국민의 내일을 위한 정부혁신
보다 나은 정부

화장품 의약외품 연구회

화장품 미생물한도 시험법 가이드라인(민원인 안내서)

2021. 10.

식품의약품안전처
식품의약품안전평가원

지침서·안내서 제·개정 점검표

명칭	화장품 미생물한도 시험법 가이드라인(민원인 안내서)

아래에 해당하는 사항에 체크하여 주시기 바랍니다.

등록대상 여부	□ 이미 등록된 지침서·안내서 중 동일·유사한 내용의 지침서·안내서가 있습니까?	□ 예 ■ 아니오
	☞ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 기존의 지침서·안내서의 개정을 우선적으로 고려하시기 바랍니다. 그럼에도 불구하고 동 지침서·안내서의 제정이 필요한 경우 그 사유를 아래에 기재해 주시기 바랍니다. (사유 :)	
	□ 법령(법·시행령·시행규칙) 또는 행정규칙(고시·훈령·예규)의 내용을 단순 편집 또는 나열한 것입니까?	□ 예 ■ 아니오
	□ 단순한 사실을 대외적으로 알리는 공고의 내용입니까?	□ 예 ■ 아니오
	□ 1년 이내 한시적 적용 또는 일회성 지시·명령에 해당하는 내용입니까?	□ 예 ■ 아니오
	□ 외국 규정을 번역하거나 설명하는 내용입니까?	□ 예 ■ 아니오
	□ 신규 직원 교육을 위해 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 정리한 자료입니까?	□ 예 ■ 아니오
	☞ 상기 사항 중 어느 하나라도 '예'에 해당되는 경우에 지침서·안내서 등록 대상이 아닙니다. 지침서·안내서 제·개정 절차를 적용하실 필요는 없습니다.	
지침서·안내서 구분	□ 내부적으로 행정사무의 통일을 기하기 위하여 반복적으로 행정사무의 세부기준이나 절차를 제시하는 것입니까? (공무원용)	□ 예(☞지침서) ■ 아니오
	□ 대내외적으로 법령 또는 고시·훈령·예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것입니까? (민원인용)	■ 예(☞안내서) □ 아니오
기타 확인 사항	□ 상위 법령을 일탈하여 새로운 규제를 신설·강화하거나 민원인을 구속하는 내용이 있습니까?	□ 예 ■ 아니오
	☞ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 상위법령 일탈 내용을 삭제하시고 지침서·안내서 제·개정 절차를 진행하시기 바랍니다.	

상기 사항에 대하여 확인하였음.

2021년 10월 28일

담당자 김 효 진

확 인(부서장) 윤 혜 성

이 안내서는 화장품 미생물한도 시험법에 대하여 알기 쉽게 설명하거나 식품의약품안전처의 입장을 기술한 것입니다.

본 안내서는 대외적으로 법적 효력을 가지는 것이 아니므로 본문의 기술방식('~하여야 한다' 등)에도 불구하고 민원인 여러분께서 반드시 준수하셔야 하는 사항이 아님을 알려드립니다. 또한, 본 안내서는 2021년 10월 현재의 과학적·기술적 사실 및 유효한 법규를 토대로 작성되었으므로 이후 최신 개정 법규 내용 및 구체적인 사실관계 등에 따라 달리 적용될 수 있음을 알려드립니다.

※ "민원인 안내서"란 대내외적으로 법령 또는 고시·훈령·예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것(식품의약품안전처 지침서등의 관리에 관한 규정 제2조)

※ 본 안내서에 대한 의견이나 문의사항이 있을 경우 식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 화장품연구과에 문의하시기 바랍니다.

전화번호: 043-719-4853
팩스번호: 043-719-4850

제·개정 이력

화장품 미생물한도 시험법 가이드라인
(민원인 안내서)

제 · 개정번호	승인일자	주요 내용
안내서-860-01	2018.4.	화장품 미생물한도 시험법 가이드라인 (제정)
안내서-860-02	2021.10.	마스크팩* 및 물휴지* 적용 시험법 추가 *내용물을 취하기 어려운 제품

목 차

Ⅰ. 개요 ····· 1

Ⅱ. 미생물한도 시험법의 구성 ····· 2

Ⅲ. 미생물한도 시험 시 주의사항 ····· 3

1. 검체의 전처리(검액 제조) ····· 5

1-1. 개요 ····· 5

1-2. 대표 제품군별 검액 제조 가이드라인 ····· 6

2. 배지성능 및 시험법 적합성시험 ····· 15

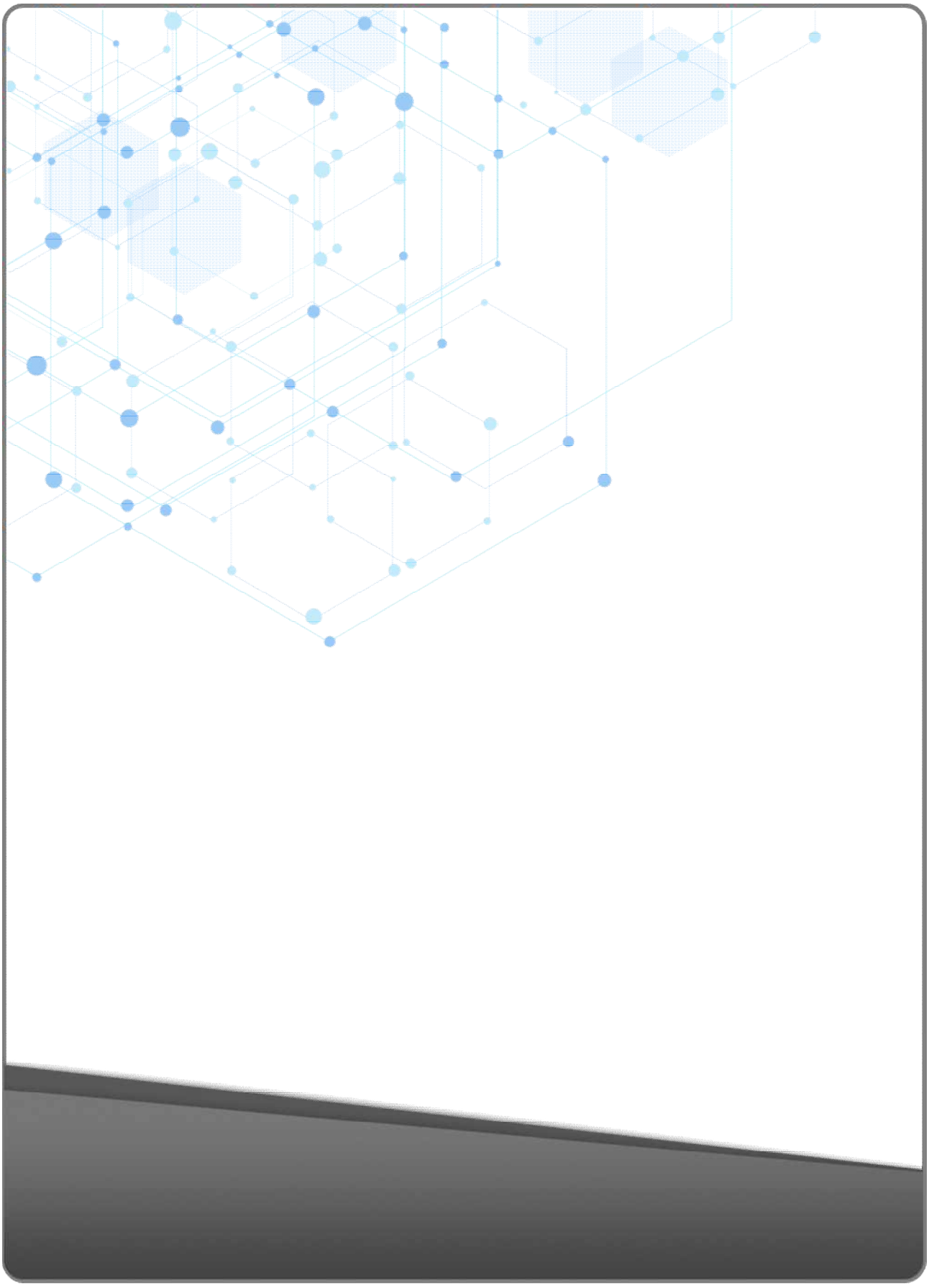
2-1. 총 호기성 생균수 시험법의 적합성시험 ····· 16

2-2. 특정미생물 시험법의 적합성시험 ····· 21

3. 본 시험(미생물한도 시험) ····· 24

3-1. 총 호기성 생균수 한도 시험 ····· 24

3-2. 특정미생물 시험 ····· 27



Ⅰ. 개요

❖ 화장품 미생물한도 시험법이란?

화장품 미생물한도 시험법은

☝ **화장품 내 미생물 수를 측정(총 호기성 생균수 시험)** 하고

✌ **특정미생물의 존재여부(특정미생물 시험)를 판단**하여

화장품이 미생물 허용한도기준에 적합한지 확인하기 위한 시험입니다.

○ 식품의약품안전처에서는 국내 화장품의 품질 및 안전성을 확보하고자 '화장품 안전기준 등에 관한 규정'을 운영하고 있으며, 동 규정 '[별표4] 유통화장품 안전관리 시험방법'을 통해 미생물한도 시험법을 제시하고 있습니다.

○ 본 가이드라인[1]은 화장품 미생물한도 시험에 사용되는 용어 설명, 시험 시 주의사항, 시험방법 및 결과 해석 사례 등을 포함하고 있습니다.

○ 또한, 화장품 제형에 따른 미생물한도 시험법 적용 사례를 설명하여 실무자들이 시험을 수행하는데 도움이 되도록 하였습니다.

1) 본 가이드라인은 국내 시험법(식품의약품안전처 고시 제 2020-12호) 및 국제 시험법(FDA의 BAM for cosmetics, PCPC microbiology guidelines M-1/M-2, USP 61/62, 1111 및 ISO 21322, 11930, 16212, 18416, 21150, 22717, 22718, 18415, 21148, 21149)을 근거로 제작하였습니다.

Ⅱ. 미생물한도 시험법의 구성

❖ 미생물한도 시험은 어떻게 수행하나요?

① 검체(화장품)에 희석액·분산제 등을 넣어 **검액을 제조**합니다.

② 시험에 들어가기 전, 제품에 적용되는 본 시험법이 적합한지 확인하기 위하여 **시험법 적합성 시험**을 수행합니다.

③ 시험법이 적합하다고 판단되면, 검체 내 미생물 오염수준을 확인하기 위한 **총 호기성 생균수 시험**과 **특정미생물 시험**을 수행합니다.

총 호기성 생균수 시험이란?

화장품 안에 있는 호기성 세균과 진균의 수를 측정하는 시험입니다.

특정미생물 시험이란?

화장품 안에 특정미생물(대장균, 녹농균, 황색포도상구균)이 존재하는지 확인하는 시험입니다.

<시험법의 구성>

	총 호기성 생균수 시험	특정미생물 시험
STEP 1	검체 전처리(검액 제조)	검체 전처리(검액 제조)+배양
STEP 2	시험법 적합성 시험	시험법 적합성 시험
STEP 3	본시험 (호기성 세균수 및 진균수 확인)	본 시험 (특정미생물 검출여부 확인)

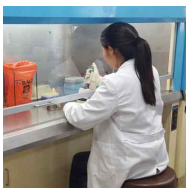
Ⅲ. 미생물한도 시험 시 주의사항

시험을 수행하기 전 이것만은 꼭 기억하세요!

아래 내용은 미생물 시험의 정확한 결과 확보를 위하여
검체 취급 시 꼭 기억해야하는 주의사항입니다.

모든 시험과정에서 미생물 오염에 주의합니다!

- 미생물 교차오염 방지를 위하여 클린벤치를 이용합니다.
- 검체 이외에 모든 재료는 멸균하여 사용합니다.
- 실험자와 검체, 외부환경 간의 미생물 교차오염에 주의합니다.


<클린벤치 사용 모습>

온도 관리에 주의합니다!

- 온도는 검체 내 미생물의 증식 및 사멸에 영향을 미칠 수 있습니다.
- 검체 보관이 필요할 때는 **'실온 보관'**을 기본 원칙으로 합니다.
- 특정 보관 온도가 별도로 제시된 화장품이 아닐 경우 냉동·냉장 보관하는 것을 권장하지 않습니다.

검체는 미생물 오염 방지를 위해 반드시 소독 후 취급합니다!

- 검체 개봉 전, 70 % 에탄올 등을 묻힌 멸균 거즈로 검체 입구 주위를 잘 닦아줍니다.

<70 % 에탄올을 묻힌 멸균로 검체 입구를 소독하는 모습>

검체 채취 시 정확한 용량을 소분합니다!

- 일부 점도가 높은 액상 제품의 경우, 정확한 소분을 위하여 바늘을 제거한 일회용 멸균 주사기를 사용 할 수 있습니다(단, 주사기 재사용 금지).
- 이때, 정확한 양을 채취하기 위하여 주사기 내 기포가 생기지 않도록 주의해야 합니다.

<올바른 주사기 사용 예>

<잘못된 주사기 사용 예 – 기포 발생>

내용물을 취하기 어려운 제품은 이렇게 준비하세요!

- 검체는 부자재(예: 침적마스크 중 부직포 등)를 제외한 화장품의 내용물로 합니다.
- 내용물을 취하기 어려운 제품(예: 하이드로겔 마스크 등)의 경우 검체에 부자재를 포함할 수 있습니다.
- 전처리 시 균일하게 분산될 수 있도록 검체를 최대한 작게 준비합니다.

<검체 채취 예>

<검체 처리 예>

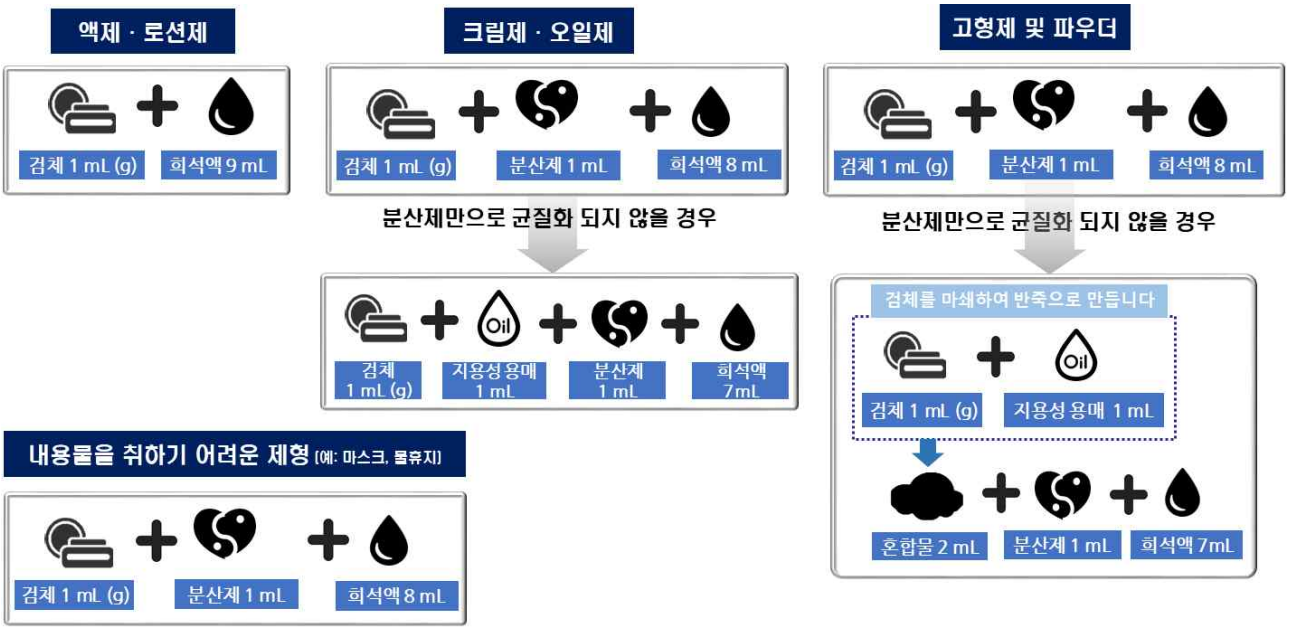
1 검체의 전처리(검액 제조)

1-1. 개요

❖ 검체의 전처리는 왜 중요할까요?

검체에 희석액[1], 분산제[2], 지용성 용매[3] 를 첨가하고 검체를 충분히 분산시키는 전처리 과정을 통해 보존제 등 항균활성물질을 중화시키거나 제거하여 실험의 정확도를 향상시킬 수 있기 때문입니다.

1) 희석액: 검체 희석을 위해 완충식염펩톤수(pH 7.0), 인산완충액(pH 7.2)를 사용할 수 있습니다.
2) 분산제: 멸균한 폴리소르베이트 80 등을 사용할 수 있으며, 미생물 생육에 대하여 영향이 없는 것 또는 영향이 없는 농도이어야 합니다.
3) 지용성 용매: 멸균한 미네랄 오일 등을 사용할 수 있으며, 미생물 생육에 대하여 영향이 없는 것이어야 합니다. 첨가량은 대상 검체 특성에 맞게 설정하여야 합니다.



참 고 하 세 요 !

- 지용성 용매는 대상 검체 특성에 따라 조절하여 넣을 수 있습니다.
- 마스크팩, 물휴지의 경우 지용성 용매 및 점도가 있는 중화제는 시트의 분산을 방해하고 뭉치게 하므로 가급적 사용을 지양합니다.
- 검액의 균질화를 위하여
  1) 가온(약40 ℃, 30분)하거나 2) 멸균한 유리구슬 첨가 후 교반 할 수 있습니다.

1-2. 대표 제품군별 검액 제조 가이드라인

○ 다양한 제형의 화장품에 대한 검액 제조 방법을 쉽게 이해할 수 있도록 대표 제품군 별 수행 사례를 아래에 정리하였습니다.

❑ 액제·로션제

제품 종류 ▶ 화장수, 샴푸, 폼 클렌져, 로션, 린스 등

<예시 1> 로션

▪ 검체 1 mL(g)에 희석배지(변형레틴액체배지 또는 검증된 배지) 또는 희석액 9 mL를 넣어 10배 희석액을 만들어줍니다.

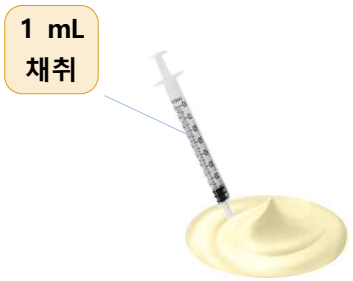
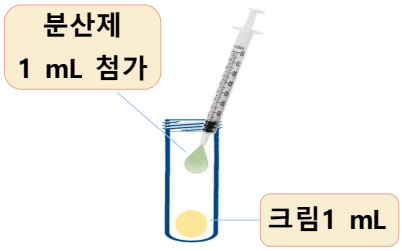
STEP 1. 검체 채취	STEP 2. 희석배지 첨가 및 균질화
피펫이나 주사기(점도가 높은 경우)를 이용하여 샘플을 채취하여 검액 제조용 용기에 넣어줍니다.	희석배지 첨가 후, 기계식 교반기를 이용하여 검체를 균질화시켜 줍니다.

❑ 크림·오일제

제품 종류 ▶ 크림, 오일, 립글로스, 헤어젤, 포마드 등

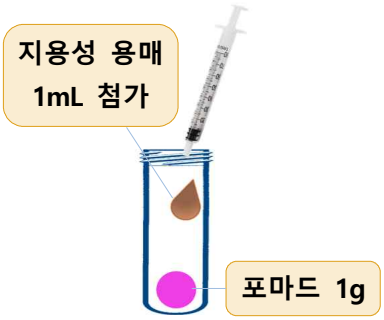
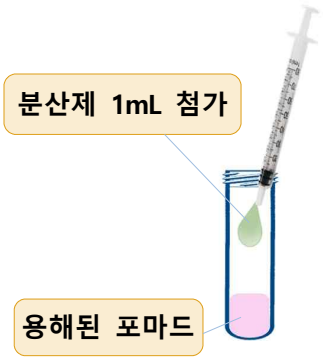
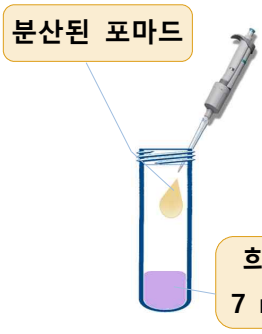
<예시 2> 크림

- 검체 1 mL(g)에 적당한 분산제 1 mL를 넣어 균질화 시키고 희석배지(변형레틴액체배지 또는 검증된 배지) 또는 희석액 8 mL를 넣어 10배 희석액을 만들어 줍니다.

STEP 1. 검체 채취	STEP 2. 분산제 첨가
	
피펫이나 주사기(점도가 높은 경우)를 이용하여 샘플을 채취하여 검액 제조용 용기에 넣어줍니다.	분산제(Tween 80 등) 1 mL를 첨가합니다.
STEP 3. 균질화	**STEP 4. 희석배지 첨가 및 균질화**
기계식 교반기 등으로 충분히 균질화 시켜줍니다.	희석배지 8 mL를 첨가한 후 기계식 교반기 등으로 충분히 균질화 시켜 줍니다.

<예시 3> 포마드

- 포마드와 같이 분산제만으로 균질화 되지 않는 오일 함량이 높은 제품은 검체 1 mL(g)에 적당량의 지용성 용매를 첨가하여 검체를 용해시킨 뒤 적당량의 분산제 및 희석배지(변형레틴액체배지 또는 검증된 배지) 또는 희석액을 넣어 10배 희석액을 만들어 줍니다.

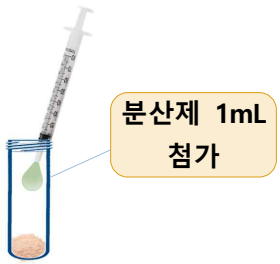
STEP 1. 지용성 용매 첨가	STEP 2. 검체 용해
 적당량의 지용성 용매(Mineral oil 등)을 첨가합니다.	 기계식 교반기 등으로 충분히 용해시켜 줍니다.
STEP 3. 분산제 첨가	**STEP 4. 희석배지 첨가 및 균질화**
 검액 내 지용성 용매에 의한 상분리 방지를 위해 적당량의 분산제(Tween 80 등)를 첨가합니다.	 희석배지 7 mL를 첨가한 후 기계식 교반기 등으로 충분히 균질화시켜 줍니다.

❑ 파우더·고형제

제품 종류 ▶ 파우더케이크, 아이섀도, 립스틱, 아이브로펜슬 등

<예시 4> 파우더

- 검체 1 mL(g)에 적당한 분선제 1 mL를 넣어 균질화 시킨 후 희석배지(변형레틴액체배지 또는 검증된 배지) 또는 희석액 8 mL를 넣어 10배 희석액을 만들어 줍니다.

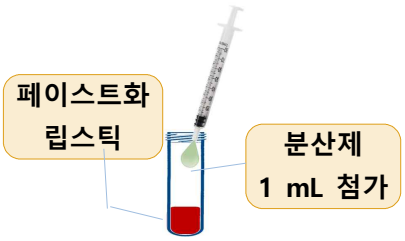
STEP 1. 검체 채취	STEP 2. 분산제 첨가
 멸균한 스페튤라 및 저울을 이용하여 정확하게 소분합니다.	 분산제(Tween 80 등) 1 mL를 첨가합니다.
STEP 3. 희석배지 첨가	**STEP 4. 균질화**
 희석배지 8 mL를 첨가합니다.	 기계식 교반기 등으로 충분히 균질화 시켜줍니다.

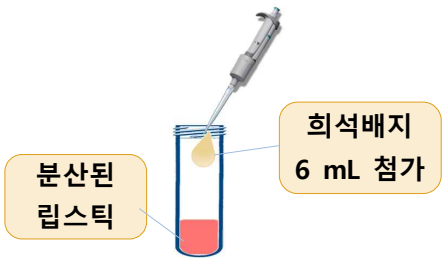
<예시 5> 립스틱

- 립스틱, 립밤 등 비수용성 고형제는 분산제만으로 균질화되지 않을 수 있습니다.
- 검체 1 g에 적당량의 **지용성 용매**를 첨가한 후 스페튤라, 조직마쇄기(tissue-grinder) 등을 이용하여 검체를 **반죽형태**로 만듭니다.
- 검체의 특성에 따라 **지용성 용매 없이 분산제만으로 반죽형태**로 만들 수 있습니다.
- 그 다음, 분산제 및 희석배지(변형레틴액체배지 또는 검증된 배지) 또는 희석액을 첨가하여 검액을 만듭니다.

<table>
<tr><th>STEP 1. 검체 채취</th><th>STEP 2. 반죽화</th></tr>
<tr><td>

멸균한 스페튤라 및 저울을 이용하여 정확하게 소분합니다.</td><td>

적당량의 지용성 용매(Mineral oil 등)을 넣고 멸균한 조직마쇄기 등으로 반죽형태로 만듭니다.</td></tr>
<tr><th>STEP 3. 분산제 첨가</th><th>STEP 4. 희석배지 첨가 및 균질화</th></tr>
<tr><td> 

검액 내 지용성 용매에 의한 상분리 방지를 위해 적당량의 분산제(Tween 80 등)을 첨가합니다.</td><td> 

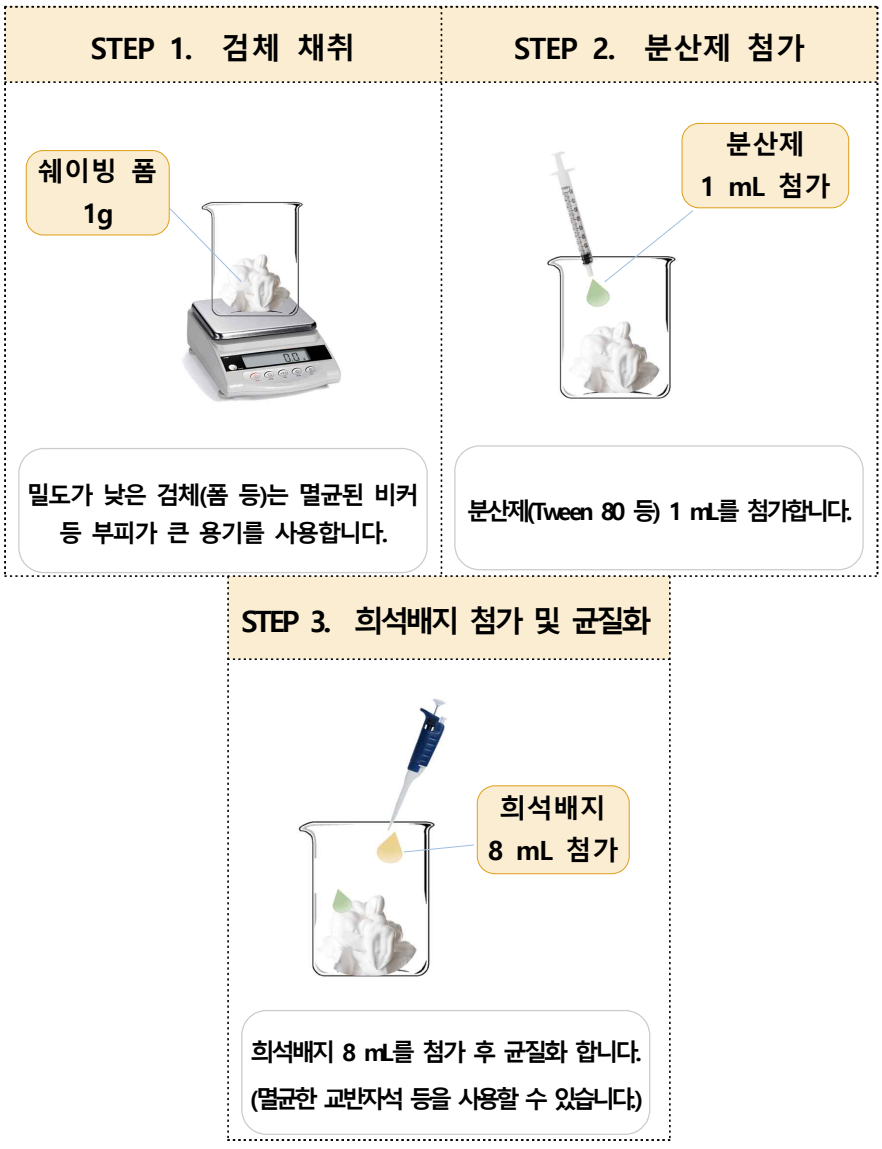
희석배지 6 mL를 첨가한 후 기계식 교반기 등으로 충분히 균질화 시켜 줍니다.</td></tr>
</table>

※ 추가적으로 검액을 만든 뒤 가온처리(약 40℃, 30분)를 하거나 교반 시 멸균한 유리구슬(5 mm: 5-7개, 3 mm: 10-15개)을 넣어 균질화 시킬 수 있습니다.

❑ 에어로졸류

<예시 6> 쉐이빙 폼

- 쉐이빙 폼과 같이 폼 형태(거품이 분사되는 형태)등 밀도가 낮은 검체의 경우 멸균된 비커와 같이 **부피가 큰 용기**를 사용할 수 있습니다.
- 멸균된 비커 안에 있는 검체 1 mL(g)에 적당한 분산제 1 mL 및 희석배지(변형레틴액체배지 또는 검증된배지) 또는 희석액 8 mL를 넣어 10배 희석액을 만들어 줍니다.



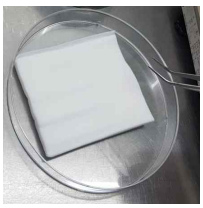
❑ 내용물을 취하기 어려운 제형

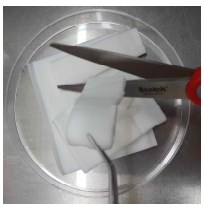
<예시 7> 침적용마스크(하이드로겔 마스크)

- 작게 자른 검체 1 g(mL)에 중화제(Dey-Engley neutralizing broth)* 또는 검증된 중화제 3 mL와 희석배지(변형레틴액체배지 또는 검증된 배지) 6 mL를 넣어 10배 희석액을 만들어 줍니다.

*검체에 함유되어 있는 항균활성 물질을 중화시키고, 검체를 균질화 시킬 수 있도록 Dey-Engley 중화배지(D/E buffer) 등을 사용한다.

STEP 1. 검체 채취



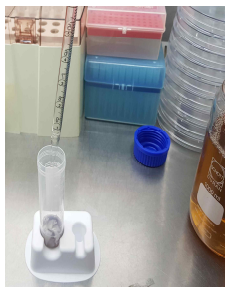


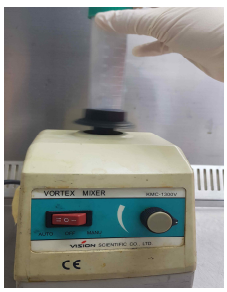
검체는 여러부위를 멸균한 가위와 핀셋을 사용하여 최대한 작게 잘라줍니다.

STEP 2. 중화제 첨가

자른 검체 1 g을 50 mL 튜브에 넣고, 3 mL 중화제를 넣어 1차 균질화 합니다.

STEP 3. 희석배지 첨가 및 균질화





희석배지 6 mL를 넣은 후 1분간 균질화 합니다.

참고하세요!

- 중화제를 희석배지보다 먼저 넣어 희석되기 전 항균활성 물질을 제어하는 역할을 할 수 있게 합니다.
- 화염 멸균한 가위와 핀셋은 반드시 충분히 식힌 후 사용해야 합니다.

비수용성 고형제의 전처리법

(예시 1)

❖ 분산제 및 희석배지 첨가 이전에 지용성 용매를 첨가한 다음 스페튤라, 조직마쇄기 등을 이용하여 검체를 반죽형태로 만드는 작업을 수행하면 충분히 균질화된 검액을 만들 수 있습니다.

▪ 립스틱

▪ 검체 1 g에 분산제 1 mL와 지용성 용매 2 ml 첨가한 모습

▪ 조직마쇄기를 이용하여 반죽형태로 만드는 모습

▪ 희석배지를 첨가하여 균질화된 검액

▪ 분산제 및 희석배지 첨가만으로 검액을 제조할 때 충분히 균질화되지 않은 검액

▪ 적당량 이상의 지용성 용매를 첨가하거나 분산제를 첨가하지 않았을 때 상분리 예시

비수용성 고형제의 전처리법

(예시 2)

❖ 지용성 용매 없이 분산제만 첨가한 다음 스페튤라 등을 이용하여 검체를 반죽 형태로 만든 후 희석배지를 첨가하여 충분히 균질화된 검액을 만들 수 있습니다.

▪ 아이라이너

▪ 검체 0.2 g에 분산제 0.2 mL를 첨가한 모습

▪ 스페튤라를 이용하여 반죽형태로 만드는 모습

▪ 희석배지를 첨가하여 균질화된 검액

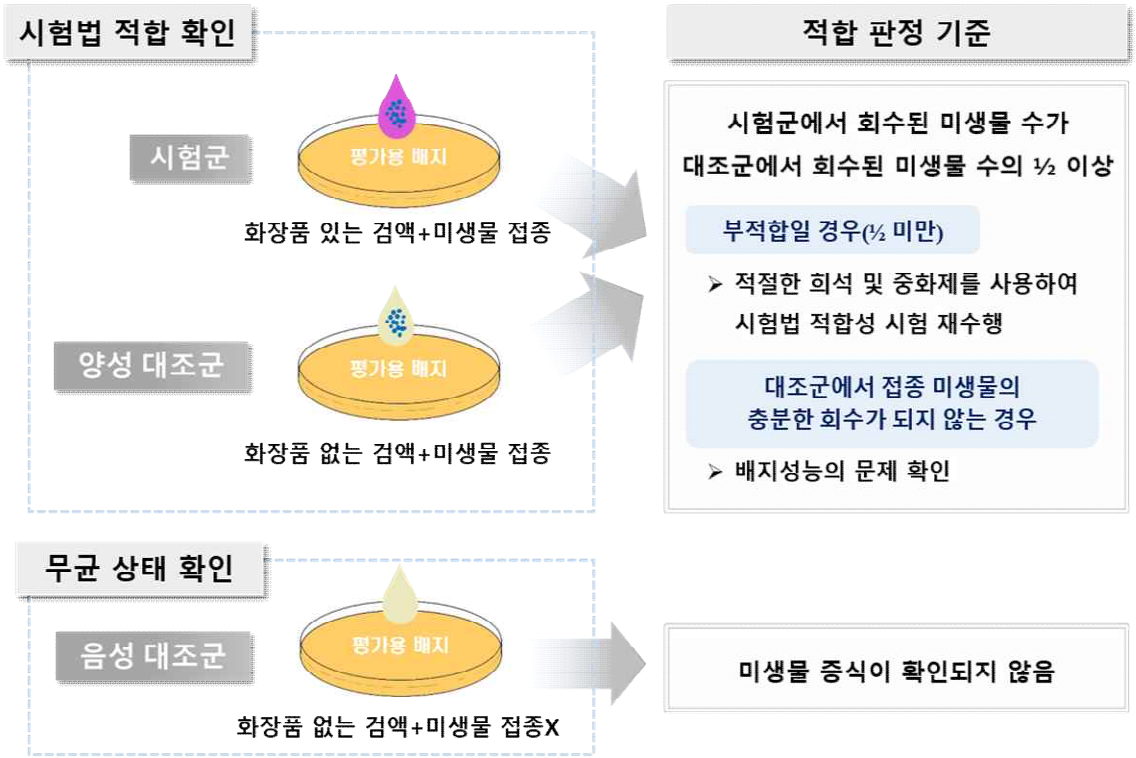
▪ 분산제 및 희석배지 첨가만으로 검액을 제조할 때 충분히 균질화되지 않은 검액

▪ 적당량 이상의 지용성 용매를 첨가하거나 분산제를 첨가하지 않았을 때 상분리

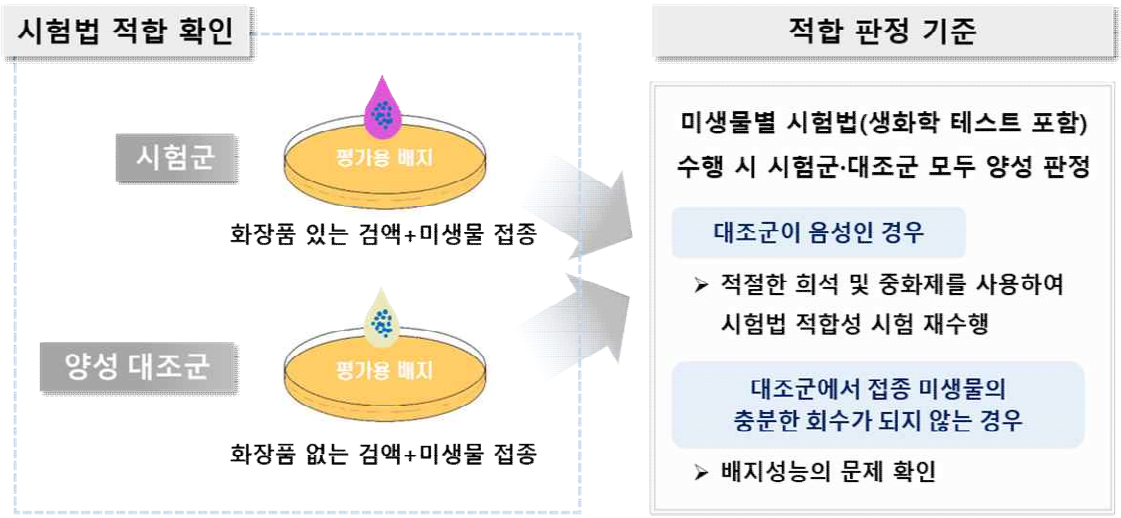
2 배지성능 및 시험법 적합성시험

배지성능 및 시험법 적합성시험은 본 시험에 들어가기 전
시험 재료 및 방법을 신뢰할 수 있는지 미리 검증하는 과정입니다

총 생균수 시험법의 적합성시험 개요도



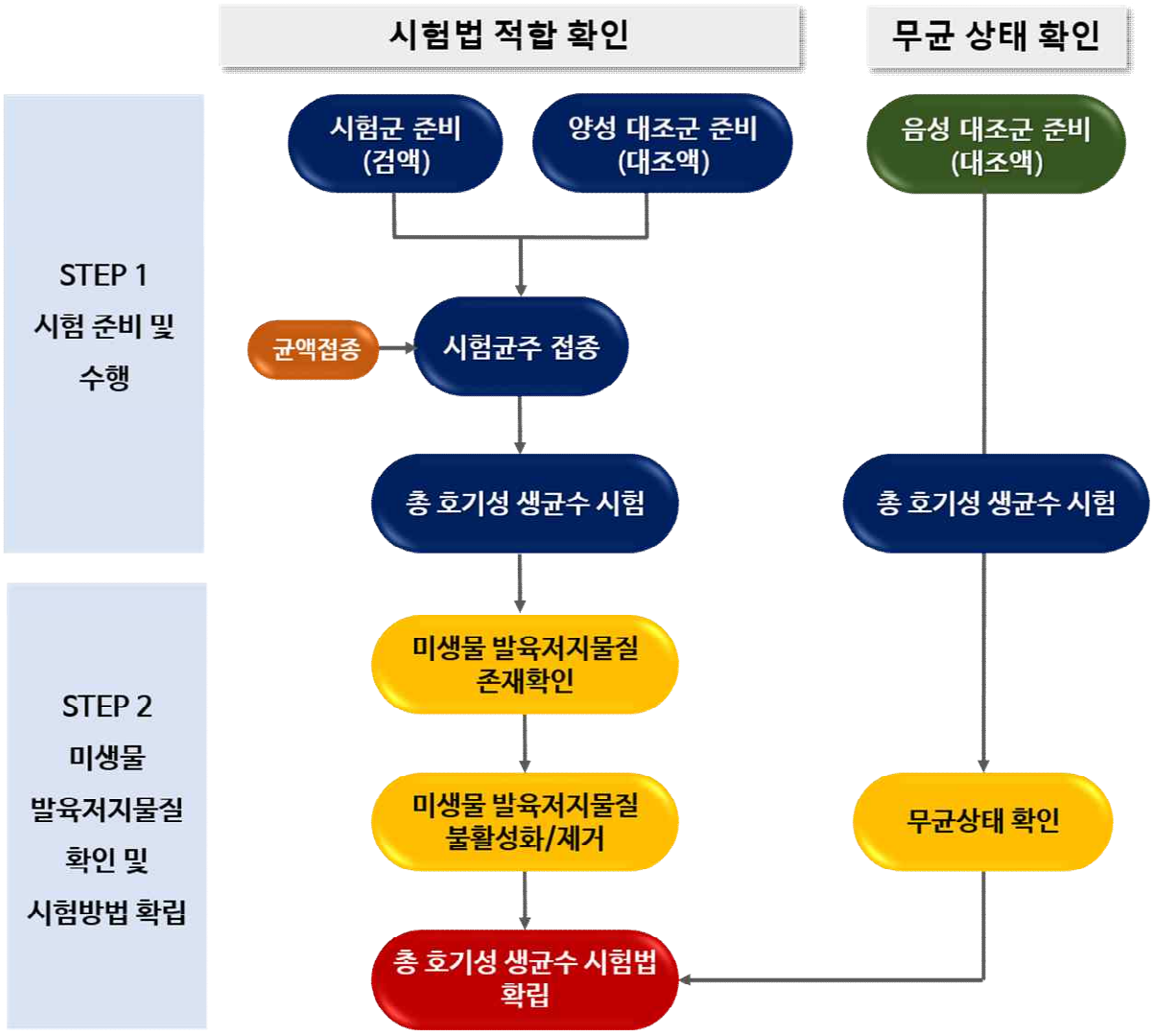
특정 미생물 시험법의 적합성시험 개요도



2-1. 총 호기성 생균수 시험법의 적합성 시험

- 검체 내 항균활성물질이 전처리 과정에서 충분히 제어되지 않는 경우나 시험재료가 오염되어 있는 경우 정확한 미생물 수를 측정하기 어렵습니다.
- 이에 화장품 성분에 의한 접종균 사멸여부를 확인하는 시험법 적합성과 희석액과 배지의 오염여부를 확인하는 배지 성능 시험을 수행해야 합니다.

총 호기성 생균수 시험의 적합성 시험 개요도



STEP 1. 시험 준비 및 수행

[STEP 1.1] 균액 제조

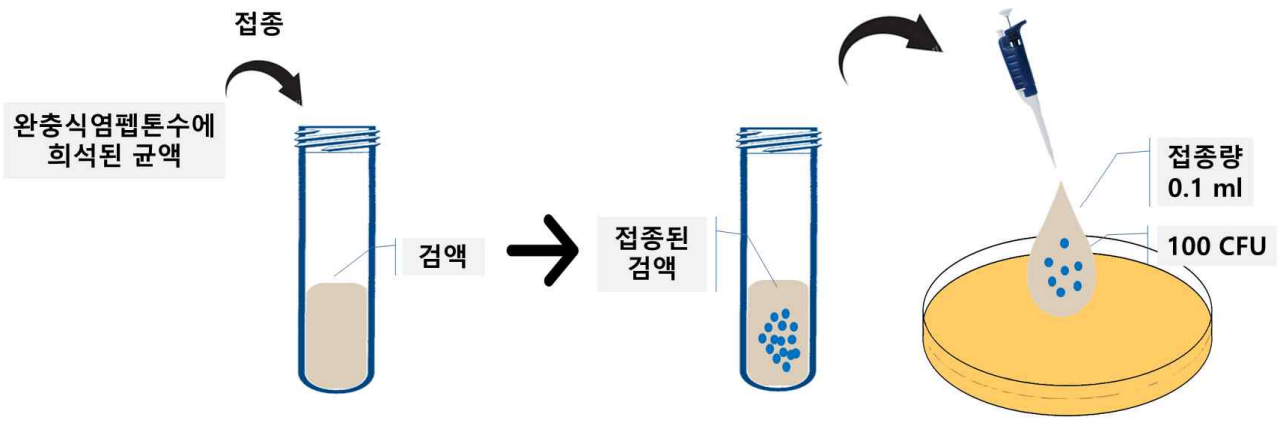
- 아래 표에 제시된 세균 및 진균을 대상으로 시험을 수행합니다.

  ☑ 세균은 대두카제인소화액체배지 또는 대두카제인소화한천배지를 사용하여 30-35 °C, 18-24시간 배양하는 것을 권장합니다.

  ☑ 진균은 사부로포도당액체배지 또는 사부로포도당한천배지를 사용하여 20-25 °C, 48시간 이상 배양하는 것을 권장합니다.

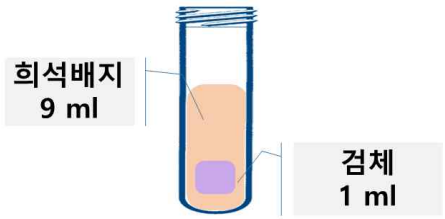
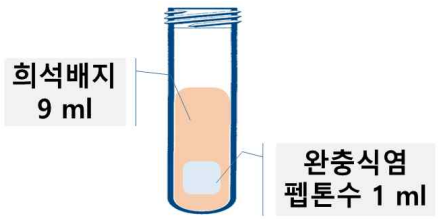
대상별 시험균주		
세균	*Escherichia coli*	ATCC 8739, NCIMB 8545, CIP53.126, NBRC 3972 또는 KCTC 2571
	Bacillus subtilis	ATCC 6633, NCIMB 8054, CIP 52.62, NBRC 3134 또는 KCTC 1021
	Staphylococcus aureus	ATCC 6538, NCIMB 9518, CIP 4.83, NRRC 13276 또는 KCTC 3881
진균	*Candida albicans*	ATCC 10231, NCPF 3179, IP48.72, NBRC 1594 또는 KCTC 7965

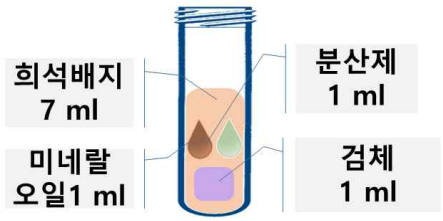
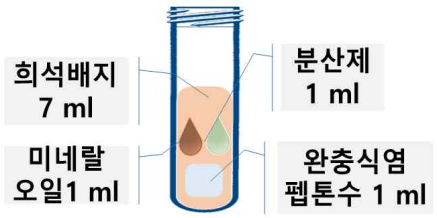
- 배양된 균을 완충식염펩톤수(pH 7.0)로 희석하며, 최종적으로 배지에 접종되는 균수가 0.1 mL당 약 100 CFU가 되도록 균액을 제조합니다.

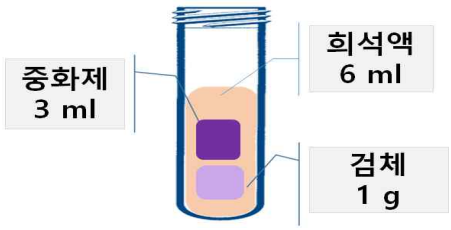
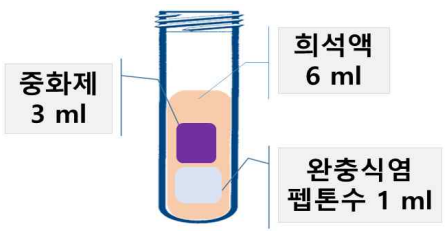


[STEP 1.2] 검액(시험군), 대조액(양성 대조군) 준비

- 제시된 전처리법(본 가이드라인 5-14페이지)에 따라 검액(시험군)을 제조합니다.
- 대조액(양성 대조군)은 검체 대신 완충식염펩톤수(pH 7.0)를 사용하여 검액 준비 방법에 따라 제조하여 대조액으로 사용합니다.

예시 1	액제·로션제의 경우
검액	대조액
	

예시 2	비수용성 고형제(립스틱 등)의 경우
검액	대조액
	

예시 3	내용물을 취할 수 없는 제품의 경우
검액	대조액
	

[STEP 1.3] 균액 접종

- 제조된 검액과 대조액에 균액 0.1 mL를 각각 접종합니다.

검체 내 항균활성물질 불활성화/제거하기 위한 권고사항!
검체 내 항균활성물질의 충분한 중화를 위하여 검액 및 대조액 제조 후 일정시간(약 20분) 대기한 다음 균액을 접종할 수 있습니다.

[STEP 1.4] 총 호기성 생균수 시험 수행

- 한천평판도말법에 따라, 검액·대조액·음성 대조액은 최소 2개의 평판배지에 0.1 mL를 도말합니다.
- 또는 한천평판희석법에 따라, 검액 · 대조액 · 음성 대조액 1 mL를 최소 2개의 페트리접시에 넣고 그 위에 멸균 후 45 ℃로 식힌 시험용 배지 15 mL를 넣어 잘 혼합합니다.
- 배지는 세균의 경우 30-35 ℃에서 적어도 48시간, 진균의 경우 20-25 ℃에서 적어도 5일간 배양합니다.

STEP 2. 미생물발육저지물질 확인 및 시험법 확립

- 검액(시험군)에서 회수한 균수가 대조액(양성 대조군)에서 회수한 균수의 50 % 이상일 경우, 총 호기성 생균수 시험법이 적합하다고 판정합니다.

시험법 적합/부적합 판정 예시

시험법 적합 예시	
검액에서 회수한 균수	대조액에서 회수한 균수
75 CFU	90 CFU
회수율: (75 ÷90) x 100 = 83%	

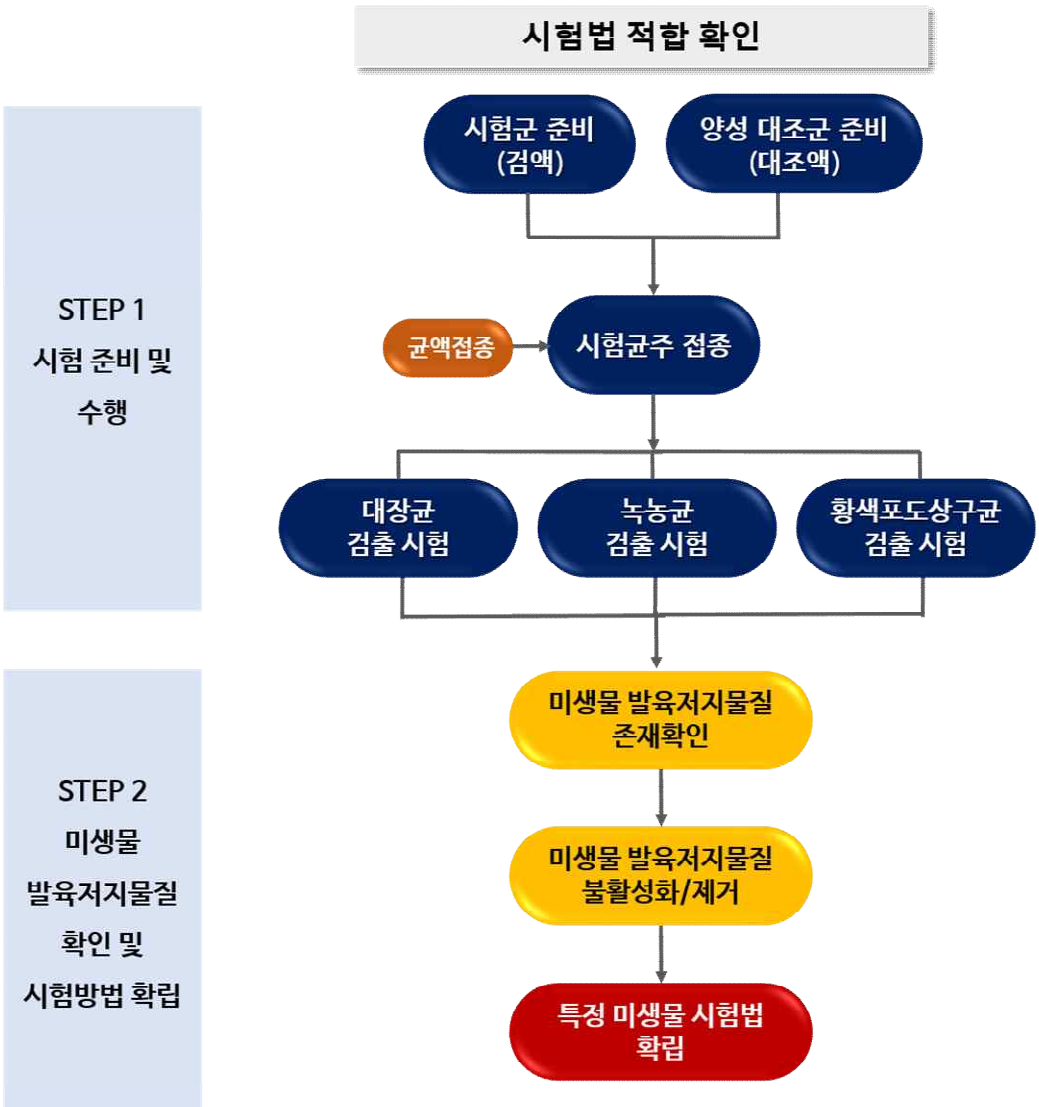
시험법 부적합 예시	
검액에서 회수한 균수	대조액에서 회수한 균수
21 CFU	90 CFU
회수율: (21 ÷90) x 100 = 23%	

- 시험법이 적합하지 않은 경우(검액에서 회수한 균수가 대조액에서 회수한 균수의 50 % 미만), 미생물발육저지물질이 존재하는 것으로 판단되므로 총 호기성 생균수 시험법을 변경해야 합니다.
- 항균활성의 중화를 위하여 희석제 및 중화제(화장품 안전기준 등에 관한 규정, 유통화장품 안전기준 시험방법, 미생물한도, 표 2)를 사용할 수 있습니다.

2-2. 특정미생물 시험법의 적합성 시험

- 검체 내 항균활성물질이 전처리 과정에서 충분히 중화되지 않는 경우 대상 미생물의 검출이 어려울 수 있습니다.
- 따라서 인위적으로 대상 미생물을 접종하여 검액을 제조한 뒤 배양 단계부터 최종 판정 단계까지 단계별로 규정된 감별 특성을 나타내는지 평가해야 합니다.

특정 미생물 시험의 적합성 시험 개요도



STEP 1. 시험 준비 및 수행

[STEP 1.1] 균액 제조

- 아래 표에 제시된 세균을 대상으로 시험을 수행합니다.

  ☑ 대두카제인소화액체배지 또는 대두카제인소화한천배지를 사용하여 30-35 ℃, 18-24시간 배양하는 것을 권장합니다.

대상 별 시험균주		
특정 미생물	*Escherichia coli*	ATCC 8739, NCIMB 8545, CIP53.126, NBRC 3972 또는 KCTC 2571
	Pseudomonas aeruginosa	ATCC 9027, NCIIMB 8626, CIP 13275 또는 KCTC 2513
	Staphylococcus aureus	ATCC 6538, NCIMB 9518, CIP 4.83, NRRC 13276 또는 KCTC 3881

- 배양된 균을 완충식염펩톤수(pH 7.0)로 희석하여 검액 0.1 mL 약 100 CFU를 개별적으로 접종할 수 있도록 균액을 제조합니다.

[STEP 1.2] 검액, 대조액 준비

- 제시된 전처리법(본 가이드라인 5-14페이지)에 따라 각 특정미생물 검출 시험법에 제시된 액체배지를 희석배지로 이용하여 검액을 제조합니다.
- 검액 제조법에 따라, 검체 대신 완충식염펩톤수(pH 7.0)를 첨가하여 대조액을 제조합니다.

[STEP 1.3] 균액 접종

- 제조된 검액/대조액에 균액 0.1 mL를 접종합니다.

검체 내 항균활성물질 불활성화/제거하기 위한 권고사항!

검체 내 항균활성물질의 충분한 중화를 위하여 검액 및 대조액 제조 후 일정시간(약 20분) 대기한 다음 균액을 접종할 수 있습니다.

[STEP 1.4] 특정미생물 시험 수행, 배양

- 각 특정미생물별 조건(본 가이드라인 27-34페이지)에 맞게 시험을 수행합니다.

STEP 2. 미생물발육저지물질 확인 및 시험법 확립

- 각 특정미생물 시험법의 단계별 양성반응을 확인하여 미생물 발육저지물질 존재유무를 확인합니다.
- 시험법이 적합하지 않은 경우(음성반응이 나올 경우), 미생물발육저지물질이 존재하는 것으로 판단되므로 특정미생물 시험법을 변경해야 합니다.
- 항균활성을 중화하기 위하여 희석제 및 중화제(화장품 안전기준 등에 관한 규정, 유통화장품 안전기준 시험방법, 미생물한도, 표 2)를 사용할 수 있습니다.

3 본 시험(미생물한도 시험)

시험법 적합성 시험을 통해 적합성이 검증된 방법을 사용합니다.

3-1. 총 호기성 생균수 한도 시험

STEP 1. 검액 제조

- 제시된 전처리법(본 가이드라인 5-14페이지)에 따라 검액을 제조합니다.

STEP 2. 배지 도말 및 배양

세균수 시험

- 한천평판도말법에 따라, 검액은 최소 2개의 총 호기성 세균용 배양 평판배지에 0.1 mL를 도말합니다. 검출 한계를 낮추기 위하여 3개의 평판배지에 1 mL를 나누어 분주한 뒤 도말할 수 있습니다.
- 또는 한천평판희석법을 수행할 수 있습니다(본 가이드라인 19페이지).
- 배지는 30-35 °C에서 적어도 48시간 배양합니다.

진균수 시험

- 상기 세균수 시험법과 같이 한천평판도말법 또는 한천평판희석법을 수행합니다.
- 배지는 20-25 °C에서 적어도 5일간 배양합니다.

STEP 3. 계수

- 희석수가 다양할 경우 최대 균집락수를 갖는 평판을 사용합니다.
- 평판당 300개 이하의 CFU를 최대치로 하여 총 세균수를 측정합니다.
- 평판당 100개 이하의 CFU를 최대치로 하여 총 진균수를 측정합니다.

총 호기성 생균수 계수 방법 및 예시(평판도말법)

(검체에 존재하는 세균 및 진균 수, CFU/g 또는 mL)

검액 0.1 mL를 각 배지에 접종한 경우

n: 배지(평판)의 개수, 각 배지에 접종한 부피 (mL)

$$\{(X1+X2+\ldots+Xn) \div n\} \times d \div 0.1$$

X: 각 배지(평판)에서 검출된 집락 수

d: 검액의 희석배수

검액 1 mL를 3개 배지에 나누어 접종한 경우

n: 1 ml 접종의 반복수

$$\{(S1+S2+\ldots+Sn) \div n\} \times d$$

S: 3개의 배지(평판)에서 검출된 집락 수의 합

d: 검액의 희석배수

[예시 1] 10배 희석 검액

	검출된 집락수	
	평판 1	평판 2
세균용 배지	66	58
진균용 배지	28	24
세균수 (CFU/g (mL)	{(66+58) ÷ 2}x10÷0.1=6200	
진균수 (CFU/g (mL))	{(28+24) ÷ 2}x10÷0.1=2600	
총 호기성 생균수 (CFU/g (mL))	6200+2600=8800	

[예시 2] 100배 희석 검액

	검출된 집락수	
	반복수 1	반복수 2
세균용 배지	5+3+4=12	5+4+7=16
진균용 배지	4+2+2=8	2+5+3=10
세균수 (CFU/g (mL)	{(12+16) ÷ 2}x100=1400	
진균수 (CFU/g (mL)	{(8+10) ÷ 2}x100=900	
총 호기성 생균수 (CFU/g (mL)	1400+900=2300	

총 호기성 생균수 계수 방법 및 예시(평판희석법)

(검체에 존재하는 세균 및 진균 수, CFU/g 또는 mL)

검액 0.1 mL를 각 배지에 접종한 경우

$$\{(X1+X2+\ldots+Xn) \div n\} \times d \div 0.1$$

- n: 배지(평판)의 개수
- X: 각 배지(평판)에서 검출된 집락 수
- d: 검액의 희석배수

[예시 1] 10배 희석 검액 1 mL씩 2반복

	각 배지에서 검출된 집락수	
	평판 1	평판 2
세균용 배지	66	58
진균용 배지	28	24
세균수 (CFU/g (mL))	{(66+58) ÷ 2}x10=620	
진균수 (CFU/g (mL))	{(28+24) ÷ 2}x10=260	
총 호기성 생균수 (CFU/g (mL))	620+260=880	

[예시 2] 100배 희석 검액 1 mL씩 2반복

	각 배지에서 검출된 집락수	
	평판 1	평판 2
세균용 배지	8	11
진균용 배지	5	7
세균수 (CFU/g (mL))	{(8+11) ÷ 2}x10=950	
진균수 (CFU/g (mL))	{(5+7) ÷ 2}x10=600	
총 호기성 생균수 (CFU/g (mL))	950+600=1550	

3-2. 특정미생물 시험

특정미생물 시험법은 제시된 선별 단계에 따라 수행하며,
양성 반응이 확인되면 다음 단계 시험을 진행합니다.

❑ 대장균(*Escherichia coli*)

STEP 1. 검액 제조 및 증균배양

[STEP 1.1] 검액 제조

- 제시된 전처리법(본 가이드라인 5-14페이지)에 따라 유당액체배지를 희석배지로 사용하여 검액을 제조합니다.

[STEP 1.2] 증균배양

- 전처리된 검액은 30-35 ℃에서 24-72시간 배양합니다.

STEP 2. 선별 배양 (1)

[STEP 2.1] 획선도말 및 배양

- 배양한 검액을 가볍게 흔든 후, 백금이 등으로 취하여 맥콘키한천배지에 도말하고 30-35 ℃에서 18-24시간 배양합니다.

[STEP 2.2] 성상확인

- 주위에 적색의 침강선 띠를 갖는 적갈색의 집락이 검출되는 경우 다음 단계를 수행합니다(검출되지 않은 경우 대장균 음성 판정).

STEP 3. 선별 배양 (2)

[STEP 3.1] 획선도말 및 배양

- 에오신메칠렌블루한천배지에서 STEP 2.2에 검출된 집락을 각각 도말하고 30-35 ℃에서 18-24시간 배양합니다.

[STEP 3.2] 성상확인

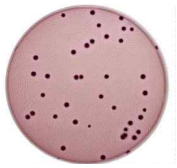
- 금속광택을 나타내는 집락 또는 투과광선 하에서 흑청색을 나타내는 집락이 검출되는 경우 다음 단계를 수행합니다.

STEP 4. 가스 발생 확인

[STEP 4.1] 가스발생 확인 및 대장균 양성 판정

- STEP 3.2에서 확인된 집락을 백금이 등으로 취하여 발효시험관이 든 유당액체배지에 넣어 44.3-44.7 ℃의 항온수조 중에서 22-26시간 배양합니다.
- 가스가 발생한 경우에는 대장균 양성으로 의심하고 동정시험으로 확인합니다.

Escherichia coli 특정미생물 시험의 개요

STEP 1. **검액 증균 배양**		30-35 ℃, 24-72시간 배양 ▶ STEP 2
STEP 2. **맥콘키한천배지** **선별 배양**		적색의 침강선 띠를 갖는 적갈색의 집락이 확인되는 경우 ▶ STEP 3
STEP 3. **에오신메칠렌블루** **한천배지 선별 배양**		금속광택을 나타내는 집락 또는 투과광선 하에서 흑청색을 나타내는 집락이 확인되는 경우 ▶ STEP 4
STEP 4. **가스발생 확인 및 양성** **판정**		가스가 발생한 경우 ▶ 대장균 양성 의심, 동정시험 수행

❑ 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)

STEP 1. 검액 제조 및 증균배양

[STEP 1.1] 검액 제조

- 제시된 전처리법(본 가이드라인 5-14페이지)에 따라 카제인대두소화 액체배지를 희석배지로 사용하여 검액을 제조합니다.

[STEP 1.2] 증균배양

- 전처리된 검액은 30-35 ℃에서 24-48시간 배양합니다.

STEP 2. 선별 배양 (1)

[STEP 2.1] 획선도말 및 배양

- 배양한 검액을 가볍게 흔든 후, 백금이 등으로 세트리미드한천배지 또는 엔에이씨한천배지에 도말하고 30-35 ℃에서 24-48시간 증균 배양한다.

[STEP 2.2] 성상확인

- 녹색 형광물질을 나타내는 집락이 검출되는 경우 다음 단계를 수행합니다(검출되지 않은 경우 녹농균 음성 판정).

STEP 3. 선별 배양 (2)

[STEP 3.1] 획선도말 및 배양

- STEP 2의 선별 과정에서 의심 집락이 확인된 경우, STEP 1.2의 증균배양액을 녹농균 한천배지 P 및 F에 도말하여 30-35 ℃에서 24-72시간 배양합니다.

[STEP 3.2] 성상확인

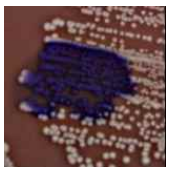
- 플루오레세인 검출용 녹농균 한천배지 F의 집락이 자외선 하에서 관찰하여 황색으로 나타나고, 피오시아닌 검출용 녹농균 한천배지 P의 집락이 청색으로 나타나면 녹농균 양성으로 판정합니다.

STEP 4. 옥시다제 시험

[STEP 4.1] 옥시다제 시험 실시 및 양성판정

- STEP 3.2에서 판정된 녹농균 의심집락은 옥시다제 시험을 실시합니다.
- 5-10초 내 보라색이 나타날 경우 녹농균 양성으로 의심하고 동정시험으로 확인합니다.
  (10초 후에도 색의 변화가 없는 경우 녹농균 음성)

Pseudomonas aeruginosa 특정미생물 시험의 개요

STEP 1. **검액 증균 배양**		30-35 ℃, 24-48시간 배양 ▶ STEP 2
STEP 2. **세트리미드** **한천배지 또는** **엔에이씨한천배지 배양**	세트리미드 한천배지 엔에이씨한천배지 	녹색 형광물질의 집락이 확인되는 경우 ▶ STEP 3
STEP 3 **녹농균 한천배지 P, F** **배양 및** **자외선 하 관찰**		플루오레세인 검출용 녹농균 한천배지 F의 집락이 자외선 하에서 황색으로 확인되고, 피오시아닌 검출용 녹농균 한천배지 P의 집락이 청색으로 확인되는 경우 ▶ STEP 4
STEP 4. **옥시다제 시험 및 양성** **판정**	(양성반응 예시1)  (양성반응 예시2) 	5-10초 이내에 보라색이 나타날 경우 ▶ 녹농균 양성 의심, 동정시험 수행

❑ 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)

STEP 1. 검액 제조 및 증균배양

[STEP 1.1] 검액 제조

- 제시된 전처리법(본 가이드라인 5-14페이지)에 따라 카제인대두소화 액체배지를 희석 배지로 사용하여 검액을 제조합니다.

[STEP 1.2] 증균배양

- 전처리된 검액은 30-35 °C에서 24-48시간 배양합니다.

STEP 2. 선별 배양 (1)

[STEP 2.1] 획선도말 및 배양

- 배양한 검액을 가볍게 흔든 후, 백금이 등으로 취하여 보겔존슨한천배지 또는 베어드파카한천배지에 도말하고 30-35 °C에서 24시간 배양합니다.

[STEP 2.2] 성상확인 및 그람염색

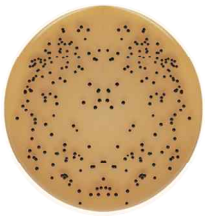
- 집락이 검정색이고 집락주위에 황색투명대가 형성되어 그람염색법에 따라 염색하여 검경한 결과 그람양성균이 확인되면 다음 단계(STEP 3)를 수행합니다.

STEP 3. 응고효소시험

[STEP 3.1] 응고효소시험 실시 및 양성판정

- STEP 2.2의 의심집락에 대하여 응고효소시험 실시 결과 양성인 경우 황색포도상구균으로 의심하고 동정시험으로 확인합니다.

Staphylococcus aureus 특정미생물 시험의 개요

STEP 1. **검액 증균 배양**		30-35 ℃, 24-48시간 배양 ▶ STEP 2
STEP 2. **보겔존슨한천배지 또는 베어드파카 한천배지 배양 및 그람염색**		황색투명대를 가진 검정색의 집락이 검출되고 그람양성균이 확인되는 경우 ▶ STEP 3
STEP 3. **응고효소시험 및 양성 판정**	양성반응 음성반응 	응고효소시험 양성인 경우 ▶ 황색포도상구균 의심, 동정시험 수행

화장품 미생물한도 시험법 가이드라인(민원인안내서)

발 행 일 2021년 10월
발 행 인 서 경 원
편 집 위 원 장 손 수 정
편 집 위 원 의료제품연구부 화장품연구과
윤혜성, 이정표, 민충식, 최지영, 김효진, 김상섭, 지정은, 고미선, 심지은

발 행 처 식품의약품안전평가원 의료제품연구부 화장품연구과

공익신고자 보호제도란?

-공익신고자등(친족 또는 동거인 포함)이 공익신고등으로 인하여 피해를 받지 않도록 **비밀보장**, **불이익보호조치**, **신변보호조치** 등을 통하여 보호하는 제도

♣보호조치 요구 방법

전화 02-360-3761 /우편 (120-705) 서울시 서대문구 통일로 81 국민권익위원회 공익보호지원과/팩스 02-360-3567