

T/GDCA

广东省化妆品学会团体标准

T/XXX XXXX—XXXX

化妆品防腐功效多次加菌试验评价方法

Test method for evaluation of cosmetic preservative efficacy by multiple addition of bacteria

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

发布

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 实验原理	1
5 实验准备	1
5.1 仪器设备	1
5.2 培养基	2
5.3 测试菌株（或等效菌株）	2
5.4 其他试剂（应符合微生物试验无菌操作的相关要求）	2
5.5 菌悬液的制备（麦氏比浊法）	2
6 样品无菌检测	3
7 中和剂效果验证试验	3
7.1 工作菌悬液的制备	3
7.2 试验分组	3
7.3 培养、计数要求	3
7.4 结果判断	3
8 防腐功效多次加菌试验	3
8.1 加菌方式	3
8.2 受试样品的制备	4
8.3 试验用混合菌悬液的制备及计数	4
8.4 样品接菌及培养	4
8.5 样品检测与分析	4
8.6 评判标准	4
附录 A（资料性） 培养基与试剂制备	6
A.1 生理盐水	6
A.2 吐温-80 生理盐水（0.5g/L）	6
A.3 大豆酪蛋白琼脂培养基（TSA）	6
A.4 沙氏葡萄糖琼脂培养基（SDA）	6
A.5 SCDLP 液体培养基	6
A.6 Eugon LT 100 肉汤	7
A.7 D/E 中和肉汤	7
A.8 改良 Letheen 肉汤	7
A.9 0.5%氯化三苯四氮唑（2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride, TTC）	7
附录 B（资料性） 防腐剂和洗涤剂抗菌活性中和剂实例	8

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××××提出。

本文件由××××归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

化妆品防腐功效多次加菌试验评价方法

1 范围

本文件规定了化妆品防腐功效多次加菌试验评价方法的术语和定义、实验原理、实验准备、样品无菌检测、中和剂效果验证试验、防腐功效多次加菌试验。

本文件适用于以水为外相/水溶性或水混溶性的等常见化妆品的防腐功效评价。

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。

国际标准化组织 ISO 11930 Cosmetics-Microbiology-Evaluation of the antimicrobial protection of a cosmetic production

欧洲药典 EP <11.0> 5.1.3 Efficacy of Antimicrobial Preservation

美国个人护理产品协会 PCPC Microbiology Guidelines

美国药典-国家处方集 通则 51

《化妆品安全技术规范》

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

标准菌株 (type culture strain/reference strain)

国内或国际菌种保藏机构保藏的、遗传学特性得到确认和保证并可追溯的菌株。

4 实验原理

根据化妆品生产和消费者使用过程中可能存在的污染（一次污染和二次污染），在产品中加入定量的标准菌株，每隔一定时间测量微生物的存活数量，计算菌株的对数减少值，并将其与评判标准进行比较，来评判抑菌剂的防腐效果。

5 实验准备

5.1 仪器设备

5.1.1 生物安全柜；

5.1.2 超净工作台；

5.1.3 高压蒸汽灭菌锅；

5.1.4 恒温干燥箱；

5.1.5 恒温培养箱：32.5℃±2.5℃，22.5℃±2.5℃；

5.1.6 电子天平；

5.1.7 水浴锅；

5.1.8 移液枪；

5.1.9 过滤器；

5.1.10 冰箱；

5.1.11 培养皿；（直径为 90 mm）

5.1.12 酒精灯；

- 5.1.13 显微镜；
5.1.14 漩涡振荡器。

5.2 培养基

- 5.2.1 大豆酪蛋白琼脂培养基（TSA）；
5.2.2 沙氏葡萄糖琼脂培养基（SDA）；
5.2.3 SCDLP 液体培养基；
5.2.4 Eugon LT 100 肉汤；
5.2.5 D/E 中和肉汤；
5.2.6 改良 Letheen 肉汤。

5.3 测试菌株（或等效菌株）

- 5.3.1 大肠埃希氏菌（ATCC 8739）；
5.3.2 铜绿假单胞菌（ATCC 9027）；
5.3.3 金黄色葡萄球菌（ATCC 6538）；
5.3.4 白色假丝酵母（ATCC 10231）
5.3.5 巴西曲霉（ATCC 16404）；
5.3.6 洋葱伯克霍尔德氏菌（ATCC 25416）；
5.3.7 恶臭假单胞菌（ATCC 17485）。

注：用于测试的工作菌株传代次数不得超过五代。

注：企业可根据实际需求，自行添加其他菌株按本方法进行试验和评价。

5.4 其他试剂（应符合微生物试验无菌操作的相关要求）

- 5.4.1 氯化三苯四氮唑（TTC）；
5.4.2 聚山梨酯-80（吐温-80）；
5.4.3 生理盐水；
5.4.4 吐温-80 生理盐水（0.5g/L）。

5.5 菌悬液的制备（麦氏比浊法）

菌悬液的制备只对活化至3-5代的培养物进行说明，不涉及前期菌种购买、活化及传代过程。

5.5.1 麦氏比浊管的制备

在微生物学中，通过比对溶液浊度，麦氏比浊管常用来校对细菌悬浮液至某个特定浓度。例如在医药学领域常见的微生物抗药物敏感性试验中，用来测量最小抑菌浓度。麦氏比浊管是通过混合特定浓度的氯化钡和硫酸，从而形成硫酸钡悬浮液。如表1，麦氏比浊管不同管号的配比。

麦氏比浊管的配比见表1。

表1 麦氏比浊管的配比

管号 (McFarland)	0.5	1	2	3	4	5
0.25% BaCl ₂ (mL)	0.2	0.4	0.8	1.2	1.6	2.0
1% H ₂ SO ₄ (mL)	9.8	9.6	9.2	8.8	8.4	8.0
细菌的近似浓度 (×10 ⁸ mL)	1	3	6	9	12	15

注：也可用其他方法如定量小球、分光光度法进行菌悬液制备。

5.5.2 细菌菌悬液的制备

取第3-5代培养物，吸取适量的无菌生理盐水加入斜面试管内，反复吹洗，洗下菌苔。将洗液转移至另一无菌试管中，涡旋混匀20 s。用无菌生理盐水将细菌与麦氏比浊管比对稀释成约 10^7 CFU/mL~ 10^8 CFU/mL的菌悬液，建议与2号管比对。制备好的菌悬液应在2 h内使用。

5.5.3 白色假丝酵母菌悬液的制备

取第3-5代培养物，吸取适量的无菌生理盐水加入斜面试管内，反复吹洗，洗下菌苔。将洗液转移至另一无菌试管中，涡旋混匀20 s。用无菌生理盐水将白色假丝酵母稀释成 10^6 CFU/mL~ 10^7 CFU/mL的菌悬液，建议使用分光光度计或细胞计数器（如血细胞计数器）来调整酵母数量。制备好的菌悬液应在2 h内使用。

5.5.4 巴西曲霉孢子悬液的制备

取第3-5代培养物，吸取适量的吐温-80生理盐水（制备方法见附录A.2）加入斜面试管内，刮洗巴西曲霉孢子于溶液中。将孢子悬液转移至装有玻璃珠的无菌三角瓶中，轻轻振摇1 min后，用无菌过滤器过滤除去菌丝。过滤后用吐温-80生理盐水将其稀释成约 10^6 CFU/mL~ 10^7 CFU/mL的孢子悬液，建议使用细胞计数器（如血细胞计数器）来调整孢子数量。制备好的孢子悬液应当在同一工作日内使用。

6 样品无菌检测

6.1 按《化妆品安全技术规范》第五章微生物检验方法2菌落总数检验方法和6霉菌和酵母菌检验方法执行。

6.2 最终得到含菌落总数、霉菌酵母菌总数均 <10 CFU/g (mL) 的样品。

7 中和剂效果验证试验

7.1 工作菌悬液的制备

用稀释液将上述 10^7 CFU/mL~ 10^8 CFU/mL细菌菌悬液和 10^6 CFU/mL~ 10^7 CFU/mL的真菌菌悬液10倍系列稀释至 10^3 CFU/mL，用于中和剂效果验证。

7.2 试验分组

7.2.1 试验组：将1 g(mL)的样品加入到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，共制备3份；

7.2.2 中和剂对照组：用1 mL稀释液加入9 mL中和剂中，室温放置 $30\text{ min}\pm 15\text{ min}$ ，作为中和剂对照组，共制备3份；

7.2.3 菌液对照组：取10 mL生理盐水作为菌液计数组，共制备3份；

7.2.4 在以上三组中，分别加入7.1中制备的工作菌悬液各1 mL。

7.3 培养、计数要求

分别对试验组、中和剂对照组和菌液对照组进行平板计数，每组进行双平行实验。细菌培养基为TSA， $32.5\text{ }^\circ\text{C}\pm 2.5\text{ }^\circ\text{C}$ 培养3 d~5 d；真菌培养基为SDA， $22.5\text{ }^\circ\text{C}\pm 2.5\text{ }^\circ\text{C}$ 培养3 d~7 d。

7.4 结果判断

7.4.1 若试验组菌落总数回收率达到菌液对照组计数（平均值）的50%至200%之间，说明中和剂有效；

7.4.2 若中和剂对照组菌落总数回收率达到菌液对照组计数（平均值）的50%至200%之间，说明中和剂毒性可接受；

7.4.3 以上结果若超出范围，应更换合适的中和剂重新验证。

8 防腐功效多次加菌试验

8.1 加菌方式

多次加菌指加菌次数在两次以上（含两次）的加菌试验。采用细菌混合、真菌混合加菌方式。

8.2 受试样品的制备

每个样品至少称取两份各30 g于两个无菌容器中，备用。

8.3 试验用混合菌悬液的制备及计数

8.3.1 菌悬液制备

将 10^7 CFU/mL~ 10^8 CFU/mL的单一细菌菌悬液按1:1混合，制成试验用细菌混合菌悬液，将 10^6 CFU/mL~ 10^7 CFU/mL的单一真菌菌悬液按1:1混合，制成试验用真菌混合菌悬液。

8.3.2 试验用菌悬液的计数

分别将制备好的试验用细菌、真菌混合菌悬液用生理盐水制成1:10稀释液，以此类推，梯度稀释 $1:10^2$ ~ $1:10^7$ ；选取 $1:10^5$ 、 $1:10^6$ 、 $1:10^7$ 等浓度梯度进行平板计数，计算混合菌悬液中细菌菌落总数和真菌菌落总数，即为初始加菌浓度。若初始混合菌悬液浓度不在加菌要求范围内，则样品需重新加菌测试。

8.4 样品接菌及培养

分别在分装好的样品中加入 $\leq 1\%$ 样品量的试验用细菌、真菌混合菌悬液，使得样品中细菌的含量为 10^5 CFU/g (mL)~ 10^6 CFU/g (mL)，真菌的含量为 10^4 CFU/g (mL)~ 10^5 CFU/g (mL)。将样品与菌悬液充分混匀。置于 $22.5\text{ }^\circ\text{C}\pm 2.5\text{ }^\circ\text{C}$ 的培养箱中培养。

8.5 样品检测与分析

8.5.1 检测节点

在每次加菌后的第7 d、14 d取样检测。

8.5.2 样品稀释

取1 g检样注入到9 mL中和稀释液中，充分混合，制成1:10的溶液。可根据需要多梯度稀释，如制成1:100，1:1000，1:10000等。

8.5.3 平板倾注

取适宜梯度的稀释液分别取1 mL注入到无菌平皿内，每个稀释液共计2个平皿，细菌用大豆酪蛋白琼脂培养基（TSA），于 $32.5\text{ }^\circ\text{C}\pm 2.5\text{ }^\circ\text{C}$ 培养3 d~5 d；真菌用沙氏葡萄糖琼脂培养基（SDA），于 $22.5\text{ }^\circ\text{C}\pm 2.5\text{ }^\circ\text{C}$ 培养3 d~7 d。

8.5.4 计算公式

化妆品的防腐效果可以以菌落数的对数减少值（ 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 ——初始接菌浓度；

N_x ——样品在不同检测时间节点的菌落数。

8.6 评判标准

每次加菌后的第7 d、14 d对数减少值均应满足表二中规定方可评判为通过，如有一个节点未达到要求，即该次测试结果评判为不通过，具体要求见表二。

评判标准见表2。

表 2 评判标准

对数减少值 ($R_X = \lg N_0 - \lg N_X$)		
每次加菌后	细菌	真菌
7 d	≥ 1	不增加
14 d	≥ 3	≥ 2

附录 A
(资料性)
培养基与试剂制备

A.1 生理盐水

配方（每升）

氯化钠	9.0 g
蒸馏水或去离子水	1000 mL

制法：搅拌至完全溶解，分装后121℃高压灭菌15 min。

A.2 吐温-80 生理盐水（0.5g/L）

配方（每升）

氯化钠	9.0 g
蒸馏水或去离子水	1000 mL

制法：加入0.5 g吐温-80搅拌至完全溶解，分装后121℃高压灭菌15 min。

A.3 大豆酪蛋白琼脂培养基（TSA）

配方（每升）

胰酪胨	15.0 g
大豆木瓜蛋白酶水解物	5.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
最终pH	7.3±0.2

制法：称取本品40 g，加入蒸馏水或去离子水1L，搅拌加热煮沸至完全溶解后分装，121℃高压灭菌15 min。

A.4 沙氏葡萄糖琼脂培养基（SDA）

配方（每升）

动物组织胃蛋白酶水解物和胰酪胨等量混合物	10.0 g
葡萄糖	40.0 g
琼脂	15.0 g
pH值（25℃）	5.6±0.2

制法：称取本品65.1 g，加入蒸馏水或去离子水1L，搅拌加热煮沸至完全溶解，分装后121℃高压灭菌15 min。

A.5 SCDLP 液体培养基

配方（每升）

酪蛋白胨	17.0 g
大豆蛋白胨	3.0 g
磷酸氢二钾	10 g
氯化钠	5.0 g
葡萄糖	2.5 g
卵磷脂	1.0 g
吐温80	7.0 g
最终pH	7.2±0.2

使用方法：称取本品38 g，加入蒸馏水或去离子水1L，搅拌加热煮沸至完全溶解，分装试管或三角瓶，121℃高压灭菌20 min。

A.6 Eugon LT 100 肉汤

配方（每升）

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

制法：称取本品37.4 g，加热溶解于1000 mL蒸馏水或去离子水中，121℃高压灭菌15 min，备用。

A.7 D/E 中和肉汤

配方（每升）

胰酪胨	5.0 g
酵母膏粉	5.0 g
葡萄糖	10.0 g
巯基乙醇酸钠	1.0 g
硫代硫酸钠	6.0 g
亚硫酸氢钠	2.5 g
卵磷脂	7.0 g
溴甲酚紫	0.02 g
最终pH	7.6±0.2

制法：称取本品34 g，加入蒸馏水或去离子水1L和5 g吐温-80，搅拌加热煮沸至完全溶解；121℃高压灭菌15 min。

A.8 改良 Letheen 肉汤

配方（每升）

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

制法：称取本品43.8 g，加热溶解于1000 mL蒸馏水或去离子水中，分装；121℃高压灭菌15 min。

A.9 0.5%氯化三苯四氮唑（2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride, TTC）

成分：TTC	0.5 g
蒸馏水	100 mL

制法：溶解后过滤除菌，或115℃高压灭菌20 min，装于棕色试剂瓶，置4℃冰箱备用。

附录 B
(资料性)
防腐剂和洗涤剂抗菌活性中和剂实例

防腐剂	能够中和防腐剂抗菌活性的化学物质	合适的中和剂和清洗液（用于膜过滤方法）
酚类物质 对羟基苯甲酸酯、苯氧乙醇、苯乙醇等 苯胺类	卵磷脂 聚山梨醇酯80 脂肪醇环氧乙烷缩合物 非离子表面活性剂	聚山梨醇酯80, 30克/升+卵磷脂, 3克/升 脂肪醇环氧乙烷缩合物, 7克/升+卵磷脂, 20克/升+聚山梨醇酯80, 4克/升 D/E中和肉汤; SDCLP 肉汤b 清洗液: 蒸馏水; 胰蛋白胍, 1克/升+氯化钠, 9克/升; 聚山梨醇酯80, 5克/升
季铵盐 阳离子表面活性剂	卵磷脂、皂苷、聚山梨醇酯80、 十二烷基硫酸钠 脂肪醇环氧乙烷缩合物	聚山梨醇酯80, 30克/升+ 十二烷基硫酸钠, 4克/升+卵磷脂, 3克/升 聚山梨醇酯80, 30克/升+皂素, 30克/升+卵磷脂, 3克/升 D/E 中和肉汤; SDCLP 肉汤b 清洗液: 蒸馏水; 胰蛋白胍, 1克/升+氯化钠, 9克/升; 聚山梨醇酯80, 5克/升
醛类 甲醛生成剂	甘氨酸、组氨酸	卵磷脂, 3克/升+聚山梨醇酯80, 30克/升+L-组氨酸, 1克/升 聚山梨醇酯80, 30克/升+皂甙, 30克/升+L-组氨酸, 1克/升+L-半胱氨酸, 1克/升 D/E中和肉汤; SDCLP 肉汤b 清洗液: 聚山梨醇酯80, 3克/升+L-组氨酸 0.5克/升
氧化剂	硫代硫酸钠	硫代硫酸钠, 5克/升 清洗液: 硫代硫酸钠, 3克/升
异噻唑啉酮类咪唑类化合物	卵磷脂、皂苷、硫酸盐、硫醇、 亚硫酸氢钠、硫代乙醇酸钠	聚山梨醇酯80, 30克/升+皂素, 30克/升+卵磷脂, 3克/升 清洗液: 胰蛋白胍, 1克/升+氯化钠, 9克/升; 聚山梨醇酯80, 5克/升
双胍类	卵磷脂、皂苷、聚山梨醇酯80	聚山梨醇酯80, 30克/升+皂素, 30克/升 +卵磷脂, 3克/升 清洗液: 胰蛋白胍, 1克/升+氯化钠, 9克/升; 聚山梨醇酯80, 5克/升
金属盐（铜、锌、汞） 有机巯基化合物	亚硫酸氢钠、L-半胱氨酸 巯基化合物、硫代乙醇酸	硫代乙醇酸钠, 0.5克/升或5克/升 半胱氨酸, 0.8克/升或1.5克/升 D/E中和肉汤; SDCLP肉汤b 清洗液: 巯基乙酸钠, 0.5克/升
a、Dey/Engley中和肉汤 b、含有卵磷脂和聚山梨醇酯80的大豆酪蛋白消化液		