

一种复方手消毒液杀菌效果及毒性的实验观察

黄丽华¹, 陈学杰² (1. 广西壮族自治区疾病预防控制中心, 南宁 530028; 2. 广西医科大学第一附属医院, 南宁 530021)

【摘要】 目的 了解一种新型手消毒液杀灭微生物效果与安全性能。**方法** 采用载体定量杀菌实验和动物毒性实验该新型手消毒液进行了实验室研究。**结果** 该消毒液以主要有效成分聚-[2-(2-乙氧基)-乙脂]-氯化胍(含量为 0.125%)和聚-环己-胍盐-氯化物(含量为 0.375%)的水溶液对布片上大肠杆菌、金黄色葡萄球菌作用 5 min, 对布片上白色念珠菌作用 10 min, 杀灭率均达 99.99%。将该消毒液原液密封置于 37℃ 放置 90 d, 杀菌效果与储存前无明显差异。菌悬液内含 50% 小牛血清对该消毒剂杀菌效果无明显影响。经 30 人次手的现场消毒实验证明, 该洗液对手上自然菌消毒效果比较好, 对自然菌杀灭率达到消毒合格要求。该消毒剂对小鼠经口 LD₅₀ > 5 000 mg/kg, 蓄积系数 K > 5; 该消毒液原液对家兔皮肤刺激实验积分为 0, 眼刺激实验积分为 1.0; 对小鼠骨髓嗜多染红细胞微核实验为阴性, 精子畸形实验结果为阴性。该消毒剂原液浸泡 72 h, 对不锈钢、铜无腐蚀, 对碳钢和铝基本无腐蚀性。**结论** 该复方消毒剂对细菌繁殖体和真菌杀灭效果较好; 属实际无毒级, 弱蓄积毒性; 对皮肤、眼睛为无刺激性; 性能稳定, 腐蚀性较低。

【关键词】 聚-[2-(2-乙氧基)-乙脂]-氯化胍; 聚-环己-胍盐-氯化物; 杀菌作用; 毒性

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2011.06.023 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)06-0691-03

Experimental observation on germicidal efficacy and toxicity of a compound hand disinfectant HUANG Li-hua¹, CHEN Xue-jie² (1. Guangxi Center for Disease Prevention and Control, Nanning, Guangxi 530028, China; 2. First Affiliated Hospital, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

【Abstract】 Objective To understand the germicidal efficacy and safety performance of a new type compound hand disinfectant containing AKACID as the germicidal component. **Methods** The carrier quantitative germicidal test and the animal toxicity test were used to carry out the laboratory study. **Results** The kill rates of Escherichia coli and Staphylococcus aureus on cloth strips exposed to the stock solution of the disinfectant for 5 min and Candida albicans on cloth strip exposed for 10 min were 99.99%. After its stock solution in air tight condition was stored at 37℃ for 90 d, the germicidal efficacy was not affected. The bacteria suspension containing 50% (v/v) calf serum did not obviously influence its germicidal efficacy. Through on-the-spot disinfection test of 30 person's hand, the compound disinfectant had good germicidal efficacy to natural bacteria of hands and was qualified for the kill ratio of natural bacteria. Its mouse oral LD₅₀ was > 5 000 mg/kg and its cumulative coefficient K was > 5. The rabbit skin irritation score of its stock solution was 0 and eye irritation score was 3.0. The result of mouse bone marrow polychromatic erythrocyte micronucleus test for this disinfectant solution was negative and the sperm malformation test was also negative. Immersion in its stock solution for 72 h did not cause corrosion of stainless steel and copper and essentially did not cause corrosion of carbon steel and aluminum. **Conclusion** The compound disinfectant has good efficacy in killing vegetative forms of bacteria and fungi. It belongs to practically non-toxic class with weak cumulative toxicity and non-irritating to skin, non-irritating to eye. It is stable and low corrosive.

【Key words】 Poly-[2-(2-ethoxy)-acetate]-guanidine chloride; Poly-cyclohexyl-guanidine salt-chloride; germicidal action; toxicity

为解决临床医护人员因频繁洗手对皮肤的刺激, 研究了解一种新型的快速复方手消毒液, 其主要有效成分是聚-[2-(2-乙氧基)-乙脂]-氯化胍(含量为 0.125%)和聚-环己-胍盐-氯化物(含量为 0.375%), 水溶液无色、无味、外观呈透明状, 是一种新型消毒液。为了解其反复使用的效果及安全性, 在实验室对其杀菌作用、稳定性、金属腐蚀性、毒性进行了实验观察, 现将结果报道如下。

1 材料与方

1.1 菌片的制备 将金黄色葡萄球菌(ATCC6538)、大肠杆菌(8099)、白色念珠菌(ATCC10231)经 37℃ 培养 24 h 新鲜斜面培养物, 用磷酸盐缓冲液(PBS)洗下菌苔, 并配制成菌悬液; 取 0.02 mL 菌悬液滴染于脱脂的无菌布片(1 cm × 1 cm)上,

干燥菌片^[1]。

1.2 中和剂鉴定实验 用金黄色葡萄球菌和白色念珠菌为代表菌株, 实验设平行 6 组(表 1), 按载体定量杀菌试验程序进行。各组实验结果判定标准均按 2002 年版《消毒技术规范》规定执行^[2]。实验重复 3 次。结果判定, 以第 1 组不长菌或有少量菌生长且少于第 2 组, 第 2 组菌数大于 50 cfu/mL; 第 3、4、5 组间菌数符合规定要求且组间菌数相差不超过 15%; 第 6 组不长菌; 表明所选中和剂及其浓度适宜。

1.3 载体浸泡定量杀菌实验 按每片 5.0 mL 用量, 将消毒液原液(阳性对照为 PBS)注入无菌平皿中, 置(20 ± 1)℃ 水浴箱内恒温, 将菌片浸没在消毒液内。作用至预定时间, 取出菌片, 分别移到盛有 5.0 mL 中和剂溶液的试管中, 中和作用

10 min,经振荡洗涤,取样进行活菌计数培养。培养后计数平板菌落数,计算存活细菌数并计算平均杀灭率。试验重复 3 次。有机物影响试验是在菌悬液内加入不同浓度的小牛血清,用其滴染菌片,按载体浸泡定量杀菌试验程序进行。

1.4 手现场消毒试验 随机选择 30 名志愿者,首先让受试者搓擦双手。用无菌棉拭沾湿含中和剂的采样液,对左手手指屈侧进行涂抹采样,作为阳性对照组。然后用妇阴洁洗液原液对受试者双手进行擦拭消毒两遍,再按上述采样方法对受试者右手进行涂抹采样,作为消毒后试验组。将棉拭头剪入盛有 5.0 mL 中和剂的试管中,洗脱棉拭头上的细菌并混匀,取洗脱液做活菌计数,计算对自然菌的消除率。

1.5 稳定性实验 将该消毒剂的原液用玻璃瓶密封包装,置 37 ℃温箱储存 90 d。于放置前后,分别取样对金黄色葡萄球菌和白色念珠菌进行杀灭效果试验,比较储存前后杀菌效果变化。

1.6 金属腐蚀性实验 将不锈钢、碳钢、铜和铝等 4 种金属片制成直径 24.0 mm、厚 1.0 mm 圆形,穿一直径为 2.0 mm 小孔,表面积总值约为 9.80 cm²,光洁度为 6。用清洁洗涤剂浸泡,去油,洗净;以 120 号粒度水砂纸磨去金属表面的氧化层,再用自来水冲净,置 50 ℃恒温箱中干燥 1 h 后精确称重。以每个金属片 200 mL 用量,将该消毒剂原液分装到烧杯内,每种金属 1 个;然后取每种金属片一式 3 片悬挂浸泡在消毒液内 72 h,取出金属片除去腐蚀产物并清洗后,干燥后精确称重作为实验后重量。计算腐蚀速率。

1.7 毒性实验^[2]

1.7.1 急性经口毒性实验 选取体质量 20~22 g 的健康昆明种一级小鼠 20 只,雌雄各半。用消毒剂原液,采用一次经口灌胃给药,给药后观察 14 d,每天记录小鼠各种表现和死亡情况,计算 LD₅₀ 值。

1.7.2 蓄积毒性实验 选择体质量 180~200 g 的健康昆明种一级大鼠 20 只,雌雄各半。根据急性毒性试验 LD₅₀ 值按体重计算染毒剂量,第 1~4 d 染毒剂量为 0.1 LD₅₀,以后每 4 小时递增 1.5 倍剂量,直至 28 d。每 4 小时称重 1 次,计算蓄积系数。

1.7.3 急性眼刺激实验 选用健康白色家兔 4 只,体质量 2.5~3.0 kg,将该消毒剂原液 0.1 mL 滴入家兔左眼结膜囊内,被动闭合 4 s 后用生理盐水冲洗,右眼为对照滴生理盐水。于滴眼后 6、24、48、72 h 和 4、7 d 观察并记录眼局部刺激反应并进行评分。

1.7.4 急性皮肤刺激实验 取 4 只健康白色家兔,体质量 2.5~3.0 kg,将背部脊柱两侧脱毛分别为 3.0 cm×3.0 cm,不损伤表皮。24 h 后将 0.2 mL 该剂原液均匀涂抹在左侧皮肤上,用二层纱布和玻璃纸覆盖后固定;右侧皮肤作为空白对照,4 h 后除去受试物。于除去受试物后 1、24、48 h 分别观察皮肤反应,进行刺激评分。

1.7.5 小鼠骨髓细胞微核实验 选用健康一级小鼠 50 只,随机分为 5 组,每组雌雄各 5 只。设计 1/2 LD₅₀、1/5 LD₅₀、1/20 LD₅₀ mg/kg 体质量 3 个剂量组,另设阴性对照(蒸馏水)及阳性对照(按体质量计算给环磷酰胺 40 mg/kg)。经口灌胃给药,采用两次给药间隔 24 h,于末次给药后 6 h,常规取股骨髓制片、固定、染色,于油镜下对每只动物观察 1 000 个嗜多染红细胞,计算微核率,进行统计学分析。

1.7.6 小鼠精子畸形实验 选用 25 只雄性健康小鼠,随机分为 5 组,每组 5 只。设计 1/2、1/5、1/20 LD₅₀ 3 个剂量组,另设

阴性对照(蒸馏水)及阳性对照(按体质量计算给环磷酰胺 40 mg/kg)。经口灌胃给药,连续 5 d,于首次给药后的第 35 天处死动物,取附睾制片、固定、染色,于油镜下对每只动物观察 2 000 条精子中畸形精子数,计算精子畸形发生率,进行统计学分析。

2 结 果

2.1 中和剂选择试验 试验表明,用含 40 g/L 吐温 80、20 g/L 卵磷脂、10 g/L 甘氨酸、1 g/L 硫代硫酸钠联合组成 PBS 中和剂,能有效中和复方消毒剂对两种试验菌的残留作用,中和剂及其产物对实验菌生长及培养基成分无不良影响,见表 1。

表 1 复方手消毒液中中和剂实验结果(每片 cfu)

组别	平均菌数	
	金黄色葡萄球菌	白色念珠菌
消毒剂+菌片	0	0
(消毒剂+菌片)+中和剂	62	54
中和剂+菌片	789 000	942 000
(消毒剂+中和剂)+菌片	768 000	912 000
阳性对照	741 000	943 000
阴性对照	0	0

2.2 杀菌效果 结果表明,该消毒液对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌作用 5 min,对布片上白色念珠菌作用 10 min,杀灭率均达 99.99%,见表 2。

表 2 复方手消毒液对细菌繁殖体、白色念珠菌的杀灭效果

实验菌	作用不同时间的平均杀灭率(%)			
	5 min	10 min	15 min	20 min
金黄色葡萄球菌	99.99	99.99	100.00	100.00
大肠杆菌	99.99	99.99	100.00	100.00
白色念珠菌	99.99	99.99	100.00	100.00

2.3 有机物影响实验结果 结果表明,用菌悬液中含体积分数 50% 小牛血清滴染的菌片进行实验,对该消毒剂杀灭金黄色葡萄球菌的效果基本无影响,见表 3。

表 3 有机物对复方手消毒液杀菌效果的影响实验结果

小牛血清 含量(%)	作用不同时间的平均杀灭率(%)			
	5 min	10 min	15 min	20 min
0	99.99	99.99	100.00	100.00
20	99.88	99.94	99.99	99.99
50	99.75	99.92	99.95	99.99

2.4 对手现场消毒效果 经 30 人次手的现场消毒试验结果表明,用复方手消毒液对手部皮肤擦拭消毒并作用 3 min,对手上自然菌的平均消除率达到 99.50%,符合现场消毒合格要求。

2.5 稳定性试验结果 经检测,复方手消毒液原液密封包装在 37 ℃条件下放置 90 d,其对金黄色葡萄球菌杀灭效果与储存前比较无明显差异,见表 4。

2.6 金属腐蚀性实验结果 经检测,复方手消毒液原液对 4 种金属浸泡 72 h,对不锈钢、铜无腐蚀性,对碳钢、铝基本腐蚀

速率 R(mm/a)均小于 0.01。

表 4 复方手消毒液稳定性实验效果

放置时间(d)	阳性对照组每片 平均菌数(cfu)	作用不同时间的平均杀灭率(%)			
		5 min	10 min	15 min	20 min
0	718 000	99.99	99.99	100.00	100.00
90	694 000	99.92	99.97	99.99	100.00

2.7 毒性实验结果

2.7.1 急性经口毒性实验 小鼠染毒后未见异常反应,未出现死亡,观察期满处死动物,大体解剖未发现组织或脏器有明显异常改变。受试物对小鼠急性经口 LD₅₀>5 000 mg/kg(体重质量),根据急性毒性分级标准属实际无毒级。

2.7.2 蓄积毒性实验 给药 20 d 后观察,雌、雄小鼠均无死亡情况发生,小鼠蓄积系数 K>5,为弱蓄积毒性。

2.7.3 急性眼刺激实验 对动物眼刺激实验,染毒组家兔眼角膜和虹膜正常,结膜未见水肿、有轻微充血,结膜刺激指数为 1。按急性眼刺激强度分级标准,属无刺激性。

2.7.4 急性皮肤刺激实验 除受试物后,各家兔受试皮肤局部未见有红斑和水肿反应。皮肤刺激反应积分值为 0,对照侧皮肤未见异常,按皮肤刺激反应评分标准,反应积分均值为 0,该洗液对家兔皮肤无刺激性。

2.7.5 小鼠骨髓细胞微核实验 经统计学分析,受试组嗜多染红细胞微核率与阴性对照组比较差异均无统计学意义(P=0.322>0.05),PCE/NCE 比值均大于 0.1(表 5),而与阳性对照组差异有统计学意义(P<0.01)小鼠骨髓嗜多染红细胞微核实验为阴性,无致突变性。

表 5 复方手消毒液对小鼠骨髓嗜多染红细胞微核实验结果

组别	含微核 PCE 数	微核细胞率	PCE/NCE
实验组	1.4±0.8	0.322	1.7±0.3
阴性对照蒸馏水	13	1.3±1.0	1.8±0.9
阳性对照环磷酸胺	319	31.9±3.3	1.1±0.9

2.7.6 小鼠精子畸形实验 经统计学分析,精子畸形实验结果为阴性。

3 讨 论

实验观察的复方手消毒液以聚-[2-(2-乙氧基)-乙脂]-氯化胍和聚-环己-胍盐-氯化物为主要有效成分,这两种胍盐具有很高的活性,使聚合物呈正电性,通过库仑力吸附到带负电性的有害微生物表面,通过细胞壁(或者包膜)扩散到细胞内部,与细胞质膜结合使其破裂,其内容物流失,从而灭菌。此外,聚

合物形成的薄膜会紧紧包裹微生物,抑制其复制分裂等繁殖行为,同时切断微生物的呼吸通道,使之迅速窒息而死。该杀菌剂的杀菌过程迅速且不产生任何有害物质,不影响杀菌环境中的其他任何无关成分,是安全无毒的高效灭菌剂^[3-5],更为优越的是,其杀菌机制不依赖于微生物的形态和种类,所以微生物的变种和变异不影响其药效的发挥,也就是说它不会使微生物产生抗药性,因此即使持续长期使用,药效也丝毫不会降低。而氧、氯、碘、醛、酚类杀菌剂依靠氧化作用或者卤代作用杀菌,杀灭有害微生物的同时会腐蚀相关设备,甚至产生有毒物质危害人畜健康。其他的重金属类杀菌剂如 Ag 等杀菌活性一般,又因其制造工艺复杂,生产成本低且不易储存和运输的缺点使其应用具有很大局限性。而复方手消毒液性能稳定,易于保存和运输,使用方便。张卓然等^[6]报道急性经口毒性实验结果显示该消毒液属实际无毒物质,与本实验观察结果一致,在亚急性毒性实验研究试验期内各试验组动物生长发育良好,体质量增重、食物利用率、脏器系数、血常规、血生化等各项指标均在本实验室正常值范围内,与对照组之间差异均无统计学意义。病理组织学检查各组脏器未见有意义的病理改变。

本实验结果表明,该复方消毒剂对细菌繁殖体和真菌杀灭效果较好;毒理学评价属实际无毒级,弱蓄积毒性;对皮肤属无刺激性,对眼睛无刺激性;性能稳定,腐蚀性较低,适合在医院长期反复洗手使用,是一种理想的新型水溶性消毒产品,具有研究开发前景,值得进一步作系统研究和适用性评价。

参考文献

[1] 刘华荣,权力敏.一种复方消毒剂杀菌效果及毒性的实验观察[J].中国消毒学杂志,2006,23(6):915-917.

[2] 卫生部卫生法制与监督司.消毒技术规范[S].北京:中华人民共和国卫生部,2002:126-134.

[3] 魏秋华,袁庆霞,王长德,等.一种复方洗手消毒液性能的研究[J].中国消毒学杂志,2006,23(2):134-136.

[4] 翟文慧,张濛,王海玉,等.一种手消毒液杀菌效果与毒性试验观察[J].预防医学论坛,2007,13(7):623-625.

[5] 文翠容,庄英杰,杨玉琴,等.一种快速手消毒液消毒性能观察[J].中国消毒学杂志,2007,24(3):234-235.

[6] 张卓然,王凤鸣,李慧,等.某品牌手皮肤黏膜消毒液的亚急性毒性实验研究[J].实用预防医学,2008,15(5):1588-1589.

(收稿日期:2010-10-09)

(上接第 690 页)

参考文献

[1] 中国合格评定国家认可委员会.ISO 15189 医学实验室质量和能力认可准则[S].北京:中国合格评定国家认可委员会,2008:1-36.

[2] Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods[M]. Wayne, Pennsylvania: EP5-A2, CLSI, 2004.

[3] 张葵.定量检测系统方法学性能验证实验的基本方法[J].临床检验杂志,2009,27(5):321-323.

[4] Clinical and Laboratory Standards Institute. User demonstration of performance for precision and accuracy[M].

Wayne, Pennsylvania: EP15-A2, CLSI, 2004.

[5] Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures[M]. Wayne, Pennsylvania: EP6-A2, CLSI, 2003.

[6] Clinical and Laboratory Standards Institute. How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory[M]. Wayne, Pennsylvania: C28-A2, CLSI, 2000.

[7] U. S. Department Health and Human Services, Medicare. Clinical and laboratory standards institute, CLSI[J]. Fed Regi St, 2006, 57(40):7002.

(收稿日期:2010-10-15)