

# 团 体 标 准

T/WSJD 002-2019

---

## 医用清洗剂卫生要求

Hygienic requirements for medical detergents

2019 - 8- 22 发布

2019 - 10-1 实施

中国卫生监督协会 发布

## 前 言

本标准由中国卫生监督协会团体标准委员会提出并归口。

本标准由中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所、北京协和医院、北京北亚骨科医院、湖北省疾病预防控制中心、北京大学深圳医院、楷腾医疗设备（中国）有限公司、3M 中国有限公司、杭州鲁沃夫货物进出口有限公司、北京创新世纪生化科技发展有限公司、上海九誉生物科技有限公司、北京佳士力科技有限公司、山东消博士消毒科技股份有限公司和南京万福金安生物医药科技有限公司起草。

本标准主要起草人：张流波、李涛、朱亭亭、邱侠、张青、李爱琼、黄小波、王继梅、陶威、刘芝兰、史绍毅、王志、任银萍、周祺、王金强、蒋士龙。

# 医用清洗剂卫生要求

## 1 范围

本标准规定了医用清洗剂原料要求、基本要求、技术要求、检验方法、运输、贮存和包装、标识要求及注意事项。

本标准适用于医用清洗剂的生产与应用。

## 2 规范性引用文件

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

GB/T 65 开槽圆柱头螺钉

GB/T 601 化学试剂 标准滴定溶液的制备

GB/T 603 化学试剂 试验方法中所用制剂及制品的制备

GB/T 679 化学试剂 乙醇(95%)

GB/T 700 碳素结构钢

GB/T 1173 铸造铝合金

GB/T 1220 不锈钢棒

GB/T 2059 铜及铜合金带材

GB/T 2481.1 固结磨具用磨料 粒度组成的检测和标记

GB/T 5750.4 生活饮用水标准检验方法 感官性状和物理指标

GB/T 9721 化学试剂 分子吸收分光光度法通则(紫外和可见光部分)

GB 9985 手洗餐具用洗涤剂

GB/T 15818 表面活性剂生物降解度试验方法

JB/T 7901 金属材料实验室 均匀腐蚀全浸试验方法

ISO 15883 清洗消毒器

《消毒技术规范》(2002年版) 卫生部

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**医用清洗剂** **medical detergent**

用于增强水对医疗器械、器具及其他相关物品上污物清洗效果的制剂。

### 3.2

**酸性医用清洗剂** **acid medical detergent**

pH 值 $\leq$ 6.5 的医用清洗剂。

### 3.3

**中性医用清洗剂 neutral medical detergent**

pH 值在 6.5~7.5 之间的医用清洗剂。

### 3.4

**碱性医用清洗剂 alkaline medical detergent**

pH 值 $\geq$ 7.5 的医用清洗剂。

### 3.5

**含酶医用清洗剂 enzyme-containing medical detergent**

加入了酶制剂如蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶等，能分解相应有机污染物的医用清洗剂。

### 3.6

**特殊用途的医用清洗剂 detergent for special use**

具有专门用途，如抗抑菌、去除生物膜、除垢除锈等作用的医用清洗剂。

## 4 原料要求

4.1 表面活性剂：应为无毒或低毒级物质。

4.2 酶：其质量应符合企业标准要求。

4.3 抗菌剂：不得使用抗菌药物及其同名原料，不得使用各种醛类化合物。

4.4 水：在 25℃条件下，电导率 $\leq$ 15 $\mu$  S/cm。

## 5 基本要求

5.1 医用清洗剂应使用安全，可有效去除相应的污染物。

5.2 医用清洗剂应符合下列要求：

- a) 与人体组织有良好的相容性，对人体无毒、无刺激；
- b) 与医疗器械及其材料有较好的材料相容性，不与医疗器械发生反应或产生有毒、有害的产物；
- c) 应没有或仅有轻微的金属腐蚀性，不影响医疗器械的机械性能，不影响消毒灭菌因子的穿透；
- d) 医用清洗剂及其降解产物应不会造成环境污染。

## 6 技术要求

### 6.1 感官

液体产品应清澈透明，不分层，无悬浮物或沉淀，无异味，颜色宜为浅色；固体产品应外形规则，色泽均匀，无明显杂质和污迹。

## 6.2 杂质限量

荧光增白剂、甲醇、甲醛、砷（1%溶液中以砷计）、重金属（1%溶液中以铅计）的限量要求按GB 9985。

## 6.3 金属腐蚀性

中性医用清洗剂对金属基本无腐蚀；酸性和碱性医用清洗剂宜对金属基本无腐蚀或仅有轻度腐蚀；医用清洗剂对器械的腐蚀程度不宜强于水洗。

## 6.4 硬度

医用清洗剂宜能减少或络合水中的金属离子（如 $\text{Ca}^{2+}$ 和 $\text{Mg}^{2+}$ ），降低水的硬度，减少水垢沉积。

## 6.5 发泡

医用清洗剂宜为低泡型，易于漂洗干净。

## 6.6 稳定性

### 6.6.1 物理性状稳定性

在高温、低温试验条件下，产品的物理性状应保持原有状态不变。

### 6.6.2 有效成分含量稳定性

6.6.2.1 有效期应 $\geq 1$ 年。

6.6.2.2 在有效期内，有效成分含量下降率应 $\leq 10\%$ ；有效成分无法测定的，其清洗效果应达到要求。

6.6.2.3 含酶医用清洗剂，在有效期内，酶活力下降率应 $\leq 20\%$ 。

### 6.6.3 开封后有效期

产品应注明开封后有效期。在标识的开封后有效期内，有效成分含量下降率应 $\leq 10\%$ 或其清洗效果达到要求。

## 6.7 清洗效果要求

6.7.1 医用清洗剂应符合下列实验结果：

- a) 血液和细菌混合污染物试验：对细菌的去除率应 $\geq 99\%$ ，且ATP含量下降率应 $\geq 99\%$ 。
- b) 人工模拟污染物试验：清洗后，肉眼观察污染物应完全溶解脱落，外观表面清洁光亮、无残留物质，且污染物去除率 $\geq 95\%$ 。

6.7.2 标明对蛋白有特效的或标明含有蛋白酶的医用清洗剂，对蛋白的去除率应 $\geq 90\%$ ；标明对淀粉有特效的或标明含有淀粉酶的医用清洗剂，对淀粉的去除率应 $\geq 60\%$ ；标明对脂肪有特效的或标明含有脂肪酶的医用清洗剂，对脂肪的去除率应 $\geq 50\%$ 。

6.7.3 标明对生物膜有特效的医用清洗剂，模拟生物膜中的细菌减少值在90%以上，ATP含量减少值在90%以上。

6.7.4 有抗菌作用的医用清洗剂，应说明抗菌作用的原理。在说明书规定的浸泡时间内，医用清洗剂应用液对铜绿假单胞菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的杀灭率 $\geq 90\%$ 。

## 6.8 安全性

- 6.8.1 医用清洗剂应达到实际无毒级。
- 6.8.2 医用清洗剂应为对皮肤无刺激或轻度刺激，不引起皮肤变态反应。
- 6.8.3 医用清洗剂表面活性剂生物降解度应 $\geq 90\%$ 。

## 6.9 微生物指标

细菌菌落总数限值为100CFU/mL，不得含有致病菌。

## 7 检验方法

7.1 感官：目测法和鼻嗅法。

7.2 杂质限量：方法按 GB 9985。

7.3 金属腐蚀性：方法见附录 A。

7.4 硬度：方法按 GB/T 5750.4。

### 7.5 稳定性

#### 7.5.1 物理性状稳定性

a) 低温试验：于 $-10^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 冰箱中放置24h，取出恢复至室温进行观察，观察无结晶、无沉淀，为低温试验合格；

b) 高温试验：于 $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 温箱中放置24h，取出立即观察，观察不分层、不混浊，且不改变气味，为高温试验合格。

#### 7.5.2 有效成分含量稳定性

可采用自然存放试验或加速试验测定有效成分含量稳定性：

a) 自然存放试验：按说明书标识的贮存方法将样品存放至有效期，比较贮存前后有效成分含量的变化；

b) 加速试验：将样品在 $37^{\circ}\text{C}$ 条件下贮存90d，比较贮存前后有效成分含量的变化，下降率 $\leq 10\%$ 可判定为有效期2年。

7.5.3 酶活力测试：方法见附录 B。

### 7.6 清洗效果要求

7.6.1 血液和细菌混合的去除效果试验：方法见附录 C。

7.6.2 人工模拟污染物的去除效果试验：方法见附录 D。

7.6.3 对脂肪、蛋白质和淀粉的去除效果试验：方法见附录 E。

7.6.4 生物膜去除效果试验：方法见附录 F。

7.6.5 细菌杀灭率测试：方法按《消毒技术规范》（2002 版）。

7.7 表面活性剂生物降解度测试方法：方法按 GB/T 15818。

7.8 急性经口毒性试验、皮肤刺激试验、皮肤变态反应试验：方法按《消毒技术规范》（2002版）。

7.9 菌落总数计数：方法按《消毒技术规范》（2002版）。

## 8 运输、贮存和包装

### 8.1 运输

产品运输时应轻装轻卸，不得倒置，防压、防撞、防挤、防止暴晒、雨淋，车辆应保持干燥。

### 8.2 贮存

8.2.1 产品应室内保存，并满足产品标识的贮存条件。

8.2.2 堆放要采取必要的防护措施，堆放高度要适当，避免包装损坏。

8.2.3 在本标准规定的运输和储存条件下，在包装完整未经启封时，产品的保质期按销售包装标识执行。

### 8.3 包装

#### 8.3.1 最小销售包装的要求

医用清洗剂的直接接触容器材料应无毒，不得含有或释放可能对使用者造成伤害的有毒物质。瓶盖应拧紧，封口应牢固，不得有漏液沾污包装的外表面。用其他包装的产品，应符合产品本身要求，以保证产品质量和使用性能为原则。

#### 8.3.2 运输包装的要求

产品运输包装材料以不损害最小销售包装为原则。最小销售包装在运输包装箱中排列整齐，封口应严实可靠，不得有缺数现象，封箱应严实可靠。每一运输包装内或产品包装容器上应附有产品质量检验合格证明。生产企业应提供每批次产品的质量检验报告。

## 9 标识要求

### 9.1 产品说明书

产品使用包装应符合国家有关规定，说明书中不得夸大宣传，相关功效应有实验依据，说明书一般应标注以下内容：

- a) 产品名称及商标名称或图案；
- b) 产品的生产日期和保质期或生产批号和期限使用日期；
- c) 产品的主要有效成分、性能、应用范围、使用方法、注意事项等；
- d) 产品贮藏及运输条件；
- e) 生产企业名称、地址、联系方式、售后服务地址及邮政编码。

### 9.2 标志

产品运输包装应有下列标志：

- a) 产品名称、商标、类型；
- b) 质量规格及装箱总数；
- c) 货箱毛重、箱体尺寸；

- d) 产品装箱日期;
- e) 防水防潮、小心轻放和防止倒置等必要的安全储运图案或标记;
- f) 生产企业名称、地址、电话和邮政编码。

## 10 注意事项

- 10.1 医用清洗剂不得口服，置于儿童不易触及处。
- 10.2 过敏者慎用。
- 10.3 医用清洗剂稀释后的应用液应一次性使用。
- 10.4 如有拮抗物质，说明书应列出，避免合用。
- 10.5 置于避光、阴凉、干燥处保存。
- 10.6 开瓶后应拧紧瓶盖，在规定有效期内使用。



**附 录 A**  
**(规范性附录)**  
**医用清洗剂对金属腐蚀性的测定**

### A.1 目的

测定医用清洗剂对各种金属的腐蚀程度。

### A.2 试验器材

A.2.1 金属片：圆形，直径24.0mm，厚1.0mm，穿一直径为2.0mm 小孔，表面积总值约为 9.8cm<sup>2</sup>（包括上、下、周边表面与小孔侧面）。光洁度为6。原料如下：

a) 碳钢（规格见 GB/T 700）；

注：碳钢易氧化生锈，应保存于油中。

b) 铜（规格见 GB/T 2059）；

c) 铝（规格见 GB/T 1173）；

d) 不锈钢（规格见 GB/T 1220）。

A.2.2 浸泡容器（玻璃制，带盖，容积为800mL~1000mL）。

A.2.3 砂纸（120号粒度水砂纸，GB/T 2481.1）。

A.2.4 称量杯。

A.2.5 天平（感量0.1mg）。

### A.3 试验步骤

A.3.1 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片两面和周边表面的氧化层，再用自来水冲净。测量片的直径、厚度、孔径（精确至0.1mm）。用无水丙酮或无水乙醇再次脱脂。置 50℃ 恒温培养箱中干燥1h，待其温度降至室温后称重（每金属片待天平回零后称重三次，精确至0.1mg，取其平均值作为试验前重量。称重时，应戴洁净手套，勿以手直接接触样片。

A.3.2 按医用清洗剂最高使用浓度配制试验用医用清洗剂，用以浸泡试验样片。浸泡时，每一金属片需浸泡在200mL医用清洗剂中。

A.3.3 金属样片用塑料线系以标签，编号和注明日期，悬挂于医用清洗剂中。一次性浸泡72h。易挥发性或有效成分不稳定的医用清洗剂，根据情况，酌情定时更换医用清洗剂，直至浸泡72h。

A.3.4 每种金属每次试验放置三片样片。浸泡时，若同种金属每一样片相隔1cm以上，可在同一容器内（含600mL消毒液）进行。

A.3.5 浸泡到规定时间后，取出金属片，先用自来水冲洗，再用毛刷或其他软性器具去除腐蚀产物。如仍有清除不掉的腐蚀产物，可按JB/T 7901所介绍的下列方法清除：

a) 铜片：在室温下浸泡于盐酸溶液（500mL 36%~38%盐酸加蒸馏水至1000mL，盐酸比重为1.19）中 1min~3min；

b) 碳钢片：置含锌粉200g/L的氢氧化钠溶液中，煮沸5min~30min；

c) 铝片：浸泡于三氧化铬磷酸溶液（三氧化铬20g，磷酸500mL，加蒸馏水至1000mL。磷酸比重为1.69）中，升温至80℃，持续5min~10min。如还未清除干净，可在室温浸于硝酸（比重1.42）溶液中 1min；

d) 不锈钢：浸泡于60℃硝酸溶液（66%~68%硝酸100mL加蒸馏水至1000mL）20min。或浸于70℃柠檬酸铵溶液（柠檬酸铵150g 加蒸馏水至1000mL）中10min~60min。

A.3.6 金属样片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℃ 恒温培养箱，干燥1h，用镊子夹取，待其温度降至室温后分别在天平上称重。天平回零后称三次，以其平均值作为试验后重量。称重时，与试验前相同，应戴洁净手套，勿以手直接接触样片。

A.3.7 样片在用化学法去除腐蚀物时，需设相应空白对照以校正误差。空白对照样片与实验组样片同样进行表面处理、洗净和称重，但不经医用清洗剂浸泡。同实验组样片用相同方法进行化学处理、水冲洗、干燥、称重，并计算其平均失重值。

A.3.8 试验的全过程应设铜片、碳钢片、铝片和不锈钢片浸泡蒸馏水的对照，不锈钢片浸泡前后的重量差应<0.3mg。否则，在找出原因后，全部试验重做。

A.3.9 试验结果，观察与纪录金属片颜色变化，并以金属腐蚀速率（R）平均值表达，在计算时应减去空白对照组样片的失重值。计算见式（A.1）：

$$R = \frac{8760 \times 10^4 \times (m - m_t - m_k)}{S \times t \times d} \dots\dots\dots (A.1)$$

式中：

8760——一年中的小时数（h）；

10000——单位换算值；

R——腐蚀速率，单位为毫米每年（mm/a）；

m——试验前金属片重量，单位为克（g）；

$m_t$ ——试验后金属片重量，单位为克（g）；

$m_k$ ——化学处理去除腐蚀产物样片失重值，单位为克（g），若试验中未进行化学清除处理者，计算时在公式中删去 $m_k$ 值；

S——金属片的表面积总值，单位为平方厘米（cm<sup>2</sup>）；

t——试验时间，单位为小时（h）；

d——金属材料密度，单位为千克每立方米（kg/m<sup>3</sup>）。

#### A.4 结果判定

腐蚀性分级标准见表A.1。

表A.1 腐蚀性分级标准

腐蚀速率 R mm/a	级 别
<0.0100	基本无腐蚀
0.0100~<0.100	轻度腐蚀
0.100~<1.00	中度腐蚀
≥1.00	重度腐蚀

#### A.5 注意事项

- A. 5.1 每张砂纸只能磨一种金属材料。一个容器盛的医用清洗剂只能浸泡同一种金属。
- A. 5.2 称重关系到结果的准确性，应认真进行，接触样片的器具不得带有油垢。
- A. 5.3 所用金属片大小、厚薄应严格一致，表面需磨光。
- A. 5.4 试验期间，需换医用清洗剂溶液时，操作应迅速，勿使样片暴露空气中过久。
- A. 5.5 金属样片仅可使用一次，否则影响试验的准确性。
- A. 5.6 试验在 20℃~25℃条件下进行。
- A. 5.7 在报告其结果时，应对试验后金属样片的外观变化等现象进行描述。

## BB

附 录 B  
(规范性附录)  
酶活力的试验方法

B.1  $\alpha$ -淀粉酶

## B.1.1 定义

1mL液体酶,于60℃、pH=6.0 条件,1h液化1g可溶性淀粉,即为1个酶活力单位,以U/g(U/mL)表示。

## B.1.2 原理

$\alpha$ -淀粉酶能将淀粉分子链中的 $\alpha$ -1,4葡萄糖苷键随机切断成长短不一的短链糊精、少量麦芽糖和葡萄糖,而使淀粉对碘呈蓝紫色的特异性反应逐渐消失,呈红棕色,其颜色消失的速度与酶活性有关、可通过固定反应后的吸光度计算其酶活力。

## B.1.3 试验器材

B.1.3.1 原碘液:称取碘(I<sub>2</sub>)11g、碘化钾(KI)22g,用少量蒸馏水使碘完全溶解,然后定容至500mL,贮存于棕色瓶中。

B.1.3.2 稀碘液:吸取原碘液(B.1.3.1)2.00mL,加碘化钾20g用蒸馏水溶解并定容至500mL,贮于棕色瓶中。

B.1.3.3 20g/L可溶性淀粉溶液:称取可溶性淀粉2.000g,精确至0.001g,用蒸馏水调成浆状物,在搅动下缓缓倾入70mL沸水中,然后以30mL蒸馏水分几次冲洗装淀粉的烧杯,洗液并入其中,加热至完全透明,冷却,定容至100mL。此溶液需要当天配制。

B.1.3.4 磷酸缓冲液(pH=6.0):称取磷酸氢二钠(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O)45.23g、柠檬酸(C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>·H<sub>2</sub>O)8.07g,用水溶解并定容至1000mL。配好后用pH计校正。

B.1.3.5 分光光度计:应符合GB/T 9721的有关规定。

B.1.3.6 恒温水浴:60℃±0.2℃。

B.1.3.7 秒表。

B.1.3.8 试管:25mm×200mm。

## B.1.4 试验步骤

## B.1.4.1 待测酶液的制备

吸取液体酶1.00mL,用磷酸缓冲液定容至刻度(将估计酶活力除以4,即酶活力应在3.7U/mL~5.6U/mL范围内),摇匀。通过四层纱布过滤,滤液供测定用。

## B.1.4.2 测定

B.1.4.2.1 吸取可溶性淀粉溶液(B.1.3.3)20.0mL于试管中,加入缓冲液5.00mL,摇匀后,于60℃±0.2℃恒温水浴中预热5min。

B.1.4.2.2 加入稀释好的待测酶液1.00mL,立刻计时,摇匀,准确反应5min。

B. 1. 4. 2. 3 立即吸取反应液(B. 1. 4. 2. 2) 1. 00mL于5. 00mL稀碘液(B. 1. 3. 2)中, 摇匀, 并以稀碘液作空白, 于660nm波长下, 用10mm比色皿, 迅速测定其吸光度(A)。根据其吸光度查表B. 1, 求得测试酶液的浓度(c)。

表B. 1 吸光度与测试 $\alpha$ -淀粉酶浓度对照表

吸光度A	酶浓度c U/mL	吸光度A	酶浓度c U/mL	吸光度A	酶浓度c U/mL
0. 100	4. 694	0. 137	4. 507	0. 174	4. 329
0. 101	4. 689	0. 138	4. 502	0. 175	4. 324
0. 102	4. 684	0. 139	4. 497	0. 176	4. 319
0. 103	4. 679	0. 140	4. 492	0. 177	4. 315
0. 104	4. 674	0. 141	4. 487	0. 178	4. 310
0. 105	4. 669	0. 142	4. 482	0. 179	4. 306
0. 106	4. 664	0. 143	4. 477	0. 180	4. 301
0. 107	4. 659	0. 144	4. 472	0. 181	4. 297
0. 108	4. 654	0. 145	4. 467	0. 182	4. 292
0. 109	4. 649	0. 146	4. 462	0. 183	4. 288
0. 110	4. 644	0. 147	4. 457	0. 184	4. 283
0. 111	4. 639	0. 148	4. 452	0. 185	4. 279
0. 112	4. 634	0. 149	4. 447	0. 186	4. 275
0. 113	4. 629	0. 150	4. 442	0. 187	4. 270
0. 114	4. 624	0. 151	4. 438	0. 188	4. 266
0. 115	4. 619	0. 152	4. 433	0. 189	4. 261
0. 116	4. 614	0. 153	4. 428	0. 190	4. 257
0. 117	4. 609	0. 154	4. 423	0. 191	4. 253
0. 118	4. 604	0. 155	4. 418	0. 192	4. 248
0. 119	4. 599	0. 156	4. 413	0. 193	4. 244
0. 120	4. 594	0. 157	4. 408	0. 194	4. 240
0. 121	4. 589	0. 158	4. 404	0. 195	4. 235
0. 122	4. 584	0. 159	4. 399	0. 196	4. 231
0. 123	4. 579	0. 160	4. 394	0. 197	4. 227
0. 124	4. 574	0. 161	4. 389	0. 198	4. 222
0. 125	4. 569	0. 162	4. 385	0. 199	4. 218
0. 126	4. 564	0. 163	4. 380	0. 200	4. 214
0. 127	4. 559	0. 164	4. 375	0. 201	4. 210
0. 128	4. 554	0. 165	4. 370	0. 202	4. 205
0. 129	4. 549	0. 166	4. 366	0. 203	4. 201
0. 130	4. 544	0. 167	4. 361	0. 204	4. 197
0. 131	4. 539	0. 168	4. 356	0. 205	4. 193
0. 132	4. 534	0. 169	4. 352	0. 206	4. 189
0. 133	4. 529	0. 170	4. 347	0. 207	4. 185
0. 134	4. 524	0. 171	4. 342	0. 208	4. 181

表 B.1 (续)

吸光度 $A$	酶浓度 $c$ U/mL	吸光度 $A$	酶浓度 $c$ U/mL	吸光度 $A$	酶浓度 $c$ U/mL
0.135	4.518	0.172	4.338	0.209	4.176
0.136	4.513	0.173	4.333	0.210	4.172
0.211	4.168	0.250	4.019	0.289	3.903
0.212	4.164	0.251	4.016	0.290	3.900
0.213	4.160	0.252	4.012	0.291	3.897
0.214	4.156	0.253	4.009	0.292	3.894
0.215	4.152	0.254	4.005	0.293	3.891
0.216	4.148	0.255	4.002	0.294	3.888
0.217	4.144	0.256	3.998	0.295	3.885
0.218	4.140	0.257	3.995	0.296	3.881
0.219	4.136	0.258	3.991	0.297	3.878
0.220	4.132	0.259	3.988	0.298	3.875
0.221	4.128	0.260	3.984	0.299	3.872
0.222	4.124	0.261	3.981	0.300	3.869
0.223	4.120	0.262	3.978	0.301	3.866
0.224	4.116	0.263	3.974	0.302	3.863
0.225	4.112	0.264	3.971	0.303	3.860
0.226	4.108	0.265	3.968	0.304	3.857
0.227	4.105	0.266	3.964	0.305	3.854
0.228	4.101	0.267	3.961	0.306	3.851
0.229	4.097	0.268	3.958	0.307	3.848
0.230	4.093	0.269	3.954	0.308	3.845
0.231	4.089	0.270	3.951	0.309	3.842
0.232	4.085	0.271	3.948	0.310	3.839
0.233	4.082	0.272	3.944	0.311	3.836
0.234	4.078	0.273	3.941	0.312	3.833
0.235	4.074	0.274	3.938	0.313	3.830
0.236	4.070	0.275	3.935	0.314	3.827
0.237	4.067	0.276	3.932	0.315	3.824
0.238	4.063	0.277	3.928	0.316	3.821
0.239	4.059	0.278	3.925	0.317	3.818
0.240	4.056	0.279	3.922	0.318	3.815
0.241	4.052	0.280	3.919	0.319	3.812
0.242	4.048	0.281	3.916	0.320	3.809
0.243	4.045	0.282	3.913	0.321	3.806
0.244	4.041	0.283	3.922	0.322	3.803
0.245	4.037	0.284	3.919	0.323	3.800
0.246	4.034	0.285	3.915	0.324	3.797
0.247	4.030	0.286	3.912	0.325	3.794

表 B.1 (续)

吸光度 $A$	酶浓度 $c$ U/mL	吸光度 $A$	酶浓度 $c$ U/mL	吸光度 $A$	酶浓度 $c$ U/mL
0.248	4.026	0.287	3.909	0.326	3.791
0.249	4.023	0.288	3.906	0.327	3.788
0.328	3.785	0.367	3.673	0.406	3.567
0.329	3.782	0.368	3.670	0.407	3.564
0.330	3.779	0.369	3.668	0.408	3.559
0.331	3.776	0.370	3.665	0.409	3.556
0.332	3.774	0.371	3.662	0.410	3.554
0.333	3.771	0.372	3.659	0.411	3.551
0.334	3.768	0.373	3.656	0.412	3.548
0.335	3.765	0.374	3.654	0.413	3.546
0.336	3.762	0.375	3.651	0.414	3.543
0.337	3.759	0.376	3.648	0.415	3.541
0.338	3.756	0.377	3.645	0.416	3.538
0.339	3.753	0.378	3.643	0.417	3.535
0.340	3.750	0.379	3.640	0.418	3.533
0.341	3.747	0.380	3.637	0.419	3.530
0.342	3.744	0.381	3.634	0.420	3.528
0.343	3.741	0.382	3.632	0.421	3.525
0.344	3.739	0.383	3.629	0.422	3.522
0.345	3.736	0.384	3.626	0.423	3.520
0.346	3.733	0.385	3.623	0.424	3.517
0.347	3.730	0.386	3.621	0.425	3.515
0.348	3.727	0.387	3.618	0.426	3.512
0.349	3.724	0.388	3.615	0.427	3.509
0.350	3.721	0.389	3.612	0.428	3.507
0.351	3.718	0.390	3.610	0.429	3.504
0.352	3.716	0.391	3.607	0.430	3.502
0.353	3.713	0.392	3.604	0.431	3.499
0.354	3.710	0.393	3.602	0.432	3.497
0.355	3.707	0.394	3.599	0.433	3.494
0.356	3.704	0.395	3.596	0.434	3.492
0.357	3.701	0.396	3.594	0.435	3.489
0.358	3.699	0.397	3.591	0.436	3.487
0.359	3.696	0.398	3.588	0.437	3.484
0.360	3.693	0.399	3.585	0.438	3.482
0.361	3.690	0.400	3.583	0.439	3.479
0.362	3.687	0.401	3.580	0.440	3.477
0.363	3.684	0.402	3.577	0.441	3.474
0.364	3.682	0.403	3.575	0.442	3.472

表 B.1 (续)

吸光度 $A$	酶浓度 $c$ U/mL	吸光度 $A$	酶浓度 $c$ U/mL	吸光度 $A$	酶浓度 $c$ U/mL
0.365	3.679	0.404	3.572	0.443	3.469
0.366	3.676	0.405	3.569	0.444	3.467
0.445	3.464	0.484	3.371	0.523	3.285
0.446	3.462	0.485	3.369	0.524	3.283
0.447	3.459	0.486	3.366	0.525	3.280
0.448	3.457	0.487	3.364	0.526	3.278
0.449	3.454	0.488	3.362	0.527	3.276
0.450	3.452	0.489	3.359	0.528	3.274
0.451	3.449	0.490	3.357	0.529	3.272
0.452	3.447	0.491	3.355	0.530	3.270
0.453	3.444	0.492	3.353	0.531	3.268
0.454	3.442	0.493	3.350	0.532	3.266
0.455	3.440	0.494	3.348	0.533	3.264
0.456	3.437	0.495	3.346	0.534	3.262
0.457	3.435	0.496	3.344	0.535	3.260
0.458	3.432	0.497	3.341	0.536	3.258
0.459	3.430	0.498	3.339	0.537	3.255
0.460	3.427	0.499	3.337	0.538	3.253
0.461	3.425	0.500	3.335	0.539	3.251
0.462	3.423	0.501	3.333	0.540	3.249
0.463	3.420	0.502	3.330	0.541	3.247
0.464	3.418	0.503	3.328	0.542	3.245
0.465	3.415	0.504	3.326	0.543	3.243
0.466	3.413	0.505	3.324	0.544	3.241
0.467	3.411	0.506	3.321	0.545	3.239
0.468	3.408	0.507	3.319	0.546	3.237
0.469	3.406	0.508	3.317	0.547	3.235
0.470	3.404	0.509	3.315	0.548	3.233
0.471	3.401	0.510	3.313	0.549	3.231
0.472	3.399	0.511	3.311	0.550	3.229
0.473	3.397	0.512	3.308	0.551	3.227
0.474	3.394	0.513	3.306	0.552	3.225
0.475	3.392	0.514	3.304	0.553	3.223
0.476	3.389	0.515	3.302	0.554	3.221
0.477	3.387	0.516	3.300	0.555	3.219
0.478	3.385	0.517	3.298	0.556	3.217
0.479	3.383	0.518	3.295	0.557	3.215
0.480	3.380	0.519	3.293	0.558	3.213
0.481	3.378	0.520	3.291	0.559	3.211



表 B.1 (续)

吸光度 $A$	酶浓度 $c$ U/mL	吸光度 $A$	酶浓度 $c$ U/mL	吸光度 $A$	酶浓度 $c$ U/mL
0.482	3.376	0.521	3.289	0.560	3.209
0.483	3.373	0.522	3.287	0.561	3.207
0.562	3.205	0.601	3.133	0.640	3.068
0.563	3.204	0.602	3.131	0.641	3.066
0.564	3.202	0.603	3.130	0.642	3.065
0.565	3.200	0.604	3.128	0.643	3.063
0.566	3.198	0.605	3.126	0.644	3.062
0.567	3.196	0.606	3.124	0.645	3.060
0.568	3.194	0.607	3.123	0.646	3.058
0.569	3.192	0.608	3.121	0.647	3.057
0.570	3.190	0.609	3.119	0.648	3.055
0.571	3.188	0.610	3.118	0.649	3.054
0.572	3.186	0.611	3.116	0.650	3.052
0.573	3.184	0.612	3.114	0.651	3.051
0.574	3.183	0.613	3.112	0.652	3.049
0.575	3.181	0.614	3.111	0.653	3.048
0.576	3.179	0.615	3.109	0.654	3.046
0.577	3.177	0.616	3.107	0.655	3.045
0.578	3.175	0.617	3.106	0.656	3.043
0.579	3.173	0.618	3.104	0.657	3.042
0.580	3.171	0.619	3.102	0.658	3.040
0.581	3.169	0.620	3.101	0.659	3.039
0.582	3.168	0.621	3.099	0.660	3.037
0.583	3.166	0.622	3.097	0.661	3.036
0.584	3.164	0.623	3.096	0.662	3.034
0.585	3.162	0.624	3.095	0.663	3.033
0.586	3.160	0.625	3.094	0.664	3.031
0.587	3.158	0.626	3.092	0.665	3.030
0.588	3.157	0.627	3.089	0.666	3.028
0.589	3.155	0.628	3.087	0.667	3.027
0.590	3.153	0.629	3.086	0.668	3.025
0.591	3.151	0.630	3.084	0.669	3.024
0.592	3.149	0.631	3.082	0.670	3.022
0.593	3.147	0.632	3.081	0.671	3.021
0.594	3.146	0.633	3.079	0.672	3.020
0.595	3.144	0.634	3.078	0.673	3.018
0.596	3.142	0.635	3.076	0.674	3.017
0.597	3.140	0.636	3.074	0.675	3.015
0.598	3.139	0.637	3.073	0.676	3.014

表 B.1 (续)

吸光度 $A$	酶浓度 $c$ U/mL	吸光度 $A$	酶浓度 $c$ U/mL	吸光度 $A$	酶浓度 $c$ U/mL
0.599	3.137	0.638	3.071	0.677	3.012
0.600	3.135	0.639	3.070	0.678	3.011
0.679	3.010	0.708	2.971	0.737	2.936
0.680	3.008	0.709	2.969	0.738	2.935
0.681	3.007	0.710	2.968	0.739	2.933
0.682	3.005	0.711	2.967	0.740	2.932
0.683	3.004	0.712	2.966	0.741	2.931
0.684	3.003	0.713	2.964	0.742	2.930
0.685	3.001	0.714	2.963	0.743	2.929
0.686	3.000	0.715	2.962	0.744	2.928
0.687	2.998	0.716	2.961	0.745	2.927
0.688	2.997	0.717	2.959	0.746	2.926
0.689	2.996	0.718	2.958	0.747	2.925
0.690	2.994	0.719	2.957	0.748	2.923
0.691	2.993	0.720	2.956	0.749	2.922
0.692	2.992	0.721	2.955	0.750	2.921
0.693	2.990	0.722	2.953	0.751	2.920
0.694	2.989	0.723	2.952	0.752	2.919
0.695	2.988	0.724	2.951	0.753	2.918
0.696	2.986	0.725	2.950	0.754	2.917
0.697	2.985	0.726	2.949	0.755	2.916
0.698	2.984	0.727	2.947	0.756	2.915
0.699	2.982	0.728	2.946	0.757	2.914
0.700	2.981	0.729	2.945	0.758	2.913
0.701	2.980	0.730	2.944	0.759	2.912
0.702	2.978	0.731	2.943	0.760	2.911
0.703	2.977	0.732	2.941	0.761	2.910
0.704	2.976	0.733	2.940	0.762	2.909
0.705	2.975	0.734	2.939	0.763	2.908
0.706	2.973	0.735	2.938	0.764	2.907
0.707	2.972	0.736	2.937	0.765	2.906

## B.1.5 计算

样品酶活力，计算见式(B.1)：

$$X = c \times n \dots\dots\dots (B.1)$$

式中：

$X$ ——样品的酶活力，单位为酶活力单位每克(酶活力单位每毫升)[U/g(U/mL)]；

$c$ ——测试酶液的浓度，单位为酶活力单位每毫升(U/mL)；

$n$ ——样品的稀释倍数。

注：所得结果表示至整数。

### B.1.6 结果的允许差

平行试验相对误差不得超过2%。

## B.2 蛋白酶

### B.2.1 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。

### B.2.2 试验原理

蛋白酶用于在40℃下水解偶氮酪蛋白30min。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。

### B.2.3 仪器设备

分光光度计(390nm)、分析天平、试管、10mL容量瓶、pH计、涡流搅拌器、漏斗、中速滤纸(90mm)、吸液管、恒温水浴(40℃)、秒表、容量瓶、移液枪。

### B.2.4 试验材料

B.2.4.1 Alcalase标准酶(1.61AU/g—Novozyme)或者其他标准酶。

B.2.4.2 偶氮酪蛋白(磺胺—偶氮酪蛋白)。

B.2.4.3 Trizma培养基(三羟甲基氨基甲烷)。

B.2.4.4 蒸馏水。

B.2.4.5 尿素。

B.2.4.6 三氯乙酸。

### B.2.5 预配溶液

B.2.5.1 将24.2gTrizma培养基溶解于800mL蒸馏水中，用1mol/L硫酸将pH调节至8.5。转移到1L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。

B.2.5.2 50%尿素溶液 将50g尿素溶解于100mL蒸馏水中。

注：保质期3个月，常温避光保存。

B.2.5.3 10%三氯乙酸终止剂 称量25g三氯乙酸，转移到250mL容量瓶中，用蒸馏水调节至刻度。

B.2.5.4 0.6%偶氮酪蛋白底物溶液 称量0.6g偶氮酪蛋白，加入10mL50%的尿素溶液，搅拌至溶解。用Tris缓冲液调节至100mL，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。

### B.2.6 标准溶液的制备

#### B.2.6.1 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0.0161g冷冻、干燥的Alcalase(标准活度1.61AU/g)，记录精确的质量，定量移取至10mL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 $2.6 \times 10^{-3}$ 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。

#### B. 2. 6. 2 标准工作溶液（每个浓度平行制备）

B. 2. 6. 2. 1 标准溶液1( $1.3 \times 10^{-5}$  AU/mL)：吸取0.05mL常备Alcalase标准溶液至10mL容量瓶中，用Tris缓冲液稀释至刻度。

B. 2. 6. 2. 2 标准溶液2( $2.6 \times 10^{-5}$  AU/mL)：吸取0.10mL常备Alcalase标准溶液至10mL容量瓶中，用Tris缓冲液稀释至刻度。

B. 2. 6. 2. 3 标准溶液3( $5.2 \times 10^{-5}$  AU/mL)：吸取0.20mL常备Alcalase标准溶液至10mL容量瓶中，用Tris缓冲液稀释至刻度。

B. 2. 6. 2. 4 标准溶液4( $1.04 \times 10^{-4}$  AU/mL)：吸取0.40mL常备Alcalase标准溶液至10mL容量瓶中，用Tris缓冲液稀释至刻度。

B. 2. 6. 2. 5 标准溶液5( $2.08 \times 10^{-4}$  AU/mL)：吸取0.80mL常备Alcalase标准溶液至10mL容量瓶中，用Tris缓冲液稀释至刻度。

#### B. 2. 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：

a) 吸取0.1mL待测样品至10mL带塞的试管中，加入4.9mL Tris缓冲液，混匀。如果样品对吸管太粘，可称取0.1g样品至10mL容量瓶中，加入4.9mL Tris缓冲液稀释至刻度；

b) 吸取上面制备的溶液0.05mL至10mL量瓶中，加入4.95mL Tris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。

#### B. 2. 8 试验步骤

B. 2. 8. 1 将水浴设置到40℃。

B. 2. 8. 2 开始分析之前10min内，先将底物溶液置于水浴中加热。

B. 2. 8. 3 分别将每种样品（标准样品和待测样品）吸取1.0mL至20mL试管中。每种样品需要做平行分析。

B. 2. 8. 4 将所有的试管放在40℃水浴中保存约1min，以达到平衡。

B. 2. 8. 5 开始反应：精确控制30s间隔，向每支试管中加入5mL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30min。

B. 2. 8. 6 终止反应：将5.0mL终止剂按30s的间隔依次加入到每支试管中，涡流搅拌后在室温下放置10min。

注：30s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30min。

B. 2. 8. 7 向标准空白和样品空白中分别加入1.0mL Std 2( $5.2 \times 10^{-5}$  AU/mL)溶液和样品溶液（可选择稀释后颜色最深的一个样品）。

B. 2. 8. 8 15min~20min内，用滤纸将所有的试管中试剂过滤到清洁干燥的试管中。

B. 2. 8. 9 分光光度计测量标准溶液、样品溶液和空白溶液在390nm处的吸光度，以蒸馏水做参比。

#### B. 2. 9 结果计算

B. 2. 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）。

B. 2. 9. 2 绘制“标准浓度（AU/mL）vs 吸光度”的图形。

B. 2. 9. 3 用excel表格或者科学计算方法参考标准图谱估计样品的浓度（线形回归）。

B. 2. 9. 4 对吸取的样品，蛋白酶活性计算见式（B. 2）：

$$R=A \times \text{稀释比例}(5000) \dots\dots\dots (B.2)$$

式中:

$R$ ——蛋白酶活性, 单位为酶活力单位每毫升 (AU/mL);

$A$ ——通过标准图谱线形回归得到的样品浓度;

如果要转换成AU/g 除以样品的密度即可。

B.2.9.5 对称量的样品, 蛋白酶活性计算见式 (B.3):

$$R=\frac{A \times \text{稀释比例}(5000)}{W} \dots\dots\dots (B.3)$$

式中:

$R$ ——蛋白酶活性, 单位为酶活力单位每克 (AU/g);

$A$ ——通过标准图谱线形回归得到的样品浓度;

$W$ ——样品的质量, 单位为克 (g)。

### B.3 蛋白酶活力测定 (福林法)

#### B.3.1 定义

在40℃条件下, 每分钟水解酪素产生1μg酪氨酸所需的酶量, 规定为一个酶活力单位。

#### B.3.2 原理

蛋白酶的水解底物对酪蛋白、乳清蛋白、谷物蛋白等都有很好的水解作用。磷钨酸和磷钼酸混合试剂, 即福林-酚试剂, 碱性条件下极不稳定, 易被酚类化合物还原而呈蓝色反应 (钨兰和钼兰混合物)。由于蛋白质中含有具有酚基的氨基酸 (酪氨酸、色氨酸、苯丙氨酸), 因此, 蛋白质及其水解产物也呈此反应。利用蛋白酶分解酪素 (底物) 生成含酚基氨基酸的呈色反应, 来间接测定蛋白酶的活力。

#### B.3.3 仪器设备

752型分光光度计、恒温水浴锅、试管、滤纸、移液管、秒表、酸度计、容量瓶、电热风恒温干燥箱。

#### B.3.4 试验材料

注: 本标准所使用所有的试剂若无任何说明, 均为分析纯。

##### B.3.4.1 福林试剂的制备

于200mL烧瓶回流装置内加入钨酸钠 ( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 100g, 钼酸钠 ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 25g蒸馏水700mL, 85%磷酸50mL, 浓盐酸100mL, 小火回流10h, 去除冷凝器后加入硫酸锂 ( $\text{Li}_2\text{SO}_4$ ) 50g, 蒸馏水50mL和数滴浓溴水摇匀, 在通风橱内再进行煮沸15min, 以去除多余的溴 (冷后若仍有绿色需再加溴水, 再煮沸去过量的溴)。冷却后加蒸馏水定容至1000mL, 混合均匀过滤。试剂呈金黄色贮于棕色试剂瓶内。使用时以1份原福林溶液与2份蒸馏水混匀 (即为福林工作液)。也可以使用市售福林溶液配制。

##### B.3.4.2 缓冲液的制备

###### B.3.4.2.1 乳酸缓冲液 (pH=3.0) 适用于酸性蛋白酶

甲液：称取乳酸（80%~90%）10.6g，加蒸馏水溶解并定容至1000mL。

乙液：称取乳酸钠（70%）16g，加蒸馏水溶解并定容至1000mL。

使用液：取甲液8mL，加乙液1mL，摇匀，稀释一倍，即成0.05mol/L乳酸缓冲溶液。

#### B.3.4.2.2 磷酸缓冲液的制备（pH=7.5）适用于中性蛋白酶

准确称取磷酸氢二钠（ $\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ）6.02和磷酸二氢钠（ $\text{NaH}_2\text{PO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ）0.5g，加蒸馏水定容至1000mL。

#### B.3.4.2.3 硼酸缓冲液（pH=10.5）适用于碱性蛋白酶

甲液：称取硼酸钠19.08g，加水溶解并定容至1000mL。

乙液：称取氢氧化钠4.0g，加水溶解并定容至1000mL。

使用液：取甲液500mL，加乙液400mL，摇匀，用水稀释至1L。

#### B.3.4.3 0.4mol/L碳酸钠溶液

准确称取无水碳酸钠42.4g，以蒸馏水溶解定容至1000mL。

#### B.3.4.4 0.4mol/L的三氯醋酸液

准确称取65.4三氯醋酸，以蒸馏水溶解定容至1000mL。

#### B.3.4.5 0.5mol/L的NaOH

准确称取 2g NaOH 溶解并定至 100mL。

#### B.3.4.6 10.00mg/mL酪素溶液

称取酪素1.000g，用少量的0.5mol/L的氢氧化钠溶液（若为酸性蛋白酶则用浓乳酸2-3滴）润湿，加入适量的各适宜的缓冲液约80mL，在沸水浴中边加热边搅拌，直至完全溶解，冷却后，转入100mL容量瓶中，用适宜的缓冲液稀释至刻度，此溶液在冰箱内贮存，有效期为三天。

#### B.3.4.7 100 μg/ml酪氨酸标准溶液

B.3.4.7.1 准确称取预先于105℃干燥至恒重的L-酪氨酸0.1000g，用1mol/L的盐酸60mL溶解后并用0.1mol/L盐酸定容至100mL，即为1.00mg/mL的酪氨酸溶液。

B.3.4.7.2 吸取1.00mg/mL酪氨酸标准溶液10.00mL，用0.1mol/L盐酸定容至100mL，即得100.0 μg/L L-酪氨酸标准溶液。

#### B.3.4.8 酶样的制备

准确称取1.000g固体酶或移取1mL液体酶样，用少量的适宜缓冲液溶解并用玻璃棒捣研，然后将上液倒入容量瓶，沉渣中再添入少量缓冲液捣研多次，最后全部移入容量瓶，稀释到刻度，用四层纱布过滤。滤液可作为测试酶用。该酶已经稀释100倍。

### B.3.5 标准曲线的绘制

B.3.5.1 L-酪氨酸标准溶液按表B.2配制。

表B.2 L-酪氨酸标准溶液配制表

试管号	0	1	2	3	4	5
取100 $\mu$ g/ml酪氨酸溶液/mL	0	1	2	3	4	5
蒸馏水/mL	10	9	8	7	6	5
酪氨酸实际浓度/( $\mu$ g/mL)	0	10	20	30	40	50

B.3.5.2 分别取上述溶液各1.00mL(需做平行试验),各加0.4mol/L碳酸钠溶液5.00mL。福林试剂使用溶液1.00mL,置于40 $\pm$ 0.2 $^{\circ}$ C水浴中显色20min,取出用分光光度计于波长680nm,比色,以不含酪氨酸的0管为空白管调零点,分别测定其吸光度值,以吸光度值为纵坐标,酪氨酸的浓度为横坐标,绘制标准曲线或计算回归方程。计算出当OD为1时的酪氨酸的量( $\mu$ g),即为吸光常数K值,其K值应在95~100范围内。

### B.3.6 试验步骤

B.3.6.1 先将酪氨酸溶液放入40 $\pm$ 0.2 $^{\circ}$ C恒温水浴中,预热5min。

B.3.6.2 取4支试管,各加入1mL酶液。

B.3.6.3 取一支作为空白管,加2mL三氯乙酸,其他3管作为测试管各加入1mL酪氨酸,摇匀,40 $^{\circ}$ C保温10min。

B.3.6.4 取出试管,3支测试管中各加入2mL三氯乙酸,空白管中加1mL酪氨酸。

B.3.6.5 静置10min,过滤沉淀。

B.3.6.6 各取1mL滤液分别加0.4mol/L的Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>5ml,福林试剂1mL。在40 $^{\circ}$ C显色20min。680nm处测OD值。以空白管调零点。

### B.3.7 结果计算

B.3.7.1 将测得的各平行样求OD值的均值。

B.3.7.2 酶的活性单位计算见式(B.4):

$$X = A \times K \times \frac{4}{10} \times n \dots\dots\dots (B.4)$$

式中:

$X$  —— 蛋白酶的活力,单位为酶活力单位每克(U/g)或毫升(mL);

$A$  —— 样品平行试验的平均OD值;

$K$  —— 吸光常数;

4 —— 反应试剂的总体积,单位为毫升(mL);

10 —— 酶解反应时间,单位为分钟(min);

$n$  —— 酶液稀释总倍数。

## B.4 脂肪酶

### B.4.1 定义

1mL液体酶于40 $^{\circ}$ C, pH=7.5的条件下,水解脂肪每分钟产生1 $\mu$ mol的脂肪酸,即为一个脂肪酶国际单位,以U/g表示。

### B.4.2 原理

脂肪酶在一定条件下,能使甘油三酯水解成脂肪酸、甘油二酯、甘油单酸和甘油,所释放的脂肪酸,可用标准碱溶液进行中和滴定,用pH计或酚酞指示液指示反应终点,根据消耗的碱量,计算其酶活力。反应式为:



#### B.4.3 试验材料

B.4.3.1 聚乙烯醇(PVA)聚合度1750±50。

B.4.3.2 橄榄油。

B.4.3.3 95%(体积分数)乙醇(GB/T 679)。

B.4.3.4 底物溶液的制备:

- a) 称取聚乙烯醇(PVA)40g,加水800mL,在沸水浴中加热、搅拌,直至全部溶解,冷却后定容至1000mL。以干净的双层纱布过滤,取滤液备用;
- b) 量取4%PVA溶液150mL,加橄榄油50mL,用高速组织捣碎机处理6min(分2次处理,每次3min,中间休息5min),即成乳白色PVA乳化液。该溶液要现用现配。该溶液如贮存在冰箱中,有效期为一周。

B.4.3.5 0.025mol/L磷酸缓冲液(pH=7.5):

- a) 甲液 称取磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )17.01g,加蒸馏水溶解并定容至500mL;
- b) 乙液 称取磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )44.77g,加蒸馏水溶解并定容至500mL;
- c) 使用液 吸取甲液13mL,加乙液100mL,混匀,即成0.25mol/L磷酸缓冲液。使用时用蒸馏水稀释10倍,即成0.025mol/L磷酸缓冲液,用pH计校正。

B.4.3.6 氢氧化钠标准溶液 $c(\text{NaOH})=0.05\text{mol/L}$ :按GB/T 601配制与标定 $c(\text{NaOH})=0.5\text{mol/L}$ 氢氧化钠标准溶液。使用时,准确稀释10倍。

B.4.3.7 10g/L酚酞指示液:按GB/T 603配制。

#### B.4.4 仪器设备

B.4.4.1 恒温水浴:  $40^\circ\text{C} \pm 0.2^\circ\text{C}$ 。

B.4.4.2 高速组织捣碎机: 8000r/min~12000r/min。

B.4.4.3 pH计: 分度值为0.02pH单位或2mV。

B.4.4.4 电磁搅拌器。

B.4.4.5 微量滴定: 10mL,分刻度 $\leq 0.05\text{mL}$ 。

#### B.4.5 试验步骤

##### B.4.5.1 待测酶液的制备

吸取液体酶1.00mL,用磷酸缓冲液定容至刻度摇匀、稀释倍数参考表B.3,控制酶液浓度,样品与对照消耗碱量之差在1mL~2mL范围内。注意,吸取样品时,应将酶液摇匀后再取。

表B.3 酶活力估测表

估测酶活力 U/g	稀释倍数
4000	600
5000	750
6000	900



## B.4.5.2 测定

### B.4.5.2.1 电位滴定法(方法一)

B.4.5.2.1.1 用pH=9.22的硼酸钠(硼砂)缓冲液,按pH计使用说明书进行校正仪器。

B.4.5.2.1.2 取两个100mL烧杯,于第一个空白杯(A)和第二个样品杯(B)中各加底物溶液(B.4.3.4)4.00mL和磷酸缓冲液(B.4.3.5)5.00mL,再于A杯中加入95%乙醇(B.4.3.3)15.0mL,于40℃±0.2℃水浴中预热5min,然后于A、B两杯中,各加待测酶液1.00mL,立即混匀计时,在40℃±0.2℃水浴中准确反应15min,于B杯中立即补加95%乙醇15.0mL终止反应,取出。

B.4.5.2.1.3 在烧杯中放一枚转子,置于电磁搅拌器上,在搅拌下,用0.05mol/L 氢氧化钠标准溶液滴定,直至pH=10.3,为其终点,记录消耗0.05mol/L氢氧化钠标准溶液的体积。

### B.4.5.2.2 指示剂滴定法(方法二)

B.4.5.2.2.1 取两个100mL锥形瓶,分别于空白瓶(A)和样品瓶(B)中,各加底物溶液(B.4.3.4)4.00mL和磷酸缓冲液(B.4.3.5)5.00mL,再于A瓶中加入95%乙醇(B.4.3.3)15.0mL,于40℃±0.2℃水浴预热5min,然后,在两瓶中各加待测酶液1.00mL,立即混匀计时,在40℃±0.2℃水浴中准确反应15min,在B瓶中立即补加95%乙醇15.0mL终止反应,取出。

B.4.5.2.2.2 于空白和样品溶液中各加酚酞指示液2滴,用0.05mol/L氢氧化钠标准溶液滴定,直至微红色并保持30s不褪为其终点,记录消耗0.05mol/L氢氧化钠标准溶液的体积。

## B.4.6 结果计算

样品酶活力计算见式(B.5):

$$X = (B - A) \times \frac{c}{0.05} \times 50 \times \frac{1}{15} \times n = \frac{200}{3} \times (B - A) \times c \times n \dots\dots\dots (B.5)$$

式中:

$X$  —— 样品的酶活力,单位为酶活力单位每克(u/g);

$B$  —— 滴定样品时消耗氢氧化钠标准溶液的体积,单位为毫升(mL);

$A$  —— 滴定空白时消耗氢氧化钠标准溶液的体积,单位为毫升(mL);

$c$  —— 氢氧化钠标准溶液浓度,单位为摩尔每升(mol/L);

0.05 —— 氢氧化钠标准溶液浓度换算系数;

50 —— 0.05mol/L氢氧化钠溶液1.00mL相当于脂肪酸50微摩尔( $\mu$ mol);

1/15 —— 反应时间15min,以1min计;

$n$  —— 稀释倍数;

所得的结果表示至整数。

## B.4.7 结果的允许差

平行试验相对误差不得超过2%。

## 附 录 C (规范性附录)

### 医用清洗剂对血液和细菌混合物的去除效果测试方法

#### C.1 目的

测定医用清洗剂对有抗热能力的肠球菌和血液混合污染物的去除效果。

#### C.2 试验材料

##### C.2.1 菌血悬液

肠球菌 ATCC 6057。  
新鲜羊血（72h以内）。  
鱼精蛋白盐酸盐（纯度 $\geq 99\%$ ）。  
肝素（纯度 $\geq 99\%$ ）。  
生理盐水。

##### C.2.2 洗脱液

吐温-80 0.1%。  
蛋白胨 1.0%。  
氯化钠 0.85%。  
用蒸馏水配制而成，调节pH值在 $7.0 \pm 0.2$ ，经 $121^\circ\text{C}$ 压力蒸汽灭菌后使用。

##### C.2.3 稀释液：胰蛋白胨生理盐水溶液（TPS）

胰蛋白胨 1.0%。  
氯化钠 0.85%。  
用蒸馏水配制而成，调节pH值在 $7.0 \pm 0.2$ ，经 $121^\circ\text{C}$ 压力蒸汽灭菌后使用。

##### C.2.4 酪蛋白胨—大豆蛋白胨培养基（CSL）

酪蛋白胨 1.7%。  
大豆蛋白胨琼脂 0.3%。  
氯化钠 0.05%。  
磷酸氢二钾 0.023%。  
葡萄糖 0.025%。  
用蒸馏水配制而成，调节pH为 $7.3 \pm 0.1$ ，经 $121^\circ\text{C}$ 压力蒸汽灭菌后使用。

##### C.2.5 酪蛋白胨—大豆蛋白胨琼脂（CSA）

酪蛋白胨 1.5%。  
大豆蛋白胨琼脂 0.5%。  
氯化钠 0.5%。

琼脂 1.5%。

用蒸馏水配制而成，调节pH为 $7.3 \pm 0.1$ ，经 $121^\circ\text{C}$ 压力蒸汽灭菌后使用。

### C.2.6 试验载体

开槽圆柱头螺钉 M6×20 GB/T65

### C.2.7 清洗机模拟仪

有金属螺盖的玻璃罐（容积为470mL，可高压灭菌，并可放入转轴的广口罐），将罐口覆盖牛皮纸，加盖，于 $121^\circ\text{C}$ 压力蒸汽灭菌后备用。转动速度为 $45\text{r}/\text{min} \sim 60\text{r}/\text{min}$ 的滚动摇床。

### C.2.8 ATP测试试剂及仪器

ATP裂解液。

ATP荧光素酶。

ATP标准品。

ATP生物荧光测试仪。

## C.3 试验步骤

### C.3.1 菌血悬液制备

肠球菌经增菌培养，分离纯化后，将纯培养物接种到CSL中，于 $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 培养24h，次日重复以上操作。第3天，取0.1mL菌液接种于CSA上，在 $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 的条件下培养72h。用生理盐水洗菌，将细菌悬浮液放入离心机内，以转速为 $6000\text{r}/\text{min}$ 的速度离心 $10\text{min} \sim 15\text{min}$ ，弃去上清，用生理盐水将沉淀物再次混匀。

将9.5mL肝素化血液（血液中肝素浓度为 $50\text{mg}/\text{L}$ ）、0.35mL细菌悬浮液和0.15mL鱼精蛋白盐酸盐（浓度为 $4\text{mg}/\text{mL}$ ）混合。血液应在20min内凝固，若在此时间内没有凝固，则需适当增加鱼精蛋白盐酸盐浓度。

### C.3.2 载体制备

将经脱脂、灭菌处理的不锈钢螺丝钉完全浸没于测试污染物中至少1min后取出，置于 $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 的条件下干燥5min至血液凝固。

### C.3.3 配制清洗剂样品

在试验开始前20min，将盛有300mL按产品说明书配制好的待测医用清洗剂的玻璃罐，在水浴中恒温至 $40^\circ\text{C}$ （或者为产品说明书所规定的温度的最低值）。

### C.3.4 清洗程序

取2个污染螺丝钉放入盛有300mL待测医用清洗剂玻璃罐中，加盖。以 $45\text{r}/\text{min} \sim 60\text{r}/\text{min}$ 的转动速度旋转洗涤 $3\text{min} \sim 5\text{min}$ ，取下玻璃罐，取出螺丝钉，放入含10mL洗脱液（或中和剂）试管中，充分敲打洗脱后，进行细菌计数和ATP含量测定。

### C.3.5 清洗效果评价

#### C.3.5.1 细菌计数法

用稀释液对洗脱液做 10 倍系列稀释，选适宜稀释度悬液，分别吸取 1.0mL 接种 CSA 平皿，每份样本接种两个 CSA 平皿。

#### C.3.5.2 ATP含量测定

同时用移液枪吸取洗脱液50 $\mu$  L，加入50 $\mu$  L裂解液，震荡混合，作用30s后加入400 $\mu$  L荧光素酶，进行RLU测定，然后加入10 $\mu$  L标准品溶液，读取其RLU及ATP含量。

同时无菌镊子取未经任何处理的污染螺丝钉，放入含10mL洗脱液（或中和剂）试管中，分别按C.3.5方法进行菌落计数和ATP含量测定，作为阳性对照。

实验结束后，将用过的同批次洗脱液、稀释液各1mL接种培养基，作为阴性对照组样本。  
试验重复三次。

#### C.4 结果判断

三次试验结果，对细菌的去除率应 $\geq 99\%$ ，且ATP含量下降率应 $\geq 99\%$ ，可判定为该医用清洗剂对血液和细菌的混合污染物清洗效果有效。

## 附 录 D (规范性附录)

### 医用清洗剂对人工模拟污染物去除效果评价方法

#### D.1 目的

通过符合ISO 15883标准的模拟污染物的去除效果，判定其清洗效果。

#### D.2 试验器材

模拟污染物：蛋白、脂类和多糖的混合物。

分析天平 感量0.1mg。

有金属螺盖的玻璃罐（容积为470mL,可高压灭菌，并可放入转轴的广口罐），将罐口覆盖牛皮纸，加盖，于121℃压力蒸汽灭菌后备用。

转动速度为45r/min~60r/min的滚动摇床。

#### D.3 试验步骤

3片模拟污染物为一组，在干燥器中过夜后，称重为 $m_0$ 。每组污染片待天平回零后称重三次，精确至0.1mg，取其平均值作为试验前重量。称重时，应用镊子夹取，勿以手直接接触样片。

在试验开始前20min,将盛有300mL按产品说明书配制好的待测医用清洗剂的玻璃罐，在水浴中恒温至40℃。

将3片模拟污染物分别放入3个盛有300mL待测医用清洗剂玻璃罐中，加盖。以45r/min~60r/min的转动速度旋转洗涤预定时间，取下玻璃罐，取出模拟污染物，挂在晾架上，30℃存放2h后，称重为 $m_1$ ，并目测其清洗效果。

称量后的污染片，按以下步骤去污：

- a) 含洗涤剂的水中浸泡 30min;
- b) 超声波中清洗 30min;
- c) 纯净水洗净;
- d) 放入含洗涤剂的水中煮沸 30min;
- e) 用自来水洗净;
- f) 用蒸馏水煮沸 10min;
- g) 用蒸馏水漂洗至 pH 呈中性;
- h) 挂在晾架上 30min 后并在干燥器中过夜后，称每组样品的重量，为  $m_2$ 。

计算人工模拟污染物去除率见式 (D.1)：

$$R = \frac{m_0 - m_1}{m_0 - m_2} \times 100\% \dots\dots\dots (D.1)$$

式中：

$R$  —— 人工模拟污染物去除率，%；

$m_0$  —— 清洗前模拟污染物质量，单位为毫克（mg）；

$m_1$  —— 医用清洗剂清洗后模拟污染物质量，单位为毫克（mg）；

$m_2$ ——洗净后模拟污染物质量，单位为毫克（mg）；  
每一待测样品需准备三组模拟污染物。

#### D.4 结果判断

目测：肉眼观察污染物完全溶解脱落，外观表面清洁光亮、无残留物质。  
人工模拟污染物去除率 $\geq 95\%$ ，可判定为对模拟污染物的清洗效果合格。

## 附录 E (规范性附录)

### 医用清洗剂对脂肪、蛋白质和淀粉的去除效果评价方法

#### E.1 目的

医用清洗剂对测定污染物的去除率。

#### E.2 试验器材

##### E.2.1 模拟污染物

猪油（食品级）。

牛血清白蛋白（纯度 $\geq 90\%$ ）。

淀粉（纯度 $\geq 90\%$ ）。

墙纸糊。

##### E.2.2 载体片

聚四氟乙烯片 大小为  $10\text{cm} \times 5\text{cm}$ 、每片重量为  $1.200\text{g} \pm 0.010\text{g}$ 。

##### E.2.3 天平

分析天平 感量  $0.1\text{mg}$ 。

##### E.2.4 超声波清洗器

##### E.2.5 恒温水浴箱

##### E.2.6 清洗机模拟仪

有金属螺盖的玻璃罐（容积为  $470\text{mL}$ ，可高压灭菌，并可放入转轴的广口罐），将罐口覆盖牛皮纸，加盖，于  $121^\circ\text{C}$  压力蒸汽灭菌后备用。

转动速度为  $45\text{r}/\text{min} \sim 60\text{r}/\text{min}$  的滚动摇床。

##### E.2.7 人工模拟污染物配方

淀粉污染物：淀粉  $3\text{g}$ 、墙纸糊  $0.5\text{g}$ ，加水至  $100\text{mL}$ ；

蛋白质污染物：牛血清白蛋白  $3\text{g}$ 、墙纸糊  $0.5\text{g}$  加水至  $100\text{mL}$ ，配制时，温度不宜超过  $50^\circ\text{C}$ ；

脂肪污染物：猪油，使用时，置电炉上加热， $45^\circ\text{C}$  油温染片。

#### E.3 试验步骤

聚四氟乙烯片在使用前，应先进行脱脂处理。脱脂方法如下：

- a) 放在含洗涤剂的水中煮沸  $30\text{min}$ ；
- b) 以自来水洗净；

- c) 用蒸馏水煮沸 10min;
- d) 用蒸馏水漂洗至 pH 呈中性;
- e) 晾干。

将聚四氟乙烯片上沿画出10mm线，下沿画出5mm线，污染物限制在此范围内。

将洁净的聚四氟乙烯片在干燥器放置过夜，每三片为一组，用分析天平精确称重（准确至 1 mg）为  $m_0$ ，待天平回零后称重三次，精确至0.1mg，取其平均值作为试验前重量。称重时，应用镊子夹取，勿以手直接接触样片。

污染片制备方法：

- a) 淀粉污染片或蛋白质污染片的制备 手持夹子将聚四氟乙烯片放入淀粉污染物或蛋白质污染物中至 10mm 上沿线 1s~2s，缓缓取出，挂回原来晾片架上，依次制备污片；
- b) 脂肪污染片的制备 取 20 $\mu$  L 猪油滴染于聚四氟乙烯片，在标定的区域内涂匀。

每组污片上污物总量应为30mg $\pm$ 5mg。在干燥器中放置2h后，称重为  $m$ 。

在试验开始前20min，将盛有300mL按产品说明书配制好的待测医用清洗剂的玻璃罐，在水浴中恒温至产品说明书所规定的温度。

将三片污染片分别放入三个盛有300mL医用清洗剂的玻璃罐中，加盖。以45r/min~60r/min的转动速度旋转洗涤预定时间，取下玻璃罐，取出聚四氟乙烯片，挂在晾片架上，放置于干燥器中，2h后称重为  $m_2$ 。每一待测样品需准备三组污染片。

计算人工模拟污染物去除率见式（E.1）：

$$R = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100\% \dots\dots\dots (E.1)$$

式中：

- $R$  —— 人工模拟污染物去除率， %；
  - $m_0$  —— 涂污前聚四氟乙烯片质量，单位为毫克（mg）；
  - $m_1$  —— 涂污后聚四氟乙烯片质量，单位为毫克（mg）；
  - $m_2$  —— 洗涤后聚四氟乙烯片质量，单位为毫克（mg）；
- 每一待测样品需准备三组模拟污染物。

#### E.4 结果判定

对蛋白质的去除率应 $\geq$ 90%；对淀粉的去除率应 $\geq$ 60%；对脂肪的去除率应 $\geq$ 50%，可判定为对蛋白质、淀粉和脂肪的清洗效果合格。



附 录 F  
(规范性附录)  
生物膜去除效果测定方法

生物膜去除效果测定方法一（管腔内表面培养法）

F.1 目的

内镜用医用清洗剂对人工培养聚四氟乙烯管腔中生物膜的去除效果。

F.2 试验器材

F.2.1 菌株

铜绿假单胞菌 ATCC 15442。

F.2.2 洗脱液

吐温-80 0.1%。

蛋白胨 1.0%。

氯化钠 0.85%。

用蒸馏水配制而成，调节pH值在 $7.0 \pm 0.2$ ，经 $121^\circ\text{C}$ 压力蒸汽灭菌后使用。

F.2.3 稀释液：胰蛋白胨生理盐水溶液（TPS）

胰蛋白胨 1.0%。

氯化钠 0.85%。

用蒸馏水配制而成，调节pH值在 $7.0 \pm 0.2$ ，经 $121^\circ\text{C}$ 压力蒸汽灭菌后使用。

F.2.4 胰蛋白胨大豆肉汤培养基（TSB）

胰蛋白胨 1.5%。

大豆蛋白胨 0.5%。

氯化钠 0.5%。

用蒸馏水配制而成，调节pH值在 $7.0 \pm 0.2$ ，经 $121^\circ\text{C}$ 压力蒸汽灭菌后使用。

F.2.5 胰蛋白胨大豆琼脂培养基（TSA）

胰蛋白胨 1.5%。

大豆蛋白胨 0.5%。

氯化钠 0.5%。

琼脂 1.6%。

用蒸馏水配制而成，调节pH值在 $7.0 \pm 0.2$ ，经 $121^\circ\text{C}$ 压力蒸汽灭菌后使用。

F.2.6 ATP测试试剂及仪器

ATP裂解液。

ATP荧光素酶。

ATP标准品。

ATP生物荧光测定仪。

### F.2.7 载体管腔

聚四氟乙烯连接管（外径10mm~12mm，内径6mm，长度1000mm）经脱脂处理，压力蒸汽灭菌后备用。

聚四氟乙烯载体管（外径6mm，内径2mm，长度1000mm）经脱脂处理，压力蒸汽灭菌后备用。

### F.2.8 蠕动泵

### F.2.9 电热恒温水浴

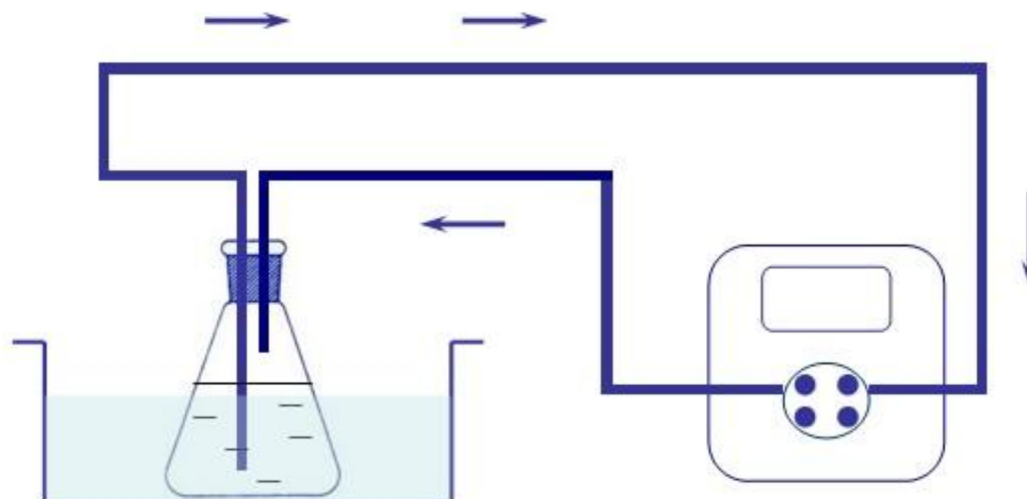
## F.3 试验步骤

### F.3.1 菌悬液制备

将分离纯化后铜绿假单胞菌接种到TSA斜面，培养24h。用TSB洗菌，并用TSB将菌液调整至所需浓度。取配制好的菌悬液2mL，加入到含200mL TSB的锥形瓶中，使其菌液浓度为 $10^2$ CFU/mL备用。

### F.3.2 生物膜培养模型搭建

用带有通气孔（过滤层0.22mm）的塞子将烧瓶塞住，通过通气孔延伸到瓶底，另一个软管在TSB液面上。通过蠕动泵和软管子将内径2mm的聚四氟乙烯管相连接组成管道系统，保持在37℃的条件，用蠕动泵在10mL/min的流量下循环，4h/d。每日更换TSB，连续培养5d。第6d用500mL无菌生理盐水以10mL/min的流速冲洗管腔去除管腔内壁的浮游菌（连接见图F.1）。



图F.1 人工生物膜培养模型简图

### F.3.3 清洗程序

在试验开始前20min，将盛有400mL按产品说明书配制好的待测医用清洗剂的锥形瓶，在水浴中恒温至40℃（或为产品说明书所规定温度的最低值）备用。

内径6mm的聚四氟乙烯管经过灭菌后，在50mm、500mm和 950mm处剪开，备用。将冲洗完毕的生物膜管腔截取为5cm的小段，作为污染物样本。分别连接在模拟内镜体的50mm、500mm和 950mm处。对连接好的模拟内镜体分别用恒温至40℃的400mL的清洗液以100mL/min的流速循环清洗5min后，再以10mL/min的流速用无菌蒸馏水冲洗1min，以冲洗管腔内残留的清洗剂。

#### F.3.4 清洗效果评价

清洗完毕后，用灭菌镊子将含生物膜的样本取出，将样本纵向分为两部分后，放入含10mL洗脱液（或中和剂）的试管中，在40KHz的超声波中清洗6.5min后，进行细菌计数和ATP含量测定：

- a) 细菌计数 用稀释液对洗脱液做 10 倍系列稀释，选适宜稀释度悬液，分别吸取 1.0mL 接种平皿，每份样本接种两个平皿；
- b) ATP 含量测定 吸取洗脱液 50μ L，加入 50μ L 裂解液，震荡混合，作用 30s 后加入 400μ L 荧光素酶，进行 RLU 测定，然后加入 10μ L 标准品溶液，读取其 RLU 及 ATP 含量。

同时用400mL的无菌蒸馏水代替医用清洗机对连接好的模拟内镜体按F.3.3进行清洗后，分别进行细菌计数、ATP生物荧光和蛋白测定。

阳性对照组 取两个样本，置室温，不作任何处理，待试验组处理至最长作用时间，将样本按F.3.3方法洗脱后，分别进行细菌计数、ATP生物荧光和蛋白测定，作为阳性对照。

阴性对照组 取脱脂灭菌后，未经任何处理的内径为2mm、5cm长的聚四氟乙烯管，分别进行细菌计数法、ATP生物荧光法测定，作为阴性对照。

试验重复三次。

#### F.4 结果判定

生物膜制备合格判定标准：细菌计数应达 $1 \times 10^7$ CFU/样本 $\sim 1 \times 10^8$ CFU/样本；水冲洗5min时，细菌减少应 $\leq 50\%$ ，ATP含量减少应 $\leq 50\%$ 。阴性对照应无菌生长。

医用清洗剂清洗合格标准：三次试验细菌减少值在 90%以上，ATP 含量减少值在 90%以上，可判为对生物膜去除效果合格。

#### 生物膜去除效果测定方法二（平整表面培养法）

F.5 目的 医用清洗剂对人工培养在聚碳酸酯载体表面的生物膜的去除效果。

#### F.6 试验材料

##### F.6.1 菌株

铜绿假单胞菌 ATCC 15442。

##### F.6.2 洗脱液

生理盐水（0.85%的氯化钠溶液）。

##### F.6.3 稀释液：胰蛋白胍生理盐水溶液（TPS）

胰蛋白胍 1.0%。

氯化钠 0.85%。

用蒸馏水配制而成，调节pH值在 $7.0 \pm 0.2$ ，经 $121^\circ\text{C}$ 压力蒸汽灭菌后使用。

#### F. 6.4 胰蛋白胨大豆肉汤培养基（TSB）

胰蛋白胨 1.5%。

大豆蛋白胨 0.5%。

氯化钠 0.5%。

用蒸馏水配制而成，调节pH值在 $7.0 \pm 0.2$ ，经 $121^\circ\text{C}$ 压力蒸汽灭菌后使用。

#### F. 6.5 胰蛋白胨大豆琼脂培养基（TSA）

胰蛋白胨 1.5%。

大豆蛋白胨 0.5%。

氯化钠 0.5%。

琼脂 1.6%。

用蒸馏水配制而成，调节pH值在 $7.0 \pm 0.2$ ，经 $121^\circ\text{C}$ 压力蒸汽灭菌后使用。

#### F. 6.6 ATP测试试剂及仪器

ATP裂解液。

ATP荧光素酶。

ATP标准品。

ATP生物荧光测定仪。

#### F. 6.7 载体

聚碳酸酯小圆片，直径1cm，厚度0.3cm。

#### F. 6.8 Masterflex蠕动泵

#### F. 6.9 DK-450B电热恒温水浴

#### F. 6.10 KQ-110E超声波清洗器

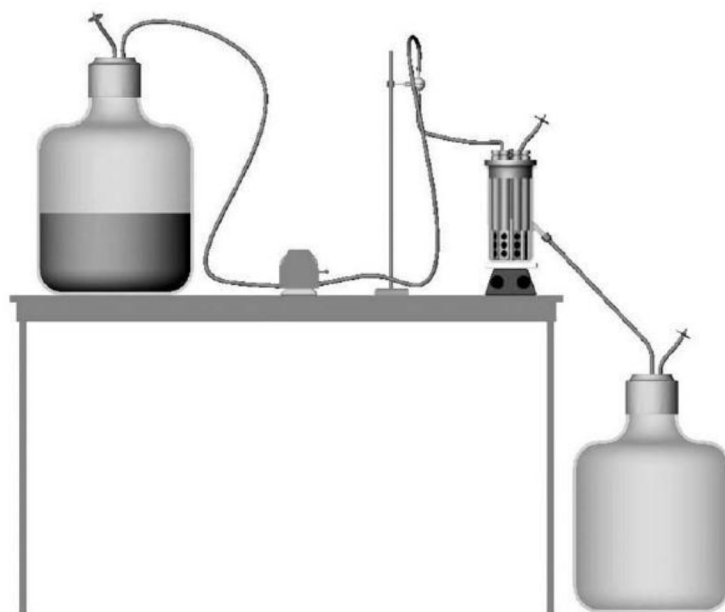
### F. 7 试验步骤

#### F. 7.1 菌悬液制备

挑取24h新鲜斜面的3~5个典型单个菌落，接种于100mL TSB中，于 $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 条件下，振荡培养20h~24h，使菌液浓度达到 $10^8$  cfu/mL，备用。

#### F. 7.2 生物膜培养模型搭建

选取聚碳酸酯小圆片，用超声波清洗后用去离子水清洗，仔细安装在反应杆上。向主反应器中加入500mL浓度为300mg/L的TSB溶液中，完成安装反应器，置于 $121^\circ\text{C}$ 灭菌20min后冷却备用。向主反应器中无菌加入1mL菌悬液后，打开磁力搅拌器，大约125r/min，温度 $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 培养24h。培养24h后，用无菌导管连接储液罐、蠕动泵和废液缸，储液罐中为100mg/L的TSB溶液。打开蠕动泵，流速控制在 $11.7 \pm 0.2$  mL/min，流动培养24h（连接见图F.2）。



图F. 2 生物膜培养模型连接示意图

### F. 7.3 清洗程序

在无菌条件下，取出培养好的有生物膜生长的载体片，用蒸馏水反复冲洗载体片表面浮游菌，然后将其放入含10mL清洗剂应用液的试管中，于 $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 水浴中放置30min。

### F. 7.4 清洗效果评价

清洗程序完毕后，用灭菌镊子将载体片取出，放入含5mL0.85%氯化钠溶液的试管中，在40KHz的超声波中清洗15min后，进行细菌计数和ATP含量测定。细菌计数和ATP含量测定方法见F. 3. 4。

### F. 8 结果判定

生物膜制备合格判定标准：细菌计数应达 $1 \times 10^7$ CFU/样本 $\sim 1 \times 10^8$ CFU/样本。

医用清洗剂清洗合格标准：三次试验细菌减少值在90%以上，ATP含量减少值在90%以上，可判为对生物膜去除效果合格。