
附件 2

化妆品防腐剂挑战试验技术指南（征求意见稿）

1.范围

本标准规定了化妆品防腐效能的评价方法。

本标准适用于含水的（ $AW \geq 0.7$ ）乳液类和膏霜类等常见化妆品防腐体系效能评价。

2.术语和定义

2.1 防腐效能评价试验

将一定量的微生物人工污染到化妆品中，模拟化妆品可能出现的污染情况，每隔一定时间检测其中的存活菌量，根据存活菌量的变化评价化妆品防腐体系效能的试验方法。

2.2 中和剂

可添加至化妆品和微生物混和物中，消除化妆品对微生物抑制或杀灭作用的试剂。

2.3 淋洗类化妆品

在人体表面（皮肤、毛发、甲、口唇等）使用后及时清洗的化妆品。

2.4 驻留类化妆品

除淋洗类产品外的化妆品。

3.设备和材料

3.1 生物安全柜。

3.2 高压蒸汽灭菌器。

3.3 天平：感量为 0.1g。

3.4 恒温培养箱： $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

3.5 均质器。

3.6 无菌吸管：1mL(具 0.01mL 刻度)、10mL(具 0.1mL 刻度)或微量移液器及吸头。

3.7 显微镜。

3.8 酸度计。

3.9 灭菌平皿：直径 90mm。

4.培养基和试剂

4.1 0.85%生理盐水。

4.2 含 0.05%(v/v)聚山梨酯 80 的生理盐水，见附录 A.1。

4.3 含 0.05%(v/v)聚山梨酯 80 的 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液，见附录 A.2。

4.4 胰酪大豆胨琼脂培养基（TSA），见附录 A.3。

4.5 沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA)，见附录 A.4。

4.6 SCDLP 液体培养基，见附录 A.5。

4.7 改良 Eugon LT 100 肉汤，见附录 A.6。

4.8 D/E 肉汤，见附录 A.7。

4.9 改良 Lethen 肉汤，见附录 A.8。

5.实验菌株

5.1 细菌：

金黄色葡萄球菌 CMCC (B) 26003

大肠埃希氏菌 CMCC (B) 44102

铜绿假单胞菌 CMCC (B) 10104

表皮葡萄球菌 CMCC (B) 26629

5.2 真菌：

黑曲霉 CMCC (F) 98003

白色念珠菌 CMCC (F) 98001

在进行化妆品防腐效能评价试验时，可根据需要增加其他相关细菌或真菌作为测试菌株。如不采用本指南推荐的菌株，需说明菌株与指南中载明的菌株开展过验证，并且结果一致。

6.实验方法

6.1 供试品微生物检测

取不少于 2 份包装完好的供试化妆品样品，依据《化妆品安全技术规范》第五章微生物

物检验方法中菌落总数、霉菌和酵母菌检验方法对样品进行检测。供试品微生物检测的结果可记为 N_f 。

6.2 微生物悬液制备

6.2.1 细菌悬液制备

用接种环从菌种保存管中（或试管斜面上）取适量菌体，分区划线接种于 TSA 平板上， $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，培养 18 h~24 h。用接种环取第 1 代培养物，分区划线接种于 TSA 平板， $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，培养 18 h~24 h。挑取上述第 2 代培养物中典型菌落，分区划线接种于 TSA 平板， $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，培养 18 h~24 h，即为第 3 代培养物。用无菌棉签取菌苔加入无菌生理盐水中，涡旋混匀。用无菌生理盐水将其稀释成约 1×10^7 CFU/mL ~ 1×10^8 CFU/mL 的菌悬液。制备好的菌悬液应在 2 h 内使用，或在 $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存不超过 24 h。

6.2.2 白色念珠菌菌悬液的制备

用接种环从菌种保存管中（或试管斜面上）取适量菌体，分区划线接种于 SDA 平板上， $28^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ ，培养 48 h~72 h。用接种环取第 1 代培养物，分区划线接种于 SDA 平板， $28^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ ，培养 48 h~72 h。挑取上述第 2 代培养物中典型菌落，分区划线接种于 SDA 平板， $28^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h~72 h，即为第 3 代培养物。用无菌棉签取菌苔加入无菌生理盐水中，涡旋混匀。用无菌生理盐水将其稀释成约 1×10^6 CFU/mL ~ 1×10^7 CFU/mL 的菌悬液。制备好的菌悬液应在 2 h 内使用，或在 $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存不超过 24 h。

6.2.3 黑曲霉孢子悬液的制备

用接种环从菌种保存管中（或试管斜面上）取适量的菌体，分区划线接种于 SDA 平板上， $28^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 培养 3 d~5 d。用无菌棉签取菌苔加入含 0.05%(v/v) 聚山梨酯 80 无菌生理盐水中，制备孢子悬液，轻轻振摇 1 min 后，用无菌玻璃棉过滤除去菌丝。用含 0.05%(v/v) 聚山梨酯 80 无菌生理盐水将其稀释成约 1×10^6 CFU/mL ~ 1×10^7 CFU/mL 的孢子悬液。制备好的孢子悬液应当天使用或在 $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存不超过 7 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。

表 1 实验菌株培养条件

	培养基	培养温度	培养时间
金黄色葡萄球菌 CMCC (B) 26003	TSA	$36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$	18 h~24 h
大肠埃希氏菌 CMCC (B) 44102	TSA	$36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$	18 h~24 h

	培养基	培养温度	培养时间
铜绿假单胞菌 CMCC (B) 10104	TSA	36℃±1℃	18 h~24 h
表皮葡萄球菌 CMCC (B) 26629	TSA	36℃±1℃	18 h~24 h
黑曲霉 CMCC (F) 98003	SDA	28℃±2℃	3 d~5 d
白色念珠菌 CMCC (F) 98001	SDA	28℃±2℃	48 h~72 h

注：实验室增加的其他测试菌株可参考以上细菌及真菌的培养温度和时间进行培养。

6.3 中和剂效果验证试验

6.3.1 工作菌悬液制备

用稀释液将上述菌悬液 10 倍系列稀释至 10^3 CFU/mL，用于中和剂效果验证。

6.3.2 验证试验分组

每种试验菌株的中和剂效果验证试验应分别进行。

试验分为以下三组，按如下方法进行供试液染菌。

试验组：将 1g(mL)供试品加入 9mL 中和剂中混匀，室温放置 $30\text{min}\pm 15\text{min}$ ，使其充分作用；

中和剂对照组：将 1mL 稀释液加入 9 mL 中和剂中，室温放置 $30\text{min}\pm 15\text{min}$ ；

菌液对照组：10 mL 稀释液。

在以上三组中，分别加入 6.3.1 中制备的工作菌悬液各 1mL。

6.3.3 培养与计数

分别对试验组、中和剂对照组和菌液对照组进行平板计数，每组接种两个平皿。各组计数结果取平均值，试验组计数结果记作 N_{vf} ，中和剂对照组计数结果记作 N_{vn} ，菌液对照组计数结果记作 N_v ，6.1 中供试品微生物检测组结果记作 N_f 。

6.3.4 结果判定

当 N_{vn} / N_v 接近（如 $0.5 \leq N_{vn} / N_v \leq 2$ ），并且 $(N_{vf} - N_f) / N_{vn} \geq 0.5$ 时，判定中和剂有良好的中和效果，通过中和效果验证。

若供试样品测试未能通过中和效果验证，可以更换中和剂或增加中和剂用量。可选用的中和剂请参考附录 A.5~A.8，或根据需求选择适宜的中和剂进行中和效果验证。

6.4 供试品防腐效能测试

6.4.1 供试品染菌

防腐效能测试实验采用单一菌种染菌的测试方式，即分别用每种测试菌株的菌悬液人

工污染供试化妆品，每隔一定时间检测其中的存活菌量，根据存活菌量的变化判断化妆品防腐体系效能。

分别取 6.2 中制备的菌液，加入装有不少于 20g(mL)供试化妆品原包装中，或加入装有 20g(mL)供试化妆品的适宜容器中，充分混匀，菌液的接种体积不得超过供试化妆品体积的 1%。细菌的染菌浓度为 1×10^5 CFU/g(mL) $\sim 1 \times 10^6$ CFU/g(mL)，黑曲霉和白色念珠菌的染菌浓度为 1×10^4 CFU/g(mL) $\sim 1 \times 10^5$ CFU/g(mL)。染菌后的样品放置于 $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 培养箱中，分别在 1、7、14 和 28 天检测其中的存活菌量，分别计作 N_x ($X=1, 7, 14, 28$)。

6.4.2 计数方法

放置至规定时间后，取 1g (mL) 染菌样品，加入 9 mL 经 6.3 验证有效的中和剂中（样品的稀释倍数应与 6.3 中和剂中和样品的稀释倍数保持一致，保证样品中的抑菌成分可以有效中和），充分混匀。室温中和 $30\text{min} \pm 15\text{min}$ 后，吸取 2 mL 样液，分别注入到两个灭菌平皿内，每皿 1mL，将 $45^\circ\text{C} \sim 50^\circ\text{C}$ 的相应培养基 15mL 注入平板，混匀，凝固后按要求进行倒置培养、计数。如平板上预期生长菌落数较多，可进行 10 倍系列稀释，选择适宜的稀释度进行平板计数。

计数结果报告方式可参考《化妆品安全技术规范》第五章 2.菌落总数检验方法和 6.霉菌和酵母菌检验方法。

6.4.3 计算方法

化妆品防腐效能评价可以用供试品中存活菌量常用对数减少值 (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 ——供试样品初始染菌量的常用对数值。（即染菌菌悬液浓度的常用对数值）

N_x ——不同检测时间，供试样品中存活菌量的常用对数值。

6.4.4 结果判定

不同取样时间供试品中存活菌量常用对数减少值 ($R_x = \lg N_0 - \lg N_x$) ^a									
	细菌				白色念珠菌			黑曲霉	
	T1 ^b	T7	T14	T28	T7	T14	T28	T14	T28
判定标准 A	$\leq 5^c$	≥ 3	≥ 3 且 NI ^d	≥ 3 且 NI	≥ 1	≥ 1 且 NI	≥ 1 且 NI	$\geq 0^f$	≥ 1 且 NI
判定标准 B	$\leq 5^c$	- ^e	≥ 3	≥ 3 且 NI	-	≥ 1	≥ 1 且 NI	≥ 0	≥ 0 且 NI
<p>a. 在防腐效能测试中，可接受偏差范围为$\pm 0.5 \log$。</p> <p>b. T1 测试时间为供试品染菌后 22~24 小时；</p> <p>c. 仅驻留类供试品需在 T1 时间点测试，淋洗类供试品无需在 T1 时间点进行测试。T1 时间点的测试菌株包括金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌、铜绿假单胞菌和表皮葡萄球菌，任一细菌的测试结果满足≤ 5 即认为符合 T1 时间点的评价要求；T7、T14 和 T28 时间点除表皮葡萄球菌外，需所有测试菌株均满足表中相应要求。</p> <p>d. NI: 与上一时间点的计数结果相比，差异未超过$\pm 0.5 \log$；</p> <p>e. “-”表示无需进行测试；</p> <p>f. N_x 与初始染菌量 N_0 相比，差异未超过$\pm 0.5 \log$ 时，$R_x=0$。</p>									

—判定标准 A，适用于不考虑其它控制因素条件下，产品配方能有效防止可能会对消费者构成潜在安全风险微生物增殖的产品。

—判定标准 B，适用于除产品组方因素外，对微生物污染采取了经风险评估有效的其他控制方式的产品。

参考《化妆品安全评估技术导则》（2021 年版）6.3.3 部分，如属于不易受微生物污染的产品，即非含水产品、有机溶剂为主的产品、含水产品中如水活度 <0.7 、乙醇含量 $>20\%$ （体积）、高/低 pH 值（ ≥ 10 或 ≤ 3 ）、一次性或包装不能开启类型的产品，可不进行防腐效能评价。

附录 A

(规范性附录)

培养基和试剂

A.1 含 0.05%(v/v)聚山梨酯 80 的生理盐水

成分: 氯化钠	8.5g
聚山梨酯 80	0.5g
水	1000mL

制法: 将各成分加入蒸馏水或纯化水中, 搅拌后加热溶解, 必要时调节 pH。121℃ 高压灭菌 20min, 灭菌后的培养基在 25℃ 的 pH 值为 7.0±0.2。

A.2 含 0.05%(v/v)聚山梨酯 80 的 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液

成分: 无水磷酸氢二钠	5.8g
磷酸二氢钾	3.6g
氯化钠	4.3g
蛋白胨	1.0g
聚山梨酯 80	0.5g
水	1000mL

制法: 将各成分加入蒸馏水或纯化水中, 搅拌后加热溶解, 必要时调节 pH。121℃ 高压灭菌 15min, 灭菌后的培养基在 25℃ 的 pH 值为 7.0 后的培养。

A.3 胰酪大豆蛋白琼脂培养基 (TSA)

成分: 胰酪胨	15.0g
大豆蛋白胨	5.0g
氯化钠	5.0g
琼脂	15.0g
水	1000mL

制法: 将各成分加入蒸馏水或纯化水中, 搅拌后加热溶解, 必要时调节 pH。121℃ 高压灭菌 15min, 灭菌后的培养基在 25℃ 的 pH 值为 7.3 后的培养。

A.4 沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA)

成分: 蛋白胨	10.0g
葡萄糖	40.0g
琼脂	15.0g
水	1000mL

制法: 将各成分加入蒸馏水或纯化水中, 搅拌后加热溶解, 必要时调节 pH。121℃ 高压灭菌 15min, 灭菌后的培养基在 25℃ 的 pH 值为 5.6 后的培养。

A.5 SCDLP 液体培养基

成分: 胰酪胨	17.0g
大豆蛋白胨	3.0g
氯化钠	5.0g
磷酸氢二钾	2.5g
葡萄糖	2.5g
卵磷脂	1.0g
吐温 80	7.0g
水	1000mL

制法: 将各成分加入蒸馏水或纯化水中, 搅拌后加热溶解, 必要时调节 pH。121℃ 高压灭菌 20min, 灭菌后的培养基在 25℃ 的 pH 值为 7.2 后的培养。

A.6 Eugon LT 100 肉汤

成分: 胰蛋白胨	15.0g
大豆蛋白胨	5.0g
氯化钠	4.0g
L-胱氨酸	0.7g
亚硫酸钠	0.2g
葡萄糖	5.5g
卵磷脂	1.0g
吐温 80	5.0g
辛基酚聚醚-9	1.0g
水	1000mL

制法: 将各成分加入蒸馏水或纯化水中, 搅拌后加热溶解, 必要时调节 pH。121℃ 高压灭菌 15min, 灭菌后的培养基在 25℃ 的 pH 值为 7.0 后的培养。

A.7 D/E 肉汤

成分: 酵母浸粉	2.5g
胰蛋白胨	5.0g
葡萄糖	10.0g
亚硫酸氢钠	2.5g
卵磷脂	7.0g
硫代硫酸钠	6.0g
溴甲酚紫	0.02g
硫乙醇酸钠	1.0g
吐温 80	5.0g
水	1000mL

制法：将各成分加入蒸馏水或纯化水中，搅拌后加热溶解，必要时调节 pH。121℃高压灭菌 15min，灭菌后的培养基在 25℃的 pH 值为 7.6 后的培养。

A.8 改良 Lethen 肉汤

成分: 牛肉浸粉	5.0g
氯化钠	5.0g
卵磷脂	0.7g
吐温 80	5.0g
酵母浸粉	2.0g
亚硫酸氢钠	0.1g
酪蛋白胰酶水解物	5.0g
肉类胃蛋白酶水解物	20.0g
水	1000mL

制法：将各成分加入蒸馏水或纯化水中，搅拌后加热溶解，必要时调节 pH。121℃高压灭菌 15min，灭菌后的培养基在 25℃的 pH 值为 7.2 后的培养。

化妆品防腐剂挑战试验技术指南（征求意见稿）

起草说明

为加强化妆品的监督管理，进一步提高化妆品使用安全性，中国食品药品检定研究院组织开展了化妆品微生物学防腐效能评价的研究制订工作。现就工作有关情况说明如下：

一、起草原则

本标准规定了化妆品防腐效能的评价方法，适用于亲水性的膏、霜、乳剂及水剂类等常见化妆品防腐体系效能评价。为保证评价方法的科学性，本次验证在样品选择上不仅涵盖了市场上不同防腐体系的化妆品，而且覆盖了不同的类别，同时组织 6 家实验室进行协作验证，充分考量了实测数据的可靠性、重复性和准确性。

二、起草过程

化妆品标准专家委员会于 2024 年 1 月委托开展了化妆品微生物学防腐效能评价方法的制定工作。由中国食品药品检定研究院（以下简称中检院）负责牵头验证，广东省药品检验所、湖北省药品监督检验研究院、上海市食品药品检验研究院、四川省药品检验研究院（四川省医疗器械检测中心）、浙江省食品药品检验研究院、江西省检验检测认证总院食品检验检测研究院 6 家外部实验室进行实验室间验证工作，同时组织花王（中国）研究开发有限公司、北京宝洁技术有限公司、资生堂（中国）投资有限公司、华熙生物科技股份有限公司、上海家化联合股份有限公司、联合利华（中国）有限公司上海分公司、皮尔法伯(上海)化妆品贸易有限公司、袋鼠妈妈:广州天然国度生物科技有限公司、诺斯贝尔化妆品股份有限公司、养生堂(安吉)化妆品有限公司参与项目调研、文本讨论及验证工作。前期准备工作包括查阅文献、参考相关的国家和行业标准、研究实验方案、化妆品样品的筛选、方法验证用菌株的制备和中和剂的筛选等。拟定验证化妆品样品和验证方法后，开展了实验室间的协作验证，根据项目中期专家及企业的意见，完善了评价方法，整理了实验数据和结果，经整理归纳后，最终形成了化妆品防腐效能评价文本和验证报告。

三、国内外相关标准情况

目前我国用于化妆品防腐效能评价的标准是团体标准 T/SHRH 017-2019 化妆品防腐挑战实验和 T/GDCDC 010-2019 化妆品防腐挑战性测试方法和《中华人民共和国药典》（2020 版）通则 1121 抑菌效力检查法。

国际上主要用于化妆品防腐效能评估的标准为 Cosmetics—Microbiology—Evaluation of the antimicrobial protection of a cosmetic product（ISO11930-2019），CTFA microbiology guidelines（2007），AOAC Official Method 998.10 Efficacy of Preservation of Non-Eye Area Water-Miscible Cosmetic and Toiletry Formulations, USP 43-NF 38<51> ANTIMICROBIAL

表 1 主要相关标准列表

序号	来源国家或组织	标准号/版本号	标准名称	检测范围/适用基质	与制修订标准的关系
1	中华人民共和国药典委员会	2020 版	《中华人民共和国药典》通则 1121 抑菌效力检查法。	药品	非等效
2	上海日用化学品行业协会	T/SHRH 017-2019	化妆品防腐挑战实验	化妆品	非等效
3	广东省日化商会	T/GDCDC 010-2019	化妆品防腐挑战性测试方法	化妆品	非等效
4	国际标准化组织	ISO11930-2019	Cosmetics—Microbiology—Evaluation of the antimicrobial protection of a cosmetic product	化妆品	非等效
5	美国分析化学家协会	AOAC 998.10-2009	Efficacy of Preservation of Non-Eye Area Water-Miscible Cosmetic and Toiletry Formulations	化妆品	非等效
6	美国药典委员会	USP 43-NF 38<51>	ANTIMICROBIAL EFFECTIVENESS TESTING	化妆品	非等效

四、实验室验证情况

本次评价方法的验证实验主要参考了 Cosmetics—Microbiology—Evaluation of the antimicrobial protection of a cosmetic product (ISO11930-2019) 和《中华人民共和国药典》(2020 版) 的方法。验证部分可分为样品菌落总数和霉菌酵母菌检测、中和剂效果验证测试以及供试品防腐效能的测试三部分。

在本次前期验证过程中, 对 40 批次的化妆品产品进行了菌落总数、霉菌和酵母菌的检验。检验结果表明, 所有批次的化妆品的菌落总数、霉菌和酵母菌的计数均 < 10 CFU/g (mL)。中和剂验证结果显示, 在 1: 100 稀释度内, 所有化妆品均能被有效中和。

在本次防腐效能测试时, 选用了 ATCC 菌株及 CMCC 菌株同时开展实验。结果显示,

来自不同菌种库的菌株存在测试结果不一致的情况。考虑到《中华人民共和国生物安全法》的实施，导致从合法途径获取 ATCC 菌株难度的增大，本次防腐效能评价测试最终选用了中国工业微生物菌种保藏管理中心来源的 CMCC 菌株作为标准菌株。中检院采用 CMCC 菌株进行的防腐效能评价的结果显示，除 1 个样品外，其余样品在各个时间点的测试结果均满足防腐效能评价的要求，成功通过防腐效能评价测试。经过分析，该样品可被归类为包装不可开启产品，无需进行防腐效能评价。因此本次试验结果中可排除该结果数值。

基于 6 家实验室的防腐效能测试结果来看，不同来源的菌株对个别供试品的防腐评价结果可能产生影响，这与中检院的测试结果一致，进一步确认了在同一个标准中，不应使用两套菌株体系进行评价。6 家实验室防腐效能结果显示，共有 4 个样品不符合防腐效能评价的要求。经分析发现，其中一个样品为袋装式面膜产品，属于一次性化妆品，无需进行防腐效能评价。因此，实际未能通过防腐效能评价的样品共 3 个。综合考虑中检院及 6 家实验室的数据，本次验证试验仅有 7.5%（3/40）的化妆品无法满足防腐效能评价要求，这一比例较低，对行业影响较小，能够满足标准制定的需求。

五、其他应予以说明的事项

在制定化妆品防腐效能评价方法时，我们综合考虑了国内外相关标准，并创新性地引入了 T1 时间点和表皮葡萄球菌两个关键要素，以限制防腐成分的过度使用。经验证，仅有 1 个样品（2.5%，1/40）未能满足 T1 时间点的要求，对行业影响较小。经过方法学验证，本方法的制定能够满足化妆品防腐效能评价的要求。