

화장품의 미생물 한도 시험법 및 방부력 테스트

(주)마이크로진

조상희



교육내용

1. 검체 전처리

- A. 수분산 검체
- B. 비수분산 검체
- C. 산성/염기성 검체
- D. 검체특징 별 전처리법

2. 총호기성 세균 검사법

- A. 한천평판 희석법
- B. 배지 적합성 시험법
- C. 미생물 발육저지물질의 확인시험

3. 특정세균 시험법

- A. 대장균 시험법
- B. 녹농균 시험법
- C. 황색포도상구균 시험법
- D. 배지의 적합성 및 시험방법의 타당성 시험

검체 전처리

A. 수분산 검체 : Water soluble samples



10 배 희석

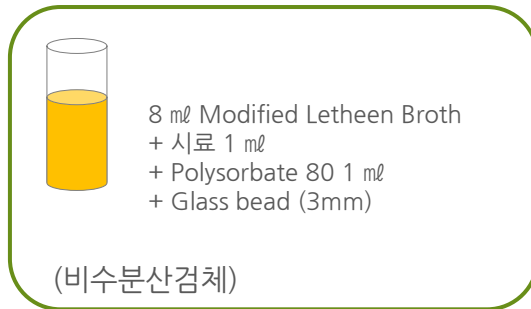


혼합된 상태

1. 수분산 검체 예: 영양 화장수, 네일 에나멜 리무버, 액상 아이라이너, 로션 외
2. 필요시 pH 조절을 한다.

검체 전처리

B. 비수분산 검체 : Insoluble in water



검체 1ml
+ Tween
80 1ml



10배 희석



혼합된 상
태

1. 비수분산 검체 시료 채취 : 마이크로피펫으로 검액을 Handling 하기 어려운 경우 무게로 채취한다.
2. 희석 시 필요에 따라 Glass bead(5mm D) 5~7개를 넣어서 vortexing하여 혼합한다.
3. 비수분산 검체 예: 오일제, 크림류, 고형제(필요에 따라 40 °C에서 30분정도 녹인 후 검사한다.)

검체 전처리

C. 산성 또는 염기성 검체 : Acidic or Basic sample

♣ 샘플 pH가 낮은 경우

: 낮은 pH는 미생물의 성장을 억제합니다. 그러므로 정확한 균의 계수를 할 수가 없습니다.

희석 샘플의 초기 pH	조치 방법
6.0~6.5	소량의 1N NaOH를 첨가하여 중성으로 맞춘다. 이 때 첨가량을 기록하여 같은 시료에 대해서 실험할때 같은 양의 1N NaOH를 첨가한다.
4.0~6.0	인산완충 희석액(1리터)에 5ml 1N NaOH를 첨가한다.
< 4.0	인산완충 희석액(1리터)에 10ml 1N NaOH를 첨가한다.

검체 전처리

D. 검사대상의 물성에 따른 전처리법

• 수용액 제제

: 검체를 Buffered sodium chloride-Peptone Solution(pH 7.0) 또는 phosphate buffer solution(pH7.2) 또는 Soybean-Casein Digest Broth에 희석한다.
: 필요시 pH를 6~8로 조정한다.

• 물에녹지 않는 비지질 제제

: 검체를 Buffered sodium chloride-Peptone Solution(pH 7.0) 또는 phosphate buffer solution(pH7.2) 또는 Soybean-Casein Digest Broth에 희석한다.
: 필요시 pH를 6~8조정한다.
: Polysorbate 80(1g/L) 같은 계면활성제를 넣을 수 있다.

• 지질 검체

: 검체를 여과멸균한 isopropyl myristate 에 녹이거나 40 ℃ 이하에서 녹인 polysorbate 80 또는 다른 저해성 없는 계면활성제를 혼합한다. 필요하면 40도 이하에서 shaking waterbath에서 주의깊게 혼합한다. 필요하면 선정한 희석액을 미리 가온하여 10배희석액을 제조한다. 위 혼합액을 희석액에 사용하여도 무방하다.

• 에어로졸형의 액체 또는 고체

: 검체를 일부 또는 전부를 멸균용기에 옮긴다. 전량 또는 일부를 검사에 이용한다.

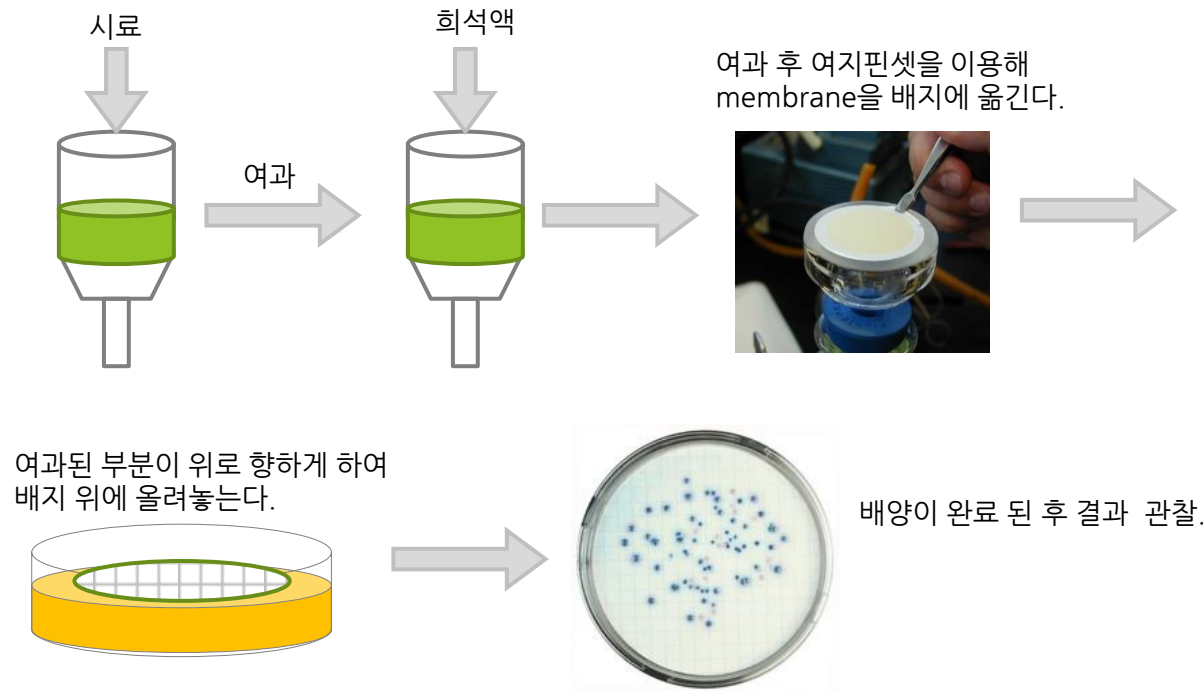
• 경피흡수패취

: 패취의 보호피복을 제거하고 점착면을 위로향하게 하여 멸균유리 또는 트레이에 올려놓고 패취끼리 부착하는 것을 막기 위해 멸균거즈를 올려놓는다. Polysorbate 80 또는 lecithin 등의 불활성화제가 있는 희석액을 패취에 넣고 30분간 진탕 혼합한다.

검체 전처리

D. 검사대상의 물성에 따른 전처리법

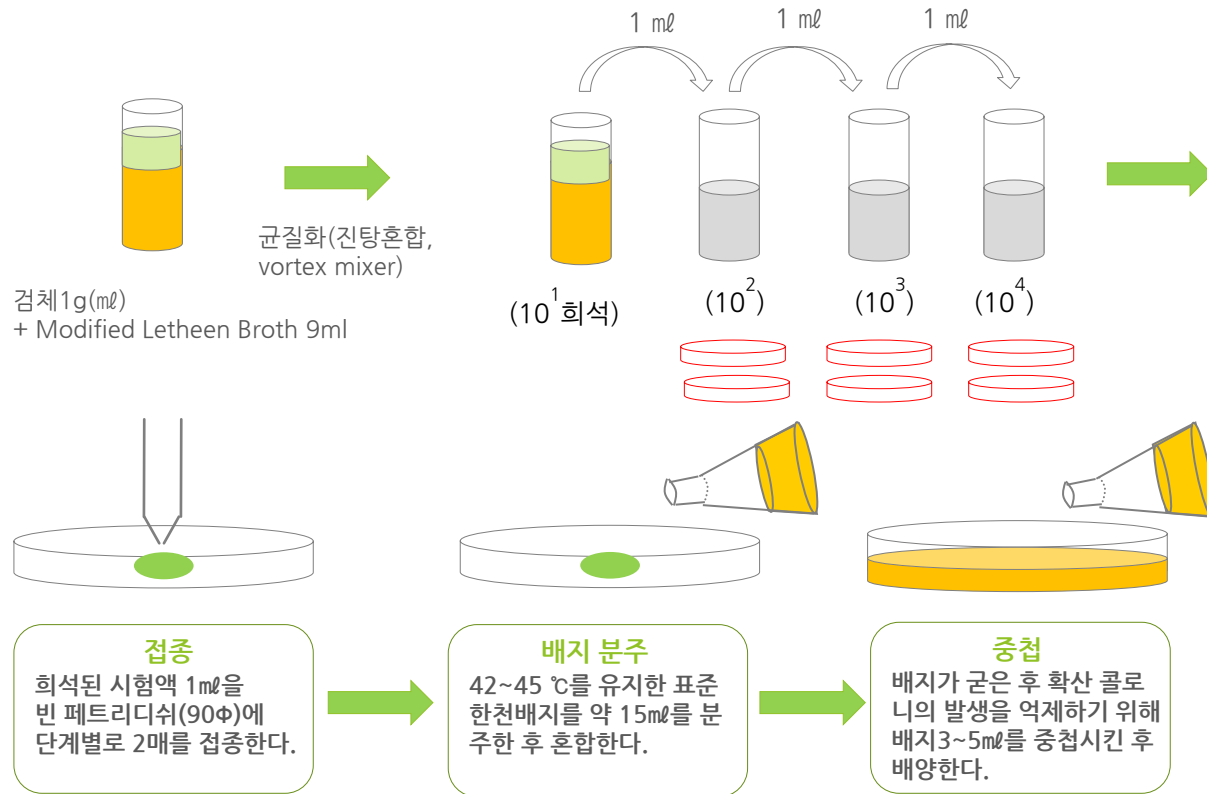
Membrane filter method를 이용한 미생물 검사 : **항균활성이 너무 강한 시료**의 경우 사용가능하다.



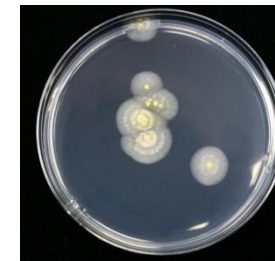
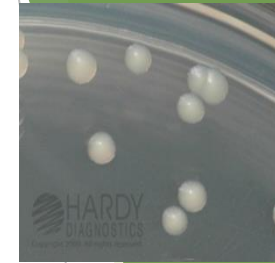
Membrane 재질	처리 용액
Cellulose nitrate	Aqueous, oily, weak alcoholic solutions
Cellulose acetate	Strong alcoholic solution, antibiotics
PES (Polyethersulfone)	Hydrophilic, alkali resistance
PVDF(Polyvinylidene fluoride)	Hydrophilic, Hydrophobic,
PTFE(Polytetrafluoroethylene)	Hydrophobic

총 호기성 세균 검사법

A. 한천평판 희석법



Aerobic bacteria Colony on Modified Letheen Agar



Fungi

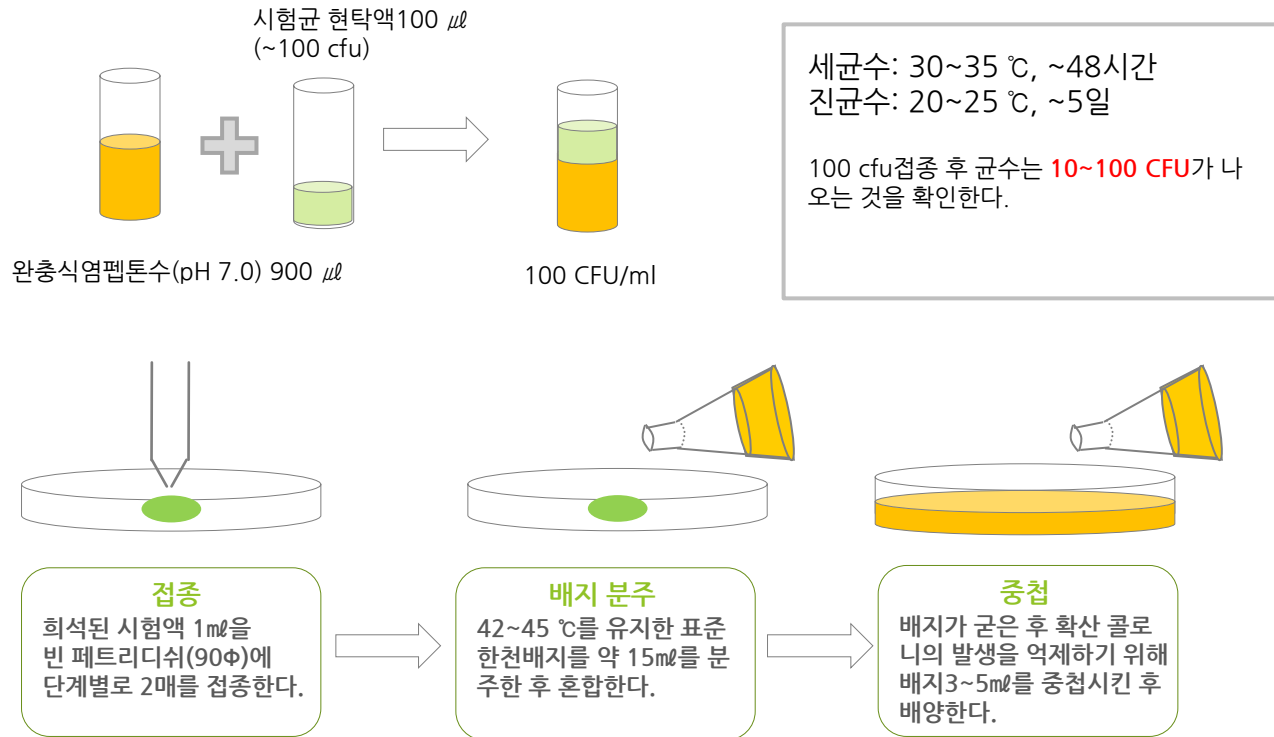


Yeast

- modified letheen agar/broth 성분 중 lecithin, sodium bisulfite, polysorbate 80 역할
: Neutralizing the preservative system found in cosmetics
- 진균수 : 검사법이 일반세균과 같지만 pour plating 보다 **spreading**하는 것을 추천

총 호기성 세균 검사법

B. 배지 적합성 시험법



총 호기성 세균 검사법

B. 배지 적합성 시험법

표 1. 배지성능시험용 균주

시험균주	준비배양조건	배지
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC No. 6538, 6538P) <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC No. 6633) <i>Escherichia coli</i> (ATCC No. 8739)	호기배양 30~35 °C 18~24 시간	Modified letheen agar/Tryptic soy agar
<i>Candida albicans</i> (ATCC No. 2091, 10231)	호기배양 20~25 °C 48 시간	Potato dextrose agar/Sabouraud dextrose agar

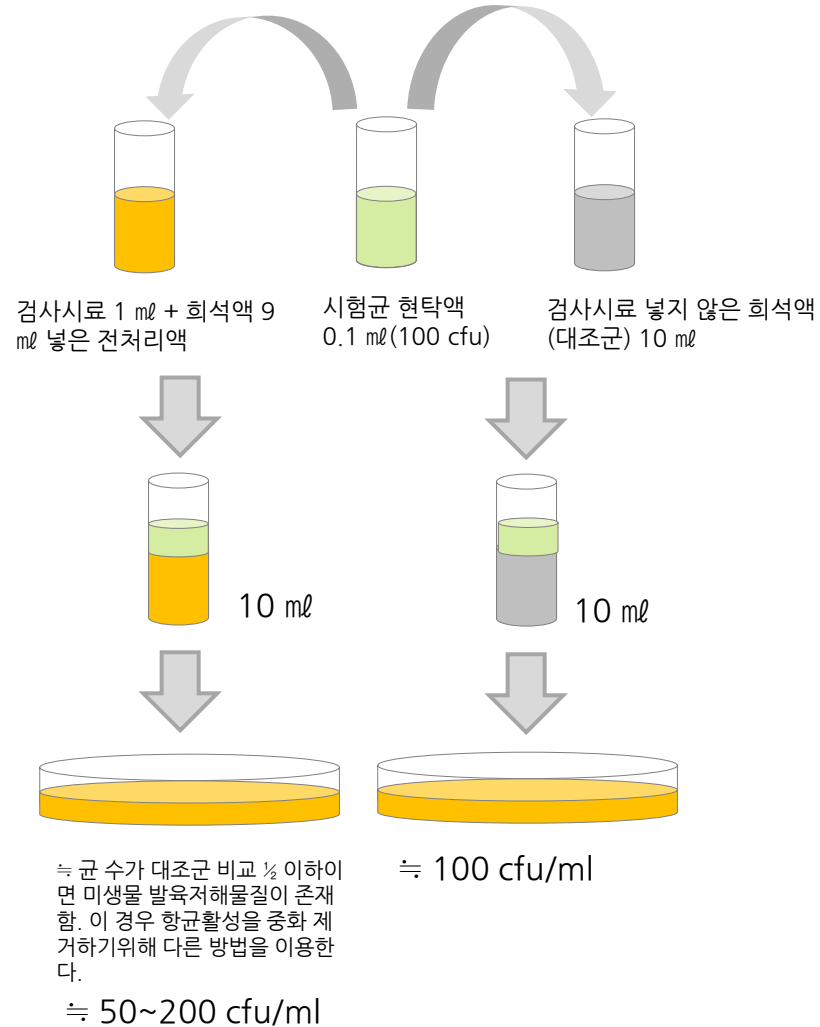
표1의 준비배양조건에서 배양된 균주 또는 이와 동등하다고 생각되는 균주를 쓸 수 있다.
배지 성능의 시험은 제조 LOT 마다 시행한다.



총 호기성 세균 검사법

C. 미생물발육저지물질의 확인 시험

접종 및 희석



※ 접종하는 시험균 현탁액의 양 (100 μ l)은 검액량(10 ml)의 1%를 초과하지 않는다.

총 호기성 세균 검사법

C. 미생물발육저지물질의 확인 시험

항균활성의 중화

- 희석액 또는 배지의 증량
- 특이적 또는 일반적 중화제를 희석액에 첨가
- 막 여과
- 여러방법 혼합하여 사용

적절한 중화법을 확립할 수 없을 경우 그 검체가 가지는 항균활성 때문에 접종균을 분리할 수 없는 것으로 간주한다. 따라서 그 검체가 접종균과 같은 종의 균이나 근연종에 오염되었을 가능성은 낮은 것으로 생각한다. 그러나 그 검체가 이들 일부 미생물만을 저해하고 시험균주이외에 균주는 저해하지 않을 가능성도 있으므로 미생물의 증식과 그 허용기준에 적합한 가장 낮은 농도로 시험한다.

[미생물 발육저지물질의 종류 및 중화제]

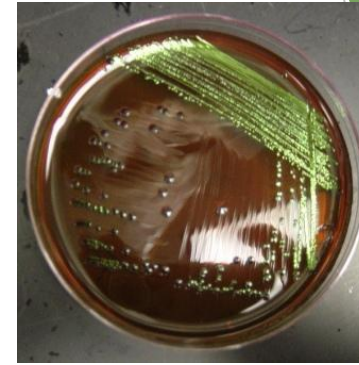
미생물 발육저지물질	중화제/중화방법
Glutaraldehyde, mercurial	Sodium hydrogen sulfite(Sodium bisulfite)
Phenolics, alcohol, aldehydes, sorbate	Dilution
Aldehydes	Glycine
Quaternary ammonium compounds(QACs), parahydroxybenzoates(parabens), bis-biguanides	Lecithin
QACs, Iodine, parabens	Polysorbate
Mercurials	Thioglycollate
Mercurials, halogens, aldehydes	Thiosulfate
EDTA(edetate)	Mg or Ca ions

특정세균 시험법

A. 대장균 시험법

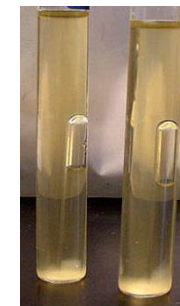


[MacConkey agar에서 대장균 콜로니 모습]



[EMB agar 에서 대장균
의 녹색금속광택 콜로니]

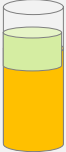
<i>Escherichia coli</i>	Large, blue-black, green metallic sheen
<i>Enterobacter/Klebsiella</i>	Large, mucoid, blue-black
<i>Proteus</i>	Large, colorless
<i>Salmonella</i>	Large, colorless
<i>Shigella</i>	Large, colorless
<i>Pseudomonas</i>	Irregular, colorless
Gram-positive bacteria	No growth to slight growth



[가스발효관에 가스가 포
집된 Lactose broth]

특정세균 시험법

B. 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*) 시험법



검체 1g(mℓ) + Tryptic Soy broth 9 mℓ
균질화(진탕혼합, vortex mixer)

자외선하에서 집락을 관찰 할 때 *Pseudomonas* agar P는 청색의 집락, F는 황색의 집락이 나타나면 녹농균 양성으로 판정한다. (옆 이미지 참조)



Cetrimide agar 또는 NAC agar에 3차 획선 도말

녹농균의 가능성이 높은 집락에 대해서 Oxidase test를 실시한다. 5~10초내에 자색으로 변하면 양성으로 판정. Oxidase test 음성인 경우 녹농균 음성으로 판정한다.



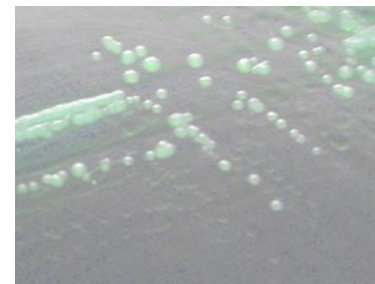
의심되는 집락이 나온 경우 증균배양액에서 녹농균한천배지 P와 F에 각각 도말



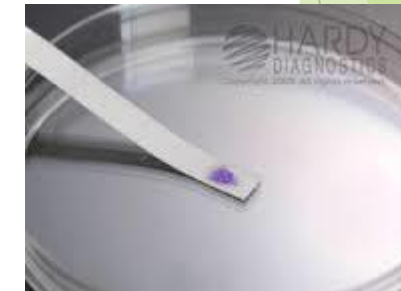
[*Pseudomonas* agar P(오른쪽, 청색), F(왼쪽, 황색)상에서 *Pseudomonas aeruginosa*의 전형적인 집락



[Cetrimide agar: 비접종]



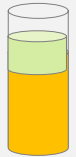
[Cetrimide agar 상에서 *Pseudomonas aeruginosa*의 전형적인 집락(Yellow-green to blue)]



[Oxidase test 결과 자색으로 바뀐 Strip]

특정세균 시험법

C. 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 시험법



검체 1g(ml) + Tryptic Soy broth 9 ml
균질화(진탕혼합, vortex mixer)

30~35 °C, 24~48 시간 배양



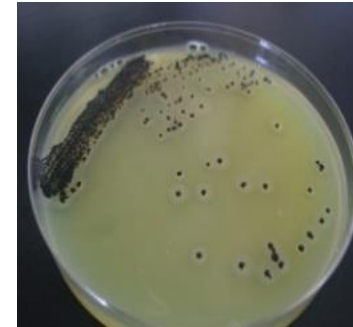
Vogel-Johnson agar 또는 Baird
parker agar에 3차 희선 도말

30~35 °C, 24 시간 배양

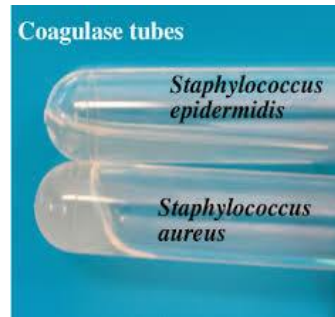
균의 집락이 검정색이고 집락주위에 황색투명대가
형성되며 그람염색을 통해 그람양성균으로 나타나
면 Coagulase test를 실시한다. Coagulase test결
과 양성이면 황색포도상구균 양성으로 판정한다.



[Vogel-Johnson agar상에서
황색포도상구균의 전형적인 집락]



[Baird parker agar상에서 황색
포도상구균의 전형적인 집락]



[Coagulase test 결과 응고]

특정세균 시험법

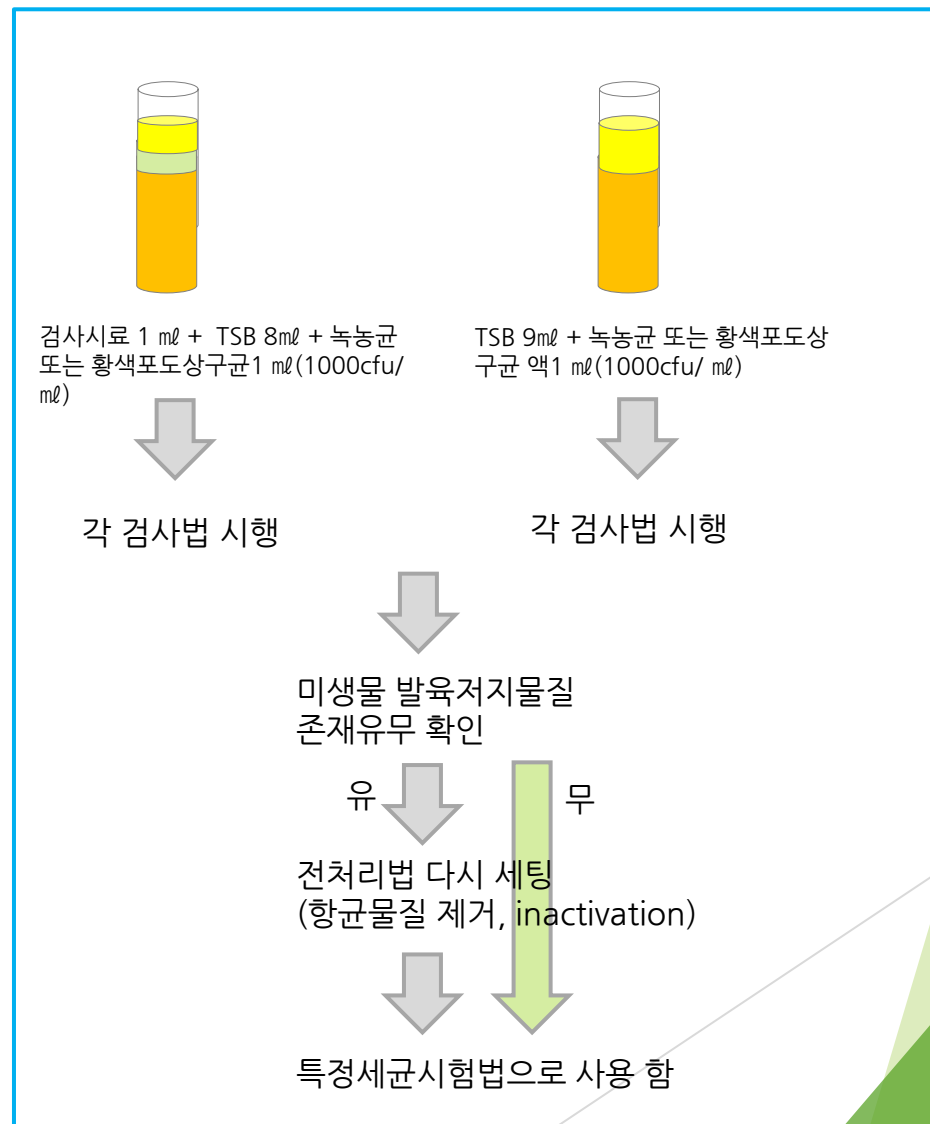
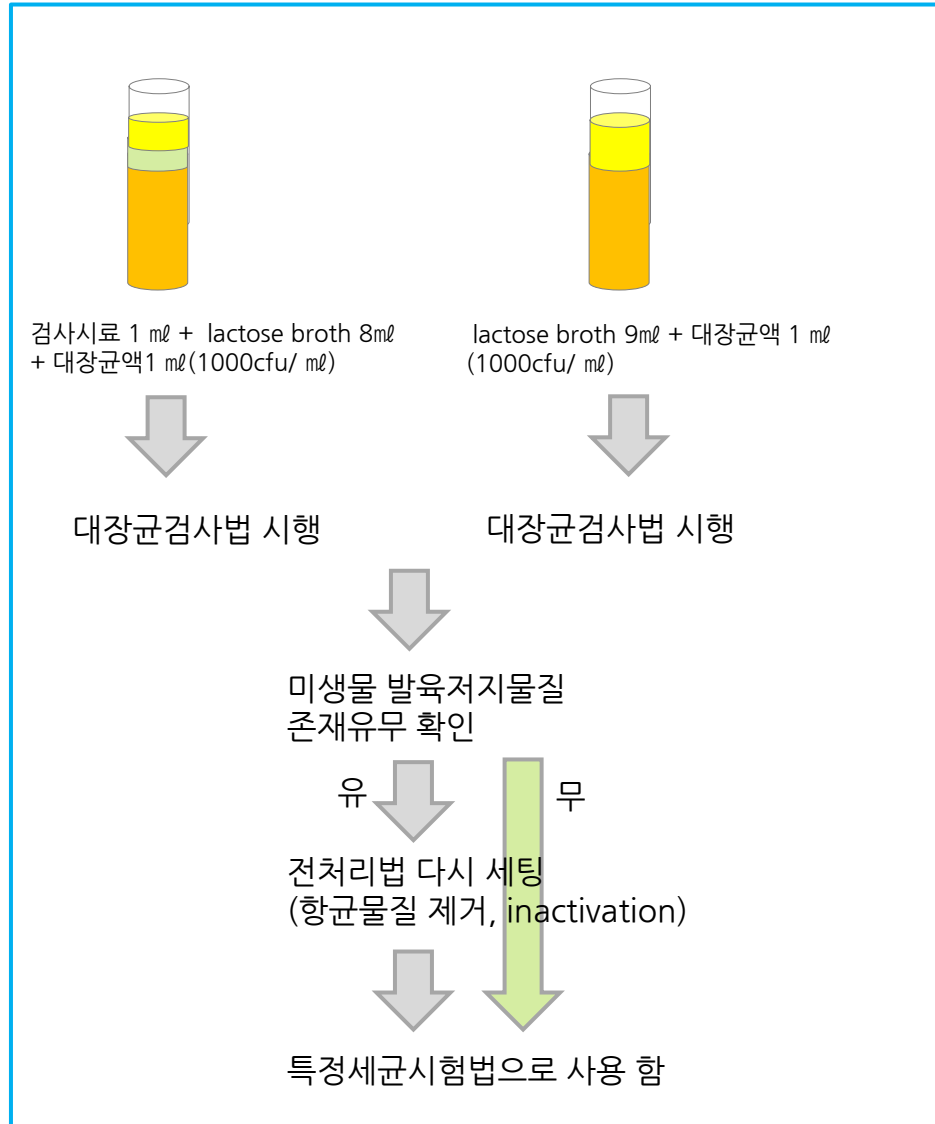
D. 특정세균에 대한 배지의 적합성 및 시험방법의 타당성 시험

표 2. 배지성능시험용 균주

시험균주	준비배양조건	배지
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC No. 6538, 6538P) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 9027)	호기배양 30~35 °C 18~24 시간	Tryptic soy broth
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	호기배양 20~25 °C 48 시간	Lactose broth

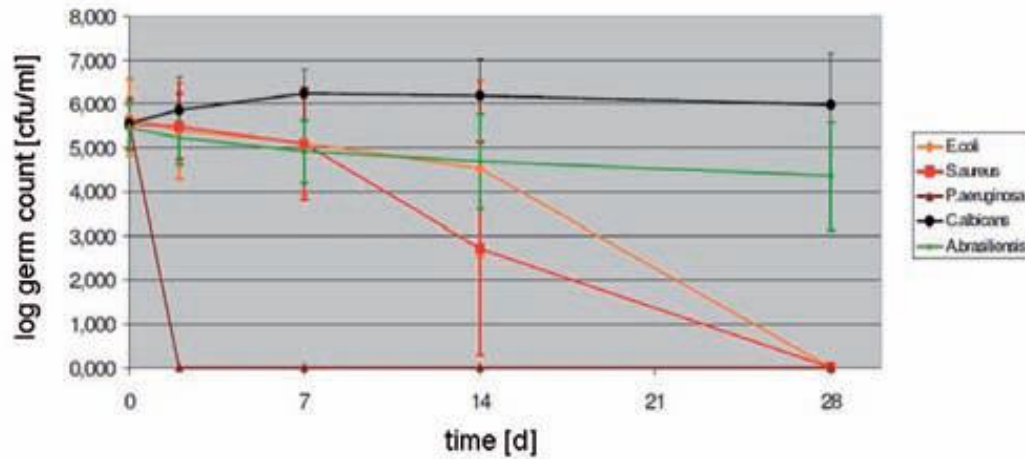
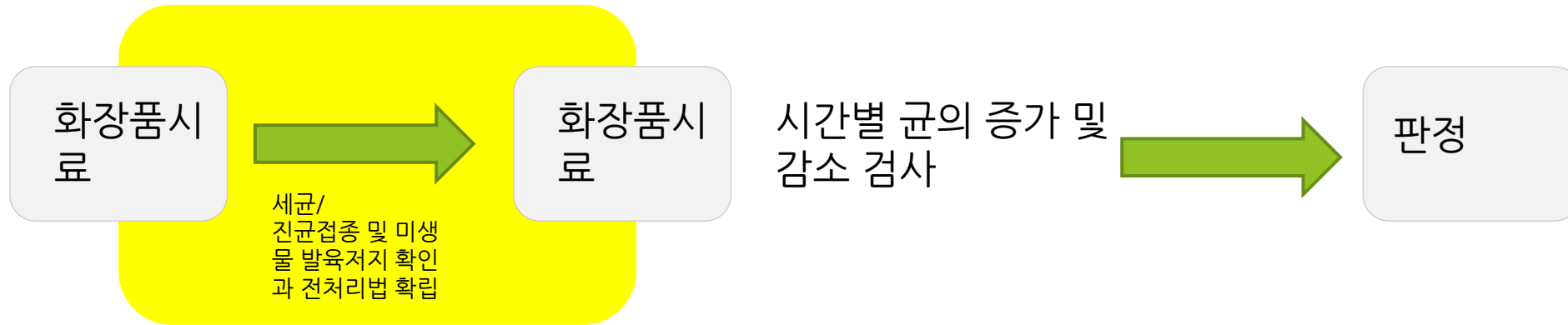
특정세균 시험법

D. 특정세균에 대한 배지의 적합성 및 시험방법의 타당성 시험



방부력 테스트

일반적인 실험 Process



방부력 테스트

방부력 테스트별 사용균주 비교

ISO 11930	SCCS	schülke KoKo Test	Ph. Eur. 7	USP 35	ASEAN
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 (CIP 82.118; NCIMB 8626; NBR 13275; KCTC 2513) <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 (CIP 4.83; NCIMB 9518; NRBC 13276; KTC 3881; NCTC 10788) <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 (CIP 53.126; NCIMB 8545; NBRC 3972; KCTC 2571; NCTC 12923) <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 (IP 48.72; NCPF 3179; NBRC 1594; KCTC 7965) <i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404 (IP 1431; IMI 149007; NBRC 9455; KCTC 6196)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> of an official reference stock in the EU <i>Staphylococcus aureus</i> of an official reference stock in the EU <i>Candida albicans</i> of an official reference stock in the EU <i>specific germs which are known to lead to spoilage of cosmetic products</i>	<i>Enterobacter gergoviae</i> ATCC 33028 <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229 <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4352 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 <i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 17397 <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 12633 <i>Kocuria rhizophila</i> ATCC 9341 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 <i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404 <i>Penicillium pinophilum</i> ATCC 36839	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027; NCIMB 8626; CIP 82.118 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538; NCTC 10788; NCIMB 9518; CIP 4.83 <i>Candida albicans</i> ATCC 10231; NCPF 3179; IP 48.72. <i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404; IMI 149007; IP 1431.83	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027; CIP82.118; or equivalent <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 (NCIMB 9518; CIP 4.83; NCTC 10788) <i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048 <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 (NCPF 3179; IP 48.72) <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404 (IMI 149007; IP 1431.83)

방부력 테스트

방부력 테스트별 시료 량, 균접종량, 시료에서 균수비교

	Sample size	Quantity of the inoculum	Germ counts of the inoculum	Germ counts in the cosmetic product
ISO 11930	20g or 20ml	1%	$10^7 - 10^8$ cfu/ml bacteria $10^6 - 10^7$ cfu/ml fungi	$10^5 - 10^6$ cfu/ml bacteria $10^4 - 10^5$ cfu/ml fungi
schülke KoKo Test	25g	0.4% each inoculation (2.4% at 6 inoculations)	$10^8 - 10^9$ cfu/ml bacteria $10^6 - 10^7$ cfu/ml fungi	$4 \times 10^5 - 4 \times 10^6$ cfu/g bacteria per inoculation $2.4 \times 10^6 - 2.4 \times 10^7$ cfu/g bacteria at 6 inoculations $4 \times 10^4 - 4 \times 10^5$ cfu/g fungi per inoculation $2.4 \times 10^5 - 2.4 \times 10^6$ cfu/g fungi at 6 inoculations
schülke KoKo Test (adapted 01/06/2012)	25g	0.4% each inoculation (2.4% at 6 inoculations)	$10^7 - 10^8$ cfu/ml bacteria $10^6 - 10^7$ cfu/ml fungi	$4 \times 10^4 - 4 \times 10^5$ cfu/g bacteria per inoculation $2.4 \times 10^5 - 2.4 \times 10^6$ cfu/g bacteria at 6 inoculations $4 \times 10^4 - 4 \times 10^5$ cfu/g fungi per inoculation $2.4 \times 10^5 - 2.4 \times 10^6$ cfu/g fungi at 6 inoculations
Ph. Eur. 7	original container	$\leq 1 \%$	$\sim 10^8$ cfu/ml	$10^5 - 10^6$ cfu/ml
USP 35	original container	0.5 – 1.0%	$\sim 10^8$ cfu/ml	$10^5 - 10^6$ cfu/ml
ASEAN	100g	1%	$\sim 10^8$ cfu/ml bacteria $\sim 10^7$ cfu/ml yeast and fungi	$\sim 10^6$ cfu/ml bacteria $\sim 10^5$ cfu/ml yeast and fungi
CTFA / M-3	final package	$\leq 1 \%$	$\sim 10^8$ cfu/ml bacteria $\sim 10^7$ cfu/ml yeast $\sim 10^7$ cfu/ml mold spores	1×10^6 cfu/ml bacteria 1×10^5 cfu/ml yeast 1×10^5 cfu/ml mold spores
CTFA / M-4	final package	0.1 to 1.0 %	has to be adapted to the quantity of inoculum	1×10^6 cfu/ml bacteria 1×10^5 cfu/ml yeast 1×10^5 cfu/ml mold spores

시료량 : 20g

접종량: $10^7 \sim 10^8$ cfu

CTFA M-3 » A Method for Preservation Testing of Water-Miscible Personal Care Products« (6)

• CTFA M-4 » Method for Preservation Testing of Eye Area Cosmetics« (6).

방부력 테스트

결과 해석 및 허용기준

	Criteria	Log Reduction		
		7 d	14 d	28 d
Bacteria	A	≥ 3	≥ 3 + no increase	≥ 3
	B	Not performed	≥ 3	≥ 3 + no increase
<i>C. albicans</i>	A	≥ 1	≥ 1 + no increase	≥ 1 + no increase
	B	Not performed	≥ 1	≥ 1 + no increase
<i>A. brasiliensis</i>	A	Not performed	≥ 0	≥ 1
	B	Not performed	≥ 0	≥ 0 + no increase

Table 5 ISO 11930 / Criteria of acceptance

	Log Reduction	
	14 d	28 d
Bacteria	> 2	No increase
Fungi	No increase	No increase

Table 8 USP 35 / Criteria of acceptance

허용기준

- 세균: 7일 이내 99.9 % 감소
- 진균: 7일 이내 90% 감소