



Konservierungsbelastungstests nach ISO 11930, Europäischem Arzneibuch sowie alternative Verfahren



Sehr geehrte Damen und Herren,

Seit 2012 existiert die **Norm ISO 11930** „Kosmetische Mittel – Mikrobiologie – Bewertung des antimikrobiellen Schutzes eines kosmetischen Produktes“.

In diesem Newsletter berichten wir über wichtige Aspekte dieser Norm zur Durchführung und Bewertung von Belastungstests.

Des Weiteren wird die Norm mit anderen Verfahren, insbesondere den Methoden und Kriterien des Europäischen Arzneibuches verglichen. Ergänzende Informationen zu diesen Themen sind in unserem [Newsletter "Sonderausgabe Kosmetik Teil 3"](#) aus 2013 enthalten.

Wir wünschen Ihnen eine informative Lektüre.

Dipl. Ing. Paul Andrei
Geschäftsführer

Inhalt

- [Einleitung](#)
- [Prinzip von Belastungstests](#)
- [Teststämme](#)
- [Keimzählverfahren](#)
- [Eignungsprüfung](#)
- [Mikrobiologische Qualität des Produktes](#)
- [Beimpfung des Produktes](#)
- [Untersuchungszeitpunkte](#)
- [Bewertung der Ergebnisse](#)
- [Bedeutung von Kriterium A und B](#)
- [Zusammenfassung](#)

Einleitung

Konservierungsbelastungstests stellen einen grundlegenden Baustein zur Bewertung der mikrobiologischen Sicherheit von kosmetischen Mitteln dar.



Seit 2012 existiert die **Norm ISO 11930** über Konservierungsbelastungstests von Kosmetika. Während man sich früher insbesondere an den Vorgaben des Europäischen oder Amerikanischen Arzneibuches orientiert hat, existieren mit der ISO 11930 Vorgaben zur Durchführung und Bewertung von Belastungstests, die speziell auf die

Kosmetikbranche ausgerichtet sind und zunehmend an Bedeutung gewinnen.

Da die ISO 11930 jedoch erst seit 2012 existiert und bisher keinen verbindlichen Gesetzescharakter hat, gibt es in der Kosmetikbranche zahlreiche, teilweise recht unterschiedliche Vorgehensweisen bei der Durchführung und Bewertung von Belastungstests. Im nachfolgenden Newsletter werden wichtige Aspekte der ISO 11930 beschrieben. Darüber

hinaus werden Alternativen bei der Durchführung von Belastungstests, insbesondere Methoden und Kriterien des Europäischen Arzneibuches dargestellt.

Prinzip von Belastungstests

Ein kosmetisches Produkt wird zu Beginn des Belastungstests mit diversen Mikroorganismen beimpft. Die Ausgangskeimzahlen werden ermittelt und die beimpften Produkte unter definierten Bedingungen eingelagert. Nach festgelegten Zeitpunkten werden die Keimzahlen der beimpften Produkte bestimmt um die Entwicklung der Keimzahlen über den Testzeitraum zu verfolgen. Letztlich wird überprüft, ob die Keimzahlen entsprechend den Vorgaben reduziert werden. Dadurch erhält man einen Hinweis bezüglich der mikrobiellen Stabilität des kosmetischen Mittels, da man nach dem Öffnen des Kosmetika in vielen Fällen mit einem Eintrag von Mikroorganismen rechnen muss.

Teststämme

Die Auswahl der Teststämme ist für die Aussagekraft eines Belastungstests von entscheidender Bedeutung. Die ISO 11930 gibt die Verwendung von fünf Teststämmen vor:

- [Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027](#)
- [Staphylococcus aureus ATCC 6538](#)
- [Escherichia coli ATCC 8739](#)
- [Candida albicans ATCC 10231](#)
- [Aspergillus brasiliensis ATCC 16404](#)



Gemäß dem Europäischen Arzneibuch sind bis auf *Escherichia coli* die gleichen Stämme einzusetzen. In der ISO 11930 wird jedoch ausdrücklich darauf hingewiesen, dass betriebs- und fallabhängig der Einsatz weiterer Stämme sinnvoll sein kann. Meist handelt es sich dabei um Keime, die im Unternehmen bereits für Schwierigkeiten gesorgt haben. Des Weiteren hat der Zustand der eingesetzten Mikroorganismen Einfluss auf die Ergebnisse des Tests. Deshalb gibt es in der ISO 11930 wie auch im Europäischen Arzneibuch ebenfalls Vorgaben zur Behandlung der Stämme und zur Herstellung der Mikroorganismensuspensionen (Inokula). Sollte von diesen Vorgaben abgewichen werden, kann dies zu unterschiedlichen Keimreduktionen bzw. Ergebnissen führen, da der Ausgangszustand der Mikroorganismen eine wichtige Rolle spielt.

Keimzählverfahren



In der ISO 11930 sind Verfahren und Nährmedien zur Durchführung der mikrobiologischen Untersuchungen enthalten. Das Europäische und Amerikanische Arzneibuch enthalten ebenfalls vergleichbare Untersuchungsmethoden. Die Auswahl der Medien sowie der Verfahren (z.B. Plattengußverfahren, Oberflächen-spatelverfahren oder Membranfiltration),

Bebrütungstemperatur und Bebrütungsdauer können einen Einfluss auf die Ergebnisse haben. Die o.g. Norm bzw. die Arzneibücher fordern, dass die in den Methoden angegebenen Keimzählverfahren produktbezogen auf deren Eignung überprüft werden (siehe nachfolgendes Kapitel).

Eignungsprüfung bzw. Nachweis der Wirksamkeit des Neutralisierungsmittels

Da Kosmetika häufig Stoffe beinhalten, die das Wachstum von Mikroorganismen verhindern sollen, muss man nachweisen, dass diese Substanzen bei der Durchführung der Keimzahlbestimmungen keinen Einfluss mehr auf die Ergebnisse haben. Die antimikrobiell wirksamen Inhaltsstoffe aus den Kosmetika müssen bei der Untersuchung neutralisiert worden sein und somit keinen Einfluss mehr auf die Untersuchungsergebnisse haben.

Deshalb muss laut der ISO 11930 der Nachweis der Wirksamkeit des Neutralisierungsmittels bzw. die Eignung der Keimzählverfahren erbracht werden.



Im Europäischen und Amerikanischen Arzneibuch werden ebenfalls entsprechende Eignungsprüfungen der Keimzählverfahren gefordert. Bei den Eignungsprüfungen bzw. Nachweisen der Wirksamkeit des Neutralisierungsmittels



werden die zu prüfenden Produkte mit definierten Mikroorganismensuspensionen belastet. Anschließend wird geprüft, inwiefern die angewandte Keimzählmethode dazu geeignet ist, die Anzahl der in das Produkt eingebrachten Mikroorganismen wieder zu finden.

Es existieren mehrere Möglichkeiten antimikrobiell wirksame Substanzen zu neutralisieren. Meist werden der Verdünnungslösung und/oder den Nährmedien diverse Inaktivierungs- bzw. Neutralisationssubstanzen hinzugefügt. In der ISO 11930 gibt es dazu im Anhang eine Übersicht. Weiterhin kann man durch z.B. eine höhere Verdünnung der Probe oder durch Anwendung eines anderen Verfahrens wie Membranfiltration ebenfalls diese antimikrobielle Wirkung der Probe neutralisieren.

In der Kosmetikbranche wird die Eignungsprüfung bzw. der Nachweis der Wirksamkeit des Neutralisierungsmittels häufig noch nicht routinemäßig beauftragt bzw. durchgeführt. In der Arzneimittelbranche gehören diese Prüfungen bereits seit Jahren zum Standard. Leider ist der Aufwand für diese Eignungsprüfungen recht hoch, jedoch kann man ausschließlich mittels dieser zusätzlichen Prüfungen sicher gewährleisten, dass die Ergebnisse der Keimzählmethode tatsächlich zuverlässig sind. Mittel- bis langfristig wird der Trend ähnlich wie in der Arzneimittelbranche dahin gehen, dass auch bei Kosmetika die Durchführung von Eignungsprüfungen gefordert wird. Durch das Zusammenfassen von Kosmetika mit ähnlichen Eigenschaften bzw. vergleichbarer Zusammensetzung zu Produktgruppen, kann man eventuell den Aufwand für diese Prüfungen erheblich reduzieren. Dies muss jedoch im Einzelfall betrachtet werden.

Mikrobiologische Qualität des Produkts

Vor Beginn oder spätestens gleichzeitig mit dem Start des Belastungstests müssen die Keimzahlen vom zu prüfenden Produkt vor der Inokulation mit den Keimsuspensionen ermittelt werden. Es ist sicherzustellen, dass sich im Produkt nicht bereits Mikroorganismen befinden, die anschließend den Verlauf bzw. die Auswertung des Konservierungsbelastungstests beeinträchtigen.



Beimpfung des Produktes mit den Mikroorganismensuspensionen (Inokula)

Die Mikroorganismen werden in der Regel in einem Verhältnis 1:100 in das Produkt eingemischt. Dabei ist eine homogene Verteilung des Inokulums in der Probe sicherzustellen. Kann dies nicht gewährleistet werden, ist die Aussagekraft des Belastungstests nicht gegeben. Unter anderem heißt es deshalb auch in der ISO 11930: „Diese Prüfung ist vor allem für wasserlösliche oder wassermischbare kosmetische Mittel bestimmt und kann eine Anpassung erfordern, z.B. bei Prüfprodukten, in denen sich das Wasser in der internen Phase befindet.“ Aus diesem Grund ist die Prüfung für w/o-Produkte in etwas abgewandelter Form mit z.B. anderen Verdünnungsmedien durchzuführen. Dies ist ein entscheidender Aspekt bei der Durchführung von Belastungstests mit w/o-Produkten und anderen schwer- oder nicht-wasserlöslichen Produkten.

Im Rahmen der Belastungstests nach ISO 11930 sowie bei anderen Methoden wie z.B. dem Europäischen und Amerikanischen Arzneibuch erfolgt zu Beginn des Belastungstests eine einmalige Beimpfung der Proben mit je einem Mikroorganismenstamm (Belastungstest mit Einfachbelastung).

Da in der Praxis jedoch Kosmetika im Rahmen des Gebrauchs durch den Verbraucher mehrfach mit Mikroorganismen kontaminiert werden können, existieren auch nicht genormte Modelle von Belastungstests, bei denen die Proben mehrfach mit Mikroorganismensuspensionen beimpft werden (Belastungstest mit Mehrfachbelastung).



Bei der Beimpfung des Produktes mit den Mikroorganismensuspensionen existieren weitere Variationsmöglichkeiten. Bei den genormten Verfahren wie auch nach der ISO 11930 erfolgt die Beimpfung der Proben stets mit einer Mikroorganismensuspension, die ausschließlich einen Teststamm beinhalten.

Bei nicht genormten Belastungstestmethoden gibt es aus Gründen der Praktikabilität bzw. um den Untersuchungsaufwand zu reduzieren Verfahren, bei denen in einer Mikroorganismensuspension zwei oder auch mehrere Teststämme zusammen gemischt werden. Die Problematik beim Einsatz von Mischkulturen ist jedoch, dass eine gegenseitige Wirkung der Mikroorganismen während des Belastungstests nicht ausgeschlossen werden kann. Des Weiteren ist von Nachteil, dass es keine genormten Verfahren und Kriterien zur Beurteilung von Ergebnissen von Belastungstests mit Mischkulturen oder Mehrfachbeimpfung gibt.

Beim Beimpfen der Proben ist die Anzahl der inokulierten Mikroorganismen im Produkt für die Ergebnisse der Tests von Bedeutung. Je höher die Anzahl an Mikroorganismen im Produkt ist, desto schwieriger ist es für das Konservierungssystem des Produktes die Keimzahlen im Belastungstest zu reduzieren. Die ISO 11930 wie auch die Verfahren nach dem Europäischen und Amerikanischen Arzneibuch machen deshalb zur Inokulation genaue Vorgaben. Für die Bakterien sind die Vorgaben zur Anzahl der inokulierten Mikroorganismen zum Zeitpunkt 0h zwischen der ISO 11930 und dem Europäischen Arzneibuch gleich. Für die Pilze liegen jedoch die Vorgaben laut der ISO 11930 um eine Zehnerpotenz niedriger als beim Europäischen Arzneibuch.

Untersuchungszeitpunkte

Belastungstests zeigen die Keimzahlentwicklung nach dem Beimpfen der Probe über einen festgelegten Zeitraum auf. Die üblichen Methoden für Belastungstests haben ihren letzten Testzeitpunkt 28 Tage nach dem Beimpfen. Während diesem Zeitraum gibt es mehrere Testzeitpunkte um den Verlauf der Keimzahlreduktion verfolgen zu können. Die ISO 11930 legt nach dem Beimpfen der Probe drei weitere Testzeitpunkte fest (7.ter, 14.ter und 28.ter Tag). Weitere Testzeitpunkte können z.B. der 2.te Tag sowie der 21.te Tag nach dem Beginn des Belastungstests sein.



Je nach Situation, kann es in Ausnahmefällen sinnvoll sein den Belastungstest über den 28.ten Tag fortzuführen, um weitere Aussagen über die langfristige Keimzahlentwicklung im Produkt zu erhalten. Dies gilt insbesondere in Fällen, in denen die Keimzahlen nur langsam reduziert werden und/oder die Gefahr besteht, dass die Keimzahlen wieder ansteigen könnten.

Bewertung der Ergebnisse

Die ISO 11930 gibt Anforderungen an die Reduktion der Keimzahlen im Rahmen der Belastungstests vor. Diese Anforderungen werden mittels logarithmischer Reduktionswerte dargestellt (siehe Tabelle 1). Um die logarithmischen Reduktionswerte zu berechnen, muss man die Ergebnisse der Keimzahlbestimmungen logarithmieren und die einzelnen Werte von den 0-Tage-Werten subtrahieren. Dadurch erhält man den logarithmischen Reduktionswert, der den Vorgaben der ISO 11930 entsprechen muss, um die Kriterien A oder B der Norm zu erreichen.

Tabelle 1: Bewertungskriterien nach ISO 11930

Geforderte logarithmische Reduktionswerte ^a					
Kriterium A	0 h	2 d	7 d	14 d	28 d
Bakterien	---	---	≥ 3	$\geq 3^b$	$\geq 3^b$
C. albicans	---	---	≥ 1	$\geq 1^b$	$\geq 1^b$
Aspergillus brasiliensis	---	---	---	Kein Anstieg gegenüber dem 0h-Wert	$\geq 1^b$
Kriterium B	0 h	2 d	7 d	14 d	28 d
Bakterien	---	---	---	≥ 3	$\geq 3^b$
C. albicans	---	---	---	≥ 1	$\geq 1^b$
Aspergillus brasiliensis	---	---	---	Kein Anstieg gegenüber dem 0h-Wert	Kein Anstieg gegenüber dem 14d-Wert

^a eine Abweichung von 0,5 log-Stufen ist zulässig

^b kein Anstieg gegenüber der letzten Zählung

Wie man auch den Fußnoten der Tabelle entnehmen kann, ist bei der Bewertung der Ergebnisse gemäß der Norm ISO 11930 eine Abweichung von 0,5 log-Einheiten von den Werten in der Tabelle zulässig. Damit werden die unvermeidbaren Schwankungen mikrobiologischer Verfahren (Messunsicherheiten) bei der Ergebnisbeurteilung berücksichtigt. Im Europäischen Arzneibuch Kap. 5.1.3 ist kein Spielraum bei der Bewertung der Ergebnisse vorgesehen. Auch sind die geforderten logarithmischen Reduktionswerte teilweise höher als bei der ISO 11930 und für die Bakterien gibt es nach 2 Tagen gemäß der ISO 11930 keine Anforderungen an die Keimzahlreduktion (siehe Tabelle 1 und 2). Insofern sind die Anforderungen an die Keimzahlreduktion nach dem Europäischen Arzneibuch Kap. 5.1.3 höher als bei der ISO 11930.

Tabelle 2: Bewertungskriterien nach Europäischem Arzneibuch 7.0/5.1.3

Geforderte logarithmische Reduktionswerte					
Kriterium A	0 h	2 d	7 d	14 d	28 d
Bakterien	---	≥ 2	≥ 3	---	Kein Anstieg gegenüber dem 7d-Wert
Pilze	---	---	---	≥ 2	Kein Anstieg gegenüber dem 14d-Wert
Kriterium B	0 h	2 d	7 d	14 d	28 d
Bakterien	---	---	---	≥ 3	Kein Anstieg gegenüber dem 14d-Wert
Pilze	---	---	---	≥ 1	Kein Anstieg gegenüber dem 14d-Wert

Hinweis:

Die geforderten Reduktionsraten nach Kap. 5.1.3 des Europäischen Arzneibuches sind anspruchsvoller als nach der ISO 11930. Insbesondere für mild bzw. alternativ konservierte Kosmetika sind deshalb die Kriterien der ISO 11930 besser zu erfüllen.

Bedeutung von Kriterium A und B

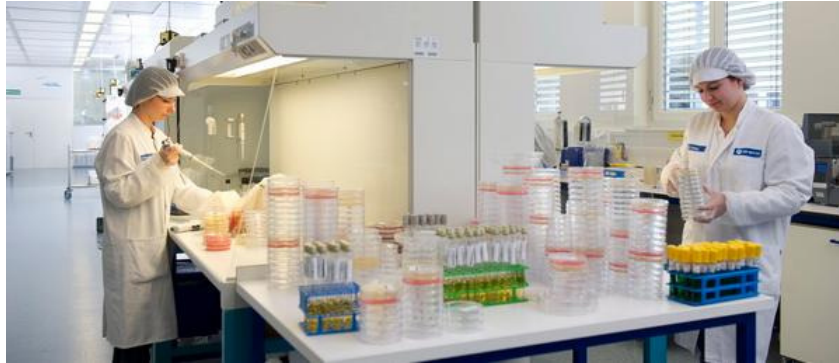
Sowohl die ISO 11930 als auch das Europäische Arzneibuch unterscheiden bei den Bewertungen der Ergebnisse zwischen Kriterium A und B. Die Bedeutung der Kriterien A und B ist jedoch in den beiden Fällen unterschiedlich.

Wenn nach der ISO 11930 das Kriterium A erfüllt wird, kann man laut der Norm davon ausgehen, dass das Produkt vor mikrobieller Vermehrung geschützt ist. Sollte ausschließlich Kriterium B erreicht werden, müssen weitere Sicherheitsmaßnahmen wie z.B. eine Schutzverpackung ergriffen werden, um das mikrobielle Risiko während des Gebrauchs entsprechend zu verringern und die Anforderungen der Norm zu erfüllen.

Die Kriterien A und B nach dem Europäischen Arzneibuch Kap. 5.1.3 für Produkte zur Anwendung auf der Haut verfolgen einen anderen Gedanken. Kriterium A soll von Produkten mit Konservierungsmitteln erfüllt werden, während Kriterium B für Produkte ohne Konservierungsmittel gilt.

Zusammenfassung

- 1) Konservierungsbelastungstests nach ISO 11930 gewinnen in der Kosmetikbranche zunehmend an Bedeutung
- 2) Die ISO 11930 fordert neben den vier Stämmen des Europäischen Arzneibuches Kap. 5.1.3 auch zusätzlich *Escherichia coli*
- 3) Je nach Fragestellung kann es sinnvoll oder sogar notwendig sein weitere Teststämme in die Tests mit einbeziehen
- 4) Eignungsprüfungen bzw. der Nachweis der Wirksamkeit des Neutralisierungsmittels werden bei beiden Testverfahren gefordert
- 5) Das Europäische Arzneibuch stellt höhere Anforderungen an die Keimzahlreduktionen als die ISO 11930. Insbesondere mild oder alternativ konservierte Kosmetika können die Kriterien der ISO 11930 besser erfüllen



BAV Institut für Hygiene und Qualitätssicherung GmbH

Hanns-Martin-Schleyer-Str. 25
77656 Offenburg

Tel +49 (0) 781 / 9 69 47 - 0
Fax +49 (0) 781 / 9 69 47 - 20
www.bav-institut.de
info@bav-institut.de



Vertretungsberechtigter Geschäftsführer:
Dipl.-Ing. Paul Andrei

Registergericht: Amtsgericht Freiburg i. Br.
Registernummer: HRB 471864

Umsatzsteuer-Identifikationsnummer gem. §/27a
Umsatzsteuergesetz:
DE 811 647 935

Fügen Sie bitte die E-Mail-Adresse news@news.bav-institut.de Ihrem Adressbuch oder der Liste sicherer Absender hinzu. Dadurch ist gewährleistet, dass unsere E-Mail Sie auch in Zukunft erreicht.

Dieser Newsletter wurde an max.mustermann@news.bav-institut.de gesendet. Dieser Newsletter wird Ihnen ausschließlich mit Ihrem Einverständnis zugesandt. Wollen Sie diesen Newsletter in Zukunft nicht mehr erhalten, klicken Sie bitte [hier](#).