

產學合作案結案報告書

華生技 104 產學字 003 號

微生物檢驗及樣品穩定度分析

甲方：莉思加企業有限公司

乙方：中華學校財團法人中華科技大學

生物科技系

計劃主持人：郭鐘達、張育奇

摘要

目前台灣有關於化妝品微生物相關檢測之法規主要有三個，包括第一個，行政院衛生福利部(參照 FDA BAMchapter23：Microbiological Methods for Cosmetics)之訂定規範；第二個為參考各國藥典包括 USP/EP/JP；第三個為 ISO 標準檢驗法，包括：ISO 21149：2006、ISO 21150:2006、ISO 22717:2006、ISO 22718:200。有關於化粧品產品之安全，尤其在微生物相關檢驗項目，都有規範。常見微生物如：大腸桿菌(*Escherichia coli*)、綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)都是不得檢測出。此外，不同類型樣品的檢樣制備，也必須依照衛生福利部之規範進行操作。

包括:液體樣品:區分水性及油性；膏、霜、乳劑半固體狀樣品、固體樣品，在本文建置標準步驟及方法。

此外，為縮短檢驗時間，目前已有廠商開發化妝品快速檢測試劑，本計畫以導入此檢測方法，該檢測試劑檢測分析菌種之時間只需 4 小時，同時可以鑑定超過 400 株以上的微生物菌種。而且準確率達 95%以上。為確認檢測是否有問題，同時需要控制組，就是標準菌株之控制組試驗亦納入本操作規範。未來，畫品公司將可利用此方法，進行內部開發產品之檢測分析，以服務客戶，達到省時及提高顧客滿意度之目標。

關鍵詞：化妝品檢測、化妝品快速檢測試劑、大腸桿菌(*Escherichia coli*)、綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)

前言與文獻回顧

目前台灣國內有關食品檢驗，已經相當完善，然而，由於化妝品為非侵入性，因此整體法規較無食品法規嚴格。目前台灣有關於化妝品微生物相關檢測之法規主要有三個，包括第一個，行政院衛生福利部(參照FDA BAMchapter23：Microbiological Methods for Cosmetics)之訂定規範；第二個為參考各國藥典包括USP/EP/JP；第三個為ISO標準檢驗法，包括：ISO 21149：2006、ISO 21150:2006、ISO 22717:2006、ISO 22718:200。有關於化粧品產品之安全，尤其在微生物相關檢驗項目，都有規範。包括：

一、菌種限量:

1. 好氧性生菌數之檢測
2. 黴菌及酵母菌生菌數之檢測
3. 大腸桿菌檢驗
4. 綠膿桿菌檢驗
5. 金黃色葡萄球菌檢驗
6. 厭氧菌數之檢測

二、培養基與接種標準菌株試驗:

化粧品之微生物試驗需要用到各種滋養性或選擇性培養基，其配製之品質攸關病原菌的分離與鑑定；因應國內GMP 精神之要求與精進，提高了對培養基品管要求。利用已知法規要求標準菌株的接種試驗確認培養基能否區分或選擇菌種以及菌落型態的正常生長。培養基之選擇，可運用自配培養基或由商業公司購買具有品質之培養基粉末均建議做適當之品管；若使用市售成品培養基(Ready-to-use)，亦可要求廠商提供品管資料結果，作為監控基準。

三、相關化粧品樣品採集與分析之步驟及注意事項如下:

1. 所採集的樣品，應具有代表性，一般視每批化粧品數量大小，隨機抽取相應

數量的包裝單位。檢驗時，應分別從兩個包裝單位以上的樣品中共取 10g 或 10ml。包裝量小的樣品，取樣量可酌減。

2. 供檢樣品，應嚴格保持原有的包裝狀態。容器不應有破裂，在檢驗前不得啓開，以防再污染。

3. 接到樣品後，應立即登記，編寫檢驗序號，並按檢驗要求盡快檢驗。如不能及時檢驗，樣品應放在室溫陰涼乾燥處，不要冷藏或冷凍。

4. 若只有一個樣品而同時需做多種分析，如細菌、毒理、化學等，則宜先取出部分樣品作細菌檢驗，再將剩余樣品作其他分析。

5. 在檢驗過程中，從開封到全部檢驗操作結束，均須防止微生物的再污染和擴散，所用器皿及材料均應事先滅菌，全部操作應在無菌室內進行。或在相應條件下，按無菌操作規定進行。

6. 如檢出糞大腸菌群或其他致病菌，自報告發出起該菌種及被檢樣品應保存一個月備查。

而提供檢驗樣品的制備，根據國內法規亦有所規範。

包培養基和試劑，如：生理鹽水，配法式以氯化鈉 8.5g，加上蒸餾水 1000ml 溶解後，分裝到加玻璃珠的錐形瓶內，每瓶 90ml，再以 121℃（151b）20min 高壓進行滅菌。SCDLP 液體培養基，成分：酪蛋白胨 17g，大豆蛋白胨 3g，氯化鈉 5g，磷酸氫二鉀 2.5g，葡萄糖 2.5g，卵磷脂 1g，吐溫 80 7g，蒸餾水 1000ml 整體製程方法，是將上述成分混合後，加熱溶解，調 pH 為 7.2。最後進行分裝，121℃（151b）20min 高壓滅菌。

其他儀器設備器具，如滅菌液體石蠟。天平、滅菌的錐形瓶：內含玻璃珠及 90ml 稀釋液、滅菌刻度吸管、水浴箱、滅菌研體及滅菌研棒、均質器都規範及滅菌條件。

此外，不同類型樣品的檢樣制備，也必須依照衛生福利部之規範進行操作。包括：

1. 液體樣品：

(1) 水溶性的液體樣品，可量取 10ml 加到 90ml 滅菌生理鹽水中，如樣品不少於 10ml。仍按 10 倍稀釋法進行。如為 5ml 則加 45ml 滅菌生理鹽水，混勻後，制成 1：10 稀釋液。

(2) 油性液體。取樣品 10ml，先加 5ml 來菌液體石蠟混勻，再加 10ml 滅菌的吐

溫 80，在 40~44℃ 水浴中振蕩混合 10min，加入滅菌的生理鹽水 75ml（在 44~44℃ 水浴中預溫），在 40~44℃ 水浴中乳化，制成 1：10 的懸液。

2. 膏、霜、乳劑半固體狀樣品

(1) 親水性的樣品，稱取 10g，加到滅菌的帶玻璃珠加有 90ml 滅菌生理鹽水的錐形瓶中，充分振蕩混勻，放 32℃ 水浴靜置 15min。用其上清液作為 1：10 的稀釋液。

(2) 疏水性的樣品，稱取 10g，放到滅菌的研鉢中，加 10ml 滅菌液體石蠟，研磨成粘稠狀，再加 10ml 滅菌吐溫 80，研磨待溶解後，加 70ml 滅菌生理鹽水，在 40~44℃ 水浴充分混合，制成 1：10 稀釋液。

(3) 固體樣品，稱取 10g，加到滅菌的生理鹽水稀釋瓶中，振蕩混勻，使其分散混懸後，放 30~32℃ 水浴中，15min 後取出，充分振蕩混合，再放到 30~32℃ 水浴中靜置 15min，取上清液作為 1：10 的稀釋液。如有均質器，上述水溶性膏、霜、粉劑等，可稱 10g 樣品加到 90ml 滅菌生理鹽水，均質 1~2min；疏水性膏、霜及眉筆、口紅等，稱 10g 樣品加到 90MLSCDLP 液體培養基，或 1g 樣品加 1ml 滅菌液體石蠟、1ml 滅菌吐溫 80、7ml 滅菌生理鹽水，均質 3~5min。

表一、台灣衛生福利部規範化妝品微生物容許含量表

生菌數	其他規定 (其他規定)
1. 嬰兒用、眼部周圍、接觸黏膜部位 化妝品: 100 CFU/ml 以下	大腸桿菌
其他化妝品 1000CFU /ml	金黃色葡萄球菌
	綠膿桿菌

表二、針對化妝品微生物之檢驗方法項目及步驟表

步驟	總生菌數	大腸桿菌	金黃色葡萄菌	綠膿桿菌	黴菌/酵母菌
培養基	MLA	MLA	BP	MLA	PDA (或 MEA)
時間	30C 48 hr	30C 48 hr	35-37C 48 hr	30C 48 hr	30C 7 days
繼代培養	-	MacConkey agar and EMB agar	-	MacConkey agar and Cetrimide agar	-
時間	-	35C 18-24 hr	-	35C 18-24 hr	-
判別鑑定		依菌種屬性，進行不同染色法 或使用快速檢測試劑或儀器			
分析結果	菌落數 (CFU/ml)	不得驗出			菌落數 (CFU/ml)

此外，常見化妝品之生菌數，其培養用之培養基，主要以Modified Letheen broth, MLB及Modified Letheen agar, MLA為主。如其他菌種，黴菌/ 酵母菌，則使用 Modified Letheen broth , MLB , 或 PDA w/chlortetracycline 或 MEA w/chlortetracycline。其他如厭氧菌則較常使用Modified Letheen broth , MLB , 或 Anaerobic agar , AnBAP、Aerobic blood agar , BAP、Modified Letheen agar , MLA。金黃色葡萄球菌則使用Modified Letheen broth , MLB、Baird-Parker (BP) agar、Voges-Johnson (VJ) agar。大腸桿菌則是Modified Letheen broth , MLB、Modified Letheen agar , MLA、MacConkey agar、EMB agar。綠膿桿菌則是Modified Letheen broth , MLB、Modified Letheen agar , MLA、MacConkey agar、Cetrimide agar。

建立分析方法

1、為了避免上述傳統方法之培養基配置出錯，國內已有廠商提供良好完整之培

養基及檢測試劑，提供快速篩檢使用。要選擇具有獲通過台灣醫療器材IVD-GMP製造廠認證才有保障。

目前的廠商都可以將大小規格的培養基進行分類控管，亦可客製化。同時原料部分採用高品質原料，如Difco、Thermo Oxoid、Merck 與Sigma 等國際知名大廠品牌。配置步驟亦依照CLSI、USP、CNS、FDA、藥典規範製程。達到品質穩定、出貨迅速之目標。這些固態培養基，也會採取混稀傾注法(pour plate) 時提供消費者、研究單位或製造工廠來使用。同時將檢驗樣品已預先凝固，便於保存與立即使用。只需要簡單加熱回熔，符合法規要求，產品設計便於傾倒，使配置培養基降低污染機率。

為縮短分析時間，除傳統方法外，生化鑑別試紙或快速檢測試劑亦是不錯之初步分析工具。表三主要是將目前分析常見化妝品微生物之生化檢測試劑，整理如表，包括：金黃色葡萄球菌、大腸桿菌、綠膿桿菌做一分類歸納。

項目	生化試劑	
金黃色葡萄球菌	Catalase 試劑	5TSB w/6.5% NaCl
	Coagulase 試劑	O/F glucose
	BHI broth	無菌礦物油
	Bile esculin agar	
	MEA w/chlortetracycline	
大腸桿菌	TSI agar	O/F medium w/mannitol
	O/F medium w/glucose	Acetamide agar
	O/F medium w/sucrose	Nitrate agar
	O/F medium w/xylose	
綠膿桿菌	TSI agar	Pseudomonas agar F
	Oxidase 試劑	Pseudomonas agar P
	Koser's citrate broth	Indole medium

(圖片引用啟新生物科技公司資料)

結果與討論

為縮短檢驗時間，目前已有廠商開發畫品快速檢測試劑，檢測分析菌種時間只需 4 小時，同時可以鑑定超過 400 株以上的微生物菌種。而且準確率達 95% 以上。為確認檢測是否有問題，同時需要控制組，就是標準菌株，如下圖所示。

項次	化妝品檢驗-微生物	化妝品防腐-微生物
1	<i>E.coli</i> (ATCC 25922)	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 9027)
2		<i>E.coli</i> (ATCC 25922)
3	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538P)	<i>S.aureus</i> (ATCC 6538)
4		<i>C. abicans</i> (ATCC 10231)
5	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	<i>A. niger</i> (ATCC16404)

圖一、化妝品常見標準菌株

而鑑定方法之主要機制，是利用產色素鑑定培養基 Chromogenic agar，他有特殊產色質(Chromogen)，由微生物之間不同專一性酵素水解，分解後釋放獨特顏色來加以檢驗。優點是可以直接鑑定微生物種類，直接計數與分析，同時簡化繁瑣的檢測步驟、加速微生物檢測的速度。詳細檢驗套組說明如下：針對大腸桿菌等氧化酶陰性的革蘭氏陰性桿菌；針對綠膿桿菌等氧化酶陽性的革蘭氏陰性桿菌，包括弧菌屬；針對葡萄球菌類及其他關聯菌種、針對鏈球菌類及其他關聯菌種、針對棒狀桿菌及其他革蘭氏陽性桿狀細菌、針對臨床奈瑟氏菌屬、莫氏桿菌屬、嗜血桿菌屬及其他相關、針對超過 90 種重要的厭氧菌、針對酵母菌以及針對常見尿道感染病原菌。因此我們可以協助化妝品工廠建立以此檢測試劑為基礎

之崩速餒部產品評估辦法。

致謝

感謝華生技 104 產學字 003 號之經費協助完成此產學合作案。

參考文獻

1. PERE JM: "Comparison of four chromogenic media and hektoen agar for detection and presumptive identification of Salmonella strains in human Stools. ", 《J CLIN MICROBIOL》, 31 March 2003 (2003-03-31), pages 1130 - 1134
2. 杨丽华等: "一种改良的化妆品微生物检测方法的探讨", 《中国卫生检验杂志》, 30 April 2012 (2012-04-30), pages 769 - 771
3. 郑星泉等: "《化妆品卫生检验手册》", 31 December 2003, article "化妆品检验", pages: 10-35
4. 台灣衛生福利部，化妝品檢驗規範。
5. 啟新生物科技，化妝品檢測與品管。