷薇科植物山楂(crataegus pinnatida bge)的干果。具有消食健脾、行气散瘀的功效。临床主要用于肉食积滞、泻痢腹痛、高血脂等症。山楂的药物功效主要来源于其中的有机酸和黄酮类成分,其中的有机酸类具有稳定的杀菌作用[1~3]。我们研制的SZ植物消毒剂(暂定名)以山楂为主要原料,以适当浓度的植物醇萃取原液,配以天然香料调制而成,无任何化学合成试剂,保存了"天然"本色。为系统观察此植物消毒剂的应用范围,我们较系统地开展了悬液消毒试验、载体消毒试验、空气消毒试验和能量试验。本研究将重点介绍SZ消毒剂对悬液中试验菌和试验病毒的灭活作用。

1 材料与方法

1.1 SZ植物消毒剂的制备

将干山楂(第三军医大学西南医院药剂科提供)用蒸馏水清洗、晾干。以适宜比例加入一定浓度的植物乙醇(重庆酿酒

作者简介:许 斌(1974-),男,重庆市人,硕士研究生,助教,主要从事流行病学、消毒学和有害生物防治等方面的研究。电话:(023)68752286,E-mail: xubin@mail.tmmu.edu.cn

收稿日期:2005-01-14;修回日期:2005-03-31

厂提供)中,浸泡7 d后取醇液,山楂残渣继续以同样比例加入植物乙醇浸泡2次。将3次的萃取液合并、过滤、分装,置室温下保存备用。

1.2 SZ植物消毒剂主要成分-熊果酸测定

中国药典中山楂的定性鉴定是检测熊果酸。按照王文祥等[4]的方法,精确称取熊果酸(分析纯,陕西慧科植物开发有限公司产品)101.0 mg,置100 ml容量瓶中加无水乙醇溶解,并定容为100 ml,作为标准品液,制作标准曲线:分别取熊果酸标准品0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 ml。100 ℃水浴挥干乙醇,加入5%香草醛-冰醋酸(重庆无机化学试剂厂产品)0.4 ml,高氯酸1.0 ml,60 ℃水浴15 min,冷却后加入冰醋酸5.0 ml,混匀,采用分光光度计(UV-9200型,北京瑞利分析仪器公司产品),在548 nm处测定 D 值。以熊果酸含量为横坐标,吸收度测定值为纵坐标制作标准曲线,并计算回归方程。

取新鲜配置的SZ植物消毒剂样本和在室内(10~35 ℃)放置1年的该消毒剂样本,用乙醇做1:20倍稀释,然后取0.4 ml,按以上方法进行 D 值测定,并计算总熊果酸含量。各样本重复3次试验。

1.3 中和剂选择试验

试验采用1.0%卵磷脂、0.5%土温80、0.5%硫代硫酸钠的混合液作为中和剂。按照卫生部2002年版消毒技术规范的要求,选择金色葡萄球菌(ATCC6538)、白色念珠菌(ATCC10231)作为试验菌,制备菌悬液。按中和剂选择试验规范方法,设计6个试验组(表1),活菌计数后进行分析。试验重复3次。

表1 SZ植物消毒剂中和剂试验结果

Tab 1 Results of neutralizer test for SZ herbal disinfectant

Group	Average bacterial count(CFU/ml)	
	Staphylococcus aureus	Candida albicans
Disinfectant + bacterial suspension	0	0
(Disinfectant + bacterial suspension) + neutralizer	6	132
Neutralizer + bacterial suspension	24 000 000	58 000 000
(Disinfectant + neutralizer) + bacterial suspension	24 600 000	47 300 000
PBS + bacterial suspension(normal bacterial control)	31 000 000	54 400 000
PBS + neutralizer + medium(negative control)	0	0

1.4 悬液杀菌试验

以金色葡萄球菌、大肠杆菌(ATCC8099)、白色念珠菌等为试验菌,用含0.1%胰蛋白胨的PBS适当稀释,使菌含量为 10^6 ~ 10^7 CFU/ml左右。将菌液0.5 ml与不同浓度的SZ植物消毒液(原液,5倍稀释,10倍稀释,20倍稀释)4.5 ml混合,在设定的时间内(3、5、10、20 min)作用;充分混合后吸取0.5 ml混合液与4.5 ml中和剂作用,10 min后吸取0.5 ml作活菌计数。同时设置对照组1(以PBS代替SZ植物消毒剂)和对照组2(用80%植物醇1:5稀释后代替SZ植物消毒剂)。各试验点重复3次试验。

1.5 悬液病毒灭活试验

1.5.1 对f2噬菌体的灭活试验 按照余茂效等[5]的方法进行f2噬菌体及其宿主菌(大肠杆菌285,由军事医学科学院卫生装备研究所提供)的培养、增殖、滴定。用LB培养液对f2噬菌体原液进行适当稀释,使噬菌体的滴度为 10^6 ~ 10^7 PFU/ml。

将噬菌体液0.5 ml与不同浓度的SZ植物消毒液(原液,5倍稀释,10倍稀释)4.5 ml混合,在设定的时间内(3、5、10 min)作用;充分混合后吸取0.5 ml混合液与4.5 ml中和剂作用,10 min后吸取20 μl混合液与1 ml宿主菌作用,制备双平板,计数菌落。同时设置对照组(以PBS代替SZ植物消毒剂)。各试验点重复3次试验。

1.5.2 对非脂质包膜病毒的灭活 按照消毒技术规范的要求和步骤进行脊髓灰质炎病毒(poliovirus, PV)的培养、增殖、滴定及病毒灭活试验。用1640细胞培养液对病毒悬液进行稀释,使病毒的滴度为 10^6 ~ 10^7 $TCID_{50}$/ml。PV由中国医学科学院病毒研究所提供,其宿主细胞(HepG2细胞)由重庆市疾病控制中心提供。

滴定:采用组织培养半数感染量法,用96孔细胞培养板做细胞培养。待细胞长满呈致密单层后弃培养液,用D-Hank液洗涤细胞,然后每孔加入0.1 ml用培养液1640稀释的不同稀释度病毒液,每个稀释度平行接种4孔。常规条件下吸附3 h后弃培养液,再加入细胞培养液继续培养并观察CPE。根据Reed-Muench方法计算病毒的 $TCID_{50}$。

病毒灭活处理:将噬菌体液0.2 ml与不同浓度的SZ植物消毒液(原液,5倍稀释)0.8 ml混合,在设定的时间内(3、5、10 min)作用;充分混合后吸取0.1 ml混合液与0.9 ml中和剂作用,再吸取混合液进行病毒滴度测定。同时用D-hank液替代消毒剂处理病毒液作为对照。试验重复2次。

2 结果

2.1 主要成分熊果酸的含量

不同标准浓度的熊果酸样本经分光光度剂检测,以熊果酸含量为横坐标,在548 nm处吸收度测定值为纵坐标作图得标准曲线(图1),其回归方程式为:y = 293.277 2x - 2.226 8,r = 0.997 8。新鲜制备的消毒剂样本光密度平均值为0.082,在室温下存放1年后,消毒剂样本光密度平均值为0.076。其熊果酸含量分别为436.43、401.25 μg/ml。

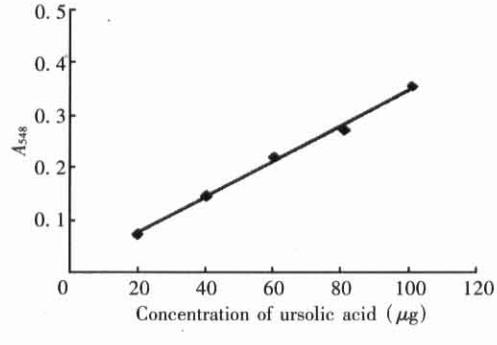


图1 熊果酸分光光度计标准曲线

Fig 1 Standard curve of ursolic acid

2.2 中和剂试验结果

本试验选用的中和剂经设定的6组试验观察,其结果符合

消毒剂鉴定技术规范的要求(表 1)。

2.3　对悬液中试验菌的灭活效果

SZ 植物消毒剂对几种试验菌的杀灭效果如表 2 所示。其原液和稀释液均有不同程度的杀菌效果。其对金色葡萄球菌和大肠杆菌的灭活作用强于白色念珠菌。

表 2　SZ 植物消毒剂对悬液中细菌繁殖体的杀灭效果 (%)

Tab 2　Disinfection efficacy of SZ herbal disinfectant on bacterial vegetative form in suspension (%)

Test group [Concentration of disinfectant (%)]	Average killing rate after exposure for different periods of time (min)			
	3	5	10	20
Staphylococcus aureus (SA)				
Stock suspension	100.00	100.00	100.00	100.00
Dilution 1:5	99.99	100.00	100.00	100.00
Dilution 1:10	99.98	99.99	100.00	100.00
Dilution 1:20	99.90	99.93	99.96	99.98
Control group 1(PBS)	—	—	—	0.00
Control group 2(1:5 dilution alcohol)	—	72.80	73.62	77.80
Escherichia coli (EC)				
Stock suspension	99.99	100.00	100.00	100.00
Dilution 1:5	99.00	99.98	100.00	100.00
Control group 1(PBS)	—	—	—	0.00
Control group 2(1:5 dilution alcohol)	—	57.82	56.62	67.50
Candida albicans(CA)				
Stock suspension	—	89.00	90.90	90.97
Dilution 1:5	—	36.76	—	51.10
Control group 1(PBS)	—	—	—	0.00
Conirol group 2(1:5 dilution alcohol)	—	30.20	29.31	33.30

2.4　对悬液中试验病毒的灭活效果

SZ 植物消毒剂对悬液中的 f2 噬菌体和 PV 有明显的杀灭作用。其灭活病毒的效果见表 3。1:5 稀释的消毒剂 3 min 能 100% 灭活 f2 噬菌体；能灭活 PV 9.00 log。

表 3　SZ 植物消毒剂对病毒的灭活效果

Tab 3　Inactivation efficacy of SZ herbal disinfectant on virus

Concentration of disinfectant	Average virus titre after exposure for different periods of time (min)					
	f2 bacteriophage (PFU/ml)			PV($TCID_{50}$)		
	3	5	10	3	5	10
Stock suspension	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1:5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1:10	98	38	2	—	—	—
Control group (disinfectant replaced by PBS)	—	—	2.3×10^{4}	—	—	9.00

3　讨论

近年来，以山楂作为主要原料制备消毒剂及其杀菌效果研究已有报道，但各家制作方法和程序各不相同，杀菌成分和杀菌效果有差别。但总的特点是，这类消毒剂对人体的刺激小、无毒、无环境污染，易于被人群接受[6,7]。

由醇液提取的山楂原液中富含有机酸，其中主要有熊果酸、山楂酸和齐墩酸，中国药典中山楂的定性鉴定是检测熊果酸[1~3]。因此，本研究通过分光光度计对 SZ 植物消毒剂中熊果酸含量进行了测定。该方法简便、经济、可靠。完全可以常规应用于山楂类消毒剂的质量检测中。我们的研究证明，消毒液原液中熊果酸的含量为 436.49 μg/ml，在室内存放 1 年后，熊果酸含量达 401.25 μg/ml，降低 8.07%。说明 SZ 植物消毒剂中熊果酸具有良好的稳定性(按照消毒技术规范要求，年平均下降 10% 以内为稳定性消毒剂)。

本试验结果植物消毒剂原液作用于细菌繁殖体时，5 min 可达到 100% 灭活，稀释 5 倍后，10 min 达 100% 灭活；1:5 稀释的消毒剂 3 min 能 100% 灭活 f2 噬菌体，使 PV 达到 9.00 log 灭活。显示出高效的杀灭细菌繁殖体和试验病毒的效果。但是针对白色念珠菌的杀灭作用却相对较差，消毒剂原液作用 20 min 杀菌率为 90.97%。稀释 5 倍后，20 min 杀菌率只有 51.10%。此外，原液对枯草杆菌芽胞的灭活率 60 min 作用也只能达到 20% 左右，这些数据提示 SZ 植物消毒剂对真菌和芽孢类微生物的杀灭作用效果有限，在实际中应当注意选择应用范围。

SZ 植物消毒剂的溶剂为 80% 左右的植物醇。醇类本身也具备杀灭微生物的作用。从试验对照的杀灭细菌率可以显示，作用 3 ~ 10 min 单纯的 1:5 稀释植物醇对细菌繁殖体的灭活率可达 56.62% ~ 77.80%，但明显低于消毒剂 1:5 稀释液的杀菌作用(99.00% ~ 100%)。这些数据提示，SZ 植物消毒剂的杀菌效应是山楂萃取物和植物醇的共同作用所致，其杀菌机制有待深入探讨。

参考文献：

[1] 罗玉梅，王贺振. 山楂的化学成分及药理研究进展[J]. 时珍国医国药，2004，15(1)：53 - 54.

[2] 冯凤莲，张卉朱. 山楂的研究进展[J]. 河北医科大学学报，1997，18(6)：383 - 384.

[3] 孙敬勇，杨书斌，谢鸿霞，等. 山楂化学成分研究[J]. 中草药，2002，33(6)：483 - 486.

[4] 王文祥，顾振纶. 比色法测定山楂总三萜酸含量[J]. 中国野生植物资源，2001，20(5)：47 - 48.

[5] 余茂效，司稚东. 噬菌体实验技术[M]. 北京：科学出版社，1991. 5 - 18.

[6] 曹　原，梁　琦，李　俐，等. LK 植物液杀灭微生物效果的试验观察[J]. 中国消毒学杂志，2001，18(4)：250 - 252.

[7] 林　玲，陈玉杰，李　俐，等. 山楂液杀灭微生物作用及其影响因素的试验观察[J]. 中国消毒学杂志，2000，17(2)：85 - 88.

(编辑　薛国文)