



中华人民共和国国家标准

GB/T 21510—2008

纳米无机材料抗菌性能检测方法

Antimicrobial property detection methods for nano-inorganic materials



2008-03-13 发布

2008-08-01 实施



中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会

发布

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
纳米无机材料抗菌性能检测方法

GB/T 21510—2008

*

中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街16号

邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 18 千字

2008年5月第一版 2008年5月第一次印刷

*

书号: 155066·1-31373 定价 14.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换

版权专有 侵权必究

举报电话:(010)68533533

前 言

本标准的附录 A、附录 B、附录 C 均为规范性附录。

本标准由全国纳米技术标准化技术委员会纳米材料分技术委员会提出并归口。

本标准负责起草单位：国家纳米科技中心、中国科学院过程工程研究所、北京赛特瑞科技发展有限公司、中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所、中国科学院理化技术研究所、中国抗菌材料及制品行业协会。

本标准起草单位：中国科学院抗菌材料检测中心、上海润河纳米材料科技有限公司、南京海泰纳米材料有限公司、江苏常泰纳米材料有限公司、波司登股份有限公司、南通纵横化工有限公司参加起草。

本标准主要起草人：陈运法、刘秀岩、季君晖、付玲、王开利、任玉枝、吴镇江、丁培。

纳米无机材料抗菌性能检测方法

1 范围

本标准规定了纳米无机材料抗菌性能的术语和定义、试验方法、试验数据处理、检测结果计算、检测报告和注意事项等。

本标准适用于纳米抗菌粉末以及以纳米抗菌粉末为抗菌功能组分(结构单元)的材料,如纤维、织物、塑料、涂料和陶瓷等。其他材料的抗菌性能检测也可以参照本标准执行。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准。然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 19619 纳米材料术语

GB/T 13221 纳米粉末粒度分布的测定 X 射线小角散射法

中华人民共和国卫生部《化妆品卫生规范》(2002 年版)

3 术语和定义

GB/T 19619 确立的以及下列术语和定义适用于本标准。

3.1

抑菌

具有抑制或妨碍细菌或真菌生长繁殖及其活性的作用。

3.2

杀菌

具有杀灭细菌或真菌生长繁殖的作用。

3.3

抗菌

具有杀灭或妨碍细菌或真菌生长繁殖及其活性的作用。

3.4

纳米抗菌粉末

符合 GB/T 13221 要求,并具有抗菌作用的离散纳米颗粒的集合体。

3.5

纳米抗菌材料

纳米抗菌粉末以及以纳米抗菌粉末为抗菌功能组分(结构单元)的材料。

4 试验方法

4.1 纳米粉末抗菌性能的试验方法按附录 A 规定的方法进行。

4.2 纤维、织物、塑料粉体和微孔滤材等材料抗菌性能的试验方法按附录 B 规定的方法进行。

4.3 塑料、陶瓷、漆膜、板材和金属等硬质表面材料抗菌性能的试验方法按附录 C 规定的方法进行。

5 试验数据处理

将各平板菌落数乘以稀释倍数,即为样本实际回收菌落数。

6 检测结果计算

6.1 计算菌落数

将各平板菌落数乘以稀释倍数,即为样本实际回收菌数。

6.2 计算抗菌率

抗菌率 R 按式(1)计算,具体的评价指标由相应的产品标准规定。

$$R = \frac{A - B}{A} \times 100\% \quad \text{.....(1)}$$

式中:

R ——抗菌率,%;

A ——对照样品与受试菌接触一定时间后平均回收菌数,单位为菌落形成单位每毫升(cfu/mL);

B ——试验样品与受试菌接触一定时间后平均回收菌数,单位为菌落形成单位每毫升(cfu/mL)。

7 检测报告

检测报告应包括以下内容:

- a) 受试样本名称、状态、加入量;
- b) 受试菌株;
- c) 接触时间;
- d) 检测日期;
- e) 检测结果,平均抗菌率应为各次试验抗菌率的算术平均值,抗菌率保留小数点后一位;
- f) 检测人员;
- g) 送检单位;
- h) 生产单位。

8 注意事项

- 8.1 微生物试验操作均应在生物安全柜中进行。
- 8.2 菌液滴染样片时,勿溢出片外。
- 8.3 振荡前须将振荡摇床上的三角烧瓶固定牢,以免碰破。
- 8.4 称量粉末样品时,操作人员应佩戴口罩,做好个人防护。

附录 A

(规范性附录)

粉末抗菌性能试验方法 振荡法

A.1 适用范围

本试验方法适用于测定纳米粉末的抗菌性能。

A.2 试验设备和材料

A.2.1 试验设备

A₂ 型二级生物安全柜、恒温振荡培养箱(300 r/min)、恒温培养箱、压力蒸汽灭菌锅、电热恒温干燥箱[(0~250)℃]、冷藏冰箱、微波炉(输出功率≥700 W)、天平(感量 0.001 g)。

A.2.2 试验器材

三角烧瓶(容量为 500 mL、250 mL、150 mL)、平皿(直径为 90 mm)、试管(18 mm×180 mm)、量筒(100 mL)、吸管(10 mL、5 mL、1 mL)、酒精灯、试管架等。

A.2.3 培养基及试剂

A.2.3.1 普通营养肉汤培养基

蛋白胨	10 g
牛肉膏	5 g
氯化钠	5 g
蒸馏水	1 000 mL

调 pH 值至 7.2~7.4, 高压蒸汽灭菌 121℃, 20 min。

用途: 用于金黄色葡萄球菌和大肠杆菌增菌培养。

A.2.3.2 普通营养琼脂培养基

蛋白胨	10 g
牛肉膏	5 g
氯化钠	5 g
琼脂	20 g
蒸馏水	1 000 mL

调 pH 值至 7.2~7.4, 高压蒸汽灭菌 121℃, 20 min。

用途: 用于金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的培养。

A.2.3.3 沙堡氏琼脂培养基

蛋白胨	10 g
葡萄糖	40 g
琼脂	20 g
蒸馏水	1 000 mL

调 pH 值至 5.4~5.8, 高压蒸汽灭菌 115℃, 30 min。

用途: 用于白色念珠菌的培养。

A.2.3.4 含 0.1% (体积分数) 吐温-80 的磷酸盐缓冲液 [PBS, 0.03 mol/L, pH(7.2~7.4)]

磷酸氢二钠(Na ₂ HPO ₄ , 无水)	2.83 g
磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	1.36 g
非离子表面活性剂吐温-80	1.0 g

蒸馏水 1 000 mL

高压蒸汽灭菌 121℃, 20 min。

用途:用于菌液和试验样本的稀释。

A.2.4 试验用标准菌种

金黄色葡萄球菌 (*staphylococcus aureus*) ATCC6538、大肠杆菌 (*escherichia coli*) 8099 或 ATCC25922、白色念珠菌 (*candida albicans*) ATCC10231。

注:根据产品的使用要求,可选用其他菌种或菌株作为试验用菌,但所有菌种或菌株必须由国际微生物菌种保藏中心或国家相应菌种保藏管理中心提供。

A.2.5 对照样本

二氧化硅粉末,要求粉末尺度不大于 100 nm,纯度为 98%~99%,不具有抗菌作用且对试验结果的判定无影响。

A.3 试验程序

A.3.1 菌种斜面的制备

A.3.1.1 菌种活化

取干菌种管,在无菌操作下打开,以毛细吸管加入适量营养肉汤,轻柔吹吸数次,使菌种融化分散。取含 5.0 mL~10.0 mL 营养肉汤培养基试管,滴入少许菌种悬液,置 37℃±1℃培养 18 h~24 h。

A.3.1.2 分离

用接种环取第一代培养的菌悬液,划线接种于营养琼脂培养基平板上,在 37℃±1℃培养 18 h~24 h。

A.3.1.3 纯化

挑取上述第二代培养物中典型菌落,接种于营养琼脂斜面,在 37℃±1℃培养 18 h~24 h,即为第三代培养物。

A.3.1.4 菌种保藏

将菌种接种于营养琼脂培养基斜面上,在 37℃±1℃培养 24 h 后,在 0℃~5℃下保藏,一般不超过一个月转种 1 次。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。

A.3.2 试验步骤

A.3.2.1 菌悬液的制备

取菌种第三代至第八代的营养琼脂培养基斜面 18 h~24 h 新鲜培养物,用 5.0 mL 吸管吸取 3.0 mL~5.0 mL 的 0.03 mol/L 磷酸盐缓冲液加入斜面试管内,反复吸吹,洗下菌苔。将洗下的菌液移至另一试管中,用振荡器混匀后,用 0.03 mol/L 磷酸盐缓冲液稀释至适宜浓度(约为 10⁵ cfu/mL)。细菌繁殖体悬液应保存在 4℃冰箱内备用且保存不应超过 4 h。

A.3.2.2 对照组样液的制备

称取对照样本 0.5 g±0.05 g 粉末放入三角烧瓶中,加入 95 mL 含 0.1%吐温-80 的磷酸盐缓冲液,混匀后,再加入 5.0 mL 预制菌悬液。

A.3.2.3 试验组样液的制备

称取试验样本 0.5 g±0.05 g 粉末放入三角烧瓶中,加入 95 mL 含 0.1%吐温-80 的 PBS,混匀后,再加入 5.0 mL 预制菌悬液。

A.3.2.4 对照样本“0”接触时间活菌计数

振荡前,将对照样液经适当稀释,吸取 1.0 mL 接种于灭菌平皿中,每样液平行接种 2 个平皿,倾注 45℃~55℃已溶化的营养琼脂培养基,待琼脂培养基凝固后翻转平板,将上述平板置于 37℃±1℃恒温培养箱中,做菌落计数。

A.3.2.5 振荡接触培养

将含对照样本和试验样本的三角烧瓶固定于恒温振荡培养箱的摇床上,在作用温度 37℃±1℃条

件下,以 150 r/min 速度,检测样品需要稀释后使用的材料振荡接触 1 h~4 h,不需要稀释直接使用的材料振荡接触 4 h~24 h。

A.3.2.6 振荡接触一定时间后活菌计数

振荡后的对照样液和试验样液经适当稀释后,分别取 1.0 mL 的样液接种于灭菌平皿中,每样液平行接种 2 个平皿,倾注 45℃~55℃已溶化的营养琼脂培养基,待琼脂培养基凝固后翻转平板,将上述平板置于 37℃±1℃恒温培养箱中,做活菌培养计数。

A.3.2.7 阴性对照组

阴性对照组分别吸取试验同批次稀释液、培养基与试验样本一起放入 37℃±1℃恒温培养箱中培养。观察有无污染。

A.3.2.8 观察结果

对细菌培养 46 h~48 h 后观察最终结果,对白色念珠菌培养 70 h~72 h 后观察最终结果。菌落计数按中华人民共和国卫生部《化妆品卫生规范》(2002 年版)中菌落总数测定方法。

A.3.2.9 试验次数

以上试验重复 3 次。

A.4 试验要求

A.4.1 “0”接触时间对照组的菌落数应在 1×10^4 cfu/mL~ 5×10^4 cfu/mL。阴性对照应无菌生长。

A.4.2 对照样本不应有明显的抗菌作用。经振荡后对照组回收菌落数不应低于“0”接触时间回收菌落数的 10%,否则试验无效。

附录 B

(规范性附录)

材料抗菌性能试验方法 振荡法

B.1 适用范围

本试验适用于测定溶出性和非溶出性的纤维、织物、塑料粉体和微孔滤材等材料的抗菌性能。

B.2 试验设备和材料

B.2.1 试验设备、试验器材和试验用标准菌种

试验设备、试验器材和试验用标准菌种的要求应符合 A.2.1~A.2.4 的规定。

B.2.2 对照样本

对照样本为纯棉平纹白布剪取的样片(32支纱),样片本身不具有抗菌作用且对试验结果的判定无影响。试验前应进行脱脂处理:将纯棉平纹白布放在含洗涤剂的水中煮沸 30 min,用自来水漂洗 3 次;然后用蒸馏水煮沸 5 min 后,再漂洗、晾干、熨平;在剪开前,按制备样片的大小抽去经纬纱,再按抽纱痕剪开。

B.3 试验程序

B.3.1 菌种斜面的制备

菌种斜面的制备应符合 A.3.1 的规定。

B.3.2 试验步骤

B.3.2.1 将抗菌织物样品剪成 10 mm×10 mm,抗菌塑料、微孔滤材、长丝、短纤、纱线按原状态采用,称取抗菌样本 1.0 g±0.05 g 放入三角烧瓶中,加入 95 mL 含 0.1%吐温-80 的 PBS,混匀后,再加入 5.0 mL 预制菌悬液。

B.3.2.2 菌悬液的制备、对照组样液的制备、对照样本“0”接触时间活菌计数、振荡接触培养、振荡接触一定时间后活菌计数、阴性对照组、观察结果、试验次数等应符合 A.3.2.1~A.3.2.2、A.3.2.4~A.3.2.9 的规定。

B.4 试验要求

试验要求应符合 A.4 规定。

附 录 C
(规范性附录)
材料抗菌性能试验方法 贴膜法

C.1 适用范围

本试验适用于测定非吸水性且可制成有一定面积的材料或涂层,如塑料、陶瓷、漆膜、板材和金属等硬质表面材料的抗菌性能。

C.2 试验设备和材料

C.2.1 试验设备

A₂型二级生物安全柜、恒温培养箱、压力蒸汽灭菌器、电热恒温干燥箱[(0~250)℃]、冷藏冰箱、微波炉(输出功率≥700 W)。

C.2.2 试验器材

三角烧瓶(容量为 500 mL、250 mL)、平皿(直径为 90 mm)、试管(18 mm×180 mm)、量筒(100 mL)、吸管(10 mL、5 mL、1 mL)、移液管(精确度 0.01 mL)、酒精灯、试管架、70%乙醇(体积分数)和聚乙烯薄膜等。

C.2.3 培养基及试剂和试验用标准菌种

培养基及试剂和试验用标准菌种应符合 A.2.3 和 A.2.4 的规定。

C.3 试验程序

C.3.1 菌种斜面的制备

菌种斜面的制备应符合 A.3.1 规定。

C.3.2 试验步骤

C.3.2.1 覆盖膜的制备

覆盖膜采用聚乙烯薄膜,尺寸为 40 mm×40 mm(±2 mm),厚度为 0.05 mm~0.10 mm。若试验样本规格较小,可按其表面积减小该覆盖膜尺寸,以使菌悬液不溢出为适。

C.3.2.2 对照样本

对照样本用卫生级高密度聚乙烯(HDPE)注塑成型,标准尺寸为 50 mm×50 mm(±2 mm),厚度不大于 5 mm,要求其本身不具有抗菌作用且对试验结果的判定无影响。

C.3.2.3 试验组样本的制备

将试验样本制成标准尺寸为 50 mm×50 mm(±2 mm),若试验样本规格较小,应不小于 20 mm×20 mm。

C.3.2.4 样品的预处理

取对照样品和受检样品,用 70%乙醇溶液擦拭其表面,5 min 后用无菌蒸馏水冲洗,自然干燥。若不适于消毒剂处理的样本,可根据样品特性直接用无菌蒸馏水冲洗或采用其他方法消毒,但不得影响其抗菌性能和干扰检测结果。

C.3.2.5 制备菌悬液

取菌种第三代至第八代的营养琼脂培养基斜面 18 h~24 h 新鲜培养物,用 5.0 mL 吸管吸取 3.0 mL~5.0 mL 的 0.03 mol/L 磷酸盐缓冲液加入斜面试管内,反复吸吹,洗下菌苔。将洗下的菌液移至另一试管中,用振荡器混匀后,用 0.03 mol/L 磷酸盐缓冲液稀释至适宜浓度(约为 10⁵ cfu/mL)。细菌繁殖体悬液应保存在 4℃冰箱内备用且保存不得超过 4 h。

C.3.2.6 接种菌液

将对照样品和受检样品分别放入灭菌平皿中,吸取 0.2 mL~0.5 mL 试验菌液分别滴加在对照样品和受检样品表面,每个样品做 3 个平行样。用灭菌镊子夹起覆盖膜分别盖在样品表面并且要铺平,不得有气泡,使菌液均匀接触样品,盖好平皿,在 $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 90% 条件下接触培养 16 h~24 h。若检验的样品采用的是光触媒类抗菌剂,应根据样本试验要求,在恒温培养箱中安装光源。

C.3.2.7 菌落计数

经接触培养 16 h~24 h 的样品,分别加入 20 mL 洗脱液,反复洗脱 3 次样品及覆盖膜,将洗脱液移入三角烧瓶中,摇匀后经适当稀释,每样液平行接种 2 个平皿,倾注 $45^{\circ}\text{C}\sim 55^{\circ}\text{C}$ 已溶化的营养琼脂培养基,待琼脂培养基凝固后翻转平板,将上述平板置于 $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中,做活菌培养计数。

C.3.2.8 阴性对照组

阴性对照组应符合 A.3.2.7 的规定。

C.3.2.9 观察结果

观察结果应符合 A.3.2.8 的规定。

C.3.2.10 试验次数

以上试验重复 3 次。

C.4 试验要求

C.4.1 “0”接触时间对照组的菌落数应在 1×10^4 cfu/片~ 5×10^4 cfu/片。阴性对照应无菌生长。

C.4.2 同一对照样品的 3 个平行活菌数值要符合以下要求:

$$\frac{\text{最高对数值}-\text{最低对数值}}{\text{平均对数值}} \leq 0.3$$

C.4.3 对照样本不应有明显的抗菌作用。经接触一定时间后对照组回收菌落数不应低于“0”接触时间回收菌落数的十分之一,否则试验无效。



GB/T 21510—2008

版权专有 侵权必究

书号:155066·1-31373

定价: 14.00 元

C.3.2.6 接种菌液

将对照样品和受检样品分别放入灭菌平皿中,吸取 0.2 mL~0.5 mL 试验菌液分别滴加在对照样品和受检样品表面,每个样品做 3 个平行样。用灭菌镊子夹起覆盖膜分别盖在样品表面并且要铺平,不得有气泡,使菌液均匀接触样品,盖好平皿,在 $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 90% 条件下接触培养 16 h~24 h。若检验的样品采用的是光触媒类抗菌剂,应根据样本试验要求,在恒温培养箱中安装光源。

C.3.2.7 菌落计数

经接触培养 16 h~24 h 的样品,分别加入 20 mL 洗脱液,反复洗脱 3 次样品及覆盖膜,将洗脱液移入三角烧瓶中,摇匀后经适当稀释,每样液平行接种 2 个平皿,倾注 $45^{\circ}\text{C}\sim 55^{\circ}\text{C}$ 已溶化的营养琼脂培养基,待琼脂培养基凝固后翻转平板,将上述平板置于 $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中,做活菌培养计数。

C.3.2.8 阴性对照组

阴性对照组应符合 A.3.2.7 的规定。

C.3.2.9 观察结果

观察结果应符合 A.3.2.8 的规定。

C.3.2.10 试验次数

以上试验重复 3 次。

C.4 试验要求

C.4.1 “0”接触时间对照组的菌落数应在 1×10^4 cfu/片~ 5×10^4 cfu/片。阴性对照应无菌生长。

C.4.2 同一对照样品的 3 个平行活菌数值要符合以下要求:

$$\frac{\text{最高对数值}-\text{最低对数值}}{\text{平均对数值}} \leq 0.3$$

C.4.3 对照样本不应有明显的抗菌作用。经接触一定时间后对照组回收菌落数不应低于“0”接触时间回收菌落数的十分之一,否则试验无效。

