

中图分类号:R917 文献标志码:A 文章编号:1006-4931(2023)08-0081-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.08.019



7种防晒化妆品微生物检验方法适用性研究

曹敏,史翔宇,冯璐

(江苏省泰州市药品检验院,江苏 泰州 225300)

摘要:目的 建立化妆品微生物检验方法适用性试验方法。方法 参照2015年版《化妆品安全技术规范》和2020年版《中国药典(四部)》通则1105和1106,对7种防晒化妆品进行微生物检验方法适用性考察。结果 菌落总数及霉菌和酵母菌总数,1种防晒化妆品需采用1:100(V/V)供试液消除抑菌性后进行微生物检验,其余6种均可采用常规法检验;控制菌,耐热大肠菌群、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌多可采用常规法检验,仅1种防晒化妆品需采用250 mL双倍乳糖胆盐(含中和剂)培养基检验耐热大肠菌群。结论 防晒化妆品微生物检验前有必要进行方法适用性试验。

关键词:防晒化妆品;微生物检验;方法适用性;耐热大肠菌群

Method Applicability of Microorganism Test on Seven Types of Suncare Products

CAO Min, SHI Xiangyu, FENG Lu

(Taizhou Institute for Food and Drug Control, Taizhou, Jiangsu, China 225300)

Abstract: Objective To establish a test method for the applicability of microorganism test methods of suncare products. Methods According to the Safety and Technical Standards for Cosmetics (2015 Edition) and the general rules 1105 and 1106 of the Chinese Pharmacopoeia (2020 Edition, Volume IV), the method applicability of the microorganism test of seven suncare products was investigated. Results The total number of bacterial colonies, molds and yeasts in one type of suncare product should be tested by 1:100 (V/V) test solution to eliminate bacteriostasis before the microorganism test, while those in the other six types could be tested by the routine method. Control bacteria, thermotolerant coliforms, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa* in most sunscreen products could be tested by the routine method, while the thermotolerant coliforms in one sunscreen product should be tested by 250 mL of double lactose bile salt (containing neutralizer) culture medium. Conclusion It is necessary to conduct a method applicability test before the microorganism test of sunscreen products.

Key words: sunscreen products; microorganism test; method applicability; thermotolerant coliforms

化妆品中常会添加防腐剂以抑制微生物生长。2015年版《化妆品安全技术规范》^[1](以下简称《规范》)中用于测定菌落总数的卵磷脂吐温80营养琼脂培养基、SCDLP液体培养基、双倍乳糖胆盐培养基中均添加了不同含量的卵磷脂和吐温80以中和防腐剂,但不同化妆品中使用的防腐剂种类及含量差异较大,很难保

证完全中和,可能导致菌落计数结果偏低或致病菌检验结果假阴性。曹婷婷等^[2]对508批化妆品进行微生物检验方法研究发现,添加阳性对照菌后,有18.5%的大肠埃希菌阳性对照和11.42%的金黄色葡萄球菌阳性对照未生长。多项研究发现,部分清洁类、洗发护发类、祛痘抗粉刺类、洗涤类、发用类、眼影、婴幼儿类化妆品

第一作者:曹敏,女,硕士研究生,主管药师,研究方向为药品、化妆品、医疗器械的微生物检验,(电子信箱)1031662072@qq.com。

表3 样品含量测定结果(mg/g, n=3)

Tab. 3 Results of the content determination of nine components in samples (mg/g, n=3)

批号	蛇床子素	小檗碱	黄柏碱	黄柏酮	鞣鞣	苦参碱	氧化苦参碱	虎杖苷	大黄素
190205	1.214	0.711	0.288	0.351	0.146	0.214	0.241	0.462	0.766
190702	1.234	0.726	0.279	0.347	0.141	0.207	0.237	0.445	0.756
190802	1.207	0.721	0.281	0.339	0.138	0.197	0.229	0.454	0.749
191002	1.246	0.735	0.305	0.348	0.134	0.223	0.248	0.441	0.773
191109	1.225	0.742	0.294	0.361	0.129	0.219	0.231	0.457	0.751

[9] 王森,管敏. 高效液相色谱波长切换法同时测定筋骨草中5种成分含量[J]. 中国药业, 2021, 30(6): 47-50

[10] 胡小祥,何艳. 高效液相色谱法同时测定骨折挫伤胶囊中羟基红花黄色素A和大黄素含量[J]. 中国药业, 2020,

29(1): 54-56.

[11] 杨娟,黄敬群. 高效液相色谱法测定除湿止汗散中苦参碱和蛇床子素含量[J]. 华北国防医药, 2010, 22(4): 321-323.

[12] 黄传俊,梅勇,杨莉,等. HPLC法同时测定金蝉止痒胶囊中盐酸小檗碱、黄芩苷和蛇床子素的含量[J]. 中国药房, 2018, 29(12): 1621-1624.

[13] 耿丽,李聪,李志浩. HPLC-DAD法同时测定止痛消炎软膏中6种化学成分的含量[J]. 中国药师, 2020, 23(4): 769-772.

[14] 王志萍,黎芳,陈勇,等. 壮药妇雅净颗粒质量标准研究[J]. 中成药, 2013, 35(11): 2422-2426.

[15] 马娜,范桂强,曹毅,等. 多波长HPLC法同时测定皮肤康洗液中5种有效成分的含量[J]. 中国药师, 2017, 20(5): 963-965.

(收稿日期:2022-06-13;修回日期:2022-09-26)

用常规法进行微生物检验时有不同程度的抑菌性,导致试验菌的回收比不达标或控制菌阳性对照不生长^[3-9]。在此,对7种常见市售防晒化妆品微生物检验方法的适用性进行研究,观察防晒化妆品是否对微生物的生长有抑制作用,同时建立相应的微生物检验方法,以提高防晒化妆品的微生物检出率。现报道如下。

1 材料

1.1 仪器

1300 SERIES A2型生物安全柜(赛默飞世尔科技公司);SHP-250型生化培养箱(上海三发科学仪器有限公司);Scientz-11L型无菌均质器(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.2 样品

妮维雅防晒隔离润肤露(A,妮维雅<上海>有限公司,批号为328129A);露得清轻透亮颜防晒隔离乳液(紫罗兰,B,强生<中国>有限公司,批号为20190315-001);美加净细嫩柔白防晒乳(C,上海家化联合股份有限公司,批号为ASIZS);新碧多效防晒霜(D,曼秀雷敦<中国>有限公司,批号为A00313);安热沙水能户外清透防晒乳(E,株式会社资生堂,批号为93030D-F);高姿多维亮白防晒霜(F,上海新高姿化妆品有限公司广州分公司,批号为ZNL3063N);大宝水凝保湿防晒露(G,北京大宝化妆品有限公司,批号为B191230U)。7种防晒化妆品前5种成分(按含量排序)见表1。

1.3 培养基及试剂

卵磷脂吐温80营养琼脂培养基、孟加拉红培养基、SCDLP液体培养基、双倍乳糖胆盐(含中和剂)培养基、

伊红美蓝琼脂培养基、Baird Parker平板培养基(北京陆桥技术股份有限公司,批号分别为200430,190926,190806,191223,201027,191225);十六烷基三甲基溴化铵培养基(广东环凯微生物科技有限公司,批号为200430);液体石蜡、吐温80、氯化钠(国药集团化学试剂有限公司,批号分别为20201023,20210107,20210209);氯化三苯基四氮唑(TTC,广东环凯微生物科技有限公司,批号为6108026,含量为0.5%)。

1.4 菌株

金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003]、铜绿假单胞菌[CMCC(B)10104]、枯草芽孢杆菌[CMCC(B)63501]、大肠埃希菌[CMCC(B)44102]、白色念珠菌[CMCC(F)98001]、黑曲霉[CMCC(F)98003],均来源于中国食品药品检定研究院。

2 方法与结果

2.1 菌液制备

参照2020年版《中国药典(四部)》通则1105,1106微生物限度检查的微生物计数法和控制菌检查法制备菌液。

2.2 供试液制备

参照2015年版《化妆品卫生规范》,根据防晒化妆品的成分制备。称取样品10g,置一次性无菌均质袋中,加10mL灭菌液体石蜡,均质3~5min,再加入10mL灭菌吐温80,均质3~5min,最后加入70mL灭菌生理盐水,充分混合,制成1:10(V/V)的疏水性供试液。称取样品10g,置装有玻璃珠及90mL灭菌生理盐水的三角瓶,充分振荡混匀,制成1:10(V/V)的亲水性供试液。

表1 7种防晒化妆品中前5种成分

Tab.1 The top five components in seven types of sunscreen products

序号	A	B	C	D	E	F	G
1	水	水	水	水	聚二甲基硅氧烷	水	水
2	甲氧基肉桂酸乙基酯	胡莫柳酯	甲氧基肉桂酸乙基酯	甲氧基肉桂酸乙基酯	水	甲氧基肉桂酸乙基酯	甲氧基肉桂酸乙基酯
3	胡莫柳酯	二苯酮-3	甘油	丁二醇	氧化锌	乙醇	C12-15醇苯甲酸酯
4	水杨酸乙基酯	丁基辛醇水杨酸酯	聚二甲基硅氧烷	环五聚二甲基硅氧烷	乙醇	C12-15醇苯甲酸酯	聚二甲基硅氧烷
5	乙醇	变性乙醇	亚甲基双-苯并三唑基四甲基丁基酚	异十二烷	甲氧基肉桂酸乙基酯	奥克林林	苯乙烯/丙烯酸(酯)类共聚物

表2 菌落总数计数方法适用性试验回收比(1:10)

Tab.2 Recovery ratio for the applicability test of the total bacterial count method (1:10)

样品	金黄色葡萄球菌			铜绿假单胞菌			枯草芽孢杆菌			白色念珠菌			黑曲霉		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
A	1.42	0.82	0.92	0.67	0.57	0.76	1.20	0.91	1.09	0.88	0.72	0.87	0.87	1.12	0.95
B	1.19	1.21	0.96	0.64	0.70	0.74	1.21	1.14	0.96	0.83	0.93	0.83	1.03	0.92	1.05
C	1.69	1.06	1.04	0.58	0.61	0.68	1.04	0.93	0.97	1.14	0.93	0.88	0.68	0.75	0.75
D	1.14	0.74	0.80	0.62	0.78	0.74	0.93	1.04	0.87	1.15	0.94	1.02	0.61	0.65	0.66
E	0.08	0.11	0.20	0.27	0.37	0.39	0.00	0.00	0.00	1.30	0.86	1.01	0.00	0.00	0.00
F	1.31	0.84	0.86	0.64	0.85	0.64	1.12	1.09	1.07	1.02	0.94	1.00	1.26	0.98	1.04
G	1.11	0.90	1.14	0.59	0.67	0.64	0.53	0.71	0.70	0.53	0.82	0.92	0.97	0.71	0.95

2.3 菌落总数及霉菌和酵母菌总数计数方法适用性试验

试验组:取2.2项下供试液9.9 mL,分别加入金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉的试验菌液0.1 mL(含菌量小于1 000 cfu),混匀,使每1 mL供试液中含菌量不大于100 cfu;取1 mL,置直径90 mm无菌平皿中,注入15~20 mL温度不超过45℃的卵磷脂吐温80营养琼脂培养基其中可加入TTC溶液,混匀,凝固,倒置,(36±1)℃培养3 d。每株试验菌每种培养基制备2个平皿,计算平均菌落数。

供试液对照组:取制备好的供试液,以稀释液代替菌液,同试验组操作。

菌液对照组:以稀释液替代供试液,同试验组操作。

测定3组菌落数并计算回收比。回收比=(试验组菌落数-供试液对照组菌落数)/菌液对照组菌落数,正常值应在0.5~2.0范围内。同法计算白色念珠菌、黑曲霉在孟加拉红琼脂培养基[(28±2)℃培养5 d]中的回收情况。

不同样品中,仅样品E采用1:10供试液进行菌落总数计数方法适用性试验时,金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、黑曲霉的回收比异常(见表2);进行霉菌和酵母菌总数计数方法适用性试验时,黑曲霉的回收比异常(见表3)。样品E采用1:100供试液进行菌落总数及霉菌和酵母菌总数计数方法适用性试验时,各种菌的回收比均正常(见表4、表5),因此,样品E进行菌落总数及霉菌和酵母菌总数计数时应使用1:100供试液。其余6种样品可用常规法检验菌落总数及霉菌和酵母菌总数。

表3 霉菌和酵母菌总数计数方法适用性试验回收比(1:10)

Tab. 3 Recovery ratio for the applicability test of the total yeast and mold count method(1:10)

样品	白色念珠菌			黑曲霉		
	1	2	3	1	2	3
A	0.82	0.88	0.76	0.74	0.75	0.69
B	1.01	0.84	0.93	0.71	0.75	0.81
C	1.14	0.96	0.92	1.26	1.00	0.98
D	0.94	0.88	0.84	0.94	0.85	0.81
E	0.77	0.74	0.72	0.49	0.45	0.41
F	1.08	1.00	0.99	0.91	0.78	0.83
G	0.65	0.66	0.67	0.77	0.77	0.73

表4 样品E菌落总数计数方法适用性试验回收比(1:100)

Tab. 4 Recovery ratio for the applicability test of the total bacterial count method for the sample E(1:100)

样品	金黄色葡萄球菌			铜绿假单胞菌			枯草芽孢杆菌			白色念珠菌			黑曲霉		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
E	1.02	0.88	0.93	1.04	0.89	0.90	1.65	0.92	0.96	0.67	0.66	0.73	0.84	0.94	0.88

表5 样品E霉菌和酵母菌总数计数方法适用性试验回收比(1:100)

Tab. 5 Recovery ratio for the applicability test of the total yeast and mold count method for the sample E(1:100)

样品	白色念珠菌			黑曲霉		
	1	2	3	1	2	3
E	1.49	1.06	0.92	0.91	0.86	1.00

2.4 控制菌检验方法适用性试验^[10]

耐热大肠菌群:取1:10供试液10 mL,分别接入2支含双倍乳糖胆盐(含中和剂)培养基的试管(每管含10 mL),其中1管接种含菌量不大于100 cfu的大肠埃希菌,作为试验组,另一管作为供试品对照组。以稀释剂代替供试液,同试验组操作,作为阳性对照组。(44.5±0.5)℃培养24 h,然后划线接种至伊红美蓝琼脂平板上,(36±1)℃培养18 h。

铜绿假单胞菌:取1:10供试液10 mL,分别接入2瓶SCDLP液体培养基(每瓶含90 mL),其中1瓶接种含菌量不大于100 cfu的铜绿假单胞菌,作为试验组,另1瓶作为供试品对照组;以稀释剂代替供试液,同供试品对照组操作,作为阴性对照组;以稀释剂代替供试液,同试验组操作,作为阳性对照组。(36±1)℃培养18 h,然后划线接种至十六烷基三甲基溴化铵琼脂平板上,(36±1)℃培养18 h。

金黄色葡萄球菌:与铜绿假单胞菌同法分组,(36±1)℃培养22 h,然后划线接种至Baird Parker平板,(36±1)℃培养48 h。

耐热大肠菌群检验结果见表6(+为检出,-为未检出;供对组指供试液对照组,阳对组指阳性对照组;下表同)。样品E试验组未检出大肠菌群,考虑选择培养基稀释法,增加双倍乳糖胆盐培养基的体积,稀释至1:100,1:200,1:500,分别将10 mL 1:10供试液加入含50,100,250 mL双倍乳糖胆盐(含中和剂)培养基的无菌瓶,再分别加入40,90,240 mL灭菌生理盐水,各亚组均同上述每管10 mL的双倍乳糖胆盐(含中和剂)培养基进行耐热大肠菌群检验操作。结果使用1:500供试液可去除样品E对大肠埃希菌的抑制作用(见表7),即样品E需用250 mL双倍乳糖胆盐(含中和剂)培养基进行耐热大肠菌群检验。其余6种样品可用常规法进行耐热大肠菌群检验。

表6 耐热大肠菌群检验方法适用性试验结果

Tab. 6 Results of the applicability test of the thermotolerant coliforms test method

样品	试验组	供对组	阳对组	样品	试验组	供对组	阳对组
A	+	-	+	E	-	-	+
B	+	-	+	F	+	-	+
C	+	-	+	G	+	-	+
D	+	-	+				

表7 样品E耐热大肠菌群检验方法适用性试验结果

Tab.7 Results of the applicability test of the thermotolerant coliforms test method for the sample E

组别	1:100	1:200	1:500
试验组	-	-	+
供对照组	-	-	-
阳对照组	+	+	+

金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌检验结果见表8。7种样品的试验组与阳性对照组(阳对组)均检出相应菌,供试液对照组(供对组)均未检出,表明各样品均可用常规法进行此2种菌的检验。

表8 金黄色葡萄球菌与铜绿假单胞菌检验方法适用性试验结果

Tab.8 Results of the applicability test of test methods of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*

样品	金黄色葡萄球菌			铜绿假单胞菌		
	试验组	供对组	阳对组	试验组	供对组	阳对组
A	+	-	+	+	-	+
B	+	-	+	+	-	+
C	+	-	+	+	-	+
D	+	-	+	+	-	+
E	+	-	+	+	-	+
F	+	-	+	+	-	+
G	+	-	+	+	-	+

3 讨论

本研究中参照2020年版《中国药典(四部)》,计数方法适用性试验所用菌株选择金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉,而闵红等^[4,6]在研究洗涤类化妆品及洗发护发化妆品微生物检查方法时用的是大肠埃希菌,而不是铜绿假单胞菌,后续需加以关注。

《规范》中进行耐热大肠菌群检验时是将10 mL供试液接种至10 mL双倍乳糖胆盐(含中和剂)培养基中,实际上将培养基进行了对半稀释,故在本研究中采用培养基稀释法扩大双倍乳糖胆盐(含中和剂)培养基用量的同时也增加了稀释液,最终使培养基得以对半稀释。

供试液的制备需判断样品的疏水、亲水特性。本研究中,除样品E因其含量最高的成分是聚二甲基硅氧烷(有机硅聚合物,不溶于水^[11])按疏水性样品进行供试液制备外,其余样品含量最高的成分均为水,按亲水性样品进行供试液制备。

化妆品的成分按含量高低排序,故排在前面的几个成分可能是导致样品E有较强抑菌性的原因。对于样品E最主要成分聚二甲基硅氧烷,赵勋国^[12]、毛露甜等^[13]研究发现,普通的聚二甲基硅氧烷经季铵盐烃基改性后变成一种新型表面活性剂,对多种细菌、酵母菌和霉菌有较好的抑制作用;对于其成分氧化锌,李马成等^[14]研究发现,纳米氧化锌收敛、抗菌、抑菌效果优于

普通氧化锌,证实了氧化锌的抗菌、抑菌效果;对于其成分乙醇,乙醇体积分数和杀菌效果不成正比,作为消毒剂时应为70%~80%^[15],过高会使细菌表面蛋白变性凝固形成一层膜,阻碍乙醇深入彻底杀死细菌,过低则渗透力太弱,即使渗入细菌,也不能将细菌体内的蛋白凝固,同样不能彻底杀死细菌,样品E中乙醇非主要成分,含量较低,可排除该成分对样品E抑菌性的影响;甲氧基肉桂酸乙基己酯为防晒剂,在另5种样品的成分表中含量排第2,而这5种样品均无抑菌性,排除该成分对样品E抑菌性的影响。

综上所述,氧化锌可能是导致样品E有较强抑菌性的主要原因。但防晒化妆品的成分复杂,各种成分间可能还存在相互影响,具体情况需进一步研究。另一方面,任何防晒化妆品在进行微生物检验前应先进行方法适用性考察,找到适宜的检验方法,以提高微生物的检出率。

参考文献

- [1] 国家食品药品监督管理总局. 化妆品安全技术规范[M]. 北京:中国标准出版社,2016:469-484.
- [2] 曹婷婷,江艳芳,林铁豪. 508批化妆品微生物检验结果及方法的初步研究[J]. 香料香精化妆品,2020(6):29-32.
- [3] 王维亚,骆瑜,刘志斌,等. 清洁类化妆品微生物检验方法适用性研究[J]. 广州化工,2019,47(20):118-121.
- [4] 闵红,周志云,杨晓莉,等. 洗发、护发化妆品微生物检验方法学研究[J]. 微生物学杂志,2016,36(5):103-107.
- [5] 朱庆丽,李倚云,王威,等. 祛痘/抗粉刺类化妆品微生物检查方法学研究[J]. 中国卫生检验杂志,2019,29(9):1039-1042.
- [6] 闵红,周志云,贾萌,等. 洗涤类化妆品微生物检查方法学探讨[J]. 生物技术,2020,30(3):262-268.
- [7] 刘奕,罗俊,庄意琼,等. 发用化妆品微生物检验方法适用性研究[J]. 香料香精化妆品,2021(6):5-9.
- [8] 牟建平,滕宝霞,贺晓文,等. 4种眼影微生物检验方法挑战性试验研究[J]. 当代化工研究,2021(10):141-143.
- [9] 吴娇娇,吕婷婷,王皓,等. 婴幼儿护肤品的微生物检验方法研究[J]. 质量与安全,2021,31(5):23-26.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:160-170.
- [11] 任东升,周志俊. 聚二甲基硅氧烷应用及安全性评估概况[J]. 中国食品卫生杂志,2011,23(2):181-185.
- [12] 赵勋国. 化妆品用硅氧烷化合物的结构功能和应用[J]. 中国洗涤用品工业,2009(4):54-62.
- [13] 毛露甜,王绍芬,钟玉华. 聚硅氧烷季铵盐微乳液在化妆品中的抑菌效果[J]. 环境与健康杂志,2010,27(4):325-327.
- [14] 李马成,黄勇,李林,等. 纳米氧化锌抑菌机理及影响因素研究进展[J]. 饲料研究,2021,44(6):147-150.
- [15] 陈俐志,刘莹,杜彪. 含乙醇手消毒剂研究进展[J]. 中国药业,2022,31(11):128-131.

(收稿日期:2022-04-29;修回日期:2022-09-19)