

附件 2

# 化妆品防腐挑战测试 评估技术指南

中国食品药品检定研究院

# 目 录

1. 范围.....	1
2. 术语和定义.....	1
3. 设备和材料.....	1
4. 培养基和试剂.....	2
5. 测试菌株.....	3
6. 测试方法.....	3
7. 说明.....	10
附 录 A.....	11

## 1.范围

本指南规定了化妆品防腐效能的评价方法。

本指南适用于化妆品防腐体系效能评价。

## 2.术语和定义

### 2.1 防腐效能评价试验

将一定量的微生物人工污染到化妆品中，模拟化妆品可能出现的污染情况，每隔一定时间检测其中的存活菌量，根据存活菌量的变化评价化妆品防腐体系效能的试验方法。

### 2.2 中和剂

可添加至化妆品和微生物混和物中，消除化妆品中抑菌或杀菌成分对微生物抑制或杀灭作用的试剂。

## 3.设备和材料

3.1 A2 型生物安全柜。

3.2 高压蒸汽灭菌器。

3.3 天平：感量为 0.1g。

3.4 恒温培养箱： $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、 $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

3.5 均质器。

3.6 无菌吸管：1mL(具 0.01mL 刻度)、10mL(具 0.1mL 刻度)或微量移液器及吸头。

3.7 显微镜。

3.8 酸度计。

3.9 涡旋混匀器。

3.10 灭菌平皿：直径 90mm。

3.11 无菌玻璃棉。

#### 4.培养基和试剂

4.1 0.85%生理盐水。

4.2 卵磷脂吐温 80 营养琼脂培养基，见附录 A.1。

4.3 虎红（孟加拉红）培养基，见附录 A.2。

4.4 含 0.05%(v/v)聚山梨酯 80 的生理盐水，见附录 A.3。

4.5 胰酪大豆胨琼脂培养基（TSA），见附录 A.4。

4.6 沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA)，见附录 A.5。

4.7 SCDLP 液体培养基，见附录 A.6。

4.8 Eugon LT 100 肉汤，见附录 A.7。

4.9 D/E 中和肉汤，见附录 A.8。

4.10 改良 Lethen 肉汤，见附录 A.9。

## 5.测试菌株

### 5.1 细菌

金黄色葡萄球菌 CMCC (B) 26003

大肠埃希氏菌 CMCC (B) 44102

铜绿假单胞菌 CMCC (B) 10104

### 5.2 真菌

黑曲霉 CMCC (F) 98003

白色念珠菌 CMCC (F) 98001

在进行化妆品防腐效能评价试验时，可根据需要增加其他相关细菌或真菌作为测试菌株。

## 6.测试方法

### 6.1 供试品微生物检测

取不少于 2 份包装完好的供试化妆品样品，依据《化妆品安全技术规范》第五章微生物检验方法中微生物检验方法总则、菌落总数、霉菌和酵母菌检验方法对样品进行检测，检测结果应符合《化妆品安全技术规范》中的限值规定。供试品微生物检测的结果记作  $N_f$ 。

## 6.2 微生物悬液制备

### 6.2.1 细菌悬液制备

用接种环从菌种保存管中（或试管斜面上）取适量菌体，分区划线接种于 TSA 平板， $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  培养 18 h~24 h。用接种环取第 1 代培养物，分区划线接种于 TSA 平板， $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  培养 18 h~24 h。挑取上述第 2 代培养物中典型菌落，分区划线接种于 TSA 平板， $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  培养 18 h~24 h，即为第 3 代培养物。用无菌棉签取菌苔加入无菌生理盐水中，涡旋混匀。用无菌生理盐水将其稀释成约  $10^7$  CFU/mL~ $10^8$  CFU/mL 的菌悬液。制备好的菌悬液应在 2 h 内使用，或在  $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$  保存不超过 24 h。

### 6.2.2 白色念珠菌菌悬液的制备

用接种环从菌种保存管中（或试管斜面上）取适量菌体，分区划线接种于 SDA 平板， $28^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  培养 48 h~72 h。用接种环取第 1 代培养物，分区划线接种于 SDA 平板， $28^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  培养 48 h~72 h。挑取上述第 2 代培养物中典型菌落，分区划线接种于 SDA 平板， $28^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  培养 48 h~72 h，即为第 3 代培养物。

用无菌棉签取菌苔加入无菌生理盐水中，涡旋混匀。用无菌生理盐水将其稀释成约  $10^6$  CFU/mL~ $10^7$  CFU/mL 的菌悬液。制备好的菌悬液应在 2 h 内使用，或在  $2^{\circ}\text{C}$ ~ $8^{\circ}\text{C}$  保存不超过 24 h。

### 6.2.3 黑曲霉孢子悬液的制备

用接种环从菌种保存管中（或试管斜面上）取适量的菌体，分区划线接种于 SDA 平板上， $28^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  培养 3 d~7 d。用无菌棉签取菌苔加入含 0.05% (v/v) 聚山梨酯 80 无菌生理盐水中，制备孢子悬液，轻轻振摇 1 min 后，用无菌玻璃棉过滤除去菌丝。用含 0.05% (v/v) 聚山梨酯 80 无菌生理盐水将其稀释成约  $10^6$  CFU/mL~ $10^7$  CFU/mL 的孢子悬液。制备好的孢子悬液应当天使用或在  $2^{\circ}\text{C}$ ~ $8^{\circ}\text{C}$  保存不超过 7 d，使用前混合均匀，并在显微镜下观察是否有孢子出芽，若有孢子出芽，则弃之不用。

表 1 测试菌株培养条件

	培养基	培养温度	培养时间
金黄色葡萄球菌 CMCC (B) 26003	TSA	$36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$	18 h~24 h
大肠埃希氏菌 CMCC (B) 44102	TSA	$36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$	18 h~24 h
铜绿假单胞菌 CMCC (B) 10104	TSA	$36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$	18 h~24 h
黑曲霉 CMCC (F) 98003	SDA	$28^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$	3 d~7 d
白色念珠菌 CMCC (F) 98001	SDA	$28^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$	48 h~72 h

注：实验室增加的其他测试菌株可参考以上细菌及真菌的培养温度和时间进行培养。使用的工作菌株培养物传代不可超过 5 次。

## 6.3 中和剂效果验证试验

### 6.3.1 工作菌悬液制备

用稀释液将上述菌悬液（或使用商业冻干菌株）10倍系列稀释至  $10^3$  CFU/mL，用于中和剂效果验证。

### 6.3.2 试验分组

每种测试菌株的中和剂效果验证试验应分别进行。

试验分为以下三组，按如下方法进行染菌。

试验组：将 1 g(mL)供试品加入 9 mL 中和剂中，混匀，室温放置  $30\text{min}\pm 15\text{min}$ ，使其充分作用；

中和剂对照组：将 1 mL 稀释液加入 9 mL 中和剂中，混匀，室温放置  $30\text{min}\pm 15\text{min}$ ；

菌液对照组：10 mL 稀释液。

在以上三组中，分别加入 6.3.1 中制备的工作菌悬液各 1mL。

### 6.3.3 培养与计数

分别对试验组、中和剂对照组和菌液对照组进行平板计数，每组接种两个平皿，按照表 1 的要求进行培养。各组计数结果取平均值，试验组计数结果记作  $N_{vf}$ ，中和剂对照组计数结果记作  $N_{vn}$ ，菌液对照组计数结果记作  $N_v$ ，6.1 中供试品微生物检测的结果记作  $N_f$ 。

### 6.3.4 结果判定

当  $N_{vn} / N_v$  接近（如  $0.5 \leq N_{vn} / N_v \leq 2$ ），并且  $(N_{vf} - N_f) / N_{vn}$

≥0.5 时，判定中和剂有良好的中和效果，通过中和效果验证。

若供试品测试未能通过中和效果验证，可以更换中和剂或增加中和剂用量。可选用的中和剂请参考附录 A.6 ~ A.9，或根据需求选择适宜的中和剂进行中和效果验证。

## 6.4 供试品防腐挑战测试

### 6.4.1 供试品染菌

防腐挑战试验采用单一菌种染菌的测试方式，即分别用每种测试菌株的菌悬液人工污染供试品，每隔一定时间检测其中的存活菌量，根据存活菌量的变化判断化妆品防腐体系效能。

分别取 6.2 中制备的菌液，加入装有不少于 20 g(mL)供试品原包装中，或加入装有 20 g(mL)供试品的适宜容器中，充分混匀，菌液的接种体积应不超过供试品体积的 1%。细菌的染菌浓度为  $10^5$  CFU/g(mL)~ $10^6$  CFU/g(mL)，真菌的染菌浓度为  $10^4$  CFU/g(mL)~ $10^5$  CFU/g(mL)。染菌后的样品放置于  $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  培养箱中，分别在 7、14 和 28 天检测其中的存活菌量，分别计作  $N_x$  ( $X=7, 14, 28$ ) (详见 6.4.4 中对时间点的规定)。

### 6.4.2 计数方法

放置至规定时间后，取 1 g (mL) 染菌样品，加入 9 mL 经 6.3 验证有效的中和剂中 (样品的稀释倍数应参考 6.3 中和剂和样品的稀释倍数，并与其保持一致，保证样品中的抑菌成分可以被有效中和)，充分混匀。室温中和  $30\text{min}\pm 15\text{min}$  后，吸

取 2 mL 样液，分别注入到两个灭菌平皿内，每皿 1 mL。将 45°C~50°C 的相应培养基（详见表 1）15 mL~ 20 mL 倾注到平皿内，充分混匀，凝固后按要求进行倒置培养、计数。如平板上预期生长菌落数较多，可进行 10 倍系列稀释，选择适宜的稀释度进行平板计数，或选用平板涂布法进行上述试验。

计数结果计算方法和报告方式可参考《化妆品安全技术规范》第五章 2.菌落总数检验方法和 6.霉菌和酵母菌检验方法。

#### 6.4.3 计算方法

化妆品防腐效能评价用供试品中存活菌量常用对数减少值 ( $R_x$ ) 作为评价指标，计算方式见式 (1):

$$R_x = \lg N_0 - \lg N_x \dots \dots \dots (1)$$

式中:

$N_0$ ——供试品初始染菌量。

$N_x$ ——不同检测时间，供试品中存活菌量。

#### 6.4.4 结果判定

表 2 化妆品防腐挑战结果判定原则

不同取样时间供试品中存活菌量常用对数减少值 ( $R_x = \lg N_0 - \lg N_x$ ) <sup>a</sup>								
	细菌			白色念珠菌			黑曲霉	
	T7	T14	T28	T7	T14	T28	T14	T28
判定标准 A	≥3	≥3 且 NI <sup>b</sup>	≥3 且 NI	≥1	≥1 且 NI	≥1 且 NI	≥0 <sup>c</sup>	≥1 且 NI
判定标准 B	- <sup>d</sup>	≥3	≥3 且 NI	-	≥1	≥1 且 NI	≥0	≥0 且 NI

a. 在防腐效能测试中，可接受偏差范围为 0.5 log;  
 b. NI: 与上一时间点的计数结果相比，差异未超过 0.5 log;  
 c.  $N_x$  与初始染菌量  $N_0$  相比，差异未超过 0.5 log 时， $R_x=0$ ;  
 d. “-”表示无需进行测试。

—判定标准 A, 适用于不考虑其它控制因素条件下, 产品配方能有效防止可能会对消费者构成潜在安全风险微生物增殖的产品。

—判定标准 B, 适用于除产品组方因素外, 对微生物污染采取了经风险评估有效的其他控制方式的产品, 如采用特定包装等手段控制微生物污染。

## 7.说明

化妆品注册人、备案人可以依据国家标准、技术规范、行业标准、国际标准、本技术指南或自建方法开展相关研究，并在安全评估报告中提交相关测试或者评估结论。

## 附录 A

### (规范性附录)

#### 培养基和试剂

##### A.1 卵磷脂吐温 80 营养琼脂培养基

成分：蛋白胨	20.0 g
牛肉膏	3.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
卵磷脂	1.0 g
吐温 80	7.0 g
水	1000 mL

制法：先将卵磷脂加到少量蒸馏水中，加热溶解，加入吐温 80，将其他成分（除琼脂外）加到其余的蒸馏水中，溶解。加入已溶解的卵磷脂、吐温 80，混匀，必要时调节 pH，加入琼脂，121°C 高压灭菌 20min。灭菌后的培养基在 25°C 的 pH 值为 7.2±0.2。

##### A.2 虎红（孟加拉红）培养基

成分：蛋白胨	5.0 g
葡萄糖	10.0 g
磷酸二氢钾	1.0 g
硫酸镁（含 7H <sub>2</sub> O）	0.5 g
琼脂	20.0 g
1/3000 虎红溶液 （四氯四碘荧光素）	100 mL
水	1000 mL
氯霉素	100 mg

制法：将各成分（除虎红和氯霉素外）加入蒸馏水或纯化水中，搅拌溶解后，加入虎红溶液，必要时调节 pH。121℃ 高压灭菌 20min，另用少量乙醇溶解氯霉素，溶解过滤后加入培养基中，若无氯霉素，使用时每 1000mL 加链霉素 30mg。灭菌后的培养基在 25℃ 的 pH 值为 7.2±0.2。

#### A.3 含 0.05%(v/v)聚山梨酯 80 的生理盐水

成分：氯化钠	8.5g
聚山梨酯 80	0.5g
水	1000mL

制法：将各成分加入蒸馏水或纯化水中，搅拌后加热溶解，必要时调节 pH。121℃ 高压灭菌 20min，灭菌后的培养基在 25℃ 的 pH 值为 7.0±0.2。

#### A.4 胰酪大豆胨琼脂培养基（TSA）

成分：胰酪胨	15.0g
大豆蛋白胨	5.0g
氯化钠	5.0g
琼脂	15.0g
水	1000mL

制法：将各成分加入蒸馏水或纯化水中，搅拌后加热溶解，必要时调节 pH。121℃ 高压灭菌 15min，灭菌后的培养基在 25℃ 的 pH 值为 7.3±0.2。

#### A.5 沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA)

成分：蛋白胨	5.0g
酪蛋白胨	5.0g
葡萄糖	40.0g
琼脂	15.0g
水	1000mL

制法：将各成分加入蒸馏水或纯化水中，搅拌后加热溶解，必要时调节 pH。121°C 高压灭菌 15min，灭菌后的培养基在 25°C 的 pH 值为 5.6±0.2。

#### A.6 SCDLP 液体培养基

成分：胰酪胨	17.0g
大豆蛋白胨	3.0g
氯化钠	5.0g
磷酸氢二钾	2.5g
葡萄糖	2.5g
卵磷脂	1.0g
吐温 80	7.0g
水	1000mL

制法：将各成分加入蒸馏水或纯化水中，搅拌后加热溶解，必要时调节 pH。121°C 高压灭菌 20min，灭菌后的培养基在 25°C 的 pH 值为 7.2±0.2。

#### A.7 Eugon LT 100 肉汤

成分：胰蛋白胨	15.0g
大豆蛋白胨	5.0g
氯化钠	4.0g
L-胱氨酸	0.7g
亚硫酸钠	0.2g
葡萄糖	5.5g
卵磷脂	1.0g
吐温 80	5.0g
辛基酚聚醚-9	1.0g
水	1000mL

制法：将各成分加入蒸馏水或纯化水中，搅拌后加热溶解，

必要时调节 pH。121°C高压灭菌 15min，灭菌后的培养基在 25°C的 pH 值为 7.0±0.2。

#### A.8 D/E 中和肉汤

成分：酵母浸粉	2.5g
胰蛋白胨	5.0g
葡萄糖	10.0g
亚硫酸氢钠	2.5g
卵磷脂	7.0g
硫代硫酸钠	6.0g
溴甲酚紫	0.02g
硫乙醇酸钠	1.0g
吐温 80	5.0g
水	1000mL

制法：将各成分加入蒸馏水或纯化水中，搅拌后加热溶解，必要时调节 pH。121°C高压灭菌 15min，灭菌后的培养基在 25°C的 pH 值为 7.6±0.2。

#### A.9 改良 Lethen 肉汤

成分：牛肉浸粉	5.0g
氯化钠	5.0g
卵磷脂	0.7g
吐温 80	5.0g
酵母浸粉	2.0g
亚硫酸氢钠	0.1g
酪蛋白胰酶水解物	5.0g
肉类胃蛋白酶水解物	20.0g
水	1000mL

制法：将各成分加入蒸馏水或纯化水中，搅拌后加热溶

解，必要时调节 pH。121°C 高压灭菌 15min，灭菌后的培养基在 25°C 的 pH 值为 7.2±0.2。

以上培养基也可选用商品化干粉或预制培养基。