

ICS 71.100.01
分类号:Y40

T/GDCDC

广东省日化商会团体标准

T/GDCDC 010-2019

化妆品防腐挑战性测试方法

Test method for the preservative challenge of cosmetics

2019 - 12 - 16 发布

2020 - 01-01 实施

广东省日化商会 发布

前 言

本标准按GB/T 1.1-2009《标准化工作导则 第1部分:标准的结构和编写规则》起草。

请注意本标准的某些内容可能涉及专利, 本标准的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由广东省日化商会提出和归口。

本标准起草单位:上海新高姿化妆品有限公司、广州中科检测技术服务有限公司、广州薇美姿实业有限公司、广东省微生物研究所(广东省微生物分析检测中心)、广东雅丽洁精细化工有限公司、广东博然堂生物科技有限公司、广东嘉丹婷日用品有限公司、广州市娇兰化妆品有限公司、广东芭薇生物科技股份有限公司、广东润洁日化有限公司、广东迪美生物技术有限公司、南京华狮新材料有限公司、拉芳家化股份有限公司、广东省日化商会。

本标准主要起草人:李雪竹、唐嘉雯、钟瑜、陈敏珊、孙廷丽、郑木创、张梅、王耀、曾小云、张娇、张忠伟、刘永龙、任传鹏、周生、刘丽红、卓琦。

本标准于2019年12月首次发布。

化妆品防腐挑战性测试方法

1 范围

本标准规定了化妆品的防腐效果测试方法，包括术语和定义、仪器及设备、培养基和试剂、生物菌株、实验步骤和结果计数及报告方法。

本标准适用于亲水性的膏、霜、乳、水剂等常见化妆品的防腐效果测试。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

防腐

采用化学或物理方法预防或抑制产品内微生物生长的过程。

2.2

防腐挑战性测试

在产品中接入若干种类，一定数量的微生物并定期检测样品中微生物的数量，根据数量的变化来评价其防腐效果。

3 仪器及设备

测试所需仪器及设备如下：

- a) 生物安全柜；
- b) 高压蒸汽灭菌锅；
- c) 冰箱：2℃-8℃；
- d) 培养箱：36℃±1℃、28℃±2℃；
- e) 恒温水浴锅；
- f) 振荡器；
- g) 天平：精确至 0.01g；
- h) pH 计；
- i) 移液器：容量 1mL、5mL 和 10mL；
- j) 灭菌试管：15×150mm；
- k) 灭菌培养皿：直径 90mm；
- l) 锥形瓶：容量 250mL；
- m) 玻璃珠；
- n) 玻璃棒；
- o) 均质器；

p) 离心机。

4 培养基和试剂

4.1 卵磷脂-吐温 80 营养琼脂培养基

4.1.1 成分

蛋白胨	20g
牛肉膏	3.0g
氯化钠	5.0g
琼脂	15.0g
卵磷脂	1.0g
吐温80	7.0g
蒸馏水	1000mL

4.1.2 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，用 1mol/L 氢氧化钠溶液或 1mol/L 盐酸溶液调节 pH 值至 7.1-7.4，分装，于 121℃ 高压灭菌 20 分钟。

4.2 沙氏琼脂培养基

4.2.1 成分

蛋白胨	10.0g
葡萄糖	40.0g
琼脂	15.0g
氯霉素	0.1g
蒸馏水	1000mL

4.2.2 制法

取上述成分混合，溶解，分装，于 115℃ 高压灭菌 15 分钟。

4.3 卵磷脂-吐温 80 沙氏琼脂培养基

4.3.1 成分

蛋白胨	10.0g
葡萄糖	40.0g
琼脂	15.0g
氯霉素	0.1g
卵磷脂	1.0g
吐温80	7.0g
蒸馏水	1000mL

4.3.2 制法

取卵磷脂加到少量蒸馏水中，加热溶解，加入吐温80；取除卵磷脂和吐温80外其他成分加到剩余的蒸馏水中，溶解，再加入已溶解的卵磷脂、吐温80，混匀，分装，于115℃高压灭菌15分钟。

4.4 营养琼脂

4.4.1 成分

蛋白胨	10.0g
牛肉膏粉	3.0g
氯化钠	5.0g
琼脂	15.0g
蒸馏水	1000mL

4.4.2 制法

取上述成分混合，溶解，用1mol/L氢氧化钠溶液或1mol/L盐酸溶液调节pH值至 7.3 ± 0.2 ，分装，于121℃高压灭菌15分钟。

4.5 生理盐水

称取氯化钠8.5g，蒸馏水加至1000mL，溶解，分装，于121℃高压灭菌20分钟。

4.6 0.5%氯化三苯四氮唑（TTC）

称取氯化三苯四氮唑粉末0.5g，加100mL蒸馏水溶解，过滤除菌或于115℃高压灭菌20分钟，装于棕色试剂瓶，置4℃冰箱备用。

5 生物菌株

菌株代数均不超过5代，可根据需求增加其他菌株作为实验菌株。可以使用加入世界菌种保藏联合会的菌种保藏机构提供的、与下述菌种等效的试验菌。

5.1 细菌

金黄色葡萄球菌ATCC6538，大肠杆菌ATCC8739，铜绿假单胞菌ATCC9027。

5.2 真菌

白色假丝酵母ATCC10231，巴西曲霉ATCC16404。

6 实验步骤

6.1 样品的背景微生物检查

6.1.1 从不少于2个包装单位的产品中共取10g或10mL，加入到装有玻璃珠的90mL灭菌生理盐水锥形瓶中，振荡20秒，或加入到装有90mL灭菌生理盐水的灭菌均质袋中，使用均质器拍打均质1-2分钟，混合后，制成1:10稀释液。

6.1.2 吸取稀释液4mL，分别注入到四个灭菌平皿内，每皿1mL。将45℃-50℃卵磷脂-吐温80营养琼脂培养基（每100mL卵磷脂-吐温80营养琼脂中加入1mL 0.5%TTC溶液）倾注到其中两个平皿内，另外两个平皿中倾注卵磷脂-吐温80沙氏琼脂培养基，每皿约15mL，随即转动平皿，使样品与培养基充

分混匀，待琼脂凝固后翻转平皿。

6.1.3 细菌培养条件：36℃±1℃，48小时±2小时，然后做菌落计数；真菌培养条件：28℃±2℃，5天，并于第3天起逐日¹⁾观察计数，以菌落未蔓延生长的最大天数结果报告。

6.2 ²⁾菌液制备

6.2.1 混合细菌悬液制备

6.2.1.1 将待测细菌分别接种到营养琼脂斜面上，于36℃±1℃培养18小时-24小时。

6.2.1.2 将5mL-10mL的生理盐水加入斜面试管内，反复吹吸洗下菌苔。

6.2.1.3 分别用移液器将每种菌悬液移至相应的无菌试管中，振荡20秒，混匀后，稀释至实验所需浓度 1×10^8 CFU/mL- 9×10^8 CFU/mL。

6.2.1.4 将每种细菌菌液稀释液按等体积混合，菌液制备后若在室温下放置，应在2小时内使用，若保存在2℃-8℃，可在24小时内使用。

6.2.1.5 取上述菌液1mL加入到9mL生理盐水试管中充分混匀，制成1:10稀释液，以此类推制成1:100，1:1000等适宜的稀释倍数。取2-3个适宜浓度稀释度的稀释液（一般取稀释度为1:100000，1:1000000和1:10000000的稀释液），每个稀释液取2mL，分别注入到两个灭菌平皿内，每皿1mL。

6.2.1.6 将45℃-50℃营养琼脂倾注到平皿内，每皿约15mL，随即转动平皿，使样品与培养基充分混匀，待琼脂凝固后，倒置于36℃±1℃培养箱内培养48小时±2小时，然后做菌落计数。

6.2.2 混合真菌悬液制备

6.2.2.1 将待测真菌分别接种到沙氏琼脂培养基斜面上（或根据菌种培养需求自定），其中，白色假丝酵母于28℃±2℃培养24小时-48小时，巴西曲霉于28℃±2℃培养5-7天。

6.2.2.2 将5mL-10mL的生理盐水加入斜面试管内，反复吹吸洗下菌苔。

6.2.2.3 分别用移液器将每种菌悬液移至相应的无菌试管中，振荡20秒，混匀后，制备成实验所需浓度 1×10^7 CFU/mL- 9×10^7 CFU/mL。

6.2.2.4 将每种真菌菌液按等体积混合，并使用100 μm细胞过滤器或无菌纱布过滤菌丝体，也可使用离心机离心获取孢子。菌液制备后可保存在2℃-8℃，并在验证过的贮存期内使用。

6.2.2.5 吸取上述菌液1mL加入到9mL生理盐水中充分混匀，制成1:10稀释液，以此类推制成1:100，1:1000等适宜的稀释倍数。取2-3个适宜浓度稀释度的稀释液（一般取稀释度为1:10000，1:100000，1:1000000的稀释液），每个稀释液取2mL，分别注入到两个灭菌平皿内，每皿1mL。

6.2.2.6 将45℃-50℃沙氏琼脂培养基（或根据菌种培养需求自定）倾注到平皿内，每皿约15mL，随即转动平皿，使样品与培养基充分混匀，待琼脂凝固后，倒置于28℃±2℃培养箱内培养5天，并于第3天起逐日观察计数，以菌落未蔓延生长的最大天数结果报告。

6.2.3 单一细菌悬液制备

按6.2.1中6.2.1.1、6.2.1.2、6.2.1.3、6.2.1.5和6.2.1.6步骤操作。

6.2.4 单一真菌悬液制备

按6.2.2中6.2.2.1、6.2.2.2、6.2.2.3、6.2.2.5和6.2.2.6步骤操作。

6.3 待测样品加菌

6.3.1 混合菌接种

1) 当样品中菌落数<100 CFU/mL (g)时，方可进行防腐挑战性测试。

2) 接种方式可根据需求选择混合菌接种或单一菌接种。

在无菌条件下称取样品于两个无菌试剂瓶中，每瓶100g或100mL。在称好的2瓶样品中分别加入1mL的混合细菌菌液和1mL的混合真菌菌液。将菌液和样品充分混合均匀，置于室温（20℃-25℃）避光贮存。

6.3.2 单一菌接种

³⁾在无菌条件下称取样品于无菌试剂瓶中，每瓶100g或100mL。在称好的样品中加入1mL的单一菌液。将菌液和样品充分混合均匀，置于室温（20℃-25℃）避光贮存。

6.4 样品检测

6.4.1 分别于加菌后第7、14、21和28天检测化妆品中的菌落数。取样前，充分混匀样品。

6.4.2 取10g或10mL样品加到装有玻璃珠及90mL灭菌生理盐水的锥形瓶中，充分振荡20秒，或加入到装有90mL灭菌生理盐水的灭菌均质袋中，使用均质器拍打均质1分钟-2分钟，混匀后，稀释成1:10的样品稀释液。

6.4.3 吸取1:10样品稀释液2mL，分别注入到两个灭菌平皿内，每皿1mL。另取1mL注入到9mL灭菌生理盐水试管中，充分混匀，制成1:100检液，并吸取2mL，分别注入到两个灭菌平皿内，每皿1mL。如样品含菌量高，还可再稀释成1:1000，1:10000等，并吸取各稀释液2mL，分别注入到两个灭菌平皿内，每皿1mL。每个稀释度应换1支吸管。

6.4.4 将45℃-50℃培养基倾注到平皿内，每皿约15mL，随即转动平皿，使样品与培养基充分混匀。含细菌样品采用卵磷脂-吐温80营养琼脂培养基培养（每100mL卵磷脂-吐温80营养琼脂中加入1mL 0.5%TTC溶液），含真菌样品采用卵磷脂-吐温80沙氏琼脂培养基培养，待琼脂凝固后翻转平皿。

6.4.5 细菌培养条件：36℃±1℃，48小时±2小时，然后做菌落计数；真菌培养条件：28℃±2℃，5天，并于第3天起逐日观察，以菌落未蔓延生长的最大天数结果报告。

7 结果计数及报告方法

7.1 菌落计数方法

先用肉眼观察，点数菌落数，然后再用5倍-10倍的放大镜检查，以防遗漏。记下各平皿的菌落数后，求出同一稀释度各平皿生长的平均菌落数。若平皿中有连成片状的菌落或花点样菌落蔓延生长时，该平皿不宜计数。若片状菌落不到平皿中的一半，而其余一半中菌落数分布又很均匀，则可将此半个平皿菌落计数后乘以2，以代表全皿菌落数。

7.2 细菌菌落计数及报告方法

7.2.1 首先选取平均菌落数在30-300个之间的平皿，作为菌落总数测定的范围。当只有一个稀释度的平均菌落数符合此范围时，即以该平皿菌落数乘其稀释倍数（见表1中例1）。

7.2.2 若有两个稀释度，其平均菌落数均在30-300个之间，则应求出两菌落总数之比进决定，若其比值小于或等于2，应报告其平均数，若大于2则报告其中稀释度较低的平皿的菌落数（见表1中例2及例3）。

7.2.3 若所有稀释度的平均菌落数均大于300个，则应按稀释度最高的平均菌落数乘以稀释倍数报告之（见表1中例4）。

7.2.4 若所有稀释度的平均菌落数均小于30个，则应按稀释度最低的平均菌落数乘以稀释倍数报告之（见表1例5）。

3) 根据菌种数量，每种菌种各需1瓶，单一菌种的试验应分别进行。

7.2.5 若所有稀释度的平均菌落数均不在 30-300 个之间, 其中一个稀释度大于 300 个, 而相邻的另一稀释度小于 30 个时, 则以接近 30 或 300 的平均菌落数乘以稀释倍数报告之(见表 1 中例 6)。

7.2.6 若所有的稀释度均无菌生长, 报告数为每 g 或每 mL 小于 10CFU。

7.2.7 菌落计数的报告, 菌落数在 10 以内时, 按实有数值报告, 大于 100 时, 采用二位有效数字, 在二位有效数字后面的数值, 应以四舍五入法计算。为了缩短数字后面零的个数, 可用 10 的指数进表示(见表 1 报告方式栏)。在报告菌落数为“不可计”时, 应注明样品的稀释度。

表 1 菌落计数结果及报告方式

例次	不同稀释度平均菌落数			两稀释度 菌数之比	菌落总数 CFU/ml 或 CFU/g	报告方式 CFU/ml 或 CFU/g
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}			
1	1365	164	20	—	16400	16000 或 1.6×10^4
2	2760	295	46	1.6	38000	38000 或 3.8×10^4
3	2890	271	60	2.2	27100	27000 或 2.7×10^4
4	不可计	4650	513	—	513000	510000 或 5.1×10^5
5	27	11	5	—	270	270 或 2.7×10^2
6	不可计	305	12	—	30500	31000 或 3.1×10^4
7	0	0	0	—	$<1 \times 10$	<10

7.2.8 按重量取样的样品以 CFU/g 为单位报告, 按体积取样的样品以 CFU/mL 为单位报告。

7.3 真菌菌落计数及报告方法

判定结果时, 应选取菌落数在 5-50 个范围内的平皿计数, 乘以稀释倍数后, 即为每 g (或每 mL) 检样中所含的真菌菌落数。其他范围内的菌落数报告应参照菌落总数的报告方法报告。

7.4 对数减少值计算方法

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 ——菌液在样品中的初始浓度;

N_x ——样品在不同检测时间的菌落数。

附 录 A
(资料性附录)
化妆品防腐效果评价标准

表A.1 化妆品的防腐效果评价标准

菌种类型	细菌				真菌			
评价参数	对数减少值 R_x^a							
测试时间	T7	T14	T21	T28	T7	T14	T21	T28
标准 I	≥ 3	≥ 3 且 NI ^b	≥ 3 且 NI ^b	> 5	≥ 2	≥ 2 且 NI ^b	≥ 2 且 NI ^b	> 4
标准 II	≥ 3	≥ 3 且 NI ^b	≥ 3 且 NI ^b	≥ 4	≥ 1	≥ 1 且 NI ^b	≥ 1 且 NI ^b	≥ 3
标准 III	-	≥ 3	≥ 3 且 NI ^b	≥ 3 且 NI ^b	-	≥ 1	≥ 1 且 NI ^b	≥ 1 且 NI ^b
a:在挑战测试中,可接受偏差范围为 0.5log。 b:NI表示与前一个测试时间相比未增长。								

注:本评价标准仅供参考,各企业应根据不同产品及配方设计目标等制定相应的防腐效果评价标准。