

ICS 71.040.99  
分类号: Y40  
备案号: 36712-2012

# QB

## 中华人民共和国轻工行业标准

QB/T 2738—2012  
代替 QB/T 2738—2005

### 日化产品抗菌抑菌效果的评价方法

Test methods for evaluating daily chemical products in antibacterial and  
bacteriostatic efficacy

2012-05-24 发布

2012-11-01 实施

中华人民共和国工业和信息化部 发布

## 前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》给出的规则起草。

本标准代替QB/T 2738—2005《日化产品抗菌抑菌效果的评价方法》。

本标准与QB/T 2738—2005相比主要变化如下：

- 修订了抗菌、抑菌作用浓度和时间；
- 修订了抗菌、抑菌操作步骤中的试验菌种；
- 规定了培养皿中培养基的量；
- 修订了部分文字表述。

本标准由中国轻工业联合会提出。

本标准由全国表面活性剂和洗涤用品标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：国家洗涤用品质量监督检验中心（太原）、西安开米股份有限公司、广东省微生物分析检测中心。

本标准主要起草人：公培龙、张宝莲、高欢泉、欧阳友生。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

- QB/T 2738—2005。

## 日化产品抗菌抑菌效果的评价方法

### 1 范围

本标准规定了具有特殊卫生功能的日化产品抗菌、抑菌效果的检测方法 & 评价标准。

本标准适用于常见洗涤用品、人体皮肤清洁用品的抗菌、抑菌性能测试，其他日化产品也可根据用途选择采用。

### 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

消毒技术规范[2002]

GB 15979—2002 一次性使用卫生用品卫生标准

GB 15981—1995 消毒与灭菌效果的评价方法与标准

QB/T 2739—2005 洗涤用品常用试验方法 滴定分析（容量分析）用试验溶液的制备

### 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

#### 3.1

**抗菌 antibacterial**

采用化学或物理方法杀灭细菌或妨碍细菌生长繁殖及其活性的过程。

#### 3.2

**抑菌 bacteriostasis**

采用化学或物理方法抑制或妨碍细菌生长繁殖及其活性的过程。

#### 3.3

**载体 carrier**

试验微生物的支持物。

#### 3.4

**生物负载 bioburden**

被测试的一个单位物品上承载活微生物的总数。

#### 3.5

**杀灭率 killing rate, (KR)**

在微生物杀灭试验中，用百分率表示微生物数量减少的值。

#### 3.6

**杀灭时间 killing time, (KT)**

用于生物指示物抗力鉴定时，指受试指示物样本，经杀菌因子作用后全部样本无菌生长的最短作用时间（min）。

#### 3.7

**菌落形成单位 colony forming unit, (cfu)**

在活菌培养计数时，由单个菌体或聚集成团的多个菌体在固体培养基上生长繁殖所形成的集落，称为菌落形成单位，以其表达活菌的数量。

3.8

**中和剂 neutralizer**

在微生物杀灭试验中，用以消除试验微生物与杀菌剂的混悬液中中和微生物表面上残留的杀菌剂，使其失去对微生物抑制和杀灭作用的试剂。

3.9

**中和产物 product of neutralization**

指中和剂与杀菌剂作用后的产物。

**4 检验抗菌、抑菌日化产品效果的实验室及无菌操作的基本要求**

- 4.1 微生物实验室应采取封闭式布局，建筑应便于清洁、消毒。为避免污染应在相对正压洁净条件下进行。因特殊需要用致病菌作指示菌时，则应在生物安全柜（负压）内进行。
- 4.2 试验开始前，应以湿式方法清洁台面和打扫室内地面，然后以紫外线或其他方法对实验室内空气进行消毒。
- 4.3 实验人员应穿戴工作服、口罩、帽子；进行无菌检验时，需经风淋后进入实验室。然后，正确穿戴好无菌隔离衣、帽和口罩。
- 4.4 每吸取一次不同样液应更换无菌吸管，接种环（针）需在火焰上烧灼灭菌后，方可再次使用。
- 4.5 除非另有说明，在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和蒸馏水或去离子水或相当纯度的水。
- 4.6 要求无菌的试剂，如蒸馏水、磷酸盐缓冲液、培养基、牛血清白蛋白、标准硬水、中和剂等，均需灭菌或过滤除菌。
- 4.7 无菌器材和试剂，使用前须检查容器或包装是否完整，有破损者不得使用。
- 4.8 正在使用的无菌器材和试剂不得长时间暴露于空气中。
- 4.9 移液或接种时，应将试管口和琼脂平板靠近火焰，防止污染。
- 4.10 所有用过的污染器材，应立即放入盛有消毒液的容器中，以防止对周围环境和清洁物品造成污染。
- 4.11 若不慎发生微生物培养物摔碎或其他试验微生物泄漏事故时，不论是否具有致病性，均应立即对污染及可能波及的区域进行消毒处理。
- 4.12 全部试验结束后，应按常规对室内空气和环境表面进行消毒处理。

**5 样品采集**

为使样品具有良好的代表性，应于同一批号三个运输包装中至少随机抽取 12 件最小销售包装样品，其中 4 件留样，4 件做抑菌或杀菌性能测试，4 件做稳定性测试。抽样的最小包装不应有破裂，检验前不得启开。

**6 日化产品抗菌、抑菌效果评价原则**

**6.1 杀菌试验测定方法**

标准中杀菌试验测定方法用于考核产品的抗菌作用。

**6.2 抑菌试验测定方法**

标准中抑菌试验测定方法用于考核产品的抑菌作用。

**6.3 检验用指示微生物**

依据产品执行标准或说明书适用范围进行表1中试验菌（由国家级或省级菌种保藏管理中心提供）的选择检测，也可根据产品的使用要求增加其他菌种作为检验菌种。

表1 抗菌、抑菌日化产品试验中微生物的选择

试验菌名称	菌株标准号	抗菌、抑菌日化产品适用范围
金黄色葡萄球菌 ( <i>Staphylococcus aureus</i> )	ATCC 6538或ATCC 27217	手、足、皮肤和黏膜，织物及一般物品表面
大肠埃希氏菌 ( <i>Escherichia coli</i> )	8099或ATCC 25922或ATCC 11229	手、餐饮具、瓜果和蔬菜，织物及一般物品表面
白假丝酵母菌（白色念珠菌） ( <i>Candida albicans</i> )	ATCC 10231	手、足、皮肤和黏膜
铜绿假单胞菌（绿脓杆菌） ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )	ATCC 15442	皮肤和黏膜

## 6.4 作用浓度

按产品明示的标准要求进行。（未明示的参照QB/T 2850—2007《抗菌抑菌型洗涤剂》）

## 6.5 作用时间

按产品明示的标准要求进行。（未明示的参照QB/T 2850—2007《抗菌抑菌型洗涤剂》）

## 6.6 结果报告

测试结果报告是试验情况和结果的书面表达，结果报告至少应包括：

- a) 试验菌种；
- b) 作用浓度；
- c) 作用时间；
- d) 效果评价结果；
- e) 对测定结果有影响的其他因素。

## 7 日化产品抗菌、抑菌效果检验方法

## 7.1 日化产品抗菌、抑菌效果检验方法分类

日化产品抗菌、抑菌效果检验方法分类见表2。

表2 日化产品抗菌、抑菌检验方法分类

类别	方法名称	表示形式	适用范围	本标准对应章节
杀菌试验	悬液定量法	计时杀菌	抗菌型日化产品	7.2
	模拟法	计时杀菌	抗菌型织物类洗涤剂	7.4
抑菌试验	滞留法	滞留抑菌	抑菌型人体皮肤清洁产品	7.6
	悬液定量法	计时抑菌	抑菌型日化产品	7.3
	模拟法	计时抑菌	抑菌型织物类洗涤剂	7.4
	抑菌环法	计时抑菌	抑菌型日化产品	7.5

## 7.2 抗菌型日化产品的杀菌效果检验方法（悬液定量法）

## 7.2.1 设备

- a) 锥形烧瓶；
- b) 平皿（直径9cm）；
- c) 量筒；
- d) 精密pH试纸；
- e) 无菌试管；

- f) 无菌刻度吸管 (1.0mL、5.0mL、10.0mL)；
- g) 恒温培养箱；
- h) 冰箱；
- i) 菌落计数器；
- j) 酒精灯；
- k) 电动混合器；
- l) 恒温干燥箱；
- m) 恒温水浴锅；
- n) 湿热灭菌锅；
- o) 电子天平；
- p) 生物安全柜等微生物试验必备仪器。

### 7.2.2 试剂

#### a) 营养琼脂培养基

称取蛋白胨10.0g、牛肉膏5.0g、氯化钠5.0g，加蒸馏水1000mL溶解，调pH至7.2~7.4，然后加入琼脂15.0g加热溶解，分装，于121℃压力蒸汽灭菌20min后备用。

#### b) 沙堡琼脂培养基

称取葡萄糖40.0g、蛋白胨10.0g、琼脂20.0g、加蒸馏水1000mL，将上述成分混合后，加热至完全溶解，调pH至5.6±0.2，于115℃压力蒸汽灭菌30min后备用。

#### c) 0.03mol/L磷酸盐缓冲液 (PBS)

称取无水磷酸氢二钠2.83g、磷酸二氢钾1.36g，加蒸馏水1000mL，待完全溶解后，调pH至7.2~7.4，经121℃压力蒸汽灭菌20min后备用。

#### d) 标准硬水 (硬度342mg/L)

称取氯化钙 (CaCl<sub>2</sub>) 0.034g、氯化镁 (MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O) 0.139g，加蒸馏水1000mL，经121℃压力蒸汽灭菌20min后备用。

#### e) 中和剂

几种常见中和剂：

- 1) 硫代硫酸钠5.0g、蒸馏水1000mL。
- 2) 磷酸二氢钾1.36g、磷酸氢二钠2.83g、卵磷脂10.0g、甘氨酸10.0g、吐温(80)30.0g、蒸馏水1000mL。
- 3) 磷酸二氢钾1.36g、磷酸氢二钠2.83g、卵磷脂3.0g、吐温(80)20.0g、蒸馏水1000mL。
- 4) 吐温(80)20.0g、硫代硫酸钠10.0g、PBS 1000mL。

注：1) 用于氯型杀菌剂；2)、3) 用于非氧化型杀菌剂；4) 用于氧型杀菌剂。

#### f) 菌液制备

##### (1) 细菌繁殖体悬液的制备

1) 取冻干菌种管，在无菌操作下打开，以毛细吸管加入适量营养肉汤，轻柔吹吸数次，使菌种融化分散。取含5.0mL~10.0mL营养肉汤培养基试管，滴入少许菌种悬液，置37℃培养18h~24h。用接种环取第1代培养的菌悬液，划线接种于营养琼脂培养基平板上，于37℃培养18h~24h。挑取上述第2代培养物中典型菌落，接种于营养琼脂斜面，于37℃培养18h~24h，即为第3代培养物。

2) 取菌种第3代~14代的营养琼脂培养基斜面新鲜培养物(18h~24h)，用5.0mL吸管吸取3.0mL~5.0mL稀释液加入斜面试管内，反复吹吸，洗下菌苔。随后，用5.0mL吸管将洗液移至另一无菌试管中，用电动混合器混合(振荡)20s，或在手掌上振敲80次，以使细菌悬浮均匀。

3) 初步制成的菌悬液，先用细菌浓度比浊测定法粗测其含菌浓度，然后以稀释液稀释至所需使用的浓度。

4) 细菌繁殖体悬液应保存在4℃冰箱内备用。应当天使用不得过夜。

5) 怀疑有污染时, 应以菌落形态、革兰染色与生化试验等法进行鉴定。

(2) 白假丝酵母菌(白色念珠菌)悬液制备

1) 取冻干菌种管, 以无菌操作打开, 用毛细吸管吸加适量沙堡液体培养基于管中, 轻柔吹吸数次, 使菌种融化分散。取含 5.0mL~10.0mL 沙堡液体培养基试管, 滴入少许菌种悬液, 置 37℃ 培养 18h~24h。用接种环取第 1 代培养的菌悬液, 划线接种于沙堡琼脂培养基平板上, 于 37℃ 培养 18h~24h。挑取上述第 2 代培养物中典型菌落, 接种于沙堡琼脂斜面, 于 37℃ 培养 18h~24h, 即为第 3 代培养物。将其密封后在 4℃ 保存, 时间不得超过 6 周。

2) 试验时, 取第 3 代斜面培养物在沙堡琼脂斜面上连续传代, 方法与第 3 代相同。取第 5 代或 6 代的沙堡琼脂培养基斜面新鲜培养物(18h~24h), 用 5.0mL 吸管吸取 3.0mL~5.0mL PBS 稀释液加入斜面试管内, 反复吹吸, 洗下菌苔。随后, 用 5.0mL 吸管将洗液移至另一无菌试管中, 用电动混合器混合 20s, 或在手掌上振敲 80 次, 以使白色念珠菌悬浮均匀。

3) 菌悬液保存在 4℃ 冰箱内备用, 当天使用不得过夜。

4) 怀疑有污染时, 应以菌落形态、革兰染色与生化试验等法进行鉴定。菌落形态可直接用显微镜观察。菌体形态可在涂片后直接用高倍显微镜观察, 也可用墨水阴地法染色(将菌与黑墨水在玻片上混匀, 推成薄膜)后观察。

### 7.2.3 中和剂鉴定试验方法

为了准确评价所测样品对微生物的杀灭作用, 杀菌试验中要求选择适当中和剂。所选中和剂不仅能及时中止抗菌洗剂对微生物的抑杀作用, 且中和剂本身与所测样品的反应产物(即中和产物)对微生物无抑制或杀灭作用, 对培养基无不良影响。

#### 7.2.3.1 中和剂鉴定试验

7.2.3.1.1 中和剂鉴定试验原则见表 3。

表 3 中和剂鉴定试验原则

试样处理						
试验分组	第 1 组	第 2 组	第 3 组	第 4 组	第 5 组	第 6 组
	杀菌剂 + 菌液 → 培养	(杀菌剂 + 菌液) + 中和剂 → 培养	中和剂 + 菌液 → 培养	(杀菌剂 + 中和剂) + 菌液 → 培养	阳性菌数对照	阴性对照
试验目的	观察试验液中的杀菌剂对试验菌有无杀灭或抑制能力	观察样液中残留杀菌剂被中和后, 受到杀菌剂作用后的试验菌是否能恢复生长	观察中和剂是否抑菌	观察中和产物, 或未被完全中和的残留杀菌剂对试验菌的生长繁殖是否有影响	阳性对照组	阴性对照组

7.2.3.1.2 中和剂鉴定试验见表 4。

表4 中和剂鉴定试验

中和剂(悬液定量法)鉴定试验						
试验分组	第1组	第2组	第3组	第4组	第5组	第6组
分别取菌悬液 <sup>a</sup> 0.1mL 加入对应1~5组	试验样液 <sup>b</sup> 5.0mL	试验样液 5.0mL	中和剂 5.0mL	中和产物 <sup>c</sup> 5.0mL	PBS 5.0mL	—
	作用至预定时间,分别吸取混 匀液0.5mL加入对应组		混匀作用10min,分别取混匀液0.5mL加入对应组			
	PBS 4.5mL	中和剂 4.5mL	中和剂 4.5mL	中和产物 4.5mL	PBS 4.5mL	—
	—	作用10min		—	—	—
取原液或稀释0.5mL 接种平板(2个/样本)	用PBS 10倍 系列稀释	用中和剂 10 倍系列稀释	用中和剂 10 倍系列稀释	用中和产物 10倍系列稀 释	用PBS 10倍 系列稀释	PBS+中剂 各1.0mL接 种平板
然后,倾注平板置37℃培养48h,计数菌落数,按稀释倍数计算出回收菌数(cfu/mL)						
<p>a 菌悬液浓度及制备:用PBS将试验菌悬液[7.2.2.f]稀释,要求浓度为取0.1mL滴于5.0mL PBS液内,回收菌数为<math>1 \times 10^4</math> cfu/mL~<math>9 \times 10^4</math> cfu/mL。</p> <p>b 试验样品用无菌标准硬水稀释至规定浓度,制成(稀释液)试验样液。</p> <p>c 取试验样液1.0mL与中和剂9.0mL混合,作用10min后制成中和产物。</p>						

## 7.2.3.2 中和剂评价规定

- 1组不长菌或明显少于2组;
- 2组有菌且较第一组为多,同时菌数明显少于3、4、5组,1、2组菌数符合表5。

表5 中和剂鉴定试验合格标准中对第1组与第2组菌落数的要求

第1组平板平均菌落数	第2组平板平均菌落数
0	>5
X (1~10)	> (X+5)
Y (>10)	> (Y+0.5Y)

- 3、4、5组菌数相似,回收菌量在 $1 \times 10^4$  cfu/mL~ $9 \times 10^4$  cfu/mL,并且其组间误差率应不大于15%。
- 6组无菌生长。
- 三组平均菌数=(3组菌数+4组菌数+5组菌数)÷3
- 误差率(%)= $\frac{(|\text{三组平均菌数}-3\text{组菌数}|+|\text{三组平均菌数}-4\text{组菌数}|+|\text{三组平均菌数}-5\text{组菌数}|) \div 3}{\text{三组平均菌数}} \times 100$

符合上述所有评价项目的中和剂表明可消除试验样品对指示菌的作用,中和剂与试验样品的中和产物对指示菌无毒害,判定为该试验样品的中和剂。

## 7.2.4 杀菌试验操作步骤

- 用PBS液将试验菌悬液(7.2.2.f)稀释,要求浓度为:取0.1mL滴于5.0mL对照样液(PBS)内,回收菌数为 $1 \times 10^4$  cfu/mL~ $9 \times 10^4$  cfu/mL;



- b) 将试验样品用无菌标准硬水稀释至规定的浓度；  
 c) 吸取试验样品原液或其稀释液 5.0mL 放入灭菌试管中，20℃恒温 5min（皂类产品 30℃）；  
 d) 吸取试验菌液 0.1mL 加入到含 5.0mL 样品的试管中，迅速混匀，并立即计时；  
 e) 作用至设定时间后，取试验菌与样品的混合液 0.5mL，加入到含 4.5mL 经灭菌的中和剂中，混匀；  
 f) 中和 10min 后，吸取样液（或作适当稀释后，取其中 2~3 个稀释度的稀释液）1mL，置于灭菌平皿内，每个样液或稀释液接种两个灭菌平皿。用凉至 40℃~45℃的营养琼脂培养基（细菌）或沙氏琼脂培养基（白色念珠菌）15mL 作倾注，转动平皿，使其充分均匀，琼脂凝固后翻转平皿，在 (35±2)℃ 培养 48h（细菌）或 72h（白色念珠菌）后，做活菌菌落计数；  
 g) 以 PBS 代替试验样品，同时按以上步骤操作，作为对照样品；  
 h) 试验重复 3 次，求其平均值。

### 7.2.5 计算公式。

杀菌率按公式 (1) 计算。

$$\text{杀菌率}(\%) = \frac{I - II}{I} \times 100 \quad \text{..... (1)}$$

式中：

I——对照样品平均菌落数；

II——试验样品平均菌落数。

结果保留整数。

### 7.2.6 活菌计数中误差评价

活菌计数中平板间菌落数误差率、稀释度间菌落数误差率不宜超过 10%，对误差率的自检，可按公式(2)~公式(7)计算。

$$\text{平板间菌落平均数} = \frac{\text{各平板菌落数之和}}{\text{平板总数}} \quad \text{..... (2)}$$

$$\text{平板间菌落数平均差} = \frac{(\text{平板间菌落平均数} - \text{各平板菌落数}) \text{的绝对值之和}}{\text{平板总数}} \quad \text{..... (3)}$$

$$\text{平板间菌落数误差率} = \frac{\text{平板间菌落数平均差}}{\text{平板间菌落平均数}} \times 100 \quad \text{..... (4)}$$

$$\text{稀释度间菌落平均数} = \frac{\text{各稀释度平均菌落数之和}}{\text{稀释度数}} \quad \text{..... (5)}$$

$$\text{稀释度间菌落数平均差} = \frac{(\text{稀释度间菌落平均数} - \text{各稀释度菌落数}) \text{的绝对值之和}}{\text{稀释度数}} \quad \text{..... (6)}$$

$$\text{稀释度间菌落数误差率} = \frac{\text{稀释度间菌落数平均差}}{\text{稀释度间菌落平均数}} \times 100 \quad \text{..... (7)}$$

### 7.2.7 抗菌型日化产品的抗菌效果评价

抗菌效果评价见表6。

表6 抗菌效果评价

试验菌种 <sup>a)</sup>	作用时间/min	作用浓度	效果评价(杀菌率%)
			≥90
			产品有杀菌作用
<sup>a)</sup> 试验菌一栏填入具体的测试菌种, 对于多个菌种的测定结果, 分别进行效果评价。			

7.3 抑菌型日化产品的抑菌效果检验方法(悬液定量法)

7.3.1 设备

同7.2.1。

7.3.2 试剂

同7.2.2。

7.3.3 抑菌试验操作步骤

a) 用 PBS 液将试验菌悬液(7.2.2.f)做适当稀释, 要求浓度为: 取 0.1mL 滴于 5.0mL 对照样液(PBS)内, 回收菌数为  $1 \times 10^4 \sim 9 \times 10^4$  cfu/mL;

b) 将试验样品用无菌标准硬水稀释至规定的浓度;

c) 吸取试验样品原液或其稀释液 5.0mL 放入灭菌试管中, 20℃ 恒温 5min (皂类产品 30℃);

d) 吸取试验菌液 0.1mL 加入到含 5.0mL 样品的试管中, 迅速混匀, 并立即计时;

e) 作用至设定时间后, 取试验菌与样品混合液 0.5mL, 加入到含 4.5mL 经灭菌的 PBS 试管中, 充分混匀;

f) 放置 10min 后, 吸取样液(或作适当稀释后, 取其中 2~3 个稀释度的稀释液) 1mL, 置于灭菌平皿内, 每个样液或稀释度接种两个灭菌平皿。用凉至 40℃~45℃ 的营养琼脂培养基(细菌)或沙氏琼脂培养基(白色念株菌) 15mL 作倾注, 转动平皿, 使其充分均匀, 琼脂凝固后翻转平皿, (35±2)℃ 培养 48h(细菌)或 72h(白色念株菌)后, 做活菌菌落计数;

g) 以 PBS 代替试验样品, 同时按以上步骤操作, 作为对照样品;

h) 实验重复 3 次, 求其平均值。

7.3.4 计算公式

抑菌率按公式(8)计算。

$$\text{抑菌率}(\%) = \frac{I - II}{I} \times 100 \dots\dots\dots (8)$$

式中:

I——对照样品平均菌落数;

II——试验样品平均菌落数。

结果保留整数。

7.3.5 误差评价

同7.2.6。

7.3.6 抑菌型日化产品的抑菌效果评价

抑菌效果评价见表7。

表7 抑菌效果评价

试验菌种 <sup>b)</sup>	作用时间/min	作用浓度	效果评价标准(抑菌率%)	
			≥90%	≥50%~90%
			产品有较强抑菌作用	产品有抑菌作用

<sup>b)</sup> 试验菌一栏填入具体的测试菌种, 对于多个菌种的测定结果, 分别进行效果评价。

#### 7.4 抗菌或抑菌型织物类洗涤剂抗菌或抑菌效果检验方法(模拟法)

##### 7.4.1 原理

本方法通过模拟洗衣机的洗衣过程, 检测洗衣粉(剂)等织物类洗涤产品的抗菌或抑菌效果。

##### 7.4.2 设备

- a) 不锈钢转轴(由一条直径0.16cm不锈钢丝制成, 如图1);

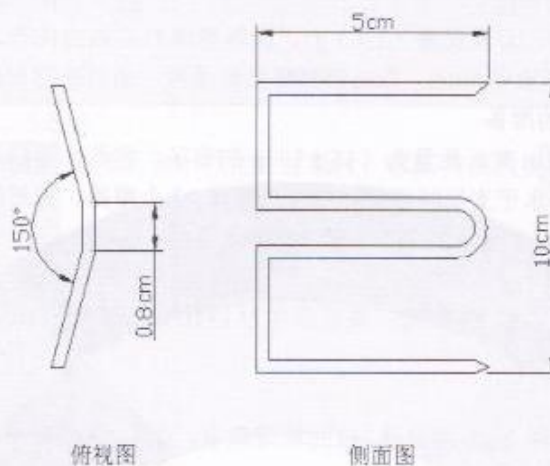


图1 缠绕测试布条的不锈钢转轴

b) 有金属螺盖的玻璃罐(容积为470mL, 可高压灭菌, 并可放入转轴的广口罐), 将罐口覆盖牛皮纸, 加盖, 于121℃灭菌25min备用;

c) 转动速度为45r/min~60r/min的滚动摇床;

d) 可调恒温水浴箱;

e) 吸管(1mL、5mL、10mL);

f) 培养皿;

g) 铺有滤纸的玻璃培养皿;

h) 细菌保存管;

i) 细菌培养箱;

j) 涡流振荡器;

k) 棉布(32支纱/cm×32支纱/cm平织棉布);

l) 别针、镊子、无菌手套、3mm~5mm玻璃珠、秒表、载体布片2.5cm~3.8cm(见测试棉布制备)。

### 7.4.3 试剂

a) 营养琼脂(同 7.2.2.a):

b) 营养琼脂 A: 在营养琼脂中另加入 1.5%的琼脂;

c) 胰蛋白胨大豆肉汤培养基 (TSB):

称取胰蛋白胨 15.0g, 大豆蛋白胨 5.0g, 氯化钠 5.0g, 加蒸馏水 1000mL 溶解, 调节 pH 为  $7.2 \pm 0.2$ , 经  $121^\circ\text{C}$  压力蒸汽灭菌后备用;

d) 牛血清白蛋白溶液 (3%):

称取牛血清白蛋白 3.0g, 加蒸馏水 100mL, 溶解后用微孔滤膜 (孔径为  $0.45\mu\text{m}$ ) 过滤除菌, 冰箱保存备用。

e) 标准硬水 (同 7.2.2.d):

f) 非离子浸湿剂:

称取 5.0g 烷基酚聚氧乙烯醚, 5.0g 碳酸钠, 加蒸馏水 1000mL 溶解;

g) 洗涤液:

移取 1.5g 非离子浸润剂 (7.4.3.f), 1.5g 碳酸钠, 加蒸馏水 3000mL 溶解;

h) 中和剂 (经中和剂鉴定试验合格, 同 7.2.3);

i) 吐温 80 (过滤除菌)。

### 7.4.4 试验准备

a) 测试棉布的制备

将大约 300g 测试棉布加入 3L 洗涤液 (7.4.3.g), 加热煮沸 1h。取出棉布, 在煮沸的去离子水中清洗 5min。然后放入凉的去离子水中 5min, 以去除残留的洗涤液, 最后将棉布晾干。

b) 测试棉布和转动支架的准备

取处理过的棉布, 剪成 5cm 宽, 质量为  $(15 \pm 1)$  g 的布条, 将其一端插入固定在测试转动支架的水平方向的外边, 然后在 3 条水平支架间以足够的张力缠绕 12 个整圈, 将布条的另一端用不锈钢别针固定在前一圈布条上。最后以  $121^\circ\text{C}$  压力蒸汽灭菌 15min, 备用。

c) 细菌悬液的制备:

用 PBS 液将试验菌悬液 (7.2.2.f) 稀释, 要求浓度为  $1 \times 10^8 \text{cfu/mL} \sim 5 \times 10^8 \text{cfu/mL}$ , 然后加入等体积的牛血清白蛋白溶液 (3%)。

d) 染菌载体的制备

每片载体布片 (7.4.2.i) 接种  $20\mu\text{L}$  菌悬液, 放回培养皿中, 加盖, 于  $(35 \pm 2)^\circ\text{C}$  培养箱中干燥 20min。

e) 测试样品的制备:

试验开始前 20min, 将盛有 265mL 硬水的玻璃罐放入水浴中恒温至测试温度  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ , 然后将被测样品按规定的浓度 (即抗菌、抑菌试验的作用浓度) 加入混合溶解, 保持该溶液的温度与测试温度  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$  一致。

### 7.4.5 杀菌或抑菌试验操作步骤

a) 将两片染菌载体 [7.4.4.d] 放入转动支架的第 6 和 7 层布条之间, 将第 3 片放入第 7 和 8 层布条之间;

b) 以无菌操作方式将转动单元 (支架、布条和染菌载体) 放入含有测试样品的玻璃罐中, 加盖;

c) 玻璃罐固定在摇床上, 滚动旋转洗涤至设定时间 (即抗菌、抑菌试验的作用时间), 取下玻璃罐;

d) 以无菌操作方式, 取出转动单元, 取下 3 片染菌载体, 放入到含有 30mL 中和剂 (在测试抑菌产品的抑菌作用时, 以含 0.5% 吐温 80 的 PBS 30mL 代替中和剂, 其他操作步骤均与测试抗菌产品试验相同) 的试管中, 在振荡器中混合 10s。然后振打 200 次, 用 PBS 做 10 倍系列稀释, 并选择适宜稀释度样液接种 TSB 平板。每个稀释度接种两个平板;

e) 以含 0.5% 吐温 80 的 PBS 代替试验样品, 同时按以上步骤操作, 作为对照样品组;

f) 菌数对照组: 将 3 片染菌载体加入含有 30mL 0.5% 吐温 80 的 PBS 试管中, 在振荡器震荡 10s,

然后震打 200 次，用 PBS 做 10 倍系列稀释，并取适宜稀释度样液 1.0mL，以倾注法接种 TSA 平板，每个稀释度接种 2 个平板：

g) 将试验组、对照组及菌数对照组平板倒置于 (35±2)℃ 培养箱中，培养 (48±4) h，计数菌落数；

h) 试验重复三次，求其平均值。

#### 7.4.6 计算公式

杀菌率或抑菌率按公式 (9) 计算。

$$\text{杀菌率或抑菌率(\%)} = \frac{I-II}{I} \times 100 \quad \text{..... (9)}$$

式中：

I——对照样品平均菌落数；

II——试验样品平均菌落数。

结果保留整数。

#### 7.4.7 抗菌型或抑菌型织物类洗涤剂的抗菌或抑菌效果评价

抗菌效果评价见 7.2.7，抑菌效果评价见 7.3.6。

### 7.5 抑菌型日化产品的抑菌效果检验方法（抑菌环法）

#### 7.5.1 原理

利用抑菌剂不断溶解经琼脂扩散形成不同浓度梯度，以显示其抑菌作用。试验通过抑菌环大小以判断其是否具有抑菌能力。

#### 7.5.2 设备

a) 刻度吸管 (1.0mL, 5.0mL)；

b) 抑菌剂载体 (5mm 直径圆形新华一号定性滤纸片，经压力蒸汽灭菌处理后，置 120℃ 烤干 2h，保存备用)；

c) 电动混合器；

d) 微量移液器 (5μL~50μL，可调式)；

e) 游标卡尺。

#### 7.5.3 试剂

a) 营养琼脂培养基 (同 7.2.2.a 或 b)；

b) 菌悬液 (同 7.2.2.f)。

#### 7.5.4 抑菌试验操作步骤

a) 抑菌片的制备

对液体抑菌试验样品，取无菌干燥滤纸片，每片滴加实际使用浓度的抑菌试验样品溶液 20μL，然后将滤纸片平放于清洁的无菌平皿内，开盖置恒温箱 (37℃) 中烘干，或置室温下自然干燥后备用。

b) 对照样的制备

取无菌干燥滤纸片，每片滴加无菌蒸馏水 20μL，干燥后备用。

c) 试验菌的接种

用无菌棉拭子蘸取浓度为  $1 \times 10^4$  cfu/mL ~  $9 \times 10^4$  cfu/mL 试验菌悬液，在营养琼脂培养基平板表面均匀涂抹 3 次。每涂抹 1 次，平板应转动 60°，最后用棉拭子绕平板边缘涂抹一周。盖好平皿，置室温干燥 5min。

d) 抑菌试验样片贴放

每次试验贴放 1 个染菌平板，每个平板贴放 4 片试验样片，1 片对对照样片，共计 5 片。用无菌镊子取样片贴放于平板表面，各样片中心之间相距 25mm 以上，与平板的周缘相距 15mm 以上。贴放好后，用无菌镊子轻压样片，使其紧贴于平板表面。盖好平皿，置 37℃ 恒温箱，培养 16h ~ 18h 后观察结果。用游标卡尺测量抑菌环的直径 (包括贴片) 并记录。试验重复 3 次。

测量抑菌环时，应选均匀而完全无菌生长的抑菌环进行。测量其直径应以抑菌环外沿为界。

#### 7.5.5 抑菌效果评价

抑菌环直径大于7mm者，产品有抑菌作用。抑菌环直径不大于7mm者，产品无抑菌作用。

#### 7.5.6 注意事项

- a) 每次试验均应设置对照组，不可省略。在报告中亦必须将对照组的试验结果列出；
- b) 接种用细菌悬液的浓度应符合要求。浓度过低，接种菌量少，抑菌环常因之增大；浓度过高，接种量过多，抑菌环则可减小；
- c) 应保持琼脂浓度准确性，同时培养皿中倾倒琼脂量为15mL~18mL，否则可影响抑菌环的大小；
- d) 培养时间不得超过18h。培养过久，部分细菌可恢复生长，抑菌环变小；
- e) 抑菌环直径可受抑菌剂的量、抑菌性能和干湿度影响。故抑菌剂滤纸片应在试验当天制备。

### 7.6 抑菌型人体皮肤清洁类产品抑菌效果检验方法（滞留法）

#### 7.6.1 原理

本试验通过模拟适合细菌生长、繁殖和可能产生感染的皮肤条件下，使用随机性、双盲的、配对比较的方法检测人体皮肤清洁类产品在一定时间内作用于人体皮肤上的滞留抑菌效果。

#### 7.6.2 设备

- a) 恒温箱；
- b) 金属筒（直径2.2cm、高度3cm）；
- c) 一次性接种环（直径4mm）；
- d) 小塑料碗（直径2.2cm，高2.5mm）；
- e) 胶带；
- f) 尼龙刮菌棒；
- g) 玻璃弯棒。

#### 7.6.3 试剂

a) 胰蛋白胨大豆肉汤培养基（TSB）（同7.4.3.c）；

b) 胰蛋白胨大豆琼脂培养基（TSA）；

称取胰蛋白胨15.0g，大豆蛋白胨5.0g，氯化钠5.0g，琼脂16.0g，加蒸馏水1000mL，调节pH至 $7.2 \pm 0.2$ ，经121℃压力蒸汽灭菌后使用。

c) 0.03mol/L的磷酸盐缓冲液（同7.2.2.c）；

d) 70%酒精；

e) 羊血；

f) 脂肪醇聚氧乙烯醚（AEO<sub>9</sub>）；

g) 外用抗生素软膏。

#### 7.6.4 样品

试验品按顺序编号分为25组。每组2个，一个为按规定的试验浓度配制的测试样品，另一个为不含抑菌剂的对照样。

#### 7.6.5 抑菌试验操作步骤

##### a) 调整阶段

试验开始前7d至14d，受试者使用不含抗菌、抑菌成分的日化产品进行日常的肤发的清洁。此阶段持续至少7d，但不超过14d。

##### b) 清洗阶段

清洗阶段共3d，受试者每天用抑菌样品清洗一侧前臂，用对照品清洗另一侧前臂，清洗过程如下：

- 1) 先清洗左臂，用流动水（水温应保持在35℃~37℃）打湿前臂内侧；
- 2) 用样品从手腕至臂肘上下摩擦15s；

3) 用手在涂有样品的手臂上上下下摩擦泡沫 45s;

4) 用流动的清水冲洗前臂 15s, 不要搓擦;

5) 用纸巾沾干前臂, 不要搓擦;

6) 重复以上步骤清洗右臂;

7) 按上面所描述的试验步骤每日清洗前臂 3 次, 每次间隔至少一个小时, 记录最后一次清洗时间。然后按规定的作用时间间隔要求, 进行滞留效果检测。第 9 次清洗前臂以后, 受试者不能洗澡、沐浴或洗净前臂, 直到试验结束。清洗前后每组试样的重量及受试者完成清洗的情况, 须记录下来。

#### c) 试验阶段

清洗阶段的第四天(最后一次清洗后的 12h~24h), 在受试者每只前臂上划出一个试验区并进行接种、封包和回收存活细菌, 具体步骤如下:

1) 将金黄色葡萄球菌(ATCC 27217)连续转种 3 代, 取第 3 代培养物接种于胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB)中, 在(35±2)℃的条件下培养(20±2)h。然后用胰蛋白胨大豆肉汤适当稀释菌悬液, 使菌悬液浓度约为 $1 \times 10^8$ cfu/mL~ $5 \times 10^8$ cfu/mL。

#### 2) 细菌接种

在受试者的每只前臂中间部位(不要在手腕和肘褶皱处), 用带有印墨直径为 3.0cm 的玻璃量筒扣在皮肤上, 划分出一个试验区。使用加样器取 10μL 上述菌悬液, 接种于前臂试验区, 菌数为 $1 \times 10^6$ cfu/试验区~ $5 \times 10^6$ cfu/试验区。用一次性接种环, 把接种物涂成一圆形, 使其与试验区边缘应有 4mm~5mm 的距离。

#### 3) 封包

细菌接种后立即用小塑料碗扣于染菌区上面, 再用胶带将小塑料碗固定在皮肤上, 记录封包的时间。

#### 4) 回收存活细菌

接种后 2h±5min 对前臂上接种的区域进行取样。将金属筒放置于试验区中间部位, 不要接触到盖有印墨的边缘。将 1mL 含 0.1% AEO<sub>9</sub> 的 0.03mol/L 磷酸盐缓冲液吸移至金属筒内, 用尼龙刮菌棒刮洗金属筒罩住区域内的皮肤 60s, 将筒内液体吸移至试管内, 再加 1mL 含 0.1% AEO<sub>9</sub> 的 0.03mol/L 磷酸盐缓冲液, 对该区域内的皮肤进行第 2 次刮洗 30s, 将第 2 次擦洗的液体, 注入含第 1 次刮洗液体的试管中。

#### 5) 试验区试验后的消毒处理

一个试验区采样之后, 需用 70% 的酒精对试验区进行消毒。然后对另一个试验区以同样方法进行采样, 采样结束后, 先用 70% 的酒精对试验区进行消毒, 然后用皮肤消毒剂对两只前臂进行消毒处理, 处理后清水冲洗, 擦干, 再涂少量的抗生素软膏。

#### 6) 平皿接种与培养

对每一个取样进行平皿接种, 以 0.03mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)对样品进行 10 倍系列稀释。选适当稀释度取 0.1mL 接种于 2 个含 5% 羊血的 TSA 平皿表面, 用玻璃弯棒涂匀, 在(35±2)℃的培养箱中培养(48±4)h, 计数菌落数。

### 7.6.6 计算公式

抑菌率按公式(10)计算。

$$\text{抑菌率}(\%) = \frac{I - II}{I} \times 100 \quad \dots\dots\dots (10)$$

式中:

I——对照样品平均菌落数;

II——试验样品平均菌落数。

结果保留整数。

### 7.6.7 抑菌型人体皮肤清洁类产品抑菌效果评价

同表5。

### 7.6.8 试验要求

a) 试验人次不得少于16人次；

b) 受试者录用标准：

1) 年龄介于18岁至65岁的男性或女性的身体健康者；

2) 前臂应完好无损且没有皮肤病及其他皮肤问题；

3) 同意在整个试验期间，避免使用抗菌、抑菌洗液和乳膏、局部固醇类药物和全身或局部使用维生素；

4) 同意在清洗阶段使用非药物香皂或洗液洗澡和淋浴，但受试者不能清洗前臂。在第9次洗完臂后，不洗澡，淋浴或洗净前臂，直到试验结束。

c) 排除受试者的标准

如果受试者有下列情况之一，不能被录用参加试验：

1) 同时参加另外一个临床试验；

2) 在过去的14d中，参加过任何一种形式的关于清洁手或手臂的试验；

3) 对香皂、去污剂、香水或青霉素过敏；

4) 怀孕妇女；

5) 诊断患有糖尿病、肝炎、艾滋病（HIV阳性）、器官移植者；

d) 其他试验限制：

1) 受试者不得使用其他清洁用品；

2) 受试者应避免洗热水盆浴和游泳；

3) 受试者应避免接触未干的油漆、涂料或者其他溶剂；

4) 受试者应避免在手腕处和前臂上喷洒香水。

e) 在试验完成后的48h~72h内，需检查前臂上有无小脓疱、水疱，隆起的红色痒疱，出现这些情况的受试者应尽快通知检验单位。

## 8 日化产品抗菌、抑菌效果稳定性检验方法

### 8.1 测试条件

8.1.1 自然留样：将原包装样品置室温（15℃~30℃）下至少1年，每半年进行抑菌或杀菌性能测试。

8.1.2 加速试验：将原包装样品置54℃~57℃恒温箱内14天或37℃~40℃恒温箱内3个月，保持对湿度大于75%，进行抑菌或杀菌性能测试。

### 8.2 检验方法

8.2.1 微生物法：采用表2中相对应的方法。

8.2.2 抗菌剂含量的测定法：采用附录A1~附录A8中相应的方法。

### 8.3 评价标准

8.3.1 产品经自然留样，其杀菌率或抑菌率达到规定的指标值，产品的杀菌或抑菌作用有效期为自留样时间。

8.3.2 产品经54℃~57℃恒温箱内放置14天的加速试验，其杀菌率或抑菌率达到规定的指标值或菌剂含量下降不超过10%，产品的杀菌或抑菌作用有效期为一年。

8.3.3 产品经37℃~40℃恒温箱内放置3个月的加速试验，其杀菌率或抑菌率达到规定的指标值或菌剂含量下降不超过10%，产品的杀菌或抑菌作用有效期为二年。



## 附录 A

(资料性附录)

## 抗菌、抑菌有效成分含量的测定方法

有效成分指具有抗菌、抑菌作用的化学物质成分。所测含量在产品有效期内，不得低于企业标准下限值。复方剂测其抗菌、抑菌主要成分的含量。植物类和用其提取物配制的产品可不测定有效成分。

## A.1 有效氯含量的测定

## A.1.1 试剂

- a) 硫酸 (GB/T 625), 2mol/L 溶液;
- b) 碘化钾 (GB/T 1272), 100g/L 溶液;
- c) 淀粉指示液 (5g/L);
- d) 硫代硫酸钠 (GB/T 637),  $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)=0.1\text{mol/L}$  标准滴定溶液。

## A.1.2 操作步骤

称取含氯抗菌试样适量，置于 100mL 容量瓶内，加蒸馏水至刻度，溶解混匀。

向碘量瓶内分别加入硫酸(A.1.1.a)10mL，碘化钾溶液(A.1.1.b)10mL，再分别加入试样溶液 10.0mL，盖好摇匀，用蒸馏水封口，置暗处放 5min (一式二份)。

用硫代硫酸钠标准滴定溶液 (A.1.1.d) 滴定游离碘，边摇边滴定，当颜色变成黄色时加入几滴淀粉指示液(A.1.1.c)，继续滴定至蓝色消失，记录消耗的硫代硫酸钠标准溶液量(mL)。

## A.1.3 计算:

有效氯含量  $L$  以质量百分数表示，按式 (A.1) 计算:

$$L(\%) = \frac{c \times V \times M \times 100}{m \times 1000} = \frac{c \times V \times M}{10m} \quad \text{..... (A.1)}$$

式中:

- $c$ ——硫代硫酸钠标准滴定溶液浓度，单位为摩尔每升 (mol/L);  
 $V$ ——滴定消耗的硫代硫酸钠标准滴定溶液的体积，单位为毫升 (mL);  
 $M$ ——氯的摩尔质量，单位为克每摩尔 (g/mol), [ $M=35.45$ ];  
 $m$ ——试验份质量，单位为克 (g)。

以两次平行测定的算术平均值表示至小数点后一位作为测定结果。

## A.1.4 重复性和再现性

在重复性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不大于这两个测定值的算术平均值的 1.3%，以大于 1.3% 的情况不超过 5% 为前提。

在再现性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不大于这两个测定值的算术平均值的 5%，以大于 5% 的情况不超过 5% 为前提。

## A.2 活性氧含量的测定

## A.2.1 试剂

- a) 硫酸铝十八水合物  $[\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}]$  (HG 3-929);
- b) 含铋和锰的硫酸溶液:

溶解 2g 硝酸铋五水合物  $[\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}]$  (HG 3-1295) 和 4g 硫酸锰一水合物  $(\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O})$  (HG 3-1081) [或相当量的四或五水合物  $(\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  或  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O})$ ] 于 1000mL 浓度为 5mol/L 硫酸溶液中;

c) 高锰酸钾 (GB/T 643),  $c(1/5\text{KMnO}_4)=0.1\text{mol/L}$  标准滴定溶液。

#### A.2.2 操作步骤

称取约 10g 试样 (准至 0.01g), 准确加入 35℃~40℃ 的水 1000mL, 用搅拌器激烈搅拌 3min, 试样溶解 (此为溶液 A)。(可能存在有少量不溶性的硅酸盐等可不必除去。)

移取 50mL 含铋和锰的硫酸溶液(A.2.1.b)于 500mL 锥形瓶中, 在不停的摇动下, 逐滴加入高锰酸钾标准滴定溶液 (A.2.1.c), 直到出现不褪的淡粉红色。

用移液管移取 100 mL 溶液 A 至上述锥形瓶中。用高锰酸钾标准滴定溶液 (A.2.1.c) 滴定至淡粉色, 至少 10s 不褪。记录消耗高锰酸钾标准滴定溶液的体积。

注: ①若终点不明显时, 可以加 1g 硫酸铝 (A.2.1.a) 重新测定。

②在试样溶解后应尽快进行测定。

#### A.2.3 计算

活性氧含量  $Y$  以质量百分数表示, 按式 (A.2) 计算:

$$Y(\%) = \frac{V \times c \times 8.0}{m_0} \dots\dots\dots (A.2)$$

式中:

$V$ ——滴定耗用高锰酸钾标准滴定溶液的体积, 单位为毫升 (mL);

$c$ ——高锰酸钾标准滴定溶液的浓度, 单位为摩尔每升 (mol/L);

$m_0$ ——试验份质量, 单位为克 (g)。

以两次平行测定的算术平均值表示至小数点后一位作为测定结果。

#### A.2.4 重复性和再现性

在重复性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不大于这两个测定值的算术平均值的 1.3% 以大于 1.3% 的情况不超过 5% 为前提。

在再现性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不大于这两个测定值的算术平均值的 5%, 大于 5% 的情况不超过 5% 为前提。

### A.3 有效碘含量的测定

#### A.3.1 试剂

a) 硫酸 (GB/T 625), 2.0mol/L 溶液;

b) 硫代硫酸钠 (GB/T 637), 0.1mol/L 溶液;

c) 淀粉指示液 (5g/L)。

#### A.3.2 操作步骤

准确称取含碘试样 5.00g (称准至 0.001g) 置碘量瓶内, 同时加硫酸 (A.3.1.a) 5mL, 摇匀。用硫代硫酸钠标准滴定溶液 (A.3.1.b) 滴定至淡黄色, 加入淀粉指示液 (A.3.1.c) 数滴, 摇匀, 呈蓝色, 续用硫代硫酸钠标准滴定溶液滴定至蓝色消失, 记录消耗硫代硫酸钠标准滴定溶液的体积 (mL)。

#### A.3.3 计算

有效碘含量  $D$  以质量百分数表示, 按式 (A.3) 计算:

$$D(\%) = \frac{c \times V \times M \times 100}{m_0 \times 1000} = \frac{c \times V \times M}{10m_0} \dots\dots\dots (A.3)$$

式中:

$c$ ——硫代硫酸钠标准滴定溶液的浓度, 单位为摩尔每升 (mol/L);

$V$ ——消耗硫代硫酸钠标准溶液的体积, 单位为毫升 (mL);

$M$ ——碘的摩尔质量, 单位为克每摩尔 (g/mol), [ $M=126.9$ ];

$m_0$ ——试验份质量, 单位为克 (g)。

以两次平行测定的算术平均值表示至小数点后一位作为测定结果。

#### A.3.4 重复性和再现性

在重复性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不大于这两个测定值的算术平均值的 1.3%，以大于 1.3% 的情况不超过 5% 为前提。

在再现性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不大于这两个测定值的算术平均值的 5%，以大于 5% 的情况不超过 5% 为前提。

### A.4 阳离子表面活性剂含量的测定

#### A.4.1 试剂

- a) 三氯甲烷 (GB/T 682)；
- b) 月桂基硫酸钠  $c(\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4\text{Na}) = 0.004\text{mol/L}$  标准滴定溶液，按 QB/T 2739—2005 中 4.23 配制；
- c) 混合指示剂溶液，按 QB/T 2739—2005 中 5.16 配制。

#### A.4.2 操作步骤

称取含  $0.002\text{mol} \sim 0.003\text{mol}$  阳离子活性物的足够试样，称准至  $0.001\text{g}$ 。用水溶解试验份并转移至  $1000\text{mL}$  单刻度容量瓶中，用水稀释至刻度，混合均匀。此即试液 A。

用移液管移取  $25.0\text{mL}$  试液 A 至  $100\text{mL}$  具塞量筒中。用量筒加  $10\text{mL}$  混合指示剂溶液， $15\text{mL}$  三氯甲烷， $10\text{mL}$  去离子水，充分摇动。

用月桂基硫酸钠标准滴定溶液滴定，开始时每次滴加  $1\text{mL} \sim 2\text{mL}$  后加塞，充分摇动。开始时三氯甲烷层呈蓝色，当接近终点时，摇动而形成乳浊液，此时极易破乳。继续逐滴滴定并反复猛烈摇动直到蓝色褪去，三氯甲烷层为淡灰—粉红色即达终点。

记录滴定所消耗月桂基硫酸钠标准滴定溶液的体积。

#### A.4.3 计算

阳离子活性物含量  $W$  以质量百分数表示，按式 (A.4) 计算：

$$W(\%) = \frac{V \times c \times M \times 100}{m_0 \times 25 \times 1000} = \frac{4 \times V \times c \times M}{m_0} \dots\dots\dots (\text{A.4})$$

式中：

- $V$ ——滴定消耗月桂基硫酸钠标准滴定溶液的体积，单位为毫升 (mL)；
- $c$ ——月桂基硫酸钠 ( $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4\text{Na}$ ) 标准滴定溶液的浓度，单位为摩尔每升 (mol/L)；
- $M$ ——阳离子表面活性剂的摩尔质量数，单位为克每摩尔 (g/mol)；
- $m_0$ ——试验份质量，单位为克 (g)。

以两次平行测定的算术平均值表示至小数点后一位作为测定结果。

#### A.4.4 重复性和再现性

在重复性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不大于这两个测定值的算术平均值的 1.5%，以大于 1.5% 的情况不超过 5% 为前提。

在再现性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不大于这两个测定值的算术平均值的 3%，以大于 3% 的情况不超过 5% 为前提。

### A.5 溶菌酶中蛋白质含量的测定——(Folin-酚法)

#### A.5.1 试剂

- a) 标准蛋白质溶液  
牛血清白蛋白 ( $100\mu\text{g/mL}$ )

- b) Folin-酚试剂

试剂 A：

- (1) 碳酸钠 (GB/T 9856), 40g/L 溶液;
- (2) 氢氧化钠 (GB/T 629), 0.2mol/L 溶液;
- (3) 硫酸铜 (GB/T 665), 10g/L 溶液;
- (4) 酒石酸钾钠(GB/T 1288), 20g/L 溶液。

临用前将 (1) 和 (2) 等体积配制成碳酸钠-氢氧化钠溶液, 将 (3) 和 (4) 等体积混合成硫酸铜酒石酸钾钠溶液。然后将这两种试剂按 50:1 的比例混合, 即成 Folin-酚试剂 A。此试剂临用前配制一天内有效。

#### 试剂 B:

称钨酸钠( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )100g, 钼酸钠( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (HG 3-1087) 25g 置 2000mL 磨口回流置内, 加蒸馏水 700mL, 85%磷酸 (GB/T 1282) 50mL 和浓盐酸 (GB/T 622) 100mL, 充分混匀, 其溶解。小火加热回流 10h, 再加入硫酸锂 ( $\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) 50g, 蒸馏水 50mL, 99%溴 (GB/T 1281) 数滴。在通风橱中开口煮沸 15min, 以除去多余的溴。冷却后定容至 1000mL, 过滤即成 Folin-酚试剂 B 贮存液, 此液应为金黄色, 置棕色瓶中, 冰箱内保存。

#### A. 5. 2 仪器

752 型分光光度计。

#### A. 5. 3 操作步骤

##### A. 5. 3. 1 制备 Folin-酚法标准曲线

取 14 支试管, 分两组按表 A.1 平行操作。

表 A. 1

试剂处理	试管编号						
	1	2	3	4	5	6	7
标准蛋白溶液/mL	0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
含标准蛋白质质量/ $\mu\text{g}$	0	10	20	40	60	80	100
蒸馏水/mL	1.0	0.9	0.8	0.6	0.4	0.2	0
Folin-酚 A 试剂/mL	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
混匀, 于 20℃~25℃放置 15min							
Folin-酚 B 试剂/mL	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

加入 Folin-酚 B 试剂后迅速混匀, 于 30℃水浴保温 30min, 以蒸馏水为空白, 在 640nm 处比色。以吸光度 ( $A_{640}$  值) 为纵坐标, 标准蛋白质质量为横坐标, 绘制标准曲线。

##### A. 5. 3. 2 测定试样蛋白质浓度

取 4 支试管, 分两组按表 A.2 平行操作。

表 A. 2

试剂处理	试管编号	
	1	2
试样溶液 / mL	0	0.2
蒸馏水/mL	1.0	0.8
Folin-酚 A 试剂 / mL	5.0	5.0
混匀, 于 20℃~25℃放置 15min		
Folin-酚 B 试剂/mL	0.5	0.5

加入 Folin-酚 B 试剂后迅速混匀, 于 30℃水浴保温 30min, 以蒸馏水为空白, 在 640nm 处比色。

#### A. 5. 4 计算

蛋白质含量  $P$  以微克每毫升试样表示, 按式 (A.5) 计算:

$$\text{蛋白质}(\mu\text{g/mL})\text{试样} = \frac{A_{640}\text{值对应标准曲线蛋白质质量}}{\text{测定时用稀释试样的mL数}} \times \text{试样的稀释倍数} \dots\dots\dots(\text{A.5})$$

以两次平行测定的算术平均值表示至小数点后一位作为测定结果。

#### A.5.5 重复性和再现性

在重复性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不大于这两个测定值的算术平均值的3%，以大于3%的情况不超过5%为前提。

在再现性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不大于这两个测定值的算术平均值的5%，以大于5%的情况不超过5%为前提。

注：Folin-酚乙试剂在酸性条件下较稳定，而Folin-酚甲试剂在碱性条件下与蛋白质作用生成碱性的铜-蛋白质溶液。当Folin-酚乙试剂加入后，应迅速摇匀，加一管摇一管，使还原反应产生在磷钼酸-磷钨酸试剂被破坏之前。

本法可测定范围是25 $\mu\text{g}$ ~250 $\mu\text{g}$ 蛋白质。试样稀释倍数应使蛋白质含量在标准曲线范围之内，若超过此范围需将试样酌情稀释。

### A.6 N-(4-氯苯基)-N-(3,4-二氯苯基)脲含量测定

英文名Triclocarban(简称TCC)

#### A.6.1 液相色谱法

##### A.6.1.1 试剂

- a) TCC对照品(纯度较高且已知浓度的TCC)；
- b) 甲醇：色谱纯。

##### A.6.1.2 仪器

- a) 高压液相色谱仪；
- b) 紫外检测器；
- c) 色谱工作站；
- d) 色谱柱：Shim-pack CLC-ODS(150 $\times$ 6.0mmID)。

##### A.6.1.3 操作条件

- a) 柱温：室温；
- b) 流动相：甲醇-水(80:20)；
- c) 进样量：20 $\mu\text{L}$ ；
- d) 检测波长：265nm；
- e) 保留时间：约12min。

可根据仪器的特点，对上述参数作适当调整，以获得最佳效果。

##### A.6.1.4 溶液的配制

对照品溶液：准确称取20mg对照品(称准至0.0001g)于100mL的容量瓶中，加50mL甲醇使其溶解，用流动相稀释、定容、摇匀、脱气。从中移取5.0mL于50mL的三角瓶中，再加25.0mL流动相，摇匀、脱气即可。

试样溶液：准确称取20mg试样(称准至0.0001g)于100mL的容量瓶中，加50mL甲醇使其溶解，用流动相稀释、定容、摇匀、脱气。从中移取5.0mL于50mL的三角瓶中，再加25.0mL流动相，摇匀、脱气即可。

##### A.6.1.5 测定及计算

在操作条件下，等待仪器基线平稳后，分别注入对照品溶液和试样溶液，记录峰面积。

TCC含量 $X_n$ 以质量百分数表示，按式(A.6)计算：

$$X_n(\%) = \frac{A_t \times m_s \times X_s}{A_s \times m_t} \dots\dots\dots (A.6.1.5)$$

式中：

- $A_t$  —— 试样溶液中TCC的峰面积；
- $A_s$  —— 对照品溶液中TCC的峰面积；
- $m_t$  —— 试样的质量，单位为克（g）；
- $m_s$  —— 对照品的质量，单位为克（g）；
- $X_s$  —— 对照品的百分含量，%。

以两次平行测定的算术平均值表示至小数点后一位作为测定结果。

**A.6.1.6 重复性和再现性**

在重复性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不大于这两个测定值的算术平均值的 2.5%；以大于 2.5% 的情况不超过 5% 为前提。

在再现性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不大于这两个测定值的算术平均值的 5%；以大于 5% 的情况不超过 5% 为前提。

**A.6.2 分光光度法**

**A.6.2.1 试剂**

- a) 二甲基甲酰胺（GB/T 17521）；
- b) 95%乙醇（GB/T 679）；
- c) 氨水（GB/T 631）。

**A.6.2.2 仪器**

分光光度计。

**A.6.2.3 溶液的配制**

对照品溶液：称取约 0.04g ( $m_s$ ) TCC（称准至 0.001g），用乙醇溶解，定量转移至 1L 的容量瓶，用乙醇加至刻度混匀，移取 4mL 此液到 100mL 容量瓶中，加 4.0mL 氨水，用乙醇加至刻度混匀。

样品溶液：称取约 1g ( $m_t$ ) 试样（称准至 0.001g），置于 50mL 烧杯中，加入 10mL 二甲基甲酰胺充分混合，用烧结玻璃漏斗抽滤。将 3mL 滤液在蒸汽浴或电热板上蒸干，将剩余物用 10~20mL 乙醇溶解并定量转移到 100mL 容量瓶中，用乙醇加至刻度并混匀，移取 4.0mL 此液到另一 100mL 容量瓶加入 4.0mL 浓氨水，用乙醇加至刻度，摇匀 ( $A_t$ )。

空白溶液：将 4.0mL 浓氨水加入 100mL 容量瓶中，用乙醇加至刻度混匀 ( $A_b$ )。

**A.6.2.4 测定及计算**

用分光光度计在 264nm 处测定试样溶液 ( $A_t$ )，对照品溶液 ( $A_s$ ) 和空白溶液 ( $A_b$ ) 的吸光 TCC 含量  $X_n$  以质量百分数表示，按式 (A.7) 计算：

$$X_n(\%) = \frac{(A_t - A_b) \times m_s \times 100}{3 \times (A_s - A_b) \times m_t} \dots\dots\dots (A.7)$$

式中：

- $A_t$  —— 试样溶液的吸光值；
- $A_b$  —— 空白溶液的吸光值；
- $A_s$  —— 对照品溶液的吸光值；
- $m_s$  —— 对照品的质量，单位为克（g）；
- $m_t$  —— 试样的质量，单位为克（g）。

以两次平行测定的算术平均值表示至小数点后一位作为测定结果。

#### A. 6. 2. 5 重复性和再现性

在重复性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不大于这两个测定值的算术平均值的 2.5%，以大于 2.5% 的情况不超过 5% 为前提。

在再现性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不大于这两个测定值的算术平均值的 5%，以大于 5% 的情况不超过 5% 为前提。

### A. 7 吡啶硫酮锌含量测定

#### A. 7. 1 试剂

- a) 氧化锌基准物 (GB/T 1260)；
- b) 盐酸 (GB/T 622) (1+2) 溶液；
- c) 硫酸 (GB/T 625)；
- d) 六次甲基四胺 (GB/T 1400)，300g/L 溶液；
- e) 二甲酚橙指示液 (2g/L)；
- f) 乙二胺四乙酸二钠 (GB/T 1401)， $c(\text{EDTA二钠})=0.02\text{mol/L}$  标准滴定溶液。

#### A. 7. 2 操作步骤

**总锌测定：**称取含 0.1g 吡啶硫酮锌的足够试样（精确到 0.0001g）于 25mL 的坩埚中，缓缓加热至完全炭化，放冷。加浓硫酸 0.5mL 使湿润，低温加热至硫酸蒸气除尽后，放进高温炉中，在 700℃~800℃ 灼烧 2h。取出，冷却，连坩埚一起放入 250mL 烧杯中，加 3mL 盐酸 (1+2)、100mL 水、3 滴二甲酚橙指示剂，再加六次甲基四胺缓冲液至溶液变紫红色后再多加 4mL，用 EDTA 二钠标准溶液滴定至恰好紫红色消失即为终点，记下 EDTA 二钠的体积。

**游离锌测定：**称取含 1g 吡啶硫酮锌的足够试样（精确至 0.0001g）于 250mL 的锥形瓶中，加 100mL 水、3 滴二甲酚橙指示液，再加六次甲基四胺缓冲液至溶液变紫红色后多加 4mL，用 EDTA 二钠标准溶液滴定至恰好紫红色消失即为终点，记录消耗 EDTA 二钠的体积。

#### A. 7. 3 计算

吡啶硫酮锌含量  $Z$  以质量百分数表示，按式 (A.8) 计算：

$$Z = \left( \frac{V_1}{m_1} - \frac{V_2}{m_2} \right) \times c \times M \times 100 \quad \text{..... (A.8)}$$

式中：

- $V_1$  —— 总锌测定时 EDTA 二钠的体积，单位为毫升 (mL)；
- $V_2$  —— 游离锌测定时 EDTA 二钠的体积，单位为毫升 (mL)；
- $m_1$  —— 总锌测定时试样的质量，单位为克 (g)；
- $m_2$  —— 游离锌测定时试样的质量，单位为克 (g)；
- $c$  —— EDTA 二钠标准滴定溶液的浓度，单位为摩尔每升 (mol/L)；
- $M$  —— 吡啶硫酮锌的摩尔质量，单位为克每摩尔 g/mol， $[M=317.7]$ 。

以两次平行测定的算术平均值表示至小数点后一位作为测定结果。

### 7. 4 重复性和再现性

在重复性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不大于这两个测定值的算术平均值的 1.3%，以大于 1.3% 的情况不超过 5% 为前提。

在再现性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不大于这两个测定值的算术平均值的 5%，以大于 5% 的情况不超过 5% 为前提。

A.8 三氯羟基二苯醚含量测定——液相色谱法

英文名 Triclosan (简称三氯生)

A.8.1 试剂

- a) 甲醇：色谱纯；
- b) 三氯羟基二苯醚（含量不少于 99.0%，且已知）。

A.8.2 仪器

- a) 高效液相色谱仪；
- b) 紫外检测器；
- c) 十八烷基硅烷键合硅胶填充柱。

A.8.3 操作条件

- a) 柱温：室温；
- b) 流动相：甲醇溶液（75+25）；
- c) 进样量：10 $\mu$ L；
- d) 检测波长：270nm。

可根据仪器的特点，对上述参数作适当调整，以获得最佳效果。

A.8.4 溶液的配制

- a) 对照品溶液（需新鲜配制）

准确称取三氯羟基二苯醚（A.8.1.b）约 250mg（精确到 0.1mg），置于 50mL 容量瓶中，加入刻度，摇匀，精确移取 1mL 稀释液于 100mL 容量瓶中，加入甲醇稀释至刻度，摇匀，经 0.45 $\mu$ m 滤膜过滤，即得每 1mL 含三氯羟基二苯醚约 50 $\mu$ g。

- b) 试样溶液

称取试样约 1g，加入甲醇溶解，置 50mL 容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，摇匀，先用普通滤，再经 0.45 $\mu$ m 微孔滤膜过滤，即得。

A.8.5 测定及计算

在操作条件下，等待仪器基线平稳后，分别注入对照品溶液和试样溶液各 10 $\mu$ L，记录峰面三氯生含量  $S$  以质量百分数表示，按式（A.9）计算：

$$S(\%) = \frac{X_s \times A_t \times 50}{A_s \times m_t \times 10^6} \times 100 \dots\dots\dots$$

式中：

- $X_s$  —— 对照品的浓度，单位为微克每毫升（ $\mu$ g/mL）；
- $A_t$  —— 试样的峰面积或峰高；
- $A_s$  —— 对照品的峰面积或峰高；
- $m_t$  —— 试样的质量，单位为克（g）。

以两次平行测定的算术平均值表示至小数点后二位作为测定结果。

A.8.6 重复性和再现性

在重复性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不大于这两个测定值的算术平均值的；以大于 2.5% 的情况不超过 5% 为前提。

在再现性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不大于这两个测定值的算术平均值的 5 大于 5% 的情况不超过 5% 为前提。

注：亦可参照 A.6.2 分光光度法测定试样中的三氯生含量。



QB/T 2738—2012

中华人民共和国轻工行业标准

日化产品抗菌抑菌效果的评价方法

范围

规范性引用文件

术语和定义

试验方法

结果判定

试验报告

附录A 抗菌抑菌效果评价方法

附录B 试验报告

附录C 试验报告

附录D 试验报告

附录E 试验报告

附录F 试验报告

附录G 试验报告

附录H 试验报告

附录I 试验报告

附录J 试验报告

附录K 试验报告

附录L 试验报告

附录M 试验报告

附录N 试验报告

附录O 试验报告

附录P 试验报告

附录Q 试验报告

附录R 试验报告

中华人民共和国  
轻工行业标准  
日化产品抗菌抑菌效果的评价方法  
QB/T 2738—2012

\*

中国轻工业出版社出版发行

地址：北京东长安街6号

邮政编码：100740

发行电话：(010)65241695

网址：<http://www.chlip.com.cn>

Email：[club@chlip.com.cn](mailto:club@chlip.com.cn)

轻工业标准化编辑出版委员会编辑

地址：北京西城区下斜街29号

邮政编码：100053

电话：(010)68049923

\*

版权所有 侵权必究

书号：155019·3799

印数：1—200册 定价：35.00元



QB/T 2738-2012