ICS 71.100.01
分类号：Y04

T/GDCDC

广 东 省 日 化 商 会 团 体 标 准

T/GDCDC 0XX—2019

化妆品防腐挑战性测试方法

The preservative challenge test of cosmetics

（征求意见稿）

2019－XX－XX 发布　　2019－XX-XX 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：

本标准主要起草人：

本标准于2019年XX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。

本标准适用于亲水性的膏、霜、乳、水剂等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

3.1 生物安全柜；

3.2 高压蒸汽灭菌锅；

3.3 冰箱：2~8℃；

3.4 培养箱：36±1℃、28±2℃；

3.5 恒温水浴锅；

3.6 振荡器；

3.7 天平：精确至 0.01g；

3.8 pH 计；

3.9 移液器：容量 1mL、5mL 和 10ml；

3.10 灭菌试管 15×150mm；

3.11 灭菌培养皿：直径 90mm；

3.12 锥形瓶：容量 250mL；

3.13 玻璃珠；

3.14 玻璃棒；

3.15 均质器；

3.16 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　　10g
牛肉膏粉　　3g
氯化钠　　5g
琼脂　　5g
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，黑曲霉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 20s，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 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℃，48h±2 小时；真菌培养条件：28±2℃，5 天。然后做菌落计数。

注:当样品中菌落数＜100 CFU/ml（g）时，方可进行防腐挑战性测试。

6.2 [1)]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 18-24 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 20s，混匀后，稀释至实验所需浓度 1×10^{8}-9×10^{8}CFU/mL。

6.2.1.4 将每种细菌菌液稀释液尽量按等体积混合，最大混合比例不宜超过 3。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±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 24-48 小时，黑曲霉于 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 20s，混匀后，制备成实验所需浓 1×10^{7}-9×10^{7}CFU/mL。

6.2.2.4 将每种真菌菌液尽量按等体积混合，最大混合比例不宜超过 3。并使用 100μm 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° C，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。

1) 接种方式可根据需求选择混合菌接种或单一菌接种。

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，使样品于培养基充分混匀，待琼脂凝固后，倒置于 28±2℃培养箱内培养 5 天，然后做菌落计数。

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6.2.1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

在无菌条件下称取样品于两个无菌试剂瓶中，每瓶100g。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° C）避光贮存。

6.3.2 单一菌接种

[2)]在无菌条件下称取样品于无菌试剂瓶中，每瓶100g。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° C）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 20s，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 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±2 小时；真菌培养条件：28±2℃，5 天，然后做菌落计数。

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，

2) 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。

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值进决定，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)。

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	—	$<1\times10$	<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个—50个范围之内的平皿计数，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。

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	[a] 对数减少值 R_X（$R_X = \lg N_0 - \lg N_X$）							
测试时间	D7	D14	D21	D28	D7	D14	D21	D28
优秀通过	≥4	[b] NI	NI	＞5	≥3	NI	NI	＞4
良好通过	≥3	NI	NI	＞5	≥2	NI	NI	＞4
勉强通过	≥3	NI	NI	≥4	≥1	NI	NI	≥3

a:N_0表示初始菌浓，N_X表示样品在某个测试时间的菌落总数。
b:NI表示与前一个测试时间相比未增长。