ICS 71.100.01
CCS Y40

T/GDICST

广东省化妆品科学技术研究会团体标准

T/GDICST XXXX—2024

化妆品微生物防腐挑战试验方法

Test method for the preservative challenge of cosmetics

内部讨论资料，严禁非授权使用

（征求意见稿）

XXXX－XX－XX 发布　　XXXX－XX－XX 实施

广东省化妆品科学技术研究会　　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　仪器及设备 1
5　培养基和试剂 2
6　试验菌株 3
7　实验步骤 4
附录 A（资料性）　化妆品防腐效果评价标准 6
附录 B（资料性）　化妆品中微生物分离与保存的试验方法 7

内部讨论资料，严禁非授权使用

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。

本文件由广州荃智美肤生物科技研究院有限公司、郑州轻工业大学、徐州工程学院和广东药科大学提出。

本文件由广东省化妆品科学技术研究会归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

内部讨论资料，严禁非授权使用

化妆品微生物防腐挑战试验方法

1 范围

本文件规定了化妆品的防腐挑战试验方法，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。

本文件适用于亲水性的膏、霜、乳、水剂等常见化妆品的防腐效果测试。

2 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。

GB/T 6682-2008 分析实验室用水规格和试验方法

《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

防腐 preservation

采用物理或化学方法杀灭微生物或抑制微生物生长繁殖及其活性，防止化妆品腐败变质。

3.2

防腐挑战试验 anticorrosion challenge test

模拟化妆品可能出现的微生物污染情况，在化妆品中加入一定量的微生物，每隔一段时间检测其中的活菌量，根据微生物的数量变化来判定产品抗微生物污染的能力和防腐功效。

4 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：温度 121 ℃±2 ℃；115 ℃±2 ℃，压力 103 Kpa±5 Kpa；
c) 冰箱：2 ℃～8 ℃；
d) 培养箱：36 ℃±1 ℃、28 ℃±2 ℃、22.5 ℃±2.5 ℃；
e) 恒温水浴锅：45 ℃～50 ℃；
f) 振荡器；
g) 天平：精确至 0.01 g；
h) pH 计；
i) 移液器：容量 1 mL、5 mL 和 10 mL；
j) 无菌试管：15 mm×150 mm；
k) 无菌培养皿：直径 90 mm；
l) 锥形瓶：容量 250 mL；
m) 玻璃珠；
n) 玻璃棒；
o) 均质器；
p) 离心机。

内部讨论资料，严禁非授权使用

5 培养基和试剂

5.1 通则

所用的试剂和材料应是适用于生物学试验的。实验室可以按照实际情况选用，允许使用验证合格的其它配方，推荐使用商品化试剂及耗材，并按照生产商提供的说明书使用。

所用的水应为符合GB/T6682规定的三级水。

5.2 营养琼脂培养基

5.2.1 成分

营养琼脂培养基所需成分如下：

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

5.2.2 制法

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

5.3 卵磷脂-吐温 80 营养琼脂培养基

5.3.1 成分

卵磷脂-吐温80营养琼脂培养基所需成分如下：

——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；
——蒸馏水 1000 mL。

5.3.2 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1 mol/L 氢氧化钠溶液或1 mol/L盐酸溶液调节pH值至7.1～7.4, 分装，于121 ℃高压灭菌20 min。

5.4 沙氏琼脂培养基

5.4.1 成分

沙氏琼脂培养基所需成分如下：

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

5.4.2 制法

取上述成分混合，溶解，分装，于115 ℃高压灭菌15 min。

5.5 卵磷脂-吐温 80 沙氏琼脂培养基

内部讨论资料，严禁非授权使用

5.5.1 成分

卵磷脂-吐温 80沙氏琼脂培养基所需成分如下：

——蛋白胨 10.0 g；
——葡萄糖 40.0 g；
——琼脂 15.0 g；
——卵磷脂 1.0 g；
——吐温 80 7 g；
——氯霉素 0.1 g；
——蒸馏水 1000 mL。

5.5.2 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 min。

5.6 生理盐水

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

5.7 0.05%吐温 80 生理盐水

称取氯化钠8.5 g，0.5 g吐温80，蒸馏水加至1000 mL，加热溶解，分装，于121 ℃高压灭菌20 min。

5.8 SCDLP 液体培养基

5.8.1 成分

——酪蛋白胨 17 g；
——大豆蛋白胨 3 g ；
——氯化钠 5 g；
——磷酸氢二钾 2.5 g；
——葡萄糖 2.5 g；
——卵磷脂 1 g；
——吐温 80 7 g；
——蒸馏水 1000 mL。

5.8.2 制法

先将卵磷脂在少量蒸馏水中加温溶解后，再与其他成分混合，加热溶解，调pH为7.2—7.3分装，每瓶90 mL，121 ℃高压灭菌20 min。注意振荡，使沉淀于底层的吐温80充分混合，冷却至25 ℃左右使用。

注：如无酪蛋白胨和大豆蛋白胨，也可用多胨代替。

5.9 0.5%氯化三苯四氮唑（TTC）

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

6 试验菌株

应使用下列菌株，根据需要可增加其他菌株作为试验菌株。应使用世界菌种保藏联合会的菌种保藏机构提供的菌种。菌株代数不应超过5代。

6.1 细菌

金黄色葡萄球菌ATCC 6538、大肠杆菌ATCC 8739、铜绿假单胞菌 ATCC 9027、洋葱伯克霍尔德氏菌ATCC 25416。

6.2 真菌

内部讨论资料，严禁非授权使用

白色念珠菌ATCC 10231、巴西曲霉ATCC 16404。

7 实验步骤

7.1 样品的初始微生物检测

取不少于2个包装单位的产品，按《化妆品安全技术规范》规定的方法进行菌落总数、霉菌和酵母菌总数检测。

7.2 菌液制备

7.2.1 单一细菌悬液制备

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

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

7.2.1.3 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 1×10^8 CFU/mL～9×10^8 CFU/mL。菌悬液制备后若在室温下放置，应在 2 h 内使用，若保存在 2 ℃～8 ℃,可在 24 h 内使用。

7.2.1.4 取上述菌液 1 mL 加入到 9 mL 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，每个稀释度取 2 mL，分别注入到两个灭菌平皿内，每皿 1 mL。每次稀释均需更换吸头。

7.2.1.5 将 45 ℃～50 ℃营养琼脂倾注到平皿内，每皿约 15 mL，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 h±2 h，然后观察并计数平皿上的菌落数量。

7.2.2 单一真菌悬液制备

7.2.2.1 将待测真菌分别接种到沙氏琼脂培养基斜面或其它经验证适用的培养基上，其中，白色假丝酵母于 28 ℃±2 ℃培养 24 h～48 h，巴西曲霉于 28 ℃±2 ℃培养 5 d～7 d。

7.2.2.2 将 5 mL～10 mL 的无菌 0.05%吐温 80 的生理盐水加入斜面试管内，反复吹吸洗下菌苔。

7.2.2.3 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 1×10^7CFU/mL～9×10^7CFU/mL。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。

7.2.2.4 吸取上述菌液 1 mL 加入到 9 mL 的无菌 0.05%吐温 80 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,每个稀释度取 2 mL，分别注入到两个灭菌平皿内，每皿 1 mL。每次稀释均需更换吸头。

7.2.2.5 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15 mL，随即转动平皿，使样品与培养基充分混匀，待琼脂凝固后，置于 28 ℃±2 ℃培养箱内培养 5d，并于第 3 d 起逐日观察计数，以菌落未蔓延生长的最大天数结果报告。

7.2.3 混合细菌悬液制备

按7.2.1中7.2.1.1、7.2.1.2、7.2.1.3制备单一细菌的菌悬液，然后将每种细菌菌液稀释液按等体积混合，制备成混合细菌悬液后，再按7.2.1.4和7.2.1.5步骤操作。

7.2.4 混合真菌悬液制备

按7.2.2中7.2.2.1、7.2.2.2、7.2.2.3制备单一真菌的菌悬液，然后将每种真菌菌液稀释液按等体积混合，制备成混合真菌悬液后，再按7.2.2.4和7.2.2.5步骤操作。

7.3 样品接种

7.3.1 接种原则

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

7.3.1.2 接种方式可根据需求选择混合菌接种或单一菌接种。

仅供行业标准制定，严禁非授权使用

7.3.2 单一菌接种

在无菌条件下称取样品于无菌试剂瓶中，每瓶100 g或100 mL。在称好的样品中加入1 mL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。

7.3.3 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100 g或100 mL。在称好的2瓶样品中分别加入1 mL的混合细菌菌液和1 mL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。

7.4 微生物检测与计数

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

7.4.2 取 10 g 或 10 mL 样品加到装有玻璃珠及 90 mL 灭菌 SCDLP 液体培养基的锥形瓶中，充分振荡 20 秒，或加入到装有 90 mL SCDLP 液体培养基的灭菌均质袋中，使用均质器拍打均质 1 min～2 min，混匀后，稀释成 1:10 的样品稀释液。

注：也可使用其它验证合格的具有中和作用的稀释液。

7.4.3 吸取 1:10 样品稀释液 2 mL，分别注入到两个灭菌平皿内，每皿 1 mL。另取 1 mL 注入到 9 mL 灭菌 SCDLP 液体培养基试管中，充分混匀，制成 1:100 检液，并吸取 2 mL，分别注入到两个灭菌平皿内，每皿 1 mL。 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 2 mL，分别注入到两个灭菌平皿内，每皿 1 mL。每个稀释度应换 1 支吸管。

7.4.4 将 45 ℃～50 ℃培养基倾注到平皿内，每皿约 15 mL,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 100 mL 卵磷脂-吐温 80 营养琼脂中加入 1 mL0.5% TTC 溶液),含真菌样品采用卵磷脂-吐温 80 沙氏琼脂培养基，摇匀后，待琼脂凝固后进行培养。

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

7.4.6 菌落计数的具体方法见化妆品安全技术规范中菌落总数及霉菌与酵母菌总数的相关规定。

7.5 结果报告

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)。

$$R_X = \log_{10} N_0 - \log_{10} N_X \quad \cdots\cdots (1)$$

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。

内部讨论资料，未经授权使用

附 录 A
（资料性）
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]	≥3且NI	≥2	≥2且NI[b]	≥2且NI[b]	≥1且NI[b]
标准Ⅱ	≥2	≥3且NI[b]	≥3且NI[b]	≥3且NI	≥1	≥1且NI[b]	≥1且NI[b]	≥1且NI[b]
标准Ⅲ	-	≥2	≥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1： 标准Ⅰ 微生物风险较高，且没有采取额外的控制方式；
标准Ⅱ 微生物风险中等，且没有采取额外的控制方式；
标准Ⅲ 具有微生物污染风险，但采取了其它的控制方式。

注2： 以上标准仅供参考。

内部讨论资料，严禁非授权使用

附 录 B
（资料性）
化妆品中微生物分离与保存的试验方法

B.1 目的

分离并保存化妆品原料、产品或环境中的微生物，以获得产生化妆品污染风险菌种。

B.2 仪器和设备

所需仪器和设备如下：
——天平：0 g～200 g，精确至0.1 g；
——高压灭菌锅：121 ℃±2 ℃，115 ℃±2 ℃，压力103 Kpa±5 Kpa；
——摇床：转速的要求；
——250 mL、150 mL规格的三角瓶；
——玻璃珠；
——10 cm规格的无菌培养皿；
——灭菌刻度吸管：10 mL、1 mL；
——恒温培养箱：36 ℃±1 ℃、28 ℃±2 ℃、22.5 ℃±2.5 ℃；
——生物安全柜；
——冰箱：-20 ℃；
——恒温水浴箱：40 ℃～44 ℃；
——均质器或研钵；
——灭菌均质袋；
——震荡器。

B.3 培养基和试剂

B.3.1 营养琼脂培养基

见5.2。

B.3.2 卵磷脂、吐温80—营养琼脂培养基

见5.3。

B.3.3 生理盐水

见5.6。

B.3.4 虎红（孟加拉红）培养基

B.3.4.1 成分

虎红（孟加拉红）培养基所需成分如下：
——蛋白胨 5 g；
——葡萄糖 10 g；
——磷酸二氢钾 1 g；
——硫酸镁（含7H2O） 0.5 g；
——琼脂 20 g；
——1/3000虎红溶液 100 mL；
——四氯四碘荧光素；
——蒸馏水加至 1000 mL；

内部讨论资料，严禁非授权使用

——氯霉素　100 mg。

B.3.4.2　制法

将上述各成分（除虎红外）加入蒸馏水中溶解后，再加入虎红溶液。121 ℃高压灭菌20 min，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1000 mL加链霉素30 mg。

B.3.5　营养肉汤培养基

B.3.5.1　成分

营养肉汤培养基所需成分如下：
——蛋白胨　10.0 g；
——牛肉膏粉　3.0 g；
——氯化钠　5.0 g。

B.3.5.2　制法

取上述成分，加入蒸馏水或去离子水1 L，搅拌加热煮沸至完全溶解，调节pH值至7.3±0.2，分装试管或三角瓶，121 ℃高压灭菌15 min，待冷至常温，备用。

B.3.6　马铃薯琼脂培养基

B.3.6.1　成分

马铃薯琼脂培养基所需成分如下：
——蛋白胨　5.0 g；
——磷酸氢二钾　1.0 g；
——硫酸镁　0.5 g；
——酵母浸出粉　2.0 g；
——葡萄糖　20.0 g；
——琼脂　14.0 g。

B.3.6.2　制法

取上述成分混合，溶解，用1 mol/L 氢氧化钠溶液或1 mol/L 盐酸溶液调节pH值至6.4±0.2,分装，于115 ℃高压灭菌15 min。

B.3.7　改良马丁培养基

B.3.7.1　成分

改良马丁培养基所需成分如下：
——酵母浸出粉　2.0 g；
——葡萄糖　20.0 g；
——磷酸氢二钾　1.0 g；
——硫酸镁　0.5 g。

B.3.7.2　制法

取上述成分混合，溶解，用1 mol/L 氢氧化钠溶液或1 mol/L 盐酸溶液调节pH值至6.4±0.2,分装，于115 ℃高压灭菌15 min。

B.3.8　灭菌液体石蜡

取液体石蜡50 mL，121 ℃高压灭菌20 min。

B.3.9　灭菌吐温80

取吐温80 50 mL，121 ℃高压灭菌20 min。

B.3.10　灭菌保存菌种的甘油

内部讨论资料，严禁非授权使用

用纯水配成80%甘油，121 ℃高压灭菌20 min。

B.4 实验步骤

B.4.1 体待检样品的制备

B.4.1.1 水溶性的液体样品，用灭菌吸管吸取 10 mL 样品加到 90 mL 灭菌生理盐水中，混匀后，制成 1：10 检液。

B.4.1.2 油性液体样品，取样品 10 g，先加 5 mL 灭菌液体石蜡混匀，再加 10 mL 灭菌的吐温 80，在 40 ℃～44 ℃水浴中振荡混合 10 min，加入灭菌的生理盐水 75 mL（在 40 ℃～44 ℃水浴中预温），在 40 ℃～44 ℃水浴中乳化，制成 1：10 的悬液。

B.4.2 膏、霜、乳剂半固体状待测样品的制备

B.4.2.1 亲水性的样品：称取 10 g，加到装有玻璃珠及 90 mL 灭菌生理盐水的三角瓶，充分振荡混匀，静置 15 min。用其上清液作为 1:10 的检液。

B.4.2.2 疏水性样品：称取 10 g，置于灭菌的研钵中，加 10 mL 灭菌液体石蜡，研磨成粘稠状，再加入 10 mL 灭菌吐温 80，研磨待溶解后，加 70 mL 灭菌生理盐水，在 40 ℃～44 ℃水 浴中充分混合，制成 1：10 检液。

B.4.3 固体待测样品的制备

固体样品称取10 g，加到90 mL灭菌生理盐水中，充分振荡混匀，使其分散混悬，静置后，取上清液作为1：10的检液。 使用均质器时，则采用灭菌均质袋，将上述水溶性膏、霜、粉剂等，称10 g样品加入90 mL灭菌生理盐水，均质1 min至2 min；疏水性膏、霜及眉笔、口红等，称10 g样品，加10 mL灭菌液体石蜡，10 mL吐温80，70 mL灭菌生理盐水，均质3 min～5 min。

B.4.4 菌种培养

取1:10的检液以生理盐水为稀释液进行10倍梯度稀释。之后取合适稀释度的菌液各1 mL分别注入灭菌平板内，每个稀释度各用2个平板，注入融化并冷至45 ℃±1 ℃左右的培养基（细菌用营养琼脂，真菌用马铃薯琼脂培养基），充分摇匀。凝固后，倒置平板，细菌置36 ℃±1 ℃培养48 h±2 h，置真菌置28 ℃±2 ℃培养5 d，观察并记录。另取一个不加样品的灭菌空平板作为空白对照。

注：培养基及培养条件可以随拟培养的目标微生物进行改变。

B.4.5 菌种纯培养的获得

无菌接种环挑取上述培养的单个菌落，在生物安全柜中进行划线分离，培养完成后选取单个菌落，再次接种于固体培养基斜面，获得纯培养物。

B.4.6 菌种保存

将纯化后的菌种采用适宜的方法进行保存。菌种保藏的基本原理是使微生物的生命活动处于半永久性的休眠状态，也就是将微生物的新陈代谢作用限制在最低范围内。

注：适宜的培养基：细菌选用营养肉汤（琼脂）培养基，霉菌、酵母菌选用改良马丁培养基或马铃薯琼脂培养基；也可以根据菌种选用其它合适的培养基。

B.4.6.1 甘油/甘油磁珠保藏法

将欲保存的菌种接种于适宜的液体培养基，按菌种生长要求，在适宜的气体条件及温度下孵育过夜或更长时间，直至生长良好。在生物安全柜中，将甘油和菌液以（80%甘油：菌液=2:5）比例混合移至甘油管，或将菌液按说明加入到带保存液的磁珠冻存管中，保存于-20 ℃或-70 ℃冰箱中。此方法适用于菌种的中长期保藏，保藏时间可在1年以上。

B.4.6.2 斜面保藏法

将菌种接种在适宜的固体斜面培养基上，待菌充分生长后转移至4 ℃冰箱中或适宜条件下保藏。保藏的时间根据微生物的种类而不同，需定期进行传代。

内部资料，严禁未授权使用

B.4.6.3 穿刺保藏法

准备一管半固体培养基，用接种针挑取菌种，自半固体培养基的中心垂直刺入，直至接近试管底部，但不要穿透，然后沿原穿刺线将接种针退出，于4 ℃冰箱保存。此方法同斜面保菌法一样需要定期移种。

B.4.6.4 液体石蜡保藏法

将菌种接种在适宜的固体斜面培养基上，待菌充分生长后注入无菌液体石蜡，使其覆盖整个斜面，再直立放置在4 ℃冰箱中保藏。

B.4.6.5 沙土保藏法

将培养好的菌种与无菌沙土混合，使菌体吸附在沙土载体上，干燥后转移至4 ℃冰箱保存。

B.4.6.6 冷冻干燥法

将菌种冷冻，在减压下利用升华作用去除水分，制成冻干粉后置于4 ℃冰箱保存。

内部讨论资料，严禁非授权使用