

# 中华人民共和国国家标准

GB/T 31402—2015/ISO 22196:2007

---

## 塑料 塑料表面抗菌性能试验方法

Plastics—Measurement of antibacterial activity on plastics surfaces

(ISO 22196:2007, IDT)

2015-05-15 发布

2015-10-01 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

## 目 次

前言 .....	III
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语和定义 .....	1
4 材料 .....	2
5 仪器 .....	4
6 仪器灭菌和菌种保藏 .....	4
7 检测步骤 .....	5
8 试验结果 .....	7
9 重复性与再现性 .....	8
10 试验报告 .....	8
附录 A (规范性附录) 生物材料的质量要求 .....	9
附录 B (资料性附录) 重复性和再现性 .....	10
参考文献 .....	13

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准使用翻译法等同采用 ISO 22196:2007《塑料 塑料表面抗菌性能试验方法》。

为了便于使用,本标准还做了下列编辑性修改:

——4.1 中用注的形式说明了与测试菌种等同的国内菌株号。

本标准由中国石油和化学工业联合会提出。

本标准由全国塑料标准化技术委员会老化方法分技术委员会(SAC/TC 15/SC 5)归口。

本标准起草单位:广东省微生物研究所、广州合成材料研究院有限公司、北京崇高纳米科技有限公司、海信容声(广东)冰箱有限公司、松下家电研究开发(杭州)有限公司、晋大纳米科技(厦门)有限公司、成都交大晶宇科技有限公司、海尔科化工程塑料国家工程研究中心股份有限公司、全国卫生产业企业管理协会抗菌产业分会。

本标准主要起草人:谢小保、欧阳友生、王浩江、李毕忠、吴继贤、李维义、周祚万、胡哲、李文东、贾春耕。

# 塑料

## 塑料表面抗菌性能试验方法

**警告:**处理和操作具有潜在危险的微生物需要很高的技术能力,必须遵守现行国家法律和条例。只有经过微生物学技术培训的人员才能进行这些检测工作。并应严格执行相关的消毒、灭菌和个人卫生规范程序。

### 1 范围

本标准规定了经抗菌处理的塑料制品(包括半成品)的抗菌性能的评价方法。

注:本标准也适用于经抗菌处理的其他无孔材料的抗菌性能检测。

本方法不适用于未经抗菌处理塑料上细菌作用和繁殖的评价。ISO 846 描述了不同于本标准所覆盖方法的一些评价塑料上细菌作用及其繁殖的试验方法。感兴趣者可以参阅 ISO 846:1997 方法 C。

本标准不涉及因抗菌处理而带来的次生效应,如预防塑料的生物腐蚀和异味,也不适用于评价塑料的生物降解性能。生物降解试验可参考 ISO 14851、ISO 14852、ISO 14855(见参考文献)及其他相关标准。

本标准并不涉及建筑用塑料,如 PVC 或复合材料,除非将其以相同方式进行抗菌处理。

根据本标准所得到的任何结果均需参照本标准及其试验条件。利用本标准所得到的结果是在本标准的试验条件下得到的抗菌性能,而不代表在其他温度、湿度、菌种和营养等条件下的抗菌性能。利用本方法进行抗菌试验需要最低剂量的抗菌剂(化学品)溶入到接种菌液中。

建议试验人员查阅 ISO 7218 进行微生物操作。

### 2 规范性引用文件

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

ISO 7218 食品和动物饲料的微生物学 微生物检验通用要求和指南(Microbiology of food and animal feeding stuffs—General requirements and guidance for microbiological examinations)。

### 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

#### 3.1

**抗菌 antibacterial**

制品表面抑制细菌生长的状态或药剂抑制制品表面细菌生长的效果。

#### 3.2

**抗菌剂 antibacterial agent**

通过表面抗菌处理或添加到制品而抑制细菌在制品表面生长的药剂。

3.3

**抗菌性能 antibacterial activity**

经过抗菌处理后的制品和未经抗菌处理后的制品在接种细菌培养后,得到的活菌数的对数的差值。

3.4

**抗菌效果 antibacterial effectiveness**

使用抗菌剂的制品表面抑制细菌生长繁殖的能力,由计算得到的抗菌性能值决定。

4 材料

4.1 试验细菌

采用以下两种细菌:

- a) 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*);
- b) 大肠杆菌(*Escherichia coli*)。

根据需要也可采用其他菌种。使用其他菌种时,应在检测报告中注明并说明理由。

试验所用菌株如表 1 所示。如从表 1 以外的机构获取菌株,则该机构应是世界菌种保藏联合会(WFCC)的成员或日本菌种保藏协会(JSCC)的成员,并且菌株应和表 1 相同,根据供应商的使用说明制备菌种。

表 1 试验所用菌株

菌种名称	菌株号
金黄色葡萄球菌	ATCC 6538P CIP 53.156 DSM 346 NBRC 12732 NCIB 8625
大肠杆菌	ATCC 8739 CIP 53.126 DSM 1576 NBRC 3972 NCIB 8545

注:中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC)是 WFCC 成员,与金黄色葡萄球菌 ATCC 6538P 等同的国内菌株号为 CGMCC 1.2910,与大肠杆菌 ATCC 8739 等同的国内菌株号为 CGMCC 1.2463。

4.2 试剂、培养基与溶液

所使用的水都应是蒸馏水或去离子水,电导率小于 1  $\mu\text{S}/\text{cm}$ 。

所有试剂都应是分析纯或微生物实验试剂。

4.2.1 非离子表面活性剂

——聚氧乙烯山梨醇酐单油酸酯(吐温 80)。

## 4.2.2 生物材料

以下是需要的生物材料：

- 卵磷脂；
- D-葡萄糖；
- 酵母膏；
- 牛肉膏(见附录 A)；
- 蛋白胨(见附录 A)；
- 酪蛋白胨；
- 大豆蛋白胨；
- 胰蛋白胨。

## 4.2.3 培养基

### 4.2.3.1 概述

应用下述专用培养基。如采用商品培养基,应按照制造商的说明书制备。

### 4.2.3.2 悬浮液—1/500 营养肉汤(1/500 NB)

将 3.0 g 牛肉膏、10.0 g 蛋白胨和 5.0 g 氯化钠溶于 1 000 mL 蒸馏水或去离子水中。用蒸馏水或去离子水稀释至 500 倍体积,并用氢氧化钠溶液或盐酸将 pH 值调整至 6.8~7.2。用高压蒸汽灭菌(见 6.2)。如不立即使用,于 5℃~10℃ 保藏。不得使用存放一个星期或以上的 1/500 营养肉汤。

### 4.2.3.3 营养琼脂

将 5.0 g 牛肉膏、10.0 g 蛋白胨、5.0 g 氯化钠、15.0 g 琼脂粉加入 1 000 mL 蒸馏水或去离子水中。将容器放在电炉上或浸入沸水水浴锅中加热搅拌,直到琼脂溶解。用氢氧化钠溶液或盐酸将 pH 值调整至 7.0~7.2(25℃)。用高压蒸汽灭菌(见 6.2)。如不立即使用,于 5℃~10℃ 保藏。不得使用存放一个月或以上的营养琼脂。

### 4.2.3.4 平板计数琼脂

将 2.5 g 酵母膏、5.0 g 胰蛋白胨、1.0 g 葡萄糖、15.0 g 琼脂粉加入 1 000 mL 蒸馏水或去离子水中。将容器放在电炉上或浸入沸水水浴锅中加热搅拌,直到琼脂溶解。用氢氧化钠溶液或盐酸将 pH 值调整至 7.0~7.2(25℃)。用高压蒸汽灭菌(见 6.2)。如不立即使用,于 5℃~10℃ 保藏。不得使用存放一个月或以上的平板计数琼脂。

### 4.2.3.5 斜面培养基

将 6 mL~10 mL 加热溶解的营养琼脂加入旋盖的试管中,用高压蒸汽灭菌(见 6.2)。灭菌后将试管置于倾角约 15° 的位置,让培养基凝固。如不立即使用,于 5℃~10℃ 保藏。不得使用存放一个月或以上的斜面培养基。

### 4.2.3.6 卵磷脂吐温大豆酪蛋白培养液(SCDLP 培养液)

将 17.0 g 酪蛋白胨、3.0 g 大豆蛋白胨、5.0 g 氯化钠、2.5 g 磷酸氢二钠、2.5 g 葡萄糖与 1.0 g 卵磷脂溶于 1 000 mL 蒸馏水或去离子水中。搅拌均匀后加入 7.0 g 非离子型表面活性剂吐温 80,用氢氧化钠溶液或盐酸将 pH 值调整至 6.8~7.2(25℃),高压蒸汽灭菌(见 6.2)。如不立即使用,于 5℃~10℃ 保

藏。不得使用存放一个月或以上的 SCDLP 培养液。

注：在大多数的情况下 SCDLP 是默认的中和剂，在 ASTM E 1054 和 EN 1040 中规定了替代的中和剂选择和评价方法。

#### 4.2.3.7 磷酸盐缓冲液

将 34.0 g 磷酸二氢钾放入 1 000 mL 容量瓶中，加入 500 mL 去离子水或蒸馏水，搅拌溶解后，用氢氧化钠溶液调整 pH 值至 6.8~7.2 (25 °C)。加入去离子水或蒸馏水至 1 000 mL，高压蒸汽灭菌（见 6.2）。不得使用存放一个月或以上的磷酸盐缓冲液。

#### 4.2.3.8 磷酸盐缓冲生理盐水

将 8.5 g 氯化钠加入 1 000 mL 去离子水或蒸馏水中，搅拌均匀，制成生理盐水。以生理盐水稀释磷酸盐缓冲液（见 4.2.3.7）至 800 倍体积。高压蒸汽灭菌（见 6.2）。如不立即使用，于 5 °C~10 °C 保藏。不得使用存放一个月或以上的磷酸盐缓冲生理盐水。

### 5 仪器

如无特别说明，使用以下器具和材料：

- 5.1 干热灭菌箱：能保持 160 °C~180 °C 的温度，温度波动不超过 ±2 °C。
- 5.2 高压蒸汽灭菌锅：能保持 (121±2) °C 的温度，保持 (103±5) kPa 压力。
- 5.3 带搅拌的加热电炉或水浴锅。
- 5.4 pH 计：精度 ±0.2。
- 5.5 天平：精度 ±0.01 g。
- 5.6 移液器：带有 1 000 μL 的枪头，灭菌后使用。
- 5.7 培养箱：在设定温度下，温度精度 ±1 °C。
- 5.8 漩涡搅拌器。
- 5.9 超声波清洗器。
- 5.10 接种环：直径 4 mm，灭菌后使用。
- 5.11 覆盖膜：不影响细菌生长并且不吸水的材料（以聚乙烯、聚丙烯或聚酯如聚对苯二甲酸乙二醇酯制成）。建议膜厚度在 0.05 mm~0.10 mm 之间。  
注：均质袋 (Stomacher bags) 切下的膜也适用。
- 5.12 带螺盖试管。
- 5.13 培养皿：直径 90 mm~100 mm，灭菌后使用。
- 5.14 纱布或脱脂棉。
- 5.15 1 000 mL 容量瓶。
- 5.16 制备培养基用的加塞锥形瓶或三角瓶。

### 6 仪器灭菌和菌种保藏

#### 6.1 干热灭菌

将物品放入干热灭菌器，灭菌温度和时间如下：

温度	最短灭菌时间
180 °C	30 min
170 °C	60 min
160 °C	120 min

## 6.2 高压蒸汽灭菌

将物品放入高压蒸汽灭菌锅,于 $(121\pm 2)^\circ\text{C}$ 灭菌 15 min 或以上。

## 6.3 玻璃器皿的准备

以碱性或中性清洁剂清洗,然后用蒸馏水或去离子水冲洗干净。使用前用干热灭菌箱或高压蒸汽灭菌锅灭菌。

## 6.4 菌种的保藏

菌种接种于适当的培养基上,存放在 $5^\circ\text{C}\sim 10^\circ\text{C}$ 条件下,每月转种一次。不得使用转种超过 5 次或转种间隔超过 1 个月的菌种,应从相关菌种保藏机构获取新的菌种进行试验。

# 7 检测步骤

## 7.1 细菌预培养

用无菌接种环将细菌从保藏菌种的培养基上转移到斜面培养基(见 4.2.3.5)上并在 $(35\pm 1)^\circ\text{C}$ 培养 16 h~24 h。再用无菌接种环将此细菌转移至新鲜的斜面培养基上,在 $(35\pm 1)^\circ\text{C}$ 培养 16 h~20 h。

## 7.2 试样的制备

每种经过抗菌处理的材料至少准备 3 片试样,未经抗菌处理的材料至少准备 6 片试样。3 片未经抗菌处理试样用于接种后立即测量活的细菌数,另 3 片用于测量接种后 24 h 的活细菌数。

注:使用 3 个以上的经过抗菌处理的试样有助于减少误差,尤其对于抗菌效果较差的材料是这样。

在对同一材料进行一系列不同抗菌处理时,若所有抗菌试样都同时采用相同菌液进行检测,则每种抗菌处理只需一组未经抗菌处理的试样作为对照。

制备抗菌处理和未经抗菌处理的试样,试样尺寸为 $(50\pm 2)\text{mm}\times(50\pm 2)\text{mm}$ ,试样厚度不超过 10 mm。如果不能切割成这样大小的样片,只要样品能够被面积为 $400\text{mm}^2\sim 1\,600\text{mm}^2$ 薄膜覆盖即可。优先考虑从制品上制备试样。如果不能从制品上制备上述大小的试样,则利用相同原料和工艺单独制备试样。如果试样尺寸不同于 $50\text{mm}\times 50\text{mm}$ ,则应在试验报告中写明实际的试样尺寸。

在制样时,注意避免试样被微生物或有机物污染。同时,试样不能互相接触。如果使用金属器具防止交叉污染,应保证该金属不含有抗菌效果。必要时,试样可以在测试前进行清洗、消毒或杀菌(如以 70%酒精擦洗)。

清洗试样可能导致表面软化、表面涂层溶解或者组分洗脱等,所以应避免清洗。如果因严重污染需要清洗,清洗方法应在试验报告中注明。

## 7.3 接种液的制备

使用无菌的接种环,转移一环预培养好的细菌(见 7.1)到少量的 1/500 NB(见 4.2.3.2)中。确保细菌分散均匀,并采用显微镜观测及计数板或利用其他合适的方法(如分光光度计法)测定细菌数量。用 1/500 NB 稀释菌悬液,使细菌的浓度在 $2.5\times 10^5\text{CFU/mL}\sim 10\times 10^5\text{CFU/mL}$ 之间,最佳浓度为 $6.0\times 10^5\text{CFU/mL}$ ,用作接种液。如果接种液不立即使用,将其放置于冰块上( $0^\circ\text{C}$ )并在 2 h 内使用。

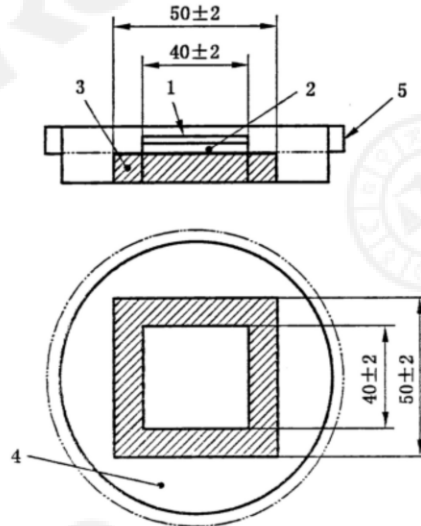
## 7.4 试样接种

制品的外表面作为测试表面,制品的横切面不需要测试。将试样(见 7.2)分别放入无菌的培养皿中,测试面朝上。用移液管吸取 0.4 mL 接种液(见 7.3),滴到每个试样表面。并将制备好的 $40\text{mm}\times$



40 mm 薄膜(见 5.11)盖于接种好的菌液上,并向下轻轻按压薄膜使菌液向四周扩散,确保菌液不要从薄膜边缘溢出。在试样接种完并盖上薄膜后,盖上培养皿盖(见图 1)。

单位为毫米



说明:

- 1——覆盖膜;
- 2——接种液(0.4 mL);
- 3——试样;
- 4——培养皿;
- 5——培养皿盖。

图 1 试样接种与覆盖膜放置

除特别说明外,覆盖膜的标准尺寸为 $(40\pm 2)\text{mm}\times(40\pm 2)\text{mm}$ ,而试样尺寸为 $50\text{mm}\times 50\text{mm}$ 。如果试样不是标准尺寸,则根据试样的大小按比例减小覆盖膜的尺寸,但覆盖膜尺寸不应小于 $400\text{mm}^2$ ,并且覆盖膜边缘距试样边缘 $2.5\text{mm}\sim 5.0\text{mm}$ 之间。如果覆盖膜的尺寸不是 $40\text{mm}\times 40\text{mm}$ ,应在试验报告中说明其实际尺寸。所使用的接种液体积应按覆盖膜面积变化的比例相应调整并在试验报告中记录。

接种液不能从覆盖膜边缘溢出。有些表面(如亲水性非常强的表面)很难防止菌液溢出。可采用选项 1 防止溢出。如果采用选项 1 仍发生溢出,则选用选项 2。如果某选项能抑制溢出,应在试验报告中记录。

——选项 1:减少菌液体积以适应试样表面。但菌液体积不小于 $0.1\text{mL}$ 。当菌液体积减少时,应增加接种液细菌的浓度,以保证测试时与标准规定的细菌数相同。

——选项 2:通过增加惰性增稠剂以增加菌液的粘度,如琼脂或其他材料。

## 7.5 接种试样的培养

除特别说明外,含有接种试样(包括 3 片未经抗菌处理制品的接种试样)的培养皿,在 $(35\pm 1)^\circ\text{C}$ 、相对湿度不小于 $90\%$ 的条件下培养 $(24\pm 1)\text{h}$ 。根据在培养温度下检测所得到的抗菌性能值来确定制品的抗菌效果。在相关方同意的条件下,也可采用其他培养温度。如使用的不是 $(35\pm 1)^\circ\text{C}$ ,应在试验报告中记录。

注:若培养温度低于 $35^\circ\text{C}$ ,活菌总数将会减少。这将使所测得的抗菌性能值与 $35^\circ\text{C}$ 下所测得的结果不同。

## 7.6 试样上的细菌回收

### 7.6.1 试样接种后即时测试

接种后,立即对已接种的3片未做抗菌处理试样进行菌种回收,在各培养皿中加入10 mL SCDLP培养液(见4.2.3.6)或其他适宜而有效的中和剂。以此种方法得到试样上细菌的回收率。应对试样进行充分冲洗,即用移液管吸取和释放SCDLP培养液,冲洗试样4次以上。

需特别注意的是,需要达到足够的菌液回收量。尤其是如试验中采用了7.4中的选项2,导致菌液的粘度增大。在此种情况下就需要采用机械搅拌,如均质、旋动和超声波振动等。若采用这些方法后回收率能达到或超过冲洗法,则可以采用。若变更回收方法,则应在报告中说明。由于试样的尺寸和性质的关系,采用10 mL中和剂回收细菌有困难,则可增加中和剂溶液用量。若中和剂的体积不等于10 mL,则在报告中注明,并在计算抗菌效果时予以考虑。

其他冲洗方法将影响所测得的抗菌性能结果,因而应充分证实其有效性才可使用。

### 7.6.2 试样接种培养后的测试

根据7.5的程序培养后,按照7.6.1处理试样,然后立即对试样上的活菌进行计数(见7.7)。

## 7.7 平板培养法测定活菌数

用磷酸盐生理盐水缓冲液(见4.2.3.8)对SCDLP回收液进行10倍梯度稀释,以计算活菌。将试样上的回收液及其10倍稀释液各取1 mL,分别放入无菌培养皿中,每个稀释度做2个培养皿。每个培养皿中注入15 mL平板计数琼脂(见4.2.3.4),轻轻搅拌以分散细菌。倒置培养皿,并于 $(35 \pm 1)^\circ\text{C}$ 培养40 h~48 h。

培养后,对培养皿中菌落数在30~300之间的菌落进行计数。记下每个稀释度培养皿上的菌落数并保留2位有效数字,记录稀释倍数。若1 mL洗脱液中的菌落数小于30,则对该培养皿直接计数。如所有培养皿中均没有菌落,则记录为<1。

## 8 试验结果

### 8.1 活菌数测定

对于每个试样,都按照式(1)来计算活菌数。

$$N = (100 \times C \times D \times V) / A \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

$N$  —— 每个试样每平方厘米的活菌数;

$C$  —— 两个培养皿的平均菌落数;

$D$  —— 稀释倍数;

$V$  —— 用于洗脱的SCDLP培养液的体积,单位为毫升(mL);

$A$  —— 覆盖膜的表面积,单位为平方毫米( $\text{mm}^2$ )。

计算每组试样回收活菌数的几何平均数并记录菌数时取2位有效数字,若某一稀释倍数的所有琼脂平板上都没有菌落,则将活菌计作< $V$ (用于洗脱的SCDLP培养液的体积 mL)。计算平均数时,如各稀释度均没有菌数,则记录为 $V$ 。

例如: $V=10$  mL,计算所得平均菌数为10。

### 8.2 试验有效的条件

8.2.1 当8.2.2、8.2.3、8.2.4中给定的3个条件均得到满足时,试验才被认定为有效。反之,则试验无

效,应重新进行试验。

8.2.2 未经抗菌处理试样接种后即时测得的细菌数的对数值应满足式(2)的要求:

$$(L_{\max} - L_{\min}) / (L_{\text{mean}}) \leq 0.2 \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中:

$L_{\max}$  —— 试样上最大活菌数的对数值;

$L_{\min}$  —— 试样上最小活菌数的对数值;

$L_{\text{mean}}$  —— 试样上几何平均活菌数的对数值。

8.2.3 未经抗菌处理的试样接种后即时测得的平均活菌数应在  $6.2 \times 10^3$  CFU/cm<sup>2</sup> ~  $2.5 \times 10^4$  CFU/cm<sup>2</sup> 范围内。

8.2.4 每个未经抗菌处理试样接种后培养 24 h 的活菌数不应小于 62 CFU/cm<sup>2</sup>。

注:若 7.5 中接种温度低于 35 °C,那么未经抗菌处理试样测得的活菌数可能达不到这个标准。

### 8.3 抗菌性能的计算

在试验被认为有效的情况下,用式(3)计算抗菌性能值,结果保留到小数点后 1 位。

$$R = (U_t - U_0) - (A_t - U_0) = U_t - A_t \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中:

$R$  —— 抗菌性能值;

$U_0$  —— 未经抗菌处理试样接种后即时菌数的对数平均值,单位为细菌数每平方厘米(CFU/cm<sup>2</sup>);

$U_t$  —— 未经抗菌处理试样接种后 24 h 的菌数的对数平均值,单位为细菌数每平方厘米(CFU/cm<sup>2</sup>);

$A_t$  —— 经抗菌处理试样接种后 24 h 的菌数的对数平均值,单位为细菌数每平方厘米(CFU/cm<sup>2</sup>)。

### 8.4 抗菌剂的效果

抗菌性能值可以用于描述抗菌效果。

## 9 重复性与再现性

重复性和再现性在附录 B 中进行了定量讨论。

## 10 试验报告

试验报告应包括以下信息:

- a) 注明采用本标准;
- b) 经抗菌处理和未经抗菌处理试样所用的塑料材质、尺寸、形状和厚度;
- c) 覆盖膜的聚合物类型、尺寸、形状和厚度;
- d) 试验用菌种和菌株号,如采用其他菌种需说明原因;
- e) 接种菌液的体积;
- f) 接种菌液中的活菌数;
- g) 8.3 中  $U_0$ 、 $U_t$  和  $A_t$  值;
- h) 抗菌性能值;
- i) 若采用了不同于本标准的一些操作,如试样清洗方法的变更、惰性增稠剂的使用、所用中和剂的种类和体积有变化、菌液回收方法变更及培养温度不同时,均应详细说明;
- j) 实验室的名称等识别资料及实验室负责人的姓名和签字;
- k) 试验开始日期;
- l) 试验报告日期。

**附录 A**  
**(规范性附录)**  
**生物材料的质量要求**

**A.1 总则**

根据来源的不同,用于接种液制备的材料的质量会有所差异,从而对结果产生重大影响,因而其组成需要加以专门规范。

**A.2 1/500 营养肉汤(1/500 NB)的化学成分**

牛肉膏和蛋白胨是控制 1/500 营养肉汤质量差异的关键成分。以下是本标准对商品化材料中总氮和  $\alpha$ -氨基氮化物要求,蛋白胨要求是酪蛋白的酶消解产物。

**牛肉膏**

总氮 6.0%~15.0%;

$\alpha$ -氨基氮 2.0%~5.0%。

**蛋白胨(酪蛋白的酶消解产物)**

总氮 12.0%~16.0%;

$\alpha$ -氨基氮 3.0%~6.0%。

**附录 B**  
(资料性附录)  
**重复性和再现性**

**B.1 背景**

本附录内容是基于大量研究结果所获得的本试验的重复性和再现性。该研究于 2000 年至 2004 年由日本国家技术与评价研究所完成,其目的一方面是采纳 ISO/IEC 17025:2000 作为实验室认可体系的一部分,另一方面是测定 JIS Z 2801:2000 的不确定度,该方法是本试验标准制定的依据。

**B.2 概述**

本方法的重复性和再现性是根据 ISO 5725-2 的统计分析得到的。对两种经处理过的测试样品在 5 个实验室进行,从而得出抗菌性能的试验结果。在剔除一个实验室的数据后,根据其他实验室的数据分析,得到以下结果:

同一实验室相同测试项目的重复性为 0.087;

不同实验室相同测试项目的再现性为 0.304。

这些数据是用本方法获得的重复性和再现性的实例,但不能用于判定不同实验室的测试结果。

**B.3 试验**

实验室间测试所用的材料和应用的试验条件如表 B.1。

**表 B.1 材料与试验条件**

经抗菌处理的试样	PET 膜,40 mm×40 mm,厚度 0.055 mm I 类试样:丙烯酸树脂涂层,混合 350 μg/g 银化合物 II 类试样:丙烯酸树脂涂层,混合 450 μg/g 银化合物
未经抗菌处理对照试样	PET 膜同上,但涂层中不加银化合物
覆盖膜	PE 膜,50 mm 方块 0.09 mm 厚
菌种	金黄葡萄球菌 CGMCC 1.291 0 (见注 3)
接种菌液体积	0.4 mL

参加实验室间测试的 5 个实验室都对两种样品进行了重复性测试。用于各个阶段的样品数均遵照本标准要求。样品、菌种和培养基等,都在测试前提供给各个实验室。

注 1: 样品包含涂了水溶性丙烯酸树脂涂层的 PET 薄膜。在涂涂料前混入一定量的银系抗菌剂,以确保试验样品上的抗菌剂均匀分布。

注 2: 由于丙烯酸树脂涂层是水溶性的,接种菌液容易扩散到涂层以外的区域。样品/涂层的结构与本标准的样品有所不同,所以,应先在薄膜上接种,然后将样品覆盖在其上。

注 3: 仅用金黄色葡萄球菌是因为它比大肠杆菌表现更大的变异性。

#### B.4 结果与讨论

经初步分析,采用裂区分析计算得到一个实验室的  $Z$  值大于 2.0,因此,该实验室的数据结果被弃用,数据分析仅采用剩余 4 个实验室的测试结果。表 B.2 列出了抗菌性能的平均值和每种抗菌处理试样的标准差。重复性试验显示为下表第一组和第二组。

表 B.2 平均抗菌性能和标准差

样品种类 (见表 B.1)	平均抗菌性能(括号内为标准差)	
	第一组	第二组
I 类试样	1.72(0.42)	1.78(0.26)
II 类试样	2.29(0.45)	2.42(0.41)

每个实验室对两种类型样品均做了 2 次重复实验。每种类型样品采用 3 个相同的试样。考虑分析结果的变异性来源包括重复试验变异性  $V_R$ (即结果或来自第一组或来自第二组),实验室间变异性  $V_L$  和 3 种被测试样之间的变异性  $V_S$ 。因为  $V_R$  和  $V_L$  不是随机的,每组都要单独分析。

表 B.3 列出了方差分析结果和不确定度。

表 B.3 方差分析表与不确定度

变异性来源	平方和	自由度	平方平均值	F-比率	$F(p=0.05)$	$F(p=0.01)$	F(测试)
重复, $V_R$	0.120 0	1	0.120 0	0.40	10.13	34.12	
实验室, $V_L$	4.656 9	3	1.552 3	5.18	9.28	29.46	
$V_R \times V_L$ (一阶误差 $e_1$ )	0.899 1	3	0.229 7	13.84	2.90	4.46	*
试样, $V_S$	4.440 8	1	4.440 8	205.12	4.15	7.50	*
$V_L \times V_S$	0.388 7	3	0.129 6	5.98	2.90	4.46	*
$V_R \times V_S$	0.013 3	1	0.013 3	0.62	4.15	7.50	
$V_R \times V_L \times V_S$	0.116 0	3	0.038 7	1.79	2.90	4.46	
二阶误差 $e_2$	0.692 8	32	0.021 7				
总计	11.327 7	47					

\* 1%显著差异水平。

如表 B.3 所示,主要区组误差  $V_R V_L$ (一阶误差  $e_1$ ) 比二阶误差  $e_2$  在 1%水平时差异性更显著。另一方面,与  $e_2$  相比,  $V_R \times V_S$  和  $V_R \times V_L \times V_S$  没有统计学意义。所以这两个量的影响就被合并于二阶误差  $e_2$  中,表 B.4 列出了合并非显著性差异后的方差分析结果。

表 B.4 方差分析表和不确定度(合并了非显著性差异)

变异性来源	平方和	自由度	平方平均值	F-比率	$F(p=0.05)$	$F(p=0.01)$	F(测试)
重复, $V_R$	0.120 0	1	0.120 0	0.40	10.13	34.12	
实验室, $V_L$	4.656 9	3	1.552 3	5.18	9.28	29.46	
$V_R \times V_L$ (一阶误差 $e_1$ )	0.899 1	3	0.229 7	13.84	2.90	4.46	*

表 B.4 (续)

变异性来源	平方和	自由度	平方平均值	F-比率	$F(p=0.05)$	$F(p=0.01)$	F(测试)
试样, $V_s$	4.440 8	1	4.440 8	194.46	4.11	7.50	*
$V_L \times V_s$	0.388 7	3	0.129 6	5.67	2.87	4.46	*
二阶误差 $e'_2$	0.822 1	36	0.022 8				
总计	11.327 7	47					

\* 1%显著差异水平。

上述结果证明,  $V_R$  来源于重复性试验的差异;  $V_L$  来源于实验室之间的差异, 相互独立并无统计意义。

本实验结果可得出下列结论:

——重复性: 在 3 个重复性测试中, 可重复性条件下的标准不确定度可由上述数据计算如下:

$$\sigma(e_2) = [V(e'_2)/3]^{1/2} = (0.022\ 8/3)^{1/2} = 0.087$$

——再现性: 在再现性条件下的标准不确定度可由上述数据计算如下:

$$\sigma(e_1) = \{[V(e_1) - V(e'_2)]/3\}^{1/2} = [(0.229\ 7 - 0.022\ 8)/3]^{1/2} = 0.304$$

## 参 考 文 献

- [1] JIS Z 2801:2000, Antimicrobial products—Test for antimicrobial activity and efficacy.
- [2] Suzuki, S., IMAI, S., and KoURAI, H. Background and evidence leading to the establishment of the JIS standard for antimicrobial products, *Biocontrol Science*, 19(2006), pp. 135-145.
- [3] Establishment of traceability and estimation of uncertainty in evaluation methods using bacteria, International Accreditation Japan/National Institute of Technology and Evaluation (IA Japan/NITE) report, March 2004.
- [4] ASTM E 1054, Standard test methods for evaluation of inactivators of antimicrobial agents.
- [5] EN 1040, Chemical disinfectants and antiseptics—Quantitative suspension test for the evaluation of basic bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics—Test method and requirements (phase 1).
- [6] ISO 846:1997, Plastics—Evaluation of the action of microorganisms.
- [7] ISO 4833, Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for the enumeration of microorganisms—Colony-count technique at 30 °C.
- [8] ISO 5725-2, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results—Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method.
- [9] ISO 6887-1, Microbiology of food and animal feeding stuffs—preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination—Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.
- [10] ISO 14851, Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials in an aqueous medium—Method by measuring the oxygen demand in a closed respirometer.
- [11] ISO 14852, Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials in an aqueous medium—Method by analysis of evolved carbon dioxide.
- [12] ISO 14855 (both parts), Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials under controlled composting conditions—Method by analysis of evolved carbon dioxide.
- [13] ISO/IEC 17025:2000, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
-