TCVN

TIÊU CHUẨN VIỆT NAM

TCVN 6972 : 2001

TỔNG CỤC TIÊU CHUẨN ĐO LƯỜNG CHẤT LƯỢNG
BẢN GỐC TCVN
KHÔNG SAO CHỤP ĐỂ PHÁT HÀNH

NƯỚC GỘI ĐẦU

Shampoo

THƯ VIỆN
TRUNG TÂM THÔNG TIN
TIÊU CHUẨN ĐO LƯỜNG CHẤT LƯỢNG
SỐ

HÀ NỘI - 2001

Lời nói đầu

TCVN 6972 : 2001 thay thế cho TCVN 5725-91 và TCVN 5817-94.

TCVN 6972 : 2001 do Ban Kỹ thuật tiêu chuẩn TCVN/TC 91 "Chất hoạt động bề mặt" biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng xét duyệt, Bộ Khoa học, Công nghệ và Môi trường ban hành.

Nước gội đầu

Shampoo

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này áp dụng cho nước gội đầu tổng hợp dùng nguyên liệu là những chất hoạt động bề mặt dễ bị phân huỷ sinh học và các phụ gia được bộ Y Tế cho phép sử dụng trong mỹ phẩm.

2 Tiêu chuẩn viện dẫn

TCVN 1056 - 86 Thuốc thử. Phương pháp chuẩn bị các thuốc thử dung dịch và hỗn hợp phụ dùng trong phân tích trắc quang và phân tích đục khuyếch tán.

TCVN 3778 - 82 Thuốc thử. Phương pháp xác định asen.

TCVN 4851 - 89 (ISO 3696-1987) Nước dùng để phân tích trong phòng thí nghiệm. Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử.

TCVN 5454 :1999 (ISO 607-1980) Chất hoạt động bề mặt và chất tẩy rửa – Phương pháp phân chia mẫu.

TCVN 5456 - 91 Chất tẩy rửa tổng hợp. Phương pháp xác định chỉ số nồng độ ion hidro (độ pH).

TCVN 5491 - 91 (ISO 8212-1986) Chất hoạt động bề mặt và chất tẩy rửa. Lấy mẫu trong sản xuất.

3 Yêu cầu kỹ thuật

3.1 Yêu cầu kỹ thuật của nước gội đầu phải phù hợp với các quy định trong bảng 1 và bảng 2.

Bảng 1 - Các chỉ tiêu ngoại quan

Tên chỉ tiêu	Yêu cầu
1. Trạng thái	Lỏng sánh, đồng nhất, không tách lớp, phân tầng và kết tủa khi biến đổi nhiệt độ nhỏ hơn 10 ^{0}C và lớn hơn 45 ^{0}C
2. Mầu	Đồng nhất
3. Mùi	Dễ chịu, đặc trưng cho từng sản phẩm

Bảng 2 - Các chỉ tiêu chất lượng

Tên chỉ tiêu	Mức chất lượng
1. Hàm lượng chất hoạt động bề mặt, tính bằng phần trăm khối lượng, không nhỏ hơn	10
2. pH của dung dịch 1%	4 - 8
3. Hàm lượng asen, tính bằng mg/kg, không lớn hơn	1
4. Hàm lượng kim loại nặng, qui ra chì, tính bằng mg/kg, không lớn hơn	2
5. Độ kích ứng da	Không đáng kể
6. Vi khuẩn và nấm mốc	
6.1. Vi khuẩn staphylococcus aureus, candida albicans và pseudomonas aeruginosa	Không được phép
6.2. Tổng số nấm mốc sống lại được, tính bằng số lượng con trong một gam mẫu, không được lớn hơn	100
6.3. Tổng số vi khuẩn hiếu khí sống lại được, tính bằng số lượng con trong một gam mẫu, không được lớn hơn	1000
6.4. Tổng số Enterobacteria và các vi khuẩn Gram âm khác, tính bằng số lượng con trong một gam mẫu, không được lớn hơn	10

4 Phương pháp thử

4.1 Quy định chung

Hoá chất dùng để phân tích là loại TKPT hoặc TKHH.

Nước cất sử dụng theo TCVN 4851 - 89 (ISO 3696-1987).

Cân phân tích, có độ chính xác 0,001 g.

4.2 Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu

Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu theo TCVN 5454 : 1999 và TCVN 5491 - 91 với lượng mẫu không ít hơn 1000 g dùng để thí nghiệm và lưu.

Mẫu thí nghiệm/mẫu lưu được cho vào bình riêng biệt đảm bảo sạch, khô, có nút kín, ngoài bình có nhãn ghi:

- tên chất tẩy rửa;
- tên nơi sản xuất;
- ngày sản xuất;
- ngày và nơi lấy mẫu.

4.3 Đánh giá ngoại quan sản phẩm

Lấy khoảng 200 g mẫu vào cốc thuỷ tinh 500 ml. Quan sát mẫu bằng mắt thường, ở nơi có đủ ánh sáng, tránh ánh sáng chói và không bị ảnh hưởng của mầu sắc khác ở gần và không có mùi lạ. Quan sát các đặc tính sau:

Trạng thái: Mô tả trạng thái quan sát được, đặc biệt lưu ý về tính đồng nhất của sản phẩm.

Mầu sắc: Mô tả mầu sắc quan sát được.

Mùi: Mô tả mùi cảm nhận được.

Thử mẫu ở nhiệt độ nhỏ hơn 10 ^{0}C : Lấy khoảng 200 g mẫu vào cốc thuỷ tinh dung tích 250 ml và đặt ở bình ổn nhiệt 10 ^{0}C. Sau 24 giờ mẫu đạt ở nhiệt độ này, lấy ra quan sát.

Thử mẫu ở nhiệt độ lớn hơn 45 ^{0}C : Lấy khoảng 200 g mẫu vào cốc thuỷ tinh dung tích 250 ml và đặt ở bình ổn nhiệt 45 ^{0}C. Sau 24 giờ mẫu đạt ở nhiệt độ này, lấy ra quan sát.

Đánh giá mẫu thử theo các yêu cầu qui định ở điều 3.1 bảng 1.

4.4 Xác định hàm lượng chất hoạt động bề mặt

4.4.1 Nguyên tắc

Các chất hoạt động bề mặt được tách khỏi nước gội đầu bằng etanol và được tính sau khi trừ đi những thành phần khác cũng tan trong etanol như clorua, glyxerin.

Chuẩn độ muối clorua (tính ra NaCl) bằng bạc nitrat với chỉ thị mầu kali cromat.

Dựa vào phản ứng oxy hoá khử của glyxerin với kali periodat trong môi trường axit, lượng periodat dư tác dụng với kali iodua giải phóng iot. Định lượng iot mới sinh bằng chuẩn độ với natri thiosunfat và tính ra hàm lượng glyxerin.

4.4.2 Hoá chất và thuốc thử

- etanol 99^0;
- bạc nitrat, dung dịch 0,1 N;
- kali cromat, dung dịch 10 %;
- axit nitric, dung dịch 1 : 4;
- methyl đỏ, dung dịch 0,1 % pha trong etanol;
- axit clohidric, d = 1,19 và dung dịch 1 + 1;
- natri thiosunfat, dung dịch 0,1 N;
- kali periodat, dung dịch 0,1 N;
- kali iodua, dung dịch 10 %;
- hồ tinh bột, dung dịch 1 %.

4.4.3 Thiết bị và dụng cụ:

- tủ sấy duy trì ở nhiệt độ 105 °C ± 2 °C;
- bếp cách thuỷ;
- bình tam giác dung tích 100 ml;
- bình tam giác có nút nhám, dung tích 250 ml;
- cốc thuỷ tinh, dung tích 250 ml;
- buret 25 ml.

4.4.4 Cách tiến hành

4.4.4.1 Xác định tổng hàm lượng chất tan trong etanol

Cân khoảng 5 g mẫu (chính xác đến 0,001 g) vào cốc thuỷ tinh dung tích 250 ml, thêm vào đó 40 ml etanol. Đậy cốc bằng mặt kính đồng hồ, đun nóng trên bếp cách thuỷ và khuấy cho mẫu phân tán hoàn toàn. Lọc mẫu qua giấy lọc vào bình tam giác dung tích 100 ml đã được sấy khô và cân trước đến khối lượng không đổi m_0 (chính xác đến 0,001 g).

Tiếp tục quá trình hoà tan trên hai lần nữa, mỗi lần với 20 ml etanol. Thu gộp tất cả dung dịch lọc vào bình tam giác trên và cô nhẹ bình này trên bếp cách thuỷ cho đến khi chỉ còn lại cặn. Sấy bình tam giác này ở nhiệt độ 105 °C đến khối lượng không đổi. Để nguội trong bình hút ẩm, sau 30 phút đem cân là giá trị m_1 (chính xác đến 0,001 g).

4.4.4.2 Xác định hàm lượng muối clorua tan trong etanol

Hoà tan phần cặn sau khi xác định chất tan trong etanol ở 4.4.4.1 trong 20 ml nước cất và thêm hai giọt methyl đỏ, nếu dung dịch có mầu vàng thì trung hoà bằng dung dịch axit nitric 1 + 4 đến mầu hồng. Cho vào 2,5 ml dung dịch kali cromat 10 %. Chuẩn độ bằng dung dịch bạc nitrat 0,1 N đến khi xuất hiện mầu đỏ gạch, thể tích chuẩn độ là V_1. Đồng thời tiến hành thí nghiệm mẫu trắng với tất cả các thuốc thử nhưng không có mẫu, thể tích chuẩn độ là V_0.

4.4.4.3 Xác định hàm lượng glyxerin tan trong etanol

Hoà tan phần cặn sau khi xác định chất tan trong etanol ở điều 4.4.4.1 trong khoảng 25 ml nước và thêm 5 ml dung dịch HCl (1 + 1), chuyển dung dịch vào bình tam giác có nút nhám dung tích 250 ml, thêm chính xác 25 ml dung dịch kali periodat, đậy nút, lắc đều mẫu, để yên 15 phút. Lấy mẫu ra, cho thêm 20 ml dung dịch axit clohidric (1 + 1) và 20 ml dung dịch kali iodua. Đậy nút, lắc tròn, để yên trong bóng tối 5 phút. Sau đó chuẩn độ dung dịch bằng dung dịch natri thiosunfat đến mầu vàng nhạt, thêm vào đó 1 ml dung dịch hồ tinh bột và tiếp tục chuẩn độ đến khi mất mầu xanh của dung dịch, thể tích dung dịch chuẩn độ là V_2 ml. Đồng thời tiến hành thí nghiệm mẫu trắng với tất cả các thuốc thử nhưng không có mẫu, thể tích dung dịch chuẩn độ là V_3 ml.

4.4.5 Tính kết quả

4.4.5.1 Tổng hàm lượng chất tan trong etanol

Tổng hàm lượng chất tan trong etanol (X_1), tính bằng phần trăm khối lượng, theo công thức sau:

$$X_1 = \frac{(m_1 - m_0) \times 100}{m}$$

trong đó

m_0 là khối lượng của bình, tính bằng gam;

m_1 là khối lượng của cặn và bình, tính bằng gam;

m là khối lượng mẫu thử, tính bằng gam.

4.4.5.2 Hàm lượng muối clorua tan trong etanol

Hàm lượng muối clorua tan trong etanol (X_2), quy ra NaCl, bằng phần trăm khối lượng (%), theo công thức sau:

$$X_2 = \frac{(V_1 - V_0) \times 0{,}0058 \times 100}{m}$$

trong đó

V_1 là thể tích bạc nitrat 0,1 N dùng để chuẩn độ mẫu thử, tính bằng mililít;

V_0 là thể tích bạc nitrat 0,1 N dùng để chuẩn độ mẫu trắng, tính bằng mililít;

m là khối lượng mẫu thử, tính bằng gam;

0,0058 là lượng gam natri clorua tương ứng 1 ml bạc nitrat 0,1 N.

4.4.5.3 Hàm lượng glyxerin tan trong etanol

Hàm lượng glyxerin tan trong etanol (X_3), tính bằng phần trăm khối lượng (%), theo công thức sau:

$$X_3 = \frac{(V_3 - V_2) \times 0,0023 \times 100}{m}$$

trong đó

V_2 là thể tích natri thiosunfat 0,1 N dùng để chuẩn độ mẫu thử, tính bằng mililít;

V_3 là thể tích natri thiosunfat 0,1 N dùng để chuẩn độ mẫu trắng, tính bằng mililít;

m là khối lượng mẫu thử, tính bằng gam;

0,0023 là lượng gam glyxerin tương ứng 1 ml natri thiosunfat 0,1 N.

4.4.5.4 Tổng hàm lượng chất hoạt động bề mặt tan trong etanol

Tổng hàm lượng chất hoạt động bề mặt tan trong etanol (X), tính bằng phần trăm khối lượng (%) theo công thức sau:

$$X = X_1 - (X_2 + X_3)$$

trong đó

X_1 là tổng hàm lượng chất tan trong etanol, tính bằng %;

X_2 là hàm lượng muối natri clorua tan trong etanol, tính bằng %;

X_3 là hàm lượng glyxerin, tính bằng %.

4.4.6 Độ chụm của phương pháp

4.4.6.1 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả xác định song song tiến hành trên cùng một mẫu thử hoặc được thực hiện liên tiếp, do cùng một người thao tác, sử dụng cùng loại thiết bị, không vượt quá 0,3 % chất hoạt động bề mặt.

4.4.6.2 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thu được trên cùng một mẫu thử ở hai phòng thí nghiệm, không vượt quá 0,5 % chất hoạt động bề mặt.

4.5 Xác định độ pH

Theo TCVN 5456 – 91.

4.6 Xác định hàm lượng asen và kim loại nặng

4.6.1 Chuẩn bị dung dịch thử

Cân khoảng 10 g mẫu (chính xác đến 0,01 g) vào bình tam giác chịu nhiệt dung tích 250 ml. Thêm 10 ml axit sunfuric đặc và đun nhẹ trên bếp điện, sau đó tăng dần nhiệt độ để mẫu cháy thành dung dịch sánh mầu nâu đen. Để nguội dung dịch và thêm dần từng giọt khoảng 5 ml axit nitric đặc và tiếp tục đun sôi nhẹ đến khi dung dịch trở thành trong suốt. Để nguội dung dịch và tráng thành bình bằng khoảng 20 ml nước cất, thêm 5 ml dung dịch axit axetic 30 %, đun sôi lại dung dịch một lần nữa. Dung dịch trong bình trong suốt, không mầu là đạt. Để nguội chuyển dung dịch vào bình định mức dung tích 100 ml, định mức đến vạch và lắc kỹ. Dung dịch này dùng để xác định asen và kim loại nặng.

4.6.2 Xác định hàm lượng kim loại nặng, tính theo chì.

4.6.2.1 Nguyên tắc

Các ion kim loại nặng tạo với dung dịch natri sunfua kết tủa mầu đen hay nâu trong môi trường axit axetic pH= 3,5 - 4. So sánh mầu của dung dịch mẫu với mầu của dung dịch chuẩn chì.

4.6.2.2 Hoá chất và thuốc thử:

- axit sunfuric, d = 1,84;
- axit clohidric, d = 1,19;
- axit nitric, d = 14,3;
- axit axetic, dung dịch 30 % và (1 + 15);
- natri sunfua, dung dịch 2 %;
- amoniac, dung dịch 25 % và (1 + 2);
- dung dịch chì tiêu chuẩn A,1 mg/ml, chuẩn bị theo TCVN1056 - 86;
- dung dịch chì tiêu chuẩn B, 0,010 mg/ml, lấy 10 ml dung dịch A cho vào bình định mức 1000 ml, định mức tới vạch bằng nước và lắc kỹ;
- dung dịch chì tiêu chuẩn C, 0,0001 mg/ml, lấy 10 ml dung dịch B cho vào bình định mức 1000 ml, định mức tới vạch bằng nước và lắc kỹ;
- Dung dịch B và C chỉ pha trước khi dùng.

4.6.2.3 Dụng cụ:

- ống so mầu Nessler 50 ml;
- bình định mức dung tích 100 ml, 1000 ml.

4.6.2.4 Cách tiến hành

Hút 10 ml dung dịch mẫu ở 4.6.1 vào ống so mầu Nessler. Đồng thời lấy 20 ml dung dịch tiêu chuẩn chì C vào ống so mầu khác. Trung hoà dung dịch mẫu và dung dịch tiêu chuẩn bằng dung dịch amoniac (1 + 2) theo chỉ thị phenolphtalein đến phớt hồng. Thêm vào mỗi ống thử 1 ml axit axetic và 0,5 ml dung dịch natri sunfua. Đậy nút và lắc đều. Sau 1 phút so sánh mầu của ống dung dịch thử không được đậm mầu hơn dung dịch của ống so sánh. Khi so sánh mầu phải nhìn từ trên xuống dưới, trên nền trắng.

4.6.3 Xác định hàm lượng asen

4.6.3.1 Nguyên tắc

Lấy 10 ml dung dịch ở 4.6.1 và xác định asen theo TCVN 3778 - 82 So sánh màu giấy của mẫu với màu giấy của dung dịch tiêu chuẩn có 0,001 mg As.

4.7 Xác định mức độ kích ứng da

Xem phụ lục A.

Chú thích – Pha loãng dung dịch cần thử 10 lần bằng nước cất trong quá trình chuẩn bị mẫu thử.

4.8 Xác định giới hạn vi khuẩn và nấm mốc

Xem phụ lục B.

5 Báo cáo kết quả

Báo cáo kết quả gồm các thông tin sau:

- thông tin nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- các phương pháp sử dụng (theo tiêu chuẩn này);
- các kết quả và cách biểu thị các kết quả;
- các chi tiết của mọi thao tác không qui định trong tiêu chuẩn này hoặc các tiêu chuẩn khác, hoặc bất kỳ thao tác tuỳ ý nào cũng như các sự cố xảy ra ảnh hưởng đến kết quả.

6 Bao gói, ghi nhãn, vận chuyển và bảo quản

6.1 Bao gói

Nước gội đầu được đóng trong các hộp bằng nhựa, hoặc chai thuỷ tinh hoặc bằng các vật liệu khác theo thoả thuận nhưng đảm bảo chắc chắn, an toàn.

Các chai hoặc hộp nước gội đầu được xếp trong bao bì bằng các tông. Số lượng đóng gói theo thoả thuận giữa hai bên sản xuất và tiêu thụ, nhưng sai lệch khối lượng đơn vị bao gói theo đúng qui định hiện hành.

6.2 Ghi nhãn

Trên mỗi chai hoặc hộp nước gội đầu có nhãn ghi:

- tên hàng hoá;
- tên và địa chỉ cơ sở sản xuất;
- thành phần và hàm lượng nguyên liệu chính;
- dung tích thực;
- hướng dẫn sử dụng;
- ngày sản xuất và hạn sử dụng.

Trên mỗi thùng các tông có nhãn ghi:

- tên hàng hoá;
- tên và hàm lượng các nguyên liệu chính;
- tên và địa chỉ cơ sở sản xuất;
- số lượng chai, hộp;
- hướng dẫn bảo quản (ký hiệu che mưa nắng);
- hạn sử dụng.

6.3 Vận chuyển và bảo quản

Nước gội đầu được vận chuyển bằng mọi phương tiện thông dụng, nhưng không được xếp chồng quá cao tránh gây đổ vỡ, bẹp bao bì sản phẩm và phải được che mưa nắng.

Bảo quản nước gội đầu trong kho khô mát.

Phụ lục A

(Qui định)

Phương pháp thử kích ứng trên da

(Áp dụng cho các sản phẩm dùng trong y tế và mỹ phẩm theo Quyết định số 3113/1999/QĐ-BYT ngày 11 tháng 10 năm 1999 của Bộ trưởng Bộ Y tế)

A.1 Nguyên tắc

Thử kích ứng trên da là một phương pháp sinh học dựa vào mức độ phản ứng của da thỏ với chất thử so với phần da kế bên không đắp chất thử.

Phép thử không áp dụng cho các chất axit hoặc kiềm mạnh (pH < 2 hoặc pH > 11,5) và các chất đã biết là có kích ứng trên da.

A.2 Dụng cụ thí nghiệm

- tông đơ điện hoặc một thiết bị thích hợp để làm sạch lông thỏ;
- kéo, panh.

A.3 Động vật và điều kiện thí nghiệm

Sử dụng thỏ trắng trưởng thành, đực hoặc cái (không sử dụng thỏ có chửa hoặc đang cho con bú), khoẻ mạnh, cân nặng không dưới 2 kg. Thỏ được nhốt riêng từng con và nuôi dưỡng trong điều kiện thí nghiệm ít nhất 5 ngày trước khi thử.

Thí nghiệm tiến hành trong nhiệt độ phòng 25 ^{0}C ± 3 ^{0}C, độ ẩm tương đối 30 % - 70 %, ánh sáng bảo đảm 12 giờ tối, 12 giờ sáng hàng ngày.

A.4 Chuẩn bị mẫu thử

Mẫu thử được chuẩn bị tuỳ theo tính chất và cách sử dụng trên người của từng loại sản phẩm.

- Chất lỏng: dùng trực tiếp hoặc pha loãng với dung môi thích hợp.
- Chất rắn: có thể dùng trực tiếp hoặc tán thành bột ẩm với dung môi thích hợp để đảm bảo chất thử được tiếp xúc tốt với da.
- Với các chất rắn khác không thể tán thành bột, cần xử lý hoặc chiết xuất theo phương pháp riêng trước khi sử dụng.

- Nếu sản phẩm cuối cùng ở dạng vô trùng, chất thử sẽ được tiệt trùng với cùng điều kiện như trong qui trình sản xuất. Chú ý với sản phẩm tiệt trùng bằng etylen dioxit vì etylen dioxit và sản phẩm phân huỷ của nó có thể gây kích ứng. Cần có đánh giá đầy đủ những phản ứng của loại sản phẩm này trước và sau khi tiệt trùng.
- Dung môi dùng để pha loãng, làm ẩm hoặc chiết xuất là các chất phân cực (nước, nước muối sinh lý) hoặc không phân cực (dầu thực vật, dầu khoáng) không gây kích ứng.

A.5 Cách tiến hành

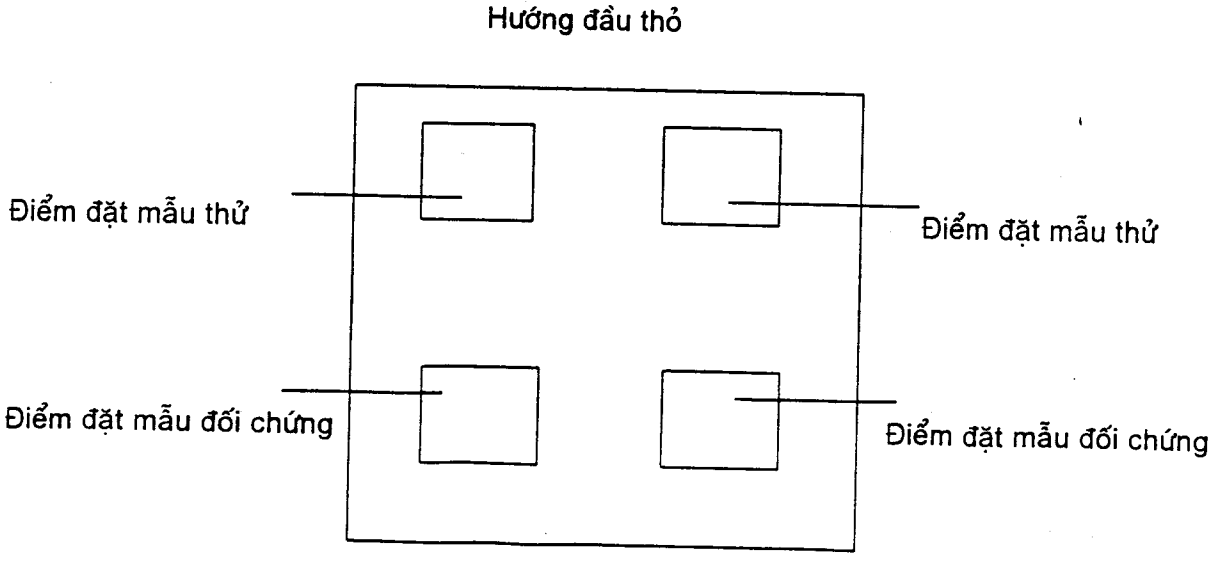
A.5.1 Chuẩn bị súc vật

Trước ngày thí nghiệm, làm sạch lông thỏ ở vùng lưng đều về hai bên cột sống một khoảng đủ rộng để đặt các mẫu thử và đối chứng (khoảng 10 cm x 15 cm). Chỉ những thỏ có da khoẻ mạnh, đồng đều và lành lặn mới được dùng vào thí nghiệm.

A.5.2 Đặt mẫu thử

Mỗi mẫu được thử trên 3 thỏ. Liều chất thử trên mỗi thỏ là 0,5 g hoặc 0,5 ml. Đặt mẫu thử đã chuẩn bị ở trên lên miếng gạc không gây kích ứng 2,5 cm x 2,5 cm có độ dày thích hợp rồi đắp lên da. Cố định miếng gạc bằng băng dính không gây kích ứng ít nhất trong 4 giờ. Sau đó bỏ gạc và băng dính, chất thử còn lại được làm sạch bằng dung môi thích hợp không gây kích ứng.

Trong trường hợp mẫu thử đã được pha loãng hoặc làm ẩm bằng dung môi, tiến hành song song đặt mẫu đối chứng là dung môi đã dùng ở chỗ da bên cạnh. Sơ đồ đặt mẫu thử có thể bố trí theo hình A.1.



Hình A.1 - Sơ đồ đặt mẫu thử

A.6 Quan sát và ghi điểm

Quan sát và ghi điểm phản ứng trên chỗ da đặt chất thử so với da kề bên không đặt chất thử ở các thời điểm 1 giờ, 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ sau khi làm sạch mẫu thử. Có thể kéo dài hơn thời gian quan sát khi có tổn thương sâu để có thể đánh giá đầy đủ hơn về khả năng hồi phục hoặc không hồi phục của vết thương nhưng không nên quá 14 ngày.

Đánh giá phản ứng trên da ở các mức độ gây ban đỏ, phù nề theo qui định ở bảng A.1.

Bảng A.1 - Mức độ phản ứng trên da thỏ

Phản ứng	Điểm đánh giá
Sự tạo vẩy và ban đỏ	
– Không ban đỏ	0
– Ban đỏ rất nhẹ (vừa đủ nhận thấy)	1
– Ban đỏ nhận thấy rõ	2
– Ban đỏ vừa phải đến nặng	3
– Ban đỏ nghiêm trọng (đỏ tấy) đến tạo thành vẩy để ngăn ngừa sự tiến triển của ban đỏ	4
Gây phù nề	
– Không phù nề	0
– Phù nề rất nhẹ (vừa đủ nhận thấy)	1
– Phù nề nhận thấy rõ (viền phù nề phồng lên rõ)	2
– Phù nề vừa phải (da phồng lên khoảng 1 mm)	3
– Phù nề nghiêm trọng (da phồng lên trên 1 mm và có lan rộng ra vùng xung quanh)	4
Tổng số điểm kích ứng tối đa có thể	8

Những thay đổi khác trên da cần theo dõi và ghi chép đầy đủ.

A.7 Đánh giá kết quả

Trên mỗi thỏ, điểm phản ứng được tính bằng tổng số điểm ở hai mức độ ban đỏ và phù nề chia cho số lần quan sát. Điểm kích ứng của mẫu thử được lấy trung bình điểm phản ứng của các thỏ đã thử.

Trong trường hợp có dùng mẫu đối chứng, điểm phản ứng của mẫu thử được trừ đi số điểm của mẫu đối chứng.

Chỉ sử dụng các điểm ở những thời gian quan sát ở 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ để tính kết quả.

Đối chiếu điểm kích ứng với các mức độ qui định trên bảng A.2 để xác định khả năng gây kích ứng trên da thỏ của mẫu thử.

Bảng A.2 - Phân loại các phản ứng thử trên da thỏ

Loại phản ứng	Điểm trung bình
Kích ứng không đáng kể	Từ 0 đến 0,5
Kích ứng nhẹ	lớn hơn 0,5 đến 2
Kích ứng vừa phải	lớn hơn 2,0 đến 5,0
Kích ứng nghiêm trọng	lớn hơn 5,0 đến 8,0

A.8 Báo cáo kết quả

Báo cáo kết quả cần ghi đầy đủ các thông tin về mẫu thử, súc vật thử (loài, số lượng). Ghi chi tiết cách chuẩn bị mẫu thử và cách đặt mẫu trên da, điểm của các lần quan sát, những nhận xét thêm nếu có và đánh giá kết quả.

Chú thích:

– Đánh giá mức độ kích ứng trên da không nên chỉ dựa vào số điểm kích ứng mà còn căn cứ vào những mô tả sự thay đổi tình trạng da đã quan sát được.

– Việc kết luận mẫu thử đạt chất lượng về chỉ tiêu kích ứng da hay không phải phụ thuộc vào yêu cầu riêng của từng sản phẩm.

Phụ lục B

(Qui định)

Tiêu chuẩn giới hạn vi khuẩn, nấm mốc trong mỹ phẩm

(Áp dụng cho các sản phẩm dùng trong y tế và mỹ phẩm theo Quyết định số 3113/ 1999/ QĐ-BYT ngày 11 tháng 10 năm 1999 của Bộ trưởng Bộ Y tế)

Tiêu chuẩn giới hạn vi khuẩn, nấm mốc trong mỹ phẩm là văn bản qui định về số lượng tối đa vi khuẩn, nấm mốc không được vượt quá trong mỹ phẩm và phương pháp thử để xác định vi khuẩn, nấm mốc trong mỹ phẩm.

B.1 Giới hạn vi khuẩn và nấm mốc

B.1.1 Trong mỹ phẩm, không được có các vi khuẩn sau:

- Staphylococcus aureus;
- Candida albicans;
- Pseudomonas aeruginosa.

B.1.2 Tổng số vi khuẩn hiếu khí sống lại được không được lớn hơn 1000/1 g hoặc 1 ml sản phẩm.

B.1.3 Tổng số nấm mốc sống lại được không được lớn hơn 100/1 g hoặc 1 ml sản phẩm.

B.1.4 Số lượng Enterobacteria và các vi khuẩn Gram âm khác không được lớn hơn 10/1 g hoặc 1 ml sản phẩm.

B.2 Phương pháp thử

B.2.1 Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu thử nghiệm

B.2.1.1 Lấy mẫu

Theo tiêu chuẩn lấy mẫu kiểm nghiệm, một mẫu đem thử phải làm ít nhất trên 3 đơn vị đóng gói nhỏ nhất.

B.2.1.2 Pha chế mẫu thử nghiệm

Tuỳ theo từng sản phẩm, lấy một lượng sản phẩm đại diện từ các đơn vị đóng gói (khoảng từ 10 - 50 g hoặc 10 - 50 ml sản phẩm) vào bình nón, thêm dung môi pha loãng thích hợp để pha loãng sản phẩm thành các nồng độ đem thử nghiệm thích hợp như: 10^{-1}; 10^{-2}; 10^{-3} hoặc 1/2; 1/5; 1/20; 1/40 v. v... sao cho khi đếm khuẩn lạc trên đĩa Petri có đường kính 90 - 100 mm, số lượng khuẩn lạc không vượt quá 300 trong một đĩa.

B.2.2 Thiết bị, dụng cụ

Thử nghiệm được tiến hành trong các điều kiện vô trùng, đảm bảo không có sự lây nhiễm các vi khuẩn từ ngoài vào mẫu thử. Các phương tiện và dụng cụ cần dùng gồm:

- hộp Petri thuỷ tinh có đường kính 90 - 100 mm;
- pipet chia vạch có thể tích 1; 5 và 10 ml;
- bình nón dung tích 100; 250 và 500 ml;
- ống nghiệm các loại 16 - 160 mm, 18 - 200 mm;
- nồi cách thuỷ ổn định được nhiệt độ trong khoảng 35 - 45 ^{0}C;
- tủ ấm điều chỉnh nhiệt độ 32 ^{0} C ± 1 ^{0} C;
- tủ sấy;
- nồi hấp tiệt trùng;
- máy đo pH.

B.2.3 Hoá chất, thuốc thử:

- thạch dùng cho vi sinh vật;
- pepton dùng cho vi sinh vật;
- natri clorid tinh khiết (NaCl);
- glucose tinh khiết;
- dinatri hydrophotsphat tinh khiết;
- natri dihydrophotsphat ;
- kali Dihydrophotsphat tinh khiết;
- dikali hydrophotsphat tinh khiết ;
- acid lactic: dung dịch 20 % hoặc 30 %;
- acid citric : dung dịch 20 %;
- natri hydroxit tinh khiết (NaOH);
- dung dịch natri hydroxit 0,1 N;

- n-dimethyl-phenylen diamin dihydroclorid;
- magnesi clorid;
- cetrimid (Cetyl trimethyl amoni bromid);
- magnesi sulfat ngậm nước;
- glycerin;
- tween 80;
- đỏ trung tính;
- tím tinh thể;
- xanh Brilliant.

B.2.4 Môi trường

B.2.4.1 Các môi trường dùng để pha loãng, đếm các vi khuẩn, nấm mốc

B.2.4.1.1 Nước Pepton

Pepton	1 g
Natri clorid	8,5 g
Nước cất	1000 ml

B.2.4.1.2 Nước muối sinh lý

Natri clorid	8, 5 g
Nước cất	1000 ml

B.2.4.1.3 Môi trường thạch Saboruaud

Pepton	10 g
Glucose	40 g
Thạch	15 - 20 g
Nước cất	1000 ml
pH sau khi tiệt trùng:	5,6 6 0,2

Cách pha: Hoà tan các chất trong nước, đun nhỏ lửa, khuấy đều cho tan hoàn toàn. Đóng vào các bình dung tích 250 ml, mỗi bình 150 ml. Hấp tiệt trùng trong nồi hấp 110^0 C trong thời gian 15 - 20 phút. Môi trường có thể bảo quản ở 4^0 C và sử dụng trong vòng 30 ngày.

B.2.4.1.4 Môi trường thạch thường

Pepton	10 g
Natri clorid	5 g
Thạch	15-20 g
Nước cất	1000 ml
pH sau khi hấp tiệt trùng	7,4 -7,6

B.2.4.2 Các môi trường dùng để phân lập vi khuẩn, nấm mốc

B.2.4.2.1 Môi trường thạch Cetrimid

Gelatin pancreatic	20,0 g
Magnegi clorid	1,4 g
Glycerin	10,0 ml
Cetrimid	0,3 g
Thạch	13,6 g
Nước cất	1000 ml

Cách pha: Hoà tan tất cả các chất rắn trong nước, thêm glycerin. Đun nóng, khuấy đều; đun sôi 1 phút cho tan hoàn toàn. pH sau khi tiệt trùng 7,2 ± 0,2.

B.2.4.2.2 Môi trường thạch để phát hiện Fluorescin của Pseudomonas

Casein pancreatic	10,0 g
Pepton	10,0 g
Dikali hydrophotsphat khan	1,5 g
Magnesi sulfat ngậm nước	1,5 g
Thạch	15,0 g
Glycerin	10,0 g
Nước cất	1000 ml

Cách pha: Hoà tan tất cả các chất rắn trong nước, thêm glycerin. Đun nóng, khuấy đều; đun sôi 1 phút cho tan hoàn toàn. pH sau khi tiệt trùng 7,2 ± 0,2.

B.2.4.2.3 Môi trường thạch để phát hiện Pyocyanin của Pseudomonas

Gelatin pancreatic	20,0 g
Magnesi clorid khan	1,4 g
Kali sunfat khan	10,0 g
Thạch	15,0 g
Glycerin	10,0 ml
Nước cất	1000 ml.

Cách pha: Hoà tan tất cả các chất rắn trong nước, thêm glycerin. Đun nóng, khuấy đều, đun sôi 1 phút cho tan hoàn toàn. pH sau khi tiệt trùng là 7,2 ± 0,2.

B.2.4.2.4 Môi trường RAT

Bột gạo	15,0 g
Tween 80	10 ml
Thạch	13,5 g
Nước cất	1000 ml
pH sau khi tiệt trùng	4,5 - 5,5

B.2.4.2.5 Môi trường thạch muối mật có lactose và glucose, chỉ thị tím tinh thể, đỏ trung tính

Cao men bia	3,9 g
Gelatin pancreatic	7,0 g
Muối mật	1,5 g
Lactose	10,0 g
Natri clorid	5,0 g
D-glucose monohydrat	10,0 g
Thạch	15,0 g
Đỏ trung tính	30 mg
Tím tinh thể	2 mg
Nước cất	1000 ml

Điều chỉnh pH sao cho sau khi đun là 7,4 ± 0,2. Đun tới sôi nhưng không đun trong nồi hấp.

B.2.4.2.6 Canh thang làm giầu Enterobacteriacease - Mossel

Gelatin pancreatic	10 g
D-glucose monohydrat	5,0 g
Mật bò khô	20,0 g
Kali dihydrophosphat	2,0 g
Di natri hydrophosphat	8,0 g
Xanh Briliant	15,0 mg
Nước cất	1000 ml

Điều chỉnh pH sao cho sau khi đun là 7,2 ± 0,2. Đun ở 100^0 C trong 30 phút và làm lạnh ngay.

B.2.4.2.7 Môi trường thạch Manitol-muối

Casein pancreatic	5,0 g
Pepton	5,0 g
Cao thịt	1,0 g
Natri clorid	75,0 g
D-manitol	10,0 g
Đỏ phenol	25 mg
Thạch	15,0 g

Cách pha: Trộn, đun nóng, khuấy đều, sau đó đun sôi 1 phút để hoà tan hoàn toàn. pH sau khi tiệt trùng: 7,4 ± 0,2.

C.2.4.2.8 Môi trường lỏng Casein đậu tương

Casein pancreatic	0,5 g
Bột đậu tương (thuỷ phân bởi papain)	3,0 g
Natri clorua	5,0 g
Dikali hydrophosphat	2,5 g
Glucosa	2,5 g
Nước cất	1000 ml

Cách pha: Hoà tan các chất rắn vào nước, đun nóng nhẹ cho tan hoàn toàn. Để nguội dung dịch ở nhiệt độ phòng, phân chia vào các bình thích hợp, đem tiệt trùng, pH sau khi tiệt trùng 7,3 ± 0,2.

B.2.5 Tiến hành nuôi cấy, xác định và phân lập

B.2.5.1 Đếm tổng số vi khuẩn hiếu khí, nấm mốc sống lại được

B.2.5.1.1 Pha loãng sản phẩm: tiến hành theo điều 2.1.2.

B.2.5.1.2 Cấy truyền

Trước tiên cấy kiểm tra pipet trên một đĩa môi trường phát hiện vi khuẩn và một đĩa môi trường nấm mốc.

Dùng pipet vô trùng cấy vào mỗi hộp Petri 1 ml sản phẩm đã pha loãng, mỗi độ pha loãng cấy vào 2 hộp để xác định số lượng vi khuẩn hiếu khí sống lại được và 2 hộp để xác định số lượng nấm mốc sống lại được.

C.2.5.1.3 Đổ đĩa

Đun nóng chảy hoàn toàn các loại môi trường dùng để đếm vi khuẩn, nấm mốc, để nguội đến 45^{0}C, rót vào các hộp Petri (đã cấy sẵn trong mỗi hộp 1 ml của một độ pha loãng của sản phẩm) mỗi hộp 15 - 20 ml môi trường; trộn đều sản phẩm đã pha loãng với môi trường bằng cách xoay hộp Petri qua phải và qua trái mỗi chiều 2 - 3 lần. Để đĩa thạch đông tự nhiên trên mặt phẳng ngang.

Thường dùng môi trường thạch thường để đếm vi khuẩn hiếu khí.

Thường dùng môi trường Sabouraud để đếm nấm mốc.

B.2.5.1.4 Ủ ấm

Sau khi các đĩa thạch đã đông tự nhiên ở nhiệt độ phòng, lật ngược đĩa thạch và đem ủ.

Những đĩa thạch dùng để đếm vi khuẩn được ủ ở 32 – 35 ^{0}C, đếm khuẩn lạc mọc trên đĩa sau khi ủ 48 - 72 giờ.

Những đĩa thạch dùng để đếm nấm mốc ở 256 2^{0}C, đếm khuẩn lạc mọc trên đĩa sau khi ủ từ 3 - 5 ngày.

B.2.5.1.5 Tính kết quả

Số lượng vi khuẩn hiếu khí, nấm mốc sống lại được có trong 1 g hoặc 1 ml sản phẩm được tính theo công thức sau:

$$M = \frac{\sum \frac{C \times d}{n}}{N}$$

trong đó:

M là số lượng vi khuẩn, nấm mốc sống lại được có trong 1 g hoặc 1 ml sản phẩm;

C là tổng số khuẩn lạc đếm được ở các đĩa Petri cùng một độ pha loãng;

n là số đĩa trong một độ pha loãng;

d là độ pha loãng;

N là số độ pha loãng (thí dụ đếm hai độ pha loãng 10^1 và 10^2 : N =2; đếm ở những độ pha loãng 2,5 và 10 thì N = 3 v.v...).

B.2.5.2 Phân lập vi khuẩn

B.2.5.2.1 Tìm Staphylococcus aureus

Cho chế phẩm vào 100 ml môi trường lỏng casein đậu tương, ủ ấm 35°C trong khoảng 24 - 48 giờ. Quan sát môi trường, nếu thấy vi khuẩn mọc, dùng que cấy lấy một quai cấy, cấy lên một đĩa thạch Mannitol- muối. Đậy đĩa, lật ngược hộp Petri, đem ủ ấm ở 35°C trong 24 giờ. Sau khi ủ ấm, kiểm tra nếu thấy:

Trên đĩa thạch Mannitol- muối có thấy những khuẩn lạc màu vàng cùng với một vùng mầu vàng xung quanh, dùng que cấy lấy khuẩn lạc điển hình, đem nhuộm Gram, soi kính thấy tụ cầu khuẩn hình chùm nho, bắt mầu gram dương, đường kính khoảng 0,8 - 1µm; tiếp tục làm các phản ứng sinh vật hoá học của Staphylococcus aureus. Chuyển một lạc khuẩn nghi ngờ đặc trưng vào ống nghiệm nhỏ, sạch vô trùng, thêm vào ống 0,5 ml huyết tương thỏ. Đem ủ ấm cách thuỷ 37°C; sau 3 giờ ủ ấm, kiểm tra các ống thử, tiếp tục ủ ấm thêm 24 giờ. Nếu thấy có hiện tượng đông huyết tương ở bất kỳ mức độ nào- sản phẩm có Staphylococcus aureus.

B.2.5.2.2 Tìm Pseudomonas aeruginosa

Cho chế phẩm vào 100 ml môi trường lỏng casein đậu tương, ủ ấm ở 35°C trong 24 - 48 giờ. Quan sát môi trường, nếu thấy vi khẩn mọc, dùng dùng que cấy lấy một quai cấy, cấy lên một đĩa thạch Cetrimid. đậy đĩa, lật ngược hộp Petri và đem ủ ấm ở 35°C trong 24 giờ. sau khi ủ ấm, kiểm tra nếu thấy:

Trên môi trường thạch Cetrimid có khuẩn lạc màu lục nhạt, có ánh huỳnh quang màu lục, thì lấy khuẩn lạc, nhuộm gram và soi kính. Nếu thấy trực khuẩn Gram âm và phản ứng oxydaza dương tính thì tiếp tục cấy truyền trên mặt môi trường thạch Pseudomonas để phát hiện fluorescin và môi trường thạch Pseudomonas để phát hiện pyocyamin trong hộp Petri. Đậy và lật ngược hộp môi trường đã cấy truyền, đem ủ ấm ở 35 ± 2°C trong ít nhất 3 ngày, đem kiểm tra các đĩa thạch dưới ánh đèn tử ngoại, nếy thấy:

Trên đĩa thạch Pseudomonas để phát hiện fluorescin có khuẩn lạc không màu đến màu vàng, có huỳnh quang hơi vàng.

Trên đĩa thạch Pseudomonas để phát hiện pyocyamin có khuẩn lạc màu vàng nhạt, có huỳnh quang màu xanh nước biển.

Tiếp tục nhuộm gram, soi kính và làm phản ứng oxydaza thấy trực khuẩn gram âm, phản ứng oxydaza dương tính, có thể kết luận có Pseudomonas aeruginosa.Nếu chưa chắc chắn có thể tiếp tục kiểm tra bằng các phép thử sinh hoá khác.

Thử phản ứng oxydaza: Chuyển khuẩn lạc vào mẩu giấy đã tẩm trước N-dimethyl phenylen diamin dihydroclorid, nếu thấy hiện mầu đỏ hồng, chuyển sang màu tím: phản ứng oxydaza dương tính.

B.2.5.2.3 Enterobacteriaceae và các vi khuẩn gam âm khác

Làm đồng nhất chế phẩm đem kiểm tra bằng cách xử lý một lượng thích hợp như đã mô tả ở trên và ủ ấm ở 35 - 37 ^{0} C trong một thời gian thích hợp để phục hồi lại vi khuẩn, nhưng không phải làm tăng vi khuẩn (thường từ 2 - 5 h). Lắc bình chứa và chuyển một lượng chế phẩm đã đồng nhất tương đương với khoảng 1 g hoặc 1 ml chế phẩm vào 100 ml môi trường canh thang làm giầu Enterobacteriaceae - Mosel và ủ ấm ở 35 - 37 ^{0}C trong 18 - 24 h.Cấy lên đĩa thạch muối mật có lactose, glucose, chỉ thị tím tinh thể và đỏ trung tính, ủ ấm ở 35 - 37^{0}C trong 18 - 48 h. Chế phẩm không có Enterobacteriaceae nếu không thấy mọc những khuẩn lac vi khuẩn gram âm trên thạch đĩa.

Đánh giá số lượng: Ủ ấm một lượng thích hợp môi trường canh thang làm giầu Enterobacteriaceae - Mosel với nhữnglượng chế phẩm đem kiểm tra đã được làm giầu đồng nhất chứa 1,0 g; 0,1 g; và 0,01 g hoặc 1,0 ml; 0,1 ml và 0,01 m. Chế phẩm có thể được pha loãng khi cần. ủ ấn ở 35^{0} - 37^{0} C trong 24 đến 48 giờ. Sự mọc của các khuẩn lạc đã phát triển tốt thường đỏ hoặc đĩa đỏ, vi khuẩn gram âm chứng tỏ kết quả dương tính. Ghi lượng nhỏ nhất của chế phẩm mà ở đó cho kết quả dương tính và lượng lớn nhất của chế phẩm mà ở đó cho kết quả âm tính. Xác định theo bảng sau số lượng Bacteria.

Bảng B.1- Tính lượng Bacteria trong chế phẩm

Kết quả đối với mỗi lượng sản phẩm			**Số bacteria có trong 1 g sản phẩm**
1,0 g hoặc 1,0 ml	0,1 g hoặc 0,1 ml	0,01 g hoặc 0,01 ml	
+	+	+	Lớn hơn 10^{2}
+	+	-	Ít hơn 10^{2} nhưng lớn hơn 10
+	-	-	Ít hơn 10 nhưng lớn hơn 1
-	-	-	Ít hơn 1

B.2.5.2.4 Tìm Candida albicans

Tiến hành trên môi trường thạch Sabouraud.

Vào cuối giai đoạn ủ ấm, kiểm tra bằng kính hiển vi xem có nấm mọc hay không. Kiểm tra sự có khuẩn lạc nghi ngờ Candida albicans. Lấy khuẩn lạc điển hình đem nhuộm gram, soi kính: Candida albicans có hình tròn, bầu dục đường kính 6 - 9 μm, bắt màu gram dương.

Thử nghiệm mầm giá đậu:

Lấy một giọt huyền dịch nấm đã nuôi cấy sau 24 h vào ống nghiệm nhỏ có chứa 1 ml huyết thanh thỏ, ủ ấm ở 37^0 C trong 3 h, sau đó lấy ra soi giữa bản và lá kính. Nếu là nấm Candida albicans thì gần như toàn bộ số tế bào sẽ nẩy mầm giống như hình - giá đậu.

Tìm tế bào vách dày: Cho môi trường RAT lên bản kính vô khuẩn, nhỏ vào một giọt huyền dịch nấm, đậy lá kính, đọc kết quả sau 24 - 48 giờ ủ ấm ở 30 ^{0}C.

Tài liệu tham khảo

[1] Tiêu chuẩn giới hạn vi khuẩn, nấm mốc và phương pháp thử của bộ Y Tế quy định cho mỹ phẩm số 3113/1999/QĐ-BYT ngày 11/10/1999.

[2] Tiêu chuẩn độ kích ứng da và phương pháp thử của bộ Y Tế quy định cho mỹ phẩm số 3113/1999/QĐ-BYT ngày 11/10/1999.