

# 用微生物挑战性试验考察化妆品防腐剂效果

牛振东, 江志杰, 张光华, 孙伟, 高春  
(北京市药品检验所, 北京 100035)

**摘要:** 为了考察 2010 年化妆品风险监测抽验样品的防腐效果, 参考《中国药典》(2010 年版附录) 对 3 种化妆品进行菌落计数方法学验证, 选取回收率达到 70% 以上的 3 种化妆品进行微生物挑战性试验。通过对 3 类化妆品进行挑战性试验研究, 结果表明, 选择的 3 种化妆品均能通过挑战性试验。通过此次考察, 可以为化妆品生产企业提高防腐工艺提供科学的依据, 为消费者的健康提供参考。

**关键词:** 化妆品; 微生物; 防腐体系; 挑战性试验

**中图分类号:** TQ658      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1006-7264(2012)03-0036-03

化妆品中一般都含有丰富的营养物质<sup>[1]</sup>, 容易造成微生物的污染, 因此在化妆品中常添加不同种类的防腐剂来防止微生物的大量繁殖。随着化妆品种类和剂型的繁多以及高科技生物原料应用的增加, 许多化妆品公司都在积极研究防腐剂问题 (包括其品种和使用浓度), 并不断建立新的防腐体系。大多数化妆品不能认为是无菌产品, 因为制造它们的原材料不是无菌的, 且在生产过程中没有采用无菌程序, 没有灭菌过程, 而且常常装在多次使用过的包装容器内, 这就可能造成了微生物的污染。产品的微生物污染是多种多样的, 最严重的微生物污染是致病性微生物的污染, 如致病性微生物金黄色葡萄球菌、条件致病性微生物绿脓杆菌或白色念珠菌的污染, 在使用过程中就会对消费者造成极大的危害。非致病性微生物的污染一般不会对消费者造成生命威胁, 然而很高浓度的微生物的污染 (如达到  $10^5$  个 / mL), 会引起产品的变质 (在颜色、气味、香味和透明度等方面), 导致产品不能使用。

防腐效能试验又称“挑战性试验”, 它是用来测定防腐剂有效抗菌的最低浓度, 所有的化妆品在生产 and 消费者使用过程中都可能受到微生物污染 (一次污染和二次污染)。微生物挑战性试验是目前评价防腐剂效果的最为广泛和经典的检测方法。微生物挑战性试验有单一菌接种法和混合菌接种法, 由于混合接种法更能接近生活实际, 代表实际污染的条件和状况, 所以混合菌接种的方法更容易被生产企业所采用和接受, 即在待测样品中分别接种混合细菌液或混合霉菌液, 搅拌均匀。再将样品置于室温下存放, 并于不同的时间分别测定样品中的活细菌和活霉菌含量<sup>[2]</sup>。为了考察市场上化妆品的抑菌效果, 在此采用单一加菌

的方法对 2010 年化妆品风险监测抽验样品进行了考察, 来初步评价此次抽检的化妆品的使用安全性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种

铜绿假单胞菌 [CMCC(B)10104]、金黄色葡萄球菌 [CMCC(B)26003]、大肠埃希菌 [CMCC(B)44102]、白色念珠菌 [CMCC(F)98001] 和黑曲霉 [CMCC(F)98003], 均购自中国药品生物制品检定所。

样品为 2010 年化妆品风险监测抽验样品, 选择防晒类、护肤类和祛斑类, 3 种具有代表性的产品进行考察。

#### 1.1.2 培养基与主要仪器设备

洁净工作台 (苏州苏洁净化设备公司)、生化培养箱 (上海一恒科学仪器有限公司)。生理盐水、SCDLP 液体培养基、卵磷脂吐温 - 80 营养琼脂培养基、双倍乳糖胆盐 (含中和剂) 培养基、Baird Parker 和孟加拉红培养基等均由陆桥试剂公司提供。

#### 1.1.3 实验用菌液的配制

实验前将各菌株分别接种到相应培养基斜面, 细菌  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  恒温培养 48 h, 霉菌、酵母菌  $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  恒温培养 5 天, 然后用少量无菌生理盐水分别将斜面上的菌苔洗出, 充分摇荡均匀, 经适当稀释分别制成  $10^6$  cfu/mL 混合细菌悬液和  $10^5$  cfu/mL 霉菌孢子悬液, 置于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  贮藏备用。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 方法

本次实验参考目前国内外使用较多的防腐效能评价方法即微生物挑战性试验, 主要有: 美国化妆品、

盥洗用品和香料协会 (CTFA)、美国药典 (USP)、欧洲药典 (EP)、美国检验方法及材料协会 (ASTM) 等推荐的方法和《中国药典》微生物挑战性试验方法, 即将一定量的微生物悬浊液加入到化妆品中, 每隔一定时间用平板计数法检测微生物的存活情况, 以此判断防腐剂的防腐效果。

### 1.2.2 培养方式与纯培养

根据《中国药典》的方法分别考察以上做过方法学验证的几个品种。取化妆品每份 20 mL, 制成供试液, 分别加入试验菌液, 使其最终细菌浓度为  $10^6$  / mL, 酵母菌和霉菌浓度为  $10^5$  / mL。放置在室温, 7 天、14 天和 28 天分别检测 1 次。检测方法是将试验样用 10 倍稀释法做系列稀释, 取 1 mL 注入平面皿, 加入适宜各种菌生长的培养基, 混匀, 待凝固后于 37 °C 至少培养 3 天, 霉菌和酵母菌在 25 °C 培养 5 天, 然后计数菌落数, 乘以稀释倍数, 即可得出每毫升样品中的微生物数。

### 1.2.3 评价标准

参考《中国药典》(2010 年版) 附录 XV III D 抑菌剂效力检查法指导原则, 产品类别 2 类, 参考局部给药制剂、非灭菌鼻用制剂及用于粘膜的乳剂, 细菌于第 7 天时菌落总数下降 3 lg, 至第 28 天时无增长; 真菌于第 14 天下降 2 lg, 至第 28 天时无增长, 判断为防腐剂防腐效果良好。

## 2 结果与讨论

### 2.1 结果

受试的 3 种类型的化妆品在检测时间内细菌和真菌的防腐能力见表 1。从表 1 结果看, 选取的 3 种类型的化妆品, 14 天细菌菌数下降不少于 2.0 lg, 14 天 ~ 28 天细菌菌数未增加; 与初始值比, 14 天和 28 天真菌菌数均未增加, 受试的 3 种类型的化妆品均能够通过挑战性试验。为了考察化妆品的防腐效力, 本次试验所选取的 3 种类型的产品都是经过微生物验证过的, 将 3 种类型的产品按照《中国药典》微生物限度检查方法 (常规法) 进行验证, 结果 3 种产品经过验证后, 各验证菌的回收率均能达到 70%, 且该 3 种样品按照化妆品卫生规范 (2007 年版) 方法进行检验为无菌产品。因此, 选择这 3 种样品作为供试品代表进行研究, 通过本次试验初步对 2010 年化妆品风险监测抽验样品的防腐效果进行了考察, 为消费者选择健康的化妆品提供可靠依据。

### 2.2 讨论

本次实验参考目前国内外使用较多的防腐效能评价方法即微生物挑战性试验, 主要有: USP 法<sup>[3]</sup>、CTFA 法<sup>[4]</sup>、EP 法和《中国药典》(2010 版) 等推荐的

方法, 接种量符合要求: 供试品中 1 mL 接种菌量为  $10^5$  cfu ~  $10^6$  cfu, 接种菌液的体积不得超过供试品体积的 0.5% ~ 1%。接种的供试品在试验期间置于 20 °C ~ 25 °C 环境下, 避光贮存, 贮存温度的变化尽可能控制在最小范围, 并防止被污染。3 个品种的细菌数 14 天均下降 2.0 lg 以上, 14 天 ~ 28 天菌数均未增加; 而真菌数与初始值相比, 14 天和 28 天菌数均不增加, 通过挑战性试验。

化妆品挑战性试验方法有很多, 目前化妆品生产制造企业或研究机构所使用的防腐检测方法主要有 CTFA、ASTM (美国检验方法及材料协会), USP 和《英国药典学》方法, 《中国药典》中的微生物抑菌浓度试验等方法。CTFA 要求在第 7 天时霉菌降低 90%, 细菌降低 99.9%, 并且在 28 天内菌数持续下降。美国在 CTFA 评价方法的基础上提出更为严格的标准, 即若单菌接种的 3 个平行试验中任何一种微生物数量的平均值, 在第 7 天下降至 100 cfu / mL 以下, 28 天全部为 0, 则视为效果优良通过挑战试验; 若第 7 天下降至 1 000 cfu / mL 以下, 则视为勉强通过; 若单菌接种的任何一种微生物, 任何一个平行样达不到上述标准, 也达不到 CTFA 的要求, 防腐体系则评定为无效。按照 CTFA 的方法, 本次考察的 3 种化妆品中, 均能通过 CTFA 的要求, 但是相对美国的方法而言, 只有祛斑类产品防腐效果优良, 护肤类产品中, 铜绿假单胞菌没能通过美国的标准, 防晒类产品大肠埃希菌和白色念珠菌没能通过美国标准。可能由于 3 种类型的产品的制造工艺不同或者是使用的防腐剂不同造成的。因此, 好的加工工艺和防腐剂的应用可以提高化妆品的品质, 消费者的健康也能得到保障。通过此次考察, 可以为化妆品生产企业提高防腐工艺提供科学的依据, 为消费者的健康提供保障。

### 2.3 化妆品防腐体系快速评价方法探讨

常规的微生物挑战试验方法的试用周期都在 28 天以上, 这对于确定一个产品的防腐体系是必须的。但很多生产企业在产品的防腐体系的筛选时, 由于摸索试验周期太长, 不利于尽快淘汰无效的防腐体系而选择有希望的防腐体系作进一步试验, 以缩短研究周期。通过检测数据, 可看到: ① 当测试进行到第 7 天时, 若细菌和霉菌数均能降低到  $10^3$  级以下时, 第 28 天时的结果和评价一般都能通过挑战试验; ② 当测试进行到第 14 天时, 细菌和霉菌数在  $10^4$  级以上时, 第 28 天时的评价基本都不能通过挑战试验。虽然这仅仅是一个经验性的规律观察, 还需要在实践中进一步验证, 但对加快化妆品产品防腐体系筛选的过程, 应该是一个有价值的帮助。

表 1 3 种化妆品微生物挑战性试验结果  
Tab.1 Result of three kinds of cosmetic challenge test

产 品	菌 种	接种菌液浓度 / cfu·mL <sup>-1</sup>	lg 值	产品在不同培养天数的菌落浓度和 lg 值							
				0 天 /cfu·mL <sup>-1</sup> lg 值	7 天 /cfu·mL <sup>-1</sup> lg 值	14 天 /cfu·mL <sup>-1</sup> lg 值	28 天 /cfu·mL <sup>-1</sup> lg 值				
祛斑类	金黄色葡萄球菌	1.5 × 10 <sup>6</sup>	lg6.18	1.4 × 10 <sup>5</sup>	lg5.15	< 10	< lg1	< 10	< lg1	< 10	< lg1
	铜绿假单胞菌	1.6 × 10 <sup>6</sup>	lg6.20	1.4 × 10 <sup>2</sup>	lg2.15	10	lg1	< 10	< lg1	< 10	< lg1
	大肠埃希菌	2.3 × 10 <sup>6</sup>	lg6.36	1.6 × 10 <sup>6</sup>	lg6.20	10	lg1	< 10	< lg1	< 10	< lg1
	黑曲霉	1.8 × 10 <sup>5</sup>	lg5.26	1.6 × 10 <sup>5</sup>	lg5.26	< 10	< lg1	< 10	< lg1	< 10	< lg1
	白色念珠菌	1.4 × 10 <sup>5</sup>	lg5.15	1.4 × 10 <sup>5</sup>	lg5.15	< 10	< lg1	< 10	< lg1	< 10	< lg1
护肤类	金黄色葡萄球菌	1.5 × 10 <sup>6</sup>	lg6.18	4.3 × 10 <sup>4</sup>	lg4.63	< 10	< lg1	< 10	< lg1	< 10	< lg1
	铜绿假单胞菌	1.6 × 10 <sup>6</sup>	lg6.20	4.3 × 10 <sup>5</sup>	lg5.63	1.8 × 10 <sup>3</sup>	lg3.26	1.2 × 10 <sup>3</sup>	lg3.09	1.1 × 10 <sup>3</sup>	lg3.04
	大肠埃希菌	2.3 × 10 <sup>6</sup>	lg6.36	1.8 × 10 <sup>6</sup>	lg6.26	20	lg1.3	< 10	< lg1	< 10	< lg1
	黑曲霉	1.8 × 10 <sup>5</sup>	lg5.26	1.5 × 10 <sup>5</sup>	lg5.18	< 10	< lg1	< 10	< lg1	< 10	< lg1
	白色念珠菌	1.4 × 10 <sup>5</sup>	lg5.15	1.1 × 10 <sup>5</sup>	lg5.05	< 10	< lg1	< 10	< lg1	< 10	< lg1
防晒类	金黄色葡萄球菌	1.5 × 10 <sup>6</sup>	lg6.18	3.6 × 10 <sup>5</sup>	lg5.56	5.7 × 10 <sup>2</sup>	lg2.76	2.9 × 10 <sup>2</sup>	lg2.46	2.8 × 10 <sup>2</sup>	lg2.45
	铜绿假单胞菌	1.6 × 10 <sup>6</sup>	lg6.20	1.5 × 10 <sup>6</sup>	lg6.16	1.9 × 10 <sup>2</sup>	lg2.28	2.0 × 10 <sup>2</sup>	lg2.30	1.5 × 10 <sup>2</sup>	lg2.18
	大肠埃希菌	2.3 × 10 <sup>6</sup>	lg6.36	1.4 × 10 <sup>6</sup>	lg6.13	6.4 × 10 <sup>3</sup>	lg3.81	< 10	< lg1	< 10	< lg1
	黑曲霉	1.8 × 10 <sup>5</sup>	lg5.26	1.5 × 10 <sup>5</sup>	lg5.18	< 10	< lg1	< 10	< lg1	< 10	< lg1
	白色念珠菌	1.4 × 10 <sup>5</sup>	lg5.15	1.4 × 10 <sup>5</sup>	g5.15	2.0 × 10 <sup>3</sup>	lg3.31	< 10	< lg1	< 10	< lg1

防腐效能试验无论是对消费者还是生产企业都至关重要,防腐剂的量添加过少,会使微生物繁殖而引起污染,化妆品会出现变质和酸败等现象,影响消费者的健康,防腐剂的量过大,会引起皮肤不适(如产生皮疹、灼烧、皮肤变红和发痒等)或过敏等病态反应,因此,适量添加防腐剂就显得尤为重要,如何适当添加就需要挑战性试验,因此,挑战性试验是评价化妆品质量的保证。建立良好的防腐体系,保证产品的微生物安全性,对于化妆品的质量安全十分重要。

### 3 结论

利用微生物挑战性试验考察了 2010 年化妆品风险监测抽验样品的防腐效果,选取回收率达到 70%

以上的 3 种化妆品进行微生物挑战性试验,结果表明,选择的 3 种化妆品均能通过挑战性试验。通过此次考察,发现 2010 年化妆品风险监测抽验样品均能通过挑战性试验,可以为消费者的选择提供参考。

#### 参考文献:

- [1] 郑萍,陈西平.几种防腐剂在化妆品中的作用效果评价[J].环境与健康杂志,2008,25(2):114-116.
- [2] 陈仪本,欧阳友生,陈娇娣,等.化妆品防腐体系的效能评价与实际的相关性[J].日用化学工业,2001,31(2):52-54.
- [3] Scott V, W. Sutton, David Porter. Development of the antimicrobial effectiveness test as USP chapter (51) [J]. PDA J Pharm Sci Technol, 2002, 56(6): 300-311.
- [4] M J Muscatiello. CTFAs preservation guidelines: a histories perspective and review [J]. C & T, 1993, 108: 53-59

## Evaluation of the effect of preservatives in cosmetic with microbial challenge test

NIU Zhen-dong, JIANG Zhi-jie, ZHANG Guang-hua, SUN Wei, GAO Chun

(Beijing Institute for Drug Control, Beijing 100035, China)

**Abstract:** According to the 2010 edition of *Chinese Pharmacopoeia Appendix*, total plate count method was used to assess the preservative effect of 3 types of cosmetic which were Beijing Drug Administration cosmetic risk survey testing samples in 2010. Three cosmetic samples with recovery rate over 70% were selected to carry out the microbial challenge test. The results showed that all of three kinds of cosmetics passed the challenge test. It not only provided the scientific basis for cosmetic manufacturers to improve preservative efficiency, but also good reference to guarantee consumer health.

**Key words:** cosmetic; microbial; preservation system; challenge test