ICS 11.080
CCS C 59

WS

中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 10009—2023

消毒产品检测方法

Test methods of disinfection products

2023－12－15 发布　　2024－05－01 实施

国家疾病预防控制局　　发布

目　　次

前　　言 III
1 范围 1
2 规范性引用文件 1
3 术语和定义 2
4 基本要求 4
4.1 实验室要求 4
4.2 人员要求 5
4.3 消毒效果检测要求 5
4.4 理化检测要求 7
4.5 毒理学评价要求 8
4.6 检测记录要求 11
4.7 检测报告要求 12
4.8 消毒效果评价要求 12
5 消毒效果检测与评价方法 12
5.1 消毒剂消毒与灭菌效果验证试验 12
5.2 消毒剂模拟现场和现场消毒与灭菌效果鉴定试验 44
5.3 空气消毒效果鉴定试验 63
5.4 水消毒效果评价试验 69
5.5 消毒器械（含灭菌器械）鉴定试验 73
5.6 消毒与灭菌指示物鉴定试验 102
5.7 灭菌医疗用品包装材料鉴定试验 121
5.8 抗（抑）菌产品鉴定试验 127
6 理化检测技术 127
6.1 消毒产品原料或单方制剂的测定方法 127
6.2 复方消毒剂有效成分含量测定的指导原则 186
6.3 pH 值的测定 186
6.4 氧化还原电位（ORP）的测定 187
6.5 铅的测定 187
6.6 砷的测定 188
6.7 汞的测定 190
6.8 消毒剂稳定性测定 190
6.9 消毒剂对金属腐蚀性的测定 193
7 毒理学试验方法 197
7.1 急性经口毒性试验 197
7.2 急性吸入毒性试验 205
7.3 皮肤刺激试验 206
7.4 急性眼刺激试验 208
7.5 阴道黏膜刺激试验 210
7.6 皮肤变态反应试验 212
7.7 亚急性经口毒性试验 214

7.8 致突变试验 215
7.9 亚慢性毒性试验 227
7.10 致畸试验 228
7.11 慢性毒性试验 230
7.12 致癌试验 231
附录A（资料性） 试剂和培养基配方 234
附录B（资料性） 抗（抑）菌产品鉴定试验 239

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。

本文件由国家疾病预防控制局提出并归口。

本文件起草单位：中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所、江苏省疾病预防控制中心、解放军疾病预防控制中心、北京市疾病预防控制中心、上海市疾病预防控制中心、浙江省疾病预防控制中心、广东省疾病预防控制中心、山东省疾病预防控制中心、湖北省疾病预防控制中心、广州海关技术中心。

本文件主要起草人：沈瑾、李涛、王佳奇、徐燕、魏秋华、于礼、朱仁义、魏兰芬、钟昱文、张剑、崔树玉、廖如燕、曾其莉、李新武、张流波。

消毒产品检测方法

1 范围

本文件规定了消毒产品的检测方法，包括基本要求、消毒效果检测与评价方法、理化检测技术和毒理学试验方法。

本文件适用于评价消毒相关产品安全性和有效性的检测，以及与检测活动相关的实验条件的控制。

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/T 601 化学试剂 标准滴定溶液的制备

GB/T 700 碳素结构钢

GB/T 1173 铸造铝合金

GB/T 1175 铸造锌合金

GB/T 1176 铸造铜及铜合金

GB/T 1220 不锈钢棒

GB/T 2481.1 固结磨具用磨料 粒度组成的检测和标记 第1部分:粗磨粒 F4～F220

GB/T 5750 生活饮用水标准检验方法

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 9985 手洗餐具用洗涤剂

GB/T 10682 双端荧光灯 性能要求

GB 14925 实验动物 环境及设施

GB 15979 一次性使用卫生用品卫生标准

GB/T 17262 单端荧光灯 性能要求

GB 17625.1 电磁兼容 限值 第1部分：谐波电流发射限值（设备每相输入电流≤16A）

GB/T 17743 电气照明和类似设备的无线电骚扰特性的限值和测量方法

GB/T 18204.9 游泳池水微生物检验方法 细菌总数测定

GB/T 18204.10 游泳池水微生物检验方法 大肠菌群测定

GB 18278.1 医疗保健产品灭菌 湿热 第1部分：医疗器械灭菌过程的开发、确认和常规控制要求

GB 18281.3 医疗保健产品灭菌 生物指示物 第3部分：湿热灭菌用生物指示物

GB 18281.5 医疗保健产品灭菌 生物指示物 第5部分：低温蒸汽甲醛灭菌用生物指示物

GB 18282.3 医疗保健产品灭菌 化学指示物 第3部分：用于BD类蒸汽渗透测试的二类指示物系统

GB 18282.4 医疗保健产品灭菌 化学指示物 第4部分：用于替代性BD类蒸汽渗透测试的二类指示物

GB 18282.5 医疗保健产品灭菌 化学指示物 第5部分：用于BD类空气排除测试的二类指示物

GB 18466 医疗机构水污染物排放标准

GB 19489 实验室生物安全通用要求

GB 19510.1 灯的控制装置 第1部分：一般要求和安全要求

GB/T 19633.1 最终灭菌医疗器械包装 第1部分：材料、无菌屏障系统和包装系统的要求

GB/T 24628 医疗保健产品灭菌 生物与化学指示物 测试设备

GB 27951 皮肤消毒剂卫生要求

GB/T 30690 小型压力蒸汽灭菌器灭菌效果监测方法和评价要求

GB/T 33417 过氧化氢气体灭菌生物指示物检验方法

GB/T 38499 消毒剂稳定性评价方法

WS 233 病原微生物实验室生物安全通用准则

WS/T 466 消毒专业名词术语

WS/T 647 溶葡萄球菌酶和溶菌酶消毒剂卫生要求

WS/T 649 医用低温蒸汽甲醛灭菌器卫生要求

中华人民共和国药典（2020年版）

化妆品安全技术规范（2015年版）

实验动物管理条例（2017年版）

生活饮用水消毒剂和消毒设备卫生安全评价规范（试行） 中华人民共和国卫生部（卫监督发〔2005〕336号）

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

中和剂 neutralizer

在杀灭微生物试验中，用以消除试验微生物与消毒剂混悬液中及微生物表面上残留的消毒剂，使其失去对微生物抑制和杀灭作用的试剂。

[来源：WS/T 466-2014,4.51]

3.2

中和产物 product of neutralization

中和剂（3.1）与消毒剂作用后的产物。

[来源：WS/T 466-2014,4.50]

3.3

菌落形成单位 colony forming unit；CFU

微生物在固体培养基上生长繁殖所形成的肉眼可见的集落。

[来源：WS/T 466-2014,4.10]

3.4

自然菌 natural bacteria

自然存在于消毒对象上的、非人工污染的细菌。

[来源：WS/T 466-2014,4.59]

3.5

杀灭对数值 killing log value；KL

在杀灭微生物试验中，当微生物数量以对数表示时，消毒前后微生物减少的值。

[来源：WS/T 466-2014,4.26]

3.6

杀灭率 killing rate；KR

在杀灭微生物试验中，用百分率表示的微生物数量减少的值。

[来源：WS/T 466-2014,4.27]

3.7

无菌保证水平 sterility assurance level；SAL

灭菌后物品上存在单个活微生物的概率，通常表示为10^{-n}。

注：本文件规定为10^{-6}，即经灭菌处理后，每件物品中有菌生长的概率是$1/10^{6}$。

[来源：WS/T 466-2014,4.36]

3.8

无菌检验 test of sterility

为确定单元产品或其部分上有无活微生物而进行的检验。

[来源：WS/T 466-2014,4.37]

3.9

载体 carrier

试验微生物的支持物。

3.10

满载 fully loaded

消毒器械使用时，按厂家说明书规定方式摆放的最高装载量。

3.11

化学指示物 chemical indicator

根据暴露于某种灭菌（消毒）程序所产生的化学或物理变化，在一个或者多个预定程序参数上显现变化的指示器材。

[来源：WS/T 466-2014,5.13]

3.12

生物指示物 biological indicator

对特定的灭菌或消毒程序有确定的抗力，可供消毒灭菌效果监测使用的微生物检验器材。

[来源：WS/T 466-2014,5.24]

3.13

暴露时间 exposed time

在规定的剂量和条件下，消毒因子和消毒处理的物品有效接触的时间。

[来源：WS/T 466-2014,5.2]

3.14

灭菌过程挑战装置 process challenge device；PCD

专门设计的模拟被灭菌物品，对灭菌过程有特定抗力，用于评价该灭菌过程有效性的装置。

[来源：WS/T 466-2014,4.13]

3.15

标定值 stated value；SV

当指示物变化达到指示物制造商定义的终点时，过程关键变量的值或值的范围。。

3.16

有效氯 available chlorine

与含氯消毒剂氧化能力相当的氯量（非消毒剂所含氯量），是衡量含氯消毒剂氧化能力的指标。

3.17

存活时间 survival time；ST

生物指示物在特定条件下暴露于杀菌因子后，微生物存活的最长时间。

[来源：WS/T 466-2014,3.4]

3.18

杀灭时间 killing time；KT

生物指示物在特定条件下暴露于杀菌因子后，微生物被全部灭活的时间。

[来源：WS/T 466-2014,5.21]

3.19

D 值 D value

在设定的暴露条件下，杀灭特定试验微生物总数的90%所需的时间。

[来源：WS/T 466-2014,3.7]

4 基本要求

4.1 实验室要求

4.1.1 消毒效果检测实验室应符合GB 19489的要求，按WS 233等生物安全相关标准和条例进行管理。

开展致病微生物包括分枝杆菌、黑曲霉菌、白色念珠菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和脊髓灰质炎病毒等试验或检测现场标本时，应符合菌毒种管理相关要求，在生物安全Ⅱ级及以上的实验室内进行，并符合国家有关生物安全的标准。实验室应采取封闭式布局，便于清洁、消毒。

4.1.2　理化实验室布局应合理，并保持整洁、通风。对温湿度有严格要求的测试场所（大型仪器室、天平室、标准物质存放地等）须配置相应监控设备，并对环境条件进行记录。

4.1.3　毒理学实验室应符合 GB 14925 的要求，并按《实验动物管理条例》等相关标准和条例进行管理。

4.2　人员要求

4.2.1　消毒产品检测实验室人员应为经过消毒实验操作技术培训的专业人员。

4.2.2　实验审核人员应具有中级职称或五年以上的消毒产品检测经历并经过专门培训。

4.2.3　实验室技术负责人和质量负责人应具有高级职称，五年以上的消毒产品检测经历并经过专门培训。

4.3　消毒效果检测要求

4.3.1　无菌操作要求

4.3.1.1　试验开始前，应以湿式方法清洁消毒台面，打扫室内地面。

4.3.1.2　实验人员应穿戴工作服、防护鞋、口罩、帽子。

4.3.1.3　每一次吸取不同样液应更换无菌吸管，接种环（针）应烧灼灭菌后，才可再次使用，也可用一次性使用的无菌吸管和接种环（针）。

4.3.1.4　要求无菌的试剂（如纯化水、生理盐水、磷酸盐缓冲液、培养基、中和剂等）应压力蒸汽灭菌，部分不能压力蒸汽灭菌的培养基和牛血清白蛋白（BSA）应做过滤除菌处理。

4.3.1.5　无菌器材和试剂，使用前应检查容器或者包装是否完整，有破损者不应使用。

4.3.1.6　对正在使用的无菌器材和试剂应采取措施避免空气中微生物的污染。

4.3.1.7　重复使用的器材，使用后应立即放入盛有消毒液的容器中，一次性器材使用后应立即放入感染性废物收集袋中，锐器应放到锐器盒中。

4.3.1.8　若发生微生物培养物打碎或者试验微生物泄漏时，应立即停止工作，对污染区及可能波及的区域进行消毒处理。

4.3.1.9　全部试验结束后，应对操作台面及室内环境进行消毒处理。

4.3.2　试验要求

4.3.2.1　消毒试验分为实验室试验、模拟试验或/和现场试验。

4.3.2.2　实验室试验以悬液定量试验为主；对不适宜用悬液定量试验评价的消毒剂，如粘稠的消毒剂、冲洗用消毒剂和原液使用的消毒剂等实验室试验可用载体定量试验，试验应重复 3 次。无特殊要求的情况下，载体定量试验以布片为载体，用途单一、明确的可以选用对应的玻璃片、不锈钢片、滤纸片等，评价消毒剂气溶胶对物体表面消毒的实验室试验时，菌片一般用金属载体，也可以根据消毒对象选择相

应载体，常用的材料有金属、玻璃、聚四氟乙烯等。评价消毒剂的实验室试验，消毒剂试验浓度应用产品说明书规定的该消毒剂对某一有代表性消毒对象的最低使用浓度。试验设 3 个不同作用时间，原则上第一时间为说明书规定的最短作用时间的 0.5 倍，第二时间为最短作用时间，第三时间为最短作用时间的 1.5 倍。对多用途的消毒剂，消毒对象所涉及的微生物相同时，若使用浓度相同，选择各种用途中最短的作用时间；若作用时间相同，选择各种用途中最低的使用浓度；若使用浓度低、作用时间短者与使用浓度高、作用时间长者同时存在时，以前者为准；若使用浓度高、作用时间短者与使用浓度低，作用时间长者同时存在时，每个剂量均须进行试验。

消毒器械产生的化学杀微生物因子的试验要求同消毒剂。对于用化学消毒因子冲洗的，可以用载体流动浸泡试验。如为物理杀微生物因子，试验一般用载体定量试验，在无特殊要求的情况下，以布片为载体。用途单一、明确的可以选用对应的玻璃片、不锈钢片、滤纸片等。

实验室灭菌试验应用载体定性试验，普通医疗器械的灭菌以不锈钢片为载体，特殊用途的可以选用玻璃片、聚四氟乙烯片（管）等。评价化学消毒剂灭菌效果时，试验设3个不同作用时间，原则上第一时间为说明书规定的最短作用时间的0.5倍，第二时间为最短作用时间，第三时间为最短作用时间的1.5倍。载体定性灭菌试验应重复5次，样本总量应不少于30个，每次试验均应设立规定数量的阴性对照和阳性对照。

4.3.2.3　消毒模拟现场或者现场试验，以使用说明书的最低有效浓度（强度）和最短作用时间进行试验，应进行 3 次重复试验。每次试验均应设立一定数量的阴性对照和阳性对照。

4.3.2.4　灭菌模拟现场或者现场试验，评价化学因子灭菌效果时，应以使用说明书的最低使用浓度（强度）和 0.5 倍的最短作用时间进行试验，消毒器械的灭菌试验应重复 5 次，消毒剂的灭菌试验至少重复 3 次，样本总量应不少于 60 个。每次试验均应设立规定数量的阴性对照和阳性对照。

4.3.2.5　鉴定和监测多用途消毒剂与消毒器械消毒效果时，现场或者模拟现场试验的消毒对象原则上是在类似物品中最难达到消毒合格者，如医疗器械消毒或者灭菌选用止血钳齿端；皮肤消毒选用人体前臂屈面皮肤；织物消毒选择棉布；一般物品表面（包括木质、塑料、橡胶、玻璃）消毒选用木质表面；餐具消毒选用竹（木）筷，不用于筷子消毒的可选用瓷质碗盘；瓜果蔬菜消毒选用表面有刺突的普通黄瓜；地面消毒选择水泥地面；手消毒选择五指屈面；对于特指消毒对象（如一些管腔医疗器械）而又在上述物品中不能选出有代表性物品时，则应用该特指对象或其模拟物进行试验。

4.3.2.6　实验室悬液定量试验时，对用于经过清洗或者较清洁的消毒对象的消毒剂，加入的有机干扰物为 0.3%（3.0 g/L）牛血清白蛋白，对用于不经过清洗或者较脏的消毒对象的消毒剂，加入的有机干扰物为 3.0%（30 g/L）牛血清白蛋白。载体浸泡杀菌试验时，加入的有机干扰物为胰蛋白胨大豆肉汤培养基（TSB）。

4.3.3　对重复试验的要求

重复性试验不是只在同次试验中增加菌片数，或者多做几份样本，而是应分期分批进行。必要的器材和试剂应重新制备，如试验微生物和试验用消毒剂应重新制备，消毒器械应重新开启，以防产生系统性误差。

4.4 理化检测要求

4.4.1 试剂或材料

4.4.1.1 本文件中所列试剂的纯度涉及基准、分析纯、化学纯及色谱纯等，凡未指明规格者，均为分析纯。

4.4.1.2 实验用水凡未指明规格者均指纯水，应符合 GB/T 6682 规定。有特殊要求的实验用水，则另作具体说明。试剂溶液未指明用何种溶剂配制时，均指用纯水配制。

4.4.1.3 标准品首选有证标准物质；当没有标准物质时，也可用纯度较高（一般不低于 98%）、性质稳定的化学试剂配制标准溶液；也可使用标准品进行标定过的标准溶液作为含量测定的对照物。

4.4.2 浓度表示法

4.4.2.1 有效成分浓度

物质的量（n_B）除以混合物的体积（v）即为有效成分浓度（c_B），常用单位为mol/L。

4.4.2.2 有效成分质量浓度

质量（m_B）除以混合物的体积（v）即为有效成分质量浓度（ρ_B），常用单位为g/L、mg/L。

4.4.2.3 有效成分质量分数

质量（m_B）与混合物的质量（m）之比即为有效成分质量分数（ω_B），无量纲单位，可用%表示，也可用mg/kg，g/kg等表示。

4.4.2.4 有效成分体积分数

体积（v_B）除以混合物的体积（v）即为有效成分体积分数（φ_B），无量纲单位，常用%表示。

4.4.3 仪器设备的检定/校准

检测用仪器、天平、容量瓶、滴定管、吸管等应按国家有关规定及规程进行计量检定/校准，以保证仪器和设备在检测工作中正常运行。

4.4.4 方法选择

4.4.4.1 同一个项目如果有两个或两个以上方法时，可根据消毒产品、设备及技术条件选择使用。

4.4.4.2 滴定法分析有效成分时，滴定液用量不得超过滴定管所标示的容量。本文件规定滴定时所取样品的质量或容量（包括含量），均根据此原则设定。若所测消毒剂含量过高，可适当减少取样量或稀释后测定；若消毒剂含量过低，可增加取样量或采用灵敏度更高的方法进行测定。

4.4.4.3 选用色谱法或分光光度法进行方法可靠性论证时，应附空白样品（不含被测成分的其他成分所构成的样品）、模拟样品（空白样品加有效成分的标准品）以及待测样品的色谱图或光谱图。如果无法提供空白样品，可用标准加入法进行方法可靠性的论证。

注：当本文件的方法不适用及本文件没有涵盖的方法时，由厂家提供检测方法及方法可靠性的论证报告，并同时在两家检测机构进行检测。

4.4.5 样品的检测

4.4.5.1 同批号的消毒产品测定有效成分，每个样品平行测定 2 次。

4.4.5.2 消毒器械的杀菌因子强度应测定强度曲线，该曲线应能反映消毒器械消毒灭菌全过程杀菌因子强度的变化趋势。

4.4.5.3 液体产品经振摇混匀后直接测定或稀释后测定。

4.4.5.4 霜、凝胶类产品，细颈容器内的样品取样时，应弃去至少 1 cm 最初移出样品，挤出所需样品量；广口容器内的样品取样时，应刮弃表面层，取出所需样品。

4.4.5.5 粉剂和片剂产品的取样量为测定所需量的 10 倍以上，经研磨后精确称取适量样品进行测定。

4.4.5.6 如果产品的使用方法有特殊要求的，按照使用方法进行取样。

4.4.6 检出限和定量限的要求

检出限为被测物能被检出的最低量，定量限为能够对被测物准确定量的最低量。常用检验方法的检出限和定量限的计算见表1 。

表1 检出限和定量限

检验方法	检出限（对应的质量、浓度）	定量限（对应的质量、浓度）
原子吸收法/原子荧光法（AAS/AFS）	3 SD	10 SD
气相色谱法（GC）	3 倍空白噪音	10 倍空白噪音
液相色谱法（HPLC）	3 倍空白噪音	10 倍空白噪音
分光光度法	0.005 A	0.015 A
容量法	X+3 SD	X+10 SD
注： SD 为标准偏差；A 为吸光度； X 为在终点附近出现可察觉变化的最小试剂体积的平均值。		

4.5 毒理学评价要求

4.5.1 评价试验项目

4.5.1.1 评价程序要求

消毒剂安全性毒理学评价程序采用分阶段系统法，逐阶段进行毒理试验，毒理试验依次分为4个阶段，如果前一阶段毒理试验结果不符合安全性要求，应增做其后阶段相应的毒理试验。

4.5.1.2 各阶段毒理试验项目

4.5.1.2.1 第一阶段试验，包括：

a) 急性经口毒性试验；

b) 急性吸入毒性试验；

c) 皮肤刺激试验：

1) 一次完整皮肤刺激试验；

2) 一次破损皮肤刺激试验；

3) 多次完整皮肤刺激试验；

d) 急性眼刺激试验；

e) 阴道黏膜刺激试验；

f) 皮肤变态反应实验。

4.5.1.2.2 第二阶段试验，包括：

a) 亚急性毒性试验；

b) 致突变试验：

1) 体外哺乳动物 L5178Y 细胞基因突变试验（体细胞基因水平，体外试验）；

2) 体外哺乳动物 V79 细胞基因突变试验（体细胞基因水平，体外试验）；

3) 体外哺乳动物细胞染色体畸变试验（体细胞染色体水平，体外试验）；

4) 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验（体细胞染色体水平，体内试验）；

5) 哺乳动物骨髓细胞染色体畸变试验（体细胞染色体水平，体内试验）；

6) 程序外 DNA 修复合成试验 （DNA 水平，体外试验）；

7) 小鼠精原细胞染色体畸变试验（性细胞染色体水平，体内试验）。

4.5.1.2.3 第三阶段试验，包括：

a) 亚慢性毒性试验；

b) 致畸试验。

4.5.1.2.4 第四阶段试验，包括：

a) 慢性毒性试验；

b) 致癌试验。

4.5.2 毒理试验项目确定原则

4.5.2.1 原则要求

应根据消毒剂的特点、使用范围和安全性评价前一阶段毒理试验的结果，确定毒理试验项目。

4.5.2.2 必做的毒理试验项目

消毒剂应进行以下试验项目：

a) 急性经口毒性试验；

b) 1 项致突变试验。

4.5.2.3 增做的毒理试验项目

根据消毒剂使用范围，在必做的两项毒理试验（4.5.2.2）基础上，分别增做以下试验：

a) 空气消毒剂应增做急性吸入毒性试验和急性眼刺激试验；

b) 手和（或）皮肤消毒剂应增做下列试验：

1) 偶尔使用或间隔数日使用的皮肤消毒剂，增做一次完整皮肤刺激试验；

2) 多次使用的皮肤消毒剂增做多次完整皮肤刺激试验；

3) 接触破损皮肤（包括用于注射部位、手术切口部位消毒）的消毒剂，增做一次破损皮肤刺激试验；

4) 接触创面（包括用于外科换药、烧伤皮肤消毒）的消毒剂，增做一次破损皮肤刺激试验和急性眼刺激试验。

c) 黏膜消毒剂应增做急性眼刺激试验；用于阴道黏膜消毒，应增做阴道黏膜刺激试验；

d) 用于游泳池水的消毒剂，应增做急性眼刺激试验；

e) 在消毒过程中接触手和（或）皮肤的消毒剂，应增做一次完整皮肤刺激试验。

4.5.2.4 新消毒剂增做的毒理试验项目

4.5.2.4.1 在我国首次生产和（或）销售含有新的杀菌有效成分的新消毒剂，应做以下毒理试验：

a) 急性经口毒性试验（包括小鼠和大鼠）；

b) 亚急性经口毒性试验；

c) 3 项致突变试验（包括反映体细胞基因水平、体细胞染色体水平和性细胞染色体水平三种类型试验）；

d) 亚慢性毒性试验；

e) 致畸试验。

4.5.2.4.2 根据消毒剂的成分，可能有致敏作用的，增做皮肤变态反应试验。

4.5.3 毒理试验用受试物的要求

4.5.3.1 受试物应是按照消毒剂生产者既定的生产工艺和配方进行规范化生产的消毒产品，其成分和浓度应与实际生产和销售的相同。

4.5.3.2 生产者应提供受试物的物理、化学性质的资料（包括消毒产品的配方、杀菌有效成分的化学结构和含量、pH 值等，植物消毒剂可不提供化学结构）。

4.5.3.3 在急性经口毒性试验、急性吸入毒性试验、亚急性毒性试验、致突变试验、亚慢性毒性试验、致畸试验、慢性毒性试验和致癌试验时，采用消毒剂原形样品。消毒剂原形是指在销售过程中原包装的粉剂、片剂或原液。对于二元包装的消毒剂，按产品使用说明比例混合配制后作为消毒剂原形样品。

4.5.3.4 在皮肤刺激试验、急性眼刺激试验和阴道黏膜刺激试验中所用样品的浓度，应是对皮肤、黏膜消毒时应用浓度的 5 倍。使用产品原液对皮肤、黏膜进行消毒的消毒剂，则采用消毒剂原液作为试验样本。

4.5.3.5 在皮肤变态反应试验时，采用的诱导浓度应为引起皮肤轻度刺激反应的最高浓度或原液，激发浓度应为不引起皮肤刺激反应的最高浓度或原液。

4.5.4 安全性毒理学试验结果的评价

4.5.4.1 对第一阶段毒理试验的评价

4.5.4.1.1 在急性经口毒性试验中，LD_{50}≥5000 mg/kg 体重，消毒剂符合要求；对于稀释使用的消毒剂，当 LD_{50}＜5000 mg/kg 体重时，则增做消毒剂最高应用浓度 5 倍溶液的急性经口毒性试验，如增做的实验结果 LD_{50}＞5000 mg/kg 体重，消毒剂符合要求；否则，应增做消毒剂原形样品的亚急性经口毒性试验。

4.5.4.1.2 在急性吸入毒性试验中，LC_{50}≥10000 mg/m^3，消毒剂符合要求；1000 mg/m^3≤LC_{50}＜10000 mg/m^3 时，在产品使用说明书中应增加警示；LC_{50}＜1000 mg/m^3 时，应放弃使用。

4.5.4.1.3 在皮肤刺激试验中，如结果为无刺激或仅具轻度刺激作用，消毒剂符合要求。

4.5.4.1.4 在急性眼刺激试验中，如对眼无刺激性或具有轻刺激性，消毒剂符合要求；否则，应放弃使用。

4.5.4.1.5 在阴道黏膜刺激试验中，如对阴道黏膜无刺激性或轻度刺激性，消毒剂符合要求；否则，应放弃使用。

4.5.4.1.6 在皮肤变态反应试验中，如未见皮肤变态反应或对皮肤仅具有极轻度致敏作用，消毒剂符合要求；否则，应放弃使用。

4.5.4.2 对第二阶段毒理试验的评价

4.5.4.2.1 在亚急性毒性试验中，如各剂量组均未观察到毒性作用，消毒剂符合要求；否则，根据实验的最小观察到有害作用剂量或最大未观察到有害作用剂量（以 mg/kg 计），参考消毒剂的毒理作用特点和使用条件，确定是否放弃使用或再进行下阶段毒理试验。

4.5.4.2.2 对新消毒剂所进行的分别反映基因水平、体细胞染色体水平和性细胞染色体水平的 3 种类型致突变试验中，如有 2 种或 3 种类型试验结果为阳性，该消毒剂不符合要求，应放弃使用。若仅 1 种类型试验为阳性，应再增做另一项同类型致突变试验，如结果为阴性，消毒剂符合要求；否则，该消毒剂亦不符合要求，应放弃使用。

4.5.4.2.3 对一般消毒剂的 1 项致突变试验中，如结果为阴性，消毒剂符合要求。如结果为阳性，应增做其他的 2 项致突变试验（包括反映基因水平和染色体水平各 1 项），如果在这 2 项试验中结果均为阴性，消毒剂符合要求；如果还出现阳性，则不符合要求，应放弃使用。

4.5.4.3 对第三阶段毒理试验的评价

在亚慢性毒性试验和（或）致畸试验中，如各剂量组均未观察到毒性作用，消毒剂符合要求；否则，应放弃使用或增做下阶段毒理试验。

4.5.4.4 对第四阶段毒理试验的评价

如果在慢性毒性试验和（或）致癌试验中，结果未观察到毒性作用，消毒剂符合要求；否则，应放弃使用。

4.6 检测记录要求

实验人员对所进行的试验，应认真观察试验结果，按相关要求做好原始记录。一般用表格方式记录，表格中应包括样品名称与编号、样品批号、样品性状、检验日期、检测项目、检测依据、试验条件、使

用仪器名称与编号、观察结果、试验者和校核者签名等栏目，应逐项填写。原始记录数据和计算应及时校核，整理装订附于检验报告后，入档保存备查。

4.7 检测报告要求

实验室应准确、清晰、明确及客观地报告每一项检测的结果，凡检测方法在本文件和有关标准中未列出者，必须详细描述。消毒灭菌效果的结果部分用表格将各试验组、阳性对照、阴性对照及其他对照组的数据列出，定性试验的对照可用文字加以说明。试验组应列出其杀灭对数值，杀灭效果合格时，杀灭对数值无须列出具体数值，用大于等于某一规定值表示；当杀灭对数值小于某一规定值时，则应列出具体杀灭对数值，并用文字简要叙述所得的结果。检验报告的结论部分，应根据试验结果得出明确的结论。此外，对试验中出现的某些异常现象应加以说明。

4.8 消毒效果评价要求

符合下列所有相应条件的消毒产品认为消毒效果试验结果合格：

a) 去除残留消毒剂效果的鉴定试验合格；

b) 消毒产品的实验室试验结果符合下列相应条件：

   1) 悬液定量试验时，每次试验对细菌繁殖体和细菌芽胞如金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌和枯草杆菌黑色变种芽胞的杀灭对数值≥5.00，对龟分枝杆菌脓肿亚种、白色念珠菌和黑曲霉菌的杀灭对数值≥4.00，对病毒的灭活对数值≥4.00。对照组微生物数在规定的范围内；

   2) 载体定量试验和载体流动浸泡试验时，每次试验对各类微生物的杀灭对数值或者灭活对数值≥3.00，对照组微生物数在规定的范围内。载体定性灭菌试验时，各次试验所有载体均无试验芽胞菌生长，对照组微生物数在规定的范围内。

c) 消毒模拟现场试验时，各次试验对试验微生物的杀灭对数值均≥3.00，对照组微生物数在规定的范围内。灭菌模拟现场试验时，各次试验所有载体均无试验微生物生长，对照组微生物数在规定的范围内；

d) 现场试验时，对消毒对象上自然菌的平均杀灭率≥90%；

e) 消毒产品用于饮用水消毒时，消毒效果的评价按《生活饮用水消毒剂和消毒设备卫生安全评价规范（试行）》进行。

5 消毒效果检测与评价方法

5.1 消毒剂消毒与灭菌效果验证试验

5.1.1 适用范围

适用于消毒剂的消毒和灭菌效果的检验。

5.1.2 菌悬液与菌片的制备

5.1.2.1 目 的

制备消毒剂杀菌试验用菌悬液或菌片，以供消毒剂杀菌试验时使用。也适用于本文件中其他消毒试验所用菌悬液或菌片。

5.1.2.2 仪器设备或试剂材料

5.1.2.2.1 试验菌种

金黄色葡萄球菌（ATCC 6538）、铜绿假单胞菌（ATCC 15442）、大肠杆菌（8099）、枯草杆菌黑色变种（ATCC 9372）芽胞、白色葡萄球菌（8032）。在上述规定的菌株基础上，根据消毒剂特定用途或试验特殊需要，还可增选其他菌株。

5.1.2.2.2 有机干扰物

悬液定量杀菌试验用牛血清白蛋白（BSA）（用于经过清洗或较清洁的消毒对象的消毒剂，BSA浓度为 0.3%；用于不经过清洗或较脏的消毒对象的消毒剂，BSA浓度为 3.0%）；载体定量杀菌试验和定性灭菌试验用胰蛋白胨大豆肉汤培养基（TSB）。有机干扰物的配制方法见附录A。

5.1.2.2.3 试剂

磷酸盐缓冲液、无菌蒸馏水或其他纯化水、稀释液、细菌培养基、营养琼脂培养基、营养肉汤培养基、革兰染色液、芽胞染色液（见附录A）。

5.1.2.2.4 设备与耗材

恒温水浴箱、离心机、电动混匀器、浊度计、恒温培养箱、玻璃漏斗、刻度吸管（1.0 mL、2.0 mL、5.0 mL、10.0 mL）、毛细吸管、移液器（10 μL、20 μL、100 μL、200 μL、1000 μL）及配套的塑料吸头等。

5.1.2.3 细菌悬液制备程序

5.1.2.3.1 细菌繁殖体悬液制备程序

a) 以无菌操作方式开启菌种管，用毛细吸管加入适量营养肉汤培养基，吹吸数次，使菌种溶化分散。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，置 36 ℃±1 ℃ 培养 18 h～24 h，或从菌种保存管中取出一粒菌珠接种于平皿上，置 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，置 36 ℃±1 ℃ 培养 18 h～24 h，即为第 3 代培养物。

b) 取第 3 代～第 8 代的营养琼脂培养基培养 18 h～24 h 的新鲜斜面培养物，用 5.0 mL 吸管吸取 3.0 mL～5.0 mL 稀释液（一般用 TPS，酸性氧化电位水消毒试验用生理盐水）加入试管内，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，用电动混匀器混合 20 s，或在手掌上振打 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浓度。

d) 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。

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。

5.1.2.3.2 细菌芽胞悬液的制备程序

a) 以无菌操作方式开启菌种管，用毛细吸管加入适量营养肉汤培养基，吹吸数次，使菌种溶化分散。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，置 36 ℃±1 ℃ 培养 18 h～24 h。挑取上述第 2 代培养物中典型菌落，接种于营养肉汤培养基，置 36 ℃±1 ℃ 培养 18 h～24 h，即为第 3 代培养物。

b) 用 10.0 mL 吸管吸取 5.0 mL～10.0 mL 第 3 代～第 5 代的 18 h～24 h 营养肉汤培养物，接种于罗氏瓶中营养琼脂培养基表面，将其摇动使菌液布满营养琼脂培养基的表面，再将多余肉汤培养物吸出，将罗氏瓶置 36 ℃±1 ℃ 恒温培养箱内培养 5 d～7 d。

c) 用接种环取菌苔少许涂于玻片上，以改良芽胞染色法染色，并在显微镜（油镜）下进行镜检。当芽胞形成率达 90% 以上时，即可进行后续处理。否则，应继续在室温下放置一定时间，直至达到上述芽胞形成率后再进行后续处理。

改良芽胞染色法：①用接种环取菌苔涂布于玻片上，待自然干燥，而后通过火焰加热将菌固定于玻片上。②将涂片放入平皿内，片上放两层滤纸，滴加足量的 5.0%孔雀绿水溶液。将平皿盖好，放 54 ℃～56 ℃ 条件下，加热 30 min。取出，去滤纸，用自来水冲去残留液。③加 0.5% 沙黄水溶液，染 1 min。水洗，待干后镜检。芽胞呈绿色，菌体呈红色。

d) 加 10.0mL 无菌蒸馏水于罗氏瓶中，以 L 棒轻轻推刮菌苔，吸出，再加入 5.0 mL 无菌蒸馏水冲洗培养基表面，吸出。将两次吸出的菌悬液集中于含玻璃珠的无菌锥形烧瓶中，振摇 5 min。

e) 将锥形烧瓶置 45 ℃ 水浴中 24 h，使菌自溶断链，分散成单个芽胞。

f) 用无菌棉花或纱布过滤芽胞悬液，清除琼脂凝块。

g) 将芽胞悬液置无菌离心管内，以 3000 r/min 速度离心 30 min。弃上清液，加蒸馏水吹吸使芽胞重新悬浮，本步骤重复 3 遍。

h) 将洗净的芽胞悬液放入含适量小玻璃珠的锥形烧瓶内，80 ℃ 水浴 10 min（或 60 ℃ 水浴 30 min），以杀灭残余的细菌繁殖体。待冷至室温后，摇匀分装保存于 4 ℃ 冰箱中备用。有效使用期半年。

i) 芽胞悬液在使用时，应先进行活菌培养计数。

j) 怀疑有杂菌污染时，应以菌落形态、革兰染色与生化试验等法进行鉴定。

5.1.2.4 菌片（染菌载体）的制备程序

5.1.2.4.1 菌片用载体应根据消毒对象选择相应的材料，如手术器械选择不锈钢片，物体表面选择棉布片，非金属管腔选择聚四氟乙烯片（管），光滑表面可选择玻璃片等。常用的材料有金属、玻璃、滤纸、棉布、聚四氟乙烯等，一般载体为方形，大小 10 mm×10 mm，金属载体一般用 12 mm 直径圆形金属片（厚 0.5 mm），特定用途的消毒产品可使用其他材质、形状的载体。

5.1.2.4.2 所用载体（除滤纸片外）于染菌前，应进行脱脂处理。脱脂方法如下：

a) 将载体放在含洗涤剂的水中煮沸 30 min；

b) 以自来水洗净；

c） 用蒸馏水煮沸 10 min；

d） 用蒸馏水漂洗至 pH 呈中性；

e） 晾干、熨平备用。

5.1.2.4.3 布片用 40 织纱的白平纹棉布制作。将脱脂后的布块按载体规定的大小抽去边缘一周的经纬纱各一根，按抽纱痕剪开。金属片以不锈钢制作，纸片以滤纸制作。

5.1.2.4.4 载体经压力蒸汽灭菌后，使用滴染法染菌。

染菌用菌悬液：细菌繁殖体用18 h～24 h培养的新鲜斜面培养物，细菌芽胞可使用4 ℃冰箱贮存液。用TSB将菌液稀释成浓度约为5×10^8 CFU/mL。

滴染法染菌时，将经灭菌的载体片平铺于无菌平皿内，用移液器逐片滴加菌液10 μL，必要时用接种环涂匀整个载体表面。如使用布片载体等渗透性材质载体，用镊子夹取载体一角滴染菌液，待菌液均匀扩散后，置于平皿内。置36 ℃±1 ℃ 恒温培养箱或室温干燥备用。

5.1.2.4.5 每个菌片（载体）的回收菌量应为1×10^6 CFU/片～5×10^6 CFU/片。

5.1.2.5 注意事项

5.1.2.5.1 用浊度计测定的菌悬液浓度，只用于在滴染菌片时对菌悬液稀释度的估计。作为菌悬液含菌浓度或菌片染菌量的正式报告（如杀菌试验中阳性对照组菌悬液或菌片所含菌量），应以活菌培养计数的实测结果为准，不宜使用根据比浊法判定的估计值。

5.1.2.5.2 菌液滴加不宜过快，避免流散影响染菌的准确性。

5.1.2.5.3 细菌繁殖体在载体上干燥的过程中，可引起部分死亡。应提高初始菌浓度，以便达到所需的回收菌量。

5.1.2.5.4 配制菌悬液和制备菌片时，应严格无菌操作，以防杂菌污染，影响杀菌试验的结果。

5.1.2.5.5 保存菌液的容器使用橡皮塞时，应将其预先煮沸 10 min 进行脱硫处理。

5.1.2.5.6 菌悬液和菌片应随时放入冰箱内，密封保存。尽量缩短室温放置时间，以减少细菌的自然死亡。

5.1.3 活菌培养计数

5.1.3.1 目的

测定消毒试验用菌悬液、菌片（染菌载体）、采样液等样本含有活菌的数量。

5.1.3.2 仪器设备或试剂材料

5.1.3.2.1 试剂

稀释液、胰蛋白胨大豆琼脂培养基（TSA）、胰蛋白胨大豆肉汤培养基（TSB）等（见附录A）。

5.1.3.2.2 设备与耗材

刻度吸管（1.0 mL、2.0 mL、5.0 mL、10.0 mL）、移液器（10 μL、20 μL、100 μL、200 μL、1 mL、5 mL）及配套的塑料吸头、电动混匀器、浊度计、恒温培养箱等。

5.1.3.3 操作程序

活菌培养计数一般使用倾注法（有特殊规定者除外）。倾注法操作程序如下：

a) 菌悬液可直接进行培养计数。将菌片和小型固体样本直接投入含 5.0 mL 稀释液的无菌试管中，将棉拭采样端剪入管内。用电动混匀器混合 20 s，或在手掌上用力振打 80 次，将菌洗下形成菌悬液。

b) 将试管按需要数量分组排列于试管架上，每管加入 4.5 mL 稀释液。各组由左向右，逐管标上 10^{-1}、10^{-2}、10^{-3}.....等。

c) 将菌悬液样本用电动混匀器混合 20s，或在手掌上用力振打 80 次，随即吸取 0.5 mL 加至 10^{-1}管内。

d) 将 10^{-1}管用电动混匀器混合 20 s，或在手掌上用力振打 80 次，混匀，再吸取出 0.5 mL 加入 10^{-2} 管内。如此类推，直至最后一管。必要时，还可作某稀释度的 1:1 或 1:4 稀释。

e) 选择适宜稀释度试管（以预计生长菌落数每平板为 15 CFU～300 CFU 者为宜），吸取其中混合均匀的悬液 1.0 mL 加于无菌平皿内。每一稀释度接种 2 个平皿。一般应接种 2 个～3 个不同稀释度。

f) 将 40 ℃～45 ℃ 熔化的培养基，倾注于已加入样液的平皿中，每平皿 15 mL～20 mL。

g) 将平板盖好，即刻轻轻摇动混匀，平放。待琼脂凝固后，翻转平板使底向上，置 36 ℃±1 ℃（嗜热脂肪杆菌芽胞的培养温度为 56 ℃±2 ℃，黑曲霉菌的培养温度为 30 ℃±1 ℃）恒温培养箱内培养。

h) 培养至规定时间，计数菌落数。对于现场试验样本，应每日观察并记录菌落数。

i) 计数菌落时，一般以肉眼观察，必要时用放大镜检查。以每平板菌落数在 15 CFU～300 CFU 的稀释度为准记录结果。对黑曲霉菌活菌计数时，以每平板菌落数在 15 CFU～100 CFU 的稀释度为准记录结果。对菌量极少的样本，按实际菌落数计算最终结果。

j) 根据稀释倍数和接种量计算每毫升菌液中或每一菌片（染菌载体）上的平均菌落数。

5.1.3.4 活菌计数中技术操作误差的测定

平板间、稀释度间误差率不应超过10%。按公式（1）、公式（2）计算误差率：

$$P_{\mathrm{p}}=\frac{\sum|N-N_{\mathrm{i}}|}{\sum N_{\mathrm{i}}}\times 100\% \quad\cdots\cdots(1)$$

式中：

P_{p}——平板间误差率，%；

N——平板间菌落平均数；

N_{i}——各平板菌落数，单位为菌落形成单位（CFU）。

$$P_{\mathrm{x}}=\frac{\sum|A-A_{\mathrm{i}}|}{\sum A_{\mathrm{i}}}\times 100\% \quad\cdots\cdots(2)$$

式中：

P_{x}——稀释度间菌落数误差率，%；

A——稀释度间菌落平均数；

A_{i}——各稀释度菌落数，单位为菌落形成单位（CFU）。

5.1.3.5 注意事项

5.1.3.5.1 严格无菌操作，防止污染。

5.1.3.5.2 认真检查实验器材有无破损（注意试管底的裂痕和破洞），以防丢失样本和污染环境。

5.1.3.5.3 注意菌液的均匀分散。

5.1.3.5.4 取液要准确，尽量减少误差。

5.1.3.5.5 每吸取一个稀释度样液，必须更换一支吸管或吸头。

5.1.3.5.6 样液加入平皿后应尽快倾注培养基，避免样液干燥。

5.1.3.5.7 倾注时培养基温度不得超过 45 ℃，以防损伤细菌或真菌。

5.1.3.5.8 倾注和摇动应尽量平稳，勿使培养基外溢，确保细菌分散均匀，便于计数菌落。

5.1.4 残留消毒剂的去除方法

5.1.4.1 目的

消毒剂的消毒效果试验，在达到规定的消毒时间时，应立即终止消毒作用，以便准确检测出试验体系中仍然存活的微生物及其数量。本方法可去除残留消毒剂对微生物的杀灭和抑制作用。

5.1.4.2 原则要求

5.1.4.2.1 应有效去除残留的消毒剂或消毒剂的影响。

5.1.4.2.2 对试验微生物无害，不减少其回收菌量。

5.1.4.2.3 不破坏培养基的营养成份，不影响其透明度。

5.1.4.3 去除方法

5.1.4.3.1 稀释中和法（中和剂法）

在消毒剂与微生物作用到达设定时间时，取样加于适宜种类和浓度的中和剂中，将残留消毒剂迅速中和，使其不再持续杀灭和抑制微生物的方法。其操作要点如下：

a) 将经消毒剂作用过的微生物样本，在达到规定作用时间，即刻取样移入鉴定合格的中和剂溶液中。

b) 所用中和剂的浓度与容量应与鉴定试验结果规定的相同。

c) 即刻混匀，并按规定时间吸取样液进行随后的培养检测。

d) 应在规定时间内进行接种培养基以前的操作，以免微生物与中和剂或中和产物接触过久。

5.1.4.3.2 过滤冲洗法

将经消毒剂作用过的微生物样本，立即加入适量稀释液中混匀（通过适量稀释，可减轻消毒剂的持续作用），并倾入装有微孔滤膜的滤器内，接真空泵抽吸过滤（或加压过滤）后，再加适量稀释液冲洗，同时过滤，可去除残留的消毒剂。多用于难以找到适宜中和剂的消毒效果试验。其操作要点如下：

a) 微孔滤膜、滤器灭菌后备用。

b) 初次过滤后，应使用对微生物无害的稀释液进行冲洗，以洗净消毒剂为准。

c） 冲洗、滤净后，以无菌操作法取出微孔滤膜，进行随后的培养检测。

5.1.4.4 注意事项

5.1.4.4.1 每次吸液，均应更换一支无菌吸管，以防交叉污染。

5.1.4.4.2 所用吸管的容量宜尽量与拟吸取的液体量相近，不要用大吸管吸取少量液体。

5.1.4.4.3 试验条件可影响残留消毒剂的去除效果，故每进行一种消毒效果试验，均应按规定对所选方法进行去除效果的鉴定试验。

5.1.5 中和剂鉴定试验

5.1.5.1 定量中和剂鉴定试验

5.1.5.1.1 目的

确定所选中和剂是否适用于拟进行的消毒效果鉴定试验。

5.1.5.1.2 仪器设备或试剂材料

仪器设备或试剂材料如下：

a） 试剂：实验菌菌悬液和菌片（见 5.1.2）、稀释液、培养基、标准硬水、中和剂（见附录 A）、有机干扰物（BSA 或 TSB，使用要求与 5.1.2.2.2 相同）。

b） 设备及耗材：刻度吸管（1.0 mL、2.0 mL、5.0 mL）、平皿、恒温水浴箱、电动混匀器等。

5.1.5.1.3 设计原则

设计原则如下：

a） 通过所设各组试验结果综合分析，应可确定所用中和剂是否具有良好的中和作用，对试验用微生物恢复和培养无不良影响；

b） 试验中所用消毒剂的浓度应为杀菌试验中使用的最高浓度；

c） 同一消毒剂拟对多种微生物进行杀灭试验时，所用中和剂应按微生物种类分别进行鉴定试验；对细菌繁殖体，一般在大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌中任选其一进行试验，特殊情况按试验结果再行选择；对细菌芽胞、白色念珠菌、黑曲霉菌、分枝杆菌应分别进行鉴定试验；当用其他特定微生物进行杀灭试验时，均应以该特定微生物进行中和剂的鉴定试验；

d） 鉴定时根据所用杀菌试验方法，相应使用悬液或载体进行试验。

5.1.5.1.4 试验分组

各组试验如下：

第 1 组：中和剂 + 菌悬液 （或菌片）；

第 2 组：（消毒剂 + 中和剂）+ 菌悬液（或菌片）；

第 3 组：稀释液 + 菌悬液 （或菌片）；

第 4 组：稀释液 + 中和剂 + 培养基。

5.1.5.1.5 中和剂悬液定量鉴定试验操作程序

根据试验分组，准备足量试管和平皿，依次进行编号。将试验用菌悬液与等量适合浓度的有机干扰物混合后，使菌量为2.5×10^3 CFU/mL～1.5×10^4 CFU/mL，作为试验菌悬液。鉴定试验包括4组：

a) 第 1 组：取 0.4 mL 标准硬水于试管内，加入 4.5 mL 中和剂，混匀，置 20 ℃±1 ℃ 水浴中 5 min 后，再加入 0.1 mL 试验菌悬液，混匀，作用 10 min，分别吸取 1.0 mL 接种于两个平皿中，做活菌培养计数。

b) 第 2 组：取 0.4 mL 消毒剂于试管内，加入 4.5 mL 中和剂（对于酸性氧化电位水检测时，取 0.5 mL 消毒剂于试管内，加入 4.4 mL 中和剂）混匀，置 20 ℃±1 ℃ 水浴中 5 min 后，再加入 0.1 mL 试验菌悬液，混匀，作用 10 min，分别吸取 1.0 mL 接种于两个平皿中，做活菌培养计数。

c) 第 3 组：取 0.4 mL 标准硬水于试管内，加入 4.5 mL 稀释液，混匀，置 20 ℃±1 ℃ 水浴中 5 min 后，再加入 0.1 mL 试验菌悬液，混匀，作用 10 min，分别吸取 1.0 mL 接种于两个平皿中，做活菌培养计数。

d) 第 4 组：分别吸取稀释液、标准硬水与中和剂各 1.0 mL 于无菌平皿内，倒入上述试验同批次的培养基 15 mL～20 mL，培养观察。

5.1.5.1.6 中和剂载体定量鉴定试验操作程序

根据试验分组，准备足量试管和平皿，依次进行编号。各组分别用适宜的无菌定量吸管按以下程序吸取或添加试剂和试验样本。将试验用菌悬液进行稀释后，使载体试验回收菌量在2.5×10^2 CFU/片～1.5×10^3 CFU/片之间。鉴定试验包括4组：

a) 第 1 组：吸取中和剂 5.0 mL 于无菌试管中，将其置 20 ℃±1 ℃ 水浴中 5 min 后，用无菌镊子夹入 1 菌片，并使浸透于中和剂内，作用 10 min 后，用电动混匀器混合 20 s，或将试管振打 80 次，混匀，分别吸取 1.0 mL 接种于两个平皿中，做活菌培养计数。

b) 第 2 组：吸取中和产物溶液（按每片浸有消毒剂的载体加入含 5.0 mL 中和剂的量制备中和产物）5.0 mL 于无菌试管内，将其置 20 ℃±1 ℃ 水浴中 5 min 后，用无菌镊子夹入 1 菌片，并使浸透于中和产物溶液中，作用 10 min 后，用电动混匀器混合 20 s，或将试管振打 80 次，混匀。分别吸取 1.0 mL 接种于两个平皿中，做活菌培养计数。

c) 第 3 组：吸取稀释液 5.0 mL 于无菌试管内，将其置 20 ℃±1 ℃ 水浴中 5 min 后， 用无菌镊子夹入 1 菌片，并使浸透于稀释液中，作用 10 min 后，用电动混匀器混合 20 s，或将试管振打 80 次，混匀，分别吸取 1.0 mL 接种于两个平皿中，做活菌培养计数。

d) 第 4 组：分别吸取稀释液与中和剂各 1.0 mL 于无菌平皿内，倒入上述试验同批次的培养基 15 mL～20 mL，培养观察。

5.1.5.1.7 评价规定

试验结果符合以下全部条件，所测中和剂判为合格：

a) 第 1、2 和 3 组有相似量试验菌生长，悬液试验作用体系中菌量在 50 CFU/mL～300 CFU/mL 之间，载体试验菌量在 2.5×10^2 CFU/片～1.5×10^3 CFU/片 之间。其组间菌落数误差率应不超过 15%。

按公式（3）计算第 1 组、第 2 组和第 3 组间菌落数误差率：

$$P_z = \frac{\sum|X - X_i|}{\sum X_i} \times 100\% \cdots\cdots (3)$$

式中：

P_z——组间菌落数误差率，%；

X——三组间菌落平均数；

X_i——各组菌落平均数，单位为菌落形成单位（CFU）。

b） 第 4 组无菌生长。否则应更换试剂，重新试验。

c） 试验重复 3 次，每次试验均应符合以上条件。

5.1.5.1.8 注意事项

注意事项如下：

a） 试验所分各组均有其特定意义，不得任意删减。

b） 无菌操作，保持试验用液和器材的无菌，注意更换吸管，保证试验的准确性。

c） 实验组序应按本文件执行。

d） 中和剂鉴定试验应根据正式杀灭试验进行选择（或设计），悬液鉴定试验结果可用于载体试验，载体鉴定试验结果不可用于悬液试验。

5.1.5.2 定性灭菌中和剂鉴定试验

5.1.5.2.1 目的

确定所选中和剂肉汤是否适用于拟进行的灭菌效果鉴定试验。

5.1.5.2.2 试剂或材料

试剂或材料如下：

a） 试剂：试验菌株（枯草杆菌黑色变种（ATCC 9372）芽胞（其悬液的制备按 5.1.2 进行）、稀释液、有机干扰物（TSB）、培养基、中和剂肉汤、标准硬水（见附录 A）。

b） 材料：试管（1.8 cm×18 cm）、载体（圆形金属片，直径 12 mm，厚 0.5 mm）等，灭菌后备用。

5.1.5.2.3 试验分组

各组试验如下：

a) 第 1 组：中和剂肉汤 + 菌悬液；

b) 第 2 组：（消毒剂 + 中和剂肉汤）+ 菌悬液；

c) 第 3 组：肉汤 + 菌悬液；

d) 第 4 组：菌悬液+ 培养基；

e) 第 5 组：肉汤 + 稀释液 + 培养基。

5.1.5.2.4 操作程序

取出冰箱保存的枯草杆菌黑色变种芽胞液，用TSB将其稀释成菌量为1×10^3 CFU/mL～1×10^4 CFU/mL 的芽胞悬液，试验包括5组：

a) 第 1 组取两支无菌试管各加入 5 mL 中和剂肉汤，再分别加入 10 μL 芽胞液，混匀后置 36 ℃±1 ℃培养箱培养 7 d 观察结果。观察中和剂肉汤对少量试验菌恢复培养的能力；

b) 第 2 组取两支无菌试管各加入 5 mL 中和剂肉汤，再在肉汤中各加一片浸泡过消毒剂的金属载体片，制成中和产物肉汤，中和 10 min 后，各加入 10 μL 的芽胞液，混匀后置 36 ℃±1 ℃培养箱培养 7 d 观察结果。观察中和产物肉汤对少量试验菌恢复培养的能力；

c) 第 3 组取两支无菌试管，各加入 5 mL TSB，再分别加入 10 μL 芽胞液，混匀后置 36 ℃±1 ℃培养箱培养 7 d 观察结果。 观察少量的试验菌在 TSB 肉汤中能否正常生长；

d) 第 4 组分别吸取 10 μL 试验用芽胞液于两个无菌平皿中，每平皿倒入 15 mL～20 mL 的 TSA，置 36 ℃±1 ℃ 培养箱进行芽胞计数培养。计数试验体系中的芽胞总量；

e) 第 5 组取两支无菌试管，一支加入 5 mL TSB，另一支加入 5 mL 中和剂肉汤，置 36 ℃±1 ℃培养箱中培养 7 d 观察结果；吸取稀释液 1 mL 于无菌平皿中，倒入试验同批次使用的 TSA15 mL～20 mL，置 36 ℃±1 ℃ 培养箱中培养 48 h，观察结果。观察所用肉汤、培养基、稀释液等是否有菌生长。

5.1.5.2.5 评价规定

试验结果符合以下全部条件时，可判断所选中和剂肉汤合格。

a) 第 1 组～第 3 组的所有试管均有菌生长，肉汤轻度浑浊，有皱褶状菌膜。

b) 第 4 组试验体系中的芽胞总数应为 10 CFU～100 CFU。

c) 第 5 组无菌生长。

d) 试验重复 5 次，每次试验均应符合以上条件。

5.1.5.3 定性消毒中和剂鉴定试验

5.1.5.3.1 目的

确定所选中和剂肉汤是否适用于拟进行的消毒效果的定性鉴定试验。

5.1.5.3.2 试剂或材料

试剂或材料如下：

a) 菌株：金黄色葡萄球菌（ATCC 6538）、铜绿假单胞菌（ATCC 15442）、肠炎沙门菌（ATCC 10708）；

b) 培养基：中和试验培养基中分为基础培养液与中和剂培养液，基础培养液包括营养肉汤或液体硫乙醇培养基，作为中和试验的基础培养基，见附录 A。根据消毒剂有效成分选择相应中和剂加入基础培养基液中制备成为中和剂培养液，中和剂培养液应经中和剂鉴定试验验证合格后方可使用。除中和试验培养基还有传代培养基，包括合成肉汤或营养肉汤，用于细菌传代培养，以及胰蛋白胨大豆琼脂用于染菌载体的菌落计数，见附录 A；

c) 载体：304 不锈钢圆筒，表面抛光，外径 8 mm±1 mm，内径 6 mm±1 mm，壁厚 1 mm±0.5 mm，长度 10 mm±1 mm；

d) 吊钩：长度为 50 mm～75 mm，直径为 0.5 mm 的镍铬合金丝，末端 3 mm 呈直角弯屈；

e) 滤纸：直径为 90 mm 的定性滤纸；

f) 磷酸盐缓冲液：见附录 A；

g) 标准硬水：见附录 A；

h) 有机干扰物：见附录 A；

i) 器皿：25 mm×100 mm 玻璃试管，直径为 90 mm 的平皿，10 mL 吸管，移液器等。

5.1.5.3.3 试验原则

通过中和剂鉴定试验结果，判断所选中和方法对消毒剂是否有效中和。若中和I组显示可有效中和，则仅使用中和剂培养液进行中和。若中和I组结果显示未完全中和，而中和II组为有效中和，则在选用中和剂培养液进行中和的基础上，再使用培养液进行二次中和。如仍显示未完全中和，则继续进行中和II组试验。试验重复3次。

5.1.5.3.4 试验分组

在消毒剂消毒效果的定性试验(应用稀释法)的中和剂鉴定试验中，至少应平行进行以下各组试验：

a) 中和Ⅰ组：（消毒剂+中和剂培养液）+菌悬液；

b) 中和Ⅱ组：（消毒剂+中和剂培养液）+菌悬液；

（消毒剂+中和剂培养液）+基础培养液+菌悬液；

c) 阳性对照：中和剂培养液和基础培养液+菌悬液；

d) 阴性对照：中和剂培养液和基础培养液。

5.1.5.3.5 操作程序

消毒效果定性试验中和剂鉴定操作程序如下：

a) 菌悬液的制备：按照 5.1.2 的规定复苏菌种，接种于含 10 mL 营养肉汤或合成肉汤的试管中，经 36 ℃±1 ℃、200r/min±20r/min 振荡培养 24 h，此为第 1 代培养物。

用移液器取第1代培养物10 μL转种于含10 mL 营养肉汤或合成肉汤的试管中，经36 ℃±1 ℃、200 r/min±20 r/min 振荡培养24 h，此为第2代培养物，可继续传代培养至第5代。用移液器取第1～5代的24 h 新鲜培养物10 μL转种于10 个含10 mL 营养肉汤或合成肉汤的试管中，经36 ℃±1 ℃静置培养48 h～56 h后备用。

铜绿假单胞菌培养物应去除培养菌液表面的菌膜，或使用10 mL 吸管直接从溶液中部吸取菌液，放入另一个试管中。不可使用含菌膜的菌悬液进行试验。将金黄色葡萄球菌、肠炎沙门菌和去除菌膜的铜绿假单胞菌培养菌液用电动混匀器振荡混合20 s，室温静置10 min后，用10 mL 吸管吸取上层四分之三的菌液转移至新的试管中混匀，以去除细菌碎片和团块，菌悬液于4 ℃ 冷藏保存备用，于30 min内使用。根据消毒剂的检测要求加入有机干扰物。

制备好的菌悬液进行稀释，取1 mL 制备好的菌悬液加入9 mL 磷酸盐缓冲溶液中进行10倍梯度稀释，取4个稀释梯度（如10^{-4}、10^{-5}、10^{-6}和10^{-7}）进行中和试验，同时取4个稀释梯度各

1.0 mL 采用倾注法接种于TSA平板中，置36 ℃±1 ℃ 恒温培养箱中培养48 h后，进行菌落计数。

b) 载体的准备：未使用过，或使用过但试验中无菌生长的载体，不需进行筛选测试，经压力蒸汽灭菌后可使用。使用过的载体，且在试验中有菌生长，应进行筛选测试，测试合格方可使用。

载体首先经外观检查，经肉眼观察合格后方可使用，如有可见破损如钝化、缺口、凹陷或凿孔等应剔除。载体置于1 mol/L NaOH 溶液中浸泡约12 h，用去离子水反复冲洗3～4次，收集冲洗水加入2～3滴1%酚酞溶液，如酚酞变为粉红色，表明有 NaOH 残留，需要继续冲洗至酚酞不变色，晾干后密闭存放。将清洗后的载体放入试管中，加入去离子水至载体完全浸没，经压力蒸汽灭菌后，冷却至室温备用。

c) 操作方法：

1) 中和 I 组：分别选取 4 个无菌载体加入 10 mL 消毒剂溶液中，作用至规定时间后，用灭菌后的吊钩取出载体，轻触管壁去除多余消毒液，分别转移至 4 管含有 10 mL 中和剂培养液的试管中。向上述 4 管中和剂培养液中分别接种 0.1 mL 4 个稀释梯度（10^{-4}、10^{-5}、10^{-6}和 10^{-7}）的菌液，置 36 ℃±1 ℃ 恒温培养箱中培养 48 h；

2) 中和 II 组：重复上述实验步骤，载体在中和剂培养液中室温静置 30 min 后，用灭菌后的吊钩取出载体，轻触管壁去除多余液体，分别转移至 4 管含 10 mL 基础培养液的试管中。向上述 4 管培养液中分别接种 0.1 mL 4 个稀释梯度（10^{-4}、10^{-5}、10^{-6}和 10^{-7}）的菌液，置 36 ℃±1 ℃ 恒温培养箱中培养 48 h；

3) 阳性对照：未暴露于消毒剂的中和剂培养液和基础培养液各 4 管，分别接种 0.1 mL 4 个稀释梯度（10^{-4}、10^{-5}、10^{-6}和 10^{-7}）的菌液，置 36 ℃±1 ℃ 恒温培养箱中培养 48 h，作为阳性对照；

4) 阴性对照：中和剂培养液和基础培养液各 1 管加入无菌载体，不接种菌液，置 36 ℃±1 ℃ 恒温培养箱中培养 48 h，作为阴性对照。

5.1.5.3.6 评价规定

试验结果符合以下全部条件时，可判断所选中的中和剂肉汤合格：

a) 菌悬液计数最后二个稀释梯度（如 10^{-6} 和 10^{-7}），至少有一个稀释梯度的菌悬液的数量在 5 CFU/mL～100 CFU/mL 范围内；

b) 阳性对照中基础培养液管有菌生长表明试验菌、培养液性能良好，中和剂培养液管有菌生长表明中和剂对试验菌生长无明显影响，阴性对照中应无菌生长；

c) 中和 I 组：接种菌量较低（5 CFU/mL～100 CFU/mL）的中和剂培养液管中有菌生长，认定为中和剂可有效中和消毒剂，且中和产物对试验菌生长无明显影响。若无菌生长或仅在接种高浓度菌液的试管中生长表明未完全中和，或中和产物有抑菌作用，应进行中和 II 组试验；

d) 中和 II 组：接种菌量较低（5 CFU/mL～100 CFU/mL）的培养液中有菌生长认为中和有效；

e) 试验重复 3 次，每次试验均应符合以上条件。

5.1.6 过滤冲洗法去除残留消毒剂试验

5.1.6.1 目的

通过滤膜过滤和冲洗的方法，去除试验体系中的残留消毒剂，以便准确检测出试验体系中仍然存活的微生物及其数量。本方法可去除残留消毒剂对微生物的杀灭和抑制作用。

5.1.6.2 仪器设备或试剂材料

5.1.6.2.1 过滤设备：灭菌处理的滤器、微孔滤膜（孔径为 0.45 μm），真空泵（或抽滤泵）。

5.1.6.2.2 稀释液和冲洗液：应不影响滤膜的性质，对微生物无伤害作用。可用生理盐水、磷酸盐缓冲液（PBS）、稀释液（见附录 A）、含吐温 80 的 PBS、可中和部分消毒成分的中和剂。

5.1.6.2.3 其他器材随试验微生物确定。

5.1.6.3 试验设计原则

5.1.6.3.1 通过所设各组试验结果综合分析，应可确定所选方法是否对测试消毒剂有良好的去除作用，对试验微生物恢复和培养无不良影响。

5.1.6.3.2 试验中所用消毒剂的浓度应为杀菌试验中使用的最高浓度。

5.1.6.3.3 同一消毒剂拟对多种微生物进行杀灭试验时，所用中和剂应按微生物种类分别进行鉴定试验。细菌繁殖体可在大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌中任选其一进行试验；细菌芽胞、白色念珠菌、黑曲霉菌、分枝杆菌应分别进行鉴定试验；

5.1.6.3.4 当用其他特定微生物进行杀灭试验时，均应以该特定微生物进行中和剂的鉴定试验。

5.1.6.4 试验分组和操作方法

根据试验分组，准备足量试管和平皿，依次进行编号。将菌悬液用等量适合浓度的有机干扰物稀释成1×10^2 CFU/mL～5×10^2 CFU/mL，作为试验菌悬液。其试验分以下3组进行：

a) 第 1 组 吸取 1.0 mL 试验菌悬液于试管内，加入 4.0 mL 标准硬水，混匀。取 1.0 mL 加入到过滤器中，然后加入 50 mL 蒸馏水作冲洗过滤处理，然后直接将滤膜有菌面朝上贴于平板表面，放置在 36 ℃±1 ℃ 恒温培养箱中培养 48 h（真菌和芽胞培养 72 h），计数菌落数；

b) 第 2 组 吸取 0.2 mL 试验菌悬液直接加入到装有 150 mL～500 mL 冲洗液的过滤器中，第 1 次稀释过滤后，再用 50 mL 蒸馏水分 2 次冲洗过滤，最后将滤膜有菌面朝上贴于平板表面，放置在 36 ℃±1 ℃ 恒温培养箱中培养 48 h（真菌和芽胞培养 72 h），计数菌落数；

c) 第 3 组 吸取 4.0 mL 消毒剂于试管中，加入 0.5 mL 有机干扰物，再加入 0.5 mL 稀释液，混匀，取 1.0 mL 加入到过滤器中，加入 150 mL ～ 500 mL 冲洗液做第 1 次冲洗过滤处理，再加入 50 mL 冲洗液做第 2 次冲洗过滤处理，冲洗后吸取 0.2 mL 试验菌悬液直接加入到过滤器中，再加入 50 mL 冲洗液做第 3 次冲洗过滤处理，然后将滤膜有菌面朝上贴于平板表面，置 36 ℃±1℃ 恒温培养箱中培养 48 h（真菌和芽胞培养 72 h），计数菌落数。

5.1.6.5 评价规定

试验结果符合以下全部条件，可判为合格：

a) 第 1、2 和 3 组测定的结果，菌悬液菌数应为 20 CFU/滤膜～100 CFU/滤膜，其组间菌落数误差率不得超过 15%。组间菌落数误差率的计算见 5.1.5.1 中式（3）；

b) 试验重复 3 次，每次试验均应符合以上条件。

5.1.7 细菌杀灭试验

5.1.7.1 目的

在实验室内验证消毒剂对细菌繁殖体和细菌芽胞的消毒效果。

5.1.7.2 仪器设备或试剂材料

5.1.7.2.1 金黄色葡萄球菌（ATCC 6538）、铜绿假单胞菌（ATCC 15442）、大肠杆菌（8099）和枯草杆菌黑色变种（ATCC 9372）芽胞等微生物的悬液或菌片，可按实际情况，选择其他相应微生物。

5.1.7.2.2 消毒剂（作用浓度应以试验菌与消毒剂的混合液中有效成份的最终浓度为准）。

5.1.7.2.3 去除残留消毒剂的中和剂或设备。

5.1.7.2.4 标准硬水。

5.1.7.2.5 有机干扰物质：BSA 或 TSB，使用要求与 5.1.2.2.2 项相同。

5.1.7.2.6 TSA 培养基：见附录 A。

5.1.7.2.7 中和剂及中和剂肉汤（含中和剂的 TSB），经鉴定合格。

5.1.7.2.8 刻度吸管 （1.0 mL、2.0mL、5.0 mL、10.0mL）。

5.1.7.2.9 恒温水浴箱。

5.1.7.2.10 恒温培养箱。

5.1.7.2.11 电动混匀器。

5.1.7.2.12 秒表。

5.1.7.2.13 稀释液：胰蛋白胨生理盐水溶液（TPS），见附录 A。

5.1.7.3 试验分组

试验中应分以下各组：

a) 试验组：根据使用说明书，选定试验菌和一个消毒剂浓度（即产品使用说明书中指定的最低浓度）以及 3 个作用时间（说明书指定最短作用时间，指定最短作用时间的 0.5 倍，指定最短作用时间的 1.5 倍。如说明书指定最短作用时间为 20 min，则 3 个作用时间应分别为 10 min、20 min 和 30 min）进行试验；

b) 阳性对照组：用标准硬水代替消毒剂溶液，按上述同样的步骤进行试验。所得结果代表试验体系中的菌液浓度，以其作为对照组活菌浓度；

c) 阴性对照组：观察同次试验用相关试剂和培养基有无污染。

5.1.7.4 悬液定量杀菌试验（化学中和法）操作程序

5.1.7.4.1 按照 5.1.2 配制菌悬液，浓度为 1×10^8 CFU/mL～5×10^8 CFU/mL，试验前与牛血清白蛋白

（BSA）等体积混合成试验用菌悬液。（回收菌落数为 1×10^7 CFU/mL～5×10^7 CFU/mL）。

5.1.7.4.2 按照产品说明书要求配制消毒液。无特殊说明者，一律使用无菌标准硬水配制，配制的浓度为待测浓度的 1.25 倍（例如要评价的消毒液浓度为 200 mg/L，则应配制的浓度为 250 mg/L），置 20 ℃±1 ℃ 水浴备用。

5.1.7.4.3 取消毒试验用无菌试管，加入 1.0 mL 含 BSA 的菌悬液，置 20 ℃±1 ℃ 水浴中 5 min 后，用无菌吸管吸取上述浓度消毒液 4.0 mL 注入其中，迅速混匀并立即计时。

5.1.7.4.4 待试验菌与消毒剂相互作用至各设定时间，分别吸取 0.5 mL 试验菌与消毒剂混合液加于 4.5 mL 中和剂中，混匀。

5.1.7.4.5 各管试验菌与消毒剂混合液经加中和剂作用 10 min 后，分别吸取 1.0 mL 样液，按 5.1.3 进行活菌培养计数。

5.1.7.4.6 同时用标准硬水代替消毒液，进行平行试验，作为阳性对照。分别吸取稀释液与中和剂各 1.0 mL 于无菌平皿内，倾入上述试验同批次的培养基 15 mL～20 mL，作为阴性对照样本。

5.1.7.4.7 所有试验样本均置 36 ℃±1 ℃ 恒温培养箱中培养，对细菌繁殖体培养 48 h 观察最终结果；对细菌芽胞应培养 72 h 观察最终结果。

5.1.7.4.8 试验重复 3 次，计算各组的活菌浓度（CFU/mL），并换算为对数值（N），然后按式（4）计算杀灭对数值：

$$KL = N_o - N_x \quad (4)$$

式中：

KL——杀灭对数值；

N_o——对照组平均活菌浓度的对数值；

N_x——试验组活菌浓度对数值。

计算杀灭对数值时，取小数点后两位值，可进行数字修约。如消毒试验组平均生长菌落数小于 1 时，本文件规定此时的杀灭对数值，即为大于或等于对照组平均活菌浓度的对数值（$KL \geqslant N_o$）。

5.1.7.5 载体浸泡杀菌试验操作程序

5.1.7.5.1 载体浸泡定量杀菌试验

载体浸泡定量杀菌试验操作程序如下：

a) 按照 5.1.2.4 制备试验用菌片，使每个菌片的回收菌数为 1×10^6 CFU/片～5×10^6 CFU/片。

b) 取无菌平皿，标明所注入消毒液的浓度。按每片 5.0 mL 的量，吸取相应浓度的消毒剂溶液注入平皿中（吸管不易吸取的粘稠消毒剂可直接用无菌平皿按每片 5 g 的量称取样品）。

c) 将盛有消毒剂平皿置 20 ℃±1 ℃ 水浴 5 min，用无菌镊子取预先制备的菌片 3 片分别放入平皿中，并使之浸没于消毒液。

d) 待菌液与消毒剂相互作用至各设定时间，用无菌镊子将菌片取出分别移入含 5.0 mL 中和剂试管中。用电动混匀器混合 20 s，或将试管在手掌上振打 80 次，中和作用 10 min。混匀后，吸取 1.0 mL 直接接种平皿，每管接种 2 个平皿，按 5.1.3 进行活菌培养计数。

e) 以标准硬水代替消毒液，进行平行试验，其余试验步骤与上述试验组相同，此组作为阳性对照。分别吸取稀释液与中和剂各 1.0 mL 于无菌平皿内，倾入同批次的培养基 15 mL～20 mL，作为阴性对照样本。

f) 所有试验样本均在 36 ℃±1 ℃ 恒温培养箱中，对细菌繁殖体培养 48 h 观察最终结果；对细菌芽胞培养 72 h 观察最终结果。

g) 试验重复 3 次，计算各组的活菌量（CFU/片），并换算为对数值（N），然后按 5.1.7.4.8 式（4）计算杀灭对数值。

5.1.7.5.2 载体浸泡定性灭菌试验

载体浸泡定性灭菌试验操作程序如下：

a) 按照 5.1.2.4 制备试验用菌片，使每个菌片的回收菌落数为 1×10^6 CFU/片～5×10^6 CFU/片。

b) 取无菌平皿，标明所加入消毒液的浓度。按每片 5.0 mL 的量，吸取相应浓度的消毒剂溶液加入平皿中。

c) 将盛有消毒剂平皿置 20 ℃±1 ℃水浴 5 min，用无菌镊子取预先制备的菌片 6 片（每个时间 2 片）分别放入平皿中，并使之浸没于消毒液。

d) 待试验菌与消毒液相互作用至设定时间，用无菌镊子将菌片取出分别移入 5.0 mL 含中和剂的 TSB 试管中。用电动混匀器混合 20 s，作为试验组样本。

e) 另取一平皿，加入 20.0 mL 标准硬水代替消毒液，放入 4 片菌片，作用至设定时间，取出 2 片，分别移入含 5.0 mL 含中和剂的 TSB 试管中，其随后的试验步骤与上述试验组相同，作为阳性对照组样本。另取出 2 片，分别移入含 5.0 mL 稀释液的试管中，按 5.1.3 进行活菌培养计数，作为菌数对照组样本。

f) 分别取含 5.0 mL TSB 的试管与含 5.0 mL 中和剂 TSB 的试管各一支，置恒温培养箱中培养，此样本作为阴性对照。

g) 所有试验样本均在 36 ℃±1 ℃ 恒温培养箱中培养。试管中的肉汤培养 7 d 观察最终结果，芽胞计数平板培养 72 h，观察最终结果。

h) 试验重复 5 次。

5.1.7.6 流动浸泡载体定量杀灭试验操作程序

5.1.7.6.1 按照 5.1.2.4 制备试验用菌片，使每个菌片的回收菌落数为 1×10^6 CFU/片～5×10^6 CFU/片。

5.1.7.6.2 开启消毒设备，待产生的消毒剂中有效成分处于稳定状态时，进行杀灭试验。

5.1.7.6.3 取尼龙网片或不锈钢网片放 250 mL 烧杯底部中央，将染菌载体放于尼龙网片或不锈钢网片表面，染菌载体上再盖一尼龙网片或不锈钢网片。将消毒剂通过管路沿烧杯壁流下，流动浸泡消毒至设定时间，用无菌镊子将染菌载体取出分别移入一含 5.0 mL 中和剂试管中，按 5.1.3 进行活菌培养计数，作为试验组样本。

5.1.7.6.4 另取两个染菌载体放入 250 mL 烧杯中，放置方法与试验组相同。以脱氯自来水或纯水代

替消毒剂，在相同流量下流动浸泡至最长作用时间，其余步骤与试验组相同，作为阳性对照组样本。

5.1.7.6.5 分别吸取稀释液与中和剂各 1.0 mL 于无菌平皿内，倾入上述试验同批次的培养基 15 mL～20 mL，作为阴性对照样本。

5.1.7.6.6 所有试验样本均在 36 ℃±1 ℃ 恒温培养箱中培养，对细菌繁殖体培养 48 h 观察最终结果；对细菌芽胞培养 72 h 观察最终结果。

5.1.7.6.7 试验重复 3 次，计算各组的活菌量（CFU/片），并换算为对数值（N），然后按 5.1.7.4 .8 式（4）计算杀灭对数值。

5.1.7.7 悬液定量杀菌试验（稀释过滤法）操作程序

5.1.7.7.1 菌悬液的制备和定量杀菌试验同 5.1.7.4.1、5.1.7.4.2 和 5.1.7.4.3。

5.1.7.7.2 滤膜孔径 0.45 μm。

5.1.7.7.3 待试验菌与消毒剂（分别预先置 20 ℃±1 ℃水浴中 5 min）相互作用至各设定时间，分别吸取 1.0 mL 试验菌与消毒剂混合液加入到装有 150 mL～500mL 冲洗液的过滤器中，稀释过滤后，再用 50 mL 冲洗液分 3 次冲洗过滤，然后将滤膜有菌面朝上贴于平板表面，置 36 ℃±1 ℃ 恒温培养箱中培养至规定时间。

5.1.7.7.4 吸取 1.0 mL 含 BSA 的试验菌悬液于试管，再加入 4.0 mL 标准硬水，混匀。做 10 倍系列稀释后取适当稀释度 1.0 mL 加入到过滤器中，然后加入 50 mL 蒸馏水作冲洗过滤处理，然后将滤膜有菌面朝上贴于平板表面，置 36 ℃±1 ℃ 恒温培养箱中培养至规定时间，计数菌落数，作为阳性对照。

5.1.7.7.5 分别吸取稀释液、蒸馏水和硬水各 1.0 mL 于无菌平皿内，倒入上述试验同批次的培养基 15 mL～20 mL，置 36 ℃±1 ℃ 恒温培养箱中培养至规定时间，计数菌落数，作为阴性对照。

5.1.7.7.6 试验重复 3 次，计算各组的活菌量（CFU/mL 或 CFU/片），并换算为对数值（N），然后按 5.1.7.4.8 式（4）计算杀灭对数值。

5.1.7.8 评价规定

5.1.7.8.1 要求按产品说明书指定的浓度与 3 个作用时间，试验重复 3 次。在产品指定最低浓度与最短作用时间，以及最短作用时间的 1.5 倍时，要求悬液定量杀灭试验中各次的杀灭对数值均 ≥5.00。载体浸泡定量杀灭试验和流动浸泡载体定量杀灭试验中，各次的杀灭对数值均 ≥3.00，判定为消毒合格。在产品指定浓度与最短作用时间的 0.5 倍时，可允许对不同细菌或在部分重复次数中，出现不合格结果。

5.1.7.8.2 对载体浸泡定性灭菌试验，阳性对照组有菌生长，菌数对照组符合要求，阴性对照组无菌生长，5 次试验均无菌生长，判定为灭菌合格。

5.1.7.8.3 报告中应将各次试验的结果全部以表的形式列出。阳性对照组应列出各次试验菌浓度，以及平均试验菌浓度。试验组应列出杀灭对数值，例如，杀灭对数值大于或等于 5.00 时，可表示为 ≥5.00 而不必列出具体的数字；杀灭对数值小于 5.00 时，应列出具体的数字（例如 2.58，4.65）。

5.1.7.9 注意事项

5.1.7.9.1 在杀菌试验中，每次均应设置阳性对照。

5.1.7.9.2 试验中所使用的中和剂、稀释液和培养基等，各批次均应进行无菌检查，发现有菌生长，则全部试验重做。

5.1.8 分枝杆菌杀灭试验

5.1.8.1 目的

在实验室内验证消毒剂对分枝杆菌的消毒效果。

5.1.8.2 仪器设备或试剂材料

5.1.8.2.1 试验菌株：龟分枝杆菌脓肿亚种（CMCC（B）93326 或 ATCC 19977）。

5.1.8.2.2 培养基：分枝杆菌培养基。

5.1.8.2.3 有机干扰物质：BSA 或 TSB，使用要求与 5.1.2.2.2 项相同。

5.1.8.2.4 中和剂（根据 5.1.5 所示方法鉴定合格者）。

5.1.8.2.5 稀释液：TPS，见附录 A。

5.1.8.2.6 标准硬水：见附录 A。

5.1.8.2.7 恒温培养箱。

5.1.8.2.8 刻度吸管（0.1 mL、1.0 mL、5.0 mL）。

5.1.8.2.9 恒温水浴箱。

5.1.8.2.10 电动混匀器。

5.1.8.2.11 计时装置。

5.1.8.3 龟分枝杆菌脓肿亚种菌悬液的制备

5.1.8.3.1 以无菌操作方式开启冻干菌种管，用毛细吸管吸加适量营养肉汤于管中，吹吸数次，使菌种溶化分散。取含 5.0 mL～10.0 mL 营养肉汤的试管，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，划线接种于分枝杆菌培养基平板上，置 36 ℃±1 ℃ 培养 72 h。挑取上述第 2 代培养物中典型菌落，接种于分枝杆菌培养基斜面，置 36 ℃±1 ℃ 培养 72 h，即为第 3 代培养物。密封后，4 ℃ 保存，时间不超过 6 周。

5.1.8.3.2 试验时，取第 3 代斜面培养物在分枝杆菌干燥培养基斜面上按上述方法连续传代，取第 5～6 代的分枝杆菌培养基斜面 72 h 培养物，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。用吸管将洗液移至另一含有 6 g～7 g 玻璃珠的无菌圆锥底塑料试管中，在电动混匀器混合 5 min，将菌液吸入到另一试管内制成菌悬液。

5.1.8.3.3 将制成的菌悬液，进行活菌培养计数（见 5.1.3），按其结果用稀释液稀释至所需浓度。

5.1.8.3.4 菌悬液保存在 4 ℃ 冰箱内备用，当天使用。

5.1.8.4 试验分组

试验分为下列各组：

a) 试验组，按 5.1.7.3 规定，选定消毒剂浓度与作用时间。

b） 阳性对照组，以标准硬水代替消毒剂溶液，按 5.1.7.3 规定程序进行试验，所得结果代表试验体系中所含受试菌的活菌浓度。

c） 阴性对照组，观察同次试验用相关溶液和培养基有无污染。

5.1.8.5 试验程序

常用杀灭试验有：悬液定量杀灭试验、载体浸泡定量杀灭试验和流动浸泡载体定量杀菌试验等。其操作程序按 5.1.7.4、5.1.7.5 和 5.1.7.6 进行，接种后的平皿应放入干净的塑料袋内，置36 ℃±1 ℃ 恒温培养箱中培养7 d，观察最终结果。

5.1.8.6 评价规定

5.1.8.6.1 悬液试验时，回收菌量为 1×10^6 CFU/mL～5×10^6 CFU/mL。载体试验时，回收菌量为 1×10^6 CFU/片～5×10^6 CFU/片。

5.1.8.6.2 按产品使用说明书指定的使用浓度和 3 个作用时间，试验重复 3 次。

5.1.8.6.3 用悬液定量杀菌试验评价杀菌效果时，在产品规定使用浓度与最低作用时间，以及最短作用时间的 1.5 倍时，各次试验的杀灭对数值均应≥4.00，在产品规定使用浓度与最短作用时间的 0.5 倍时，允许杀灭对数值＜4.00，判定为实验室试验该产品对分枝杆菌污染物消毒的有效剂量。

5.1.8.6.4 用载体浸泡定量杀菌试验评价杀菌效果时，在产品规定使用浓度与最短作用时间和最短作用时间的 1.5 倍时，各次试验的杀灭对数值应≥3.00，在产品规定使用浓度与最短作用时间的 0.5 倍时，允许杀灭对数值＜3.00，判为实验室试验该产品对分枝杆菌污染物消毒的有效剂量。

5.1.9 真菌杀灭试验

5.1.9.1 目的

在实验室内验证消毒剂对真菌的消毒效果。

5.1.9.2 试剂或材料

5.1.9.2.1 试剂

麦芽浸膏琼脂、沙堡液体琼脂培养基、试验菌及其菌悬液或菌片（白色念珠菌 ATCC 10231 和黑曲霉菌 ATCC 16404 孢子悬液与菌片。按 5.1.9.3.1和 5.1.9.3.2所示方法制备。根据消毒剂特定用途和特殊需要，可选择相应的菌株。中和剂 （根据5.1.5 所示方法鉴定合格者）、稀释液 TPS、标准硬水、有机干扰物BSA或TSB（使用要求与5.1.2.2.2相同）（见附录A）。

5.1.9.2.2 设备及材料

刻度吸管 （0.1mL、1.0mL、2.0mL、5.0mL、10.0mL）、恒温水浴箱、电动混匀器、计时装置、恒温培养箱。

5.1.9.3 真菌悬液制备

5.1.9.3.1 白色念珠菌悬液或菌片的制备程序

白色念珠菌悬液或菌片的制备程序如下：

a) 以无菌操作方式开启冻干菌种管，用毛细吸管吸加适量沙堡液体培养基于菌种管中，轻轻吹吸，使菌种沉淀物溶化分散。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，置 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，置 36 ℃±1 ℃ 培养 18 h～24 h，即为第 3 代培养物。

b) 取第 3 代～第 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 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，用电动混匀器混合 20 s，或在手掌上振打 80 次，以使白色念珠菌悬浮均匀。

c) 悬液定量杀灭试验时，菌悬液浓度为 1×10^7 CFU/mL～5×10^7 CFU/mL，试验前与牛血清白蛋白等体积混合成试验用菌悬液（回收菌量为 1×10^6 CFU/mL～5×10^6 CFU/mL）；载体定量杀菌试验时，菌片制备按 5.1.2.4 要求进行（回收菌量为 1×10^6 CFU/片～5×10^6 CFU/片）。

d) 菌悬液保存在 4 ℃ 冰箱内备用，当天使用。

e) 怀疑有污染时，应以菌落形态、革兰染色与生化试验等方法进行鉴定。

5.1.9.3.2 黑曲霉菌孢子悬液或菌片的制备程序

黑曲霉菌孢子悬液或菌片的制备程序如下：

a) 以无菌操作方式开启冻干菌种管，用毛细管吸取少量麦芽浸膏营养肉汤培养基加到菌种管中，轻轻吹吸，使菌种沉淀物溶化分散。取少许沉淀物悬液加到含 5.0 mL 麦芽浸膏营养肉汤培养基试管中，置 30 ℃±1 ℃ 恒温培养箱中培养 42 h～48 h。用接种环划线接种第 1 代培养物于麦芽浸膏培养基平板，置 30 ℃±1 ℃ 恒温培养箱中培养 42 h～48 h。取平板培养物中的典型菌落，接种于麦芽浸膏营养肉汤培养基，置 30 ℃±1 ℃ 恒温培养箱中培养 42 h～48 h，即为第 3 代培养物。

b) 用 10.0 mL 吸管吸取 5.0 mL～10.0 mL 第 3 代培养物，接种罗氏瓶，并摇动使菌液布满麦芽浸膏培养基表面，将多余肉汤培养物液体吸出，置 30 ℃±1 ℃ 恒温培养箱中培养 42 h～48 h。

c) 向罗氏瓶培养物中加入 5.0 mL～10.0 mL 0.05%（V/V）吐温 80 生理盐水溶液，刮洗黑曲霉菌分生孢子于溶液中，将孢子悬液移入装有玻璃珠的三角瓶中，轻轻振摇 1 min 后，过滤除去菌丝后，显微镜下（400 倍）观察是否仍有菌丝存在，若有可经 5000 r/min～6000 r/min 离心 20 min。再次在显微镜下（400 倍）观察，必要时重复上述步骤。

d) 黑曲霉菌分生孢子悬液在 2 ℃～8 ℃ 储存不能超过 2d，使用前，混合均匀，在显微镜下（400 倍）观察是否有孢子出芽，若有则不得使用。

e) 悬液法试验时，先制成浓度为 1×10^7 CFU/mL～5×10^7 CFU/mL 的孢子悬液，试验前再与等量的 BSA 相混合，制成试验用孢子悬液（回收菌量为 1×10^6 CFU/mL～5×10^6 CFU/mL）。

f） 菌片以滴染法制备，先制成浓度为 2×10^{8} CFU/mL～1×10^{9} CFU/mL 的孢子悬液，试验前再与等量的 BSA 相混合，制成试验用孢子悬液，每片加 10 μL 孢子悬液，晾干备用（回收菌量应达 1×10^{6} CFU/片～5×10^{6} CFU/片）。

5.1.9.4 试验分组

试验分为下列各组：

a） 试验组，按 5.1.7.3 规定，确定消毒剂浓度与作用时间，对受试菌种的杀灭能力进行测定。

b） 阳性对照组，以标准硬水代替消毒剂溶液，按 5.1.7.3 规定程序进行试验，所得结果代表试验体系中所含试验菌的活菌浓度。

c） 阴性对照组，观察同次试验用相关溶液和培养基有无污染。

5.1.9.5 试验程序

悬液定量杀菌试验、载体浸泡定量杀菌试验的操作程序均见5.1.7。白色念珠菌使用沙堡琼脂培养基，黑曲霉菌使用麦芽浸膏琼脂。

活菌培养计数时，白色念珠菌在36 ℃±1 ℃ 恒温培养箱中培养72 h 观察最终结果。黑曲霉菌在30 ℃±1 ℃ 恒温培养箱中培养72 h 观察最终结果。

5.1.9.6 评价规定

按产品使用说明书指定的使用浓度和3个作用时间，试验重复3次，在产品规定使用浓度与最短作用时间，以及最短作用时间的1.5倍时，各次试验的杀灭对数值应≥4.00，判定为消毒合格。

用载体浸泡定量杀菌试验评价杀菌效果时，在产品规定使用浓度与最短作用时间，以及最短作用时间的1.5倍时，各次试验的杀灭对数值应≥3.00，判定为消毒合格。

5.1.9.7 注意事项

5.1.9.7.1 黑曲霉菌试验操作应在专门的生物安全Ⅱ级实验室内进行，避免造成环境污染和操作者受污染。

5.1.9.7.2 其他注意事项见 5.1.7.9。

5.1.10 病毒灭活试验

5.1.10.1 目的

评价消毒因子对病毒的灭活效果。

5.1.10.2 仪器设备或试剂材料

5.1.10.2.1 试验用病毒株：脊髓灰质炎病毒Ⅰ型（poliovirus-Ⅰ，PV-Ⅰ）疫苗株；艾滋病病毒 1 型（human immunodeficiency virus，HIV-1）美国株。

5.1.10.2.2 宿主细胞可采用 VERO 细胞系、BGM 细胞、L20B、Hela 细胞系或 FL 细胞系，作为 PV-Ⅰ的测试细胞。用含有人 T 淋巴细胞白血病病毒 1 型（human T cell leukemiavirus 1，HTLV-1）基因的

人淋巴细胞（MT4 株）作为HIV-1的测试细胞。

5.1.10.2.3 细胞培养瓶。

5.1.10.2.4 96孔培养板。

5.1.10.2.5 恒温水浴箱。

5.1.10.2.6 二氧化碳培养箱（36 ℃±1 ℃，5%CO_2）。

5.1.10.2.7 二级生物安全柜。

5.1.10.2.8 低温冰箱（-20 ℃，-80 ℃）。

5.1.10.2.9 液氮罐。

5.1.10.2.10 倒置显微镜。

5.1.10.2.11 低温高速离心机。

5.1.10.2.12 可调移液器及配套一次性塑料吸头。

5.1.10.2.13 细胞培养液（无血清）、细胞维持液（2%血清）、细胞生长液（10%血清）。

5.1.10.2.14 胰蛋白酶。

5.1.10.2.15 纯化水、标准硬水见附录A。

5.1.10.2.16 有机干扰物BSA。

5.1.10.2.17 小牛血清或新生牛血清。

5.1.10.3 病毒悬液的制备

5.1.10.3.1 用镊子从液氮或-70 ℃以下冰箱中取出细胞冻存管，立即放入盛有37 ℃～40 ℃温水的烧杯中，搅动，待完全解冻取出冻存管，用75%酒精棉球擦洗表面，用吸管将细胞悬液缓慢地滴入含有足量细胞生长液的细胞培养瓶中，置于二氧化碳培养箱过夜，次日更换新鲜的细胞生长液继续培养，做好记录。逐日观察细胞生长情况，在细胞长满单层时，用于传代或消毒试验。

5.1.10.3.2 取出超低温冻存的病毒，室温融化，用细胞培养液作10倍稀释，然后全部接种于已长满单层细胞的细胞瓶内，置于二氧化碳培养箱，吸附1h～2h，吸出病毒悬液，加入细胞维持液，置于二氧化碳培养箱。待75％的细胞出现病变时，收获病毒。

5.1.10.3.3 将含有病毒及宿主细胞的培养液，在冰浴条件下用超声波，或室温与-20 ℃反复冻融3次，或其他相应的方法，破碎宿主细胞，释放病毒，离心（6000 r/min，15 min）去除沉淀（主要为细胞碎片），上清液即为所需的病毒悬液，将病毒悬液每管1.0 mL 分装于冻存管（1.5 mL）中。

5.1.10.3.4 取1支病毒悬液，按病毒滴度测定法，测定其病毒滴度。其余置 -80 ℃冷冻保存备用。

5.1.10.3.5 取出低温保存的病毒，室温融化，与有机干扰物（病毒悬液中BSA终浓度为1.5％或0.15％）混合，制备成试验用病毒悬液，备用。

5.1.10.4 病毒载体的制备

5.1.10.4.1 按5.1.2.4制备载体。

5.1.10.4.2 取出低温冻存的病毒悬液，室温融化，与有机干扰物（病毒悬液中BSA终浓度为1.5％或0.15％）混合，取10 μL 滴染于载体上，室温晾干后备用。

5.1.10.5 病毒滴度测定

5.1.10.5.1 操作步骤

用细胞培养液对样本做10倍梯度稀释，每个稀释度在细胞板上加4孔（各孔中已长满单层的宿主细胞），置于二氧化碳培养箱1 h～2 h后更换细胞维持液继续培养，逐日在显微镜下观察细胞病变，连续观察3 d～5 d，逐孔记录细胞病变情况。

5.1.10.5.2 病毒滴度的计算

病毒滴度以半数细胞感染剂量（$TCID_{50}$）表示，$TCID_{50}$的对数值按公式（5）计算：

$$M = N + O \quad (5)$$

式中：

M——$TCID_{50}$ 对数值；

N——病变率高于50%组稀释度的对数值；

O——距离比例。

具体计算步骤如下：

a) 计算细胞病变率。先计数培养板上不同稀释度样本细胞病变发生与未发生的孔数，然后分别计算“细胞病变（-）”和“细胞病变（+）”的累积总计值。计算“细胞病变（-）”累积值时，由稀释度低样本组向稀释度高样本组累积；计算“细胞病变（+）”累积值由稀释度高样本组向稀释度低样本组累积（见表 2 ）。各稀释度样本组“细胞病变（+）”累积总计值，除以该稀释度样本组“细胞病变（-）”与“细胞病变（+）”累积总计值之和即为其病变比，由之可得病变率（%）（见表 2 ）。

b) 计算距离比例。距离比例可按公式（6）计算：

$$O = \frac{P - 50}{P - Q} \quad (6)$$

式中：

O——距离比例；

P——高于50%组的病变率；

Q——低于50%组的病变率。

注：病变率高于 50% 组是指病变率超过50%的最低稀释组，以下简称高于 50% 组；病变率低于50% 组是指病变率低于 50% 的最高稀释组，以下简称低于 50% 组。

计算举例：设试验数据如表2。

表2 某消毒剂对 HIV 灭活作用的测定结果

样本	接种	细胞病变		累积值		病变比	病变率（%）
稀释度	孔数	-	+	细胞病变（-）	细胞病变（+）		
10^{-4}	4	0	4	0	12	12/12	100
10^{-5}	4	0	4	0	8	8/8	100

10^{-6}	4	1	3	1	4	4/5	80
10^{-7}	4	3	1	4	1	1/5	20
10^{-8}	4	4	0	8	0	0/8	0

本例，高于50%组病变率（%）为80；低于50%病变率（%）为20；高于50%组稀释度对数值为6。

距离比例=（80-50）/(80-20)=0.5

$TCID_{50}$对数值= 6＋0.5 = 6.5

5.1.10.6 残留消毒剂中和稀释法的鉴定试验

5.1.10.6.1 目的

确定所选中和剂是否适用于拟进行的细胞感染法病毒灭活试验。

5.1.10.6.2 试验设计原则

试验设计原则如下：

a) 通过所设各组试验结果综合分析，应可确定所用中和剂是否对测试消毒因子有良好的中和作用，对试验用病毒株和细胞株是否有害或不良影响；

b) 根据试验目的，选择适宜的病毒株和细胞株；

c) 中和试验用消毒剂浓度应为最高使用浓度，最短作用时间不得少于 30 s。

5.1.10.6.3 中和剂和中和产物对细胞的影响试验

中和剂和中和产物对细胞的影响试验如下：

第1组：将中和剂作10倍系列稀释，分别取不同稀释度的中和剂接种长满单层细胞的细胞板中，每个稀释度接种4孔，每孔接种0.1 mL，置二氧化碳培养箱内2 h，用显微镜观察经中和剂处理后的细胞形态的变化。将中和剂全部吸出，其中两孔接种细胞维持液，另两孔接种病毒悬液。置二氧化碳培养箱内18 h～24 h，用显微镜观察细胞形态的变化以及细胞被正常病毒感染的情况。该组是观察不同稀释度的中和剂对细胞形态的影响及经中和剂处理后的细胞被正常病毒感染的情况。

第2组：将中和产物（悬液法中和产物制备方法：0.9 mL中和剂＋0.08 mL消毒剂溶液+0.02 mL细胞维持液；载体法中和产物制备方法：1.0 mL中和剂＋1片浸过消毒剂的载体）作10倍系列稀释，分别取不同稀释度的中和产物接种长满单层细胞的细胞板中，每个稀释度接种4孔，每孔加0.1 mL，置二氧化碳培养箱内2 h，用显微镜观察经中和产物处理后的细胞形态的变化。将中和产物全部吸出，其中两孔接种细胞维持液，另两孔接种病毒悬液。置二氧化碳培养箱内18 h～24 h，用显微镜观察细胞形态的变化以及细胞被正常病毒感染的情况。该组是观察不同稀释度的中和产物对细胞形态的影响及经中和剂处理后的细胞被正常病毒感染的情况。

第3组：将病毒悬液接种于未处理细胞，以观察病毒是否可正常生长。

第4组：将未接种病毒的细胞进行培养，观察其生长是否正常。

3 d～5 d 记录试验结果。试验重复3次。

5.1.10.6.4 中和剂和中和产物对病毒的影响试验

a) 试验分组如下：

第1组：中和剂 + 病毒悬液；

第2组：（中和剂 + 消毒剂）+ 病毒悬液；

第3组：细胞维持液 + 病毒悬液；

第4组：未接种病毒的细胞。

b) 病毒悬液定量法中和剂鉴定试验操作程序如下：

1) 消毒剂的配制：用标准硬水配制作用浓度 1.25 倍的消毒剂溶液，备用。

2) 病毒悬液的配制：按 5.1.10.3 制备试验用病毒悬液。

3) 中和剂鉴定试验分以下 4 组：

第 1 组：吸取0.98 mL中和剂溶液于试管内，置20 ℃±1 ℃水浴5 min，加入0.02 mL 病毒悬液，混匀，作用10 min，用细胞培养液作10倍系列稀释，选取后4个稀释度分别接种于已形成单层细胞的培养板上，每个稀释度种4孔，每孔接种0.1 mL，吸附2 h，更换细胞维持液，置二氧化碳培养箱内培养。观察经中和剂作用后的病毒对细胞感染滴度的影响。

第 2 组：吸取0.98 mL中和产物（0.9 mL中和剂＋0.08 mL消毒剂溶液）于试管内，置20 ℃±1 ℃水浴5 min，再吸加0.02 mL 病毒悬液，混合均匀，作用10 min，用细胞培养液作10倍系列稀释，选取后4个稀释度分别接种于已形成单层细胞的培养板上，每个稀释度种4孔，每孔接种0.1 mL，吸附2 h，更换细胞维持液，置二氧化碳培养箱内培养。观察经中和产物作用后的病毒对细胞感染滴度的影响。

第 3 组：吸取0.98 mL细胞维持液于试管内，置20 ℃±1 ℃水浴5 min，再吸加0.02 mL 病毒悬液，混合均匀，作用10 min，用细胞培养液作10倍系列稀释，选取后4个稀释度分别接种于已形成单层细胞的培养板上，每个稀释度种4孔，每孔接种0.1 mL，吸附2 h，更换维持液，置二氧化碳培养箱内培养。观察病毒是否可正常生长，该组为阳性对照组。

第 4 组：吸取细胞维持液加到已形成单层细胞的细胞板上，共加4孔，每孔0.2 mL，置二氧化碳培养箱内培养3 d～5 d，记录试验结果。观察细胞能否正常生长，该组为阴性对照组。

4) 将第 1～3 组样本进行病毒滴度测定，观察第 4 组细胞生长情况。3 d～5 d 记录试验结果。

5) 试验重复 3 次。

c) 病毒载体定量中和剂鉴定试验操作程序如下：

1) 按 5.1.10.4 制备染毒载体。

2) 中和剂鉴定试验分以下 4 组：

第 1 组：吸取中和剂1.0 mL 于无菌试管中，将其置20 ℃±1 ℃ 水浴5 min，用无菌镊子取1片病毒载体片浸入中和剂内，作用10 min，用细胞培养液做10倍系列稀释，选取后4个稀释度分别接种于已形成单层细胞的培养板上，每个稀释度种4孔，每孔接种0.1 mL，吸附2 h，更换维持液，置二氧化碳培养箱内培养。

第 2 组：吸取中和产物溶液（以浸有消毒剂的载体置1.0 mL 中和剂内，作用10 min） 1.0 mL 于无菌试管中，将其置20 ℃±1 ℃ 水浴5 min，用无菌镊子取1片病毒载体片浸入中和产物溶液中，作用10min，用细胞培养液做10倍系列稀释，选取后4个稀释度分别接种于已形成单层细胞的培养板上，每个稀释度种4孔，每孔接种0.1 mL，吸附2 h，更换维持液，置二氧化碳培养箱内培养。

第 3 组：吸取细胞维持液1.0 mL 于无菌试管中，将其置20 ℃±1 ℃ 水浴5 min，用无菌镊子取1片病毒载体片浸入细胞维持液中，作用10 min，用细胞培养液做10倍系列稀释，选取后4个稀释度分别接种于已经形成单层细胞的培养板上，每个稀释度种4孔，每孔接种0.1 mL，吸附2 h，更换维持液，置二氧化碳培养箱内培养。

第 4 组：吸取细胞维持液加到已形成单层细胞的细胞板上，共加4孔，每孔0.2 mL，置二氧化碳培养箱内培养。

3) 将第 1～3 组样本进行病毒滴度测定，观察第 4 组细胞生长情况。3 d～5 d 记录试验结果。

4) 试验重复 3 次。

5.1.10.6.5 评价规定

3次试验结果均符合以下全部条件，所测中和剂可判为合格：

a) 经中和剂和中和产物处理的细胞形态正常，且接种病毒后细胞出现细胞病变。

b) 第 1～3 组病毒滴度的误差率小于 15%，悬液定量法对照组病毒滴度对数值为≥4.00，载体法对照组病毒滴度对数值为≥3.00。第 4 组细胞生长正常。

c) 补充说明：一般情况下，当中和剂和中和产物对细胞和病毒均无影响时，才可判定该所选中和剂合格。但对于醛类、季铵盐类等所形成的中和产物对细胞毒性较大时，所选中和剂及中和产物对试验病毒无影响，中和产物从第 2 个稀释度 （10^{-2}）起对细胞无影响，且用于试验的病毒悬液滴度≥7.00 时，所选中和剂也可使用。

5.1.10.7 残留消毒剂物理去除方法的鉴定试验

病毒灭活试验中的物理去除法，首选稀释离心法，其次为稀释超滤管法。

5.1.10.7.1 分组

分组如下：

a) 病毒悬液 + 除药处理；

b) 消毒剂+病毒悬液+ 除药处理；

c) 病毒悬液；

d) 未接种病毒的细胞。

5.1.10.7.2 悬液定量操作程序

a) 按 5.1.10.3 制备病毒悬液。消毒剂用标准硬水按规定浓度 1.25 倍配制备用。

b) 鉴定试验分以下 4 组：

第 1 组：吸取0.08 mL的细胞维持液与0.02 mL的试验用病毒悬液分别加到含有2 mL～10 mL稀释液的离心管（或超滤管）中，随后做除药处理，最终回收（浓缩）样液量为1 mL。吸取最终样液进行病毒滴度测定。

第 2 组：在含有2 mL～10 mL稀释液的离心管（或超滤管）中加入0.08 mL的消毒剂，混匀后再加入0.02 mL的试验用病毒悬液，混匀，随后做除药处理，最终回收（浓缩）样液量为1 mL。吸取最终样液进行病毒滴度测定。

第 3 组：吸取0.02 mL的试验用病毒悬液，加到含0.98 mL细胞维持液的试管中，混匀后直接进行病毒滴度测定。

第 4 组：将未接种病毒的细胞板内，换为细胞维持培养液进行正常培养。

c) 将第 1～3 组样本进行病毒滴度测定，同时观察第 4 组细胞生长情况。3 d～5 d 记录试验结果。

d) 试验重复 3 次。

5.1.10.7.3 评价规定

3次试验结果均符合以下全部条件，所用物理除药法可判为合格：

a) 第 1～3 组病毒滴度的误差率小于 15%；

b) 第 4 组细胞生长正常。

5.1.10.8 脊髓灰质炎病毒灭活试验

5.1.10.8.1 目 的

验证各种消毒因子对病毒的灭活效果。

5.1.10.8.2 悬液定量灭活试验

操作程序如下：

a) 按 5.1.10.3 制备病毒悬液；

b) 取待测消毒剂，用灭菌硬水稀释至说明书设定的作用浓度的 1.25 倍，置 20 ℃±1 ℃ 水浴中备用；

c) 取 0.2 mL 病毒悬液加入无菌试管内，置 20 ℃±1 ℃ 水浴 5 min，加入 0.8 mL 消毒剂样品混匀，作用至设定时间，取 0.1 mL 加入到 0.9 mL 的中和剂中混匀，用细胞培养液做 10 倍系列稀释，进行病毒滴度测定；

d) 阳性（病毒）对照组试验中，除用细胞培养液代替消毒剂外，其他操作同试验组；

e) 试验重复 3 次。

5.1.10.8.3 载体定量灭活试验

操作程序如下：

a) 按 5.1.10.4 制备病毒载体；

b) 取待测消毒剂，用灭菌硬水稀释至说明书设定的作用浓度，于 20℃±1℃ 水浴中备用；

c) 取无菌平皿，按每片 5.0 mL 的量，吸取消毒液加入平皿中；

d) 将平皿置 20 ℃±1 ℃ 水浴 5 min 后，用无菌镊子分别取病毒载体片浸没于消毒液中；

e) 作用至设定时间，取出载体片分别移入含 1.0 mL 的中和剂试管中。振打 80 次，进行病毒滴度测定；

f) 直接将病毒载体片加到 1.0 mL 细胞培养液的试管中，振打 80 次，进行病毒滴度测定，作为阳性对照组；

g) 试验重复 3 次。

5.1.10.8.4 结果计算

灭活对数值按公式（7）计算：

$$K = \lg N_0 - \lg N_x \quad (7)$$

式中：

K——灭活对数值；

N_0——阳性（病毒）对照组平均病毒感染滴度（$TCID_{50}$）；

Nx——试验（消毒）组平均病毒感染滴度（$TCID_{50}$）。

5.1.10.8.5 评价规定

试验结果判定如下：

a) 悬液定量杀灭试验中，灭活对数值≥4.00，阳性对照组病毒滴度对数值≥5.00 时，可判断为消毒合格；

b) 载体定量灭活试验中，灭活对数值≥3.00，阳性对照组病毒滴度对数值≥4.00 时，可判断为消毒合格。

5.1.10.9 艾滋病病毒灭活试验

5.1.10.9.1 目 的

测定消毒剂对艾滋病病毒灭活所需的剂量，以验证对该病毒污染物消毒的实用剂量。

5.1.10.9.2 原理

用细胞感染法测定消毒剂作用前后（或试验组与对照组）样本中 HIV 的量。以细胞病变作为判断指标，确定各组病毒的感染滴度，计算消毒剂对 HIV 的灭活对数值。

5.1.10.9.3 安全防护

试验中要求采取严密防护措施。我国规定所有接触 HIV 的试验均应在生物安全三级（biological safety level 3，BSL 3）实验室内进行，并制定有相应的安全防护措施。在 HIV 灭活试验时，应严格按照有关安全规定进行。

5.1.10.9.4

分组如下：

a) 试验组根据所测消毒剂对其他微生物的杀灭或灭活剂量估计，设立适宜的浓度与作用时间组（不少于 1 个浓度，3 个作用时间），对作用时间的设计应不短于 30s。所设组应能测出使 HIV 全部灭活所需的最低有效剂量（药物浓度与作用时间）；

b) 阳性对照组用细胞维持液代替消毒剂，按试验组规定步骤加入 HIV 悬液进行试验和培养，观察 HIV 生长是否良好；

c) 阴性对照组用不含 HIV 的完全培养基作为阴性对照，观察所用培养基有无污染，细胞是否生长良好；

d) 消毒剂对细胞毒性组取系列稀释的不同浓度的待测消毒剂各 100 μL，分别加入含有 100 μL 用完全培养基制备的 MT4 细胞悬液（含细胞 400 000 个/mL）的 96 孔培养板内。置二氧化碳培养箱中培养 7 d，观察细胞生长情况，确定对细胞无毒性的消毒剂最高稀释度。

5.1.10.9.5 HIV 悬液定量灭活试验操作程序

HIV 悬液定量灭活试验操作程序如下：

a) 从液氮中取出冻存的 MT4 细胞，在 36 ℃±1 ℃ 温水中迅速融化，并用细胞维持液洗涤两次后，转种于加有 10 mL 完全培养基培养瓶中。逐日观察细胞生长情况，在细胞对数生长期时收获细胞用于消毒试验；

b) 从液氮中取出冻存 HIV-1 毒种，接种于含 10mL 细胞悬液（含细胞 700 000 个/mL～800 000 个/mL）培养瓶中。逐日观察病变，待 3/4 细胞出现病变时，收获病毒。收获时，将培养液取出，尽快离心，并将含病毒的上清液按每管 0.5 mL 分装于无菌离心管（1.5 mL）中，冷冻保存于-80 ℃备用。如不能立即离心，可暂将培养瓶冷冻保存于-20 ℃，并争取尽快离心分装；

c) 取待测消毒剂，用无菌纯化水作 1:2、1:4、1:8 ...系列稀释。视消毒剂的类型和实验目的，确定最高稀释度。为防止污染培养液，必要时在试验前将消毒剂过滤除菌；

d) 取 100 μL 有机干扰物，与 100 μL 病毒原液混合。加入 0.8 mL 待检消毒剂后计时。待作用至规定时间，取出 100 μL，加入 0.9 mL 用完全培养基制备的 MT4 细胞悬液（400 000 个/mL），在 36 ℃±1 ℃，放置 40 min，以确保残留病毒全部吸附在细胞上。阳性（病毒）对照组试验中，用无菌细胞维持液代替消毒剂；消毒剂对细胞毒性组试验中，用细胞维持液代替病毒；

e) 取出反应管，立即采取去除残留消毒剂处理。处理可用物理去除法或中和稀释法（所用方法应先经试验证明，既可有效去除残留消毒剂，又对细胞和 HIV 无杀灭或抑制作用；

f) 在 96 孔培养板上滴定样本中残留的病毒量。先在培养板（96 孔）的各孔中，加入 100 μL 用完全培养基制备的 MT4 细胞悬液（含细胞 400 000 个/mL）。同时，用完全培养基对待滴定样本做 1：10 系列稀释，然后取 100 μL 稀释好的样本加入已含 MT4 细胞悬液的 96 孔培养板内。每个稀释度做 4 孔；

g) 将按上述程序加液的 96 孔培养板，放入二氧化碳培养箱中（36℃±1℃，5%CO2），逐日在显微镜下观察细胞病变。被感染细胞融合肿胀，出现多核巨细胞。第 4 天，在各反应孔内补加 50 μL 新鲜完全培养基。第 7 天，逐孔观察并记录细胞病变情况；

h) 试验重复 3 次。

5.1.10.9.6 评价规定

评价规定如下：

a) 对测试滴度的HIV，3次灭活试验后均应不再检出，此时的灭活对数值应≥4.00，可判为该消毒剂浓度与作用时间，对HIV污染物消毒的实验室试验合格；

b) 在正常情况下，HIV 阳性对照组病毒感染滴度（$TCID_{50}$）对数值应为5～7。阴性对照组宿主细胞生长良好，并且无 HIV 检出。所用浓度的消毒液对宿主细胞生长无不良影响。否则，根据发现的问题，或调整 HIV 悬液浓度，或选择适宜消毒液浓度，或更换污染试剂和培养基，或改进其他有关条件后，重做试验。

5.1.10.9.7 注意事项

注意事项如下：

a) 操作人员应具有较丰富的病毒学实验工作经验，必须绝对遵守BSL3实验室的安全制度。身体状态欠佳，或有伤口时，应暂时停止工作。

b) 有感染可能性的操作，均应在BSL3实验室的层流负压生物安全柜中进行。

c) 一旦发生事故，有病毒感染或污染环境的可能时，切莫惊慌，除立即进行妥善消毒处理外，并应尽快报告实验室和单位领导。

d) 本试验周期较长，在全部过程中应注意防止样本污染。

5.1.11 消毒剂杀菌作用影响因素试验

5.1.11.1 目的

对新消毒产品进行评价时，了解有机物、温度和 pH 对消毒剂杀菌作用的影响规律。

5.1.11.2 试剂或材料

5.1.11.2.1 菌片与菌悬液（按 5.1.2要求和方法制备）。

5.1.11.2.2 恒温水浴箱。

5.1.11.2.3 冷水浴装置。

5.1.11.2.4 温度计。

5.1.11.2.5 pH计。

5.1.11.2.6 有机物，根据消毒剂的使用对象选择，如酵母粉、血清、蛋白胨、牛血清白蛋白。

5.1.11.2.7 中和剂（经中和剂试验鉴定合格）。

5.1.11.2.8 盐酸（用无菌纯化水配制成稀盐酸溶液）。

5.1.11.2.9 氢氧化钠（用无菌纯化水配制5.6%或7.8%的氢氧化钠溶液）。

5.1.11.3 微生物的选择

根据所测消毒剂鉴定需要决定。一般情况下，对细菌繁殖体应选择大肠杆菌和金黄色葡萄球菌，作为革兰阴性细菌与阳性细菌的代表；对细菌芽胞应选择枯草杆菌黑色变种芽胞。也可直接选择特定的微生物进行试验。试验应分以下各组：

a) 试验组：各种因素影响的测定，均用杀灭相应微生物试验所得最低有效浓度和 3 个作用时间进行杀灭试验。以该最低有效浓度所需的最短有效时间和最短有效时间的 2 倍、3 倍为 3 个作用时间。试验结果应测出合格杀灭对数值的最低有效剂量。必要时，可根据需要调整消毒剂浓度或作用时间，若最短有效时间较长（＞30 min），可根据情况适当缩短作用时间的组距。对最短有效时间较短者（＜5 min），可根据情况适当延长作用时间的组距；

b) 阳性对照组：用标准硬水代替消毒剂溶液，按上述同样的步骤进行试验。所得结果代表活菌浓度；

c) 阴性对照组：观察同次试验用相关试剂和培养基有无污染。

5.1.11.4 有机物对杀灭微生物效果影响的测定

5.1.11.4.1 以小牛血清为有机物代表，应设置无小牛血清对照组；含 25%小牛血清组；含 50%小牛血清组等 3 组。各组所用消毒剂浓度和作用时间，见 5.1.11.3。

5.1.11.4.2 菌悬液与无菌小牛血清按 1:1 与 3:1 比例混合，分别配成含 50%与 25%小牛血清的菌悬液。此含小牛血清的菌悬液，可用于悬液定量杀菌试验，亦可滴染菌片进行载体定量试验。

5.1.11.4.3 以悬液定量杀灭试验或载体浸泡定量杀灭试验进行测定，试验程序见 5.1.7。

5.1.11.4.4 试验重复 3 次。

5.1.11.4.5 计算每次试验的杀灭对数值和平均杀灭对数值。

5.1.11.5 温度对杀灭微生物效果影响的测定

5.1.11.5.1 设置 10 ℃±1 ℃、20 ℃±1 ℃、30 ℃±1 ℃ 等，以 10 ℃为间隔。各组消毒剂浓度和作用时间的设置见 5.1.11.3。

5.1.11.5.2 以悬液定量杀灭试验或载体浸泡定量杀灭试验进行测定，试验程序见 5.1.7。

5.1.11.5.3 试验重复 3 次。

5.1.11.5.4 计算每次试验的杀灭对数值和平均杀灭对数值。

5.1.11.6 pH 对杀灭微生物效果影响的测定

5.1.11.6.1 以该消毒剂的使用浓度 pH 值和使用浓度的 pH 值加 2、pH 值减 2，设 3 组进行试验。对消毒液 pH 值的调节，先用 pH 计测定原消毒剂的 pH 值，在偏酸时慢慢滴加氢氧化钠溶液，偏碱时慢慢滴加盐酸溶液以调整。随时用 pH 计测定消毒剂的 pH 值。当达到所要求的 pH 值后，停止调整，进行随后的试验。必要时，在 pH 值调整后可测定有效成分含量以观察是否受到 pH 值变化的影响。

5.1.11.6.2 各 pH 组所用消毒液浓度和作用时间，见 5.1.11.3。

5.1.11.6.3 以悬液定量杀灭试验或载体浸泡定量杀灭试验进行测定，试验程序见 5.1.7。

5.1.11.6.4 试验重复 3 次。

5.1.11.6.5 计算每次试验的杀灭对数值和平均杀灭对数值。

5.1.11.7 评价规定

有机物影响试验以不含小牛血清组为对照，温度影响试验以20 ℃±1 ℃ 组为对照，pH影响试验以消毒剂使用溶液pH值组为对照。

a) 该组第 1 个～第 3 个作用时间杀灭效果均合格，判为该组所试因素无影响；
b) 该组第 1 个作用时间杀灭效果不合格，第 2 个、第 3 个作用时间杀灭效果合格，判为该组所试因素有轻度影响；
c) 该组第 1 个、第 2 个作用时间杀灭效果不合格，第 3 个作用时间杀灭效果合格，判为该组所试因素有中度影响；
d) 该组第 1～3 个作用时间杀灭效果均不合格，判为该组所试因素有重度影响。

5.1.12 消毒剂中微生物检验方法

按照GB 27951的方法进行检验。

5.1.13 消毒效果定性试验—应用稀释法

5.1.13.1 目的

可用于评价消毒剂对光滑硬质物体表面的消毒效果。

5.1.13.2 试剂或材料

5.1.13.2.1 试验菌株：金黄色葡萄球菌（ATCC6538）、铜绿假单胞菌（ATCC15442）、肠炎沙门菌（*Salmonella enterica*）（ATCC10708）。

5.1.13.2.2 培养基：基础培养液（营养肉汤或液体硫乙醇培养基）；胰蛋白胨大豆琼脂培养基（TSA）；中和剂培养液（根据消毒剂有效成分选择相应中和剂加入基础培养基液中制备成为中和剂培养液，中和剂培养液应经中和剂鉴定试验验证合格后方可使用）。

5.1.13.2.3 其他试剂：磷酸盐缓冲液、标准硬水、有机干扰物（用 3%牛血清白蛋白，如为清洁物品则用 0.3%牛血清白蛋白）。

5.1.13.2.4 载体：304 不锈钢圆筒，表面抛光，外径 8 mm±1 mm，内径 6 mm±1 mm，壁厚 1 mm±0.5 mm，长度 10 mm±1 mm。

5.1.13.2.5 吊钩：长度为 50 mm～75 mm，直径为 0.5 mm 的镍铬合金丝，末端 3 mm 呈直角弯屈。

5.1.13.2.6 滤纸：直径为 90 mm 的定性滤纸。

5.1.13.2.7 器皿：25 mm×100 mm 玻璃试管、直径为 90 mm 的平皿、10 mL 吸管、移液器等。

5.1.13.3 操作步骤

试验操作步骤如下：

a) 按照 5.1.5.3 配制菌悬液进行载体染菌，每次试验时取 80 个无菌载体染菌，首先向 4 个无菌试管（25 mm×100 mm）中分别加入 20 mL 制备好的菌悬液，依次向每管菌液中加入 20 个干燥无菌载体，确保载体完全浸没于菌液中，持续 15 min±2 min。用灭菌后的吊钩取出载体，轻触管壁去除多余菌液，垂直放置于无菌的双层滤纸上，置 36 ℃±1 ℃ 恒温培养箱内干燥 40 min±2 min 后，于 2 h 内进行试验；

b) 对染菌载体菌落计数，随机挑选 2 个染菌载体，分别放入 2 个含 10 mL 营养肉汤的 50 mL 离心管中，用电动混匀器剧烈振荡混匀 20 s 进行洗脱，系列稀释后进行菌落计数。每个染菌载体上金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的回收菌量为 1.0×10^{6} CFU/载体～1.0×10^{7} CFU/载体，肠炎沙门菌的回收菌量为 1.0×10^{5} CFU/载体～1.0×10^{6} CFU/载体；

c) 用标准硬水配制消毒剂溶液至作用浓度，以每管 10 mL 分装至 60 个无菌试管（25 mm×100 mm）中，置于 20 ℃±1 ℃ 水浴中平衡 10 min；

d) 用灭菌后的吊钩以 20s±5s 间隔依次向每管消毒液中加入一个染菌载体，加入过程中不应触碰管壁，轻柔振荡 2～3 下后放入于 20 ℃±1 ℃水浴中；

e) 消毒作用至规定时间后，用灭菌后的吊钩依次钩取染菌载体，轻触管壁去除多余消毒液，转移至 10 mL 中和剂培养液管中，加入时不应触碰管壁；

f) 振荡混匀，置 36 ℃±1 ℃ 恒温培养箱中静置培养 48 h±2 h；

g) 若中和剂鉴定试验结果显示中和 I 组未完全中和，在中和剂培养液中静置 30 min 后用灭菌后的吊钩将染菌载体取出后，转移至基础培养液管中，振荡混匀后进行培养；

h) 阳性对照为将未经消毒处理的染菌载体各 1 个，分别放入 10 mL 中和剂培养液和 10 mL 基础培养液管中振荡混匀，置 36 ℃±1 ℃ 恒温培养箱中静置培养 48 h±2 h；

i) 阴性对照为将无菌载体各 1 个分别放入 10 mL 中和剂培养液和 10 mL 基础培养液中振荡混匀，置 36 ℃±1 ℃恒温培养箱中静置培养 48 h±2 h；

j) 试验重复 3 次。

5.1.13.4 评价规定

阳性对照管应有菌生长，阴性对照管应无菌生长。

消毒剂标注的消毒对象为光滑硬质物体表面时，对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的三次重复杀灭效果均应达到表3的要求，即金黄色葡萄球菌的杀灭试验，阳性管数为0～3个，且阳性对照菌量对数值为6～7为合格，铜绿假单胞菌的杀灭试验，阳性管数为0～6个，且阳性对照菌量对数值为6～7为合格。当消毒剂标注对肠炎沙门菌有效时，对肠炎沙门菌的杀灭效果也应同时达到表3 的要求。

表3 消毒剂应用稀释法对微生物杀灭效果的判定

试验菌株	阳性管数（个）	实验管数（个）	阳性对照菌量对数值
金黄色葡萄球菌	0～3	60	6～7
铜绿假单胞菌	0～6	60	6～7
肠炎沙门氏菌	0～1	60	5～6

5.2 消毒剂模拟现场和现场消毒与灭菌效果鉴定试验

5.2.1 消毒剂对食（饮）具的模拟现场消毒效果鉴定试验

5.2.1.1 目的

用于验证消毒剂对食（饮）具上细菌的消毒效果。

5.2.1.2 试剂或材料

5.2.1.2.1 试验菌株：大肠杆菌（8099），对尚需用于杀灭其他特定微生物者，可用该微生物进行试验。菌悬液制备按 5.1.2 规定的方法和要求进行。

5.2.1.2.2 中和剂溶液：经中和剂鉴定试验合格。

5.2.1.2.3 稀释液：TPS，见附录 A。

5.2.1.2.4 培养基：胰蛋白胨大豆琼脂培养基（TSA）。

5.2.1.2.5 有机干扰物：胰蛋白胨大豆肉汤培养基（TSB）。

5.2.1.2.6 无菌棉拭。

5.2.1.2.7 规格板（用可弯曲的软性材料制备，中央留一大小为 5cm×5cm 空格作为采样部位）。

5.2.1.2.8 试验用食（饮）具样本 瓷碗（盘）或竹（木）筷前端（周长 2.0 cm±0.2 cm，长度 12.5 cm±1.4 cm，总面积为 25 cm^2）。

5.2.1.2.9 标准硬水：见附录 A。

5.2.1.3 操作程序

5.2.1.3.1 按产品使用说明书中的最低使用浓度与最短作用时间进行试验。

5.2.1.3.2 用无菌规格板在试验用碗（盘）内表面标出染菌区。无菌操作吸取试验用菌悬液，分别滴加于染菌区，每区 0.1 mL，涂匀，置 36 ℃ ±1 ℃ 恒温培养箱至干燥。对筷子取前端规定长度，蘸染预定量菌液后，置 36 ℃ ±1 ℃ 或室温干燥。

5.2.1.3.3 试验组：将 10 个染菌碗（盘）或 10 个筷子样本，依次定时放入含消毒剂溶液的容器中，使其完全浸没。作用至规定时间，轻轻取出碗（盘），弃掉消毒剂，分别向碗（盘）内的染菌区加入 5 mL 中和剂溶液，用 L 棒刮洗染菌区，作用 10 min，分别取 1.0 mL 样液，以倾注法接种 2 块平皿。轻轻取出筷子样本， 放入含 20 mL～25 mL 中和剂溶液的试管中，电动混匀器振荡 20 s 或振打 200 次，作用 10 min，分别取 1.0 mL 样液，以倾注法接种 2 块平皿。将接种好的平板置 36 ℃±1 ℃ 恒温培养箱培养 48 h，计数菌落数，作为试验组。

5.2.1.3.4 阳性对照组：直接向 2 个染菌碗（盘）的染菌区加入 5 mL 中和剂，或直接将 2 支染菌筷子样本浸没于含 20 mL～25 mL 中和剂溶液的试管中。随试验组采样、检测，检测结果作为消毒前菌量，菌量应在 2.50×10^7 CFU/样本～1.25×10^8 CFU/样本。

5.2.1.3.5 阴性对照组：将本次试验未用完的中和剂、稀释液、培养基等设为阴性对照。

5.2.1.3.6 试验重复 3 次。

5.2.1.3.7 按公式（8）计算每件食（饮）具上的生长菌落数：

$$C = M \times N \quad (8)$$

式中：

C——每件食（饮）具样本生长菌落数，CFU/样本；

M——平板上平均菌落数，CFU/平板；

N——检测时样本稀释倍数。

5.2.1.3.8 按 5.1.7.4.8 计算每次试验的杀灭对数值和平均杀灭对数值。

5.2.1.4 评价规定

阴性对照组均无菌生长，阳性对照组菌量为2.50×10^{7} CFU/样本～1.25×10^{8} CFU/样本，以每种食（饮）具30个样本中大肠杆菌杀灭对数值均≥3.00，所用消毒剂的浓度和作用时间为消毒合格剂量。

5.2.2 消毒剂对医疗器械模拟现场消毒效果鉴定试验

5.2.2.1 目的

用于验证消毒剂对人工污染微生物的医疗器械的消毒效果。

5.2.2.2 试剂或材料

5.2.2.2.1 试验菌株：枯草杆菌黑色变种（ATCC 9372）芽胞（下简称芽胞，其悬液的制备按 5.1.2.3 规定进行），用于高水平消毒剂的鉴定；龟分枝杆菌脓肿亚种（ATCC19977 或 CMCC（B）93326），用于中水平消毒剂的鉴定；白色念珠菌（ATCC 10231）/金黄色葡萄球菌（ATCC 6538），用于低水平消毒剂的鉴定。可按实际情况，增选其他相应微生物。

5.2.2.2.2 中和剂溶液：经中和剂鉴定试验合格。

5.2.2.2.3 培养基: 胰蛋白胨大豆琼脂培养基，分枝杆菌干燥培养基，沙堡琼脂培养基 见附录 A。

5.2.2.2.4 有机干扰物：胰蛋白胨大豆肉汤培养基（TSB）。

5.2.2.2.5 载体：医用止血钳齿端部分，按 5.1.2.4.2 进行脱脂处理，灭菌后备用。

5.2.2.2.6 塑料试管（1.8 cm×18 cm）

5.2.2.2.7 标准硬水：见附录 A。

5.2.2.3 操作程序

5.2.2.3.1 按产品使用说明书中的最低使用浓度与最短作用时间进行试验。

5.2.2.3.2 染菌时，将止血钳样本齿面朝上，用 0.1 mL 无菌吸管或移液器将 20 μL 试验用菌悬液滴染齿部，涂匀，干燥备用。

5.2.2.3.3 取无菌平皿，按每个载体 10 mL 用量加入消毒剂，置 20 ℃±1 ℃水浴中保温 5 min。

5.2.2.3.4 将 10 个染菌样本浸没于消毒液中进行消毒处理。

5.2.2.3.5 作用至规定时间，取出样本，分别移入含 10 mL 中和剂溶液的塑料试管内。在手掌上振打 200 次，分别取样液 1.0 mL，以倾注法接种 2 个无菌平皿，放 36 ℃±1 ℃ 恒温培养箱培养至规定时间，计数菌落数，作为试验组。

5.2.2.3.6 每次试验，以标准硬水代替消毒液，将 2 个染菌样本以同样条件处理，然后与试验组样本同法进行活菌培养计数，作为阳性对照组，其菌量应在 1×10^{6} CFU/样本～5×10^{6} CFU/样本。

5.2.2.3.7 将本次试验未用完的同批次中和剂溶液、稀释液、培养基等设为阴性对照。

5.2.2.3.8 试验重复 3 次。

5.2.2.4 评价规定

阴性对照组均无菌生长，阳性对照组菌量达到规定要求，30个试验组样本的微生物杀灭对数值均≥3.00，判定为消毒合格。

5.2.3 消毒剂对医疗器械模拟现场灭菌效果鉴定试验

5.2.3.1 目的

用于验证消毒剂对人工污染芽胞的医疗器械的灭菌效果。

5.2.3.2 试剂或材料

5.2.3.2.1 试验菌株：枯草杆菌黑色变种（ATCC 9372）芽胞（其悬液的制备按 5.1.2.3 规定进行）。

5.2.3.2.2 稀释液：TPS，见附录 A。

5.2.3.2.3 中和剂溶液：经中和剂鉴定试验合格。

5.2.3.2.4 培养基：胰蛋白胨大豆琼脂培养基（TSA），见附录 A。

5.2.3.2.5 含中和剂的胰蛋白胨大豆肉汤培养基（经中和剂鉴定合格）。

5.2.3.2.6 标准硬水：见附录 A 。

5.2.3.2.7 有机干扰物 ：胰蛋白胨大豆肉汤培养基（TSB）。

5.2.3.2.8 载体：医用止血钳齿端部分，按 5.1.2.4.2 规定方法进行脱脂处理。灭菌后备用。

5.2.3.2.9 试管（1.8 cm×18 cm）。

5.2.3.3 操作程序

5.2.3.3.1 按产品使用说明书中的最低使用浓度与 0.5 倍最短作用时间。

5.2.3.3.2 染菌样本按 5.1.2.4 进行制备。

5.2.3.3.3 取无菌平皿，按每个载体 10 mL 用量加入消毒剂，置 20 ℃±1 ℃水浴中保温 5 min。

5.2.3.3.4 将 20 个染菌样本浸没于消毒剂中作用至规定时间后取出，分别放于含 10 mL 中和剂 TSB 的试管内，置 36 ℃±1 ℃ 恒温培养箱中培养 7 d，观察最终结果，作为试验组。

5.2.3.3.5 以标准硬水代替消毒剂，将 2 个染菌载体依上同样条件处理，与试验组样本同法接种、培养、观察结果，作为阳性对照组。

5.2.3.3.6 另取 2 个染菌样本，分别放入含 10 mL 中和剂溶液塑料试管内。在手掌上振打 200 次，取样接种平板，置 36 ℃±1 ℃ 恒温培养箱中培养 72 h，计数菌落数，作为菌数对照组。其菌量应为 1×10^6 CFU/样本～5×10^6 CFU/样本。

5.2.3.3.7 将本次试验未用完的同批次中和剂溶液、稀释液、培养基等设为阴性对照。

5.2.3.3.8 试验重复 3 次。

5.2.3.4 评价规定

阳性对照组菌量达到规定要求，阴性对照组均无菌生长，试验组60个样本均无菌生长，判定为灭菌合格。有菌生长者，肉汤培养基呈轻度浑浊，有皱褶状菌膜，轻轻振摇可见絮状沉淀，无菌生长者肉汤清澈透明。

5.2.3.5 注意事项

本试验应严格无菌操作，否则灭菌试验可能失败。

5.2.4 医疗器械消毒剂连续使用稳定性鉴定试验

5.2.4.1 目的

用于验证消毒剂在连续使用有效期内对医疗器械的消毒、灭菌效果。

5.2.4.2 试剂或材料

5.2.4.2.1 枯草杆菌黑色变种（ATCC 9372）芽胞（悬液按 5.1.2.3 进行制备）。

5.2.4.2.2 有机干扰物：使用要求与 5.1.2.2.2 相同。

5.2.4.2.3 中和剂溶液：经中和剂鉴定合格者。

5.2.4.2.4 中和剂肉汤：含中和剂的 TSB。

5.2.4.2.5 培养基：TSA、TSB， 见附录 A。

5.2.4.2.6 载体：医用止血钳齿端部分，按 5.1.2.4.2 方法进行脱脂处理，灭菌后备用。

5.2.4.2.7 医疗器械：医用剪刀、止血钳、镊子等小型器械。

5.2.4.2.8 无菌带盖搪瓷盘。

5.2.4.2.9 标准硬水：见附录 A。

5.2.4.2.10 稀释液：TPS，见附录 A。

5.2.4.3 操作程序

5.2.4.3.1 按 5.1.2.4 制备染菌样本。

5.2.4.3.2 试验时，配制双份 2000 mL 消毒液，分别盛装于 2 个无菌带盖搪瓷盘中。各放入清洁的试验用医疗器械，使达满载要求。每次试验同时对 2 个搪瓷盘中的消毒液进行检测。

5.2.4.3.3 搪瓷盘内放入器械后，连续每日将器械取出，用清水洗涤，沥干，再回放入消毒液中，直至试验结束。

5.2.4.3.4 放入器械至使用说明书上连续使用的最长时间，吸取消毒液样本，用于医疗器械消毒的，按消毒剂对医疗器械的消毒模拟现场试验 5.2.2 的方法，每盘用 5 个染菌样本进行试验；用于医疗器械灭菌的，按消毒剂对医疗器械的模拟现场灭菌试验 5.2.3 的方法，每盘用 10 个染菌样本进行试验。测定该消毒液对芽胞的杀灭效果。

5.2.4.3.5 试验重复 3 次。

5.2.4.4 评价规定

对于医疗器械消毒的消毒剂，按消毒剂对医疗器械的消毒模拟现场试验 5.2.2 的评价规定进行；对于医疗器械灭菌的消毒剂，按消毒剂对医疗器械的模拟现场灭菌试验 5.2.3 的评价规定进行。3次试验均达到合格要求时判定为连续使用稳定性试验合格。

5.2.4.5 注意事项

5.2.4.5.1 盛装消毒液的搪瓷盘，在操作完毕后应加盖。

5.2.4.5.2 本试验应严格无菌操作，否则灭菌试验可能失败。

5.2.5 消毒剂对手模拟现场消毒效果鉴定试验

5.2.5.1 目的

用于验证消毒剂对人工污染于手表面细菌的消毒效果。

5.2.5.2 试剂或材料

5.2.5.2.1 试验菌株：大肠杆菌（8099 或 NCTC 10538），可增加特定细菌进行试验。取 2 支在 TSB 中培养 18 h～24 h 的大肠杆菌培养物分别接种于 1 L TSB 大三角烧瓶中，置 36 ℃±1 ℃ 恒温培养箱中培养 18 h～24 h，用 TSB 将其稀释为 2×10^8 CFU/mL～2×10^9 CFU/mL 菌悬液。

5.2.5.2.2 培养基：胰蛋白胨大豆琼脂培养基（TSA）、胰蛋白胨大豆肉汤培养基（TSB），见附录 A。

5.2.5.2.3 中和剂溶液：经中和剂鉴定合格者。

5.2.5.2.4 普通洗手液。

5.2.5.2.5 参考样品：正丙醇 60%（V/V）与异丙醇 60%（V/V）。

5.2.5.2.6 标准硬水：见附录 A。

5.2.5.2.7 稀释液：TPS，见附录 A。

5.2.5.2.8 吸管、试管、平皿。

5.2.5.2.9 电动混匀器。

5.2.5.3 试验步骤

5.2.5.3.1 菌悬液的制备：取 2 支在 TSB 中培养 18 h～24 h 的大肠杆菌培养物分别接种于 1 L TSB 大三角烧瓶中，置 36 ℃±1 ℃ 恒温培养箱中培养 18 h～24 h，用 TSB 将其稀释为 2×10^8 CFU/mL～2×10^9 CFU/mL 菌悬液。

5.2.5.3.2 将 20 名志愿者随机分为两组，每组 10 人，第一组使用参考样品，第二组使用试验样品。

5.2.5.3.3 使用普通洗手液洗手 1 min 去除手表面的自然菌，用无菌纸、纱布、巾等将手擦干。

5.2.5.3.4 将 2×10^8 CFU/mL～2×10^9 CFU/mL 大肠杆菌的菌悬液放入无菌容器中。

5.2.5.3.5 将双手掌中间到指尖部位浸入菌悬液中，手指分开，停留 5 s 后在空气中干燥 3 min。

5.2.5.3.6 干燥后立即将两手拇指与其他手指尖分别在含 10 mL TSB 的平皿底部搓洗 1 min，做适当稀释后，分别取样液 1.0 mL 以倾注法接种 2 个无菌平皿，置 36 ℃±1 ℃恒温培养箱培养 48 h，计数菌落数，作为试验前菌数。

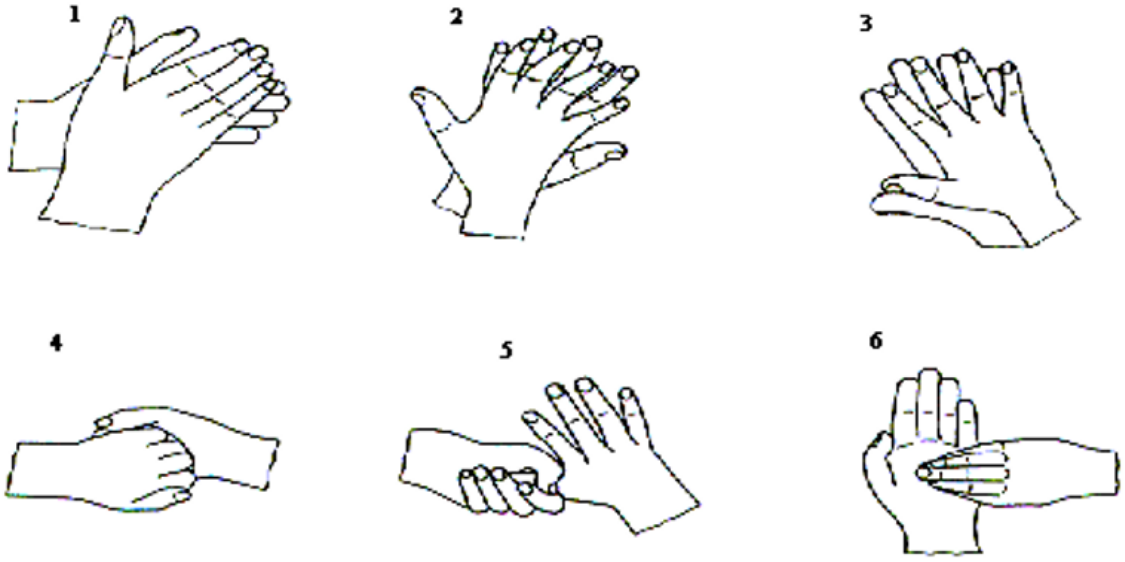
5.2.5.3.7 不再重复污染手，并作为试验样品组，立即进行消毒处理。

5.2.5.3.8 对试验样品组，按说明书规定的用量、作用时间以手消毒方法（如图 1）搓擦 30 s～60 s（卫生手消毒）或最长 3 min（外科手消毒）。

5.2.5.3.9 参考样品组，对于卫生手消毒，取 60%异丙醇 3 mL 于手心中，按手消毒方法用力搓擦 30 s，以确保手的所有部位均匀接触异丙醇。重复使用异丙醇按上述方法搓擦，使总的搓擦时间为 60s。对于外科手消毒，使用 60%正丙醇 3 mL，按手消毒方法用力搓擦，当接近干燥时，再加 3 mL 正丙醇搓擦，并保持作用 3 min。

5.2.5.3.10　以自来水冲洗 5 s，抖掉手上残留的水。

5.2.5.3.11　立刻将两手拇指与其他手指尖在盛有 10 mL 含中和剂的 TSB 的平皿底部搓洗 1 min，做适当稀释后，分别取样液 1.0 mL 以倾注法接种 2 个无菌平皿，置 36 ℃±1 ℃恒温培养箱培养 48 h，计数菌落数，作为试验后菌数。



标引序号说明:

1—掌心对掌心搓擦;
2—手指交错掌心对手背搓擦;
3—手指交错掌心对掌心搓擦;
4—两手互握互搓指背;
5—拇指在掌中转动搓擦;
6—指尖在掌心中摩擦。

图1　手消毒方法

5.2.5.3.12　在试验当日，第一组与第二组样品对换，重复上述试验。

5.2.5.3.13　分别计算参考样品组和试验样品组菌数减少的对数值。

5.2.5.4　评价规定

5.2.5.4.1　试验样品组减少的对数值大于或等于参考样品组减少的对数值，判定为消毒合格。

5.2.5.4.2　试验样品组减少的对数值小于参考样品组减少的对数值，但无统计学意义，判定为消毒合格。

5.2.5.4.3　试验样品组减少的对数值小于参考样品组减少的对数值，且有统计学意义，判定为消毒不合格。

5.2.5.5　注意事项

5.2.5.5.1　试验样品和参考样品必须在同一志愿者配对进行试验，并在同一天、相同环境和同样试验

条件下进行。

5.2.5.5.2 志愿者应年满 18 岁，身体健康，手部皮肤应无破损、无皮肤病，手指甲短而干净。

5.2.5.5.3 所有志愿者都应使用同一批菌悬液染菌，菌悬液最多可使用 3 h。

5.2.5.5.4 对于免洗手类消毒液，试验组应根据说明书介绍的方法涂擦，作用时间以说明书为准。

5.2.6 消毒剂对手现场消毒效果鉴定试验

5.2.6.1 目的

用于验证消毒剂对手表面细菌的消毒效果。

5.2.6.2 试剂或材料

5.2.6.2.1 中和剂溶液中和剂鉴定合格。

5.2.6.2.2 培养基：胰蛋白胨大豆琼脂培养基（TSA），见附录 A。

5.2.6.2.3 稀释液：TPS，见附录 A。

5.2.6.2.4 标准硬水：见附录 A。

5.2.6.2.5 无菌棉拭。

5.2.6.2.6 电动混匀器。

5.2.6.2.7 吸管、试管、平皿。

5.2.6.3 试验步骤

5.2.6.3.1 选定志愿者，试验不少于 30 人次。

5.2.6.3.2 消毒前，在志愿者双手相互充分搓擦后，让志愿者左手指并拢，用无菌棉拭在含 10 mL 稀释液试管中浸湿，于管壁上挤干后，在五指屈面指尖至指根，往返涂擦 2 遍，每涂擦一遍，将棉拭转动一次。采样后，以无菌操作方式将棉拭采样端剪入原稀释液试管内，作为阳性对照组样本。

5.2.6.3.3 按消毒剂使用说明书的方法和使用浓度对右手进行消毒，对卫生手的消毒一般设定作用时间为最长 1 min，最短 30 s；对外科手一般设定最长作用时间为 3 min。消毒后用中和剂溶液代替稀释液，用与阳性对照组同样的方法对志愿者右手上残留的自然菌采样一次，作为试验组样本。

5.2.6.3.4 将阳性对照组和试验组样本，分别取 1.0 mL，以倾注法接种平皿，每个样本接种 2 个平皿，置 36 ℃±1 ℃ 恒温培养箱中培养 48 h，每日观察并记录最终结果。

5.2.6.3.5 将本次试验未用完的同批次中和剂溶液、稀释液、棉拭、培养基等分别设阴性对照。

5.2.6.3.6 以每手为单位，按 5.1.7.4.8 计算杀灭对数值。

5.2.6.4 评价规定

5.2.6.4.1 阴性对照组应无菌生长，30 人次手上自然菌的平均杀灭率≥90%，判定为消毒合格。

5.2.6.4.2 外科手消毒评价时，30 人次手上自然菌的平均杀灭率≥90%，且每人次的残留菌量＜150 CFU/每手，可判定消毒合格。

5.2.6.5 注意事项

5.2.6.5.1 本试验需有志愿者参与，重复人次较多，一人可多次受试，但不得在一批试验或同日反复参与，否则可影响结果的准确性。

5.2.6.5.2 志愿者接受试验时，不得触摸任何表面，以免使手的试验部位沾染杂菌。

5.2.6.5.3 棉拭涂抹采样，较难标准化，为此应尽量使棉拭的大小、用力的均匀、吸取采样液的量以及洗菌时敲打的轻重等保持先后一致。

5.2.6.5.4 擦拭消毒时，要依据说明书适量均匀涂抹。

5.2.6.5.5 现场样本须及时检测，常温运送、存放不得超过 2 h，4 ℃冰箱存放不得超过 4 h。

5.2.6.5.6 对于免洗手类消毒液，试验组应根据说明书介绍的方法涂擦，作用时间一般到消毒液干燥后停止。

5.2.7 消毒剂对皮肤模拟现场消毒效果鉴定试验

5.2.7.1 目的

用于验证消毒剂对人工污染于皮肤表面细菌的消毒效果。

5.2.7.2 试剂或材料

5.2.7.2.1 试验菌株：金黄色葡萄球菌（ATCC 27217），可增加特定细菌进行试验。

5.2.7.2.2 培养基：胰蛋白胨大豆琼脂培养基（TSA），见附录 A。

5.2.7.2.3 稀释液：TPS，见附录 A。

5.2.7.2.4 中和剂溶液：中和剂经鉴定合格。

5.2.7.2.5 普通洗手液。

5.2.7.2.6 金属筒（直径 2.2 cm、高度 3 cm）。

5.2.7.2.7 尼龙刮菌棒。

5.2.7.2.8 吸管、试管、平皿。

5.2.7.2.9 电动混匀器。

5.2.7.2.10 一次性接种环。

5.2.7.2.11 外用皮肤消炎药膏。

5.2.7.2.12 皮肤消毒剂。

5.2.7.2.13 75% 酒精。

5.2.7.2.14 标准硬水：见附录 A。

5.2.7.2.15 恒温培养箱。

5.2.7.3 试验步骤

5.2.7.3.1 菌悬液按 5.2.5.3.1 制备。

5.2.7.3.2 用普通洗手液清洗志愿者前臂内侧 1 min，用自来水冲净残留皂液，用无菌纸巾擦干。

5.2.7.3.3 在志愿者的双前臂内侧中段，用带有印墨直径为 3.00 cm 的玻璃筒扣在皮肤上，划分出试验区。

5.2.7.3.4 使用加样器取 10 μL 菌悬液，滴加于前臂试验区（使回收菌落数为 2×10^6 CFU/试验区～1×10^7 CFU/试验区），用一次性接种环把菌悬液涂成圆形，其边缘应与印墨有 4 mm～5 mm 的距离，在空气中自然干燥。

5.2.7.3.5 根据消毒剂使用说明书规定的方法对右前臂内侧进行消毒，一般设定作用时间为 1 min～3 min，最长 5 min。

5.2.7.3.6 作用至规定时间，用中和剂溶液对前臂上涂菌的区域进行取样。采样时，将金属筒放置于试验区中间部位，罩住染菌区，不要接触到盖有印墨的边缘。将 1.0 mL 中和剂溶液吸移至金属筒内，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 1.0 mL 中和剂溶液对该区域内的皮肤进行第二次刮洗 30 s，将第二次刮洗的液体，注入含第一次刮洗液体的试管中，作为试验组样本。

5.2.7.3.7 以标准硬水代替消毒剂对左前臂做同样处理，用稀释液做适当稀释，取适宜稀释度作为对照组样本。

5.2.7.3.8 将阳性对照组和试验组样本，分别取 1.0 mL，以倾注法接种平皿，每个样本接种 2 个平皿，置 36 ℃±1 ℃ 恒温培养箱中培养 48 h，观察最终结果。

5.2.7.3.9 将本次试验未用完的同批次中和剂溶液、稀释液、棉拭、培养基等分别设阴性对照。

5.2.7.3.10 按 5.1.7.4.8 计算杀灭对数值。

5.2.7.3.11 试验不得少于 15 人次。

5.2.7.4 评价规定

阴性对照组无菌生长，阳性对照组回收菌落数为2×10^6 CFU/试验区～1×10^7 CFU/试验区，且对每一人次皮肤表面人工污染的金黄色葡萄球菌的杀灭对数值均≥3.00，判定为消毒合格。

5.2.7.5 注意事项

5.2.7.5.1 志愿者录用标准：

a) 年龄介于 18 岁至 65 岁；

b) 志愿者身体健康；

c) 前臂皮肤完好无损且没有皮肤病及其他皮肤问题。

5.2.7.5.2 排除志愿者的标准，如果志愿者有下列情况之一，不能被录用参加试验：

a) 孕妇；

b) 诊断患有糖尿病、各种传染病、器官移植者。

5.2.7.5.3 试验采样结束后，先用 75%的酒精对志愿者前臂进行消毒，然后用皮肤消毒剂对双前臂进行消毒处理，处理后清水冲洗，擦干，再涂少量的外用皮肤消炎药膏于试验区，以防皮肤感染；

5.2.7.5.4 在试验完成后的 48 h～72 h 内，志愿者如发现前臂上有小脓疱、水疱，隆起的红色痒疱，应及时通知检验单位。

5.2.8 消毒剂对皮肤现场消毒效果鉴定试验

5.2.8.1 目的

用于验证消毒剂对皮肤表面细菌的消毒效果。

5.2.8.2 试剂或材料

5.2.8.2.1 中和剂溶液：经鉴定合格。

5.2.8.2.2 培养基：胰蛋白胨大豆琼脂培养基（TSA）。

5.2.8.2.3 稀释液：见附录 A。

5.2.8.2.4 标准硬水：见附录 A。

5.2.8.2.5 规格板（用牛皮纸制备，中央留一 3.00 cm×10.0 cm 的空格作为采样部位）121 ℃ 15 min 灭菌备用。

5.2.8.2.6 无菌棉拭。

5.2.8.2.7 电动混匀器。

5.2.8.2.8 吸管、试管、平皿。

5.2.8.3 试验步骤

5.2.8.3.1 选定志愿者，试验不少于 30 人次。

5.2.8.3.2 让志愿者将左右前臂内侧中段相互充分对搓，将规格板放于志愿者左前臂内侧中段表面，用无菌棉拭在含 10mL 稀释液试管中浸湿，于管壁上挤干后，在规格板框定的区域内，横向往返涂擦 10 遍，纵向往返涂擦 3 遍，每涂擦一遍，将棉拭转动一次。采样后，以无菌操作方式将棉拭采样端剪入原稀释液试管内，电动混匀器振荡混匀 20s，或在手掌振打 200 次，用稀释液作适当稀释，取适宜稀释度作为阳性对照组样本。

5.2.8.3.3 按消毒剂使用说明书的方法对右前臂内侧进行消毒，一般设定作用时间为 1 min～3 min，最长不超过 5 min。作用至设定时间用中和剂溶液代替稀释液，与阳性对照组同样的方法对志愿者右前臂内侧表面残留的自然菌采样一次，作为试验组样本。

5.2.8.3.4 将阳性对照组和试验组样本，分别取 1.0 mL，以倾注法接种平皿，每个样本接种 2 个平皿，置 36 ℃±1 ℃恒温培养箱中培养 48 h，观察最终结果。

5.2.8.3.5 将每次试验未用完的同批次中和剂溶液、稀释液、棉拭、培养基等分别作为阴性对照。

5.2.8.3.6 以手臂为单位,按 5.1.7.4.8 计算杀灭对数值。

5.2.8.4 评价规定

阴性对照组无菌生长，阳性对照组有较多细菌生长，30人次皮肤表面自然菌的平均杀灭率≥90%，判定为消毒合格。

5.2.8.5 注意事项

5.2.8.5.1 本试验需有志愿者参与，重复人次较多，一人可多次受试，但不得在一批试验或同日反复参与，否则可影响结果的准确性。

5.2.8.5.2 志愿者试验时，不得触摸任何表面，以免使试验部位沾染杂菌。

5.2.8.5.3　棉拭涂抹采样，较难标准化，为此应尽量使棉拭的大小、用力的均匀、吸取采样液的量以及洗菌时敲打的轻重等先后保持一致。

5.2.8.5.4　擦拭消毒时，要依据说明书适量均匀涂抹。

5.2.8.5.5　现场样本须及时检测，常温运送、存放不得超过 2 h，4 ℃冰箱存放不得超过 4 h。

5.2.9　消毒剂对硬质物体表面模拟现场消毒效果鉴定试验

5.2.9.1　目的

用于验证消毒剂对人工污染于硬质物体（指除本文件已有专门规定如食（饮）具、医疗器械等以外的物体）表面细菌的消毒效果。

5.2.9.2　试剂或材料

5.2.9.2.1　试验菌株：大肠杆菌（8099）/金黄色葡萄球菌（ATCC 6538）可选用特定细菌进行试验。菌悬液按 5.1.2 制备。

5.2.9.2.2　中和剂溶液：经中和剂鉴定试验合格。

5.2.9.2.3　稀释液：TPS，见附录 A。

5.2.9.2.4　培养基：胰蛋白胨大豆琼脂培养基（TSA），见附录 A。

5.2.9.2.5　标准硬水：见附录 A。

5.2.9.2.6　有机干扰物：胰蛋白胨大豆肉汤培养基（TSB）。

5.2.9.2.7　规格板（用不锈钢材料制备，中央留一 5cm×5cm 的空格作为采样部位）。

5.2.9.2.8　无菌棉拭。

5.2.9.2.9　电动混匀器。

5.2.9.3　试验步骤

5.2.9.3.1　一般以木制桌面为代表进行人工染菌，也可以特定的实物为染菌对象。每次试验，各类物品表面测试 10 个样本。

5.2.9.3.2　染菌时，选物品较平的部位，于规格板中央空格，用无菌棉拭沾以试验用菌悬液均匀涂抹。待自然干燥后进行试验。每次试验设 2 个区块作为阳性对照区，10 个区块为试验区。

5.2.9.3.3　将无菌棉拭在含 10 mL 稀释液试管中浸湿，于管壁上挤干，对对照组区块涂抹采样，每区块横竖往返各 8 次。以无菌操作方式将棉拭采样端剪入原稀释液试管内，电动混匀器振荡 20 s，或在手掌上振打 200 次，用稀释液做适当稀释后，作为阳性对照组样本。

5.2.9.3.4　按说明书中的方法和使用剂量对物体表面进行消毒。将无菌棉拭在含 10 mL 中和剂溶液试管中浸湿，于管壁上挤干，消毒作用至设定时间时，分别对消毒区块进行涂抹采样，每区块横竖往返各 8 次。采样后，以无菌操作方式将棉拭采样端剪入原中和剂溶液试管内，电动混匀器振荡 20 s，或在手掌上振打 200 次，作为试验组样本。

5.2.9.3.5　将阳性对照组和试验组样本，分别取 1.0 mL，以倾注法接种平皿，每个样本接种 2 个平皿，置 36 ℃±1 ℃ 恒温培养箱中培养 48 h，观察最终结果。

5.2.9.3.6 将每次试验未用完的同批次中和剂溶液、稀释液、棉拭、培养基等设为阴性对照。

5.2.9.3.7 每次试验 10 个样本，进行 3 次重复试验。

5.2.9.3.8 按 5.1.7.4.8 计算每次试验的杀灭对数值和平均杀灭对数值。

5.2.9.4 评价规定

阴性对照组无菌生长，阳性对照组检测菌量为2.5×10^{7} CFU/样本～1.25×10^{8} CFU/样本，30个样本的杀灭对数值均≥3.00，判定为消毒合格。

5.2.9.5 注意事项

5.2.9.5.1 阳性对照组和试验组应在相邻的区域，但不得在同一区内进行试验。

5.2.9.5.2 棉拭涂抹采样较难标准化，为此应尽量使棉拭的大小、用力的均匀、吸取采样液的量以及洗菌时敲打的轻重等等先后一致。

5.2.9.5.3 现场样本须及时检测。室温存放不得超过 2 h，4 ℃ 冰箱存放不得超过 4 h。

5.2.10 消毒剂对硬质物体表面现场消毒效果鉴定试验

5.2.10.1 目的

用于验证消毒剂对硬质物体（指除本文件已有专门规定如食（饮）具、医疗器械等以外的物体）表面自然菌的消毒效果。

5.2.10.2 试剂或材料

5.2.10.2.1 中和剂溶液：经中和剂鉴定试验合格。

5.2.10.2.2 稀释液：TPS，见附录 A。

5.2.10.2.3 培养基 胰蛋白胨大豆琼脂培养基（TSA），见附录 A。

5.2.10.2.4 规格板（用不锈钢材料制备，中央留一 5cm×5cm 的空格作为采样部位）。

5.2.10.2.5 无菌棉拭。

5.2.10.2.6 电动混匀器。

5.2.10.3 操作程序

在使用现场，按说明书介绍的使用浓度、作用时间和消毒方法消毒物体表面，检测样本数应≥30份。

a) 在物体表面（桌面、台面、门等）用规格板标定 2 块相邻的面积各为 25 cm^2的区块，一块供消毒前采样，一块供消毒后采样；

b) 将无菌棉拭在含 10 mL 稀释液试管中浸湿，于管壁上挤干，对对照区块涂抹采样，横竖往返各 8 次。采样后，以无菌操作方式将棉拭采样端剪入原稀释液试管内，电动混匀器振荡 20 s 或在手掌振打 200 次，做适当稀释后，作为阳性对照组样本；

c) 按说明书中的方法和剂量对物体表面进行试验。将无菌棉拭在含 10 mL 中和剂溶液试管中浸湿，于管壁上挤干，消毒作用至设定时间，对消毒区块涂抹采样，横竖往返各 8 次。采样后，

以无菌操作方式将棉拭采样端剪入原中和剂溶液试管内，电动混匀器振荡 20 s 或在手掌振打 200 次，作为试验组样本；

d) 将阳性对照组和试验组样本，分别取 1.0 mL，以琼脂倾注法接种平皿，每个样本接种 2 个平皿，置 36 ℃±1 ℃恒温培养箱中培养 48 h，每日观察并记录最终结果；

e) 将本次试验未用完的同批次中和剂溶液、稀释液、棉拭、培养基等分别设阴性对照；

f) 以每样本为单位，按 5.1.7.4.8 计算每次试验的杀灭对数值和平均杀灭对数值。

5.2.10.4 评价规定

阴性对照组应无菌生长，阳性对照组应有较多细菌生长，消毒样本的平均杀灭率≥90%，判定为消毒合格。

5.2.10.5 注意事项

5.2.10.5.1 在现场试验中，自然菌的种类复杂，平板上常出现大面积霉菌生长，导致无法计数菌落。在两个平行的平板中如有一个平板可数清菌落数时，即按该平板菌落数计算结果。如两平板均有大面积霉菌生长，应重新进行试验。

5.2.10.5.2 阳性对照组和试验组应在相邻的区域，但不得在同一区内进行试验。

5.2.10.5.3 棉拭涂抹采样较难标准化，为此应尽量使棉拭的大小、用力的均匀、吸取采样液的量以及洗菌时敲打的轻重等先后一致。

5.2.10.5.4 现场样本须及时检测。室温存放不得超过 2 h，4 ℃ 冰箱存放不得超过 4 h。

5.2.11 消毒剂对多孔物体表面模拟现场消毒效果鉴定试验

5.2.11.1 目的

用于验证消毒剂对人工污染于多孔物体表面上细菌的消毒效果。

5.2.11.2 试剂或材料

5.2.11.2.1 试验菌株：大肠杆菌（8099）/金黄色葡萄球菌（ATCC 6538）可选用特定细菌进行试验。菌悬液按 5.1.2 制备。

5.2.11.2.2 中和剂溶液：经中和剂鉴定试验合格。

5.2.11.2.3 稀释液：TPS，见附录 A。

5.2.11.2.4 培养基：胰蛋白胨大豆琼脂培养基（TSA），见附录 A。

5.2.11.2.5 标准硬水：见附录 A。

5.2.11.2.6 有机干扰物：胰蛋白胨大豆肉汤培养基（TSB）。

5.2.11.2.7 载体：材质与产品说明书中要消毒的多孔物体相同，规格为 15 mm×15 mm×15 mm（厚度可≤15 mm）。

5.2.11.2.8 电动混匀器。

5.2.11.3 试验步骤

5.2.11.3.1 按产品使用说明书中的使用浓度与作用时间进行试验。

5.2.11.3.2 菌片的制备见 5.1.2.4。

5.2.11.3.3 取无菌器皿，按每个载体 10 mL～15 mL 用量加入消毒剂，以没过载体为准，置 20 ℃±1 ℃ 水浴中保温 5 min。

5.2.11.3.4 将 10 个染菌样本浸没于消毒液中进行消毒处理。

5.2.11.3.5 作用至规定时间，以无菌操作方式用镊子将载体移入含 10 mL 中和剂溶液的试管（离心管）内，电动混匀器振荡 20 s 或在手掌振打 200 次，分别取样液 1.0 mL 以倾注法接种平皿，每样本接种 2 个平皿，置 36 ℃±1 ℃ 恒温培养箱培养 48 h，计数菌落数，作为试验组。

5.2.11.3.6 每次试验，以标准硬水代替消毒液，将 2 个染菌样本以同样条件处理，然后与试验组样本同法进行活菌培养计数，作为阳性对照组，其菌量应在 1×10^6 CFU/样本～5×10^6 CFU/样本。

5.2.11.3.7 将本次试验未用完的同批次中和剂溶液、稀释液、培养基等设为阴性对照。

5.2.11.3.8 每次试验 10 个样本，进行 3 次重复试验。

5.2.11.3.9 按 5.1.7.4.8 计算每次试验的杀灭对数值和平均杀灭对数值。

5.2.11.4 评价规定

阴性对照组无菌生长，阳性对照组回收菌落数为1×10^6 CFU/样本～5×10^6 CFU/样本，30个样本的杀灭对数值均≥3.00，判定为消毒合格。

5.2.12 消毒剂对织物模拟现场消毒效果鉴定试验

5.2.12.1 目的

用于验证消毒剂对人工污染于织物上细菌的消毒效果。

5.2.12.2 试剂或材料

5.2.12.2.1 试验菌株：金黄色葡萄球菌（ATCC 6538），季铵盐类和胍类消毒剂用大肠杆菌（8099）。可增加特定细菌进行试验，菌悬液按 5.1.2 制备 。

5.2.12.2.2 有机干扰物：胰蛋白胨大豆肉汤培养基（TSB）。

5.2.12.2.3 中和剂溶液： 经中和剂鉴定试验合格。

5.2.12.2.4 稀释液：TPS，见附录 A。

5.2.12.2.5 培养基：胰蛋白胨大豆琼脂培养基（TSA）。

5.2.12.2.6 载体：布片，规格 10 mm×10 mm。

5.2.12.2.7 标准硬水：见附录 A。

5.2.12.2.8 小布袋：规格 50 mm×50 mm。

5.2.12.2.9 白大衣。

5.2.12.2.10 电动混匀器。

5.2.12.3 试验步骤

5.2.12.3.1 菌片的制备见 5.1.2.4。

5.2.12.3.2　将菌片放入小布袋中，每袋放入 1 个菌片，分别将 10 个小布袋放入 5 件白大衣的左右口袋内。

5.2.12.3.3　按说明书中的使用浓度将白大衣浸没于消毒剂溶液中，浸泡至设定的消毒作用时间，以无菌操作方式用镊子将菌片放入含 5 mL 中和剂溶液的试管内，电动混匀器振荡 20 s 或在手掌振打 80 次，作为试验组样本。

5.2.12.3.4　将 2 个菌片放入一小布袋中，浸没于标准硬水至与试验组同样的时间，以无菌操作方式用镊子将染菌布片放入含 5 mL 中和剂溶液的试管内，在电动混匀器上振荡 20 s 或在手掌振上打 80 次，作为阳性对照组样本。

5.2.12.3.5　将阳性对照组和试验组样本分别取 1.0 mL，以倾注法接种平皿，每个样本接种 2 个平皿，置 36 ℃±1 ℃恒温培养箱中培养 48 h，观察最终结果。

5.2.12.3.6　将本次试验未用完的同批次中和剂溶液、稀释液、培养基等分别设阴性对照。

5.2.12.3.7　试验重复 3 次。

5.2.12.3.8　按 5.1.7.4.8 计算每次试验的杀灭对数值和平均杀灭对数值。

5.2.12.4　评价规定

阴性对照组无菌生长，阳性对照组回收菌落数为1×10^6 CFU/片～5×10^6 CFU/片，30个样本的杀灭对数值均≥3.00，判定为消毒合格。

5.2.13　消毒剂对瓜果蔬菜模拟现场消毒效果鉴定试验

5.2.13.1　目的

用于验证消毒剂对瓜果蔬菜上细菌的消毒效果。

5.2.13.2　试剂或材料

5.2.13.2.1　试验菌株：大肠杆菌（8099），菌悬液按 5.1.2 制备 。

5.2.13.2.2　有机干扰物：胰蛋白胨大豆肉汤培养基（TSB）。

5.2.13.2.3　中和剂溶液：中和剂鉴定合格。

5.2.13.2.4　稀释液：TPS，见附录 A。

5.2.13.2.5　培养基：胰蛋白胨大豆琼脂培养基（TSA）。

5.2.13.2.6　标准硬水：见附录 A。

5.2.13.2.7　无菌棉拭。

5.2.13.2.8　灭菌剪刀。

5.2.13.2.9　试验用果蔬：首选粗细均匀、新鲜、普通品种黄瓜（表面有刺突，黄瓜周长约 10.0 cm），试验前标出染菌区，即取中间段，每段长度约 2.5 cm，使染菌区表面积为 25.0 cm^2。

5.2.13.2.10　电动混匀器。

5.2.13.3　操作程序

5.2.13.3.1　按产品使用说明书的消毒方法、作用浓度和作用时间，进行杀灭试验。

5.2.13.3.2 对试验样本先用水进行冲洗，无菌纱布擦干后，再用 75% 的乙醇擦拭，作用 3 min 再次进行无菌水冲洗，无菌纱布擦干（或晾干）备用。

5.2.13.3.3 用棉拭蘸取菌悬液均匀涂布在标出的染菌区，置 36 ℃±1 ℃恒温培养箱或室温至干燥。样本的回收菌量为 2.50×10^{7} CFU/样本～1.25×10^{8} CFU/样本。

5.2.13.3.4 按照每件试验样本 400 mL 配制试验浓度消毒液。将 10 件试验样本依次定时浸没于消毒液中，浸泡至设定时间取出样本，将无菌棉拭于含 10 mL 中和剂溶液试管中沾湿，分别在试验样本染菌区涂抹采样，棉拭横竖往返各 8 次，采样后将棉拭棉花端剪入原中和剂溶液试管内，电动混匀器振荡 20 s 或在手掌振打 200 次，作用 10 min，作为试验组样本。

5.2.13.3.5 按照每件试验样本 400 mL 配制标准硬水。将 2 件试验样本依次浸没于标准硬水中，浸泡时间和其余步骤与试验组相同，作为阳性对照组样本。

5.2.13.3.6 将阳性对照组和试验组样本分别取 1.0 mL，以倾注法接种平皿，每个样本接种 2 个平皿，置 36 ℃±1 ℃恒温培养箱中培养 48 h，观察最终结果。

5.2.13.3.7 将本次试验未用完的同批次中和剂溶液、稀释液、培养基等分别设阴性对照。

5.2.13.3.8 试验重复 3 次。

5.2.13.3.9 按 5.1.7.4.8 计算杀灭对数值。

5.2.13.4 评价规定

三次试验阴性对照均无菌生长，阳性对照组回收菌量均为2.50×10^{7} CFU/样本～1.25×10^{8} CFU/样本，30个样本的杀灭对数值均≥3.00，所用消毒剂的浓度和作用时间为消毒合格剂量。

5.2.14 消毒剂对瓜果蔬菜现场消毒效果鉴定试验

5.2.14.1 目的

用于验证消毒剂对瓜果蔬菜上细菌的现场消毒效果。

5.2.14.2 试剂或材料

5.2.14.2.1 中和剂溶液：经中和剂鉴定试验合格。

5.2.14.2.2 稀释液：TPS，见附录 A。

5.2.14.2.3 PBS（0.03 mol/L 磷酸盐缓冲液）。

5.2.14.2.4 培养基：胰蛋白胨大豆琼脂培养基（TSA），见附录 A。

5.2.14.2.5 无菌棉拭。

5.2.14.2.6 电动混匀器。

5.2.14.2.7 试验用果蔬：首选粗细均匀、新鲜、普通品种黄瓜（黄瓜周长约 10.0 cm），试验前标出黄瓜中间段相邻两段区域，每段长度约 2.5 cm，使每个区域表面积为 25 cm^2。

5.2.14.3 操作程序

按说明书介绍的使用浓度、作用时间和消毒方法消毒物体表面，检测样本数应≥30份。操作程序如下：

a) 在黄瓜中间段标定 2 块相邻的面积各为 25cm^{2}的区块，一个区域供消毒前采样，另一区域供消毒后采样；

b) 将无菌棉拭在含 10 mL PBS 的试管中浸湿，于管壁上挤干，在对照区域涂抹采样，横竖往返各 8 次，并对已采样区域做标记。采样后，以无菌操作方式将棉拭采样端剪入原稀释液试管内，电动混匀器振荡 20 s 或在手掌振打 200 次，做适当稀释后，作为阳性对照组样本；

c) 按照每件试验样本 400 mL 配制试验浓度消毒液，按说明书中的方法和剂量对黄瓜表面进行消毒。将试验样本依次定时浸没于消毒液中，浸泡至设定时间取出样本，将无菌棉拭在含 10 mL 中和剂溶液试管中浸湿，于管壁上挤干，消毒作用至设定时间，对黄瓜消毒区域涂抹采样，横竖往返各 8 次。采样后，以无菌操作方式将棉拭采样端剪入原中和剂溶液试管内，电动混匀器振荡 20 s 或在手掌振打 200 次，作为试验组样本；

d) 将阳性对照组和试验组样本，分别取 1.0 mL，以琼脂倾注法接种平皿，每个样本接种 2 个平皿，置 36 ℃±1 ℃恒温培养箱中培养 48 h，每日观察并记录最终结果；

e) 将本次试验未用完的同批次中和剂溶液、稀释液、棉拭、培养基等设阴性对照；

f) 每次试验 10 个样本，试验重复 3 次；

g) 以每样本为单位，按 5.1.7.4.8 计算每个样本的杀灭对数值和平均杀灭对数值。

5.2.14.4 评价规定

阴性对照组应无菌生长，阳性对照组应有较多细菌生长，30个样本消毒后的平均杀灭率≥90%，判定为消毒合格。

5.2.14.5 注意事项

5.2.14.5.1 在现场试验中，自然菌的种类复杂，平板上常出现大面积霉菌生长，导致无法计数菌落。在两个平行的平板中如有一个平板可数清菌落数时，即按该平板菌落数计算结果。如两平板均有大面积霉菌生长，应重新进行试验。

5.2.14.5.2 阳性对照组和试验组应在同一根黄瓜相邻的区域，但不得在同一区内进行试验。

5.2.14.5.3 棉拭涂抹采样较难标准化，为此应尽量使棉拭的大小、用力的均匀、吸取采样液的量以及洗菌时敲打的轻重等等先后一致。

5.2.14.5.4 现场样本应及时检测。室温存放不得超过 2 h，4 ℃冰箱存放不得超过 4 h。

5.2.15 消毒剂对内镜模拟现场消毒效果鉴定试验

5.2.15.1 目的

用于评价人工污染于内镜上的细菌的消毒效果。

5.2.15.2 仪器设备或试剂材料

5.2.15.2.1 试验菌株：铜绿假单胞菌（ATCC 15442）、枯草杆菌黑色变种（ATCC 9372）芽胞和龟分枝杆菌脓肿亚种（CMCC（B）93326 或 ATCC 19977）；根据特定用途或试验特殊需要，可增选其他菌株。

5.2.15.2.2 中和剂（鉴定合格）、稀释液：胰蛋白胨生理盐水溶液（TPS）。

5.2.15.2.3 有机干扰物：胰蛋白胨大豆肉汤培养基（TSB）。

5.2.15.2.4 模拟内镜：聚四氟乙烯管，外径 10 mm，内径 6 mm，总长度 2000 mm，分别在 50 mm、1000 mm、1950mm 处剪断，共分为 4 截。其内壁能与载体外壁紧密相套连接。

5.2.15.2.5 载体：聚四氟乙烯管（外径 6 mm，内径 4 mm，长度 30 mm）经脱脂处理高压灭菌后备用。

5.2.15.2.6 蠕动泵：可调节流速，有单个或多个通道，驱动器转速在 1 r/min～100 r/min。

5.2.15.2.7 电动混匀器。

5.2.15.3 试验步骤

5.2.15.3.1 染菌载体的制备：取 0.02 mL 芽胞液/菌悬液滴染于聚四氟乙烯管载体内壁，涂抹均匀，置 54℃或 37℃培养箱中干燥备用。

5.2.15.3.2 染菌模拟内镜的制备：试验时，先将模拟内镜体在 50 mm、1000 mm 和 1950 mm 处剪开，取染菌载体分别连接在 50 mm、1000 mm、和 1950 mm 处，连接处用封口膜密封。

5.2.15.3.3 浸泡消毒程序：将染菌模拟内镜完全浸没在消毒剂中，染菌模拟内镜一端与蠕动泵连接，以 0.1 L/min～0.2 L/min 的流速，进行流动浸泡消毒，按消毒剂使用说明书的规定浸泡至作用时间。机械自动清洗程序：将模拟内镜体装放于清洗消毒机内规定的位置，按照供应商提供的说明书规定的程序运行。

5.2.15.3.4 细菌菌落计数：消毒处理完毕后，用灭菌镊子将染菌载体取出，分别置于含有 10 mL 中和剂溶液的试管内，敲打 200 次，分别吸取洗脱液 1.0 mL 接种平皿，每份样本接种两个平皿。阳性对照组，取 2 个染菌载体，放置室温环境中，不作消毒处理，待试验组处理结束，将染菌载体置于含有 10 mL 中和剂溶液的试管中，敲打 200 次，用稀释液做 10 倍系列稀释，选适宜稀释度的悬液，分别吸取 1.0 mL 接种平皿，每份样本接种两个平皿。同时分别吸取试验用中和剂和稀释液各 1.0 mL 接种平皿，每份样本接种两个平皿，作为阴性对照组。各组接种平皿后，倾注 15 mL～20 mL TSA，待凝固后，置 36 ℃±1 ℃培养箱内，培养 72 h，计数菌落数。

5.2.15.3.5 按 5.1.7.4.8 计算杀灭对数值。

5.2.15.3.6 试验重复 3 次。

5.2.15.4 评价规定

符合以下条件可判断消毒合格：

a) 阴性对照组无菌生长；

b) 阳性对照组，枯草杆菌黑色变种芽胞和龟分枝杆菌脓肿亚种的回收菌落数均为 1×10^6 CFU/载体～5×10^6 CFU/载体。铜绿假单胞菌回收的菌落数为 1×10^7 CFU/载体～5×10^7 CFU/载体；

c) 每次试验铜绿假单胞菌杀灭对数值均≥5.00，龟分枝杆菌脓肿亚种杀灭对数值均≥4.00，枯草杆菌黑色变种芽胞杀灭对数值均≥3.00；

d) 3 次试验均达合格要求。

5.2.16 消毒剂对血液透析机模拟现场消毒效果鉴定试验

5.2.16.1 目的

用于评价消毒剂对人工污染微生物的血液透析机的消毒效果。

5.2.16.2 试剂或材料

5.2.16.2.1 试验菌株：枯草杆菌黑色变种（ATCC9372）芽胞，根据特定用途或试验特殊需要，可增选其他菌株。

5.2.16.2.2 中和剂溶液：经中和剂鉴定试验合格。

5.2.16.2.3 有机干扰物：胰蛋白胨大豆肉汤培养基（TSB）。

5.2.16.2.4 载体：聚四氟乙烯管（外径 6 mm，内径 4 mm，长度 30 mm）经脱脂处理压力蒸汽灭菌后备用。

5.2.16.2.5 培养基：胰蛋白胨大豆琼脂培养基（TSA）。

5.2.16.2.6 血液透析机。

5.2.16.3 试验步骤

5.2.16.3.1 染菌载体的制备：取 0.02 mL 芽胞悬液滴染于聚四氟乙烯管载体内壁，涂抹均匀，置 54 ℃或 37 ℃培养箱中干燥备用。

5.2.16.3.2 染菌载体的放置：将 6 个染菌载体放入血液透析机旁路内连器（管）中。

5.2.16.3.3 血液透析机消毒程序：按照产品说明书规定的程序运行。

5.2.16.3.4 细菌菌落计数：消毒处理完毕后，用灭菌镊子将染菌载体取出，分别置于含有 10 mL 中和剂溶液的试管内，敲打 200 次，分别吸取洗脱液 1.0 mL 接种平皿，每个样本接种两个平皿。阳性对照组，取 2 个染菌载体，放置室温环境中，不作消毒处理，待试验组处理结束，将染菌载体置于含有 10 mL 中和剂溶液的试管中，敲打 200 次，用稀释液做 10 倍系列稀释，选适宜稀释度的悬液，分别吸取 1.0 mL 接种平皿，每个样本接种两个平皿。同时分别吸取试验用中和剂和稀释液各 1.0 mL 接种平皿，每份样本接种两个平皿，作为阴性对照组。各组接种平皿后，倾注 15 mL～20 mL TSA，待凝固后，置 36 ℃±1 ℃培养箱内，培养 72 h，计数菌落数，按 5.1.7.4.8 计算杀灭对数值。

5.2.16.3.5 每次试验 6 个样本，试验重复 5 次。

5.2.16.3.6 结果判定：阴性对照组无菌生长，阳性对照组菌量为 1×10^6 CFU/载体～5×10^6 CFU/载体。30 个样本的杀灭对数值均≥3.00，判定为消毒合格。

5.2.17 消毒剂对食品加工工具和设备模拟现场消毒效果鉴定试验

参照消毒剂对食（饮）具模拟现场消毒效果鉴定中方法（见5.2.1）进行试验。

5.3 空气消毒效果鉴定试验

5.3.1 目的

用于验证消毒器械或消毒剂对空气中细菌的消毒效果。

5.3.2 仪器设备或试剂材料

5.3.2.1 试验菌株：白色葡萄球菌（8032）。

5.3.2.2 采样液：非化学因子杀菌试验时，用含抗泡沫剂（辛醇或橄榄油）的营养肉汤培养基；化学因子杀菌试验时，用相应中和剂的营养肉汤培养基（加入辛醇或橄榄油）。

5.3.2.3 采样平板：非化学因子杀菌试验时，用普通营养琼脂平板；化学因子杀菌试验时，用含相应中和剂的普通营养琼脂平板。

5.3.2.4 稀释液：TPS，见附录A。

5.3.2.5 相邻的一对气雾柜（或气雾室），一个用于消毒试验，一个用于试验对照。一对气雾柜（或气雾室）所处环境（包括温度、湿度、光照、密闭性和通风条件等）应一致。柜（或室）宜以不锈钢或铝合金和玻璃构建。应安装温度和湿度调节装置以及通风机过滤除菌或其他消毒装置和相应管道，此外，还应开启喷雾染菌、给消毒剂、采样、袖套操作、样本传递和空气搅拌装置等窗口。

5.3.2.6 染菌装置，包括：空气压缩机、压力表、气体流量计、气溶胶发生器等。喷出细菌气溶胶微粒的直径90%以上应为1 μm～10 μm。

5.3.2.7 空气微生物采样装置，包括：六级筛孔空气撞击式采样器、液体撞击式采样器、抽气设备、气体流量计等。

5.3.2.8 环境监测器材，如温度计、湿度计等。

5.3.3 中和剂鉴定试验

5.3.3.1 六级筛孔空气撞击式方法

5.3.3.1.1 实验用气雾柜和气雾室

消毒剂试验在1 m^3的气雾柜（或20 m^3～30 m^3 的气雾室）中进行，消毒器械试验在20 m^3～30 m^3气雾室内进行。

5.3.3.1.2 菌悬液的制备

取3～8代白色葡萄球菌18 h～24 h新鲜培养物，5 mL营养肉汤培养基反复吹洗，洗下菌苔，用营养肉汤稀释至浓度为5×10^2 CFU/mL～3×10^3 CFU/mL，备用。

5.3.3.1.3 试验操作

试验分组及操作步骤如下：

a) 第 1 组：分别吸取上述稀释的菌悬液0.1 mL，均匀涂抹于2块含中和剂的营养琼脂平板上，做活菌培养计数。观察中和剂对试验菌生长有无抑制作用；

b) 第 2 组：按产品使用说明书中消毒剂的使用剂量，在1 m^3的气雾柜（或20 m^3～30 m^3气雾室）中喷雾消毒剂或开启消毒器械，作用至消毒预定时间，立即用装有中和剂营养琼脂平板的六级空气撞击式采样器进行采样，空气采样体积与空气消毒鉴定试验预设消毒后采样时间（或采样体积）相同，采样结束后，作用10 min，分别吸取上述稀释的菌悬液0.1 mL，均匀涂抹于6块采集了消毒剂的平皿，做活菌培养计数，观察中和产物对试验菌生长有无抑制作用。

c) 第 3 组：分别吸取上述稀释的菌悬液 0.1 mL，均匀涂抹于 2 块普通营养琼脂平板表面，做活菌培养计数，作为菌数对照。

d) 第 4 组：分别吸取稀释液 0.1 mL，均匀涂抹于 2 块含中和剂的营养琼脂平板上和两块普通营养琼脂平板上，36 ℃±1 ℃恒温培养箱中培养 48 h，作为阴性对照组。

5.3.3.1.4 评价规定

实验结果符合以下全部条件，所测中和剂可判为合格：

a) 第 1～3 组菌量为 50 CFU/平板～300 CFU/平板，三组间菌落数误差率应不超过 15%。三组间菌落数误差率按公式（3）计算。

b) 第 4 组无菌生长。否则，说明试剂有污染，应更换无污染的试剂重新进行试验。

c) 试验重复 3 次，每次试验均应符合以上条件。

5.3.3.2 液体冲击式采样法

5.3.3.2.1 实验用气雾柜和气雾室

消毒剂试验在1 m^3的气雾柜（或20 m^3～30 m^3的气雾室）中进行，消毒器械试验在20 m^3～30 m^3气雾室内进行。

5.3.3.2.2 菌悬液的配制

取3～8代白色葡萄球菌18 h～24 h新鲜培养物，5 mL营养肉汤培养基反复吹洗，洗下菌苔，用营养肉汤稀释至浓度为5×10^3 CFU/mL～3×10^4 CFU/mL，备用。

5.3.3.2.3 试验操作

试验分组及操作步骤如下：

a) 第 1 组：在 1 m^3气雾柜（或 20 m^3～30 m^3气雾室）里喷雾硬水，喷雾剂量与产品说明书中消毒剂的使用剂量相同，待喷雾结束后，作用至消毒预定时间，立即用装有 10 mL 含中和剂采样液的采样器进行采样，空气采样体积与空气消毒鉴定试验预设消毒后采样时间（或采样体积）相同，采样结束后，作用 10 min，在采样液中加入 0.1 mL 菌悬液，混匀，分别吸取 1.0 mL 接种于两个平皿中，置 36 ℃±1 ℃培养箱内进行菌落计数培养，48 h 记录试验结果。该组观察含中和剂的采样液对试验菌生长有无抑制作用。

b) 第 2 组：在 1 m^3气雾柜（或 20 m^3～30 m^3气雾室）里喷雾消毒剂，喷雾剂量与产品说明书中消毒剂的使用剂量相同，待喷雾结束后，作用至消毒预定时间，立即用装有 10 mL 含中和剂采样液的采样器进行采样，空气采样体积与空气消毒鉴定试验预设消毒后采样时间（或采样体积）相同，采样结束后，作用 10 min，在采样液中加入 0.1 mL 菌悬液，混匀，分别吸取 1.0 mL 接种于两个平皿中，置 36 ℃±1 ℃培养箱内进行菌落计数培养，48 h 记录试验结果。该组观察含中和产物的采样液对试验菌生长有无抑制作用。

c) 第 3 组：在 1 m^3气雾柜（或 20 m^3～30 m^3气雾室）里喷雾硬水，喷雾剂量与产品说明书中消毒剂的使用剂量相同，待喷雾结束后，作用至消毒预定时间，立即用装有 10 mL 采样液的采样器进行采样，空气采样体积与空气消毒鉴定试验预设消毒后采样时间（或采样体积）相同，

采样结束后，作用 10 min，在采样液中加入 0.1 mL 菌液，混匀，分别吸取 1.0 mL 接种于两个平皿中，置 36 ℃±1 ℃培养箱内进行菌落计数培养，48 h 记录试验结果。该组作为菌数对照；

d) 第 4 组：分别吸取稀释液、采样液各 1.0 mL 于无菌平皿内，倒入上述试验同批次的培养基 15 mL～20 mL，置 36 ℃±1 ℃培养箱内进行培养。该组作为阴性对照。

5.3.3.2.4 评价规定

试验结果符合以下全部条件时，可判断所选中和剂合格。

a) 第 1～3 组菌量为 50 CFU/mL～300 CFU/mL，三组间菌落数误差率应不超过 15%。三组间菌落数误差率按公式（3）计算。

b) 第 4 组无菌生长。否则，说明试剂有污染，应更换无污染的试剂重新进行试验

c) 试验重复 3 次，每次试验均应符合以上条件。

5.3.4 实验阶段

空气消毒试验分为实验室试验与现场试验两个阶段。两个阶段试验的特点见表4。

表4 各阶段空气消毒试验的特点

项 目	实验室试验		现场试验
目 的	测定最低有效剂量		验证实用消毒效果
试 验 柜（室）	≥1 m^3柜	20 m^3～30 m^3室	≥20 m^3房间
采 样 器	液体撞击式	六级筛孔空气撞击式 或液体撞击式	六级筛孔空气撞击式 或液体撞击式
菌 株	白色葡萄球菌	白色葡萄球菌	空气中自然菌
试验菌雾粒	＜10 μm	＜10 μm	不 定
温 度	20 ℃～25 ℃	20 ℃～25 ℃	自然条件
相对湿度	50%～70%	50%～70%	自然条件
中 和 剂	加于采样液中 或采样平板中	加于采样液中 或采样平板中	加于采样液中 或采样平板中
对 照	需有自然消亡对照	需有自然消亡对照	不需自然消亡对照
结果计算	杀灭率	杀灭率	消亡率

5.3.5 空气消毒效果实验室试验

5.3.5.1 取试验菌菌悬液，用无菌脱脂棉过滤后，再用营养肉汤培养基稀释成所需浓度。

5.3.5.2 同时调节两个气雾柜（或室）的温度、相对湿度至试验要求的温度和相对湿度。

5.3.5.3　将使用的器材一次放入气雾柜（或室）内，将门关闭。此后，一切操作和仪器设备的操纵均在柜（或室）外通过带有密封袖套的窗口或摇控器进行。直至试验结束并对气雾柜（或室）内空气进行消毒后，方可将门打开。

5.3.5.4　按设定的压力、气体流量及喷雾时间喷雾染菌。边喷雾染菌，边用风扇搅拌。喷雾染菌完毕，继续搅拌 5 min，而后静置 5 min，同时对对照组和试验组气雾柜（或室）分别进行消毒前采样，作为对照组试验开始前和试验组消毒处理前的阳性对照（即污染菌量）。气雾柜（或室）内空气细菌浓度应达 5×10^4 CFU/m^3～5×10^6 CFU/m^3（按消毒处理前阳性对照样本检测结果计）。

5.3.5.5　在实验室鉴定试验时，气雾室内用六级筛孔空气撞击式采样器（或液体撞击式采样器）采样时，将采样器放在室中央 1.0 m 高处（采样方法按采样器使用说明书进行）。气雾柜内用采样量较小的液体撞击式采样器采样，采样器置柜内中央处。

5.3.5.6　按产品说明书规定方法，在试验气雾柜（或室）内进行消毒。对照组气雾柜（或室）同时作相应（不含消毒剂）处理。

5.3.5.7　作用至规定时间，对试验组和对照组气雾柜（或室）按前述要求同时进行采样。

5.3.5.8 在实验室试验阶段，用液体撞击式采样器采集的样本，按 5.1.3 所示方法进行活菌培养计数，在 36 ℃±1 ℃恒温培养箱内培养 48 h，观察最后结果。用六级筛孔空气撞击式采样器采样时，采样平板直接放入 36 ℃±1 ℃恒温培养箱中培养 48 h，观察最后结果，计数生长菌落。

5.3.5.9 全程试验完毕，对表面和空气中残留的细菌做最终消毒后，打开通风机过滤除菌排风，排除柜（或室）内滞留的污染空气，为下一次试验作好准备。5.3.5.10 在完成试验组与阳性对照组采样和样本接种后，应将未用的同批培养基、采样液和 TPS 等（各取 1 份～2 份），与上述两组样本同时进行培养或接种后培养，作为阴性对照。若阴性对照组有菌生长，说明所用培养基或试剂有污染，试验无效，更换无菌器材重新进行。

5.3.5.11 试验重复 3 次，分别计算每次试验的杀灭率，杀灭率均≥99.90% 时判定为消毒合格。杀灭率的计算方法按公式（9）和（10）：

$$N_t = \frac{V_0 - V_t}{V_0} \times 100\% \quad (9)$$

$$K_t = \frac{V_0'(1-N_t) - V_t'}{V_0'(1-N_t)} \times 100\% \quad (10)$$

式中：

Nt——不同时间空气中细菌的自然消亡率；

V_0 与 V_t——分别为对照组试验开始前和试验过程中不同时间的空气含菌量；

Kt——消毒处理对空气中细菌的杀灭率；

V_0'与 V_t'——分别为试验组消毒处理前和消毒过程中不同时间的空气含菌量。

消毒前后空气中的含菌量计算方法见如下举例。

举例：用某消毒剂对气雾柜内空气消毒10 min，试验组消毒前空气含菌量为100 000 CFU/m³，消毒后为50 CFU/m³；对照组处理前空气含菌量为90 000 CFU/m³，处理后为50 000 CFU/m³。该消毒剂作用10 min对空气中微生物的杀灭率按下法计算：

a） 细菌在空气中 10 min 的自然消亡率为：

$$N_t = \frac{90000 - 50000}{90000} \times 100\% = 44.44\%$$

b） 对空气中微生物的杀灭率为：

$$K_t = \frac{100000(1 - 44.44\%) - 50}{100000(1 - 44.44\%)} \times 100\% = \frac{55560 - 50}{55560} \times 100\% = 99.91\%$$

5.3.6 空气消毒效果现场试验

5.3.6.1 按说明书选择相应大小的房间，在室内无人情况下进行试验。用六级筛孔空气撞击式采样器进行空气中自然菌采样，作为消毒前样本（阳性对照）。消毒处理后，再做一次采样，作为消毒后的试验样本。

5.3.6.2 采样时，采样器置室内中央 1.0 m 高处。房间大于 10 ㎡者，每增加 10 ㎡增设一点，最多设 5 点。

5.3.6.3 因现场试验环境条件变化较多，难以统一，无法测定准确的自然沉降率，故只按所得消亡率（自然衰亡和消毒处理中杀菌的综合效果）做出验证结论。消亡率的计算按公式（11）进行：

$$K = \frac{B - A}{B} \times 100\% \quad \cdots\cdots (11)$$

式中：

K——消亡率；

B——消毒前样本平均菌数；

A——消毒后样本平均菌数。

举例：一无人手术室，消毒前采样，空气中的平均含菌量为 5000 CFU/m³。用某消毒剂喷雾对室内空气消毒 30 min 后采样，含菌量减至 50 CFU/m³。该消毒剂处理 30 min 后，室内空气中自然菌的消亡率可按下法计算：

$$\text{消亡率} = \frac{5000 - 50}{5000} \times 100\% = 99.00\%$$

该消毒剂作用 30 min，可使房间内空气中自然菌的消亡率达 99.00%。

5.3.6.4 试验采样完成后，应将未用的同批培养基，与上述试验样本同时进行培养或接种后培养，作为阴性对照。阴性对照组若有菌生长，说明所用培养基有污染，试验无效，更换后重新进行。

5.3.6.5 试验重复 3 次。计算出每次的消亡率。除有特殊要求者外，对无人室内进行的空气消毒，每次的自然菌消亡率均≥90% 者为合格。

5.3.7 注意事项

5.3.7.1 实验室试验中，每次均应同时设置试验组与对照组。两组条件尽量保持一致。消毒前、后及不同次数间的环境条件亦应尽量保持一致。

5.3.7.2 注意记录试验过程中的温度和相对湿度，以便分析对比。

5.3.7.3 现场试验时消毒前菌数≤500 CFU/m^3 可更换场所重新检测。

5.3.7.4 每次试验完毕，气雾柜、气雾室应充分通风。必要时消毒冲洗间隔 4 h 后方可做第二次试验。

5.3.7.5 试验时，气雾柜（或室）必须保持密闭，设有空气过滤装置，以防染菌空气外逸，污染环境。

5.3.7.6 试验时，气雾柜、气雾室或现场房间应防止日光直射，以免造成杀菌作用不稳定。

5.3.7.7 雾柜排风过滤装置中的滤材应定期更换，换下的滤材应经灭菌后再作其他处理。

5.3.7.8 在气雾柜或密闭房间内进行消毒剂喷雾消毒时，用悬挂染菌样片法观察的消毒效果，不能代表对空气的消毒效果。

5.4 水消毒效果评价试验

5.4.1 生活饮用水消毒效果评价试验

5.4.1.1 仪器设备或试剂材料

5.4.1.1.1 试验菌株：大肠杆菌（8099）。

5.4.1.1.2 微孔滤膜滤器和滤膜（滤膜孔径为 0.45 μm，滤膜大小视滤器型号确定）。

5.4.1.1.3 抽滤水泵或气泵。

5.4.1.1.4 恒温水浴箱。

5.4.1.1.5 无菌三角烧瓶和广口瓶。

5.4.1.1.6 品红亚硫酸钠琼脂培养基，见附录 A。

5.4.1.1.7 中和剂溶液：经中和剂鉴定合格。

5.4.1.1.8 磁力搅拌器、电动混匀器。

5.4.1.1.9 标准硬水：见附录 A。

5.4.1.1.10 消毒剂溶液除有特殊规定者外，应使用无菌硬水配制。消毒剂溶液浓度应以所含有效成份为准。

5.4.1.1.11 刻度吸管。

5.4.1.1.12 恒温培养箱。

5.4.1.1.13 秒表。

5.4.1.1.14 稀释液：见附录 A。

5.4.1.1.15 胰蛋白胨大豆琼脂培养基，见附录 A。

5.4.1.1.16 生理盐水：见附录 A。

5.4.1.2 试验菌污染水样的配制和菌落计数

5.4.1.2.1 试验菌污染水样配制

取36 ℃±1 ℃培养18 h～24 h的新鲜大肠杆菌斜面，用稀释液洗下菌苔，混匀后再用生理盐水适当稀释，配制成试验用大肠杆菌悬液。将大肠杆菌悬液加入装有脱氯自来水或蒸馏水的三角烧瓶中，放入恒温水浴箱（20 ℃±2 ℃）中，开动磁力搅拌器5 min，使大肠杆菌在水中分布均匀。

5.4.1.2.2 菌落计数

菌落计数方法如下：

a) 用无菌镊子夹取滤膜边缘，将粗燥面向上，贴放在已灭菌滤器的滤床上，稳妥地固定好滤器。取一定量待检水样（稀释或不稀释）注入滤器中，在负压 0.05 MPa 下抽滤；

b) 水样滤完后，再抽气约 5 s，关上滤器阀门，取下滤器。用无菌镊子夹取滤膜边缘，移放在品红亚硫酸钠琼脂培养基平板上，滤膜截留细菌面向上。滤膜应与培养基完全紧贴，当中不得留有气泡，然后将平板倒置，放入 36 ℃±1 ℃恒温培养箱内培养 22 h～24 h。

c) 观察结果和计数：计数滤膜上生长带有金属光泽的黑紫色大肠杆菌菌落，并计算出染菌水样中含有的大肠杆菌数（CFU/100 mL）。

5.4.1.3 中和剂鉴定试验

5.4.1.3.1 试验前准备

按 5.4.1.2.1方法制备水样，使水样中大肠杆菌量为5×10^2 CFU/100mL～2×10^3 CFU/100mL。将装有600 mL染菌水样的三角烧瓶和加入消毒剂、倍数浓度中和剂的300 mL脱氯自来水的三角烧瓶标记好，放入恒温水浴箱（20 ℃±2 ℃）中，开动磁力搅拌器5 min。按消毒剂产品使用说明书规定的最高剂量，进行中和剂鉴定试验。

5.4.1.3.2 试验方法

消毒剂化学除药方法的鉴定，至少应平行进行以下试验。

a) 第 1 组：取 300 mL 染菌水样，加入倍数中和剂，使水样中的中和剂含量为拟使用含量，混匀作用 10 min，分别取 100 mL、10 mL、1 mL 各两份，系列稀释，用滤膜法进行大肠杆菌菌落计数；

b) 第 2 组：分别取 100 mL、10 mL、1 mL 染菌水样各两份，系列稀释，用滤膜法进行大肠杆菌菌落计数；

c) 第 3 组：将装有加入消毒剂、倍数浓度中和剂的 300mL 脱氯自来水恒温 10 min 后，加入大肠杆菌悬液混匀作用 10 min，分别取 100 mL、10 mL、1 mL 水样各两份，系列稀释，用滤膜法进行大肠杆菌菌落计数；

d) 第 4 组：分别取 100 mL 脱氯自来水各两份，各加入倍数中和剂混匀（使水样中的中和剂含量为拟使用含量），用滤膜法进行大肠杆菌菌落计数，作为阴性对照组。

试验重复3次。

5.4.1.3.3 评价规定

三次试验结果中，1、2、3组平均菌量分别为5×10^2 CFU/100 mL～2×10^3 CFU/100 mL，且组间误差率不超过15%，第4组（阴性对照组）无大肠杆菌生长时，判定为实验室中和剂试验有效，若未达上述要求，应查找原因，纠正后重做试验。

5.4.1.4 生活饮用水（集中供水、高层建筑二次供水）消毒效果评价试验

通过实验室模拟现场试验和对天然水样消毒试验，评价对自来水厂等集中供水和高层建筑二次供水的消毒效果。实验室模拟现场试验是以大肠杆菌为试验菌评价消毒效果，天然水样消毒试验是由自然水体取样，进一步评价受试消毒剂或方法对成分较复杂的天然水的消毒效果。

5.4.1.5 生活饮用水（分散式供水）消毒效果评价试验

通过实验室模拟现场试验和对天然水样消毒试验，评价对用于疫源地或特殊条件下的生活饮用水水源水的消毒效果。实验室模拟试验是以大肠杆菌为试验菌评价消毒效果，天然水样消毒试验是由自然水体取样，进一步评价受试消毒剂或方法对成分较复杂的天然水的消毒效果。

5.4.1.5.1 模拟现场消毒效果评价

5.4.1.5.1.1 试验方法

选择使用说明书规定的最小剂量和最短作用时间进行试验。试验方法如下：

a) 按 5.4.1.2.1 所示方法配制试验菌污染水样。

b) 将装有试验菌污染水样的三角烧瓶放入恒温水浴箱（20 ℃±2 ℃）中，开动磁力搅拌器 5 min，使大肠杆菌在水中分布均匀。先取 2 份试验菌污染水样进行大肠杆菌菌落计数，作为阳性对照组。

c) 待水样的温度恒定后加入消毒剂，迅速搅拌均匀。从开始加消毒剂起计时，按规定时间吸取水样，注入装有中和剂的无菌三角烧瓶中，以终止消毒作用。

d) 将中和后水样，分别取 100 mL、10 mL、1 mL 各 2 份，按 5.4.1.2.2 所示方法进行大肠杆菌菌落计数。

e) 将未接种大肠杆菌的试验用同批培养基平板 2 个，36 ℃±1 ℃培养 18 h～24 h，作为阴性对照组。

f) 试验重复 3 次。

5.4.1.5.1.2 评价规定

三次试验均对大肠杆菌杀灭对数值≥3.00，阳性对照组平均菌量在1×10^4 CFU/100 mL～1×10^5 CFU/100 mL，阴性对照组均无大肠杆菌生长时，可判定为实验室模拟现场试验合格。

5.4.1.5.2 现场消毒效果评价

5.4.1.5.2.1 试验方法

选择使用说明书规定的最小剂量和最短作用时间进行试验。试验方法如下：

a) 自然水体取样，将装有天然水样的三角烧瓶放入恒温水浴箱（20 ℃±2 ℃）中，开动磁力搅拌器混匀 5 min，取 2 份按 5.4.1.2.2 所示方法进行大肠菌群计数，同时各取 1.0 mL 接种两个平皿，倾注胰蛋白胨大豆琼脂培养基，计数菌落，作为阳性对照组。

b) 在天然水样中加入消毒剂，迅速搅拌均匀。从开始加消毒剂起计时，按规定时间吸取水样，注入装有中和剂的无菌三角烧瓶中，以终止消毒作用。

c) 将中和后水样取 2 份，按 5.4.1.2.2 所示方法进行总大肠菌群检测，同时各取 1.0 mL 接种两个平皿，倾注胰蛋白胨大豆琼脂培养基，36 ℃±1 ℃培养 48 h，计数菌落，作为试验组样本。

d) 将试验用同批培养基平板各 2 个，36 ℃±1 ℃培养 48 h，作为阴性对照组。

e) 试验重复 3 次。

5.4.1.5.2.2 评价规定

三次试验中天然水样消毒前均有菌且有大肠菌群生长，菌落总数＞1×10^3 CFU/mL，总大肠菌群＞10 CFU/100 mL；阴性对照组均无菌生长；三次试验对自然水体水样菌落总数的杀灭对数值均≥1.00，消毒后自然水体（每100 mL）总大肠菌群均未检出，菌落总数≤100 CFU/mL；可判定为对天然水样消毒现场试验合格。

5.4.2 人工游泳池水消毒效果评价试验

5.4.2.1 目的

通过游泳池水现场消毒试验，评价对游泳池水的消毒效果。游泳池水现场消毒试验是由游泳池水体取样，进一步验证受试消毒剂或方法对成分较复杂的游泳池水的消毒效果。

5.4.2.2 仪器设备或试剂材料

5.4.2.2.1 微孔滤膜滤器和滤膜（滤膜孔径为 0.45 μm，滤膜大小视滤器型号确定）。

5.4.2.2.2 抽滤水泵或气泵。

5.4.2.2.3 恒温水浴箱。

5.4.2.2.4 无菌三角烧瓶和广口瓶。

5.4.2.2.5 生理盐水：见附录 A。

5.4.2.2.6 中和剂：经鉴定合格。

5.4.2.2.7 磁力搅拌器、电动混匀器。

5.4.2.2.8 标准硬水：见附录 A。

5.4.2.2.9 消毒剂溶液除有特殊规定者外，应使用无菌硬水配制。消毒剂溶液浓度应以所含有效成份为准。

5.4.2.2.10 刻度吸管。

5.4.2.2.11 恒温培养箱。

5.4.2.2.12 秒表。

5.4.2.2.13 稀释液：见附录 A。

5.4.2.2.14 培养基：胰蛋白胨大豆琼脂培养基、品红亚硫酸钠琼脂培养基、伊红美兰琼脂培养基，见附录 A。

5.4.2.3 现场消毒效果评价

5.4.2.3.1 试验方法

选择使用说明书规定的最小剂量和最短作用时间进行试验。试验方法如下：

a) 在人工游泳池现场采集水样。游泳池水面≤1000 m^2，设 2 个采样点；＞1000 m^2，设 3 个采样点。

b) 采样时，使用无菌玻璃瓶在水面下 30 cm 深处采集，瓶内加有适量鉴定合格的中和剂溶液。宜以闭馆后、消毒前的样本作为阳性对照样本；

c) 将装有游泳池水样的三角烧瓶放入恒温水浴箱（20 ℃±2 ℃）中，开动磁力搅拌器 5 min，作为阳性对照组；

d) 水样温度恒定后加入消毒剂，迅速搅拌均匀。从开始加消毒剂起计时，作用至规定时间后，吸取水样，注入装有中和剂的无菌三角烧瓶中，以终止消毒作用，作为试验组样本；

e) 将阳性对照组和试验组样本，按照 GB/T 18204.9 和 GB/T 18204.10 检测菌落总数和大肠菌群数；

f) 试验重复 5 次。

5.4.2.3.2 评价规定

五次试验中游泳池水消毒前均有菌且有大肠菌群生长，菌落总数＞1×10^3 CFU/mL，大肠菌群＞10 MPN/100 mL；阴性对照组均无菌生长；五次试验对游泳池水中菌落总数的杀灭对数值均≥1.00，消毒后游泳池水（每100 mL）大肠菌群均为未检出，菌落总数均≤200 CFU/mL；可判定为对游泳池消毒现场试验合格。

5.4.3 医疗机构污水消毒效果评价试验

医疗机构污水现场消毒试验按照GB 18466执行。

5.5 消毒器械（含灭菌器械）鉴定试验

5.5.1 紫外线灯辐照强度的测定和消毒试验

5.5.1.1 目的

测定紫外线灯（包括双灯管组合灯具）辐照强度并验证消毒效果。

5.5.1.2 仪器设备或试剂材料

5.5.1.2.1 试验菌株：金黄色葡萄球菌（ATCC 6538）、大肠杆菌（8099）、枯草杆菌黑色变种（ATCC 9372）芽胞、龟分枝杆菌脓肿亚种（ATCC 19977 或 CMCC（B）93326）和脊髓灰质炎-Ⅰ型疫苗株。

5.5.1.2.2 染菌载体：10 mm×10 mm 玻片，12 mm 直径圆形不锈钢（厚 0.5 mm），必要时根据消毒对象选用其他载体。

5.5.1.2.3 紫外线强度计。

5.5.1.2.4 紫外线灯测定架。

5.5.1.2.5 稳压器（220 V）。

5.5.1.2.6 培养基：胰蛋白胨大豆琼脂培养基（TSA）、沙堡琼脂培养基等目标微生物相关的培养基。

5.5.1.2.7 病毒宿主细胞及相关培养液。

5.5.1.2.8 稀释液：磷酸盐缓冲液（PBS）。

5.5.1.2.9　有机干扰物：胰蛋白胨大豆肉汤培养基（TSB）。

5.5.1.3　紫外线强度测定

5.5.1.3.1　测量时，电压应稳定在 220 V，电源频率应稳定在 50 Hz±0.5 Hz。

5.5.1.3.2　应使用基准镇流器（无对应基准镇流器的紫外线灯使用自配镇流器），电子镇流器应符合 GB 17625.1、GB/T 17743 和 GB 19510.1 等的规定。电感镇流器应符合 GB/T 10682 和 GB/T 17262 等。

5.5.1.3.3　测试时的环境温度应保持在 20 ℃～25 ℃、相对湿度＜60%。

5.5.1.3.4　根据产品标识峰值波长，选择由计量部门检定合格且在有效期内的紫外线强度计测定。

5.5.1.3.5　进行紫外线强度测定前，应先用酒精棉球擦除灯管上的灰尘和油垢。在测试过程中，操作人员应采取有效措施，防止眼睛和人体裸露部位被紫外线灼伤。

5.5.1.3.6　将待测紫外线灯管固定于测定架，调节距离使灯管距其下方垂直中心放置强度计处 1000 mm±1 mm。

5.5.1.3.7　开启紫外线灯稳定 5 min 后，直接读取紫外线强度值（μW/cm^2）。

5.5.1.3.8　普通型或低臭氧型直管紫外线灯，在灯管下方垂直 1000 mm±1 mm 的中心处，新灯管的紫外线强度应符合表 5 和表 6 的要求。

5.5.1.3.9　使用中的灯管，可在原处进行测定。测定位置仍在灯管下方垂直距离 1000 mm±1 mm 的中心处。使用中灯管的强度值应不低于表 5 和表 6 的要求，低于此值者应予更换。

5.5.1.3.10　多灯管组合灯具的测定方法和合格标准，同单支灯管。

5.5.1.3.11　对异型（非直管型）、高照度型等灯管的检测距离和强度值合格标准，随产品用途和使用方法而定。 应不低于产品使用说明书注明的紫外线强度值，并按其推荐剂量（即紫外线强度值乘以照射时间（s））进行杀菌试验，证明能满足应用所需效果者判定为实验室测试合格。

5.5.1.3.12　辐射照度检测，每次鉴定抽查 10 支灯管，每支灯管重复测定 3 次。双端和单端紫外线灯的初始紫外线强度分别应不低于表 5、表 6 中规定值的 93%，其他紫外线灯强度应符合相关标准要求。

表5　双端紫外线灯的初始紫外线强度规定值

标称功率（W）	4	6	8	13	15	18	30	36	60	75	100	150	250	320	400	550	750	1000
紫外线强度（μW/cm^2）	9	15	22	35	50	62	100	135	190	250	305	400	650	720	900	1150	1300	1730

表6　单端紫外线灯的初始紫外线强度规定值

标称功率（W）	5	7	9	11	18	24	36	55	75	95	150
紫外线强度（μW/cm^2）	9	16	22	33	51	65	110	150	170	304	400

5.5.1.4　微生物杀灭效果测定

5.5.1.4.1　按 5.1.2 所示方法制备细菌或芽胞或真菌菌片。菌片以玻片为载体。

5.5.1.4.2　试验时，确定菌片照射位置。若无特殊要求，应在灯管下方垂直距离 1000 mm±1 mm 的中

心处。

5.5.1.4.3 菌片每 2 片为一组，不应重叠，平置于无菌平皿中，若箱内容积过小，可将试验菌直接涂染于所设计消毒的物品表面进行试验，每 2 件为一组。

5.5.1.4.4 平皿放于测定架预先确定的位置上进行照射或对试验菌直接涂染的物品表面进行照射。若为紫外线消毒箱，其箱内应同时将所设计消毒的物品摆放至产品使用说明书中规定的最高装载量，并保证紫外线能照射到被消毒的物品表面。在消毒箱每层的内、外两个点各放一个含菌片的平皿（大型消毒箱按各层对角线在内、中、外各放一个平皿，相邻层对角线交叉摆放），打开平皿盖。

5.5.1.4.5 关闭紫外线消毒箱门或盖，开启紫外线灯，照射至规定时间。

5.5.1.4.6 按产品使用说明书规定的作用时间的 0.5 倍、1.0 倍和 1.5 倍设置 3 个作用时间进行试验。

5.5.1.4.7 将照射后样本送实验室进行活菌培养计数（见 5.1.3）的测定。

5.5.1.4.8 以试验用的同批菌片置室温下，待试验组消毒完毕后，立即将该批菌片 2 片分别放入含 5.0 mL PBS 试管中，电动混匀器振荡 20 s 或各振打 80 次。取洗液按 5.1.3 所示方法进行活菌培养计数，作为阳性对照组。

5.5.1.4.9 以同次实验用培养基或 PBS 接种培养基培养，作为阴性对照组。

5.5.1.4.10 试验重复 3 次。

5.5.1.4.11 对异型（非直管型）、高照度型，或非 30 W 功率等灯管的照射距离，随产品用途和使用方法而定。

5.5.1.4.12 每次试验阳性对照组回收菌量为 1×10^6 CFU/片～5×10^6 CFU/片，阴性对照组无菌生长，各点各次试验的杀灭对数值均≥3.00，判定为消毒合格。

5.5.1.5 臭氧产生量的测定

紫外线灯产生的臭氧量不同可影响杀菌效果和使用的安全，故应测定臭氧浓度以便进行综合考虑。臭氧浓度测定方法见本文件理化鉴定技术。检测条件应以产品使用说明中规定的使用方法、面积（或容积）和时间为准，进行现场（或模拟现场）测定。

5.5.1.6 有效寿命测定

将待测新的紫外线灯固定于测定架，调节距离使灯管距其下方垂直中心放置紫外线强度计探头1000 mm±1 mm处，开启紫外线灯5 min（功率≤36 W）稳定后，分别于5 min、1 h、500 h、1000 h，用紫外线强度计在灯管下方垂直距离1.0 m的中心处测量其强度值（$\mu W/cm^2$）。

单支灯的寿命从新的紫外线灯点燃5 min开始计时，按灯的紫外线强度降低到70 $\mu W/cm^2$（功率≥30 W的灯）或降低到本文件规定的70%（功率＜30 W的灯）时的累计点燃时间计算。

紫外线灯的累计点燃时间≥1000 h，判为寿命合格。

5.5.1.7 注意事项

5.5.1.7.1 测试前应先用酒精棉球擦除灯管上的灰尘和油垢，以免影响紫外线强度。

5.5.1.7.2 杀菌试验时，应使紫外线直接照射拟消毒表面，否则不能反映真实的杀菌效果。

5.5.1.7.3 在紫外线灯下工作时，勿直视灯管，并穿戴防护眼镜、防护服、手套等，以减少对测试人

员的伤害。在有人条件下，室内空气环境中的 1 h 平均容许臭氧浓度为 0.1 mg/m^3。

5.5.1.7.4 测定紫外线强度或进行杀菌试验时，应保持室内洁净。

5.5.2 干热灭菌柜灭菌效果鉴定试验

5.5.2.1 目的

测定干热灭菌柜(以下简称灭菌柜)对细菌芽胞的杀灭效果，以验证其灭菌性能是否符合设计规定。

5.5.2.2 仪器设备或试剂材料

5.5.2.2.1 枯草杆菌黑色变种（ATCC 9372）芽胞菌片。染菌载体（10 mm×10 mm，以不锈钢片或玻片为代表，必要时可随灭菌对象增用或改用其他载体）。菌片上细菌芽胞在 160 ℃±2 ℃条件下，D 值为≥2.5 min。

5.5.2.2.2 培养基：TSB，见附录 A。

5.5.2.2.3 活菌培养计数所需器材（见 5.1.3）。

5.5.2.2.4 满载物品：使用说明书中规定灭菌器可以处理的物品。

5.5.2.2.5 多点温度时间测定仪。

5.5.2.3 柜内温度测定

将多点温度时间测定仪的各个探头，分别放于灭菌柜内各层对角线的内、中、外3点，相邻层对角线交叉。在柜内摆放物品至满载。关闭柜门，开启电源，按灭菌柜设计程序进行灭菌。每3 min记录各点的温度至灭菌程序结束。试验重复3次，计算各点不同时间的平均温度，列出图表。

5.5.2.4 灭菌试验步骤

5.5.2.4.1 根据试验要求，制备枯草杆菌黑色变种芽胞悬液和芽胞样片。

5.5.2.4.2 每次试验取 2 个菌片为一组，平放于无菌平皿内，勿重叠。加盖，分置于灭菌柜内各层，对角线的内、中、外 3 点，相邻层对角线交叉摆放。灭菌柜内除菌片样品以外，还应满载以模拟常规处理物品。

5.5.2.4.3 关闭柜门，开启电源，按灭菌柜设计程序时间进行灭菌。灭菌完毕，取出平皿，将菌片取出接种于含 5.0 mL TSB 的试管中，置 36 ℃±1 ℃ 恒温培养箱内培养 7 d，自第 3 日起每日观察结果，混浊表面有皱褶状菌膜者表示有菌生长，判定为阳性；澄清者表示无菌生长，判定为阴性。对难以判定的肉汤管，取其中 0.2 mL 悬液接种 TSA 平板，用灭菌 L 棒涂布均匀，置 36 ℃±1 ℃恒温培养箱中培养。48 h 后涂片染色，在显微镜下观察菌落形态，或进一步做其他试验，以判断生长者是否为试验菌。若有非验菌污染，应查找原因重新进行试验。

5.5.2.4.4 菌数对照组，以同批试验用菌片 2 片放在室温下，待试验组灭菌接种后，立即分别移入含 5.0 mL PBS 试管中，振打 80 次，按 5.1.3 所示方法进行活菌培养计数。

5.5.2.4.5 阳性对照组，以同批试验用菌片 2 片放在室温下，待试验组灭菌接种后，立即分别接种于 5.0 mL TSB，放入培养箱中培养 7 d，自第 3 日起每日与试验组同时观察结果。

5.5.2.4.6 阴性对照组，以未染菌载体 2 片分别接种于 5.0 mL TSB，放入培养箱中培养 7 d，观察有

无细菌生长。

5.5.2.4.7　重复试验 5 次。

5.5.2.5　评价规定

5.5.2.5.1　在 3 次测定温度的试验中，各点平均温度均达设计要求。

5.5.2.5.2　在 5 次灭菌试验中，各次试验菌数对照组的回收菌量为 1×10^6 CFU/片～5×10^6 CFU/片；阳性对照组有菌生长；阴性对照组无菌生长；所有试验菌片均无菌生长判定为灭菌合格。

5.5.2.6　注意事项

5.5.2.6.1　试验时应注意防止环境的污染和严格遵守无菌操作技术规定。

5.5.2.6.2　试验必须在满载条件下进行。

5.5.3　压力蒸汽灭菌器鉴定试验

5.5.3.1　目的

用于验证压力蒸汽灭菌器（下简称灭菌器）的灭菌效果。

5.5.3.2　物理参数验证

5.5.3.2.1　仪器设备或试剂材料

仪器设备或试剂材料如下：

a)　标准测试包：标准测试包应由漂白纯棉布单组成，尺寸大约为 900 mm×1200 mm，经纱应为（30±6）支纱/cm，纬线应为（27±5）支纱/cm，每平方米的质量应为（185±5）g，无折边。

无论新的或脏的棉布单，都应进行清洗，并应避免加任何织物清洗剂。

标准测试包在温度20 ℃～30 ℃、相对湿度40%～60%的环境中进行干燥稳定后才能使用。

标准测试包应按照图2的规定进行折叠和组装。

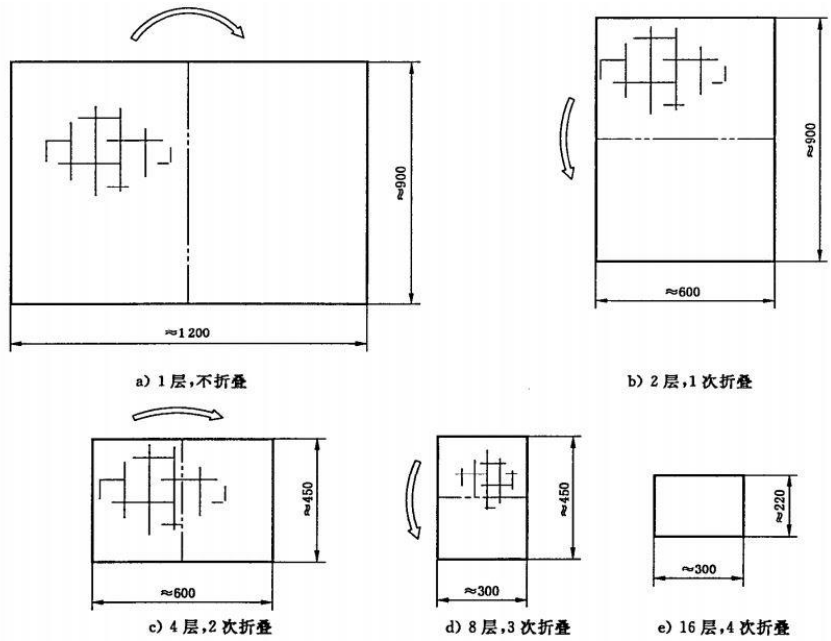


图2　标准测试包的折叠和组装

布单应叠成大约220 mm×300 mm，用手压好之后，摞成高度大约250 mm。标准测试包应采用相似的包布进行包裹，并用宽度不超过25 mm的扎带进行紧固。标准测试包的总质量应为7 kg±0.14 kg（大约需要30张布单）。标准测试包在测试周期结束后，应从灭菌器中取出，并在20 ℃～30 ℃和相对湿度40%～60%的环境中进行通风。然后才可继续使用。在每次使用间隔期间，标准测试包应存放在20 ℃～30 ℃和相对湿度40%～60%的环境中。

注1：使用过后，标准测试包将被压缩。如果250 mm厚的标准测试包质量超过7.14 kg，标准测试包就不能再使用了。

注2：使用之前，应用校准过的仪表测量标准测试包的温度和湿度。确保包内条件温度应为20 ℃～30 ℃，相对湿度应为40%～60%，否则不能用于检测。

b）小规格测试包：该测试包专门用于只能装载一个灭菌单元的灭菌器，测试当周期参数达到设定值，在规定的条件下，蒸汽能够快速、均匀地渗透测试包。

测试包应由经漂白的纯棉布单组成，尺寸大约为900 mm×l200 mm。经纱应为（30±6）支纱/cm；纬纱应为（27±5）支纱/cm；每平方米的质量应为（185±5）g，无折边。

无论新的或脏的棉布单，都应进行清洗，并应避免加任何清洗剂。

注3：织物清洗剂会影响织物的性质，并可能含有导致产生非冷凝气体的挥发物。

注4：标准测试包在温度为20 ℃～30 ℃、相对湿度为40%～60%的环境中进行干燥稳定后才能使用。

测试包应按照图2的规定进行折叠和组装。

布单应叠成大约220 mm×300 mm，用手压好之后，摞成高度大约150 mm。测试包应采用相似的包布进行包裹，并用宽度不超过25 mm的扎带进行紧固。测试包的总质量应为4 kg±0.16 kg。（大约需要17张布单）测试包在测试周期结束后，应从灭菌器中取出，并在20 ℃～30 ℃和相对湿度40%～60%的环境中进行通风。然后才可继续使用于检测。在每次使用间隔期间，测试包应存放在20 ℃～30 ℃和相对湿度40%～60%的环境中。

注5：使用过后，测试包将被压缩。如果150 mm厚的包质量超过4.16 kg，测试包就不能再使用了。

注6：使用之前，应用校准过的仪表测量测试包的温度和湿度，确保包内应为20 ℃～30 ℃，相对湿度应为40%～60%，否则不能用于检测。

c）传感器：7 个温度传感器和 1 个压力传感器，用于测量试验中指定位置的温度和压力。温度传感器应符合 JB/T 8622 中 A 级的铂电阻，且 t_{90}≤0.5 s；温度传感器及其连接线的任何部分的截面积均应不超过 3.1 mm^2；温度传感器的运行特性不应受它所处环境（例如：压力、蒸汽或真空）的影响。

d）满载物品：使用包含至少 50%质量比的棉纤维，每平方米的质量约为 200 g，无论新的或脏的棉布单，都应进行清洗，并应避免加任何织物清洗剂。布单烘干后温度为 20 ℃～30 ℃，相对湿度 40%～60%环境下通风至少 1 h。通风干燥后，将布单折叠成包，每包质量为 7.5 kg±0.5 kg。

5.5.3.2.2　小负载温度试验

5.5.3.2.2.1 试验步骤

试验步骤如下：

a) 运行设备的泄露测试程序，泄露测试合格后进行下一步；

b) 将 1 个温度传感器和 1 个压力传感器放置灭菌器厂家规定的参考测量点上，此位置的传感器也可采用温度、压力集成的传感器；

c) 空载运行灭菌周期；

d) 将标准测试包打开，并把 5 个温度传感器放在标准测试包中图 3 所示位置，然后将测试包重新进行包装。对于只能装载一个灭菌单元的灭菌器，采用小规格测试包，对于装载 1 个以上灭菌单元的灭菌器，采用标准测试包；

e) 将测试包放置在灭菌室水平的几何中心，离灭菌室底水平面高度为 100 mm～200 mm。对于只能处理 1 个灭菌单元的灭菌器，本测试方法相应被修改为将测试包放置在灭菌室底水平面上；

f) 将第 7 个温度传感器固定于距测试包的上表面 50 mm 的垂直中心处；

g) 运行 1 个灭菌周期；

h) 测试完成后，检查 7 个温度传感器和 1 个压力传感器的测试数据记录。

5.5.3.2.2.2 评价规定

小负载温度试验应符合以下要求：

a) 对于灭菌室容积不大于 800 L 的灭菌器，平衡时间应不超过 15 s；对于容积更大的灭菌器，平衡时间应不超过 30 s；

b) 在灭菌时间内，在标准测试包上方测量点所得的温度比在灭菌室参考测量点测得的温度，在开始 60s 内应不超过 5 ℃，在 60 s 后应不超过 2 ℃；

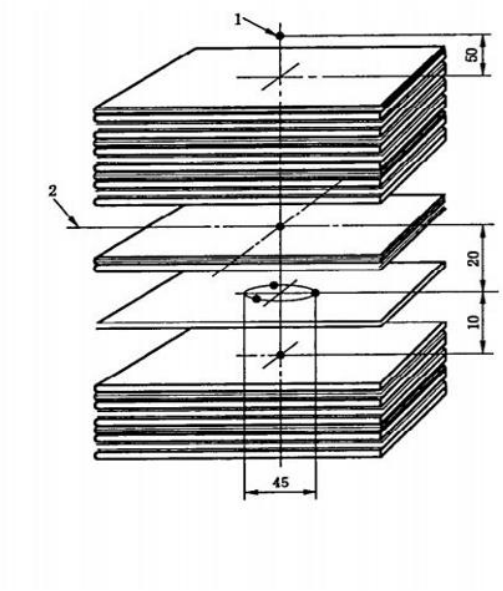
c) 在维持时间，灭菌室参考测量点测得的温度、标准测试包中任一测试点的温度，以及根据灭菌室压力计算所得的对应饱和蒸汽温度应符合如下要求：

——应在灭菌温度范围内，灭菌温度范围下限为灭菌温度，上限应不超过灭菌温度+3 ℃。

——同一时刻各点之间的差值应不超过 2 ℃。

d) 对于灭菌温度分别为 121 ℃、126 ℃和 134 ℃的灭菌器，维持时间应分别不小于 15 min、10 min 和 3 min。

注：其他温度和时间组合可使用。



标引序号说明:

1—传感器的位置;

2—中间层。

图3　传感器放置的位置

5.5.3.2.3　满负载温度试验

5.5.3.2.3.1　试验步骤

试验步骤如下：

a)　运行设备的泄露测试程序，泄露测试合格后进行下一步；

b)　将 1 个温度传感器和 1 个压力传感器放置灭菌器厂家规定的参考测量点上，此位置的传感器也可采用温度、压力集成的传感器；

c)　空载运行灭菌周期；

d)　将标准测试包打开，并把 5 个温度传感器放在标准测试包中图 3 所示位置，将第 7 个温度传感器固定于距测试包包内最上方的棉巾之下。然后将测试包重新进行包装。对于只能装载一个灭菌单元的灭菌器，采用小规格测试包，对于装载 1 个以上灭菌单元的灭菌器，采用标准测试包；

e)　将测试包放置在灭菌室水平的几何中心，离灭菌室底水平面高度为 100 mm～200 mm。对于只能处理 1 个灭菌单元的灭菌器，本测试方法相应被修改为将测试包放置在灭菌室底水平面上；

f)　装入满载物品，满载运行 1 个灭菌周期；

g)　测试完成后，检查 7 个温度传感器传感器和 1 个压力传感器的测试数据记录。

5.5.3.2.3.2　评价规定

满载温度试验应符合以下要求：

a) 对于灭菌室容积不大于 800 L 的灭菌器，平衡时间应不超过 15 s；对于容积更大的灭菌器，平衡时间应不超过 30 s；

b) 平衡时间结束时，在灭菌室参考测量点测得的温度，标准测试包的几何中心及包内最顶棉布层下面的位置测量所得的温度都应在灭菌温度范围内；

c) 在维持时间，灭菌室参考测量点测得的温度、标准测试包中任一测试点的温度，以及根据灭菌室压力计算所得的对应饱和蒸汽温度应符合如下要求：

——应在灭菌温度范围内，灭菌温度范围下限为灭菌温度，上限应不超过灭菌温度+3 ℃。

——同一时刻各点之间的差值应不超过 2 ℃。

d) 对于灭菌温度分别为 121 ℃、126 ℃和 134 ℃的灭菌器，维持时间应分别不小于 15 min、10 min 和 3 min。

注：其他温度和时间组合可使用。

5.5.3.2.4 注意事项

温度参数试验注意事项如下：

a) 检测用的温度传感器、压力传感器应经过校准，并有相关校准证书或报告；

b) 当温度参数试验不合格时，应对灭菌设备的温度、压力进行偏差校正，校正后重新进行试验，直至温度参数试验合格为止；

c) 试验时可根据需要，选择常用灭菌温度的灭菌周期进行温度试验。当多个灭菌周期具有相同的灭菌温度时，选择灭菌时间最长的灭菌周期进行试验；

d) 灭菌器的温度参数试验应至少每年进行一次。

5.5.3.3 灭菌效果验证

5.5.3.3.1 仪器设备或试剂材料

仪器设备或试剂材料如下：

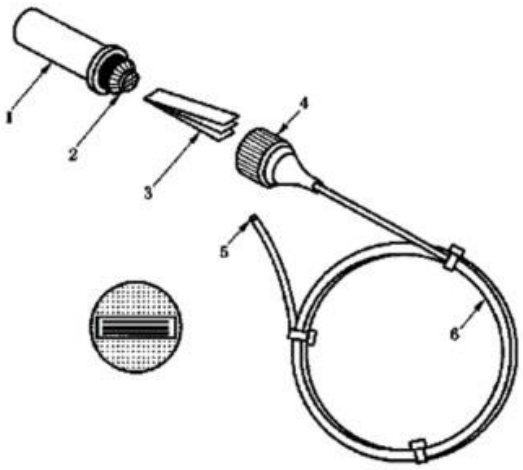
a) 菌片：嗜热脂肪杆菌（ATCC 7953 或 SSI K31 株）芽胞菌片，含菌量为 1×10^6 CFU/片～5×10^6 CFU/片，或嗜热脂肪杆菌（ATCC 7953）芽胞生物指示物，121 ℃±0.5 ℃ 条件下，D 值不低于 1.5 min；

b) 标准生物测试包：23 cm×23 cm×15 cm 的普通棉布包（每 10 毫米经线数 30±6、纬线数 27±5），质量 1.5 Kg±0.045 Kg；

c) 一次性标准生物测试包；

d) 管腔型 PCD（管腔型灭菌过程验证装置） 由管盖、连接器、指示物、指示物固定器、软管组成（见图 4）。

——材料：聚四氟乙烯（PTFE）



标引序号说明：

1—管盖；

2—指示物固定器；

3—指示物；

4—连接器；

5—开口端；

6—软管。

注：管腔型PCD材料：聚四氟乙烯（PTFE）；管壁厚度：（0.5±0.025）mm；管内直径：（2.0±0.1）mm；软管长度：（1500±15）mm；指示物固定器质量：（10.0±0.1）g；内部自由容积：装置内部总容积减去指示物固定器容积的（6±1）%。

图4　空腔负载试验的灭菌过程验证装置（PCD）

e)　满载物品：使用说明书中规定灭菌器可以处理的物品；

f)　培养基：溴甲酚紫葡萄糖蛋白胨培养液（见附录 A）；

g)　恒温培养箱；

h)　纸塑包装材料：应符合 GB/T 19633 的要求。

5.5.3.3.2　实验步骤

方法一步骤如下：

a)　运行设备的泄露测试程序，泄露测试合格后进行下一步；

b)　选择要测试的灭菌周期；

c)　空载运行该灭菌周期；

d)　将 2 个菌片装入灭菌小纸袋内，将该纸袋或两个嗜热脂肪杆菌（ATCC 7953）芽胞灭菌指示物置于标准测试包中心部位，制成标准生物测试包。也可使用一次性标准生物测试包；

e)　将标准生物测试包分别放置于灭菌柜内中心部位、靠门处和排气口处，每处各放一包；

f)　装入满载物品，满载运行 1 个灭菌周期；

g)　灭菌周期结束后，取出指示菌片，投入溴甲酚紫葡萄糖蛋白胨培养液中，或取出灭菌指示物，经 56 ℃±2 ℃ 培养 7 d（灭菌指示物的培养方法按说明书执行），观察培养基颜色变化。检

测时以培养基作为阴性对照，以加入指标菌片的培养基作为阳性对照。灭菌指示物的阴性对照和阳性对照的设置方法按说明书操作；

h) 试验重复 5 次。

方法二步骤如下：

a) 对管腔型 PCD 进行预处理，使 PCD 的内外表面温度在 20 ℃～30 ℃之间，相对湿度 40%～60%；

b) 选择要测试的灭菌周期，放入管腔型 PCD，空载运行灭菌周期；

c) 取出管腔型 PCD，打开管盖，按照制造商说明，确认无可见液态水，PCD 中连接处密封完整；

d) 按照管腔型 PCD 使用说明书规定，将指示菌片固定，盖上管盖，保证密封；

e) 用纸塑包装材料将 PCD 包装并密封，分别放置于灭菌柜内中心部位、靠门处和排气口处，每处各放一包；

f) 装入满载物品，满载运行 1 个灭菌周期；

g) 灭菌周期结束后，取出指示菌片，投入溴甲酚紫葡萄糖蛋白胨培养液中，经 56 ℃±2 ℃培养 7 d，观察培养基颜色变化。检测时以培养基作为阴性对照，以加入指标菌片的培养基作为阳性对照；

h) 试验重复 5 次。

5.5.3.3.3 评价规定

每次试验阳性对照变黄，阴性对照颜色不变，对照菌片的回收菌量为1×10^6 CFU/片～5×10^6 CFU/片；试验组颜色不变，判定为灭菌器灭菌效果合格。

用生物指示物进行评价时，结果判定按说明书进行。

5.5.3.3.4 注意事项

注意事项如下：

a) 压力蒸汽灭菌器在灭菌管腔型医疗器械时，按照方法二对其灭菌效果进行鉴定；其他情况均按照方法一对其灭菌效果进行鉴定；

b) 小型压力蒸汽灭菌器在灭菌特殊医疗器械时，其鉴定方法参照 GB/T 30690；

c) 所用菌片和生物指示物应符合相关规定，并在有效期内使用；

d) 试验时应注意防止环境的污染，严格遵守无菌操作技术规定；

e) 试验应在满载条件下进行。

5.5.4 消毒柜（箱）消毒效果鉴定试验

5.5.4.1 目的

用于验证各种消毒柜（箱）的消毒效果。

5.5.4.2 仪器设备或试剂材料

5.5.4.2.1 试验用微生物：大肠杆菌（8099）、金黄色葡萄球菌（ATCC 6538）、铜绿假单胞菌（ATCC 15442）、白色念珠菌（ATCC 10231）、龟分枝杆菌脓肿亚种（CMCC（B）93326 或 ATCC 19977）、脊髓

灰质炎病毒Ⅰ型疫苗株、枯草杆菌黑色变种（ATCC 9372）芽胞等。

5.5.4.2.2 培养基：TSA、沙堡琼脂培养基等（见附录A）。

5.5.4.2.3 病毒宿主细胞及相关培养液。

5.5.4.2.4 有机干扰物：按照5.1.2.2。

5.5.4.2.5 多点温度时间测定仪。

5.5.4.2.6 紫外线强度计。

5.5.4.2.7 紫外线灯架。

5.5.4.2.8 稳压器（220 V）。

5.5.4.2.9 微波漏能测试仪。

5.5.4.2.10 满载物品使用说明书中规定消毒的物品。

5.5.4.2.11 载体：10 mm×10 mm玻片，必要时增用或改用其他载体。

5.5.4.3 消毒因子强度测试方法

5.5.4.3.1 柜（箱）内温度测定

将多点温度时间测定仪的探头分别置于消毒柜（箱）每层的内、外两点（大型柜（箱）按各层对角线置于内、中、外3点，相邻层对角线交叉摆放）放置，在柜（箱）内摆放食（饮）具至满载。关闭柜门，开启电源，按消毒柜（箱）设定程序进行消毒。每3 min记录各点的温度至消毒程序结束。

5.5.4.3.2 紫外线强度测定

打开消毒柜（箱）的盖或门，将内装紫外线灯管取下，在紫外线灯测定架上按5.5.1.3测定其照射强度的辐照度值，以确定是否与产品质量标准或企业标准中规定的相同。必要时，以与柜（箱）门（或盖）一样大小的铝板，用胶带固定于消毒柜（箱）的门框（或消毒箱盖）上。铝板中央处钻一直径为15 mm小圆孔，开启柜（箱）内紫外线灯，照射5 min，待稳定后，通过铝板上小圆孔用照度计测定射出紫外线的辐照度值（$\mu W/cm^2$）。

5.5.4.3.3 臭氧产生量的测定

与5.5.1.5的测定方法相同。

5.5.4.4 消毒柜（箱）对微生物的杀灭效果检测方法

5.5.4.4.1 细菌杀灭试验

细菌杀灭试验方法如下：

a) 根据说明书选择大肠杆菌（8099）、金黄色葡萄球菌（ATCC 6538）、铜绿假单胞菌（ATCC 15442）、白色念珠菌（ATCC 10231）、龟分枝杆菌脓肿亚种（CMCC（B）93326或ATCC 19977）、枯草杆菌黑色变种（ATCC 9372）芽胞等合适的指标微生物，按5.1.2.4制备菌片；

b) 在消毒柜（箱）满载的情况下，将干燥菌片置无菌平皿内，每平皿放2片，勿重叠。在消毒柜（箱）每层的内、外两个点各放一含菌片的平皿（大型消毒柜或箱，按各层对角线在内、中、外各放一平皿，相邻层对角线交叉摆放），打开平皿盖；

c) 关闭柜（箱）门，开启电源，按消毒柜（箱）设计程序进行消毒。消毒完毕，按说明书规定的时间打开柜门，盖上平皿盖，取出平皿。将菌片移入含 5 mL PBS （化学消毒时应采用相应的中和剂）试管内，按 5.1.3 所示方法进行活菌培养计数，作为试验组；

d) 进行上述消毒或灭菌试验时，将放有 2 片染菌菌片的平皿室温放置，不做消毒处理。当消毒试验完毕后，取该菌片进行活菌培养计数，置 36 ℃±1 ℃恒温培养箱培养，作为阳性对照。另将同批培养基与 PBS 等培养，作为阴性对照；

e) 消毒试验重复 3 次；

f) 消毒试验按 5.1.7.4.8 计算平均杀灭对数值。

5.5.4.4.2 脊髓灰质炎病毒灭活试验

脊髓灰质炎病毒灭活试验方法如下：

a) 按 5.1.10 所示方法制备脊髓灰质炎病毒悬液和载体；

b) 在消毒柜（箱）满载的情况下，将染毒载体置无菌平皿内，每平皿放 2 片，勿重叠。在消毒柜（箱）每层的内、外两个点各放一平皿（大型消毒柜（箱）按各层对角线在内、中、外各放一平皿，相邻层对角线交叉摆放），打开平皿盖；

c) 关闭柜（箱）门，开启电源，按说明书设定程序进行消毒。消毒完毕，按说明书规定的时间，打开柜（箱）门，盖上平皿盖，取出平皿。将载体移入含 1 mL 细胞维持液的试管中。振打 80 次，取样按 5.1.10.5 测定病毒滴度；

d) 阳性对照，将染毒载体 2 片，分别移入含 1 mL 细胞维持液的试管中。振打 80 次取样，按 5.1.10.5 所示方法测定病毒滴度；

e) 阴性对照，用不含脊髓灰质炎病毒的完全培养基作为阴性对照，以观察培养基无污染，细胞是否生长良好；

f) 试验重复 3 次；

g) 按 5.1.10.8.5 计算病毒的灭活对数值。

5.5.4.4.3 评价规定

符合以下要求者判定为消毒合格。

a) 细菌杀灭对数值每次试验各点均≥3.00，阳性对照组回收菌数为 1×10^6 CFU/片～5×10^6 CFU/片，阴性对照无菌生长；

b) 脊髓灰质炎病毒杀灭对数值每次试验各点均≥3.00，阴性对照细胞生长良好，阳性对照组病毒对数值≥4.00。

5.5.4.5 注意事项

5.5.4.5.1 测试微波消毒柜（箱）时应先用微波漏能测试仪检测有无微波泄漏。测试人员长时间受微波照射，对人体有害，试验时应做好防护。微波强弱受电压影响很大，试验时，应注意电压是否符合说明书规定值。

5.5.4.5.2 进行紫外线消毒柜（箱）测试前应先用酒精棉球擦除灯管上的灰尘和油垢，以免影响紫外

线强度。杀菌试验时，应将紫外线直接照射拟消毒表面，否则不能反映真实的杀菌效果。试验时，应注意柜（箱）内物品是否有未被紫外线直接照到处（如被柜或箱内支架遮挡），如实用中拟消毒物品有可能处于该位置，在染菌样片布点时应考虑观察该部位的消毒效果。在紫外线灯下工作时，勿直视灯管，并穿戴防护眼镜、防护服、手套等，以减少对测试人员的伤害。在有人条件下，室内空气环境中的 1 h 平均容许臭氧浓度为 0.1 mg/m^3。测定强度值或进行杀菌试验时，应保持室内洁净。

5.5.4.5.3　湿度影响臭氧气体对细菌的杀灭效果，每次试验必须保持一致。

5.5.5　内镜自动清洗消毒机消毒效果鉴定试验

按照消毒剂对内镜模拟现场消毒效果鉴定试验方法（见5.2.15）进行试验。

5.5.6　臭氧消毒器消毒效果鉴定试验

5.5.6.1　目的

用于验证臭氧发生器产生的臭氧以气体或水为载体进行的消毒效果。

5.5.6.2　仪器设备或试剂材料

5.5.6.2.1　试验菌株：枯草杆菌黑色变种（ATCC 9372）芽胞、龟分枝杆菌脓肿亚种（ATCC 19977 或 CMCC（B） 93326），金黄色葡萄球菌（ATCC 6538）、大肠杆菌（8099）、铜绿假单胞菌（ATCC 15442）、白色念珠菌（ATCC 10231）、脊髓灰质炎病毒Ⅰ型疫苗株、白色葡萄球菌（ATCC 8032）。

5.5.6.2.2　载体：布片，面积为 10 mm×10 mm，必要时可增用或改用其他载体。

5.5.6.2.3　中和剂：经中和剂鉴定试验合格。

5.5.6.2.4　培养基：胰蛋白胨大豆琼脂培养基、分枝杆菌干燥培养基，沙堡琼脂培养基。

5.5.6.2.5　有机干扰物：胰蛋白胨大豆肉汤培养基（TSB）。

5.5.6.2.6　臭氧浓度测定仪。

5.5.6.2.7　温度与湿度计。

5.5.6.2.8　水流量计（1 L/min～10 L/min）。

5.5.6.2.9　不锈钢网。

5.5.6.2.10　移液管（1 mL、5 mL、10 ml、25 ml）、滴定管（2 mL、5 mL、10 mL、25 mL、50 mL）、碘量瓶（100 mL、250 mL）、容量瓶（50 mL、100 mL、250 mL、500 mL、1000 mL）、锥形瓶（100 mL、250 mL、500 mL）、天平（0.1 mg）、大气采样器。

5.5.6.2.11　配制 3 mol/L 硫酸、200 g/L 碘化钾和 5 g/L 淀粉等溶液、配制并标定 0.05 mol/L 硫代硫酸钠滴定液。

5.5.6.3　臭氧浓度测定

5.5.6.3.1　碘量法

5.5.6.3.1.1　采样

检测臭氧水溶液浓度时，精密吸取样本100.0 mL～300.0 mL（浓度较低，但不低于10 mg/L时，取400.0 mL），置于500 mL具塞锥形瓶中，加入200 g/L碘化钾溶液20 mL混匀；再加3 mol/L硫酸5 mL，瓶口加塞，静置5 min。

注：采样涉及水流量时，水流量按照企业使用说明书设定。

检测臭氧气体浓度时，将采集的样品吸收液（蒸馏水350 mL 和200 g/L 碘化钾溶液20 mL）装于500 mL具塞锥形瓶中，从臭氧消毒器排气管处采集臭氧气体5 L以上，加3 mol/L硫酸5 mL，瓶口加塞，静置5 min。

5.5.6.3.1.2 滴定

上述两种样品均用0.05 mol/L硫代硫酸钠滴定液滴定至溶液呈淡黄色时加5 g/L淀粉溶液1 mL，继续滴定至无色。记录所用硫代硫酸钠滴定液的总量，并将滴定结果用空白试验校正；重复测定2次。

5.5.6.3.1.3 浓度计算

取2次测试平均值计算臭氧浓度。因消耗1 mol/L硫代硫酸钠滴定液1 mL需24.00 mg臭氧，故臭氧浓度可按公式（12）计算：

$$X = \frac{c \times Vt \times 24.00}{V} \quad \cdots\cdots (12)$$

式中：

X ——臭氧含量，单位为毫克每升（mg/L）；

c ——硫代硫酸钠滴定液的浓度，单位为摩尔每升（mol/L）；

V_t ——消耗的硫代硫酸钠滴定液的体积,单位为毫升（mL）；

V ——臭氧水的升数或所采集气体的体积，单位为升（L）；

24.00 ——消耗1 mL浓度为1 mol/L的硫代硫酸钠滴定液相当的臭氧量，单位为毫克（mg）。

5.5.6.3.2 仪器法

5.5.6.3.2.1 紫外线吸收法

原理：臭氧对波长254 nm的紫外光吸收系数最大，在此波长下紫外光通过臭氧层会产生衰减，符合朗伯-比尔（Lambert-Beer）定律，见公式（13）：

$$I = I_0 - K \times L \times C \quad \cdots\cdots (13)$$

式中：

I——光束穿透臭氧后的光强度；

I_o——无臭氧存在时入射光强度；

K——臭氧对紫外光的吸收系数；

L——臭氧样品池光程长度；

C——臭氧浓度。

注：根据该公式，在K、L值已知条件下，通过检测I/I_0 值即可测出臭氧浓度值。

测定：按照应用分为检测空气臭氧和检测水溶臭氧两种。按照仪器使用说明书操作。仪器在使用前应经过国家授权的计量单位检定合格后方可使用。

5.5.6.3.2.2 电化学法

原理：水中臭氧在电化表面产生电化学还原作用：$O_3 + H_2O + 2e^- \rightarrow O_2 + 2OH^-$

电化回路中电流特性曲线与溶液中分子臭氧的浓度成正比。

电化学检测仪主要用于水溶臭氧浓度在线连续检测控制。

操作：可采用广泛使用的“膜电极”溶解臭氧检测仪。仪器在使用前应经过国家授权的计量单位检定合格后方可使用。

仪器测定法按使用说明书要求进行。化学滴定法测定参考本文件理化鉴定实验技术。针对不同原理的设备还应分别按下列要求测定。

a) 通过式臭氧消毒设备：测定水样流出消毒设备后臭氧浓度由高到低的衰变曲线。测定时，若出水流量可调，设 3 个流量（流量大小不同臭氧含量不同），若出水流量不可调，则按说明书要求设 1 个流量，各流量水样流出消毒设备后，即刻测定水样中臭氧含量，并设 5 个～6 个时间段，取水样放入 20 ℃±1 ℃水浴中，分别测定水样中臭氧含量，并绘制臭氧浓度衰变曲线；

b) 暴气式臭氧消毒设备：测定一定容量的水体中臭氧浓度由低到高，直到臭氧浓度达饱和时的浓度变化曲线。测定时，无专用容器者，设 3 L 和 6 L 两个容量的水样，若无专用容器但需在更大容量的水样中进行试验者，视消毒设备状况，按使用说明书要求调整水样用量。有专用容器者，按说明书要求，加入规定容量的水样，通入臭氧气体，设 5 个～6 个时间段（应测出臭氧浓度达饱和时的最短时间），分别测定水样中臭氧含量，并绘制臭氧浓度变化曲线。

5.5.6.4 杀灭微生物试验

按产品使用说明书中的最低使用浓度与最短作用时间，按5.1.7.6、5.1.10和5.3的方法进行试验。

5.5.6.5 评价规定

载体法：阴性对照组均无菌生长，阳性对照组菌量为1×10^6 CFU/样本～5×10^6 CFU/样本，试验组杀灭对数值均≥3.00，判定为消毒合格。

病毒滴度每次试验阳性对照组对数值≥4.00，阴性对照组细胞生长良好，灭活对数值≥3.00，判定为消毒合格。

5.5.7 酸性氧化电位水生成器消毒效果鉴定试验

5.5.7.1 目的

用于验证酸性氧化电位水生成器生成的酸性氧化电位水的消毒效果。

5.5.7.2 仪器设备或试剂材料

5.5.7.2.1 试验微生物：金黄色葡萄球菌（ATCC 6538）、大肠杆菌（8099）、铜绿假单胞菌（ATCC 15442）、白色念珠菌（ATCC 10231）、黑曲霉菌（ATCC 16404）孢子、枯草杆菌黑色变种（ATCC 9372）芽胞和脊髓灰质炎病毒Ⅰ型疫苗株。

5.5.7.2.2 中和剂：杀菌试验采用 0.1%硫代硫酸钠、0.1%吐温 80 的生理盐水；病毒灭活试验采用 0.1%硫代硫酸钠的生理盐水。

5.5.7.2.3 稀释液：生理盐水。

5.5.7.2.4 有机干扰物：3%牛血清白蛋白或0.3%牛血清白蛋白。

5.5.7.2.5 pH值测定仪。

5.5.7.2.6 ORP 测定仪。

5.5.7.3 杀灭微生物试验操作程序

5.5.7.3.1 菌悬液的制备

按5.1.2所示相关方法制备菌悬液。必要时，可增设其他试验微生物。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，用电动混匀器混合（振荡）20 s，或在手掌上振打80次，以使细菌悬浮均匀，然后用稀释液将其制成细菌浓度为2×10^9 CFU/mL～9×10^9 CFU/mL的试验用菌悬液（对白色念珠菌、黑曲霉菌孢子菌悬液浓度为2×10^8 CFU/mL～9×10^8 CFU/mL）。

5.5.7.3.2 悬液定量杀菌试验操作程序

悬液定量杀菌试验操作程序如下：

a) 开启生成器，待产生的酸性氧化电位水中有效成分处于稳定状态时，用250 mL磨口三角瓶接取满瓶后，盖好瓶盖，置20 ℃±1 ℃水浴备用；

b) 取消毒试验用无菌大试管，先加入0.05 mL试验用菌悬液，再加入0.05 mL有机干扰物，混匀，用无菌吸管加到含9.9 mL酸性氧化电位水的试管中，混匀；

c) 待试验菌与消毒剂相互作用至各预定时间，分别吸取0.5 mL试验菌与酸性氧化电位水混合液加于含4.5 mL中和剂（0.1%硫代硫酸钠、0.1% 吐温80的生理盐水）的试管中，混匀，作用10 min，作为试验组；

d) 同时用标准硬水代替酸性氧化电位水，进行平行试验，作为阳性对照组；

e) 用同批次的中和剂、培养基作为阴性对照组；

f) 所有试验样本均在36 ℃±1 ℃温箱中培养，对细菌繁殖体培养48 h观察最终结果；对细菌芽胞和白色念珠菌应培养72 h观察最终结果；

g) 按5.1.3将各组样本进行活菌培养计数；

h) 试验重复3次（包括对照）；

i) 计算各组的活菌浓度（CFU/mL）并换算为对数值（N）然后按5.1.7.4.8计算杀灭对数值。

5.5.7.3.3 评价规定

取酸性氧化电位水原液与3个作用时间，重复试验3次。在最短作用时间，以及最短作用时间的1.5倍时，对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草杆菌黑色变种芽胞，各次试验的杀灭对数值均≥5.00，对白色念珠菌和黑曲霉菌孢子，各次试验的杀灭对数值均≥4.00，判定为消毒合格。

5.5.7.3.4 注意事项

注意事项如下：

a) 试验中所使用的中和剂、稀释液和培养基等，各批次均应进行无菌检查，发现有菌生长，则全部试验应换用未污染试剂或培养基重做；

b) 进行细菌悬液定量杀菌试验时，对用于清洗物品的消毒或用于冲洗浸泡消毒，有机干扰物采用0.3%（3 g/L）牛血清白蛋白，对未清洗的物品或有机物较多的物品的消毒，有机干扰物用3%（30 g/L）牛血清白蛋白。

5.5.7.4 脊髓灰质炎病毒灭活试验

5.5.7.4.1 制备悬液

按5.1.10.3所示方法制备脊髓灰质炎病毒悬液。

5.5.7.4.2 脊髓灰质炎病毒灭活试验操作程序

取脊髓灰质炎病毒悬液0.05 mL 加入到无菌试管中，再加入0.05 mL有机干扰物，然后加入4.9 mL酸性氧化电位水，混匀，至20 ℃水浴中作用至规定时间。

a) 取0.1 mL病毒与酸性氧化电位水混合液，加入到含0.9 mL中和剂的试管中。振打混合后，取样按5.1.10.5所示方法测定病毒滴度；

b) 用细胞维持液代替酸性氧化电位水，其余步骤与试验组相同，作为阳性对照组；

c) 用不含脊髓灰质炎病毒的完全培养基作为阴性对照组；

d) 试验重复3次；

e) 根据各组的平均病毒滴度按5.1.10.8.5计算病毒的灭活对数值。

5.5.7.4.3 评价规定

对脊髓灰质炎病毒，在3次试验中，阳性对照组病毒滴度对数值为5.00～7.00，灭活对数值≥4.00，判为消毒合格。

5.5.7.4.4 注意事项

注意事项如下：

a) 对有机干扰物的要求与5.5.7.3相同；

b) 在病毒灭活试验中，每次均应设置阳性对照；

c) 脊髓灰质炎病毒灭活试验操作均应在生物安全Ⅱ级以上实验室内进行，避免造成操作人员实验室感染和对环境污染；

d) 操作人员应具有基本的病毒学实验工作经验，尽量使用移液器与无菌一次性吸头。

5.5.7.5 现场和模拟现场试验

酸性氧化电位水现场和模拟现场试验所用仪器设备或试剂材料，染菌方法，采样方法，培养方法和评价方法与5.2消毒剂模拟现场和现场消毒鉴定试验相同。消毒方法根据消毒对象而定，对瓜果蔬菜、餐饮具、医疗器械、较小的物体表面（如塑料玩具），采用流动冲洗浸泡的方法，即将试验样本或载体放入适当容器内，将酸性氧化电位水连续不断地加入到容器中，使试验样本或载体完全浸泡于酸性氧化电位水中；卫生手、皮肤黏膜的消毒时采用流动冲洗的消毒方法；对环境地面和物体表面（如桌、台面）

可采用无纺布等在酸性氧化电位水中浸湿后擦洗消毒的方法。消毒作用时间按厂家使用说明书规定进行。

5.5.8 次氯酸钠发生器消毒效果鉴定试验

5.5.8.1 目的

用于验证次氯酸钠发生器制备的次氯酸钠消毒剂的消毒效果。

5.5.8.2 仪器设备或试剂材料

5.5.8.2.1 试验菌株：枯草杆菌黑色变种（ATCC 9372）芽胞、龟分枝杆菌脓肿亚种（ATCC 19977 或CMCC（B）93326），金黄色葡萄球菌（ATCC 6538）、大肠杆菌（8099）、铜绿假单胞菌（ATCC 15442）、白色念珠菌（ATCC 10231）、脊髓灰质炎病毒Ⅰ型疫苗株。

5.5.8.2.2 中和剂：经中和剂鉴定试验合格。

5.5.8.2.3 培养基：胰蛋白胨大豆琼脂培养基、分枝杆菌干燥培养基，沙堡琼脂培养基。

5.5.8.2.4 有机干扰物：3%牛血清白蛋白或 0.3%牛血清白蛋白，胰蛋白胨大豆肉汤培养基（TSB）。

5.5.8.2.5 标准硬水。

5.5.8.3 有效氯含量测定

测定方法参考本文件理化检验技术。

5.5.8.4 杀灭微生物试验操作程序

按产品使用说明书中的最低使用浓度与最短作用时间，按5.1.7.4、5.1.7.5和5.1.10的方法进行试验。

5.5.8.5 评价规定

悬液法：阳性对照组的回收菌量为1×10^7 CFU/mL～5×10^7 CFU/mL，阴性对照组无菌生长，试验组杀灭对数值≥5.00，判定为消毒合格。对白色念珠菌和黑曲霉菌孢子，阳性对照组的回收菌量为1×10^6 CFU/mL～5×10^6 CFU/mL，阴性对照组无菌生长，试验组的杀灭对数值≥4.00，判定为消毒合格。每次试验阳性对照组病毒滴度对数值≥5.00，阴性对照组细胞生长良好，杀灭对数值≥4.00，判定为消毒合格

载体法：阴性对照组均无菌生长，阳性对照组菌量为1×10^6 CFU/样本～5×10^6 CFU/样本，试验组杀灭对数值均≥3.00，判定为消毒合格。病毒滴度每次试验阳性对照组对数值≥4.00，阴性对照组细胞生长良好，灭活对数值≥3.00，判定为消毒合格。

5.5.9 二氧化氯发生器消毒效果鉴定试验

5.5.9.1 目的

用于验证二氧化氯发生器制备的二氧化氯消毒剂或气体的消毒效果。

5.5.9.2 仪器设备或试剂材料

5.5.9.2.1 试验菌株：枯草杆菌黑色变种（ATCC 9372）芽胞、龟分枝杆菌脓肿亚种（ATCC 19977 或

CMCC（B） 93326），金黄色葡萄球菌（ATCC 6538）、大肠杆菌（8099）、铜绿假单胞菌（ATCC 15442）、白色念珠菌（ATCC 10231）、脊髓灰质炎病毒Ⅰ型疫苗株、白色葡萄球菌（ATCC 8032）。

5.5.9.2.2 中和剂：经中和剂鉴定试验合格。

5.5.9.2.3 培养基：胰蛋白胨大豆琼脂培养基、分枝杆菌干燥培养基、沙堡琼脂培养基。

5.5.9.2.4 有机干扰物 ：3%牛血清白蛋白或 0.3%牛血清白蛋白，胰蛋白胨大豆肉汤培养基（TSB）。

5.5.9.2.5 标准硬水。

5.5.9.3 二氧化氯浓度测定

可使用二氧化氯在线监测设备或二氧化氯化学滴定方法，化学滴定法测定参照本文件理化检测技术（见第6章）。

5.5.9.4 杀灭微生物试验操作程序

按产品使用说明书中的最低使用浓度与最短作用时间，按5.1.7.4、5.1.7.5、5.1.10和5.3的方法进行试验。

5.5.9.5 评价规定

悬液法：阳性对照组的回收菌量为1×10^7 CFU/mL～5×10^7 CFU/mL，阴性对照组无菌生长，试验组杀灭对数值≥5.00，判定为消毒合格。对白色念珠菌和黑曲霉菌孢子，阳性对照组的回收菌量为1×10^6 CFU/mL～5×10^6 CFU/mL，阴性对照组无菌生长，试验组的杀灭对数值≥4.00，判定为消毒合格。病毒滴度每次试验阳性对照组对数值≥5.00，阴性对照组细胞生长良好，杀灭对数值≥4.00，判定为消毒合格

载体法：阴性对照组均无菌生长，阳性对照组菌量为1×10^6 CFU/样本～5×10^6 CFU/样本，试验组杀灭对数值均≥3.00，判定为消毒合格。病毒滴度每次试验阳性对照组对数值≥4.00，阴性对照组细胞生长良好，灭活对数值≥3.00，判定为消毒合格。

5.5.10 环氧乙烷灭菌器灭菌效果鉴定试验

5.5.10.1 目的

用于验证环氧乙烷灭菌器对细菌芽胞的灭菌效果。

5.5.10.2 仪器设备或试剂材料

5.5.10.2.1 试验菌株：枯草杆菌黑色变种（ATCC 9372）芽胞或其生物指示物（已备案的自含式生物指示物），在柜内环氧乙烷浓度为 600 mg/L±30 mg/L，相对湿度为 60%±10% 条件下，温度为 54 ℃±1 ℃，D 值≥2.5 min（使用环氧乙烷混合气体）；D 值≥2.0 min（使用 100%环氧乙烷纯气体）。

5.5.10.2.2 染菌载体：滤纸片，面积为 10 mm×10 mm，必要时增用或改用其他载体。菌片回收菌量≥1×10^6 CFU/片，可采用已备案的自含式生物指示物。

5.5.10.2.3 聚乙烯塑料袋：大小为 60 mm×40 mm，材料厚度为 0.15 mm～0.25 mm。

5.5.10.2.4 满载物品：使用说明书中规定的灭菌物品。

5.5.10.3 试验操作程序

5.5.10.3.1 按5.1.2制备枯草杆菌黑色变种芽胞悬液和菌片（或使用已备案的自含式生物指示物）。菌片放入聚乙烯塑料袋内密封包装，每袋2片。每次试验需用多少袋菌片应依据灭菌柜室可用体积大小确定：

a) 体积≤5 m^3时，用10袋（20个菌片）；

b) 5 m^3＜体积≤10 m^3时，每增加1 m^3，应增加1袋（10袋～15袋）；

c) 体积＞10 m^3时，每增加2 m^3，应增加1袋（≥16袋）。

5.5.10.3.2 将装有菌片的聚乙烯塑料袋或生物指示物先放置被灭菌物品中，然后再放入灭菌柜。放置点的选择首先应考虑最难灭菌位置（可根据产品设计参数或温湿度监测数据，如靠近柜室不受热的位置或柜门处等），其余再均匀分布于灭菌柜室中。

5.5.10.3.3 按使用说明书所规定的浓度、作用时间、柜内的温度和相对湿度，在满载条件下进行环氧乙烷灭菌处理。灭菌周期一般包括：

a) 排除空气；

b) 预处理；

c) 加入灭菌剂；

d) 灭菌处理；

e) 去除灭菌剂；

f) 换气；

g) 加入空气至大气压。

5.5.10.3.4 灭菌完毕，以无菌方式取出菌片，分别置于含5 mL TSB试管中（自含式生物指示物按说明书要求操作），置36 ℃±1 ℃ 恒温培养箱内培养7 d，自第3日起每日观察结果，混浊表面有皱褶状菌膜者表示有菌生长，判定为阳性；澄清者表示无菌生长，判定为阴性。对难以判定的肉汤管，取其中0.1 mL～0.2 mL悬液接种TSA平板，用灭菌L棒涂布均匀，置36 ℃±1 ℃恒温培养箱中培养48 h后涂片染色，在显微镜下观察菌落形态，或进一步做其他试验，以判断生长者是否为试验菌。若有非试验菌污染，应查找原因重新进行试验。或取出生物指示物，经36 ℃±1 ℃培养7 d（生物指示物的培养方法按说明书执行），作为试验组。

5.5.10.3.5 以同批试验用菌片2片放在室温下，待试验组完成灭菌程序后，立即分别移入5.0 mL含0.1%吐温80的PBS试管（含玻珠）中，振荡器振荡，按5.1.3所示方法进行活菌培养计数，作为菌数对照组。

5.5.10.3.6 以同批试验用菌片2片放在室温下，待试验组完成灭菌程序后，立即分别置于含5.0 mL TSB试管中，放入培养箱中36 ℃±1 ℃培养7 d，自第3日起每日与试验组同时观察结果，作为阳性对照组。

5.5.10.3.7 以未染菌载体2片分别置于含5.0 mL TSB试管中，放入培养箱中作定性培养，观察有无细菌生长，作为阴性对照组。

5.5.10.3.8 试验重复5次。

5.5.10.3.9　菌片可以用已备案的自含式生物指示物替代，处理方式按产品使用说明书。

5.5.10.4　评价规定

每次试验菌数对照组的回收菌量为1×10^6 CFU/片～5×10^6 CFU/片；阳性对照组有菌生长；阴性对照组无菌生长；所有试验菌片均无菌生长判定为灭菌合格。对难以判断结果的TSB，取其中0.1 mL悬液接种营养琼脂平板， 用无菌L棒涂抹均匀， 置36 ℃±1 ℃恒温培养箱内培养。48 h后涂片染色，显微镜下观察菌落形态，或进一步做其他试验，判断有无生长或生长的是否为试验菌。若为非试验菌，则应重新进行试验。用生物指示物进行评价时，结果判定按说明书进行。

5.5.10.5　注意事项

5.5.10.5.1　环氧乙烷液体可溶解聚乙烯、聚氯乙烯等，不可将其液体滴落于此类物品上。环氧乙烷不论液体或气体，均可损坏赛璐珞制品，试验时应予注意。

5.5.10.5.2　环氧乙烷是一种易燃易爆并有毒的药品，为保证试验安全进行，操作及试验人员应事先熟悉环氧乙烷性能和设备操作规程，并严格遵守安全守则。如使用钢瓶、气罐储存环氧乙烷时，应缓慢打开阀门，勿使药液突然喷出。操作现场应采取防火防爆措施，不得有明火作业及电火花发生，严禁穿着有钉的鞋进入现场，以防摩擦产生火花而引发安全事故。

5.5.10.5.3　工作环境中应通风良好。灭菌结束，打开容器，在排放环氧乙烷气体时，必须开窗。工作现场空气中环氧乙烷最高容许浓度为2 mg/m^3。如人员吸入过多环氧乙烷气体，可引起头痛，呕吐等中毒症状，严重者可致肺水肿等。如出现中毒症状，应迅速离开现场至通风良好处休息。轻者呼吸新鲜空气，直到症状消除；重者应及时送医院治疗。

5.5.10.5.4　现场监测灭菌效果时，灭菌作用时间按说明书执行，不必使用0.5倍作用时间。

5.5.11　过氧化氢气体等离子体（过氧化氢气体）灭菌器灭菌效果鉴定试验

5.5.11.1　目的

验证过氧化氢气体等离子灭菌柜对细菌芽胞的灭菌效果。

5.5.11.2　仪器设备或试剂材料

5.5.11.2.1　试验菌株：嗜热脂肪杆菌（ATCC 7953 或 SSI K31）芽胞，抗力鉴定合格，在使用浓度为53%～60%过氧化氢，灭菌舱内作用浓度为2.3 mg/L±0.4 mg/L，作用温度50 ℃±0.5 ℃的条件下，D值的要求为0.75 s～8.00 s。对于自含式的生物指示物，测试的D值应在说明书上的D值±20%范围内。

5.5.11.2.2　染菌载体：直径小于等于0.4 mm、长度为20 mm～30 mm的不锈钢钢针，以染菌后不堵塞管腔为限。必要时可增用或改用其他载体，载体回收菌量为1×10^6 CFU/载体～5×10^6 CFU/载体。

5.5.11.2.3　培养基：TSA、TSB、溴甲酚紫葡萄糖蛋白胨培养液（见附录A）。

5.5.11.2.4　中和剂：含0.1%硫代硫酸钠的TSB。

5.5.11.2.5　磷酸盐缓冲液（0.03 mol/L，pH 7.2）。

5.5.11.2.6　模拟医疗器械管腔：材质、内径和长短应与厂家提供的说明书中最难灭菌的消毒对象相一

致。以常见的硬式镜不锈钢材料管腔、软式镜聚四氟乙烯材料管腔为模拟管腔，验证微生物的灭菌效果。

5.5.11.3　灭菌效果测定操作方法

5.5.11.3.1　将染菌载体放入不锈钢管腔中最难灭菌的位置（一般为中间位置），制作 10 根测试样本。将 10 根测试样本均匀平行摆放在器械盒内，用双层无纺布包裹，放置在灭菌舱内，灭菌舱内如仅一层隔架，则 10 根样本平行摆放在器械盒内放置在灭菌舱中央（如图 5 所示）；若灭菌舱内可摆放上下两层隔架，则将 10 根样本均匀摆放在两个器械盒内，分别放置在灭菌舱内上下两层隔架中央，如图 6 所示。

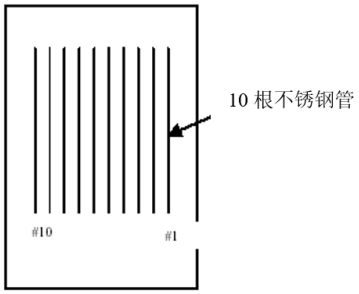


图5　不锈钢管摆放方式（一层）

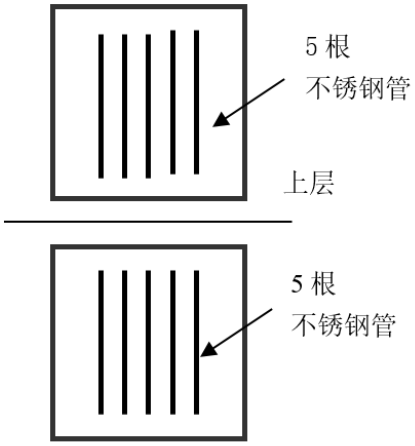


图6　不锈钢管摆放方式（两层）

将染菌的载体放置聚四氟乙烯管腔的中最难灭菌的位置（一般为中间位置），制作10根测样本。 将10根测试样本均匀平行摆放在器械盒内,用双层无纺布包裹,放置在灭菌舱内,灭菌舱内如仅一层隔架，则10根样本平行摆放在器械盒内放置在灭菌舱中央（如图7所示）；若灭菌舱内可摆放上下两层隔架，则将10根样本均匀摆放在两个器械盒内，分别放置在灭菌舱内上下两层隔架中央（如图8所示）。

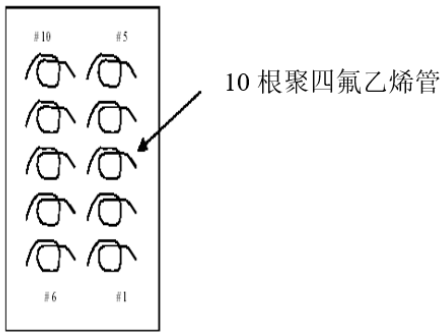


图7　聚四氟乙烯管摆放方式（一层）

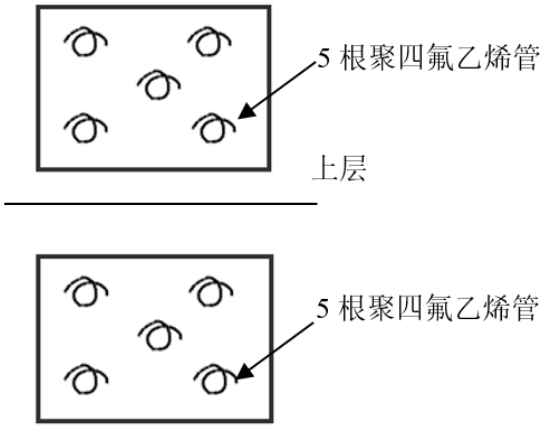


图8　聚四氟乙烯管摆放方式（两层）

5.5.11.3.2　按照说明书要求 10 支测试管腔可作为满负载进行灭菌测试。

5.5.11.3.3　按说明书的要求加入规定量及规格的过氧化氢。

5.5.11.3.4　设定半周期灭菌程序，并启动该灭菌程序，进行灭菌处理试验。

5.5.11.3.5　灭菌程序结束后，在无菌条件下取出染菌载体，将嗜热脂肪杆菌芽胞载体放入溴甲酚紫葡萄糖蛋白胨培养液，56 ℃±2 ℃恒温培养箱中培养 7 d，作为试验组。

5.5.11.3.6　将同批试验用 2 个嗜热脂肪杆菌芽胞载体分别放入含 5.0 mL 稀释液试管中，各振打 200 次。进行活菌培养计数，作为菌数对照组。

5.5.11.3.7　将同批试验用 2 个嗜热脂肪杆菌芽胞载体放入溴甲酚紫葡萄糖蛋白胨培养液，56 ℃±2 ℃恒温培养箱中培养 7 d，作为阳性对照组。

5.5.11.3.8　将同批试验用未染菌载体 2 个放入溴甲酚紫葡萄糖蛋白胨培养液，56 ℃±2 ℃恒温培养箱中培养 7 d，作为阴性对照组。

5.5.11.3.9　试验重复 5 次。

5.5.11.4　评价规定

每次试验的菌数对照组回收菌量均为1×10^6 CFU/载体～5×10^6 CFU/载体。

阳性对照组有菌生长，阴性对照组无菌生长，试验组无菌生长时判定为灭菌合格。

5.5.12 低温蒸汽甲醛灭菌器灭菌效果鉴定试验

5.5.12.1 目的

测定低温蒸汽甲醛灭菌器 （下简称灭菌器） 对细菌芽胞的杀灭能力，评价其灭菌性能是否达到灭菌合格要求。

5.5.12.2 灭菌周期的物理性能检测

灭菌周期的物理性能检测应分别在空载、小负载和满负载情况下进行，且应在同一台机器上进行，测试重复3次。

5.5.12.2.1 试验负载

5.5.12.2.1.1 小负载

小负载由多组小量样品组成，灭菌室容积增加时，样品数量相应增加。有效容积小于100 L的灭菌室，每10 L有效容积放置1个小负载样品单元。有效容积大于100 L的灭菌室，除对应于100 L容积所使用的10个小负载样品单元外，每增加25 L有效容积增放1个小负载样品单元。

小负载样品单元：小负载样品单元由3个灭菌过程验证装置（PCD）组成，根据GB/T 19633的规定用双层纸包装。灭菌过程验证装置（PCD）应至少符合YY/T 0883要求：

灭菌过程验证装置由一个容纳指示物系统的密封舱连接一个内径一致的管腔组成。密封舱应为圆柱形结构，在整个长度范围内各横截面大小一致，管腔与密封舱连接处的远端开口。PCD结构要求参考5.5.3.3。

注：也可使用其他证实等效的材料，如聚亚苯基砜（PPSU）、聚醚醚酮树脂（PEEK）。采用其他不同材料时，壁厚和密封舱重可能需要相应的改变。

5.5.12.2.1.2 满负载

应至少使用生产商规定的最大负载质量的90％测试负载。满负载由满负载单元和其他样品组成。满负载单元至少占最大装载质量的15％，其他样品由与满负载单元相似的物品和材料组成，装载附件的质量不包括在负载质量中。

满负载单元应由以下的材料组成：

a) 1500 mm长的PVC软管，内径4 mm，外径6 mm，此管双层包装，总质量40 g±5 g；
b) 1000 mm长的PVC软管，内径8 mm，外径12 mm，用1个M8×60不锈钢螺钉嵌入PVC管的一个末端。全管双层包装，总重120 g±10 g；
c) 聚酰胺PA11或PA12的棒，长度80 mm，直径15 mm，1个M8×60不锈钢螺钉，聚酰胺棒和不锈钢螺钉用双层包装，总重45 g±5 g；
d) 1根不锈钢管，长度230 mm，内径6 mm，外径8 mm。不锈钢管用双层包装，总质量45 g±5 g；
e) PCD装置，双层包装；

f） 包装用透明塑料/纸复合袋应符合 GB/T 19633 规定。满负载单元的总质量 250 g±25 g，250 g±50 g 不包括样品装载附件。

5.5.12.2.2 测试设备

5.5.12.2.2.1 材料要求：温度、压力测试设备应具备耐高温、耐湿、耐压、耐化学品腐蚀等特点，其整体具有全密封防水性能。

5.5.12.2.2.2 压力测试仪器、温度测试仪器。

5.5.12.2.3 温度、压力检测方法

5.5.12.2.3.1 空载条件下温度、压力测试

测试的目的主要用来证明空载条件下的温度和压力条件符合设定要求，并确定整个灭菌周期中温度最高点等关键位置。

对于灭菌室容积小于1000 L的灭菌器，至少放置10个温度传感器，在此基础上容积每增加100 L增加1个，在灭菌器内表面有代表性的位置放置传感器。

5.5.12.2.3.2 小负载温度、压力测试

小负载温度测试主要用于证明灭菌负载中的温度和压力条件符合设定要求。其次，证明在整个灭菌周期中，压力变化的速率保持在一定范围内，没有破坏样品和样品的包装；确定温度最低的位置。

对于灭菌室容积小于60 L的灭菌器，至少放置4个温度传感器，60 L～100 L的灭菌器，至少放置6个温度传感器，大于100 L的灭菌器，在此基础上容积每增加100 L增加2个温度传感器，在参考测量点上放置1个温度传感器。将其他的温度传感器平均放置在装有负载样品的可用空间内，注意那些已经确定的关键位置。

5.5.12.2.3.3 满负载温度、压力测试

满负载温度、压力测试用于证明灭菌负载中的温度和压力条件符合设定要求。

将满负载单元放在灭菌室的可用空间内。温度传感器数量要求同前述。

在参考测量点放置1个温度传感器。打开包装，将2个温度传感器插入前述的包装中，用胶带将温度传感器与包装纸内的螺钉固定，保持良好的接触，将双层包装封口，放回满负载单元中。将满负载单元放在可用空间的已知位置，这个位置在小负载温度测试中证明是温度最低的位置。将剩余的传感器平均放在可用空间中。

5.5.12.2.4 温度、压力评价规定

5.5.12.2.4.1 预热规定如下：

灭菌室内壁的温度应符合制造商的规定。

5.5.12.2.4.2 灭菌温度规定如下：

a） 灭菌温度范围下限为灭菌温度，上限为灭菌温度＋4 ℃。

b） 温度曲线要求：

——整个灭菌周期中，参考测量点的温度应不超过灭菌温度范围的上限。

——在进行通风过程之前，理论灭菌温度应不超过灭菌温度范围的上限。

——在进入维持时间之前，平衡时间应不能超过 60 s。

——在维持时间中，规定温度应处于灭菌温度范围内，且各点之间的差值应不大于 2 ℃。

5.5.12.2.4.3 压力规定如下：

a) 压力曲线：压力曲线通过测量灭菌周期压力来获得。测量应包括压力的极值，测量的数据还应足以确定公差，以及在部分灭菌阶段中的压力变化速度。测量得到的结果应与制造商提供的标准相对应.

b) 压力曲线要求：整个灭菌周期中，应显示完整的压力曲线和相关的压力限定值。压力的最大变化速率应不能超过 1000 kPa/min，测量时间间隔为 3 s。

注 1：压力变化速率超过1000 kPa/min可能会损坏包装。在维持时间中，压力曲线应处于指定的公差之间。

注 2：维持时间中，灭菌室的压力曲线和温度曲线间有紧密的联系。

5.5.12.3 灭菌试验实验室检测方法

5.5.12.3.1 仪器设备或试剂材料

5.5.12.3.1.1 嗜热脂肪杆菌（ATCC 7953 或 SSI K31）芽胞菌片。嗜热脂肪杆菌（ATCC 7953 或 SSI K31）芽胞，抗力符合 WS/T 649 要求的微生物，含菌量为 1×10^6 CFU/片～5×10^6 CFU/片，也可采用符合上述要求的自含式生物指示物。

5.5.12.3.1.2 考虑医疗器械存在较为复杂的设计，应选择与日常灭菌负载相一致材质的载体。染菌载体回收菌量为 1×10^6 CFU/片～5×10^6 CFU/片。载体如下：

a) 金属片：直径 12 mm～15 mm 不锈钢圆片；

b) 玻璃片：10 mm×10 mm 玻璃片；

c) 塑料片：10 mm×10 mm 聚四氟乙烯塑料片。

5.5.12.3.1.3 将载体放入 PCD 中，PCD 用双层包装；对于不能放入 PCD 内的载体用灭菌包装材料包装后，放入小负载单元和满负载单元中。灭菌包装材料应符合 GB/T 19633 规定。

5.5.12.3.2 装载及测试

5.5.12.3.2.1 指示物的数量取决于灭菌空间的大小，应能准确评估灭菌过程的有效性。灭菌室容积小于 60 L 的灭菌器，至少放置 7 个微生物载体；60 L～100 L 的灭菌器，至少放置 11 个微生物载体；大于 100 L 的灭菌器，在此基础上容积每增加 100 L 增加 1 个微生物载体。小负载与满负载条件同前述。

5.5.12.3.2.2 将双层包装的 PCD 平均放置在灭菌室的可用空间中，记录分布情况。

5.5.12.3.2.3 半程灭菌周期结束之后，对产品化微生物载体（生物指示物）应按生产商的规定的条件进行培养，对于自制的嗜热脂肪杆菌芽胞载体移入溴甲酚紫葡萄糖蛋白胨培养液于 56 ℃±2 ℃培养 7 d，检查是否符合无生长要求。

5.5.12.3.2.4 在 5 次灭菌试验中，阳性对照组细菌生长良好。所有试验菌片全部无细菌生长时，可判为灭菌合格。

5.5.12.3.3 评价规定

每次试验中的菌数对照组检测回收菌量为1×10^6 CFU/片～5×10^6 CFU/片，阳性对照组有菌生长，阴性对照组无菌生长，试验组无菌生长判定为灭菌合格。

用自含式生物指示物进行评价时，结果判定按说明书进行。

5.5.12.3.4 注意事项

甲醛对人有一定的毒性，工作环境应通风良好。

消除残留的甲醛，可用自然通风，或用25%氨水加热蒸发或喷雾进行中和。

5.5.13 对其他消毒器械高水平消毒及灭菌效果鉴定试验

5.5.13.1 目的

用于对上述消毒器械以外的消毒器械高水平消毒或灭菌效果鉴定试验的通用要求。

5.5.13.2 对细菌芽胞或生物指示物的要求

5.5.13.2.1 细菌芽胞的选择：压力蒸汽、高温蒸煮、过氧化氢气体、低温甲醛蒸汽消毒或灭菌应使用嗜热脂肪杆菌（ATCC 7953）芽胞；干热、环氧乙烷、微波和其他化学消毒应使用枯草杆菌黑色变种（ATCC 9372）芽胞。对新的灭菌因子应选择上述两种芽胞。

5.5.13.2.2 细菌芽胞的含量和抗力要求：压力蒸汽灭菌用嗜热脂肪杆菌芽胞载体含量应为 1×10^6 CFU/载体～5×10^6 CFU/载体，在 121 ℃±0.5 ℃的条件下，D 值应≥1.5 min。干热灭菌用枯草杆菌黑色变种芽胞应为 1×10^6 CFU/载体～5×10^6 CFU/载体，在 160 ℃条件下，D 值应≥2.5 min。环氧乙烷灭菌用枯草杆菌黑色变种芽胞应为 1×10^6 CFU/载体～5×10^6 CFU/载体，在环氧乙烷浓度为 600 mg/L±30 mg/L ，作用温度为 54 ℃±1 ℃，相对湿度为 60%±10%的条件下，D 值应≥2.5 min。微波用枯草杆菌黑色变种芽胞应为 1×10^6 CFU/载体～5×10^6 CFU/载体。

5.5.13.2.3 使用相应的自含式生物指示物，芽胞含量除压力蒸汽和低温甲醛蒸汽灭菌生物指示物为≥1×10^5 CFU/载体，其他生物指示物均应≥1×10^6 CFU/载体。抗力要求同上。

5.5.13.3 载体的要求

5.5.13.3.1 根据消毒器械对被消毒对象的不同，可分为消毒实体器械和管腔型器械。

5.5.13.3.2 对消毒实体器械，可根据消毒因子和消毒对象的不同，可选择使用不锈钢片（直径 1.2 cm ）、止血钳齿部、滤纸片或布片（10 mm×10 mm 用于压力蒸汽灭菌或化学消毒因子的消毒或灭菌），玻璃纤维片（10 mm×10 mm 或 5 mm×20 mm 用于干热、过氧化氢气体消毒或灭菌）、塑料片（10 mm×10 mm 用于微波消毒或灭菌）。也可以根据消毒因子的不同使用相应的生物指示物。

5.5.13.3.3 对消毒管腔器械，应使用不锈钢针（直径 0.4 mm，长度 20 mm），然后将染菌的不锈钢针放置于规定长度的聚四氟乙烯管或不锈钢管。对于内镜的消毒也可使用模拟内镜管腔（见 5.2.15.2）。

5.5.13.4 染菌载体的制备

5.5.13.4.1 芽胞悬液的制备：按 5.1.2.3.2 的方法制备细菌芽胞，用胰蛋白胨大豆肉汤培养基（TSB）

稀释制备好的芽胞，制成芽胞悬液，芽胞含量为 10^8 CFU/mL～10^9 CFU/mL。

5.5.13.4.2 不锈钢片（直径 1.2 cm）、止血钳齿部、玻璃纤维片、滤纸片和布片染菌载体的制备：将载体片放置于无菌平皿内，用移液器吸取 10 μL 芽胞悬液滴染于载体片上，待其均匀扩散后，置于 36 ℃±1 ℃恒温箱中干燥，制成染菌载体，每个染菌载体的芽胞回收数量为 1×10^6 CFU/载体～5×10^6 CFU/载体。也可使用相应的自含式生物指示物或菌片式的生物指示物。

5.5.13.4.3 不锈钢针染菌载体的制备：用两个小铁夹子夹住不锈钢针两端，将其横向支撑起来，用 10 μL 移液器吸取芽胞悬液滴染不锈钢针，每根滴染 5 滴，在室温自然晾干制成染菌载体，每个染菌载体的芽胞回收数量为 1×10^6 CFU/载体～5×10^6 CFU/载体。将染菌载体放置于规定长度和直径的聚四氟乙烯管腔或不锈钢管腔的中间位置。

5.5.13.5 消毒柜室内或消毒器械中载体放置位置的要求

5.5.13.5.1 消毒处理设备柜室体积小于 5 m^3 时，至少放置 10 个染菌载体于不同的位置。

5.5.13.5.2 消毒处理设备柜室体积为 5 m^3～10 m^3 时，每增加 1 m^3，增加一个位置点。

5.5.13.5.3 消毒处理设备柜室体积大于 10 m^3 时，每增加 2 m^3，增加一个位置点。

5.5.13.5.4 5.5.13.5.1 至 5.5.13.3.3 的情况均应包括消毒柜室内或消毒器械中最难消毒的位置，该位置应由厂商提供，如果厂商不能提供，应先进行预试验找出柜室内或消毒器械中最难消毒的部位。

5.5.13.6 消毒方法的要求

对于消毒器械，按厂家说明书规定的使用方法和作用时间，在满载的条件下进行试验，试验至少重复3次。对于灭菌器械，按厂家说明书规定的使用方法和半周期作用时间，在满载的条件下进行试验，试验至少重复5次。

5.5.13.7 杀灭对数值的计算方法

首先计算各组的活菌数（CFU/片），并换算为对数值（N），然后按公式（14）计算杀灭对数值：

$$KL=N_o-N_x \quad (14)$$

式中：

KL——杀灭对数值；

N_o——对照组平均活菌数的对数值；

N_x——试验组活菌数对数值。

5.5.13.8 评价规定

5.5.13.8.1 对于消毒器械，经 3 次重复试验，每次试验的阳性对照组回收菌数均应为 1×10^6 CFU/载体～5×10^6 CFU/载体，阴性对照组应无菌生长，试验组所有染菌载体的杀灭对数值均≥3.00，可判为消毒合格。

5.5.13.8.2 对于灭菌器械，经 5 次重复试验，每次试验的阳性对照组回收菌数均应为 1×10^6 CFU/载体～5×10^6 CFU/载体，阴性对照组应无菌生长，试验组所有染菌载体均无菌生长，可判为灭菌合格。

5.5.13.8.3 使用自含式生物指示物试验时，经 5 次重复试验，阳性对照组生物指示物颜色由紫色变为

黄色（或厂家说明书规定的颜色），阴性对照组生物指示物未发生颜色变化，试验组生物指示物颜色未发生变化，可判为灭菌合格。

5.5.14 生成消毒因子的消毒器械的检测方法通则

消毒器械产生的杀菌因子包括物理因子和化学因子。物理因子包括但不限于干热、湿热、紫外线、辐射、高压静电、等离子体等。化学因子包括但不限于臭氧、二氧化氯、酸性氧化电位水等。消毒器械通过物理或化学方法制备或生成的气体，按照相关的标准或规范进行效果评价。

消毒器械的物理杀菌因子应测定强度曲线和有代表性点位的强度；化学杀菌因子应测定浓度曲线，该曲线应能反映消毒器械消毒灭菌全过程杀菌因子强度的变化趋势。

评价化学因子灭菌效果时，灭菌剂实验室试验、模拟现场或者现场试验，应按照产品说明书规定的最低作用浓度（强度）和0.5倍作用时间（环氧乙烷为说明书规定时间）；消毒剂实验室试验、模拟现场或者现场试验作用浓度及作用时间按照产品使用说明书规定进行试验，

灭菌剂和高水平消毒剂选用枯草杆菌黑色变种芽胞为指示菌；中水平消毒剂选用金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌、龟分枝杆菌脓肿亚种和脊髓灰质炎病毒（Ⅰ型疫苗株）；低水平消毒剂选用金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌进行测试，或者按照产品使用说明书规定进行验证。

消毒效果的评价，符合下列所有相应条件的消毒产品认为消毒效果试验结果合格：

a) 去除残留消毒剂效果的鉴定试验合格。

b) 消毒产品的实验室试验结果符合下列相应条件：

悬液定量试验时，每次试验对细菌繁殖体和细菌芽胞如金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌和枯草杆菌黑色变种芽胞的杀灭对数值≥5.00，对龟分枝杆菌脓肿亚种、白色念珠菌和黑曲霉菌的杀灭对数值≥4.00，对病毒的灭活对数值≥4.00。对照组微生物数在规定的范围内。

载体定量试验和载体流动浸泡试验时，每次试验对各类微生物的杀灭对数值或者灭活对数值≥3.00，对照组微生物数在规定的范围内。载体定性试验时，各次试验所有载体均无试验芽胞菌生长，对照组微生物数在规定的范围内。

消毒模拟现场试验时，各次试验对试验微生物的杀灭对数值均≥3.00，对照组微生物数在规定的范围内。灭菌模拟现场试验时，各次试验所有载体均无试验芽胞菌生长，对照组微生物数在规定的范围内。

现场试验时，对消毒对象上自然菌的平均杀灭对数值≥1.00。

5.6 消毒与灭菌指示物鉴定试验

5.6.1 紫外线灯照射强度化学指示卡鉴定试验

5.6.1.1 目的

测定紫外线灯照射强度化学指示卡在照射后颜色的变化与所受照射剂量的相关情况，判定其是否合格。

5.6.1.2 实验器材

5.6.1.2.1 紫外线照度计。

5.6.1.2.2 30 W低臭氧直管紫外线灯。

5.6.1.2.3 紫外线灯测定架（测定时，紫外线灯固定于测定架顶端。顶端高2 m，可上下移动）。

5.6.1.2.4 稳压器（220 V）。

5.6.1.3 试验操作程序

a) 将紫外线灯装于测定架上，指示卡置灯管下方垂直中心位置的照射台上（灯管与照射台距离可上下调整，以达到检测时规定的照射强度）；

b) 开启紫外线灯，待5 min后灯管工作稳定，按指示卡上各标准色块注明的强度，分别调整好灯管下照射台中心测试点处的紫外线照射强度（用照度计测定），以进行随后的照射试验；

c) 照射试验时，在测定架上对指示卡变色区进行照射。每10张指示卡为一组，每组照射1 min，每个强度照射3组（共30张指示卡）；

d) 照射后，即刻用肉眼观察照射过的指示卡，比较其变色区色块与相应标准色块的颜色；

e) 同时用照度计测定紫外线照射强度，以便与指示卡结果核对；

f) 变色区色块与标准色块，以及指示卡检测结果与照度计测定结果的符合率均≥90% 者，可判定为合格。

5.6.1.4 稳定性试验

5.6.1.4.1 在产品使用说明书规定的条件下，存放足量指示卡。

5.6.1.4.2 达到规定的储存期限（至少半年）后，按5.6.1.3方法进行检测和判定。

5.6.1.5 注意事项

5.6.1.5.1 所用照度计必须定期检测校正，并在计量标定有效期内。

5.6.1.5.2 试验中所用指示卡必须为同一批产品。

5.6.1.5.3 光敏指示卡反应变色后，久存可能颜色有所改变，为此检测结果应即时观察并用文字记录。

5.6.1.5.4 电压波动可影响灯管放射的紫外线强度，试验时应予注意。

5.6.2 消毒剂浓度试纸实验室鉴定试验

5.6.2.1 目的

通过检测消毒剂浓度试纸（下简称试纸）颜色反应情况与溶液中消毒剂浓度相关程度，判定其是否合格。

5.6.2.2 仪器设备或试剂材料

消毒剂有效成分化学分析器材。

5.6.2.3 指示单一浓度的试纸测定法

5.6.2.3.1 分组

将消毒剂浓度设定为指示浓度的1.2倍、1.0倍和0.8倍三组，每组浓度测试 30个样本 （取自 3个以上最小包装）。

5.6.2.3.2 操作程序

鉴定时，应根据试纸使用说明书所列使用方法将三组试纸分别放入对应浓度的消毒液中进行测试。

5.6.2.3.3 结果判定

消毒剂浓度设定为指示浓度的1.2倍时，所有30个样本均应达到标准色；消毒剂浓度设定为指示浓度的1.0倍时，30个样品中，90%以上的样品应达到标准色；消毒剂浓度设定为指示浓度的0.8倍时，所有30个样本均不能达到标准色。

5.6.2.4 指示多个浓度的试纸测定法

5.6.2.4.1 分 组

指示多个浓度的试纸应对每个浓度分别进行符合性试验，每个浓度测试30个样本 （取自3个以上最小包装）。

5.6.2.4.2 操作程序

鉴定时，应根据试纸使用说明书所列使用方法将试纸放入对应浓度的消毒液中进行测试。

5.6.2.4.3 结果判定

各浓度组符合率≥90% 者为合格。

5.6.2.5 试纸的稳定性试验方法

5.6.2.5.1 取包装完好并在产品使用说明书规定的储存条件下，存放足量产品。

5.6.2.5.2 达到规定的储存期限（至少半年）后进行检测。检测时，先观察外观，然后按 5.6.2.3 和 5.6.2.4 所示方法进行检测和判定。

5.6.2.5.3 试验结果符合要求者，可认为该存放时间即为其贮存有效期。

5.6.2.6 开瓶有效期的试验方法

5.6.2.6.1 取包装完好并在产品使用说明书规定的储存条件下，将样品瓶盖打开至产品说明书规定的开瓶有效期后，按 5.6.2.3 和 5.6.2.4 所示方法进行检测和判定。

5.6.2.6.2 试验结果符合要求者，可认定该开瓶时间为开瓶有效期。

5.6.2.7 注意事项

5.6.2.7.1 有效成分不稳定的消毒剂，应在试纸检测后尽快以化学法滴定其浓度。

5.6.2.7.2 对于反应后颜色可消退的产品，应及时观察结果，并用文字记录。

5.6.2.7.3 本方法不适用于对残留消毒剂测试卡的评价。

5.6.2.7.4 能监测多种消毒剂的试纸应分别用对应的消毒剂进行检测。

5.6.3 化学指示物鉴定试验

5.6.3.1 目的

通过在规定的单个或多个灭菌参数下，指示物所产生的物理和/或化学变化，来判断该化学指示物是否合格。

5.6.3.2 仪器设备或试剂材料

5.6.3.2.1 压力蒸汽灭菌化学指示物抗力检测器，技术指标应符合 GB/T 24628 的要求。

5.6.3.2.2 环氧乙烷灭菌化学指示物抗力检测器，技术指标应符合 GB/T 24628 的要求。

5.6.3.2.3 过氧化氢气体等离子体（包括过氧化氢气体）灭菌化学指示物抗力检测器，技术指标应符合 GB/T 24628 的要求。

5.6.3.2.4 干热灭菌化学指示物抗力检测器，技术指标应符合 GB/T 24628 的要求。

5.6.3.2.5 低温蒸汽甲醛灭菌化学指示物抗力检测器，技术指标应符合 GB 18281.5 附录 A 的要求。

5.6.3.2.6 B-D 蒸汽暴露装置，技术指标应符合 GB 18282.4 附录 J、GB 18282.5 附录 G 的要求。

5.6.3.2.7 4 kg B-D 标准测试包：使用纯棉布包，棉布的经、纬数范围分别为 30 线/cm±6 线/cm、27 线/cm±5 线/cm，质量应为（185±5）g/m^2。布单应叠成大约 220 mm×300 mm，用手压好之后，摞成高度大约 150 mm。测试包应采用相似的包布进行包裹，并用宽度不超过 25 mm 的扎带进行紧固。测试包的总质量应为 4 kg±0.16 kg（大约需要 17 张布单）。测试包在测试周期结束后，应从灭菌器中取出，在 20 ℃～30 ℃和相对湿度 40%～60%的环境中进行通风后才可继续使用。每次使用间隔期间，测试包应存放在 20 ℃～30 ℃和相对湿度 40%～60%的环境中。

5.6.3.2.8 温度压力测定仪：温度精确度 0.1 ℃、准确度 0.1 ℃。时间精确度 1 s、准确度 1 s。压力精确度 0.1 kPa，0～100 kPa 范围内，压力准确度不超过 1.0 kPa；压力 100 kPa～420 kPa 范围内，压力准确度不超过 2.0 kPa。

5.6.3.3 测试基本程序

a) 每组样本包括 10 个化学指示卡、标签或来自不同卷的胶带。热力灭菌的指示物还应同时将 1 个温度压力测定仪放入检测器中；
b) 操作抗力检测器，同时对每组样本进行处理，详见 5.6.3.4～5.6.3.8；
c) 程序结束后立即打开柜门，取出上述物品；
d) 观察化学指示物变化情况，对比温度压力测定仪的测定值与设备的设定值；
e) 各组试验均重复三次。

5.6.3.4 一类化学指示物

5.6.3.4.1 压力蒸汽灭菌一类化学指示物应符合表 7 的要求。

表7 压力蒸汽灭菌一类化学指示物测试要求

实验分组	测试时间	测试温度℃	合格结果
成功试验	2 min±5 s	134 ℃	颜色达到终点色

	10 min±5 s	121 ℃	颜色达到终点色
失败试验	0.3 min±5 s	134 ℃	颜色未达到终点色
	2 min±5 s	121 ℃	颜色未达到终点色
干热试验	30 min±1 min	140 ℃	颜色未达到终点色

5.6.3.4.2 环氧乙烷灭菌一类化学指示物应符合表 8 的要求。

表8 环氧乙烷灭菌一类化学指示物测试要求

测试环境	测试时间	测试温度	相对湿度	气体浓度	合格结果
无环氧乙烷气体	90 min±1 min	60 ℃±2 ℃	≥85%	无	颜色未达到终点色
环氧乙烷气体测试	2 min±15 s	54 ℃±1 ℃	60%±10%	600 mg/L±30 mg/L	颜色未达到终点色
	3 min±15 s	37 ℃±1 ℃			
环氧乙烷气体测试	20 min±15 s	54 ℃±1 ℃	60%±10%	600 mg/L±30 mg/L	颜色达到终点色
	25 min±15 s	37 ℃±1 ℃			

5.6.3.4.3 低温蒸汽甲醛灭菌一类化学指示物应符合表 9 的要求。

表9 低温蒸汽甲醛灭菌一类化学指示物测试要求

实验分组	测试时间	测试温度	甲醛浓度	合格结果
无甲醛试验	90 min ±1 min	80 ℃±2 ℃	0	颜色未达到终点色
失败试验	20 s ±5 s	60 ℃±0.5 ℃	1.0 mol/L± 0.01 mol/L	颜色未达到终点色
成功试验	15 min ±15 s	70 ℃±2 ℃	1.0 mol/L ± 0.01 mol/L	颜色达到终点色
注：为了证明对特殊过程的适用性，应增加生产商规定的低温蒸汽甲醛灭菌程序进行附加的功能测试。若一类化学指示物仅标明在低于55 ℃或高于65 ℃的温度下灭菌周期使用，则测试应在生产商规定的最高温度和甲醛浓度下进行。				

5.6.3.4.4 过氧化氢气体等离子体（包括过氧化氢气体）灭菌一类化学指示物应符合表 10 的要求。

表10 过氧化氢气体等离子体（包括过氧化氢气体）灭菌一类化学指示物测试要求

实验分组	测试时间	测试温度	过氧化氢气体浓度	合格结果
无过氧化氢试验	45 min±5 min	50 ℃±0.5 ℃	0	颜色未达到终点色
失败试验	7 s±1 s	50 ℃±0.5 ℃	2.3 mg/L±0.4 mg/L	颜色未达到终点色
成功试验	6 min±1 s	50 ℃±0.5 ℃	2.3 mg/L±0.4 mg/L	颜色达到终点色

5.6.3.5 二类化学指示物

5.6.3.5.1 4kg B-D 测试纸（包）的试验方法

5.6.3.5.1.1 试验分组

B-D测试物的鉴定评价分为成功试验、失败试验和干热试验三组。

成功试验：设定B-D蒸汽暴露装置的温度为134 ℃、时间为3.5 min，或产品说明书规定的温度和时间，分别进行B1饱和蒸汽成功试验、B2饱和蒸汽成功试验和B3饱和蒸汽成功试验三组试验。

失败试验：将B-D测试物和温度压力测定仪放置在标准测试包的中央位置，在134 ℃3.5 min灭菌过程的最后1 min开始时或121 ℃15 min灭菌过程的最后5 min开始时，标准测试包中央和蒸汽暴露装置腔体下排气口之间将会产生2 ℃～6 ℃的温差，此时B-D测试物应显示不变色或不均匀/不完全变色。对阳性结果的产生条件有特殊规定的，应在最后30%灭菌时间开始时显示类似结果。

a) B1 泄漏冷空气试验

设定 B-D 蒸汽暴露装置的温度为 134 ℃、时间为 3.5 min，或产品说明书规定的温度和时间，根据预实验的标准包内外温差，设定泄露空气量，运行 B1 低大气压循环。

b) B1 注入冷空气试验

设定 B-D 蒸汽暴露装置的温度为 134 ℃、时间为 3.5 min，或产品说明书规定的温度和时间，根据预实验的标准包内外温差，设定注入空气量，运行 B1 低大气压循环。

c) B1 修改排气阶段试验

设定 B-D 蒸汽暴露装置的温度为 134 ℃、时间为 3.5 min，或产品说明书规定的温度和时间，修改排气阶段。根据预试验减少压力范围，必要时减少脉动排气的次数，根据预实验的标准包内外温差，设定实验参数，运行 B1 低大气压循环。

d) B2 修改排气阶段试验

设定 B-D 蒸汽暴露装置的温度为 134 ℃、时间为 3.5 min，或产品说明书规定的温度和时间，修改排气阶段。根据预试验减少压力范围，必要时减少脉动排气的次数，根据预实验的标准包内外温差，设定实验参数，运行 B2 跨大气压循环。

e) B3 注入冷空气试验

设定 B-D 蒸汽暴露装置的温度为 134 ℃、时间为 3.5 min，或产品说明书规定的温度和时间，根据预实验的标准包内外温差，设定注入空气量，运行 B3 高大气压循环。

干热试验：将 B-D 测试物置于 140 ℃±2 ℃的干热条件下暴露 30 min±1 min。

成功试验和失败试验均包括 B1 低大气压循环、B2 跨大气压循环、B3 高大气压循环三种排气方式，实验项目要求见表 11。各种排气方式试验步骤如下：

B1 低大气压循环步骤如下：①压力下降到 5.0 kPa，②输入蒸汽使压力达到 97.0 kPa，③重复步骤 ①、② 三次，④如果使用空气注入，应在蒸汽进入至暴露时间过程中压力达到 75.0 kPa-105.0 kPa 时进行并完成，⑤蒸汽输入达到设置运行压力，⑥维持设定的温度和时间，⑦降压达到 5.0 kPa，⑧输入空气。

B2 跨大气压循环步骤如下：①降压至 5.0 kPa，②蒸汽输入达到 150.0 kPa，③排气降压到 50.0 kPa，④重复步骤 ②、③ 三次，⑤蒸汽输入达到设置压力数值减去 10.0 kPa，⑥降压到 110.0 kPa～120.0 kPa，⑦重复步骤 ⑤、⑥ 一次，⑧蒸汽输入达到设置的压力数值，⑨维持设定的温度和时间，⑩降压到 5.0 kPa，⑪输入空气。

B3 高大气压循环步骤如下：①压力降到 5.0 kPa，②蒸汽输入达到 95.0 kPa，③压力下降到 5.0 kPa，④重复步骤 ②、③ 一次，⑤蒸汽输入使压力达到设置压力数值减去 20.0 kPa，⑥降压至 105.0 kPa～120.0 kPa，⑦重复步骤 ⑤、⑥ 两次，⑧如果使用空气注入，应在蒸汽进入至暴露时间过程中压力达到 120.0 kPa-130.0 kPa 时进行并完成，⑨输入蒸汽达到设置运行压力，⑩维持设定的温度和时间，⑪降压至 5.0 kPa，⑫输入空气。

表11　B-D 测试物的测试要求

实验分组		B1 低大气压脉动	B2 跨大气压脉动	B3 高大气压脉动
成功试验		√	√	√
失败试验	修改排气	√	√	/
	泄漏冷空气	√	/	/
	注入冷空气	√	/	√
干热试验		140 ℃±2 ℃、30 min±1 min		
注：“√”为必做项目 “/”为不做项目。				

5.6.3.5.1.2　试验操作步骤

a)　标准测试包：试验前，将测试所需棉布包在温度为 20 ℃～30 ℃，相对湿度为 40%～60%的条件下放置 4 h。

b)　B-D 蒸汽暴露装置：开启设备电源开关，打开压缩气和电热蒸汽发生器开关，压缩气压力表显示数值约 0.5 MPa，待蒸汽暴露装置夹层压力数值约 0.2 MPa，空锅状态运行预热程序，对 B-D 蒸汽暴露装置进行预热。

c)　将温度压力时间测定仪和 B-D 测试物同时放入 B-D 蒸汽暴露装置。按 5.6.3.5.1（1）的要求分别进行成功试验和失败试验。检测结束后，读取温度压力测定仪的参数，与 B-D 蒸汽暴露装置的设定参数进行比较，取出 B-D 测试纸，观察试验结果。

d)　将 B-D 测试物放置在 140 ℃干热设备中 30 min±1 min，观察颜色变化。

e)　成功试验和失败试验重复 3 次，干热试验重复 5 次。

5.6.3.5.1.3　结果判定

测定结果符合以下全部情况者判定为合格：

a)　温度压力测定仪记录的温度与 B-D 蒸汽暴露装置设定温度相差≤0.5 ℃；温度压力测定仪记录的设定温度维持时间与设定时间相差≤10 s，则为有效测试循环，可进行后续试验结果判定。

b)　成功试验应变色均匀，达到终点色；失败试验不显示颜色变化，或显示不完全/不均匀的颜色变化，且未达到终点色；干热试验应不显示颜色变化，或显示轻微颜色变化，或变化的程度明显不同于终点色。

5.6.3.5.1.4　稳定性试验

产品在使用说明书规定的储存条件下保存至规定时间（至少半年）后，取包装完好的产品，按照5.6.3.5.1的方法进行检测。若结果符合上述要求，则判定产品在该保存期内性能稳定。

5.6.3.5.2 7 kg B-D 测试纸（包）的试验方法

7 kg B-D测试纸（包）按GB 18282.3和GB 18182.4的方法进行。

5.6.3.5.3 管腔 B-D 装置的试验方法

5.6.3.5.3.1 试验分组

管腔B-D测试物应在低大气压循环下进行成功试验和失败试验。

低大气压循环步骤如下：①压力抽至20 kPa，②输入蒸汽使压力达到95 kPa（压力变化速率不应超过50 kPa/min），③重复步骤 ①、② 至少八次，④输入蒸汽达到暴露压力（压力变化速率在25 kPa/min～50 kPa/min之间，压力值应在蒸汽暴露装置所允许的压力范围之内），⑤维持暴露时间，⑥降压至10 kPa，⑦输入空气至大气压。

成功试验：设定B-D蒸汽暴露装置的温度为134 ℃、时间为3.5 min。

失败试验：1）调整抽真空深度，找到使冷空气排出不彻底的真空度；2）通过调整不可冷凝气体残留量，在产品说明书标识的暴露时间的最后30%开始时，使管腔装置盲端产生2 ℃～6 ℃的温差。

5.6.3.5.3.2 操作步骤

a) B-D 蒸汽暴露装置：开启设备电源开关，打开压缩气和电热蒸汽发生器开关，压缩气压力表显示数值约 0.5 MPa，待蒸汽暴露装置夹层压力数值约 0.2 MPa，空锅状态运行预热程序，对 B-D 蒸汽暴露装置进行预热；
b) 将温度压力时间测定仪和管腔 B-D 测试物同时放入 B-D 蒸汽暴露装置，进行成功试验和失败试验。检测结束后，读取温度压力时间测定仪的参数，同 B-D 汽暴露装置的设定参数进行比较，取出管腔 B-D 测试物，观察试验结果；
c) 成功试验和失败试验重复 3 次。

5.6.3.5.3.3 结果判定

测定结果符合以下全部情况者判定为合格：

a) 温度压力测定仪记录的温度与 B-D 蒸汽暴露装置设定温度相差≤0.5℃；温度压力测定仪记录的设定温度维持时间与设定时间相差≤10 s；
b) 成功试验应变色均匀且达到终点色；失败试验不显示颜色变化，或显示不完全/不均匀的颜色变化，且未达到终点色。

5.6.3.5.3.4 重复使用稳定性试验

将管腔B-D装置重复使用产品说明书标识的相应次数后，进行密封性试验和油浴试验。

a) 密封性试验：在管腔 B-D 装置开口末端内壁联上一 50 mL 的注射器，把密封帽放于水面下，通过注射器给管腔 B-D 装置加压，观察密封性。密封帽或管腔 B-D 装置中无气泡产生，则管腔 B-D 装置合格；若有气泡产生，则不合格。

b) 油浴试验：用油浴并加热到管腔 B-D 装置最高操作温度（如 140 ℃），重复进行密封性实验。若上述试验结果合格，则判定管腔 B-D 装置重复使用该次数时性能稳定。

5.6.3.5.3.5 注意事项

a) 测定时应使用饱和蒸汽，否则可影响结果的准确性。

b) 温度压力测定仪检定时所发现的误差，在记录试验温度及压力时，应将读数校正。

c) 对重复性试验应分次进行，而不可只在同次压力蒸汽灭菌处理中增加化学指示物的数量。

5.6.3.6 三类和四类化学指示物

不同灭菌类型，关键变量不同，标定值（SV）对应的参数不同。压力蒸汽灭菌包括时间、温度和饱和蒸汽（通过饱和蒸汽传输）；干热灭菌包括时间和温度；环氧乙烷灭菌包括时间、温度、相对湿度和环氧乙烷（环氧乙烷）浓度；低温蒸汽甲醛灭菌包括时间、温度、水（通过饱和蒸汽传输）和甲醛浓度；过氧化氢气体等离子体（包括过氧化氢气体）灭菌包括时间、温度、过氧化氢浓度。三类和四类化学指示物应符合表12的要求。

表12 三类和四类化学指示物的测试要求

灭菌过程	测试时间	测试温度	灭菌剂浓度	相对湿度	合格结果
压力蒸汽	SV SV（1-25 %）	SV SV-2 ℃	/	/	达到终点色 未达到终点色
干热	SV SV（1-25%）	SV SV-5 ℃	/	/	达到终点色 未达到终点色
环氧乙烷	SV SV（1-25%）	SV SV-5 ℃	SV SV（1-25%）	>30% >30%	达到终点色 未达到终点色
低温蒸汽甲醛	SV SV（1-25%）	SV SV-3 ℃	SV SV（1-20%）	/	达到终点色 未达到终点色
过氧化氢气体等离子（含过氧化氢气体）	SV SV（1-25%）	SV SV-3 ℃	SV SV（1-20%）	/	达到终点色 未达到终点色
注：除干热灭菌化学指示物外，其他的多变量化学指示物（三类和四类），还应进行无灭菌因子试验（压力蒸汽灭菌为干热试验），具体方法按一类化学指示物的要求进行。 对于过氧化氢气体等离子（含过氧化氢气体）灭菌不同品牌、不同型号、不同灭菌程序有不同的灭菌参数，其化学指示物应根据说明书的使用范围，分别进行检测。					

5.6.3.7 五类化学指示物

5.6.3.7.1 压力蒸汽灭菌五类化学指示物测试要求

a) 压力蒸汽灭菌五类化学指示物应针对所有关键过程变量进行设计，指示物在暴露于灭菌条件后应达到终点，该终点指示了相关参数公差范围内的关键过程变量；

b) 压力蒸汽灭菌五类化学指示物应规定 121 ℃和 135 ℃的 SV，以及在 121 ℃～135 ℃范围内的一个或多个等间隔温度点处的 SV。121 ℃时的 SV 不得少于 16.5 min，135 ℃时的 SV 不得少于 1.2 min；

c) 在所有 SV 条件下测试的压力蒸汽灭菌五类化学指示物应达到终点；

d) 压力蒸汽灭菌五类化学指示物暴露于时间 SV×85%和对应的温度 SV-1 ℃的条件下，不可达到其终点；

e) 压力蒸汽灭菌五类化学指示物在 140 ℃±2 ℃下暴露于干热的时间为 30 min±1 min 时，不可达到其终点；

f) 有些因素可能会对灭菌操作的效果产生不利影响，同时不能被指示物准确地检测到，制造商必须清晰地阐明这些因素；

g) 压力蒸汽灭菌五类化学指示物温度系数应通过 log SV 和/或 SV 对温度所绘曲线的斜率来确定。压力蒸汽灭菌五类化学指示物温度系数应在 10 ℃至 27 ℃之间，最小二乘法进行回归分析，曲线的相关性系数不得小于 0.9。温度系数和相关性系数可参照 GB 18281.3 附录 B 公式计算。

5.6.3.7.2 环氧乙烷灭菌五类指示物（包内灭菌效果指示物）测试要求

a) 环氧乙烷灭菌五类指示物应针对所有关键过程变量进行设计，指示物在暴露于灭菌条件后应达到终点，该终点指示了相关参数公差范围内的关键过程变量；

b) 环氧乙烷灭菌五类指示物应规定 37 ℃和 54 ℃的 SV 值，37 ℃和 54 ℃的 SV 分别不得低于 75 min 和 30 min；

c) 在所有 SV 条件下测试的环氧乙烷灭菌五类化学指示物应达到终点；

d) 环氧乙烷灭菌五类化学指示物暴露于时间 SV×80%和对应的温度 SV，以及环氧乙烷浓度 600 mg/L±30 mg/L，相对湿度 60%±10%条件下，不可达到其终点；

e) 环氧乙烷五类指示物测试应进行无灭菌因子试验，暴露于时间及温度 SV、相对湿度 60%±10%以及无环氧乙烷气体条件下，不可达到其终点；

f) 有些因素可能会对灭菌操作的效果产生不利影响，同时不能被指示物准确地检测到，制造商必须清晰地阐明这些因素。

5.6.3.7.3 过氧化氢气体等离子体（包括过氧化氢气体）灭菌五类化学指示物测试要求

5.6.3.7.3.1 基本要求

过氧化氢气体等离子体（包括过氧化氢气体）灭菌五类化学指示物应针对所有关键过程变量进行设计，产品的抗力标定值等同于或超过GB/T 33417规定的过氧化氢气体灭菌生物指示物的性能要求。测试所用生物指示物抗力应符合GB/T 33417。

5.6.3.7.3.2 试验方法

过氧化氢气体等离子体（包括过氧化氢气体）灭菌五类化学指示物的评价分为成功试验、失败试验和无灭菌因子试验。

成功试验：化学指示物和生物指示物同时暴露于12倍的D值条件下。

失败试验：化学指示物暴露于8倍D值条件下。

无灭菌因子试验：化学指示物和生物指示物同时暴露于无过氧化氢、时间45 min±5 min、温度50 ℃±0.5 ℃的条件下。

5.6.3.7.3.3 操作步骤

a) 每组实验，取 10 个化学指示物及 10 个生物指示物同时放入抗力仪中。

b) 操作抗力仪器，按各组试验参数的要求，将各组样品分次进行处理。

c) 灭菌循环结束后打开柜门，取出上述物品，观察实验结果。

d) 各组试验均重复 3 次。

5.6.3.7.3.4 结果判定

测定结果符合以下全部情况者判定为合格：

a) 成功实验：生物指示物全部阴性，化学指示物达到终点色；

b) 失败实验：化学指示物未达到终点色；

c) 无灭菌因子实验：生物指示物全部阳性，化学指示物未达到终点色。

d) 若生物指示物结果不符合上述要求，则试验无效，应分析并解决问题后，重新试验。

5.6.3.7.3.5 稳定性试验

产品在使用说明书规定的储存条件下保存至一定时间（至少半年）后，取包装完好的产品，按上述步骤进行检测，若结果符合上述要求，则判定产品在该保存期内性能稳定。

5.6.3.8 压力蒸汽灭菌六类化学指示物

5.6.3.8.1 试验方法

压力蒸汽灭菌六类化学指示物应符合表13的要求。

表13 压力蒸汽灭菌六类化学指示物测试要求

试验分组	测试时间	测试温度	合格结果
成功试验	SV	SV	达到终点色
失败试验	SV（1-6%）	SV-1 ℃	未达到终点色
干热试验	30 min±1 min	140 ℃±2 ℃	未达到终点色

5.6.3.8.2 结果判定

每次试验均符合下列情况者判为合格：

a) 每次测定温度与设定温度相差≤0.5 ℃，设定温度的维持时间与设定时间相差≤10 s。

b) 成功试验时，化学指示物达到终点色，失败试验和干热试验时未达到终点色。

5.6.3.8.2 稳定性试验

产品在使用说明书规定的储存条件下保存至一定时间（至少半年）后，取包装完好的产品，按上表进行检测，若结果符合上述要求，则判定产品在该保存期内性能稳定。

5.6.4 生物指示物鉴定试验

5.6.4.1 目的

测定生物指示物含菌量，以及规定灭菌参数下的存活时间、杀灭时间与 D值是否达到要求。

5.6.4.2 仪器设备或试剂材料

5.6.4.2.1 灭菌抗力仪，应符合 GB/T 24628 的要求。

5.6.4.2.2 恒温培养箱。

5.6.4.2.3 胰蛋白胨大豆肉汤培养基（TSB）。

5.6.4.2.4 胰蛋白胨大豆琼脂培养基 （TSA）。

5.6.4.2.5 指示菌恢复培养基。

5.6.4.2.6 0.1%胰蛋白胨的生理盐水溶液。

5.6.4.3 含菌量的测定

最少抽取4个生物指示物样本。无菌试管内加入10 mL含有0.1%胰蛋白胨的生理盐水溶液，加入适量无菌玻璃珠，将待计数染菌载体投入试管，用电动混匀器振荡直至染菌载体被完全打碎，洗下芽胞，制成悬液。按5.1.3规定进行活菌培养计数。

5.6.4.4 D 值的测定

D值的测定方法有存活曲线法、部分阴性法和验证法，应至少使用其中两种方法测定D值。

5.6.4.4.1 存活曲线法

a) 随机抽取 50 个样本；
b) 根据不同的暴露条件设置 10 个暴露时间点，每个时间点测试 5 个样本，最短的暴露时间可以设定为 0 s，最长的暴露时间使菌量减少到小于或等于初始菌量的 0.01%；
c) 测试之前，首先对生物指示物抗力测试仪进行预热；
d) 按照生物指示物抗力测试仪操作说明书的流程进行操作，对 10 个暴露时间分别处理；
e) 处理完毕，对各组样本随机抽取 3 个进行活菌计数；
f) 用所得的全部存活菌数的常用对数值，对时间（min）作图，用最小二乘法进行回归分析，确定最佳线性曲线。回归分析时不应包括初始菌落数 0.5 log 范围内的存活数据点。计算所得直线斜率的负倒数值即等于以分钟表示的指定暴露条件下的 D 值，同时所得线性曲线相关系数应不小于 0.8。

5.6.4.4.2 部分阴性法

a) 随机选取 120 个样本。分成 6 组，每组 20 个样本；

b) 生物指示物抗力测试仪参数设置：设置暴露参数；暴露时间至少为 6 个时间点，至少 1 个时间点全部有菌生长，至少 2 个时间点部分有菌生长，至少 2 个时间点全部无菌生长；

c) 对 6 组样本分别暴露；

d) 暴露完成后将 6 组生物指示物按照说明书要求培养到规定时间，记录阴性和阳性结果。当最短暴露时间点全部为阳性，最长暴露时间全部为阴性，并且中间至少 2 组有部分样本阳性，试验结果有效。带入式（15）和式（16）计算 D 值。

$$U_{HSK} = U_K - \frac{d}{2} - \frac{d}{n}\sum_{i=1}^{i=6} r_i \quad \cdots\cdots (15)$$

$$D = \frac{U_{HSK}}{\log_{10} N_0 + 0.2507} \quad \cdots\cdots (16)$$

式中：

U_{HSK}——达到无菌生长平均时间，单位为分钟（min）；

U_K——首次显示所有样本无菌生长的暴露时间，单位为分钟（min）；

d——暴露时间的固定间隔，单位为分钟（min）；

n——每组的样本量，单位为个；

D——D值；

N_0——回收菌落数，单位为菌落形成单位（CFU）；

r_i——每次暴露无菌样本数量，单位为个。

5.6.4.4.3 验证法（存活时间、杀灭时间）

应分别使用不少于50个相同批次的样本，通过存活时间和杀灭时间验证D值。样本暴露后应按照制造商给出的方法进行培养。存活时间（ST）和杀灭时间（KT）用式（17）和式（18）计算：

$$ST \geq (\log N_0 - 2) \times D \quad \cdots\cdots (17)$$

$$KT \leq (\log N_0 + 4) \times D \quad \cdots\cdots (18)$$

式中：

ST—— 存活时间，单位为分钟（min）；

KT—— 杀灭时间，单位为分钟（min）；

N_0—— 为每批生物指示物初始菌量的平均数；

D—— D值。

暴露时间设定为ST值时，若全部样本有菌生长，则符合要求，若有样本无菌生长，则不符合要求；暴露时间设定为KT值时，若全部样本无菌生长，则符合要求，若有样本有菌生长，则不符合要求。

5.6.4.5 稳定性试验

在产品说明书规定的条件下储存包装完好的足量产品，达到说明书规定的储存期限（至少半年）后进行检测。检测前，先观察外观，特别注意指示剂中的培养液颜色有无变化。在外观正常情况下，按5.6.4.3和5.6.4.4测定含菌量和D值。

5.6.4.6 结果判定

5.6.4.6.1 含菌量

环氧乙烷灭菌生物指示物、过氧化氢气体等离子体（包括过氧化氢气体）灭菌生物指示物≥1×10^6 CFU/载体，压力蒸汽灭菌生物指示物≥1×10^5 CFU/载体，低温蒸汽甲醛灭菌生物指示物≥1×10^5 CFU/载体；对于成品的指示物，满足上述含菌量要求的同时，载体回收菌量与产品说明书标称菌量的误差应在-50%～+300%之间。

5.6.4.6.2 D 值

a) 压力蒸汽灭菌生物指示物在 121 ℃时，D 值大于或等于 1.5 min。
b) 环氧乙烷灭菌生物指示物：相对湿度 60%±10%，100%环氧乙烷气体浓度 600 mg/L±30 mg/L 的条件下，在 54 ℃±1 ℃时，D 值≥2.0 min；相对湿度 60%±10%，混合环氧乙烷气体浓度 600 mg/L±30 mg/L 的条件下，在 54 ℃±1 ℃时，D 值≥2.5 min。
c) 过氧化氢气体等离子体（包括过氧化氢气体）灭菌生物指示物：过氧化氢液体浓度为 59%±2%，灭菌舱内过氧化氢气体作用浓度为 2.3 mg/L±0.4 mg/L，作用温度 50 ℃±0.5 ℃的条件下，D 值为 0.75 s～8 s。
d) 低温蒸汽甲醛灭菌生物指示物：甲醛浓度为 1.0 mol/L±0.01 mol/L，在 60 ℃±0.5 ℃时，D 值≥6 min。
e) 对于成品的指示物，满足上述要求的同时，测试的 D 值应在产品说明书标称 D 值±20%范围内。

5.6.4.6.3 稳定性试验

在产品说明书规定的储存条件下，达到储存期限（至少半年）后，含菌量和D值符合上述要求，则判定为合格。

5.6.5 快速生物指示物培养时间一致性评价

5.6.5.1 目的

适用于所有类型的生物指示物，包括自含式和菌片式。如生物指示物标称的培养时间同标准的7天或更长时间相比要短，缩短的培养时间需要根据相应的验证方法学进行确认，以保证生物指示物经过缩短的时间培养后，可以有效获得所需培养结果。

5.6.5.2 仪器设备或试剂材料

5.6.5.2.1 测试样本应能代表芽胞悬液、染菌载体或自含式生物指示物。

5.6.5.2.2 培养箱应能够提供特定的培养条件中规定的温度，并且能监测和验证。

5.6.5.2.3 生长培养基应能满足培养温度条件的规定。

5.6.5.2.4 应使用相关的抗力仪，抗力仪的标准参考 GB/T 24628。

5.6.5.3 试验方法

5.6.5.3.1　确定生物指示物存活率 30%～80%的灭菌暴露条件。该灭菌暴露条件除了未指定时间参数，其余灭菌参数均包含。

5.6.5.3.2　生物指示物的样本量为 3 个批次，且每个批次至少包含 100 个样本。每次灭菌暴露均使用同一个批次的样本，不同批次的样本不能混用。

5.6.5.3.3　验证过程中推荐将生物指示物置于相应的材料装置中进行灭菌暴露。如果生物指示物固有的抗力可以满足灭菌暴露要求，那么可以不使用相应的材料装置。

5.6.5.3.4　灭菌暴露后，应在 8 h 之内将生物指示物放入培养基进行培养，所有生物指示物培养至少 7 d。

5.6.5.3.5　应每天或隔天记录生物指示物阳性结果。

5.6.5.4　结果判定

5.6.5.4.1　以培养 7 d 的阳性结果作为最终的阳性数（即分母）。每次缩短培养时间的生物指示物的阳性数作为分子，同培养 7 d 的阳性数相比，如果达到 97%的符合率，就可以作为生物指示物可接受的缩短的培养时间。

5.6.5.4.2　在 3 次灭菌暴露测试下，最长的达到 97%符合率的时间作为可接受的缩短培养时间，即每次测试结果的符合率都要达到 97%。

5.6.5.5　注意事项

在3次灭菌测试中，如果任何一次生物指示物的存活不在30%～80%之间，那么测试结果不能作为实验依据，应重新测试直至指示物的存活率在30%～80%之间。

5.6.6　PCD 产品的鉴定试验

5.6.6.1　压力蒸汽灭菌敷料类 PCD 产品

5.6.6.1.1　目的

在饱和蒸汽作用下，对比压力蒸汽灭菌敷料类PCD产品与标准测试包的抗力,以判定PCD产品是否合格。

5.6.6.1.2　测试项目

测试项目如下：

a)　生物指示物的鉴定：按照 5.6.4 进行测定，符合压力蒸汽灭菌生物指示物鉴定试验的要求。

b)　化学指示物的鉴定：按照 5.6.3 进行测定，符合五类化学指示物鉴定试验的要求。

c)　敷料类 PCD 的比对试验：在 B1 低大气压循环、B2 跨大气压循环和 B3 高大气压循环下，敷料类 PCD 与标准测试包进行抗力对比测试。B1 低大气压循环、B2 跨大气压循环、B3 高大气压循环参数的具体参数见 5.6.3.5。

5.6.6.1.3　仪器设备或试剂材料

仪器设备或试剂材料如下：

a) 蒸汽暴露装置：时间控制以秒为单位；温度控制以 0.1 ℃为单位；暴露期柜室内温度误差 0 ℃～1.5 ℃；包含 3 种循环方式：B1 低大气压循环、B2 跨大气压循环、B3 高大气压循环；可定量注入和泄露冷空气；

b) 标准测试包：由 16 条全棉手术巾（每 10 毫米经线数 30±6、纬线数 27±5）制成，每条手术巾的尺寸为 41 cm×66 cm，每条手术巾的长边先折成 3 层，短边折成 2 层，从下往上叠放，折叠边一块为左，一块为右，叠放高度 15 cm，质量约为 1.36 kg；

c) 恒温恒湿培养箱 温度为 20 ℃～30 ℃，相对湿度为 40%～60%。

5.6.6.1.4 试验方法

试验分为成功试验、修改程序试验和失败试验三组。

a) 成功试验：根据产品说明书规定合格的灭菌暴露温度和暴露时间分别运行 B1 低大气压循环、B2 跨大气压循环和 B3 高大气压循环三组试验，敷料类 PCD 和标准测试包中的指示物（生物或/和化学）均灭菌合格；

b) 修改程序试验：根据产品说明书规定修改程序的灭菌暴露温度和暴露时间分别运行 B1 低大气压循环、B2 跨大气压循环和 B3 高大气压循环三组试验，敷料类 PCD 中的指示物（生物或/和化学）灭菌失败，但是标准测试包中的指示物（生物或/和化学）灭菌合格；

c) 失败试验：根据产品说明书规定失败的灭菌暴露温度和暴露时间分别运行 B1 低大气压循环、B2 跨大气压循环和 B3 高大气压循环三组试验，敷料类 PCD 和标准测试包中的指示物（生物或/和化学）灭菌失败。

5.6.6.1.5 操作步骤

a) 标准测试包：试验前，将打好的标准测试包在温度为 20 ℃～30 ℃，相对湿度为 40%～60%的条件下放置 4 h。将相应的化学或/和生物指示物取出，放置于标准测试包中心部位，备用；

b) 蒸汽暴露装置：开启设备电源开关，打开压缩气和电热蒸汽发生器开关，压缩气压力表显示数值 0.5 Mpa 左右，抗力仪夹层压力 0.2 Mpa 左右，空锅状态运行预热程序，对蒸汽暴露装置进行预热；

c) 将 PCD 产品、标准测试包并排放入蒸汽暴露装置内，分别进行成功试验、修改程序试验和失败试验，根据规定的灭菌暴露温度和暴露时间分别运行 B1 低大气压循环、B2 跨大气压循环和 B3 高大气压循环；

d) 检测结束后，取出 PCD 产品和标准测试包内的化学或/和生物指示物，观察化学指示物的测试结果，对生物指示物按照使用说明书进行培养；

e) 成功试验、修改程序试验和失败试验分别重复 3 次。

5.6.6.1.6 结果判定

测定结果符合下述全部条件，则该产品判定合格。

a) 成功试验：化学敷料类 PCD，样品和标准测试包中的化学指示物，在 B1、B2、B3 循环中均合格，则判定成功试验合格。生物敷料类 PCD，样品和标准测试包中的生物指示物，在 B1、B2、B3 循环测试后，培养结果全部阴性，则判定成功试验合格。

b) 修改程序试验：化学敷料类 PCD，在 B1、B2、B3 循环测试后，样品中的化学指示物均未达终点色，标准测试包中的化学指示物达终点色，则判定修改程序试验合格。生物敷料类 PCD，在 B1、B2、B3 循环测试后，样品中的生物指示物阳性，标准生物测试包中的生物指示物阴性，则判定修改程序试验合格。

c) 失败试验：化学敷料类 PCD，样品和标准测试包中的化学指示物，在 B1、B2、B3 循环测试后，均未达终点色，则判定失败试验合格。生物敷料类 PCD，样品中生物指示物和放在标准测试包中的生物指示物，在 B1、B2、B3 循环测试后，培养结果全部阳性，则判定失败试验合格。

5.6.6.1.7 稳定性试验

产品在使用说明书规定的储存条件下，保存至规定时间（至少半年）后，取包装完好的产品，按上述方法进行检测。若结果符合上述要求，则判定产品在该保存期内性能稳定。

5.6.6.2 压力蒸汽灭菌管腔类 PCD 产品

5.6.6.2.1 目的

在饱和蒸汽作用下，比对压力蒸汽灭菌管腔类PCD产品与对比管腔的抗力,以判定压力蒸汽灭菌管腔类PCD产品是否合格。

5.6.6.2.2 测试项目

a) 生物指示物的鉴定：符合压力蒸汽灭菌生物指示物的要求。

b) 化学指示物的鉴定：符合五类化学指示物的要求。

c) 管腔类 PCD 的比对试验：在低大气压循环下，管腔类 PCD 与对比管腔进行抗力对比测试。低大气压循环步骤如下：

1) 压力抽至 20 kPa（压力变化速率不应超过 50 kPa/min）；

2) 输入蒸汽使压力达到 95 kPa（压力变化速率不应超过 50 kPa/min）；

3) 重复步骤 1）、2）五次以上；

4) 输入蒸汽达到暴露压力（压力变化速率在 25 kPa/min～50 kPa/min 之间，压力值应在蒸汽暴露装置所允许的压力范围之内）；

5) 维持暴露时间；

6) 降压至 10 kPa；

7) 输入空气至大气压。

5.6.6.2.3 仪器设备或试剂材料

仪器设备或试剂材料如下：

a) 测试仪器技术指标：时间控制以秒为单位；温度控制以 0.1 ℃ 为单位；暴露期柜室内温度误差 0～1.5 ℃；

b) 对比管腔：材质型号、长度和内径与样品模拟的管腔一致；

c) 电热恒温培养箱；

d) 温度压力测定仪：温度精确度 0.1 ℃、准确度±0.1 ℃；时间精确度 1 s、准确度±1 s；压力精确度 0.1 kPa、准确度 4 kPa～16 kPa 范围内，不超过±1.0 kPa，16 kPa～385 kPa 范围内，不超过±2.0 kPa。

5.6.6.2.4 试验分组

压力蒸汽灭菌管腔类PCD的鉴定试验分为成功试验、修改程序试验和失败试验三组。

成功试验：根据产品说明书规定合格的灭菌暴露温度和暴露时间运行低大气压循环，待测管腔类PCD和对比管腔中的指示物（生物或/和化学）均合格。

修改程序试验：根据产品说明书规定修改程序试验的灭菌暴露温度和暴露时间运行低大气压循环，待测管腔类PCD的指示物（生物或/和化学）均不合格，而对比管腔中的指示物（生物或/和化学）均合格。

失败试验：根据产品说明书规定失败的灭菌暴露温度和暴露时间运行低大气压循环，待测管腔类PCD和对比管腔中的指示物（生物或/和化学）均不合格。

5.6.6.2.5 操作步骤

a) 测试仪器的准备：开启设备电源开关，打开压缩气和电热蒸汽发生器开关，压缩气压力表显示数值 0.5 Mpa 左右，抗力仪夹层压力 0.2 MPa 左右，空锅状态运行预热程序，对测试仪器进行预热。

b) 将管腔类 PCD 和对比管腔并排放于测试仪器内。按上述要求分别进行成功试验、修改程序试验和失败试验。检测结束后，取出管腔类 PCD 和对比管腔内对应的化学或/和生物指示物，观察化学指示物的测试结果，对生物指示物按照使用说明书进行培养。

c) 成功试验、修改程序试验和失败试验分别重复 3 次。

5.6.6.2.6 结果判定

测定结果符合下述全部条件，则该产品判定合格。

a) 成功试验：化学管腔类 PCD，经低大气压循环测试后，样品和对比管腔中的化学指示物均达到终点色，则判定成功试验合格。生物管腔类 PCD，经低大气压循环测试后，样品中生物指示物和放在对比管腔中的生物指示物培养结果均为阴性，则判定成功试验合格。

b) 修改程序试验：化学管腔类 PCD，经低大气压循环测试后，样品中的化学指示物未达终点色，对比管腔中的化学指示物达终点色，则判定修改程序试验合格。生物管腔类 PCD，经低大气压循环测试后，样品中的生物指示物培养结果为阳性，对比管腔中的生物指示物培养结果为阴性，则判定修改程序试验合格。

c) 失败试验：化学管腔类 PCD，经低大气压循环测试后，样品和对比管腔中的化学指示物均未达终点色，则判定失败试验合格。生物管腔类 PCD，经低大气压循环测试后，样品和对比管腔中的生物指示物培养结果均为阳性，则判定失败试验合格。

5.6.6.2.7 重复使用稳定性试验

根据制造商推荐的使用次数，将管腔类PCD装置进行相应次数的灭菌暴露后，测试PCD管腔的密封性。

5.6.6.3 低温灭菌过程有效性监测用管腔类 PCD 的鉴定试验

5.6.6.3.1 目的

在环氧乙烷、过氧化氢气体等离子体（包括过氧化氢气体）、低温蒸汽甲醛等低温灭菌标准测试条件下，对比低温灭菌管腔类PCD与所代表的管腔类医疗器械的抗力，以证明其是否符合要求。

5.6.6.3.2 对指示物的要求

a) 与 PCD 组合使用的化学指示物应符合五类化学指示物的要求。

b) 与 PCD 组合使用的生物指示物应符合相关灭菌因子生物指示物的要求。

c) 待测 PCD 抗力应大于比对管腔的抗力。

5.6.6.3.3 仪器设备或试剂材料

仪器设备或试剂材料如下：

a) 环氧乙烷、过氧化氢气体等离子体（包括过氧化氢气体）和低温蒸汽甲醛灭菌检测仪器。

b) 比对用模拟管腔：材质、型号、长度和内径应与待测 PCD 管腔一致。

c) 电热恒温培养箱。

5.6.6.3.4 试验分组

试验时将待测PCD与比对用模拟管腔同时并排放置于相应的检测仪器中，分别进行成功试验、修改程序试验和失败试验，试验均重复3次。

成功试验：待测PCD与比对用模拟管腔在产品制造商规定成功试验测试周期暴露后，PCD和比对用模拟管腔中的指示物（生物或/和化学）均合格。

修改程序试验：待测PCD与比对用模拟管腔在产品制造商规定的修改程序试验测试周期暴露后，待测PCD中的指示物（生物或/和化学）不合格，而比对用模拟管腔中的指示物（生物或/和化学）合格。

失败试验：待测PCD与比对用模拟管腔在产品制造商规定的失败试验测试周期暴露后，PCD和比对用模拟管腔中的指示物（生物或/和化学）均不合格。

5.6.6.3.5 结果判定

测定结果符合下述全部条件，则该产品判为合格。

a) 成功试验：待测 PCD 与比对用模拟管腔中的生物指示物培养均阴性或化学指示物均达终点色。

b） 修改程序试验：待测 PCD 中生物指示物培养阳性或化学指示物未达终点色，而比对用模拟管腔中生物指示物培养呈阴性或化学指示物达终点色。

c） 失败试验：待测 PCD 与比对用模拟管腔中的生物指示物培养均阳性或化学指示物均未达终点色。

5.6.6.3.6 重复使用稳定性试验

根据制造商推荐的使用次数，将管腔类PCD装置进行相应次数的灭菌暴露后，测试PCD管腔的密封性。

5.7 灭菌医疗用品包装材料鉴定试验

5.7.1 理化性能鉴定

5.7.1.1 一般检查

5.7.1.1.1 在日光或良好的人工光源下检查，包装应无削弱其功能的洞孔、裂缝、撕裂、皱痕或会影响其功能的局部加厚或变薄。

5.7.1.1.2 包装内医疗用品应无未经保护的，可能会破坏包装的尖锐边缘或突出物。

5.7.1.2 质量测定

5.7.1.2.1 仪器设备

5.7.1.2.1.1 天平：精度 2 mg，测量精确度 0.5%。

5.7.1.2.1.2 切割机：精度 1.0%。

5.7.1.2.2 操作步骤

5.7.1.2.2.1 条件：在温度 23 ℃±1 ℃，相对湿度 50%±2%条件下进行。

5.7.1.2.2.2 取样：取 5 份样品，按每片 100 mm×100 mm 或面积 100 cm^2制备样片，每份样品切 4 片样片，共 20 个样片。

5.7.1.2.2.3 称量：称取每片样片质量，以克（g）为单位，保留三位有效数字。

5.7.1.2.2.4 计算：计算平均值与标准差。

$$M（g/m^2） = m \times 10000 / A \quad (19)$$

式中：

M——质量，单位为克每平方厘米（g/m^2）；

m——样片平均质量，单位为克（g）；

A——样片平均面积，单位为平方厘米（cm^2）。

5.7.1.2.3 结果报告

在一定温湿度条件下，每平方米样片的平均质量（g）。

5.7.1.2.4 结果评价

包装材料单位面积的平均质量，应在产品标准的±5%范围内。纸质材料的平均质量应≥56 g/m^2。

5.7.1.2.5 注意事项

在制备样片时避免用手直接接触。

5.7.1.3 pH 值测定

5.7.1.3.1 仪器设备或试剂材料

5.7.1.3.1.1 纯化水或纯化水：电导率≤0.1 mS/m。

5.7.1.3.1.2 标准缓冲溶液：pH 值 4.0，6.9，9.2。

5.7.1.3.1.3 pH 计：分辨率 0.05。

5.7.1.3.1.4 回流冷凝器。

5.7.1.3.2 操作步骤

称取样品2 g，精确到0.1 g。粉碎成约5 mm×5 mm大小，放入带塞细颈玻璃烧瓶内。将100 mL 纯化水加入另一同样带塞细颈玻璃烧瓶内，连接回流冷凝器，将水加热到接近沸腾。移去冷凝器，将接近沸腾的水加入含有样品的烧瓶内，连接冷凝器慢煮1 h。用冷凝器快速冷却至20 ℃～25 ℃。让纤维沉淀，并轻轻将抽提液倒入小烧杯内，测定pH值。

5.7.1.3.3 结果报告

取两次测定结果的平均值。

5.7.1.3.4 结果评价

包装材料水提取物的 pH 值应在 5.0～8.0 范围内。

5.7.2 灭菌因子穿透性能与对包装标识的影响

5.7.2.1 灭菌条件

根据产品使用说明选择相应的灭菌条件，以下灭菌参数可作为参考。

a) 压力蒸汽灭菌：121 ℃，20 min；134 ℃，4 min；

b) 环氧乙烷灭菌：灭菌条件符合生产厂家说明书的要求；

c) 过氧化氢气体等离子体灭菌：灭菌条件符合生产厂家说明书的要求。

5.7.2.2 样品数量

每种参数需10个样品，每个样品包装内放置 1 个相应的生物指示剂。

5.7.2.3 操作要求

5.7.2.3.1 压力蒸汽灭菌：按 GB 18278 进行。

5.7.2.3.2 环氧乙烷灭菌：灭菌条件符合生产厂家说明书的要求。

5.7.2.3.3 过氧化氢气体等离子体灭菌：灭菌条件符合生产厂家说明书的要求.

5.7.2.4 结果报告

5.7.2.4.1 灭菌因子穿透性能：包装内生物指示剂灭菌情况。

5.7.2.4.2　灭菌因子对包装标识的影响：外包装及其标识的外观。

5.7.2.5　结果评价

5.7.2.5.1　灭菌因子穿透性能：在灭菌条件下，包装内生物指示剂应无菌生长。

5.7.2.5.2　灭菌因子对包装标识的影响：外包装及其标识不因灭菌而变色或变得难以辨认。

5.7.3　微生物屏障性能鉴定

5.7.3.1　灭菌条件

必须在灭菌后进行微生物屏障性能检测，根据产品使用说明选择相应的灭菌条件，以下灭菌参数可作参考。

a)　压力蒸汽灭菌：121 ℃，20 min～30 min；134 ℃，4 min～6 min；

b)　环氧乙烷灭菌：灭菌条件符合生产厂家说明书的要求；

c)　过氧化氢气体等离子体灭菌：灭菌条件符合生产厂家说明书的要求。

5.7.3.2　不透气性包装材料渗透试验—染色渗透试验

5.7.3.2.1　试剂材料

5.7.3.2.1.1　海绵：由醋酸纤维海绵制取，其尺寸为 110 mm×75 mm×32 mm，用防水胶粘剂与尺寸为 110 mm×75 mm×12 mm 的钢板粘结，其总质量控制在 800 g±50 g。

5.7.3.2.1.2　平滑玻璃。

5.7.3.2.1.3　吸纸：白色中快吸滤纸或色层分析纸。

5.7.3.2.1.4　染色液：1%苋菜红水溶液，见附录 A。

5.7.3.2.1.5　浅盘：深度不小于 15 mm，最小面积为 135 mm×95 mm。

5.7.3.2.1.6　样片：面积 250 mm×105 mm，共 5 个样片。

5.7.3.2.2　操作步骤

5.7.3.2.2.1　取一块面积与样片相同的吸纸，放在玻璃表面，将待测试料的内表面与吸纸接触。

5.7.3.2.2.2　将染色液倒入浅盘中，使海绵在浅盘内滞留 1 min，取出海绵，靠着盘的边把多余的液体挤除。

5.7.3.2.2.3　将海绵放在样片上，保证海绵的边缘在样片边部之内（且距边部不少于 15 mm），并静置 2 min。

5.7.3.2.2.4　取走海绵，检查吸收纸被沾染情况。

5.7.3.2.3　结果报告

报告被沾染的吸收纸的样片数量。

5.7.3.2.4　结果评价

所有被检吸收纸上不沾染颜料为合格。

5.7.3.3　透气性包装材料微生物屏障试验

5.7.3.3.1 湿性条件下微生物屏障性能

5.7.3.3.1.1 仪器设备或试剂材料

仪器设备或试剂材料如下：

a) 试验微生物：金黄色葡萄球（ATCC 6538）；

b) 培养基：血琼脂、营养琼脂、营养肉汤；

c) 真空干燥箱：100 mbar；

d) 样片：面积 50 mm×50 mm，至少 5 个样片，如需复测另加 20 个样片。

5.7.3.3.1.2 操作步骤

操作步骤如下：

a) 将灭菌后样片于 100 mbar 真空干燥 10 min；

b) 将金黄色葡萄球菌接种于 6 mL 营养肉汤培养基内，取 36 ℃±1 ℃培养 16 h 后的菌悬液作活菌计数；

c) 将预处理的样片外表面朝上平铺于无菌平皿内；

d) 用含 10^7 CFU/mL 的金黄色葡萄球菌悬液滴到样片上，互不接触滴 5 滴，每滴滴染 100 μL；

e) 将染菌样片在温度 20 ℃～25 ℃，相对湿度 40%～50%条件下放置使其干燥。从染菌至检测最长时间不超过 6 h；

f) 将染菌样片平铺于血琼脂培养基表面，完全接触，染菌面朝上，5 s～6 s 后将样片移开；

g) 将血琼脂培养基于 36 ℃±1 ℃培养 16 h～24 h 进行菌落计数。

5.7.3.3.1.3 结果报告

每个血琼脂培养基平板上生长的菌落数以及5个平板上生长的菌落总数。

5.7.3.3.1.4 结果评价

a) 5 个培养基平板上均无菌生长，表明试验菌不能透过样片，以此为合格。

b) 如 5 个培养基平板上生长的菌落总数≤5 CFU，则用 20 个样片复测，在 20 个平板上生长的菌落数≤5 CFU 为合格。

5.7.3.3.2 干性条件下微生物屏障性能

5.7.3.3.2.1 仪器设备或试剂材料

a) 试验瓶：250 mL 有盖玻璃瓶，螺旋盖带有 34 mm 的孔：密封垫圈内径 34 mm，由聚四氟乙烯（PTFE）或带 PTFE 覆盖层材料制成。

b) 试验微生物：枯草杆菌黑色变种（ATCC 9372）芽胞。

c) 培养基：营养琼脂培养基。

d) 样片：圆形，直径 42 mm，共 10 个。

e) 其他：铝箔、滤纸。

5.7.3.3.2.2 操作步骤

a) 取 100 mL 含 10^6 CFU/mL 芽胞的乙醇（96%）悬液与 100 g 无菌石英粉（0.04 mm～0.15 mm）混合，50 ℃干燥 16 h，备用；

b) 在试验瓶内加入 20 mL 营养琼脂培养基并使凝固；

c) 将试验瓶用铝箔或其他材料包裹，于 121 ℃灭菌 20 min，试验前在无菌条件下移去包裹；

d) 在无菌条件下将 10 个经灭菌处理的样片分别置于试验瓶两个密封垫圈之间，并用螺旋盖适当压紧，使样片被密封垫圈紧压在瓶沿上；

e) 称取 0.25 g 染菌石英粉均匀撒于样片上；

f) 将试验瓶放入培养箱加热到 50 ℃，取出放入冷藏箱降至 10 ℃。如此为 1 次，重复 5 次；

g) 将试验瓶置 36 ℃±1 ℃培养 24 h，进行活菌计数。

5.7.3.3.2.3 结果报告

每个样片透过的菌落数及10个样片透过的菌落总数。

5.7.3.3.2.4 结果评价

每个样片透过的菌落数≤5 CFU，10个样片透过的菌落总数≤15 CFU，判为合格。

5.7.4 无菌性保持试验

5.7.4.1 仪器设备或试剂材料

5.7.4.1.1 样本：化学指示包装袋、棉布、无纺布、皱纹纸、灭菌硬质容器。

5.7.4.1.2 灭菌器：过氧化氢气体等离子体低温灭菌器、压力蒸汽灭菌器、环氧乙烷灭菌器（经灭菌试验鉴定合格）。

5.7.4.1.3 采样液：无菌检验用洗脱液（以下简称洗脱液）。

5.7.4.1.4 不锈钢载体：圆片直径为 1.2 cm，经脱脂灭菌后备用。

5.7.4.1.5 培养基：需氧-厌氧菌培养基、无菌试验用真菌培养基（下简称真菌培养基）

5.7.4.1.6 培养箱：20 ℃～25 ℃恒温培养箱、30 ℃～35 ℃恒温培养箱。

5.7.4.1.7 试验菌株：藤黄微球菌（CMCC（B）28001）；生胞梭菌（CMCC（B）64941）；白色念珠菌（CMCC（F）98001）；金黄色葡萄球菌（CMCC（B）26003）。

5.7.4.2 试验方法

5.7.4.2.1 培养基性能鉴定

5.7.4.2.1.1 需氧-厌氧培养基培养性能检查：接种 1.0 mL 含 10 个以下的藤黄微球菌（CMCC（B）28001）菌悬液，置 30 ℃～35 ℃培养 24 h 后，应生长良好。另接种 1.0 mL 含 50 个以下的生胞梭菌（CMCC（B）64941）菌悬液，置同样条件，亦应生长良好。

5.7.4.2.1.2 真菌培养基培养性能检验：接种 1.0 mL 含 50 CFU 以下的白色念珠菌（CMCC（F）98001）菌悬液，置 20 ℃～25 ℃ 培养 24 h 后应生长良好。

5.7.4.2.1.3 培养基无菌检查：于无菌检查前 3 d，将未种菌的需氧-厌氧菌培养基与真菌培养基分别置 30 ℃～35 ℃与 20 ℃～25 ℃条件下，培养 72 h 后应无菌生长。

5.7.4.2.1.4 阳性对照菌悬液制备：于无菌试验前一天，取金黄色葡萄球菌（CMCC（B）26003）普通琼脂斜面新鲜培养物1接种环，接种于需氧-厌氧菌培养基内，在30 ℃～35 ℃培养16 h～18 h备用。用时以无菌生理盐水稀释至1:10^6。

5.7.4.2.2 样本制备

化学指示包装袋:将化学指示包装袋内放入5片不锈钢载体作为试验用样本，共计50个进行灭菌，每个放置时间应测试50个样本。

棉布、无纺布、皱纹纸：按照使用说明的要求将棉布、无纺布或皱纹纸采用双层包装包好弯盘（例如长×宽：180 mm×110 mm），每个弯盘内放入5片不锈钢载体，共计50个进行高压灭菌，每个放置时间应测试50个样本。

灭菌硬质容器：将灭菌硬质容器放入5片不锈钢载体作为试验用样本，共计10个进行灭菌，每个放置时间应测试10个样本。

5.7.4.2.3 样本放置

将灭菌后的试验样本按序编号后放于实验室中，室温条件下每隔7 d记录温、湿度情况。放置时间在试验开始和产品使用说明书规定的有效期时（如选择加速老化法，可依据样品放置条件进行设定），分别对50个包装袋内不锈钢载体进行样本培养。

5.7.4.2.4 样本培养

在5级洁净实验室内，以无菌作方式打开包装。用镊子夹起不锈钢载体各放入1支装有15 mL的需氧-厌氧菌培养基和真菌培养基的试管中，每个包装样本各放入3支需氧-厌氧菌培养基和2支真菌培养基试管，作为试验组样本，其中1支需氧-厌氧菌培养基作为阳性对照组样本。

5.7.4.2.5 对照组样本

取1接种环金黄色葡萄球菌普通斜面新鲜培养物，接种于需氧-厌氧菌培养基内，30 ℃～35 ℃培养16 h，用无菌生理盐水稀释至1:10^6。吸取1 mL菌液接种于1支加有样本的需氧-厌氧菌培养基内作为阳性对照组样本。

用同批次试验的培养基作为阴性对照组样本。

5.7.4.2.6 注意事项

将试验组需氧-厌氧菌培养基、阳性对照组和阴性对照组样本同时放置30 ℃～35 ℃温箱中培养5 d，观察培养记录结果。将试验组真菌培养管、阳性对照组和阴性对照组样本同时放置20 ℃～25 ℃温箱中培养7 d，观察培养记录结果。

5.7.4.2.7 评价规定

阳性对照组应有菌生长，阴性对照组应无菌生长。经50个样品测试的需氧-厌氧菌培养管及真菌培养管均无菌生长，未检出细菌和真菌，无菌检验鉴定合格。

5.7.5 产品有效期鉴定

5.7.5.1 样本存放

取足量包装完好的样品，在产品使用说明书规定的储存条件下储存至有效期（保质期）进行鉴定试验。

5.7.5.2　样品放置条件

5.7.5.2.1　自然留样法

将样片放置室温下，模拟室内货架贮存，每周记录湿度与温度，按产品使用说明书规定的有效期进行检测。

5.7.5.2.2　加速老化法

把样片置于温度为60 ℃～65 ℃、相对湿度为80%±5%的干燥器内7 d后进行检测，相当于室温下放置180 d。

5.7.5.3　鉴定项目

5.7.5.3.1　化学指示色块按 5.6.3.4 中第一类指示物的检测方法进行鉴定试验。

5.7.5.3.2　微生物屏障性能测试按 5.7.3.3 微生物屏障性能鉴定方法。

5.7.5.3.3　无菌性保持：参照 5.7.4。

5.8　抗（抑）菌产品鉴定试验

抗（抑）菌产品的鉴定试验见附录B。

6　理化检测技术

6.1　消毒产品原料或单方制剂的测定方法

6.1.1　仪器设备

6.1.1.1　酒精比重计。

6.1.1.2　大气采样器。

6.1.1.3　天平（感量 0.1 mg）。

6.1.1.4　分光光度计。

6.1.1.5　酸度计。

6.1.1.6　臭氧分析仪。

6.1.1.7　气相色谱仪。

6.1.1.8　高效液相色谱仪。

6.1.1.9　原子荧光分光光度计。

6.1.1.10　原子吸收分光光度计。

6.1.2　原料或单方制剂含量测定方法

6.1.2.1　有效氯含量的测定

6.1.2.1.1　原理

在酸性溶液中，含氯消毒剂中的有效氯氧化溶液中的碘化钾产生等摩尔的碘，用硫代硫酸钠标准溶液滴定释放出的碘，根据硫代硫酸钠标准溶液的用量，计算有效氯的含量。

6.1.2.1.2 试剂配制

配制2 mol/L硫酸、100 g/L碘化钾与5 g/L淀粉等溶液；配制并标定0.1 mol/L硫代硫酸钠滴定液（见6.1.3.1）。

6.1.2.1.3 样品测定

精密吸取液体含氯消毒剂适量，使其相当于有效氯约0.6 g，置100 mL容量瓶中，加纯水至刻度，混匀。对固体含氯消毒剂，精密称取适量使其相当于有效氯约0.6 g，置烧杯中以纯水溶解，转入100 mL容量瓶中。称量杯及烧杯用纯水洗3次，洗液全部转入容量瓶。

向100 mL碘量瓶中加混匀的消毒剂稀释液10.0 mL，100 g/L碘化钾溶液10 mL和2 mol/L硫酸10 mL。此时，溶液出现棕色。盖上盖并振摇混匀后加纯化水数滴于碘量瓶盖缘，置暗处5 min。打开盖，让盖缘纯水流入瓶内。用硫代硫酸钠滴定液（装于25 mL滴定管中）滴定游离碘，边滴边摇匀。待溶液呈淡黄色时加入5 g/L淀粉溶液10滴，溶液立即变蓝色。继续滴定至蓝色消失，记录用去的硫代硫酸钠滴定液总量，同时做空白试验。重复测2次，取2次平均值进行以下计算。

6.1.2.1.4 计算公式

因1 mol/L硫代硫酸钠滴定液1 mL相当于0.03545 g有效氯，按公式（20）、公式（21）计算有效氯含量：

固体样品

$$\omega(\%) = \frac{c \times V_{st} \times 0.03545}{m} \times 100\% \quad \cdots\cdots (20)$$

液体样品

$$\rho(g/L) = \frac{c \times V_{st} \times 0.03545}{V} \times 1000 \quad \cdots\cdots (21)$$

式中：

ω——有效氯含量；

ρ——有效氯含量，单位为克每升（g/L）；

c ——硫代硫酸钠滴定液浓度，单位为摩尔每升（mol/L）；

V_{st}——滴定用去硫代硫酸钠滴定液体积（减空白），单位为毫升（mL）；

m ——碘量瓶中所含消毒剂原药质量，单位为克（g）；

V ——碘量瓶中含液体消毒剂原液体积，单位为毫升（mL）。

6.1.2.1.5 注意事项

本方法适合测定各种含氯消毒剂中的有效氯。液体样品及可溶性样品可按产品标示的有效氯含量，吸取或称取适量于100 mL容量瓶中用水稀释至刻度，混匀。对于固体样品，将具有代表性的固体样品于研钵中研匀，用减量法称取适量，置于100 mL烧杯中，加少量水，将样品调成糊状。将样品全部转移至100 mL容量瓶中，稀释到刻度，混匀。例如：漂粉精（有效氯含量60%～70%）和漂白粉（有效氯含量25%～30%）的取样量分别为1 g和2 g。

6.1.2.2 有效碘含量的测定

6.1.2.2.1 原理

在弱酸性溶液中，含碘消毒剂中的游离碘定量的与硫代硫酸钠发生反应，根据硫代硫酸钠标准溶液的用量，计算有效碘的含量。

6.1.2.2.2 试剂配制

配制5 g/L淀粉溶液；乙酸（36%）；配制并标定0.1 mol/L硫代硫酸钠滴定液（见6.1.3.1）。

6.1.2.2.3 样品测定

精密取含碘消毒剂适量，使其相当于有效碘约0.25 g，置100 mL容量瓶中并加入乙酸5滴。用0.1 mol/L硫代硫酸钠滴定液滴定，边滴边摇匀。待溶液呈淡黄色时加入5 g/L淀粉溶液10滴（溶液立即变蓝色），继续滴定至蓝色消失，记录用去的硫代硫酸钠滴定液总量，同时做空白试验。重复测2次，取2次平均值进行以下计算。

6.1.2.2.4 计算公式

因1 mol/L硫代硫酸钠滴定液1 mL相当于0.1269 g有效碘，按公式（22）、公式（23）计算有效碘含量：

$$\omega(\%) = \frac{c \times V_{st} \times 0.1269}{m} \times 100\% \cdots\cdots (22)$$

$$\rho(g/L) = \frac{c \times V_{st} \times 0.1269}{V} \times 1000 \cdots\cdots (23)$$

式中：

ω——有效碘含量；

ρ ——有效碘含量，单位为克每升（g/L）；

c ——硫代硫酸钠滴定液浓度，单位为摩尔每升（mol/L）；

V_{st}——滴定用去硫代硫酸钠滴定液体积（减空白），单位为毫升（mL）；

m ——碘量瓶中所含消毒剂原药的质量，单位为克（g）；

V ——碘量瓶中含液体消毒剂原液体积，单位毫升（mL）。

6.1.2.2.5 注意事项

本方法适用于测定含碘消毒剂中的有效碘。当消毒剂的酸性很强或含醇量较高时，不宜使用淀粉指示剂。此时，可直接观察碘的黄色消失以判断终点（如测定碘酊、碘甘油等碘制剂时，直接用硫代硫酸钠滴定至溶液无色即可认为到达终点）。

6.1.2.3 过氧乙酸（$C_2H_4O_3$）含量的测定

6.1.2.3.1 原理

由于反应不完全或放置期间的分解，过氧乙酸溶液中含有部分过氧化氢。在酸性条件下，高锰酸钾不与过氧乙酸作用，仅与过氧化氢起氧化还原反应，使其分解掉，反应式为：

$$2KMnO_4+3H_2SO_4+5H_2O_2 = 2MnSO_4+K_2SO_4+5O_2\uparrow+8H_2O$$

故在加入碘化钾前，先滴加高锰酸钾溶液至微粉色，以消除过氧化氢的干扰。上述氧化还原反应进行较慢，可用硫酸锰为催化剂，以加速反应的进行。碘化钾与过氧乙酸反应产生等摩尔碘，用硫代硫酸钠标准溶液滴定释放出的碘，根据硫代硫酸钠的用量，计算过氧化物的含量。反应式为：

$$CH_3COOOH+2KI+2H_2SO_4 = 2KHSO_4+H_2O+I_2+ CH_3COOH$$

$$I_2+2Na_2S_2O_3 = 2NaI+Na_2S_4O_6$$

6.1.2.3.2 试剂配制

配制2 mol/L硫酸、100 g/L碘化钾、0.01 mol/L高锰酸钾、100 g/L硫酸锰、30 g/L钼酸铵与5 g/L淀粉；配制并标定0.05 mol/L硫代硫酸钠滴定液（见6.1.3.1）。

6.1.2.3.3 样品测定

精密吸取样品适量，使其相当于过氧乙酸约0.7 g，于100 mL容量瓶中用纯水稀释至刻度，混匀。向100 mL碘量瓶中精密加入混匀的过氧乙酸稀释液5.0 mL，加2 mol/L硫酸5 mL，100 g/L硫酸锰3滴，摇匀并用0.01 mol/L高锰酸钾溶液滴定至溶液呈粉红色。随即加100 g/L碘化钾溶液10 mL与30 g/L钼酸铵3滴，摇匀并用0.05 mol/L硫代硫酸钠滴定液（装于25 mL滴定管中）滴定至淡黄色。加入5 g/L淀粉溶液3滴（溶液立即变蓝色），继续用硫代硫酸钠滴定至蓝色消失，记录硫代硫酸钠滴定液的总用量，同时做空白试验。重复测2次，取2次平均值进行以下计算。

6.1.2.3.4 计算公式

因1 mol/L硫代硫酸钠1 mL相当于0.03803 g过氧乙酸，按公式（24）计算过氧乙酸含量：

$$\rho(g/L) = \frac{c\times V_{st}\times 0.03803\times 100}{V\times V_0}\times 1000 \quad \cdots\cdots (24)$$

式中：

ρ——过氧乙酸含量，单位为克每升（g/L）；

c ——硫代硫酸钠滴定液的浓度，单位为摩尔每升（mol/L）；

V_{st}——滴定中用去的硫代硫酸钠滴定液的体积（减空白），单位为毫升（mL）；

V ——碘量瓶中所含过氧乙酸样液体积，单位为毫升（mL）；

V_0——取样量，单位为毫升（mL）。

6.1.2.3.5 注意事项

本方法适用于测定过氧化物类消毒剂中的过氧乙酸有效成分。滴加高锰酸钾溶液至微粉色，以消除过氧化氢的干扰。试验时可根据实际浓度，先用高浓度的高锰酸钾溶液滴定，再用低浓度高锰酸钾滴定，否则消耗高锰酸钾溶液的量过多。实验中，加碘化钾和钼酸铵后放置8min后，实验平行结果较好。过氧乙酸性质不稳定，易分解，高温保存时间短，应贮存在阴凉通风处。贮存容器应以聚乙烯桶或瓶为宜。过氧乙酸切勿与其他药品、有机物质随意混合，以免剧烈分解甚至爆炸。

6.1.2.4 过氧化氢（H_2O_2）含量的测定

6.1.2.4.1 原理

在酸性溶液中，高锰酸钾可氧化消毒剂中的过氧化氢，根据高锰酸钾标准溶液的用量，计算过氧化氢的含量。其反应式为：

$2KMnO_4+3H_2SO_4+5H_2O_2 = 2MnSO_4+K_2SO_4+5O_2\uparrow+8H_2O$

6.1.2.4.2 试剂配制

配制2 mol/L硫酸与100 g/L硫酸锰等溶液；配制并标定0.02 mol/L高锰酸钾滴定液（见6.1.3.3）。

6.1.2.4.3 样品测定

精密吸取样品适量，使其相当于过氧化氢约0.3 g，于100 mL容量瓶中用纯水稀释至刻度，混匀。取过氧化氢稀释液10.0 mL，置100 mL碘量瓶中，加入2 mol/L硫酸20 mL与100 g/L硫酸锰3滴，摇匀。用0.02 mol/L高锰酸钾滴定液（装于25 mL滴定管中）滴定至溶液呈粉红色，记录高锰酸钾滴定液用量。重复测2次，取2次平均值进行以下计算。

6.1.2.4.4 计算公式

因1 mol/L高锰酸钾滴定液1mL相当于0.08505 g过氧化氢，故可按公式（25）计算过氧化氢含量：

$$\rho(g/L) = \frac{c\times V_{st}\times 0.08505\times 100}{V\times V_0}\times 1000 \quad\cdots\cdots(25)$$

式中：

ρ——过氧化氢含量，单位克每升（g/L）；

c ——高锰酸钾滴定液的浓度，单位为摩尔每升（mol/L）；

V_{st}——高锰酸钾滴定液体积，单位为毫升（mL）；

V ——碘量瓶中所含过氧化氢样液体积，单位为毫升（mL）；

V_0——取样量，单位为毫升（mL）。

6.1.2.5 臭氧（O_3）含量的测定

6.1.2.5.1 第一法： 碘量法

6.1.2.5.1.1 原理

在酸性溶液中，臭氧与碘化钾反应，产生等摩尔的碘，用硫代硫酸钠标准溶液滴定释放出的碘，根据硫代硫酸钠标准溶液的用量，计算样品中臭氧的含量。反应式为：

$O_3+2KI+2H_2SO_4 = 2K_2SO_4+H_2O+I_2+ O_2\uparrow$

$I_2+2Na_2S_2O_3 = 2NaI+Na_2S_4O_6$

6.1.2.5.1.2 试剂配制

配制3 mol/L硫酸、200 g/L碘化钾与5 g/L淀粉等溶液；配制并标定0.05 mol/L硫代硫酸钠滴定液（见6.1.3.1）。

6.1.2.5.1.3 采样

检测臭氧水（臭氧水溶液）浓度时，精密吸取样本100.0 mL～300.0 mL（浓度较低，但不低于10 mg/L时，取400.0 mL）置于500 mL带塞锥形瓶中，加200 g/L碘化钾溶液20 mL，混匀。再加3 mol/L硫酸5 mL，瓶口加塞，静置5 min。取样涉及到水流量时，水流量应按企业使用说明书设定。

检测臭氧气体浓度时，将采集的样品吸收液（纯水350 mL与200 g/L碘化钾溶液20 mL）装于500 mL带塞锥形瓶中，从臭氧发生器排气管处采臭氧气体5 L以上，加3 mol/L硫酸5 mL，瓶口加塞，静置5 min。

6.1.2.5.1.4 样品测定

上述两种样品均用0.05 mol/L硫代硫酸钠滴定液滴定至溶液呈淡黄色时加5 g/L淀粉溶液数滴，继续滴定至无色。记录用去硫代硫酸钠滴定液总量，并将滴定结果用空白试验校正。重复测定2次，取2次测试平均值计算臭氧浓度。

6.1.2.5.1.5 计算公式

因1 mol/L硫代硫酸钠滴定液1 mL相当于24.00 mg臭氧，故臭氧含量可按公式（26）计算：

$$\rho(mg/L)=\frac{c\times V_{st}\times 24.00}{V} \quad (26)$$

式中：

ρ——臭氧含量，单位为毫克每升（mg/L）；

c ——硫代硫酸钠滴定液的浓度，单位为摩尔每升（mol/L）；

V_{st} ——硫代硫酸钠滴定液消耗体积（减空白），单位为毫升（mL）；

V ——臭氧水或其气体采样体积，单位为升（L）。

6.1.2.5.1.6 注意事项

本方法适用于测定过氧化物类消毒剂中的臭氧有效成分或臭氧发生器产生的臭氧气体的含量。

6.1.2.5.2 第二法：紫外线吸收法

6.1.2.5.2.1 原理

臭氧对波长λ=254 nm紫外光吸收系数最大，在此波长下紫外光通过臭氧层会产生衰减，符合朗伯-比尔（Lambert-Beer）定律，见公式（27）：

$$I=I_0-K\times L\times C \quad (27)$$

式中：

I ——光束穿透臭氧后的光强度；

I_0——无臭氧存在时入射光强度；

K ——臭氧对紫外光的吸收系数；

L ——臭氧样品池光程长度；

C ——臭氧浓度。

根据该公式，在K、L值已知条件下，通过检测I/I_0值即可测出臭氧浓度值。

6.1.2.5.2.2 测定

按照应用分为检测空气臭氧和检测水溶臭氧两种。按照仪器使用说明书操作。仪器在使用前应经过国家授权的计量单位检定合格后方可使用。

6.1.2.6 二氧化氯（ClO_2）含量的测定

6.1.2.6.1 第一法： 五步碘量法

6.1.2.6.1.1 适用范围

本方法适用于由亚氯酸盐、氯酸盐为原料制成的二氧化氯消毒剂。用五步碘量法测定消毒剂中二氧化氯，同时还可测定消毒剂中的氯气、亚氯酸根离子、氯酸根离子的含量。本方法最低检出质量浓度为0.1 mg/L。

6.1.2.6.1.2 原理

利用不同pH条件下ClO_2、Cl_2、ClO_2^-、ClO_3^-分别与I^-反应来测定各响应物质的含量。反应方程式如下：

$Cl_2+2I^-=I_2+2Cl^-$ (pH =7， pH ≤2， pH <0.1)

$2ClO_2+2I^-=I_2+2ClO^-$ (pH=7)

$2ClO_2+10I^-+8H^+=5I_2+2Cl^-+4H_2O$ (pH≤2， pH <0.1)

$ClO_2^-+4I^-+4H^+=2I_2+Cl^-+2H_2O$ (pH ≤2， pH <0.1)

$ClO_3^-+6I^-+6H^+=3I_2+Cl^-+3H_2O$ (pH <0.1)

然后用硫代硫酸钠作滴定剂，分步滴定反应产生的I_2。

试剂如下：

a) 分析中所用试剂均为分析纯，用水为无氧化性氯的纯水；

b) 硫代硫酸钠标准溶液（0.1 mol/L）：配制并标定（见6.1.3.1）；

c) 硫代硫酸钠标准溶液（0.01 mol/L）：吸取10.0 mL b）中硫代硫酸钠溶液（0.1 mol/L）于100 mL容量瓶中，用纯水定容至刻度。临用时现配；

d) 2.0 mol/L硫酸溶液；

e) 100 g/L碘化钾溶液：称取10 g碘化钾溶于100 mL纯水中，储于棕色瓶中，现用现配；

f) 饱和磷酸氢二钠溶液：用十二水合磷酸氢二钠与纯水配成饱和溶液；

g) pH=7磷酸盐缓冲溶液：溶解25.4 g无水KH_2PO_4和216.7 g $Na_2HPO_4·12H_2O$于800 mL纯水中，用纯水稀释成1000 mL；

h) 50 g/L溴化钾溶液：溶解5 g溴化钾于100 mL纯水中，储于棕色瓶中，每周重配一次；

i) 淀粉溶液：5 g/L。

6.1.2.6.1.3 仪器设备或试剂材料

仪器设备或试剂材料如下：

a) 25 mL酸式滴定管；

b) 50 mL、500 mL碘量瓶；

c) 高纯氮（99.999%）。

6.1.2.6.1.4 采样

采样方法如下：

a) 应用清洁干燥的棕色广口瓶采集样品。采样时，将发生器采样口的管子直接插到瓶底，打开采样口阀门，直至样品溶液溢出达采样瓶体积的一倍时，关闭阀门，立即盖上瓶盖；

b) 样品应密闭避光10 ℃以下低温保存，2 h内使用；如超过2 h，应重新采样；

c) 移取分析试样时，应将移液管插入样品瓶的底部取样，取样操作宜在通风橱中进行。

6.1.2.6.1.5 分析步骤

分析步骤如下：

a) 在 500 mL 的碘量瓶中加 200 mL 纯水，吸取 1.0 mL～20.0 mL 样品溶液于碘量瓶中，加入 10.0 mL 磷酸盐缓冲液，摇匀。同时准备 4 份样品重复试验；

b) 取上述 a）中含有样品的碘量瓶 2 个，分别加入 10 mL 碘化钾溶液，用硫代硫酸钠标准滴定液滴定至淡黄色时，加 1 mL 淀粉溶液，溶液呈蓝色，继续滴至蓝色刚好消失为止，记录读数为 A；

c) 在 b）滴定后的溶液中加入 10.0 mL 2.0 mol/L 硫酸溶液，置暗处 5 min，用硫代硫酸钠标准滴定液滴定至蓝色消失，记录读数为 B；

d) 取上述 a）中另外 2 个含有样品的碘量瓶，同时通入压力为 0.06 MPa 的高纯氮气，吹气时间 20 min～30 min。吹气完毕后，再向 2 个碘量瓶中分别加入 10 mL 碘化钾溶液、1 mL 淀粉溶液。若样品溶液为无色透明，则进行 e）操作；若溶液变为蓝色，则用硫代硫酸钠标准滴定液滴定至蓝色刚好消失为止；

e) 在 d）滴定后的溶液中加入 10.0 mL 2.0 mol/L 硫酸溶液，置暗处 5 min，用硫代硫酸钠标准滴定液滴定至蓝色消失，记录读数为 C；

f) 另取 2 个 50 mL 碘量瓶，分别加入 1 mL 溴化钾溶液和 20 mL 2.0 mol/L 硫酸溶液，混匀，吸取 1.0 mL～20.0 mL 样品溶液于碘量瓶中，立即塞住瓶塞并混匀，置于暗处反应 20 min，然后加入 10 mL 碘化钾溶液，剧烈震荡 5 s，立即转移至装有 25 mL 饱和磷酸氢二钠溶液的 500 mL 碘量瓶中，清洗 50 mL 碘量瓶并将洗液转移至 500 mL 碘量瓶中，使溶液最后体积在 200 mL～300 mL。用硫代硫酸钠标准滴定液滴定至淡黄色时，加 1 mL 淀粉溶液，继续滴至蓝色刚好消失为止。同时用蒸馏水作空白对照，得读数为 D=样品读数-空白读数。

6.1.2.6.1.6 计算公式

X_1、X_2、X_3、X_4分别按公式（28）、公式（29）、公式（30）、公式（31）计算：

$$X_1 = \frac{(B-C)\times c\times 16863}{V} \quad (28)$$

$$X_2 = \frac{C\times c\times 16863}{V} \quad (29)$$

$$X_3 = \frac{[D-(A+B)]\times c\times 13908}{V} \quad (30)$$

$$X_4 = \frac{[A-(B-C)\div 4]\times c\times 35450}{V} \quad (31)$$

式中：

X_1——ClO_2的浓度，单位为毫克每升（mg/L）；

X_2——ClO_2^-的浓度，单位为毫克每升（mg/L）；

X_3——ClO_3^-的浓度，单位为毫克每升（mg/L）；

X_4—— Cl_2的浓度，单位为毫克每升（mg/L）；

A.B.C.D ——上述各步中硫代硫酸钠标准溶液用量，单位为毫升（mL）；

c——硫代硫酸钠标准溶液的浓度，单位为摩尔每升（mol/L）；

V——二氧化氯溶液的样品体积，单位为毫升（mL）。

6.1.2.6.1.7 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

6.1.2.6.1.8 注意事项

操作时要防止阳光直射，准备工作要充分到位，尽可能缩短操作时间，以防止二氧化氯因挥发、分解而影响测定的准确性。

6.1.2.6.2 第二法：分光光度法

6.1.2.6.2.1 适用范围

本方法适用于浓度在10 mg/L～250 mg/L二氧化氯的测定，高浓度消毒剂可稀释后测定；最低检出浓度为10 mg/L。

6.1.2.6.2.2 原理

使用石英比色皿，采用紫外可见分光光度计在190 nm～600 nm波长范围内扫描，观察二氧化氯水溶液特征吸收峰，二氧化氯的最大吸收峰在360 nm处，可作为定性依据，但氯气在此也有弱吸收，产生干扰。应采用二氧化氯水溶液在430nm处的吸收，吸光度与二氧化氯浓度成正比，且氯气、ClO_2^-、ClO_3^-、ClO^-在此无吸收，可作为定量依据。

6.1.2.6.2.3 试剂或材料

试剂或材料如下：

a) 分析中所用试剂均为分析纯，用水为二次蒸馏水。

b) 二氧化氯标准贮备溶液：亚氯酸钠溶液与稀硫酸反应，可产生二氧化氯。氯等杂质通过亚氯酸钠溶液除去。用恒定的空气流将所产生的二氧化氯带出，并通入纯水中配成二氧化氯标准贮备溶液，在每次使用前，其浓度以碘量法测定。二氧化氯溶液应避光、密闭，并冷藏保存。

二氧化氯溶液制备方法（见图 9）：在 A 瓶（洗气瓶）中放入 300 mL 水，A 瓶封口上有二根玻璃管，一根玻璃管（L_1）下端插至近瓶底，上端与空气压缩机相接，另一根玻璃管（L_2）下端口离开液面 20 mm～30 mm，其另一端插入 B 瓶底部。B 瓶为高强度硼硅玻璃，滴液漏斗（E）下端伸至液面下，玻璃管（L_3）下端离开液面 20 mm～30 mm，另一端插入 C 瓶底部。溶解 10 g 亚氯酸钠于 750 mL 水内并倒入 B 瓶中，在分液漏斗中装有 20 mL 硫酸溶液（1+9，体积比）。C 瓶结构同 A 瓶一样，瓶内装有亚氯酸钠饱和溶液。玻璃管（L_4）插入 D 瓶底部，D 瓶为 2 L 硼硅玻璃收集瓶，瓶中装有 1500 mL 水，用以吸收所发生的二氧化氯，余气由排气管排出。D 瓶上的另一根玻璃管（L_5）下端离开液面 20 mm～30 mm，上端与环境空气相通而作为排气管，尾气由排气管排出。整套装置应放在通风橱内。

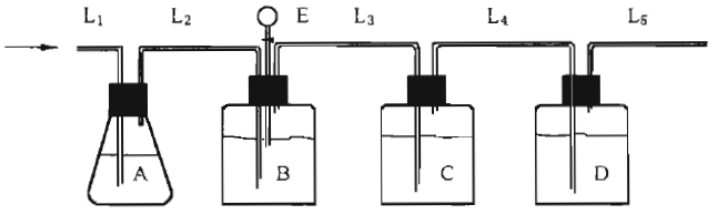


图9　ClO_2 发生吸收装置图

启动空气压缩机，使适量空气均匀通过整个装置。每隔 5 min 由分液漏斗加入 5 mL 硫酸溶液，在全部加完硫酸溶液后，空气流要持续 30 min。将 D 瓶中所获得的黄绿色二氧化氯标准溶液放于棕色玻璃瓶中，密封避光冷藏保存。二氧化氯浓度按本文件第二法（分光光度法）测定，其质量浓度为 250 mg/L～600 mg/L。

c)　二氧化氯标准溶液：取一定量新标定的二氧化氯标准贮备溶液，用二次蒸馏水稀释至所需浓度。

6.1.2.6.2.4　仪器设备

仪器设备如下：

a)　紫外可见分光光度计；

b)　石英比色皿（1 cm）；

c)　100 mL 容量瓶。

6.1.2.6.2.5　分析步骤

分析步骤如下：

a)　标准曲线的绘制：分别取 4.0 mL、10.0 mL、20.0 mL、40.0 mL、80.0 mL 和 100.0 mL 二氧化氯标准溶液（250 mg/L）于 100 mL 容量瓶中，加水至刻度，配成浓度为 10 mg/L、25 mg/L、50 mg/L、100 mg/L、200 mg/L 和 250 mg/L 的二氧化氯溶液，于 430 nm 处测定吸光度值，以二氧化氯浓度对吸光度值绘制标准曲线；

b)　样品测定：按照样品说明书配制二氧化氯消毒液或其稀释液，于 430 nm 测定其吸光度值，与标准曲线比较而定量；

c)　结果计算：消毒剂中二氧化氯的浓度按公式（32）计算：

$$\rho = \frac{\rho_1}{V_1/V_2} \quad (32)$$

式中：

ρ——消毒剂中二氧化氯的浓度，单位为毫克每升（mg/L）；

ρ_1——样品测定液中二氧化氯的浓度，单位为毫克每升（mg/L）；

V_1——所取消毒剂原液体积，单位为毫升（mL）；

V_2——定容体积，单位为毫升（mL）。

6.1.2.6.2.6　精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

6.1.2.7 有效溴含量的测定

6.1.2.7.1 原理

在酸性溶液中，含溴消毒剂中的有效溴氧化溶液中的碘化钾产生等摩尔的碘，用硫代硫酸钠标准溶液滴定释放出的碘，根据硫代硫酸钠标准溶液的用量，计算有效溴的含量。

6.1.2.7.2 试剂配制

碘化钾；配制硫酸溶液（1+8）与5 g/L淀粉指示剂；配制并标定0.1 mol/L硫代硫酸钠滴定液（见6.1.3.1）。

6.1.2.7.3 样品测定

精密称取样品适量，使其含有效溴约0.15 g，置于先加有125 mL水、2 g碘化钾的250 mL碘量瓶中，在电磁搅拌器上充分搅拌，使样品完全溶解，加硫酸溶液（1+8）20 mL。盖上盖并振摇混匀后加纯水数滴于碘量瓶盖缘，置暗处5 min。打开盖，让盖缘纯水流入瓶内。用硫代硫酸钠标准液滴定游离碘，边滴边摇匀。待溶液呈淡黄色时加入5 g/L淀粉溶液10滴，溶液立即变蓝色。继续滴定至蓝色消失，记录用去的硫代硫酸钠滴定液总量，同时做空白试验。重复测2次，取2次平均值进行以下计算。

6.1.2.7.4 计算公式

因1 mol/L硫代硫酸钠滴定液1 mL相当于0.07991 g有效溴，按公式（33）计算有效溴含量：

$$\omega(\%) = \frac{c \times V_{st} \times 0.07991}{m} \times 100\% \quad \cdots\cdots (33)$$

式中：

ω——有效溴含量；

c ——硫代硫酸钠标准溶液浓度，单位为摩尔每升（mol/L）；

V_{st} ——滴定用去硫代硫酸钠滴定液体积（减空白），单位为毫升（mL）；

m ——称取样品的质量，单位为克（g）。

6.1.2.7.5 注意事项

本方法适用于测定单一含溴消毒剂中的有效溴。

6.1.2.8 甲醛（CH_2O）含量的测定

6.1.2.8.1 原理

在碱性溶液中，甲醛被碘氧化为相应的酸，而后调节溶液的酸碱度至弱酸性，用硫代硫酸钠标准溶液滴定剩余碘，根据加入的碘和消耗的硫代硫酸钠的量，计算甲醛含量。有关反应式为：

$$2NaOH + I_2 = NaI + NaIO + H_2O$$

$$HCHO + NaIO + NaOH = HCOONa + NaI + H_2O$$

$$NaI + NaIO + HCl = NaCl + H_2O + I_2$$

$$I_2 + 2Na_2S_2O_3 = 2NaI + Na_2S_4O_6$$

6.1.2.8.2 试剂配制

配制50 g/L氢氧化钠溶液、稀盐酸溶液（1份盐酸加2份蒸馏水）与5 g/L淀粉溶液；配制并标定0.05 mol/L硫代硫酸钠滴定液（见6.1.3.1）与 0.05 mol/L碘滴定液（见6.1.3.2）。

6.1.2.8.3 样品测定

精密吸取样品适量，使其相当于甲醛约0.30 g，置于100 mL容量瓶中，用纯水稀释至刻度，混匀。向碘量瓶中加混匀的甲醛稀释液5.0 mL和50 g/L氢氧化钠溶液10 mL，再自50 mL滴定管缓慢加入0.05 mol/L碘滴定液约40 mL，边加边摇匀，至溶液呈鲜黄色，精确记下用去的碘滴定液毫升数。将碘量瓶盖上盖子并加纯水于盖缘。放置20 min后再加入25 mL稀盐酸，并用0.05 mol/L硫代硫酸钠滴定液（装入25 mL滴定管中）滴定至溶液呈淡黄色。加入5 g/L淀粉溶液10滴（溶液立即变蓝色），继续用硫代硫酸钠滴定液滴定至蓝色消失。记录硫代硫酸钠滴定液总用量。重复测2次，取2次的平均值进行以下计算。

6.1.2.8.4 计算公式

因1 mol/L碘滴定液1mL相当于0.01501 g甲醛，故可按公式（34）计算甲醛含量：

$$V_{IS} = \frac{c_{st} \times V_{st}}{c_I}$$

$$V_{IF} = V_I - V_{IS}$$

$$\rho(g/L) = \frac{c_I \times V_{IF} \times 0.01501}{V} \times 1000 \quad \cdots\cdots (34)$$

式中：

ρ——甲醛含量，单位为克每升（g/L）；

V_{IS} ——与硫代硫酸钠反应的碘滴定液体积，单位为毫升（mL）；

c_{st} ——硫代硫酸钠滴定液的浓度，单位为摩尔每升（mol/L）；

V_{st} ——硫代硫酸钠滴定液的体积，单位为毫升（mL）；

c_I ——碘滴定液浓度，单位为摩尔每升（mol/L）；

V_I ——加入的碘滴定液体积，单位为毫升（mL）；

V_{IF} ——与甲醛反应消耗的碘滴定液，单位为毫升（mL）；

V ——碘量瓶中所含甲醛样液体积，单位为毫升（mL）。

6.1.2.8.5 注意事项

本方法适用于测定单一甲醛消毒剂中的甲醛含量。

6.1.2.9 戊二醛（$C_5H_8O_2$）含量的测定

6.1.2.9.1 原理

戊二醛与三乙醇胺溶液反应，以盐酸羟胺中性溶液作指示剂，用硫酸标准溶液滴定剩余三乙醇胺溶液，根据硫酸标准溶液的用量计算戊二醛的含量。

6.1.2.9.2 试剂配制

配制65 g/L三乙醇胺溶液、1%盐酸溶液、10 g/L氢氧化钠溶液、0.4 g/L溴酚蓝乙醇溶液与盐酸羟胺中性溶液（17.5 g盐酸羟胺加蒸馏水75 mL溶解，并加异丙醇稀释至500 mL，摇匀。加 0.4 g/L溴酚

蓝乙醇溶液15 mL，用65 g/L三乙醇胺溶液滴定至溶液显蓝绿色）；配制并标定0.25 mol/L硫酸滴定液（见6.1.3.4）。

6.1.2.9.3 样品测定

精密吸取样品适量，使其相当于戊二醛约0.2 g，置250 mL碘量瓶中，精确加65 g/L 三乙醇胺溶液20.0 mL与盐酸羟胺中性溶液25 mL，摇匀。静置反应1 h后，用0.25 mol/L硫酸滴定液（装于25 mL滴定管中）滴定。待溶液显蓝绿色，记录硫酸滴定液用量。同时，以不含戊二醛的三乙醇胺、盐酸羟胺中性溶液重复上述操作（空白对照）。重复测2次，取2次的平均值进行以下计算。

6.1.2.9.4 计算公式

因1 mol/L硫酸滴定液1 mL相当于0.1001 g戊二醛，按公式（35）计算戊二醛含量：

$$\rho(g/L)=\frac{c\times(V_2-V_1)\times 0.1001}{V}\times 1000 \quad (35)$$

式中：

ρ——样品中戊二醛含量，单位为克每升（g/L）；

c ——硫酸滴定液浓度，单位为摩尔每升（mol/L）；

V_1——样品滴定中用去的硫酸滴定液体积，单位为毫升（mL）；

V_2——空白对照滴定中用去的硫酸滴定液体积，单位为毫升（mL）；

V——戊二醛样品体积，单位为毫升（mL）。

6.1.2.9.5 注意事项

本方法适用于测定醛类消毒剂中戊二醛有效成分的含量。方法的滴定终点以溴酚蓝在中性条件下为蓝绿色来指示。对于高浓度的戊二醛，应预先稀释至质量浓度为2%左右稀溶液后再进行测定。对于碱性或酸性戊二醛样品，先用1%盐酸或10 g/L氢氧化钠溶液调pH至7.0，再用上法进行含量测定。

6.1.2.10 环氧乙烷（C_2H_4O）含量的测定

6.1.2.10.1 第一法 容量分析法

6.1.2.10.1.1 原理

环氧乙烷用盐酸处理时，导致环的破裂，同时消耗等摩尔的盐酸。先用一定量的盐酸和环氧乙烷作用，然后再用氢氧化钠标准溶液滴定过量的盐酸。根据盐酸和氢氧化钠标准溶液的用量，计算环氧乙烷的含量。

6.1.2.10.1.2 试剂配制

配制5 g/L甲基橙溶液及盐酸-氯化镁溶液（在0.2 mol/L盐酸中加入$MgCl_2$•6 H_2O 120 g，溶解并稀释至100 mL）；配制并标定0.1 mol/L氢氧化钠滴定液（见6.1.3.5）。

6.1.2.10.1.3 样品测定

取20 mL盐酸-氯化镁溶液放入100 mL碘量瓶中，盖上瓶盖，称重。于冰瓶中取出装有环氧乙烷样品的容器，取样品适量，使其相当于环氧乙烷约40 mg～50 mg，尽快置于碘量瓶中，重新盖上瓶盖，混匀，称重。两次质量差即为环氧乙烷样品质量。然后，加5 g/L甲基橙溶液1滴作为指示剂，用0.1 mol/L氢

氧化钠滴定液（装入25 mL滴定管中）滴定。当红色溶液变成黄色时，记录氢氧化钠滴定液用量。同时以纯水代替环氧乙烷重复上述操作（空白对照）。重复测2次，取2次的平均值进行以下计算。

6.1.2.10.1.4 计算公式

因1 mol/L氢氧化钠滴定液1 mL相当于0.04405 g环氧乙烷，故可用式（36）计算其含量：

$$\omega(\%) = \frac{c\times(V_2-V_1)\times 0.04405}{m}\times 100\% \quad (36)$$

式中：

ω——环氧乙烷含量；

c——氢氧化钠滴定液浓度，单位为摩尔每升（mol/L）；

V_1——样品滴定中用去的氢氧化钠滴定液体积，单位为毫升（mL）；

V_2——空白对照滴定中用去的氢氧化钠滴定液体积，单位为毫升（mL）；

m——环氧乙烷样品的质量，单位为克（g）。

6.1.2.10.2 第二法：气相色谱法

6.1.2.10.2.1 原理

采用色谱柱分离，氢火焰离子化检测器检测，根据保留时间定性，峰高或峰面积定量。

6.1.2.10.2.2 色谱参考条件

色谱柱：毛细管色谱柱（6%氰丙基苯基-94%二甲基聚硅氧烷，60 m×0.25 mm×1.40 μm）或同等极性的毛细管色谱柱；柱温为程序升温，从50 ℃（保持0 min），以5 ℃/min升至180 ℃（保持0 min）；进样口温度210 ℃；检测器FID温度280 ℃； 氮气流量1.0 mL/min；氢气流量40 mL/min；空气流量450 mL/min；进样量0.1 mL。环氧乙烷峰与其他杂质峰的分离度应大于1.5。

6.1.2.10.2.3 标准曲线的绘制

用5 mL注射器取一定量的环氧乙烷纯气（在标准状况下1 mL环氧乙烷气体重1.965 mg），注入100 mL注射器中，用清洁空气稀释至100 mL，计算环氧乙烷浓度，然后再用100 mL注射器适当稀释配成环氧乙烷浓度为0.0025、0.0050、0.0100、0.050 mg/L及0.100 mg/L的标准气体。分别进样0.10 mL，测量其峰高，以环氧乙烷峰高对其质量（mg）进行线性回归，计算线性回归方程。

6.1.2.10.2.4 样品测定

用大气采样器在现场采集一定量的空气，取0.1 mL空气样品（记录温度及气压）直接进样，测其峰高，根据线性回归方程计算样品中环氧乙烷含量。

6.1.2.10.2.5 计算公式

按公式（37）换算体积，并计算环氧乙烷的含量。

$$V_0 = V\times\frac{273}{273+t}\times\frac{p}{101.3} \quad (37)$$

式中：

X——样品中环氧乙烷的含量，单位为毫克每立方米（mg/m^3）；

V——进样体积，单位为毫升（mL）；

p——测定样品时的气压，单位为千帕（kPa）；

t——测定样品时的温度，单位为摄氏度（℃）；

m——样品中环氧乙烷的质量，单位为毫克（mg）；

V_0——换算为标准状况下的样品体积，单位为毫升（mL）。

6.1.2.11 乙醇（C_2H_6O）和异丙醇含量的测定

6.1.2.11.1 第一法：气相色谱法

6.1.2.11.1.1 概述

本方法检出限0.03%，方法线性范围0.1%～2.0%，六次加标回收率为98%～101%，平均加标回收率99.5%。

6.1.2.11.1.2 色谱参考条件

色谱参考条件如下：

a) 色谱柱:2.0 m×4 mm 玻璃柱；固定相：GDX-102 0.2 mm～0.3 mm（60 目～80 目）；柱温 180 ℃；进样口温度和检测器温度 230 ℃；载气（N_2）流速 45 mL/min；氢气流速 45 mL/min；空气流速 450 mL/min；

b) 毛细管柱:DW-WAX：30 m×0.32 mm×0.25 μm：柱温 60 ℃，保持 10 min；进样口温度 230 ℃，检测器温度 250 ℃，载气(N_2）流速 1.0 mL/min；氢气流速 40 mL/min；空气流速 400 mL/min；分流比为 60:1。

6.1.2.11.1.3 标准溶液的配制

体积分数标准溶液：配制乙醇浓度（以体积分数计）分别为0.100%、0.200%、0.300%、0.500%、1.00%及2.00%的乙醇标准系列。

质量浓度标准溶液：配制乙醇质量浓度分别为1.00 g/L、2.00 g/L、3.00 g/L、5.00 g/L、10.0 g/L及20.0 g/L的乙醇标准系列。

6.1.2.11.1.4 含量测定

含量测定如下：

a) 根据需要进行样品检测前处理；

b) 低黏溶液样品可量取一定体积，用纯水直接稀释后检测。其他样品应称取一定质量，用纯水定容后检测；

c) 取 1 μL 样品溶液或标准应用液进入气相色谱仪测其峰面积。以乙醇标准应用液的峰面积（或峰高）对其含量绘制标准曲线，待测样品的峰面积（或峰高）与标准曲线比较而定量。

6.1.2.11.1.5 计算公式

计算方法如下：

a) 对于吸取一定体积并用纯水直接稀释的低粘度溶液样品，样品中乙醇含量按公式（38）计算：

$$\varphi = \varphi_1 \times f \quad (38)$$

式中：

φ——样品中乙醇的体积分数，%；

φ_1——根据体积分数标准曲线计算出的样品测定溶液中乙醇的体积分数，%；

f ——样品稀释倍数。

b) 对于称取一定质量并用纯水定容的样品，样品中乙醇含量按公式（39）计算：

$$\omega = \rho \times V/m \times 100 \quad (39)$$

式中：

ω——样品中乙醇的质量分数，%；

ρ——根据质量浓度标准曲线计算出的样品测定溶液中乙醇的质量浓度，单位为克每升（g/L）；

V——样品定容体积，单位为升（L）；

m——样品取样量，单位为克（g）。

6.1.2.11.1.6 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的5%。

6.1.2.11.1.7 异（正）丙醇含量检测方法

可参照上述步骤进行检测。

6.1.2.11.1.8 复合醇含量检测方法

参照上述方法对消毒剂中的各种醇类含量分别进行检测，计算总醇含量。

6.1.2.11.1.9 结果判定

消毒剂有效含量的检测结果应不低于产品标准规定含量的下限值。按GB/T 38499存放规定期限的消毒剂，有效含量的下降率应≤10%。

6.1.2.11.2 第二法：比重法（适用于乙醇测定）

6.1.2.11.2.1 原理

根据阿基米德定理，当酒精计在酒精溶液中平衡时，它所排开酒精溶液质量等于酒精计本身质量，根据酒精计的质量和排开酒精溶液的体积，可得出溶液的相对密度，再换算成体积分数。

6.1.2.11.2.2 样品测定

于约20 ℃在量筒中加入适量乙醇样品溶液，其量以使酒精比重计放入后能充分浮起为准。将比重计下按后，缓慢松手，当其上浮静止且溶液无气泡时，读取液面处比重计刻度即为其百分含量。

6.1.2.11.2.3 注意事项

本方法操作简单，无需特殊仪器，适用于仅含乙醇和水的溶液。由于不能排除其他醇类的干扰，当存在甲醇、异丙醇、正丁醇、异戊醇等的干扰时，应以气相色谱法为准。

6.1.2.12 醋酸氯己定、葡萄糖酸氯己定、盐酸氯己定测定方法

6.1.2.12.1 方法一：高效液相色谱法

6.1.2.12.1.1 适用范围

适合于含醋酸氯己定、葡萄糖酸氯己定、盐酸氯己定的单方和复方消毒剂。

6.1.2.12.1.2 原理

样品经流动相[0.02 mol/L磷酸二氢钾溶液(pH=2.5)+乙腈=65+35]超声波提取，采用高效液相色谱-二极管阵列检测器测定，峰面积外标法定量。

6.1.2.12.1.3 仪器设备

仪器设备如下：

a) 高效液相色谱仪，具二极管阵列检测器。

b) 电子天平，精度为0.1 mg。

c) 超声波清洗器。

6.1.2.12.1.4 试剂或材料

试剂或材料如下：

a) 醋酸氯己定标准品。

b) 磷酸二氢钾、85%磷酸均为分析纯；乙腈为色谱纯。

c) 水：GB/T 6682规定的一级水。

6.1.2.12.1.5 分析步骤

分析步骤如下：

a) 流动相、提取液的制备：称取2.7 g磷酸二氢钾，放入1000 mL量筒中，加入约950 mL水溶解后，加入1.5 mL 85%磷酸，然后加水定容至1000 mL，混匀，得到流动相A相 (pH=2.5)，B相为乙腈。量取流动相A相325 mL，加乙腈175 mL，混合均匀，得到提取液；

b) 标准溶液的制备：称取醋酸氯己定标准20 mg（精确至0.1 mg），用流动相稀释至50.0 mL，得到400 mg/L标准溶液；

c) 标准曲线的制备：将标准溶液用流动相稀释成10 mg/L、20 mg/L、40 mg/L、80 mg/L、100 mg/L和200 mg/L的标准系列，10 μL进样测定；

d) 色谱条件：色谱柱：C18柱(4.6 mm×250 mm,5 μm)；流动相：A相+B相= 65+35；流速：1.0 mL/min；进样量：10 μL；柱温：30 ℃；波长扫描200 nm～400 nm；测定波长：260 nm；以保留时间和紫外光谱图谱定性，以峰面积外标法定量；

e) 样品测定：称取或量取样品适量于50 mL容量瓶中，加提取液40 mL，超声波提取20 min，定容至50 mL，过0.45 μm滤膜后，进样测定。

6.1.2.12.1.6 计算公式

根据标准曲线，计算样品中醋酸氯己定含量，计算公式（40）如下：

$$X = \frac{\rho \times V}{M \times 1000} \quad (40)$$

式中：

X——样品中醋酸氯己定的含量，单位为克每千克或克每升（g/kg或g/L）；

ρ——由标准曲线得到样品溶液的醋酸氯己定的质量浓度，单位为毫克每升（mg/L）；

V——定容体积，单位为毫升（mL）；

M——样品量，单位为克或毫升（g或mL）；

注：葡萄糖酸氯己定含量测定可以用醋酸氯己定做标准品，并将结果乘以1.4352。

盐酸氯己定含量测定可以用醋酸氯己定做标准品，并将结果乘以0.92458。

6.1.2.12.1.7　精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

6.1.2.12.1.8　色谱图

高效液相色谱图见图10。

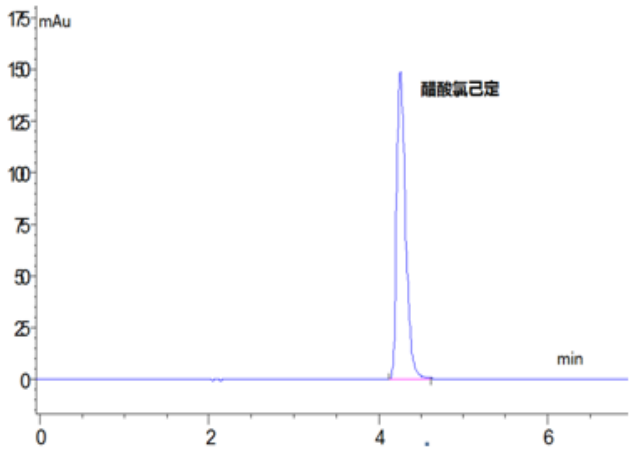


图10　醋酸氯己定的高效液相色谱图

6.1.2.12.2　方法二：滴定法

6.1.2.12.2.1　适用范围

适合于含醋酸氯己定的单方消毒剂。

6.1.2.12.2.2　原理

样品用丙酮和冰醋酸溶解，加甲基橙饱和丙酮溶液，用高氯酸滴定液滴定，甲基橙指示液显橙色时停止滴定，通过高氯酸滴定液使用量，计算醋酸氯己定含量。

6.1.2.12.2.3　分析步骤

精密称取本品适量，加丙酮30 mL与冰醋酸2 mL，振摇使溶解后，加甲基橙的饱和丙酮溶液0.5 mL～1 mL，用高氯酸滴定液（0.1 mol/L）滴定至溶液显橙色，并将滴定的结果用空白试验校正。每1 mL高氯酸滴定液（0.1 mol/L）相当于31.28 mg的醋酸氯己定。

6.1.2.12.2.4 计算公式

样品中醋酸氯己定含量，计算公式（41）如下：

$$X=\frac{C\times(V-V_0)\times 31.28}{M\times 0.1} \quad (41)$$

式中：

X——样品中醋酸氯己定的含量，单位为克每千克或克每升（g/kg或g/L）；

C——标准滴定溶液的摩尔浓度，单位为摩尔每升（mol/L）；

V——试样测定所消耗的标准滴定溶液的体积，单位为毫升（mL）；

V_0 ——相应的空白测定所消耗的标准滴定溶液的体积，单位为毫升（mL）；

M——样品量，单位为克或毫升（g或mL）。

6.1.2.12.2.5 精密度

重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

6.1.2.12.3 紫外分光光度法

6.1.2.12.3.1 适用范围

适合于软膏型或液体制剂型含氯己定类（包括醋酸氯己定、葡萄糖酸氯己定、盐酸氯己定）的单方消毒剂。

6.1.2.12.3.2 原理

样品中的醋酸氯己定经氯仿溶解基质，1.5 mol/L的醋酸溶液提取后，在波长260 nm处测定吸光度值定量。

6.1.2.12.3.3 分析步骤

精密称取本品适量（约相当于醋酸氯己定10 mg），置分液漏斗中，加微温三氯甲烷30 mL，振摇使基质溶解，用1.5 mol/L醋酸溶液提取5次（20 mL、20 mL、15 mL、15 mL、15 mL），合并酸液于100 mL量瓶中，用1.5 mol/L醋酸溶液稀释至刻度，摇匀，精密量取5 mL，置50 mL量瓶中，用乙醇稀释至刻度，摇匀，照紫外-可见分光光度法，在260 nm的波长处测定吸光度。另取醋酸氯己定标准品约10 mg，精密称定，置100 mL量瓶中，加1.5 mol/L醋酸溶液溶解并稀释至刻度，摇匀。精密量取5 mL，置50 mL量瓶中，用乙醇稀释至刻度，同法测定，计算，即得。

对于液体剂型醋酸氯己定消毒液，不需要经分液漏斗提取，直接用1.5 mol/L醋酸溶液稀释后，再用乙醇稀释，测定吸光度。

6.1.2.12.3.4 计算公式

样品中醋酸氯己定含量，计算公式（42）如下：

$$X = \frac{A_2 \times m}{A_1 \times M} \quad (42)$$

式中：

X——样品中醋酸氯己定的含量，单位为克每千克或克每升（g/kg或g/L）；

m——醋酸氯己定标准品的质量，单位为毫克（mg）；

A_1——醋酸氯己定标准溶液的吸收值；

A_2——样品溶液的吸收值；

M——样品量，单位为克或毫升（g或mL）。

注：葡萄糖酸氯己定含量测定可以用醋酸氯己定做标准品，并将结果乘以1.4352。

盐酸氯己定含量测定可以用醋酸氯己定做标准品，并将结果乘以0.92458。

6.1.2.12.3.5 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

6.1.2.13 聚六亚甲基单胍、聚六亚甲基双胍测定方法

6.1.2.13.1 方法一：可见分光光度法

6.1.2.13.1.1 适用范围

适合于含聚六亚甲基单胍、聚六亚甲基双胍的单方消毒剂。

6.1.2.13.1.2 原理

聚六亚甲基单胍（PHMG）、聚六亚甲基双胍（PHMB）能够与曙红Y(Eosin Y)反应，颜色由橙色变为粉红色，在波长545 nm处测量吸光度值，吸光度值与PHMG、PHMB含量成正比。

6.1.2.13.1.3 仪器

仪器如下：

a) 可见光分光光度计，5 cm比色杯。

b) 分析天平。

c) 容量瓶：25 mL、100 mL、250 mL、500 mL。

d) 移液管：1.0 mL、2.0 mL、2.5 mL、4.0 mL、6.0 mL、8.0 mL和10.0 mL。

6.1.2.13.1.4 试剂

试剂如下：

a) PHMB盐酸盐标准品，PHMG标准品（可采用纯度大于95%的原料）。

b) 曙红Y（Eosin Y），三水合醋酸钠，分析纯。

6.1.2.13.1.5 分析步骤

分析步骤如下：

a) 指示液的制备：称取 0.6 g 曙红 Y，放入 250 mL 烧杯中，以大约 50 mL 温纯水溶解并冷却，转移至 100 mL 容量瓶中，用纯水定容到 100 mL，充分混匀。用移液管吸取 10 mL，以纯水定容至 250 mL，得到指示液。

b) 醋酸钠溶液的制备：将 10 g 三水合醋酸钠溶解于 100 mL 纯水中。

c) PHMG、PHMB 标准溶液的制备：称取 PHMG、PHMB 标准 10 mg（精确至 0.1 mg），用纯水稀释至 100 mL，得到 100 mg/L 标准溶液。

d) 标准曲线的制备：将 PHMG、PHMB 标准溶液用纯水稀释成 2.00 mg/L、4.00 mg/L、6.00 mg/L、8.00 mg/L 和 10.0 mg/L 的标准系列，用移液管分别吸取 10 mL 至 25 mL 容量瓶中，同时以纯水做空白，加 1 mL 醋酸钠溶液和 2.5 mL 指示液，以纯水定容至 25 mL，用力振摇，充分混匀，分光光度计 545 nm 处测定吸光值，绘制标准曲线。

e) 样品测定：称取或量取样品适量，用纯水稀释至标准曲线浓度范围内，取 10 mL 样品溶液，按照上述方法测定。

6.1.2.13.1.6 计算公式

根据标准曲线，计算样品的PHMG、PHMB含量，计算公式（43）如下：

$$X = \frac{\rho \times V}{M \times 1000} \quad (43)$$

式中：

X——样品中PHMG、PHMB的含量，单位为克每千克或克每升（g/kg或g/L）；

ρ——由标准曲线得到样品溶液的PHMG、PHMB的质量浓度，单位为毫克每升（mg/L）；

V——样品溶液体积，单位为毫升（mL）；

M——样品量，单位为克或毫升（g或mL）。

6.1.2.13.1.7 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

6.1.2.13.2 方法二：紫外分光光度法

6.1.2.13.2.1 适用范围

适合于含聚六亚甲基双胍的单方消毒剂。

6.1.2.13.2.2 原理

聚六亚甲基双胍在234 nm处有紫外吸收，一定浓度范围内吸光度与PHMB含量成正比。

6.1.2.13.2.3 仪器设备

仪器设备如下：

a) 紫外分光光度计，1cm 石英比色杯。

b) 分析天平。

6.1.2.13.2.4 试剂

PHMB盐酸盐标准品。

6.1.2.13.2.5 分析步骤

a) PHMB 标准溶液的制备：称取 PHMB 标准 10 mg（精确至 0.1 mg），用蒸馏水稀释至 100 mL，得到 100 mg/L 标准溶液。

b) 标准曲线的制备：将标准溶液用纯水稀释成 2.00 mg/L、4.00 mg/L、6.00 mg/L、8.00 mg/L、10.0 mg/L、12.0 mg/L 和 16.0 mg/L 的标准系列，用 1 cm 石英比色杯在紫外分光光度计 234 nm 处，测定吸光值，并绘制标准曲线。

c) 样品测定：称取或量取样品适量，用纯水稀释至标准曲线浓度范围内，按照上述方法测定。

d) 对检测时有干扰的样品，需生产企业同时提供不含 PHMB 的空白对照样品。

6.1.2.13.2.6 计算公式

根据标准曲线，计算样品的PHMB含量，计算公式（44）如下：

$$X = \frac{\rho \times V}{M \times 1000} \quad (44)$$

式中：

X——样品中PHMB的含量，单位为克每千克或克每升（g/kg或g/L）；

ρ——由标准曲线得到样品溶液的PHMB的质量浓度，单位为毫克每升（mg/L）；

V——样品溶液体积，单位为毫升（mL）；

M——样品量，单位为克或毫升（g或mL）。

6.1.2.13.2.7 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

6.1.2.13.3 方法三：毛细管电泳法

6.1.2.13.3.1 适用范围

适合于含聚六亚甲基单胍、聚六亚甲基双胍的单方和复方消毒剂，也可以用于鉴别聚六亚甲基单胍和聚六亚甲基双胍。

6.1.2.13.3.2 原理

利用混合胶束电动毛细管色谱（MEKC）可同时分离定消毒剂中有效成分聚六亚甲基单胍（PHMG）、聚六亚甲基双胍（PHMB）、醋酸氯己定（CHA），以校正峰面积外标法定量。

6.1.2.13.3.3 仪器

仪器如下：

a) 毛细管电泳仪，具二极管阵列检测器（PDA）。

b) 分析天平。

6.1.2.13.3.4 试剂

试剂如下：

a) 聚六亚甲基单胍盐酸盐（PHMG），聚六亚甲基双胍盐酸盐（PHMB），醋酸氯己定（CHA）标准品；

b) 四硼酸钠（$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$，>99.5%）；氢氧化钠（NaOH，优级纯）；硼酸（H_3BO_3，优级纯）；十二烷基硫酸钠（SDS，≥99%）；脱氧胆酸钠（SD，≥98%）；聚乙二醇 20000 (PEG 20000)。

6.1.2.13.3.5 分析步骤

分析步骤如下：

a) 标准溶液的制备：称取 PHMG、CHA 及 PHMB 各 50 mg（精确至 0.1 mg），分别置于 15 mL 塑料离心管中，用移液器加入超纯水 10 mL，涡旋混匀，制得质量浓度均为 5.00 g/L 的标准储备液，于 4 ℃冰箱冷藏保存；

b) 标准曲线的制备：分别将 PHMG、PHMB、CHA 的标准储备液用样品溶液逐级稀释，分别配制成 7.5 mg/L、15 mg/L、30 mg/L、60 mg/L 和 120 mg/L 的 PHMG 的工作液、PHMB 和 CHA 混合工作液；

c) 分离缓冲溶液：2 0mmol/L 四硼酸钠+30 mmol/L SDS+5 mmol/L SD+0. 8g/L PEG 20000；

d) 样品提取液：将分离缓冲溶液用超纯水稀释 10 倍；

e) 电泳条件：毛细管：50.2 cm（有效长度：40 cm）×50 μm i.d.；分离电压：24 kV；检测波长：214 nm（测定 PHMG 和 CHA）和 235 nm（测定 PHMB）；进样压力及时间：3.448 kPa，12 s；操作温度 25 ℃；

f) 新毛细管在使用前分别用 1 mol/L NaOH 冲洗 20 min，水冲洗 5 min，分离缓冲液冲洗 5 min。每次进样前依次用 1 mol/L NaOH 冲洗 2 min，水冲洗 2 min，分离缓冲液冲洗 2 min，以保证迁移时间和校正峰面积的重现性；

g) 样品测定：液体样品用样品提取液稀释后直接进样；消毒湿巾样品则用剪刀剪成细小片，称取 1 g，置于 50 mL 离心管中，加入 10 mL 样品提取液，超声提取 10 min，将提取液转移至另一 50 mL 离心管中，再加入 10 mL 样品提取液，重复上述操作，将两次提取液合并、混匀即可直接进样分析。

6.1.2.13.3.6 计算公式

根据标准曲线，计算样品的PHMB、PHMG、CHA含量，计算公式（45）如下：

$$X = \frac{\rho \times V}{M \times 1000} \quad \cdots\cdots (45)$$

式中：

X——样品中PHMB、PHMG、CHA的含量，单位为克每千克或克每升（g/kg或g/L）；

ρ——由标准曲线得到样品溶液的PHMB、PHMG、CHA的质量浓度，单位为毫克每升（mg/L）；

V——样品溶液体积，单位为毫升（mL）；

M——样品量，单位为克或毫升（g或mL）。

6.1.2.13.3.7 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

6.1.2.13.3.8　电泳图

毛细管电泳图见图11。

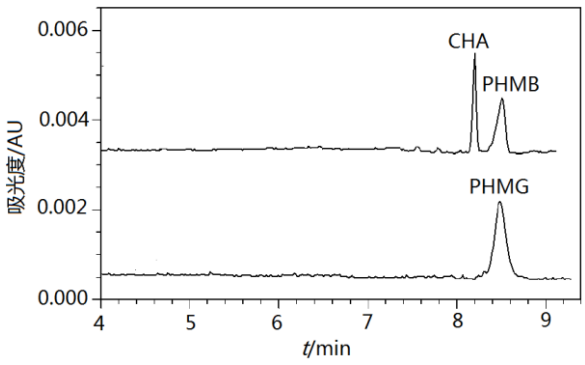


图11　PHMB、PHMG、CHA 的毛细管电泳图

6.1.2.14　季铵盐类消毒剂有效成分含量检测方法

6.1.2.14.1　方法一：高效液相色谱法测定氯化苄铵松宁（苄索氯铵）

6.1.2.14.1.1　原理

苄索氯铵在水溶液中带正电，在270 nm～277 nm波长处有特征紫外吸收。在常用C_{18}反相色谱柱有保留行为，并与样品中的其余组分进行分离。采用二极管阵列检测器对其进行检测，峰面积与组分质量浓度成正比，采用峰面积外标法定量。

6.1.2.14.1.2　适用范围

适用于原料、单方及复方化学消毒剂中苄索氯铵的测定。方法检出限：2 mg/L。

6.1.2.14.1.3　仪器设备

a)　高效液相色谱仪配备二极管阵列检测器。

b)　分析天平。

c)　涡旋振荡器。

6.1.2.14.1.4　试剂

除特殊说明外，所用试剂均为分析纯；实验用水应符合GB/T 6682三级水的规格（蒸馏水或去离子水或相当纯度的水）。乙腈（色谱纯）、乙酸铵、冰乙酸（17.4 mol/L，≥99.8%）。

6.1.2.14.1.5　标准品

苄索氯铵（99%）。

6.1.2.14.1.6　色谱条件

色谱柱：C_{18}(4.6 mm×250 mm, 5 μm)。

流动相：V(乙腈)：V(20 mmol/L NH_4Ac(冰乙酸pH 4.16)) = 70:30。

流速：1.0 mL/min。

检测波长：270 nm。

柱温：30 ℃。

进样量：10 μL。

6.1.2.14.1.7 操作步骤

操作步骤如下：

a) 流动相的配制：称 0.771 g NH_4Ac，置于 500 mL 具塞量筒中，加入少量水溶解后再加入 2 mL 冰乙酸，混匀，用水稀释定容至 500 mL 刻度，混匀。此溶液 pH 为 4.16；

b) 标准储备液的配制：称取在 105 ℃干燥 2 h 的苄索氯铵标准品 20 mg（精确至 0.1 mg），用水溶解，再用水稀释定容至 10.0 mL，得 2.00 mg/mL 标准储备液；

c) 标准系列的配制：分别移取 0.20 mL、0.40 mL、0.60 mL、0.80 mL 和 1.00 mL 储备液，置于 10 mL 容量瓶中，用纯水稀释、定容至刻度，摇匀后备用，则相应工作液质量浓度分别为 40 mg/L、80 mg/L、120 mg/L、160 mg/L 和 200 mg/L；

d) 标准曲线的制作：将苄索氯铵标准系列依质量浓度由低至高的顺序，在规定的液相色谱仪器条件下，测定其响应值。以工作液质量浓度为横坐标，相应峰面积为纵坐标制作标准曲线；

e) 样品处理：移取适量液体（或称取适量粘稠液体）样品，置于 10 mL 容量瓶中，用水稀释定容，经 0.45 μm 滤膜过滤；

f) 待仪器稳定后，在给定的仪器条件下，将处理好的样品依次注入色谱柱。

6.1.2.14.1.8 含量计算

苄索氯铵含量按公式（46）计算。

$$X = \frac{V \times \rho}{m \times 1000} \quad (46)$$

式中：

X——苄索氯铵含量，单位为克每千克或克每升（g/kg或g/L）；

ρ ——通过标准曲线计算的上样液中苄索氯铵的质量浓度，单位为毫克每升（mg/L）；

V——样品定容体积，单位为毫升（mL）；

m——取或称样量，单位为克或毫升（mL或g）。

6.1.2.14.1.9 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的5%。

6.1.2.14.1.10 注意事项

遇到有基体干扰的样品，可换用分离柱效比高效液相色谱高2～3个数量级的高效毛细管电泳法。

6.1.2.14.1.11 色谱图和光谱图

色谱图和紫外吸收光谱图见图12和图13。

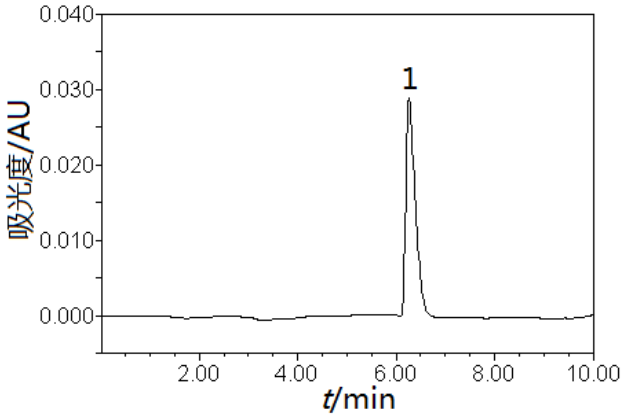


图12　苄索氯铵标准溶液色谱图（200mg/L 苄索氯铵）

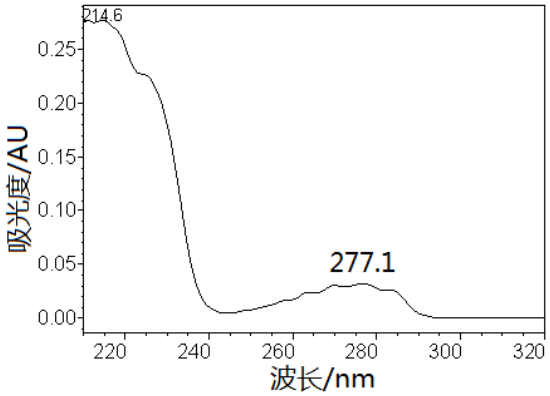


图13　苄索氯铵的紫外吸收光谱图

6.1.2.14.2　方法二：高效毛细管电泳法测定苯扎氯铵（洁尔灭）

6.1.2.14.2.1　方法原理

苯扎氯（或溴）铵属阳离子表面活性剂，分别在214 nm和262 nm有紫外吸收。样品从正极进样后，以高压直流电场为驱动力、石英毛细管为分离通道，在pH2.1的分离缓冲溶液中，苯扎氯铵带正电，三种同系物（十二烷基二甲基苄基氯化铵、十四烷基二甲基苄基氯化铵、十六烷基二甲基苄基氯化铵）因淌度差异，相互分离且与样品基体分离，并迁移至负极进行紫外检测。校正峰面积与组分质量浓度成正比，采用校正峰面积外标法定量。

6.1.2.14.2.2　适用范围

苯扎氯铵和苯扎溴铵的阳离子部分是相同的，故本方法既适用于原料、单方和复方化学消毒剂中苯扎氯铵含量的测定，也同样适用于苯扎溴铵含量的测定，还适用于醋酸洗必泰与苯扎氯铵或苯扎溴铵复配的复方化学消毒剂中这些物质的同时测定。三种同系物的检出限均为0.5 mg/L。醋酸洗必泰的检出限为0.3 mg/L。

6.1.2.14.2.3　仪器设备

仪器设备如下：

a)　毛细管电泳仪，配备紫外（UV）或二极管阵列（PDA）检测器。

b) 分析天平。

c) 涡旋振荡器。

6.1.2.14.2.4 试剂或材料

除特殊说明外，所用试剂均为分析纯。实验用水应符合GB/T 6682三级水的规格（蒸馏水或去离子水或相当纯度的水）。无水磷酸二氢钠、磷酸（14.6 mol/L，85%）、冰乙酸（17.4 mol/L，≥99.8%）、氢氧化钠（优级纯）、乙腈（色谱纯）、聚乙二醇20000（PEG 20000）。

a) 标准品：十二烷基二甲基苄基氯化铵（C12-BAC，≥99%）、十四烷基二甲基苄基氯化铵（C14-BAC，99%）、十六烷基二甲基苄基氯化铵（C16-BAC，≥97%）；

b) 石英毛细管：内径 50 μm，外径 365 μm。

6.1.2.14.2.5 毛细管电泳条件

毛细管电泳条件如下：

a) 石英毛细管：30.2 cm×50 mm i.d.；分离电压：11 kV；检测波长：214 nm；进样压力：3.448 kPa；操作温度：25° C；压力进样，时间为 5 s；

b) 分离缓冲溶液：V[(62.5 mmol/L 磷酸二氢钠 + 62.5 mmol/L 磷酸 (pH 2.1)+8.33 g/L PEG 20 000)]: V(乙腈)=3:2；

c) 样品提取或稀释液：V（50 mmol/L 乙酸）：V（乙腈）=1:1；

d) 50 mmol/L 乙酸：吸取 144μL 冰乙酸，置于 50 mL 具塞带刻度塑料离心管中，用水稀释定容至 50 mL 刻度，摇匀；

e) 新石英毛细管的预处理：新的石英毛细管依次用 1 mol/L 氢氧化钠冲洗 20 min、水冲洗 5 min、分离缓冲溶液冲洗 5 min。每次进样前分别用 1 mol/L 氢氧化钠、水及分离缓冲溶液冲洗 2 min、2 min、2 min。为得到较好的数据，应弃去最初几针的数据，待得到较稳定的迁移时间后，方能进样测定；

f) 1 mol/L 氢氧化钠水溶液配制：称取 2.0 g NaOH 固体，置于已加少量水的 50 mL 具塞带刻度塑料离心管中，振摇溶解，加水至 50 mL 刻度。

6.1.2.14.2.6 分离缓冲溶液配制方法

配制方法如下：

a) 储备液的配制。0.5 mol/L 磷酸：1.71 mL 磷酸于 50 mL 具塞带刻度塑料离心管中，用水稀释定容至 50mL 刻度，摇匀；0.5 mmol/L NaH_2PO_4：称取 3.0 g 无水磷酸二氢钠置于 50 mL 具塞带刻度塑料离心管中，加入 50 mL 水溶解、摇匀；100 g/L PEG 20000：称取 5 g PEG 20000，置于 50 mL 具塞带刻度塑料离心管中，加入 50 mL 水溶解、混匀。

b) 分别移取 750 μL 0.5 mol/L 磷酸、750 μL 0.5 mol/L 磷酸二氢钠、500 μL100 g/L PEG 20000，置于 15 mL 具塞带刻度塑料离心管中，加水至 6 mL 刻度，混匀，加入 4 mL 乙腈混匀后备用。

c) 用移液器将分离缓冲溶液分装于 3 个 1.5 mL 试样瓶中，其中两瓶用于分离，另一瓶用于清洗。用 200 μL 移液器滴加 2～3 滴矿物油于盛装分离缓冲溶液的试样瓶中，以防止分离缓冲溶液中有机溶剂的挥发。

6.1.2.14.2.7 环境条件

室内温度：15 ℃～26 ℃；相对湿度：＜60%。

6.1.2.14.2.8 操作步骤

操作步骤如下：

a) 标准溶液配制：称取折算纯度后的 C12-BAC、C14-BAC 及 C16-BAC 标准品（精确至 0.1 mg），分别置于 15 mL 具塞带刻度塑料离心管中，用移液器加相应体积的水溶解，配制成质量浓度均为 1000 mg/L 的三种同系物的储备液。C16-BAC 需加热溶解；

b) 工作液的配制：分别移取 1.60 mL 三种 BAC 储备液，均置于同一 10 mL 容量瓶中，用样品稀释液稀释、定容至刻度，则三种 BAC 的工作液质量浓度均为 160 mg/L；

c) 标准系列的配制：用样品稀释液将工作液以倍比稀释法逐级稀释，配制成三种 BAC 质量浓度均分别为 10 mg/L、20 mg/L、40 mg/L 和 80 mg/L；

d) 标准曲线的制作：将 BAC 标准系列在规定的电泳条件下，测定其响应值。以工作液质量浓度为横坐标，相应校正峰面积为纵坐标制作标准曲线；

e) 样品处理：液体样品用样品提取液稀释后，置于 1.5 mL 试样瓶中；

f) 待仪器稳定后，在给定的仪器条件下，将处理好的样品依次注入毛细管。

6.1.2.14.2.9 计算公式

十二烷基二甲基苄基氯化铵（C_{12}-BAC）、十四烷基二甲基苄基氯化铵（C_{14}-BAC）、十六烷基二甲基苄基氯化铵（C_{16}-BAC）含量按公式（47）计算。

$$X = \frac{V \times \rho}{m \times 1000} \quad (47)$$

式中：

X——C_{12}-BAC、C_{14}-BAC或C_{16}-BAC的含量，单位为克每千克或克每升（g/kg或g/L）；

ρ——通过标准曲线计算的上样液中C_{12}-BAC、C_{14}-BAC或C_{16}-BAC的质量浓度，单位为毫克每升（mg/L）；

V——样品定容体积，单位为毫升（mL）；

m ——称或取样量，单位为克或毫升（g或mL）。

苯扎氯铵的含量为C_{12}-BAC、C_{14}-BAC、C_{16}-BAC含量之和。

6.1.2.14.2.10 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

6.1.2.14.2.11 注意事项

注意事项如下：

a) 遇到有基体干扰的样品，可通过增加石英毛细管的长度实现与基体的分离，达到去除干扰的目的。

b) 考虑到苄索氯铵与苯扎氯铵不复配在一起，故本法也同样适用于原料、单方和复方化学消毒剂中苄索氯铵的测定。

c) 用十二烷基二甲基苄基氯化铵为标准物质对苯扎溴铵进行定量时，需乘以换算系数 1.13。

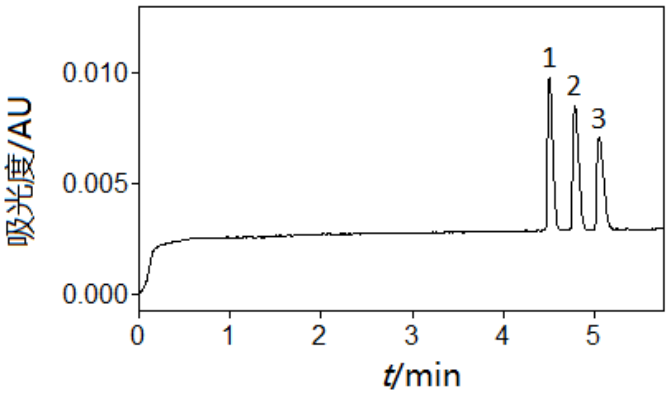
d) 对于无样品温度控制的设备，可用 200 μL 移液器滴加 2～3 滴矿物油于盛装分离缓冲溶液的试样瓶中，以防止样品溶液中有机溶剂的挥发。

e) 对季铵盐含量高的样品，可将样品稀释液中 50 mmol/L HAC 与乙腈比例由 1:1 改为 1:4。

f) 本方法可同时测定醋酸洗必泰，迁移时间在 3.7 min 左右。

6.1.2.14.2.12 电泳图

电泳图见图14。



标引序号说明：

1— C_{12}-BAC（80 mg/L）；

2—C_{14}-BAC（80 mg/L）；

3—C_{16}-BAC（80 mg/L）。

图14 3 种消毒剂有效成分混合标准溶液电泳图

6.1.2.14.3 方法三：毛细管电泳法测定苄索氯铵

6.1.2.14.3.1 方法原理

苄索氯铵属阳离子表面活性剂，分别在214 nm及270 nm有最大吸收。在十二烷基硫酸钠与脱氧胆酸钠的混合胶束分离缓冲溶液中，实现与样品基体的分离，利于其准确定量。

6.1.2.14.3.2 适用范围

本方法适用于原料、单方及复方化学消毒剂中苄索氯铵的含量测定；本法也适用于单方和复方化学消毒剂中苄索氯铵与聚六亚甲基双胍的同时测定；还适用于复方化学消毒剂中苄索氯铵与醋酸洗必泰的同时测定。本方法中这三种物质的检出限均为1 mg/L。

6.1.2.14.3.3 仪器设备

仪器设备如下：

a) 毛细管电泳仪配备二极管阵列检测器。

b) 分析天平。

c) 涡旋振荡器。

6.1.2.14.3.4 试剂与材料

除特殊说明外，所用试剂均为分析纯。实验用水应符合GB/T 6682三级水的规格(蒸馏水或去离子水或相当纯度的水)。十水合四硼酸钠（硼砂，Na2B4O7·10H2O，>99.5%）、硼酸（H3BO3，优级纯）、十二烷基硫酸钠（SDS，≥99%）、脱氧胆酸钠（SD，≥98%）、聚乙二醇20000（PEG 20000）、氢氧化钠（优级纯）。

a) 标准品：苄索氯铵（≥99.9%）；

b) 石英毛细管：内径 50 μm，外径 365 μm。

6.1.2.14.3.5 毛细管电泳条件

毛细管电泳条件如下：

a) 毛细管电泳条件：石英毛细管：50 mm i.d.×50.2 cm（有效长度：40 cm）；分离电压：24 kV；检测波长：214 nm；进样压力：3.448 kPa；进样时间：12 s；操作温度：25 ℃；

b) 分离缓冲溶液：20 mmol/L 硼砂（无需调 pH）+30 mmol/L SDS+5 mmol/L SD+0.8 g/L PEG 20000；样品提取（或稀释）液：将分离缓冲溶液用水稀释 10 倍；

c) 新毛细管的预处理：新的毛细管分别用 1 mol/L 氢氧化钠冲洗 20 min、水冲洗 5 min、分离缓冲溶液冲洗 5 min。每次进样前分别用 1 mol/L 氢氧化钠、水及分离缓冲溶液冲洗 2 min、2 min、2 min。为得到较好的数据，应弃去最初几针的数据，待得到稳定的迁移时间，方能进行定量测定；

d) 1 mol/L 氢氧化钠水溶液配制：称取 2.0 g NaOH 固体，置于已加少量水的 50 mL 具塞带刻度塑料离心管中，振摇溶解，加水至 50 mL 刻度。

6.1.2.14.3.6 分离缓冲溶液配制方法

配制方法如下：

a) 储备液的制备方法：80 mmol/L 硼砂储备液：称取 1.525 g 硼砂，置于 50 mL 具塞带刻度塑料离心管，加入 50 mL 水溶解；200 mmol/L SDS 储备液：称取 2.884 g SDS 于 50 mL 具塞带刻度塑料离心管，加入 50 mL 水溶解；100 mmol/L SD 储备液：称取 2.073 g SD 于 50 mL 具塞带刻度塑料离心管，加入 50 mL 水溶解；100 g/L PEG 20000 储备液：称取 5 g PEG 20000，置于 50 mL 具塞带刻度塑料离心管，加入 50 mL 水溶解；

b) 分离缓冲溶液的配制：分别移取 2.5 mL 80 mmol/L 硼砂、1.5 mL 200 mmol/L SDS、0.5 mL 100 mmol/L SD 和 0.08 mL 100g/L PEG 20000，置于 15 mL 具塞带刻度塑料离心管中，加水至 10 mL 刻度，混匀后即为分离缓冲溶液；

c) 用移液器将分离缓冲溶液分装于 3 个试样瓶中，其中 2 个瓶用于分离，另 1 个瓶用于冲洗。

6.1.2.14.3.7 环境条件

室内温度：15 ℃～26 ℃；相对湿度：＜60%。

6.1.2.14.3.8 操作步骤

操作步骤如下：

a) 苄索氯铵标准储备液的配制：称取在 105 ℃干燥 2 h 的苄索氯铵标准品 10 mg（精确至 0.1 mg），置于 10 mL 容量瓶中，加入水溶解、定容，涡旋混匀，制得质量浓度为 1.00 g/L 的标准储备液，于 4 ℃冰箱冷藏保存。

b) 工作液的配制：分别移取 1.20 mL 苄索氯铵储备液，置于 10 mL 容量瓶中，用样品稀释液稀释、定容至刻度，则工作液质量浓度为 120 mg/L。

c) 标准系列的配制：用样品提取液将工作液以倍比稀释法逐级稀释，配制成质量浓度分别为 7.5 mg/L、15 mg/L、30 mg/L 和 60 mg/L 的标准系列。

d) 标准曲线的制作：将标准系列依质量浓度由低至高的顺序，在规定的电泳条件下，测定其响应值。以工作液质量浓度为横坐标，相应校正峰面积为纵坐标制作标准曲线。

e) 样品处理：液体样品用样品提取液稀释后装入 1.5 mL 样品瓶中直接进样。

f) 待仪器稳定后，在给定的仪器条件下，将处理好的样品依次注入毛细管。

6.1.2.14.3.9 计算公式

苄索氯铵含量按公式（48）计算。

$$X = \frac{V \times \rho}{m \times 1000} \quad (48)$$

式中：

X——苄索氯铵含量，单位为克每千克或克每升（g/kg或g/L）；

ρ——通过标准曲线计算的上样液中苄索氯铵的质量浓度，单位为毫克每升（mg/L）；

V ——样品定容体积，单位为毫升（mL）；

M——称或取样量，单位为克或毫升（g或mL）。

6.1.2.14.3.10 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

6.1.2.14.3.11 注意事项

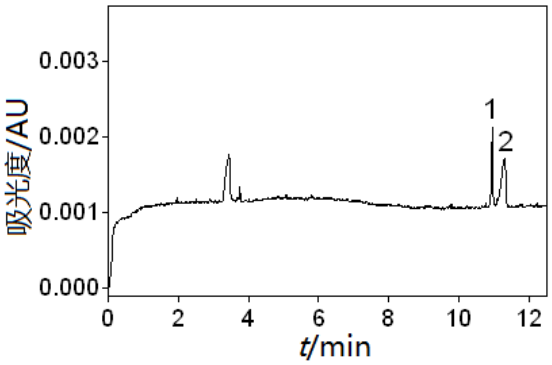
注意事项如下：

a) 遇到有基体干扰的样品，可通过增加石英毛细管的长度实现与基体的分离，达到去除干扰的目的；

b) 对无基体干扰的样品，可通过减少石英毛细管的长度，减少分离时间，达到快速分离的目的。

6.1.2.14.3.12 电泳图

电泳图见图15。



标引序号说明：

1——苄索氯铵（5mg/L）；

2——聚六亚甲基双胍（5mg/L）。

图15　苄索氯铵和聚六亚甲基双胍混合标准溶液电泳图

6.1.2.14.4　方法四：四苯硼钠滴定法

6.1.2.14.4.1　原理

通过直接测定季铵盐中的阳离子（杀菌活性成分）来测定季铵盐的含量。在碱性水溶液中，带正电的季铵盐与带负电的溴酚蓝酸性染料指示剂相互作用而形成蓝色离子对化合物，该蓝色化合物易溶于与水不互溶的氯仿中。由于此蓝色化合物不如四苯硼钠与季铵盐间形成的化合物更稳定，故利用此性质将溴酚蓝作为以四苯硼钠滴定季铵盐的指示剂。滴定开始时，季铵盐与溴酚蓝结合，生成蓝色化合物。滴定至近终点时，溴酚蓝指示剂则逐渐从蓝色化合物中被四苯硼钠置换而游离出来，因其不溶于氯仿而转入碱性水层，在剧烈振摇下，氯仿层的蓝色消褪而碱性水层呈淡紫色，即为终点。

6.1.2.14.4.2　适用范围

苯扎溴铵、苯扎氯铵或其他阴离子取代的季铵盐的阳离子部分是相同的，故本方法既适用于原料或单方化学消毒剂中苯扎溴铵含量的测定，也同样适用于原料或单方化学消毒剂中苯扎氯铵或其他阴离子取代的季铵盐含量的测定。本方法检出限为0.9 g/L。

6.1.2.14.4.3　材料与方法

材料与方法如下：

a)　试剂：除特殊说明外，所用试剂均为分析纯。实验用水应符合 GB/T 6682 三级水的规格（蒸馏水或去离子水或相当纯度的水）。氢氧化钠、溴酚蓝、四苯硼钠（＞99%）、氯仿。

b)　1 mol/L 氢氧化钠溶液：4.0 g 氢氧化钠，加水溶解成 100 mL 溶液。

c)　0.05% 溴酚蓝指示剂：称取 0.1 g 溴酚蓝，加入 3 mL 1 mol/L 氢氧化钠溶液，溶解，再加水至 200 mL。

d)　0.02 mol/L 四苯硼钠滴定液：参照 6.1.3.7 进行配制和标定。

6.1.2.14.4.4　操作步骤

操作步骤如下：

a)　取适量体积液体样品，使其相当于苯扎溴铵约 0.25 g，置于 250 mL 碘量瓶中；

b) 分别加水 50 mL 和 1 mol/L 氢氧化钠溶液 1 mL，摇匀，加入 0.05%溴酚蓝指示剂 0.4 mL，则水层为蓝色澄清液体，加入氯仿 10 mL，氯仿层为无色澄清液体，振摇混匀，静置，水层变浑且颜色逐渐变浅，氯仿层则变为蓝色澄清液体；

c) 用 0.02 mol/L 四苯硼钠滴定液开始滴定，边滴边摇匀，水层颜色逐渐变浅，变为乳白色即接近终点，接近终点时须强力振摇。待氯仿层的蓝色消失，水层呈淡紫色，即为终点，记录四苯硼钠标准溶液用量。重复测定两次，取两次平均值进行计算。同时作空白试验。空白试验将水代替样品重复上述步骤。

6.1.2.14.4.5 计算公式

若化学消毒剂中有效成分为苯扎溴铵，则其含量按公式（49）计算：

$$X = \frac{C \times V_{stp} \times M}{V \times 1000} \quad (49)$$

式中：

X ——苯扎溴铵含量，单位为克每千克或克每升（g/kg 或 g/L）；

C ——四苯硼钠滴定液的浓度，单位为摩尔每升（mol/L）；

Vstp ——四苯硼钠滴定液样品与空白体积差，单位为毫升（mL）；

M ——苯扎溴铵相对分子质量 384.4；

V ——取（液体）或称（固体或粘稠液体）样量，单位为毫升或克（mL 或 g）。若化学消毒剂中有效成分为苯扎氯铵，则式中 M 取苯扎氯铵平均相对分子质量 353.5。

6.1.2.14.4.6 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的3%。

6.1.2.14.4.7 注意事项

注意事项如下：

a) 滴定液应在有效期内使用。在常温（15 ℃～25 ℃）下保存时间一般不超过 2 个月，当溶液出现浑浊、沉淀、颜色变化等现象时，应重新制备。

b) 滴定液的消耗体积控制在 35 mL～40 mL 为宜。滴定液用量不宜超过滴定管所标示的量。若所测化学消毒剂中季铵盐含量过高，可适当减少取样量或经稀释后测定，以减少测定误差；若化学消毒剂中季铵盐含量过低，可增加取样量或采用灵敏度更高的方法进行测定。

c) 滴定速度一般保持在 6 mL/min～8 mL/min。滴定终点以氯仿层的蓝色消褪而水层呈淡紫色来指示，不易判断，故临近终点时要逐滴滴加、强烈振摇、静置分层后再仔细观察，若滴定过程中振摇不充分，可能使含量测定结果偏低。用白纸衬底观察，以便于正确地判断终点。

d) 与酒精或异丙醇等复配的消毒液，应预先对样品进行醇类加热挥发处理，冷却至室温补水后再测定。

e) 化学消毒剂中的一些成分可使氯仿层和水层乳化，即有机相和水相不分层，使得实验无法进行。此时宜采用 6.1.2.14.1～6.1.2.14.3。

f) 该法测定的是季铵盐总量，若需测定每种季铵盐成分，应采用 6.1.2.14.1～6.1.2.14.3 方法。

g） 氯仿属于高毒物质，实验废液严禁倒入下水道，应由专门机构妥善处理。

6.1.2.15 甲酚皂（煤酚皂，C7H8O）含量的测定

6.1.2.15.1 原理

采用色谱柱分离，氢火焰离子化检测器检测，根据保留时间定性，峰面积内标法定量。

6.1.2.15.2 色谱参考条件

DB-225毛细管色谱柱（键合氰乙基甲基聚硅氧烷，30 m×0.25 mm×0.25μm）或同等极性的毛细管色谱柱；柱温110 ℃；进样口温度：200 ℃；检测器FID温度：210 ℃；氮气流量45 mL/min；空气流量450 mL/min；氢气流量40 mL/min；分流比2:1。

6.1.2.15.3 校正因子测定

精密称取水杨醛约1.3 g，置50 mL容量瓶中，加乙醚使溶解并稀释至刻度，摇匀，作为内标溶液。另精密称取邻甲酚对照品约0.65 g，至25 mL容量瓶中，加乙醚使溶解并稀释至刻度，摇匀，作为对照品溶液。精密量取对照品溶液和内标溶液各5mL，置具塞试管中，密塞，摇匀。取1μL注入气相色谱仪，计算邻甲酚的校正因子，再乘以1.042，即间甲酚、对甲酚的校正因子。

6.1.2.15.4 样品测定

精密称取适量样品置分液漏斗中，加盐酸0.1 mL，摇匀，加水3 mL，摇匀，精密加入乙醚20 mL，轻轻振摇，静置分层，弃去水层，加水5 mL，轻轻振摇，分层，弃去水层。精密量取乙醚提取液5 mL和内标溶液5 mL，置具塞试管中，摇匀，取1μL注入气相色谱仪，测定。

6.1.2.15.5 计算公式

计算公式如下：

a） 邻甲酚校正因子计算见公式（50）。

$$f_1 = \frac{A_{标} \times m_{内}}{A_{内} \times m_{标}} \quad (50)$$

式中：

f_1——邻甲酚校正因子；

$A_{内}$——内标物质峰面积；

$A_{标}$——邻甲酚峰面积；

$m_{标}$——由微量进样器注入气相色谱仪中所检测分析的邻甲酚标准的质量，单位为克（g）；

$m_{内}$——由微量进样器注入气相色谱仪中所检测分析的内标物的质量，单位为克（g）。

b） 间甲酚、对甲酚校正因子计算见公式（51）。

$$f_2 = 1.042 f_1 \quad (51)$$

式中：

f_1——邻甲酚校正因子；

f_2——间甲酚、对甲酚校正因子；

c） 样品中甲酚异构体含量计算见公式（52）。

$$C=\frac{(A_1\times f_1+A_2\times f_2)\times m_1\times \mathrm{b}}{A\times w}\times 100\% \cdots\cdots (52)$$

式中：

C——甲酚皂含量，%；

A——内标物质峰面积；

A_1——邻甲酚峰面积；

A_2——间、对甲酚峰面积；

f_1——邻甲酚校正因子；

f_2——间甲酚、对甲酚校正因子；

m_1——内标物取样量，单位为克（g）；

w——样品实际取样量；

b——样品定容所用乙醚体积与内标标准定容所用乙醚体积之比。

6.1.2.16 苯甲酸、水杨酸和山梨酸含量的测定

6.1.2.16.1 原理

苯甲酸、水杨酸和山梨酸在280 nm处有紫外吸收，可用高效液相色谱进行分离，并根据保留时间定性，峰面积定量。

6.1.2.16.2 色谱参考条件

色谱柱：C_{18}柱；流动相：0.05 mol/L磷酸二氢钾/甲醇/三乙胺（500/500/1，用磷酸调pH至4.3～4.4）。分析前，经0.45μm 滤膜过滤及真空脱气；检测波长：280 nm。

6.1.2.16.3 标准溶液的制备

称取水杨酸、苯甲酸和山梨酸各0.25 g（精确至0.1 mg），置于100 mL棕色容量瓶中，加甲醇使其溶解并定容至刻度，摇匀。精密吸取1.00 mL于50 mL棕色容量瓶中，用流动相稀释至刻度，摇匀，此溶液各成分浓度为0.0500 g/L。

6.1.2.16.4 样品溶液的制备

精密称取样品约0.5 g，置于50 mL棕色容量瓶中，加甲醇40 mL，超声处理3 min，加甲醇至刻度，摇匀，过滤，弃去初滤液，精密吸取滤液1.00 mL 置另一棕色容量瓶中，用流动相定容至刻度，摇匀。

6.1.2.16.5 样品测定

吸取标准溶液和样品溶液各10 μL，分别注入液相色谱仪，记录峰面积，与标准溶液比较而定量。

6.1.2.16.6 计算公式

计算公式见式（53）。

$$X(\%)=\frac{\rho_{标}\times A_{样}\times F\times V}{A_{标}\times m\times 1000}\times 100\% \cdots\cdots (53)$$

式中：

X——样品中各成分含量；

$\rho_{标}$——标准溶液质量浓度，单位为克每升（g/L）；

$A_{样}$——样品测定峰面积；

F——样品溶液稀释倍数；

V——样品定容体积，单位为毫升（mL）；

$A_{标}$——标准溶液峰面积；

m——样品质量，单位为克（g）。

6.1.2.17 2,4,4'-三氯-2'-羟基二苯醚（DP300）含量的测定

6.1.2.17.1 原理

2，4，4’-三氯-2’-羟基二苯醚在280 nm处有紫外吸收，可用反相高效液相色谱（HPLC）分离，并根据保留时间定性，峰面积定量。

6.1.2.17.2 试剂配制

甲醇（色谱纯）；2,4,4’-三氯-2’-羟基二苯醚标准溶液：准确称取2,4,4’-三氯-2’-羟基二苯醚标准品0.1 g，用少量甲醇溶解后并定容至100 mL，此溶液2,4,4’-三氯-2’-羟基二苯醚浓度为1.00 g/L。

6.1.2.17.3 色谱参考条件

色谱柱：C_{18}柱（150 mm×4.6 mm 5 μm）；流动相：甲醇/水（80/20），分析前，经0.45μm滤膜过滤及真空脱气；流速：1.5 mL/min；检测波长：280 nm；柱温：25 ℃。

6.1.2.17.4 标准曲线的绘制

用2,4,4’-三氯-2’-羟基二苯醚标准溶液配制质量浓度分别为0 mg/L、200 mg/L、400 mg/L、600 mg/L和800 mg/L的标准系列。在设定色谱条件下，分别取5μL进行分析。以标准系列质量浓度ρ为横坐标，峰面积Y为纵坐标，进行线性回归处理，得到线性方程。

6.1.2.17.5 样品测定

若消毒剂中2,4,4’-三氯-2’-羟基二苯醚的标示浓度过高，应适当稀释，使其稀释后浓度在标准曲线线性范围内。对于膏体样品应先用流动相配制成溶液。经0.45μm滤膜过滤备用。在设定的色谱条件下，进5 μL样品溶液进行分析。根据峰面积，从线性方程计算出相应的2,4,4’-三氯-2’-羟基二苯醚浓度。根据取样量和稀释倍数，换算出样品中2,4,4’-三氯-2’-羟基二苯醚的最终浓度。

6.1.2.17.6 注意事项

本方法适用于测定消毒剂中的2,4,4’-三氯-2’-羟基二苯醚有效成分。如果遇到某些有干扰的消毒剂，可适当调整色谱条件以达到最佳分离效果。

6.1.2.18 对氯间二甲苯酚含量的测定

6.1.2.18.1 原理

对氯间二甲苯酚在220 nm或280 nm处有紫外吸收，可用反相高效液相色谱（HPLC）分离，并根据保留时间定性，峰面积定量。

6.1.2.18.2 试剂配制

甲醇（色谱纯）；对氯间二甲苯酚标准溶液：准确称取对氯间二甲苯酚标准品0.1 g，用少量甲醇溶解后并定容至100 mL，此溶液对氯间二甲苯酚浓度为1.00 g/L。

6.1.2.18.3 色谱参考条件

色谱柱：C_{18}柱（150 mm×4.6 mm,5 μm）；流动相：甲醇/水（70/30），分析前，经0.45μm滤膜过滤及真空脱气；流量：1.00 mL/min；紫外检测波长：220 nm；柱温：25 ℃。

6.1.2.18.4 标准曲线的绘制

用对氯间二甲苯酚标准溶液配制质量浓度分别为0 mg/L、200 mg/L、400 mg/L、600 mg/L和800 mg/L的标准系列。在设定色谱条件下，分别取5 μL进行分析。以标准系列质量浓度ρ为横坐标，峰面积Y为纵坐标，进行线性回归处理，得到线性方程。

6.1.2.18.5 样品测定

对膏体样品和含量较高的液体样品，应用流动相稀释，进样前所有样液经0.45μm滤膜过滤。在设定的色谱条件下，进5μL样品溶液进行分析。根据峰面积，从线性方程计算出相应的对氯间二甲苯酚浓度。根据取样量和稀释倍数，换算出样品中对氯间二甲苯酚的最终含量。

6.1.2.18.6 注意事项

本方法适用于测定消毒剂中的对氯间二甲苯酚有效成分。如果遇到某些有干扰的消毒剂，可适当调整色谱条件以达到最佳分离效果。若在220 nm处有干扰时，可在280 nm处测定。

6.1.2.19 邻苯二甲醛（O-phthalaldehyde， OPA）含量的测定

6.1.2.19.1 原理

样品中邻苯二甲醛经预处理后，以气相色谱法-氢火焰离子化检测器（GC-FID）分析，保留时间定性，峰面积外标法定量。

6.1.2.19.2 试剂配制

乙醇溶液（1+1）：用量筒量取100 mL无水乙醇（优级纯）于烧杯中，加入100 mL纯水，混匀。

6.1.2.19.3 邻苯二甲醛储备液

称取0.3 g（精确至0.1 mg）邻苯二甲醛标准物质置于100 mL容量瓶中，用乙醇溶液（1+1）溶解、定容，此储备液浓度为3000 mg/L。

6.1.2.19.4 色谱参考条件

色谱柱：聚乙二醇毛细管柱（30.0 m×0.25 mm×0.25 μm）；检测器：FID；温度：柱温180 ℃；汽化室温度250 ℃；检测器温度250 ℃；柱流速：1.0 mL/min；分流比：30:1；气体流量：氢气40 mL/min，空气450 mL/min，氮气40 mL/min，进样量：1 μL。

6.1.2.19.5 标准曲线的绘制

从储备液中准确移取0.20 mL、0.50 mL、1.00 mL、3.00 mL、5.00 mL和10.0 mL溶液于25 mL容量瓶中，以乙醇溶液（1+1）定容，则工作溶液浓度依次为24.0 mg/L、60.0 mg/L、120 mg/L、360 mg/L、600 mg/L和1200 mg/L。在相同的气相色谱条件下，测定其峰面积，绘制浓度-峰面积校准曲线，计算线性回归方程。

6.1.2.19.6 样品的预处理

样品用乙醇溶液（1+1）稀释后，直接用气相色谱仪测定。

6.1.2.19.7 样品测定

将处理好的样品依次进入气相色谱仪，测得峰面积，根据其峰面积从校正曲线或从线性回归方程中查出相应含量。根据取样量和稀释倍数，换算出样品中邻苯二甲醛的最终浓度。

6.1.2.19.8 最低检出限

本方法的检出限2.0 mg/L。

6.1.2.20 氯离子含量的测定

6.1.2.20.1 试剂准备

制备试剂过氧化氢溶液 [$\omega(H_2O_2)$ = 30%]、氢氧化钠溶液 [c(NaOH) = 1.0 mol/L]、硝酸溶液 [$c(HNO_3)$ = 1.0 mol/L]、硝酸溶液 [$c(HNO_3)$ = 0.1 mol/L]、二苯卡巴腙-溴酚蓝混合指示剂；制备并标定硝酸汞标准溶液{$c[1/2Hg(NO_3)_2]$ = 0.014 mol/L} （见GB/T 601-2016 化学试剂 标准滴定溶液的制备）。

6.1.2.20.2 样品制备

精密吸取液体含氯消毒剂适量，使其相当于有效氯约 0.1 g，置 1000 mL 容量瓶中，加蒸馏水至刻度，混匀。对固体含氯消毒剂，精密称取适量使其相当于有效氯约 0.1 g，置烧杯中以蒸馏水溶解，转入 1000 mL 容量瓶中。称量杯及烧杯用蒸馏水洗 3 次，洗液全部转入容量瓶。

6.1.2.20.3 样品预处理

取 6.1.2.20.2 中的样品 150 mL，置于 250 mL 锥形瓶中，将样品用氢氧化钠溶液调节至中性或弱碱性，加入 1 mL 过氧化氢，搅拌均匀。

6.1.2.20.4 滴定

取 6.1.2.20.3 中的样品及纯水各 50 mL，分别置于 250 mL 锥形瓶中，加 0.2 mL 二苯卡巴腙-溴酚蓝指示剂，用 1.0 mol/L 硝酸调节样品 pH。使溶液由蓝色变成纯黄色（如样品为酸性，先用 1.0 mol/L 氢氧化钠溶液调节至呈蓝色），再加 0.1 mol/L 硝酸 0.6 mL，此时溶液 pH 为 3.0±0.2（注意，应严格

控制 pH，酸度过大，汞离子与指示剂结合能力减弱，使结果偏高，反之，终点将提前使结果偏低）。用硝酸汞标准溶液滴定，当临近终点时，溶液呈现暗黄色。此时，缓慢滴定，并逐滴充分摇荡，当溶液呈当溶液呈淡橙红色，泡沫呈紫色时即为终点（注意，如果水样消耗硝酸汞标准液大于 10 mL，应取少量样品稀释后再测定）。

6.1.2.20.5　计算公式

样品氯化物（以 Cl^-计）的质量浓度计算见公式（54）：

$$\rho(Cl^-)=\frac{(V_1-V_0)\times C\times 0.50}{V\times 0.014} \quad (54)$$

式中：

$\rho(Cl^-)$——样品中氯化物（以Cl^-计）的质量浓度，单位为克每升（g/L）；

C——硝酸汞滴定液的浓度，单位为摩尔每升（mol/L）；

V_0——空白（纯水）消耗硝酸汞标准溶液体积，单位为毫升（mL）；

V_1——样品消耗硝酸汞标准溶液体积，单位为毫升（mL）；

V——样品体积，单位为毫升（mL）；

0.50——1 mL硝酸汞标准溶液相当于氯化物（以Cl^-计）的质量，单位为毫克每毫升（mg/mL）。

6.1.2.21　次氯酸含量的测定

6.1.2.21.1　测定 pH

按照6.3测定溶液的pH值。

6.1.2.21.2　测定氯离子浓度

测定溶液的氯离子浓度的方法见6.1.2.20。

6.1.2.21.3　次氯酸含量的计算

6.1.2.21.3.1　当溶液的 pH 大于 5.0 时，可按公式（55）计算次氯酸的含量。

$$Y=\frac{1}{1+K_a\times 10^{pH}}\times 100\% \quad (55)$$

式中：

Y——次氯酸占有效氯的百分比，%；

pH——溶液pH；

Ka——次氯酸的电离平衡常数，常温下Ka值为3.8×10^{-8}。

6.1.2.21.3.2　当溶液的 pH 值小于 5.0 时，可按公式（56）计算次氯酸的含量。

$$Y=\frac{1}{10^{-pH-1.55}\times\rho(Cl^{-1})\times K^{-1}+1}\times 100\% \quad (56)$$

式中：

Y——次氯酸占有效氯的百分比，%；

K——化学反应（$Cl_2 + 2H_2O \rightleftharpoons HClO + H_3O^+ + Cl^-$）的平衡常数，常温下K值为$5.5\times 10^{-4}$；

pH——溶液pH；

$\rho(Cl^-)$——溶液中Cl^-的质量浓度，单位为克每升（g/L）。

6.1.2.22 过碳酸钠消毒剂中四乙酰乙二胺(TAED)含量的测定（气相色谱法）

6.1.2.22.1 原理

用气相色谱的内标法测定过碳酸钠消毒剂中四乙酰乙二胺(TAED)含量，样品用乙腈溶解制成溶液，将内标物加入到该溶液中，注入气相色谱仪，经毛细管柱分离，火焰电离化检测器（FID）检测，根据保留时间定性，响应因子、峰面积比较定量。

6.1.2.22.2 试剂与材料

6.1.2.22.2.1 乙腈（C_2H_3N）：分析纯。

6.1.2.22.2.2 载气：色谱用。

6.1.2.22.2.3 辅助载气：色谱用。

6.1.2.22.2.4 有机相微孔滤膜：0.45μm。

6.1.2.22.3 标准品

6.1.2.22.3.1 硬脂酸甲酯（$C_{19}H_{38}O_2$，CAS 号：112-61-8）：纯度≥99.0%。

6.1.2.22.3.2 四乙酰乙二胺($C_{10}H_{16}O_4N_2$ ，CAS 号:10543-57-4)：纯度≥99.0%。

6.1.2.22.4 仪器和设备

6.1.2.22.4.1 气相色谱仪：具有火焰电离化检测器（FID）。

6.1.2.22.4.2 弹性石英毛细管柱： 推荐 100%二甲基聚硅氧烷为固定液的弹性石英毛细管柱(25 m×0.25 mm, 0.25μm df），或等效色谱柱。

6.1.2.22.4.3 分析天平：感量 0. 1 mg。

6.1.2.22.4.4 研磨均质器。

6.1.2.22.5 仪器参考条件

6.1.2.22.5.1 载气：氢或氦压力为 15 psig，流速为 50 mL/min。

6.1.2.22.5.2 进样器：分流/不分流进样器。

6.1.2.22.5.3 进样量：1.5μL。

6.1.2.22.5.4 进样器温度：250 ℃。

6.1.2.22.5.5 检测器温度：300 ℃。

6.1.2.22.5.6 升温程序：150 ℃～220 ℃，以 10 ℃/min 速度升温；220 ℃～300 ℃，以 15 ℃/min 速度升温。

6.1.2.22.6 分析步骤

6.1.2.22.6.1 样品前处理

称取约50 g的待测样品，用研磨均质器研磨混匀后备用。

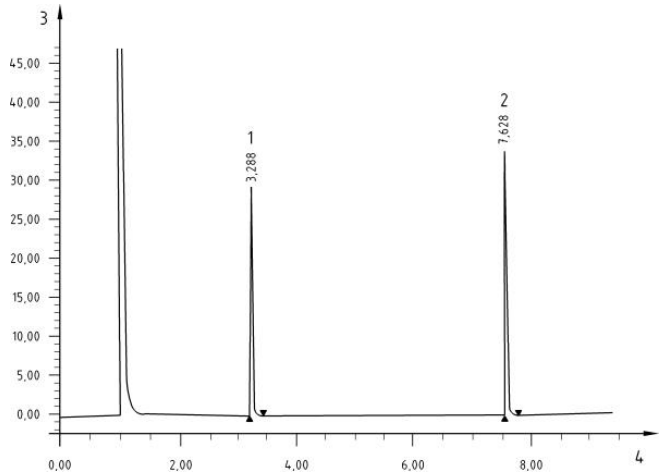
6.1.2.22.6.2 **校准**

校准方法如下：

a) 内标溶液的配制：称取约 250 mg（精确至 0.1 mg）硬脂酸甲酯，置于 100 mL 容量瓶中，用乙腈稀释并定容，充分混匀；

b) 标准溶液的配制：称取 25 mg，50 mg，75 mg，100 mg 4 份 TAED 标准物质（精确至 0.1 mg），分别置于 20 mL 容量瓶中，精确加入 20 mL 内标溶液，溶解样品；

c) 响应因子 RF 的测定：6.1.2.22.5 的色谱操作条件系典型操作参数，分析者可以根据仪器的特点，对操作参数作适当调整，以获得最佳效果。待仪器基线稳定后，向气相色谱仪注入 1.5 μL 标准溶液，记录色谱图，每个标准溶液重复 3 次。得到的典型色谱图如下。



标引序号说明：

1 ——TAED；

2—— 硬脂酸甲酯(内标物)；

3 ——电压，mv；

4 ——时间，min。

图16 典型的含 50mgTAED 标准溶液气相色谱图

计算每个色谱图中TAED和内标物的峰面积，通过以(A_{IS}/A_I)对(m_{IS}/m_I)线性回归分析求得校准标准曲线。TAED相对内标物的响应因子即为校准标准曲线的斜率。如果相关系数小于0.98，则应重新配制标准溶液和测定。

或利用公式（57）计算各色谱响应因子RF_i：

$$RF_i = (A_{IS} \times m_I)/（A_I \times m_{IS}） \cdots\cdots (57)$$

式中：

A_I——标准溶液中TAED的峰面积；

A_{IS}——标准溶液中硬脂酸甲酯的峰面积；

m_I——标准溶液中TAED的质量，单位为毫克（mg）；

m_{IS}——标准溶液中硬脂酸甲酯的质量，单位为毫克（mg）。

响应因子RF为所有RF_i的平均值。如果RF的相对标准偏差大于3%，重复校准程序并重新注入。

注意：不需要每次测定样品都要做多点校准，但是在每次测试前，用50 mgTAED加20 mL内标溶液做单点校准是需要做的，响应因子与多点校准的平均值相差应小于0.5%。

6.1.2.22.6.3 测定

测定方法如下：

a) 试样溶液的配制:称取约 500 mg（精确至 0.1 mg）样品，于 100 mL 的容量瓶中。加入 250 mg（精确至 0.1 mg） 脂酸甲酯，用乙腈稀释并定容，充分混匀。如果溶液混浊，则通过 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

b) 试样含量的测定:于上述色谱操作条件下，用微量注射器吸取 1.5 μL 试样溶液直接注入气相色谱仪，记录色谱图，重复 2 次。其典型色谱图参考图 16。

6.1.2.22.7 计算公式

样品中TAED的质量百分含量，$\omega(C_{10}H_{16}O_4N_2)$，按公式（58）计算：

$$\omega(C_{10}H_{16}O_4N_2) = (RF \times m_{IS} \times A_I \times 100)/(m \times A_{IS}) \quad \cdots\cdots (58)$$

式中：

RF——响应因子；

m_{IS}——试样溶液中硬脂酸甲酯的质量，单位为毫克（mg）；

m——样品质量，单位为毫克（mg）；

A_{IS}——样品溶液中硬脂酸甲酯的峰面积；

A_I——样品溶液中TAED的峰面积。

6.1.2.22.8 允许误差

在重复性条件下获得的两次测定结果的绝对差值不得大于平均值的10%。

6.1.2.23 苯酚含量的测定方法

6.1.2.23.1 原理

采用容量分析法。$KBrO_3$与KBr在酸性介质中产生Br_2，Br_2与苯酚发生取代反应，生成稳定的三溴苯酚，剩余的Br_2与KI反应产生I_2，可以用$Na_2S_2O_3$标准溶液滴定，根据空白（以纯水代替试样）与试样消耗$Na_2S_2O_3$标准溶液的差值，计算消毒剂中苯酚的含量。

6.1.2.23.2 消毒剂中苯酚含量的测定

取适量消毒剂（使含苯酚约0.75 g）置于500 mL容量瓶中，加纯水适量使溶解并稀释至刻度，充分混匀；精确吸取25 mL置碘量瓶中，精确加0.1 mol/L溴滴定液（配制及标定见6.1.3.9）30 mL，再加盐酸5 mL，立即密塞，振摇30 min，静置15 min后，注意微开瓶塞，加碘化钾（100 g/L）试液6 mL，立即密塞，充分振摇后，加三氯甲烷1 mL，以0.1 mol/L硫代硫酸钠标准溶液（配制及标定见6.1.3.1）滴定，至近终点时，加0.5%淀粉指示液1 mL，继续滴定至蓝色消失，并将滴定结果以空白试验校正。按公式（59）、（60）计算消毒剂中苯酚的含量。

$$X_1 = \frac{(V_2 - V_1) \times C \times 0.01568}{m} \times 20 \times 100 \cdots\cdots (59)$$

$$X_2 = \frac{(V_2 - V_1) \times C \times 0.01568}{V} \times 20 \times 1000 \cdots\cdots (60)$$

式中：

X_1——试样中苯酚的含量（质量分数），%；

X_2——试样中苯酚的含量，单位为克每升（g/L）；

V_1—— 试样消耗硫代硫酸钠标准滴定溶液体积，单位为毫升（mL）；

V_2——空白试验消耗硫代硫酸钠标准滴定溶液体积，单位为毫升（mL）；

C——硫代硫酸钠标准滴定溶液浓度，单位为摩尔每升（mol/L）；

0.01568——1/6苯酚（C_6H_5OH）的摩尔质量，单位为克每毫摩尔（g/mmol）；

20 ——试样稀释倍数（500/25）；

m——试样取样量，单位为克（g）；

V——试样取样量，单位为毫升（mL）。

6.1.2.24 活性氧（Oxone）分析方法

6.1.2.24.1 第一法（活性氧/活性成分的测试方法）

6.1.2.24.1.1 操作步骤

测定方法如下：

a) 准确称量 0.4 g±0.05 g（精确到 0.0001 g）样品，并记录样品重量 W_s；

b) 加入约 75 mL 纯水，使样品完全溶解；

c) 加入足够量的冰使溶液温度降至 20 ℃以下；

d) 加入 1 mL 2%的钼酸铵溶液和 10 mL 20%的硫酸溶液；

e) 加入 10 mL 25%的碘化钾溶液；

f) 边磁力搅拌边用 0.1 mol/L 硫代硫酸钠标准溶液（$C_{Na_2S_2O_3}$，配制及标定见 6.1.3.1）滴定，待溶液变为淡黄色时（接近滴定终点）加入淀粉指示剂（5%）继续滴定，溶液从蓝色变为无色并保持 30 s 不变，即为滴定终点。记录消耗的硫代硫酸钠标准溶液体积 V；

g) 重复步骤 b）～f），做空白试验。记录消耗的硫代硫酸钠标准溶液体积 V_0；

h) 使用如下计算公式计算活性氧/活性成分%AO：

$$\%AO = \frac{C_{Na_2S_2O_3} \times (V - V_0) \times 0.076 \times 100}{W_s} \cdots\cdots (61)$$

i) 重复三次，取平均值。

6.1.2.24.1.2 含水率测试方法

测试方法如下：

a) 准确称取 5 g±0.5 g（精确到 0.01 g）样品，并记录样品重量 W_1；

b) 在 65℃±0.5 ℃的烘箱中烘 30 min；

c) 把样品置于干燥器中冷却至室温，并称重，记录样片重量 W_2；

d) 计算含水率，按公式（62）：

$$\%Moisture = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100 \quad (62)$$

e） 重复三次取平均值。

6.1.2.24.2 第二法（活性氧含量的测定方法）

6.1.2.24.2.1 原理

过碳酸钠消毒剂溶于水分解为碳酸钠和过氧化氢，用硫酸中和碳酸钠并使溶液呈酸性，在酸性条件下，过氧化氢与高锰酸钾发生氧化还原反应，根据高锰酸钾滴定液的消耗量，确保活性氧的含量，反应式如下：

$2KMnO_4+3H_2SO_4 + 5H_2O_2 =K_2SO_4+2MnSO_4 +5O_2\uparrow + 8H_2O$

6.1.2.24.2.2 试剂

试剂如下：

a） 硫酸溶液：1＋3；

b） 高锰酸钾标准滴定溶液：c（1／5 $KMnO_4$）≈ 0.1 mol／L。

6.1.2.24.2.3 操作步骤

称取约5 g试样（精确至0.0002 g），置于250 mL烧杯中。加少量水润湿，加入约25 mL硫酸溶液使试样全部溶解。将试验溶液全部转移至500 mL容量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀。用移液管移取20 mL试验溶液，置于锥形瓶中，用高锰酸钾标准滴定溶液滴定至溶液呈粉红色，并在30 s内不消失即为终点。同时进行空白试验。空白试验应与测定平行进行，并采用相同的分析步骤，取相同量的所有试剂（标准滴定溶液除外），但空白试验不加试样。

6.1.2.24.2.4 计算公式

活性氧含量以氧（O）的质量分数W_1计，数值以％表示，按公式（63）计算：

$$W_1 = \frac{[(V - V_0)/1000]c \times M}{m \times 20 \times 500} \times 100\% \quad (63)$$

式中：

V ——滴定试验溶液所消耗的高锰酸钾标准滴定溶液的体积的数值，单位为毫升（mL）；

V_0 ——空白试验所消耗的高锰酸钾标准滴定溶液的体积的数值，单位为毫升（mL）；

c ——高锰酸钾标准滴定溶液浓度的准确数值，单位为摩尔每升（mol/L）；

m ——试料质量的数值，单位为克（g）；

M ——氧（1/2 O）的摩尔质量的数值，单位为克每摩尔（g/mol）（M＝7.999）。

取平行测定结果的算术平均值为测定结果，两次平行测定结果的绝对差值不大于0.1％。

6.1.2.25 聚乙烯吡咯烷酮含量的测定方法

6.1.2.25.1 试验原理

聚乙烯吡咯烷酮在C_{18}反相色谱柱上有保留行为，可与样品中的其他组分进行分离。其在205 nm波长处有较明显紫外吸收，故采用紫外吸收检测器进行检测，依据峰面积和浓度之间的定量关系测定消毒剂中该物质的含量。

6.1.2.25.2　试验试剂和器材

6.1.2.25.2.1　试验试剂

乙腈（色谱级）、超纯水。

6.1.2.25.2.2　仪器设备或试剂材料

高效液相色谱仪、电子天平（感量0.0001 g）、移液管、容量瓶。

6.1.2.25.3　色谱条件

6.1.2.25.3.1　色谱柱：C_{18}柱（4.6 mm×150 mm，5 μm）。

6.1.2.25.3.2　流动相：乙腈：水=5：95（体积比）。

6.1.2.25.3.3　流速：1.0 mL/min。

6.1.2.25.3.4　紫外检测波长：205 nm。

6.1.2.25.3.5　柱温：20 ℃。

6.1.2.25.3.6　进样量：20 μL。

6.1.2.25.4　试验步骤

6.1.2.25.4.1　对照品溶液的配制

精密称取聚乙烯吡咯烷酮K30对照品0.1 g于100 mL容量瓶中，加纯水溶解，定容至刻度，摇匀，得浓度为1.00 mg/mL标准溶液。再用纯水将K30标准溶液进行系列稀释，配制成浓度为0.05 mg/mL、0.10 mg/mL、0.20 mg/mL、0.40 mg/mL和0.80 mg/mL的标准系列。

6.1.2.25.4.2　绘制标准曲线

在设定色谱条件下，分别取20 μL进行分析。以标准系列质量浓度X为横坐标，峰面积Y为纵坐标，绘制标准曲线，进行线性回归处理，得到线性方程。

6.1.2.25.4.3　供试品溶液的配制及检测

精密量取本品聚维酮碘溶液2 mL于100 mL容量瓶中，加水溶解，定容至刻度，摇匀，稀释50倍作为供试样品。按上述步骤测其峰面积，代入标准线性方程，根据取样量和稀释倍数计算出供试品中聚乙烯吡咯烷酮K30的含量。

6.1.2.25.5　计算公式

聚乙烯吡咯烷酮含量按公式（64）计算：

$$X = \frac{\rho \times V_2}{V_1 \times 1000} \times 100 \quad \cdots\cdots (64)$$

式中：

X——聚乙烯吡咯烷酮含量，%；

ρ——通过标准曲线计算的稀释液中聚乙烯吡咯烷酮的质量浓度，单位为克每升（g/L）；

V_2——样品定容体积，单位为毫升（mL）；

V_1——取样体积，单位为毫升（mL）。

6.1.2.25.6 精密度

为了考察方法间的重现性，在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算数平均值的5%。

6.1.2.25.7 注意事项

6.1.2.25.7.1 量器不能随意加热，容量瓶严禁加热。

6.1.2.25.7.2 该色谱条件下聚乙烯吡咯烷酮保留时间较短。

6.1.2.25.7.3 聚乙烯吡咯烷酮溶解时不能用力震荡，以免产生气泡影响定容。

6.1.2.25.7.4 色谱图中检出的物质，应与聚乙烯吡咯烷酮标准溶液的保留时间和紫外光谱图进行比较确证。如遇到有基体干扰的特殊样品，可通过调整流动相比例使之满足分离度。

6.1.2.26 聚氧乙烯脂肪醇醚的鉴别方法

6.1.2.26.1 方法原理

用红外照射有机物分子时，分子中的化学键或官能团可发生振动吸收，不同的化学键或官能团吸收频率不同，在红外光谱上将处于不同位置，从而可获得分子中含有何种化学键或官能团的信息。

6.1.2.26.2 仪器设备

傅里叶变换红外光谱仪、旋转蒸发仪、茄形瓶、减压泵、水浴锅。

6.1.2.26.3 样品预处理及制样

取适量样品于茄形瓶中，减压蒸馏除去水分得到待测样品，取1.0 mg左右干燥待测样品用KBr液膜法压片测定红外图谱，并与聚氧乙烯脂肪醇醚-8对照图谱比对。

6.1.2.26.4 谱图分析

图17为聚氧乙烯脂肪醇醚-8为代表的红外光谱。图中的2924 cm^{-1}、2856 cm^{-1}、1466 cm^{-1} 和1378 cm^{-1} 显示烷基吸收，-OH出现在3476 cm^{-1}，聚氧乙烯醚的特征吸收峰有1350 cm^{-1}(-CH_2-非平面摇摆振动，中等强度尖峰)、1116.7 cm^{-1} (C—O—C不对称伸缩，最强峰)、947 cm^{-1} (对称伸缩振动，较弱)、885 cm^{-1} (端基—CH_2CH_2OH的-CH_2-平面摇摆振动)、844 cm^{-1} (中间的聚氧乙烯平面摇摆振动)。

不同环氧乙烷加成数（EO数）的聚氧乙烯脂肪醇醚的红外光谱出现有规律的变化，较明显的是C—O—C不对称伸缩谱带为强峰，随EO数增大而增强，位置稍向低波数位移（从EO数3的1121 cm^{-1} 移至EO数11的1116 cm^{-1}），对称伸缩谱带强度也增大，波数稳定在949 cm^{-1} 附近。烷基中，1378 cm^{-1} 峰波数比较恒定，末端的平面摇摆由888 cm^{-1}低移至884 cm^{-1}，此2峰强度随EO数增大而减弱，而中间的EO数稳定在843 cm^{-1}， 强度增大，以上有关峰的强度变化可用于计算这类化合物的EO数。

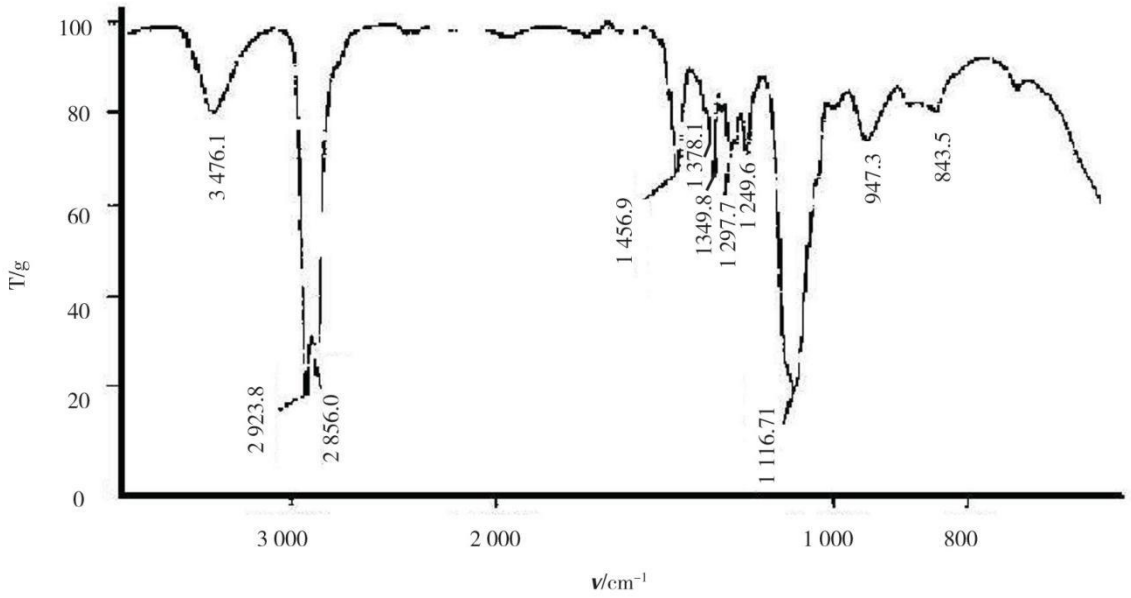


图17　聚氧乙烯脂肪醇醚-8 的红外光谱图

6.1.2.27　烷基酚聚氧乙烯醚的鉴别方法

6.1.2.27.1　方法原理

用红外照射有机物分子时，分子中的化学键或官能团可发生振动吸收，不同的化学键或官能团吸收频率不同，在红外光谱上将处于不同位置，从而可获得分子中含有何种化学键或官能团的信息。

6.1.2.27.2　仪器设备或试剂材料

傅里叶变换红外光谱仪、旋转蒸发仪、茄形瓶、减压泵、水浴锅。

6.1.2.27.3　样品预处理及制样

取适量样品于茄形瓶中，减压蒸馏除去水分得到待测样品，取1.0 mg左右干燥待测样品用KBr液膜法压片测定红外图谱，并与壬基酚聚氧乙烯醚-10对照图谱比对。

6.1.2.27.4　谱图分析

图18为壬基酚聚氧乙烯醚-10(NP-10)的红外光谱。除了显示聚氧乙烯的特征吸收峰外，还有苯环振动峰1609 cm^{-1}和1512 cm^{-1}尖峰，对位取代832 cm^{-1} 峰，芳醚C—O—C 1249 cm^{-1} 特征峰，EO中C—O—C强吸收峰出现在1116 cm^{-1}。不同EO数的NP，在1640 cm^{-1}～600 cm^{-1}范围内，相关峰的吸收强度发生变化，可用于定量计算其EO数。

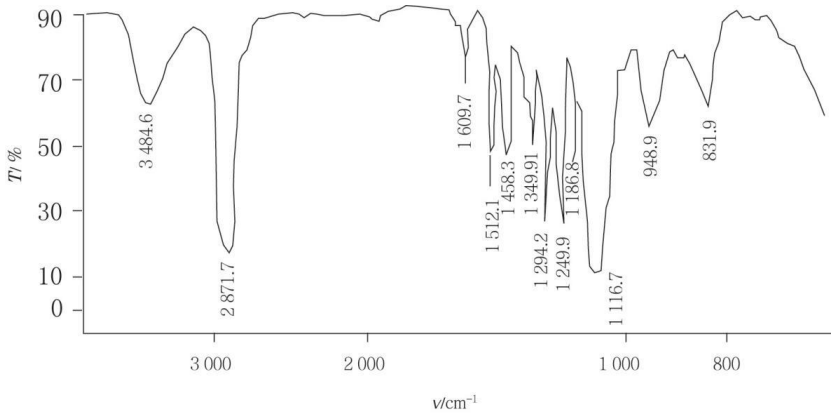


图18　NP-10的红外光谱图

6.1.2.28　溴氯-5,5-二甲基乙内酰脲及其有效卤素（以Cl计）含量测定

6.1.2.28.1　原理

在酸性溶液中，含溴消毒剂可以将碘化钾氧化生成碘。以淀粉溶液为指示剂，用硫代硫酸钠溶液滴定生成的碘，根据消耗的硫代硫酸钠溶液的量，计算出有效卤素（以Cl计）的含量。

6.1.2.28.2　试剂或材料

6.1.2.28.2.1　碘化钾溶液：300 g/L碘化钾(分析纯)溶液。

6.1.2.28.2.2　硫酸溶液：1份95%～98%的分析纯硫酸加5份去离子水配制而成。

6.1.2.28.2.3　淀粉指示剂：10 g/L淀粉溶液。

6.1.2.28.2.4　硫代硫酸钠溶液：0.1 mol/L硫代硫酸钠滴定液，配制并标定见6.1.3.1。

6.1.2.28.3　仪器设备

6.1.2.28.3.1　电子分析天平：精度0.1 mg。

6.1.2.28.3.2　磁力搅拌器。

6.1.2.28.4　试验步骤

6.1.2.28.4.1　粉剂、颗粒剂可直接称量，片剂用干燥的研钵研磨后称量。

6.1.2.28.4.2　称取样品0.15 g（精确至0.0001 g），加入干燥洁净的250 mL碘量瓶中，再放入一根磁力搅拌棒于碘量瓶中，然后顺序加入去离子水120 mL、碘化钾溶液10 mL和硫酸溶液20 mL，迅速盖好碘量瓶盖，加少量去离子水以密封瓶口，放在暗处的磁力搅拌器上，避光搅拌至样品溶解。

6.1.2.28.4.3　取下搅拌器上的碘量瓶，用蒸馏水冲洗瓶塞和瓶内壁，立刻用硫代硫酸钠滴定液滴定，至浅黄色时，加2 mL淀粉指示剂，溶液立即变为蓝色，继续用硫代硫酸钠滴定液滴定至蓝色刚好消失，放置30 s不变色为终点，记录消耗硫代硫酸钠滴定液的体积。

6.1.2.28.4.4　按上述步骤进行空白对照试验。

6.1.2.28.4.5　平行测定2次，取其含量平均值作为样品的有效卤素（以Cl计）含量。

6.1.2.28.5　试验数据处理

a)　溴氯-5,5-二甲基乙内酰脲含量以质量分数w_1计，数值以%表示，按公式（65）计算：

$$w_1 = \frac{(V/1000 - V_0/1000)c \times M/4}{m} \times 100 \quad \cdots\cdots (65)$$

式中：

w_1——溴氯-5,5-二甲基乙内酰脲含量，%；

V——试样消耗硫代硫酸钠滴定液的体积的数值，单位为毫升（mL）；

V_0——空白消耗硫代硫酸钠滴定液的体积的数值，单位为毫升（mL）；

c——硫代硫酸钠滴定液浓度的准确数值，单位为摩尔每升（mol/L）；

M——溴氯-5,5-二甲基乙内酰脲的摩尔质量的数值，单位为克每摩尔（g/mol）(M=241.5)；

m——称取样品的质量的数值，单位为克（g）。

b) 有效卤素（以 Cl 计）含量以质量分数 w_2 计，数值以%表示，按公式（66）计算：

$$w_2 = \frac{(V/1000 - V_0/1000)c \times M}{m} \times 100 \quad (66)$$

式中：

w_2 ——有效卤素（以Cl计）含量，%；

V——试样消耗硫代硫酸钠滴定液的体积的数值，单位为毫升（mL）；

V_0——空白消耗硫代硫酸钠滴定液的体积的数值，单位为毫升（mL）；

c——硫代硫酸钠滴定液浓度的准确数值，单位为摩尔每升（mol/L）；

M——有效卤素（以Cl计）摩尔质量的数值，单位为克每摩尔（g/mol）(M=35.45)；

m——称取样品的质量的数值，单位为克（g）。

c) 最终计算结果保留三位有效数字。

6.1.2.28.6 精密度

两次平行测试结果的绝对差值不大于两个测定值的算术平均值的0.5%。

6.1.2.29 1,3-二溴-5,5-二甲基乙内酰脲和有效溴（以 Br 计）含量测定

6.1.2.29.1 原理

在酸性溶液中，含溴消毒剂可以将碘化钾氧化生成碘。以淀粉溶液为指示剂，用硫代硫酸钠溶液滴定生成的碘，根据消耗的硫代硫酸钠溶液的量，计算出有效溴及1,3-二溴-5,5-二甲基乙内酰脲的含量。

6.1.2.29.2 试剂或材料

6.1.2.29.2.1 碘化钾：为分析纯。

6.1.2.29.2.2 硫酸溶液：1 份 95%～98%的分析纯硫酸加 8 份去离子水配制而成。

6.1.2.29.2.3 淀粉指示剂：为 5 g/L 淀粉溶液。

6.1.2.29.2.4 硫代硫酸钠溶液：0.1 mol/L 硫代硫酸钠滴定液，配制及标定见 6.1.3.1。

6.1.2.29.3 仪器设备

6.1.2.29.3.1 电子分析天平：精度 0.1 mg。

6.1.2.29.3.2 磁力搅拌器。

6.1.2.29.4 试验步骤

6.1.2.29.4.1 粉剂、颗粒剂可直接称量，片剂用干燥的研钵研磨后称量。

6.1.2.29.4.2 量取 125 mL 去离子水置于 250 mL 碘量瓶中，再加入 2 g 碘化钾，放入一根磁力搅拌棒。

6.1.2.29.4.3 称取样品 0.15 g（精确至 0.0001 g），置于上述碘量瓶中，在电磁搅拌器上充分搅拌，使样品完全溶解，加硫酸溶液20 mL，盖上盖并振摇混匀后加去离子水数滴于碘量瓶盖缘，置暗处5 min。

6.1.2.29.4.4 打开盖，让盖缘去离子水流入瓶内。用硫代硫酸钠滴定液滴定游离碘，边滴边摇匀。待

溶液呈淡黄色时，加入淀粉指示剂 10 滴，溶液立即变为蓝色。继续用硫代硫酸钠滴定液滴定至蓝色消失，放置 30s 不变色为终点，记录消耗硫代硫酸钠滴定液的体积。

6.1.2.29.4.5　按上述步骤进行空白试验。

6.1.2.29.4.6　平行测定 2 次，取其含量平均值作为样品的有效溴含量。

6.1.2.29.5　实验数据处理

实验数据处理如下：

a)　1,3-二溴-5,5-二甲基乙内酰脲的含量以质量分数 w_3 计，数值以%表示,按公式（67）计算：

$$w_3 = \frac{(V/1000 - V_0/1000)c \times M/4}{m} \times 100 \quad (67)$$

式中：

w_3 ——1,3-二溴-5,5-二甲基乙内酰脲的含量，%；

V ——试样消耗硫代硫酸钠滴定液的体积的数值，单位为毫升（mL）；

V_0 ——空白消耗硫代硫酸钠滴定液的体积的数值，单位为毫升（mL）；

c ——硫代硫酸钠滴定液浓度的准确数值，单位为摩尔每升（mol/L）；

M ——1,3-二溴-5,5-二甲基乙内酰脲摩尔质量的数值，单位为克每摩尔（g/mol）(M=285.94)；

m ——称取样品的质量的数值，单位为克（g）。

b)　有效溴（以 Br 计）含量以质量分数 w_4 计，数值以%表示，按公式（68）计算：

$$w_4 = \frac{(V/1000 - V_0/1000)c \times M}{m} \times 100 \quad (68)$$

式中：

w_4 ——有效溴（以Br计）含量，%；

V——试样消耗硫代硫酸钠滴定液的体积的数值，单位为毫升（mL）；

V_0 ——空白消耗硫代硫酸钠滴定液的体积的数值，单位为毫升（mL）；

c ——硫代硫酸钠滴定液浓度的准确数值，单位为摩尔每升（mol/L）；

M——有效溴（以Br计）摩尔质量的数值，单位为克每摩尔（g/mol）(M=79.90)；

m ——称取样品的质量的数值，单位为克（g）。

c)　最终计算结果保留三位有效数字。

6.1.2.29.6　精密度

两次平行测试结果的绝对差值不大于两个测定值的算术平均值的0.5%。

6.1.2.30　溶菌酶酶活性测定

6.1.2.30.1　原理

溶菌酶通过溶解革兰阳性菌细胞壁使细菌溶解，菌液在可见光范围内的吸光度降低，以溶壁微球菌为底物，用分光光度法，以450 nm波长处菌液单位时间内吸光度降低程度测定溶菌酶酶活性。

在室温25 ℃、pH为6.2时，在波长450 nm处，每分钟引起吸收度下降0.001为1个溶菌酶酶活性单位。

6.1.2.30.2 试剂

6.1.2.30.2.1 磷酸盐缓冲液：取磷酸二氢钠 10.4 g 与磷酸氢二钠 7.86 g 及乙二胺四乙酸二钠 0.37 g，加水溶解 至 1000 mL，调节 pH 至 6.2。

6.1.2.30.2.2 溶壁微球菌[Micrococcuslysodeik，CGMCC1.0634]。

6.1.2.30.3 试验步骤

6.1.2.30.3.1 样品溶液制备

量取样品，用磷酸盐缓冲液稀释成约1000 U/mL的溶液，稀释所用倍数记为N。

6.1.2.30.3.2 底物悬浮液的制备

临用前配制。称取溶壁微球菌15 mg～20 mg，加磷酸盐缓冲液0.5 mL～1 mL，在研钵内研磨3 min，再加磷酸盐缓冲液适量，使总体积约为50 mL，悬浮液于25 ℃±0.1 ℃在450 nm波长处测得的吸收度为0.70±0.05。

6.1.2.30.3.3 样品测定

量取25 ℃±0.1 ℃的底物悬浮液3 mL，置比色池中，在450 nm的波长处测定吸收度，作为0 s的读数A_0，然后量取25 ℃±0.1 ℃的供试品溶液0.15 mL（相当于溶菌酶7.5μg），加到比色池中，迅速混匀，用秒表计时，至60 s时再测定吸收度A；同时量取磷酸盐缓冲液0.15 mL，同法操作，做为空白试验，测得0 s的读数A'_0及60 s的读数A'。

平行测定3次，计算平均值。

6.1.2.30.3.4 计算公式

计算未知溶液中溶菌酶酶活性，见式（69）：

$$C = \frac{(A_0 - A) - (A'0 - A')}{0.15} \times N \times 10^3 \quad (69)$$

式中：

C——样品溶菌酶酶活性，单位为U/mL；

A_0——样品0s时的吸收度；

A——样品60s时的吸收度；

A'_0——空白0s时的吸收度；

A'——空白60s时的吸收度；

N——稀释倍数。

6.1.2.31 溶葡萄球菌酶酶活性测定

6.1.2.31.1 原理

以偶联活性艳蓝染料KNR的金黄色葡萄球菌细胞壁肽聚糖（KNR-PG）为色源底物，根据酶作用过程中定量地释放带有KNR染料基团的小分子可溶性片段产物，在除去未反应的不溶性底物后，对上清液进行比色测定溶葡萄球菌酶酶活性。

在pH10.0的1.2 mL反应体系下，37 ℃温度下，在波长595 nm处，每分钟使KNR-PG溶液吸光度值增加0.35的酶量为1个溶葡萄球菌酶酶活性单位。

6.1.2.31.2 试剂

6.1.2.31.2.1 溶葡萄球菌酶标准品溶液：按照溶葡萄球菌酶活性单位定义，对溶葡萄球菌酶冻干粉进行标定。需要时，用 Tris-HCl 缓冲液溶解，配制成 0.9 U/mL 的标准品溶液，-20 ℃贮存，每次试验用 1 支，避免反复冻融。

6.1.2.31.2.2 甘氨酸：分析纯。

6.1.2.31.2.3 氢氧化钠：分析纯。

6.1.2.31.2.4 三羟甲基氨基甲烷（Tris）：分析纯。

6.1.2.31.2.5 95%乙醇：分析纯。

6.1.2.31.2.6 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液：0.2 mol/L，pH10.0。

6.1.2.31.2.7 三羟甲基氨基甲烷盐酸缓冲液（Tris-HCl 缓冲液）：0.05 mol/L，pH7.5。

6.1.2.31.2.8 色源底物 KNR-PG 溶液：按照 WS/T 647 的附录 C 方法制备色源底物 KNR-PG，用甘氨酸-氢氧化钠缓冲液以 1:5 质量体积比例均匀悬浮。

6.1.2.31.3 试验步骤

6.1.2.31.3.1 标准曲线的制备

取洁净干燥的微量离心管6只，标号，按表14顺序每管中加入对应量的溶葡萄球菌酶标准品溶液，再加入不同量的0.2 mol/L甘氨酸-氢氧化钠缓冲液。然后按序号加入色源底物KNR-PG溶液130 μL，每管加入底物后迅速在旋涡混合仪上混匀。将加好溶液的微量离心管迅速移入37 ℃的恒温水浴锅中定时反应20 min。从水浴中取出微量离心管，每管中加入300 μL95%乙醇终止反应，10000 r/min离心10 min，离心结束后，取上清液于595 nm处，以0号管为空白测定吸光度。根据测得的吸光度值及相对应的标准品溶葡萄球菌酶酶活性（U/mL），求得线性回归曲线：

$$C_0 = （A - B）/K \quad (70)$$

式中：

C_0——标准品溶葡萄球菌酶酶活性，单位为（U/mL）；

A——吸光度；

B——截距；

K——标准曲线的斜率。

表14 标准曲线制备

名称	管号					
	0	1	2	3	4	5

溶葡萄球菌酶标准品溶液/μL	0	20	40	60	80	100
甘氨酸-氢氧化钠缓冲液/μL	770	750	730	710	690	670
底物/μL	130	130	130	130	130	130
95%乙醇/μL	300	300	300	300	300	300
溶葡萄球菌酶标准品溶液终浓度/U/mL	0	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1

6.1.2.31.3.2 **样品的测定**

待测样品的测定方法同标准曲线，取50 μL用于测定。平行测定3次，计算平均值。

6.1.2.31.4 **计算公式**

根据标准曲线，计算未知溶液中溶葡萄球菌酶酶活性，见式（71）：

$$C = C_0 \times V_{反} / V_{样} \times N \quad (71)$$

式中：

C ——样品溶葡萄球菌酶酶活性，单位为（U/mL）；

C_0 ——标准品溶葡萄球菌酶酶活性，单位为（U/mL）；

$V_{反}$——反应体系体积，为0.9mL；

$V_{样}$——样品加入体积，为0.05mL；

N ——样品稀释倍数。

6.1.2.32 **蛋白酶活性测定**

6.1.2.32.1 **范围及目的**

本方法描述了液体洗涤剂中蛋白酶活性的测定过程。

6.1.2.32.2 **试验原理**

蛋白酶用于在40 ℃下水解偶氮酪蛋白30 min。未分解的蛋白质用三氯乙酸沉淀，分解的产品用光谱定量分析。

6.1.2.32.3 **仪器设备**

分光光度计、分析天平、试管、10 mL容量瓶、pH计、涡流搅拌器、漏斗、中速滤纸（90 mm）、吸液管、恒温水浴（40 ℃）、秒表、容量瓶、移液枪。

6.1.2.32.4 **试验材料**

6.1.2.32.4.1 Alcalase 标准酶（1.61 AU/g—Novozyme）或者其他标准酶。

6.1.2.32.4.2 偶氮酪蛋白（磺胺—偶氮酪蛋白）。

6.1.2.32.4.3 Trizma 培养基（三羟甲基氨基甲烷）。

6.1.2.32.4.4 蒸馏水。

6.1.2.32.4.5 尿素。

6.1.2.32.4.6 三氯乙酸。

6.1.2.32.5 **预配溶液**

6.1.2.32.5.1 将 24.2 gTrizma 培养基溶解于 800 mL 蒸馏水中，用 1 mol/L 硫酸将 pH 调节至 8.5。

转移到 1 L 容量瓶中，用蒸馏水调节至刻度。25 ℃保存。

注：不早于测试前一天配制。

6.1.2.32.5.2　50%尿素溶液：将 50 g 尿素溶解于 100 mL 蒸馏水中。

注：保质期 3 个月，常温避光保存。

6.1.2.32.5.3　10%三氯乙酸终止剂：称量 25 g 三氯乙酸，转移到 250 mL 容量瓶中，用蒸馏水调节至刻度。

6.1.2.32.5.4　0.6%偶氮酪蛋白底物溶液：称量 0.6 g 偶氮酪蛋白，加入 10 mL50%的尿素溶液，搅拌至溶解。用 Tris 缓冲液调节至 100 mL，继续搅拌，直至无颗粒可见。为降低空白反应影响，应当天配制新鲜的底物溶液。

6.1.2.32.6　标准溶液的制备

6.1.2.32.6.1　常备标准溶液

从冷冻室内取出Alcalase标样，放在干燥器内，直至达到室温。用分析天平称量约0.0161 g冷冻、干燥的Alcalase（标准活度1.61 AU/g），记录精确的质量，定量移取至10 mL容量瓶中，用Tris缓冲液补充至定体积。

由此可得到活度大约是2.6×10^{-3} AU/g的常备溶液。通过称取的Alcalase标样准确质量计算常备溶液的蛋白酶的活度，至少保留4位有效数字。

6.1.2.32.6.2　标准工作溶液（每个浓度平行制备）

标准工作溶液如下：

a)　标准溶液 1(1.3×10^{-5} AU/mL)：吸取 0.05 mL 常备 Alcalase 标准溶液至 10mL 容量瓶中，用 Tris 缓冲液稀释至刻度。

b)　标准溶液 2(2.6×10^{-5} AU/mL)：吸取 0.10 mL 常备 Alcalase 标准溶液至 10 mL 容量瓶中，用 Tris 缓冲液稀释至刻度。

c)　标准溶液 3(5.2×10^{-5} AU/mL)：吸取 0.20 mL 常备 Alcalase 标准溶液至 10 mL 容量瓶中，用 Tris 缓冲液稀释至刻度。

d)　标准溶液 4(1.04×10^{-4} AU/mL)：吸取 0.40 mL 常备 Alcalase 标准溶液至 10 mL 容量瓶中，用 Tris 缓冲液稀释至刻度。

e)　标准溶液 5(2.08×10^{-4} AU/mL)：吸取 0.80 mL 常备 Alcalase 标准溶液至 10 mL 容量瓶中，用 Tris 缓冲液稀释至刻度。

6.1.2.32.7　样品溶液的制备（平行制样）

将待分析的样品的活度稀释至标准曲线范围内，方法如下：

a)　吸取 0.1 mL 待测样品至 10 mL 带塞的试管中，加入 4.9 mLTris 缓冲液，混匀。如果样品对吸管太粘，可称取 0.1 g 样品至 10 mL 容量瓶中，加入 4.9 mLTris 缓冲液稀释至刻度；

b)　吸取上面制备的溶液 0.05 mL 至 10 mL 量瓶中，加入 4.95 mLTris 缓冲液。至此，样品溶液的稀释因子是 5000，实际测量中可以根据样品的活度调节稀释因子。

6.1.2.32.8 试验步骤

6.1.2.32.8.1 将水浴设置到 40 ℃。

6.1.2.32.8.2 开始分析之前 10 min 内，先将底物溶液置于水浴中加热。

6.1.2.32.8.3 分别将每种样品（标准样品和待测样品）吸取 1.0 mL 至 20 mL 试管中。每种样品需要做平行分析。

6.1.2.32.8.4 将所有的试管放在 40 ℃水浴中保存约 1 min，以达到平衡。

6.1.2.32.8.5 开始反应：精确控制 30 s 间隔，向每支试管中加入 5 mL 底物溶液、涡流搅拌后再放回到水浴中。将每支试管在水浴中保持 30 min。

6.1.2.32.8.6 终止反应：将 5.0 mL 终止剂按 30 s 的间隔依次加入到每支试管中，涡流搅拌后在室温下放置 10 min。

注：30 s 间隔的时间可随操作熟练程度自行调整，但要求保证每个样品的反应时间精确控制在 30 min。

6.1.2.32.8.7 向标准空白和样品空白中分别加入 1.0 mLStd 2(5.2×10^{-5} AU/mL)溶液和样品溶液（可选择稀释后颜色最深的一个样品）。

6.1.2.32.8.8 15 min～20 min 内，用滤纸将所有的试管中试剂过滤到清洁干燥的试管中。

6.1.2.32.8.9 用分光光度计测量标准溶液、样品溶液和空白溶液在 390 nm 的吸光度，以蒸馏水做参比。

6.1.2.32.9 结果计算

6.1.2.32.9.1 用空白的吸光度补偿标准样品和待测样品的吸光度(标准样品和待测样品的吸光度减去相应的空白吸光度）。

6.1.2.32.9.2 绘制“标准浓度（AU/mL）vs 吸光度”图。

6.1.2.32.9.3 用 excel 表格或者科学计算方法参考标准图估计样品的浓度（线性回归）。

6.1.2.32.9.4 对吸取的样品，蛋白酶活性计算见式（72）：

$$R = A \times \mathrm{N} \quad (72)$$

式中：

R——蛋白酶活性，单位为AU/mL；

A——通过标准图线性回归得到的样品浓度；

N——稀释比例

如果要转换成AU/g除以样品的密度即可。

6.1.2.32.9.5 对称量的样品，蛋白酶活性计算见式（73）：

$$R = \frac{A \times \mathrm{N}}{W} \quad (73)$$

式中：

R——蛋白酶活性，单位为AU/g；

A——通过标准图线形回归得到的样品浓度；

W——样品的质量，单位为克（g）。

N ——稀释比例

6.1.3 滴定液的配制及其浓度标定

6.1.3.1 硫代硫酸钠（$Na_2S_2O_3$）滴定液

6.1.3.1.1 配制 0.1 mol/L 硫代硫酸钠滴定液时，称取 $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ 26 g，加无水碳酸钠 0.20 g，用纯水溶解成 1000 mL，摇匀。装于棕色玻璃瓶中，置暗处，30 d 后经过滤并标定其浓度。

6.1.3.1.2 标定浓度时，称取经 120 ℃烘干至恒重的基准重铬酸钾 0.15 g（精确至 0.0001 g），置于 250 mL 碘量瓶中，加纯水 50 mL 溶解。加 2 mol/L 硫酸 15 mL 和 200 g/L 碘化钾溶液 10 mL，盖上盖并混匀，加纯水数滴于碘量瓶盖缘，置暗处 10 min 后再加纯水 90 mL。在室温 20 ℃～25 ℃，用装于 50 mL 滴定管中的硫代硫酸钠滴定液滴定至溶液呈淡黄色，加 5 g/L 淀粉溶液 10 滴（溶液立即变蓝），继续滴定到溶液由蓝色变成亮绿色。记录硫代硫酸钠滴定液总毫升数，并将滴定结果用空白试验校正。若空白试验中有硫代硫酸钠消耗，则将滴定用去的硫代硫酸钠滴定液毫升数减去空白试验中其用量，得校正后的硫代硫酸钠滴定液毫升数。因为 1 mol/L 硫代硫酸钠滴定液 1 mL 相当于 0.04903 g 重铬酸钾，故可按公式（74）计算硫代硫酸钠滴定液浓度：

$$C(mol/L) = \frac{m}{0.04903 \times V} \quad \cdots\cdots (74)$$

式中：

C ——硫代硫酸钠滴定液浓度，单位为摩尔每升（mol/L）；

m ——碘量瓶中重铬酸钾质量，单位为克（g）；

V ——硫代硫酸钠滴定液（减空白）体积，单位为毫升（mL）。

用0.05mol/L硫代硫酸钠滴定液时，在临用前于容量瓶中加纯化水稀释0.1mol/L该液制成。必要时可标定其浓度。

6.1.3.1.3 注意事项如下：

a) 配制的碘化钾溶液及所用碘化钾易被空气氧化，每次取后应及时加盖。一旦变成黄色即不可再用。

b) 用硫代硫酸钠溶液滴定需加淀粉溶液时，一定待溶液至淡黄色再加。过早加淀粉，溶液中多量的游离碘易与淀粉生成过多的碘淀粉吸附产物，影响终点的准确。

6.1.3.2 碘滴定液

6.1.3.2.1 配制 0.05 mol/L 碘滴定液时，称取 13 g 碘片、36 g 碘化钾，加 100 mL 纯水溶解后，再加浓盐酸 3 滴与纯水成 1000 mL。混匀，装于带玻璃塞的棕色玻璃瓶中，保存于暗处备用。

6.1.3.2.2 标定浓度时，向 100 mL 碘量瓶中加已知浓度（0.1 mol/L）的硫代硫酸钠滴定液 20.0 mL，5 g/L 淀粉溶液 2 mL，摇匀。用装于 25 mL 滴定管中的碘滴定液滴定至溶液变成蓝色，记录用去的碘滴定液毫升数。因 1 mol/L 碘滴定液相当于同容量的 1 mol/L 硫代硫酸钠滴定液，故可按公式（75）计算碘滴定液浓度：

$$C(mol/L) = \frac{C_1 \times V_2}{V} \quad \cdots\cdots (75)$$

式中：

C——碘滴定液浓度，单位为摩尔每升（mol/L）；

C_1——硫代硫酸钠滴定液浓度，单位为摩尔每升（mol/L）；

V_1——硫代硫酸钠滴定液体积，单位为毫升（mL）；

V——碘滴定液体积，单位为毫升（mL）。

6.1.3.3 高锰酸钾（$KMnO_4$）滴定液

6.1.3.3.1 配制 0.02 mol/L 高锰酸钾滴定液时，称取 3.2 g 高锰酸钾，溶于 1000 mL 纯水中，煮沸 15 min。冷后装于玻璃瓶中，严密塞上塞子。静置 2 d 后，用垂熔玻璃滤器滤过，将滤液混匀，装瓶保存。

6.1.3.3.2 标定浓度时，称取经 105 ℃烘干至恒重的基准草酸钠 0.2 g（精确至 0.0001 g），置烧杯中，加纯水 250 mL 与硫酸 10 mL，搅拌使溶解。自 50 mL 滴定管中迅速加入高锰酸钾滴定液约 25 mL，待褪色后，置水浴上加热至 65 ℃。继续用高锰酸钾滴定液滴定至溶液显微红色并持续 30 s 不褪色时（此时液温仍＞55 ℃），记录用去的高锰酸钾滴定液毫升数。因 1 mol/L 高锰酸钾滴定液 1 mL 相当于 0.3350 g 草酸钠，用式（76）计算其浓度：

$$C(mol/L) = \frac{m}{0.3350 \times V} \quad (76)$$

式中：

C——高锰酸钾滴定液浓度，单位为摩尔每升（mol/L）；

m——草酸钠质量，单位为克（g）；

V——高锰酸钾滴定液体积，单位为毫升（mL）。

6.1.3.4 硫酸（H_2SO_4）滴定液

6.1.3.4.1 配制 0.25 mol/L 硫酸滴定液时，取硫酸 15 mL，沿盛有纯水的烧杯壁缓缓注入水中。待溶液温度降至室温，再加纯水稀释至 1000 mL，摇匀。

6.1.3.4.2 标定浓度时，称取经 270 ℃～300 ℃烘干至恒重的基准无水碳酸钠 0.8 g（精确至 0.0001 g），置 250 mL 碘量瓶中，加纯水 50 mL 使溶解。加甲基红-溴甲酚绿混合指示液（1 g/L 甲基红乙醇溶液 20 mL 与 2 g/L 溴甲酚绿乙醇溶液 30 mL 混匀）10 滴，用配制的硫酸滴定液（装入 50 mL 滴定管中）滴定。待溶液由绿色转变为紫红色时，煮沸 2 min。冷却至室温后，继续滴定至溶液由绿色变为暗紫色，记录用去的硫酸滴定液总毫升数。因 1 mol/L 硫酸滴定液 1 mL 相当于 0.1060 g 无水碳酸钠，按公式（77）计算硫酸滴定液浓度：

$$C(mol/L) = \frac{m}{0.1060 \times V} \quad (77)$$

式中：

C——硫酸滴定液浓度，单位为摩尔每升（mol/L）；

m——无水碳酸钠质量，单位为克（g）；

V——硫酸滴定液体积，单位为毫升（mL）。

6.1.3.5 氢氧化钠（NaOH）滴定液

6.1.3.5.1 称取 37 g 氢氧化钠，加纯水振摇，使溶解成 50 mL 饱和溶液。冷却后，置聚乙烯塑料瓶中，静置数日待澄清。配制 0.1 mol/L 氢氧化钠滴定液时，取澄清的氢氧化钠饱和溶液 5.6 mL，加纯水成 1000 mL，摇匀。

6.1.3.5.2 标定浓度时，称取经 105 ℃烘干至恒重的基准邻苯二甲酸氢钾 0.4 g（精确至 0.0001 g），置 250 mL 碘量瓶中。加纯水 50 mL 溶解，加 2 滴酚酞指示液（1 g 酚酞，加乙醇溶成 100 mL 溶液），用氢氧化钠滴定液（装于 50 mL 碱式滴定管中）滴定。待溶液呈红色时，记录用去的氢氧化钠滴定液毫升数。因 1 mol/L 氢氧化钠滴定液 1 mL 相当于 0.2042 g 邻苯二甲酸氢钾，按公式（78）计算其浓度：

$$C(mol/L) = \frac{m}{0.2042 \times V} \quad \cdots\cdots (78)$$

式中：

C ——氢氧化钠滴定液浓度，单位为摩尔每升（mol/L）；

m ——邻苯二甲酸氢钾质量，单位为克（g）；

V ——氢氧化钠滴定液体积，单位为毫升（mL）。

6.1.3.6 高氯酸（$HClO_4$）滴定液

6.1.3.6.1 配制 0.1 mol/L 高氯酸滴定液时，取冰醋酸 750 mL，缓缓加入高氯酸（浓度为 70%～72%者）8.5 mL，振摇使混匀。在室温下缓缓滴加醋酐（边加边摇）23 mL 后，摇匀。待冷却后，加冰醋酸使成 1000 mL 溶液，摇匀，放置 24 h 后标定其浓度。

6.1.3.6.2 标定浓度时，称取经 105 ℃烘干至恒重的基准邻苯二甲酸氢钾 0.4 g（精确至 0.0001 g），置 100 mL 碘量瓶中，加冰醋酸 20 mL 使溶解，加结晶紫指示液（0.5 g 结晶紫用冰醋酸溶成 100 mL 溶液）1 滴，用配制的高氯酸滴定液（装于 25 mL 滴定管中）滴定。待溶液由紫色变成蓝色时，记录用去的高氯酸滴定液毫升数。同时，使用不含邻苯二甲酸氢钾的冰醋酸重复上述操作（空白对照）。因 1 mol/L 高氯酸滴定液 1 mL 相当于 0.2042 g 邻苯二甲酸氢钾，用式（79）计算其浓度：

$$C(mol/L) = \frac{m}{0.2042 \times (V_1 - V_2)} \quad \cdots\cdots (79)$$

式中：

C ——高氯酸滴定液浓度，单位为摩尔每升（mol/L）；

m ——邻苯二甲酸氢钾质量，单位为克（g）；

V_1 ——样本组用去高氯酸滴定液体积，单位为毫升（mL）；

V_2 ——空白组用去高氯酸滴定液体积，单位为毫升（mL）。

6.1.3.7 四苯硼钠［（C_6H_5）$_4$BNa］滴定液

6.1.3.7.1 配制 0.02 mol/L 四苯硼钠滴定液时，称取四苯硼钠 7.0 g，加纯水 50 mL，振摇使溶解。加入新配制的氢氧化铝凝胶（取三氯化铝 1.0 g，溶于 25 mL 纯水中。在不断搅拌下缓缓滴加氢氧化钠试液至 pH 为 8～9）与氯化钠 16.6 g，充分搅拌均匀。然后，加纯水 250 mL，振摇 15 min。静置 10 min，过滤。取滤液，并滴加氢氧化钠试液至 pH 为 8～9，再加纯水稀释至 1000 mL，摇匀。

6.1.3.7.2 标定浓度时，精确量取本液 10.0 mL，加醋酸-醋酸钠缓冲液（取无水醋酸钠 20 g，加纯水 300 mL 溶解。加溴酚蓝指示液 1 mL 与冰醋酸 60 mL～80 mL，至溶液从蓝色变为纯绿色，再加纯水稀释至 1000 mL。pH 3.7）10 mL 与溴酚蓝指示液 0.5 mL。用 0.01 mol/L 烃铵盐滴定液（见 5.2.1.3.8）滴定至蓝色。同时做不含本液的空白试验滴定。因 1 mol/L 四苯硼钠滴定液 1 mL 相当于 1 mol/L 烃铵盐滴定液 1 mL，故可按公式（80）计算其浓度：

$$C(mol/L)=\frac{(V_1-V_2)\times c}{V} \quad (80)$$

式中：

C ——四苯硼钠滴定液浓度，单位为摩尔每升（mol/L）；

V_1 ——样本组用去烃铵盐体积，单位为毫升（mL）；

V_2 ——空白组用去烃铵盐体积，单位为毫升（mL）；

C_1 ——烃铵盐滴定液浓度，单位为摩尔每升（mol/L）；

V ——量取四苯硼钠滴定液的体积，单位为毫升（mL）。

6.1.3.8 烃铵盐（$C_{22}H_4OCIN$）滴定液

6.1.3.8.1 配制 0.01 mol/L 烃铵盐滴定液时，取氯化二甲基苄基烃铵 3.8 g，加纯水使溶解。再加醋酸-醋酸钠缓冲液（pH 3.7）10 mL，并加纯化水稀释成 1000 mL，摇匀。

6.1.3.8.2 标定浓度时，称取经 150 ℃烘干 1 h 的分析纯氯化钾 0.18 g（精确至 0.0001 g），置 250 mL 容量瓶中，加醋酸-醋酸钠缓冲液（pH 3.7）使溶解并稀释至刻度，摇匀。精确吸取稀释液 20.0 mL，置 50 mL 容量瓶中，精确加 0.02 mol/L 四苯硼钠溶液 25.0 mL，再加纯水至刻度，摇匀后经干燥滤纸过滤。弃去初滤液，精确取续滤液 25.0 mL，置 250 mL 碘量瓶中，加溴酚蓝指示液 0.5 mL，用配制的烃铵盐滴定液滴定。待溶液呈蓝色时，记录用去的烃铵盐滴定液毫升数。同时，用不含氯化钾的醋酸-醋酸钠缓冲液重复上述操作（空白对照）。因 1 mol/L 烃铵盐滴定液 1 mL 相当于 0.07455 g 氯化钾，故可用公式（81）计算烃铵盐滴定液浓度：

$$C(mol/L)=\frac{m}{0.07455\times(V_1-V_2)} \quad (81)$$

式中：

C ——烃铵盐滴定液浓度，单位为摩尔每升（mol/L）；

m ——氯化钾质量，单位为克（g）；

V_1 ——样本组用去烃铵盐滴定液体积，单位为毫升（mL）；

V_2 ——空白组用去烃铵盐滴定液体积，单位为毫升（mL）。

6.1.3.9 溴标准滴定溶液[c(1/2 Br_2)=0.1 mol/L]配制与标定

6.1.3.9.1 配制

取溴酸钾3.0 g与溴化钾25 g，溶于1000 mL纯水中，摇匀。

6.1.3.9.2 标定

量取35.00 mL～40.00 mL配制的溴溶液，置于碘量瓶中，加2 g碘化钾及5 mL盐酸溶液(20%)，摇匀，于暗处放置5 min。加150 mL纯水(15 ℃～20 ℃)，用硫代硫酸钠标准滴定溶液[c($Na_2S_2O_3$)=0.1 mol/L]滴定，近终点时加2 mL淀粉指示液(10 g/L)，继续滴定至溶液蓝色消失。同时做空白试验。溴标准滴定溶液的浓度[c(1/2 Br_2)]，按公式（82）计算c(1/2 Br_2)的浓度：

$$c(1/2Br_2)=\frac{(V_1-V_2)\times C_1}{V} \quad (82)$$

式中：

$c(1/2Br_2)$ ——溴标准滴定溶液的浓度，单位为摩尔每升（mol/L）；

V_1 ——硫代硫酸钠标准滴定溶液体积，单位为毫升（mL）；

V_2 ——空白试验消耗硫代硫酸钠标准滴定溶液体积，单位为毫升（mL）；

C_1——硫代硫酸钠标准滴定溶液浓度，单位为摩尔每升（mol/L）；

V ——溴溶液体积，单位为毫升（mL）。

6.2 复方消毒剂有效成分含量测定的指导原则

6.2.1 分析方法的选择

首选仪器分析法，如色谱分析法、光学分析法以及电化学分析法等；化学分析法经证实可靠者，也可以采用。

6.2.2 分析方法的可靠性论证

6.2.2.1 专属性

经试验验证，除有效成分以外的其他成分均不得干扰有效成分的测定。

6.2.2.2 准确性

以加标回收率表示。回收率一般在平均值X±10.0%之间（n≥6）。

6.2.2.3 重复性

某已知含量的模拟样品，用该法连续测定n次，其RSD应≤5.00%（n≥6）。

6.2.2.4 回归方程的线性

配制一系列已知浓度的模拟样品五份（高、低浓度之间的倍数一般为5倍～10倍），用某法测定。以测定信号（如色谱峰面积或峰高、吸光度等）对其浓度（或质量）进行线性回归，其相关系数应满足r≥0.99（n≥5）。

6.2.2.5 灵敏度

即用某法测定某样品的最低检出浓度（S/N=3）。

6.3 pH 值的测定

6.3.1 样品处理：原液直接测定 pH 值，对于需调节 pH 后使用的消毒剂，加入 pH 调节剂后，再次测定 pH 值。固体样品按使用最高浓度，测定其溶液的 pH 值。啫喱，乳液，强酸（碱）性样品按样品＋纯水＝1+9（V/V 或 W/V）比例准确称取放入 50 mL 烧杯中，搅拌 5 min 或超声 1 min～2 min 使样品溶液混

合均匀，冷却至室温，测定溶液的 pH 值。

6.3.2 测定方法：水溶液样品经 pH 试纸确定溶液 pH 范围后，用相应的 pH 校正液校正 pH 计，再测定样品的 pH 值。以有机物为溶剂的样品采用 pH 试纸测定 pH 值。

6.3.3 仪器校正中常用的标准缓冲液：应使用标准缓冲物质配制，配制方法如下。

a) 邻苯二甲酸氢钾标准缓冲液（pH4.00，20 ℃） 精密称取在 115 ℃±5 ℃干燥 2 h～3 h 的邻苯二甲酸氢钾（$KHC_8H_4O_4$）10.12 g，加纯水使溶解并稀释至 1000 mL；

b) 磷酸盐标准缓冲液（pH6.88，20 ℃） 精密称取在 115 ℃±5 ℃干燥 2 h～3 h 的无水磷酸氢二钠 3.533 g 与磷酸二氢钾 3.387 g，加纯水使溶解并稀释至 1000 mL；

c) 硼砂标准缓冲液（pH9.23，20 ℃） 精密称取硼砂（$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$）3.80 g（注意避免风化），加纯水使溶解并稀释至 1000 mL，置聚乙烯塑料瓶中，密塞，避免与空气中二氧化碳接触。

6.4 氧化还原电位（ORP）的测定

样品一般为液体，可采用铂电极，在酸度计“mV ”档上直接测定读数。

6.5 铅的测定

6.5.1 原理

样品经处理后注入石墨炉原子化器中经高温原子化（见表15），待测元素铅的基态原子吸收同种元素空心阴极灯发出的283.3 nm共振线，在一定范围内其吸收值与铅含量成正比。

6.5.2 试剂配制

所用试剂均为优级纯；硝酸溶液[ω（HNO_3）=3%]；铅标准溶液（100 mg/L）：国家标准物质中心购买。将此溶液用硝酸溶液[ω（HNO_3）=3%] 稀释成1000 mg/L铅的标准使用液；基体改进剂$NH_4H_2PO_4$（50 g/L）：称取5.00 g磷酸二氢铵，用纯水溶解稀释至100 mL。

6.5.3 仪器参考条件

波长：283.3 nm；狭缝：0.5 nm；灯电流：4 mA；测量模式：峰高；测量方式：标准曲线法；进样体积：标准溶液10 mL，样品溶液10 mL，基体改进剂5 mL。

表15 石墨炉升温程序

步骤	温度（℃）	时间（s）	流量（L/min）
干燥	85	10.0	3.00
	110	40.0	3.00
灰化	700	15.00	3.00
	700	10.0	3.00
	700	2.0	0.0
原子化	1800	1.0	0.0
	1800	4.00	0.0
烧尽	2200	2.0	3.00

6.5.4 标准曲线的绘制

分别准确吸取铅标准使用液（1000 mg/L）0.00 mL、0.50 mL、1.00 mL、2.00 mL、4.00 mL和8.00 mL于100 mL容量瓶中，用硝酸溶液[ω（HNO_3）=3%] 定容至刻度，配制成标准曲线的浓度为0.00 mg/L、5.00 mg/L、10.0 mg/L、20.0 mg/L、40.0 mg/L和80.0 mg/L。在给定的仪器条件下，分别将标准曲线溶液和基体改进剂上机测定绘制标准曲线。

6.5.5 样品预处理

依照各消毒产品使用说明书中的使用方法稀释，取稀释后的使用液25 mL于锥形瓶中，放数粒玻璃珠置于电热板上加热赶氯气、氧气，待液体剩2 mL～3 mL时取下稍冷，加入5 mL硝酸放置电热板上继续消解，直至冒白烟消解完全，消化液呈无色透明或略带黄色取下冷却，冷却后用水将消化液转入25 mL容量瓶中定容。同时做空白试验

6.5.6 样品测定

在给定的仪器条件下，分别将样品溶液和基体改进剂上机测定，由标准曲线直接得出样品溶液的浓度。

6.5.7 计算公式

$$X = \frac{C_1 - C_2}{V_1} \times \frac{V_2}{1000} \quad \cdots\cdots (83)$$

式中：

X ——被测样品中铅含量，单位为毫克每升（mg/L）；

C_1 ——被测样品溶液的质量浓度，单位为毫克每升（mg/L）；

C_2 ——试剂空白液的质量浓度，单位为毫克每升（mg/L）；

V_1 ——样品体积，单位为毫升（mL）；

V_2 ——样品稀释体积，单位为毫升（mL）。

6.5.8 注意事项

本方法适用于测定消毒剂中铅的含量。对不含有机化合物及表面活性剂的消毒产品（如：次氯酸钠发生器生产的次氯酸钠消毒剂）可按其使用说明书中使用方法稀释后直接测定，对含有机化合物及表面活性剂的消毒产品按其方法稀释后经酸消解后测定。消毒剂中含有大量的氯化钠等钠盐，对铅的测定产生严重的干扰，为消除钠盐的干扰应加入基体改进剂。

6.6 砷的测定

6.6.1 第一法：银盐法

具体检验方法参见GB/T 9985。

6.6.2 第二法：氢化物发生原子荧光法

6.6.2.1 原理

样品经预处理后，加入硼氢化钾将砷生成砷化氢，用氩气做载气将砷化氢导入原子化器中进行原子化，以特制砷空心阴极灯做激发光源，使砷原子产生原子荧光，荧光强度与砷的含量成正比。

6.6.2.2 试剂配制

所用试剂均为优级纯；盐酸；氢氧化钾；硫脲（100 g/L）—抗坏血酸（100 g/L）溶液：分别称取硫脲、抗坏血酸各10 g溶于100 mL纯水中，用时现配；硼氢化钾（20 g/L）：称取2 g氢氧化钾溶于200 mL纯水中，加入20 g硼氢化钾并使之溶解，用纯水稀释至1000 mL，用时现配；砷标准溶液（100 mg/L）：国家标准物质中心购买；砷标准使用液（1.00 mg/L）：吸取砷标准储备液1.00 mL于100 mL容量瓶中，加入5 mL HCl，以纯水定容，混匀。

6.6.2.3 仪器参考条件

灯电流：56 mA；负高压：320 V；原子化器温度：200 ℃；原子化器高度：8 mm；载气流量：500 mL/min；屏蔽气流量：1000 mL/min；读数时间：10 s；延迟时间：1 s。

6.6.2.4 标准曲线的绘制

吸取砷标准使用液（1.00 mg/L）0.00 mL、0.50 mL、1.00 mL、3.00 mL、5.00 mL、7.00 mL和10.0 mL于100 mL容量瓶中，加入20 mL硫脲（100 g/L）—抗坏血酸（100 g/L）溶液，5 mL HCl，用纯水定容至刻度，摇匀，配制成含砷为0.00 mg/L、5.00 mg/L、10.0 mg/L、30.0 mg/L、50.0 mg/L、70.0 mg/L和100 mg/L的标准系列溶液。放置30 min后，在给定的仪器条件下，依次测定标准溶液。

6.6.2.5 样品预处理

样品根据性状分为液体和固体。按各消毒产品使用说明书中使用方法稀释。取稀释后的样品使用液50 mL于锥形瓶中置电热板上加热，赶尽氯气或氧气等气体，待液体剩（5～10）mL时稍冷后加入5 mL硝酸消解，直至冒白烟消解完全，消化液呈无色透明或略带黄色取下冷却，冷却后用少许水将消化液转入50 mL容量瓶中，加入10 mL硫脲（100 g/L）—抗坏血酸（100 g/L）溶液，2.5 mL HCl，再用水定容至刻度摇匀，放置30 min后测定。同时做空白试验。

6.6.2.6 样品测定

在给定的仪器条件下，将样品溶液上机测定，由标准曲线直接得出样品溶液的浓度。

6.6.2.7 计算公式

$$X = \frac{C_1 - C_2}{V_1} \times \frac{V_2}{1000} \quad (84)$$

式中：

X ——被测样品中砷含量，单位为毫克每升（mg/L）；

C_1 ——被测样品溶液的浓度，单位为毫克每升（mg/L）；

C_2 ——试剂空白液的浓度，单位为毫克每升（mg/L）；

V_1 ——样品体积，单位为毫升（mL）；

V_2 ——样品稀释体积，单位为毫升（mL）。

6.6.2.8 注意事项

本方法适用于测定消毒剂中砷的含量。对不含有机化合物及表面活性剂的消毒产品（如：次氯酸钠发生器生产的次氯酸钠消毒剂）可按其使用说明书中使用方法稀释后直接测定，对含有机化合物及表面

活性剂的消毒产品，由于此类样品在仪器的反应池中反应强列影响样品的气液分离，干扰测定，甚至有些样品反应生成的气体将反应池的连接管崩开，所以按其方法稀释后经酸消解后测定。

6.7 汞的测定

按《化妆品安全技术规范》（2015年版）试验方法进行测定。

6.8 消毒剂稳定性测定

6.8.1 目的

适用于对各类消毒剂保存稳定性的评价，不适用于消毒剂开瓶后或活化后的保存稳定性评价。

6.8.2 基本要求

6.8.2.1 待测样品的要求

6.8.2.1.1 待测样品应为包装完整的同一产品 3 个批次。

6.8.2.1.2 待测样品应是批量生产的定型包装消毒剂产品，若产品为试验条件受限制的大桶包装，应改用模拟小包装，其包装材质和封装条件应与大桶包装的内包装一致。

6.8.2.2 仪器设备的要求

6.8.2.2.1 恒温恒湿箱：温度波动应控制在设定温度±2 ℃范围内，相对湿度波动应控制在设定相对湿度±5%范围内。

6.8.2.2.2 光照试验箱：温度波动应控制在设定温度±2 ℃范围内，相对湿度波动应控制在±5%范围内，照度应能达到 4500 Lx±500 Lx。

6.8.2.3 试验分类

6.8.2.3.1 稳定性试验按存放条件分为加速试验、长期试验和强光照射试验。

6.8.2.3.2 可使用加速试验初步确定产品有效期，作为上市销售的依据。

6.8.2.3.3 长期试验作为消毒剂有效期的验证，如产品通过了加速试验，但未通过相应的长期试验，应按实际长期试验的结果确定有效期；如产品未通过加速试验，但通过了相应的长期试验，按长期试验测定结果确定有效期。

6.8.2.3.4 对新活性成分应进行强光照射试验，由该试验证明为对光不稳定的消毒剂应采用避光包装。

6.8.2.4 检测与评价要求

6.8.2.4.1 稳定性试验按测定方法分为化学法和微生物法。

6.8.2.4.2 测定消毒剂稳定性时首选化学法测定有效成分含量的变化，也可采用微生物法。

6.8.2.4.3 在应用化学法时，不稳定的如过氧乙酸、过氧化氢、二氧化氯、次氯酸钠等消毒剂有效成分含量下降率≤15%，其他类消毒剂有效成分含量下降率应≤10%，且存放后有效成分含量均不应低于产品企业标准规定含量的下限值。

6.8.2.4.4 在应用微生物法时，存放前后对微生物杀灭效果应无明显变化。杀灭微生物效果无明显变

化是指，对只使用原液的消毒剂，存放后对微生物的杀灭效果能保持消毒合格水平以上者；对需稀释后使用的消毒剂，存放后杀灭微生物达到消毒合格所需的最短时间小于等于存放前杀灭相同微生物达到消毒合格所需最短时间者。

6.8.2.4.5　除测定有效成分含量或杀灭微生物效果外，还应观察记录消毒剂有无颜色变化；并且对液体消毒剂应观察记录有无沉淀或悬浮物产生，对片剂应观察记录外观性状是否完好。性状变化的记录应写进检测报告。物理性状变化应符合产品企业标准要求。

6.8.3　检测与评价方法

6.8.3.1　加速试验

6.8.3.1.1　存放方法

不同保存条件下消毒剂有效期的预测见表16。

表16　不同保存条件下消毒剂有效期的预测

保存条件	保存时间	有效期
54℃±2℃	14 d	12 个月
37℃±2℃	90 d	24 个月
40℃～45℃	180 d	36 个月
35℃～40℃	270 d	36 个月

6.8.3.1.2　检测方法

按化学法分别测定存放前、后消毒剂有效成分含量，或按微生物法分别测定存放前、后消毒剂杀灭微生物能力。

6.8.3.1.3　评价方法

6.8.3.1.3.1　有效成分含量或杀灭微生物能力符合 6.8.2.4.3 或 6.8.2.4.4 的要求时，按表 16 初步确定产品有效期。

6.8.3.1.3.2　在加速试验条件下，消毒剂的有效成分含量不符合 6.8.2.4.3 的要求或杀灭微生物能力不符合 6.8.2.4.4 的要求时，该消毒剂的有效期暂不作确定，应按长期试验的方法进行试验，以确定有效期。

6.8.3.2　长期试验

6.8.3.2.1　存放方法

将待测样品置温度25 ℃±2 ℃、相对湿度60%±10%或温度30 ℃±2 ℃、相对湿度65%±5%恒温恒湿箱内或说明书标注的保存条件下，存放12个月（对溶液或混悬液等液体消毒剂可不要求相对湿度）。12个月后仍需继续观察者，可存放至观察结束。采用温度25 ℃±2 ℃或30 ℃±2 ℃存放条件，由企

业自己决定，如采用25 ℃±2 ℃存放条件，应在产品标签和说明书上加注“避免高温”或“于阴凉处保存”等说明性文字。

6.8.3.2.2 检测方法

分别于存放前和存放后第3、6、9和第12个月，按化学法分别测定存放前、后消毒剂有效成分含量，或按微生物法分别测定存放前、后消毒剂杀灭微生物能力。如于12个月后仍需继续观察时，分别于存放至第18和24个月及以后每隔12个月取样进行检测，直至有效成分含量或杀灭微生物能力低于相关标准要求。

6.8.3.2.3 评价方法

以有效成分含量符合6.8.2.4.3或杀灭微生物能力符合6.8.2.4.4要求的最长存放时间确定消毒剂的有效期。

6.8.3.3 强光照射试验

6.8.3.3.1 存放方法

分别将3个批次待测固体样品或其原料置于敞口培养皿中，厚度≤5 mm, 对液体待测样品置于250 mL的无色透明磨口瓶内,装量宜为磨口瓶容量的80%，将盖子盖紧，然后放置于强光照试验箱中，在照度为4500 Lx±500 Lx、温度为25 ℃±2 ℃、相对湿度为60%±10%的条件下存放10 d。

6.8.3.3.2 检测方法

按化学法分别测定存放前、后消毒剂有效成分含量，或按微生物法分别测定存放前、后消毒剂杀灭微生物能力。

6.8.3.3.3 评价方法

经强光照射后,有效成分含量不符合6.8.2.4.3的要求或杀灭微生物能力不符合6.8.2.4.4的要求时，为光不稳定消毒剂。

6.8.3.4 化学法

6.8.3.4.1 按本文件 3 理化检验技术中的方法测定各种消毒剂有效成分含量。

6.8.3.4.2 每批次待测样品各测 1 份样品，每份样品重复测 2 次，取其平均值作为该批次样品有效成分含量。按公式（85）计算 3 个批次待测样品批间相对平均偏差，若批间相对平均偏差≤5%，取 3 个批次的平均值作为判定依据；若批间相对平均偏差＞5%，则以平均偏差最大者作为判定依据。

$$RAD=\frac{\sum_{i=1}^{n}|x_i-\bar{x}|}{n\times\bar{x}}\times 100\% \quad\cdots\cdots(85)$$

式中：

RAD——相对平均偏差，%；

$\bar{x}$——为n个批次样品有效成分含量的平均值；

x_i——为第i个批次样品的有效成分含量；

n为样品批次，本文件中n=3。

6.8.3.5 微生物法

6.8.3.5.1 将按规定方法存放的 3 个批次待测样品等量混合后取样，按本文件 2.1.7 项的方法检测各种消毒剂杀灭微生物能力。

6.8.3.5.2 在杀灭微生物试验中，所用指标微生物应为使用说明书中拟杀灭微生物中抗力最强者。

6.8.3.5.3 对只使用原液进行消毒的消毒剂，存放后，仍用消毒剂原液进行杀灭微生物试验；对稀释后进行消毒的消毒剂进行杀灭微生物试验，存放前后的稀释倍数应相同。

6.8.3.5.4 存放后杀灭微生物试验的作用时间及其他试验条件均应与存放前杀灭微生物试验相同。

6.9 消毒剂对金属腐蚀性的测定

6.9.1 目的

测定气溶胶喷雾、超声雾化、汽化、气体、常量喷雾、擦拭、浸泡或冲洗消毒条件下消毒剂、消毒器械对各种金属的腐蚀程度，以能注明在使用时是否给予应有的注意。

6.9.2 常用器材

6.9.2.1 圆形金属片，直径 24.00 mm，厚 1.0 mm，穿一直径为 2.0 mm 小孔，表面积总值约为 9.80 cm^2（包括上、下、周边表面与小孔侧面）；光洁度为 6。原料如下：

碳钢（规格见 GB/T 700）；铜（规格见 GB/T 1176）；铝（规格见 GB/T 1173）； 不锈钢（规格见 GB/T 1220）；锌（规格见 GB/T 1175）。

碳钢易氧化生锈，应保存于油中。

6.9.2.2 浸泡容器（玻璃制，带盖，容积为 800 mL～1000 mL）。

6.9.2.3 砂纸（去金属氧化层的砂纸为 120 号粒度水砂纸，砂纸应符合 GB/T 2481.1 的要求）。

6.9.2.4 称量器具（称量用的分析天平精度为 0.1 mg）。

6.9.2.5 超声波清洗机（带加温装置）。

6.9.2.6 喷雾装置：包括空气压缩机、压力表、气体流量计、气溶胶喷雾器等。喷出的气溶胶微粒 90%以上直径应为 1 μm～10 μm。

6.9.2.7 恒温干燥箱、干燥器、游标卡尺、软毛刷、橡皮器具等。

6.9.3 操作程序

6.9.3.1 金属试样的处理和测量

6.9.3.1.1 金属试样的前处理

在有表面活性作用的清洁剂中浸泡10 min，充分去油，洗净；或用氧化镁糊剂涂抹除油后洗净；以120号粒度水砂纸磨去金属试样两面和周边表面的氧化层（在同一张砂纸上只能磨同一种材料的金属试样），再用纯水冲净。用无水丙酮或无水乙醇再次脱脂。置50 ℃恒温箱中干燥1 h，用塑料镊子取出储存于干燥器内，放置室温后再用游标卡尺测量表面积和天平称重，备用。

6.9.3.1.2 腐蚀试样清洗

6.9.3.1.2.1 作用到规定时间后，取出金属试样，先用纯水冲洗，再用软毛刷或橡皮器具去除腐蚀产物。并应按下列化学方法配合超声波清洗机清除，以便彻底去除腐蚀物：

a) 铜片：在室温下浸泡于盐酸溶液（500 mL36%～38%盐酸加纯水至 1000 mL，盐酸密度为 1.19 g•cm^{-3}）中 1 min～3 min；

b) 碳钢片：浸泡于 75 ℃～90 ℃柠檬酸铵溶液（200 g 柠檬酸铵加纯水至 1000 mL）20 min；

c) 铝片：在室温下浸泡于硝酸溶液（66%～68%硝酸 100 mL 加纯水至 1000 mL，硝酸密度为 1.42 g•cm^{-3}）1 min～5 min；

d) 不锈钢：浸泡于 60 ℃硝酸溶液（66%～68%硝酸 100 mL 加纯水至 1000 mL，硝酸密度为 1.42 g•cm^{-3}）20 min；

e) 锌：浸泡于 70 ℃氯化铵溶液（100 g 氯化铵加纯水配制成 1000 mL 溶液）中 2 min～5 min。

6.9.3.1.2.2 金属试样除去腐蚀产物并清洗后，用粗滤纸吸干水分，置于垫有滤纸的平皿中，放入 50 ℃温箱，干燥 1 h，用塑料镊子夹取，取出储存于干燥器内，放置室温后再称重。

6.9.3.1.3 金属试样测量

6.9.3.1.3.1 用游标卡尺测量试验前金属试样的直径、厚度、孔径（精确至 0.1 mm），计算试样表面积总值。

6.9.3.1.3.2 用分析天平分别对试验前和试验清洗后的金属试样称重，每个金属试样重复称重 3 次，精确至 0.1 mg，取其平均值分别作为试验前和试验后的重量。

6.9.3.1.3.3 在进行测量尺寸、称重等操作时，应戴洁净手套，使用的测量工具应干净无油污，用塑料镊子夹取样片，不可以手直接接触金属试样。

6.9.3.2 气雾腐蚀性试验

6.9.3.2.1 仪器设备

相邻的一对气雾柜（1 m^3）或气雾室（20 m^3），一个用于试验，一个用于对照。一对气雾柜或气雾室所处环境（包括温度、湿度、光照、密闭性、和通风条件等）应一致。柜（或室）宜以不锈钢或铝合金和玻璃构建。应安装温度和湿度调节装置以及通风机装置和相应管道。

6.9.3.2.2 金属试样放置

6.9.3.2.2.1 每种金属试样各 3 片沿气雾柜或气雾室一条对角边的内、中、外等距离依次悬挂，在气雾柜内的悬挂高度为金属试样在气雾柜高度中央位置，在气雾室内的悬挂高度为金属试样离地 0.8 m～1.2 m 位置。试验组和对照组的摆放方式和位置应相同。

6.9.3.2.2.2 金属试样放置的位置其测试表面不应直接受到喷雾。

6.9.3.2.2.3 金属试样的支架应由惰性非金属材料制成，如玻璃、塑料或有涂层的木制品。悬挂金属试样的材料不应使用金属，而应使用人造纤维、棉纤维或其他惰性绝缘材料。

6.9.3.2.3 试验步骤

6.9.3.2.3.1 同时调节两个气雾柜（或室）的温度、相对湿度至试验要求的温度（20 ℃～25 ℃）和

相对湿度（70%～80%）。

6.9.3.2.3.2　按6.9.3.2.2中的要求放置试验组和对照组的试样。

6.9.3.2.3.3　试验组根据气雾柜（或室）的体积按照消毒剂产品使用说明书（浓度和使用量）和循环次数配制所需消毒液，根据喷雾装置流量计算喷雾时间；消毒机器按照使用说明书和循环次数调节参数，设定开机时间。如使用配制消毒液不稳定的消毒剂（如氧化类等），应当天使用当天配制。

6.9.3.2.3.4　将喷雾装置或消毒机器和通风装置连接至智能定时插座或开关，根据每个循环时间（循环时间为喷雾或开机时间、消毒时间和消毒后30 min通风时间总和）和45次循环设定智能定时插座或开关。开启开关，进行循环金属试样。

6.9.3.2.3.5　循环结束后，取出金属试样，按6.9.3.1.2和6.9.3.1.3分别进行金属试样清洗和称重。

6.9.3.2.3.6　在整个试验期间，试验不得中断。当必须中断试验时间较长时，应同时将试验组和对照组的被测金属试样从气雾柜（或室）中取出，并按照试验完成后处理金属试样的相同方式进行金属试样处理，处理完毕后保存在干燥器中直至试验恢复。

6.9.3.2.4　试验对照

对照组除用纯水代替消毒液或消毒机关闭消毒因子外，其余试验步骤和过程均与试验组相同。循环结束后，取出金属试样，随同试验组金属试样用相同方法进行清洗、化学处理、水冲洗、干燥、称重，并计算其平均失重值。

6.9.3.3　全浸腐蚀性试验

6.9.3.3.1　消毒液更换频率

使用易挥发或有效成分不稳定的消毒剂如二氧化氯、酸性电位水和氧化类消毒剂等，用于浸泡金属试样的消毒液每天更换1次，有效成分稳定的消毒剂如胍类、酚类、季铵盐、醛类等，用于浸泡金属试样的消毒液无需更换。

6.9.3.3.2　试验步骤

试验步骤如下：

a)　浸泡法：按消毒剂最高使用浓度配制试验用消毒液，用以浸泡试验金属试样。浸泡时，每一金属试样应浸泡在至少200 mL消毒液中；

b)　连续冲洗法：将发生器消毒因子调到最高浓度，将出液管（非金属制）插入浸泡容器底部，打开发生器，调节流量，使得消毒液不断溢出而金属试样不明显摆动；

c)　金属金属试样用塑料线系以标签，注明编号和日期，悬挂于消毒液中。连续浸泡或冲洗72 h；

d)　每种金属每次试验放置3片金属试样。浸泡或冲洗时，若同种金属每一金属试样相隔1 cm以上，可在同一容器内（浸泡法含600 mL消毒液）进行；

e)　浸泡或冲洗到规定时间后，取出金属试样，按6.9.3.1.2和6.9.3.1.3分别进行金属试样清洗和称重。

6.9.3.3.3　试验对照

对照组金属试样按与试验组完全相同的程序（表面处理、清洗、称重等）处理后，在不含消毒因子的纯水中连续浸泡或冲洗72 h。浸泡或冲洗到规定时间后，取出金属试样，随同试验组金属试样用相同方法进行清洗、化学处理、水冲洗、干燥、称重，并计算其平均失重值。

6.9.3.4 试验结果

观察与记录金属试样颜色变化，并以金属腐蚀速率（R）平均值表达。按公式（86）计算：

$$R = \frac{8.76\times10^{7}\times(M-M_t-M_k)}{S\times T\times D} \quad (86)$$

式中：

R ——腐蚀速率，单位为毫米每年（mm/a）；

M ——试验前金属试样平均重量，单位为克（g）；

M_t ——试验后金属试样平均重量，单位为克（g）；

M_k ——对照组金属试样平均失重值，单位为克（g）；

S ——金属试样的表面积总值，单位为平方厘米（cm^2）；

T ——试验时间，单位为小时（h）；

D ——金属材料密度，单位为千克每平方米（kg/m^3）。

腐蚀速率用所试验的全部平行金属试样的平均值进行评价；当某个平行金属试样的腐蚀速率与平均值之相对偏差超过10%时，应取新的金属试样作重复试验，用第二次试验结果进行计算与评价。当再次不符合要求时，则应以两次试验全部金属试样的平均值进行评价。

6.9.4 金属腐蚀性试验方法选择

6.9.4.1 应根据消毒剂或消毒器械消毒的对象及环境，选择相应的金属和合金进行腐蚀性试验。无特定使用对象的，应对常用的碳钢、铝、铜和不锈钢材料进行测试。

6.9.4.2 根据化学消毒方式不同选择相应的金属腐蚀性试验方法，见表 17。

表17 金属腐蚀性试验方法

试验方法		适用消毒方式	
气雾腐蚀性试验	气雾柜（1 m^3）	气溶胶喷雾、超声雾化、汽化或气体消毒	气溶胶喷雾的化学消毒剂
	气雾室（20 m^3）		1.气溶胶喷雾的化学消毒剂 2.消毒器械和采用超声雾化、汽化（干雾）或气体消毒的化学消毒剂[a]
全浸腐蚀性试验	连续冲洗法	常量喷雾、擦拭、浸泡或冲洗消毒	由发生器产生易挥发、低浓度的臭氧水、二氧化氯水和氧化电位水等，说明书上注明为冲洗方法时
	浸泡法		由化学消毒剂配置的消毒液或发生器产生的消毒液使用非冲洗方法时
注：[a] 配合超声雾化、汽化（干雾）或气体器械进行消毒的化学消毒剂，相应设备由厂家提供。			

6.9.5 腐蚀性分级标准

根据金属腐蚀速率将消毒剂金属腐蚀性划分为4个腐蚀等级，见表18。

表18　消毒剂金属腐蚀性分级

腐蚀速率（R）（mm/a）	级别
＜0.0100	基本无腐蚀
0.0100～＜0.1000	轻度腐蚀
0.1000～＜1.0000	中度腐蚀
≥1.0000	重度腐蚀

6.9.6　注意事项

6.9.6.1　每张砂纸只能磨一种金属材料。一个容器盛的消毒液只能浸泡同一种金属。

6.9.6.2　金属试样支持系统的材质应对消毒液和金属试样呈惰性，它与金属试样的接触面积应尽可能小。

6.9.6.3　所用金属试样大小、厚薄（规格）应严格一致，表面需磨光。

6.9.6.4　试验期间，需换消毒剂溶液时，操作应迅速，勿使样片暴露空气中过久。

6.9.6.5　金属样片仅可使用一次，否则影响试验的准确性。

6.9.6.6　试验在 20 ℃～25 ℃条件下进行。

6.9.6.7　在报告其结果时，应对试验后金属试样的外观变化（如锈蚀感官、色泽变化）等现象进行描述。

6.9.6.8　在进行测量尺寸、称重等操作时，应戴洁净手套，使用的测量工具应干净无油污，用塑料镊子夹取样片，不可以手直接接触金属试样。

7　毒理学试验方法

7.1　急性经口毒性试验

7.1.1　目的

检测消毒剂对实验动物的急性毒性作用和强度，为亚急（慢）性毒性试验和致突变试验提供剂量选择的依据。

7.1.2　实验动物

小鼠或大鼠任选一种，雌雄各半。小鼠体重18 g～22 g，大鼠体重180 g～220 g，根据不同的急性毒性试验设计方法，选用适当的实验动物数量，通常分为4个～6个剂量组；一般小鼠每组选用8只～10只，实验动物总数不少于50只；大鼠每组选用5只～6只，实验动物总数不少于30只。

7.1.3　试验分组

7.1.3.1　概率单位-对数图解法：计算 LD_{50}，随机分为 5 个～6 个剂量组。通常最高剂量组的实验动物死亡率应≥90%，最低剂量组实验动物死亡率应≤10%。可先以较大的组距，对少量实验动物进行预试验，找出其粗略致死剂量范围，然后再设计正式试验的剂量分组。

7.1.3.2　霍恩（Horn）法：则可先通过预试验找出其粗略致死剂量范围，然后按照 1.0、2.15、4.64 乘以 10^t（t=0、±1、±2、±3），或者按照 1.0、3.16 乘以 10^t（t=0、±1、±2、±3）的方法设 4 个～5 个剂量组。

7.1.4　操作程序

7.1.4.1　实验动物的准备：试验前，禁食过夜，不限制饮水。

7.1.4.2　受试物的配制：试验用受试物浓度按 4.5.3.3。用水或食用植物油为溶剂配制成溶液，或采用 0.5% 羧甲基纤维素配制成混悬液。

7.1.4.3　染毒方法：用灌胃方式将受试物一次给予实验动物。一般小鼠灌胃量不超过 0.2 mL/10 g 体重，大鼠灌胃量不超过 1.0 mL/100 g 体重。若受试物毒性很低，一次灌胃容量太大，可在 24 h 内分成 2 次～3 次给予，其总剂量作为一日剂量计算。

7.1.4.4　染毒后观察实验动物的中毒表现和死亡数及死亡时间，并对死亡实验动物和观察期满处死实验动物进行尸体解剖，肉眼观察，发现有异常的组织或脏器，尚需进一步作组织病理学检查。观察时间 14 d。

7.1.4.5　根据给予受试物后 14 d 内的各剂量组实验动物死亡率计算 LD_{50}（半数致死剂量）。

7.1.5　LD_{50} 的计算方法

7.1.5.1　概率单位-对数图解法

7.1.5.1.1　根据各剂量组实验动物死亡率，从表 19 中查各组的概率单位。因死亡率为 0%和 100%的概率单位，与所试实验动物数有关，故应另在表 20 中查找。

示例：某组死亡率为45%的概率单位，查表19。先在表的左侧第一列上找到40，而后在表的第一行找到5，两者交叉点处的4.87，即为45%的概率单位。某组用10只实验动物，如果全部存活（死亡率为0%），查表22，其概率单位为3.04。

表19　百分率-概率单位换算表

死亡率%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	—	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.001	4.005	4.008	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.003	5.005	5.008	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23

90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
注：横标目数字为死亡率的个位数，纵标目数字为死亡率的十位数。										

表20　相应于反应率为 0% 及 100% 的概率单位

该组实验动物数	反应率		该组实验动物数	反应率	
	0%	100%		0%	100%
—	—	—	11	3.00	7.00
2	3.85	6.15	12	2.97	7.03
3	3.62	6.38	13	2.93	7.07
4	3.47	6.53	14	2.90	7.10
5	3.36	6.64	15	2.87	7.13
6	3.27	6.73	16	2.85	7.15
7	3.20	6.80	17	2.82	7.18
8	3.13	6.87	18	2.80	7.20
9	3.09	6.91	19	2.78	7.22
10	3.04	6.96	20	2.76	7.24

7.1.5.1.2　用方格纸绘散点图，横轴表示剂量的对数值（x），纵轴为概率单位值（y），将各组数值点在图上。

7.1.5.1.3　按各点的分布趋势，用直尺绘出一条最适合于各点的直线，使线上方的点到线的总距离与线下方的点到线的总距离相近，此线应尽量靠近概率单位为 5 的点及附近的点。

7.1.5.1.4　查出求概率单位 5 处的剂量对数，其反对数即为 LD_{50} 。

7.1.5.1.5　按公式（87）、公式（88）和公式（89）计算 LD_{50} 的 95% 可信限。

$$S = \frac{x_2 - x_1}{y_2 - y_1} \quad (87)$$

式中：

S——LD_{50} 的标准差；

y_1——概率单位等于 4；

y_2——概率单位等于 6；

x_1——概率单位等于 4（y_1）时相应的剂量对数值；

x_2——概率单位等于 6（y_2）时相应的剂量对数值。

$$S_m = \frac{S}{\sqrt{\frac{N}{2}}} \quad (88)$$

式中：

S_m——LD_{50} 的标准误；

N——概率单位 y_1（=4）及 y_2（=6）相应的死亡率间所用的实验动物数。

$$\log（LD_{50}）的95\%可信限 = \log（LD_{50}）\pm 1.96S_m \cdots\cdots (89)$$

式中：

LD_{50}——半数致死剂量；

S_m——LD_{50} 的标准误。

注：式（89）结果，经反对数变换后，可得 LD_{50} 的 95% 可信限。

7.1.5.2 霍恩法

根据各剂量组实验动物死亡率，从表21或表22查出其相应的LD_{50}值和95%可信限。表21用于每组5只实验动物，组距剂量递增公比为$\sqrt[3]{10}$，即$10\times\sqrt[3]{10}$ =21.5，$21.5\times\sqrt[3]{10}$=46.4，…，以此类推。此剂量系列排列如下：1.00×10^t、2.15×10^t、4.64×10^t，…，t=0、±1、±2、±3、…。表22用于每组5只实验动物，组距剂量递增公比为$\sqrt{10}$，即 $10\times\sqrt{10}$=31.6，$31.6\times\sqrt{10}$=100，…，以此类推。此剂量系列排列如下：1.00×10^t、3.16×10^t、10.0×10^t，…，t=0、±1、±2、±3、…。

表21 每组 5 只实验动物、组距$\sqrt[3]{10}$倍 LD_{50}值和 95%可信限

各剂量组实验动物死亡数				剂量组					
				剂量1=0.464×10^t 剂量2=1.00×10^t 剂量3=2.15×10^t 剂量4=4.64×10^t		剂量1=1.00×10^t 剂量2=2.15×10^t 剂量3=4.64×10^t 剂量4=10.0×10^t		剂量1=2.15×10^t 剂量2=4.64×10^t 剂量3=10.0×10^t 剂量4=21.5×10^t	
1组	2(3)组	3(2)组	4组	LD_{50}	可信限	LD_{50}	可信限	LD_{50}	可信限
0	0	3	5	2.00	1.37~2.91	4.30	2.95~6.26	9.26	6.36~13.5
0	0	4	5	1.71	1.26~2.33	3.69	2.71~5.01	7.94	5.84~10.8
0	0	5	5	1.47	—	3.16	—	6.81	—
0	1	2	5	2.00	1.23~3.24	4.30	2.65~6.98	9.26	5.70~15.00
0	1	3	5	1.71	1.05~2.78	3.69	2.27~5.99	7.94	4.89~12.9
0	1	4	5	1.47	0.951~2.27	3.16	2.05~4.88	6.81	4.41~10.5
0	1	5	5	1.26	0.926~1.71	2.71	2.00~3.69	5.84	4.30~7.94
0	2	2	5	1.71	1.01~2.91	3.69	2.17~6.28	7.94	4.67~13.5
0	2	3	5	1.47	0.862~2.50	3.16	1.86~5.38	6.81	4.00~13.5
0	2	4	5	1.26	0.775~2.05	2.71	1.69~4.41	5.84	3.60~9.50
0	2	5	5	1.08	0.741~1.57	2.33	1.60~3.99	5.001	3.44~7.30
0	3	3	5	1.26	0.740~2.14	2.71	1.59~4.62	5.84	3.43~9.95
0	3	4	5	1.03	0.665~1.75	2.33	1.43~3.78	5.001	3.08~8.14
1	0	3	5	1.96	1.22~3.14	4.22	2.63~6.76	9.09	5.66~14.6
1	0	4	5	1.62	1.07~2.43	3.48	2.31~5.24	7.50	4.98~11.3
1	0	5	5	1.33	1.05~1.70	2.87	2.26~3.65	6.19	4.87~7.87
1	1	2	5	1.96	1.06~3.60	4.22	2.29~7.75	9.09	4.94~1.67
1	1	3	5	1.62	0.866~3.01	3.48	1.87~6.49	7.50	4.02~16.7
1	1	4	5	1.33	0.737~2.41	2.87	1.59~5.20	6.19	3.42~11.2
1	1	5	5	1.10	0.661~1.83	2.37	1.42~3.95	5.11	3.007~8.51
1	2	2	5	1.62	0.818~3.19	3.48	1.76~6.37	7.50	3.80~14.8
1	2	3	5	1.33	0.658~2.70	2.87	1.42~5.82	6.19	3.05~12.5
1	2	4	5	1.10	0.550~2.20	2.37	1.19~4.74	5.11	2.55~10.2
1	3	3	5	1.10	0.523~2.32	2.37	1.13~4.99	5.11	2.43~10.8
2	0	3	5	1.90	1.00~3.58	4.008	2.16~7.71	8.80	4.66~16.6
2	0	4	5	1.47	0.806~2.67	3.16	1.74~5.76	6.81	3.74~12.4
2	0	5	5	1.14	0.674~1.92	2.45	1.45~4.13	5.28	3.13~8.89
2	1	2	5	1.90	0.839~4.29	4.08	1.81~9.23	8.80	3.89~19.9
2	1	3	5	1.47	0.616~3.50	3.16	1.33~7.53	6.81	2.86~16.2
2	1	4	5	1.14	0.466~2.77	2.45	1.00~5.98	5.28	2.16~12.9
2	2	2	5	1.47	0.573~3.76	3.16	1.24~8.10	6.81	2.66~17.4
2	2	3	5	1.14	0.406~3.18	2.45	0.875~6.85	6.28	1.89~14.8
0	0	4	4	1.96	1.18~3.26	4.22	2.53~7.02	9.09	5.46~15.1
0	0	5	4	1.62	1.27~2.05	3.48	2.74~4.42	7.50	5.90~9.53
0	1	3	4	1.96	0.978~3.92	4.22	2.11~8.44	9.09	4.54~18.2

0	1	4	4	1.62	0.893~2.92	3.48	1.92~6.30	7.50	4.14~13.6
0	1	5	4	1.33	0.885~2.01	2.87	1.91~4.33	6.19	4.11~9.33
0	2	2	4	1.96	0.930~4.12	4.22	2.00~8.88	9.09	4.31~19.1
0	2	3	4	1.62	0.797~3.28	3.48	1.72~7.06	7.50	3.70~15.2
0	2	4	4	1.33	0.715~2.49	2.87	1.54~5.36	6.19	3.32~11.5
0	2	5	4	1.10	0.686~1.77	2.37	1.48~3.80	5.11	3.19~8.19
0	3	3	4	1.33	0.676~2.63	2.87	1.46~5.67	6.19	3.14~12.2
0	3	4	4	1.10	0.599~2.02	2.37	1.29~4.36	5.11	2.78~9.39
1	0	4	4	1.90	0.969~3.71	4.08	2.09~7.99	8.80	4.50~17.2
1	0	5	4	1.47	1.02~2.11	3.16	2.20~4.54	6.81	4.74~9.78
1	1	3	4	1.90	0.757~4.75	4.08	1.63~10.2	8.80	3.51~22.0
1	1	4	4	1.47	0.654~3.30	3.16	1.41~7.10	6.81	3.03~15.3
1	1	5	4	1.14	0.581~2.22	2.45	1.25~4.79	5.28	2.70~10.3
1	2	2	4	1.90	0.706~5.09	4.08	1.52~11.0	8.80	3.28~23.6
1	2	3	4	1.47	0.564~3.82	3.16	1.21~8.24	6.81	2.62~17.7
1	2	4	4	1.14	0.454~2.85	2.45	0.997~6.13	5.28	2.11~13.2
1	3	3	4	1.14	0.423~3.05	2.45	0.912~6.57	5.28	1.97~14.2
2	0	4	4	1.78	0.662~4.78	3.83	1.43~10.3	8.25	3.07~22.2
2	0	5	4	1.21	0.583~2.52	2.61	1.26~5.42	5.62	2.71~11.7
2	1	3	4	1.78	0.455~6.95	3.83	0.980~15.00	8.25	2.11~32.3
2	1	4	4	1.21	0.327~4.48	2.61	0.705~9.66	5.62	1.52~20.8
2	2	2	4	1.78	0.410~7.72	3.83	0.883~16.6	8.25	1.90~35.8
2	2	3	4	1.21	0.266~5.52	2.61	0.573~11.9	5.62	1.23~25.6
0	0	5	3	1.90	1.12~3.20	4.08	2.42~6.89	8.80	5.22~14.8
0	1	4	3	1.90	0.777~4.63	4.08	1.67~9.97	8.80	3.60~21.5
0	1	5	3	1.47	0.806~2.67	3.16	1.74~5.76	6.81	3.74~12.4
0	2	3	3	1.90	0.678~5.30	4.08	1.46~11.4	8.80	3.15~24.6
0	2	4	3	1.47	0.616~3.50	3.16	1.33~7.53	6.81	2.86~16.2
0	2	5	3	1.14	0.602~2.15	2.45	1.30~4.62	5.28	2.79~9.96
0	3	3	3	1.47	0.573~3.76	3.16	1.24~8.10	6.81	2.66~17.4
0	3	4	3	1.14	0.503~2.57	2.45	1.08~5.54	5.28	2.33~11.9
1	0	5	3	1.78	0.856~3.69	3.83	1.85~7.96	8.25	3.98~17.1
1	1	4	3	1.78	0.481~6.58	3.83	1.04~14.2	8.25	2.23~30.5
1	1	5	3	1.21	0.451~3.25	2.61	0.972~7.01	5.62	2.09~15.1
1	2	3	3	1.78	0.390~8.11	3.83	0.840~17.5	8.25	1.81~37.6
1	2	4	3	1.21	0.310~4.74	2.61	0.668~10.2	5.62	1.44~22.0
1	3	3	3	1.21	0.279~5.26	2.61	0.602~11.3	5.62	1.30~24.4

表22　每组 5 只实验动物、组距 $\sqrt{10}$ 倍 LD_{50} 值和 95%可信限

各剂量组实验动物死亡数	剂量组	
	剂量1=0.316×10^{t}	剂量1=1.00×10^{t}

				剂量2=1.00×10^t 剂量3=3.16×10^t 剂量4=10.0×10^t		剂量2=3.16×10^t 剂量3=10.0×10^t 剂量4=31.6×10^t	
1组	2(3)组	3(2)组	4组	LD_{50}	可信限	LD_{50}	可信限
0	0	3	5	2.82	1.60~4.95	8.91	5.007~15.7
0	0	4	5	2.24	1.41~3.55	7.08	4.47~11.2
0	0	5	5	1.78	—	5.62	—
0	1	2	5	2.82	1.36~5.84	8.91	4.30~18.5
0	1	3	5	2.24	1.08~4.64	7.08	3.42~14.7
0	1	4	5	1.78	0.927~3.41	5.62	2.93~10.8
0	2	2	5	2.24	1.01~4.97	7.08	3.19~15.7
0	2	3	5	1.78	0.801~3.95	5.62	2.53~12.5
0	2	4	5	1.41	0.682~2.93	4.47	2.16~9.25
0	2	5	5	1.12	0.638~1.97	3.55	2.02~6.24
0	3	3	5	1.41	0.636~3.14	4.47	2.01~9.92
0	3	4	5	1.12	0.542~2.32	3.55	1.71~7.35
1	0	3	5	2.74	1.35~5.56	8.66	4.26~17.6
1	0	4	5	2.05	1.11~3.80	6.49	3.51~12.0
1	0	5	5	1.54	1.07~2.21	4.87	3.40~6.98
1	1	2	5	2.74	1.10~6.82	8.66	3.48~21.6
1	1	3	5	2.05	0.806~5.23	6.49	2.55~16.5
1	1	4	5	1.54	0.632~3.75	4.87	2.00~11.9
1	1	5	5	1.15	0.537~2.48	3.65	1.70~7.85
1	2	2	5	2.05	0.740~5.70	6.49	2.34~18.0
1	2	3	5	1.54	0.534~4.44	4.87	1.69~14.1
1	2	4	5	1.15	0.408~3.27	3.65	1.29~10.3
1	3	3	5	1.15	0.378~3.53	3.65	1.20~11.2
2	0	3	5	2.61	1.01~6.77	8.25	3.18~21.4
2	0	4	5	1.78	0.723~4.37	5.62	2.29~13.8
2	0	5	5	1.21	0.554~2.65	3.83	1.75~8.39
2	1	2	5	2.61	0.768~8.87	8.25	2.43~28.1
2	1	3	5	1.78	0.484~6.53	5.62	1.53~20.7
2	1	4	5	1.21	0.318~4.62	3.83	1.00~14.6
2	2	2	5	1.78	0.434~7.28	5.62	1.37~23.00
2	2	3	5	1.21	0.259~5.67	3.83	0.819~17.9
0	0	4	4	2.74	1.27~5.88	8.66	4.003~18.6
0	0	5	4	2.05	1.43~2.94	6.49	4.53~9.31
0	1	3	4	2.74	0.968~7.75	8.66	3.06~24.5
0	1	4	4	2.05	0.843~5.00	6.49	2.67~15.8
0	1	5	4	1.54	0.833~2.85	4.87	2.63~9.01
0	2	2	4	2.74	0.896~8.37	8.66	2.83~26.5

0	2	3	4	2.05	0.711~5.93	6.49	2.25~18.7
0	2	4	4	1.54	0.604~3.92	4.87	1.91~12.4
0	2	5	4	1.15	0.568~2.35	3.65	1.80~7.42
0	3	3	4	1.54	0.555~4.27	4.87	1.76~13.5
0	3	4	4	1.15	0.463~2.88	3.65	1.47~9.10
1	0	4	4	2.61	0.953~7.15	8.25	3.01~22.6
1	0	5	4	1.78	1.03~3.06	5.62	3.27~9.68
1	1	3	4	2.61	0.658~10.4	8.25	2.08~32.7
1	1	4	4	1.78	0.528~5.98	5.62	1.67~18.9
1	1	5	4	1.21	0.442~3.32	3.83	1.40~10.5
1	2	2	4	2.61	0.594~11.5	8.25	1.88~36.3
1	2	3	4	1.78	0.423~7.48	5.62	1.34~23.6
1	2	4	4	1.21	0.305~4.80	3.83	0.966~15.2
1	3	3	4	1.21	0.276~5.33	3.83	0.871~16.8
2	0	4	4	2.37	0.539~10.4	7.50	1.70~33.00
2	0	5	4	1.33	0.446~3.99	4.22	1.41~12.6
2	1	3	4	2.37	0.307~18.3	7.50	0.970~58.0
2	1	4	4	1.33	0.187~9.49	4.22	0.592~30.0
2	2	2	4	2.37	0.262~21.4	7.50	0.830~67.8
2	2	3	4	1.33	0.137~13.00	4.22	0.433~41.0
0	0	5	3	2.61	1.19~5.71	8.25	3.77~18.1
0	1	4	3	2.61	0.684~9.95	8.25	2.16~31.5
0	1	5	3	1.78	0.723~4.37	5.62	2.29~13.8
0	2	3	3	2.61	0.558~12.2	8.25	1.76~38.6
0	2	4	3	1.78	0.484~6.53	5.62	1.53~20.7
0	2	5	3	1.21	0.467~3.14	3.83	1.48~9.94
0	3	3	3	1.78	0.434~7.28	5.62	1.37~23.00
0	3	4	3	1.21	0.356~4.12	3.83	1.13~13.00
1	0	5	3	2.37	0.793~7.10	7.50	2.51~22.4
1	1	4	3	2.37	0.333~16.9	7.50	1.05~53.4
1	1	5	3	1.33	0.303~5.87	4.22	0.958~18.6
1	2	3	3	2.37	0.244~23.1	7.50	0.771~73.00
1	2	4	3	1.33	0.172~10.3	4.22	0.545~32.6
1	3	3	3	1.33	0.148~12.1	4.22	0.467~38.1

7.1.5.3 一次最大限度试验

如20只实验动物（雌雄各半）一次灌胃剂量5000 mg/kg体重，在14 d内又无一死亡，可判定LD_{50}≥5000 mg/kg体重。

7.1.5.4 其他方法

也可采用其他方法如寇氏（Karber）法、固定剂量法（Fixed dose method）及上-下法（Up - down procedure）等。

7.1.6 急性经口毒性试验分级评价规定

急性经口毒性试验分级评价规定见表 23。

表23 急性经口毒性试验分级

LD_{50}/（mg/kg体重）	毒性分级
LD_{50}≥5000	实际无毒
500≤LD_{50}＜5000	低毒
50≤LD_{50}＜500	中等毒
1≤LD_{50}＜50	高毒
LD_{50}＜1	剧毒

7.2 急性吸入毒性试验

7.2.1 目的

检测消毒剂对实验动物的急性吸入毒性作用和强度。

7.2.2 实验动物

小鼠或大鼠任选一种，雌雄各半。小鼠体重为18 g ～22 g，大鼠体重为180 g ～220 g。

7.2.3 操作程序

7.2.3.1 试验设计

染毒浓度的设计、实验动物分组、观察期限、观察指标等可按7.1的要求进行。

7.2.3.2 染毒方法

试验用受试物浓度按 4.5.3.3。急性吸入毒性试验可采用静式染毒法或动式染毒法。

7.2.3.2.1 静式染毒法

静式染毒法如下：

a) 静式染毒是将实验动物放在一定体积的密闭容器（染毒柜）内，加入一定量的消毒剂，并使其挥发，造成实验需要消毒剂浓度的空气，一次吸入性染毒 2 h；

b) 染毒柜的容积以每只染毒小鼠不少于 3 L/h 空气计，每只大鼠不少于 30 L/h 计；

c) 计算染毒浓度，染毒浓度一般应采用实际测定浓度。在染毒期间一般可测 4 次～5 次，求其平均浓度。在无适当测试方法时。可用式（90）计算染毒浓度:

$$c = \frac{a \times d}{V} \quad \cdots\cdots (90)$$

式中：

c——染毒浓度，单位为毫克每立方米（mg/m^3）；

a——消耗消毒剂量，单位为立方米（m^3）；

d——消毒剂密度，单位为毫克每立方米（mg/m^3）；

V——染毒柜容积，单位为立方米（m^3）。

7.2.3.2.2 动式染毒法

动式染毒法如下：

a) 动式染毒是采用机械通风装置，连续不断地将含有一定浓度消毒剂的空气均匀不断地送入染毒柜，并排出等量的染毒气体，维持相对稳定的染毒浓度。一次吸入性染毒 2 h；

b) 气体消毒剂，经流量计与空气混合成一定浓度后，直接输入染毒柜。易挥发液体消毒剂，通过空气鼓泡或适当加热促使挥发后输入染毒柜。若消毒剂现场使用采取喷雾法时，可采用喷雾器或超声雾化器使其雾化后输入染毒柜；

c) 计算染毒浓度，染毒浓度一般应采用实验动物呼吸带实际测定浓度，每 30 min 一次，取其平均值。若无适当的测试方法，也可采用公式（91）计算染毒浓度：

$$c = \frac{a \times d}{V_1 + V_2} \quad (91)$$

式中：

c——染毒浓度，单位为毫克每立方米（mg/m^3）；

a——气化或雾化消毒剂量，单位为立方米（m^3）；

d——消毒剂密度，单位为毫克每立方米（mg/m^3）；

V_1——输入染毒柜风量，单位为立方米（m^3）；

V_2——染毒柜容积，单位为立方米（m^3）。

7.2.3.3 LC_{50} 的计算

7.2.3.3.1 LC_{50}（半数致死浓度）的计算可按 7.1 的要求进行。

7.2.3.3.2 在预试验的基础上，如 20 只实验动物（雌雄各半）一次 2 h 吸入染毒浓度 10000 mg/m^3，在 14 d 内无一死亡，可判定 $LC_{50} \geqslant 10000$ mg/m^3。

7.2.4 急性吸入毒性试验评价规定

急性吸入毒性试验评价规定见表24。

表24 急性吸入毒性试验分级

2 h LC_{50}/（mg/m^3）	毒性分级
$LC_{50} \geqslant 10000$	实际无毒
$1000 \leqslant LC_{50} < 10000$	低毒
$100 \leqslant LC_{50} < 1000$	中等毒
$10 \leqslant LC_{50} < 100$	高毒
$LC_{50} < 10$	剧毒

7.3 皮肤刺激试验

7.3.1 目 的

检测消毒剂对实验动物皮肤的刺激（腐蚀）作用和强度。

7.3.2 实验动物

每次试验至少需3只皮肤完好的健康家兔或豚鼠。

7.3.3 操作程序

7.3.3.1 一次完整皮肤刺激试验

7.3.3.1.1 试验用受试物的浓度一般为皮肤消毒应用液的 5 倍或使用消毒剂原液（参考 4.5.3.4）。

7.3.3.1.2 在试验前 24 h，用剪刀将家兔或豚鼠背部脊柱两侧的毛去掉。去毛范围，各约 3 cm×3 cm，不得损伤皮肤。

7.3.3.1.3 次日将受试物 0.5 mL（g）直接滴于面积为 2.5 cm×2.5 cm 的一侧去毛完整皮肤上，或滴于同样大小的 2 层～4 层纱布上并敷贴在一侧去毛皮肤表面，然后用一层无刺激塑料膜或油纸覆盖，再用无刺激胶布固定。另一侧去毛皮肤作为空白对照（或溶剂对照）。敷贴时间为 4 h。对于使用后清洗的消毒剂，敷贴时间为 2 h。试验结束后，用温水或无刺激性溶剂除去残留受试物。

7.3.3.1.4 分别于去除受试物后 1 h、24 h 和 48 h 观察皮肤局部反应，并按表 25 进行刺激反应评分。

表25 皮肤刺激反应的评分标准

皮肤刺激反应		皮肤刺激反应评分
红斑形成	无	0
	勉强可见	1
	明显	2
	严重	3
	紫红色红斑，并有焦痂	4
水肿形成	无	0
	勉强可见	1
	皮肤隆起，轮廓清楚	2
	水肿隆起约 1 mm	3
	水肿隆起超过 1 mm	4

7.3.3.2 一次破损皮肤刺激试验

7.3.3.2.1 涂受试物前，在 2.5 cm×2.5 cm 的去毛皮肤上，用 75%酒精清洁、消毒暴露皮肤，待酒精挥发后，用灭菌刀片或注射针头在皮区内划一个“井”形的破损伤口，并在该破损皮区内染毒。注意皮肤破损仅达表皮，不要伤及真皮。

7.3.3.2.2 试验用受试物的浓度、手术前的皮肤准备、手术后受试物的涂抹、局部皮肤反应的观察和评分方法按 7.3.3.1 的要求进行。注意鉴别感染和原发性刺激反应的区别，若有感染可疑，应进行重复测试。

7.3.3.3　多次完整皮肤刺激试验

7.3.3.3.1　试验前实验动物皮肤准备按 7.3.3.1.2 的要求。

7.3.3.3.2　次日将受试物 0.5 mL（g）涂抹在一侧皮肤上，受试物的浓度同 7.3.3.1.1，另一侧涂抹溶剂作为对照，在涂抹后 4 h，用水或无刺激的适宜溶剂清洗，除去残留物。每天涂抹一次，连续涂抹 14 d。在每次涂抹后 24 h 观察结果，按表 24 评分。为了便于受试物的涂抹和结果观察，必要时应剪毛。对照区的处理方法同试验区。

7.3.4　评价规定

7.3.4.1　一次皮肤刺激试验

在各个观察时间点，按照表25对实验动物的皮肤红斑与水肿形成情况进行评分，并分别按时间点将3只实验动物的评分相加，除以实验动物数，获得不同时间点的皮肤刺激反应积分均值（刺激指数 DI）。取其中最高皮肤刺激指数，按表26评定该受试物对实验动物皮肤刺激强度的级别。

表26　皮肤刺激强度分级

皮肤刺激指数 DI	刺激强度级别
0≤DI＜0.5	无刺激性
0.5≤DI＜2.0	轻刺激性
2.0≤DI＜6.0	中等刺激性
6.0≤DI≤8.0	强刺激性

7.3.4.2　多次皮肤刺激试验

按公式（92）计算每天每只实验动物皮肤刺激指数（DI），并以表26判定皮肤刺激强度。

$$\mathrm{DI}=\frac{\mathrm{M}}{n\times 14} \quad (92)$$

式中：

DI——皮肤刺激指数；

M ——所有实验动物14 d的红斑和水肿总积分；

n ——受试实验动物数；

14——多次皮肤试验刺激天数。

7.4　急性眼刺激试验

7.4.1　目　的

检测消毒剂对实验动物眼睛的急性刺激和腐蚀作用。

7.4.2　实验动物

使用3只家兔。试验前检查家兔双眼，有异常者不能用于试验。

7.4.3　操作程序

7.4.3.1　试验用受试物一般为黏膜或空气消毒应用液的 5 倍浓度的溶液或消毒剂原液(参考 4.5.3.4)。

7.4.3.2　吸取受试物 0.1 mL，滴入家兔一侧眼结膜囊内。另一侧眼以生理盐水作为正常对照。

7.4.3.3　滴入受试物后，将眼被动闭合 4 s，30 s 用生理盐水冲洗。于滴眼后 1 h、24 h、48 h、72 h、7 d、14 d 和 21 d，肉眼观察家兔眼结膜、虹膜和角膜的损伤与恢复情况。如果 72 h 内未出现刺激反应，或第 7 d 或第 14 d，眼睛刺激反应完全恢复，即可提前终止试验。必要时，用 2% 荧光素钠溶液或裂隙灯、放大镜检查角膜及虹膜变化。

7.4.4　评价规定

按表29对家兔眼角膜、虹膜和结膜的急性刺激反应进行评分，并分别计算每只实验动物在3个不同观察时间（24 h、48 h和72 h）的角膜损害、虹膜损害、结膜充血和结膜水肿四方面的“平均评分”（即每只实验动物的24 h、48 h和 72 h 评分之和除以观察数3）。分别以实验动物眼角膜、虹膜和结膜充血、水肿的平均评分和恢复时间，按表27、表28、表29判定受试物对眼睛的刺激强度。

表27　家兔急性眼刺激反应的评分标准

眼损害表现		评分
角膜损害	无溃疡形成或混浊	0
	散在或弥漫性混浊，虹膜清晰可见	1
	半透明区易分辨，虹膜模糊不清	2
	出现灰白色半透明区，虹膜细节不清，瞳孔大小勉强可见	3
	角膜不混浊，虹膜无法辨认	4
虹膜损害	正常	0
	皱褶明显加深，充血、肿胀、角膜周围有中度充血，瞳孔对光仍有反应	1
	出血、肉眼可见破坏，或瞳孔对光无反应	2
结膜（睑结膜、球结膜）充血	血管正常	0
	血管充血呈鲜红色	1
	血管充血呈深红色，血管不易分辨	2
	弥漫性充血呈紫红色	3
结膜（睑结膜、球结膜）水肿	无水肿	0
	轻微水肿（包括瞬膜）	1
	明显水肿，伴有部分眼睑外翻	2
	水肿至眼睑近半闭合	3
	水肿至眼睑大半闭合	4

表28　眼刺激性反应分级标准（一）

损伤类型		分级标准
可逆性损伤	无刺激性	3 只实验动物的平均评分：角膜损害＜1、虹膜损害＜1、结膜充血＜2 和结膜水肿＜2 或 3 只实验动物中至少有 2 只实验动物的平均评分符合上述

		标准，另外 1 只实验动物的刺激反应在 21 d 内完全恢复[a]。
	轻刺激性	3 只实验动物中有 2 只实验动物的平均评分：角膜损害≥1；虹膜损害≥1；结膜充血≥2；结膜水肿≥2，且 7 d 内全部实验动物的刺激反应完全恢复[a]。
可逆性损伤	刺激性[b]	3 只实验动物中有 2 只实验动物的平均评分：角膜损害≥1；虹膜损害≥1；结膜充血≥2；结膜水肿≥2，且 21 d 内全部实验动物的刺激反应完全恢复。
不可逆性损伤	腐蚀性[c]	至少有 1 只实验动物的角膜、虹膜或结膜的刺激反应在 21 d 的观察期内未完全恢复或（和）在 3 只实验动物中有 2 只实验动物的平均评分：角膜损害≥3；虹膜损害≥1.5。

[a] 完全恢复是指实验动物的眼刺激反应评分，角膜损害= 0，虹膜损害= 0，结膜充血= 0 或 1，结膜水肿= 0 或 1。

[b] 刺激性是指接触受试物后所产生的可逆性炎性反应。

[c] 腐蚀性是指接触受试物后所产生的不可逆性组织损伤。

表29　眼刺激性反应分级标准（二）

平均评分	实验动物数 只	恢复时间[a] d	损伤类型	
角膜损害＜1 和 虹膜损害＜1 和 结膜充血＜2 和 结膜水肿＜2	≥2	≤21	可逆性损伤	无刺激性
角膜损害≥1 或 虹膜损害≥1 或 结膜充血≥2 或 结膜水肿≥2	≥2	≤7	可逆性损伤	轻刺激性
		≤21		刺激性
角膜损害≥3 或 虹膜损害≥1.5	≥2	—	不可逆性损伤	腐蚀性[b]
角膜损害≥1 或 虹膜损害≥1 或 结膜充血≥1 或 结膜水肿≥1	≥1	＞21		

[a] 恢复时间是指实验动物刺激反应评分恢复至角膜损害=0，虹膜损害=0，结膜充血=0 或 1，结膜水肿=0 或 1 的时间。

[b] 至少有 1 只实验动物于 21d 尚存在角膜粘连或血管翳，也可判为腐蚀性。

7.5　阴道黏膜刺激试验

7.5.1　目　的

检测消毒剂对实验动物阴道黏膜的刺激作用和强度。

7.5.2 实验动物

选用健康、初成年的雌性白色家兔，同一品系，体重2.0 kg～3.0 kg。试验前应检查实验动物阴道口有无分泌物、充血、水肿和其他损伤情况。如有炎症或损伤，应弃用。选择未交配的实验动物进行试验。

7.5.3 试验分组

分为染毒组和对照组，每组3只。

7.5.4 操作程序

7.5.4.1 稀释使用的消毒剂采用黏膜消毒时应用液 5 倍浓度的溶液作为受试物。若应用液为原液的消毒剂则用原液作受试物。对照组采用生理盐水。

7.5.4.2 将长度为 8 cm 左右的钝头软管或 12 号硅胶导尿管与 2 mL 的注射器连接。注射器和导管注满受试液备用。每只实验动物各准备一套。

7.5.4.3 一次阴道黏膜刺激试验的染毒方法：将实验动物仰面固定，暴露出会阴和阴道口。将导管用受试液或对照液湿润后轻柔地插入阴道（4 cm～5 cm），并用注射器缓慢注入 2 mL 受试液，抽出导管，完成染毒。对照组实验动物用生理盐水作同样处理。

7.5.4.4 由于实验动物阴道容积的个体差异，有时受试液注入后可能有溢出，可用消毒棉或软纸拭去。

7.5.4.5 多次阴道黏膜刺激试验的染毒方法：按上述 7.5.4.3 的染毒方法，每隔 24 h 重复染毒一次，连续 5 d。对照组实验动物用生理盐水作同样处理。

7.5.4.6 末次染毒后 24 h，采用气栓法处死实验动物，剖腹取出完整的阴道，纵向切开，肉眼观察是否有充血、水肿等表现，供病理取材时参考。然后将阴道放入 10%福尔马林溶液中固定 24 h 以上，选取阴道的两端和中央（即位于耻骨联合处附近）3 个部位的组织制片，HE 染色后，进行组织病理学检查。

7.5.5 评价规定

7.5.5.1 组织病理学检查结果，按表 30 规定对阴道黏膜的刺激反应进行评分。

表30 阴道黏膜刺激反应评分标准 [a]

阴道组织反应		反应评分
A. 上皮组织	完整—正常	0
	细胞变性或变扁平	1
	组织变形	2
	局部糜烂	3
	广泛糜烂或溃疡	4
B. 白细胞浸润（每个高倍视野）	无	0
	极少 ＜25 个	1
	轻度 25 个～50 个	2

	中度　51 个～100 个	3
	重度　＞100 个	4
C．血管充血	无	0
	极少	1
	轻度	2
	中度	3
	重度伴血管破裂	4
D．水肿	无	0
	极少	1
	轻度	2
	中度	3
	重度	4
[a] 刺激反应积分=A+B+C+D。		

7.5.5.2　将试验组 3 只实验动物 3 个部位的刺激反应积分相加后，再除以观察总数（实验动物数×3），得出试验组阴道黏膜刺激反应的平均积分，最大记分为 16（见表 31）。

7.5.5.3　对照组评分方法同 7.5.5.1 和 7.5.5.2。

7.5.5.4　将试验组平均积分减去对照组平均积分得出刺激指数后，按表 31 进行刺激强度分级。

表31　阴道黏膜刺激强度分级

阴道黏膜刺激指数 DI	阴道黏膜刺激反应强度
0≤DI＜1	无
1≤DI＜5	极轻
5≤DI＜9	轻度
9≤DI＜12	中度
DI≥12	重度

7.5.5.5　当对照组实验动物阴道黏膜刺激反应平均积分大于 9 时，应采用 6 只实验动物进行复试，以鉴别是否与操作损伤有关。

7.6　皮肤变态反应试验

7.6.1　目　的

实验动物重复接触消毒剂后产生皮肤变态反应的可能性及其强度。

7.6.2　实验动物

选用皮肤完好的健康白色豚鼠，雌雄各半，体重200 g～300 g。

7.6.3　试验分组

将豚鼠随机分为试验组、阴性对照组和阳性对照组，每组实验动物至少16只。

7.6.4 操作程序

7.6.4.1 对试验组豚鼠，给予受试物诱导和激发处理。阳性对照组给予阳性致敏物（如：2,4-二硝基氯苯）诱导和激发处理。阴性对照组仅给以受试物激发处理。

7.6.4.2 诱导处理浓度允许引起皮肤轻度刺激反应。激发浓度可低于诱导浓度，并不得引起原发性刺激反应。如果原液不引起皮肤刺激反应，诱导和激发均使用原液。

7.6.4.3 试验前 24 h 将豚鼠背部左侧 3 cm×3 cm 范围内去毛。取诱导浓度的消毒剂溶液（或原液）0.5 mL（g），直接涂在 2 cm×2 cm 左侧去毛皮肤上或滴于同样大小的 2 层～4 层纱布上，再将其敷贴在左侧去毛区。用一层无刺激塑料膜或油纸覆盖，再以无刺激胶布固定，6 h 后将敷贴的受试物洗去。第 7 d 和第 14 d 以同样方法重复一次。

7.6.4.4 在末次诱导后 14 d，将激发浓度的消毒剂溶液 0.5 mL（g）直接涂抹在 2 cm×2 cm 右侧脱毛皮肤上或滴于同样大小的 2 层～4 层纱布上，敷贴于豚鼠背部右侧 3 cm×3 cm 去毛区。然后，用一层无刺激塑料膜或油纸和无刺激胶布固定，6 h 后将敷贴的受试物洗去。24 h 和 48 h 后观察皮肤反应，按表 32 对皮肤反应进行评分。

表32 皮肤反应的评分标准

皮肤反应		评分
红斑形成	无红斑	0
	轻微红斑	1
	中度红斑	2
	严重红斑	3
	水肿性红斑	4
水肿形成	无水肿	0
	轻度水肿	1
	中度水肿	2
	严重水肿	3

7.6.4.5 实验室开展皮肤变态反应试验初期，或使用新的实验动物种属或品系时，应同时设阳性对照组，阳性对照物可使用 2,4-二硝基氯苯。为保证试验方法的可靠性，在进行该类试验时，每隔半年应使用阳性对照物检查一次。若检测报告中需用非本次阳性对照组的实验数据时，应注明其实验日期。阳性对照组的操作程序同试验组，以阳性致敏物替代受试物。

7.6.4.6 阴性对照组，仅对实验动物给予受试物的激发处理，每次试验必须设置。

7.6.5 评价规定

7.6.5.1 化学物质引起的过敏性接触性皮炎，属迟发型变态反应。对于实验动物，仅见皮肤红斑和水肿。

7.6.5.2 根据表 33 标准，将出现皮肤反应（评分≥1）的实验动物数除以该组实验动物数，求得致敏率（%），按表 33 评定致敏强度。

表33 致敏强度分级标准[a]

致敏率%	致敏强度
0～8	极轻度
9～28	轻度
29～64	中度
65～80	强度
81～100	极强度
[a] 致敏率为 0% 时，可判为未见皮肤变态反应。	

7.7 亚急性经口毒性试验

7.7.1 目的

7.7.1.1 实验动物多次接触消毒剂的靶器官蓄积毒性作用，并确定其最大未观察到有害作用剂量和最小观察到有害作用剂量。

7.7.1.2 为亚慢性、慢性毒性或致癌试验的剂量设计提供依据。

7.7.2 实验动物

一般用啮齿类实验动物，首选大鼠，所用大鼠应为6周龄～8周龄，每组至少10只，雌雄各半。

7.7.3 试验分组

将实验动物随机分为4组（3个剂量组和1个对照组）。选择受试物剂量时，高剂量组应出现明显的毒性反应，但不引起死亡，如果出现实验动物死亡应不超过10%；中间剂量组应可观察到轻微的毒性效应；低剂量组应不引起任何毒性效应 （属未观察到有害作用剂量）。至于具体的剂量设计，可考虑高剂量为LD_{50} 的 1/5～1/10，高、中、低3个剂量间的组距以3倍～5倍为宜，最低不小于2倍。对于 LD_{50}≥5000 mg/kg体重的消毒剂，高剂量应用1000 mg/kg 体重。另以受试物溶剂代替受试物进行试验，作为阴性（溶剂）对照组。

7.7.4 操作程序

7.7.4.1 采用灌胃方式经口染毒。

7.7.4.2 灌胃法每天灌胃一次，每周称体重，并按体重调整受试物的给予量。

7.7.4.3 试验期为 28 d，末次染毒后 24 h 处死实验动物，检测各项观察指标。

7.7.5 观察指标

7.7.5.1 临床检查

观察实验动物中毒表现，每周称量体重一次。

7.7.5.2 血液学检查

包括血红蛋白含量、红细胞计数、白细胞计数及其分类计数等。

7.7.5.3 血液生化检查

包括天冬氨酸氨基转移酶、丙氨酸氨基转移酶、尿素氮、肌酐、血清总蛋白和白蛋白、总胆固醇等。必要时，可根据所观察到的受试物毒性效应，或与受试物化学结构相似物质的毒性作用，选择其他一些生化指标。

7.7.5.4 脏器重量

测量肝、肾等重要脏器的重量，并根据体重计算其脏器系数（脏器重/体重×100%）。

7.7.5.5 病理学检查

实验结束时，处死所有实验动物，进行全面的肉眼尸检，并将尸检发现的异常组织和主要脏器和组织（如心、肺、肝、肾、脾、脑、肾上腺、睾丸、卵巢和胃肠等）固定保存。当各剂量组实验动物尸检未发现明显病变，先进行高剂量组和阴性对照组实验动物的肝、肾、胃肠和其他可能受损的脏器的组织病理学检查。如大体解剖发现异常或高剂量组实验动物组织病理学检查发现病变，还应对中、低剂量组实验动物相应的器官进行组织病理学检查。

7.7.6 评价规定

将各试验组实验动物观察指标与阴性对照组加以比较，并进行统计学检验，注意各剂量组间的剂量-反应（效应）关系。评定受试物的最小观察到有害作用剂量和最大未观察到有害作用剂量及毒性作用的靶器官。

7.8 致突变试验

7.8.1 体外哺乳动物 L5178Y 细胞基因突变试验

7.8.1.1 目的

检测消毒剂对体外培养的哺乳动物细胞的基因突变作用，以作为评价消毒剂致突变性的依据。

7.8.1.2 试剂

7.8.1.2.1 F_{10P}培养液：为完全培养液。以 Fischer 或 RPMI 1640 培养液，加入马血清 10%，丙酮酸钠 220 μg/mL，青霉素 100 IU/mL 和链霉素 100 μg/mL 配制而成（pH 7.2～7.4）。于 4 ℃冰箱中保存备用。

7.8.1.2.2 F_{0P}培养液：为无血清培养液。以 Fischer 或 RPMI 1640 培养液，加入丙酮酸钠 220 μg/mL，青霉素 100 IU/mL 和链霉素 100 μg/mL 等配制而成（pH 7.2～7.4）。于 4 ℃冰箱中保存备用。

7.8.1.2.3 马血清：将过滤除菌后的马血清，经 56 ℃作用 30 min 灭活补体。分装后，于-20 ℃保存备用 。

7.8.1.2.4 集落用培养基：用 Fischer 或 RPMI 1640 培养液，加入马血清 20%、丙酮酸钠 220 μg/mL、琼脂 0.37% 配制而成。

7.8.1.2.5 无钙镁磷酸盐缓冲液（无钙镁 PBS，pH 7.2～7.4）。

磷酸二氢钾（KH_2PO_4） 0.20 g

磷酸氢二钠（$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$） 2.89 g

氯化钾（KCl）　　0.20 g

氯化钠（NaCl）　　8.00 g

双蒸水（压力蒸汽灭菌）　　1000 mL

7.8.1.2.6　受试物：最好能直接溶于 F_{10P} 与 F_{0P} 培养液中。否则应先溶于二甲基亚砜（DMSO），而后再加于上述培养液内。所加 DMSO 的量应低于 1%（体积分数）。

7.8.1.2.7　阳性对照物：选用甲基磺酸乙酯（EMS），丝裂霉素 C（MMC），甲基硝基亚硝基胍（MNNG），苯并（α）芘（BaP）等。

7.8.1.2.8　三氟胸苷（TFT）：用生理盐水配成 100 μg/mL 溶液，可冻存 3 个月。

7.8.1.2.9　肝微粒体酶混合液（S9 混合液）：取健康的雄性成年 SD 或 Wistar 大鼠，体重 150 g 左右，约 5 周龄～6 周龄。将多氯联苯（Aroclor 1254），溶于玉米油中，浓度 200 mg/mL，按 500 mg/kg 体重一次腹腔注射。5 d 后，断头处死实验动物，取出肝脏称重后，用预冷的 0.15 mol/L 氯化钾溶液冲洗肝脏数次。每克肝（湿重）加 0.15 mol/L 氯化钾溶液 3 mL。剪碎肝脏，在冰浴中用玻璃匀浆器制成肝匀浆。以上操作应注意无菌和局部冷环境。

将肝匀浆用低温（0 ℃～4 ℃）高速离心机，以 9000 *g* 离心 10 min。取上清液即为 S9，分装于无菌冷冻安瓿中。S9 制成后，应进行无菌检查，以及用间接致癌物鉴定其活性。合格者置-80 ℃或液氮中储存备用，储存期不超过半年。

S9 混合液应以上述 S9 液在临用时按无菌要求配制。一般配成含 10% S9 的混合液。其配方如下：

S9　　0.10 mL

1.65 mol/L 氯化钾 + 0.4 mol/L 氯化镁　　0.04 mL

葡萄糖-6-磷酸•2Na　　1.8 mg

氧化型辅酶 II （NADP）　　3.1 mg

用 F_{0P} 培养液补足至　　1.0 mL

7.8.1.3　细胞

试验以小鼠淋巴瘤L5178Y细胞[胸苷激酶（TK）座位为杂合子（tk+/tk-）] 检测TK基因的突变。为减少细胞的自发突变率，在制备该细胞试验用悬液时，先将其在加有THMG的F_{10P}培养液中培养24 h，杀灭培养液中所存在的自发突变细胞（tk-/tk-），然后将细胞悬浮于THG培养液（不含氨甲喋呤的THMG培养液）中培养1 d～3 d。

THMG 含下列4种成分，各成分的终末浓度如下：

胸苷　　5×10^{-6} mol/L

次黄嘌呤　5×10^{-5} mol/L

氨甲喋呤　4×10^{-7} mol/L

甘氨酸　　1×10^{-4} mol/L

7.8.1.4　试验分组

7.8.1.4.1　一般设 4 个剂量组。有细胞毒性的受试物，最高剂量组的细胞存活率为 10%～20%，无细胞

毒性受试物最高剂量不超过 10 mmol/L 或 5 mg/mL。

7.8.1.4.2 同时应有阴性（溶剂）对照组、阳性对照组和未处理对照组。阳性与阴性对照组的操作程序同试验组，阳性对照组用阳性对照物代替受试物，阴性（溶剂）对照组用受试物溶剂代替受试物。

7.8.1.4.3 除未处理对照组外，试验组和其他对照组，还均应包括有加 S9 混合液和不加 S9 混合液的两部分。

7.8.1.5 操作程序

7.8.1.5.1 细胞准备

将新清除了自发突变体的细胞群体，用F_{10P}培养液制成悬液。以无菌烧瓶加入细胞悬液和F_{10P}培养液至100 mL，细胞终末密度为7×10^3 个/mL～8×10^3 个/mL。培养物以含5%二氧化碳的空气充气后，加盖密闭，于36 ℃±1 ℃进行培养。L5178Y细胞的细胞增殖周期约为10 h～11 h，在常规培养24 h后，细胞数将增加约5倍。用稀释法维持生长，每天将细胞培养物用F_{10P}培养液作4倍稀释（或隔天用F_{10P}培养液作24倍稀释），继续培养。实验前一天用F_{10P}培养液和F_{0P}培养液各50%的对半混合液（马血清终末浓度为5%）稀释。

7.8.1.5.2 受试物处理

用 7.8.1.5.1中F_{10P}和F_{0P}的对半混合液将细胞培养物稀释至1×10^6个/mL，并分种于50 mL有盖试管中，每管6 mL，再加S9混合液4 mL（总量共10 mL）。不加S9混合液管，代之以F_{0P}培养液。在上述试管内加入一定浓度的受试物，并以含5%二氧化碳的空气充气后加盖密闭，于36 ℃±1 ℃培养4 h。

处理结束后，以200 *g*离心10 min，除去含受试物的上清液，收集细胞。细胞用Hanks液洗涤，再加入20 mL F_{10P}培养液充分混悬（细胞浓度为0.3×10^6个/mL），以含5%二氧化碳的空气充气后，加盖密闭，于36 ℃±1 ℃振荡培养，开始表达。

7.8.1.5.3 表达

细胞的表现型表达时间为2 d。表达开始后24 h和48 h经计数后将细胞稀释至3×10^5个/mL。

7.8.1.5.4 选择和集落化

表达结束后，取10 mL培养物经离心后除去大部分上清液。并将细胞在留下的约1 mL F_{10P}培养基中混悬。将细胞悬液移入含100 mL集落培养基的烧瓶中。此时细胞密度为3×10^4个/mL。在36 ℃±1 ℃ 振荡培养30 min。取出0.5 mL后，向余下的细胞悬液中加入1.0 mL TFT贮存液，继续振荡培养15 min。将样本取出，倒于3个直径10 cm平皿中，每平皿33 mL，含1×10^6个细胞（称为TFT平板），作突变体的选择。将先前取出的0.5 mL细胞悬液用集落培养基先作1:100稀释，细胞悬液浓度为3×10^2个/mL。振荡培养15 min后，取出2.0 mL再用集落培养基作1:50稀释（此时细胞悬液浓度为6个/mL） 后振荡培养。经15 min培养后，倒入3个直径为100 mm的平皿中，每平皿33 mL，含细胞200个（称为VC平板）。待琼脂凝固后，置二氧化碳培养箱（36 ℃±1 ℃）中静置培养10 d。计数各个平皿中出现的集落数（m）。

7.8.1.5.5 相关指标的计算

按公式（93）、公式（94）计算绝对集落形成效率（E_a）和相对集落形成效率（E_r），按公式（95）计算突变频率（MF）。

$$E_a = \frac{m}{n} \quad (93)$$

式中：

E_a——绝对集落形成效率；

m——形成集落数，单位为细胞集落数（CFU）；

n——接种细胞数，单位为细胞个数。

$$E_x = \frac{E_{a1}}{E_{a0}} \quad (94)$$

式中：

E_x——相对集落形成效率；

E_{a1}——试验组绝对集落形成效率；

E_{a0}——溶剂对照组绝对集落形成效率。

$$MF = \frac{m_{TFT}}{m_{VC}} \times f \quad (95)$$

式中：

MF ——突变频率；

m_{TFT} ——TFT 平板集落数，单位为细胞集落数（CFU）；

m_{VC} —VC 平板集落数，单位为细胞集落数（CFU）；

f —稀释系数为 2×10^{-4}。

7.8.1.6 评价规定

7.8.1.6.1 对 L5178Y 细胞，自发突变频率推荐可接受的范围为 2×10^{-5}～1×10^{-4}。

7.8.1.6.2 用适当的统计学检验方法处理，当各剂量组 MF 与阴性（溶剂）对照组者相比突变率升高，且有统计学意义，并呈剂量-反应关系时，或仅一个剂量组有统计学意义的升高并经重复试验证实者，均可判为阳性结果，即受试物对 L5178Y 细胞 TK 系统有致突变性。

7.8.2 体外哺乳动物 V79 细胞基因突变试验

7.8.2.1 目 的

检测消毒剂对体外培养的哺乳动物细胞可否引起基因突变，以对消毒剂的致突变性做出评价。

7.8.2.2 试 剂

7.8.2.2.1 完全培养液：以 Eagle 最低必需培养液（EMEM）或 RPMI1640 培养液加 10%小牛血清、青霉素（100 IU/mL）和链霉素（100 μg/mL）配制而成。

7.8.2.2.2 小牛血清：将过滤除菌后的小牛血清放入 56 ℃水浴中，保温 30 min 以灭活补体， 而后分装，保存于-20 ℃备用。

7.8.2.2.3 无钙镁磷酸盐缓冲液（无钙镁 PBS）：见 7.8.1.2.5。

7.8.2.2.4 胰蛋白酶-EDTA 溶液：分别用无钙镁 PBS 配制胰蛋白酶与 EDTA 溶液，胰蛋白酶溶液浓度为 0.05%，EDTA 溶液浓度为 0.02%。两溶液按 1:1 混合。存放于-20 ℃备用。

7.8.2.2.5 受试物：最好能直接溶于无血清培养液内。否则应先溶于二甲基亚砜（DMSO），而后加于

无血清培养液内。所加DMSO溶液量为0.5%（体积分数）。

7.8.2.2.6 阳性对照物：可根据受试物的性质和结构选用不同的阳性对照物，例如甲基磺酸乙酯（EMS），丝裂霉素C（MMC），甲基硝基亚硝基胍（MNNG），苯并（α）芘（BaP）等。

7.8.2.2.7 6-硫代鸟嘌呤（6-TG）：用0.5%碳酸氢钠溶液配制为1.0 mg/mL溶液，保存于4 ℃备用。

7.8.2.2.8 肝微粒体酶混合液（S9 混合液）：见 7.8.1.2.9。

7.8.2.2.9 磷酸盐缓冲液（0.067 mol/L，pH 6.8）：取磷酸氢二钠9.47 g溶于蒸馏水1000 mL中，配成第一液；取磷酸二氢钾9.07 g溶于蒸馏水1000 mL中，配成第二液；取第一液49.5 mL加于第二液50.5 mL中混匀，即为pH 6.8的0.067 mol/L 磷酸盐缓冲液。

7.8.2.2.10 姬姆萨染液：取姬姆萨染料3.8 g，置玛瑙乳钵中，加少量甲醇研磨。逐渐加甲醇至375 mL，待完全溶解后，再加125 mL甘油，放入36 ℃±1 ℃恒温培养箱中保温48 h。保温期间振摇数次，使充分溶解。取出过滤，两周后使用，作为姬姆萨染液原液。

使用时，取1份姬姆萨染液原液，与9份0.067 mol/L磷酸盐缓冲液（pH 6.8）混合，配成其应用液。

7.8.2.3 细 胞

以中国仓鼠肺（V79）细胞株进行试验。为减少其自发突变，正式试验前将野生型细胞接种于含THMG（见 7.8.1.3）的MEM培养液内并在二氧化碳培养箱中培养一周，以杀灭自发HGPRT位点突变体。遂后重新接种于MEM培养液中。

7.8.2.4 试验分组

7.8.2.4.1 一般设4个试验剂量组。对有细胞毒性的受试物，最高剂量组的细胞存活率为10%～20%，无细胞毒性受试物最高剂量不超过10 mmol/L（或 5 mg/mL）。

7.8.2.4.2 同时应设阴性（溶剂）对照组、阳性对照组和未处理对照组。阳性与阴性对照组的操作程序同试验组，阳性对照组用阳性对照物代替受试物，阴性（溶剂）对照组用受试物溶剂代替受试物。

7.8.2.4.3 除未处理对照组外，各组均应包括加S9混合液和不加该液的样本。

7.8.2.5 操作程序

7.8.2.5.1 细胞准备

将5×10^5个细胞接种于含完全培养液的直径为100 mm的平皿中，除未处理对照组一皿外，其余每组二皿，共13皿。于二氧化碳培养箱中（36 ℃±1 ℃）培养24 h。

7.8.2.5.2 接触受试物

吸去7.8.2.5.1培养皿中的培养液，用无钙镁PBS洗2次。将含有细胞的培养皿分为两大组，一组加S9混合液，另一组不加S9混合液。加S9混合液组，在培养皿中加入2 mL S9混合液，对不加S9混合液组，则用2 mL无血清培养液代替，再加一定量不同浓度受试物的供试液，最后用不含血清的培养液补足至10 mL。并将培养皿置二氧化碳培养箱中培养5 h，处理结束后，吸去培养皿中液体部分，用无钙镁 PBS洗

涤细胞2次，再加入完全培养液10 mL，在二氧化碳培养箱中培养19 h～22 h。阳性和阴性（溶剂）对照组也分加与不加S9混合液两大组，操作方法同上。

7.8.2.5.3 表 达

将培养物用胰蛋白酶-EDTA消化。待细胞脱落后，加入完全培养液，终止消化。混匀、计数并进行表达。表达时，以5×10^5个细胞接种于直径为100 mm的平皿中。培养3 d后，分传一次，仍接种5×10^5个细胞，培养3 d后再进行突变体的选择，并按7.8.1.5.5中式（95）和式（96）计算绝对集落形成效率（E_a）和相对集落形成效率（E_r）。

7.8.2.5.4 细胞毒性测定

将7.8.2.5.3消化计数后的细胞，每平皿接种200个，每组5个平皿，于二氧化碳培养箱内（36 ℃±1 ℃）培养7 d。取出样本，固定并进行姬姆萨染色后，计数各平皿的细胞集落数。并按 7.8.1.5.5计算相对集落形成效率（E_r），以相对集落形成效率表示细胞的毒性。

7.8.2.5.5 突变频率的测定

表达结束后，消化细胞，分别接种，每组5个平皿，每平皿种2×10^5个细胞。待细胞贴壁后加入6-TG，终末浓度为5 μg/mL。放入二氧化碳培养箱培养7 d～10 d。固定后进行姬姆萨染色，计数平皿内集落数，并计算其突变频率（MF）。

7.8.2.5.6 突变频率（MF）的计算

按公式（96）计算突变频率:

$$MF=\frac{m}{n\times E_a} \quad (96)$$

式中：

MF——突变频率；

m——突变集落数，单位为细胞集落数（CFU）；

E_a——绝对集落形成效率；

n——接种细胞数。

7.8.2.6 评价规定

7.8.2.6.1 对 V79 细胞，推荐可接受的自发突变频率范围为 1×10^{-5}～1×10^{-4}。

7.8.2.6.2 用适当统计学检验方法处理，当各剂量组 MF 与阴性（溶剂）对照组者相比，突变率升高，且有统计学意义，并呈剂量-反应关系时，或仅一个剂量组有统计学意义的升高并经重复试验证实者，均可判为阳性结果，即受试物对 V79 细胞 HGPRT 系统有致突变性。

7.8.3 体外哺乳动物细胞染色体畸变试验

7.8.3.1 目 的

用细胞遗传学方法检测体外培养的哺乳动物细胞染色体畸变，评价消毒剂的致突变性。

7.8.3.2 试 剂

7.8.3.2.1 完全培养液：采用Eagle最低必需培养液（EMEM）或Dulbecco最低必需培养液（DMEM）等，并加入10%小牛血清以及青霉素（100 IU/mL）和链霉素（100 μg/mL）。

7.8.3.2.2 小牛血清：见 7.8.2.2.2。

7.8.3.2.3 无钙镁磷酸盐缓冲液（无钙镁PBS，pH 7.2～7.4）：见 7.8.1.2.5。

7.8.3.2.4 胰蛋白酶-EDTA溶液：见 7.8.2.2.4。

7.8.3.2.5 受试物：最好能直接溶于无血清完全培养液内。否则，先溶于二甲基亚砜（DMSO），而后加于完全培养液内。所加DMSO溶液量应低于1.0%（体积分数）。

7.8.3.2.6 阳性对照物：加S9时选用环磷酰胺等，不加S9时选用丝裂霉素C等 。

7.8.3.2.7 肝微粒体酶混合液（S9混合液）：见 7.8.1.2.9。

7.8.3.2.8 秋水仙素溶液（0.04%）：取40 mg秋水仙素溶解于100 mL无菌0.85% 氯化钠溶液中，过滤除菌。

7.8.3.2.9 甲醇-冰醋酸（3:1，体积比）固定液：临用现配。

7.8.3.2.10 姬姆萨染液：见 7.8.2.2.10。

7.8.3.2.11 氯化钾溶液（0.075 mol/L）。

7.8.3.3 细 胞

可选用中国仓鼠肺（CHL）细胞、中国仓鼠肺（V79）细胞、中国仓鼠卵巢（CHO）细胞，或人外周血淋巴细胞等进行试验。在一般情况下，本试验推荐使用CHL细胞。

7.8.3.4 试验分组

7.8.3.4.1 所设试验剂量组应不少于4个。最高剂量组的细胞存活率一般应为10%～20%，无毒性受试物最高剂量组不超过10 mmol/L（或5 mg/mL）。

7.8.3.4.2 同时应设阴性（溶剂）对照组、阳性对照组和未处理对照组，阳性与阴性对照组的操作程序同试验组，阳性对照组用已知染色体断裂剂替代受试物，阴性（溶剂）对照组用受试物的溶剂。

7.8.3.4.3 除未处理对照组外，各组均应包括加S9混合液和不加该液的样本。

7.8.3.5 操作程序

7.8.3.5.1 细胞准备

使用CHL细胞时，在试验前一天，将其1×10^6个细胞接种于直径为100 mm平皿中，置36 ℃±1 ℃二氧化碳培养箱内待用。

7.8.3.5.2 接触受试物

试验时，吸出细胞培养平皿中的培养液，加入试验所规定浓度的受试物和S9混合物（10%） 以及不含小牛血清的完全培养液，放二氧化碳培养箱内作用2 h。结束后，吸去完全培养液，用Hanks液洗细胞3次。加完全培养液，再置二氧化碳培养箱中培养，于24 h收获细胞。收获细胞之前2 h～4 h，加入秋水仙素溶液（终末浓度为1 μg/mL），阻断细胞于有丝分裂中期相。

7.8.3.5.3 收获细胞

用胰蛋白酶-EDTA溶液消化细胞，待细胞脱落，加入培养液并混匀以终止胰蛋白酶作用。离心（1000 r/min～1200 r/min，5 min～7 min），弃去上清液后，加入0.075 mol/L氯化钾溶液低渗处理10 min～20 min。离心后，再以甲醇-冰醋酸液固定2次。按常规滴片干燥，用姬姆萨液染色15 min左右。

7.8.3.5.4 细胞染色体畸变分析

每组各选100个染色体分散良好的中期分裂相细胞，进行染色体畸变分析，观察和记录染色体结构的异常及数量异常。染色体结构异常可有：断裂，微小体，有着丝点环，无着丝点环，单体互换，双微小体，裂隙，非特定性型变化（粉碎化等）。染色体数量异常可有:非整倍体，多倍体，内复制。

7.8.3.6 评价规定

用χ^2检验或其他适当的统计学检验方法，对所得试验数据进行处理。当各剂量组与阴性（溶剂）对照组相比，畸变细胞率升高，且有统计学意义，并有剂量-反应关系时；或仅一个剂量组有统计学意义的升高，并经重复试验证实时，可判为该受试物在本试验中具有致突变性。

7.8.4 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验

7.8.4.1 目 的

检测消毒剂对小鼠骨髓嗜多染红细胞微核形成的影响，评价消毒剂的染色体损伤毒性。

7.8.4.2 试 剂

7.8.4.2.1 受试物：用水、植物油或用 0.5% 羧甲基纤维素钠配制成溶液或混悬液。

7.8.4.2.2 阳性对照物：常用环磷酰胺或丝裂霉素 C。

7.8.4.2.3 小牛血清：见 7.8.2.2.2。

7.8.4.2.4 姬姆萨染液：见 7.8.2.2.10。

7.8.4.3 实验动物

选用体重为25 g～30 g的小鼠，雌雄各半。

7.8.4.4 试验分组

随机分为5组，受试物至少设3个剂量组，每个剂量组用10只实验动物，雌雄各半。另设阴性（溶剂）和阳性对照组。剂量组一般取受试物的1/2 LD_{50}、1/5 LD_{50}、1/20 LD_{50}等剂量，以得到剂量-反应关系。高剂量组应不引起实验动物死亡，不引起明显骨髓抑制。若采用一次最大限度试验测得LD_{50}大于5000 mg/kg体重，即以5000 mg/kg体重为高剂量。阳性对照组选用环磷酰胺（40 mg/kg体重）或丝裂霉素（1 mg/kg～1.5 mg/kg体重）。阴性（溶剂）对照组用受试物溶剂。

7.8.4.5 操作程序

7.8.4.5.1 实验动物染毒采用经口灌胃 30 h 染毒法，即两次染毒间隔 24 h，第二次染毒后 6 h 取材。

7.8.4.5.2 用颈椎脱臼法处死实验动物，取股骨或胸骨。剥除肌肉，擦净血污。切断股骨或胸骨两端，暴露骨髓腔。

7.8.4.5.3 用注射器吸取 0.1 mL 小牛血清，冲洗骨髓腔。用冲洗液常规涂片，晾干或热风吹干。

7.8.4.5.4 将已干的涂片，在甲醇中固定 5 min～10 min。用姬姆萨液染色 10 min～15 min，然后用 pH6.8 PBS 液冲洗，晾干。

7.8.4.5.5 阳性与阴性对照组的操作程序同试验组。

7.8.4.5.6 选择细胞分布均匀、完整、着色适当的区域。在油镜下计数含微核的嗜多染红细胞（PCE）数。成熟红细胞（NCE）呈粉红色，而 PCE 呈灰蓝色，微核多呈圆形、边缘光滑、整齐，嗜色性与有核细胞核质一致，呈紫红色或蓝紫色。直径通常为红细胞的 1/20～1/5。

7.8.4.5.7 每只实验动物计数 1000 个 PCE。微核细胞率指含有微核的 PCE 数，以千分率表示。一个 PCE 中出现有两个或多个微核，仍按一个计数。此外，还应观察 PCE/NCE 比例，作为对细胞毒性的指标。一般计数 200 个 PCE，同时记数所见到的 NCE。当 PCE/NCE＜0.1 时，提示对骨髓具有明显抑制作用，应降低受试物剂量，重新进行试验。

7.8.4.6 评价规定

7.8.4.6.1 阴性对照组小鼠，微核细胞率一般不超过 0.3%。

7.8.4.6.2 用泊松分布、二项分布或其他适当的统计学检验试验方法处理。当各剂量组与溶剂对照组相比，微核细胞率升高，且有统计学意义，并有剂量-反应关系，或仅一个剂量组微核细胞率有统计学意义的升高，并经重复试验证实时，均可判为受试物具有体内染色体损伤作用。

7.8.5 哺乳动物骨髓细胞染色体畸变试验

7.8.5.1 目 的

用细胞遗传学方法检测实验动物骨髓细胞染色体畸变率，评价消毒剂的致突变性。

7.8.5.2 试 剂

7.8.5.2.1 阳性对照物：常用环磷酰胺，丝裂霉素 C 等。

7.8.5.2.2 秋水仙素（0.04%）：见 7.8.3.2.8。

7.8.5.2.3 甲醇-冰醋酸（3:1，体积比）固定液：临用现配。

7.8.5.2.4 姬姆萨染液：见 7.8.2.2.10。

7.8.5.2.5 磷酸盐缓冲液（PBS，0.067 mol/L，pH 7.4）。

7.8.5.2.6 氯化钾溶液（0.075 mol/L）。

7.8.5.3 实验动物

成年小鼠（体重25 g～30 g），或大鼠（体重180 g～220 g）。实验动物总数不少于30只，雌雄各半。

7.8.5.4 试验分组

随机分为5组。至少3个受试物剂量组，为1/2 LD_{50}、1/5 LD_{50}、1/20 LD_{50},若采用一次最大限度试验，测得LD_{50}＞5000 mg/kg体重，即以5000 mg/kg体重为高剂量。另设阳性对照组和阴性（溶剂）对照组，

每组6只实验动物，雌雄各半。阳性对照组可用环磷酰胺（40 mg/kg体重） 或丝裂霉素C（1.5 mg/kg～2 mg/kg体重）。阴性（溶剂）对照组采用受试物溶剂。

7.8.5.5 操作程序

7.8.5.5.1 用经口灌胃方式，共染毒两次，间隔 24 h。于第二次染毒后 6 h 处死实验动物。处死实验动物前 2 h～4 h 腹腔注射 0.04%秋水仙素溶液，剂量为 4 mg/kg 体重。

7.8.5.5.2 用颈椎脱臼法处死实验动物，取出股骨，剔除肌肉等组织。

7.8.5.5.3 剪去股骨两端，用注射器吸取 5 mL 生理盐水，从股骨一端注入，用 10 mL 离心管从股骨另一端接取流出的骨髓细胞悬液。

7.8.5.5.4 将骨髓细胞悬液离心（1000 r/min，5 min～7 min），除上清液。加 0.075 mol/L 氯化钾溶液 7 mL，用滴管将细胞轻轻混匀，置 36 ℃±1 ℃水浴中低渗处理 7 min。

7.8.5.5.5 加入 2 mL 甲醇-冰醋酸固定液，混匀。离心（1000 r/min，5 min～7 min），弃上清液。再加入 7 mL 固定液，混匀，固定 7 min。离心（1000 r/min，7 min），弃去上清液。

7.8.5.5.6 用同法再固定 1 次～2 次，弃上清液，加入数滴新鲜固定液，混匀。

7.8.5.5.7 用悬液滴片，晾干，以姬姆萨应用液染色。

7.8.5.5.8 每组各选 100 个染色体分散良好的中期分裂相细胞，进行染色体畸变分析，观察和记录染色体结构的异常和数量的异常。染色体结构异常可有：断裂、微小体、有着丝点环、单体互换、双微小体、裂隙、粉碎化等。染色体数量的异常可有：非整倍体、多倍体、内复制等。

7.8.5.5.9 计算畸变细胞率。畸变细胞率为 100 个中期分裂相细胞中有染色体畸变的细胞数。一个中期分裂相细胞出现两种或多种畸变，仍按一个有染色体畸变细胞计。

7.8.5.5.10 阳性与阴性（溶液）对照组的操作程序同试验组。只是阳性组选用环磷酰胺（40 mg/kg 体重）或丝裂霉素（1.5 mg/kg～2.0 mg/kg 体重）作为受试物的替代物。阴性（溶剂）对照组用受试物溶剂作为受试物的替代物。

7.8.5.6 评价规定

用χ^2检验或其他适当的统计学检验方法对所得试验数据进行统计学处理。当各剂量组与阴性（溶剂）对照组相比，畸变细胞率升高，且有统计学意义，并有剂量-反应关系时；或仅一个剂量组畸变细胞率有统计学意义的升高，并经重复试验证实时，可判为该受试物在本试验中具有致突变性。

7.8.6 程序外 DNA 修复合成试验

7.8.6.1 目 的

检测受试物是否可引起体外哺乳动物细胞的原发DNA损伤。推荐用放射自显影法进行测定。

7.8.6.2 试 剂

7.8.6.2.1 完全培养液：用 Eagle 最低要求培养基（EMEM）85 份加小牛血清 15 份，青霉素（终末浓度 100 IU/mL）与链霉素（终末浓度 100 μg/mL），pH 7.2～7.4。过滤除菌后，保存于 4 ℃冰箱备用。

7.8.6.2.2 同步培养液：用不含精氨酸的 EMEM 培养基 98 份，加小牛血清 2 份，再加青霉素（终末浓

度 100 IU/mL）与链霉素（终末浓度为 100 μg/mL）配制而成。

7.8.6.2.3 小牛血清：见 7.8.2.2.2。

7.8.6.2.4 无钙镁磷酸盐缓冲液（无钙镁 PBS）：见 7.8.1.2.5。

7.8.6.2.5 胰蛋白酶-EDTA 溶液：见 7.8.2.2.4。

7.8.6.2.6 甲醇-冰醋酸（3:1，体积比）固定液：临用现配。

7.8.6.2.7 肝微粒体酶混合液（S9 混合液）：见 7.8.1.2.9。

7.8.6.2.8 显影液及定影液：包括柯达（Kodak）D-196 显影液、停显液及 F-5 定影液 。

7.8.6.2.9 羟基脲（HU）贮备液（250 mmol/L）。

7.8.6.2.10 1% 枸橼酸钠溶液。

7.8.6.2.11 ^{3}H-胸腺嘧啶核苷。

7.8.6.2.12 NTB-2 核乳胶或国产核-4 乳胶。

7.8.6.3 细 胞

可选用人成纤维细胞、大鼠原代肝细胞、外周血淋巴细胞等进行试验。宜使用人胚肺成纤维细胞（2BS）。

7.8.6.4 试验分组

受试物可设4个剂量组。最高剂量组应使细胞存活率在10%～20% 。无毒性受试物最高剂量不超过 10 mmol/mL。同时应有阳性对照组和阴性（未处理、溶剂）对照组。阳性对照组用阳性对照物代替受试物，阴性（溶剂）对照组用受试物溶剂代替受试物。

7.8.6.5 人胚肺成纤维细胞（2 BS）放射自显影法操作程序

7.8.6.5.1 将细胞增殖至所需数量后，用完全培养液制成单细胞悬液，浓度为 0.5×10^{5} 个/mL～1.0×10^{5} 个/mL。将细胞悬液接种至有小盖玻片的 6 孔细胞培养板中，在 36 ℃±1 ℃二氧化碳培养箱内培养 1 d～3 d，至细胞 50%融合。每一剂量组和各对照组分别作 2 个～3 个平行样本。

7.8.6.5.2 换用同步培养液，培养 3 d。

7.8.6.5.3 在试验的前一日下午，加入羟基脲（HU）贮备液使 HU 的终末浓度为 10 mmol/L。继续在 36 ℃±1 ℃下培养 16 h，然后将上述长有细胞的盖片置于含有不同浓度的受试物、HU（10 mmol/L）及 ^{3}H-胸腺嘧啶核苷（13.5 kBq/mL～27 kBq/mL，8.11×10^{7} kBq/mmol）同步培养液中。在 36 ℃±1 ℃培养 5 h。

7.8.6.5.4 阳性及阴性对照组的操作程序同试验组，只是阳性对照组用阳性对照物代替受试物，阴性（溶剂）对照组用受试物溶剂代替受试物。

7.8.6.5.5 处理结束后，用 Hanks 液洗涤 3 次，再用 1%枸橼酸钠溶液处理 10 min。将小盖玻片用甲醇-冰醋酸固定液固定 30 min，重复 2 次。干燥过夜，将有细胞的盖玻片用少量中性树胶，粘固于载玻片上，长有细胞的一面朝上。

7.8.6.5.6 在暗室中，将适量之 NTB-2 乳胶（或核-4 乳胶）移入浸渍用的玻璃器皿中，置于 40 ℃水

浴中融化，再加入等量 40 ℃蒸馏水，继续在水浴中加温，用玻璃棒轻轻搅拌 10 min～20 min，使气泡逸出。同时将准备做自显影处理的载玻片，置水浴箱平台上预热。而后，将附有样本的载玻片垂直浸渍于乳胶液中约 5 s。提出玻片，拭去其背面乳胶并待其干固。

7.8.6.5.7 将干固的附有样本的载玻片置于有变色硅胶干燥剂袋的曝光盒中，盒外包黑色避光纸，于 4 ℃冰箱中曝光 10 d。曝光后，将玻片在 D-196 显影液中显影 4 min，在停显液中漂洗 30 s ，在 F-5 定影液中定影 10 min，再用水漂洗数小时。

7.8.6.5.8 细胞在显影后用姬姆萨染液染色，脱水透明后，用盖片封固。在油镜下，计数各样本细胞核的显影银粒数，每个样本计数 100 个细胞，同时计数相当面积的本底银粒数，两者之差为细胞核净银粒数。计算各试验组和对照组“银粒数/核”的均值及其标准差。

7.8.6.6 评价规定

用 *t*检验或其他适当的统计学检验方法处理，当各试验剂量组“银粒数/核” 均值比阴性（溶剂）对照组者升高，且有统计学意义，并呈剂量-反应关系时；或仅一个剂量组有统计学意义的升高，但经重复试验证实者，可判为该受试物诱导了DNA修复合成，具有DNA损伤作用。

7.8.7 小鼠精原细胞染色体畸变试验

7.8.7.1 目 的

利用细胞遗传学方法，以哺乳动物体内试验检测受试物引起的生殖细胞染色体损伤。

7.8.7.2 试 剂

7.8.7.2.1 受试物：用水、植物油配成溶液，或用 0.5%羧甲基纤维素钠制成混悬液。

7.8.7.2.2 阳性对照物：常用环磷酰胺，或丝裂霉素。

7.8.7.2.3 秋水仙素（0.04%）：见 7.8.3.2.8。

7.8.7.2.4 甲醇-冰醋酸（3:1，体积比）固定液：临用现配。

7.8.7.2.5 姬姆萨染液：见 7.8.2.2.10。

7.8.7.2.6 枸橼酸三钠。

7.8.7.3 实验动物

选用3月龄～4月龄，体重25 g～30 g的雄性小鼠。实验动物总数不少于25只。

7.8.7.4 试验分组

受试物至少设3个试验剂量组，每个剂量组5只实验动物。另设阳性对照组和阴性（溶剂）对照组。阳性对照组用环磷酰胺（40 mg/kg 体重） 或丝裂霉素C（1.5 mg/kg～2 mg/kg 体重），腹腔注射。

7.8.7.5 操作程序

7.8.7.5.1 用经口灌胃方式，共染毒两次，间隔 24 h。于第二次染毒后 6 h 处死实验动物。处死实验动物前 3.5 h～5.0 h 腹腔注射 0.04% 秋水仙素溶液，剂量为 4 mg/kg 体重。

7.8.7.5.2 用颈椎脱臼法处死小鼠，取睾丸，去除脂肪。置含 2.2%枸橼酸三钠溶液平皿中去除睾丸被

膜，用针头使曲精小管松散。一个实验动物的 2 个睾丸可分别或合并处理。

7.8.7.5.3 用吸管尽可能去除 2.2%枸橼酸三钠溶液，将曲精小管置于含 3 mL～4 mL 低渗液（1% 枸橼酸三钠）的试管中。10 min 后更换低渗液，以去除碎片和精子。在室温下，低渗时间总计不超过 25 min。低渗结束后去除低渗液。加入预冷的固定液（甲醇-冰醋酸），固定 10 min 后，更换固定液，再固定 10 min。第 3 次固定至少 30 min，也可在冰箱中过夜。用镊子将已固定的曲精小管移到含 50%醋酸 5 mL 的离心管中，吸管吹打至不透光，离心（1000 r/min，5 min）。

7.8.7.5.4 将固定液 1.0 mL～1.5 mL 加至离心所得细胞沉淀物中。滴管吹打后，滴 2 滴至用 70%乙醇浸湿的玻片，分散后，热风干燥。

7.8.7.5.5 用姬姆萨应用液在室温染色 10 min，自来水淋洗两次。

7.8.7.5.6 以油镜检查染色体结构的异常情况。每只实验动物做两个睾丸，每个睾丸分析 50 个中期分裂相精原细胞。记录观察染色体型和染色单体型染色体的结构异常。检查染色体数目异常时，记录非整倍体和多倍体。

7.8.7.6 评价规定

用χ^2检验或其他适当的统计学检验方法对所得试验数据进行统计学处理。当各剂量组与阴性（溶剂）对照组相比，畸变细胞率升高，且有统计学意义，并有剂量-反应关系时； 或仅一个剂量组有统计学意义的升高，经重复试验证实后，可判为该受试物对哺乳动物睾丸细胞具有致突变性。

7.9 亚慢性毒性试验

7.9.1 目 的

7.9.1.1 检测消毒剂较长期染毒对实验动物的毒性作用及其靶器官，并确定其最大未观察到有害作用剂量。

7.9.1.2 为慢性毒性和致癌试验的剂量设计提供依据。

7.9.2 实验动物

一般用啮齿类实验动物，首选大鼠。所用大鼠应为4周龄～6周龄者。全部试验至少用80只实验动物。

7.9.3 试验分组

将实验动物随机分为4组（3个剂量组和1个对照组），每组20只实验动物，雌雄各半。选择受试物剂量时，高剂量组应出现明显的毒性反应，但不引起死亡，如果出现实验动物死亡应不超过10%；中间剂量组应可观察到轻微的毒性效应；低剂量组应不引起任何毒性效应 （属未观察到有害作用剂量）。至于具体的剂量选择，可考虑高剂量为LD_{50}的 1/20～1/5，高、中、低3个剂量间的组距以3倍～5倍为宜，最低不小于2倍。另以受试物溶剂代替受试物进行试验，作为阴性对照组。

7.9.4 操作程序

7.9.4.1 采用灌胃方式或将受试物掺入饲料经口染毒。

7.9.4.2　灌胃法每天灌胃一次，每周称体重，并按体重调整受试物给予量。如受试物掺入饲料时，应定期称饲料消耗量，计算消毒剂摄入量。

7.9.4.3　试验期为 90 d，末次染毒后 24 h 处死实验动物，检测各项观察指标。

7.9.5　观察指标

7.9.5.1　临床观察：观察实验动物中毒表现，每周称量体重一次，食物消耗量至少 1 次～2 次。

7.9.5.2　血液学检查：包括血红蛋白含量、红细胞数、白细胞及其分类计数、血小板数、网织红细胞数等。

7.9.5.3　血液生物化学检查：包括天冬氨酸氨基转移酶、丙氨酸氨基转移酶、碱性磷酸酶、乳酸脱氢酶、尿素氮、肌酐、血清总蛋白和白蛋白、总胆固醇、总胆红素等。必要时，可根据所观察到的受试物毒性效应，或与受试物化学结构相似物质的毒性作用，选择其他一些生化指标。

7.9.5.4　脏器重量：测量主要脏器（如肝、肾、脾、睾丸等）的脏器重量和脏器系数（脏器重/体重×100%）。

7.9.5.5　病理学检查：实验结束时，处死所有实验动物，进行系统解剖和肉眼观察，并将主要器官和组织（如心、肺、肝、肾、脾、脑、肾上腺、睾丸、卵巢、胃肠和系统解剖时发现的异常组织等）固定、保存。当各剂量组实验动物尸检未发现明显病变时，先进行高剂量组和阴性对照组实验动物肝、肾、胃、肠及其他重要的和可能受损的脏器的组织病理学检查。如发现病变，还应对中、低剂量组实验动物相应的器官进行组织病理学检查。

7.9.6　评价规定

将各试验组实验动物观察指标与阴性对照组加以比较并进行统计学检验，注意各剂量组间的剂量-反应（效应）关系。评定受试物最小观察到有害作用剂量和最大未观察到有害作用剂量及毒性作用的靶器官。

7.10　致畸试验

7.10.1　目　的

检测消毒剂对妊娠实验动物有无致畸胎性，确定其未观察到发育毒性的剂量。

7.10.2　试　剂

7.10.2.1　1/1000 茜素红溶液：茜素红 0.1 g，氢氧化钾 10 g，加蒸馏水 1000 mL。

7.10.2.2　透明液 A：甘油 200 mL，氢氧化钾 10 g，蒸馏水 790 mL。

7.10.2.3　透明液 B：甘油与蒸馏水等量混合。

7.10.2.4　固定液（Bouins 液）：苦味酸饱和液 75 份，甲醛 20 份，冰醋酸 5 份。

7.10.3　实验动物

试验用大鼠或小鼠 （必要时可用家兔）。用大鼠和小鼠试验时，取健康、性成熟、未交配过的体重为200 g～250 g的大鼠，或体重为25 g～30 g的小鼠。

7.10.4 试验分组

至少设4组，其中3个为试验组，1个为阴性对照组。每组至少有15只孕鼠。高剂量组可用雌鼠的1/10 LD_{50} 作为试验剂量；低剂量组，可用雌性实验动物的1/100 LD_{50}作为试验剂量。其间设中剂量组。阴性对照组以受试物的溶剂代替受试物进行试验。阳性对照组常用阿司匹林（270 mg/kg～280 mg/kg体重）、敌枯双（1 mg/kg体重）或维生素A（40000 IU）。对于实验室首次进行的实验动物品种或品系必需设阳性对照组。为了保证试验方法的可靠性，每隔半年需用阳性对照物检查一次。

7.10.5 操作程序

7.10.5.1 将雌鼠和雄鼠按 1:1 或 2:1 的比例同笼饲养。每日晨观察阴栓（或阴道涂片）。查出阴栓或精子的当天定为孕期零天。如 5 d 内未交配，调换雌鼠。查出的孕鼠按上述随机分组，并进行称重和编号。

7.10.5.2 在大、小鼠孕期 6 d～15 d 期间， 每天用灌胃法给予受试物。分别于孕期 0 d、6 d、10 d、15 d 和 20 d 称重孕鼠，并根据体重调整受试物给予量。注意观察并记录孕鼠的毒性反应。

7.10.5.3 大鼠于孕期第 20 d，小鼠于孕期第 18 d，用颈椎脱臼法处死。剖腹，取出子宫称重，检查活胎、吸收胎、早期死胎和晚期死胎数。

7.10.5.4 逐个记录活胎鼠的性别、体重、身长和尾长。外观检查头面部、躯干部、四肢等有无畸形，诸如皮下出血、露脑、脑膨出、眼部畸形（无眼或开眼等）、鼻孔扩大、单鼻孔、唇裂、脊柱裂、四肢和尾畸形、肛门闭锁等。

7.10.5.5 每窝取约 1/2～2/3 活胎鼠，用眼科镊剥皮。取出内脏（注意勿拉断肋骨），去掉后颈和两肩胛骨之间的脂肪块。将胎鼠放入茜素红溶液染色。当天摇动玻璃瓶 2 次～3 次。待骨骼染成红色时为止。将胎鼠换入透明液 A 中 1 d～2 d，换入透明液 B 中 2 d～3 d。待胎鼠骨骼已染红，而软组织的紫红色基本褪去，可换置甘油中。

7.10.5.6 将染好的标本连同甘油一并倒入含水平皿内，在解剖显微镜下，用透射光源，先观察胎鼠全身，然后逐步检查：

a) 头骨、胸骨、脊椎骨、肋骨和四肢等有无骨化不全、骨化迟缓和其他缺陷；

b) 观察脊椎骨有无缺失、融合、纵裂等畸形；

c) 观察胸骨的发育和数目，有无胸骨缺失等；

d) 检查肋骨有无融合肋、分叉肋、肋骨中断、缺肋、短肋、波状肋、多肋畸形等；

e) 最后检查四肢骨畸形。

7.10.5.7 每窝取约 1/3～1/2 活胎鼠浸入固定液 2 周，作内脏检查。将已固定的胎鼠用水冲净，仰放于石蜡板上。剪去四肢和尾，用刀片在头颈部常规共切 5 刀，再用刀片剖开胸、腹腔。着重检查：

a) 有无裂舌、双叉舌、裂腭及眼、鼻和脑部的畸形；

b) 是否出现右位心、心脏过大、肺过大或过小等畸形；

c) 消化系统和泌尿生殖系统各器官的大小、形状以及位置；

d) 有无肾盂积水，双侧有无睾丸，以及子宫发育不全等畸形。

7.10.6 观察指标

7.10.6.1 主要观察实验动物畸胎出现率，同时观察其他指标，如着床数、活胎数、晚期死胎数、早期死亡数，以及活胎体重、身长、尾长等。

7.10.6.2 观察全部结果的剂量-反应关系，确定受试物的母体毒性、发育毒性及致畸性。求出受试物的最小致畸剂量和最大无致畸作用剂量。对致畸强度应以致畸指数表示。

7.10.6.3 按公式（97）计算致畸指数:

$$TI = \frac{LD_{50}}{TD_{min}} \quad (97)$$

式中：

TI——致畸指数；

LD_{50}——雌鼠 LD_{50}；

TD_{min}——最小致畸剂量。

7.10.7 评价规定

致畸指数＜10为基本不致畸；10～100为致畸；＞100为强致畸。

7.11 慢性毒性试验

7.11.1 目 的

检测受试物长期染毒对实验动物所产生的毒性作用，确定其最小观察到有害作用剂量，最大未观察到有害作用剂量及毒性作用的靶器官。

7.11.2 实验动物

试验选用刚离乳的大鼠。在试验结束时，每个剂量组每种性别的实验动物应不少于10只。中间需活杀实验动物检查时，应相应增加实验动物数量。

7.11.3 试验分组

将实验动物随机分在3个剂量组和1个阴性对照组。阴性对照组除不接触消毒剂外，其他与试验组相同，若在试验中对受试物使用溶剂或赋形剂时，阴性对照组应给予相应剂量的溶剂或赋形剂。试验剂量根据亚慢性试验结果选择。高剂量应引起明显的毒性效应甚至个别实验动物死亡，低剂量应不引起毒性效应。

7.11.4 操作程序

7.11.4.1 用灌胃法或将受试物掺入饲料或饮水中喂饲。掺入饲料的受试消毒剂的最高浓度一般不超过 5%。饲料中受试消毒剂应定期监测，观察其均匀性和稳定性。

7.11.4.2 灌胃法每天给药一次。

7.11.4.3 前 3 个月每周称量体重，3 个月后每月称 1 次体重，调整受试物灌胃量。如受试物掺入饲料，应定期称饲料消耗量。如受试物溶于饮水中喂饲，应记录实验动物的饮水量。

7.11.4.4　试验期限为一般为6个月，必要时可延长至2年。

7.11.5　观察指标

7.11.5.1　与亚慢性毒性试验基本相同，也可根据受试物对实验动物的亚慢性毒性作用和靶器官，可适当增加或更换一些针对性更强更灵敏的观察指标。

7.11.5.2　临床观察：观察中毒表现，体重前3个月每周1次，以后每月1次。

7.11.5.3　血液学检查：于试验的第3个月、第6个月及以后每半年进行1次血液学检查。

7.11.5.4　血液生化检查：检查时间同血液学检查。

7.11.5.5　病理学检查包括如下内容：

a)　系统解剖：所有实验动物包括试验过程中死亡的实验动物都应进行完整的系统解剖和详尽的肉眼观察。肉眼可见的异常组织都应留样作进一步组织病理学检查。

b)　脏器重量：称取脑、肝、肾、脾和睾丸重量并计算脏器系数。

c)　组织学检查：对照组、高剂量组实验动物及系统解剖发现异常的组织均需作详尽的组织学检查。当高剂量组有异常发现时，其他剂量组才进行相应检查。检查脏器一般包括脑、心、肺、肝、脾、肾、胃、肠、肾上腺、甲状腺、垂体、睾丸（卵巢）和子宫等。

7.11.6　评价规定

比较各剂量组与对照组观察指标的变化。计算分析其剂量-反应关系，并确定受试物最小观察到有害剂量和最大未观察到有害作用剂量，及毒性作用靶器官。

7.12　致癌试验

7.12.1　目　的

检测长期接触消毒剂后实验动物出现肿瘤的情况，评价其致癌性。也可将致癌试验和慢性毒性试验结合在一批实验动物中进行。

7.12.2　实验动物

以刚离乳的大鼠或小鼠进行试验。如与慢性毒性试验结合进行，通常选用大鼠。各剂量组和阴性对照组使用的有效实验动物数，至少雌雄各50只。如与慢性毒性结合进行，试验中间需处死实验动物进行检查时，应相应增加实验动物数。

7.12.3　试验分组

实验动物分组按7.11.3的要求进行，一般设3个剂量组与1个阴性对照组。根据亚慢性试验结果选择剂量。最高剂量组为最大耐受剂量，可引起轻度毒性效应，但不能因肿瘤以外因素明显缩短其生命期限。最低剂量组应不影响实验动物正常的生长、发育和寿命，即不引起任何毒性效应。中间剂量处于最高和最低剂量之间。若在试验中对受试物使用溶剂或赋形剂时，阴性对照组应以相应的溶剂或赋形剂进行试验。

7.12.4　操作程序

7.12.4.1　将受试物灌胃或掺入饲料或饮水中喂饲。掺入饲料中的受试物最高浓度不应超过 5%。如用灌胃法，每天给药 1 次。

7.12.4.2　前 3 个月每周称体重，3 个月后每月称体重，并调整受试物的灌胃量。每周称饲料消耗量 1 次。若受试物溶于饮水中喂饲，应记录饮水量。试验期应包括实验动物正常寿命期的大部分时间，大鼠为 2 年以上，小鼠为 18 个月以上。

7.12.4.3　试验过程中，除观察一般临床症状外，着重观察实验动物的肿瘤发生情况。对每一肉眼可见或可触及的肿瘤，其出现的时间、部位、大小、外形和发展情况均应有记录。

7.12.4.4　凡在试验过程中死亡或濒死而提前处死，以及试验结束全部处死的实验动物，均应进行完整的尸检及系统的、全面的、详细的器官和组织的病理学检查。对肉眼可见肿瘤或可疑病变组织，对试验过程中死亡或濒死而提前处死的实验动物，高剂量组和对照组的全部实验动物，均应进行全面的病理组织学检查。如果高剂量组肿瘤、癌前病变或增生的发生率和阴性对照组者相比，差异有统计学意义时，则中、低剂量组所有实验动物的有关器官和组织均应进行病理组织学检查。若高剂量组存活实验动物数显著少于对照组或存在影响肿瘤发生的毒作用时，则中剂量组也应按上述高剂量组的要求进行系统检查。

7.12.4.5　若致癌试验和慢性毒性试验结合一起进行，还应按慢性毒性试验的要求，对有关指标进行观察和记录。

7.12.5　评价规定

7.12.5.1　肿瘤发生率

按公式（98）计算肿瘤发生率：

$$TR = \frac{M}{n} \times 100\% \quad (98)$$

式中：

TR——肿瘤发生率，整个实验终了时患肿瘤实验动物总数在有效实验动物总数中所占的比例，%；

M——试验终了时患肿瘤实验动物数；

n——有效实验动物数，最早出现肿瘤时的存活实验动物总数。

7.12.5.2　致癌试验阳性的判断标准

符合以下任意一条，则受试物致癌试验阳性：

a)　阴性对照组实验动物出现的一种或数种肿瘤，试验组均有发生且发生率超过前者。

b)　试验组发生阴性对照组未有的肿瘤。

c)　试验组肿瘤发生的时间早于阴性对照组者。

d)　试验组每个实验动物的平均肿瘤数超过阴性对照组者。

7.12.5.3　致癌试验阴性结果的确立

假如实验动物试验规模为两种种属、两种性别，至少3个剂量，其中一个接近最大耐受剂量，每组实验动物至少50只，试验组肿瘤发生率与对照组无差异，则致癌试验结果为阴性。

7.12.5.4 试验报告

在结果报告中，应写明所发现肿瘤的部位、数量、性质、癌前病变、其他毒性效应，以及剂量-反应关系及统计学分析结果。

附 录 A
（资料性）
试剂和培养基配方

A.1 胰蛋白胨生理盐水溶液（TPS）

胰蛋白胨	1.0 g
氯化钠	8.5 g
纯化水	1000 mL

先用900 mL以上纯化水溶解，并调节pH值在7.0～7.2（20 ℃），最终用纯化水加至1000 mL，分装后，经121 ℃压力蒸汽灭菌20 min后备用。

A.2 磷酸盐缓冲液（PBS，0.03 mol/L，pH7.2）

无水磷酸氢二钠	2.83 g
磷酸二氢钾	1.36 g
纯化水	1000 mL

将各成分加入到1000 mL纯化水中，待完全溶解后，于121 ℃压力蒸气灭菌20 min备用。

A.3 标准硬水（硬度 342mg/L）

氯化钙（$CaCl_2$）	0.304 g
氯化镁（$MgCl_2 \cdot 6H_2O$）	0.139 g
纯化水	1000 mL

将各成分加入到1000 mL纯化水中，待完全溶解后，用0.45μm滤膜过滤除菌备用。

A.4 生理盐水

氯化钠	8.5 g
纯化水	1000 mL

将氯化钠加入到1000 mL纯化水中，待完全溶解后，于121 ℃压力蒸气灭菌20 min备用。

A.5 有机干扰物

牛血清白蛋白	30 g或3 g
纯化水	1000 mL

溶解后用微孔滤膜（孔径为0.45μm）滤过除菌，冰箱保存备用。

A.6 营养琼脂培养基

蛋白胨	10 g
牛肉膏	5 g
氯化钠	5 g
琼脂	15 g
纯化水	1000 mL

用纯化水配制而成，调节pH至 7.2～7.4，加热溶解，分装，于121 ℃压力蒸汽灭菌20 min备用。

A.7 营养肉汤培养基

蛋白胨	10 g
牛肉膏	5 g
氯化钠	5 g
纯化水	1000 mL

将各成份溶解于纯化水中，调节pH至7.2～7.4，分装，于121 ℃压力蒸汽灭菌 20 min备用。

A.8 胰蛋白胨大豆肉汤培养基（TSB）

胰蛋白胨	1.5%（g/100 mL）
大豆蛋白胨	0.5%（g/100 mL）
氯化钠	0.5%（g/100 mL）

用纯化水配制而成，调节pH为7.0～7.4，经121 ℃压力蒸汽灭菌20 min备用。

A.9 胰蛋白胨大豆琼脂培养基（TSA）

胰蛋白胨	1.5%（g/100 mL）
大豆蛋白胨	0.5%（g/100 mL）
氯化钠	0.5%（g/100 mL）
琼脂	1.6%（g/100 mL）

用纯化水配制而成，调节pH为 7.0～7.4，经121 ℃压力蒸汽灭菌20 min备用。

A.10 品红亚硫酸钠培养基

蛋白胨	10 g
酵母浸膏	5 g
牛肉膏	5 g
乳糖	10 g
琼脂	15 g～20 g
磷酸氢二钾	3.5 g

无水亚硫酸钠	5 g
5%碱性品红乙醇溶液	20 mL
纯化水	1000 mL

各成分（除5%碱性品红乙醇溶液和无水亚硫酸钠外）溶解于纯化水，调pH为7.2～7.4，再加入乳糖，分装，经115 ℃压力蒸汽灭菌30 min备用。按照GB/T 5750制备平板。

A.11 溴甲酚紫葡萄糖蛋白胨培养液

蛋白胨	10 g
葡萄糖	7.5 g
蔗糖	2.0 g
可溶性淀粉	1.5 g
1%溴甲酚紫乙醇溶液	1.3 mL
纯化水	1000 mL

将蛋白胨、葡萄糖、蔗糖溶解于纯化水中，调节pH至7.2～7.4，加入1%溴甲酚紫乙醇溶液，摇匀后，分装每管5 mL，于115 ℃压力蒸汽灭菌30 min。置4 ℃冰箱备用。

A.12 嗜热脂肪杆菌恢复琼脂培养基

蛋白胨	10 g
牛肉膏	3 g
可溶性淀粉	1 g
葡萄糖	1 g
琼脂	20 g
纯化水	1000 mL

以上各成分纯化水溶解，调节pH至7.0～7.2，装瓶，经115 ℃压力蒸汽灭菌30 min备用。

A.13 沙堡琼脂培养基

葡萄糖	40 g
蛋白胨	10 g
琼脂	20 g
纯化水	1000 mL

将上述成分混合后，加热至完全溶解，调节pH至5.4～5.8，于115 ℃压力蒸汽灭菌30 min备用。

A.14 沙堡液体培养基

葡萄糖	40 g

蛋白胨	10 g
纯化水	1000 mL

将上述成分混合后，加热至完全溶解，调节pH至5.4～5.8，于115 ℃压力蒸汽灭菌30 min备用。

A.15 麦芽浸膏琼脂培养基（MEA）

麦芽浸膏	30 g
大豆蛋白胨	3 g
琼脂	15 g
纯化水	1000 mL

将上述成分制成溶液于121 ℃，20 min灭菌，灭菌后无菌调节pH至5.4～5.8备用。

A.16 麦芽浸膏肉汤养基（MEB）

麦芽浸膏	30 g
纯化水	1000 mL

将上述成分制成溶液于121℃，20 min灭菌，灭菌后无菌调节pH至5.4～5.8备用。

A.17 人淋巴细胞维持培养基

1640干粉培养基	10×10.4 g
L谷氨酰胺	2.93 g
丙酮酸钠	1.004 g
青霉素80万单位	
链霉素100万单位	
碳酸氢钠	20.0 g
Hepes	23.9 g
纯化水	10000 mL

除青霉素、链霉素外，其余各成分溶于纯化水中，调节pH至7.0～7.2，115 ℃压力蒸汽灭菌30 min备用。临用前加入青霉素、链霉素灭菌溶液。

A.18 人淋巴细胞完全培养基

在人淋巴细胞维持培养基中加入10%无菌小牛血清。

A.19 伊红亚甲蓝培养基

蛋白胨	10 g
乳糖	10 g

磷酸二氢钾	2 g
2%伊红溶液	2 mL
0.65%亚甲蓝溶液	1 mL
琼脂	17 g
纯化水	1000 mL

将蛋白胨、磷酸二氢钾和琼脂溶解于纯化水中，调节pH至7.1，分装，于121 ℃压力蒸汽灭菌20 min。临用时，以无菌操作加入乳糖并加热溶化琼脂，冷至50 ℃时，加入伊红和亚甲蓝溶液摇匀，倒平板置4 ℃冰箱备用。

A.20 乳糖胆盐发酵管

蛋白胨	20 g
猪胆盐(或牛，羊胆盐)	5 g
乳糖	10 g
0.04%溴甲酚紫水溶液	25 mL
纯化水	1000 mL

将蛋白胨、胆盐及乳糖溶解于纯化水中，调节pH至7.4，加入0.04%溴甲酚紫水溶液，分装（每管10 mL），并放入一个小倒管，于115 ℃压力蒸汽灭菌30 min备用。

A.21 乳糖发酵管

蛋白胨	20 g
乳糖	10 g
0.04%溴甲酚紫水溶液	25 mL
纯化水	1000 mL

将蛋白胨及乳糖溶解于纯化水中，调节pH至7.4，加入0.04%溴甲酚紫水溶液，分装（每管10 mL），并放入一个小倒管，于115 ℃压力蒸汽灭菌30 min备用。

A.22 洗脱液

吐温80	1 g
蛋白胨	10 g
氯化钠	8.5 g
0.03mol/L PBS液	1000 mL

将各成分加入到1000 mL0.03 mol/L PBS液中，加热溶解后调pH至7.2～7.4，于121 ℃压力蒸汽灭菌20 min备用。

附 录 B
（资料性）
抗（抑）菌产品鉴定试验

B.1 微生物指标检验方法

参照GB 15979中的方法进行检验。

B.2 抗菌效果鉴定试验

B.2.1 悬液定量杀菌试验

B.2.1.1 适用范围

适用于液体抗菌卫生用品（如液体抗菌液、抗菌喷雾剂等）对微生物抗菌效果的测定。

B.2.1.2 仪器设备或试剂材料

B.2.1.2.1 试验菌株：金黄色葡萄球菌（ATCC 6538）、大肠杆菌（8099）、白色念珠菌（ATCC 10231）及根据抗菌剂特定用途所用的其他菌株。

B.2.1.2.2 稀释液：磷酸盐缓冲液（PBS，0.03 mol/L，pH 值 7.2）见附录 A。

B.2.1.2.3 培养基：胰蛋白胨大豆琼脂培养基（TSA）与沙堡琼脂培养基见附录 A。

B.2.1.2.4 标准硬水见附录 A。

B.2.1.2.5 中和剂。

B.2.1.2.6 电动混匀器。

B.2.1.2.7 恒温水浴箱。

B.2.1.2.8 恒温培养箱。

B.2.1.2.9 Ⅱ级生物安全柜。

B.2.1.3 悬液定量中和剂鉴定试验

B.2.1.3.1 分组

第1组：4.5 mL中和剂 + 0.45 mL标准硬水+0.05 mL菌悬液→培养

第2组：（0.45 mL抗菌剂 + 4.5 mL中和剂）+ 0.05 mL菌悬液→培养

第3组：4.95 mL稀释液 + 0.05 mL菌悬液→培养

第4组：同批次PBS1.0 mL + 中和剂1.0 mL + 培养基→培养

B.2.1.3.2 操作步骤

B.2.1.3.2.1 菌悬液的配制：取试验菌 24 h 新鲜斜面培养物用 PBS 洗下，用 PBS 稀释至约 5.0×10^3 CFU/mL～3.0×10^4 CFU/mL 菌悬液备用。

B.2.1.3.2.2 第 1 组：吸取 0.45 mL 标准硬水于无菌试管内，加入 4.5 mL 中和剂，混匀，置 20 ℃±1 ℃水浴中 10 min 后，再加入 0.05 mL 试验菌悬液，混匀，作用 10 min，分别吸取 1.0 mL 接种于 2

个平皿中，做活菌培养计数。

B.2.1.3.2.3 第2组：吸取4.5 mL中和剂于无菌试管内，加入0.45 mL抗菌剂，混匀，置20 ℃±1 ℃水浴中10 min制成中和产物，加入0.05 mL试验菌悬液，混匀，作用10 min，分别吸取1.0 mL接种于2个平皿中，做活菌培养计数。

B.2.1.3.2.4 第3组：吸取4.95 mL PBS于无菌试管中，置20 ℃±1 ℃水浴中10 min，加入0.05 mL试验菌悬液，混匀，作用10 min，分别吸取1.0 mL接种2个平皿，做活菌培养计数。

B.2.1.3.2.5 第4组：分别吸取稀释液（PBS）、中和剂各1.0 mL于同一无菌平皿内，倒入上述试验同批次的培养基15 mL～20 mL，作为阴性对照组培养观察。

B.2.1.3.2.6 进行3次重复试验。

B.2.1.3.3 **评价规定**

实验结果符合以下全部条件，所测中和剂可判为合格：

a) 悬液试验作用体系中菌量在50 CFU/mL～300 CFU/mL;

b) 第 1、2和 3 组有相似量试验菌生长，且组间菌落数误差率应不超过15%。组间菌落数误差率按5.1.5.1.7计算;

c) 第4组无菌生长。否则，说明试剂有污染，应更换无污染的试剂重新进行试验;

d) 3 次重复试验均应符合以上条件。

B.2.1.4 **悬液定量杀菌试验操作步骤**

B.2.1.4.1 菌悬液的制备：取试验菌 24 h 新鲜斜面培养物用 PBS 洗下，用 PBS 稀释至约 5.0×10^5 CFU/mL～4.5×10^6 CFU/mL菌悬液备用。

B.2.1.4.2 试验组：取无菌试管，先加入5.0 mL样品，置20 ℃±1 ℃水浴中5 min后，再加入0.1 mL试验用菌悬液，迅速混匀并计时。待试验菌与样品相互作用至各预定时间，分别吸取0.5 mL试验菌与样品混合液加于含4.5 mL中和剂的试管中，混匀，与中和剂作用10 min后，分别吸取1.0 mL样液，按5.1.3进行活菌培养计数。

B.2.1.4.3 阳性对照组：同时用稀释液代替样品，与试验组进行平行试验。阳性对照回收菌落数在1.0×10^4 CFU/mL～9.0×10^4 CFU/mL。

B.2.1.4.4 阴性对照组：取试验同批次PBS、中和剂和培养基进行培养作为阴性对照。

B.2.1.4.5 所有试验样本和对照样本均在36 ℃±1 ℃培养，细菌繁殖体培养48 h观察最终结果；白色念珠菌培养72 h观察最终结果。

B.2.1.4.6 进行3次重复试验，按公式(B.1）计算杀菌率。

$$X=\frac{A-B}{A}\times100\% \quad \text{(B.1)}$$

式中：

X——杀菌率，%;

A——阳性对照组回收菌量，单位为菌落形成单位每毫升（CFU/mL）；

B——试验组回收菌量，单位为菌落形成单位每毫升（CFU/mL）。

B.2.1.5 评价规定

杀菌率≥90%，判为有抗菌作用；杀菌率≥99%，判为有较强抗菌作用。

B.2.2 载体定量杀菌试验

B.2.2.1 适用范围

适用于粘稠状（半固体）抗菌卫生用品如抗菌洗手液、抗菌沐浴露、抗菌凝胶、膏状抗菌产品等对微生物抗菌效果的鉴定。

B.2.2.2 仪器设备或试剂材料

B.2.2.2.1 试验菌株：金黄色葡萄球菌（ATCC 6538）、大肠杆菌（8099）、白色念珠菌（ATCC 10231）及根据抗菌剂特定用途所用的其他菌株。

B.2.2.2.2 稀释液：磷酸盐缓冲液（PBS，0.03 mol/L，pH 值 7.2）见附录 A。

B.2.2.2.3 培养基：胰蛋白胨大豆琼脂培养基（TSA）与沙堡琼脂培养基见附录 A。

B.2.2.2.4 标准硬水见附录 A。

B.2.2.2.5 中和剂。

B.2.2.2.6 载体：10 mm×10 mm 白平纹布片。

B.2.2.2.7 恒温水浴箱。

B.2.2.2.8 恒温培养箱。

B.2.2.2.9 Ⅱ级生物安全柜。

B.2.2.2.10 电动混匀器。

B.2.2.3 载体定量中和剂鉴定试验

B.2.2.3.1 分组

第1组：5.0 mL中和剂 + 菌片→培养

第2组：5.0 mL中和产物（5.0 mL中和剂+浸泡过抗菌剂的载体片）+ 菌片→培养

第3组：5.0 mL稀释液 + 菌片→培养

第4组：稀释液1.0 mL + 中和剂1.0 mL + 培养基→培养

B.2.2.3.2 操作步骤

B.2.2.3.2.1 试验菌片的制备：取试验菌 24 h 新鲜斜面培养物用 PBS 洗下，用 PBS 稀释至约 2.5×10^4 CFU/mL～1.5×10^5 CFU/mL 菌悬液，每布片滴加 10 μL 菌液，晾干备用。

B.2.2.3.2.2 第 1 组：吸取 5.0 mL 中和剂，置 20 ℃±1 ℃水浴中 10 min 后，加入菌片，作用 10 min，用电动混合器混合 20 s 或在手掌上用力振打 80 次，分别吸取 1.0 mL 接种于 2 个平皿中，做活菌培养计数。

B.2.2.3.2.3 第 2 组：取 5.0 mL 中和产物（5.0 mL 中和剂加一片浸有抗菌剂的载体片，置 20 ℃±

1 ℃水浴中中和 10 min 制成中和产物），加入菌片，作用 10 min，用电动混合器混合 20 s 或在手掌上用力振打 80 次，分别吸取 1.0 mL 接种于 2 个平皿中，做活菌培养计数。

B.2.2.3.2.4 第 3 组：吸取 5.0 mL PBS，置 20 ℃±1 ℃水浴中 10 min，加入菌片，作用 10 min，用电动混合器混合 20 s 或在手掌上用力振打 80 次，分别吸取 1.0 mL 接种 2 个平皿，做活菌培养计数。

B.2.2.3.2.5 第 4 组：分别吸取稀释液（PBS）、中和剂各 1.0 mL 于同一无菌平皿内，倒入上述试验同批次的培养基 15 mL～20 mL，作为阴性对照组培养观察。

B.2.2.3.2.6 进行 3 次重复试验。

B.2.2.3.3 评价规定

实验结果符合以下全部条件，所测中和剂可判为合格：

a) 载体的回收菌量为 2.5×10^2 CFU/片～1.5×10^3 CFU/片；

b) 第 1、2 和 3 组有相似量试验菌生长，且组间菌落数误差率应不超过 15%。组间菌落数误差率按 5.1.5.1.7 计算；

c) 第 4 组无菌生长。否则，说明试剂有污染，应更换无污染的试剂重新进行试验；

d) 3 次重复试验均应符合以上条件。

B.2.2.4 载体定量杀菌试验操作步骤

B.2.2.4.1 菌片的制备：取试验菌 24 h 新鲜斜面培养物用 PBS 洗下，用 PBS 稀释至约 1×10^6 CFU/mL～9×10^6 CFU/mL 菌悬液，每布片滴加 10 μL 菌液，晾干备用。

B.2.2.4.2 试验组：取无菌平皿，按每载体 5.0 mL 的量加入抗菌剂，置 20 ℃±1 ℃水浴中 5 min 后，再加入试验用菌片，并迅速计时。待试验菌片与样品相互作用至各预定时间，分别将菌片加到含 5.0 mL 中和剂的试管中，作用 10 min 后，用电动混合器混合 20 s 或在手掌上用力振打 80 次，分别吸取 1.0 mL 样液，按 5.1.3 进行活菌培养计数。

B.2.2.4.3 阳性对照组：同时取与试验样品同质材料不含抗菌成分的对照样品代替抗菌样品浸泡 2 片染菌载体，与试验组进行平行试验。阳性对照回收菌落数在 1.0×10^4 CFU/片～9.0×10^4 CFU/片。

B.2.2.4.4 阴性对照组：取试验同批次 PBS、中和剂和培养基进行培养作为阴性对照。

B.2.2.4.5 所有试验样本和对照样本均在 36 ℃±1 ℃培养，细菌繁殖体培养 48 h 观察最终结果；白色念珠菌培养 72 h 观察最终结果。

B.2.2.4.6 进行 3 次重复试验，按公式(B.2)计算杀菌率。

$$X=\frac{A-B}{A}\times100\% \quad \text{(B.2)}$$

式中：

X——杀菌率，%；

A——阳性对照组回收菌量，单位为菌落形成单位每片（CFU/片）；

B——试验组回收菌量，单位为菌落形成单位每片（CFU/片）。

B.2.2.5 评价规定

杀菌率≥90%，判为有抗菌作用；杀菌率≥99%，判为有较强抗菌作用。

B.2.3 载体类抗菌产品抗菌试验

B.2.3.1 适用范围

适用于添加有抗菌剂的卫生湿巾或可溶性抗菌物质的用品的抗菌性能效果的鉴定。

B.2.3.2 仪器设备或试剂材料

B.2.3.2.1 试验菌株：金黄色葡萄球菌（ATCC 6538）、大肠杆菌（8099）、白色念珠菌（ATCC 10231）及根据抗菌剂特定用途所用的其他菌株。

B.2.3.2.2 稀释液：磷酸盐缓冲液（PBS，0.03 mol/L，pH 值 7.2）见附录 A。

B.2.3.2.3 培养基：胰蛋白胨大豆琼脂培养基（TSA）与沙堡琼脂培养基见附录 A。

B.2.3.2.4 标准硬水见附录 A。

B.2.3.2.5 中和剂。

B.2.3.2.6 试验样片：20 mm×30 mm。

B.2.3.2.7 对照样片：20 mm×30 mm（与试验样片材质相同，不含抗菌成分。试验前需做灭菌处理）。

B.2.3.2.8 恒温培养箱。

B.2.3.2.9 Ⅱ级生物安全柜。

B.2.3.2.10 电动混匀器。

B.2.3.2.11 恒温水浴箱。

B.2.3.3 中和剂鉴定试验

B.2.3.3.1 试验分组

第1组：5.0 mL中和剂 +对照样片+10μL菌液→培养；

第2组：5.0 mL 中和剂 + 抗菌样片+ 10μL菌液→培养；

第3组：5.0 mL稀释液 + 对照样片+ 10μL菌液→培养；

第4组：稀释液 + 中和剂 + 培养基→培养。

B.2.3.3.2 试验步骤

B.2.3.3.2.1 菌悬液配制：取试验菌 24 h 新鲜斜面培养物用 PBS 洗下，用 PBS 稀释至约 2.5×10^4 CFU/mL～1.5×10^5 CFU/mL 菌悬液，备用。

B.2.3.3.2.2 样片制备：用无菌剪刀将抗菌卫生用品和材质相同但不含抗菌成分的对照样品分别剪成 20 mm×30 mm 样片备用。

B.2.3.3.2.3 第 1 组：取 5.0 mL 中和剂于无菌试管内，用无菌镊子取 1 片对照样片加入试管内，置 20 ℃±1 ℃水浴 10 min，再滴入 10μL 菌液，作用 10 min，混匀，分别吸取 1.0 mL 接种于 2 个平皿中，做活菌培养计数。

B.2.3.3.2.4 第 2 组：取 5.0 mL 中和剂于无菌试管内，用无菌镊子取 1 片抗菌样片加入试管内，振荡

混匀，置 20 ℃±1 ℃水浴作用 10 min 制成中和产物，再滴入 10μL 菌液，作用 10 min，混匀，分别吸取 1.0 mL 接种 2 个平皿，做活菌培养计数。

B.2.3.3.2.5 第 3 组：取 5.0 mLPBS 于无菌试管内，用无菌镊子取 1 片对照样片加入试管内，置 20 ℃±1 ℃水浴 10 min，再滴入 10μL 菌液，作用 10 min，混匀，分别吸取 1.0 mL 接种于 2 个平皿中，做活菌培养计数。

B.2.3.3.2.6 第 4 组：分别吸取稀释液与中和剂各 1.0 mL 于同一无菌平皿内，倾注同批次的培养基 15 mL～20 mL，培养观察。

B.2.3.3.2.7 进行 3 次重复试验。

B.2.3.3.3 **评价规定：**

实验结果符合以下全部条件，所测中和剂可判为合格：

a) 载体的回收菌量在 2.5×10^{2} CFU/片～1.5×10^{3} CFU/片。

b) 第 1、2 和 3 组有相似量试验菌生长，且组间菌落数误差率应不超过 15%。组间菌落数误差率按 5.1.5.1.7 计算。

c) 第 4 组无菌生长。否则，说明试剂有污染，应更换无污染的试剂重新进行试验。

d) 3 次重复试验均应符合以上条件。

B.2.3.4 **杀菌试验步骤**

B.2.3.4.1 菌悬液的制备：取试验菌 24 h 新鲜斜面培养物用 PBS 洗下，用 PBS 稀释至约 1×10^{5} CFU/mL～9×10^{5} CFU/mL 菌悬液。

B.2.3.4.2 试验组：取无菌平皿，用无菌镊子取 1 片试验样片，置 20 ℃±1 ℃水浴 5 min，在样片上滴加 0.1 mL 试验用菌悬液，立即计时。待试验菌与样片相互作用至各预定时间，分别夹取染菌样片加于 5.0 mL 中和剂试管中，中和 10 min 后，用电动混合器混合 20 s 或在手掌上用力振打 80 次，分别吸取 1.0 mL 样液，按 5.1.3 进行活菌培养计数。

B.2.3.4.3 阳性对照组：同时用对照样片代替试验样片，进行平行试验。阳性对照回收菌落数在 1.0×10^{4} CFU/片～9.0×10^{4} CFU/片。

B.2.3.4.4 阴性对照组：取试验同批次使用的 PBS、中和剂和培养基进行培养作为阴性对照。

B.2.3.4.5 试验样本和对照样本均在 36 ℃±1 ℃培养，细菌繁殖体培养 48 h 观察最终结果；白色念珠菌培养 72 h 观察最终结果。

B.2.3.4.6 进行 3 次重复试验，按 B.3.2.5 项计算杀灭率。

B.2.3.5 **评价规定**

杀菌率≥90%，判为有抗菌作用；杀菌率≥99%，判为有较强抗菌作用。

B.2.4 **洗衣粉抗菌效果鉴定试验**

B.2.4.1 **原理**

将染菌布片放入特制的多层布卷中间，通过模拟洗衣机的洗衣过程，检测抗（除）菌洗衣粉（剂）的抗菌作用。本方法适用于抗（除）菌洗衣粉（剂）抗菌效果的鉴定。

B.2.4.2 仪器设备或试剂材料

B.2.4.2.1 试验菌株：大肠杆菌（8099 或者 ATCC11229），金黄色葡萄球菌（ATCC 6538）。

B.2.4.2.2 培养基：营养琼脂 A 中琼脂含量为 1.5%；营养琼脂 B 是在营养琼脂 A 中另加入 1.5%的琼脂；营养肉汤是胰蛋白胨大豆琼脂培养基（TSA）。

B.2.4.2.3 3.0%牛血清白蛋白（过滤除菌）。

B.2.4.2.4 烷基酚聚氧乙烯醚（Tergitol）。

B.2.4.2.5 碳酸钠。

B.2.4.2.6 标准硬水。

B.2.4.2.7 非离子浸湿剂。

B.2.4.2.8 稀释液：磷酸盐缓冲液（PBS，0.03 mol/L，pH 值 7.2）见附录 A。

B.2.4.2.9 含 0.5% 吐温的磷酸盐缓冲液。

B.2.4.2.10 吐温 80（过滤除菌）。

B.2.4.2.11 无菌纯化水或者纯化水。

B.2.4.2.12 不锈钢转轴由一条直径 0.16 cm 不锈钢丝制成。

B.2.4.2.13 有金属螺盖的玻璃罐容积为 470 mL，可压力蒸汽灭菌，并可放入转轴的广口罐，将罐口覆盖牛皮纸，加盖，于 121 ℃灭菌 25 min 备用。

B.2.4.2.14 转动速度为 45 r/min～60 r/min 的滚动摇床。

B.2.4.2.15 可调恒温水浴箱。

B.2.4.2.16 吸管（1 mL、5 mL、10 mL）。

B.2.4.2.17 培养皿。

B.2.4.2.18 铺有滤纸的玻璃培养皿。

B.2.4.2.19 菌种保存管。

B.2.4.2.20 细菌培养箱。

B.2.4.2.21 涡流振荡器。

B.2.4.2.22 细菌比浊仪。

B.2.4.2.23 棉布：32 支纱/cm×32 支纱/cm 平织棉布。

B.2.4.2.24 别针、镊子、无菌手套、3 mm～5 mm 玻璃珠、秒表、载体布片 2.5 cm×3.75 cm 。

B.2.4.3 实验准备

B.2.4.3.1 测试棉布的制备

B.2.4.3.1.1 非离子浸润剂的制备：取 5 g 烷基酚聚氧乙烯醚，5 g 碳酸钠加入到 1 L 纯化水中。

B.2.4.3.1.2 洗涤液的制备：1.5 g 非离子浸润剂，1.5 g 碳酸钠，加入到 3 L 纯化水中。将大约 300

g 测试棉布加入 3 L 洗涤溶液，加热煮沸 1 h，取出棉布在煮沸的纯化水中清洗 5 min，然后放入凉纯化水中 5 min，以去除残留的浸润剂，然后将棉布晾干。

B.2.4.3.2 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 g±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，然后在三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。

B.2.4.3.3 细菌悬液的制备

取0.5 mL营养肉汤冻干的菌种溶解，接种于含10 mL的营养肉汤的试管，于36 ℃±1 ℃培养24 h。然后振荡混合均匀。用10 μL接种环在营养琼脂平板上划线，置于36 ℃±1 ℃培养24 h。然后从平板上挑取单个菌落种入菌种保藏管中，上下摇动10次，吸弃多余液体，置-80 ℃冰箱保存。试验前，从菌种保藏管中取出一粒带菌小颗粒放入营养琼脂斜面，晃动斜面。将斜面置36 ℃±1 ℃培养24 h。每天转种1次，连续传三代。

第四天，用5.0 mL PBS洗脱斜面上的菌苔，取0.5 mL加入到含9.5 mL PBS的试管中，混匀，取1 mL～2 mL加入含有20 mL营养琼脂B的细胞培养瓶中，晃动培养瓶使菌液覆盖整个琼脂表面。吸弃多余菌液，然后将培养瓶倒置平放在36 ℃±1 ℃培养箱中培养24 h。

用5LPBS和3g灭菌玻璃珠洗脱细胞瓶中的菌体，用PBS调整浓度至1×10^{8} FU/mL～5×10^{8} CFU/mL，然后加入等量3.0%的牛血清白蛋白。

B.2.4.3.4 染菌载体的制备

每片载体接种20μL菌悬液，放回培养皿中，加盖，于36 ℃±1 ℃在培养箱中干燥20 min。

B.2.4.3.5 测试样品的制备

至少在实验开始前20 min，将盛有265 mL标准硬水的玻璃罐在水浴箱中恒温至测试温度（25 ℃±1 ℃）。加入被测试样品混合溶解。

B.2.4.4 实验步骤

B.2.4.4.1 将 2 片染菌载体放入转动支架的第 6 和 7 层布条之间，将第 3 片放入第 7 和 8 层布条之间。

B.2.4.4.2 以无菌操作方式将转动单元（支架、布条和染菌载体）放入含有测试产品的玻璃罐中，加盖。

B.2.4.4.3 玻璃罐固定在摇床上，滚动旋转洗涤 20 min，取下玻璃罐。

B.2.4.4.4 以无菌操作方式，取出转动单元，取出 3 片染菌载体，放入到含有 30 mL 含 0.5%吐温 80 的 PBS 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。

B.2.4.4.5 对照组除用含0.5%吐温 80的PBS替代测试产品外,其他实验条件和步骤均与试验组相同。

B.2.4.4.6 菌数对照：将 3 片染菌载体加入含有 30 mL0.5% 吐温 80 的 PBS 试管中，在振荡器振荡 10

s，然后振打 80 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 两个平板。

B.2.4.4.7 将试验组、对照组和菌数对照组平板倒置于 36℃±1℃培养箱中培养 48 h ± 4 h，计数菌落数。

B.2.4.4.8 以试验同批次的稀释液、培养基等分别设阴性对照。

B.2.4.4.9 结果计算：试验重复 3 次。记录并计算测试样品的菌落总数，求其平均值。

用公式(B.3)计算抗菌率：

$$K（\%）=[（A-B）/A\ ]\times 100\% \cdots\cdots (B.3)$$

式中：

K——抗菌率；

A——试验前对照样品的菌落数，单位为菌落形成单位每片（CFU/片）；

B——试验后实验样品的菌落数，单位为菌落形成单位每片（CFU/片）。

B.2.4.5 评价规定

各次试验的抗菌率均≥50%，即判定该试样具有抗菌作用。

B.2.4.6 注意事项

B.2.4.6.1 将旋转单元放入玻璃罐后应将盖子盖紧，以防转动时漏水。

B.2.4.6.2 试验时应严格无菌操作，以防止杂菌污染。

B.2.5 浸渍试验

B.2.5.1 原理

将试样和对照织物分别放于三角烧瓶中，用含有肉汤培养基的试验菌悬液接种于试样和对照织物上，经培养后，分别将培养前、后试样上的细菌洗下，测定细菌的数量，可计算出试样上细菌减少的百分率。该方法适用于溶出性抗菌织物的抗菌效果的鉴定。

B.2.5.2 仪器设备或试剂材料

B.2.5.2.1 试验菌株：金黄色葡萄球菌（ATCC 6538）。

B.2.5.2.2 试样在距试样布边 10 cm 以上、离布端 1 m 以上部位，剪取直径为 5 cm 的圆形试样若干（需用试样数量要根据纤维类别及织物织法而定，以能吸收 1 mL 菌液且三角瓶中不留残液为度）。另同法剪取对照织物若干，取 3 份试样和 2 份对照织物分别装于三角烧瓶中，盖好瓶口灭菌备用。

B.2.5.2.3 培养基：营养肉汤培养基、胰蛋白胨大豆琼脂培养基（TSA）、营养琼脂平板。

B.2.5.2.4 磷酸盐缓冲液（PBS，0.03 mol/L，pH 为 7.2）见附录 A。

B.2.5.2.5 恒温水浴箱。

B.2.5.2.6 36 ℃±1 ℃恒温培养箱。

B.2.5.3 菌悬液的制备

用接种环将保存的菌种以划线法接种到营养琼脂平板上，在36 ℃±1 ℃恒温培养箱中培养24 h，取平皿上典型的菌落移种到含肉汤培养基的三角烧瓶中，在36 ℃±1 ℃条件下培养24 h，用肉汤对培养液进行系列稀释，使菌悬液的含菌量为1×10^5 CFU/mL～5×10^5 CFU/mL。

B.2.5.4 试验步骤

B.2.5.4.1 分别取 1 mL 菌悬液加在 2 份准备好的三角烧瓶内的织物上，确保其均匀分布，且三角烧瓶中不留多余液，封好瓶口，以防蒸发。

B.2.5.4.2 分别在一个盛有试样和对照织物的三角烧瓶中加入 100 mL PBS，剧烈摇晃 1 min 洗涤细菌，取 1.0 mL 做系列 10 倍稀释，选适当稀释度以倾注法接种平皿，作为“0”接触时间样品和对照织物上的细菌数。

B.2.5.4.3 将另一个装有接种试样的三角烧瓶在 36 ℃±1 ℃恒温培养箱中培养 20 h±2 h，然后加入 100 mL PBS，剧烈摇晃 1 min 洗涤细菌，取 1.0 mL 做 10 倍系列稀释，选适当稀释度以倾注法接种平皿，作为试验组。

B.2.5.4.4 试样不接种菌悬液，在“0”接触时间加入 100 mL PBS，剧烈摇晃 1 min 取样，接种平皿，作为阴性对照组。

B.2.5.4.5 另取 1 个装有对照织物的三角烧瓶，接种 1.0 mL 菌悬液后，在 36 ℃±1 ℃恒温培养箱中培养 20 h±2 h，然后加入 100 mL PBS，剧烈摇晃 1 min 洗涤细菌，取 1.0 mL 做 10 倍系列稀释，选适当稀释度以倾注法接种平皿，作为阳性对照组。

B.2.5.4.6 将阴性对照组和阳性对照样本与试验组样本一并放入 36 ℃±1 ℃恒温培养箱中培养 48 h，计数菌落数。

B.2.5.4.7 进行 3 次重复试验。

B.2.5.4.8 结果计算见公式（B.4）。

$$\mathrm{K}(\%) = [B\text{或者}C\text{或者（}B+C\text{）}/(2-A)]/[B\text{或者}C\text{或者（}B+C\text{）}/2]\times100\% \cdots\cdots\cdots\cdots (\mathrm{B}.4)$$

式中：

K——抗菌率；

B——“0”接触时间试样组细菌数，单位为菌落形成单位每毫升（CFU/mL）；

C——“0”接触时间对照织物组的细菌数；单位为菌落形成单位每毫升（CFU/mL）；

A——试验组试样上的细菌数。

如果“B”和“C”差别较大时，取较大值；如果“B”和“C”差别不大时，取平均值。

B.2.5.5 评价规定

B.2.5.5.1 “0”接触时间对照织物组的平均菌落数应在 1×10^3 CFU/mL～5×10^3 CFU/mL。

B.2.5.5.2 阴性对照应无菌生长，阳性对照菌数比“0”接触时间的菌数明显增加。

B.2.5.5.3 各次试验的抗菌率均≥50%，即判定该试样具有抗菌作用。

B.2.5.6 注意事项

B.2.5.6.1　对织物进行染菌操作时，应确保其均匀分布，且三角瓶中不沾染或者存留多余菌液。

B.2.5.6.2　三角瓶内的织物染菌后，应将瓶口封好，以防液体蒸发，造成细菌死亡。

B.2.6　振荡烧瓶试验

B.2.6.1　原理

将抗菌产品放入含菌的液体中，通过快速长时间振荡，增加菌体与抗菌产品的接触的机会，以显示其抗菌作用。本方法适用于对非溶出性抗菌织物的抗菌效果鉴定。

B.2.6.2　仪器设备或试剂材料

B.2.6.2.1　试验菌株：金黄色葡萄球菌（ATCC 6538）、大肠杆菌（8099）、白色念珠菌（ATCC 10231），根据抗菌剂特定用途也可用其他菌株。

B.2.6.2.2　磷酸盐缓冲液（PBS，0.03 mol/L，pH 值 7.2），见附录 A。

B.2.6.2.3　振荡摇床（300 r/min）。

B.2.6.2.4　培养基：营养琼脂培养基、胰蛋白胨大豆琼脂培养基（TSA）、沙堡琼脂培养基见附录 A。

B.2.6.2.5　抗菌样品：将抗菌物品剪切成 10 mm×10 mm 样片。

B.2.6.2.6　非抗菌样品：将非抗菌物品剪切成 10 mm×10 mm 样片。

B.2.6.2.7　三角烧瓶（规格 250 mL）。

B.2.6.3　实验分组及操作程序

B.2.6.3.1　菌悬液的制备

取试验菌24 h新鲜斜面培养物用PBS洗下，用PBS稀释至约为1.5×10^5 CFU/mL～7.5×10^5 CFU/mL。

B.2.6.3.2　分组及操作程序

B.2.6.3.2.1　抗菌试验组：称取 0.75 g 抗菌样品，置入 250 mL 的三角烧瓶中,再加入 70 mL PBS 和 5.0 mL 菌悬液，将三角烧瓶固定于振荡摇床上，以 300 r/ min 振摇 2 min 和 1 h 时分别吸取 1.0 mL 作为试验组振荡前、后样液。将振荡前、后样液，按照 5.1.3 规定的方法进行活菌培养计数。

B.2.6.3.2.2　非抗菌对照组：称取 0.75 g 非抗菌样品，置入 250 mL 的三角烧瓶中,再加入 70 mL PBS 和 5.0 mL 菌悬液，将三角烧瓶固定于振荡摇床上，以 300 r/min 振摇 2 min 和 1 h 时分别吸取 1.0 mL 作为对照组振荡前、后样液。将振荡前、后样液，按照 5.1.3 规定的方法进行活菌培养计数。

B.2.6.3.2.3　空白对照组：在三角烧瓶中再加入 70 mL PBS 和 5.0 mL 菌悬液，将三角烧瓶固定于振荡摇床上，以 300 r/min 振摇 2 min 和 1 h 时分别吸取 1.0 mL 作为空白对照组振荡前、后样液。将振荡前、后样液，按照 5.1.3 规定的方法进行活菌培养计数。

B.2.6.3.2.4　非溶出验证组：称 1.5 g 抗菌样品，置入 250 mL 的三角烧瓶中,再加入 140 mL PBS，将三角烧瓶固定于振荡摇床上，以 300 r/min 振摇 1 h，从烧瓶中取出 70 mL 液体加到另一个无菌烧瓶中，再加入 5.0 mL 菌悬液，振摇 1 h，吸取 1.0 mL 作为验证组振荡后样液。将振荡后样液，按照 5.1.3 规定的方法进行活菌培养计数。

B.2.6.3.2.5　阴性对照组：以试验同批次的 PBS、培养基分别设阴性对照。

B.2.6.3.2.6　试验温度为20 ℃～25 ℃。

B.2.6.3.3　抑菌率计算

进行3次重复试验，按公式(B.5)计算抑菌率：

$$K（\%）=\frac{A-B}{A}\times 100\% \cdots\cdots (B.5)$$

式中：

K——抑菌率；

A——样品振荡前平均菌落数；

B——样品振荡后平均菌落数。

B.2.6.4　评价规定

符合下列全部条件者，判定该产品具有抗菌作用。

a)　各次试验阴性对照均无菌生长。

b)　空白对照组活菌计数在 1×10^4 CFU/mL～5×10^4 CFU/mL 之间，且振荡前、后平均菌落数差值在15%以内。

c)　各次试验中，试验样片抑菌率与对照样片抑菌率的差值均＞26%。

d)　空白对照组振荡前平均菌落数与非溶出验证组加菌振荡 1h 的平均菌落数差值在 15%以内。

B.2.6.5　注意事项

B.2.6.5.1　振荡前须将振荡摇床上的三角烧瓶固定牢，以免碰破。

B.2.6.5.2　试验中，在实验误差允许的范围内，如果试验组和对照组出现振荡后菌落数高于振荡前菌落数的情况，其抑菌率可按“0”计算。

B.2.6.5.3　非溶出验证组，振荡后活菌计数时，须用振荡 1h，不加菌，但加有抗菌样片的 PBS 进行稀释。

B.2.7　贴膜试验

B.2.7.1　原理

本方法是通过将细菌污染于抗菌制品表面，然后用塑料薄膜覆盖，使细菌与抗菌制品表面充分接触，以测定其抗菌效果。本方法适用于PE抗菌底模、PE打孔膜及PE抗菌包装袋、抗菌塑料、抗菌地板、抗菌瓷砖等产品抗菌效果的鉴定。

B.2.7.2　仪器设备或试剂材料

B.2.7.2.1　试验菌株：金黄色葡萄球菌（ATCC 6538）、大肠杆菌（8099）、白色念珠菌（ATCC 10231），也可根据抗菌产品特定用途选用其他菌株。

B.2.7.2.2　磷酸盐缓冲液（PBS，0.03 mol/L，pH 值 7.2），见附录 A。

B.2.7.2.3　培养基：胰蛋白胨大豆琼脂培养基（TSA）、胰蛋白胨大豆肉汤培养基（TSB）与沙堡琼脂培养基见附录 A。

B.2.7.2.4　薄膜：不影响细菌生长和不吸水的材料，厚度不规定，使用一面应有较好的粘合性，面积为（40 mm±2 mm）×（40 mm±2 mm）的正方形。

B.2.7.2.5　无菌塑料袋。

B.2.7.2.6　恒温水浴箱。

B.2.7.2.7　36 ℃±1 ℃恒温培养箱。

B.2.7.2.8　样片将试样及对照试样（与试样同质不含抗菌组分）分别制成边长为 50 mm±2 mm 的正方形，其中抗菌样片 3 个，对照样片 6 个。试验前，以脱脂棉蘸取酒精轻轻擦拭样片 2～3 次，充分干燥。

B.2.7.3　**操作程序**

B.2.7.3.1　倾注琼脂培养基平板。

B.2.7.3.2　菌悬液制备：取试验菌 24 h 新鲜斜面培养物用 PBS 洗下，然后用 1/500 的胰蛋白胨大豆肉汤培养基（TSB）汤稀释成 2.5×10^5 CFU/mL～1.0×10^6 CFU/mL 试验用菌悬液。

B.2.7.3.3　将样片试验面朝上放于无菌平皿中，取 0.4 mL 菌悬液滴染于样片中央，涂匀。按图表示的方法用薄膜覆盖，小心触压薄膜，使菌液均匀散开，盖上平皿盖。如图 B.1。

B.2.7.3.4　将装有接种过菌液的试验样片的平皿（3 个抗菌样片和 3 个对照样片），置 36 ℃±1 ℃，相对湿度不低于 90%的培养箱内培养 24 h±1 h。

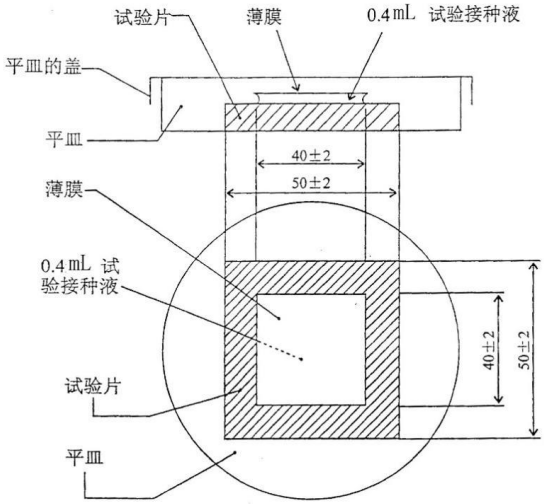
B.2.7.3.5　洗脱：以无菌操作方式用镊子将覆盖膜和试验样片放入无菌塑料袋中，然后加入 10.0 mL 胰蛋白胨大豆肉汤培养基（TSB），用手充分揉搓袋中的试验样片和覆盖薄膜，将细菌洗下。

B.2.7.3.6　吸取 1.0 mL 洗下的菌液，至含 9.0 mL PBS 的试管中，做 10 倍系列稀释，取适当稀释度接种 2 个平皿，以倾注法加入 15L～20 mL TSA，置 36 ℃±1 ℃恒温培养箱内培养 40 h～48 h。

B.2.7.3.7　将另 3 个对照样片接种后立即用镊子将覆盖膜和试验样片放入塑料袋中，洗脱和接种方法与试验样片相同。

B.2.7.3.8　以试验用同批次稀释液、培养基等分别设阴性对照。

B.2.7.3.9　进行 3 次重复试验



图B.1 菌液接种到试验片和用薄膜覆盖示意图

B.2.7.4 活菌数的计算

计算见公式B.6。

$$N = C \times D \times V \quad \text{(B.6)}$$

式中：

N——为活菌数，单位为菌落形成单位每样本（CFU/样本）；

C——为2个平板的平均菌落数，单位为菌落形成单位每样本(CFU/样本)；

D——为稀释倍数；

V——为洗脱用肉汤培养基的体积数，单位为毫升（mL）。

B.2.7.5 结果计算与判定

B.2.7.5.1 试验成立应符合的条件。

B.2.7.5.1.1 各次试验阴性对照均无菌生长。

B.2.7.5.1.2 对照样片接种后直接求出活菌数的对数值符合公式(B.7)。

$$(L_{最大值} - L_{最小值}) / L_{平均值} \leq 0.3 \quad \text{(B.7)}$$

式中：

$L_{最大值}$——最大活菌数的对数值；

$L_{最小值}$——最小活菌数的对数值；

$L_{平均值}$——平均活菌数的对数值。

B.2.7.5.1.3 对照样片“0”时间接种后的活菌数平均值应不少于 1.0×10^5 CFU/样片。

B.2.7.5.1.4 覆盖了薄膜的对照样片培养 24 h 后的活菌数，每样片均不少于 1.0×10^4 CFU。

B.2.7.5.2 计算

抗菌活性值的计算见公式（B.8）：

$$R = \log(B/A) - \log(C/A) = \log(B/C) \quad \text{(B.8)}$$

式中：

R——抗菌活性值；

A——对照样片在“0”时间接种后的活菌数的平均值，单位为菌落形成单位每样片（CFU/样片）；

B——对照样片在接种后培养24h的活菌数的平均值，单位为菌落形成单位每样片（CFU/样片）；

C——抗菌样片在接种后培养24h的活菌数的平均值，单位为菌落形成单位每样片（CFU/样片）。

B.2.7.5.3 评价规定

各次试验抗菌活性值均≥1.0，可判定该试样具有抗菌作用；各次试验抗菌活性值均≥2.0，可判定该试样具有较强抗菌作用。

B.2.7.6 注意事项

B.2.7.6.1 用薄膜覆盖，小心触压薄膜，以免菌液溢出薄膜外。

B.2.7.6.2 试验时应严格无菌操作，以防杂菌污染。

B.3 抑菌效果鉴定试验

B.3.1 抑菌效果试验——营养肉汤稀释法

B.3.1.1 适用范围

适用于液体及可溶解固体抑菌剂的检测，但不适用于浑浊的液体抑菌剂和溶解后溶液浑浊的可溶解固体抑菌剂的检测。

B.3.1.2 仪器设备或试剂材料

B.3.1.2.1 试验菌株：金黄色葡萄球菌（ATCC 6538 或 ATCC 25923）、大肠杆菌（8099 或 CICC 10899）、白色念珠菌（ATCC 10231）及根据抑菌剂特定用途所用的其他菌株。

B.3.1.2.2 稀释液：磷酸盐缓冲液（PBS，0.03 mol/L，pH 值 7.2）见附录 A。

B.3.1.2.3 培养基：营养肉汤与沙堡液体培养基见附录 A。

B.3.1.2.4 灭菌纯化水。

B.3.1.2.5 Ⅱ级生物安全柜。

B.3.1.2.6 电动混匀器。

B.3.1.2.7 恒温水浴箱。

B.3.1.2.8 恒温培养箱。

B.3.1.3 操作步骤

B.3.1.3.1 菌悬液的制备：取试验菌 24 h 新鲜斜面培养物用 PBS 洗下，用 PBS 稀释至约 5.0×10^{7} CFU/mL～2.5×10^{8} CFU/mL（真菌菌液浓度为 5.0×10^{6} CFU/mL～2.5×10^{7} CFU/mL）菌悬液备用。

B.3.1.3.2 抑菌溶液的配制：以无菌操作取 5.0 mL（或 5 g）样品，放入 45.0 mL 灭菌纯化水中，充分振荡溶解，配成 10%的均匀分散的溶液或者悬液。

B.3.1.3.3 含抑菌剂培养基配制：取上述抑菌剂稀释溶液 2.5 mL 加入到含 2.5 mL 双倍浓度 TSB 的试管中。

B.3.1.3.4 取 0.1 mL 菌悬液接种于含抑菌剂的营养肉汤试管中，作为试验组样本。

B.3.1.3.5 以同样方法将菌悬液接种于不含抑菌剂的营养肉汤的试管中，作为阳性对照组样本。

B.3.1.3.6 取 2 支含试验用的营养肉汤试管，作为阴性对照组样本。

B.3.1.3.7 将试验菌悬液按 5.1.3 进行活菌培养计数，菌量为 5.0×10^{7} CFU/mL～2.5×10^{8} CFU/mL（真菌菌液浓度为 5.0×10^{6} CFU/mL～2.5×10^{7} CFU/mL）。

B.3.1.3.8 将试验组样本、阳性对照组样本、阴性对照组样本及菌悬液活菌平板放置 36 ℃±1 ℃恒温培养箱中，培养 48 h（真菌 72 h），观察结果。

B.3.1.4 评价规定

当阳性对照组有细菌生长（混浊），阴性对照组无菌生长（透明），试验组菌悬液浓度为1.0×10^6 CFU/mL～5.0×10^6 CFU/mL（真菌为1×10^5 CFU/mL～5×10^5 CFU/mL）时，试验组无菌生长，可判为该样品对受试菌有抑菌作用。

B.3.2 抑菌效果试验——琼脂稀释法

B.3.2.1 目的及适用范围

适用于液体、啫喱、半固体凝胶类、粘稠状抑菌剂及可溶性的固体抑菌剂的检测。

B.3.2.2 仪器设备或试剂材料

B.3.2.2.1 试验菌株：金黄色葡萄球菌（ATCC 6538）、大肠杆菌（8099）、白色念珠菌（ATCC 10231）及根据抑菌剂特定用途所用的其他菌株。

B.3.2.2.2 稀释液：磷酸盐缓冲液（PBS，0.03 mol/L，pH 值 7.2）见附录 A。

B.3.2.2.3 培养基：营养琼脂培养基与沙堡琼脂培养基见附录 A。

B.3.2.2.4 灭菌纯化水。

B.3.2.2.5 Ⅱ级生物安全柜。

B.3.2.2.6 电动混匀器。

B.3.2.2.7 恒温水浴箱。

B.3.2.2.8 恒温培养箱。

B.3.2.2.9 加样器（1 μL～10 μL）。

B.3.2.3 试验步骤

B.3.2.3.1 菌悬液的制备：取试验菌 24 h 新鲜斜面培养物用 PBS 洗下，用 PBS 稀释至约 1.0×10^7 CFU/mL～5.0×10^7 CFU/mL 菌悬液备用。

B.3.2.3.2 抑菌溶液的配制：以无菌操作取 5 mL（或 5 g）样品，放入 45 mL 灭菌纯化水中，充分振荡溶解，配成 10%的均匀分散的溶液或者悬液，置 45 ℃～50 ℃温箱（或水浴）中备用。

B.3.2.3.3 双倍浓度琼脂培养基的制备：配制双倍浓度的胰蛋白胨大豆琼脂培养基与沙堡琼脂培养基，经高压灭菌后，置 45 ℃～50 ℃恒温培养箱（或恒温水浴箱）中备用，此培养基将用于稀释抑菌溶液或者悬液。

B.3.2.3.4 含抑菌液培养基的配制：分别取 10 mL 稀释的抑菌液加入平皿内。将在 45 ℃～50 ℃水浴中的双倍浓度营养琼脂培养基 10 mL，加进平皿内，边加边摇平板，使抑菌液和培养基充分混匀。

B.3.2.3.5 用加样器取 1 μL～2 μL（含菌量约为 1×10^7 CFU/mL～5×10^7 CFU/mL 的 PBS 溶液）菌悬液点种于含抑菌液培养基的平板，共点种 3 个点，接种后所形成的菌液圈直径约 5 mm～8 mm（每个点菌量约为 1.0×10^4 CFU～1.0×10^5 CFU）。

B.3.2.3.6 以同样方法接种不含抑菌成分的营养琼脂平板，作为阳性对照。

B.3.2.3.7 将试验菌悬液按 5.1.3 进行活菌培养计数，菌量为 1.0×10^7 CFU/mL～5.0×10^7 CFU/mL。

B.3.2.3.8　将接种后的平板放置 36 ℃±1 ℃恒温培养箱中培养 18 h～24 h（白色念珠菌培养 24 h～36 h），观察结果。

B.3.2.4　评价规定

当阳性对照组有实验菌生长，阴性对照组无菌生长，每点滴加菌量为1.0×10^4 CFU～1.0×10^5 CFU，试验组无菌落生长时可判为有抑菌作用。

B.3.3　抑菌环试验

B.3.3.1　原理

利用抑菌剂不断溶解经琼脂扩散形成不同浓度梯度，并通过抑菌环大小以判断其是否具有抑菌能力。本方法适用于液体抑菌剂与可溶解的抑菌产品抑菌效果的定性测定。

B.3.3.2　仪器设备或试剂材料

B.3.3.2.1　试验菌株：金黄色葡萄球菌（ATCC 6538）、大肠杆菌（8099 或者 ATCC 11229）、白色念珠菌（ATCC 10231）及根据抑菌剂特定用途所用的其他菌株。

B.3.3.2.2　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。

B.3.3.2.3　活菌培养计数所需器材见 5.1.3。

B.3.3.2.4　微量移液器 5 μL～50 μL，可调式。

B.3.3.2.5　游标卡尺。

B.3.3.2.6　培养基：胰蛋白胨大豆琼脂培养基（TSA）与沙堡琼脂培养基见附录 A。

B.3.3.3　操作程序

B.3.3.3.1　抑菌样片的制备：对液体抑菌剂，取无菌并干燥的滤纸片。每片滴加实际使用浓度抑菌剂溶液 5 μL，然后将滤纸片平放于清洁的无菌平皿内，开盖置恒温培养箱（36 ℃±1 ℃）中烤干，或者置室温下自然干燥后作为抑菌样片备用。

溶出性抑菌产品，可直接制成直径为 5 mm，厚不超过 4 mm 圆片（块）作为抑菌样片，每 4 片（块）一组。

B.3.3.3.2　阴性对照样片的制备：取无菌干燥滤纸片，每片滴加无菌纯化水 5 μL，干燥后备用。

溶出性抑菌产品的阴性对照样本，应取同种材质不含抑菌成份的样品，制成与试验组大小相同的样片（块）。

B.3.3.3.3　菌悬液制备：取试验菌 24 h 新鲜斜面培养物用 PBS 洗下，用 PBS 稀释至约 5.0×10^5 CFU/mL～5.0×10^6 CFU/mL 菌悬液。

B.3.3.3.4　试验菌的接种：用无菌棉拭子蘸取浓度为 5×10^5 CFU/mL～5×10^6 CFU/mL 试验菌悬液，在适宜的培养基平板表面均匀涂抹 3 次。每涂抹 1 次，平板应转动 60°，最后将棉拭子绕平板边缘涂抹一周。盖好平皿，置室温干燥 5 min。

B.3.3.3.5 抑菌样片贴放：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 片阴性对照样片，共 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 ℃恒温培养箱，培养 16 h～18 h 观察结果。用游标卡尺测量抑菌环的直径（包括贴片）并记录。

B.3.3.3.6 将试验菌悬液按 5.1.3 进行活菌培养计数，菌量为 5.0×10^5 CFU/mL～5.0×10^6 CFU/mL。

B.3.3.3.7 重复 3 次试验。

B.3.3.3.8 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。

B.3.3.4 评价规定

B.3.3.4.1 抑菌作用的判断：抑菌环直径大于 7 mm 者，判为有抑菌作用。抑菌环直径小于或者等于 7 mm 者，判为无抑菌作用。

B.3.3.4.2 3 次重复试验（共 12 个样片）均有抑菌作用结果者，判为合格。

B.3.3.4.3 阴性对照组应无抑菌环产生，否则试验无效。

B.3.3.5 注意事项

B.3.3.5.1 每次试验均应设置阴性对照。

B.3.3.5.2 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，抑菌环则可减小。

B.3.3.5.3 应保持琼脂浓度的准确性，否则可影响抑菌环的大小。

B.3.3.5.4 培养时间不得超过 18 h。培养过久，部分细菌可恢复生长，抑菌环变小。

B.3.3.5.5 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。

B.3.4 最小抑菌浓度测定试验——琼脂稀释法

B.3.4.1 原理

将不同浓度的抑菌剂混合溶解在琼脂培养基中，然后点种细菌，通过细菌的生长与否，以定量测定抑菌物质抑制受试菌生长的最低浓度，即最小抑菌浓度（Minimal Inhibitory Concentration，MIC）。适用于可溶性的液体、嗜喱、半固体凝胶类、黏稠状抑菌剂及可溶性的固体抑菌剂的抑菌效果定量测定。

B.3.4.2 仪器设备或试剂材料

B.3.4.2.1 试验菌株：金黄色葡萄球菌（ATCC 6538）、大肠杆菌（8099 或者 ATCC 11229）、可根据抑菌剂的用途，选择特定的菌株。

B.3.4.2.2 营养琼脂培养基，制备、高压蒸汽灭菌后，置 45℃～50℃水浴备用，此培养基将用于对照试验。

B.3.4.2.3 磷酸盐缓冲液（PBS，0.03 mol/L，pH 值 7.2），见附录 A。

B.3.4.2.4 灭菌纯化水。

B.3.4.2.5 加样器（1 μL～10 μL）。

B.3.4.2.6　45 ℃～50 ℃恒温水浴箱。

B.3.4.2.7　刻度吸管、试管、平皿。

B.3.4.2.8　36 ℃±1 ℃恒温培养箱。

B.3.4.3　操作步骤

B.3.4.3.1　菌悬液制备：取试验菌 24 h 新鲜斜面培养物用 PBS 洗下，用 PBS 稀释至约 10^7 CFU/mL 的菌悬液。

B.3.4.3.2　抑菌溶液的配制：以无菌操作取 5 mL（或 5 g）样品，放入 45 mL 灭菌纯化水中，充分振荡溶解，配成 10%的均匀分散的溶液或者悬液。

B.3.4.3.3　抑菌剂稀释液配制：将已配成 10%的抑菌溶液或者悬液用纯化水做对倍系列稀释成不同浓度的受试液，置 45 ℃～50 ℃恒温水浴箱备用。

B.3.4.3.4　双倍浓度营养琼脂培养基：经高压蒸汽灭菌后，置 45 ℃～50 ℃恒温箱水浴备用，此培养基将用于稀释抑菌溶液或者悬液。

B.3.4.3.5　含抑菌液培养基的配制：分别取 10 mL 系列稀释的抗菌液加入平皿内。将在 45 ℃～50 ℃水浴中的双倍浓度营养琼脂培养基 10mL，加进平皿内，边加边摇平板，使抑菌液和培养基充分混匀。

B.3.4.3.6　用加样器取 1 μL～2 μL（含菌量约为 10^7 CFU/mL 的 PBS 溶液）菌悬液点种于含抑菌液培养基的平板，接种后所形成的菌液圈直径约 5 mm～8 mm（每个点菌量约为 10^4 CFU）。

B.3.4.3.7　以同样方法接种不含抑菌成分的营养琼脂平板，作为阳性对照。

B.3.4.3.8　将试验菌悬液按 5.1.3 进行活菌培养计数，菌量为 10^7 CFU/mL。

B.3.4.3.9　将接种后的平板放置 36 ℃±1 ℃恒温培养箱中培养 18 h～24 h，观察结果。

B.3.4.4　评价规定

菌落生长被完全抑制的最低抑菌液浓度为该样品对受试菌的MIC。单一菌落生长可忽略不计。

B.3.4.5　注意事项

B.3.4.5.1　接种时，应由低抑菌剂浓度向高抑菌剂浓度平板依次接种，最后接种对照平板。

B.3.4.5.2　为了保证平板受热均匀，培养时平板堆放不得超过 4 块。

B.3.5　最小抑菌浓度测定试验——营养肉汤稀释法

B.3.5.1　原理

将不同浓度的抑菌剂混合于营养肉汤培养基中，然后接种细菌，通过细菌的生长与否，以定量测定抑菌剂抑制受试菌生长的最低浓度，即最小抑菌浓度（MIC）。本方法适用于可溶性的液体及可溶解性固体抑菌剂抑菌效果的定量测定。本方法不适用于自身浑浊及非溶解性抑菌剂抑菌效果的定量测定。

B.3.5.2　仪器设备或试剂材料

B.3.5.2.1　试验菌株：金黄色葡萄球菌（ATCC 6538），大肠杆菌（8099 或者 ATCC 11229），可根据抑

菌剂的用途，选择特定的菌株。

B.3.5.2.2　培养基：双倍浓度的营养肉汤培养基，见附录A。

B.3.5.2.3　稀释液：磷酸盐缓冲液（PBS，0.03 mol/L，pH值7.2）见附录A。

B.3.5.2.4　刻度吸管、试管。

B.3.5.2.5　36 ℃±1 ℃恒温培养箱。

B.3.5.3　操作步骤

B.3.5.3.1　菌悬液的制备：取试验菌24 h新鲜斜面培养物用PBS洗下，用PBS稀释至约10^8 CFU/mL菌悬液备用。

B.3.5.3.2　抑菌溶液的配制按B.3.1.3.2进行。

B.3.5.3.3　含抑菌剂培养基配制：将抑菌剂或者抑菌溶液用纯化水做对倍系列稀释成不同浓度的受试液，取各稀释度受试液2.5 mL加入到含2.5 mL双倍浓度营养肉汤的试管中。

B.3.5.3.4　取0.1 mL菌悬液接种于含抑菌剂的营养肉汤的试管中，作为试验组样本。

B.3.5.3.5　以同样方法将菌悬液接种于不含抑菌剂的营养肉汤的试管中，作为阳性对照组样本。

B.3.5.3.6　取2支含营养肉汤的试管，作为阴性对照组样本。

B.3.5.3.7　将试验菌悬液按5.1.3进行活菌培养计数，菌量为10^8 CFU/mL。

B.3.5.3.8　将试验组样本、阳性对照组样本、阴性对照组样本及菌悬液活菌计数平板放置36 ℃±1 ℃恒温培养箱中，培养48 h，观察结果。

B.3.5.4　评价规定

当阳性对照组有细菌生长（混浊），阴性对照组无菌生长（透明），试验组菌悬液浓度为5×10^5 CFU/mL～5×10^6 CFU/mL时，试验组无菌生长的最高稀释度所对应的抑菌剂浓度，为该样品对受试菌的MIC。

B.3.5.5　注意事项

接种时，应由低抑菌剂浓度向高浓度依次接种。

B.3.6　滞留抑菌效果鉴定试验

B.3.6.1　原理

模拟适合细菌生长、繁殖和可能产生感染的皮肤条件，将实验菌涂于经过抗菌产品处理的前臂皮肤，以检测抑菌样品在规定时间内的滞留抑菌效果。本方法适用于具有抗（抑）菌作用的香皂、洗手液或者沐浴液的滞留抑菌效果的鉴定。

B.3.6.2　仪器设备或试剂材料

B.3.6.2.1　试验产品试验品为25套按顺序编号的样品。每套2块，一块为含抑菌成份的测试样品皂，另一块为不含抑菌成分的对照样品。

B.3.6.2.2 不含抑菌成分的洗发液和沐浴液各25瓶（200 mL/瓶，试验调整阶段用）。

B.3.6.2.3 不含抑菌成分的香皂25块（试验调整阶段用）。

B.3.6.2.4 胰蛋白酶大豆肉汤培养基（TSB），见附录A。

B.3.6.2.5 胰蛋白酶大豆琼脂培养基（TSA），见附录A。

B.3.6.2.6 0.075 mol/L的磷酸盐缓冲液。

B.3.6.2.7 70%酒精。

B.3.6.2.8 恒温培养箱。

B.3.6.2.9 金属筒（直径2.2 cm、高度3 cm）。

B.3.6.2.10 一次性接种环（直径4 mm）。

B.3.6.2.11 小塑料碗（直径2.2 cm、高2.5 mm）。

B.3.6.2.12 胶带（Darapore，3 M公司生产）。

B.3.6.2.13 尼龙刮菌棒。

B.3.6.2.14 Triton-X 100 500 mL。

B.3.6.2.15 外用抗生素软膏（例如：百多邦莫匹罗星软膏）。

B.3.6.2.16 玻璃弯棒。

B.3.6.2.17 羊血经脱纤维处理。

B.3.6.2.18 金黄色葡萄球菌（ATCC 27217）（此株金黄色葡萄球菌是一种低毒性、对青霉素敏感、对四环素有抗药性的色素株，曾用于许多试验研究，没有任何严重副作用）。

B.3.6.2.19 皮肤消毒剂。

B.3.6.3 试验步骤

B.3.6.3.1 调整阶段

试验开始前7 d至14 d，志愿者使用不含抑菌成分的香皂、洗发水和沐浴液进行日常的洗手、洗澡。此阶段持续至少7 d，但不超过14 d。

B.3.6.3.2 清洗阶段

清洗阶段共3 d，志愿者每天用测试样品清洗一侧前臂，用对照样品清洗另一侧前臂，清洗过程如下：

a) 先清洗左臂，用流动水（水温应保持在36 ℃±1 ℃）打湿前臂内侧；

b) 用香皂从手腕至臂肘上下摩擦15 s；

c) 用手在涂有香皂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，不要搓擦；

e) 用纸巾沾干前臂，不要搓擦；

f) 重复以上步骤清洗右臂；

g) 按上面所描述的试验步骤每日清洗前臂3次，每次间隔至少一个小时，在最后一次清洗之后，应记录好时间，在12 h之后，进行滞留效果检测。在第9次清洗前臂以后，志愿者不能洗澡、

淋浴或者洗净前臂，直到试验结束。清洗前、后的两块香皂的质量及志愿者完成清洗的情况，须记录下来。

B.3.6.3.3 试验阶段

清洗阶段的第四天（最后一次清洗后在规定的时间内，一般为12 h或者24 h），将在志愿者每侧前臂上划出一个试验区，对试验区进行接种、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大豆肉汤培养基（TSB）中，在 36 ℃±1 ℃的条件下培养 20 h ±2 h。然后用胰蛋白酶大豆肉汤适当稀释菌悬液，使菌悬液浓度约为 10^8 CFU/mL～10^9 CFU/mL。

b) 细菌接种：在志愿者的每侧前臂中间部位（不要在手腕和肘皱褶处），用带有印墨直径为 3.00 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（菌落数为 10^6 CFU/试验区～10^7 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：接种后 2 h±5 min 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 1 mL 含 0.1%triton-X100 的 0.075 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%triton X-100 的 0.03 mol/L 磷酸盐缓冲液，对该区域内的皮肤进行第二次刮洗 30 s，将第二次擦洗的液体，注入含第一次刮洗液体的试管中。

e) 实验区试验后的消毒处理：一个实验区采样之后，应用 70% 的酒精对实验区进行消毒。然后对另一个实验区以同样方法进行采样，采样结束后，先用 70%的酒精对实验区进行消毒，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 平板表面，用玻璃弯棒涂匀，在 36 ℃±1 ℃的培养箱中培养 48 h±4 h，计数菌落数。

g) 以试验同批次的稀释液、培养基等分别设阴性对照。

h) 抑菌率的计算见式（B.9）。

$$抑菌率 = [（对照平均菌落数－试验平均菌落数）/对照平均菌落数] \times 100\% \cdots\cdots\cdots\cdots (B.9)$$

B.3.6.4 评价规定

B.3.6.4.1 各次试验阴性对照组无菌生长。

B.3.6.4.2 实验不得少于 16 人次，抑菌率均≥50%，判定该产品在规定的时间内有滞留抑菌作用。

B.3.6.5 注意事项

B.3.6.5.1 志愿者录用标准：

a) 年龄介于 18 岁至 65 岁的男性或者女性；

b) 志愿者应身体健康；

c) 前臂应完好无损且没有皮肤病及其他皮肤问题；

d) 同意在整个试验期间，避免使用抗（抑）菌洗液和乳膏、局部类固醇类药和全身或者局部使用抗生素，除非因为并发病症医生要求使用；

e) 同意在清洗阶段使用非药物香皂或者洗液洗澡和淋浴，但志愿者不能清洗前臂。在第 9 次洗完前臂以后，不可洗澡，淋浴或者洗净前臂，直到试验结束。

B.3.6.5.2 排除志愿者的标准如果志愿者有下列情况之一，不能被录用参加试验：

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者手臂的试验；

c) 对香皂、去污剂、香水或者青霉素过敏；

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。

B.3.6.5.3 其他试验限制：

a) 志愿者不得使用其他清洁用品；

b) 志愿者应避免洗热水盆浴和游泳；

c) 志愿者应避免接触未干的油漆、涂料或者者其他溶剂；

d) 志愿者应避免在手腕处和前臂上喷洒香水。

B.3.6.5.4 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。出现这些情况的志愿者应尽快通知检验单位。

B.4 抗（抑）菌产品稳定性测试方法（见 6.8）

B.5 消毒洗衣粉（剂）对织物模拟现场消毒效果鉴定试验

B.5.1 目的

用于鉴定消毒洗衣粉（剂）对人工污染于织物上细菌的消毒效果。

B.5.2 器材

B.5.2.1 试验菌株金黄色葡萄球菌（ATCC 6538），铜绿假单胞菌（ATCC 15442）。

B.5.2.2 培养基：营养琼脂 A 中琼脂含量为 1.5%；营养琼脂 B 是在营养琼脂 A 中另加入 1.5% 的琼脂；胰蛋白胨大豆肉汤培养基（TSB）和胰蛋白胨大豆琼脂培养基（TSA），见附录 A。

B.5.2.3 牛血清白蛋白（过滤除菌），见附录 A。

B.5.2.4 烷基酚聚氧乙烯醚（Tergitol）。

B.5.2.5 碳酸钠。

B.5.2.6 标准硬水，见附录 A。

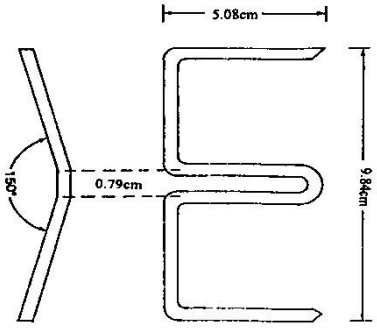
B.5.2.7 非离子浸湿剂见测试棉布制备部分。

B.5.2.8　中和剂经中和剂鉴定合格。

B.5.2.9　吐温 80（过滤除菌）。

B.5.2.10　灭菌纯化水或纯化水。

B.5.2.11　不锈钢转轴（由一条直径 0.16 cm 不锈钢丝制成，如图 B.2）。



图B.2 缠绕测试布条的不锈钢转轴

B.5.2.12　有金属螺盖的玻璃罐（容积为 470 mL，可高压蒸汽灭菌，并可放入转轴的广口罐），将罐口覆盖牛皮纸，加盖，于 121 ℃灭菌 25 min 备用。

B.5.2.13　转动速度为 45 r/min～60 r/min 的滚动摇床。

B.5.2.14　可调恒温水浴箱。

B.5.2.15　刻度吸管（1 mL，5 mL 和 10 mL）。

B.5.2.16　培养皿。

B.5.2.17　铺有滤纸的玻璃培养皿。

B.5.2.18　菌种保存管。

B.5.2.19　细菌培养箱。

B.5.2.20　涡流振荡器。

B.5.2.21　细菌比浊仪。

B.5.2.22　棉布：32 支纱/cm×32 支纱/cm 平织棉布。

B.5.2.23　别针、镊子、无菌手套、3 mm～5 mm 玻璃珠、秒表、载体布片 2.5 cm×3.75 cm，见测试棉布准备。

B.5.2.24　磷酸盐缓冲液（PBS0.03 mol/L pH7.2）。

B.5.2.25　含 0.5%（V/V）吐温 80 的 PBS。

B.5.3　实验准备

B.5.3.1　测试棉布的制备

B.5.3.1.1　非离子浸润剂的制备：取 5 g 烷基酚聚氧乙烯醚，5 g 碳酸钠加入到 1 L 纯化水中。

B.5.3.1.2　洗涤液的制备：1.5 g 非离子浸润剂，1.5 g 碳酸钠，加入到 3 L 纯化水中。

将大约 300 g 测试棉布加入 3 L 洗涤溶液。加热煮沸 1 h。取出棉布在煮沸的纯化水中清洗 5 min 后放入凉纯化水中 5 min，以去除残留的浸润剂。然后将棉布晾干。

B.5.3.1.3　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 g±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，然后在三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。

B.5.3.2　细菌悬液的制备

取0.5 mL营养肉汤溶解的冻干的菌种，然后吸取0.1 mL接种于含10 mL 的营养肉汤的试管，置36 ℃±1 ℃培养24 h。然后，振荡混合均匀。用10 μL接种环在营养琼脂平板上划线，置36 ℃±1 ℃培养24 h。然后，从平板上挑取单个菌落种入菌种保藏管中，上下摇动10次，吸弃多余液体，置-80 ℃冰箱保存。试验前，从菌种保藏管中取出一粒带菌小粒珠，放入营养琼脂斜面，晃动斜面。将斜面置36 ℃±1 ℃培养24 h。每天转种1次，连续传三代。第四天，用5.0 mL PBS 洗脱斜面上的菌苔，取0.5 mL 加入到含9.5 mL PBS 的试管中，混匀，取1 mL～2 mL 加入含有20 mL营养琼脂B的细胞培养瓶中，晃动培养瓶使菌液覆盖整个琼脂表面。吸弃多余菌液，然后将培养瓶倒置平在36 ℃±1 ℃培养箱中，培养24 h。用5.0 mL PBS和3 g灭菌玻璃珠洗脱细胞瓶中的菌体，用PBS调整浓度至1×10^8 CFU/mL～5×10^8 CFU/mL，然后加入等量的3.0%牛血清白蛋白。

B.5.3.3　染菌载体的制备

每片载体接种20 μL菌悬液，放回培养皿中，加盖，置36 ℃±1 ℃培养箱中干燥20 min。

B.5.3.4　测试样品的制备

至少在实验开始前20 min，将盛有265 mL标准硬水的玻璃罐在水浴箱中恒温至测试温度（25 ℃±1 ℃），加入被测试样品混合溶解。

B.5.4　试验步骤

B.5.4.1　将两片染菌载体放入转动支架的第 6 和 7 层布条之间，将第 3 片放入第 7 和 8 层布条之间。

B.5.4.2　以无菌操作方式将转动单元（支架、布条和染菌载体）放入含有测试产品的玻璃罐中，加盖。

B.5.4.3　玻璃罐固定在摇床上，滚动旋转洗涤 20 min，取下玻璃罐。

B.5.4.4　以无菌操作方式，取出转动单元，取出 3 片染菌载体，放入到含有 30 mL 中和剂的试管中，中和作用 10 min，在振荡器中混合 10 s，然后振打 80 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。

B.5.4.5　对照组除用含 0.5%（V/V）吐温 80 的 PBS 替代测试产品外，其他实验条件和步骤均与试验组相同。

B.5.4.6　将试验组、对照组和菌数对照组平板置于 36 ℃±1 ℃培养箱中培养 48 h，计数菌落数。

B.5.4.7　进行 3 次重复试验。

B.5.4.8　结果计算，按 5.1.7.4.8 方法计算杀灭对数值。

B.5.5　评价规定

B.5.5.1　阳性对照回收菌数为 1.0×10^6 CFU/样本～5.0×10^6 CFU/样本。

B.5.5.2　每次试验杀灭对数值均≥3.00，判定为消毒合格。

B.5.6 注意事项

B.5.6.1 将旋转单元放入玻璃罐后应将盖子盖紧，以防转动时漏水。

B.5.6.2 试验时应严格无菌操作，以防止杂菌污染。