

团 体 标 准

T/CAFFCI 46-2021

化妆品微生物检验方法（定性） ATP 生物荧光增幅法

Qualitative Detection of microorganisms in cosmetics

Amplified ATP bioluminescence method

2021-04-30 发布

2021-05-29 实施

中国香料香精化妆品工业协会 发布

前 言

本标准按照GB/T 1.1—2020《标准化工作指南 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本标准由中国香料香精化妆品工业协会提出。

本标准由中国香料香精化妆品工业协会归口。

本标准起草单位：中国食品发酵工业研究院有限公司、中国食品药品检定研究院、联合利华（中国）有限公司、广州宝洁有限公司、查士利华微生物应用技术（上海）有限公司、广州浪奇实业股份有限公司、上海创元化妆品有限公司。

本标准主要起草人：姚粟、刘吉泉、洪海军、葛媛媛、刘骥、翟磊、崔生辉、刘艺茹、赖顺果、蔡俊松、沈颖、林雅芳、王旭、蒋惠迪、李金、张飞、李婷、白飞荣、陈怡文、卢志敏、曾四立。



化妆品微生物检验方法（定性） ATP 生物荧光增幅法

1 范围

本标准规定了化妆品中微生物的检验方法（定性）-ATP 生物荧光增幅法的仪器和设备、培养基和试剂、检验步骤和结果判读。

本标准适用于化妆品中微生物的检验。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
《化妆品安全技术规范》（2015 年版）

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

- a) ATP 三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate)
- b) ADP 二磷酸腺苷 (adenosine diphosphate)
- c) AK 腺苷酸激酶 (adenylate kinase)
- d) TAT 胰酪胨卵磷脂吐温肉汤 (trypticase azolectin tween)
- e) MTAT 改良胰酪胨卵磷脂吐温肉汤 (modified trypticase azolectin tween)

5 检验方法

5.1 方法提要

样品稀释制成检液，经 MTAT 富集培养后，利用微生物体内的 AK，催化外源添加的 ADP 底物生成 ATP，实现 ATP 增幅；通过添加荧光素酶和荧光素，将 ATP 高能键在断裂过程中产生的能量转化为生物荧光信号；采用全自动荧光光度仪检测，根据生物荧光信号强度判断样品中是否含有微生物。

5.2 仪器和设备

- a) 全自动荧光光度仪：需具备试剂添加、计时、读取荧光强度等功能¹⁾；
- b) 摇床培养箱：30 ℃±2 ℃，圆周式震荡，200 r/min-250 r/min；
- c) 轨道式往复摇床：振幅 3.81 cm，280 r/min，或经验证具有同等破壁效果的摇床；
- d) 生物安全柜；
- e) 漩涡混合器：0 r/min-2500 r/min；
- f) 高压灭菌器；
- g) 电子天平：量程 0 g-200 g，精确至 0.1 g；
- h) 移液器：50 μL、100 μL、1 mL、5 mL；
- i) 玻璃珠：直径 0.5 mm，或等效的其他材料或大小的珠、砂，如氧化锆珠；
- j) 旋盖玻璃瓶：250 mL，或其他无菌/可灭菌容器；
- k) 量筒：1000 mL；
- l) 烧杯：2000 mL；
- m) pH计。

5.3 培养基和试剂

5.3.1 通用要求

在没有注明其他要求时，本标准需使用分析纯试剂和符合GB/T 6682规定的一级水。

5.3.2 TAT 基础培养基²⁾

5.3.2.1 成分

胰蛋白胨	20.0 g
大豆卵磷脂	5.0 g

5.3.3 MTAT 培养基

5.3.3.1 成分

TAT 基础培养基（见 4.3.2）	22.5g
硫代硫酸钠	0.5 g
组氨酸	0.1 g
蛋白胨	7.5 g
葡萄糖	15.0 g

1) Celsis® Advance II 光度计。给出这一信息是为了方便本文件的使用者，并不表示对该产品的认可，如果其他等效产品具有相同的效果，则可使用这些等效的产品。

2) TAT 基础培养基仅用于后续 MTAT 培养基的配置。

氯化钠	0.85 g
卵磷脂	1.43 g
吐温 80	39.0 g
水	964 mL

5.3.3.2 制备

先将卵磷脂和吐温 80 加入水中，加热溶解，再加入其他成分，溶解并混匀。使用 6 mol/L NaOH 或 HCl 溶液调 pH 值至 7.0 ± 0.2 ，121 °C 高压灭菌 15 min。

5.3.4 消泡剂

聚二甲基硅氧烷大颗粒乳液或其他等效产品。

5.3.5 ATP 生物荧光增幅法试剂盒³⁾或其他等效产品

含细胞裂解剂、ADP 底物试剂、荧光素酶试剂、ATP 阳性对照标品。

5.4 操作步骤

5.4.1 通用要求

产品第一次使用本方法或发生变化可能影响检验结果时，首先需通过产品影响测试，产品影响测试试验步骤参见附录A。符合产品影响测试要求的样品可按照以下步骤进行检验。

5.4.2 检液制备

按照《化妆品安全技术规范》（2015年版）第五章微生物检验方法规定的供试样品制备方法，制成 1:10 稀释的检液，制备中使用 MTAT 或其他经验证的适宜中和剂作为稀释液。

5.4.3 增菌

取 10 mL 1:10 稀释的检液，加入 90 mL MTAT 或其他经过验证等效的培养基中，制备成产品试样，如产品抑菌性较强，可采用增加培养基用量、添加中和剂或薄膜过滤等方法，消除产品抑菌作用。将培养基置于摇床培养箱中于 $30 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ ，200 r/min - 250 r/min 振荡培养 48 h。另取 100 mL MTAT 作为培养基空白按上述方法一同培养。

5.4.4 上机检测

在 100 mL 产品试样中加入 15 g 玻璃珠和 0.1 mL 消泡剂，置往复式摇床上 280 r/min 振荡处理 30 min。

取破壁处理后的产品试样 50 μL 上机检测（见 4.2 a），按照仪器和试剂使用说明书进行操作，完成 ATP 生物荧光增幅法检测。同时取培养基空白 50 μL 两平行以同样方法上机检测。

上机检测方法如下：

3) AMPiScreen™ 试剂。给出这一信息是为了方便本文件的使用者，并不表示对该产品的认可，如果其他等效产品具有相同的效果，则可使用这些等效的产品。

a)向 50 μL 产品试样中加入细胞裂解剂和 ADP 底物试剂各 100 μL,以裂解微生物细胞并开始 ATP 增幅反应;

b) 向产品试样中加入荧光素酶试剂 100 μL 开始荧光反应,由全自动荧光光度计读取相对荧光强度值 (RLU)。

6 结果判读

检测完成后使用软件进行数据处理和结果判读。

6.1 结果判读标准

以未加产品试样的 MTAT 检测所得荧光信号均值 (RLU) 为培养基空白荧光值,通常情况下按下列公式计算阳性阈值:

$$\text{阳性阈值} = 3 \times \text{培养基空白荧光值}$$

a) 产品试样 RLU 值 \geq 阳性阈值,判定为阳性;

b) 产品试样 RLU 值 $<$ 阳性阈值,判定为阴性。

6.2 结果报告

a) 结果为阴性者,表明在该检验条件下被检样品未检出微生物;

b) 结果为阳性者,按《化妆品安全技术规范》(2015年版)第五章微生物检验方法进行确证。



附录 A
(规范性附录)
产品影响测试

A.1 产品影响测试步骤

a) 将 10-100 CFU 洋葱伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia cepacia*) CICC 21926 或铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) CICC 10419 等其他适用菌种接入 10 mL MTAT 中, 制成菌悬液;

b) 按检液制备要求 (见 4.4.2) 制备 1:10 稀释的检液。取 10 mL 1:10 稀释的检液加入 90 mL MTAT 中, 制备成产品试样, 同时取 100 mL MTAT 作为培养基空白;

c) 将以上制备的菌悬液、产品试样和培养基空白置摇床培养箱中于 $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, 200 r/min - 250 r/min 振荡培养 48 h;

d) 对培养后的产品试样和培养基空白按上机检测要求 (见 4.4.4) 进行 ATP 生物荧光增幅法检测。若产品试样检测结果为阴性, 可继续进行以下试验; 若结果为阳性, 则需将产品试样划线或涂布至卵磷脂吐温 80-营养琼脂培养基和虎红培养基以确认产品中是否含有微生物污染或非微生物来源 ATP 干扰;

e) 将菌悬液用 MTAT 稀释 100 倍待用;

f) 900 μL MTAT 中加入 100 μL ATP 阳性对照标品, 混合均匀, 为 ATP 培养基对照;

g) 900 μL MTAT 中加入 100 μL 100 倍稀释的菌悬液, 混合均匀, 为微生物对照;

h) 900 μL 产品试样中加入 100 μL ATP 阳性对照标品, 混合均匀, 为 ATP 试样;

i) 900 μL 产品试样中加入 100 μL 100 倍稀释的菌悬液, 混合均匀, 为微生物试样;

j) 将上述制备的 ATP 培养基对照、微生物对照、ATP 试样和微生物试样按上机检测要求 (见 4.4.4) 进行 ATP 生物荧光增幅法检测。

A.2 结果判定

按表 A.1 综合判定样品是否符合产品影响测试标准要求。

表 A.1 产品影响测试符合标准

编号	项目	符合标准

表 1 产品影响测试符合标准（续）

A	培养基空白	参照仪器和试剂使用说明
B	ATP 培养基对照	> 3 倍培养基空白 RLU
C	微生物对照	> 3 倍培养基空白 RLU
D	产品试样	< 3 倍培养基空白 RLU ^a
E	ATP 试样	> 3 倍培养基空白 RLU
F	微生物试样	> 3 倍培养基空白 RLU
G	产品 ATP 回收率 = $\frac{(D-C)}{(B-A)} \times 100\%$	> 25% ^b
<p>^a 若产品试样 RLU 结果大于 3 倍培养基空白 RLU 且平板中有菌落生长（见 A.1 d），该样品不符合产品影响测试标准，需按《化妆品安全技术规范》（2015 年版）第五章微生物检验方法进行确证，同时可更换不同批次产品重新进行确认。若产品试样 RLU 结果大于 3 倍培养基空白 RLU 且平板中没有菌落生长（见 A.1 d），应消除样品本底荧光信号的影响，可采用富集后稀释等方法重新进行确认。</p> <p>^b 25 % 为推荐值，经验表明当样品 ATP 回收率 > 25 % 时，样品成分通常对检测结果影响较小。</p>		