

비이온 界面 活性劑가 化粧品의 防腐力에 미치는 影響

최 중 완
한국화장품(주) 기술개발연구

The effect of nonionic surfactants on the antimicrobial activity of preservatives in cosmetic products

J.O. Choi
Hankook cosmetics R & D Cente

요 약

방부제와 계면활성제를 혼합 사용하였을 경우 미생물에 대한 방부력 변화를 검토하고자 Imidazolidinyl urea, Methylparaben, Imidazolidinyl urea와 Methylparaben 혼합체 3종의 농도에 따른 각 농도별 계면활성제 Tween 20, Tween 60, Tween 80의 첨가가 *S. aureus* ATCC E. coli ATCC 10536, *P. aeruginosa* NCTC 10490에 대한 방부력에 미치는 영향을 실험하였으며, 아울러 제품내에서 Tween 60 계면활성제 농도에 변화를 주었을때의 방부력 변화를 조사하였다.

1. *S. aureus* ATCC 6538 Methylparaben과 Imidazolidinyl urea 혼합체에 대해 내성을 전혀 갖지 않았다.
2. *E. coli* ATCC 10536은 Methylparaben에 대하여 내성을 전혀 갖지 않았다.

3. Methylparaben과 Imidazolidinyl urea 혼합체는 Gram 음성균, Gram 양성균에 넓은 항균 spectrum을 나타냈다. 즉, 방부제는 단일 사용시보다 혼합 사용시 상승효과를 가졌다.

4. Imidazolidinyl urea는 Polyoxyethylene(20) Sorbitan fatty acid ester류에 의해 전혀 방부력에 영향을 받지않는 반면에 시험균주 3종에 대해 내성이 잘 되었다.

5. Methylparaben은 Polyoxyethylene(20) Sorbitan fatty acid ester류에 의해 불활성화가 큰 폭으로 나타났다.

6. 방부제 Methylparaben 0.2%를 함유하는 제품에 비이온 계면활성제 Tween 60의량을 0.5, 1.0, 2.0%로 달리 첨가하였을시 D-value는 제품내 비이온 계면활성제 Tween 60의 량이 증가할수록 비례하여 커졌다. 즉, 비이온 계면활성제 Polyoxyethylene(20) Sorbitan monostearate에 의해 Methylparaben이 제품내에서도 불활성화 되었다.

서 론

화장품은 천연물 기원의 영양성분과 미생물에 의해 변화되기 쉬운 원료가 많이 사용되고 있는 관계로 인하여 시장에서 유통중 또는 소비자가 사용중에 곰팡이, 효모, 세균 등의 미생물에 의해 오염 및 증식되기 쉬우므로 이와같은 미생물의 성장을 억제하기 위하여 방부제를 첨가하며, 첨가되는 방부제의 종류와 농도는

방부력 실험에 의하여 결정되어진다.

방부제를 일정한 수준으로 사용하여 약간의 미생물의 성장을 억제한다는 것은 가능할지 모르나, 특정 방부제가 모든 곰팡이, 효모, 세균을 공통적으로 억제시킬 수 있는 항미생물적 활성을 충분히 가지고 있지 않기때문에 이로 인하여 적정량 이상의 방부제를 첨가한다는 것은 사용시 피부위 부작용 및 제품 안정성면에서 문제점을 야기시키므로 화장품 처방중의 영양성분의 배합, pH, 유화형태, 방부제의 combination 및 그 안정성을 고려하여 각 제품별로 적당한 방부체계를 선택하여 사용하여야 하는 것은 매우 중요한 일이다(1).

이와같은 원인에 기인하여 적절한 방부체계를 찾는 데 대한 실험보고는 많다. 그중에서 본 논문과 관련있는 실험으로 Orth 등(2-5)의 특정 세균을 사용하여 여러종류의 화장품에 방부제를 단일 또는 혼합 사용시 이상적인 배합비율 등에 대한 논문과 화장품에서 주로 검출되는 미생물에 대한 방부제의 최소 저지농도 (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) 및 내성시 최소 저지농도를 페놀성 산화방지제를 사용하여 실험을 수행한 McCathy(6)의 보고가 있으며, DeNavarre(7-11) 등은 Polysorbate 80에 의한 방부제의 불활성화에 대하여 다수 논문을 발표했다. 또한, Rieger 등(12)은 Emulsion 내에서 phenolic 방부제의 불활성화에 대하여 보고하였다.

본 논문에서는 화장품 제조에 필수불가결한 원료인 계면활성제중 많이 사용되고 있는 비이온 계면활성제 Polyoxyethylene(이하 P.O.E로 약함) Sorbitan fatty acid ester 계통의 Hydrophilic Lipophilic Balance(이하 HLB로 약함) 치가 높은 P.O.E Sorbitan monolaurate, P.O.E Sorbitan monostearate 및 P.O.E Sorbitan monooleate 3종을 선정하고, 또한 1970년도 부터 점진적으로 사용회수가 많아지고 있는 Methyl *p*-hydroxybenzoate, Imidazolidinyl urea, Methyl *p*-hydroxybenzoate와 Imidazolidinyl urea를 1:1로 혼합한 방부제를 조제하여 본 방부제를 제품에 첨가하였을때 제품의 변질에 미치는 영향을 조사하였다.

실험재료 및 방법

1. 시험균주, 배지, 방부제 및 계면활성제

1.1. 시험균주

본 실험에 사용한 시험균주로는 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10490을 사용하였다.

1.2. 배 지

본 실험에 이용한 배지로는 DIFCO사 제품으로 Table 1과 같이 3종의 배지를 사용하여 시험균의 배양용 배지로 사용하였다.

1.3. 방부제

본 실험에 사용한 방부제로는 비교적 사용빈도가 많은 Methyl *p*-hydroxybenzoate (Methylparaben) : 和光工業(株) (일본)의 제품과 Imidazolidinyl urea (Germall-115) : Sutton Labs.(미국) 및 Methyl *p*-hydroxybenzoate와 Imidazolidinyl urea를 1:1로 혼합한 것을 사용하였다.

1.4. 계면활성제

본 실험에 사용한 계면활성제로는 P.O.E Sorbitan monolaurate (Polysorbate 20) : ICI Americas.(미국), P.O.E Sorbitan monostearate (Polysorbate 60) : Nikkol Chemicals.(일본), P.O.E Sorbitan monooleate (Polysorbate 80) : ICI Americas.(미국)를 사용하였다.

Table 1. The composition of medium (%)

	T. S. B	T. S. A	T. S. A. LT
Tryptone	1.7	1.5	1.5
Soytone	0.3	0.5	0.5
Dextrose	0.25	-	-
Sodium chloride	0.5	0.5	0.5
Dipotassium phosphate	0.25	-	-
Agar	-	1.5	1.5
Lecithin	-	-	0.07
Tween 80	-	-	0.5
D. W. (ml)	100	100	100
pH	7.3	7.3	7.3

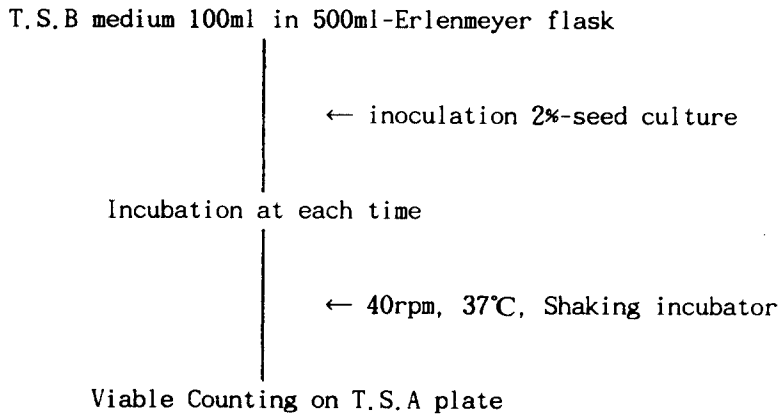
T. S. B = Trypticase Soy Broth

T. S. A = Trypticase Soy Agar

T.S.A.LT = Trypticase Soy Agar containing Lecithin and Tween 80

2. 시험균주의 최적 배양조건 측정

전술한 시험균 3종을 준비된 멸균한 T.S.A 사면배지에 접종하여 37°C, 24시간 배양한 후 이것으로부터 1백금이 균을 취하여 T.S.B 배지 30ml을 함유한 250ml-Erlenmeyer flask에 재접종하여 37°C에서 24시간 전배양 하였다. 시험균주의 최적 배양조건 측정실험에서는 T.S.B 배지 100ml을 함유한 500ml-Erlenmeyer flask에 2%의 전배양액을 접종한 후 37°C에서 40rpm으로 진탕배양하면서 6시간 간격으로 1ml씩 sampling하여 일정배울 희석한 후 T.S.A plate상에 도말, 배양한 후 평판위에 생성된 colony수를 측정하였다.



Scheme 1. Cultural condition of using Microorganisms.

3. 최소 저지농도 측정

3.1. 방부제의 최소 저지농도 및 내성 측정

시험균을 T.S.B에서 37°C, 20-24 hrs. 증균 배양한 후, T.S.A plate상에 이식하여 위와같은 조건에서 재배양한 T.S.A plate상으로부터 1백금이를 취하여 멸균된 생리식염수 10ml에 옮기고 혼합, 현탁시켜 접종액으로 하였다. 조제한 멸균된 T.S.B 시험관에 농도를 달리한 방부제를 첨가한 배지에 상기와같이 배양한 균액을 저농도 방부제가 첨가된 시험관에서부터 0.1ml씩 접종한 다음, 37°C에서 48시간 배양하여 방부제 농도에 따른 균의 성장정도를 배지의 혼탁도에 따라 판정하여 MIC를 조사하였다.

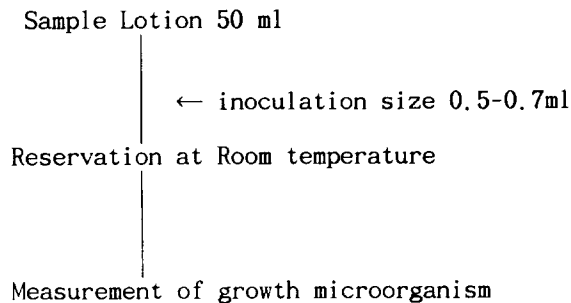
3.2. 계면활성제의 농도에 따른 MIC 및 내성 측정

시험균을 T.S.B 배지에서 37°C, 20-24hrs. 증균 배양한 후 T.S.A plate상에 2회에 걸쳐 위와같은 온도와 시간동안 재배양한 T.S.A plate상으로부터 1백금이를 취하여 멸균된 생리식염수 10ml에 옮기고 혼합, 현탁시켜 접종액으로 하였다. 선택된 방부제 농도를 멸균된 T.S.B 시험관에 가하고 재차 선택된 계면활성제 농도

를 멸균된 T.S.B 시험관에 가하여 각 농도별로 준비한 후, 상기 기술한 접종액을 저농도 방부제가 첨가된 시험관에서 부터 차례로 0.1ml씩 접종한 다음, 37°C에서 48시간 배양하여 방부제 농도에 따른 균의 성장 정도를 혼탁도에 따라 판정하여 MIC를 조사하였다.

4. 제품의 방부력 측정법

5°C에 보관중인 T.S.A 사면배지상의 균주를 1백금이 취하여 멸균된 T.S.B배지 10ml에 접종하고 37°C, 24시간 계대배양(3회)한 후, 원심분리기를 이용 10,000rpm, 15분간 원심분리한 후, 상등액을 제거하고 D.W.를 이용 2회 균체를 세척하여 D.W.를 가해 10ml를 만들어 접종액으로 사용하였다. 미리 준비한 50ml의 각 로션 제품에 상기 기술한 접종액을 1×10^6 /ml 정도로 접종될 수 있도록 첨가하였다. 이와같은 배양조건에서 *E.coli* 및 *S.aureus*의 경우에는 0.5ml를 첨가하였고, *P.aeruginosa*는 0.7ml를 접종한 후 Linear regression method에 따라 0, 2, 4, 24hr. 간격으로 경시적으로 1ml씩 Sampling하여 T.S.A.LT plate상에 발생하는 colony수를 측정하여 경과시간에 따른 접종균의 사멸율을 계산하여 방부력을 조사하였다.



Scheme 2. Preservative efficacy test of products.

실험 결과 및 고찰

1. 시험균주의 증식도

방부력 실험에 사용할 시험균주의 가장 활성이 강한 상태의 배양시간을 조사하기 위한 실험결과, 증식도는 Fig.1과 같다.

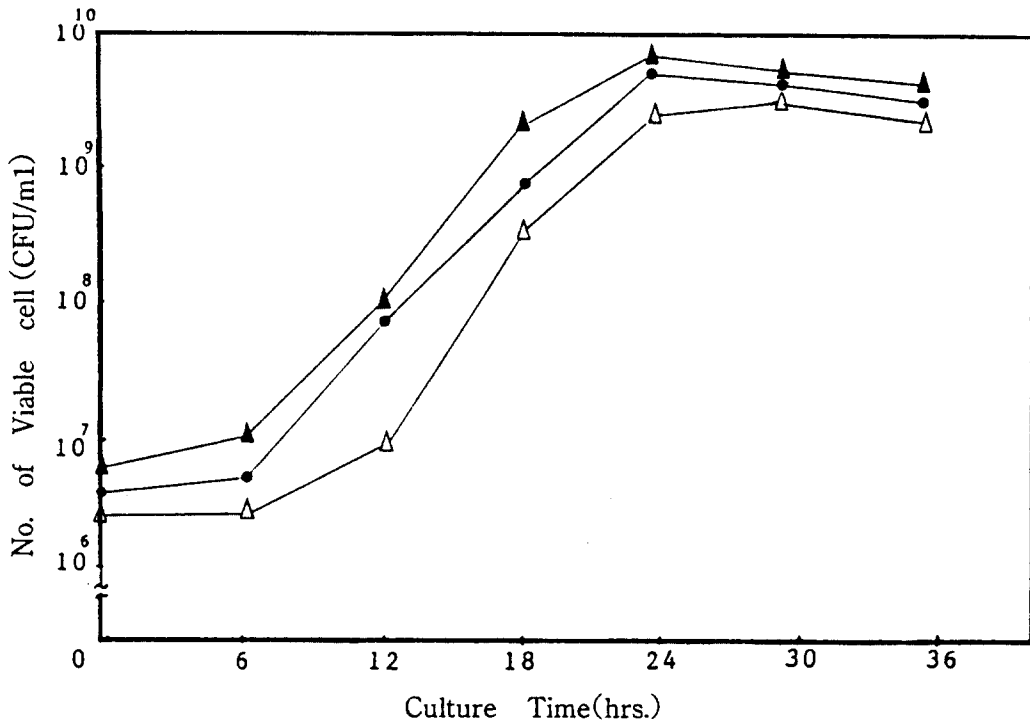


Fig.1 Growth Curves of test organisms

△—△ : *P. aeruginosa* ●—● : *E. coli* ▲—▲ : *S. aureus*

Fig.1 에서와 같이 *S.aureus* ATCC 6538은 유도기가 거의 없이 정상기에 도달하는데 소요되는 시간은 24hr.이었고, *E.coli* ATCC 10536은 유도기가 매우 짧았으며 대수증식기 및 정상기에 도달하는 시간은 24hr.이 소요되었으며, *P.aeruginosa* NCTC 10490은 유도기가 6hr.으로 타균에 비하여 길었으며, 도달하는 시간은 30hr.이 소요되었다. 따라서, 본 실험에서 가장 활성이 강한 상태의 대수기 중간부분인 *S.aureus* ATCC 6538과 *E.coli* ATCC 10536은 16hr., *P.aeruginosa* NCTC 10490은 18hr. 배양한 균을 접종균으로 사용하였다.

2. 계면활성제에 의한 방부력 변화

본 실험에서는 비이온 계면활성제중 HLB가가 높은 전술한 Polyoxyethylene Sorbitan fatty acid ester인 3종이 방부력에 미치는 변화를 조사했다.

본 실험에서 사용한 *S.aureus*, *E.coli*, *P.aeruginosa* 3종의 시험균주는 화장품 및 제약의 방부력 실험에 있어서 대표균주일 뿐만아니라 화장품, 제약에 있어서 규제대상 병원성 균주로 지정된 균주이다(13-15).

또한 방부제 사용 최고농도는 Nipa-M의 경우 0.3%, Germall-115는 0.4%로 안정성을 고려한 화장품에 첨가할 수 있는 최고농도로 하여 시험했다.

2.1. P.O.E(20) Sorbitan monolaurate에 의한 방부력 변화

Tween 20은 노란색 액상으로 HLB가가 16.7인 수용성 비이온 계면활성제로 propylene glycol에 잘 녹지않는 성질을 가지고 있으며 화장품에 가용화제, 유화제로 많이 사용된다.

T.S.B 배지내에서의 Tween 20 첨가에 의한 방부력에 미치는 영향에 대하여 실험한 결과는 Fig. 2와 같다.

Imidazolidinyl urea는 Tween 20에 의해 방부력의 영향을 받지않으나,

Methylparaben, Methylparaben과 Imidazolidinyl urea 혼합체는 Tween 20에 의해 방부력에 영향을 크게 받아 불활성화율이 높았다. 비이온 계면활성제에 의한 방부제의 불활성화 작용기작은 여러 보고가 있으나, 방부제가 micelle내에의 용해로 인하여 방부력이 감소되는 것으로 사료된다(16-18).

따라서, Tween 20의 첨가량이 늘어날수록 방부제의 첨가량 또한 다량 첨가되어야 할 것으로 사료된다. Imidazolidinyl urea는 비이온 계면활성제 Tween 20에 의해 방부력에 전혀 영향을 받지 않았다. 다만, 시험균주 3종은 모두 Imidazolidinyl urea에 대하여 내성이 잘되는 것으로 나타났다.

또한, *E.coli*는 Methylparaben, *S.aureus*는 Methylparaben과 Imidazolidinyl urea의 혼합체에 대해서 내성을 전혀 갖지 않았다. 이는 *E.coli*가 Methylparaben에 대해 내성력을 가지지 않는다는 최근의 Orth⁽⁴⁾보고와는 일치하였다. 본 실험에서의 Imidazolidinyl urea의 MIC는 *P.aeruginosa* 0.15%, *E.coli* 0.14%, *S.aureus* 0.10%으로 Kabara⁽¹⁹⁾의 *P.aeruginosa* 0.2%, *E.coli* 0.2%, *S.aureus* 0.1% 라는 보고와 비교하여 보면 약간 상이하였으며, Methylparaben 또한 약간의 차이가 있었다. 이는 본 연구에 사용한 균주와의 성질 및 실험 방법상의 차이로 사료된다.

화장품은 다품종, 소량생산으로 인하여 많은 품종이 제조시설을 공용하는 경향이 있으며, 공용에 의한 타품종에의 교차 오염성이 생길 가능성이 높으므로 제조시 미생물적인 주의가 요망된다. 제품으로 통상 적정량의 방부제가 첨가되고 있기때문에 제품이 장치내에 잔류해도 급속한 미생물의 증식은 일어나기 어렵지만, 불완전한 세척후의 잔류하는 희석상태의 화장품은 절호의 온상이 되어 다음 LOT에 고농도 미생물 오염의 원인이 된다.

따라서, 제조시설의 세척 및 소독이 절실히 요구되며, 아울러 처방작성시 방부제의 종류 및 농도의 선택에 있어서 미생물에 대한 내성적 측면도 충분히 고려해야 할 것으로 사료된다.

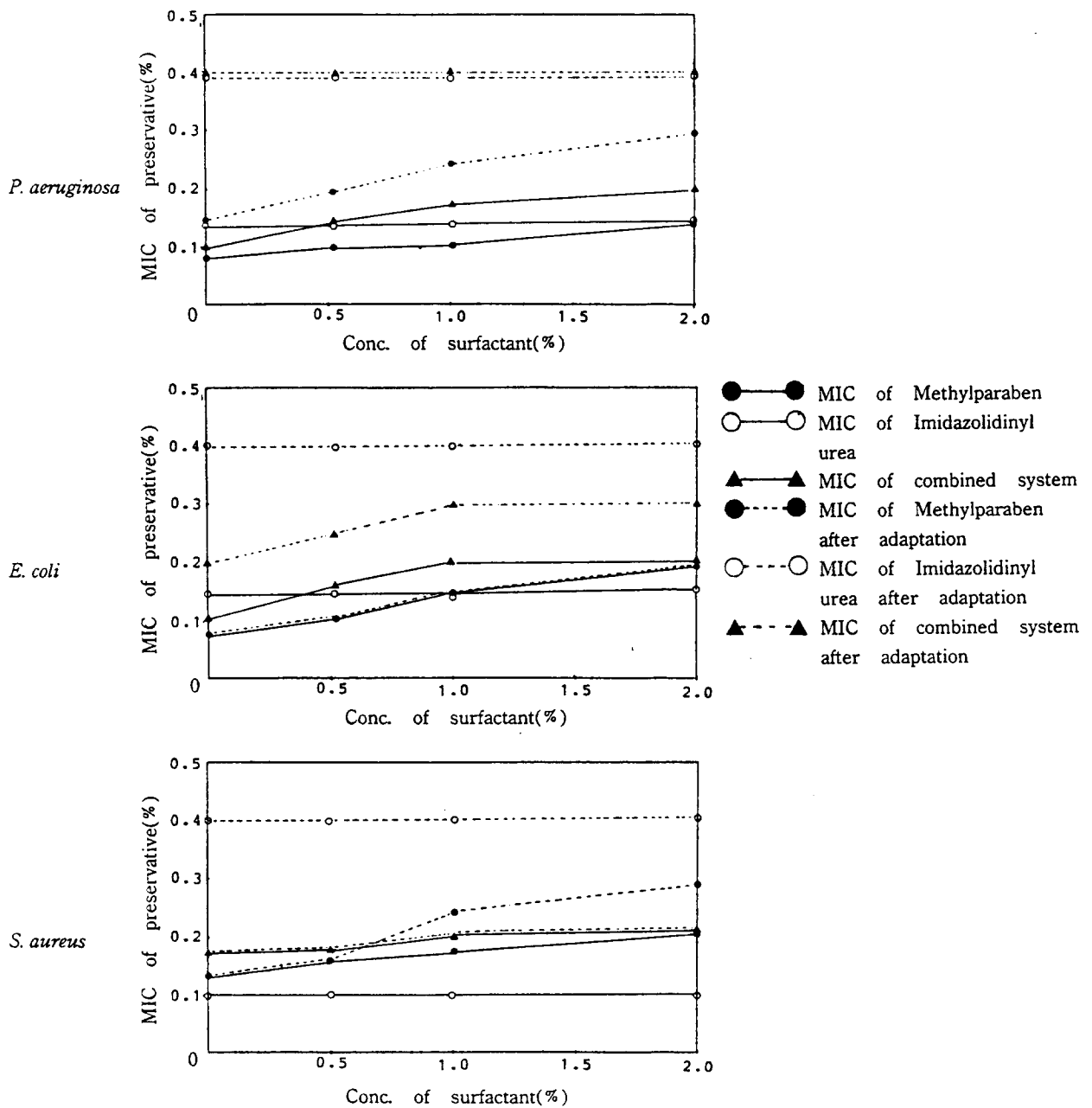


Fig.2. MIC curves of the test organisms to preservatives in T.S.B containing various concentration of Tween 20

2.2. P.O.E(20) Sorbitan monostearate에 의한 방부력의 변화

Tween 60은 노란색 액상으로 HLB가가 14.9인 수용성 비이온 계면활성제로 propylene glycol에 잘 녹지않는 성질을 가지고 있으며 화장품중 로션, 크림에 유화제로 많이 사용된다.

T.S.B 배지내에서의 Tween 60에 의한 방부력에 미치는 영향에 대하여 실험한 결과는 Fig. 3과 같다.

Imidazolidinyl urea는 Tween 60에 의해 전혀 방부력에 영향을 받지 않았으나, Methylparaben, Methylparaben과 Imidazolidinyl urea 혼합체는 불활성화를 크게 받았다. 내성면으로 볼때 Methylparaben에 있어 *E.coli*, Methylparaben과 Imidazolidinyl urea를 혼합 사용한 경우의 *S.aureus*는 내성을 전혀 갖지 않았으나, 시험균주 3종은 모두 Imidazolidinyl urea에 대해서 본 실험의 최고 사용농도 0.4%선 까지 내성을 가졌다. 이상의 결과에서 Methylparaben은 Polysorbate계 비이온 계면활성제 Tween 60 첨가에 의해 쉽게 불활성화 되고 있다. 이는 DeNavarre⁽²⁰⁾, Patel과 Kostenbauder⁽²¹⁾ 및 Mitchell⁽²²⁾의 여러종류의 방부제 특히, 페놀성 방부제가 비이온 계면활성제의 첨가로 인해 쉽게 불활성화 된다는 보고와 일치하였다. 또한, Imidazolidinyl urea와 Methylparaben의 혼합사용시에는 불활성화가 감소되었다. 즉, 방부제 혼합으로 인한 방부력 상승효과를 가져올 수 있었다고 사료된다.

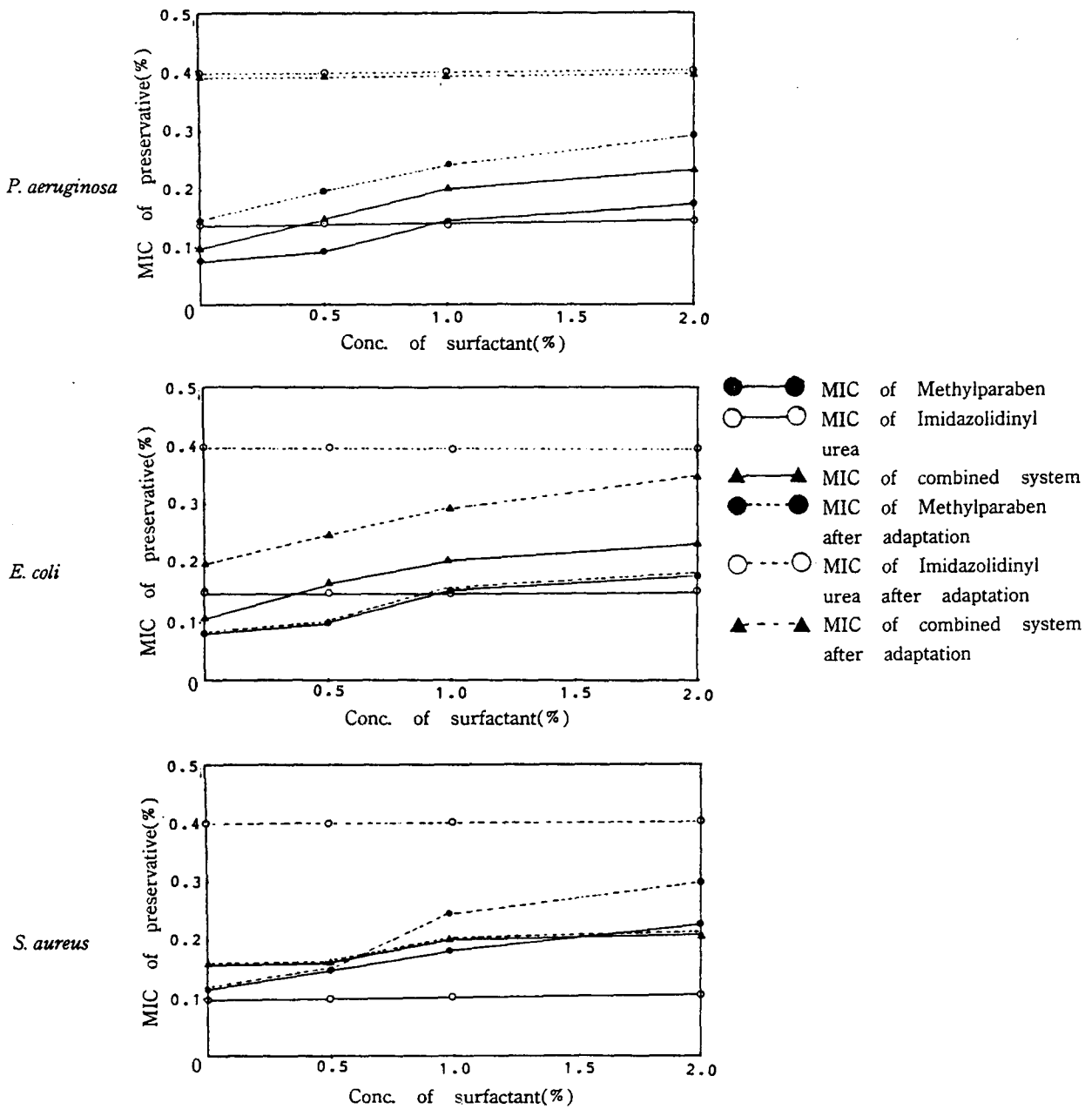


Fig.3. MIC curves of the test organisms to preservatives in T.S.B containing various concentration of Tween 60

2.3. P.O.E(20) Sorbitan monooleate에 의한 방부력의 변화

Tween 80은 노란색 액상으로 HLB가가 15.0인 수용성 비이온 계면활성제로 propylene glycol에 잘 녹지않는 성질을 가지고 있으며 특히 기초화장품에 있어서 Tween 60과 같은 목적의 유화제로 많이 사용된다.

T.S.B 배지내에서의 Tween 80 첨가에 의한 방부력에 미치는 영향에 대하여 실험한 결과는 Fig. 4와 같다.

시험균주 3종은 Imidazolidinyl urea에 대해 모두 최고농도까지 내성을 가졌다. 또한 Imidazolidinyl urea는 Tween 80에 의해 방부력이 불활성화 되지는 않았으나, Methylparaben, Methylparaben과 Imidazolidinyl urea 혼합체는 Tween 80에 의해 방부력에 불활성화 영향을 크게 받았다. 이와같은 결과는 DeNavarre⁽²³⁾의 0.1% Methylparaben은 1% 비이온 계면활성제의 존재하에서 방부력이 전혀 없다는 보고와 일치하였다. 또한, Proprzan⁽¹¹⁾ 등은 2%의 비이온 계면활성제의 존재하에서도 0.2% Methylparaben과 8% propylene glycol의 혼합사용으로 미생물의 성장을 억제할 수 있는 불활성화 방어에 대해 보고하였다.

Methylparaben에 있어 *E.coli*, Imidazolidinyl urea와 Methylparaben 혼합체에서 *S.aureus*는 내성을 가지지 않았다.

Orth와 Lutes⁽⁴⁾에 의해 T.S.B내에서 *E.coli*와 *S.aureus*가 Methylparaben에 대해 내성을 가지지 않는다고 보고되었으나, 본 실험결과에서는 Polysorbate계 비이온 계면활성제 첨가에 의해 *E.coli*는 내성을 가지지 않았으나, *S.aureus*는 내성을 가졌다. 이는 Polysorbate계 비이온 계면활성제 첨가로 Gram 양성균에 대해서 불활성화가 진행되는 것으로 사료된다.

또한 Orth⁽²⁴⁾의 *S.aureus*가 T.S.B 내에서 방부제를 혼합사용한 경우 내성을 가지지 않는다는 보고와 본 실험에서 방부제를 혼합사용한 경우에 Polysorbate 80을 추가로 첨가하였을시 또한 동일한 결과를 보였다.

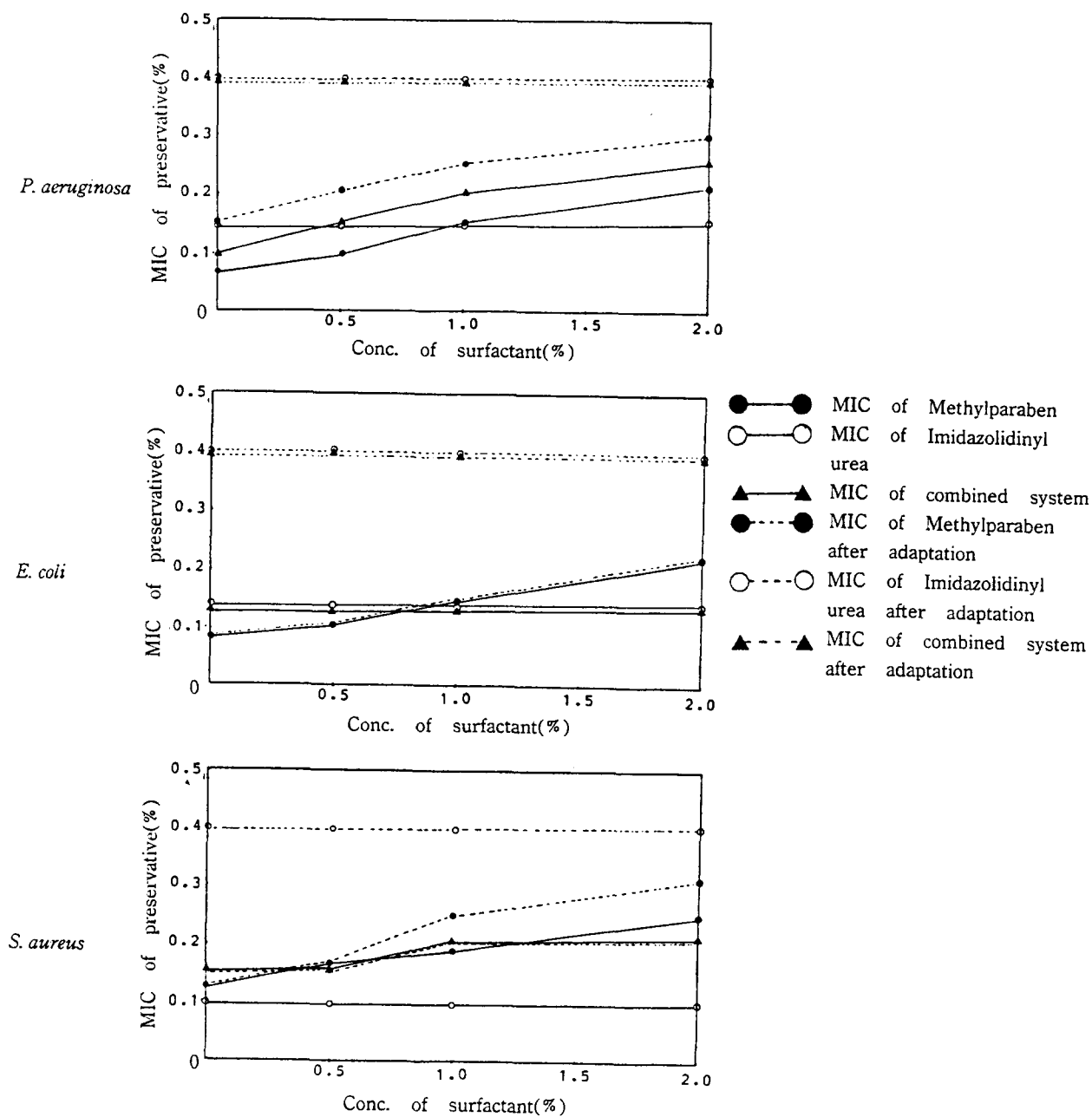


Fig.4. MIC curves of the test organisms to preservatives in T.S.B containing various concentration of Tween 80

3. 제품의 방부력 변화

실험용 Lotion제품, 즉 Table 2와 같이 비이온 계면활성제 Polysorbate 60을 사용한 제품내에 시험균주를 접종, 시험균의 생균수 변화를 조사, 방부력을 비교한 결과 Fig. 5, Fig. 6과 같다.

Table 2. Formula of Lotion samples

Raw Material	sample		
	I	II	III
Purified water	65.89	60.89	48.89
Methylparaben	0.20	0.20	0.20
1,3-Butylene Glycol	5.00	5.00	5.00
EDTA-2Na	0.01	0.01	0.01
T E A	0.30	0.30	0.30
Purified water	2.00	2.00	2.00
Carboxy vinyl polymer (2%)	15.00	15.00	15.00
Stearic acid	1.20	1.20	1.20
Cetanol	0.40	0.40	0.40
Polysynlane	8.00	6.00	16.00
Lexol GT-865	-	6.00	6.00
Cutina CBS	1.00	1.00	1.00
Polysorbate 60	0.50	1.00	2.00
Arlacel 80	0.50	1.00	2.00
계 (%)	100.00	100.00	100.00

Methylparaben 0.2%로 방부된 제품에 비이온 계면활성제 Tween 60의 량을 0.5, 1.0, 2.0%로 달리 첨가하여 시험균주 3종을 접종하여 Linear regression method에(1.13)따라 시간별 (0, 2, 4, 24hr.) 생균수를 측정한 결과, Gram 음성균인 *E. coli* ATCC 10536과 *P. aeruginosa* NCTC 10490은 균 접종후 2시간내에 사멸되었으나, *S. aureus* ATCC 6538은 Fig. 5, Fig. 6과 같이 D-value는 5.2, 8, 14hr.으로 /조사되었다. 즉, 0.2% Methylparaben으로 방부된 Lotion 제품에 실험한 결과, Fig. 5와 같이 P.O.E Sorbitan monostearate 0.5, 1.0, 2.0% 순으로 불활성화는 커졌다. 따라서, 제품내에서도 전술한 배지 실험에서와 동일하게 비이온 계면활성제에 의해 Methylparaben은 불활성화 됨이 확인되었다.

제품내에서 Methylparaben의 불활성화는 Fig. 6과 같이 Tween 60의 량에 비례하였다. 즉, Tween 60의 량이 0.5% 추가됨에따라 *S. aureus* ATCC 6538균주에 대하여 D-value가 3hr.씩 늘어났다. 아울러, 본실험 처방 구성으로 보아 0.2% Methylparaben으로 방부하고자 할 경우 Tween 60의 량이 0.3% 수준을 넘지 않아야 하며, 처방 구성상 Tween 60의 량을 줄일수 없을 경우는 Methylparaben 단독이 아닌 Germall-115등과의 혼합 방부체계를 사용하는 것이 미생물적으로 안전한 처방이라고 사료된다.

화장품에 여러 유형의 비이온 계면활성제의 사용이 높아져감과 아울러 갈수록 여러 유형의 많은 원료가 사용되는 처방의 복잡화로 인해 모든 화장품 처방에 일률적으로 방부제의 특정농도를 규정 짓는다는 것은 불가능한 일이 되었다. 따라서, 화장품 처방 각각에 대하여 신중을 기하지 않으면 안되리라고 사료된다.

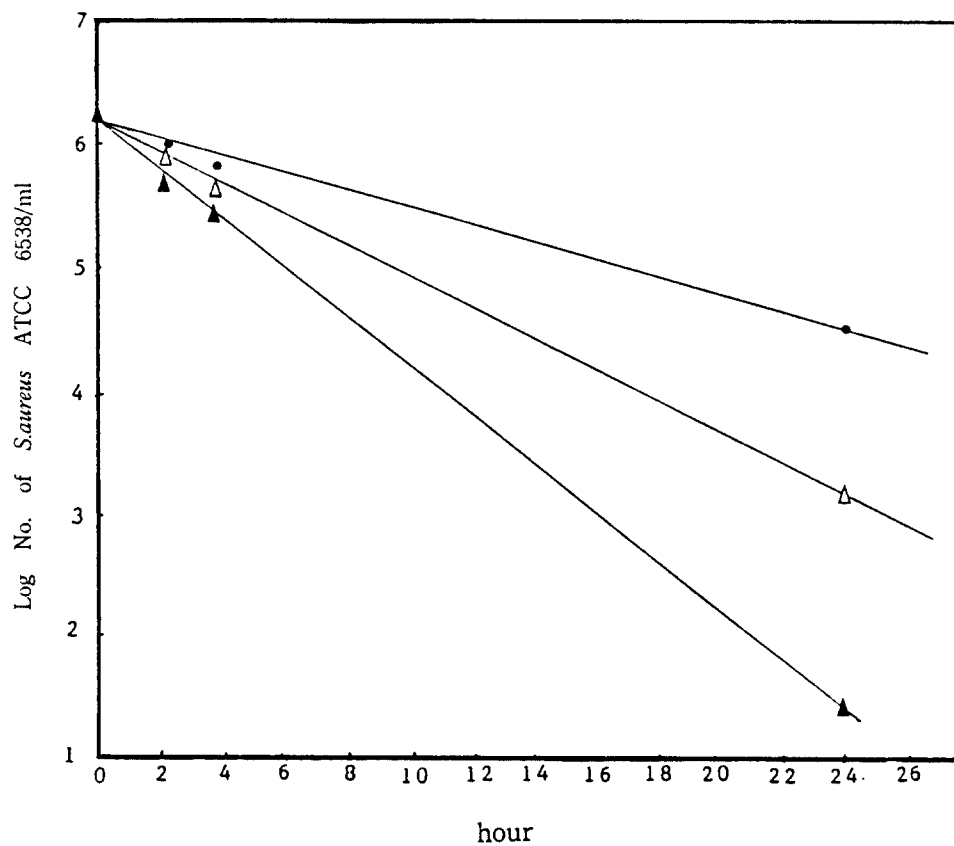


Fig.5. Survivor curves for *S. aureus* ATCC 6538 in Lotion with 0.2% Methylparaben containing 0.5, 1.0 or 2.0% Tween 60

- ▲—▲ : Lotion with 0.5% Tween 60
- △—△ : Lotion with 1.0% Tween 60
- : Lotion with 2.0% Tween 60

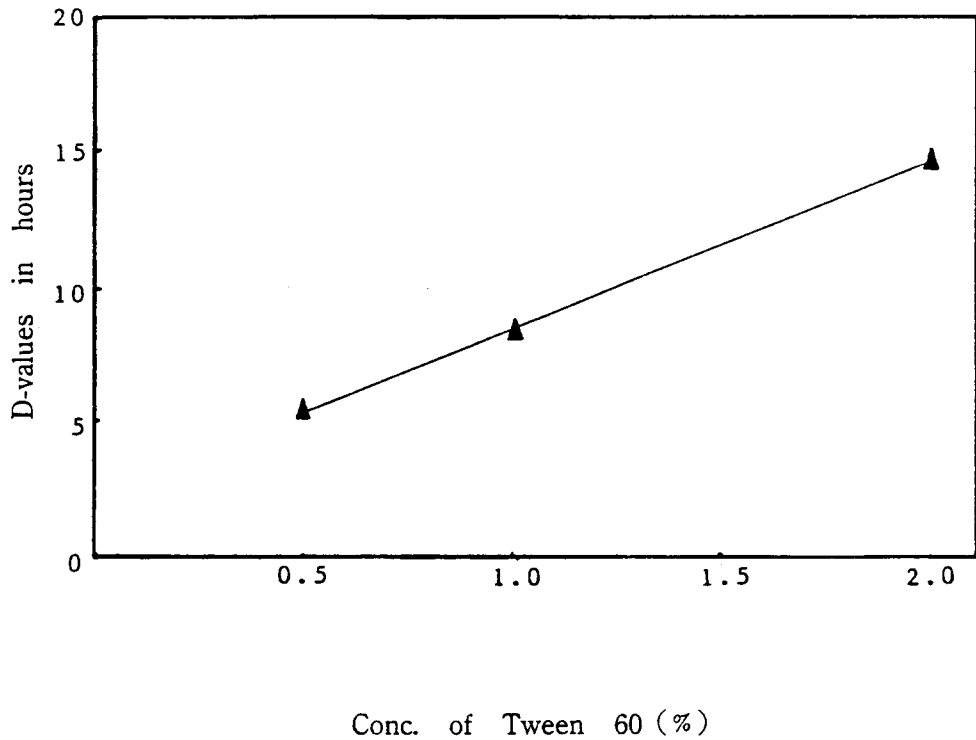


Fig.6. Preservative death time curve for *S.aureus* ATCC 6538 in Lotion with 0.2% Methylparaben containing 0.5, 1.0 or 2.0% Tween 60

Abstract

In order to investigate the effect of nonionic surfactants on the antimicrobial activity of preservatives in the presence and absence of P.O.E(20) Sorbitan fatty acid ester commonly used in cosmetics and pharmaceutical systems, these experiments were carried out by determining Minimum Inhibitory Concentration(MIC) values and MIC values of adaptation against test organisms.

And also the inactivation of the preservative against each microorganism in formula added with various concentrations of P.O.E(20) Sorbitan monostearate were measured by use of a preservative death time curve.

The results obtained were as follow :

1) Nonionic surfactant inactivated Methylparaben to varying extents, but not Imidazolidinyl urea.

2) A combined preservative system was inactivated to a little extent (range of 0.16-0.20% Conc.), no adaptation was observed for the *S.aureus* ATCC 6538.

Imidazolidinyl urea complex combined with Methylparaben had a broad antibacterial spectrum against the Gram(+) and the Gram(-) bacteria.

It was found that preservatives had a synergistic effect by use of mixed form of preservatives.

3) In formula preserved with 0.2% Methylparaben containing 0.5, 1.0 and 2.0% P.O.E(20) Sorbitan monostearate, *E. coli* ATCC 10536 and *P.aeruginosa* NCTC 10490 died quickly within in 2hr..

4) However, From Fig.5, *S. aureus* ATCC 6538 died more slowly within increasing surfactant concentration and the D-values(Decimal reduction

time) were 5.2, 8 and 14 hr. for samples containing 0.5, 1.0 and 2.0% P.O.E(20) Sorbitan monostearate, respectively.

5) In the case of Methylparaben, no adaptation for the *E. coli* ATCC 10536.

6) All of the nonionic surfactant, P.O.E(20) Sorbitan fatty acid ester, used in the experiments decreased the effectiveness of Methylparaben, but not of Imidazolidinyl urea.

Reference

1. D. S. Orth, JSCC, 31, 165-172, (1980)
2. Bruck, Am. Perf. Cos., 88(4), 45, (1971)
3. P. A. Berke and W. E. Rosen, Cos. & Toil., June, 45-53, (1982)
4. D. S. Orth and C.M. Lutes, Cos. & Toil., Feb., 57-64, (1985)
5. J. L. Smith, Cos. & Toil., March, 39-52, (1981)
6. J. J. Zeelie and J. J. McCathy, Cos. & Toil., 97, 61-64, (1982)
7. DeNavarre, M.G, Am. Perf. Aromat., 1st Doc. Ed., 99-100, (1960)
8. Coates, D, Mfg. chem. Aerosol News, 44, 41-42, (1973)
9. Brown, M. R. W., and Richards, R. M. E., Nature, 207, 1391, (1965)
10. Parker, M. S., and Barnes, M. soap Perf. cosmet., 40, 163-170, (1967)
11. Poprza, J., and DeNavarre, M. G., J. Soc. Cosmet. Chem., 10, 81-87, (1959)
12. Rieger, M. M., Cos. & Toil., 96, 39-43, (1983)
13. D. S. Orth, JSCC, 30, 321-332, (1979)
14. CTFA, CTFA Cosmet. J. 13, 19-22, (1981)
15. M. Barnes and G. W. Denton, Soap. Perf. Cosmet. 42, 729-733, (1969)

16. A. Aoki et al., J. pharm. Soc. Jpn., 76, 939-943, (1956)
17. W. Evans, J. Pharm. Pharmacol., 16, 323-331, (1964)
18. F. Pisano and H. Kostenbauder, J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed., 48, 310-314, (1959)
19. Jon J. Kabara, Cosmetic and drug preservation, Dekker, 656, (1984)
20. M. G. DeNavarre and H. E. Bailey, J. Soc. Cosmet. Chem., 7, 427-433, (1958)
21. N. K. Patel and H. B. Kostenbauder, J. Pharm. Sci., 47, 289-293, (1958)
22. A. G. Mitchell, J. Pharm. Pharmacol., 16, 533-537, (1964)
23. M. G. DeNavarre and H. Bailey, J. Soc. Cosmet. Chem., 7, 427-433, (1956)
24. D. S. Orth, Int. Soc. Trop. Dermatol. 11, 505-506, (1980)