**화장품 방부 효과 시험 가이드라인**

**위생복지부 식품약물관리서**

**2021년 5월**

**목차**

페이지

[1 머리말 1](#_Toc146476419)

[2 목적 1](#_Toc146476420)

[3 적용범위 1](#_Toc146476421)

[4 검사 기구 및 시약 1](#_Toc146476422)

[4.1 작업환경: 1](#_Toc146476423)

[4.2 기구 및 재료: 1](#_Toc146476424)

[4.3 70% 에탄올 용액: 2](#_Toc146476425)

[4.4 세균 및 칸디다 알비칸스 희석액(생리식염수): 2](#_Toc146476426)

[4.5 흑국균 희석액(Polysorbate 80 용액): 2](#_Toc146476427)

[4.6 배지: 2](#_Toc146476428)

[4.7 시험 미생물 균주: 4](#_Toc146476429)

[5 검사방법: 4](#_Toc146476430)

[5.1 세균 접종 균액 제조: 4](#_Toc146476431)

[5.2 칸디다 알비칸스 접종 균액 제조: 5](#_Toc146476432)

[5.3 흑국균 접종 균액 제조: 5](#_Toc146476433)

[5.4 중화제 효과의 검증: 6](#_Toc146476434)

[5.5 시험 검체 준비: 6](#_Toc146476435)

[5.6 검체 균락수 검사: 7](#_Toc146476436)

[5.7 대수 감소값 계산방법: 8](#_Toc146476437)

[5.8 화장품 방부 효과 시험 평가표준: 8](#_Toc146476438)

[6 참고자료 9](#_Toc146476439)

# 머리말

본 가이드는 화장품 방부 시스템 보호 제품의 전체적인 평가에 사용한다. 제품이 미생물 오염을 피하는 보호원은 화학 방부제, 배합 자체 고유의 특성, 포장 설계 및 제조과정 등으로부터 비롯된다. 해당 가이드는 화장품 전체 방부 효과 시험 평가 시에 취해야 하는 일련의 절차 및 평가 표준을 설명한다.

# 목적

화장품 방부 시스템 보호 제품의 전체적인 평가에 사용한다.

# 적용범위

본 방법은 화장품 적용액, 로션, 크림 등 일반적인 화장품 방부제 효과의 검사에 적용하고, 제품에 다수 종류, 일정 수량의 미생물을 접종하며, 샘플의 미생물 수량을 정기적으로 검사하고, 수량 변화에 따라 그 방부 효과를 검사한다.

# 검사 기구 및 시약

* 1. 작업환경:

작업대는 넓고 깨끗하며 빛이 양호하고, 작업대의 광도는 100피트 촉광 이상이고, 밀폐된 실내에서 환기가 양호하며, 최대한 먼지 및 흐르는 공기가 없도록 한다. 15분마다 균락수는 15CFU/배양 접시를 초과해선 안 된다.

* 1. 기구 및 재료:
     1. 생물 안전 캐비닛(Biological safety cabinet, BSC): 2등급(class II)(포함) 이상
     2. 고압 멸균로: 121℃ 이상 도달 가능
     3. 인큐베이터: 내부 온도의 온도차를 ±1.0°C 이내로 유지 가능
     4. 저울: 2000g까지 무게를 잴 수 있을 경우, 감도는 0.1g이다. 120g까지 무게를 잴 수 있을 경우, 감도는 5mg이다.
     5. 볼텍스 믹서(Vortex mixer)
     6. pH 미터(pH meter)
     7. 균락수 측정기: 균락 계산에 적용
     8. 피펫 에이드(Pipette aid)
     9. 피펫(Pipette): 멸균 완료, 1mL 피펫은 0.01mL 눈금이어야 한다. 5mL 및 10mL 피펫은 0.1mL 눈금이어야 한다.
     10. 유리구슬: 직경 약 5~7mm, 멸균 완료
     11. 배양 접시(petri dish): 멸균 완료, 내경 약 90mm, 깊이 약 15mm, 샬레 내외면은 평탄하고 기포, 스크래치 또는 기타 결함이 없어야 한다.
     12. 희석용 용기: 무균 파우치 또는 100mL, 50mL 또는 10mL 커버(마개) 표기를 한 멸균 가능한 입구가 넓은 병 또는 시험관
     13. 굽은 도포 유리막대, 거즈패드, 약 국자, 주걱, 가위 및 핀셋: 멸균 또는 폐기 가능
     14. 원심분리기: 2000g의 원심분리력을 견딜 수 있다.
     15. 시약: 염화나트륨, 95% 에탄올 및 폴리소르비톨 80 (Polysorbate 80, Tween 80), 염산(HCl, 조정 pH값), 수산화나트륨(NaOH, 조정 pH값) 은 모두 시약금을 채택한다. Letheen 배양액(Letheen broth), Letheen 한천(Letheen agar), 트립티케이스 펩톤(trypticase peptone), 치오톤 펩톤(thiotone peptone), 효모 추출물(yeast extract) 및 한천(agar)은 모두 미생물 등급을 채택한다.
  2. 70% 에탄올 용액:

95% 에탄올 560mL을 취하고, 증류수 200mL에 녹이고, 균일하게 혼합한다.

* 1. 세균 및 칸디다 알비칸스 희석액(생리식염수):

염화나트륨(Sodium chloride, NaCl) 8.5g을 취해 증류수 1000mL에 녹이고, 균일하게 혼합하며, 적당한 용기에 나눠 담고, 121°C에서 15분간 멸균한다.

* 1. 흑국균 희석액(Polysorbate 80 용액):

Tween 80 (Polysorbate 80) 0.5g을 취해 생리식염수(4.4 참고) 1L에 넣고, 가열, 교반해서 완전히 녹을 때까지 균일하게 혼합하며, 적당한 용기에 나눠 담고, 121°C에서 15분간 멸균한다.

* 1. 배지:
     1. 변형 Letheen 배양액(Modified Letheen broth,mLB):

Letheen 배양액(Letheen broth) 25.7g

트립티케이스 펩톤(trypticase peptone) 5g

치오톤 펩톤(thiotone peptone) 10g

효모 추출물(yeast extract) 2g

아황산수소나트륨(NaHSO3) 0.1g

증류수 1000mL

교반해서 녹인 후에 적당한 용기에 나눠 담고, 121°C에서 15분간 멸균하고, 최종 pH값은 7.2±0.2이다.

* + 1. 변형 Letheen 배지(Modified Letheen agar,mLA):

Letheen 한천(Letheen agar) 32g

트립티케이스 펩톤(trypticase peptone) 5g

치오톤 펩톤(thiotone peptone) 10g

효모 추출물(yeast extract) 2g

염화나트륨 5g

아황산수소나트륨(NaHSO3) 0.1g

한천(agar) 5g

증류수 1000mL

교반해서 녹인 후에 적당한 용기에 나눠 담고, 121°C에서 15분간 멸균하고, 최종 pH값은 7.2±0.2이다.

* + 1. 대두카제인소화한천배지(Tryptic soy agar, TSA):

췌장소화카제인 (pancreatic digest of casein) 15g

대두파파야단백질효소소화물(papaic digest of soybean meal) 5g

염화나트륨 5 g

한천(agar) 15g

증류수 1000mL

교반해서 녹인 후에 적당한 용기에 나눠 담고, 121°C에서 15분간 멸균하고, 최종 pH값은 7.3±0.2이다.

* + 1. 사부로드포도당한천배지(Sabouraud Dextrose Agar, SDA) :

포도당 (Dextrose) 40g

췌장소화카제인 (pancreatic digest of casein) 5g

동물조직펩신소화 (peptic digest of animal tissue) 5g

한천(agar) 15g

증류수 1000mL

교반해서 녹인 후에 적당한 용기에 나눠 담고, 121°C에서 15분간 멸균하고, 최종 pH값은 5.6±0.2이다.

* + 1. 감자포도당한천배지(Potato Dextrose Agar, PDA) :

감자 추출물 (potato infusion) 200g

포도당 (Dextrose) 20g

한천(agar) 20g

증류수 1000mL

교반해서 녹인 후에 적당한 용기에 나눠 담고, 121°C에서 15분간 멸균하고, 최종 pH값은 5.6±0.2이다.

* 1. 시험 미생물 균주:

연속 세대수는 모두 5대를 넘지 않고, 상황을 보고 다른 균주를 시험 균주로 추가할 수 있다.

* + 1. 대장균(Escherichia coli) ATCC8739
    2. 녹농균(Pseudomonas aeruginosa) ATCC9027
    3. 황색포도상구균(Staphylococcus aureus) ATCC6538
    4. 칸디다 알비칸스(Candida albicans) ATCC10231
    5. 흑국균(Aspergillus brasiliensis) ATCC16404

# 검사방법:

* 1. 세균 접종 균액 제조:
     1. 세균을 각각 대두카제인소화한천배지(TSA)에 접종하고, 32.5±2.5℃ 인큐베이터에서 18~24시간 배양한다.
     2. 생리식염수(4.4 참고) 10mL을 취해 균이 가득 자란 대두카제인소화한천배지에 추가하고, 균락을 반복해서 세척한다.
     3. 각각 피펫(Pipette)으로 각 균종 현탁액을 해당 무균 시험관에 옮기고, 볼텍스 믹서 (Vortex mixer)로 3분이 넘지 않게 진동, 혼합한다.
     4. 각 균종 현탁액을 생리식염수로 접종 필요 농도 1x107~1x108 CFU/mL까지 희석한다.
     5. 균액을 제조한 후에 실온에 놓을 경우 2시간 내에 사용해야 한다.
     6. 샘플 검사 진행을 시작함과 동시에 상기 균액 1mL을 취해 생리식염수 9mL 시험관에 넣고 충분히 혼합해서 1:10 희석액을 만든다. 이런 방식으로 1:100, 1:1,000 등 적절한 희석 배수를 제조한다. 2~3개의 적절한 희석 배수의 희석액(일반적으로 희석 배수 1:100,000, 1:1,000,000 및 1:10,000,000의 희석액을 취함) 각 1mL을 취해 배양 접시에 넣고, 각 배수 희석액마다 각각 이중 재시험을 진행한다.
     7. 약 45℃~50℃까지 냉각한 대두카제인소화한천배지를 상기 배양 접시에 기울여서 쏟고, 각 샬레당 약 15~20mL이며, 이후 배양 접시를 회전시켜서 샘플과 배지를 충분히 균일하게 혼합한다. 한천이 응고되면 32.5±2.5℃ 인큐베이터에 도치시키고, 24~48시간 배양한 후에 균락 계수를 진행하고, 이 계수에서 얻은 값은 N이다.
  2. 칸디다 알비칸스 접종 균액 제조:
     1. 칸디다 알비칸스를 사부로드포도당한천배지(SDA)에 접종하고, 32.5±2.5℃ 인큐베이터에서 18~24시간 배양한다.
     2. 생리식염수(4.4 참고) 10mL을 취해 균이 가득 자란 사부로드포도당한천배지에 추가하고, 균락을 반복해서 세척한다.
     3. 피펫(Pipette)으로 칸디다 알비칸스 현탁액을 해당 무균 시험관에 옮기고, 볼텍스(vortex)로 3분이 넘지 않게 진동, 혼합한다.
     4. 칸디다 알비칸스 현탁액을 생리식염수(4.4 참고)로 접종 필요 농도 1x106~1x107 CFU/mL까지 희석한다.
     5. 5 균액을 제조한 후에 실온에 놓을 경우 2시간 내에 사용해야 한다.
     6. 샘플 검사 진행을 시작함과 동시에 상기 균액 1mL을 취해 생리식염수 9mL 시험관에 넣고 충분히 혼합해서 1:10 희석액을 만든다. 이런 방식으로 1:100, 1:1,000 등 적절한 희석 배수를 제조한다. 2~3개의 적절한 희석 배수의 희석액(일반적으로 희석 배수 1:100,000, 1:1,000,000 및 1:10,000,000의 희석액을 취함) 각 1mL을 취해 배양 접시에 넣고, 각 배수 희석액마다 각각 이중 재시험을 진행한다.
     7. 약 45℃~50℃까지 냉각한 사부로드포도당한천배지를 상기 배양 접시에 기울여서 쏟고, 각 샬레당 약 15~20mL이며, 이후 배양 접시를 회전시켜서 샘플과 배지를 충분히 균일하게 혼합한다. 한천이 응고되면 32.5±2.5℃ 인큐베이터에 도치시키고, 24~48시간 배양한 후에 균락 계수를 진행하고, 이 계수에서 얻은 값은 N이다.
  3. 흑국균 접종 균액 제조:
     1. 흑국균을 감자포도당한천배지(PDA)에 접종하고, 22.5±2.5℃ 인큐베이터에서 7~11일간 배양한다.
     2. Polysorbate 80 용액(4.5 참고) 10mL을 취해 균이 가득 자란 감자포도당한천배지에 추가하고, 가볍게 균락 표면 상의 포자를 세척한다. (곰팡이 균사를 제거하지 않도록 조심)
     3. 피펫(Pipette)으로 흑국균 현탁액을 해당 무균 시험관에 옮기고, 볼텍스 믹서(Vortex mixer)로 약 1분간 진동, 혼합한다.
     4. 흑국균 현탁액을 40μm~100μm 필터로 여과한다.
     5. 여과한 흑국균 현탁액을 Polysorbate 80 용액으로 접종 필요 농도 1x106~1x107 Spores/mL까지 희석한다.
     6. 균액을 제조한 후에 2~8℃에서 보관할 수 있지만, 24시간 내에 사용해야 한다.
     7. 샘플 검사 진행을 시작함과 동시에 상기 균액 1mL을 취해 Polysorbate 80 9mL 시험관에 넣고 충분히 혼합해서 1:10 희석액을 만든다. 이런 방식으로 1:100, 1:1,000 등 적절한 희석 배수를 제조한다. 2~3개의 적절한 희석 배수의 희석액(일반적으로 희석 배수 1:100,000, 1:1,000,000 및 1:10,000,000의 희석액을 취함) 각 1mL을 취해 배양 접시에 넣고, 각 배수 희석액마다 각각 이중 재시험을 진행한다.
     8. 약 45℃~50℃까지 냉각한 감자포도당한천배지를 상기 배양 접시에 기울여서 쏟고, 각 샬레당 약 15~20mL이며, 이후 배양 접시를 회전시켜서 샘플과 배지를 충분히 균일하게 혼합한다. 한천이 응고되면 22.5±2.5℃ 인큐베이터에 도치시키고, 3~5일간 배양한 후에 균락 계수를 진행하고, 이 계수에서 얻은 값은 N이다.
  4. 중화제 효과의 검증:

방부 효과를 효과적으로 평가하기 위해 ISO11930: 2019 방법을 참고하여 중화제 효과의 검증 진행을 권장한다.

* 1. 시험 검체 준비:
     1. 무균 조건에서 측정하려는 화장품 검체를 취해 무균 샘플병에 놓고, 병당 20g 또는 20ml이며, 각 검체마다 총 5개를 준비한다.
     2. 무게를 잰 각 화장품 검체에 0.2mL의 단일 균액을 넣는다.
     3. 균액과 검체를 충분히 균일하게 혼합하고, 실온(20℃~25℃)에서 보관한다.
     4. 0일차 균락수 N0 계산방식: N/100
     5. 각각 균을 추가한 이후 7(T7), 14(T14) 및 28(T28)일차에 화장품 검체 중의 균락수를 검사한다.
     6. 검체는 개봉해서 샘플을 취하기 전에 용기에 어떠한 파손이 없는지 자세히 검사하고, 검체를 균일하게 흔들어서 혼합하며, 70% 에탄올 용액으로 검체 용기의 표면을 소독하고, 다시 무균 거즈로 표면을 깨끗하게 닦는다.
     7. 액체 검체:

검체 1mL를 정확하게 취하고, 멸균 시험관에 놓고, 9mL MLB 또는 기타 증명을 거친 중화제를 넣고 균일하게 혼합해서 10배 희석 검액으로 하며, 실온에 30±15분간 정치시킨다.

* + 1. 고체 및 분말 검체

검체 1g를 정확하게 취하고, 멸균 시험관에 놓고, 121°C에서 15분간 멸균을 거친 Tween 80 1mL을 넣고, 나이프로 검체를 분산시킨 후에 다시 8mL MLB 또는 기타 증명을 거친 중화제를 넣고 균일하게 혼합해서 10배 희석 검액으로 하며, 실온에 30±15분간 정치시킨다.

* + 1. 크림 및 유지류 검체:

검체 1g를 정확하게 취하고, 멸균 시험관에 놓고, 121°C에서 15분간 멸균을 거친 Tween 80 1mL, 무균 유리구슬 5~7개 및 8mL MLB 또는 기타 증명을 거친 중화제를 넣고 균일하게 혼합해서 10배 희석 검액으로 하며, 실온에 30±15분간 정치시킨다.

* + 1. 분무제:

70% 에탄올 용액으로 적신 거즈로 분무기의 노즐을 소독하고, 먼저 노즐에서 일부 검체를 무균 거즈에 분출해서 버린 후에 다시 검체를 희석병에 분사해서 검체 1g을 정확히 취해 멸균 시험관에 넣는다. 9mL MLB 또는 기타 증명을 거친 중화제를 넣고 균일하게 혼합해서 10배 희석 검액으로 하며, 실온에 30±15분간 정치시킨다.

* 1. 검체 균락수 검사:
     1. 멸균 완료한 피펫으로 상기(5.5.1~10 참고)의 10배 희석 검액 1mL을 빨아들이고, 9mL MLB 또는 기타 증명을 거친 중화 희석액에 넣고, 순서대로 102～106배 등 시리즈의 희석 검액을 만든다.
     2. 희석 검액 또는 원액을 충분히 흔들고 균일하게 혼합한다.
     3. 각각 세균을 추가한 검체 희석 검액 0.1mL을 흡입해서 MLA에 넣고, 무균 유리막대로 도포하고, 각 희석 검액은 최소 2회 반복한다.
     4. 배지가 검액을 흡수하면 배지를 도치시키고 32.5°C±2.5°C 인큐베이터에서 48~72시간 배양시킨다.
     5. 각각 칸디다 알비칸스를 추가한 검체 희석 검액 0.1mL을 흡입해서 SDA에 넣고, 무균 유리막대로 도포하고, 각 희석 검액은 최소 2회 반복한다.
     6. 배지가 검액을 흡수하면 배지를 도치시키고 32.5°C±2.5°C 인큐베이터에서 48~72시간 배양시킨다.
     7. 각각 흑국균을 추가한 검체 희석 검액 0.1mL을 흡입해서 PDA에 넣고, 무균 유리막대로 도포하고, 각 희석 검액은 최소 2회 반복한다.
     8. 배지가 검액을 흡수하면 배지를 도치시키고 22.5°C±2.5°C 인큐베이터에서 3~5일간 배양시킨다.
     9. 배양 후에 각각 세균, 칸디다 알비칸스 25~250개 균락 및 흑국균 15~150개 균락의 희석 배수 평판을 선택해서 계수하고, 해당 희석 배수의 2배 평판의 균락수 평균치에 희석 배수를 곱하고, 접종 부피(0.1mL)를 곱해서 균락수를 얻으며, 단위는 CFU/g 또는 CFU/mL이다.
     10. 이 계수에서 얻은 값은 NX이다.
  2. 대수 감소값 계산방법:

화장품의 방부 효과는 균락수의 대수 감소값(RX)을 평가 파라미터 지표로 할 수 있다.

Rx 계산방식은 다음과 같다.



공식에서:

N0——검체에서 균액의 0일차 균락수

NX——각 검사시간별 검체의 균락수

* 1. 화장품 방부 효과 시험 평가표준:

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 평가 파라미터: 대수 감소값 Rx | | | | | | | | |
| 균종 유형 | 세균 | | | 칸디다 알비칸스 | | | 흑국균 | |
| 샘플링 시간(일수) | T7 | T14 | T28 | T7 | T14 | T28 | T14 | T28 |
| 표준 A＊ | ≥3 | ≥3 또는  NIb | ≥3 또는  NIb | ≥1 | ≥1 및  NIb | ≥1 및  NIb | ≥0c | ≥1 및  NIb |
| 표준 B＊ | - | ≥3 | ≥3 또는  NIb | - | ≥1 | ≥1 및  NIb | ≥0c | ≥0c 및  NIb |
| a: 도전 시험 중에 수용 가능한 편차 범위는 0.5log이다.  b: NI는 이전 시험 시간과의 비교가 증가하지 않았음을 뜻한다.  c: RX=0은 균락수와 0일차의 비교가 증가하지 않았음을 뜻한다. | | | | | | | | |

* 표준 A 부합: 제품 미생물 오염 위험이 통제되며, 제품이 잠재적인 미생물 오염의 위험을 피하도록 보호할 수 있다.

표준 B 부합: 제품에 여전히 미생물 오염 위험이 존재하고, 재평가를 하고 기타 추가적인 제어조건을 추가해야 제품 미생물 위험이 통제될 수 있다.

# 참고자료

* 1. ISO 11930:2019 Cosmetics — Microbiology — Evaluation of the antimicrobial protection of a cosmetic product.
  2. 衛生福利部食品藥物管理署 109.07.28 公布建議檢驗方法-化粧品中 微生物檢驗方法。