附件 11

牙膏微生物检验方法总则

General Guidelines

1 范围

 本部分规定了牙膏微生物学检验的基本要求。

本部分适用于牙膏样品的采集、保存及供检样品制备。

2 仪器和设备

2.1 天平：0-200g，精确至0.1g。

2.2 高压灭菌器。

2.3 振荡器。

2.4 三角瓶：250mL、150mL。

2.5 玻璃珠。

2.6 灭菌刻度吸管：10mL、1mL。

2.7 均质器。

2.8 灭菌均质袋。

3 培养基和试剂

3.1 SCDLP液体培养基

 成分：酪蛋白胨 17g

 大豆蛋白胨 3g

 氯化钠 5g

 磷酸氢二钾 2.5g

 葡萄糖 2.5g

 卵磷脂 1g

 吐温80 7g

 蒸馏水 1000mL

制法：先将卵磷脂在少量蒸馏水中加热溶解后，再与其他成分混合，加热溶解，调pH为7.2~7.3分装，每瓶90mL，121℃高压灭菌20min。注意振荡，使沉淀于底层的吐温80充分混合，冷却至25℃左右使用。

注：如无酪蛋白胨和大豆蛋白胨，也可用多胨代替。

4 样品的采集及注意事项

4.1 所采集的样品，应具有代表性，一般视每批牙膏规格大小，随机抽取相应数量的包装单位。检验时，应从不少于2个包装单位的样品中共取10g。包装量小于20g的样品，采样时可适当增加样品包装数量。

4.2 供检样品，应严格保持原有的包装状态。容器不应有破裂，在检验前不得打开，防止样品被污染。

4.3 接到样品后，应立即登记，编写检验序号，并按检验要求尽快检验。如不能及时检验，样品应置于室温阴凉干燥处，不要冷藏或冷冻。

4.4 若只有一个样品而同时需做多种分析，如微生物、毒理、化学等，则宜先取出部分样品做微生物检验，再将剩余样品做其他分析。

4.5 在检验过程中，从打开包装到全部检验操作结束，均须防止微生物的再污染和扩散，所用器皿及材料均应事先灭菌，全部操作应在符合生物安全要求的实验室中进行。

5 供检样品的制备

称取10g，加到装有玻璃珠及90mL SCDLP液体培养基的三角瓶中，充分振荡混匀，静置15min，作为1:10的检液。

使用均质器时，则采用灭菌均质袋，称10g样品加入90mL SCDLP液体培养基，均质1min~2min，静置15min，作为1:10的检液。

牙膏产品微生物检验方法的修订

起草说明

为加强牙膏的监督管理，进一步提高牙膏使用安全性，中国食品药品检定研究院组织开展了《化妆品安全技术规范》微生物检验方法对牙膏产品适用性的研究制订工作。现就工作有关情况说明如下：

一、起草原则

试验要求验证《化妆品安全技术规范》第五章微生物检验方法是否适用于牙膏产品。为保证验证方法的科学性，本次验证在牙膏样品选择上不仅涵盖了市场上不同功效的牙膏，而且覆盖了不同的使用人群，同时组织不同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2023年9月委托开展了《化妆品安全技术规范》微生物检验方法对牙膏产品的适用性验证工作。由中国食品药品检定研究院负责牵头验证，北京大学口腔医学院口腔医疗器械检验中心、浙江省食品药品检验研究院、四川省药品检验研究院、湖北省药品监督检验研究院、广州市药品检验所和华测检测认证集团股份有限公司6家外部实验室进行实验室间验证工作。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、牙膏样品的筛选、方法验证用菌株的制备、验证用培养基的质控和中和剂的筛选。拟定验证牙膏样品和验证方法后，开展了实验室间的协作验证，根据项目中期标准专家委员会的意见，完善了验证方法，整理了实验数据和分析结果，经整理归纳后，最终形成了验证报告。

三、国内外相关标准情况

目前我国用于牙膏产品限值规定的标准是推荐性国家标准GB/T 8372-2017《牙膏》，该标准推荐牙膏产品的微生物检验方法参考《化妆品安全技术规范》，该标准规定的微生物检验项目和限值与《化妆品安全技术规范》一致。

国际上主要用于牙膏产品检测的标准为ISO11609-2017，该标准的检验方法参考ISO-Cosmetics—Microbiology的相关检验方法。

表1 主要相关标准列表

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 序号 | 来源国家或组织 | 标准号 | 标准名称 | 检测范围/适用基质 | 与制修订标准的关系 |
| 1 | 国际标准化组织 | ISO 11609-2017 | Dentistry-Tooth-Requirements, test menthods and marking | 牙膏 | 非等效 |
| 2 | 中华人民共和国 | GB/T 8372-2017 | 牙膏 | 牙膏 | 等效 |

四、实验室验证情况

本次验证的检测方法和评价原则可分为定量检测方法（菌落总数、霉菌和酵母菌）和定性检测方法（耐热大肠菌群、铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌）两部分。定量检测方法的适用性评价原则参考《中华人民共和国药典》（2020版）1105非无菌产品微生物限度检查中供试品计数方法适用性试验原则，定性检测方法的适用性评价参考《中华人民共和国药典》（2020版）1106非无菌产品微生物限度检查中控制菌检查法评价原则。

在本次前期验证过程中，对牙膏产品进行菌落总数检验时，发现一款名为参半清新酵素牙膏存在微生物污染。尽管该牙膏未能满足微生物适用性验证的样品要求而予以剔除，但这证明了《化妆品安全技术规范》（2015版）适用于部分牙膏。在中国食品鉴定研究院的中和剂验证中发现，《化妆品安全技术规范》中使用的稀释剂生理盐水与牙膏产品在1:10稀释度，对其余6种牙膏产品中人工添加的金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌和黑曲霉的回收率均< 0.5，不符合产品适用性验证的要求（见附表1）。经进一步验证，即使使用生理盐水将牙膏产品稀释100倍，依然无法回收样品中人工污染的金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌（见附表2）。即《化妆品安全技术规范》（2015版）第五章微生物检验方法2.菌落总数检验方法和6.霉菌和酵母菌检验方法不适用于全部牙膏产品的检验。为进一步明确牙膏产品的检验方法，本次验证针对中和剂验证实验的结果，选用了SCDLP肉汤作为中和剂。在将牙膏样品与中和剂按1:50的比例进行稀释后，菌落总数检测的回收率均大于0.5（见附表3）；将牙膏样品与中和剂按1:20的比例稀释后，霉菌和酵母菌检测的回收率也均大于0.5（见附表4），符合《中国药典》（2020版）的产品适用性验证要求。各验证单位也使用此方法进行适用性验证，结果与中检院结果一致。鉴于以上验证结果，建议重新修订两个定量检验方法，在样品的前处理过程中增加中和剂的中和稀释步骤，确保牙膏样品中的微生物能够被准确地检测和计数，满足检验方法对牙膏产品的适用性评价要求。

经本实验室对6种牙膏产品进行3次定性检测方法的验证（见表5），验证结果符合《中国药典》（2020版）的产品适用性评价要求，该结果与6家外部实验室的结果一致，进一步证明方法的有效性和可重复性。可以表明《化妆品安全技术规范》第五章微生物检验方法3.耐热大肠菌群检验方法、4.铜绿假单胞菌检验方法和5.金黄色葡萄球菌检验方法可应用于牙膏产品的检验。

五、其他应予以说明的事项

在耐热大肠菌群的验证中，验证单位广州市药品检验所第二组试验接种100 CFU组的5管均未见阳性菌生长。通过分析实验过程，发现该实验室在接种101 CFU组时的接菌量为8 CFU，这导致100 CFU组的接菌量过低，使得该实验组5管阳性菌株无法良好生长。参考其余实验室的验证结果以及该实验室第一次和第三次的重复验证结果，可认为该结果为实验室内部误差造成，对最终结论没有影响。

附表.

表1 牙膏产品与中和剂按1:10比例稀释后的验证结果

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 样品序号 | 黄色葡萄球菌 | 大肠埃希氏菌 | 铜绿假单胞菌 | 枯草芽孢杆菌 | 白色念珠菌 | 黑曲霉 |
| SCDLP | 生理盐水 | D/E | LT-100 | SCDLP | 生理盐水 | D/E | LT-100 | SCDLP | 生理盐水 | D/E | LT-100 | SCDLP | 生理盐水 | D/E | LT-100 | SCDLP | 生理盐水 | D/E | LT-100 | SCDLP | 生理盐水 | D/E | LT-100 |
| 1 | 0.00  | 0.00  | 0.03 | 0.00 | 0.28  | 0.03  | 0.72 | 0.55 | 0.00  | 0.00  | 0.23 | 0.12 | 1.05  | 0.83  | 0.91 | 0.75 | 0.54  | 0.00  | 0.97 | 1.01 | 0.97  | 0.00  | 1.03 | 1.17 |
| 2 | 0.01  | 0.00  | 0.29 | 0.00 | 0.34  | 0.00  | 0.73 | 0.26 | 0.00  | 0.00  | 0.31 | 0.13 | 0.86  | 0.85  | 0.93 | 0.74 | 0.63  | 0.00  | 0.97 | 1.10 | 1.02  | 0.00  | 0.90 | 1.10 |
| 3 | 0.61  | 0.00  | 0.32 | 0.00 | 0.88  | 0.02  | 0.67 | 0.54 | 0.00  | 0.01 | 0.18 | 0.09 | 1.14  | 0.83  | 0.99 | 0.90 | 0.51  | 0.00  | 0.88 | 0.92 | 0.94  | 0.00  | 1.11 | 0.92 |
| 4 | 0.03  | 0.00  | 0.10 | 0.00 | 0.64  | 0.01  | 0.64 | 0.31 | 0.00  | 0.00  | 0.16 | 0.07 | 1.04  | 0.86  | 0.90 | 0.79 | 0.39  | 0.00  | 0.83 | 0.95 | 1.00  | 0.00  | 1.04 | 0.95 |
| 5 | 0.06  | 0.00  | 0.03 | 0.00 | 0.51  | 0.02 | 0.62 | 0.24 | 0.00  | 0.01 | 0.18 | 0.09 | 0.92  | 0.78 | 1.07 | 0.70 | 0.46  | 0.00  | 0.66 | 0.40 | 0.84  | 0.00  | 1.25 | 1.05 |
| 6 | 0.71  | 0.00  | 0.75 | 0.31 | 0.98  | 0.05 | 0.9 | 0.69 | 0.39  | 0.01 | 0,73 | 0.4 | 0.93  | 0.67 | 0.79 | 0.81 | 0.88  | 0.00  | 1.08 | 1.15 | 0.96  | 0.00  | 0.97 | 0.91 |

表2牙膏产品与生理盐水按比例稀释后的验证结果

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 样品序号 | 黄色葡萄球菌 | 大肠埃希氏菌 | 铜绿假单胞菌 | 枯草芽孢杆菌 | 白色念珠菌 | 黑曲霉 |
| 1:10 | 1:50 | 1:100 | 1:10 | 1:10 | 1:50 | 1:100 | 1:10 | 1:10 | 1:10 |
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0.03 | 0 | 0 | 0 | 0.83 | 0 | 0 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.85 | 0 | 0 |
| 3 | 0 | 0 | 0.08 | 0.02 | 0 | 0 | 0.05 | 0.83 | 0 | 0 |
| 4 | 0 | 0 | 0 | 0.01 | 0 | 0 | 0 | 0.86 | 0 | 0 |
| 5 | 0 | 0 | 0 | 0.02 | 0 | 0 | 0 | 0.78 | 0 | 0 |
| 6 | 0 | 0 | 0 | 0.05 | 0 | 0 | 0 | 0.67 | 0 | 0 |

表3 6种牙膏经50倍稀释后菌落总数验证结果

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 菌株名称 | 实验序号 | 回收率 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 金黄色葡萄球菌 | 1组 | 1.11 | 1.24 | 1.22 | 1.40 | 1.23 | 1.21 |
|  | 2组 | 1.08 | 0.97 | 1.32 | 1.24 | 1.12 | 1.17 |
|  | 3组 | 1.12 | 1.59 | 1.42 | 1.57 | 1.41 | 1.47 |
|  | 4组 | 1.21 | 1.13 | 1.22 | 1.20 | 1.02 | 1.14 |
|  | 5组 | 1.30 | 1.32 | 1.50 | 1.33 | 1.08 | 1.29 |
| 大肠埃希氏菌 | 1组 | 1.52 | 1.52 | 1.61 | 1.46 | 1.50 | 1.45 |
|  | 2组 | 1.00 | 0.96 | 1.16 | 1.10 | 0.92 | 0.93 |
|  | 3组 | 0.97 | 0.90 | 1.02 | 1.00 | 0.99 | 1.04 |
|  | 4组 | 1.00 | 0.83 | 0.85 | 0.96 | 1.04 | 1.00 |
|  | 5组 | 1.11 | 0.97 | 1.13 | 1.14 | 1.12 | 1.06 |
| 铜绿假单胞菌 | 1组 | 0.97 | 1.01 | 1.02 | 1.29 | 0.90 | 0.96 |
|  | 2组 | 1.26 | 1.20 | 1.32 | 1.05 | 1.17 | 0.99 |
|  | 3组 | 1.09 | 1.00 | 1.09 | 0.91 | 0.87 | 0.90 |
|  | 4组 | 0.92 | 0.96 | 1.08 | 0.98 | 0.83 | 1.03 |
|  | 5组 | 0.96 | 0.99 | 0.95 | 0.89 | 0.79 | 0.94 |
| 枯草芽孢杆菌 | 1组 | 1.06 | 1.25 | 1.19 | 1.20 | 1.17 | 1.19 |
|  | 2组 | 0.94 | 0.99 | 1.00 | 0.80 | 1.07 | 1.30 |
|  | 3组 | 0.82 | 0.74 | 0.83 | 0.82 | 0.75 | 0.84 |
|  | 4组 | 0.94 | 1.11 | 1.05 | 1.00 | 0.89 | 1.01 |
|  | 5组 | 1.08 | 1.11 | 1.15 | 1.29 | 1.08 | 1.03 |

表4 6种牙膏经20倍稀释后霉菌和酵母菌验证结果

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 菌株名称 | 实验序号 | 回收率 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 黑曲霉 | 1组 | 1.00 | 1.08 | 0.94 | 0.85 | 1.23 | 0.82 |
|  | 2组 | 0.89 | 0.86 | 0.96 | 0.88 | 0.94 | 0.86 |
|  | 3组 | 1.00 | 1.03 | 0.97 | 0.82 | 0.95 | 0.72 |
|  | 4组 | 1.22 | 1.23 | 1.08 | 1.14 | 1.29 | 1.22 |
|  | 5组 | 1.15 | 1.26 | 1.26 | 1.21 | 1.08 | 1.17 |
| 白色念珠菌 | 1组 | 0.87 | 1.01 | 1.06 | 1.01 | 0.86 | 0.95 |
|  | 2组 | 1.09 | 1.21 | 1.27 | 1.13 | 1.11 | 1.27 |
|  | 3组 | 1.14 | 0.95 | 1.27 | 1.18 | 1.21 | 1.03 |
|  | 4组 | 0.79 | 0.86 | 0.90 | 0.91 | 1.05 | 1.05 |
|  | 5组 | 0.94 | 0.73 | 1.10 | 1.01 | 0.97 | 1.06 |

表5 6种牙膏定性检测验证结果

（101 CFU接菌量组n=3；100 CFU接菌量组n=5）

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 菌株名称 | 实验序号 | 接种量（CFU） | 阳性管数\* |
| 1# | 2# | 3# | 4# | 5# | 6# |
| 金黄色葡萄球菌 | 1组 | 101 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 100 | 4 | 5 | 3 | 3 | 5 | 4 |
| 2组 | 101 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 100 | 2 | 3 | 4 | 3 | 4 | 2 |
| 3组 | 101 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 100 | 4 | 4 | 2 | 2 | 4 | 3 |
| 耐热大肠菌群 | 1组 | 101 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 100 | 4 | 5 | 5 | 5 | 4 | 5 |
| 2组 | 101 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 100 | 4 | 5 | 4 | 4 | 3 | 4 |
| 3组 | 101 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 100 | 1 | 1 | 5 | 2 | 2 | 3 |
| 铜绿假单胞菌 | 1组 | 101 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 100 | 2 | 5 | 5 | 5 | 1 | 4 |
| 2组 | 101 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 100 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 3组 | 101 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 100 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 |

\*：数字代表了在此稀释度下的阳性菌检出管数量