

중국식품약품검정연구원 “화장품 안전성 시험평가 기술지침”

등 3건의 기술지침을 발표 통지

[국가약품감독관리국, 2024년 7월 8일 발표]

관련 기관에 드리는 글:

업계가 화장품 안전성 평가 능력과 수준을 향상시키고, 화장품 안전성 평가 업무를 표준화하며, 화장품 안전성 평가 제도의 질서 있는 시행을 촉진하기 위해 “화장품감독관리조례”, “화장품 안전성 평가 기술지침(2021년도)” 및 “화장품 안전성 평가관리 최적화 관련 조치” 등 관련 법규와 규범성 문건의 요건에 따라, “화장품 안전성 시험평가 기술지침”, “화장품 방부력 시험평가 기술지침”과 “화장품 포장재 호환성 시험평가 기술지침”(별첨 참조)을 제정하고 발표한다.

이에 특별히 통지한다.

별첨:

1. 화장품 안전성 시험평가 기술지침
2. 화장품 방부력 시험평가 기술지침
3. 화장품 포장재 호환성 시험평가 기술지침

중국식품약품검정연구원

2024년 7월 8일

화장품 방부력 시험평가 기술지침

중국식약품검정연구원

목 차

1. 범위	1
2. 용어 및 정의	1
3. 설비 및 재료	1
4. 배지 및 시약	2
5. 시험 균주	3
6. 시험 방법	4
7. 설명	4
부록A	4

1. 범위

이 지침은 화장품의 방부 효과 평가 방법을 규정했다.

이 지침은 화장품 방부 체계의 효율성 평가에 적용된다.

2. 용어 및 정의

2.1 방부효능 평가 시험

일정량의 미생물을 화장품에 인공적으로 오염시키고, 화장품의 가능한 오염을 시뮬레이션하며, 일정 시간마다 생존균의 양을 검사하고, 생존균 양의 변화에 따라 화장품의 방부제 체계의 효능을 평가하는 시험 방법이다.

2.2 중화제

화장품과 미생물의 혼합물에 첨가하여, 화장품의 세균 억제 또는 살균 성분의 미생물에 대한 억제 또는 박멸 효과를 제거하는 시약을 말한다.

3. 설비와 재료

3.1. A2형 생물 안전캐비닛.

3.2. 고압증기멸균기.

3.3. 저울: 분해능 0.1g.

3.4. 항온 인큐베이터: $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

3.5. 균질기.

3.6. 멸균빨대: 1mL(0.01mL 눈금), 10mL(0.1mL 눈금) 또는 마이크로 피펫 및 팁.

3.7. 현미경.

3.8. pH계.

3.9. 볼텍스(vortex) 혼합기.

3.10. 멸균접시(sterilized plate): 지름 90mm.

3.11. 멸균유리솜.

4. 배지 및 시약

4.1. 0.85% 생리식염수.

4.2. 레시틴 트윈 80 영양 한천 배지(Lecithin Tween-80 Nutrient Agar Base), 부록A.1 참조

4.3. 로즈 벵갈 배지, 부록A.2 참조

4.4. 0.05%(v/v) 폴리소베이트80이 함유된 생리식염수, 부록A.3 참조

4.5. Trypticase Soy Agar 배지(TSA), 부록A.4 참조

4.6. Sabouraud Glucose Agar 배지(SDA), 부록A.5 참조

4.7. SCDLP 액체 배지, 부록A.6 참조

4.8. Eugon LT 100 배양액, 부록A.7 참조

4.9. D/E 중화 배양액, 부록A.8 참조

4.10. 변형 Lethen 배양액, 부록A.9 참조

5. 시험 균주

5.1. 세균

황색포도상구균CMCC(B)26003

대장균 CMCC(B)44102

녹농균 CMCC(B)10104

5.2. 진균

아스페르길루스 니제르 CMCC(F)98003

칸디다 알비칸스 CMCC(F)98001

화장품 방부력 평가 시험시 필요에 따라 기타 관련 세균 또는 진균을 추가하여 시험 균주로 삼을 수 있다.

6. 시험방법

6.1. 시험품 미생물 검사

최소 2개 이상의 포장에 잘 된 시험용 화장품 샘플을 준비하고, “화장품안전기술규범” 제5장 미생물 검사방법의 미생물 검사방법 총칙, 균락총수, 곰팡이균 및 효모균 검사방법에 따라 샘플 측정을 하고, 측정결과는 “화장품안전기술규범”의 제한값 규정에 부합해야 한다. 시험품 미생물의 측정결과는 N_f 로 표기한다.

6.2. 미생물 현탁액의 준비

6.2.1. 세균 현탁액의 준비

Inoculating loop(접종루프)를 사용하여 균종 보관튜브(또는 시험관 경사면)에서 적당량의 균체를 채취하고, TSA 플레이트에 구역별 선을 긋고 접종하며, $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 18h~24h 배양한다. Inoculating loop을 사용하여 1세대 배양물을 채취하고, TSA 플레이트에 구역별 선을 긋고 접종하며, $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 18h~24h 배양한다. 상기 2세대 배양물에서 대표적인 콜로니를 채취하고, TSA 플레이트에 구역별 선을 긋고 접종하며, $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 18h~24h 배양하는 것이 3세대 배양물이 된다. 멸균면봉을 사용하여 Bacterial Lawn을 멸균 생리염수에 넣고, 볼텍스(vortex) 방식으로 균일하게 혼합한다. 멸균 생리염수를 사용하여 약 107 CFU/mL~108 CFU/mL의 세균 현탁액으로 희석한다. 준비된 세균 현탁액은 2h 이내에 사용하거나, $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 에서 24h 이상 보관하지 않는다.

6.2.2. 칸디다 알비칸스 현탁액의 준비

Inoculating loop을 사용하여 균종 보관튜브(또는 시험관 경사면)에서 균체를 적당량 채취하고, SDA 플레이트에 구역별 선을 긋고 접종하며, $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 에서 48h~72h 동안 배양한다. Inoculating loop을 사용하여 1세대 배양물을 채취하고, SDA 평판에 구역별 선을 긋고 접종하며, $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 에서 48h~72h 배양한다. 상기 2세대 배양물에서 대표적인 콜로니를 채취하고, SDA 플레이트에 구역별 선을 긋고 접종하며, $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 에서 48h~72h 동안 배양한 것이 3세대 배양물이 된다. 멸균면봉을 사용하여 Bacterial Lawn을 멸균 생리식염수에 넣고, 볼텍스(vortex) 방식으로 균일하게 혼합한다. 멸균 생리식염수를 사용하여 약 106 CFU/mL~107 CFU/mL의 세균 현탁액으로 희석한다. 준비된 세균 현탁액은 2h 이내에 사용하거나, $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 에서 24h 이상 보관하지 않는다.

6.2.3. 아스페르길루스 니제르 포자 현탁액의 준비

Inoculating loop을 사용하여 균종 보관튜브(또는 시험관 경사면)에서 균체를 적당량 채취하고, SDA 평판에 구역별 선을 긋고 접종하며, $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 에서 3d~7d 배양한다. 멸

균면봉을 사용하여 Bacterial Lawn을 0.05%(v/v) 폴리소베이트80 이 함유된 멸균 생리 식염수에 넣고, 포자 현탁액을 만들며, 1min 가볍게 흔든 후, 멸균 유리솜을 사용하여 균사를 여과 및 제거한다. 0.05%(v/v) 폴리소베이트80이 함유된 멸균 생리염수를 사용하여 약 106 CFU/mL~107 CFU/mL의 포자 현탁액으로 희석한다. 준비된 포자 현탁액은 당일 사용하거나 2℃~8℃에서 7d 이상 보관하지 않으며, 사용전 균일하게 혼합하고, 현미경을 통해 포자의 발아 여부를 관찰하며, 포자 발아가 있을 경우, 폐기하고 사용하지 않는다.

표1 시험균주 배양조건

	배지	배양온도	배양시간
황색포도상구균CMCC(B)26003	TSA	36℃ ± 1℃	18h~24h
대장균 CMCC(B)44102	TSA	36℃ ± 1℃	18h~24h
녹농균 CMCC(B)10104	TSA	36℃ ± 1℃	18h~24h
아스페르길루스 니제르CMCC(F)98003	SDA	28℃ ± 2℃	3 d~7 d
칸디다 알비칸스CMCC(F)98001	SDA	28℃ ± 2℃	48h~72h

주: 실험실에서 추가한 기타 시험균주는 상기 세균 및 진균의 배양온도와 시간을 참고하여 배양할 수 있다. 사용된 작업균주 배양물의 계대배양(cell passage)은 5회를 초과할 수 없다.

6.3. 중화제(neutralizer) 효과 검증시험

6.3.1. 작업세균 현탁액 제조

희석액을 사용하여 상기 세균 현탁액(또는 상업용 얼린 균주 사용)을 103 CFU/mL로 10배 희석하고, 중화제 효과 검증에 사용한다.

6.3.2. 시험 그룹화

종류별 시험균주의 중화제 효과 검증시험은 각각 진행해야 한다.

시험은 아래와 같이 3개 그룹으로 구분하고, 아래 방법에 따라 세균 오염을 진행한다.

시험군: 1g(mL) 시험품을 9mL 중화제에 첨가하고, 균일하게 혼합하며, 실온에서 30min ± 15min 보관하여, 충분히 작용하도록 한다.

중화제 대조군: 1mL 희석액을 9mL 중화제에 첨가하고, 균일하게 혼합하며, 실온에서 30min ± 15min 보관한다.

균액 대조군: 10mL 희석액.

상기 3개 그룹에서 6.3.1에서 준비한 작업세균 현탁액을 1mL씩 첨가한다.

6.3.3. 배양 및 계수

시험균, 중화제 대조균과 균액 대조균을 대상으로 플레이트 수를 계산하고, 그룹별 2개씩 접종하며, 표1의 요구사항에 따라 배양한다. 그룹별 계수 결과는 평균값을 취하고, 시험균 계수 결과는 N_{vf} , 중화제 대조균 계수 결과는 N_{vn} , 균액 대조균 계수 결과는 N_v , 6.1의 시험품 미생물의 측정 결과는 N_f 로 표기한다.

6.3.4. 결과 판정

N_{vn}/N_v 가 근접하고(예: $0.5 \leq N_{vn}/N_v \leq 2$), $(N_{vf} - N_f)/N_{vn} \geq 0.5$ 일 때, 중화제가 양호한 중화 효과가 있는 것으로 판정하고, 중화효과 검증을 통과한다.

시험품 테스트가 중화효과 검증을 통과하지 못한 경우, 중화제를 변경하거나 중화제 사용량을 늘릴 수 있다. 선택한 중화제는 부록 A.6~A.9를 참고하거나, 필요에 따라 적합한 중화제를 사용하여 중화효과 검증을 진행할 수 있다.

6.4. 시험품의 방부력 시험

6.4.1. 시험품 세균 오염

방부력 시험은 단일 균종 세균 오염의 시험방식을 사용하고, 즉, 종류별 시험균주의 세균 현탁액을 사용하여 시험품을 인위적으로 오염시키며, 일정 시간마다 생존 세균수를 측정하고, 생존 세균수의 변화에 따라 화장품 방부체계 효능을 판단한다.

6.2에서 준비한 균액을, 20g(mL) 이상의 시험품이 함유된 기본 포장에 넣거나, 20g(mL) 시험품이 함유된 적당한 용기에 넣고, 충분히 혼합하며, 균액의 접종 부피는 시험품 부피의 1%를 초과하지 않아야 한다. 세균의 세균 오염농도는 105 CFU/g(mL)~106 CFU/g(mL)이고, 진균의 세균 오염농도는 104 CFU/g(mL)~105 CFU/g(mL)이다. 세균 오염후 샘플을 $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 인큐베이터에 넣고, 7, 14 및 28일 생존 세균수를 측정하며, $N_x(X=7, 14, 28)$ (6.4.4의 시간포인트(time point)의 규정)로 표기한다.

6.4.2. 계수방법

지정된 시간 후, 1g(mL) 세균 오염 샘플을, 9mL의 6.3의 검증을 통한 중화제(샘플의 희석배수는 6.3 중화제 중화샘플의 희석배수를 참고해야 하고, 일치해야 하며, 샘플의 세균 억제성분이 효과적으로 중화될 수 있도록 보장함)에 넣고, 충분히 균일하게 혼합

한다. 실온에서 30min±15min 중화시킨 후, 2mL 샘플액을 피펫하여, 2개의 멸균용기에 주입하고, 용기별 1mL를 주입한다. 45℃~50℃의 배지(표1 참조) 15mL~20mL를 용기에 넣고, 충분히 혼합하며, 응고후 요구사항에 따라 뒤집어서 배양하고, 계수 작업을 진행한다. 플레이트에 다수의 콜로니가 성장할 것으로 예상되는 경우에는 10배 연속희석을 실시할 수 있으며, 10배 희석을 할 수 있고, 적당한 희석도를 선택하여 플레이트 계수를 하거나, 플레이트 도포법을 선택하여 상기 시험을 한다.

계수결과 계산방법과 보고방식은 “화장품안전기술규범” 제5장 2. 균락총수 검사방법과 6. 곰팡균 및 효모균 검사방법을 참고할 수 있다.

6.4.3. 계산방법

화장품 방부효능 평가용 시험품에서 생존 세균수 상용로그 감소값(Rx)을 평가지표로 삼고, 계산방식은 식(1)과 같다:

$$Rx = \lg N_0 - \lg N_x \quad \text{.....(1)}$$

식에서:

N_0 — 시험품의 초기 세균 오염량.

N_x — 서로 다른 측정시간, 시험품의 생존 세균수.

6.4.4. 결과 판정

표2 화장품 방부력 시험 결과 판정원칙

서로 다른 샘플 채취시간 시험품에서 생존 세균수 상용로그 감소값($R_X = \lg N_0 - \lg N_X$) ^a								
	세균			칸디다 알비칸스			아스페르길루스 니제르	
	T7	T14	T28	T7	T14	T28	T14	T28
판정표준 A	≥3	≥3, NI ^b	≥3, NI	≥1	≥1, NI	≥1, NI	≥0 ^c	≥1, NI
판정표준 B	- ^d	≥3	≥3, NI	-	≥1	≥1, NI	≥0	≥0, NI
a. 방부 효능 테스트에서, 수용 가능한 편차범위는 0.5 log이다. b. NI: 앞전 시간포인트의 계수결과와 비교시, 차이는 0.5 log를 초과하지 않는다. c. N_X 를 초기 세균 오염량 N_0 과 비교할 때, 차이가 0.5 log를 초과하지 않을 시, $R_X=0$. d. “-” 는 테스트가 필요하지 않음을 나타낸다.								

- 판정기준 A, 기타 통제 요소를 고려하지 않는 조건에서, 제품 처방이 소비자에게 잠재적인 안전성 위험을 초래할 수 있는 미생물의 증식을 효과적으로 방지할 수 있는 제품에 적용된다.
- 판정기준 B, 제품 처방 요인을 제외하고, 미생물 오염에 대해 리스크 평가 후 효과적인 기타 통제 방식을 사용하는 제품에 적용되며, 특정 포장 등 수단을 통한 미생물 오염 통제를 예로 들 수 있다.

7. 설명

화장품 허가인, 등록인은 국가표준, 기술규범, 업계표준, 국제표준, 본 기술지침 또는 자체 방법에 따라 관련 연구를 진행할 수 있고, 안전성 평가 보고서에 관련 테스트 또는 평가 결론을 제출할 수 있다.

부 록 A

(규범성 부록)

배지 및 시약

A.1 레시틴 트윈 80 영양 한천 배지

성분: 펩톤	20.0g
소고기 페이스트	3.0g
염화나트륨	5.0g
한천	15.0g
레시틴	1.0g
트윈 80	7.0g
물	1000mL

제조방법: 먼저 레시틴을 소량의 증류수에 첨가하고, 가열용해하며, 트윈80을 첨가하고, 기타 성분(한천을 제외)을 남은 증류수에 첨가하여 용해시킨다. 용해된 레시틴, 트윈 80을 첨가하고, 균일하게 혼합하며, 필요시 pH를 조절하고, 한천을 첨가하며, 121℃에서 20min 동안 고압멸균한다. 멸균후 배지는 25℃에서 pH값이 7.2 ± 0.2 가 된다.

A.2 로즈 벵갈 배지

성분: 펩톤	5.0g
포도당	10.0g
인산이수소칼륨	1.0g
황산마그네슘(7H ₂ O 포함)	0.5 g
한천	20.0g
1/3000타이거레드 용액	100mL

(Tetrachlorotetraiodofluorescein disodium salt)

물 1000mL

클로로마이세틴 100mg

제조방법: 각 성분(로즈벵갈과 클로람페니콜을 제외함)을 증류수 또는 정제수에 첨가하고, 교반하여 용해시킨 후, 로즈벵갈 용액을 첨가하며, 필요시 pH를 조절한다. 121℃에서 20min 동안 고압멸균하고, 소량의 에틸알코올 용해 클로람페니콜을 사용하여, 용해 및 여과한 후 배지에 넣고, 클로람페니콜이 없을 경우, 사용시 1000mL당 스트렙토마이신을 30mg 첨가한다. 멸균후 배지는 25℃에서 pH값이 7.2 ± 0.2 가 된다.

A.3 0.05%(v/v) 폴리소베이트80이 함유된 생리식염수

성분: 염화나트륨 8.5g

폴리소르베이트 80 0.5g

물 1000mL

제조방법: 각 성분을 증류수 또는 정제수에 첨가하고, 교반 후 가열용해하며, 필요시 pH를 조절한다. 121℃에서 20min 동안 고압멸균하고, 멸균후 배지는 25℃에서 pH값이 7.0 ± 0.2 가 된다.

A.4 Trypticase Soy Agar 배지(TSA)

성분: 트립톤 15.0g

소이펩톤 5.0g

염화나트륨 5.0g

한천 15.0g

물 1000mL

제조방법: 각 성분을 증류수 또는 정제수에 첨가하고, 교반 후 가열용해하며, 필요시 pH를 조절한다. 121℃에서 15min 동안 고압멸균하고, 멸균후 배지는 25℃에서 pH값이 7.3 ± 0.2 가 된다.

A.5 Sabouraud Glucose Agar 배지(SDA)

성분: 펩톤 5.0g

카세인 펩톤	5.0g
포도당	40.0g
한천	15.0g
물	1000mL

제조방법: 각 성분을 증류수 또는 정제수에 첨가하고, 교반 후 가열용해하며, 필요시 pH를 조절한다. 121℃에서 15min 동안 고압멸균, 멸균후 배지는 25℃에서 pH값이 5.6 ±0.2가 된다.

A.6 SCDLP 액체 배지

성분: 트립톤	17.0g
소이 펩톤	3.0g
염화나트륨	5.0g
Dipotassium phosphate	2.5g
포도당	2.5g
레스틴	1.0g
트윈 80	7.0g
물	1000mL

제조방법: 각 성분을 증류수 또는 정제수에 첨가하고, 교반 후 가열용해하며, 필요시 pH를 조절한다. 121℃에서 20min 동안 고압멸균하고, 멸균후 배지는 25℃에서 pH값이 7.2±0.2가 된다.

A.7 Eugon LT 100 배양액

성분: 트립톤	15.0g
소이 펩톤	5.0g
염화나트륨	4.0g
L-시스틴	0.7g

아황산나트륨	0.2g
포도당	5.5g
레시틴	1.0g
트윈 80	5.0g
옥톡시놀-9	1.0g
물	1000mL

제조방법: 각 성분을 증류수 또는 정제수에 첨가하고, 교반 후 가열용해하며, 필요시 pH를 조절한다. 121℃에서 15min 동안 고압멸균하고, 멸균후 배지는 25℃에서 pH값이 7.0 ± 0.2 가 된다.

A.8 D/E 중화 배양액

성분: 효모 추출물	2.5g
트립톤	5.0g
포도당	10.0g
아황산수소나트륨	2.5g
레시틴	7.0g
티오황산나트륨	6.0g
브로모크레졸 퍼플	0.02g
Sodium thioglycolate	1.0g
트윈 80	5.0g
물	1000mL

제조방법: 각 성분을 증류수 또는 정제수에 첨가하고, 교반 후 가열용해하며, 필요시 pH를 조절한다. 121℃에서 15min 동안 고압멸균하고, 멸균후 배지는 25℃에서 pH값이 7.6 ± 0.2 가 된다.

A.9 개량 Letheen 배양액

성분: 소고기 추출물	5.0g
염화나트륨	5.0g
레시틴	0.7g
트윈 80	5.0g
효모 추출물	2.0g
아황산수소나트륨	0.1g
트립티케이스 가수분해물	5.0g
육류 펩신 가수분해물	20.0g
물	1000mL

제조방법: 각 성분을 증류수 또는 정제수에 첨가하고, 교반 후 가열용해하며, 필요시 pH를 조절한다. 121℃에서 15min 동안 고압멸균하고, 멸균후 배지는 25℃에서 pH값이 7.2 ± 0.2 가 된다.

상기 배지는 상품화한 건조 분말 또는 미리 준비된 배지를 선택할 수도 있다.