

111 年度化粧品 GMP 教育訓練(二)課程規劃

- 微生物檢驗II

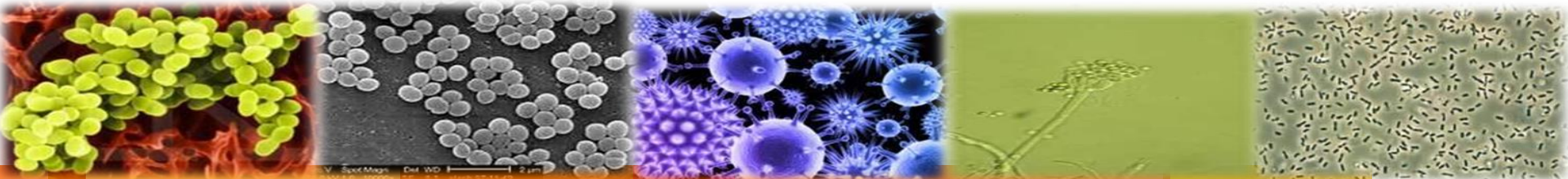
微生物試驗取樣與操作



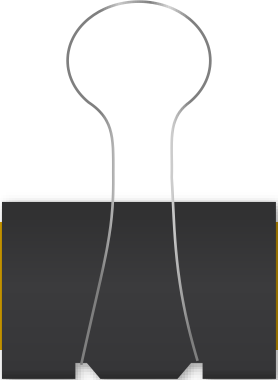
- 主辦單位：衛生福利部食品藥物管理署
- 承辦單位：社團法人中華民國學名藥協會
- 講 師：嘉南藥理大學化粧品系 林朝賢 助理教授

微生物試驗取樣與操作大綱

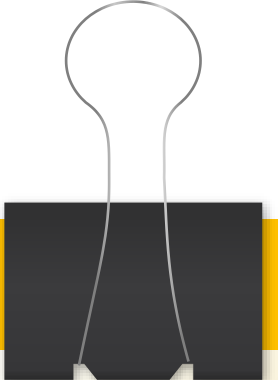
- 原料、半成品、成品、落下菌及水質取樣方法及流程
 - ✓ 實驗操作(環境、作業人員及器具)
- 作業區環境微生物檢驗方法介紹
 - ✓ 培養基配製
 - ✓ 微生物檢驗基本概念
- 微生物快篩試劑(片)檢測評估
- 委外檢驗
- 不符合規格產品之調查



微生物檢驗的法源

- 
- 成分之物理及化學特性
 - 成分之毒理資料。
 - 產品安定性檢驗報告。
 - 微生物檢測報告。
 - 防腐效能試驗報告。

產品資訊檔PIF

- 
- 主管機關：衛生福利部
 - 化粧品衛生安全管理法第六條第三項。
 - 化粧品微生物容許量基準表。

化粧品衛生安全管理法

定規格

2

制定規格



- pH
- 黏度
- 折射率
- 純度
- 微生物.....

原料



- pH
- 導電度
- 膜回壓
- 微生物.....

水



- 顏色
- 尺寸
- 相容性
- 破損率
- 微生物.....

包材



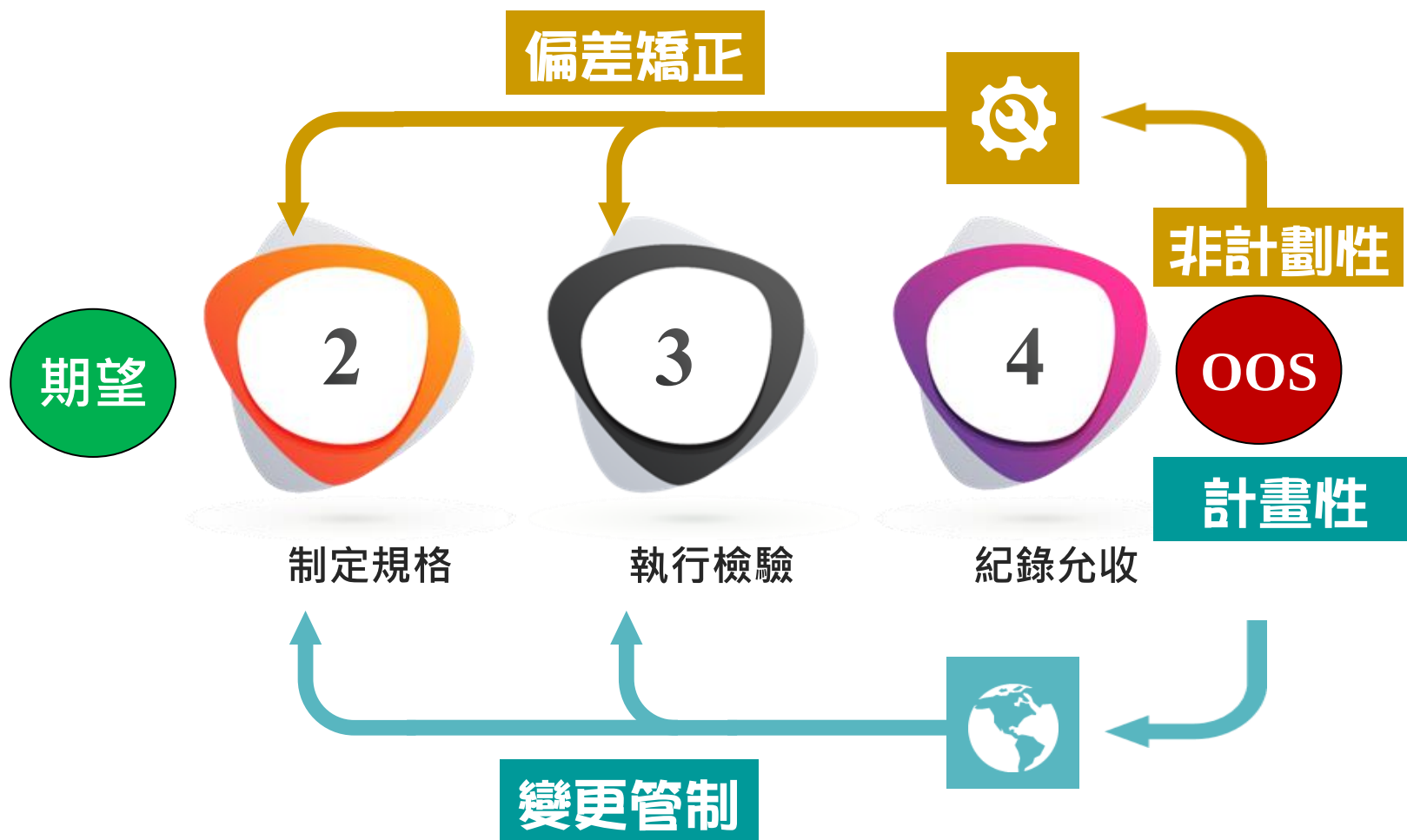
- pH
- 黏度
- 限用成分
- 重金屬
- 微生物.....

半成品 / 成品

導入GMP四階品質文件



導入GMP四階品質文件



微生物與製程衛生管控

從業員工

教育訓練
衛生健康管理



製造環境

除溼過濾系統
人流物流動線
蟲鼠害管理



生產用水

活性炭與樹脂
靜滯水



原物料

含水萃取物
吸濕性粉體



設備清潔

傳輸管、盲管
抽料機、馬達



消費污染

使用不當 手挖、稀釋
保存不當 衛浴室



化粧品的生命週期與劣質化因子

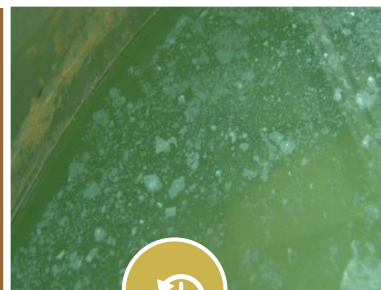


微生物汙染與劣質化粧品案例



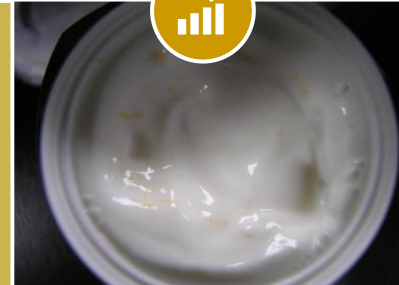
面膜折痕
長黴

眼影長細菌



精華液長
生物膜

霜體長
金黃色葡萄球菌



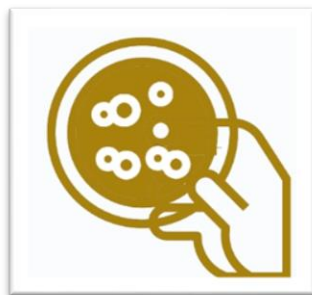
微生物檢驗各式方法



國際慣用微生物限量試驗

Approval standards	ISO 21149, Cosmetics — Microbiology — Enumeration and detection of aerobic mesophilic bacteria	ASEAN microbial limit test for cosmetic products ACM THA 06	China: Standard methods of microbiological examination for cosmetics , General rules 化妆品微生物标准检验方法细菌总数测定 GB 7918.1-87	U.S. Pharmacopeia - USP 37- <61> Microbial examination of nonsterile products: microbial enumeration tests	COLIPA, Guidelines on Microbial Quality Management, published by the European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association, 1997	E P, Microbiological Examination of non-sterile products, 4th edition, published by the European Pharmacopoeia, 2002	FDA, Bacteriological Analytical Manual, published by the U.S. Food and Drug Administration, 2017
Recommended media list	Bacteria: Soybean-casein digest agar (SCDA) ; Eugon LT 100 agar	Bacteria: Modified letheen agar (MLA) Mould and yeast: Malt extract agar (MEA) ; Potato dextrose agar (PDA)	Bacteria: SCDLP medium (Soybean-casein digest agar ; SCDA with polysorbate 80, lecithin)	Bacteria: Soybean-casein digest agar (SCDA) ; Trypticase soy agar (TSA) Sabouraud dextrose agar	Bacteria: Soybean-casein digest agar (SCDA)/buffered sodium chloride-peptone solution with neutralizing agents. e.g. polysorbate 20 or 80, lecithin, thiosulphate	Bacteria: Fluid thioglycollate medium ; Soybean-casein digest agar (SCDA)	Bacteria: Modified letheen agar (MLA) (M78) Mould and yeast: Malt extract agar (MEA) (M93) Commercial bacterial identification kit (API or equivalent)
Validation test	Validation of the efficiency of neutralizer	Validation of the efficiency of neutralizer	Not mentioned	Promotion tests for media are required	Not mentioned	Promotion and validation tests for media are required	Not mentioned

化粧品微生物檢驗參考因子



檢體前處理

防腐劑

劑型型態

合格採樣

防腐中和

連續稀釋

培養與計算

接種方法

培養條件

培養溫度

適用評估

好氧厭氧

塗抹傾倒

菌數換算

判定與紀錄

增殖培養

允收與否

標示狀態

推斷試驗

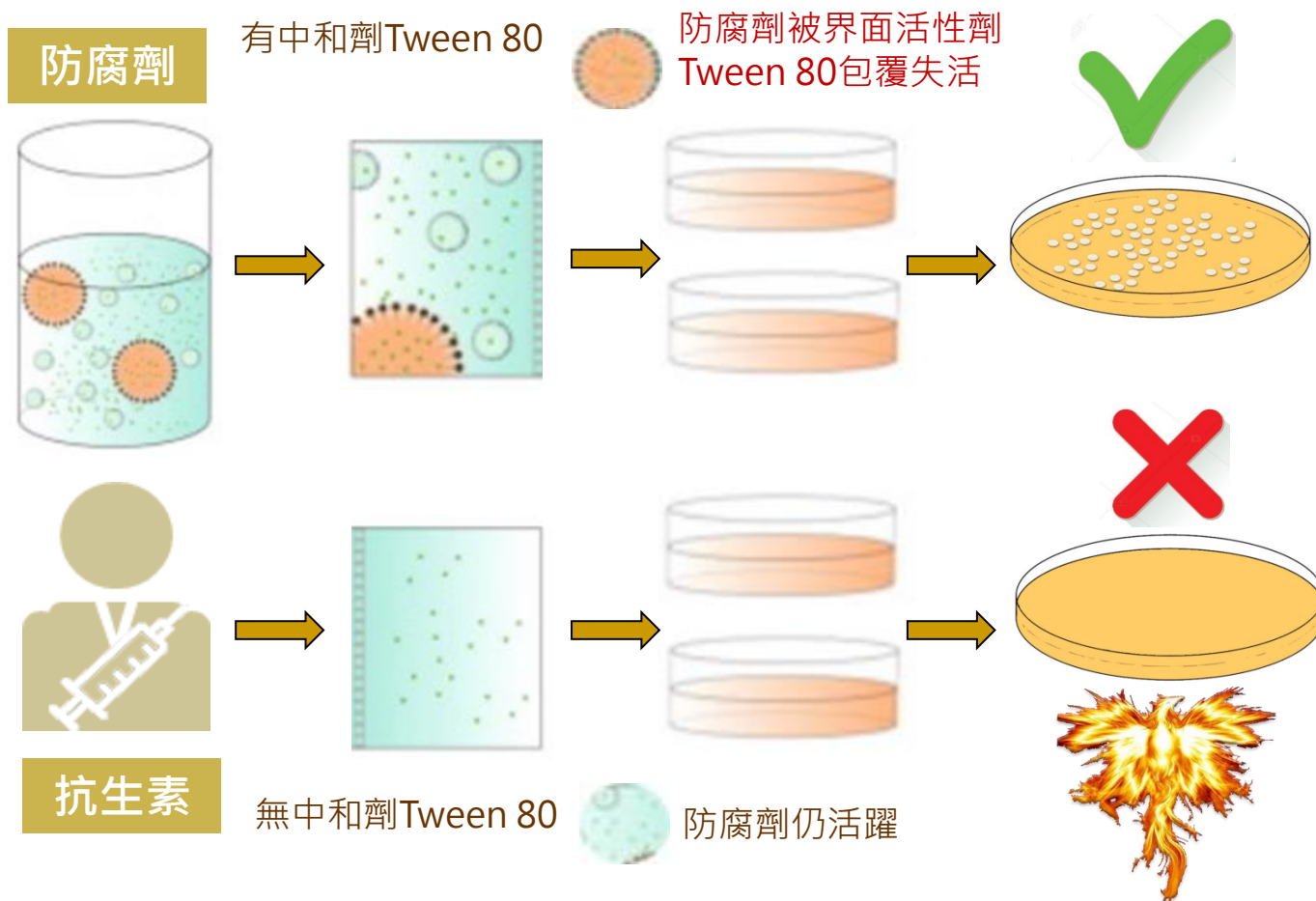
留樣保存

追蹤汙染

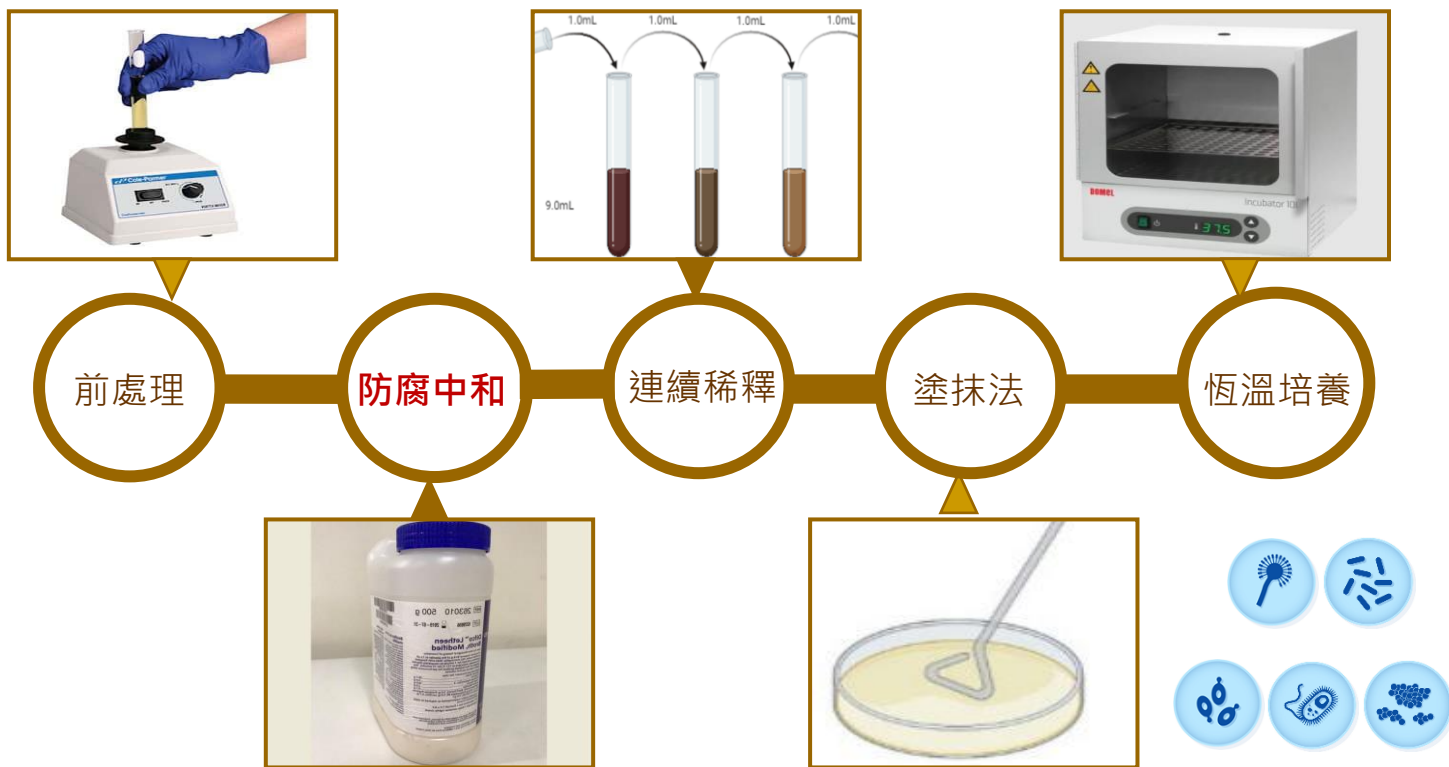
化粧品微生物總生菌檢測流程



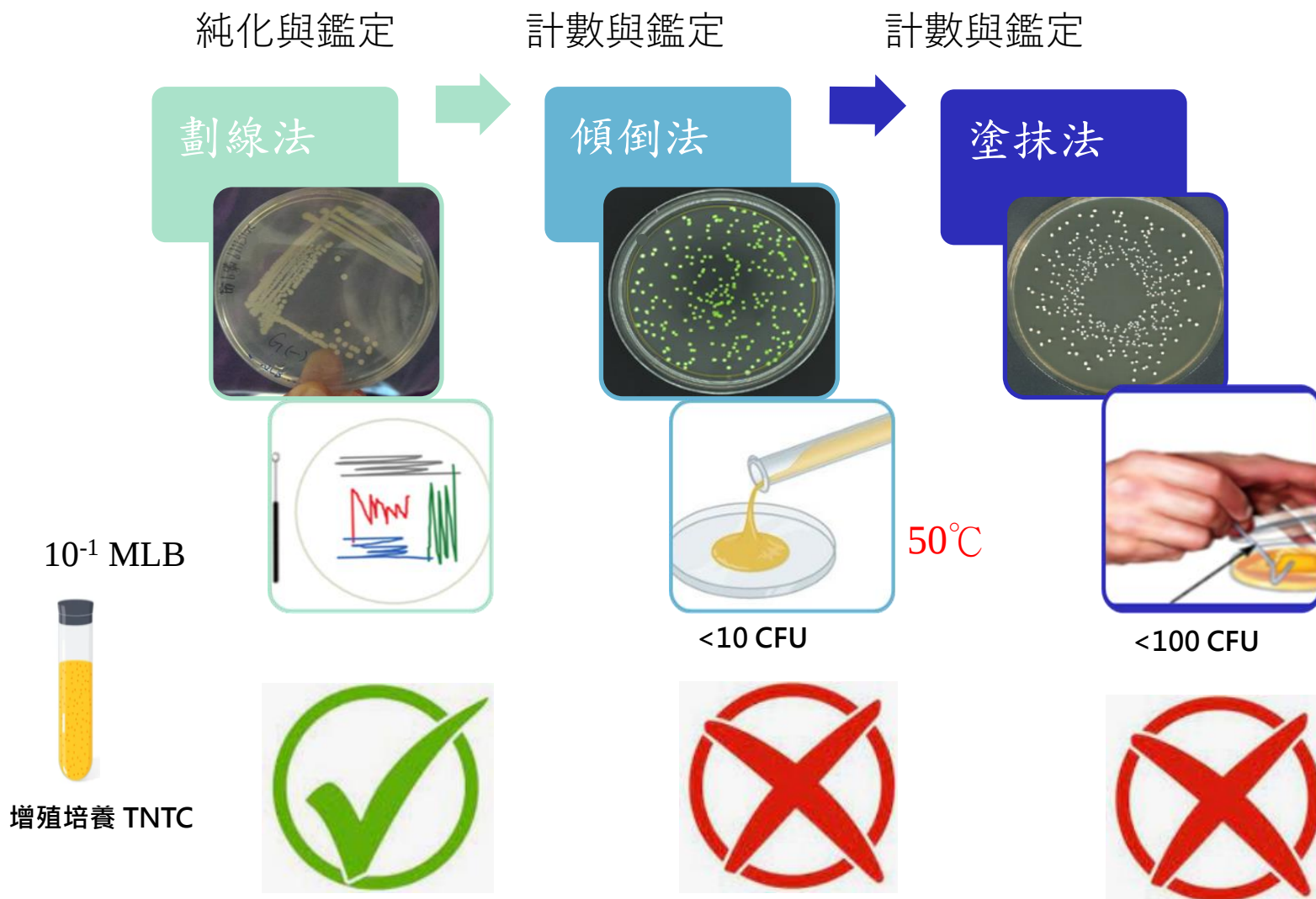
檢體抑菌性與火鳳凰現象



微生物檢驗



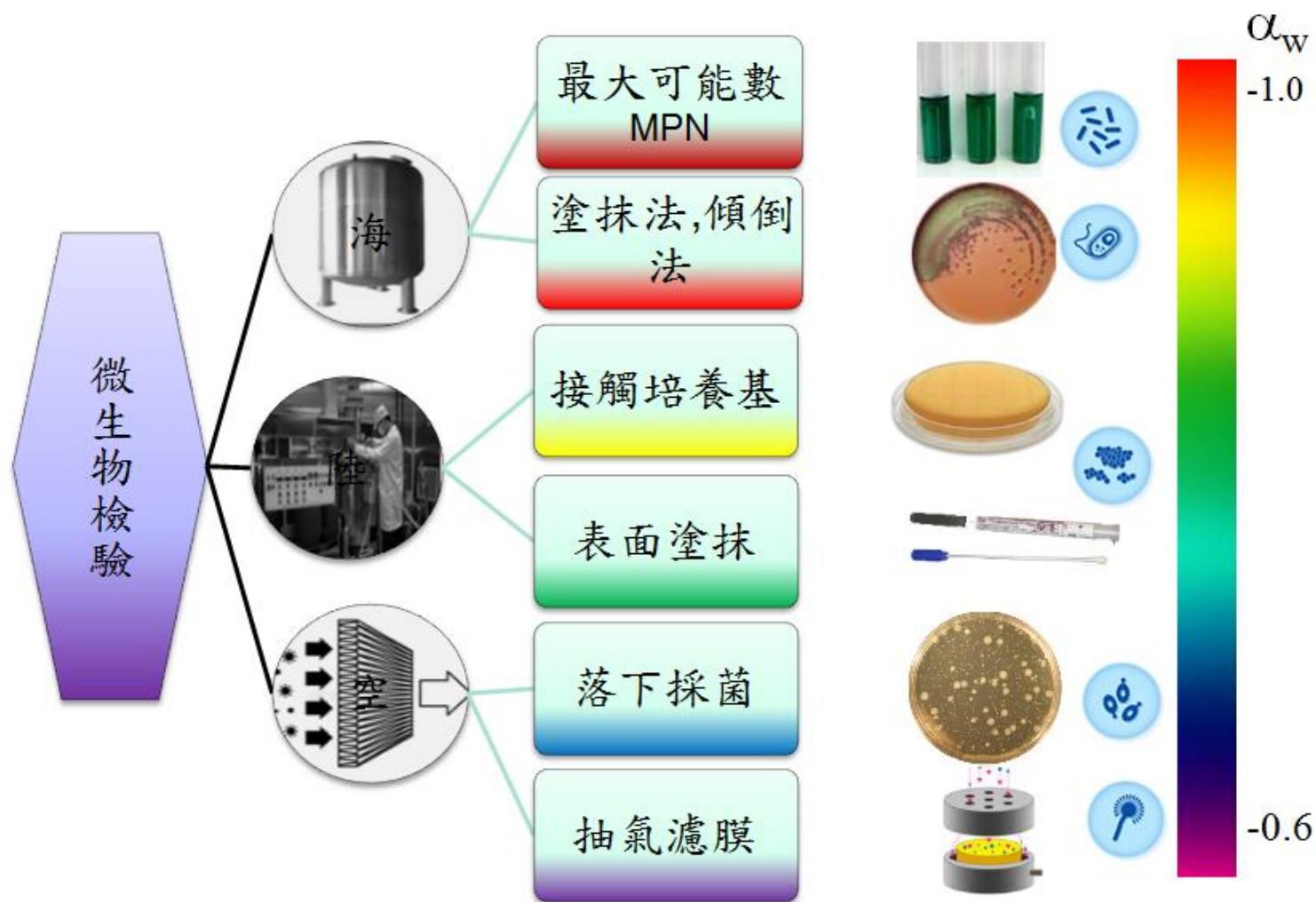
微生物檢驗基本概念



認識檢驗常用培養基

檢測項目	適用培養基	重要成分	溫度℃
化粧品細菌限量檢驗	Modified Lethen agar	防腐劑中和劑	30
水質檢驗總生菌	Plate count agar	酪蛋白分解物	30
空氣落下菌檢驗細菌	Plate count agar / Tryptic soy agar	酪蛋白分解物	30
空氣落下菌檢驗真菌	Malt extract agar/ Potato dextrose agar	麥芽抽出/馬鈴薯醣類	25
化粧品真菌限量檢驗	Potato dextrose agar / chlortetracycline	馬鈴薯醣類	25
廠污細菌繼代培養	Tryptic soy agar	大豆分解蛋白	30
大腸桿菌	Eosin methylene blue agar (Levine)	乳糖、酸鹼指示劑	35
金黃色葡萄球菌	Baird parker agar	氯化鋰、丙酮酸鈉	35
綠膿桿菌	Cetrimide agar	溴化烷基三甲基铵	35
白色念珠菌	Sabouraud dextrose agar	葡萄糖、抗菌劑	30

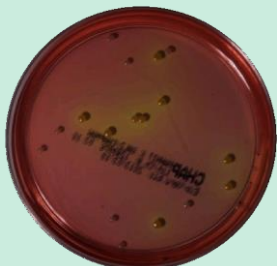
作業區環境微生物檢驗方法介紹



白色念珠菌檢測之各種方法比較

SOP	FDA	USP	ISO 18416
中和劑	MLB	Polysorbate 20 或MLB、 SCDLP-20	Tryptone ; TSB + Lecithin- sodium chloride solution
培養基	PDA+ (Chloramphenicol)	Sabouraud Dextrose Agar (SDA)	SDA 或 SDCA (Chloramphenicol)
培養溫度	30±2 °C	30~35 °C	32.5±2.5 °C
培養時間	7 days	24 hr ~48 hr	24 hr ~48 hr
			

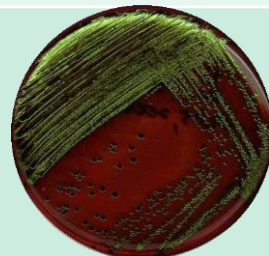
金黃色葡萄球菌檢測之各種方法比較

SOP	FDA	USP	ISO 22718
中和劑	MLB	TSB+Lecithin+Polysorbate 20	ELT100 broth
培養基	Baird-Parker	Mannitol salt agar	Baird-Parker
培養溫度	35±2 °C	30~35 °C	32.5±2.5 °C
培養時間	48 hr	18 hr ~72 hr	24 hr ~48 hr
			

綠膿桿菌檢測之各種方法比較

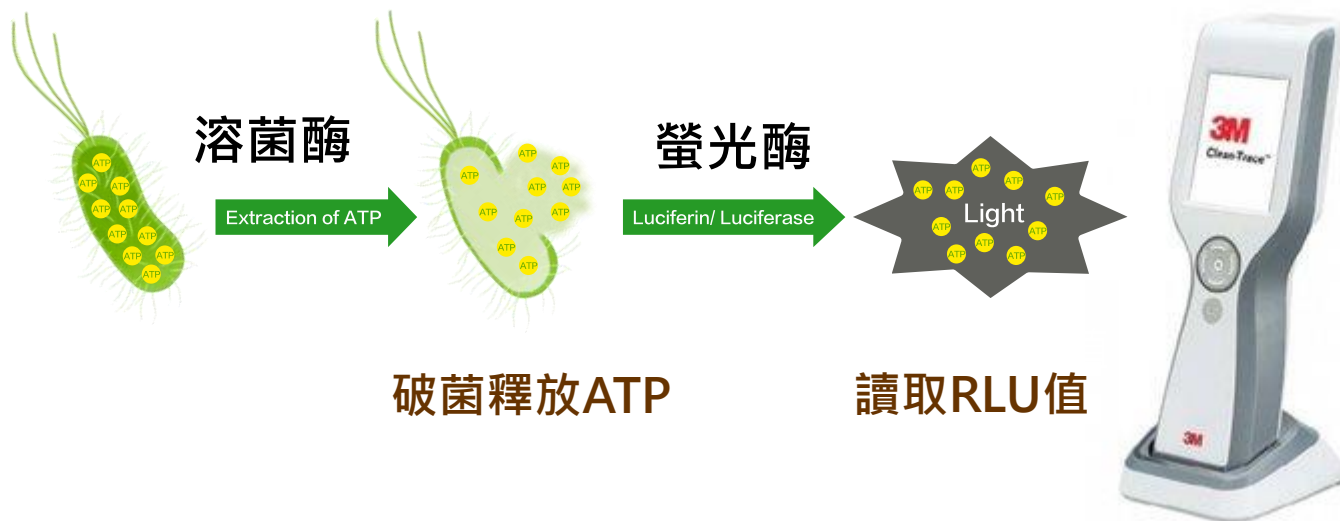
SOP	FDA	USP	ISO 22717
中和劑	MLB	TSB+Lecithin + Polysorbate 20	ELT100 broth MLB
培養基	Cetrimide/PaP	Cetrimide	Cetrimide
培養溫度	25±2 °C	30~35 °C	32.5±2.5 °C
培養時間	18 hr ~24 hr	18 hr ~72 hr	24 hr ~48 hr
			

大腸桿菌檢測之各種方法比較

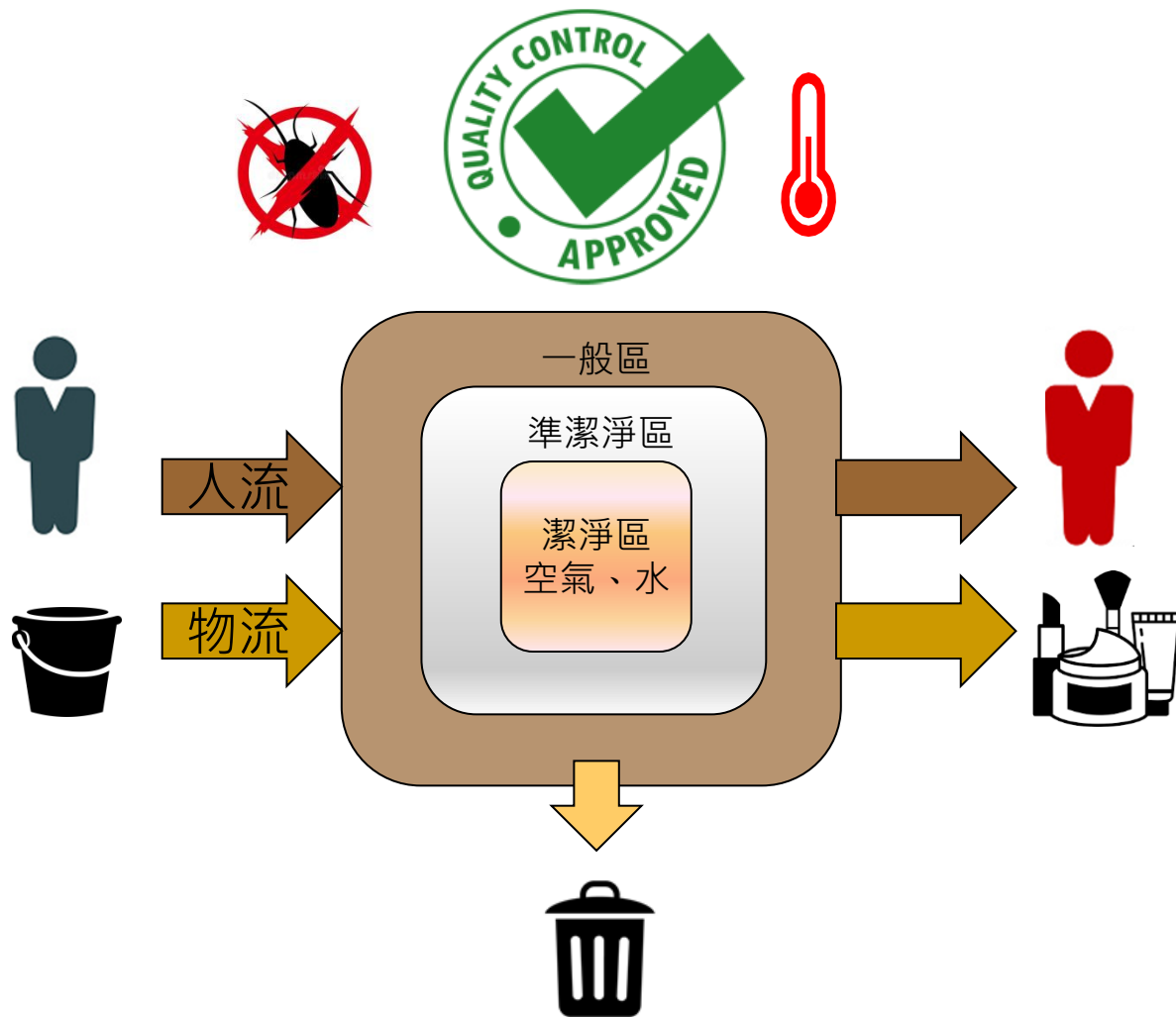
SOP	FDA	USP	ISO 21150
中和劑	MLB	TSB+Lecithin + Polysorbate 20	ELT100 broth MLB
培養基	MacConkey	MacConkey	MacConkey/ EMB
培養溫度	35±2 °C	30~35 °C	32.5±2.5 °C
培養時間	18 hr ~24 hr	18 hr ~72 hr	24 hr ~48 hr
			

替代性微生物檢驗方法-ATP冷光儀

清潔度	相對光亮度(RLU)	APC相對量CFU/cm ²
非常清潔	<50	<60
適度清潔	100<X<300	<500
需校正行動	300<X<1,000	1,500~3,000
不符規格	>1,000	>5,000



潔淨區的概念



潔淨室一指一室內空間，其空氣的供應、空氣分佈、供應空氣的過濾、建構的材料及操作程序皆加以規範，以控制空氣懸浮微粒的濃度，能符合適當清淨度等級的標準。常見設定規格為溫度 $23\pm4^{\circ}\text{C}$ ，濕度 (R.H.) 60 % 以下，Class 100,000

空氣落下菌取樣與常用檢驗方法



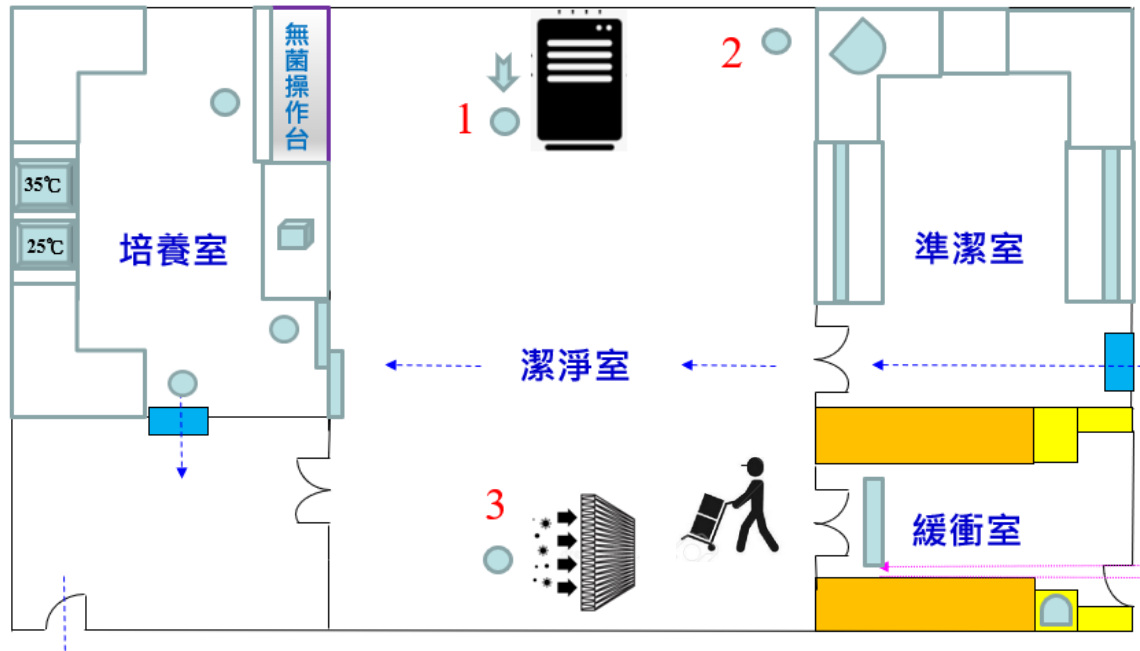
- 關鍵區域應有溫溼度、壓差設計，有微粒子檢測資料，如僅執行初始檢測，濾網須定期更換。
- 關鍵區域應有微生物定期監測，落下菌檢驗至少每半年1次

落下菌法

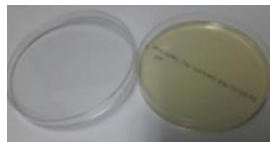
- （一）試驗方法之限制：
 - 要檢測低污染程度的空氣懸浮微生物，除非長時間的暴露，否則落菌法靈敏度不高。**建議暴露4 hr**，較有代表性。
 - 避免培養基表面會有乾涸的問題。
- （二）採樣地點：採樣地點是在必須監測微生物管制環境之位置
 - 應以“最差狀況=最可能汙染源”的條件來監測
 - 監測落下總生菌數可使用, PCA、TSA；勿使用MLA
 - 監測總真菌數可使用MEA, PDA



落下菌採樣settle plates監測位置



採樣點： 作業中 吹瓶室 無菌操作台
傳遞箱 牆死角 回風處

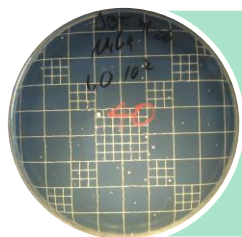


潔淨室空氣測試之參考標準

ISO14644	FS 209	≥ 0.1 $\mu\text{m}/\text{ft}^3$	≥ 0.2 $\mu\text{m}/\text{ft}^3$	≥ 0.3 $\mu\text{m}/\text{ft}^3$	≥ 0.5 $\mu\text{m}/\text{ft}^3$	≥ 5.0 $\mu\text{m}/\text{ft}^3$
4	Class 10	350	75	30	10	
5	Class 100		750	300	100	
7	Class 10,000				10,000	70
8	Class 100,000				100,000	700

潔淨等級	90mm落菌 CFU/ 4hrs	90mm落菌 CFU/ 1hr
Class 100,000	< 100	< 20
Class 10,000	< 50	< 5
Class 100	< 5	< 1

水質取樣與檢驗方法



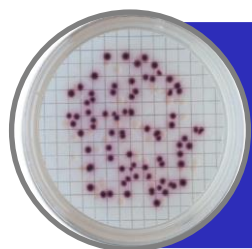
混合稀釋法 NIEA E204.52B

- 1.0 ml 水檢體吸至空培養皿，倒入20 ml 50°C胰化蛋白
胰葡萄糖抽出物培養基 (TGEA) 或在培養皿計數培養基
(PCA) $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 培養 48 ± 3 小時



多管發酵法 NIEA E201.54B

- 本方法係以檢測水中革蘭氏染色陰性，且能在LST培養基
 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 培養 48 ± 3 小時發酵乳糖並產生酸及氣體之
大腸桿菌群



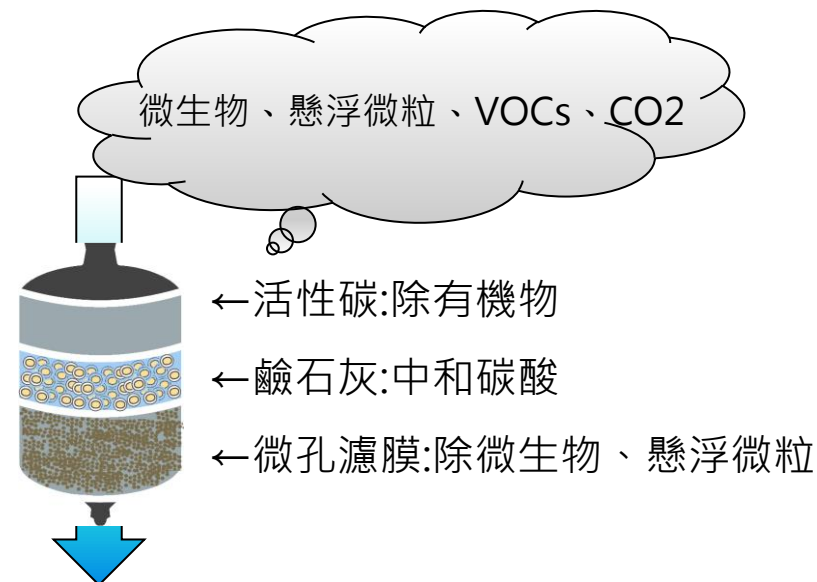
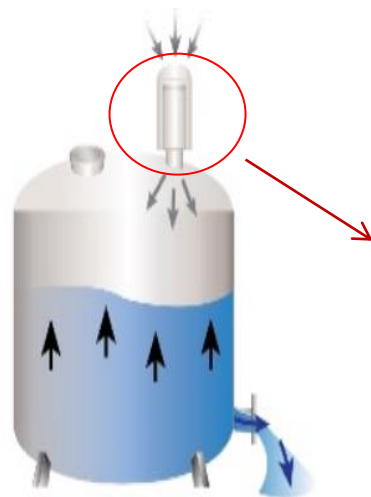
濾膜法 NIEA E230.55B

- $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 以 m-Endo agar LES培養基培養 48 ± 3 小時
後觀察計數

- 水質檢驗(儲桶或循環管路)
- 1) 水質檢驗(每週至少1次)或製程參數監控得擇一確認；應每月至少1次定期微生物檢測(生菌數之容許限值 100 CFU/ mL)
- 2)製程參數監控：至少應包含導電度。
- 3) 微生物水質檢測驗：建議各使用點每月至少取樣檢測1次，且每週至少取樣檢測1點。

■ 5.3.2.3 微生物抽樣檢測：17.水系統管理作業程序_v.1.0_PDF

室內空氣污染物與空氣過濾器



純水污染項目	污染值		單位
二氧化碳 (CO ₂)	8 hrs	1,000	ppm
總揮發性有機化合物(TVOC)	1 hr	0.56	ppm
細菌(Bacteria)	max	1,500	CFU/m ³
真菌(Fungi)	max	1,000	CFU/m ³
< 10 μm之懸浮微粒 (PM ₁₀)	24 hrs	75	μg/m ³
< 2.5μm之懸浮微粒 (PM _{2.5})	24 hrs	35	μg/m ³

空氣過濾器(air vent)能有效發揮功能，需要能夠氣密的儲槽蓋(內有氣密O型環)，氣密的液位控制接頭，具有逆止閥的溢流管(防止倒流污染)等配套措施

外購包裝水管理



包裝水

- 比照原料管理
- 應有COA或逐批檢驗
- 存放久成靜滯水長生物膜

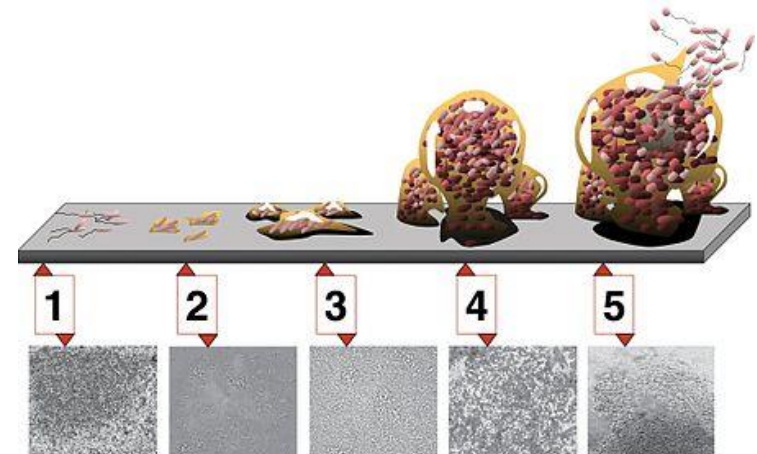
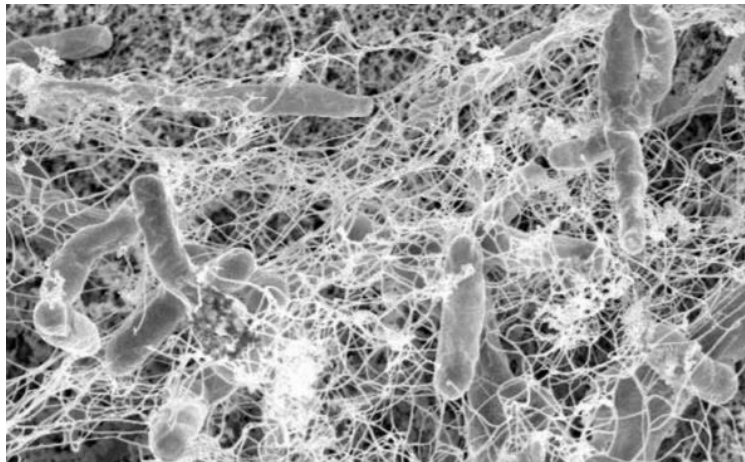


運水車

- 衛生符合運輸規定
- 純水桶應有清潔消毒紀錄
- 有水質檢驗紀錄

純水系統與生物膜

分類	屬名
革蘭氏陰性菌 	Pseudomonas
	Flavobacterium
	Burkholderia
	Acinetobacter
	Klebsiella
革蘭氏陽性桿菌 	Bacillus
革蘭氏陽性球菌 	Micrococcus



生物膜與界面活性劑



Pseudomonas aeruginosa

- 長在5% RH40, 7days(I)



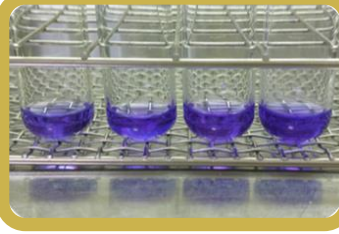
Pseudomonas aeruginosa

- 長在5% RH40, 7days(II)



Pseudomonas aeruginosa

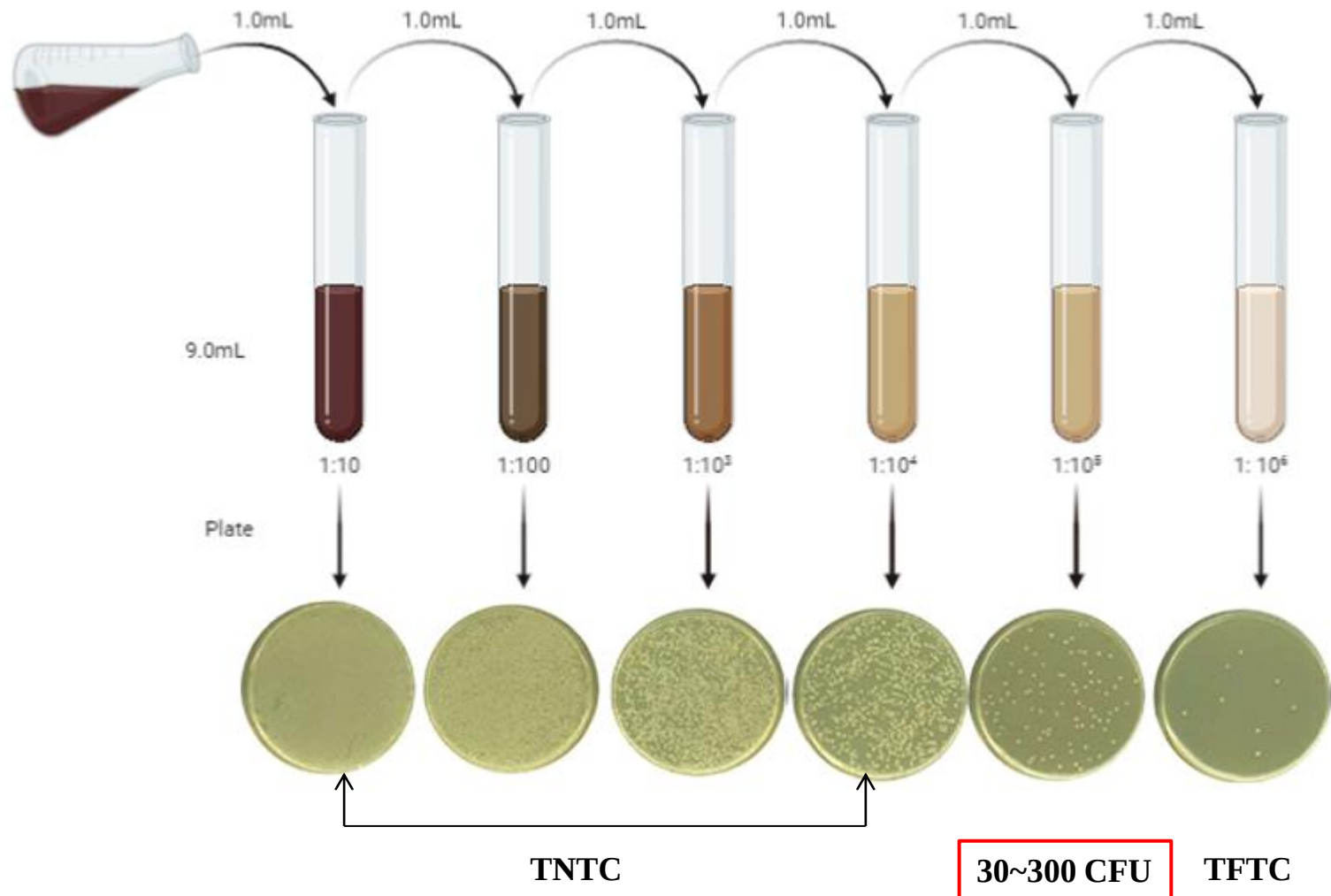
- 結晶紫染色



Pseudomonas aeruginosa

- 定量OD595

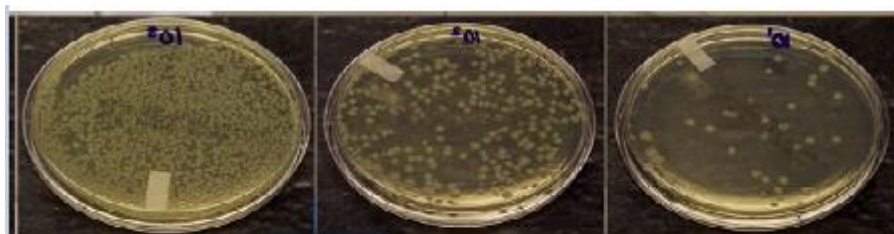
水質總生菌數檢驗方法



品管菌數量統計



1.0 mL



10^3

3000



10^2

300



10^1

30

Serial dilutions	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
Plate 1/ cfu	TNTC	300	27	TFTC
Plate 2/ cfu	TNTC	290	35	TFTC
平均/ 0.1 mL	—	295	31	—
Final cfu/ ml		3.0×10^4	3.1×10^4	

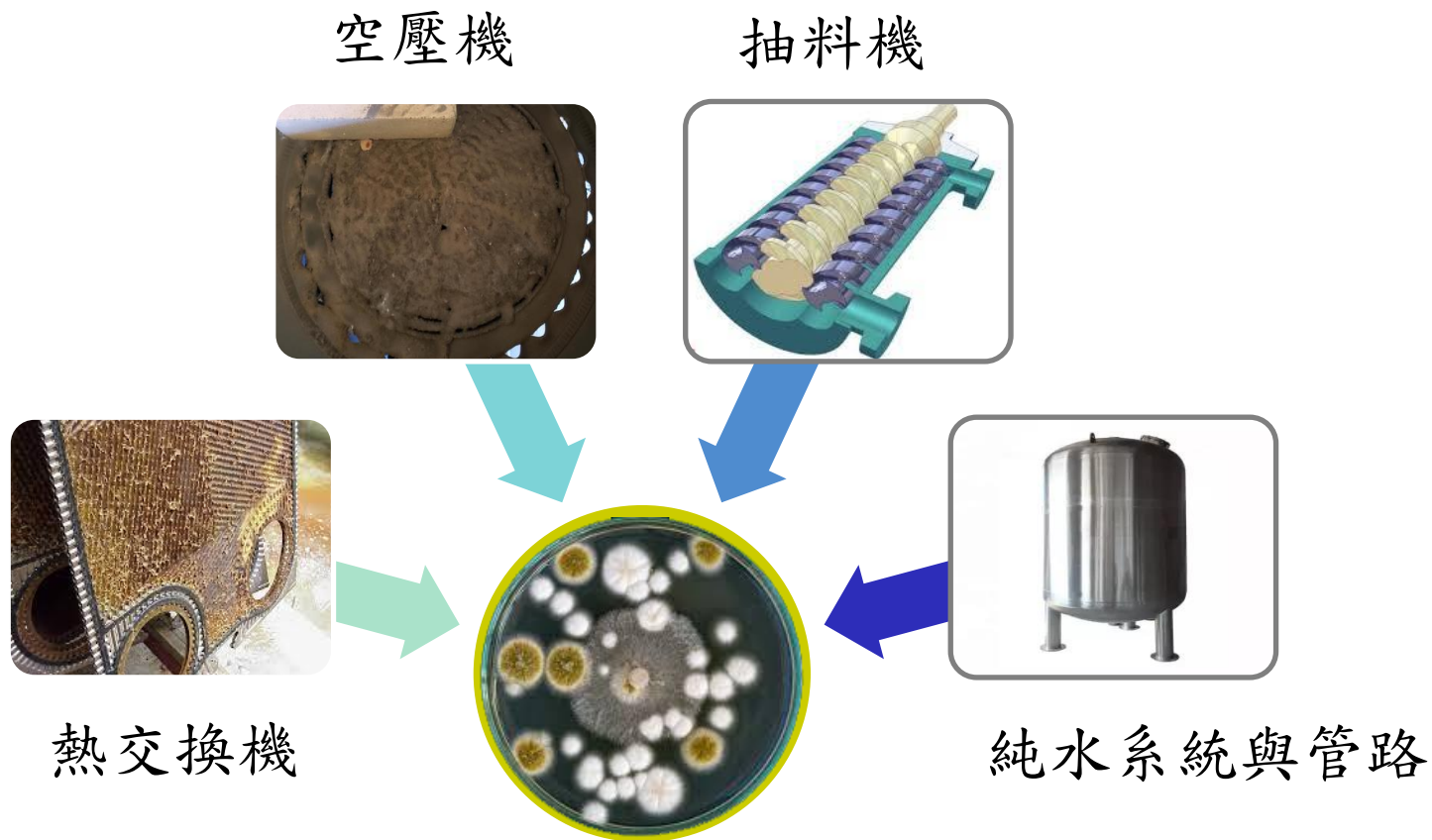
作業區環境微生物檢驗方法介紹

品管檢驗：物性、化性、微生物、滅菌

製程設施：無塵、空壓、熱交換、抽料、純水

排污設施：廢氣、廢水、集塵、蟲鼠害、廢棄物

設備隱形死角-微生物天堂



8-steps培養基製作



1. 秤重



2. 加水攪拌



3. 調pH



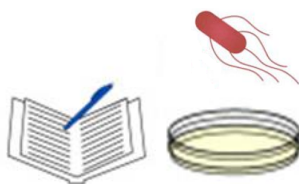
4. 滅菌



5. 傾到製作



8. 檢驗



7. 陽性對照

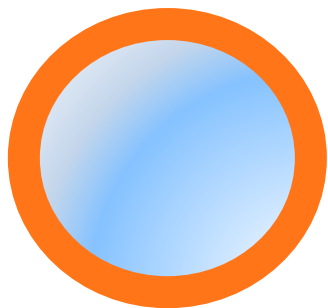


6. 封袋保存

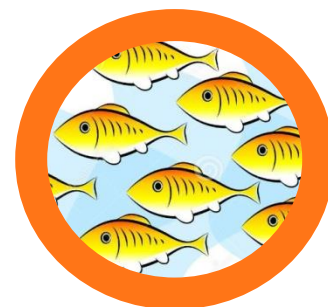
培養基陽性對照

- 培養基選用應有適合性(含抑菌性)評估。為了避免檢驗呈偽陰性，微生物試驗必須執行陽性對照。在平板中加入不超過100 CFU的微生物，長出計算結果差別不可小於2級數。每試驗批培養基需要執行陽性試驗。
- 每種培養基要根據它的包裝形式與儲存條件執行安定性試驗，訂定末效期。
- 依藥典方法測試，陽性測試菌株(例如 *E.coli* ATCC25922)是具有其代表種的穩定特性，並能有效證明特定培養基最佳性能的一株菌。藥典通常要求來自當前批次培養基上的生長的菌落計數不低於前批合格批次的 50% (USP 2003b) 或 70% (USP 2004)。即通過陽性對照試驗。
- 配製培養基時應注意標籤上提供物理化學參數、pH值(真菌與細菌有差異)、有效期或滅菌條件等資訊。

證明培養基效能: 培養基適用性試驗



Negative control:
dilute broth/ no
contamination



Positive control:
Growth promotion



**Treatment
methods:**
Neutralization
/ filtration/ dilution

TABLE 3. Culture Conditions for Preparation of Standardized Cell Suspensions and for Microbial Recovery Studies in Method Validation Experiment (United States Pharmacopeia Chapter <61>).¹¹

ORGANISM	CULTURE MEDIUM	TEMP (°C)	TIME (CELL SUSPENSION)	TIME (RECOVERY)
<i>S. aureus</i>	Soybean-Casein Digest (broth, agar)	30 to 35	18 to 24 hours	≤3 days
<i>P. aeruginosa</i>	Soybean-Casein Digest (broth, agar)	30 to 35	18 to 24 hours	≤3 days
<i>B. subtilis</i>	Soybean-Casein Digest (broth, agar)	30 to 35	18 to 24 hours	≤3 days
<i>C. albicans</i>	Sabouraud Dextrose (agar, broth)	20 to 25	2 to 3 days	≤5 days ^a
<i>A. brasiliensis</i>	Sabouraud Dextrose Agar or Potato-Agar	20 to 25	5 to 7 days	≤5 days ^a

^aAlternate medium: Sabouraud Dextrose Agar or Soybean-Casein Digest Agar

抽樣計畫

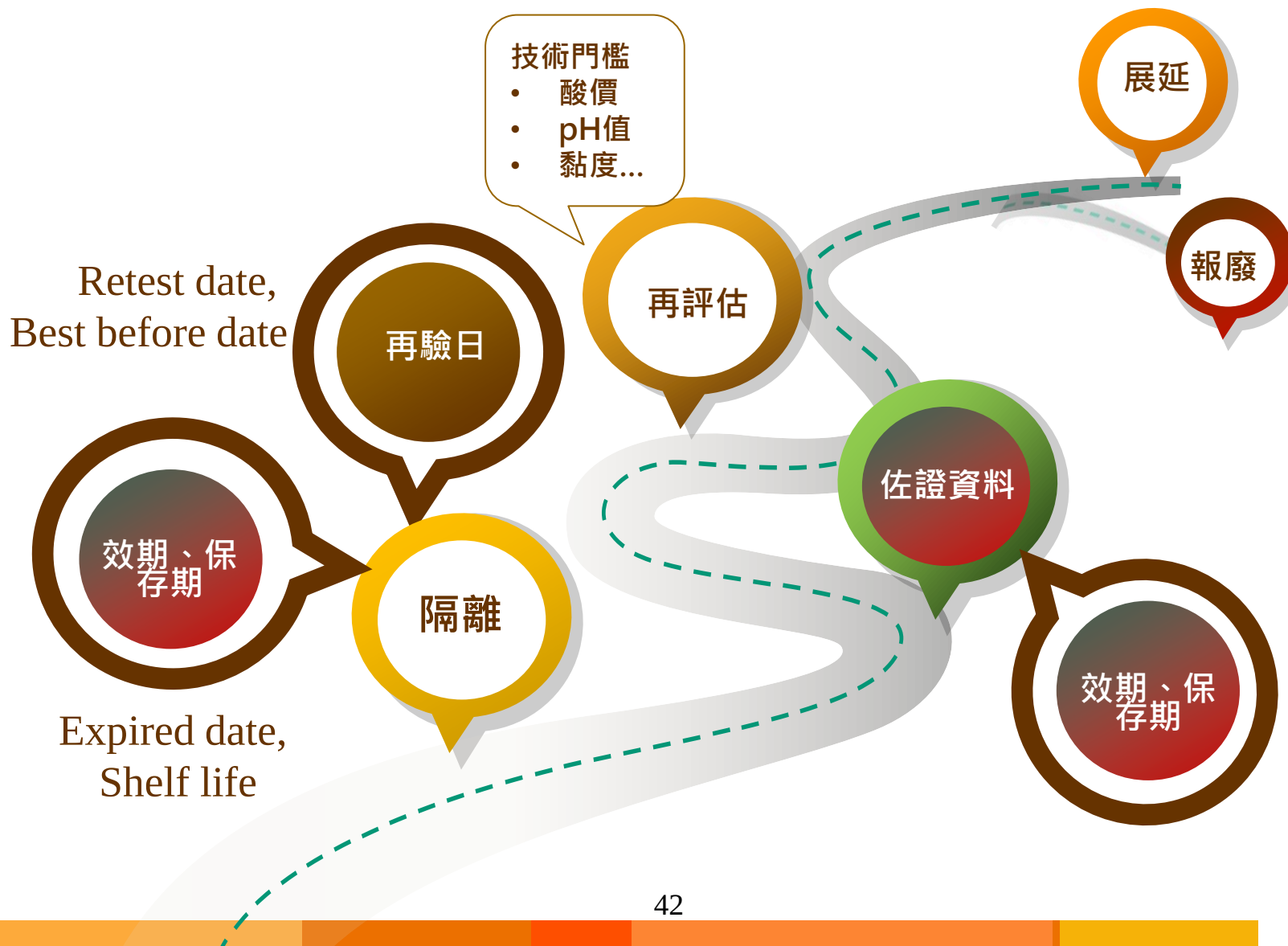
- 原料、包材、原料水、半成品與成品應執行抽樣計畫(參考19.原物料管理作業程序_V.1.0_PDF)
- 包材:MIL-STD-105E
- 原料: $\sqrt{N}+1$
- 無塵工作棚(clean booth)



客供原料管理作業



逾期原物料管理



委託外部測試機構檢驗

SGS

超微量工業安全實驗室

委託者：[REDACTED]

測試報告

報告編號：[REDACTED] 日期：2019年08月24日 頁數

委託者：[REDACTED]

測試結果：

菌株名稱

	(CFU/mL)		菌量(CFU/mL)	
痤瘡丙酸桿菌 (<i>Propionibacterium acnes</i>)	5.3×10^5	60 分鐘	5.5×10^0	>99.9

備註：1. 測試報告僅就委託者之委託事項提供測試結果，不對產品合法性做判斷
2. 本測試報告之所有檢驗內容，均依委託事項執行檢驗，如有不實，願意承擔完全責任。
3. 本報告不得分離，分離使用無效。
4. 菌株編號：
痤瘡丙酸桿菌 BCRC 10723 ; ATCC 6919
5. 滅菌率R(%)小於1%則無明顯抑菌效果。

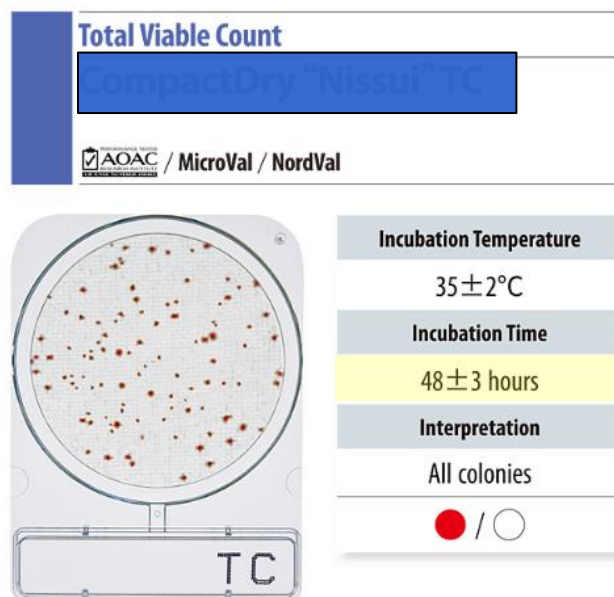
- END -

- • 註明委託的技術條款
- • 委託範圍（產品名稱，測試項目，判斷標準.....）
- • 樣品處理方法（樣品運送，倉儲條件等）
- • 當測試數據是不符合要求的程序

委外檢驗廠內允收標準

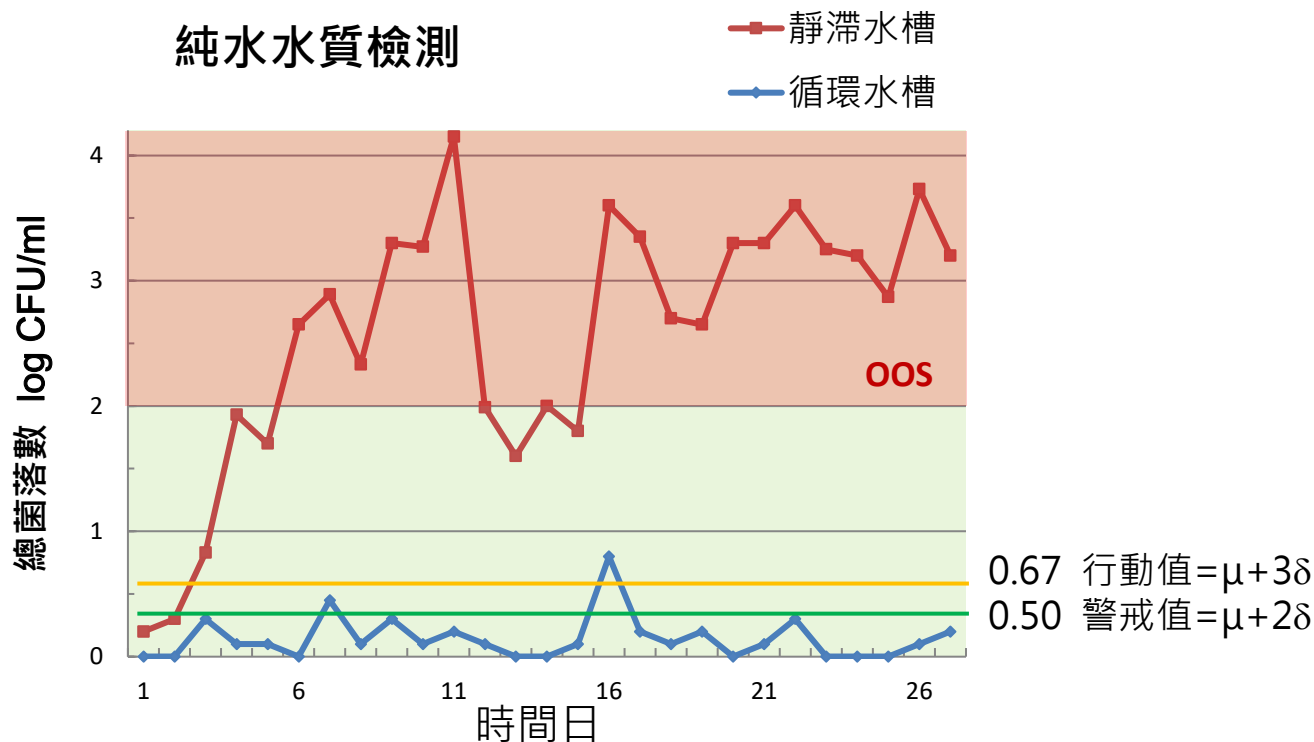
- 目前尚無化粧品委外檢驗(校正)相關實驗室的認證要求，但化粧品製造業者辦理委託前，應評估受託實驗室之履約能力、法遵能力與檢驗(或校正)量能，及確認其履約方法，以確保委託事項依約履行，若委外檢驗(或校正)對象具實驗室認證，可證明其檢驗結果的公信力及可靠度。

微生物快篩試劑(片)檢測評估



- 快篩片並無較快仍須培養48小時
- 快篩片無含防腐中和劑易產生火鳳凰現象
- 快篩利用TTC呈色但纖維膜可能分布不均
- AOAC認證僅針對無防腐劑檢體(如食品)檢驗
- 建議應與認證微生物實驗室數據或國際參考方法比對

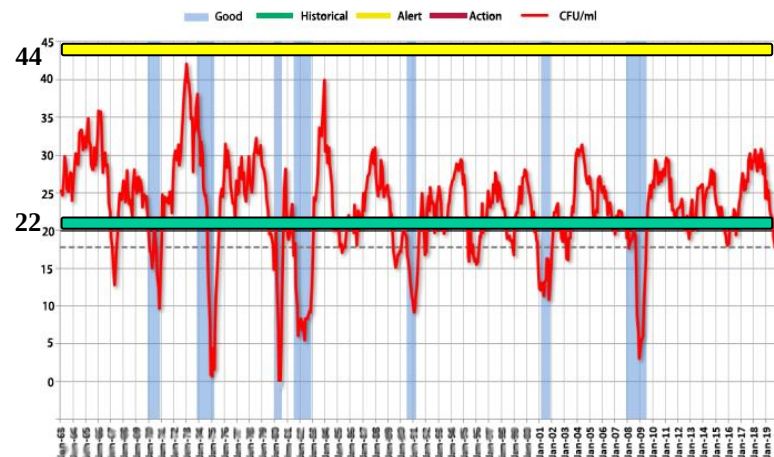
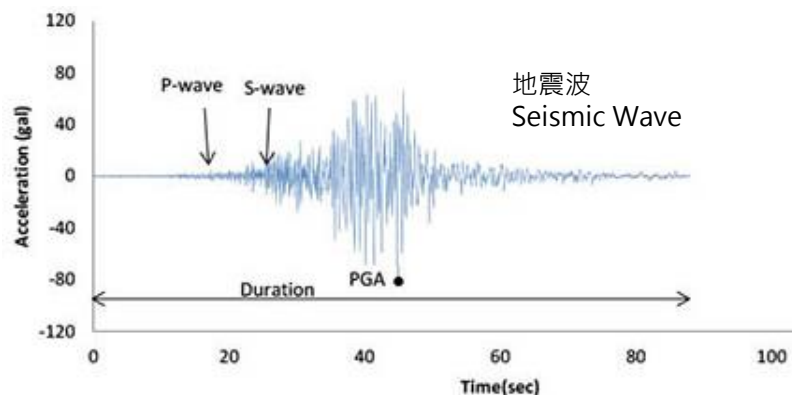
儲水槽循環維護與風險管理的關係



當超純水靜滯開始曝露在大氣下時，二氧化碳溶解至水中。二氧化碳→碳酸→碳酸根離子。利用電導率(conductivity)或pH的變化來監視這個過程。當水中離子濃度持續增加，電導率會持續升高(或電阻抗值持續下降)，通常，在一小時之內，導電度會由 $0.055\mu\text{S}/\text{cm}$ ($18.2\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$)升高到 $0.25\mu\text{S}/\text{cm}$ 以上(下降至 $4\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ 以下)，整個過程中水中總離子濃度甚至提高到4.5倍以上。

品管檢驗數據與風險管理

55



RISK	LOW	MODERATR	HIGH	EXTREME
Symbol	Historical data	Alert level	Action level	OOS
Statistic	Mean	Mean $\pm 2\delta$	Mean $\pm 3\delta$	Specification
Score 38,24,45	34.66,(δ 9.45)	15.76 53.56	6.31 63.01	0 100
Earthquake	3.0,(δ 0.5) 自然能量釋放	4.0	4.5	6.0
Purified Water	22, (δ 11) CFU	44 CFU	55 CFU	100 CFU

Standard Deviation, σ : 11.03855

Count, N: 25
Sum, Σx : 563
Mean, μ : 22.52
Variance, σ^2 : 121.8496

Steps

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \mu)^2}$$

$$\sigma^2 = \frac{\sum (x_i - \mu)^2}{N}$$

$$= \frac{(35 - 22.52)^2 + \dots + (18 - 22.52)^2}{25}$$

$$= \frac{3046.24}{25}$$

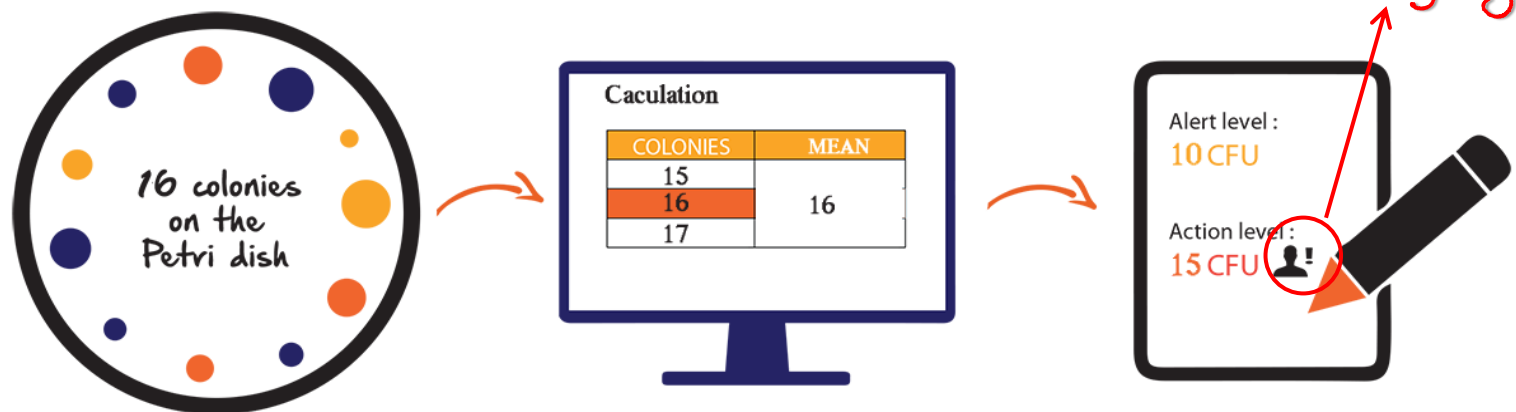
$$= 121.8496$$

$$\sigma = \sqrt{121.8496}$$

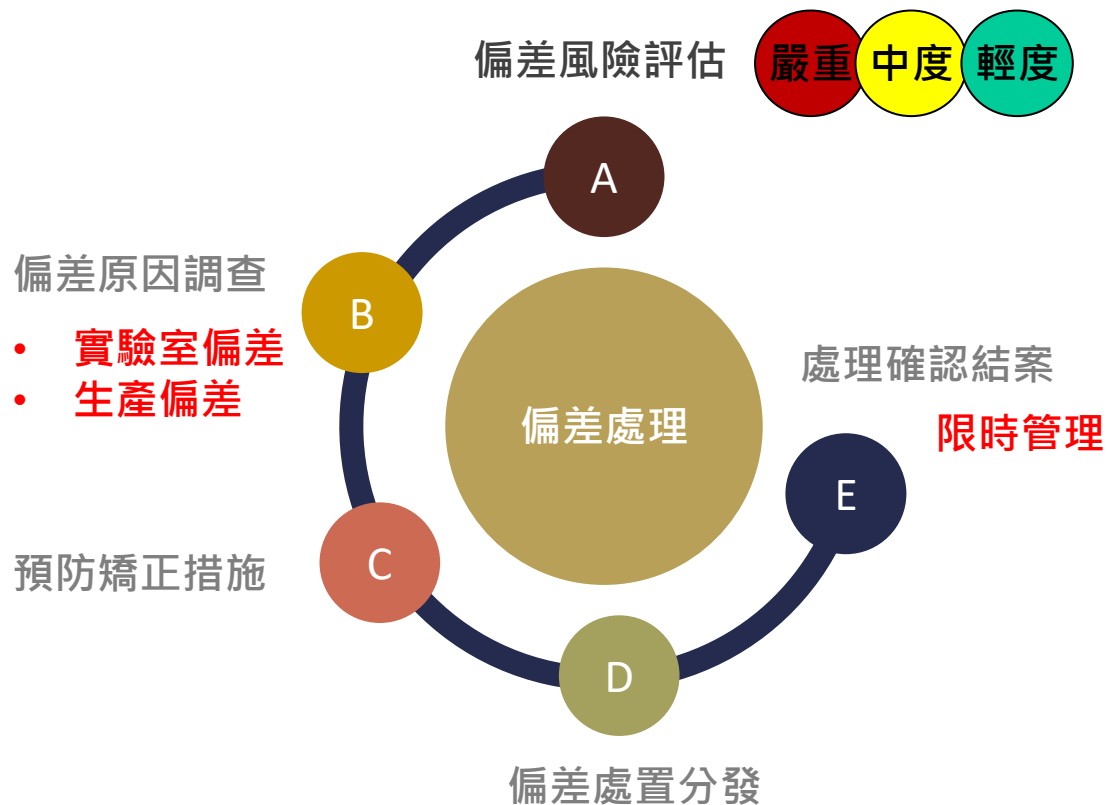
$$= 11.03855$$

為什麼要設警戒值和行動值？

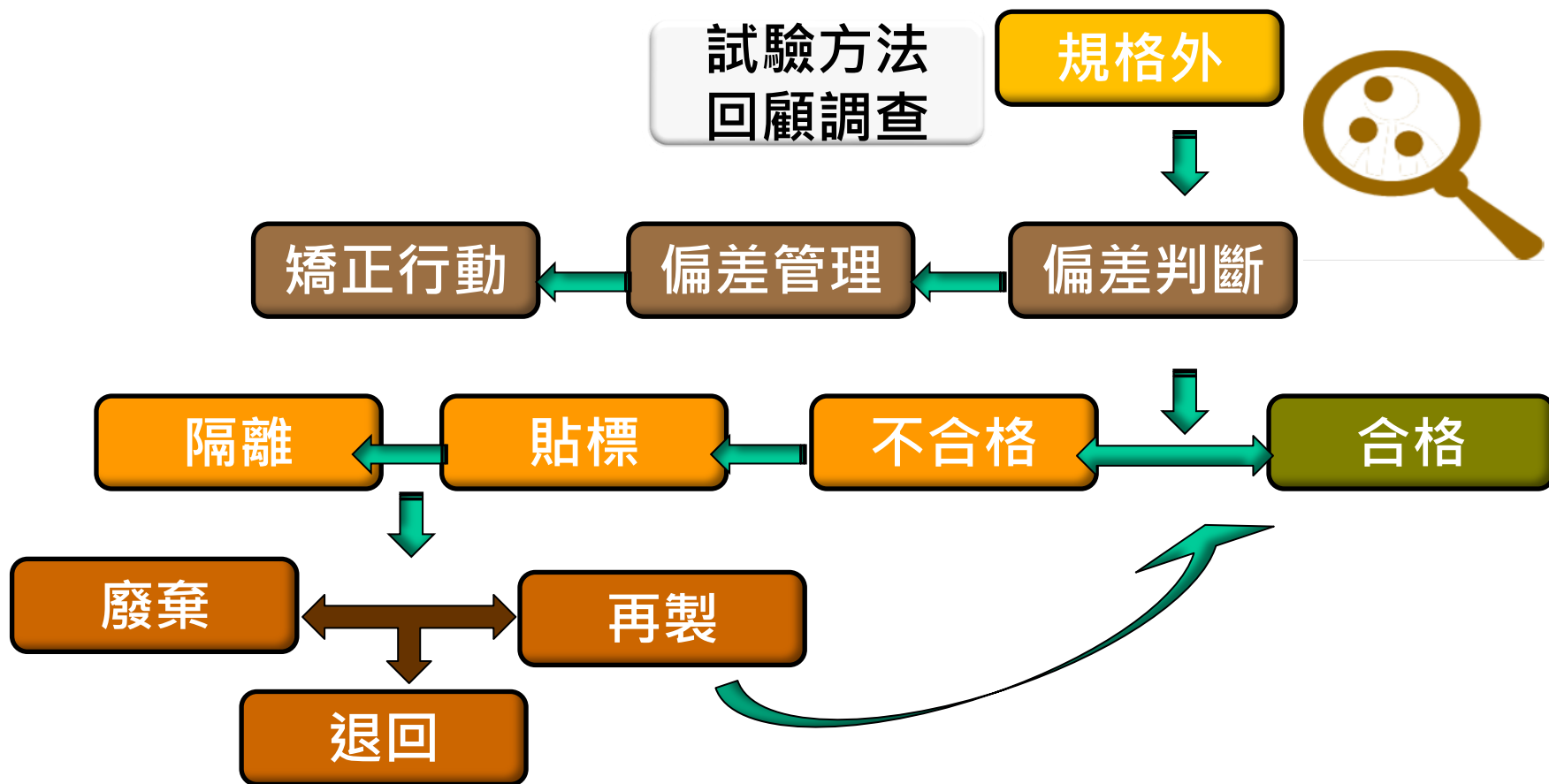
- 因為大部分的現行微生物技術，需要至少48小時才能得到確定的結果(ATP 冷光儀檢測除外)。在出現結果之前，這些水已經用於製造過程。
- 警戒值或行動值有別於允收規格，它們仍是處在合格允收界限內，是用來監測和預測未來即將發生品質劣化的趨勢。
- 警戒值是一種基準或範圍，超越時表示該製程已脫離正常操作條件。警戒界限為一種預警狀態，但**不需採取矯正措施**。然超過行動值則要立即介入矯正以預防不合格品產生。品管實為掌控與管理工廠大數據的關鍵人(the keyman)。



不符合規格產品之調查



不合格品處理調查流程



不合格品再製問題

- 受微生物汙染的產品再加工的安全性堪虞。
- 即使成品滅菌後，部分原料仍有變色、異味與降解等變質問題。
- 產品殘留微生物毒素、代謝有機物與過敏原(內毒素、黴菌孢子)或滅菌劑殘留等問題。
- 化粧品受微生物汙染不符規格，應直接隔離報廢，不得再製或混批稀釋。



Thanks for your listening



授課老師：林朝賢 博士

服務單位：嘉南藥理大學

聯絡電話: 0911-714-981

E-mail: chlin152003@gmail.com