

에멀전 제형에서 수종의 폴리올이 방부 시스템에 미치는 영향

조완구[†]·조영진^{*}

[†]전주대학교 대체의학대학 대체건강관리학부

^{*}아이리스(주)

(2008년 8월 5일 접수 ; 2008년 11월 28일 채택)

Effects of Various Polyols on Antiseptic System in Emulsions

Wan-Goo Cho[†]· Young-Jin Cho^{*}

[†]College of Alternative Medicine, Jeonju University, Hyoja-dong, Wansan-gu, Jeonju, Cheonbuk, 560-759, Korea

^{*}Iris Ltd., 932-1, Tae Gock -ri, Buk-Myon, Jeongeup, Cheonbuk, 580-812. Korea

(Received August 5, 2008 ; Accepted November 28, 2008)

Abstract : It is inevitable to use chemical germicidal agents like paraben, imidazolidinyl urea and phenoxyethanol to preserve the emulsions which is usually used in cosmetics. Although these chemical preservatives are good enough to reduce the microbiological contamination, they are irritative, allergenic to the skin. Several kinds of polyols are used in cosmetics as moisturizer and solvent. In this study, we evaluate the effects of polyols on anti-microbial activities, safety and resistant index. MIC(minimal inhibitory concentration) of polyols determined against 6 germs including *Staphylococcus aureus*. The order of MIC was PG \cong DPG \cong 1,3BG > HG > 1,2-PD > 1,2-HD \cong 1,2-OD. The 2~3 wt% of 1,2-HD(hexanediol) shows good anti-microbial effects in emulsions without allergenic response. Resistant index of 1,2-HD was less than 2 and this value was smaller than that of chemical preservatives. The mechanism of antimicrobological effect might be disturb the membrane of germs by investigating using electron microscope. Added to that, using this paradigm, low preservative contents, paraben-free system, and even preservative-free systems can be expected from these results.

Keywords : polyol, preservative, emulsion, cosmetic, safety, germicidal

1. 서론

화장품 등의 제품에 다양하게 이용되는 에멀

전 제형은 미생물 등의 영양원이 될 수 있는 성분을 다수 함유하고 있어서 제품에 곰팡이가 피거나 세균에 의해 부패될 수 있다. 제조 시 미생물에 대한 오염은 불결한 상태에서의 제조를 의미하며 시간에 따른 악화나 그에 따라 수반되는 피부 자극의 발생 등 다양한 문제를 유

[†] 주저자 (e-mail : wgcho@jj.ac.kr)

발하며 이를 방지하기 위하여 방부제를 사용하고 있다[1-4].

방부제는 화장품 등 에멀전 제형에 배합되어 외부로부터 오염되는 미생물의 증식을 억제하며, 경시적으로 사멸시켜 제품의 열화를 방지하는 목적으로 사용된다. 이와 같이 미생물의 증식을 억제하는 작용을 정균작용이라 하며, 방부제는 화장품 중에서 정균작용을 함으로써 제품이 변질되는 것을 방지하고 있다. 단독으로 사용되는 방부제의 효과는 별로 강하지 않지만化粧品の 성분과 융합되기 쉬어, 오염된 각종의 미생물을 시간에 따라 사멸시키므로 추가로 방부제를 첨가하는 것이 일반적이다. 대표적인 것은 파라옥시안식향산에스테르로 일반적으로 파라벤(paraben)이라고 부르며 이미다졸리디닐우레아, 페녹시에탄올 등의 화학 방부제가 혼합되어 있다.

화장품 자체의 안전성은 대개 충분한 시험을 거치기 때문에 크게 문제가 되는 경우는 많지 않으나 방부제 등의 원료는 화장품 원료 중 부작용 유발 가능성이 높은 것으로 알려진 대표적인 성분이다[5-7].

최근 방부제의 동향을 살펴보면 파라벤류의 환경 호르몬 가능성과 포름알데하이드 방출류의 방부제의 피부 안전성 문제 제기 등으로 인하여 피부에 안전한 새로운 방부시스템에 대한 요구가 증가되고 있다. 또한 천연 화장품, 자연주의 화장품 등 Well-being 제품들이 시장에 많이 출시되면서 화학 방부제를 배제하고 있으나 이들 제품도 실제로는 화학 방부제를 사용하고 있는 것이 대부분이다[8].

글리세린(GL), 프로필렌글리콜(PG), 디프로필렌글리콜(DPG), 1,3-부틸렌글리콜(BG), 등의 폴리올류는 항균력이 있는 것으로 보고되고 있다[9]. Table 1에 MIC 값을 나타냈다. 폴리올류는 에멀전 제형에서 보습제와 용매로도 사용되

고 있으며 그 사용이 증가하고 있다. 그러나 이들 폴리올류도 함량에 따라 피부 자극성을 유발할 수 있으며 피부에 사용하는 제품의 경우 사용감을 저하 시키는 등의 문제점을 내포하고 있다.

본 연구에서는 헥실렌글리콜(HG), 1,2-헥산디올(HD), 1,2-펜탄디올(PD), 1,2-옥탄디올(OD) 등을 포함한 다양한 폴리올류의 방부력에 미치는 영향을 조사하고 피부 자극성 정도와 폴리올의 방부력 기작 등을 연구하고자 하였다. 이들 결과는 향후 방부제를 사용하지 않는 에멀전 제품을 개발하는데 도움을 줄 것으로 기대한다.

2. 실험

2.1. 실험 재료

2.1.1. 시험 균주

사용된 세균의 균주는 *Staphylococcus aureus*(*S. aureus*, 화농균) ATCC 6538, *Escherichia coli*(*E. coli*, 대장균) ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*, 녹농균) ATCC 15522, *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*, 여드름균) ATCC 6919, 진균의 균주는 *Candida albicans* (*C. albicans*, 칸디다균) ATCC 10231, *Aspergillus niger* (*A. niger*, 흑곰팡이) ATCC 9642를 각각 사용하였다.

2.1.2. 미생물 배지와 배양조건

사용된 미생물 배지와 배양조건을 Table 2에 나타내었다.

2.1.3. 재료

글리세린, 1,3-부틸렌글리콜 등의 폴리올류는

Table 1. MIC of polyols(wt %).

Strains	Glycerin	1,3-Butylene	Propylene	Dipropylene
		Glycol	Glycol	Glycol
<i>S. aureus</i>	35	14	16	14
<i>P. aeruginosa</i>	40	10	10	10
<i>E. coli</i>	28	10	10	8
<i>C. albicans</i>	30	10	14	14
<i>A. niger</i>	40	14	16	18

Table 2. Culture conditions of microbiological strains.

	Culture conditions	
	Bacteria	Yeast & Mold
Culture media	Brain Heart Infusion Broth (Difco Co.)	Sabouraud Dextrose Broth (Difco Co.)
Culture time & Temp.	24 hrs, 35 °C,	48 hrs, 30 °C(<i>C. albicans</i>) 5 days, 30 °C(<i>A. niger</i>)
Microorganism suspension liq.	0.85% Sodium chloride	0.85% Sodium chloride, 0.05% Polysorbate 80

Table 3과 같이 사용하였으며 그 외 시약은 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 특급 및 1급 시약들을 사용하였다. 증류수는 Milli Q(Millipore Co., Milford, MA, USA)에서 18MW-cm로 통과시킨 것을 사용하였다.

Alamar Blue를 이용하여 육안으로 색 변화를 관찰하여 수행하였다. 세균과 칸디다균은 청색에서 핑크색으로 변화가 일어나지 않는 가장 낮은 농도, 곰팡이의 균사가 생성 되지 않는 가장 낮은 농도를 MIC로 정하였다.

Table 3. Polyol description.

Materials	Manufacturer
Propylene glycol	Sigma-Aldrich, Korea
Dipropylene glycol	Nikko Chem., Japan
1,3-Buthylene glycol	Maruzen Pharm., Japan
Hexylene glycol	Sigma-Aldrich, Korea
Glycerin	LG H&H, Korea
1,2-Pentandiol	Sigma-Aldrich, Korea
1,2-Hexanediol	Sigma-Aldrich, Korea
1,2-Octanediol	Sigma-Aldrich, Korea

Table 4. Composition of emulsions.

	Materials	wt %
1	D.I. Water	to 100
2	Preservatives	q.s.
3	Glycerin	4.0
4	Carboxy Vinyl Polymer	0.2
5	Triethanolamine	0.4
6	Liquid Paraffin	5.0
7	Cetyl Octanoate	4.0
8	Caprylic/capric Triglyceride	4.0
9	Cetyl Alcohol	1.5
10	Stearyl Alcohol	1.5
11	Stearic acid	2.0
12	PEG-40 Stearate	2.5
13	Sorbitan Stearate	1.0

2.2. 실험 방법

2.2.1. 에멀전 제조

에멀전은 유상과 수상을 각각 75 °C로 가열 용해하여 혼합 유화 후 실온으로 냉각하여 견본 시료로 사용하였다. Table 4에 에멀전의 조성을 나타냈으며 Table 5에 에멀전의 방부제 조성과 폴리올의 조성을 나타내었고 편차 부분은 증류수로 보정하였다.

2.2.2. 항균력 평가

항균력 평가는 broth 희석 방법으로 진행하여 MIC(minimal inhibitory concentration)를 결정하였다. 시험 균 주 6종에 대하여 2.1.2.의 배양조건으로 미생물을 준비하였다. 96-well plate를 사용하여 항균 활성을 평가하였으며 판정은

2.2.3. 방부력 실험 (Challenge test)

방부력 시험은 CTFA 기준 방법으로 진행하였다[4]. 미생물 현탁액에 세균과 진균을 혼합하여 미생물 접종액을 준비하고 세균은 10^9 , 진균은 10^8 CFU/ml 이 되도록 접종액의 농도를 맞추어 준다. 50 g의 시료에 세균과 진균 현탁액을 각각 0.1 ml씩 접종한 후 잘 섞어 접종한 후 일주일 간격으로 시료를 채취하여 생균수를 검사한다. 세균은 Soytone Dextrose Casitone Agar 배지, 진균은 Sabouraud Dextrose Agar에 배양한 후 균수를 측정하였다.

Table 5. Composition of preservatives.

Emulsion number	Materials
1	Methyl paraben 0.25, Ethyl paraben 0.07%
2	Methyl paraben 0.25, Ethyl paraben 0.1, Propyl paraben 0.07%
3	1,2-Hexanediol 1%
4	1,2-Hexanediol 2%
5	1,2-Hexanediol 1%, GL 0.5%
6	1,2-Hexanediol 1%, 1,2-pentanediol 2%
7	1,2-Hexanediol 1%, 1,2-pentanediol 2%, GL 0.5%
8	No preservative
9	1,2-Hexanediol 3%

2.2.4. 내성지수 평가

내성 지수는 방부제가 존재하는 액상 배지에서 내성에 의해 균 성장이 일어난 최종 방부제 농도를 내성 없이 성장한 균의 방부제 농도의 최고값으로 나눈 비율로 결정하였다[10]. 내성 지수는 미생물이 방부제에 내성(적응)을 나타낼 수 있는 가능성이며 최소값은 1이고 내성지수 값이 커질수록 미생물이 내성을 나타낼 가능성이 커진다.

$$\text{내성 지수} = \frac{\text{내성 유발 후 성장한 균의 최종 농도}}{\text{내성 유발 전 성장한 균의 최종농도}}$$

예를 들면 1차 실험에서 미생물이 성장한 최고농도는 0.2%이며 이 농도에서 자란 균을 다음 단계의 방부제 용액에 접종균으로 사용하여 내성을 유발한 결과 균의 내성 유발로 인한 최고 성장 농도는 0.6%로 가정하면 내성지수는 $3(0.6/0.2)$ 으로 하였다.

2.2.5. 피부 안전성 평가

세포독성 시험은 V79-4 세포(Chinese hamster, continuous cell line of tissue

fibroblast)를 배양하여 MTT 시험으로 실시하였다[11]. 알러지 시험은 LLNA(local lymph node assay)법을 이용하였다. 원료를 에탄올에 2.0, 6.0, 10.0 wt%의 농도로 희석하여 마우스의 귀를 이용하여 대조군과의 증폭 정도로 평가하였다[12].

2.2.6. 항균 작용 기작 평가

1,2-헥사메틸렌글리콜의 항균 작용 기작을 확인하기 위하여 전자 현미경(Transmission Electron Microscope) 측정을 활용하였다. 균주를 37 °C에서 12시간 혼합 배양한 후 원심 분리하여 시료를 준비하였다. 1,2-헥사메틸렌글리콜과 세균을 혼합하여 3 wt% 글루탈알데하이드로 분산한 후 최종적으로 오스뮴테트라옥사이드로 고정 후 현미경 사진을 측정하였다.

2.2.7. 통계 처리

각 데이터의 통계처리는 Minitab 14 프로그램을 사용하여 진행하였다.

2.3. 실험장치

에멀전 제조를 위한 교반기는 호모믹서(TK-25, TK)와 전자현미경(LEO-912AB Omega, LEO)를 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 항균력 평가

화장품 원료 중에서 보습제로 사용되는 폴리올, 7종에 대하여 항균력 평가를 수행하였다. Table 6의 결과와 같이 MIC 값은 $PG \cong DPG \cong 1,3BG > HG > 1,2-PD > 1,2-HD \cong 1,2-OD$ 의 순서를 보였다. 다양한 폴리올 중 1,2-PD, 1,2-HD, 1,2-OD의 항균력이 우수하였다. 이들 원료는 세균과 진균에 대하여 모두 우수한 항균력을 나타냈다. 특히, 1,2-HD과 1,2-OD는 방부제 수준의 항균력을 보였다. 일반적으로 항균력이 보고되고 있는[13-14] PG의 경우 MIC 값이 10 정도를 보였다.

3.2. 피부 안전성 평가

1,2-HD는 PG 등에 비해 세포독성은 높으나 피부에 안전한 수준이며 알러지에 대해 음성으로 평가되었다. 1,2-OD는 우수한 항균력에도

Table 6. MIC of polyols.

	PG	DPG	1,3BG	HG	1,2-PD	1,2-HG	1,2-OD
<i>S. aureus</i>	15	15	15	7.5	3.75	1.87	0.31
<i>P. aeruginosa</i>	7.5	5	5	1.87	1.87	0.62	0.31
<i>E. coli</i>	10	7.5	10	3.75	1.87	0.94	0.16
<i>C. albicans</i>	15	15	10	7.5	2.5	0.94	0.16
<i>A. niger</i>	15	15	10	5	1.87	0.62	0.08
<i>P. acnes</i>	15	15	15	5	3.75	1.25	-

불구하고 알리지 유발 위험이 있는 것으로 판명되어 화장품 원료로 적합하지 않은 것으로 평가되었다(Table 7). 1,2-PD는 1,2-HD에 비하여 항균력은 떨어지나 피부에 대한 안전성은 우수한 것으로 확인되었다. 1,2-HD와 1,2-PD는 피부에 안전한 것으로 확인되었으므로 인체에 사용하는 제품의 에멀전 제형에 사용할 수 있다.

Table 7. Toxicity of polyols.

	Cell toxicity(IC50)*	Allergy
1,2-Hexanediol	0.1%	negative
1,2-Octanediol	-	+ EC : 30.26
1,2-Pentanediol	0.5%	negative
Hexylene glycol	5.0%	negative
Dipropylene glycol	5.0%	negative
1,3-Butylene glycol	5.0%	negative
Propylene glycol	5.0%	negative

*SLS(표준대조군) : 0.005%

3.3. 하이드록실기의 위치에 따른 항균력

HD는 하이드록실기의 결합 위치에 따라 다양한 이성질체가 존재한다. 그 중에서 2,5-HD, 1,5-HD, 1,6-HD, 1,2-HD의 4가지 이성질체에 대하여 항균력 평가를 수행한 결과 1,2-HD의 항균력이 가장 우수하였다(Table 8). 극성을 띠는 하이드록실기가 같은 방향의 배향성을 가지고 있는 경우에 항균력이 우수하게 나타나는 경향을 보였다. 하이드록실기가 같은 방향의 배향성을 가지고 있는 1,2-HD의 항균력이 가장 좋았고, 작용기가 서로 대칭되는 위치에 존재하는 2,5-HD의 항균력이 가장 약하게 나타났다.

Table 8. MIC of hexanediols varying the conformation of hydroxyl groups.

	2,5-HD	1,5-HD	1,6-HD	1,2-HD
<i>S. aureus</i>	5	3.75	2.5	1.87
<i>P. aeruginosa</i>	1.87	1.87	1.87	0.62
<i>E. coli</i>	5	3.75	3.75	0.94
<i>C. albicans</i>	7.5	5	3.75	0.94
<i>A. niger</i>	7.5	3.75	2.5	0.62
<i>P. acnes</i>	3.75	3.75	1.87	1.25

3.4. 방부력 평가

1,2-HD를 포함한 폴리올의 에멀전 제형에서의 방부력을 비교하기 위하여 기존 제품의 방부제 시스템과 challenge test를 수행하였다. 방부제와 폴리올을 포함한 에멀전의 제조 직후 세균과 진균을 각각 접종하고 경시에 따른 균수를 세어 균의 감소 효과를 본 결과 1,2-HD 3% 수준에서는 메틸파라벤 등의 화학방부제를 첨가한 시료와 동등 이상의 방부력을 보였다(Table 9).

3.5. 내성 지수 평가

1,2-HD는 1.3이하의 낮은 내성지수를 나타냈다. 방부제 중에서 내성지수가 가장 낮은 페녹시에탄올보다 작게 평가되었다(Table 10). 1,2-HD를 방부제로 사용했을 경우 방부제에 대한 세균의 내성 때문에 발생하는 미생물 오염이 매우 감소할 것으로 생각된다. 특히 내성지수가 낮은 페녹시에탄올과 함께 사용할 경우 큰 효과를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

3.6. 폴리올의 항균 작용 기작

폴리올류의 세균에 대한 항균 기작을 추정하기 위하여 전자 현미경을 사용하여 관찰하였다. *S. aureus*와 *P. aeruginosa*를 1.0 wt%의 1,2-HD 처리 전과 처리 1시간 후의 상태를 관

Table 9. Microbial reduction against time varying composition of preservatives.

Inoculation germ	Emulsion number	initial	1 day	2 days	7 days	14 days	21 days	28 days
bacteria	1	4.6×10^6	4.4×10^4	2.6×10^2	< 20	< 20	< 20	< 20
	2	4.6×10^6	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
	3	4.6×10^6	10^5	10^5	4.4×10^2	< 20	< 20	< 20
	4	4.6×10^6	20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
	5	4.6×10^6	2.2×10^3	10^3	< 20	< 20	< 20	< 20
	6	4.6×10^6	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
	7	4.6×10^6	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
	8	4.6×10^6	10^{5-6}	10^{5-6}	10^5	10^5	2.8×10^4	10^3
	9	10^6	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
yeast & mold	1	10^5	10^5	10^5	10^4	< 20	< 20	< 20
	2	10^5	10^5	10^3	< 20	< 20	< 20	< 20
	3	10^5	10^5	10^4	10^4	10^4	10^4	10^{3-4}
	4	10^5	10^5	10^4	10^3	1.8×10^2	< 20	< 20
	5	10^5	10^5	10^4	10^4	10^4	10^4	10^4
	6	10^5	10^5	10^4	10^4	8.4×10^2	80	< 20
	7	10^5	10^3	10^4	10^3	1.4×10^2	< 20	< 20
	8	10^5	10^5	10^5	10^5	10^5	10^5	10^5
	9	10^5	2.4×10^4	10^3	20	< 20	< 20	< 20

Table 10. Resistant index of preservatives.

Preservative	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Methylchloroisothiazolinone	8.3	16.7	16.7
2-Bromo-2-Nitropropane-1,3-diol	12.2	9.7	9.7
Triclosan	11.7	1.5	-
DMDM Hydantoin	4.1	5.1	4.1
Isopropyl Butylcarbamate	2.7	1.9	-
Methyl Paraben	4.0	1.4	7
Imidazolidinyl Urea	3.6	4.6	4.2
Polyaminopropyl Biguanide	2.2	1.1	1.3
Phenoxyethanol	1.5	1.6	1.4
1,2-Hexanediol	1.3	1	1.3

찰하였다(Fig. 1과 Fig. 2). 처리 전후에서 외부 수분 유입 및 세포벽 파열, 세포질 유출 등이 관찰되었으며 이는 폴리올류가 세포질 용해 후 세포벽이 파열 되는 것에 관여하는 것으로 추정된다.

4. 결론

에멀전 제형의 보존 안정성을 위해서는 방부제를 사용하며 이들 방부제는 피부에 사용하는

제품의 경우 피부 자극성과 알러지 유발의 가능성이 높다. 방부제를 대체하기 위해 다양한 폴리올의 MIC 값을 측정하여 비교한바 PG의 경우 10.0 % 정도를 보였고 대체적인 항균력은 $PG \cong DPG \cong 1,3BG > HG > 1,2-PD > 1,2-HG \cong 1,2-OD$ 의 순서를 보였다. 1,2-HD은 PG 등에 비해 세포독성은 높으나 피부에 안전한 수준이며 알러지 음성으로 평가되었다. 1,2-HD는 세균과 진균에 대하여 기존 화학 방부제와 동등 수준의 항균력을 나타냈으며, 세균의 세포벽과 세포막에 작용하는 물질이므로 오

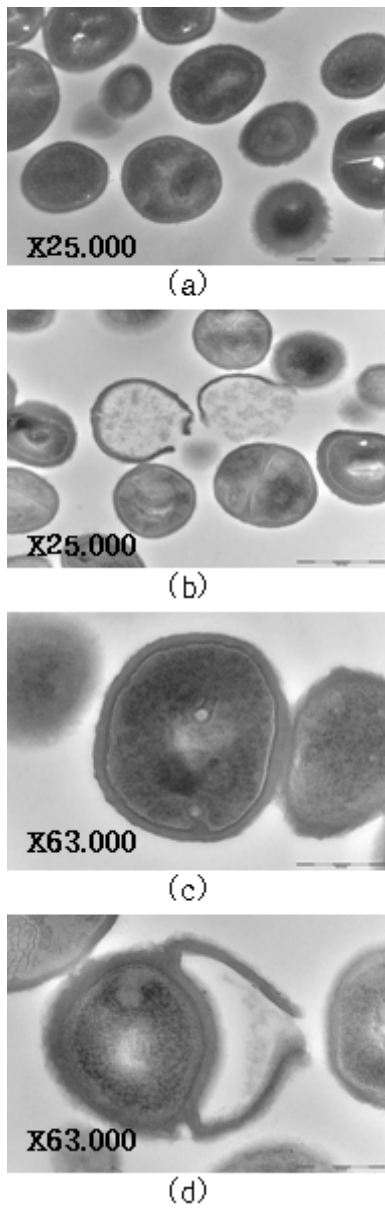


Fig. 1. TEM Morphology of *S. aureus*; (a) before treating 1,2-hexandiol(x25,000), (b) after treating 1.0 wt % of 1,2-hexandiol(x25,000), (c) before treating 1,2-hexandiol(x63,000), (d) after treating 1.0 wt % of 1,2-hexandiol(x63,000).

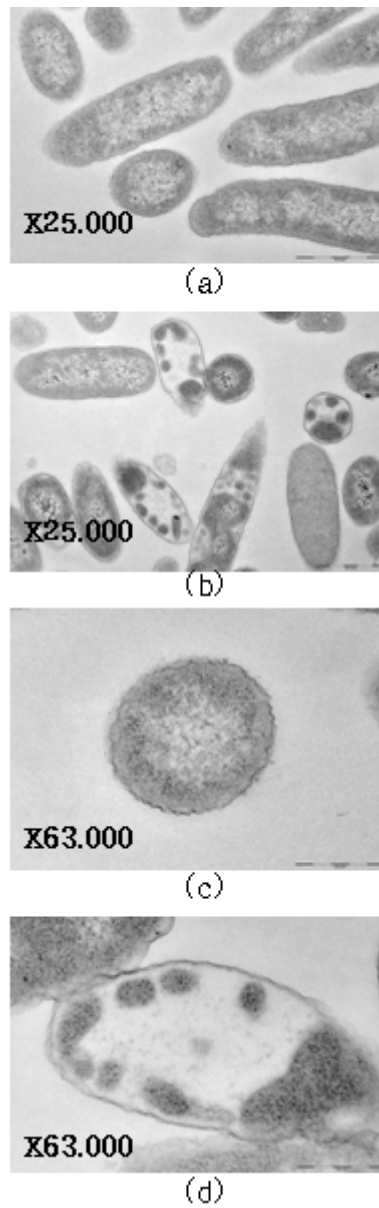


Fig. 2. TEM Morphology of *P. aeruginosa*; (a) before treating 1,2-hexandiol (x25,000), (b) after treating 1.0 wt % of 1,2-hexandiol(x25,000), (c) before treating 1,2-hexandiol(x63,000), (d) after treating 1.0 wt % of 1,2-hexandiol(x63,000).

염균의 내성 유발이 적은 향균제이다. 1,2-HD를 방부제로 사용할 경우 내성균의 발생으로 인한 미생물 오염이 감소하게 됨으로써 유용한 제품 품질 보전, 저자극 제품에 대한 소비자 신뢰 확보, 미생물 오염으로 인한 제품 폐기 비용 절감 등의 효과를 기대할 수 있다.

감사의 글

이 논문은 2008년도 중소기업청 산학연 공동 기술개발지원사업(과제번호 000265470108)으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. K. H. Shin, I. Y. Kwack, S. W. Lee, K. H. Suh, S. J. Moon and I. S. Chang, Effects of Polyols on Antimicrobial and Preservative Efficacy in Cosmetics, *J. Soc. Cosmet. Sci., Korea*, **33(2)**, 111 (2007).
2. T. Kinnunen and M. Koskela, Antimicrobial and antifungal properties of propylene glycol, hexylene glycol and 1,3-butylene glycol *in vitro*, *Acta. Derm. Venereo.*, **71(2)**, 148 (1991).
3. E. Y. Lee, D. W. Choi, S. J. Moon, I. S. Chang and H. C. Eun, A Study of Influencing Factors for Sensory Irritation Due to Preservatives of Cosmetics, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **32(1)**, 65 (2006).
4. G. S. Chung, Inactivation of the Preservative in Cosmetic by the Addition of Inorganic Powder, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **11(1)**, 13 (1985).
5. H. J. Kim and S. B. Kim, The Effect of Corrosion Inhibitors on Antimicrobial Activity of Biocide in Water-soluble Cutting Fluid, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **18(5)**, 393 (2003).
6. S. J. Kim and H. D. Hwang, Viability Change of *Mycobacterium Tuberculosis* in the Sputum Specimens Stored at Different Temperatures with or without Preservatives, *J. Korean Soc. Microbiol.*, **21(4)**, 435 (1986).
7. H. J. Kim and M. R. Kim, Consumers' Attitude to Purchase Foods and Analysis of Factors to Distinguish Acceptor Groups, *Korean J. Dietary Culture*, **14(4)**, 289 (1999).
8. C. N. Smith and B. R. Alexander, The Relative Cytotoxicity of Personal Care Preservative Systems in Balb/C 3T3 Clone A31 Embryonic Mouse Cells and the Effect of Selected Preservative Systems upon the Toxicity of a Standard Rinse-off Formulation, *Toxicology in Vitro*, **19**, 963 (2005).
9. A. Curry and G. N. Jr. McEwen, "Microbiology Guidelines", CTFA Quality Assurance Guidelines, October 24, (2005).
10. M. C. Otero and M. E. Nader-Macias, Inhibition of *Staphylococcus aureus* by H₂O₂-producing *Lactobacillus Gasseri* Isolated from the Vaginal Tract of Cattle, *Animal Reproduction Science*, **96**, 35 (2006).
11. J. K. Lee, T. J. Kim, B. H. Kim, S. Y. Kim, J. S. Hah, J. H. Kim and J. R. Kim, Involvements of Oxidative Stress in β -amyloid Peptide-induced Cytotoxicity in PC12 Cells, *J. Korean Neurol. Assoc.*, **21(4)**, 401 (2003).
12. I. Kimber and D. A. Basketter, The Murine Local Lymph Node Assay: A Commentary on Collaborative Studies and New Directions, *Fd. Chem. Toxicol.*, **30**, 165 (1992).
13. I. Olitzky, Antimicrobial Properties of Propylene Glycol Based Topical Therapeutic Agent, *J. Pharm. Sci.*, **54(5)**, 787 (1965).
14. J. J. Zeelie and T. J. McCarthy, Effects of Copper and Zinc Ions on the Germicidal Properties of Two Popular Pharmaceutical Antiseptic Agents Cetylpyridinium Chloride and Povidone-iodine, *Analyst*, **123**, 503 (1998).