ICS 71.100.40
CCS Y 40

QB

中华人民共和国轻工行业标准

QB/T 2738－2023
代替 QB/T 2738－2012

日化产品抗菌抑菌效果的评价方法

Evaluating methods for antibacterial and bacteriostatic efficacy of daily chemical products

2023-04-21 发布　　2023-11-01 实施

中华人民共和国工业和信息化部　发布

目　次

前言 ……II
1 范围 …… 1
2 规范性引用文件…… 1
3 术语和定义…… 1
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 …… 2
5 样品采集…… 2
6 日化产品抗菌、抑菌效果评价原则…… 2
7 日化产品抗菌、抑菌效果检验方法…… 3
8 日化产品抗菌、抑菌效果稳定性检验方法……21
附录 A（资料性）统计检验示例……22
参考文献……25

前　言

本文件按照GB/T 1.1－2020《标准化工作导则　第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件代替QB/T 2738－2012《日化产品抗菌抑菌效果的评价方法》，与QB/T 2738－2012相比，除编辑性改动外，主要技术变化如下：

a） 更改了检验用指示微生物（见 6.3，2012 年版的 6.3）；

b） 增加了菌落计数规定（见 6.6）；

c） 更改了日化产品抗菌、抑菌效果检验方法分类（见 7.1，2012 年版的 7.1）；

d） 更改了试验用设备、试剂（见 7.2.1、7.2.2，2012 年版的 7.2.1、7.2.2）；

e） 更改了菌液制备（见 7.2.2.5，2012 年版的 7.2.2 f））；

f） 更改了中和剂鉴定试验方法（见 7.2.3，2012 年版的 7.2.3）；

g） 删除了抗抑菌结果保留整数的规定（见 7.2.5、7.3.4）；

h） 增加了抑菌效果检验方法（悬液定量法）特殊情况下的菌落计数（见 7.3.3.6）；

i） 更改了抑菌效果评价表述（见 7.3.6，2012 年版的 7.3.6）；

j） 更改了抑菌环法试验菌悬液浓度（见 7.5.4.3，2012 年版的 7.5.4c））；

k） 更改了部分培养温度及培养时间[见 7.2.2.5、7.2.4.6、7.3.3.6、7.4.4.4、7.4.5.6、7.5.4.1、7.5.4.4、7.6.5.3，2012 版的 7.2.2 f）、7.2.4 f）、7.3.3 f）、7.4.4 d）、7.4.5 g）、7.5.4 a）、7.5.4 d）、7.6.5.c）]；

l） 增加了持续抑菌效果检验方法（体外模拟法，适用于皂类产品）、抗菌型日化产品的杀菌效果检验方法（载体浸泡定量法）及抑菌型日化产品的杀菌效果检验方法（载体浸泡定量法）（见 7.7、7.8、7.9）；

m） 更改了日化产品抗菌、抑菌效果稳定性检验方法及评价标准（见第 8 章，2012 年版的第 8 章）；

n） 删除了对于抗菌剂含量测定等内容（见 2012 年版的附录 A）；

o） 增加了统计检验示例（见附录 A）。

本文件由中国轻工业联合会提出。

本文件由全国表面活性剂和洗涤用品标准化技术委员会（SAC/TC 272）归口。

本文件起草单位：中国日用化学研究院有限公司、上海开米科技有限公司、广东省微生物分析检测中心、北京宝洁技术有限公司、蓝月亮（中国）有限公司、山东泰和水处理科技股份有限公司、完美（广东）日用品有限公司、广州超威生物科技有限公司、广东利诚检测技术有限公司、中轻检验认证（太原）有限公司。

本文件主要起草人：王杰、于文、谢小保、黄亮、张靖峰、雷帅、郁晓艺、刘亚军、钟美媛、姚晨之。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——2005年首次发布为QB/T 2738－2005，2012年第一次修订；

——本次为第二次修订。

日化产品抗菌抑菌效果的评价方法

1 范围

本文件描述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，规定了评价标准。

本文件适用于常见洗涤用品的抗菌、抑菌性能的测试和评价，其他日化产品抗菌、抑菌性能的测试和评价根据用途选择使用。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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。

GB 4789.2 食品安全国家标准 食品微生物学检测 菌落总数测定

QB/T 2153 工业油酸

QB/T 2850 抗菌抑菌型洗涤剂

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。

[来源：《消毒技术规范》（2002年版），1.3.30]

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。

[来源：《消毒技术规范》（2002年版），1.3.31]

3.3

载体 carrier

试验微生物的支持物。

[来源：《消毒技术规范》（2002年版），1.3.29]

3.4

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表达活菌数量的集落。

[来源：《消毒技术规范》（2002年版），1.3.13，有修改]

3.5

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。

[来源：《消毒技术规范》（2002年版），1.3.11]

3.6

中和产物　product of neutralization

中和剂（3.5）与杀菌剂作用后的产物。

[来源：《消毒技术规范》（2002年版），1.3.12]

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，试验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，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，应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）应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，均应灭菌或过滤除菌。

4.7　无菌器材和试剂，使用前应检查容器或包装是否完整，有破损者不应使用。

4.8　正在使用的无菌器材和试剂不应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，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 3 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，检验前不应启开。

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

文件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

文件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
金黄色葡萄球菌 （*Staphylococcus aureus*）	ATCC 6538或ATCC 27217
大肠埃希氏菌（大肠杆菌） （*Escherichia coli*）	8099或ATCC 25922或ATCC 11229
白假丝酵母菌（白色念珠菌） （*Candida albicans*）	ATCC 10231
铜绿假单胞菌（绿脓杆菌） （*Pseudomonas aeruginosa*）	ATCC 15442或ATCC 9027

6.4 作用浓度

按产品明示的标准要求进行，未明示的执行QB/T 2850。

6.5 作用时间

按产品明示的标准要求进行，未明示的执行QB/T 2850。

6.6 菌落计数

按GB 4789.2中规定计数。

6.7 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	本文件对应条
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
	载体浸泡定量法	计时杀菌	抗菌型日化产品	7.8
抑菌试验	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
			抑菌型皂类产品	7.7
	抑菌环法	计时抑菌	抑菌型日化产品	7.5
	滞留法	滞留抑菌	抑菌型人体皮肤清洁产品	7.6
	载体浸泡定量法	计时杀菌	抑菌型日化产品	7.9

7.2　日化产品的杀菌效果检验方法（悬液定量法）

7.2.1　设备

主要设备有：

a）　锥形烧瓶，
b）　平皿（直径 9 cm），
c）　量筒，
d）　精密 pH 试纸，
e）　无菌试管，
f）　无菌刻度吸管（1.0 mL、5.0 mL、10.0 mL）或相应的可调量程移液器，
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

7.2.2.1　培养基

商品化的合格市售培养基：

a）　营养琼脂培养基，
b）　营养肉汤培养基，
c）　沙氏琼脂培养基，
d）　沙氏液体培养基。

7.2.2.2　0.03mol/L 磷酸盐缓冲液（PBS）

称取无水磷酸氢二钠2.83 g、磷酸二氢钾1.36 g，加蒸馏水1 000 mL，待完全溶解后，调pH至7.2～7.4，经121℃压力蒸汽灭菌20 min后备用。

7.2.2.3　标准硬水（硬度 342 mg/L）

称取氯化钙（$CaCl_2$）0.304 g、氯化镁（$MgCl_2·6H_2O$）0.139 g，加蒸馏水1 000 mL，经121℃压力蒸汽灭菌20 min后备用。

7.2.2.4　中和剂

几种常见中和剂：

a）　硫代硫酸钠 5.0 g、蒸馏水 1 000 mL（用于氯型杀菌剂）；
b）　磷酸二氢钾 1.36 g、磷酸氢二钠 2.83 g、卵磷脂 10.0 g、甘氨酸 10.0 g、吐温（80）30.0 g、蒸馏水 1 000 mL（用于非氧化型杀菌剂）；
c）　磷酸二氢钾 1.36 g、磷酸氢二钠 2.83 g、卵磷脂 3.0 g、吐温（80）20.0 g、蒸馏水 1 000 mL（用于非氧化型杀菌剂）；
d）　吐温（80）20.0 g、硫代硫酸钠 10.0 g、PBS 1 000 mL（用于氧型杀菌剂）。

7.2.2.5　菌液制备

7.2.2.5.1　细菌繁殖体悬液的制备

细菌繁殖体悬液的制备步骤如下。

a）　取冻干菌种管，在无菌操作下打开，加入适量营养肉汤，轻柔吹吸数次，使菌种融化分散。取含 5.0 mL～10.0 mL 营养肉汤培养基试管，滴入少许菌种悬液，置（36±1）℃培养 18 h～24 h。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（36±1）℃培养 18 h～24 h。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（36±1）℃培养 18 h～24 h，即为第 3 代培养物。
b）　取菌种第 3～6 代的营养琼脂培养基斜面新鲜培养物（18 h～24 h），用 5.0 mL 吸管吸取 3.0 mL～5.0 mL 稀释液加入斜面试管内，反复吹吸，洗下菌苔。随后，用 5.0 mL 吸管将洗液移至另一无菌试管中，用电动混合器混合（振荡）20 s，或在手掌上振敲 80 次，以使细菌悬浮均匀。
c）　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。
d）　细菌繁殖体悬液应保存在 4℃冰箱内备用，当天使用不应过夜。
e）　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。

7.2.2.5.2　白假丝酵母菌（白色念珠菌）悬液制备

白假丝酵母菌（白色念珠菌）悬液制备步骤如下：

a）　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 5.0 mL～10.0 mL 沙堡液体培养基试管，滴入少许菌种悬液，置（36±1）℃培养 18 h～24 h。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（36±1）℃培养 18 h～24 h。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（36±1）℃培养 18 h～24 h，即为第 3 代培养物。

b） 取菌种第 3～6 代的沙堡琼脂培养基斜面新鲜培养物 18 h～24 h，用 5.0 mL 吸管吸取 3.0 mL～5.0 mL PBS 稀释液加入斜面试管内，反复吹吸，洗下菌苔。随后，用 5.0 mL 吸管将洗液移至另一无菌试管中，用电动混合器混合 20 s，或在手掌上振敲 80 次，以使白色念珠菌悬浮均匀。

c） 菌悬液保存在 4℃冰箱内备用，当天使用不应过夜。

d） 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

7.2.3.1 总则

为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。

7.2.3.2 试验分组

试验分为以下 4 组：

a） 第 1 组：5.0 mL 中和剂+菌液→培养 ；

b） 第 2 组：（0.5 mL 抗菌剂+4.5 mL 中和剂）+菌液→培养；

c） 第 3 组：5.0 mL 稀释液+菌液→培养 ；

d） 第 4 组：稀释液+中和剂+培养基→培养。

7.2.3.3 试验步骤

根据试验分组，准备试管和平皿，依次进行编号。

a） 第 1 组：取 5.0 mL 中和剂于试管中，置（20±1）℃水浴 5 min，加入 0.1 mL 菌悬液，混匀，作用 10 min。用中和剂做 10 倍系列稀释，选适宜稀释度悬液，各吸取 1.0 mL，分别接种于 2 个平皿中，做活菌培养计数。

b） 第 2 组：取 5.0 mL 中和产物溶液 （取试验样液 1.0 mL 与中和剂 9.0 mL 混合，作用 10 min 后制成中和产物）于试管中，置（20±1）℃水浴 5 min，加入 0.1 mL 菌悬液，混匀，作用 10 min。用中和产物做 10 倍系列稀释，选适宜稀释度悬液，各吸取 1.0 mL，分别接种于 2 个平皿中，做活菌培养计数。

c） 第 3 组：取 5.0 mL PBS 于试管中，置（20±1）℃水浴 5 min，加入 0.1 mL 菌悬液，混匀，作用 10 min。用 PBS 做 10 倍系列稀释，选适宜稀释度悬液，各吸取 1.0 mL，分别接种于 2 个平皿中，做活菌培养计数。

d） 第 4 组：分别吸取 PBS 与中和剂各 1.0 mL 于同一无菌平皿内，倒入同批次的培养基 15 mL～20 mL，培养观察。

7.2.3.4 结果判定

7.2.3.4.1 第 1、2、3 组菌数相似，回收菌量在 1×10^4 CFU/mL～9×10^4 CFU/mL，并且其组间菌落数误差率不大于 15%。第 1、2、3 组间菌落数误差率按公式（1）计算：

$$E=\frac{\sum_{i=1}^{3}|V-v|}{3\times V}\times 100\% \qquad \cdots\cdots（1）$$

式中：

E——组间菌落数误差率；

V——3 组间菌落算术平均数，单位为每毫升菌落形成单位（CFU/mL）；

v——各组菌落算术平均数，单位为每毫升菌落形成单位（CFU/mL）。

7.2.3.4.2　第 4 组无菌生长。

7.2.3.4.3　连续 3 次试验取得合格评价。

7.2.4　杀菌试验操作步骤

7.2.4.1　用 PBS 液将试验菌悬液（7.2.2.5）稀释，要求浓度为：取 0.1 mL 滴于 5.0 mL 对照样液（PBS）内，回收菌数为 1×10^4 CFU/mL～9×10^4 CFU/mL。

7.2.4.2　将试验样品用无菌标准硬水稀释至规定的浓度。

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

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

7.2.4.5　作用至设定时间后，取试验菌与样品的混合液 0.5 mL，加入到含 4.5 mL 经灭菌的中和剂中，混匀。

7.2.4.6　中和 10 min 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）1 mL，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）15 mL～20 mL 作倾注，转动平皿，使其充分均匀，琼脂凝固后翻转平皿，（36±1）℃培养（48±2）h（细菌）或（72±3）h（白色念珠菌）后，做活菌菌落计数。

7.2.4.7　以 PBS 代替试验样品，同时按以上步骤操作，作为对照样品。

7.2.4.8　实验重复 3 次，求其平均值。

7.2.5　计算公式

杀菌率按式（2）计算，结果以百分数（%）表示，保留两位小数。

$$S=\frac{I-II}{I}\times 100\% \qquad \cdots\cdots（2）$$

式中：

S——杀菌率；

I——对照样品平均菌落数，单位为每毫升菌落形成单位（CFU/mL）；

II——试验样品平均菌落数，单位为每毫升菌落形成单位（CFU/mL）。

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，可按式（3）～式（8）计算。

$$v_p=\frac{\sum_{i=1}^{n}T}{n} \qquad \cdots\cdots（3）$$

式中：

v_p——平板间菌落平均数，单位为每毫升菌落形成单位（CFU/mL）；
T——各平板菌落，单位为每毫升菌落形成单位（CFU/mL）；
n——平板总数。

$$s=\frac{\sum_{i=1}^{n}\left|v_p-T\right|}{n} \qquad \cdots\cdots（4）$$

式中：
s——平板间菌落数平均差，单位为每毫升菌落形成单位（CFU/mL）；
v_p——平板间菌落平均数，单位为每毫升菌落形成单位（CFU/mL）；
T——各平板菌落，单位为每毫升菌落形成单位（CFU/mL）；
n——平板总数。

$$E_p=\frac{s}{v_p}\times 100\% \qquad \cdots\cdots（5）$$

式中：
E_p——平板间菌落数误差率；
s——平板间菌落数平均差，单位为每毫升菌落形成单位（CFU/mL）；
v_p——平板间菌落平均数，单位为每毫升菌落形成单位（CFU/mL）。

$$v_s=\frac{\sum_{i=1}^{d}D}{d} \qquad \cdots\cdots（6）$$

式中：
v_s——稀释度间菌落平均数，单位为每毫升菌落形成单位（CFU/mL）；
D——各稀释度平均菌落数，单位为每毫升菌落形成单位（CFU/mL）；
d——稀释度数。

$$s_d=\frac{\sum_{i=1}^{n}\left|v_s-D\right|}{d} \qquad \cdots\cdots（7）$$

式中：
s_d——稀释度间菌落平均差，单位为每毫升菌落形成单位（CFU/mL）；
v_S——稀释度间菌落平均数，单位为每毫升菌落形成单位（CFU/mL）；
D——各稀释度菌落数，单位为每毫升菌落形成单位（CFU/mL）；
d——稀释度数。

$$E_d=\frac{s_d}{v_s}\times 100\% \qquad \cdots\cdots（8）$$

式中：
E_d——稀释度间菌落数误差率；
s_d——稀释度间菌落数平均差，单位为每毫升菌落形成单位（CFU/mL）；
v_s——稀释度间菌落平均数，单位为每毫升菌落形成单位（CFU/mL）。

7.2.7 产品抗菌效果评价

将测试结果填入表 6，评价产品的抗菌效果。当杀菌率不低于 90%，表明此条件下产品有抗菌效果。

表 6　抗菌效果评价

试验菌种[a]	作用时间/（min）	作用浓度	效果评价
[a]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　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

7.3.3.1　用 PBS 液将试验菌悬液（7.2.2.5）做适当稀释，要求浓度为：取 0.1 mL 滴于 5.0 mL 对照样液（PBS）内，回收菌数为 1×10^4 CFU/mL～9×10^4 CFU/mL。

7.3.3.2　将试验样品用无菌标准硬水稀释至规定的浓度。

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

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

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

7.3.3.6　吸取样液（或作适当稀释后，取其中 2～3 个稀释度的稀释液）1 mL，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（白色念珠菌）15 mL～20 mL 作倾注，转动平皿，使其充分均匀，琼脂凝固后翻转平皿，（36±1）℃培养（48±2）h（细菌）或（72±3）h（白色念珠菌）后，做活菌菌落计数。若接种低稀释度样液的平板无菌落生长，但接种高稀释度样液的平板有菌落生长，按无菌落生长计数。

7.3.3.7　以 PBS 代替试验样品，同时按以上步骤操作，作为对照样品。

7.3.3.8　试验重复 3 次，求其算术平均值。

7.3.4　计算公式。

抑菌率按公式（9）计算，结果以百分数（%）表示，保留2位小数。

$$Y=\frac{I-II}{I}\times100\% \qquad \cdots\cdots(9)$$

式中：

Y——抑菌率；

I——对照样品平均菌落数，单位为每毫升菌落形成单位（CFU/mL）；

II——试验样品平均菌落数，单位为每毫升菌落形成单位（CFU/mL）。

7.3.5　误差评价

同7.2.6。

7.3.6　产品抑菌效果评价

将测试结果填入表7，评价产品的抑菌效果。当抑菌率不低于90%，表明此条件下产品有强效抑菌效果；当抑菌率不低于50%且不足90%时，表明此条件下产品有抑菌效果。

表7　抑菌效果评价

试验菌种[a]	作用时间/min	作用浓度	效果评价
[a]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。			

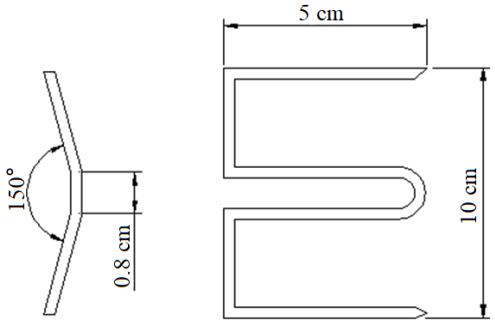
7.4　织物类洗涤剂抗菌或抑菌效果检验方法（模拟法）

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（液）等织物类洗涤产品的抗菌或抑菌效果。

7.4.2　设备

7.4.2.1　不锈钢转轴（由一条直径 0.16 cm 不锈钢丝制成，如图 1 所示）。



a）俯视图　　b）侧面图

图 1　缠绕测试布条的不锈钢转轴

7.4.2.2　有金属螺盖的玻璃罐（容积为 470 mL，能高压灭菌，并能放入转轴的广口罐），将罐口覆盖牛皮纸，加盖，于 121℃灭菌 25 min 备用。

7.4.2.3　转动速度为 45 r/min～60 r/min 的滚动摇床。

7.4.2.4　可调恒温水浴箱。

7.4.2.5　吸管（1 mL、5 mL、10 mL）。

7.4.2.6　培养皿。

7.4.2.7　铺有滤纸的玻璃培养皿。

7.4.2.8　细菌保存管。

7.4.2.9　细菌培养箱。

7.4.2.10　涡流振荡器。

7.4.2.11　棉布（32 支纱/cm×32 支纱/cm 平织棉布）。

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

7.4.3　试剂

7.4.3.1　培养基（商品化的合格市售培养基）：营养琼脂、胰蛋白胨大豆琼脂培养基（TSA）、胰蛋白胨大豆肉汤培养基（TSB）。
7.4.3.2　牛血清白蛋白溶液（浓度 3%）：称取牛血清白蛋白 3.0 g，加蒸馏水 100 mL，溶解后用微孔滤膜（孔径为 0.45 μm）过滤除菌，冰箱保存备用。
7.4.3.3　标准硬水（7.2.2.3）。
7.4.3.4　非离子浸湿剂：称取 5.0 g 烷基酚聚氧乙烯醚，5.0 g 碳酸钠，加蒸馏水 1 000 mL 溶解。
7.4.3.5　洗涤液：移取 1.5 g 非离子浸润剂（7.4.3.4），1.5 g 碳酸钠，加蒸馏水 3 000 mL 溶解。
7.4.3.6　中和剂（经中和剂鉴定试验合格，同 7.2.3）。
7.4.3.7　吐温 80（过滤除菌）。

7.4.4　试验准备

7.4.4.1　测试棉布的制备

将大约 300 g 测试棉布加入 3 L 洗涤液（7.4.3.5），加热煮沸 1 h。取出棉布，在煮沸的去离子水中清洗 5 min。然后放入凉的去离子水中 5 min，以去除残留的洗涤液，最后将棉布晾干。

7.4.4.2　测试棉布和转动支架的准备

取处理过的棉布，剪成 5 cm 宽，质量为（15±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℃压力蒸汽灭菌 15 min，备用。

7.4.4.3　细菌悬液的制备

用 PBS 液将试验菌悬液（7.2.2.5）稀释，要求浓度为 1×10^8 CFU/mL～5×10^8 CFU/mL，然后加入等体积的牛血清白蛋白溶液（3%）。

7.4.4.4　染菌载体的制备

每片载体布片（7.4.2.11）接种 20 μL 菌悬液，放回培养皿中，加盖，于（36±1）℃培养箱中干燥 20 min。

7.4.4.5　测试样品的制备

试验开始前 20 min，将盛有 265 mL 硬水的玻璃罐放入水浴中恒温至测试温度（25±1）℃的玻璃罐，然后将被测试样品按规定的浓度（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一致。

7.4.5　杀菌或抑菌试验操作步骤

7.4.5.1　将 2 片染菌载体（7.4.4.4）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。
7.4.5.2　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。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。

7.4.5.3　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 30 mL 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 30 mL 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 10 s，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 TSA 平板，每个稀释度接种 2 个平板。
7.4.5.4　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。
7.4.5.5　菌数对照组：将 3 片染菌载体加入含有 30 mL 0.5%吐温 80 的 PBS 试管中，在振荡器振荡 20 s，然后振打 200 次，用 PBS 做 10 倍系列稀释，并取适宜稀释度样液 1.0 mL，以倾注法接种 TSA 平板，每个稀释度接种 2 个平板。
7.4.5.6　将试验组、对照组及菌数对照组平板倒置于（36±1）℃培养箱中，培养（48±2）h，计数菌落数。
7.4.5.7　试验重复 3 次，求其算术平均值。

7.4.6　计算公式

杀菌率和抑菌率分别按公式（2）和公式（9）计算，结果以百分数（%）表示，保留2位小数。

7.4.7　产品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　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

7.5.2.1　刻度吸管（1.0 mL、5.0 mL）。
7.5.2.2　抑菌剂载体（5 mm 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 2 h，保存备用）。
7.5.2.3　电动混合器。
7.5.2.4　微量移液器（5 μL～50 μL，可调式）。
7.5.2.5　游标卡尺。

7.5.3　试剂

7.5.3.1　营养琼脂（7.2.2.1）。
7.5.3.2　设备菌悬液（7.2.2.5）。

7.5.4　抑菌试验操作步骤

7.5.4.1　抑菌片的制备

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20 μL，然后将滤纸片平放于清洁的无菌平皿内，开盖置恒温箱（36±1）℃中烘干，或置室温下自然干燥后备用。固体抑菌试验样品，直接制成直径为5 mm，厚度不超过4 mm圆片（块）备用。

7.5.4.2　对照样的制备

液体抑菌试验样品，取无菌干燥滤纸片，每片滴加无菌蒸馏水20 μL，干燥后备用。固体抑菌试验样品，取同种材质不含抑菌成分的样本，制成与试验组大小相同的圆片（块）备用。

7.5.4.3　试验菌的接种

用无菌棉拭子蘸取浓度为1×10^5 CFU/mL～9×10^5 CFU/mL试验菌悬液，在营养琼脂培养基平板表面均匀涂沫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5 min。

7.5.4.4　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25 mm以上，与平板的周缘相距15 mm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（36±1）℃恒温箱，培养16 h～18 h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　产品抑菌效果评价

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

7.5.6　注意事项

7.5.6.1　每次试验均应设置对照组，不应省略。在报告中亦应将对照组的结果列出。
7.5.6.2　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，抑菌环则可能减小。
7.5.6.3　应保持琼脂浓度的准确性，同时培养皿中倾倒琼脂量为 15 mL～20 mL，否则可能影响抑菌环的大小。
7.5.6.4　培养时间不应超过 18 h。培养过久，部分细菌可能恢复生长，抑菌环变小。
7.5.6.5　抑菌环直径可能受抑菌剂的量、抑菌性能和干湿度影响。故抑菌片应在试验当天制备。

7.6　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

7.6.2.1　恒温箱。
7.6.2.2　金属筒（直径 2.2 cm、高度 3 cm）。
7.6.2.3　一次性接种环（直径 4 mm）。
7.6.2.4　小塑料碗（直径 2.2 cm，高 2.5 mm）。
7.6.2.5　胶带。
7.6.2.6　尼龙刮菌棒。
7.6.2.7　玻璃弯棒。

7.6.3 试剂

7.6.3.1 培养基（商品化的合格市售培养基）：胰蛋白胨大豆肉汤培养基（TSB）、胰蛋白胨大豆琼脂培养基（TSA）。
7.6.3.2 0.03 mol/L 的磷酸盐缓冲液（同 7.2.2.3）。
7.6.3.3 70%～75%酒精。
7.6.3.4 羊血。
7.6.3.5 脂肪醇聚氧乙烯醚。
7.6.3.6 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，一个为按规定的作用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

7.6.5.1 调整阶段

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

7.6.5.2 清洗阶段

清洗阶段共 3 d，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：

a） 先清洗左臂，用流动水（水温应保持在 35℃～37℃）打湿前臂内侧；
b） 用样品从手腕至臂肘上下摩擦 15 s；
c） 用手在涂有样品的手臂上上下摩擦泡沫 45 s；
d） 用流动的清水冲洗前臂 15 s，不应搓擦；
e） 用纸巾沾干前臂，不应搓擦；
f） 重复 a）～e）步骤清洗右臂；
g） 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 1 h，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，受试者不应洗澡、沐浴或洗净前臂，直到试验结束。清洗前后每组试样的质量及受试者完成清洗的情况，应记录。

7.6.5.3 试验阶段

清洗阶段的第 4 天（最后一次清洗后的 12 h～24 h 内），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：

a） 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内汤培养基（TSB）中，在（36±1）℃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 1×10^8 CFU/mL～5×10^8 CFU/mL。
b） 细菌接种。在受试者的每只前臂中间部位（不应在手腕和肘皱褶处），用带有印墨直径为 3.0 cm 的玻璃量筒扣在皮肤上，划分出一个试验区。使用加样器取 10 μL 上述菌悬液，接种于前臂试验区，菌数为 1×10^6 CFU/试验区～5×10^6 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 4 mm～5 mm 的距离。
c） 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。

d） 回收存活细菌。接种 2 h±5 min 后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，不应接触到盖有印墨的边缘。将 1 mL 含 0.1%脂肪醇聚氧乙烯醚（AEO_9）的 0.03 mol/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 60 s，将筒内液体吸移至试管内，再加 1 mL 含 0.1% AEO_9 的 0.03 mol/L 磷酸盐缓冲液，对该区域内的皮肤进行第 2 次刮洗 30 s，将第 2 次擦洗的液体，注入含第 1 次刮洗液体的试管中。

e） 试验区试验后的消毒处理。一个试验区采样之后，应用 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。

f） 平皿接种与培养。对每一个取样进行平皿接种，以 0.03 mol/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 0.1 mL 接种于 2 个含 5%羊血的 TSA 平皿表面，用玻璃弯棒涂匀，在（36±1）℃的培养箱中培养（48±2）h，计数菌落数。

7.6.6 计算公式

抑菌率按公式（9）计算，结果以百分数（%）表示，保留2位小数。

7.6.7 产品抑菌效果评价

同7.3.6。

7.6.8 试验要求

7.6.8.1 试验人次

不应少于 16 人次。

7.6.8.2 受试者录用标准

受试者录用标准如下：

a） 年龄介于 18 岁至 65 岁的男性或女性的身体健康者；

b） 前臂应完好无损且没有皮肤病及其他皮肤问题；

c） 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抗生素；

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

7.6.8.3 排除受试者的标准

排除受试者的标准如下：

a） 同时参加另外一个临床试验；

b） 在过去的 14 d 中，参加过任何一种形式的关于清洁手或手臂的试验；

c） 对香皂、去污剂、香水或青霉素过敏；

d） 怀孕妇女；

e） 诊断患有糖尿病、肝炎、艾滋病（HIV 阳性）、器官移植者。

7.6.8.4 其他试验限制

7.6.8.4.1 受试者不应使用其他清洁用品。

7.6.8.4.2　受试者避免洗热水盆浴和游泳。
7.6.8.4.3　受试者避免接触未干的油漆、涂料或者其他溶剂。
7.6.8.4.4　受试者避免在手腕处和前臂上喷洒香水。

7.6.8.5　试验后检查

在试验完成后的 48 h～72 h 内，应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尽快通知检验单位。

7.7　持续抑菌效果检验方法（体外模拟法，适用于皂类产品）

7.7.1　设备

7.7.1.1　生物安全柜。
7.7.1.2　恒温培养箱。
7.7.1.3　水浴锅。
7.7.1.4　移液器。
7.7.1.5　无菌剪刀或者刀片，镊子。
7.7.1.6　250 mL 带盖无菌瓶子。

7.7.2　试剂和材料

7.7.2.1　测试样品及对照样品

测试样品为含有抗/抑菌活性成分的皂类，对照样品为同配方同工艺但仅不添加抗/抑菌成分的皂类。也可选用以下配方的脂肪酸钠皂为对照参比样品。

对照参比皂制作：以脂肪酸配比氢氧化钠碱液经酸碱中和反应制成块状参比皂。所用试剂材料为工业级及以上纯度。按照 7 份 C_{12} 脂肪酸（月桂酸），35 份 C_{16} 脂肪酸（棕榈酸），3 份 C_{18} 脂肪酸（硬脂酸），30 份油酸（符合 QB/T 2153 中高纯油酸型），10 份水，3 份甘油，及按酸碱摩尔比（1∶1.01）配比氢氧化钠进行反应。反应完成后，干燥除水至总水份 5%～15%，继而制作成皂。pH 介于 10.0～10.5（1%参比皂溶液 25℃）。制备完成后，成皂置于密实袋中 25℃室温存放或 4℃冷藏，1 年以内使用。

测试样品与对照样品三维尺寸应相同，因此测试前应将两者裁成相同大小，如 62 mm×37 mm×16 mm 或其他合适的尺寸。

7.7.2.2　去毛后的无菌猪皮或其他动物皮

猪皮或其他动物皮应经物理方法进行无菌处理（非高温灭菌或化学处理，可采用钴 60 辐射灭菌），每个批次的猪皮在使用前应抽样进行无菌检查。经检验合格，猪皮置于−20℃冰箱储存。在每次试验前，猪皮应先进行解冻，解冻后的无菌猪皮 pH 约为 7.0～8.0。

7.7.2.3　培养基（商品化的合格市售培养基）

细菌活化培养基：胰蛋白胨大豆肉汤培养基（TSB）、胰蛋白胨大豆琼脂培养基（TSA）。

中和剂及细菌回收：含共计 1.5%吐温 80，1%卵磷脂的改良 Letheen 肉汤培养基（MLBTL）。

计数培养基：含共计 1.5%吐温 80 的改良 Letheen 琼脂培养基（MLAT）。

7.7.3　抑菌试验操作步骤

7.7.3.1　菌种选择

以金黄色葡萄球菌（ATCC 6538）作为代表菌进行测试。

7.7.3.2 菌种准备

7.7.3.2.1 第一天，将传代次数不超过 5 代的待测菌种在合适的培养基如胰蛋白胨大豆琼脂培养基（TSA）上划线，经（36±1）℃培养 18 h～24 h。
7.7.3.2.2 第二天，从上述平板上挑取一个单菌落接种到含 30 mL 胰蛋白胨大豆肉汤培养基（TSB）的 50 mL 无菌容器中，经（36±1）℃静置培养 18 h～24 h。
7.7.3.2.3 第三天，吸取 7.7.3.2.2 中的培养液按 1∶50 稀释到胰蛋白胨大豆肉汤培养基（TSB），经（36±1）℃ 200 r/min 振荡培养 2.5 h±15 min。

7.7.3.3 产品清洗流程

7.7.3.3.1 调节水温为（35±2）℃且水速为（4.0±0.3）L/min，并保证整个清洗过程水温和水速符合上述要求。水系统应安装除菌处理，并达到不大于 100 CFU/mL 的要求。
7.7.3.3.2 将约 7.5 cm×10 cm 大小的无菌猪皮有毛孔的正面朝上，放置在一个硬质的平板上，固定住猪皮的一端。
7.7.3.3.3 用水冲洗猪皮固定端，左右移动平板，依靠水的自然下流冲洗猪皮 15 s。保持猪皮和水流的夹角大约为 120°，且出水处距离猪皮顶端的垂直距离保持在 5 cm～7 cm。
7.7.3.3.4 将冲洗过的猪皮放在水平位置，用润湿的香皂涂擦猪皮 15 s，保证涂抹均匀完整。
7.7.3.3.5 放下产品，揉搓猪皮 45 s，保持各个部位揉搓的均一性。
7.7.3.3.6 冲洗猪皮 15 s，冲洗方法与步骤 7.7.3.3.3 相同。
7.7.3.3.7 用纸巾将猪皮上的水蘸干（不应搓擦，只可用纸巾轻轻拍打猪皮即可）将猪皮放置在平板上静置晾干 1 min。
7.7.3.3.8 重复步骤 7.7.3.3.1～7.7.3.3.7 共 9 次以模拟长期使用的效果。在最后一次重复完成步骤 7.7.3.3.7 之后，将猪皮从硬质平板上取下，冲洗猪皮的背面以除去泡沫，大约 2 s。冲洗过程中避免污染猪皮正面。冲洗后，将猪皮置于干燥纸巾上，猪皮正面朝上。用纸巾轻拭以除去猪皮上残留水珠。
7.7.3.3.9 在生物安全柜中，用无菌剪刀或者刀片将产品洗过的猪皮剪出 6 块大小均一的小块猪皮，每块为 2.0 cm×2.5 cm。

7.7.3.4 微生物的接种

7.7.3.4.1 在每块猪皮上接种 10 μL 菌液（步骤 7.7.3.2）。用一次性接种环或者枪头将菌液在猪皮上涂抹均匀，避免接触猪皮边缘部位。每块猪皮应使用新的接菌环或者枪头。
7.7.3.4.2 将猪皮放置在生物安全柜中 5 min～20 min，待菌液晾干。

7.7.3.5 菌种收集和培养计数

7.7.3.5.1 将接种后的猪皮置于培养皿并置入密实袋，放入（36±1）℃，60%～80%湿度的培养箱中。其中 3 块小皮的菌应在完成 7.7.3.4 步骤后立即洗脱以计算初始接种菌浓度作为质量把控点（要求每块小猪皮上的菌落回收数，应为 5×10^5 CFU/块～5×10^6 CFU/块），另外 3 块小皮的收集时间为种菌之后指定的抑菌时间（根据测定要求确定具体的收集菌的时间间隔，如选择在种菌之后 4 h 或者 12 h 或者 24 h 等）。
7.7.3.5.2 在特定的收集时间点将每块猪皮放入含有 50 mL MLBTL 的无菌带盖瓶中。
7.7.3.5.3 以均匀频率用力充分摇晃含有猪皮的无菌带盖瓶 1 min。
7.7.3.5.4 用 MLBTL 对上述 50 mL 洗脱液进行 10 倍系列稀释。在每个稀释梯度各取 0.5 mL 到两个无菌培养皿中，然后再倒入约 15 mL～20 mL 的 MLAT 培养基，晃动培养皿使稀释液和培养基混合均匀。等待培养基完全凝固之后，将培养皿倒置放入培养箱中培养 24 h～48 h。

7.7.3.5.5　培养完成之后，取出平板计数。每个平板上菌落数在 25 CFU/个～250 CFU/个范围内为最佳，计算得出每块皮上的菌数。

7.7.4　数据有效性检验

试验每天进行1次，至少重复5次，每次每种产品在3个小皮的菌落回收平均数值记为1次独立重复的结果。以独立重复结果的对数值做测试样品和对照样品的方差F检验和结果的t检验。

F检验取显著性水平取p不大于0.1（双侧检验），评定测试样品与对照样品各自重复检验结果的方差是否存在显著性差异，当存在显著性差异，试验需要重新进行。

t检验取显著性水平取p不大于0.05（双侧检验），评价测试样品与对照样品抑菌性能是否存在差异，给出结论。当两组样品结果存在显著性差异时，按7.7.5进一步做持续抑菌效果评价。

附录A给出了统计检验过程，供应用参考。

7.7.5　持续抑菌效果评价

测试样品的持续抑菌效果Y_t按公式（10）计算，结果以百分数（%）表示，保留两位小数。当Y_t不小于50%时，可认为测试样品在该实验时间内对所测试的菌种有抑菌效果。

$$Y_t = \frac{I - II}{I} \times 100\% \qquad \cdots\cdots（10）$$

式中：

Y_t——持续抑菌率，其中下标t为持续抑菌时间；

I——对照样品平均菌落数，单位为每毫升菌落形成单位（CFU/mL）；

II——试验样品平均菌落数，单位为每毫升菌落形成单位（CFU/mL）。

7.8　抗菌型日化产品的杀菌效果检验方法（载体浸泡定量法）

7.8.1　设备

同7.2.1。

7.8.2　试剂

同7.2.2。

7.8.3　染菌载体制备

白平纹棉布片于染菌前，应进行脱脂处理。脱脂方法如下：将载体放在含洗涤剂的水中煮沸 30 min 以自来水洗净，再用蒸馏水煮沸 10 min 用蒸馏水漂洗至 pH 呈中性。晾干、熨平后裁剪成 20 mm×30 mm 的布片经压力蒸汽灭菌烤干后，平铺于无菌平皿内。用 PBS 将试验菌悬液（7.2.2.5）稀释至约 5×10^6 CFU/mL～5×10^7 CFU/mL 制成试验菌悬液备用。用微量移液器滴染 10 μL 菌悬液于灭菌载体上，滴染菌液后，染菌载体可置（36±1）℃恒温箱内烘干或室温晾干备用。要求每个菌片的回收菌数，按活菌培养计数所得结果，应为 1×10^4 CFU/片～9×10^4 CFU/片。

7.8.4　中和剂鉴定试验

7.8.4.1　试验分组

试验分为以下 4 组：

a）　第 1 组：5.0 mL 中和剂+染菌载体→培养；

b） 第 2 组：（含试样的载体+5.0 mL 中和剂）+染菌载体→培养；
c） 第 3 组：5.0 mL 稀释液+染菌载体→培养；
d） 第 4 组：稀释液+中和剂+培养基→培养。

7.8.4.2 试验步骤

7.8.4.2.1 根据试验分组，准备试管和平皿，依次进行编号。
7.8.4.2.2 第 1 组：取 5.0 mL 中和剂于无菌平皿中，置（20±1）℃水浴 5 min，加入 1 片染菌载体，作用 10 min，用无菌镊子取出菌片放入 5.0 mL 中和剂试管内，作用 10 min，置涡旋振荡器上振荡 1 min 或在手掌上用力振打 80 次，将试验菌洗下，用中和剂做 10 倍系列稀释后，选择适宜稀释度，分别吸取 1.0 mL 接种于 2 个平皿中，做活菌培养计数。
7.8.4.2.3 第 2 组：取 5.0 mL 中和产物（以一片浸有抗菌样品的载体置 5.0 mL 中和剂内，作用 10 min）于无菌平皿中，置（20±1）℃水浴 5 min，加入 1 片染菌载体，作用 10 min，用无菌镊子取出染菌载体移入含 5.0 mL 中和产物试管内，作用 10 min，置涡旋振荡器上振荡 1 min 或在手掌上用力振打 80 次，将试验菌洗下，用中和产物做 10 倍系列稀释后，选择适宜稀释度，分别吸取 1.0 mL 接种于 2 个平皿中，做活菌培养计数。
7.8.4.2.4 第 3 组：取 5.0 mL PBS 于无菌平皿中，置（20±1）℃水浴 5 min，加入 1 片染菌载体，作用 10 min，取出菌片放入 5.0 mL PBS 试管内，作用 10 min 后，置涡旋振荡器上振荡 1 min 或在手掌上用力振打 80 次，将试验菌洗下，用 PBS 做 10 倍系列稀释，选适宜稀释度分别吸取 1.0 mL 接种于 2 个平皿中，做活菌培养计数。
7.8.4.2.5 第 4 组：分别吸取稀释液（PBS）与中和剂各 1.0 mL 于同一无菌平皿内，倒入同批次的培养基 15 mL～20 mL，培养观察。

7.8.4.3 结果判定

7.8.4.3.1 第 1、2、3 组菌数相似，回收菌量在 1×10^4 CFU/片～9×10^4 CFU/片，并且其组间误差率不大于 15%。第 1、2、3 组间菌落数误差率按公式（11）计算：

$$E=\frac{\sum_{i=1}^{3}|V-v|}{3\times v}\times100\% \qquad \cdots\cdots（11）$$

式中：
E——组间菌落数误差率；
V——三组间菌落平均数，单位为每毫升菌落形成单位（CFU/mL）；
v——各组菌落平均数，单位为每毫升菌落形成单位（CFU/mL）。
7.8.4.3.2 第 4 组无菌生长。
7.8.4.3.3 连续 3 次试验取得合格评价。

7.8.5 杀菌试验操作步骤

7.8.5.1 将试验样品用无菌标准硬水稀释至规定的浓度（皂类产品用蒸馏水稀释）。
7.8.5.2 按 5 mL（g）/片的量称取试验样品原液或其稀释液于无菌平皿内，置（20±1）℃水浴 5 min［皂类产品（30±1）℃］，用无菌镊子取染菌载体，使载体完全浸没于抗菌样品中，立即计时。
7.8.5.3 作用至设定时间后，取染菌载体加入到含 5.0 mL 中和剂试管中，混匀。
7.8.5.4 中和 10 min 后，置涡旋振荡器上振荡 1 min 或在手掌上用力振打 80 次，将试验菌洗下，吸取样液（或作适当稀释后，取其中 2～3 个稀释度的稀释液）1 mL，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）15 mL～20 mL 作倾注，转动平皿，使其充分均匀，琼脂凝固后翻转平皿，（36±1）℃培养（48±2）h（细菌）或（72±3）h（白色念珠菌）后，做活菌菌落计数。

7.8.5.5　以 PBS 代替试验样品，同时按以上步骤操作，作为对照样品。

7.8.5.6　试验重复 3 次，求其算术平均值。

7.8.6　计算公式

杀菌率按公式（12）计算，结果以百分数（%）表示，保留两位小数：

$$S_z = \frac{I - II}{I} \times 100\% \qquad \cdots\cdots（12）$$

式中：

S_z——载体法杀菌率；

I——对照样品平均菌落数，单位为菌落形成单位每片（CFU/片）；

II——试验样品平均菌落数，单位为菌落形成单位每片（CFU/片）。

7.8.7　误差评价

同7.2.6。

7.8.8　产品抗菌效果评价

同7.2.7。

7.9　抑菌型日化产品的抑菌效果检验方法（载体浸泡定量法）

7.9.1　设备

同7.2.1。

7.9.2　试剂

同7.2.2。

7.9.3　染菌载体制备

同7.8.3。

7.9.4　抑菌试验操作步骤

7.9.4.1　将试验样品用无菌标准硬水稀释至规定的浓度（皂类产品用蒸馏水稀释）。

7.9.4.2　按 5 mL（g）/片的量称取试验样品原液或其稀释液于无菌平皿内，置（20±1）℃水浴 5 min［皂类产品（30±1）℃］，用无菌镊子取染菌载体，使载体完全浸没于抑菌样品中，立即计时。

7.9.4.3　作用至设定时间后，取染菌载体加入到含 5.0 mL PBS 试管中，混匀。

7.9.4.4　置涡旋振荡器上振荡 1 min 或在手掌上用力振打 80 次，将试验菌洗下，吸取样液（或作适当稀释后，取其中 2～3 个稀释度的稀释液）1 mL，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）15 mL～20 mL 作倾注，转动平皿，使其充分均匀，琼脂凝固后翻转平皿，（36±1）℃培养（48±2）h（细菌）或（72±3）h（白色念珠菌）后，做活菌菌落计数。

7.9.4.5　以 PBS 代替试验样品，同时按以上步骤操作，作为对照样品。

7.9.4.6　试验重复 3 次，求其算术平均值。

7.9.5 计算公式

抑菌率按公式（13）计算，结果以百分数（%）表示，保留两位小数：

$$Y_z = \frac{I - II}{I} \times 100\% \qquad \cdots\cdots（13）$$

式中：

Y_z——载体法抑菌率；

I——对照样品平均菌落数，单位为菌落形成单位每片（CFU/片）；

II——试验样品平均菌落数，单位为菌落形成单位每片（CFU/片）。

7.9.6 误差评价

同7.2.6。

7.9.7 产品抑菌效果评价

同7.3.6。

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℃）下按产品使用说明规定的时间抽样进行杀菌或抑菌性能测定。

8.1.2 加速试验：将原包装样品置（54±2）℃恒温箱内 14 d 或（37±2）℃恒温箱内 90 d 或 40℃～45℃恒温箱内 180 d 或者 40℃～45℃恒温箱内 270 d，进行杀菌或抑菌性能测试。

8.2 检验方法

采用表 2 中相对应的方法。

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然留样时间。

8.3.2 产品经（54±2）℃恒温箱内放置 14 d 的加速试验，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一年。

8.3.3 产品经（37±2）℃恒温箱内放置 90 d 的加速试验，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二年。

8.3.4 产品经 40℃～45℃恒温箱内 180 d 或者 35℃～40℃恒温箱内 270 d 的加速试验，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三年。

附　录　A
（资料性）
统计检验示例

A.1　检验原理

采用 t 检验判别两个样本平均数与其各自所代表的总体的差异是否显著：

a）　两个样本检验结果核查：

按公式（A.1）计算统计量 F：

$$F=\frac{s_1^2}{s_2^2} \qquad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots（A.1）$$

式中：

s_1^2、s_2^2——2 个样本检测结果的方差，这里 $s_1^2 \geqslant s_2^2$；

取显著性水平 p=0.1，进行双侧的 F 统计检验。当公式（A.1）计算统计量 F 大于限值要求时，表明两个样本检测结果方差存在显著性差异，两组试验结果不可比，应重新进行试验。

b）　两个样本是否存在显著性差异的 t 检验：

在 F 检验无显著性差异时，按公式（A.2）计算统计量 t：

$$t=\frac{|\bar{x}-\bar{y}|}{\sqrt{\frac{(n_1-1)s_1^2+(n_2-1)s_2^2}{n_1+n_2}\left(\frac{1}{n_1}+\frac{1}{n_2}\right)}} \qquad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots（A.2）$$

式中：

$\bar{x}$、$\bar{y}$——2 个样本检测结果的算术平均值；

s_1^2、s_2^2——2 个样本检测结果的方差；

n_1、n_2——2 个样本容量。

取显著性水平 p=0.05，进行双侧的 t 统计检验。当公式（A.2）计算统计量 t 不大于限值要求时，表明两个样本检测结果无显著性差异，两个样本性能相当；当公式（A.2）计算统计量 t 大于限值要求时，表明两个样本检测结果存在显著性差异，两个样本性能不同。

A.2　应用实例

A.2.1　实测数据汇总

表 A.1 给出实测数据汇总实例。

表 A.1　测试数据汇总表

样　本	实验重复次数（n）	实测结果	各次实测结果的均值
测试样本	第一次	x_1　x_2　x_3　…	$\bar{x}_1$
	第二次	x_1　x_2　x_3　…	$\bar{x}_2$
	第三次	x_1　x_2　x_3　…	$\bar{x}_3$
	第四次	x_1　x_2　x_3　…	$\bar{x}_4$
	第五次	x_1　x_2　x_3　…	$\bar{x}_5$
	…	…	…
	平　均	——	$\bar{x}$
	结果方差	——	$s_{实}^2$

表 A.1（续）

样　本	实验重复次数（n）	实测结果	各次实测结果的均值
对照样本	第一次	y_1　y_2　y_3　…	$\bar{y}_1$
	第二次	y_1　y_2　y_3　…	$\bar{y}_2$
	第三次	y_1　y_2　y_3　…	$\bar{y}_3$
	第四次	y_1　y_2　y_3　…	$\bar{y}_4$
	第五次	y_1　y_2　y_3　…	$\bar{y}_5$
	…	…	…
	平　均	——	$\bar{y}$
	结果方差	——	$s_{对}^2$
注：实测结果取菌落回收数（CFU）的对数值进行计算和统计检验。			

A.2.2　检验结果核查

根据测试样本与对照样本的重复试验次数，对检验结果进行显著性水平 p=0.1 下的双侧 F 统计检验。将表 A.1 中测试样本和对照样本的检验结果方差 $s_{实}^2$、$s_{对}^2$ 按大小不同分别代入公式（A.1）计算 F 值，与表 A.2 中给出的对应检验限值 F（f_1，f_2）比较，当大于限值时，应重新进行试验。小于限值时进行 A.2.3 的 t 检验。

表 A.2　F 分布表（显著性水平 p=0.05，单尾）

F（f_1，f_2）		$f_1=n_1-1$				
		3	4	5	6	7
$f_2=n_2-2$	3	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89
	4	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09
	5	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88
	6	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21
	7	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79
注：表中 f_1、f_2 分别为测试样本和对照样本的自由度，n_1、n_2 为分别为测试样本和对照样本的样本容量（即试验重复次数），其中试验结果方差大的以数字下标 1 代表，方差小的以数字下标 2 代表。						

A.2.3　t 检验

根据测试样本与对照样本的重复试验次数，取显著性水平 p=0.05，进行双侧的统计检验。将表 A.1 中测试样本和对照样本的检测结果的平均值 $\bar{x}$、$\bar{y}$，结果方差 $s_{实}^2$、$s_{对}^2$，以及重复实验次数 $n_{实}$、$n_{对}$ 代入公式（A.1）计算 t 值。将 t 值与对应的合并自由度 f 下表 A.3 中检验限值 t_f 作比较。

表 A.3　t_f 分布表（显著性水平 p=0.05，双尾）

f	6	7	8	9	10	11	12	13	14
α	2.45	2.37	2.31	2.26	2.23	2.20	2.18	2.16	2.15
注：表中 f 为自由度，$f=n_{实}+n_{对}-2$。									

当 t 值不大于限值时，表明两检测结果无显著性差异，测试样品与对照样品抑菌效果没有差异。

当 t 值大于限值时，表明两检测结果有显著性差异，测试样品与对照样品抑菌效果有差异。

A.3 其他

统计检验已有成熟的计算软件，可使用各种计算软件，对检测结果进行 F 检验和 t 检验，判定结果的有效性。

参 考 文 献

[1]《消毒技术规范》（2002 年版）（国家卫生健康委）