

化妆品防腐剂的短期抑菌效能评价

蔡颖¹, 唐波¹, 陈冠武¹, 林宁静¹, 周广彪¹, 陈双鹏¹, 郑子乔²

(1. 汕头出入境检验检疫局, 广东 汕头 515031; 2. 广州名嫡化妆品公司, 广东 广州 510040)

摘要: 分别将金黄色葡萄球菌、大肠杆菌的菌悬液与适当浓度的杰马 BP、GPL 和尼泊金甲酯 (以下简称尼甲) 3 种防腐剂的水溶液或添加防腐剂的化妆品混合均匀, 作用 4 h、8 h 和 24 h 后进行菌落总数测定, 以细菌总数的杀灭对数值作为评价指标。结果显示, 尼甲按 1 : 1 000 ~ 3 : 1 000 的比例加入水中后, 对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的抑菌作用弱。浓度提高到 5 : 1 000 ~ 15 : 1 000 加入化妆品中后, 对大肠杆菌的抑菌效果明显增强, 但对金黄色葡萄球菌的抑杀作用反而减弱。在膏状化妆品中尼甲对大肠杆菌的抑杀作用明显强于液状化妆品。GPL 和杰马 BP 在 0.05% ~ 0.15% 的水溶液中对 2 种致病菌产生明显甚至强烈的抑杀作用, 且对 2 种菌的抑杀强度基本相同, 浓度提高到 0.25% ~ 0.75% 并加入化妆品中后, 抑菌效果明显下降。在膏状化妆品中 GPL 和杰马 BP 对大肠杆菌的抑杀作用强于金黄色葡萄球菌。膏状和液状化妆品中 GPL 和杰马 BP 对大肠杆菌的抑杀作用基本相当。

关键词: 化妆品; 防腐剂; 抑菌效能

中图分类号: TQ658 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-7264(2012)05-0036-04

化妆品抑菌效果测定方法中最经典的是微生物挑战试验 (microbial challenge testing), 许多文献^[1-9]采用《美国药典》、《欧洲药典》、CTFA 等的方法, 测试时间一般均需要 7 天 ~ 28 天, 还未发现研究防腐剂对致病菌短期 (1 天内) 抑杀作用的报道。长的测试周期反映的是化妆品产品在较长时间内甚至在保质期内防止腐败的能力, 而短期抑菌效能则可以反映产品在受到致病菌污染后短时间内的自净作用的强弱, 也可作为化妆品防腐体系优劣评判的另一指标。

为此, 本项目建立了防腐剂或化妆品短期抑菌效能测定方法, 并对 3 种常见的防腐剂尼泊金甲酯 (以下简称尼甲)、杰马 BP、GPL 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的短期抑菌作用进行了测定。杰马 BP 为双咪唑烷基脲 (杰马) 与丁氨基甲酸 3-碘代 2-丙炔基酯 (IPBC) 的混合物, 其中含 IPBC 0.70% ~ 0.90%, 杰马 40% 左右; GPL 为乙内酰脲 (DMDM) 与 IPBC 混合物, 其中 IPBC 含量 2.5%, DMDM 含量 47.5% 左右。

1 实验材料

1.1 实验用菌株 (见表 1)

表 1 使用菌株一览表

Tab.1 List of bacteria strains used in the study

序号	菌株名称	菌株类型	菌株编号	菌株来源
1	金黄色葡萄球菌	标准菌株	AS1.2465	中国普通微生物菌种保藏中心
2	大肠杆菌	标准菌株	44113	中国医学细菌保藏管理中心

1.2 试剂和仪器

脑心浸液肉汤 (BHI), 双料 BHI 肉汤 (各组分浓度均为营养肉汤的 2 倍), 卵磷脂-吐温 80-营养琼脂培养基 (均为北京陆桥技术有限公司产品)。防腐剂: 尼泊金甲酯 (以下简称尼甲)、杰马 BP 和 GPL (由广州名嫡化妆品公司提供)。不含防腐剂的化妆品基质: 分为白色膏状和透明液状 2 种 (由广州名嫡化妆品公司提供)。

恒温培养箱 (上海博迅实业有限公司)。

收稿日期: 2012-03-03

基金项目: 广东省汕头市科技计划项目 (汕市财文[2008]386号-69)。

作者简介: 蔡颖 (1974-), 男, 广东人, 主任。

2 实验方法

2.1 防腐剂水溶液短期抑菌作用的测定方法

在培养管中加入 5 mL 双料肉汤, 再加入 5 mL 适当浓度的防腐剂水溶液 (或防腐剂与水的混合物), 制成含防腐剂的 BHI 肉汤, 最后加入 0.1 mL 适当浓度的菌悬液, 混匀。经测定, 加入防腐剂的 BHI 肉汤, 其 pH 值与普通的 BHI 肉汤基本相同, 没有变化。菌悬液终浓度 1×10^6 cfu / mL ~ 9×10^6 cfu / mL, 尼泊金甲酯由于在水中的溶解度低, 为方便与加入化妆品的情形比较, 这里不考虑其溶解度, 直接按比例与水混合, 最终与水的混合比例分别为 3 : 1 000、2 : 1 000、1 : 1 000 (分别相当于 0.3%、0.2% 和 0.1%), 杰马 BP、GPL 的终浓度则为 0.15%、0.1% 和 0.05%。在室温下 (25 °C 左右) 作用一定时间 (4 h、8 h 和 24 h) 后, 每次各取 1 mL 进行菌落总数测定。以灭菌去离子水作为阴性对照。

2.2 已加防腐剂的化妆品短期抑菌作用的测定方法

防腐剂杰马 BP、GPL 配制成适当浓度的水溶液, 吸取 20 μ L 至已加入 0.1 g 化妆品的 1.5 mL 离心管中, 尼泊金甲酯由于溶解度较小, 直接称取适量加入 0.1 g 化妆品中, 再加入菌悬液 0.1 mL 混匀。菌悬液终浓度 1×10^6 cfu / g ~ 9×10^6 cfu / g, 尼泊金甲酯的终浓度为 1.5%、1.0%、0.5%, 杰马 BP、GPL 的终浓度为 0.75%、0.5% 和 0.25%。菌液与加入防腐剂的化妆品在室温下 (25 °C 左右) 作用适当的时间 (4 h、8 h 和 24 h) 后, 直接在样品离心管中加入 BHI 肉汤 0.8 mL, 吹打均匀后全部吸出, 用卵磷脂 - 吐温 80 - 营养琼脂培养基进行菌落总数测定。以不含防腐剂的化妆品基质作为阴性对照。

2.3 评价指标

杀灭对数值: 细菌数量减少的对数值, 称为杀灭对数值。杀灭对数值 < 1 为无抑菌效果; ≥ 1 为有明显抑菌效果; ≥ 3 为有较强抑菌效果; ≥ 5 为有强烈抑菌效果。

3 结果

3.1 3 种防腐剂及添加防腐剂的化妆品对致病菌的抑杀作用

3 种防腐剂及添加防腐剂的化妆品对 2 种致病菌的杀灭对数值及按 2.3 的标准进行评判后结果见表 2 ~ 表 7。实验结果显示:

表 2 尼甲对金黄色葡萄球菌的短期抑菌作用

Tab.2 Short-term bacteriostatic efficacy on staphyococcus aureus of methylparaben

	浓度	杀灭对数值			抑菌作用评价		
		4 h	8 h	24 h	4 h	8 h	24 h
尼甲与水混合物	3:1 000	0.17	0.04	1.15	无效	无效	明显
	2:1 000	0.17	0.29	1.28	无效	无效	明显
	1:1 000	0.17	-0.06	0.11	无效	无效	无效
含尼甲的膏状化妆品	1.5%	0.45	0.32	0.59	无效	无效	无效
	1.0%	0.29	0.17	0.37	无效	无效	无效
	0.5%	0.02	0.02	0.02	无效	无效	无效

表 3 尼泊金甲酯对大肠杆菌的短期抑菌作用

Tab.3 Short-term bacteriostatic efficacy on escherichia coil of methylparaben

	浓度	杀灭对数值			抑菌作用评价		
		4 h	8 h	24 h	4 h	8 h	24 h
尼甲与水混合物	3 : 1 000	-0.68	-1.72	-1.26	无效	无效	无效
	2 : 1 000	-0.20	-1.45	-0.88	无效	无效	无效
	1 : 1 000	-0.72	-1.83	-1.60	无效	无效	无效
含尼甲的膏状化妆品	1.5%	0.23	1.00	2.80	无效	明显	明显
	1.0%	0.64	1.00	3.25	无效	明显	较强
	0.5%	0.25	0.94	3.02	无效	无效	较强
含尼甲的液状化妆品	1.5%	0.51	0.81	2.37	无效	无效	明显
	1.0%	0.51	0.67	≥ 5	无效	无效	强烈
	0.5%	0.84	0.51	4.64	无效	无效	较强

表 4 GPL 对金黄色葡萄球菌的短期抑菌作用

Tab.4 Short-term bacteriostatic efficacy on staphyococcus aureus of GPL

	浓度 / %	杀灭对数值			抑菌作用评价		
		4 h	8 h	24 h	4 h	8 h	24 h
GPL 水溶液	0.15	≥ 5	≥ 5	≥ 5	强烈	强烈	强烈
	0.10	3.87	≥ 5	≥ 5	较强	强烈	强烈
	0.05	0.34	2.95	≥ 5	无效	明显	强烈
含 GPL 膏状化妆品	0.75	0.64	1.33	≥ 5	无效	明显	强烈
	0.50	0.50	0.89	≥ 5	无效	无效	强烈
	0.25	0.04	0.24	1.62	无效	无效	明显

1) 尼甲与水混合后在 3 : 1 000 (相当于 0.3%) 浓度及以下对大肠杆菌完全无效, 对金黄色葡萄球菌

表 5 GPL 对大肠杆菌的短期抑菌作用

Tab.5 Short-term bacteriostatic efficacy on escherichia coil of GPL

	浓度 / %	杀灭对数值			抑菌作用评价		
		4 h	8 h	24 h	4 h	8 h	24 h
GPL 水溶液	0.15	≥5	≥5	≥5	强烈	强烈	强烈
	0.10	≥5	≥5	≥5	强烈	强烈	强烈
	0.05	0.95	≥5	≥5	无效	强烈	强烈
含 GPL 膏状化妆品	0.75	1.27	1.98	≥5	明显	明显	强烈
	0.50	1.27	2.05	3.28	明显	明显	较强
	0.25	1.50	1.86	3.13	明显	明显	较强
含 GPL 液状化妆品	0.75	1.40	3.68	≥5	明显	较强	强烈
	0.50	1.20	2.68	≥5	明显	明显	强烈
	0.25	0.97	1.65	≥5	无效	明显	强烈

表 6 杰马 BP 对金黄色葡萄球菌的短期抑菌作用

Tab.6 Short-term bacteriostatic efficacy on staphyococcus aureus of Germall BP

	浓度 / %	杀灭对数值			抑菌作用评价		
		4 h	8 h	24 h	4 h	8 h	24 h
杰马 BP 水溶液	0.15	3.94	≥5	≥5	较强	强烈	强烈
	0.10	2.99	2.94	≥5	明显	明显	强烈
	0.05	0.80	1.20	2.25	无效	明显	明显
含杰马 BP 膏状化妆品	0.75	0.53	0.96	≥5	无效	无效	强烈
	0.50	0.19	0.50	3.33	无效	无效	较强
	0.25	0.00	0.44	1.09	无效	无效	明显

表 7 杰马 BP 对大肠杆菌的短期抑菌作用

Tab.7 Short-term bacteriostatic efficacy on escherichia coil of Germall BP

	浓度 / %	杀灭对数值			抑菌作用评价		
		4 h	8 h	24 h	4 h	8 h	24 h
杰马 BP 水溶液	0.15	≥5	≥5	≥5	强烈	强烈	强烈
	0.10	≥5	≥5	≥5	强烈	强烈	强烈
	0.05	0.92	1.70	2.92	无效	明显	明显
含杰马 BP 膏状化妆品	0.75	1.63	2.13	≥5	明显	明显	强烈
	0.50	1.61	2.50	≥5	明显	明显	强烈
	0.25	1.43	2.16	3.10	明显	明显	较强
含杰马 BP 液状化妆品	0.75	1.36	2.41	≥5	明显	明显	强烈
	0.50	0.94	1.67	≥5	无效	明显	强烈
	0.25	0.88	1.41	1.94	无效	明显	明显

只有 2 个高浓度作用 24 h 后才表现出抑菌作用；提高浓度并加入化妆品中后，对大肠杆菌的抑菌效果明显增强，但对金黄色葡萄球菌的抑杀作用反而减弱；膏状化妆品中的尼甲对大肠杆菌的抑杀作用明显强于金黄色葡萄球菌；膏状化妆品中的尼甲对大肠杆菌的抑杀作用明显强于液状化妆品。

2) 在本研究的多数浓度和作用时间下，GPL 水溶液能对 2 种致病菌产生明显甚至强烈的抑杀作用，且对 2 种菌的抑杀强度基本相同；提高浓度并加入化妆品中后，抑菌效果明显下降，GPL 在膏状化妆品中对大肠杆菌的抑杀作用强于对金黄色葡萄球菌；液状化妆品中的 GPL 对大肠杆菌的抑杀作用强于膏状化妆品中。

3) 杰马 BP 对致病菌的抑杀作用也与 GPL 基本相同，但总体稍弱。

4 讨论

国内文献^[1-9]对于防腐剂抑菌作用检测多采用《美国药典》、CTFA 等的方法，测试时间一般均需要 7 天~28 天，化妆品样品量 10 g~40 g 不等。虽然基本能反映产品的实际防腐情况，但由于测试时间长、一次测试样品量大，将导致时间和费用等成本增加。另外，每次测试样品多达 10 g~40 g，菌悬液才 1 mL，测试时要非常小心才能混合均匀；每次测定菌落总数时，要取 1 g，这个 1 g 的代表性要做好也不容易。而本文建立的化妆品短期抑菌作用的测定方法，测试周期短，成本低，另外，由于与细菌作用的化妆品全部参与菌落总数测定，不存在代表性问题，比较容易获得稳定结果。国内外有关化妆品防腐剂防腐效能测试指标多数为细菌残留的绝对数或减少百分比，但以绝对数作为评价指标，结果容易受初始菌量的影响；由于细菌被抑杀是呈几何级数递减的，以减少百分比为评价指标也不够直观。本文借鉴文献^[10]的内容，使用“杀灭对数值”作为评价指标。实践证明，相比细菌绝对数、减少百分比等常规指标好，“杀灭对数值”直观、明确、稳定且可靠。另外，与防腐剂杀灭致病菌的评判标准多数认为杀灭对数值≥3 为有效不同，本研究拟定杀灭对数值 <1 为无抑菌效果，≥1 为有明显抑菌效果，≥3 为有较强抑菌效果，≥5 为有强烈抑菌效果，对于评价化妆品短期抑菌效果具有更好的针对性。

本研究试验结果显示,就水溶液而言,GPL和杰马BP对致病菌具有强烈的抑杀作用,尼泊金甲酯可能由于在水中的溶解度差,影响了其抑菌效果,加入水中后,其对大肠杆菌基本未表现出抑菌作用,对金黄色葡萄球菌仅在高浓度长时间作用后才呈现出一定的抑菌作用。提高浓度加入化妆品中后,尼泊金甲酯对金黄色葡萄球菌反而失去了抑菌效果,但在5:1000(相当于0.5%)的浓度下与大肠杆菌接触24h后能产生明显抑杀作用,对2种菌的抑杀作用呈现出此消彼长的情形。GPL和杰马BP加入到化妆品中后,抑菌作用明显减弱。综合来看,无论是以水溶液的形式还是加入化妆品中,新型防腐剂GPL和杰马BP的短期抑菌效能明显高于传统防腐剂尼泊金甲酯;加入化妆品中后,各种防腐剂的短期防腐效能表现与水溶液中有所不同。

从以上讨论可知,防腐剂加入化妆品中后与其在水溶液中的抑菌效果差别很大,有可能减弱,也可能增强;加入不同化妆品中的抑菌效果也不尽相同。因此,测定化妆品防腐剂对致病菌的短期抑杀作用应以最终产品为准。当然,本文的方法不能代替传统的防腐效能测试,不过或许可以在配方研制过程中作为配方调整的依据来使用,也可在化妆品防腐效果方面提供与传统防腐效能测试不完全相同的信息。

5 结论

防腐剂加入化妆品中后与其在水溶液中的短期抑

菌效果差别很大,加入不同化妆品中的抑菌效果也不尽相同。因此,测定化妆品防腐剂的短期抑菌效果应以产品为准。

参考文献:

- [1] 林惠芬, 李斌, 王惠英. 用微生物挑战性试验评价化妆品防腐剂效果 [J]. 日用化学工业, 1999 (4): 43-45.
- [2] 陆霞霞, 古梅英, 张静, 等. 用微生物挑战性试验对化妆品中常用防腐剂防腐效果的观察 [J]. 广东卫生防疫, 2000, 26(4): 16-19.
- [3] 郭好洁, 童贵忠, 李娜. 生物法检测化妆品中防腐剂的防腐效力观察 [J]. 浙江预防医学, 2005, 17(8): 77,79.
- [4] 许雅, 曾转萍, 吴宪毅, 等. 化妆品防腐剂抑菌和微生物污染关系的研究 [J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15 (1): 1201-1203.
- [5] 郑萍, 陈西平. 化妆品中污染微生物对常用防腐剂的抵抗性 [J]. 环境与健康杂志, 2009, 26(8): 694-695.
- [6] 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.
- [7] 符晓梅, 封幼玲, 诸元生, 等. 两种方法测定化妆品防腐剂抑菌效果及评价 [J]. 环境与健康杂志, 2000, 17 (3): 167-170.
- [8] 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所. 消毒与灭菌效果的评价方法与标准 GB 15981—1995 [S]. 中华人民共和国卫生部, 1996-07-01.
- [9] 陈仪本, 欧阳友生, 陈娇娣, 等. 化妆品防腐体系的构建及其效能评价 [J]. 日用化学工业, 2001, 31(4): 42-46.
- [10] 中华人民共和国卫生部. 消毒技术规范 [S]. 中华人民共和国卫生部, 2002-11-15.

Evaluation on short-term bacteriostatic efficacy of cosmetic antiseptics

CAI Ying¹, TANG Bo¹, CHEN Guan-wu¹, LIN Ning-jing¹, ZHOU Guang-biao¹, CHEN Shuang-peng¹, ZHENG Zi-qiao²

(1. Shantou Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shantou, Guangdong, 515031, China;

2. Guangzhou Mingdi Cosmetics Company, Guangzhou, Guangdong, 510040, China)

Abstract: Suspensions of staphylococcus aureus or Escherichia coli were added to aqueous solution of germall BP, GPL and methylparaben or cosmetics containing these preservatives of proper concentration respectively, then mixed thoroughly. After kept in ambient temperature for 4h, 8h or 24h, the total bacterial counts in these mixtures were determined, and the killing logarithm was set as a parameter for evaluation of short-term bacteriostatic efficacy. Results: while added to water in a ratio of 1 : 1 000~3 : 1 000, methylparaben exhibited a weak inhibition on Staphylococcus aureus and Escherichia coli. While added in cosmetics with concentrations of 5 : 1 000~15 : 1 000, methylparaben inhibited and killed Escherichia coli more quickly and remarkably; on the contrary, it showed a more weaker inhibition on Staphylococcus aureus. Methylparaben presented stronger bacteriostatic efficacy on Escherichia coli in paste cosmetics than that in liquid cosmetics. Aqueous solution of Germall BP and GPL at concentrations of 0.05%~0.15% exhibited significant to strong bacteriostatic efficacy on staphylococcus aureus and Escherichia coli, and with basically the same degree between the two bacteria; however, their bacteriostatic efficacy dropped distinctly in cosmetics at concentrations of 0.25%~0.75%. Germall BP and GPL presented basically the same bacteriostatic efficacy on Escherichia coli in both paste cosmetics and liquid cosmetics.

Key words: cosmetics; preservative; bacteriostatic efficacy