

ICS 71.100.70
C2682
Y42

团 体 标 准

T/SHRH 017-2019

全国团体标准信息平台

化妆品防腐挑战试验

Antimicrobial Effectiveness Testing of Cosmetics

全国团体标准信息平台

2019-03-22 发布

2019-04-01 实施

上海日用化学品行业协会 发布

目 次

前言.....	2
1. 范围.....	3
2. 规范性引用文件.....	3
3. 生物安全措施和防污染措施.....	3
4. 术语和定义.....	3
5. 仪器和设备.....	4
6. 试剂和材料.....	4
7. 操作步骤.....	5
8. 结果判断.....	5
附录 A 培养基和试剂.....	7
附录 B 常见中和剂参考表.....	9

前 言

本标准按照GB/T1.1-2009给出规则起草。

本标准由上海日用化学品行业协会提出和归口。

本标准起草单位：上海海关食品中心、上海家化联合股份有限公司、上海东晟源日化有限公司、上海天祥质量技术服务有限公司、上海轻工业研究所有限公司、上海日用化学品行业协会。

本标准主要起草人：刘夏、李晓虹、王传现、曹平、陈园园、陈田、谢坤、王革、李琮、陈逸君、金坚、陈亦华

化妆品防腐挑战试验

1 范围

本部分规定了化妆品防腐性能的检测评价方法。

本部分适用于液体类、乳液类、膏霜类等常见化妆品的防腐体系性能测试，其他产品也可根据用途选择采用。

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，仅所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。

化妆品安全技术规范（2015 版）

消毒技术规范（2002 版）

GB/T 6682-2008 分析实验室用水规格和试验方法

GB 19489-2008 实验室生物安全通用要求

GB4789.28-2013 食品安全国家标准 食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求

3 生物安全措施和防污染措施

3.1 生物安全措施

为了保护实验室人员的安全，应由具备资格的工作人员进行检测，所有培养物和废弃物应参照 GB 19489 中的有关规定执行。

3.2 防污染措施

防止污染措施应符合 GB/T 27403 的规定。

4 术语和定义

4.1 防腐挑战试验

即微生物挑战性实验：将一定量的微生物加入到化妆品中，模拟化妆品中可能出现的污染情况，每隔一定时间对其中的活菌量进行检测，以活菌增减量判断化妆品防腐体系效能的实验方法。

4.2 中和剂（neutralizer）

在微生物杀灭试验中，用以消除试验微生物与杀菌剂的混悬液中和微生物表面上残留的杀菌剂，使其失去对微生物抑制和杀灭作用的试剂。

4.3 中和产物（product of neutralization）

指中和剂与杀菌剂作用后的产物。

5 仪器和设备

5.1 水浴锅：48℃±2℃。

5.2 移液器：量程 0.5 μL~10 μL；量程 10 μL~100 μL；量程 100 μL~1000 μL 及无菌吸头。

5.3 无菌吸管，10.0 mL（具 0.1 mL 刻度）或移液器及吸头。

5.4 离心机：2000 g；

5.5 显微镜；

5.6 三角瓶（200mL）；

5.7 玻璃试管（18 mm×180mm）；

5.8 恒温培养箱：32.5℃±2.5℃ 22.5℃±2.5℃。

5.9 电子天平。

5.10 生物安全柜。

- 5.11 计时器。
- 5.12 比浊仪。
- 5.13 涡旋振荡器。

6 试剂和材料

除另有规定外，所有试剂均为分析纯或生化试剂。

- 6.1 实验用水：应符合 GB/T 6682 中一级水的规格。
- 6.2 磷酸盐缓冲液（PBS）：0.03 mmol/L，pH 8.0，见附录 A.1。
- 6.3 营养琼脂培养基：见附录 A.2。
- 6.4 沙氏琼脂培养基（SDA）：见附录 A.3。。
- 6.5 Eugon LT 100 肉汤：见附录 A.4。
- 6.6 D/E 中和肉汤（Dey/Engley 中和肉汤）：见附录 A.5。
- 6.7 改良 Letheen 肉汤：见附录 A.6。
- 6.8 胰蛋白胨大豆琼脂（TSA）：见附录 A.7。
- 6.9 试验菌株：金黄色葡萄球菌（ATCC 6538）、大肠埃希氏菌（ATCC 25922）、铜绿假单胞菌（ATCC 15442）、白色假丝酵母菌（ATCC 10231）、黑曲霉菌（ATCC16404）。

7 操作步骤

7.1 菌液制备

- 7.1.1 白色假丝酵母菌菌液的制备：从保存好的试管斜面上（或菌种保存管中）取适量的菌体或菌种吸附小磁珠接种于沙氏葡萄糖琼脂斜面，28℃±2℃，培养 18-24 h。用接种环取第 1 代培养物，划线接种于 SDA 平板，28℃±2℃，培养 18-24 h。挑取上述第 2 代培养物中典型菌落，划线接种于 SDA 琼脂斜面，28℃±2℃，培养 18-24 h，即为第 3 代培养物。吸取适量的无菌 PBS 缓冲液加入斜面试管内，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 PBS 缓冲液将其稀释成约 1.0×10^6 cfu/mL ~ 1.0×10^7 cfu/mL 的菌悬液。制备好的菌悬液应在 2 h 内使用，或在 2℃~8℃保存不超过 24 h。
- 7.1.2 铜绿假单胞菌\金黄色葡萄球菌\大肠杆菌菌液的制备：从保存好的试管斜面上（或菌种保存管中）取适量的菌体或菌种吸附小磁珠接种于胰蛋白胨大豆琼脂斜面，36℃±1℃，培养 18-24 h。用接种环取第 1 代培养物，划线接种于 TSA 平板，36℃±1℃，培养 18-24 h。挑取上述第 2 代培养物中典型菌落，划线接种于 TSA 琼脂斜面，36℃±1℃，培养 18-24 h，即为第 3 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。用无菌生理盐水将其稀释成约 1.0×10^7 cfu/mL ~ 1.0×10^8 cfu/mL 的菌悬液。制备好的菌悬液应在 2 h 内使用，或在 2℃~8℃保存不超过 24 h。
- 7.1.3 黑曲霉孢子悬液的制备：从保存好的试管斜面上（或菌种保存管中）取适量的菌体或菌种吸附小磁珠接种于马铃薯葡萄糖琼脂斜面，22.5℃±2.5℃，培养 7 d-11 d。吸取适量的无菌 0.05%(v/v) 吐温 80 生理盐水加入斜面试管内，刮洗黑曲霉分生孢子于溶液中。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，用无菌玻璃棉过滤除去菌丝。过滤后，显微镜下（400 倍）观察悬液中是否存在菌丝，若悬液中有菌丝存在，可经 2000 g，离心 20 min 除去菌丝。再次在显微镜下观察，若仍有菌丝存在，需再次离心。用无菌 0.05%(v/v) 吐温 80 生理盐水将其稀释成约 1.0×10^6 cfu/mL ~ 1.0×10^7 cfu/mL 的孢子悬液。制备好的孢子悬液应当天使用；或在 2℃~8℃保存不超过 2 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。

7.2 中和剂鉴定试验

- 7.2.1 每种试验菌株的中和剂鉴定试验应分别进行。
- 7.2.2 化学中和剂的选择：为了中和化妆品中的防腐剂，多采用 D/E 中和肉汤、Eugon LT 100 液体培养基或者改良 LETHEEN 肉汤。若中和效果不理想，可根据产品中添加的防腐剂类型，参考附录 B 进行选择。
- 7.2.3 化学中和剂鉴定流程
- 7.2.3.1 将 7.1 中准备的菌液 10 倍系列稀释至浓度为 1×10^3 cfu/mL 的菌悬液，用于中和鉴定试验。

7.2.3.2 将1 g或1 mL样品加入到9 mL中和剂中，彻底混匀，室温作用 30 ± 15 min，制成中和产物；若中和效果不理想，可用中和剂作为稀释液进行二次倍比稀释。将1 mL稀释液（PBS）加入到9 mL中和剂中，彻底混匀，室温作用 30 ± 15 min，作为对照组。

7.2.3.3 分别接种1 mL 7.2.3.1中制备的菌液至测试管（含10 mL中和产物）和对照管中，涡旋混匀。同时接种1 mL 7.2.3.1中制备的菌液至10 mL稀释液（PBS）中，作为阳性对照组。

7.2.3.4 分别对测试组、对照组和阳性对照组进行平板计数，每个稀释度进行双平行实验。细菌培养基为TSA， $36 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ，培养48 h；白色假丝酵母菌培养基为SDA， $28 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ，培养48–72 h。

7.2.3.5 对各组进行计数，测试组计数结果记作 N_{vf} ，对照组计数结果记作 N_{vn} ，阳性对照组计数结果记作 N_v 。当 N_{vn} 接近 N_v ，并且 $N_{vf} \geq 0.5N_{vn}$ 时，认为中和剂有效。

7.2.4 其余中和方法：除化学中和剂方法外，还可采用稀释法、过滤冲洗法对产品中残留的防腐剂进行中和，具体操作方法可参照《消毒技术规范》（2002版）2.1.1.4.3。采用稀释法时，应采取适当措施补偿活菌回收率灵敏度的降低，以避免假阴性结果（例如，可采用膜过滤计数法代替稀释液平板计数法）。

7.3 挑战试验

7.3.1 每种试验菌株的杀菌试验应分别进行。

7.3.2 挑战试验前应该先按照《化妆品安全技术规范》（2015版）第五章第2节“菌落总数检验方法”对样品进行“菌落总数”检测。

7.3.3 接种：取0.2 mL 7.1中制备的菌液，加入到装有20 g或20 mL样品的无菌塑料瓶中，彻底混合均匀。接种后的样品置于 $22.5 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2.5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养，分别在7，14，28天计数，分别计作 N_x （ $x=7, 14, 28$ ）。

7.3.4 计数：培养至特定时间后（7，14，21，28天），取1 mL或1 g接种后的样品，加入含有9 mL无菌中和剂的试管中，充分涡旋混匀。（若中和剂鉴定试验中，对样品进行百倍稀释后测定了中和剂的有效性，则接种后的样品进行计数时也应进行百倍稀释。）室温，与中和剂作用 30 ± 15 min后，分别吸取1.0 mL样液于2个无菌平皿中进行平板计数。如平板上生长菌落数较多，可进行10倍系列稀释，选择合适的稀释度进行平板计数。每个稀释度至少进行双平行计数。黑曲霉菌在 $22.5 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2.5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养3–5 d；铜绿假单胞菌\金黄色葡萄球菌\大肠杆菌和白色假丝酵母菌在 $32.5 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2.5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养48–72 h。

7.3.5 选取菌落数在30–300 cfu（细菌和白色假丝酵母菌）或者15–150 cfu（黑曲霉）的平板进行计数，并按照 $N_x = C/(V \cdot d)$ 计算样品中的活菌浓度（ C 代表计数平板上的菌落平均数； V 代表计数平板上的加菌样品接种量，一般为1 mL； d 代表计数平板对应的稀释倍数）。

7.3.5 除大肠杆菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌、黑曲霉外，还可根据产品具体情况，增加特定的试验菌，该试验菌可以代表产品最可能受到的生物污染。比如，在高糖分口服制剂（口腔用品）的防腐挑战试验中，推荐增加鲁氏接合酵母NCYC 381。

8 结果判断

参考表 1 对产品进行防腐效果评价。

表 1 化妆品防腐效果评价标准

对数减少值 R_x ($R_x = \lg N_0 - \lg N_x$) ^a								
菌种	细菌			白色假丝酵母菌			黑曲霉	
测试时间	T7	T14	T28	T7	T14	T28	T14	T28
标准 A	≥ 3	≥ 3 且 NI^b	≥ 3 且 NI^b	≥ 1	≥ 1 且 NI^b	≥ 1 且 NI^b	$\geq 0^c$	≥ 1 且 NI^b
标准 B	/	≥ 3	≥ 3 且 NI^b	/	≥ 1	≥ 1 且 NI^b	$\geq 0^c$	≥ 0 且 NI^b
a: 在防腐剂挑战试验中, 可接受的偏差范围为 $0.5\log$。 b: NI 表示 N_x 与前一测试时间点相比未增长。 c: 当 $\lg N_0 = \lg N_x$, 且 N_x 与初始浓度 N_0 相比未增长时, $R_x = 0$。								

附 录 A
(规范性附录)
培养基和试剂

A.1 0.03 mol/L磷酸盐缓冲液 (PBS)

A.1.1 制备

称取无水磷酸氢二钠 2.83g, 磷酸二氢钾1.36g, 加蒸馏水1000 mL, 待完全溶解后, 调pH至7.2~7.4
121 °C 高压蒸汽灭菌15 min。

A.2 营养琼脂培养基

A.2.1制备

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	5.0g
氯化钠	5.0g
琼脂	15.0g - 20.0g
蒸馏水	1000 mL

制 法: 除琼脂外其他成分溶解于蒸馏水中, 调pH至7.2~7.4, 然后加入琼脂, 加热溶解, 分装; 121°C
高压蒸汽灭菌15 min后备用。

A.3 沙氏琼脂培养基 (SDA)

A.3.1 制备

蛋白胨	10.0g
葡萄糖	40.0g
琼脂	20.0g
蒸馏水	1000 mL

制 法: 用 700m l蒸馏水将琼脂溶解, 300m L蒸馏水将葡萄糖与蛋白胨溶解, 混合上述两部分, 调
pH至5.6±0.2, 摇匀后分装, 115 °C压力蒸汽灭菌15 min; 使用前, 用过滤除菌方法加入0.1 g /L的氯
霉素或者0.03g /L的链霉素。

A.4 Eugon LT 100 肉汤

A.4.1 制备

酪蛋白胰酶消化物	15.0 g
大豆粉木瓜酶消化物	5.0 g
L-胱氨酸	0.7 g
氯化钠	4.0 g
亚硫酸钠	5.0 g
葡萄糖	0.2 g
卵磷脂	5.5 g
吐温80	5.0 g
辛苯聚醇—9	1.0 g
蒸馏水	1 000 .0mL

制 法: 将上述各成分, 吐温80, 辛苯聚醇—9以及卵磷脂依次加入到沸水中煮沸至完全溶解。待
溶液冷却后, 调节pH至7.0±0.2, 将培养基分装至合适容器中, 于121 °C高压灭菌 15 min。

A.5 D/E中和肉汤 (Dey/Engley 中和肉汤)

A.5.1 制备

葡萄糖	10.0 g
大豆磷脂	7.0 g
硫代硫酸钠	6.0 g
吐温 80	5.0 g
酪蛋白胰酶消化物	5.0 g
亚硫酸氢钠	2.5 g
酵母抽提物	2.5 g
硫代乙酸钠	1.0 g
溴甲酚紫	0.02 g
蒸馏水	1 000 .0mL

制 法：将上述各成分或脱水完全培养基依次加入水中加热至完全溶解，待溶液冷却后，调节 pH 至 7.0 ± 0.2 ，将培养基分装至合适容器中，于 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。

A.6 改良Lethen肉汤

A.6.1 制备

肉类胃蛋白酶消化物	20.0 g
酪蛋白胰酶消化物	5.0 g
浓缩牛肉汁	5.0 g
酵母抽提物	2.0 g
卵磷脂	0.7 g
吐温80	5.0 g
氯化钠	5.0 g
亚硫酸氢钠	0.1 g
蒸馏水	1 000 .0mL

制 法：将吐温80以及卵磷脂依次加入到沸水中煮沸至完全溶解，加热时混合其他成分溶解，轻轻混匀，避免泡沫。待溶液冷却后，调节pH至 7.2 ± 0.2 ，将培养基分装至合适容器中，于 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。

A.7 胰酪胨大豆琼脂培养基(TSA)

A.7.1 制备

酪蛋白胰酶消化物	15.0 g
大豆粉木瓜酶消化物	5.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 .0mL

制 法：除琼脂外其他成分溶解于蒸馏水中，调pH至 $7.2 - 7.4$ ，加入琼脂，加热溶解，分装； $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭菌15 min后备用。

附录 B 常见中和剂参考表

表B.1 防腐剂和洗涤液的中和剂抗菌性

杀菌剂类型	中和剂	中和剂和洗涤剂（膜过滤法）
酚类化合物：对羟苯甲酸酯， 苯氧乙醇，苯基乙醇等； 酰替苯胺	卵磷脂 吐温 80 脂肪醇环氧乙烷冷凝液 非离子型表面活性剂	中和剂：吐温 80, 30 g/L + 卵磷脂, 3 g/L 脂肪醇环氧乙烷冷凝液, 7 g/L + 卵磷脂, 20 g/L + 吐温 80, 4 g/L D / E 中和肉汤 ^a ；SDCLP 液体培养基 ^b 。 洗涤剂：蒸馏水；胰蛋白胍, 1 g/L + NaCl, 9 g/L；吐温 80, 5 g/L
季铵盐 阳离子表面活性剂	卵磷脂，皂素，吐温 80， 十二烷基磺酸钠(SDS) 脂肪醇环氧乙烷冷凝液	中和剂：吐温 80, 30 g/L + SDS, 4 g/L + 卵磷 脂, 3 g/L 吐温 80, 30 g/L + 皂素, 30 g/L + 卵磷脂, 3 g/L D / E 中和肉汤 ^a ； SDCLP 液体培养基 ^b 。 洗涤剂：蒸馏水；胰蛋白胍, 1 g/L + NaCl, 9 g/L；吐温 80, 5 g/L
醛 甲醛生成剂	甘氨酸，组氨酸	中和剂：卵磷脂, 3 g/L + 吐温 80, 30 g/L + L- 组氨酸, 1 g/L 吐温 80, 30 g/L + 皂素, 30 g/L + L-组氨酸， 1 g/L + L-半胱氨酸, 1 g/L D / E 中和肉汤 ^a ； SDCLP 液体培养基 ^b 。 洗涤剂：吐温 80, 3 g/L + L-组氨酸, 0.5 g/L
氧化剂	硫代硫酸钠	中和剂：硫代硫酸钠, 5 g/L 洗涤剂：硫代硫酸钠, 3 g/L
异噻唑啉酮 咪唑类	卵磷脂，皂素 胺，硫酸盐，硫醇，亚硫酸氢 钠，硫代乙酸钠	中和剂：吐温 80, 30 g/L + 皂素, 30 g/L + 卵 磷脂, 3 g/L 洗涤剂：胰蛋白胍, 1 g/L + NaCl, 9 g/L；吐 温 80, 5 g/L
双胍类	卵磷脂，皂素，吐温 80	中和剂：吐温 80, 30 g/L + 皂素, 30 g/L + 卵 磷脂, 3 g/L 洗涤剂：胰蛋白胍, 1 g/L + NaCl, 9 g/L；吐 温 80, 5 g/L
金属盐（铜，锌，汞） 有机汞	亚硫酸氢钠，L-半胱氨酸巯基 化合物，巯基乙酸	中和剂：硫代乙酸钠, 0.5 g/L 或 5 g/L L-半胱氨酸, 0.8 g/L 或 1.5 g/L D / E 中和肉汤 ^a ； SDCLP 液体培养基 ^b 。 洗涤剂：硫代乙酸钠, 0.5 g/L