

# 化妆品防腐效能评价方法操作指南

化妆品防腐效能评价比较常用的方法是微生物挑战性实验。其基本原理是：将一定量的微生物加入到化妆品中，每隔一定时间检测微生物增减的数量，以此来判断防腐剂的防腐效能。通过该方法既可以评价防腐剂的效能，又能在安全剂量内确定化妆品使用的防腐剂的最低浓度。

微生物挑战性实验可采用单一培养或混合培养方式。单一培养即分别接种每种实验菌株的菌悬液于测试化妆品中，在接种后的一定时间内对化妆品进行平板计数（APC），以此判断防腐剂的防腐效能。混合培养为将几种细菌或真菌的混合液接种于化妆品中，在接种后一定时间内，测定化妆品的 APC，以此判断防腐效能。可根据实际情况选择培养方式

挑战性实验测试菌株的选用原则为：尽量覆盖革兰氏阳性、阴性细菌，酵母菌和霉菌至少各一种，并且对各防腐剂抵抗性较高，能代表化妆品中可能污染的微生物对防腐剂的抵抗性的菌株。可根据化妆品的性质，生产、使用环境等增加菌株。一般较常用的菌株为金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌和黑曲霉等。

检测时间：一般为在样品中加入微生物时，以及第 1、7、14、21、28 天检测化妆品中的菌落数。

判定标准：推荐采用《欧洲药典》的结果评定标准，即细菌于第 7 天时菌落总数下降 99.9%，至第 28 天时无增长；真菌于第 14 天下降 99.0%，至 28 天时无增长，判断为防腐效果良好。

对于能够保证化妆品产品微生物质量合格，且在使用过程中不存在二次污染的化妆品可以不进行微生物挑战性实验。

## 化妆品防腐效能评价方法

### 1. 定义

微生物挑战性实验：将一定量的微生物加入到化妆品中，每隔一定时间检测微生物增减的数量，以此来判断防腐剂的防腐效能的实验方法。

### 2 仪器设备

- 2.1 生物安全柜
- 2.2 高压蒸汽灭菌器
- 2.3 冰箱
- 2.4 恒温培养箱
- 2.5 均质器

2.6 旋涡振荡器

2.7 天平

2.8 灭菌培养皿

2.9 灭菌试管

2.10 灭菌刻度吸管

2.11 灭菌试剂瓶

2.12 玻璃珠

### 3.试剂和培养基

3.1 生理盐水

3.2 含 0.05%吐温 80 的生理盐水

3.3 改良的 LETHEEN 肉汤

3.4 水解大豆琼脂培养基 (TSA 培养基)

3.5 马铃薯葡萄糖培养基 (PDA)

3.6 萨布罗右旋糖琼脂培养基(SDA)

### 4.实验菌株

4.1 细菌：金黄色葡萄球菌 ATCC6538，大肠杆菌 ATCC8739，铜绿色假单胞菌 ATCC9027。

4.2 真菌：黑曲霉 ATCC16404，白色假丝酵母 ATCC10231。

根据实际情况可增加其他细菌作为测试菌株。

### 5.实验方法

**5.1 样品准备：**取包装完好的待测化妆品样品 2 份，在无菌条件下各称取 30g 于灭菌试剂瓶中，备用。

**5.2 细菌悬浊液的制备：**制备 3 种细菌菌悬液，浓度为  $10^8$ cfu/mL。

**5.3 真菌悬浊液的制备：**制备白色假丝酵母菌悬液和黑曲霉孢子悬液，浓度为  $10^8$ cfu/mL。

**5.4 菌液接种及样品检测：**取上述称量好的化妆品 (30g)，分别加入 0.3mL 混合细菌悬浊液和 0.3mL 混合真菌悬浊液，用旋涡振荡器混合均匀，将样品于室温 ( $22.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$ ) 保存，并分别于 0、1、7、14、21、28 天检测化妆品中的菌落数，即取 1g 或 1mL 待测样品加入到 9mL 改良的 LETHEEN 肉汤中，充分混匀稀释成适宜的倍数，检测样品中菌落数。每次检测做两个平行样。

**5.5 结果计数：**按《化妆品卫生规范》(2007) 中菌落计数方法进行计数。

**5.6 评价方法：**

$$\text{菌落数下降的百分数 (\%)} = \frac{(A_0 - A_n)}{A_0} \times 100\%$$

式中：

$A_0$ ——为初始加入微生物时化妆品中微生物的含量，单位为 cfu/g 或 mL；

$A_n$ ——为不同检测时间化妆品中微生物的含量，单位为 cfu/ g 或 mL。

根据不同检测时间菌落数下降的百分数评价化妆品的防腐效果。

# 《化妆品微生物挑战性实验操作指南》编制说明

## 1.情况说明

为进一步完善化妆品安全技术法规体系，中国食品药品检定院组织开展了化妆品微生物挑战性实验操作指南的制订工作。

## 2.研究现状:

化妆品种类繁多，新开发产品层出不穷，现阶段化妆品的微生物污染还不能完全避免。因此对化妆品进行防腐效能评价，预防化妆品的微生物污染是必要的。化妆品防腐效能评价方法的基本原理是在化妆品中加入一定量的微生物，定期检测微生物生长情况，以此判断防腐剂的防腐效能。目前，世界各国都没有统一的防腐效能评价方法。在具体操作过程中，不同的国家、不同的组织采用的测试菌种、培养方法等都有一定的差异。各种方法上的不同导致判定标准上的不同。而我国也没有相应的标准方法，化妆品的防腐效能评价主要是参照美国药典（USP）、欧洲药典等的方法进行。为规范化妆品防腐效能评价的方法，预防化妆品的微生物污染，保护使用者的健康，我们制定了本指南。

## 3.研制情况:

本研究工作在调研了国内外大量的研究方法基础上，对测试菌株、培养方式、评价方法等进行了系统的研究，提出了基本适合我国实际情况的化妆品防腐效能评价方法。

### 3.1 测试菌株的确定

在防腐效能评价中测试菌株的选择非常重要。要选用使用过程中可能污染的微生物，越能代表实际污染状况则越能正确评价防腐剂的作用效果。一般应包括革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌、霉菌和酵母菌中的至少一种。其中 USP（美国药典）和 EP（欧洲药典）推荐使用金黄色葡萄球菌（G+），铜绿假单胞杆菌（G-），黑曲霉(霉菌)，白色假丝酵母(酵母菌)等。美国的 CTFA 还列出了更多的菌种，在必要的情况下使用，例如在非眼部使用化妆品和水溶性的化妆品中推荐使用表皮葡萄球菌和其他的革兰氏阴性菌等。

化妆品常用防腐剂主要有醇类防腐剂、酚类防腐剂、羧酸及其酯类或盐类防腐剂、酰胺类防腐剂、杂环类防腐剂、季铵盐类防腐剂以及其他类型防腐剂。欧洲和美国化妆品中最常用防腐剂为对羟基苯甲酸酯类，其次是咪唑烷基脲；日本化妆品最常使用的防腐剂是对羟基苯甲酸酯类；亚太地区最常使用的是对羟基苯甲酸酯类和咪唑烷基脲。根据美国 FDA 公布的化妆品防腐剂使用情况以及我国一些地区的调查情况，本实验选用了使用频率较高的 5 种常用防腐剂（对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、凯松、1, 2-溴 2-硝基-1, 3-丙二醇、咪唑烷基脲），测试化妆品中常

见污染菌株对它们的抵抗性，从而选出抵抗性较强的菌株进行防腐效能评价实验。

结果显示：金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、铜绿色假单胞菌、黑曲霉和白色假丝酵母，这一组微生物对常用防腐剂的抵抗能力达到了最高的水平，见表 1。结合我国化妆品微生物污染情况的调查结果显示，这些菌种能较好的代表化妆品中可能污染的微生物，因此选用进行防腐效能评价实验。

表 1 常用防腐剂对受试标准菌株的最小抑菌浓度 单位：mg/mL

菌株	防腐剂最小抑菌浓度				
	对羟基苯甲酸 甲酯	对羟基苯甲酸 丙酯	凯松	1, 2-溴 2-硝基 -1, 3-丙二醇	咪唑烷基脲
	金黄色葡萄球菌	7.50	3.00	1.00	0.025
表皮葡萄球菌	0.05	5.00	0.10	0.05	0.25
大肠杆菌	5.00	5.00	1.00	0.025	1.50
铜绿假单胞菌	5.00	5.00	1.00	0.05	1.50
枯草芽孢杆菌	7.50	5.00	0.25	0.025	1.00
蜡样芽孢杆菌	7.50	5.00	0.25	0.05	2.50
白色念珠菌	2.50	2.50	0.50	0.25	4.00
黑曲霉	2.50	1.00	0.25	0.25	4.50
婉氏拟青霉	2.50	1.00	0.10	0.25	3.50
绿色木霉	2.50	1.00	0.25	0.50	3.50
土曲霉	2.50	1.00	0.10	0.25	4.00

### 3.2 评价标准

本次实验采用的评价标准为：细菌于加标的第 7 天时菌落总数下降 99.9%，至第 28 天时无增长，真菌于第 14 天下降 99.0%，至 28 天时无增长，判断为防腐效果合格。其中细菌和真菌有一项不能达到以上标准判断为化妆品的防腐效果不合格。以此标准判定的结果与模拟使用实验结果一致性较好。因此确定了本标准的检测方法。

### 3.3 微生物挑战性实验方法确定

采用上述常用化妆品防腐剂自制化妆品，进行模拟使用实验和保存实验，同时利用上述菌株进行混合培养的微生物挑战性试验，结果见表 2，表 3。通过微生物挑战性实验的化妆品均通过了模拟使用实验和保存实验，说明该方法能准确评估化妆品的防腐效果，确保化妆品的安全。

表 2 细菌混合培养挑战性实验结果

防腐剂种类	防腐剂含量	不同检测时间微生物菌落数下降百分比						是否通过挑战性实验
		0 天*	1 天	7 天	14 天	21 天	28 天	
对羟基苯甲酸甲酯	0.05	6.4×10 <sup>6</sup>	75.00	85.16	99.99	99.99	99.99	未通过
	0.1	6.4×10 <sup>6</sup>	95.31	99.56	99.99	100.00	100.00	未通过
	0.2	6.4×10 <sup>6</sup>	96.88	98.28	100.00	100.00	100.00	未通过
	0.4	6.4×10 <sup>6</sup>	98.75	99.77	100.00	100.00	100.00	未通过

对羟基苯甲酸丙酯	0.05	6.4×10 <sup>6</sup>	98.44	99.52	99.99	100.00	100.00	未通过
	0.1	6.4×10 <sup>6</sup>	89.69	99.84	99.99	100.00	100.00	未通过
	0.2	6.4×10 <sup>6</sup>	92.19	99.89	100.00	100.00	100.00	通过
	0.4	6.4×10 <sup>6</sup>	98.13	99.93	100.00	100.00	100.00	通过
咪唑烷基脲	0.1	6.4×10 <sup>6</sup>	98.44	99.98	100.00	100.00	100.00	通过
	0.2	6.4×10 <sup>6</sup>	99.99	99.99	100.00	100.00	100.00	通过
	0.3	6.4×10 <sup>6</sup>	99.99	99.99	100.00	100.00	100.00	通过
	0.4	6.4×10 <sup>6</sup>	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	通过
凯松	0.01	6.4×10 <sup>6</sup>	84.38	100.00	100.00	100.00	100.00	通过
	0.02	6.4×10 <sup>6</sup>	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	通过
	0.05	6.4×10 <sup>6</sup>	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	通过
	0.1	6.4×10 <sup>6</sup>	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	通过
1, 2-溴-2-硝基-1, 3-丙二醇	0.01	6.4×10 <sup>6</sup>	98.44	98.98	100.00	100.00	100.00	通过
	0.02	6.4×10 <sup>6</sup>	99.50	99.20	100.00	100.00	100.00	通过
	0.03	6.4×10 <sup>6</sup>	99.87	99.89	100.00	100.00	100.00	通过
	0.05	6.4×10 <sup>6</sup>	99.90	100.00	100.00	100.00	100.00	通过
空白	0	6.4×10 <sup>6</sup>	7.2×10 <sup>6</sup>	1.8×10 <sup>7</sup>	2.0×10 <sup>7</sup>	3.2×10 <sup>6</sup>	8.6×10 <sup>5</sup>	未通过

表 3 真菌混合培养挑战性实验结果

防腐剂种类	防腐剂含量	不同检测时间微生物菌落数下降百分数 (%)						是否通过挑战性实验
		0 天*	1 天	7 天	14 天	21 天	28 天	
对羟基苯甲酸甲酯	0.01	5.5×10 <sup>6</sup>	34.55	94.91	88.18	74.54	90.19	未通过
	0.1	5.5×10 <sup>6</sup>	67.27	87.45	85.27	94.55	93.45	未通过
	0.2	5.5×10 <sup>6</sup>	82.55	98.82	99.99	99.99	99.99	通过
	0.4	5.5×10 <sup>6</sup>	93.45	99.99	100.00	100.00	100.00	通过
对羟基苯甲酸丙酯	0.05	5.5×10 <sup>6</sup>	92.36	99.27	98.35	99.99	100.00	未通过
	0.1	5.5×10 <sup>6</sup>	90.91	99.94	94.91	100.00	100.00	未通过
	0.2	5.5×10 <sup>6</sup>	93.45	99.96	100.00	100.00	100.00	通过
	0.4	5.5×10 <sup>6</sup>	94.55	99.98	100.00	100.00	100.00	通过
咪唑烷基脲	0.1	5.5×10 <sup>6</sup>	52.73	89.64	89.27	82.73	83.64	未通过
	0.2	5.5×10 <sup>6</sup>	86.00	96.00	98.18	97.64	98.36	未通过
	0.3	5.5×10 <sup>6</sup>	89.09	98.45	98.20	98.25	98.62	未通过
	0.4	5.5×10 <sup>6</sup>	93.45	99.45	98.45	98.31	99.84	未通过
凯松	0.01	5.5×10 <sup>6</sup>	92.18	99.99	99.99	99.99	100.00	通过
	0.02	5.5×10 <sup>6</sup>	99.07	99.76	100.00	100.00	100.00	通过
	0.05	5.5×10 <sup>6</sup>	99.42	99.91	100.00	100.00	100.00	通过
	0.1	5.5×10 <sup>6</sup>	99.89	99.92	100.00	100.00	100.00	通过
1, 2-溴-2-硝基-1, 3-丙二醇	0.01	5.5×10 <sup>6</sup>	54.55	47.27	96.18	99.96	99.98	未通过
	0.02	5.5×10 <sup>6</sup>	41.82	65.45	97.09	99.72	99.65	未通过
	0.03	5.5×10 <sup>6</sup>	65.45	99.82	98.99	99.79	99.99	未通过
	0.05	5.5×10 <sup>6</sup>	14.55	29.09	99.99	100.00	100.00	通过
空白	0	5.5×10 <sup>6</sup>	6.5×10 <sup>6</sup>	4.9×10 <sup>6</sup>	4.4×10 <sup>6</sup>	5.8×10 <sup>6</sup>	6.0×10 <sup>6</sup>	未通过

#### 4.方法验证:

利用本标准对市售化妆品进行了防腐效能评价，检测结果见表 4 和表 5。结果显示市售化妆品的防腐效果较好，进一步验证了该方法的可行性。

表 3 市售化妆品细菌挑战性实验结果

编号	类型	不同检测时间微生物菌落数下降百分数 (%)						是否通过挑战性实验
		0 天	1 天	7 天	14 天	21 天	28 天	
1	洗颜泥	2.5×10 <sup>6</sup>	73.94	96.97	100.00	100.00	100.00	未通过
2	洗颜泥	2.5×10 <sup>6</sup>	87.66	98.99	100.00	100.00	100.00	未通过
3	洗面奶	2.5×10 <sup>6</sup>	88.65	100.00	100.00	100.00	100.00	通过
4	柔肤水	2.5×10 <sup>6</sup>	87.93	100.00	100.00	100.00	100.00	通过
5	柔肤水	2.5×10 <sup>6</sup>	76.32	100.00	100.00	100.00	100.00	通过
6	浴液	2.5×10 <sup>6</sup>	96.97	100.00	100.00	100.00	100.00	通过
7	浴盐	2.5×10 <sup>6</sup>	95.15	100.00	100.00	100.00	100.00	通过
8	沐浴露	2.5×10 <sup>6</sup>	93.23	100.00	100.00	100.00	100.00	通过
9	浴液	2.5×10 <sup>6</sup>	98.79	100.00	100.00	100.00	100.00	通过
10	洗发露	2.5×10 <sup>6</sup>	74.45	100.00	100.00	100.00	100.00	通过
11	洗发露	2.5×10 <sup>6</sup>	89.70	100.00	100.00	100.00	100.00	通过
12	洗发露	2.5×10 <sup>6</sup>	90.63	100.00	100.00	100.00	100.00	通过
13	洗发露	2.5×10 <sup>6</sup>	95.66	100.00	100.00	100.00	100.00	通过
14	润肤霜	2.5×10 <sup>6</sup>	86.32	100.00	100.00	100.00	100.00	通过
15	润肤霜	2.5×10 <sup>6</sup>	85.36	100.00	100.00	100.00	100.00	通过
16	护肤乳	3.8×10 <sup>8</sup>	85.62	99.65	100.00	100.00	100.00	通过
17	护肤乳	3.8×10 <sup>8</sup>	90.12	100.00	100.00	100.00	100.00	通过
18	护肤乳	3.8×10 <sup>8</sup>	79.99	99.98	100.00	100.00	100.00	通过
19	精华	3.8×10 <sup>8</sup>	82.37	99.91	100.00	100.00	100.00	通过
20	精华	3.8×10 <sup>8</sup>	88.66	100.00	100.00	100.00	100.00	通过

\*注：0 天的结果为菌落数 (cfu/mL)

表 4 市售化妆品霉菌和酵母菌挑战性实验结果

编号	类型	不同检测时间微生物菌落数下降百分数 (%)						是否通过挑战性实验
		0 天	1 天	7 天	14 天	21 天	28 天	
1	洗颜泥	3.3×10 <sup>6</sup>	96.97	100.00	100.00	100.00	100.00	通过
2	洗颜泥	3.3×10 <sup>6</sup>	90.12	84.55	90.91	90.90	89.90	未通过
3	洗面奶	3.3×10 <sup>6</sup>	93.64	100.00	100.00	100.00	100.00	通过
4	柔肤水	3.3×10 <sup>6</sup>	90.15	100.00	100.00	100.00	100.00	通过
5	柔肤水	3.3×10 <sup>6</sup>	89.63	99.97	100.00	100.00	100.00	通过
6	浴液	3.3×10 <sup>6</sup>	99.95	100.00	100.00	100.00	100.00	通过
7	浴盐	3.3×10 <sup>6</sup>	79.68	100.00	100.00	100.00	100.00	通过
8	沐浴露	3.3×10 <sup>6</sup>	92.54	100.00	100.00	100.00	100.00	通过
9	浴液	3.3×10 <sup>6</sup>	89.79	100.00	100.00	100.00	100.00	通过
10	洗发露	3.3×10 <sup>6</sup>	92.86	100.00	100.00	100.00	100.00	通过
11	洗发露	3.3×10 <sup>6</sup>	80.53	100.00	100.00	100.00	100.00	通过
12	洗发露	3.3×10 <sup>6</sup>	97.00	100.00	100.00	100.00	100.00	通过

13	洗发露	3.3×10 <sup>6</sup>	86.33	100.00	100.00	100.00	100.00	通过
14	润肤霜	3.3×10 <sup>6</sup>	96.56	100.00	100.00	100.00	100.00	通过
15	润肤霜	3.3×10 <sup>6</sup>	89.36	100.00	100.00	100.00	100.00	通过

\*注： 0 天的结果为菌落数（cfu/mL）

## 5.验证结果

采用以上确立的方法对市售化妆品进行防腐效能评价，结果显示：大部分市售化妆品通过挑战性实验，防腐效能良好。结果表明该方法能有效的评价化妆品中防腐剂的效能，并且方法简便，具有实际可操作性。

综上所述，参照美国 C T F A， F D A， 欧洲药典和美国药典中的微生物挑战性实验的方法，通过实验确立的化妆品防腐效能评价方法，能真实反映化妆品的防腐功效，具有很好的实用性。