

团 体 标 准

T/CIET XXXX—2022

化妆品用原料 银耳多糖

Cosmetic ingredients—Tremella polysaccharide

2022 - XX - XX 发布

2022 - XX - XX 实施

# 目 次

前言 .....	II
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语和定义 .....	1
4 INCI 名称、中文名称、CAS 号 .....	1
5 要求 .....	1
6 试验方法 .....	2
7 检验规则 .....	3
8 标志、包装、运输、贮存和保质期 .....	3
附录 A（规范性） 葡萄糖醛酸含量的测定 .....	5
附录 B（规范性） 银耳多糖中总糖的测定 .....	7
附录 C（规范性） 平均相对分子质量的测定 .....	9
附录 D（规范性） 微生物的测定 .....	11
参考文献 .....	14

## 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。

本文件由山东焦点福瑞达生物股份有限公司提出。

本文件由中国国际经济技术合作促进会归口。

本文件起草单位：山东焦点福瑞达生物股份有限公司、北京共生文化咨询有限公司。

本文件主要起草人：

# 化妆品用原料 银耳多糖

## 1 范围

本文件规定了化妆品用原料银耳多糖的术语和定义、要求、试验方法、检验规则、标志、包装、运输、贮存和保质期。

本文件适用于以银耳为原料，经提取、纯化、精制、干燥等工序制成的化妆品用原料银耳多糖。

## 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 6678 化工产品采样总则

《中华人民共和国药典》四部（2020年版）

## 3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

## 4 INCI 名称、中文名称、CAS 号

INCI名称：TREMELLA POLYSACCHARIDE

中文名称：银耳多糖

CAS号：9075-53-0

## 5 要求

### 5.1 鉴别

产品经糖醛酸反应呈紫红色。

### 5.2 感官要求

应符合表1的规定。

表1 感官要求

项目	要求
色泽	白色或类白色
气味	略有特殊性气味或无味
状态	粉末或颗粒

### 5.3 理化指标

应符合表2的规定。

表2 理化指标

项目	指标
葡萄糖醛酸含量/%	≥18.0
总糖含量/%	≥90.0
干燥失重/%	≤10.0
炽灼残渣/%	≤10.0
pH值（0.5%水溶液，25℃）	5.5~8.0
透光率（1mg/mL，660nm）/%	≥99.0
平均相对分子质量	实测值
蛋白质含量/%	≤0.1
重金属（以Pb计）/(mg/kg)	≤20

#### 5.4 卫生指标

应符合表3的规定。

表3 卫生指标

项目	指标
菌落总数/(CFU/g)	≤200
霉菌和酵母菌总数/(CFU/g)	≤100
金黄色葡萄球菌/g	不得检出
铜绿假单胞菌/g	不得检出

## 6 试验方法

### 6.1 感官检验

取适量样品均匀置于清洁、干燥的白瓷盘中，在自然光下，观察其色泽和状态，嗅其气味。

### 6.2 理化指标

#### 6.2.1 葡萄糖醛酸含量

按照附录A规定的方法进行检验。

#### 6.2.2 总糖含量

按照附录B规定的方法进行检验。

#### 6.2.3 干燥失重

按照《中华人民共和国药典》四部（2020年版）通则0831干燥失重测定法进行检验。

#### 6.2.4 炽灼残渣

按照《中华人民共和国药典》四部（2020年版）通则0841炽灼残渣检查法进行检验。

#### 6.2.5 pH值

称取供试品0.50g，置300mL的三角瓶中，加重蒸水100mL，振摇使样品悬浮到溶液中，用保鲜膜封口，50℃水浴振摇至完全溶解为均一溶液，冷却至室温，用经校验合格的pH计检测。

#### 6.2.6 透光率

称取供试品0.10g，置300mL的锥瓶中，加纯化水100mL，振摇使样品悬浮到溶液中，用保鲜膜封口，50℃水浴振摇至完全溶解为均一溶液，冷却至室温，按紫外-可见分光光度计法检测600nm处的透光率值。

#### 6.2.7 平均相对分子质量

按照附录C规定的方法进行检验。

### 6.2.8 蛋白质含量

按照《中华人民共和国药典》四部（2020年版）通则0731 蛋白质含量测定法 第五法进行检验。

### 6.2.9 重金属

按照《中华人民共和国药典》四部（2020年版）通则0821 重金属检查法 第二法进行检验。

### 6.3 卫生指标

菌落总数、霉菌和酵母菌总数、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌按照附录 D 规定的方法进行检验。

## 7 检验规则

### 7.1 出厂检验

7.1.1 产品经出厂检验合格，附产品合格证后方可出厂。

7.1.2 出厂检验项目：感官、葡萄糖醛酸含量、总糖含量、干燥失重、炽灼残渣、pH 值、透光率、蛋白质、菌落总数、霉菌和酵母菌总数。

### 7.2 型式检验

型式检验项目为本文件第4章要求的所有项目，若发生下列情况之一时，应进行型式检验：

- a) 正常生产情况下每年应不少于一次检验；
- b) 设备或工艺更改时；
- c) 生产场地转移时；
- d) 产品停产六个月及以上后恢复生产时；
- e) 出厂检验结果与上次型式检验有较大差异时；
- f) 国家质量监督机构提出型式检验要求时。

### 7.3 组批和采样

7.3.1 以同一班次，同一条生产线生产的包装完好的同一种产品为一组批。

7.3.2 按 GB/T 6678 中的规定进行采样和确定采样单元数。检验取 3 份试样，其中 1 份作试样检测，另 2 份密封后保存以备复查。

### 7.4 判定规则

若检验结果不符合本文件要求，应重新加倍取样检验，复验结果如仍有不符合本文件要求的，则整批产品判定为不合格品。复验结果如符合本文件要求，则整批产品判定为合格品。

## 8 标志、包装、运输、贮存和保质期

### 8.1 标志

产品包装应采用鲜明的标签。标签的内容应包括：生产厂名、厂址、产品名称、规格、净含量、生产批号或生产日期、贮存条件、保质期。

### 8.2 包装

产品应装入适当的包装容器内，密封。每件包装量可根据用户的要求而定。包装应符合运输和贮存的规定。

### 8.3 运输

产品在运输过程中应避免日晒雨淋、受潮，搬运装卸应小心轻放，严禁碰撞，防止包装破损，严禁与有毒有害或其他有污染的物品以及具有氧化性的物质混装、混运。

### 8.4 贮存

产品应密封贮存，防止日晒、雨淋、受潮，严禁与有毒有害的物品混贮。

#### 8.5 保质期

在规定的运输和贮存条件下，产品包装完整和未经启封的情况下，保质期按销售包装标注执行。

**附录 A**  
**(规范性)**  
**葡萄糖醛酸含量的测定**

**A.1 仪器及用具**

- A.1.1 紫外-可见分光光度计。
- A.1.2 电子天平，精确度0.01g和0.0001g。
- A.1.3 往复式恒温振荡水浴摇床。
- A.1.4 电陶炉。
- A.1.5 旋涡混合器。
- A.1.6 真空干燥箱。
- A.1.7 移液管：10mL。
- A.1.8 量瓶：100mL。
- A.1.9 移液器：0.2mL、1mL、5mL。
- A.1.10 具塞试管25mL。
- A.1.11 称量瓶、干燥器、烧杯、计时器。

**A.2 试剂及试液**

- A.2.1 葡萄糖醛酸标准品。
- A.2.2 硼砂硫酸溶液：称取四硼酸钠9.54g，溶于1000mL浓硫酸中。
- A.2.3 咔唑试液：精密称取咔唑0.125g，溶于100mL无水乙醇中，置棕色瓶中保存。
- A.2.4 葡萄糖醛酸标准贮备液B：精密称取经105℃真空干燥至恒重的葡萄糖醛酸标准品100mg，放入100mL量瓶中，加水溶解稀释至刻度，摇匀。
- A.2.5 葡萄糖醛酸标准溶液：用移液管吸取5mL葡萄糖醛酸标准贮备液B至100mL量瓶中加纯化水稀释至刻度，即得约50 μg/mL的葡萄糖醛酸标准溶液。

**A.3 操作****A.3.1 供试液的制备**

称取供试品0.1g[按干燥品计：根据供试品干燥失重(h)，计算出所需样品的质量 $W_1=0.1 \times 100 / (100-h)$ ，精确到0.001g]，置于100mL量瓶中，加纯化水50mL~70mL，振摇使样品悬浮到溶液中，置50℃水浴摇床中溶解。溶解为均一溶液后，取出冷却至室温，用纯化水稀释至刻度，混匀后转入烧杯中。称取约5.0g ( $W_2$ ，精确到0.01g) (密度约为1.00g/mL，即相当于5.0mL)，置50mL量瓶中，加水稀释至刻度，摇匀，即得供试液。

**A.3.2 标准曲线的制备**

精密量取葡萄糖醛酸标准溶液0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mL，分别置25mL具塞试管中，各加水至1.0mL，混匀，冰浴中冷却，缓缓加入已置冰浴中冷却的硼砂硫酸溶液5.0mL，密塞，混匀，沸水浴加热10分钟，冰浴中冷却至室温。精密加入咔唑试液0.2mL，混匀，置沸水浴中加热15分钟，冰浴中冷却至室温。用紫外-可见分光光度计，在530nm的波长处测定吸光度，以葡萄糖醛酸的浓度对相应的吸光度计算回归方程(回归相关系数 $r > 0.990$ )。

**A.3.3 供试液的测定**

**A.3.3.1** 取2支具塞试管，分别加入供试液各1mL，另取一支25mL的具塞试管加入纯化水1mL作为空白样，混匀，冰浴中冷却，缓缓加入已置冰浴中冷却的硼砂硫酸溶液5.0mL，密塞，混匀，沸水浴加热10分钟，冰浴中冷却至室温。精密加入咔唑试液0.2mL，混匀，置沸水浴中加热15分钟，冰浴中冷却至室温。

**A.3.3.2** 用紫外-可见分光光度计，在530nm的波长处测定吸光度，将测得的吸光度带入回归方程，求

出供试液中葡萄糖醛酸的浓度  $C_1$ 。

#### A.3.4 计算公式

按下式计算葡萄糖醛酸含量  $X_G$

$$X_G = \frac{C_1 \times 50 \times 100 \times 100 \times 10^{-6}}{W_1 \times (100 - h) \times W_2} \times 100\% \dots\dots\dots (A. 1)$$

式中：

$X_G$ ：葡萄糖醛酸含量，单位为%；

$C_1$ ：用回归方程计算出的供试液中葡萄糖醛酸浓度，单位为  $\mu\text{g/mL}$ ；

$W_1$ ：称取的供试品质量，单位为g；

$W_2$ ：第二步稀释供试液的称取量，单位为g；

$h$ ：干燥失重，%；

## 附录 B (规范性) 银耳多糖中总糖的测定

### B.1 原理

游离的单糖或寡糖、多糖中的己糖、戊糖、糖醛酸(或甲苯衍生物)可以在浓硫酸作用下,脱水生成糠醛或羟甲基糠醛,与苯酚缩合成一种橙黄色化合物,在一定范围内其颜色深浅(可见光区域内的吸光度)与糖的浓度成正比,己糖在490nm波长下(戊糖及糖醛酸在480nm)有最大吸收峰,故可用比色法在相应波长下测定,并以标准单糖的标准曲线计算样品中总糖的含量。

### B.2 仪器和设备

B.2.1 电子天平:精确度为0.01g和0.0001g。

B.2.2 紫外-分光光度计。

B.2.3 旋涡振荡器。

B.2.4 电陶炉。

### B.3 试剂和试液

B.3.1 80%苯酚:取重蒸苯酚80g(精确至0.01g),加水20mL,置于棕色瓶中,4℃下储存,可长期使用。

B.3.2 6%苯酚:临用时以80%苯酚配制(以质量分数计)。

B.3.3 甘露糖标准储备液:准确称取预先烘干至恒重的甘露糖25.0mg(精确至0.0001g),置于500mL容量瓶中,加蒸馏水定容,摇匀,4℃下储存,可长期使用。

B.3.4 浓硫酸:分析纯。

### B.4 甘露糖标准曲线的制备

分别取甘露糖标准储备液0、0.8mL、1.0mL、1.2mL、1.4mL、1.6mL、1.8mL置于具塞试管,分别以蒸馏水补至2.0mL,分别加入6%苯酚溶液1.0mL,摇匀,室温条件下,移液管悬空垂直加入6.0mL浓硫酸,静置10min,用旋涡振荡器混合均匀,置于沸水浴反应30min,反应结束后于冰水浴冷却至室温。在波长490nm处测定吸光度值,以吸光度值为纵坐标,甘露糖的含量(μg)为横坐标,绘制标准曲线。

### B.5 总糖含量的测定

精确称取样品约0.03g(精确到0.0000 1g),置于500mL容量瓶中,加蒸馏水定容至500mL,摇匀,静至2h,待用。

吸取2.0mL上述溶液,置于具塞试管中,每个样品进行3个平行测试,以2.0mL水按同样显色操作作为空白对照。同标准曲线的制备方法,在490nm的波长处测定吸光度,根据样品测得的吸光度值,从标准曲线中查出相应的甘露糖的含量。

### B.6 结果计算

总糖含量计算方法见式A.1。

$$X = \frac{C_1 \times 500 \times f}{m \times (1-h) \times 2 \times 10^6} \times 100\% \dots\dots\dots (B.1)$$

式中:

X: 总糖含量,单位为%;

C<sub>1</sub>: 根据样品测得的吸光度,从标准曲线上查出的甘露糖的含量,单位为μg;

M: 样品质量,单位为kg;

H: 样品水分含量,单位%;

F: 银耳多糖相当于甘露糖的换算因子: 1.25。

### B.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5%。

#### B.8 实验注意事项

实验注意事项如下：

- a) 每次测定样品时必须平行做 3 份试验，以提高试验的准确度；
- b) 样品反应结束后应严格控制冰水浴时间，保证每次测定样品的冰水浴时间和制定标准曲线时冰水浴时间一致，为提高试验的准确度，控制冰水浴时间为 3min；
- c) 试验所用标准曲线要注意及时进行更新，尤其是试验所用浓硫酸更换时应重新制定标准曲线；
- d) 试验所用 6%苯酚应现配现用。

**附录 C**  
**(规范性)**  
**平均相对分子质量的测定**

**C.1 仪器与用具**

C.1.1 电子天平，精确度0.01g和0.0001g。

C.1.2 恒温槽。

C.1.3 往复式恒温振荡水浴摇床。

C.1.4 乌氏黏度计、秒表、5mL移液枪。

**C.2 试液**

C.2.1 0.2mol/L氯化钠溶液：称取氯化钠11.69g，置1000mL量瓶中，加水溶解并稀释至刻度，摇匀，即得。

**C.2.2 供试液的制备：**

- a) 取供试品 0.1g（以干燥品计，另外该称样量不确定，当特性黏数低于 3.0dL/g 或平均相对分子质量低于 10 万时应增加称样量），精密称定 ( $W_1$ )，置 100ml 量瓶中，加入 0.2mol/L 氯化钠溶液 60~70mL，振摇使本品混悬于溶液中，置 50℃ 的恒温水浴摇床中振摇至完全溶解。取出，充分振摇使混合均匀，冷却至室温，加 0.2mol/L 氯化钠溶液稀释至刻度，摇匀；
- b) 取上述溶液适量 ( $W_2$ )（注：该称样量不确定，根据测定的供试液的流出时间调整）至 50 mL 量瓶中，加 0.2mol/L 氯化钠溶液稀释至刻度，摇匀，作为供试液；
- c) 对于每一供试品，应平行制备两份供试液。

**C.3 测定****C.3.1 溶剂流出时间 ( $t_0$ ) 的测定：**

- a) 润洗过程：取 0.2mol/L 氯化钠溶液适量（不少于 7ml），沿洁净、干燥的乌氏黏度计的宽管内壁注入储液球（B 球）中，将侧管管口接一乳胶管，夹住管口的胶管，自主管口处抽气，使液面缓缓升到缓冲球（C 球）的顶部，用洗耳球将溶液吹下，将溶液沿宽管倒出。重复润洗至少两次；
- b) 测定过程：取 0.2mol/L 氯化钠溶液适量，沿洁净、干燥的乌氏黏度计（见图 1）的宽管内壁注入储液球（B 球）中，使液面在储液球（B 球）两刻度线之间，将黏度计垂直固定于恒温水浴槽内（水浴温度  $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ ），并使水浴液面高于缓冲球（C 球），放置 15 分钟。将侧管管口的胶管夹住，自主管口处抽气，使供试液的液面缓缓升高到缓冲球（C 球）的中部，先放开乳胶管，再放开吸耳球，使供试液在管内自然下落，用秒表准确记录液面自测定线  $m_1$  下降到  $m_2$  处的流出时间（应大于 100 秒）；重复测定至少两次，两次测定值相差不得超过 0.2 秒，取两次的平均值为溶剂溶液的流出时间 ( $t_0$ )。

**C.3.2 供试液流出时间 ( $t_1$ ) 的测定：**

- a) 润洗过程：取供试液，按照溶剂流出时间 ( $t_0$ ) 的润洗过程操作，重复润洗至少两次；
- b) 测定过程：取供试液，按照溶剂流出时间 ( $t_0$ ) 的测定过程操作，重复测定至少两次，两次测定值相差不得超过 0.2 秒，取两次的平均值为供试液的流出时间 ( $t_1$ )。 $t_1/t_0$  应在 1.3~1.5 之间，否则应调整供试液浓度后再测；

C.3.3 乌氏黏度计的清洗：将乌氏黏度计按照溶剂润洗过程的方法先用 0.2mol/L 氯化钠溶液清洗两次，再用纯化水润洗两次，倒置悬挂在黏度计架上，自然晾干。

**C.4 计算****C.4.1 按下式计算供试液浓度C**

$$C = \frac{W_1 \times W_2 \times (100 - h)}{100 \times 50 \times \rho^{25}} \dots\dots\dots (C. 1)$$

式中:

C: 供试液浓度, 单位为 g/dL;

h: 供试品的干燥失重, 单位为 %;

$\rho^{25}$ : 供试液在 25℃ 的密度 (1.000g/mL), 单位为 g/mL;

W<sub>1</sub>: 称取供试品的质量, 单位为 g;

W<sub>2</sub>: 称取供试液的质量, 单位为 g。

#### C. 4. 2 按下式计算特性粘数 $[\eta]$

$$[\eta] = \frac{\sqrt{2\left[\left(\frac{t_1}{t_0} - 1\right) - \ln\frac{t_1}{t_0}\right]}}{C} \dots\dots\dots (C. 2)$$

式中:

$[\eta]$ : 特性粘数, 单位为 dL/g;

t<sub>1</sub>: 供试液的平均流出时间, 单位为 s;

t<sub>0</sub>: 溶剂的平均流出时间, 单位为 s;

C: 供试液的浓度 (按干燥品计算), 单位为 g/dL。

#### C. 4. 3 按下式由特性黏数计算平均相对分子质量Mr

$$Mr = \left( \frac{[\eta] \times 10^5}{36} \right)^{\frac{1}{0.78}} \dots\dots\dots (C. 3)$$

式中:

$[\eta]$ : 特性粘数, 单位为 dL/g。

#### C. 5 记录和结果要求

记录测定时间、样品溶解时间、测量温度、各次称量数据、流出时间等; 两次平行测定结果的相对平均偏差不得过 5%; 结果取两次平行测定结果的平均值。

**附录 D**  
**(规范性)**  
**微生物的测定**

**D.1 菌落总数、霉菌和酵母菌测定**

**D.1.1 仪器及用具**

- D.1.1.1 生化培养箱。
- D.1.1.2 霉菌培养箱。
- D.1.1.3 冷冻恒温振荡器。
- D.1.1.4 电子天平,精确度为0.01g。
- D.1.1.5 双人单面净化工作台。
- D.1.1.6 锥形瓶、灭菌平皿(直径90mm)、灭菌药勺、酒精灯。

**D.1.2 培养基和试液**

- D.1.2.1 培养基:卵磷脂吐温80营养琼脂培养基、孟加拉红琼脂培养基。
- D.1.2.2 试液:灭菌生理盐水。

**D.1.3 测定**

**D.1.3.1 供试品制备**

称取供试品0.1g(精确到0.01g),置于100ml的灭菌生理盐水中,在40~42℃振荡器中振荡至溶解,作为供试液。

**D.1.3.2 菌落总数测定**

制备正常浓度2倍的卵磷脂吐温80营养琼脂培养基100ml,121℃灭菌15min后,待温度下降至46℃~50℃时,向培养基中加入溶解好的供试液,振荡混匀后,然后倒入灭菌的平皿中,待培养基凝固后,置于36±1℃培养箱中培养48±2h。计数平板上的菌落总数。

**D.1.3.3 霉菌和酵母菌测定**

制备正常浓度2倍的孟加拉红琼脂培养基100ml,121℃15min灭菌后,待温度下降至46~50℃时,向培养基中加入溶解好的供试液,振荡混匀后,然后倒入灭菌的平皿中,待培养基凝固后,置于28±1℃培养箱中培养72±2h。计数平板上的霉菌和酵母菌数。

**D.1.3.4 阴性对照**

分别取制备正常浓度2倍的卵磷脂吐温80营养琼脂培养基和孟加拉红琼脂培养基10ml,分别向培养基中加入10ml生理盐水,振荡混匀后,然后倒入灭菌的平皿中,待培养基凝固后,作为阴性对照。阴性对照不应有菌生长。

**D.1.4 菌落计数及报告方法**

- D.1.4.1 以相当于1g供试品的菌落数报告菌数。若平板上无菌落生长,以小于10CFU/g报告菌数;若平板上有菌落生长,以实际菌落数乘以10报告菌数。
- D.1.4.2 其他情况按《化妆品安全技术规范》2015年版中菌落计数及报告方法的规定,进行菌落计数及报告。

**D.2 金黄色葡萄球菌的测定**

**D.2.1 仪器及用具**

- D.2.1.1 显微镜。

D. 2. 1. 2 电子天平，精确度为 0. 1g。

D. 2. 1. 3 生化培养箱。

D. 2. 1. 4 双人单面净化工作台。

D. 2. 1. 5 灭菌试管、灭菌吸管、载玻片、酒精灯、锥形瓶、灭菌平皿（直径 90mm）、接种环、灭菌药勺。

## D. 2. 2 培养基和试液

D. 2. 2. 1 培养基：SCDLP 液体培养基、Baird Parker 琼脂基础培养基、血琼脂培养基、甘露醇发酵培养基、脑心浸出液肉汤。

D. 2. 2. 2 试剂：冻干兔血浆、香柏油、革兰氏染色试剂盒。

## D. 2. 3 测定

### D. 2. 3. 1 增菌培养

称取供试品 1. 0g，接种至 200ml 的 SCDLP 液体培养基中，置于  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  培养箱中培养 22~26h。

### D. 2. 3. 2 分离

自上述增菌培养液中，取 1~2 接种环，划线接种在 Baird Parker 琼脂基础培养基或血琼脂平板培养基上，置  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  培养 48h。在血琼脂平板上菌落呈金黄色，圆形，不透明，表面光滑，周围有溶血圈。在 Baird Parker 琼脂基础培养基上为圆形，光滑，凸起，湿润，颜色呈灰色到黑色，边缘为淡色，周围为一混浊带，在其外层有一透明带。用接种针接触菌落似有奶油树胶的软度。若发现可疑菌，挑取单个菌落分纯在血琼脂平板上，置  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  培养  $24 \pm 2\text{h}$ 。

### D. 2. 3. 3 染色镜检

挑取分纯菌落，涂片，进行革兰氏染色，镜检。金黄色葡萄球菌为革兰氏阳性菌，排列成葡萄状，无芽胞，无夹膜，致病性葡萄球菌，菌体较小，直径约为  $0. 5 \mu\text{m} \sim 1 \mu\text{m}$ 。

d 甘露醇发酵试验：取上述分纯菌落接种到甘露醇发酵培养基中，在培养基液面上加入高度 2~3mm 的灭菌液体石蜡，置  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  培养  $24 \pm 2\text{h}$ ，金黄色葡萄球菌应能发酵甘露醇产酸。

### D. 2. 3. 4 血浆凝固酶试验

挑取至少 5 个可疑菌落（小于 5 个全选），分别接种到 5ml BHI 和营养琼脂小斜面， $36 \pm 1^\circ\text{C}$ ，培养 18~24h。取冻干兔血浆，每支西林瓶中加入 0. 5ml 灭菌生理盐水轻微摇晃至完全溶解，然后加入 BHI 培养物 0. 2~0. 3ml，充分混合后，置  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  培养箱中，每半小时观察一次，观察 6h，如呈现凝固（即倾斜或倒置时，呈现凝块）或凝固体积大于原体积的一半，被判定为阳性结果。否则为阴性结果。同时以已知血浆凝固酶阳性和阴性菌株的肉汤培养物作为对照。结果如可疑，挑取营养琼脂小斜面的菌落到 5ml BHI， $36 \pm 1^\circ\text{C}$ ，培养 18~48h，重复试验。

## D. 2. 4 检验结果报告

凡在上述选择平板上有可疑菌落生长，经染色镜检，证明为革兰氏阳性葡萄球菌，并能发酵甘露醇产酸，血浆凝固酶试验阳性者，可报告被检样品检出金黄色葡萄球菌。

## D. 3 铜绿假单胞菌的测定

### D. 3. 1 仪器及用具

D. 3. 1. 1 显微镜。

D. 3. 1. 2 电子天平，精确度为 0. 01g。

D. 3. 1. 3 生化培养箱。

D. 3. 1. 4 双人单面净化工作台。

D. 3. 1. 5 灭菌试管、载玻片、酒精灯、锥形瓶（300ml）、灭菌平皿（直径 90mm）、无菌玻璃棒、接种针、接种环、灭菌药勺。

### D. 3. 2 培养基、试剂和试液

D.3.2.1 培养基：SCDLP 液体培养基、十六烷三甲基溴化铵琼脂、绿脓菌素测定培养基、硝酸盐蛋白胨水培养基、明胶培养基、营养琼脂培养基。

D.3.2.2 试剂和试液：革兰氏染色试剂盒、氧化酶试剂（1%二甲基对苯二胺试液）、氯仿、1mol/L 的盐酸。

### D.3.3 测定

#### D.3.3.1 增菌培养

称取供试品1.0g，接种至200mL的SCDLP液体培养基中，置于 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养18~24h。如有铜绿假单胞菌生长，培养液表面多有一层薄菌膜，培养液常呈黄绿色或蓝绿色，则进行分离培养。

#### D.3.3.2 分离

从培养液的薄膜处挑取培养物，划线接种在十六烷三甲基溴化铵琼脂平板上，置 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养18~24h。凡铜绿假单胞菌在此培养基上，其菌落扁平无定型，向周边扩散或略有蔓延，表面湿润，菌落呈灰白色，菌落周围培养基常扩散有水溶性色素。发现可疑的菌落应进行染色镜检。

#### D.3.3.3 染色镜检

挑取可疑的菌落，涂片，革兰氏染色，镜检为革兰氏阴性者应进行氧化酶试验。

#### D.3.3.4 氧化酶试验

取一小块洁净的白色滤纸片放在灭菌平皿内，用无菌玻璃棒挑取铜绿假单胞菌可疑菌落涂在滤纸片上，然后在其上滴加一滴新配制的1%二甲基对苯二胺试液，在15~30s之内，出现粉红色或紫红色时为氧化酶试验阳性；若培养物不变色，为氧化酶试验阴性。

#### D.3.3.5 绿脓菌素试验

取可疑菌落2~3个，分别接种在绿脓菌素测定培养基上，置 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\pm 2\text{h}$ ，加入氯仿3~5mL，充分振荡使培养物中的绿脓菌素溶解于氯仿液内，待氯仿提取液呈蓝色时，用吸管将氯仿移到另一试管中并加入1mol/L 的盐酸1mL左右，振荡后，静置片刻。如上层盐酸液内出现粉红色到紫红色时为阳性，表示被检物中有绿脓菌素存在。

#### D.3.3.6 硝酸盐还原产气试验

挑取可疑的铜绿假单胞菌纯培养物，接种在硝酸盐蛋白胨水培养基中，置 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\pm 2\text{h}$ ，观察结果。凡在硝酸盐蛋白胨水培养基内的小倒管中有气体者，即为阳性，表明该菌能还原硝酸盐，并将亚硝酸盐分解产生氮气。

#### D.3.3.7 明胶液化试验

取铜绿假单胞菌可疑菌落的纯培养物，穿刺接种在明胶培养基内，置 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\pm 2\text{h}$ ，取出放置于 $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ 冰箱10~30min，如仍呈溶解状或表面溶解时即为明胶液化试验阳性；如凝固不溶者为阴性。

#### D.3.3.8 $42^{\circ}\text{C}$ 生长试验

挑取可疑的铜绿假单胞菌纯培养物，接种在普通琼脂斜面培养基上，放在 $42\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养箱中，培养24~48h，铜绿假单胞菌能生长，为阳性，而近似的荧光假单胞菌则不能生长。

### D.3.4 检验结果报告

被检样品经增菌分离培养后，经证实为革兰氏阴性杆菌，氧化酶及绿脓菌素试验皆为阳性者，即可报告被检样品中检出铜绿假单胞菌；如绿脓菌素试验阴性而液化明胶、硝酸盐还原产气和 $42^{\circ}\text{C}$ 生长试验三者皆为阳性时，仍可报告被检样品中检出铜绿假单胞菌。

### 参 考 文 献

- [1] T/SFABA 3—2018 银耳多糖产品中多糖含量的测定
  - [2] T/SFABA 4—2018 银耳多糖
  - [3] 《化妆品安全技术规范》（2015年版）
  - [4] 《中华人民共和国药典》（2020年版）
-