

壳聚糖成膜剂的杀菌效果与毒理学研究

王余华, 王晓, 刘科亮

四川省疾病预防控制中心, 四川 成都 610041

摘要:目的 了解壳聚糖成膜剂的杀菌效果及其毒性。方法 悬液定量杀菌试验和动物毒性试验。结果 该样品作用大肠杆菌, 金黄色葡萄球菌 2 min, 杀灭对数值 > 5.00, 作用白色念珠菌 2 min, 杀灭对数值 > 4.00, 稳定性试验结果证明, 该产品稳定性好, 毒性试验结果表明, 对皮肤无刺激。结论 壳聚糖成膜剂具有良好的杀灭微生物性能, 毒性低, 稳定性好, 可广泛用于皮肤、伤口等消毒。

关键词:壳聚糖; 杀菌作用; 毒性

中图分类号: R187 文献标志码: A 文章编号: 1003-8507(2014)10-1842-02

Study on germicidal efficacy and toxicology of chitosan film formers

WANG Yu-hua, WANG Xiao, LIU Ke-liang

Sichuan Provincial Center for Disease Prevention and Control, Chengdu, Sichuan 610041, China

Abstract: Objective This study was to learn the germicidal efficacy and toxicology of chitosan film formers. **Methods** Suspension quantitative *germicidal* test and animal toxicity test were conducted. **Results** The killing logarithm value of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* exposed to the solution for 2 min was >5.00 in average. That of *Candida albicans* with the same exposure was >4.00 in average. The product was stable and not irritating to skin. **Conclusion** The chitosan film formers are recommended to be widely used in skin and wound disinfection because of its good germicidal efficacy and low toxicity.

Keywords: Chitosan film formers; Germicidal efficacy; Toxicology

壳聚糖, 学名聚-2-脱氧-β-D葡萄糖, 是甲壳素经过脱乙酰化反应后的多糖类高分子衍生物。壳聚糖具有良好的抗菌性、成膜性, 被广泛地应用于食品、医药及化工等行业。本研究对其杀菌效果及毒理学进行了探讨, 结果报告如下。

1 材料与方法^[1]

1.1 菌悬液的制备 试验指标菌选择大肠杆菌(8099), 金黄色葡萄球菌(ATCC6538), 白色念珠菌(ATCC10231), 均从中国普通微生物菌种保藏中心购买。用胰蛋白胨生理盐水(TPS)洗下指标菌的24 h培养物, 制成菌悬液后按1:1加入3%牛血清白蛋白混匀备用。

1.2 中和剂鉴定试验 试验共分6组, 按悬液定量试验程序操作。结果以第1组无菌生长或只有少数菌生长, 第2组菌数不少于100 cfu/ml, 第3、4、5菌数相近, 且组间误差率不大于15%, 第6组无菌生长, 表明所用中和剂合适。试验菌为金黄色葡萄球菌和白色念珠菌。

1.3 悬液定量杀菌试验 在无菌试管中加入消毒剂4 ml和菌悬液1 ml, 混匀、计时, 到规定时间后立

即取0.5 ml混合液加至4.5 ml中和剂试管中, 作用10 min, 计数菌落数。阳性对照用TPS代替消毒剂按相同方法进行。计算杀灭对数值。试验在20℃恒温水浴中操作, 重复3次。

1.4 稳定性试验 将样品在37℃培养箱中放置90 d, 并在存放前、后均进行白色念珠菌的悬液定量杀菌试验, 比较该样品的杀灭对数值的变化, 从而确定其有效期。

1.5 多次完整皮肤刺激试验 试验选用4只健康大耳白兔(四川省实验动物专委会养殖场提供, 动物合格证号SCXK(川)2008-14)。试验前在兔子脊柱两侧各剪3 cm×3 cm的被毛, 试验时将0.5 ml样品涂抹于一侧被剪皮肤上, 另一侧皮肤不做处理, 作为空白对照。每天涂抹一次, 连续14 d。并于每次涂抹后24 h观察皮肤反应情况, 对结果进行评价。

2 结果

2.1 中和剂试验结果 试验结果表明, 含10 g/L碳酸氢钠, 20 g/L吐温80的磷酸盐缓冲液(PBS)能有效终止该样品的残留毒性, 中和产物对试验菌的生长无影响, 结果符合标准的要求。见表1。

2.2 定量杀菌实验结果 表中结果证实, 该样品原液对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌作用2 min的平均杀灭对数值均>5.00, 对白色念珠菌作用2 min的平均杀灭对数值>4.00, 达到合格要求。见表2。

作者简介: 王余华(1964-), 女, 副主任技师, 研究方向: 消毒学

表 1 壳聚糖成膜剂的中和剂鉴定试验结果

组别	平均菌数 (cfu/ml)	
	金黄色葡萄球菌	白色念珠菌
消毒剂+菌悬液	0	0
消毒剂+菌悬液+中和剂	123	110
中和剂+菌悬液	17 200 000	1 870 000
消毒剂+中和剂+菌悬液	18 700 000	1 980 000
阳性对照	18 900 000	2 140 000
阴性对照	0	0

注: 试验温度 20℃, 重复 3 次; 样品原液作用 0.5 min。

表 2 壳聚糖成膜剂定量杀菌试验结果

菌种	作用不同时间 (min) 的平均杀灭对数值			对照组平均菌落数的对数值
	1	2	3	
大肠杆菌	>7.31	>7.31	>7.31	7.31
金黄色葡萄球菌	>7.28	>7.28	>7.28	7.28
白色念珠菌	>6.33	>6.33	>6.33	6.33

2.3 稳定性试验结果 结果表明, 该样品于 37℃ 保存 90 d 后, 对试验菌的平均杀灭对数值与存放前比较无变化, 保质期可定为 2 年。

2.4 毒理学试验结果 该样品对家兔的多次完整皮肤刺激试验结果为阴性。

3 讨论

壳聚糖来源广泛, 因为其优秀的性能, 特别是良好的抗菌性能, 已经应用于诸多行业, 如作为生

物抗菌敷料在皮肤组织工程中的应用^[2], 还可以与银粒子结合成复合物后, 其抗菌性能得到较大提高^[3]。但是其抑菌机理尚不确定, 根据现有的研究成果, 有可能是因为壳聚糖分子量大, 可吸附在细胞表面, 形成一层较致密的分子膜, 从而使营养物质的运输得以阻断, 细胞因缺乏营养而死亡。也可能是壳聚糖与细胞内的蛋白质和核酸结合后, 干扰了细胞的正常生理功能, 导致细胞死亡^[4]。目前国内对壳聚糖作为抗菌剂的实验报告研究较多^[5], 但有关稳定性和毒性试验的报告较少。

本研究结果显示, 该样品作用大肠杆菌, 金黄色葡萄球菌和白色念珠菌 2 min, 均可达消毒合格要求; 该产品可贮存 2 年, 稳定性好; 毒性试验结果表明, 对皮肤无刺激。

参考文献

[1] 中华人民共和国卫生部. 消毒技术规范 [S]. 北京: 中华人民共和国卫生部, 2002: 15-151.
 [2] 何玲, 于波, 王慧丽, 等. 甲壳素 / 壳聚糖生物抗菌敷料在皮肤组织工程中的应用 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14 (38): 7149-7152.
 [3] 牛梅, 戴晋明, 侯文生, 等. 载银壳聚糖复合物的结构及其抗菌性能研究 [J]. 材料导报, 2011, 25 (10): 15-18, 26.
 [4] 吴小勇, 曾庆孝, 阮征, 等. 壳聚糖的抑菌机理及抑菌特性研究进展 [J]. 中国食品添加剂, 2004, (6): 46-49, 68.
 [5] 刘楠, 陈西广, 刘成圣, 等. 壳聚糖抑菌性能研究进展 [J]. 海洋科学, 2005, 29 (10): 90-92.

收稿日期: 2013-09-03

(上接第 1837 页)

[12] Hassan R, Ho M. Mesothelin targeted Cancer immunotherapy [J]. Eur J Cancer, 2008, 44 (1): 46-53.
 [13] Leong ML, Hampl J, Liu Weiqun, et al. Impact of preexisting vector-specific immunity on vaccine potency: characterization of listeria monocytogenes-specific humoral and cellular immunity in humans and modeling studies using recombinant vaccines in mice [J]. Infect Immun, 2009, 77 (9): 3958-3968.
 [14] Sciaranghella G, Lakhashe SK, Ayash-Rashkovsky M, et al. A live attenuated *Listeria monocytogenes* vaccine vector expressing SIV Gag is safe and immunogenic in macaques and can be administered repeatedly [J]. Vaccine, 2011, 29 (3): 476-486.
 [15] Zhao Xinyan, Li Zhongxia, Gu Baiyan, et al. Pathogenicity and immunogenicity of a vaccine strain of *Listeria monocytogenes* that relies on a suicide plasmid to supply an essential gene product [J]. Infect Immun, 2005, 73 (9): 5789-5798.
 [16] Qian Yue, Zhang Na, Jiang Ping, et al. Inhibitory effect of live-attenuated *Listeria monocytogenes*-based vaccines expressing MIA gene on malignant melanoma [J]. Journal of Huazhong University of Science and Technology - Medical Sciences, 2012, 32 (4): 591-597.
 [17] Friedman RS, Frankel FR, Xu Z, et al. Induction of human im-

munodeficiency virus (HIV)-specific CD8 T-cell responses by *Listeria monocytogenes* and a hyperattenuated *Listeria* strain engineered to Express HIV antigens [J]. J Virol, 2000, 74 (21): 9987-9993.
 [18] Thompson RJ, Bouwer HG, Portnoy DA, et al. Pathogenicity and immunogenicity of a *Listeria monocytogenes* strain that requires D-alanine for growth [J]. Infect Immun, 1998, 66 (8): 3552-3561.
 [19] Rayevskaya MV, Frankel FR. Systemic immunity and mucosal immunity are induced against human immunodeficiency virus Gag protein in mice by a new hyperattenuated strain of *Listeria monocytogenes* [J]. J Virol, 2001, 75 (6): 2786-2791.
 [20] Stevens R, Howard KE, Nordone S, et al. Oral immunization with recombinant listeria monocytogenes controls virus load after vaginal challenge with feline immunodeficiency virus [J]. J Virol, 2004, 78 (15): 8210-8218.
 [21] Wood LM, Guirnalda PD, Seavey MM, et al. Cancer immunotherapy using *Listeria monocytogenes* and listerial virulence factors [J]. Immunol Res, 2008, 42 (1/3): 233-245.
 [22] Seder RA, Darrah PA, Roederer M. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design [J]. Immunology, 2008, 8 (4): 247-258.

收稿日期: 2013-01-30