

网络出版时间:2016-02-02 09:37

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2016.03.004

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20160202.0937.008.html>

甲酚纳米乳消毒剂的质量评价及消毒功效研究

杨雪峰¹, 韩庆功¹, 郑爱武², 柳东阳¹, 李珊珊¹,
袁香丽¹, 胡 萌¹, 杜家洋¹, 丁丹霞¹

(1 河南科技学院 动物科学学院, 河南 新乡 453003; 2 新乡市畜牧技术推广站, 河南 新乡 453000)

[摘要] **【目的】**对甲酚纳米乳消毒剂进行质量评价和消毒功效研究。**【方法】**分别利用肉眼观察和离心法检测甲酚纳米乳消毒剂的外观性状和物理稳定性, 染色法和稀释法鉴别其结构类型, 透射电镜观察其微观形态, 激光粒度分析仪测定其粒径大小, 加速试验考察其稳定性, 最后通过载体定量杀菌试验和物体表面现场消毒试验研究甲酚纳米乳消毒剂的消毒功效。**【结果】**甲酚纳米乳消毒剂外观澄明、均一, 离心不分层, 为水包油型纳米乳, 乳滴呈规则的球形, 平均粒径为 (34.89 ± 3.56) nm, 粒径呈正态分布; 在37℃贮存90 d, 主药甲酚的平均含量下降了9.62%, 稳定性良好。体积分数0.5%和1.0%的甲酚纳米乳消毒剂分别作用3和1 min以上时, 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的平均杀灭率均大于99.90%; 体积分数1%和高于3%的甲酚纳米乳消毒剂分别作用5和3 min以上时, 对自然菌的杀灭率均大于90%; 甲酚纳米乳消毒剂的消毒效果与来苏儿无显著差异($P > 0.05$)。**【结论】**甲酚纳米乳消毒剂水溶性好, 刺激性气味小, 稳定性好, 消毒功效强, 值得在临床中推广应用。

[关键词] 甲酚; 纳米乳; 消毒剂; 中和剂

[中图分类号] S859.79⁺9.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2016)03-0023-05

Quality evaluation and disinfection efficacy of cresol nanoemulsion disinfectant

YANG Xue-feng¹, HAN Qing-gong¹, ZHENG Ai-wu², LIU Dong-yang¹,
LI Shan-shan¹, YUAN Xiang-li¹, HU Meng¹,
DU Jia-yang¹, DING Dan-xia¹

(1 College of Animal Science, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, Henan 453003, China;

2 Xinxiang Husbandry Technique Popularization Station, Xinxiang, Henan 453000, China)

Abstract: **【Objective】**The aim of this study was to evaluate the quality and disinfection efficacy of novel cresol nanoemulsion disinfectant. **【Method】**The external properties, physical stability, structure type, micromorphology, particle size, and stability of cresol nanoemulsion disinfectant were determined by macroscopic observation, centrifuge method, staining/dilution method, transmission electron microscope, laser particle size analyzer, and acceleration test, respectively. The carrier quantify disinfect experiment and body surface disinfection test were also conducted to evaluate the disinfection efficacy of the disinfectant. **【Result】**Cresol nanoemulsion disinfectant was clear, uniform, and not creamed after centrifugalization. The emulsion belonged to oil-in-water type and the droplet was regular sphere. The mean droplet size was (34.89 ± 3.56) nm with normal distribution. The average content of cresol reduced by 9.62% after storing for 90 days at 37℃, indicating that it was stable. The average killing rates of cresol nanoemulsion disinfect-

[收稿日期] 2014-07-24

[基金项目] 新乡市科技发展计划项目(13NY29); 国家级大学生创新创业训练计划项目(201210467037)

[作者简介] 杨雪峰(1973—), 女, 河南泌阳人, 副教授, 博士, 主要从事兽医药理学研究。E-mail: yangxuefeng2003@126.com

ants with concentrations of 0.5% and 1.0% (V/V) against *E. coli* and *S. aureus* were all higher than 99.90% for more than 3 and 1 min, respectively. The average killing rates against natural bacteria were all higher than 90% when disinfectants with concentrations of 1% and >3% (V/V) were used for over 5 and 3 min, respectively. The difference in disinfection effects of cresol nanoemulsion disinfectant and Lysol was not significant ($P>0.05$). **【Conclusion】** Cresol nanoemulsion disinfectant had good solubility, small pungent taste, good stability and strong disinfection efficacy. Thus, it can be generalized and applied in clinic.

Key words: cresol; nanoemulsion; disinfectant; neutralizer

甲酚是传统酚类消毒剂来苏儿(即甲酚皂溶液^[1])的主要功效成分,具有水溶性低和特殊刺激性气味等缺点。来苏儿由于生产工艺较复杂,且刺激性气味较重等原因,其临床应用受到限制。因此,生产中迫切需要寻求解决甲酚水溶性差和刺激性气味重的办法。

纳米乳是近年来研究较多的一种药物载体,具有其他药物载体所不可比拟的优点:①属于热力学稳定体系,稳定性好,易于制备和保存;②可提高难溶性药物的溶解度^[2];③药物被包封于纳米级的小滴内,避免了与外界因素如空气、光等接触,纳米乳载体能保护药物,避免药物被氧化或水解,能提高药物稳定性^[3],同时具有缓释的性能^[4];④能提高药物的生物利用度^[5-6];⑤粒径小且均匀,可提高包封于其中的药物的分散度,还可促进药物的透皮吸收^[7];⑥能掩盖一些药物的不良气味^[3]。因此,纳米乳被认为是一种极具发展潜力的理想药物载体,纳米乳制剂也成为近年来研究的热点。本课题组以纳米乳为药物载体,以甲酚为模型药物,研制出一种甲酚纳米乳消毒剂,并就其制备方法申请了国家发明专利^[8]。本研究进一步对甲酚纳米乳消毒剂的质量及消毒功效进行考察,以期为甲酚纳米乳消毒剂的临床应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株 大肠杆菌 8099 和金黄色葡萄球菌 ATCC 6538,由河南科技学院药理实验室提供。

1.1.2 主要试剂 甲酚(分析纯,天津市光复精细化工研究所),营养琼脂(青岛市高科园海博生物技术有限公司),MHB 培养基(北京奥博星生物技术有限公司),吐温-80(天津市瑞金特化学品有限公司),苏丹红Ⅲ(上海试剂三厂),亚甲基蓝(天津市福晨化学试剂厂),牛血清白蛋白(盐城赛宝生物科技有限公司)。

甲酚纳米乳消毒剂,本课题组前期制备^[8]。来

苏儿,参照文献[9]制备。

30 mg/mL 吐温-80 PBS 液:精密称取 3 g 吐温-80 于容量瓶中,加入 PBS 定容至 100 mL,高压灭菌。同法配制 5 mg/mL 硫代硫酸钠 PBS 液、10 mg/mL 吐温-80+10 mg/mL 卵磷脂+5 mg/mL 硫代硫酸钠 PBS 液。

1.1.3 主要仪器 DU 800 UV/ Vis Spectrophotometer 紫外/可见分光光度计(美国 beckman coulter 公司);日立 H27500 透射电镜(日本日立公司);Zetasizer Nano ZS 型激光粒度分析仪(英国 Malvern Instrument 公司);SHP-250 型生化培养箱(上海三发科学仪器有限公司)。

1.2 甲酚纳米乳消毒剂的质量评价

1.2.1 外观性状的鉴别 用肉眼观察甲酚纳米乳消毒剂的外观性状,并参照文献[10],将其离心(15 000 r/min)15 min,观察是否出现分层,不分层则说明纳米乳物理稳定性好。

1.2.2 结构类型的鉴定 ①染色法。参照文献[11],利用油性染料苏丹红Ⅲ(红色)和水溶性染料亚甲基蓝(蓝色)在纳米乳中扩散的快慢来判断纳米乳类型。若红色扩散快于蓝色,则为油包水(W/O)型纳米乳,反之则为水包油(O/W)型。②稀释法^[3]。取适量甲酚纳米乳消毒剂置于洁净烧杯中,不停加入蒸馏水稀释,观察消毒剂被稀释的情况。若消毒剂能与蒸馏水混合均匀,并能被蒸馏水无限稀释,则判定其为 O/W 型,反之则为 W/O 型。

1.2.3 微观形态的观察和粒径大小的分布情况 用透射电镜观察甲酚纳米乳消毒剂的微观形态。取 10 倍稀释的甲酚纳米乳消毒剂 1 滴,滴加在覆有碳膜的铜网上,自然晾干后,用 20 mg/mL 磷钨酸溶液(pH 7.4)滴在铜网上负染 15 min,自然挥干后在透射电镜下观察纳米乳的微观形态。另取 10 倍稀释的甲酚纳米乳消毒剂适量,利用激光粒度分析仪测定其平均粒径。

1.2.4 稳定性的考察 利用加速试验方法考察甲酚纳米乳消毒剂的化学稳定性。取密封好的甲酚纳

米乳消毒剂,置 37 ℃恒温培养箱内贮存 90 d,贮存前、后分别利用已建立的紫外分光光度法测定其有效成分甲酚的含量。每次检测 3 批样品,每批样品重复测 3 次,结果取其平均值。依据《消毒技术规范》(2008 版),确定其在常温下的存贮时间。

1.3 甲酚纳米乳消毒剂的消毒效果评价

依据《消毒技术规范》(2008 版)进行试验。

1.3.1 中和剂筛选试验 以大肠杆菌 8099 为试验菌,将其第 3 代菌悬液用磷酸盐缓冲液(PBS)稀释,并与牛血清白蛋白按体积比 1 : 1 混匀,稀释成 $(2.5 \times 10^3) \sim (1.5 \times 10^4)$ CFU/mL 的菌悬液,备用。

以 30 mg/mL 吐温-80 PBS、5 mg/mL 硫代硫

酸钠 PBS、10 mg/mL 吐温-80 + 10 mg/mL 卵磷脂 + 5 mg/mL 硫代硫酸钠 PBS 为供筛中和剂,试验设计见表 1,按中和剂悬液定量鉴定试验操作程序^[12]进行试验,甲酚纳米乳消毒剂体积分数为 3%,中和作用时间为 5 min。满足以下条件则判定所选中和剂及其浓度适宜:第 1 组不长菌或仅有极少数菌落生长;第 2 组有菌落生长,较第 1 组多,但较第 3、4、5 组少;第 3、4、5 组菌落数相近,且误差率不超过 15%;第 6、7、8 组无细菌生长。第 3、4、5 组的组间菌落数误差率 = $[(3 \text{ 组间菌落平均数} - \text{各组菌落平均数}) \text{ 的绝对值之和} \div 3 \text{ 组菌落平均数之和}] \times 100\%$ 。

表 1 甲酚纳米乳消毒剂中和剂筛选试验设计

Table 1 Screening test design for neutralizers of cresol nanoemulsion disinfectant

组别 Group	体系组成 Composition	组别 Group	体系组成 Composition
1	消毒剂+菌悬液 Disinfectant+Bacterial suspension	5	稀释液+菌悬液 Diluent+ Bacterial suspension
2	(消毒剂+菌悬液)+中和剂 (Disinfectant+Bacterial suspension)+Neutralizer	6	培养基 Culture medium
3	中和剂+菌悬液 Neutralizer+ Bacterial suspension	7	稀释液 Diluent
4	(消毒剂+中和剂)+菌悬液 (Disinfectant+Neutralizer)+Bacterial suspension	8	中和剂 Neutralizer

1.3.2 载体定量杀菌试验 在无茵棉布片(1.0 cm×1.0 cm)上分别逐片滴加 3×10^8 CFU/mL 的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌悬液 10 μ L,干燥后即制成载体菌片。取载体菌片,分别浸入 5 mL 甲酚纳米乳消毒剂和来苏儿(体积分数分别为 0.2%, 0.5%, 1.0%)中,以磷酸盐缓冲液作为阳性对照组,作用至预定时间(1,3,5 min),取出载体菌片,放入装有 5 mL 30 mg/mL 吐温-80 PBS 液中中和剂的试管中,作用 10 min 后,敲打振荡试管 80 次,以充分洗脱菌片上的残存菌并混匀。然后取洗脱液原液及其不同稀释度(10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5})的稀释液 500 μ L,用平板倾注法进行活菌计数。不同浓度的甲酚纳米乳消毒剂和来苏儿分别重复 3 次,计算平均杀菌率。

1.3.3 物体表面现场消毒试验 选择木质油漆桌面为代表,用 5.0 cm×5.0 cm 无茵不锈钢规格板限定采样区域。消毒前先用无茵棉拭沾湿稀释液进行涂抹法采样,作为消毒前的阳性对照组,并将中和剂、稀释液进行接种培养,作为阴性对照组。然后分别用无茵棉拭蘸取不同体积分数(分别为 1%, 3%, 5%)的甲酚纳米乳消毒剂和来苏儿,对桌面进行涂

擦消毒。消毒作用至预定时间(3,5,10 min)时,用无茵棉拭沾湿 30 mg/mL 吐温-80 PBS 中和剂,以同样方法进行涂抹采样,作为试验组。最后将采样棉拭头置入装有 5 mL 稀释液的试管中,充分振荡洗脱。取洗脱液进行活菌培养,计数培养后的自然菌总数,计算自然菌的灭除率。

2 结果与分析

2.1 甲酚纳米乳消毒剂的质量评价

2.1.1 外观性状的鉴别 甲酚纳米乳消毒剂外观呈深黄色,澄清,透明,均一,在烧杯中晃动无挂壁现象,流动性良好;离心后未见分层,仍均匀、澄清,表明该纳米乳消毒剂的物理稳定性好。

2.1.2 结构类型的鉴定 在甲酚纳米乳消毒液中,亚甲基蓝的扩散速度大于苏丹红Ⅲ,且该纳米乳能被蒸馏水无限稀释,说明制备的纳米乳为 O/W 型。

2.1.3 微观形态和粒径大小分布 透射电镜下观察,甲酚纳米乳消毒剂的乳滴呈规则的球形,分布均匀,无粘连(图 1)。粒度分析结果(图 2)表明,甲酚纳米乳消毒剂的乳滴平均粒径为 (34.89 ± 3.56) nm,粒径分布呈正态分布。

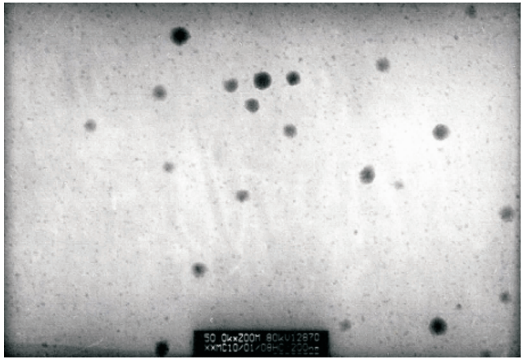


图 1 甲酚纳米乳消毒剂的透射电镜照片(×50 000 倍)

Fig. 1 Transmission electron micrograph of cresol nanoemulsion disinfectant (×50 000)

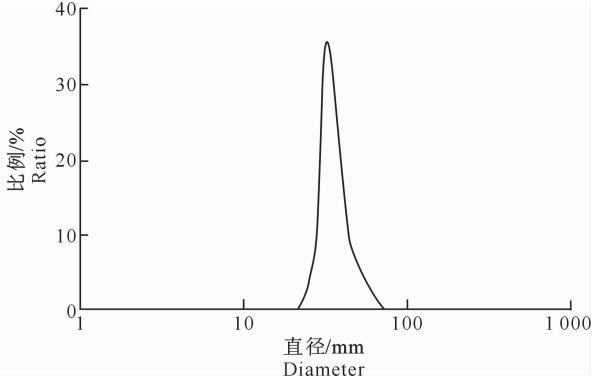


图 2 甲酚纳米乳消毒剂的粒径分布图

Fig. 2 Size distribution of cresol nanoemulsion disinfectant

2.1.4 稳定性考察结果 甲酚纳米乳消毒剂在 37℃放置 90 d,放置前的甲酚平均含量 138.42 mg/mL,放置后的甲酚平均含量为 125.10 mg/mL,下降了 9.62%。说明甲酚纳米乳消毒剂的性能稳定,可在常温下至少贮存 2 年。

2.2 甲酚纳米乳消毒剂的消毒效果

2.2.1 中和剂的筛选 由表 2 可知,只有 30

mg/mL吐温-80 PBS 作为中和剂时的组间菌落数误差率小于 15%,表明 30 mg/mL 吐温-80 PBS 能有效中和甲酚纳米乳消毒剂对试验菌的残余作用,中和剂及其中和产物对试验菌及培养基无不良影响。据此确定,30 mg/mL 吐温-80 PBS 为甲酚纳米乳消毒剂的适宜中和剂。

表 2 甲酚纳米乳消毒剂对大肠杆菌的中和剂筛选试验结果

Table 2 Neutralizer screening test of cresol nanoemulsion disinfectant against *Escherichia coli*

中和剂 Neutralizer	各组回收菌落数/(CFU·mL ⁻¹) Colony count of each group								第 3、4、5 组间 菌落数误差率/% Error rate in colony count among groups 3,4 and 5
	1 组 Group 1	2 组 Group 2	3 组 Group 3	4 组 Group 4	5 组 Group 5	6 组 Group 6	7 组 Group 7	8 组 Group 8	
I	0	100	1.38×10 ⁴	1.38×10 ⁴	1.37×10 ⁴	0	0	0	0.32
II	0	270	8.9×10 ³	1.02×10 ⁴	1.36×10 ⁴	0	0	0	16.51
III	0	300	7.0×10 ³	1.0×10 ⁴	1.37×10 ⁴	0	0	0	22.58

注: I. 30 mg/mL 吐温-80 的 PBS; II. 5 mg/mL 硫代硫酸钠 PBS; III. 10 mg/mL 吐温-80+10 mg/mL 卵磷脂+5 mg/mL 硫代硫酸钠 PBS。

Note: I. PBS contains 30 mg/mL Tween-80; II. PBS contains 5 mg/mL sodium thiosulfate; III. PBS contains 10 mg/mL Tween-80 and 10 mg/mL Lecithin and 5 mg/mL sodium thiosulfate.

2.2.2 载体定量杀菌试验结果 由表 3 可知,随着甲酚纳米乳消毒剂体积分数的增加和作用时间的延长,其消毒效果增强;体积分数 0.5%和 1.0%甲酚

纳米乳消毒剂分别作用 3 和 1 min 以上,对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的平均杀灭率均大于99.90%,与来苏儿的消毒效果无显著差异($P>0.05$)。

表 3 甲酚纳米乳消毒剂的载体定量杀菌试验结果

Table 3 Carrier quantify sterilization experiment of cresol nanoemulsion disinfectant

消毒剂 Disinfectant	体积分数/% Concentration	对大肠杆菌的平均杀灭率/% Average sterilizing rate against <i>Escherichia coli</i>			对金黄色葡萄球菌的平均杀灭率/% Average sterilizing rate against <i>Staphylococcus aureus</i>		
		1 min	3 min	5 min	1 min	3 min	5 min
甲酚纳米乳消毒剂 Cresol nanoemulsion disinfectant	0.2	55.56	66.67	88.89	58.82	70.74	85.36
	0.5	99.64	99.97	100.00	99.82	99.96	100.00
	1.0	99.96	99.98	100.00	99.99	100.00	100.00
来苏儿 Lysol	0.2	56.96	68.87	89.78	58.56	72.43	87.71
	0.5	99.67	99.89	100.00	99.80	99.98	100.00
	1.0	100.00	100.00	100.00	99.92	100.00	100.00

2.2.3 物体表面现场消毒试验结果 由表 4 可知,

随着甲酚纳米乳消毒剂体积分数的增加和作用时间

的延长,其消毒效果逐渐增强;体积分数 1%和高于 3%的甲酚纳米乳消毒剂分别作用 5 和 3 min 以上,其对自然菌的杀灭率均大于 90%,与来苏儿的消毒效果无显著差异($P>0.05$)。

表 4 甲酚纳米乳消毒剂的物体表面现场消毒试验结果

Table 4 Surface sterilization experiment of cresol nanoemulsion disinfectant

消毒剂 Disinfectant	体积分数/% Concentration	对自然菌的平均杀灭率/% Average sterilizing rate against natural bacteria at different times		
		3 min	5 min	10 min
甲酚纳米乳消毒剂 Cresol nanoemulsion disinfectant	1	83.40	91.38	93.82
	3	90.84	93.24	96.08
	5	96.28	98.46	99.54
来苏儿 Lysol	1	85.68	91.25	92.67
	3	90.13	92.60	93.15
	5	92.45	93.02	93.26

3 讨论与结论

3.1 甲酚纳米乳消毒剂的质量评价

质量评价不但是新药研制时的最基本要求,也是药效学研究的基础。纳米乳的质量评价指标目前尚无统一标准^[13],通常主要有外观性状、剂型鉴别、结构类型、微观形态、粒径大小和稳定性等。纳米乳的外观通常呈透明或半透明状,高速离心后不分层,仍维持透明或半透明状;结构类型主要有水包油(O/W)型、油包水(W/O)型和双连续型,通常采用稀释法^[3]和染色法^[11]等进行鉴别;微观形态通常为圆球形,粒径一般在 10~100 nm,分布均匀;稳定性考察指标通常包括粒径、外观、澄清度及主药的含量等。本试验对甲酚纳米乳消毒剂的质量评价结果表明,甲酚纳米乳消毒剂外观澄明、均一,离心不分层,为 O/W 型,乳滴呈规则的球形,平均粒径为(34.89±3.56) nm,粒径呈正态分布;在 37℃贮存 90 d,主药甲酚的平均含量下降了 9.62%,稳定性良好。依据《消毒技术规范》(2008 版),甲酚纳米乳消毒剂在常温下至少可存贮 2 年。

3.2 甲酚纳米乳消毒剂的消毒效果评价

目前,纳米技术与纳米材料已广泛应用于各个领域,但在消毒领域的应用尚鲜见报道^[14]。魏坤等^[15]对复方纳米银抗菌乳液消毒效果的研究结果表明,用该消毒液原液作用 1 min,对棉布载体上金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌和大肠杆菌的平均杀灭率均达到 99.9%以上;对伤寒沙门菌作用 2 min,平均杀灭率亦达到 99.9%以上;用该消毒液原液擦拭消毒并作用 2 min,对手上自然菌平均杀灭率达到 97%以上,说明该纳米银复方消毒液具有良好的杀菌效果。魏秋华等^[14]以醋酸氯己定和纳米氧化物为主要抗菌成分,经纳米乳化技术工艺制备出一种皮肤消毒纳米乳液,该消毒纳米乳液

具有良好的杀菌效果,原液对布片上金黄色葡萄球菌和大肠杆菌作用 3 min,对白色念珠菌作用 5 min,平均杀灭率均达 99.90%以上;且在降低醋酸氯己定含量的条件下,其杀菌效果仍明显优于文献^[16]报道的含氯己定消毒剂。本试验利用载体定量杀菌试验和物体表面现场消毒试验,研究了甲酚纳米乳消毒剂的消毒功效,结果表明,体积分数 0.5%和 1.0%的甲酚纳米乳消毒剂分别作用 3 和 1 min 以上时,对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的平均杀灭率均大于 99.90%;体积分数 1%和高于 3%的甲酚纳米乳消毒剂分别作用 5 和 3 min 以上时,对自然菌的杀灭率均大于 90%;甲酚纳米乳消毒剂的消毒效果与来苏儿无显著差异($P>0.05$)。结果提示,甲酚纳米乳消毒剂的消毒功效较强,与来苏儿的消毒效果相当。但与来苏儿相比,甲酚纳米乳消毒剂水溶性好,刺激性气味小,稳定性好的优势,值得在临床中推广应用。

[参考文献]

[1] 陈杖榴. 兽医药理学 [M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2009: 293.
Chen Z L. Veterinary pharmacology [M]. 3 Edition. Beijing: China Agriculture Press, 2009: 293. (in Chinese)

[2] Liu Y, Zhang D, Zou D, et al. Transmission of visible and ultra-violet light through charged stabilized nanoemulsions [J]. J Biomed Nanotechnol, 2011, 7: 621-631.

[3] Jaiswal M, Dudhe R, Sharma P K. Nanoemulsion: An advanced mode of drug delivery system [J]. Biotech, 2014, 4: 1-5.

[4] Zhang Y, Shang Z H, Gao C H, et al. Nanoemulsion for solubilization, stabilization, and *in vitro* release of pterostilbene for oral delivery [J]. AAPS Pharm Sci Technol, 2014, 5: 1-9.

[5] Gong Y, Wu Y, Zheng C, et al. An excellent delivery system for improving the oral bioavailability of natural vitamin E in rats [J]. AAPS Pharm Sci Technol, 2012, 13(3): 961-966.