琼脂弥散法测定过氧化氢稀溶液的化学稳定性

余江河 何 华[1] 李正茂

(中国药科大学微生物学教研室,[1]分析化学教研室,南京 210009)

摘 要 在过氧化氢(H_2O_2)稀溶液中加入非那西丁,应用琼脂弥散法跟踪检测,对 H_2O_2 稀溶液的化学稳定性进行探索性研究。结果表明:80℃时含非那西丁组和空白对照组对金黄色葡萄球菌的有效杀菌时间分别为 192 h 和 120 h;对大肠杆菌的有效杀菌时间分别为 144 h 和 72 h。考察 144 h 时 H_2O_2 稀溶液的化学稳定性,非那西丁组与空白组的分解率分别为 78.18%和 94.28%。表明非那西丁能延长 H_2O_2 稀溶液的有效杀菌时间,同时增强 H_2O_2 稀溶液的化学稳定性。

关键词 H_2O_2;金黄色葡萄球菌;大肠杆菌;化学稳定性;琼脂弥散法

过氧化氢(H_2O_2)作为消毒杀菌剂被应用已有很久的历史,许多研究证明,一定浓度的 H_2O_2 对细菌、芽胞、病毒和真菌均有杀灭作用。但由于 H_2O_2 稀溶液不稳定,影响杀菌效果,因而,在应用上受到一定的限制。尽管在化学稳定性的研究方面有报道,且国外药典规定可加入非那西丁作为稳定剂[1,2],但应用琼脂弥散法跟踪检测并同时应用化学法对其化学稳定性进行检测,目前尚未见文献报道。我们通过在 H_2O_2 稀溶液(3%)中加入非那西丁,用琼脂弥散法跟踪检测杀菌效果,对 H_2O_2 稀溶液的化学稳定性进行探索性研究。

1 实验部分

1.1 实验材料

菌种:金黄色葡萄球菌 ATcc 25923;大肠杆菌 ATcc 25922。

培养基:(1)普通肉汤培养基:蛋白胨 1 g,牛肉浸膏 0.5 g,氯化钠 0.5 g,蒸馏水 100 ml。pH7.4～7.6。(2)普通琼脂培养基:普通肉汤 100 ml 加琼脂 2 g。pH7.4～7.6。试剂蛋白胨、牛肉浸膏、琼脂均为 BR 级。

试剂:30%H_2O_2(市售),非那西丁(药用级),高锰酸钾(AR)。

1.2 琼脂弥散法跟踪测定方法

1.2.1 *样品的制备* 将 30% H_2O_2 溶液用蒸馏水作 1∶10 稀释,使最终浓度为 3%作为空白液。取空白液 1 份加入一定量的非那西丁作为测定液。

1.2.2 *菌液和测定用含菌平板的制备* 将金黄色葡萄球菌 ATcc 25923,大肠杆菌 ATcc 25922 接种于定量的普通肉汤培养基中,于 37℃恒温振荡培养 6～8 h,将经振荡培养的菌液配制成浓度约 10^8 CFU/ml 备用。将 10^8 CFU/ml 的菌液加到经熔化后冷却至 55℃左右的普通琼脂培养基中,加入量为普通琼脂培养基 100 ml 加菌液 100 μl 混匀后制成含菌平板。每板加含菌琼脂培养基 20 ml,冷却后用直径为 6 mm 的打孔器打孔,挖去孔中的琼脂备用。

1.2.3 *实验温度的选择* 40℃,57℃和 80℃三个温度,并选择一定的时间取样测定。

1.3 实验方法与结果

将空白液和加非那西丁液各三份分别放入 40℃,57℃,80℃的恒温水浴中,在放入水浴之前,首先取样测定 H_2O_2 稀溶液的浓度,作为 100%的浓度(即 0 小时的浓度)。从 1 h 开始每隔一定的时间取样测定。取样时间分

收稿日期 1994-06-27

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

别为 1,3,5,8,10,24,48,72,96,120,144,168,192,216,240,264,288,312,336 h。取样后立即冷却至室温,加到含菌平板的孔中,加样量为 50 μl/孔,与此同时测定 H_2O_2 稀溶液的 pH 值。然后放入 37℃培养箱中培养 24 h,取出测量抑菌圈的直径。通过抑菌圈直径和 pH 值的变化来判断空白液和加非那西丁液二者的化学稳定性。同时,用高锰酸钾法测定 H_2O_2 稀溶液的含量[3]。实验结果见图 1。含非那西丁组与空白对照组相比,明显提高 H_2O_2 稀溶液的化学稳定性,延长其有效杀菌时间。

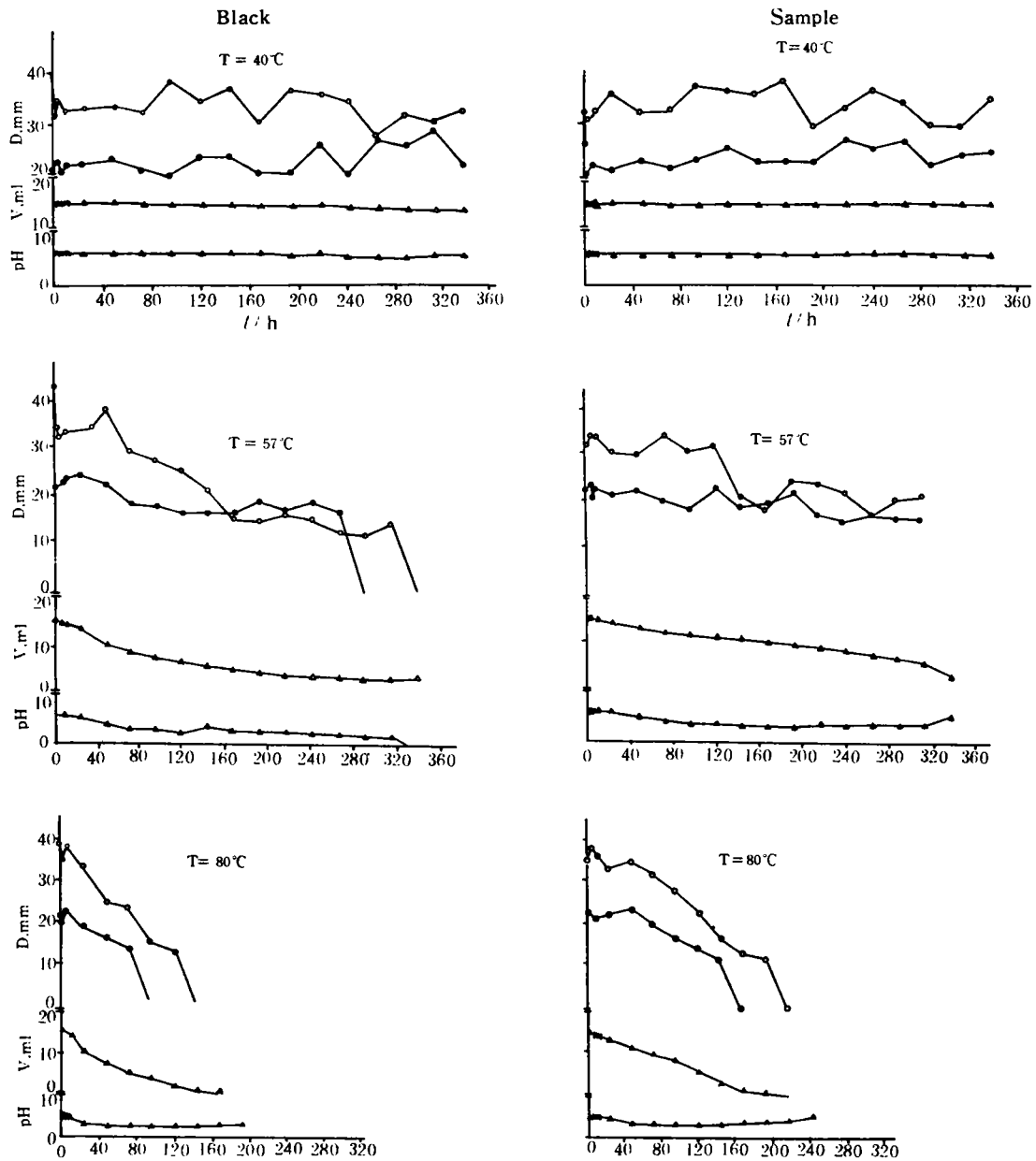

Fig 1. The time course of black space and sample to chemical stability, antibacteria activity and pH in 40℃、57℃ and 80℃
D: diameter of the zone of inhibit; *V*: potassium permanganate consumed of the volume; —∘—*Staphylococcus aureus*; —•—*E. coli*; —△—chemical stability; —▲—pH

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3 讨 论

1)H_2O_2 的杀菌机理主要是通过破坏细菌的通透屏障，使毒性物质易于进入细菌细胞内，使胞浆结构出现混乱，甚至可以使芽胞的皮质消失。同时，也可破坏细菌的氨基酸、酶和 DNA，特别可抑制含-SH 酶的活性。由于抑制了含-SH 酶的活性，使 DNA 核苷酸链断裂及其碱基组成改变。这些破坏作用可被-OH 的清除剂抑制，因此，认为 H_2O_2 的杀菌作用主要是通过毒性-OH 的形成实现的[1]。近代理论的研究认为 H_2O_2 释放水分子，其中的-OH 强烈吸引某些蛋白质中的氢原子，引起分子重排，也是其杀菌的原因[4]。

2)pH 值对 H_2O_2 稀溶液的化学稳定性有显著的影响。当 pH 值下降时，H_2O_2 的分解速度加快，杀菌作用下降。H_2O_2 稀溶液对金黄色葡萄球菌的杀菌作用优于对大肠杆菌的作用。

3)40℃时，空白液与加非那西丁液相比化学稳定性和杀菌作用无明显变化。57℃时，对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的杀菌作用，空白液 24 h 变化不大，从 48 h 到 268 h 杀菌作用下降，268 h 以后对大肠杆菌无杀菌作用，292 h 以后对金黄色葡萄球菌无杀菌作用。加非那西丁液对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌杀菌作用在 120 h 均变化不大。从 120 h 到 192 h 杀菌作用虽呈下降趋势，但明显小于空白液。H_2O_2 的分解速度呈平缓下降趋势。这说明非那西丁具有使 H_2O_2 化学性质稳定的作用。80℃时，空白液和加非那西丁液对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的有效杀菌时间明显缩短，这说明 H_2O_2 的稳定性受温度的影响较大。但加非那西丁液有效杀菌时间明显长于空白液。加非那西丁液和空白液两者对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的有效杀菌时间分别为 192，144 h 和 120，72 h。考察 144 h 的 H_2O_2 分解率，加非那西丁液和空白液分别为 78.18%和 94.28%。这说明非那西丁有明显的使 H_2O_2 稀溶液化学性质稳定的作用。

4)H_2O_2 稀溶液化学稳定性和杀菌作用之间有一定的相关性。将做进一步的研究。

参 考 文 献

1 俞晓峰．过氧化氢杀菌机理研究的进展．消毒与灭菌，1988，5(3)：49

2 李先璋，陈昌斌，文安桂．过氧化氢溶液稳定剂的筛选及有效期预测．医讯，1985，8(3)：111

3 中华人民共和国药典委员会．中华人民共和国药典：二部．北京：化学工业出版社，人民卫生出版社，1990.418

4 钱海伦主编．微生物学．北京：中国医药科技出版社，1993.188

Determination of Chemical Stability of Hydrogen Peroxide Dilute Solution by Agar Diffusion Test

Yu Jianghe, He Hua[1], Li Zhengmao

Department of Microbiology, [1]*Department of Analytical Chemistry*, *China Pharmaceutical University*, *Nanjing 210009*

Abstract An agar diffusion test was employed to determine the chemical stability of hydrogen peroxide dilute solution containing phenacetine. At 80℃, the effective disinfact time of the group containing phenacetine and the control group were respectively 192 h and 120 h for *Staphylococcus aures* and were respectively 144 h and 72 h for *E. coli*. At 144 h, the decomposition ratio of the group containing phenacetine and the control group were 78.18% and 94.28% respectively. The results showed that phenacetine could prolong the effective disinfact time of hydrogen peroxide dilute solution and enhance the chemical stability of hydrogen peroxide dilute solution.

Key words hydrogen peroxide; *Staphylococcus aureus*; *E. coli*; chemical stability; agar diffusion test

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net