

112年度「化粧品GMP研討會(二)」

# 微生物試驗

品質監督管理組

許潤顯

112/9/15、9/21、9/26



衛生福利部  
食品藥物管理署  
Taiwan Food and Drug Administration

<http://www.fda.gov.tw/>

# 課程大綱



法規管理要求



微生物試驗



微生物試驗減項評估

# 國內化粧品(洗手乳)微生物污染案例



賴先生使用該款 [redacted] 洗手乳，用「清雅槐花配方」(左瓶)洗手後刺癢紅痛，將「神奇紫草配方」(右瓶)送衛生局檢驗生菌量竟高達120萬CFU/g。(蔡淑媛翻攝)

# FDA食品藥物消費者專區


## 食品藥物管理署-食品藥物消費者專區

共有 215 筆搜尋結果

項次	燈號	標題	更新日期
1		歐盟EC發布消費警訊, Marcapar barbier之化粧品「Shampooing」, 因產品遭微生物汙染, 而回收乙事。	2023/08/14
2		加拿大HC發布消費警訊, Groupe Marcelle Inc.之化粧品「WATIER Age Control Supreme Sublime Advanced Day Cream」, 因產品遭微生物汙染, 而回收乙事。	2023/07/26
3		歐盟EC發布消費警訊, lmark之化粧品「Colutorio Clorhexidina + xilitol IMARK」, 因產品遭微生物汙染, 而回收乙事。	2023/06/27
4		加拿大HC發布消費警訊, BKIND Enterprise Inc.之化粧品「BKIND Brightening Face Serum」, 因產品遭微生物汙染, 而回收乙事。	2023/06/17
5		韓國MFDS發布消費警訊, (주)생활공작소之化粧品「생활공작소 센서티브 물티슈 90매」, 因產品遭微生物汙染, 而回收乙事。	2023/06/14
6		瑞士FCAB發布消費警訊, Essence之化粧品「Essence Camouflage + matt Concealer 50」, 因產品遭微生物汙染, 而回收乙事。	2023/06/07
7		美國FDA發布消費警訊, Nature Lake LLC之化粧品「Hand Soap Kit」、「Hand Soap Duo Kit」、「Hand Soap Tablet 5 Pack Refill pouch」及「Hand Soap Tablet 12 pack Refill Pouch」, 因產品遭微生物汙染, 而自主回收乙事。	2023/05/24
8		美國FDA發布消費警訊, Delta Brands Inc.之化粧品「Clarisse brand Panty Spray; 4 fl. oz.」, 因產品遭微生物汙染, 而回收乙事。	2023/03/31
9		美國FDA發布消費警訊, American Institute of Intradermal Cosmetics之化粧品「PREMIER PIGMENTS COLOR IS EVERYTHING Beautiful Brows Light Blonde Honey 0.5 oz」, 因產品遭微生物汙染, 而回收乙事。	2023/03/27
10		美國FDA發布消費警訊, Evolved By Nature Inc之化粧品「Evolved By Nature Hand Soap Rosemary Lemon」, 因產品遭微生物汙染, 而回收乙事。	2023/03/17

# Safety Gate: the EU rapid alert system for dangerous non-food products

Notifying country	France
Product category	Cosmetics
Product	Shampoo
Name	Shampooing
Brand	Marcapar barbier
Batch number	BSH1/Y091 BSH2/X051
Type / number of model	250ML - 007670 500ML - 007671
Barcode	3760172621836 3760172621843
Product description	Liquid shampoo, verbena/bergamot fragrance intended for men. This product is supplied in 250 and 500 ml bottle. Product sold online.
Packaging description	Plastic bottle.
Country of origin	France
Risk type	Microbiological
Risk description	The product is microbiologically contaminated with the bacteria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (measured value up to: 10 000 CFU/g). The microorganism may potentially cause illness in some consumers, particularly those with a weakened immune system; and if used on damaged skin, or if it comes into contact with the eyes, the product may cause infection or irritation.



1 Media files

[View all](#)

<https://ec.europa.eu/safety-gate-alerts/screen/webReport/alertDetail/10009816?lang=en>

# Microbiological contamination of cosmetic products – observations from Europe, 2005–2018

Species of bacteria found in microbiologically contaminated cosmetic products registered in the Rapex database in 2005 –2018

Microorganisms identified	Number or reported products	Per cent of all of the reported products
<b>Gram-negative bacteria</b>	<b>62</b>	<b>59.62</b>
<b>Achromobacter</b>	<b>1</b>	<b>0.96</b>
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	1	0.96
<b>Burkholderia</b>	<b>4</b>	<b>3.85</b>
<i>Burkholderia cepacia</i>	3	2.88
<i>Burkholderia species</i>	1	0.96
<b>Citrobacter</b>	<b>1</b>	<b>0.96</b>
<i>Citrobacter freundii</i>	1	0.96
<b>Enterobacter</b>	<b>12</b>	<b>11.54</b>
<i>Enterobacter cloacae</i>	4	3.85
<i>Enterobacter gergoviae</i>	8	7.69
<b>Klebsiella</b>	<b>3</b>	<b>2.88</b>
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	0.96
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	1.92
<b>Pantoea</b>	<b>2</b>	<b>1.92</b>
<i>Pantoea agglomerans</i>	1	0.96
<i>Pantoea species</i>	1	0.96
<b>Pseudomonas</b>	<b>37</b>	<b>35.58</b>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30	28.84
<i>Pseudomonas putida</i>	1	0.96
<i>Pseudomonas species</i>	6	5.77

<b>Rhizobium</b>	<b>1</b>	<b>0.96</b>
<i>Rhizobium radiobacter</i>	1	0.96
<b>Serratia</b>	<b>1</b>	<b>0.96</b>
<i>Serratia marcescens</i>	1	0.96
<b>Gram-positive bacteria</b>	<b>7</b>	<b>6.73</b>
<b>Bacillus</b>	<b>1</b>	<b>0.96</b>
<i>Bacillus firmus</i>	1	0.96
<b>Enterococcus</b>	<b>2</b>	<b>1.92</b>
<i>Enterococcus faecium</i>	1	0.96
<i>Enterococcus species</i>	1	0.96
<b>Staphylococcus</b>	<b>4</b>	<b>3.85</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	3.85
<b>Fungi</b>	<b>2</b>	<b>1.92</b>
<b>Candida</b>	<b>2</b>	<b>1.92</b>
<i>Candida albicans</i>	2	1.92
<b>Unspecified microbiological risk</b>	<b>45</b>	<b>43.37</b>
Mould	2	1.92
Unspecified bacteria	36	34.62
Unspecified bacteria and mould	1	0.96
Unspecified bacteria, yeast, and mould	4	3.85
Unspecified microbiological contamination	1	0.96
Yeast	1	0.96

# 化粧品-微生物法規

## 化粧品衛生安全管理法第六條

化粧品微生物容許量基準表修正規定對照表

修正規定				現行規定				說明
編號	產品類型	生菌數	其他規定	編號	產品類型	生菌數	其他規定	
1	三歲以下孩童用、眼部周圍用及使用於接觸黏膜部位之化粧品	100 CFU/g 或 CFU/mL 以下	不得檢出大腸桿菌 ( <i>Escherichia coli</i> )、綠膿桿菌 ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )、金黃色葡萄球菌 ( <i>Staphylococcus aureus</i> ) 或白色念珠菌 ( <i>Candida albicans</i> ) 等。	1	嬰兒用、眼部周圍用及使用於接觸黏膜部位之化粧品	100 CFU/g 或 CFU/mL 以下	不得檢出大腸桿菌 ( <i>Escherichia coli</i> )、綠膿桿菌 ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ) 或金黃色葡萄球菌 ( <i>Staphylococcus aureus</i> ) 等。	一、修正適用產品之類型。 二、新增不得檢出菌種一項。
2	其他類化粧品	1000 CFU/g 或 CFU/mL 以下		2	其他類化粧品	1000 CFU/g 或 CFU/mL 以下		

# 課程大綱



法規管理要求



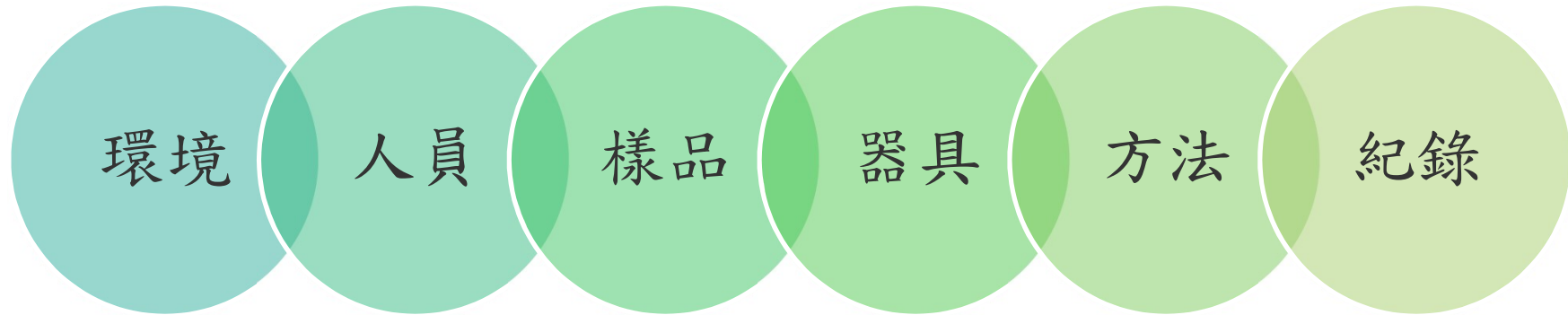
微生物試驗



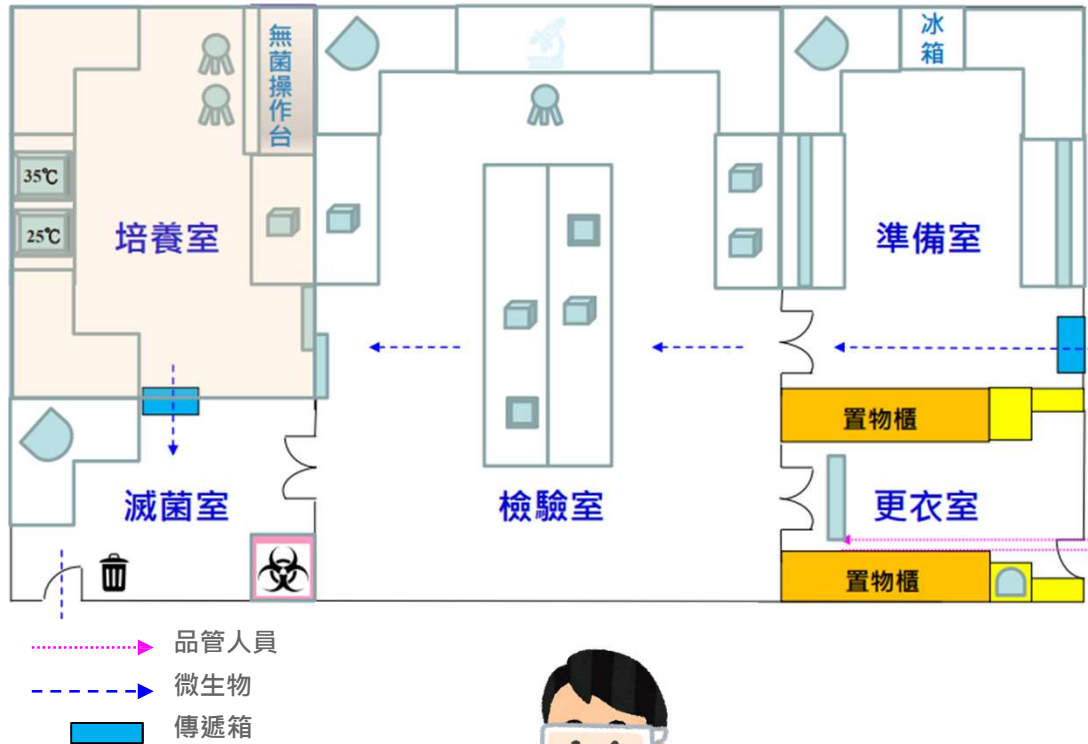
微生物試驗減項評估



# 微生物試驗



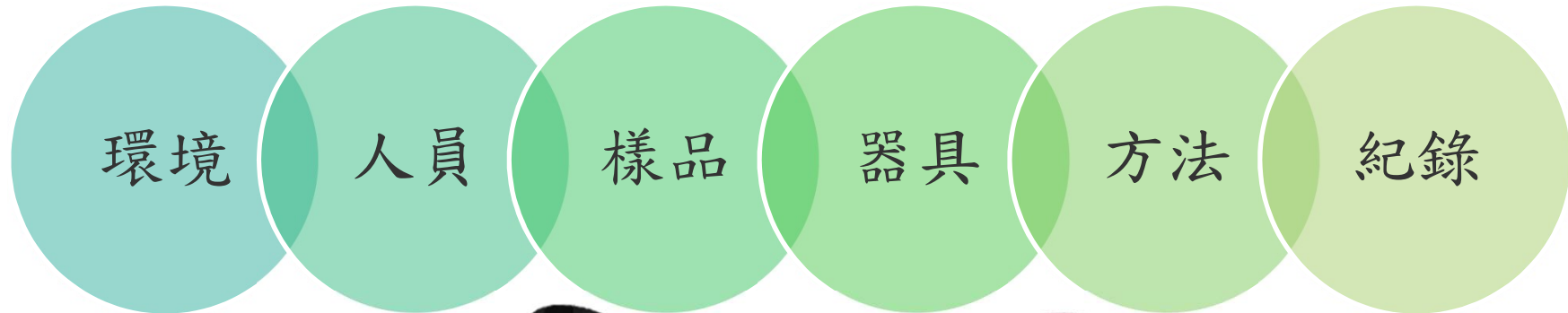
# 實驗室示意圖



- ✓ 獨立空調系統
- ✓ 理化、微生物試驗室分開
- ✓ 良好的實驗室動線，避免實驗中混雜或污染
  - 人、物流分開
  - 進、出入口分開
  - 盡可能避免多組實驗人員同時進行
- ✓ 門禁管制

110年化粧品GMP訓練(二)-林朝賢 老師

# 微生物試驗-人員

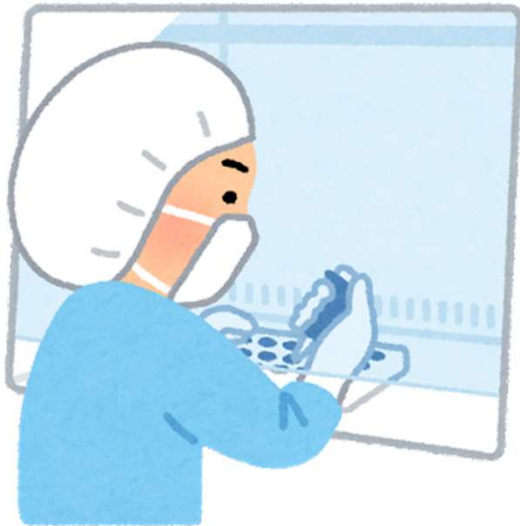


# 人員

## 訓練合格之試驗人員確保試驗結果正確性

- 教育訓練

- 人員健康檢查
- 洗手及更衣流程
- 微生物操作訓練
- 生物安全櫃操作訓練

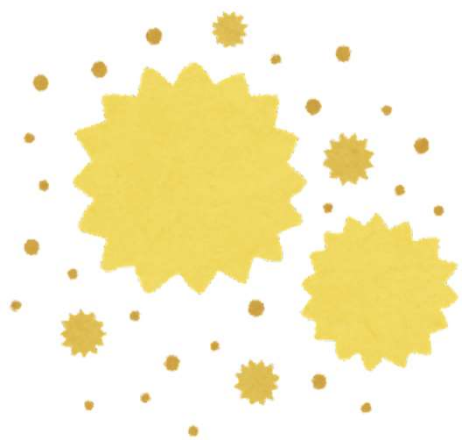
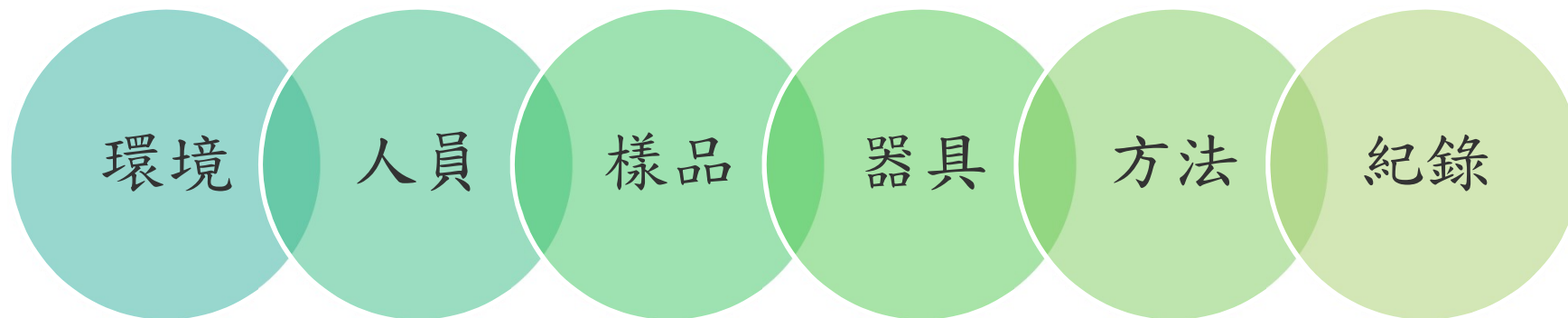


### 微生物操作-避免實驗污染

- 操作中減少濺灑及氣霧之產生。
- 實驗中盡可能減少尖銳品之使用。
- 手套有破損，應立即更換。



# 微生物試驗-樣品



環境



水



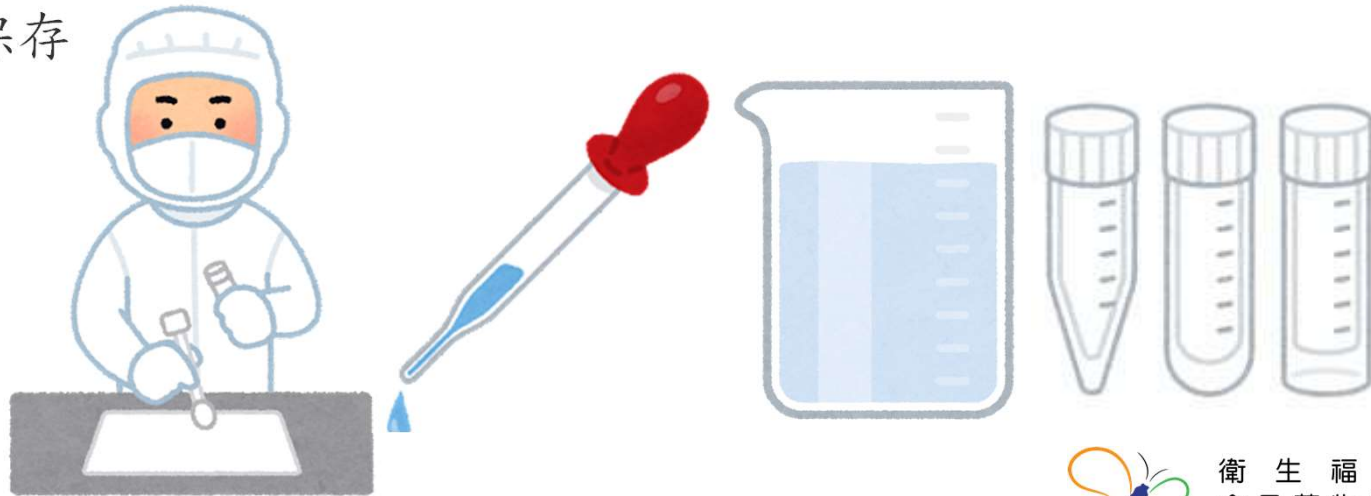
成品

# 樣品

## 由訓練合格之人員取樣

- 取樣

- 取樣人員訓練
- 取樣方法(步驟、取樣量)
- 取樣容器、器具(確認已消毒/  
拋棄式耗材)
- 樣品標示
- 樣品保存



樣品標示卡			
<input type="checkbox"/> 半成品 <input type="checkbox"/> 成品			
名稱	·0000	批號	<input type="checkbox"/> - <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> - <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
抽樣日期		取樣容器	
抽樣點 (地點)		抽樣量	淨重(g)
			毛重(g)
儲存溫度	溫度：00 ± 0 °C	儲存濕度	00 ± 0 % RH
抽樣人員		備註	避光....

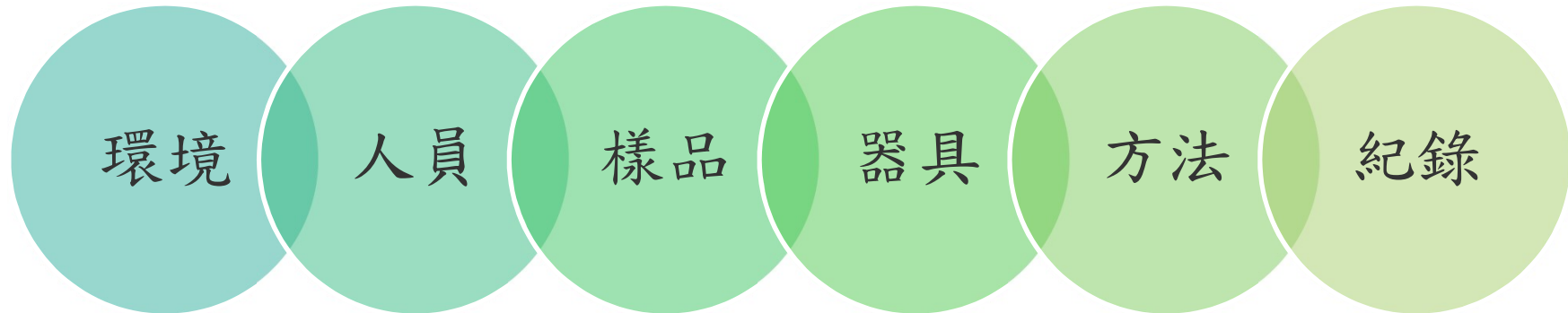
(SOP-XXX/ O.O)

# 採樣方法注意事項-以NIEA E203.56B為例

## 六、採樣與保存

- (一) 盛裝水樣檢驗微生物時，應使用清潔並經滅菌之玻璃瓶、無菌塑膠容器或市售無菌採樣袋，且於採樣時應避免受到污染。水樣若含有餘氯時，應使用內含硫代硫酸鈉錠劑之無菌採樣袋，或於無菌容器中加入適量之無菌硫代硫酸鈉以中和餘氯（採取加氯之廢水時，每 100 mL 之水樣如加入 0.1 mL 之 10% 硫代硫酸鈉，可中和之餘氯量約為 15 mg/L。採取含氯之飲用水水樣時，每 100 mL 之水樣如加入 0.1 mL 之 3% 硫代硫酸鈉，可中和之餘氯量約為 5 mg/L）。
- (二) 飲用水採樣前應清潔手部，出水口以火烤或以 70% 至 75% 酒精消毒。所採水樣應具有代表性。
- (三) 運送時水樣溫度應維持在小於 10°C 且不得凍結，實驗室內保存溫度應維持在  $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。
- (四) 水樣應於採樣後 24 小時內完成水樣塗抹步驟（七、步驟（四）），並置入培養箱中培養。
- (五) 水樣量以能做完所需檢驗為度，但不得少於 100 mL。

# 微生物試驗-器具





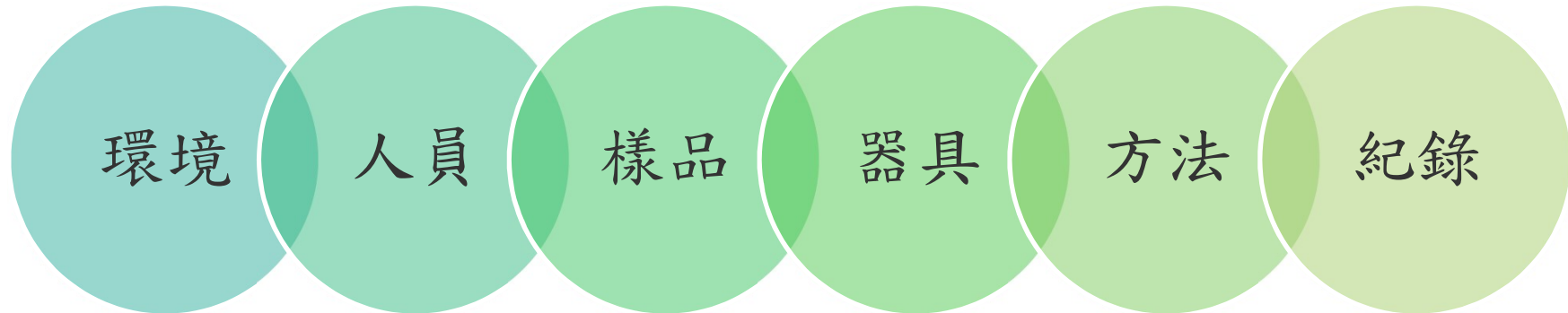
# 微生物實驗-器具

## 實驗前需已滅菌並妥善保存

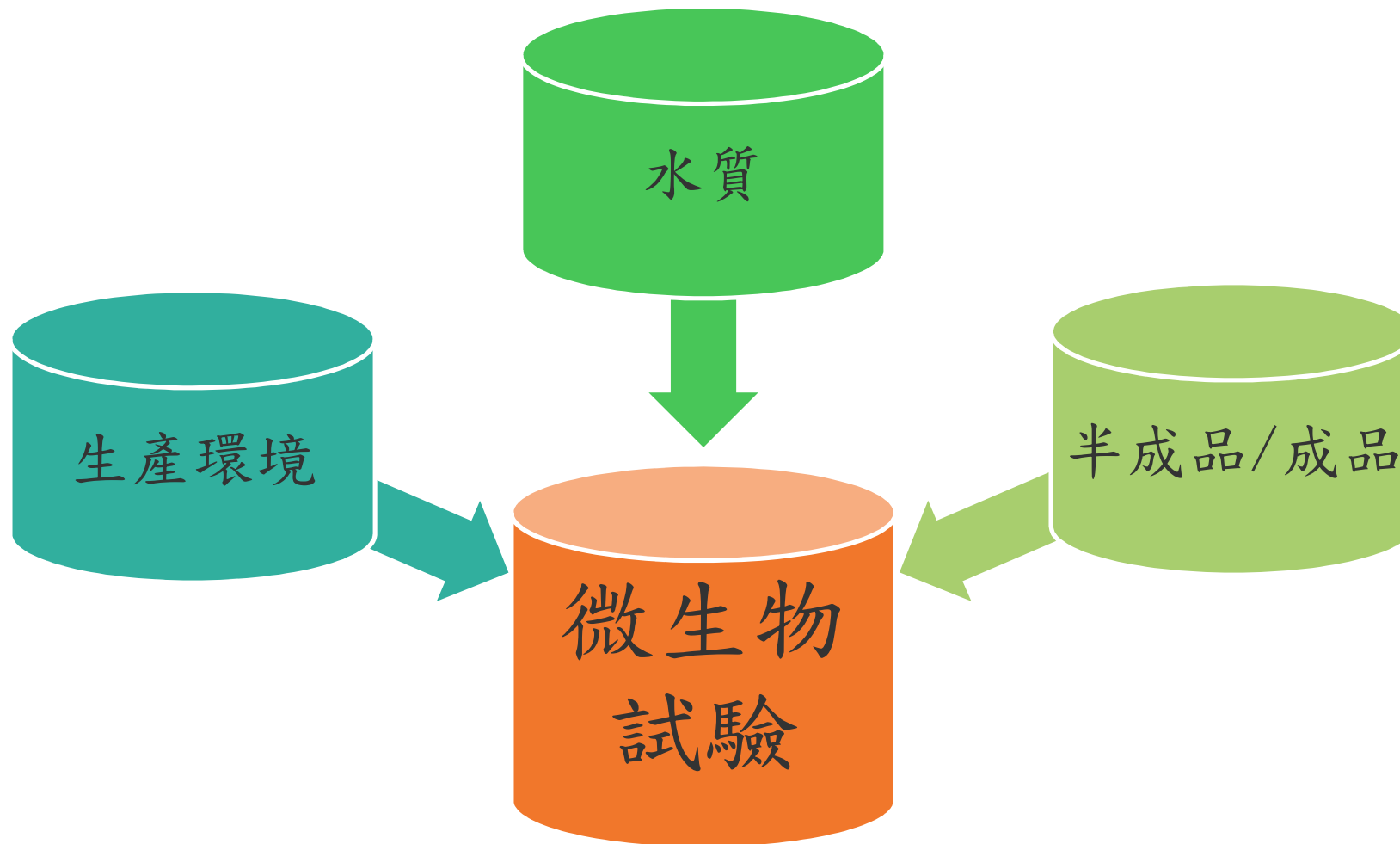
- 微生物操作器具
    - 可重複性使用器具-已滅菌/消毒
    - 拋棄式耗材-未開封
    - 以防漏容器傳遞運送器具、耗材
    - 培養皿正確配置/滅菌，效期
- ※巴德派克金黃葡萄球菌培養基需另加蛋黃亞碲酸鹽液



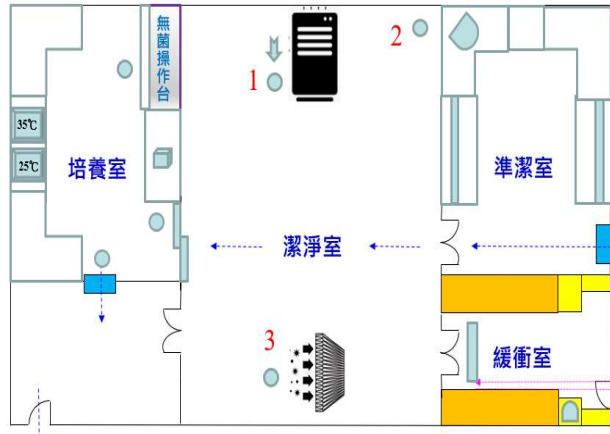
# 微生物試驗-方法



# 化粧品中微生物試驗方法



# 化粧品生產環境微生物試驗方法



<https://www.youtube.com/watch?v=Na3fJoz2Ytg>  
[https://www.youtube.com/watch?v=5k8\\_qOg0Xm8](https://www.youtube.com/watch?v=5k8_qOg0Xm8)

## 參考方法

- USP <1116>-落菌法
- 空氣中細菌濃度檢測方法(NIEA E301.15C)

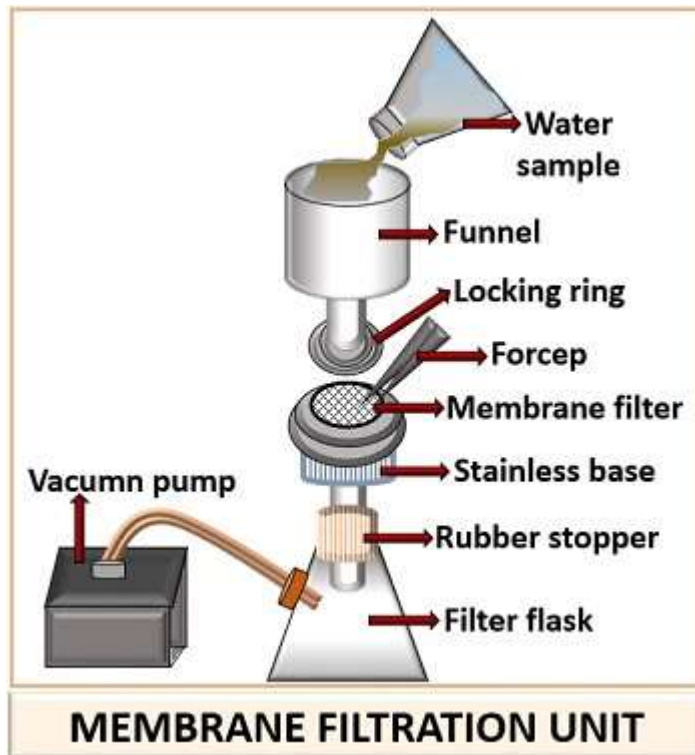
## 取樣點

- 傳遞箱
- 牆角落
- 迴風口

## 檢測頻率

- 定期檢測，確認生產環境，建議3個月1次。
- 落菌法培養基暴露時間不宜過短或過長。
- 培養基標示採樣點編號、起訖時間。
- 建議TSA(90 mm)， $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$ 下培養、至少72hr

# 化粧品水質微生物試驗方法



無菌 0.45  $\mu\text{m}$

## 參考方法

- 水中總菌落數檢測方法－塗抹法 (NIEA E203.56B)
- 水中總菌落數檢測方法－濾膜法 (NIEA E205.57B)

## 取樣點

- 生產用水取水點
- 循環階段儲水桶

## 檢測頻率

- 生產用水取水點，各點每月最少檢測一次
- 每週最少檢測一點
- 異常事件熱/化消後檢測
- 建議TGE/PCA(90 mm)，35°C 下培養、48hr。

<https://www.youtube.com/watch?app=desktop&v=K2UJzVxIIFM>

# 包裝水

首頁 > 業務專區 > 化粧品 > 化粧品GMP專區 > 常見問題與答覆

製程用水為外購(包裝水或以水車送水)，其品質規範為何?(原料及包裝材料)

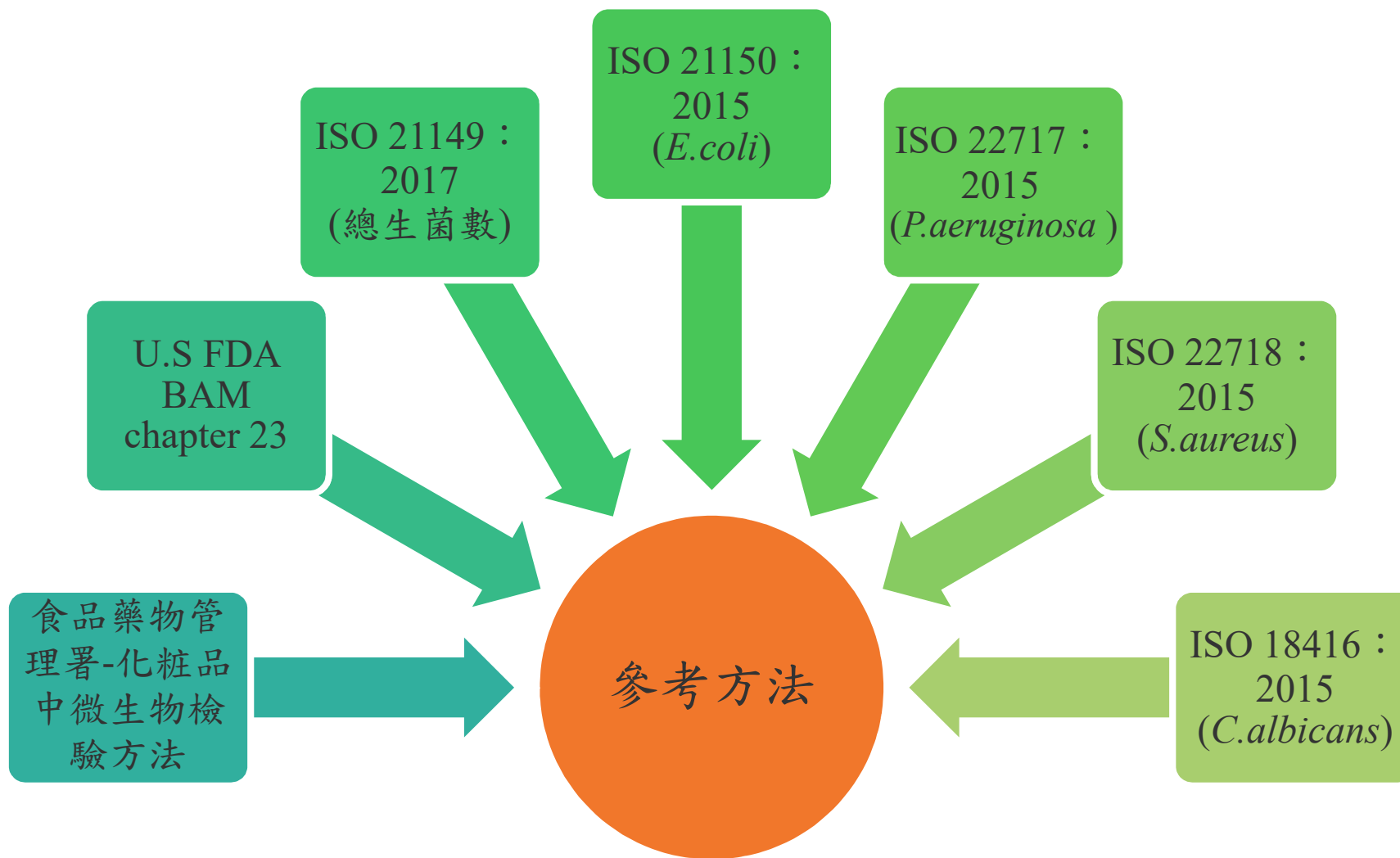
| 發布日期：2022-05-12 | 更新日期：2022-05-12

外購製程用水(如包裝水或水車運送)應依原料相關規定逐批抽樣與檢驗，若有佐證資料，可減少部分檢驗項目。若以供應商分析證明文件作為佐證資料，業者應評估供應商具備一定技術、知識及經驗，以確保製程用水品質。

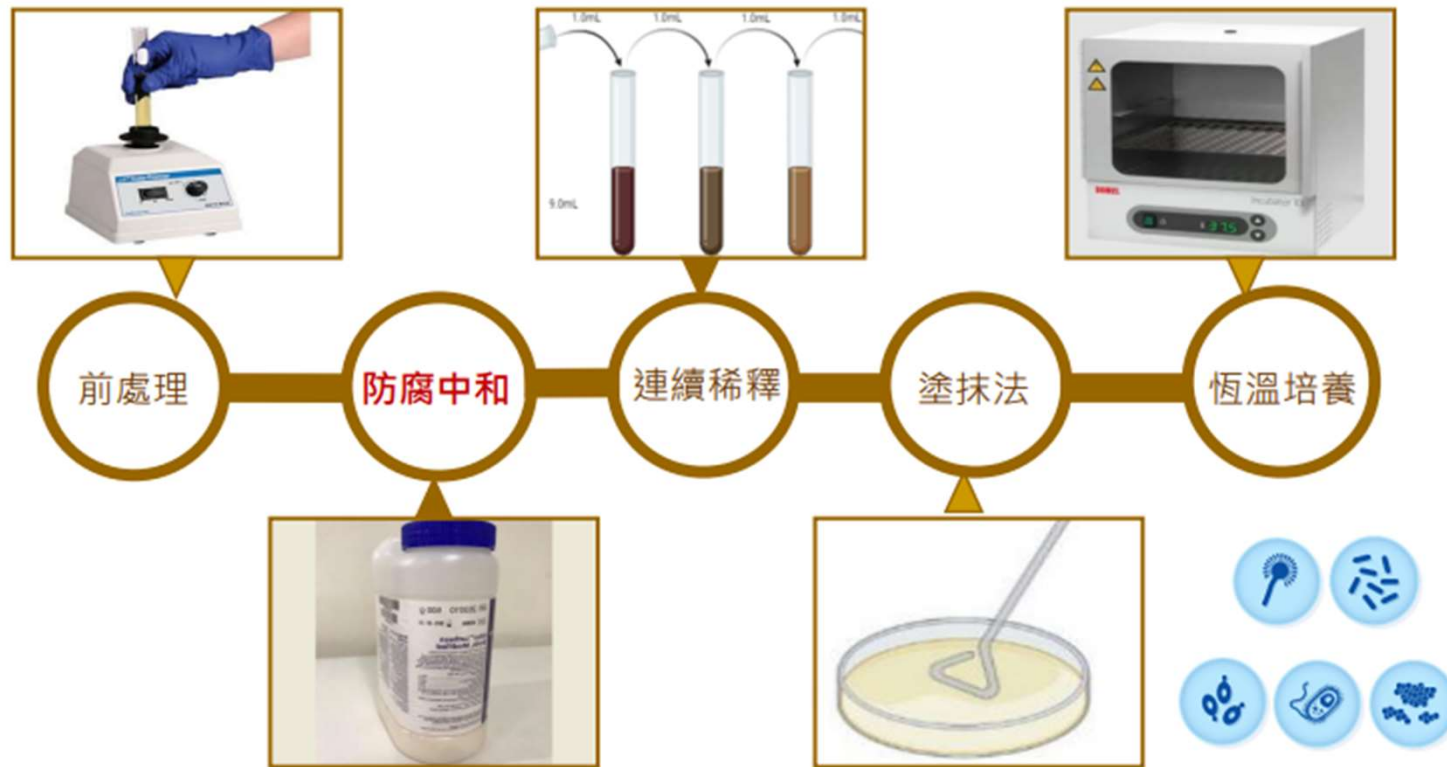
另，包裝水應規範開封使用期間及保存方式，水車送水之廠內儲存桶及循環管路(使用點)水質應有定期監測相關佐證資料(如理化試驗及微生物試驗)。

<http://www.fda.gov.tw/TC/siteListContent.aspx?sid=11191&id=40500>

# 化粧品半成品/成品微生物試驗方法



# 化粧品半成品/成品微生物試驗流程





# 化粧品半成品/成品樣品-前處理

## 食品藥物管理署-化粧品中微生物檢驗方法

### 2.5. 檢液之調製：

檢體於開封前仔細檢查容器無任何的破損，將檢體振搖均勻混合，以70%乙醇溶液消毒檢體容器的表面，再以無菌紗布擦乾表面。

#### 2.5.1. 液態檢體：

精確稱取檢體1 mL，置於滅菌試管，加入MLB 9 mL，混合均勻，作為10倍稀釋檢液。

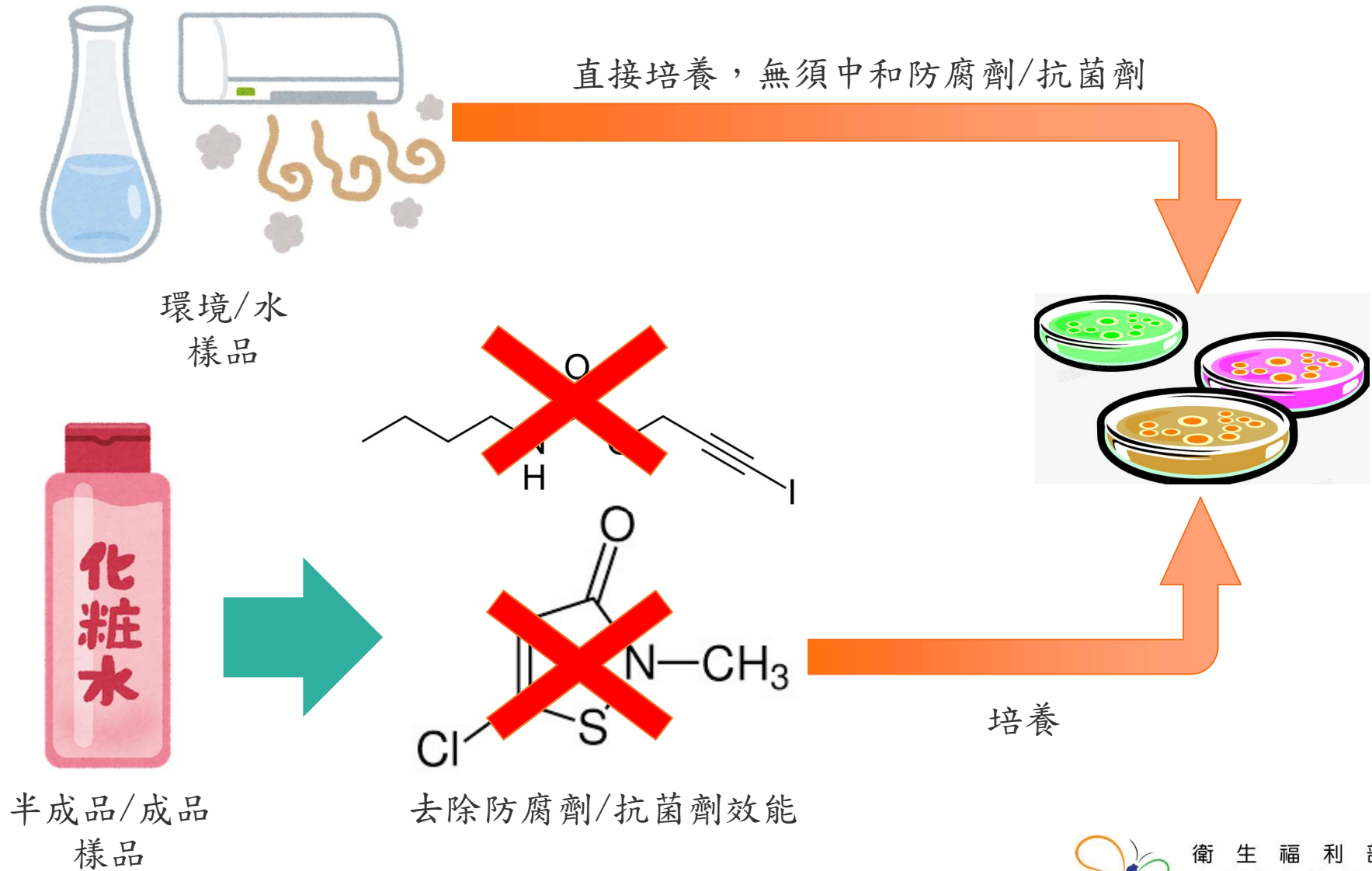
#### 2.5.2. 固態與粉末檢體：

精確稱取檢體1 g，置於滅菌試管，加入經121°C滅菌15分鐘之Tween 80 1 mL，利用抹刀將檢體分散後，再加入MLB 8 mL，混合均勻，作為10倍稀釋檢液。

#### 2.5.3. 面霜及油脂類檢體：

精確稱取檢體1 g，置於滅菌試管，加入經121°C滅菌15分鐘之Tween 80 1 mL、無菌玻璃珠5~7顆及MLB 8 mL，混合均

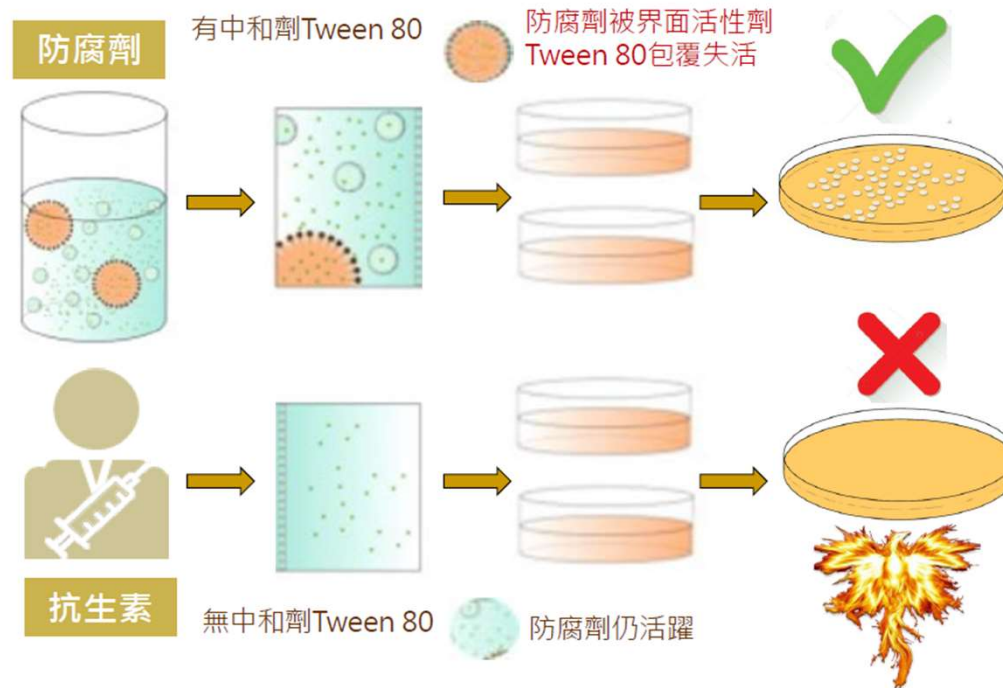
# 化粧品微生物樣品-防腐中和



# 化粧品中微生物樣品-防腐中和

部分化粧品之半成品/成品含有複方防腐劑/抗菌劑

## 檢體抑菌性與火鳳凰現象



111年度化粧品教育訓練(二)-微生物檢驗(二) 林朝賢老師

# 化粧品中防腐劑/抗菌中和

防腐劑/抗菌劑種類眾多，需適當中和

## Annex D (informative)

### Neutralizers of antimicrobial activity of preservatives and rinsing liquids

Preservative	Chemical compounds able to neutralize preservative's antimicrobial activity	Examples of suitable neutralizers and of rinsing liquids <sup>[6] [7]</sup> (for membrane filtration methods)
Phenolic compounds: parabens, phenoxyethanol, phenylethanol, etc. Anilides	Lecithin, Polysorbate 80, Ethylene oxide condensate of fatty alcohol Non-ionic surfactants	Polysorbate 80, 30 g/l + lecithin, 3 g/l. Ethylene oxide condensate of fatty alcohol, 7 g/l + lecithin, 20 g/l + polysorbate 80, 4 g/l. D/E neutralizing broth <sup>a</sup> . <i>Rinsing liquid: distilled water; tryptone, 1 g/l + NaCl 9 g/l; polysorbate 80, 5 g/l.</i>
Quaternary ammonium compounds Cationic surfactants	Lecithin, saponin, polysorbate 80, sodium dodecyl sulphate Ethylene oxide condensate of fatty alcohol	Polysorbate 80, 30 g/l + sodium dodecyl sulphate, 4 g/l + lecithin, 3 g/l. Polysorbate 80, 30 g/l + saponin, 30 g/l + lecithin, 3 g/l. D/E neutralizing broth <sup>a</sup> . <i>Rinsing liquid : distilled water; tryptone, 1 g/l + NaCl, 9 g/l; polysorbate 80, 5 g/l.</i>

ISO 21149 : 2017 Annex D

# 化粧品中微生物樣品前處理-序列稀釋

## H. Microbiological enumeration and growth

### 1. Aerobic plate count (APC). FDA BAM 23

Use spread plate technique to facilitate recognition of different colony types. Decimally dilute the cosmetic preparation (see G, above) in MLB to obtain a complete dilution series from  $10^{-1}$  to  $10^{-3}$ . Use a new sterile pipet to transfer 1.0 ml of the current dilution into 9 ml of fresh MLB to make the next decimal dilution.

### 9.3.1 Dilutions for counting methods ISO 21149 : 2017

Usually, the initial suspension is the first counted dilution. If needed, additional serial dilutions (e.g. 1:10 dilution) may be performed from the initial suspension using the same diluent (according to the expected level of contamination of the product).

### 食藥署-化粧品中微生物檢驗方法

2.5.6. 系列稀釋檢液：使用已滅菌之吸管，吸取上述之10倍稀釋檢液1 mL，加至MLB 9 mL中，依序作成 $10^2 \sim 10^6$ 倍等系列稀釋檢液。

# 化粧品中微生物樣品前處理-序列稀釋

## 化粧品產品受微生物污染範例

### 事件過程：

◎ 歐盟EC發布消費警訊，Elcurina之化粧品「Intensiv Handcreme mit Sheabutter & Allantoin」(批號：00760)，因產品遭受微生物汙染(aerobic mesophilic bacteria：檢測值最高30000 cfu/g，其中包含微生物Pluralibacter gergoviae、酵母菌及黴菌：檢測值最高2000 cfu/g)，不符合歐盟化粧品法規，故進行回收。

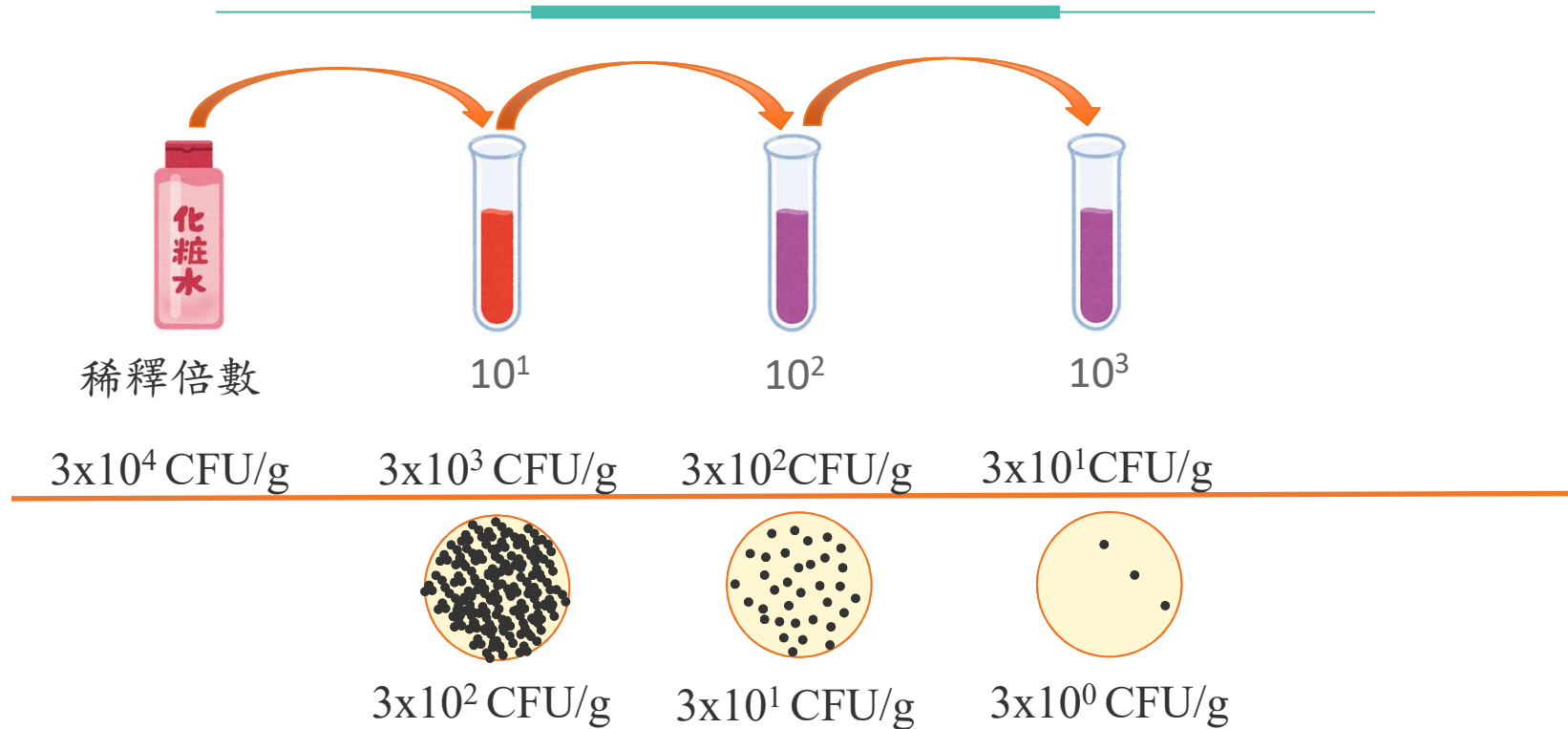
### 事件過程：

◎ 歐盟EC警訊發布，Special Nadra之化粧品「High Class Red Henna Powder」及「Henna Powder, Special For Golden Brown Hair & Hands」2項化粧品(批號：未明示)，因產品遭受微生物(mesophilic aerobic bacteria)汙染，故進行回收。

High Class Red Henna Powder檢驗值: 85000 cfu/g

Henna Powder, Special For Golden Brown Hair & Hands檢驗值:  
76000 cfu/g)

# 化粧品中微生物樣品前處理-序列稀釋



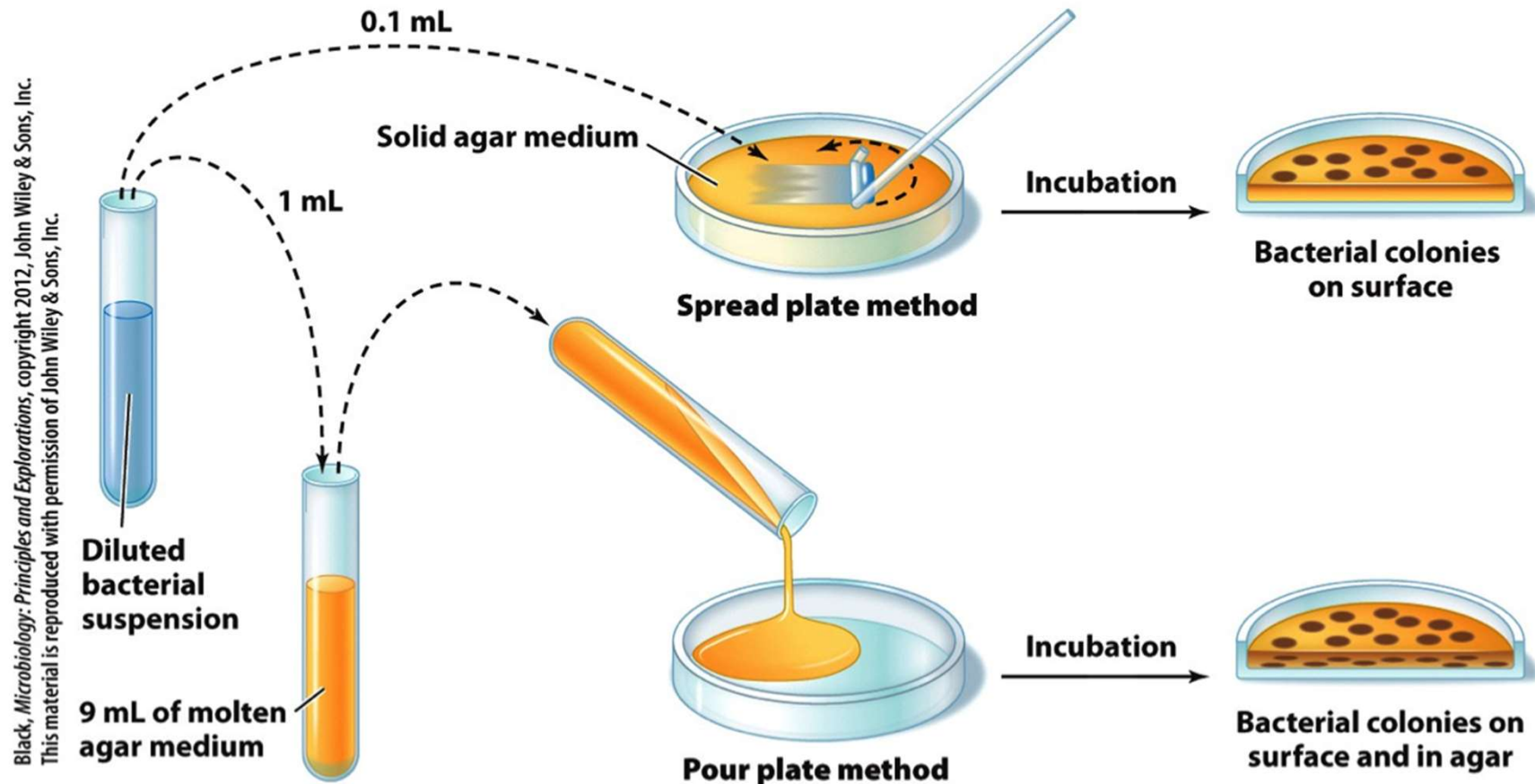
## 10 Counting of colonies (plate counts and membrane filtration methods)

After incubation, count the colonies:

- in Petri dishes containing 30 colonies to 300 colonies; if less than 30 colonies are counted, see 12.2.3;
- on membranes containing 15 colonies to 150 colonies; if less than 15 colonies are counted, see 12.2.3.

ISO 21149 : 2017

# 培養計數方法-總生菌數



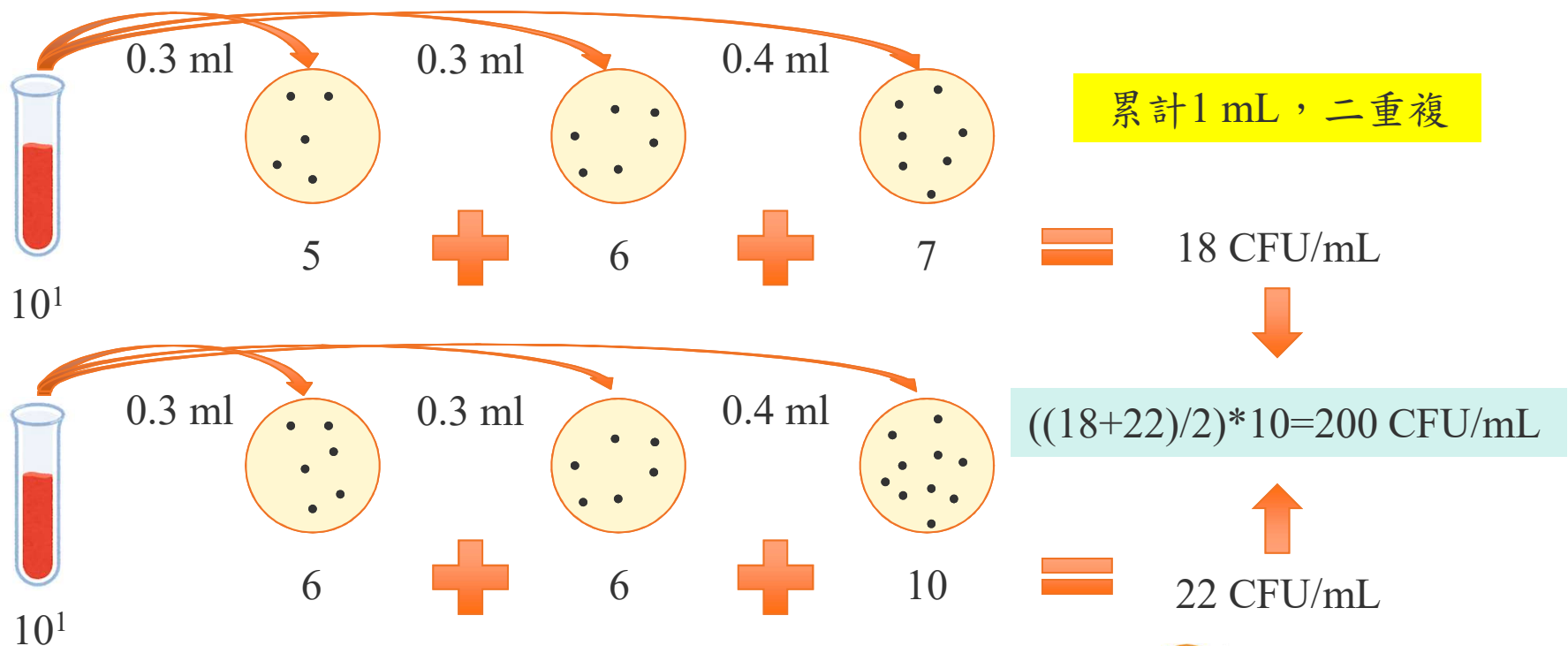
<https://www.acebiolab.com/TW/product/63727>



# 培養計數方法-總生菌數

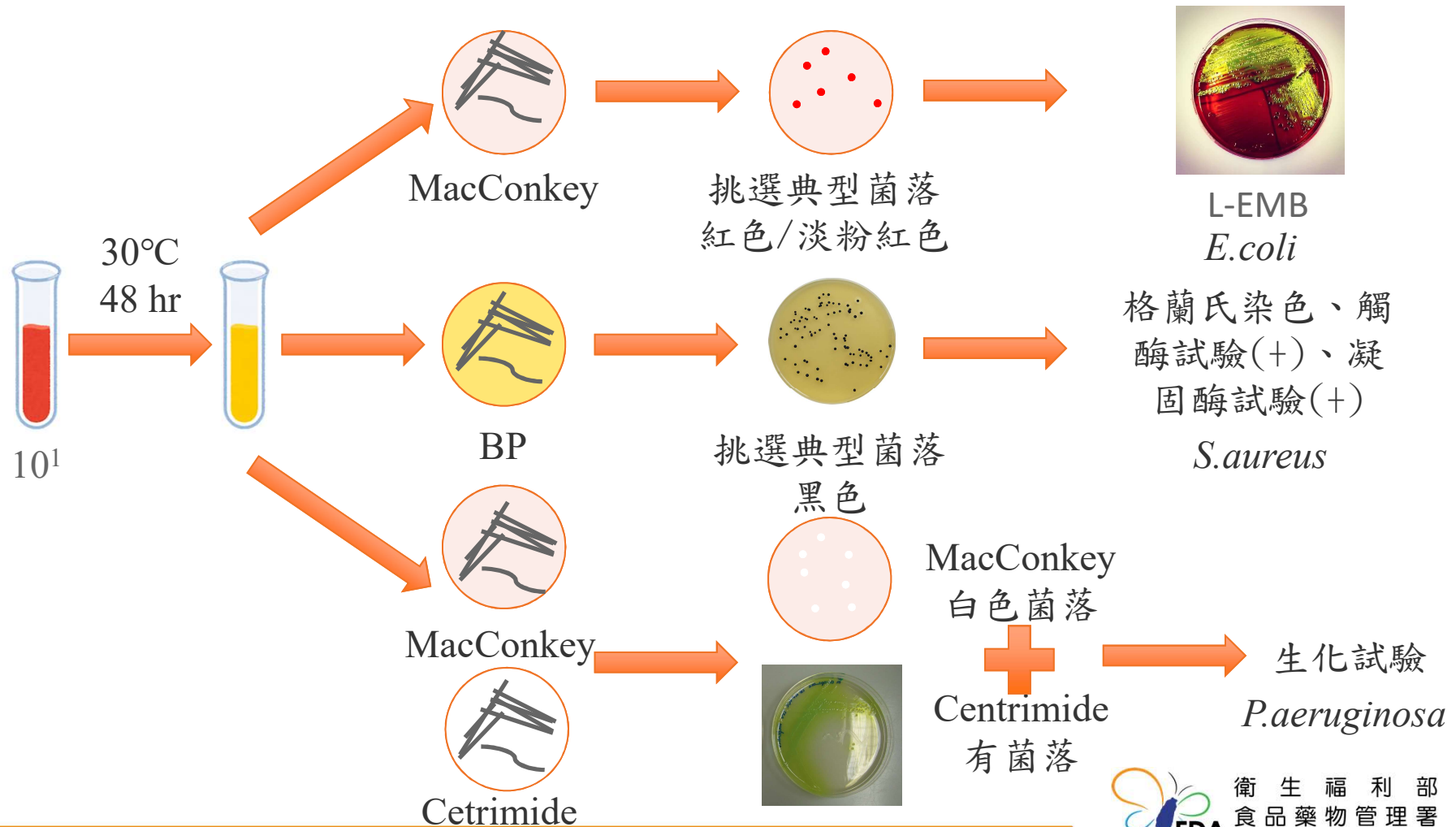
## 若預期可能微生物污染數量少時可參考使用 FDA BAM 23

In addition, plate 1 ml of  $10^{-1}$  dilution onto one set of either two (0.5 ml each), or three (0.3, 0.3, 0.4 ml each) MLA plates. Regardless of the number of plates used in plating, the total volume should add up to 1 ml. Do the same for a duplicate set. The dilution factor is 10.



# 致病菌

## 食品藥物管理署-化粧品中微生物檢驗方法



# 綠膿桿菌-生化試驗

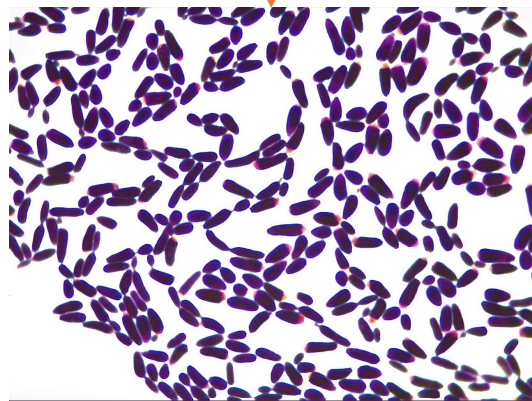
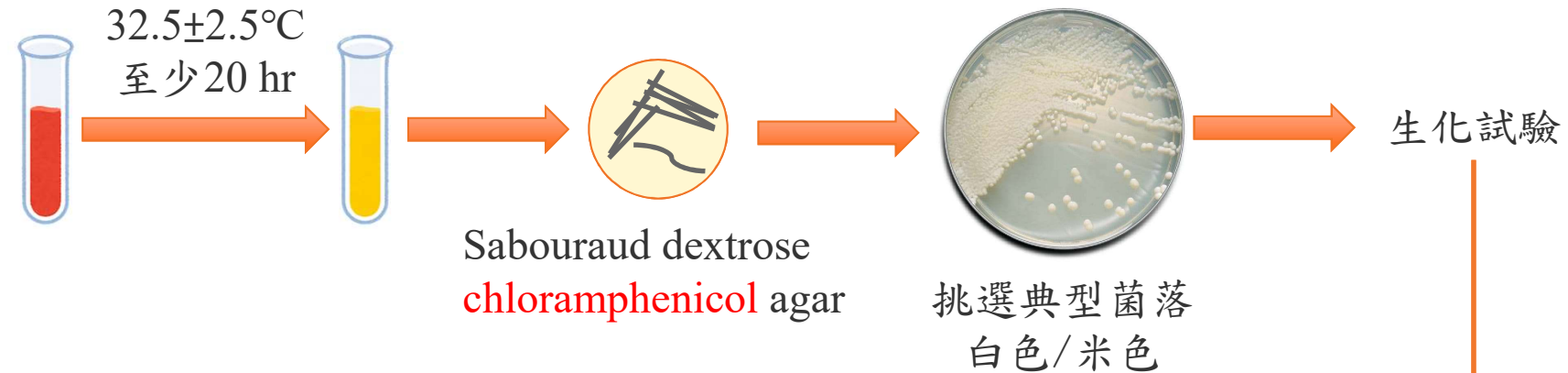
## 食品藥物管理署-化粧品中微生物檢驗方法

生化試驗		正反應	負反應	綠膿桿菌反應
TSI斜面培養基	斜面	紅色(鹼性)	黃色(酸性)	(+) <sup>a</sup>
	底部	紅色(鹼性)	黃色(酸性)	(+) <sup>a</sup>
	產氣	培養基有裂縫	培養基完整	(-) <sup>a</sup>
	硫化氫	黑色	非黑色	(-) <sup>a</sup>
42°C生長試驗		有菌落生長	無菌落生長	(+) <sup>a</sup>
檸檬酸鹽試驗		混濁	澄清	(+) <sup>a</sup>
丙二酸鹽試驗		藍色	綠色	(+) <sup>a</sup>
精氨酸脫酸酶試驗		紫色	黃色	(+) <sup>a</sup>
硝酸鹽還原試驗	顏色	粉紅或紅色	無變化	(+) <sup>a</sup>
	氣泡	有	無	(+) <sup>a</sup>
螢光產生試驗		有(水溶性)	無	(+)
色素產生試驗		有(紅色)	無	(+)

a：表示為有可能是綠膿桿菌

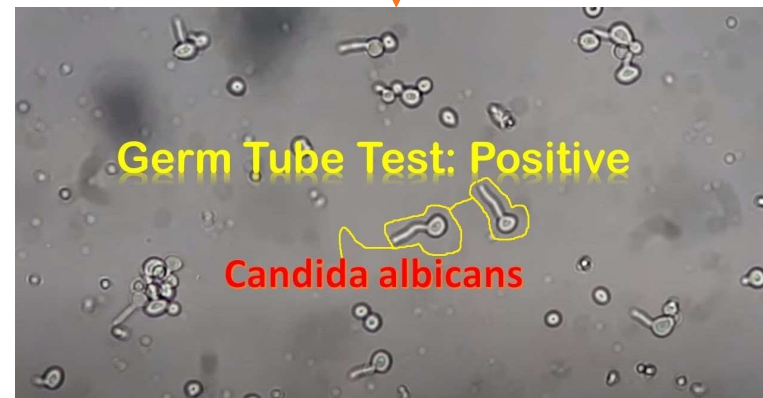
# 致病菌-白色念珠菌

## 食品藥物管理署-化粧品中白色念珠菌之檢驗



深紫色，短  
卵圓形或細  
長細胞有時  
具出芽酵母  
細胞

<https://oercommons.org/courseware/lesson/93392/overview>



<https://www.youtube.com/watch?v=0DwN1fpPnBA>



衛生福利部  
食品藥物管理署  
Taiwan Food and Drug Administration

# 化粧品成品微生物試驗頻率

## 總生菌數

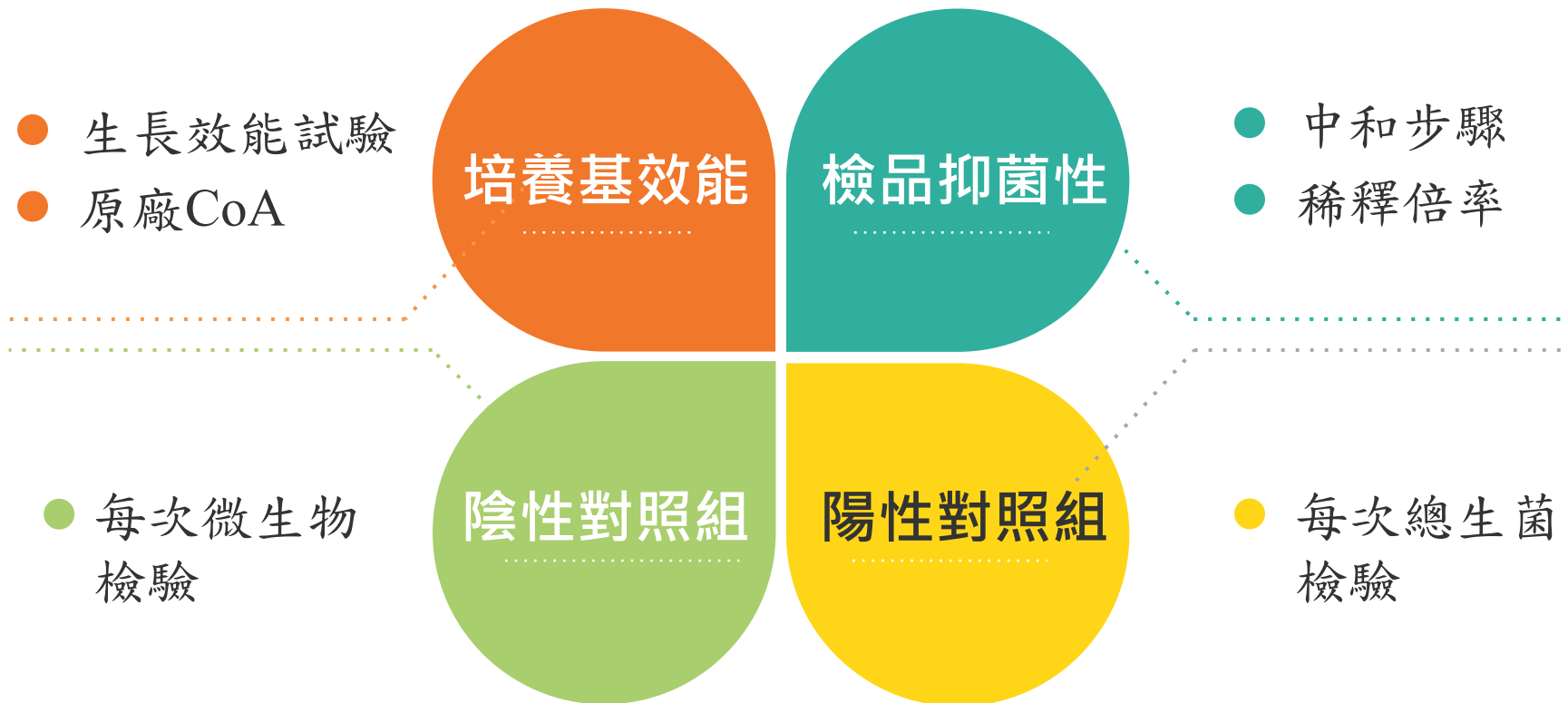
- 每批抽樣檢驗(原則)
- 半成品微生物試驗結果不能替代成品微生物試驗結果
- 微生物減項試驗(評估資料)

- 建議定期抽樣檢驗

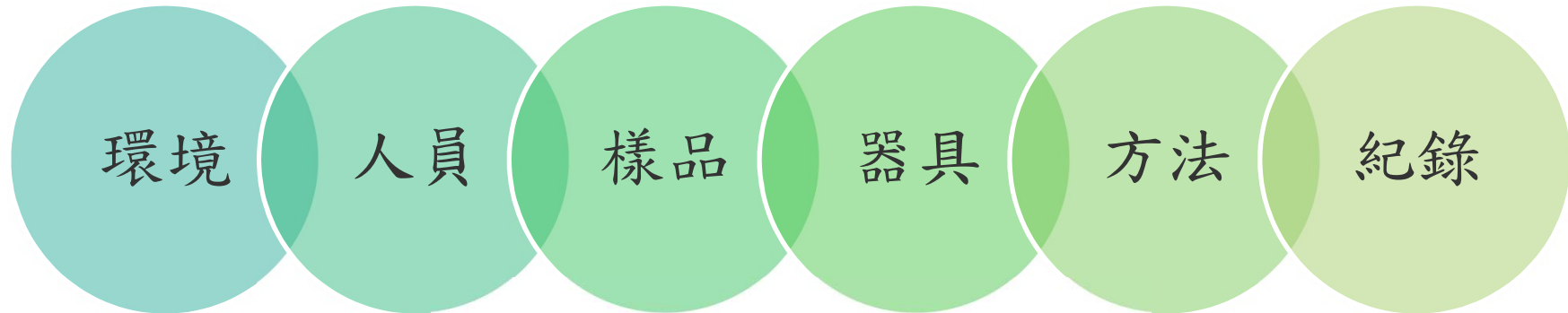
## 致病菌

# 微生物檢驗原則

食藥署建議方法、國際標準方法、快篩試劑、廠規方法依循原則



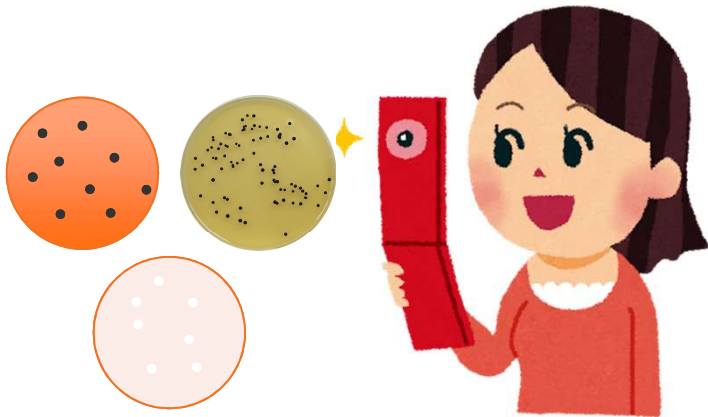
# 微生物試驗-紀錄



# 微生物試驗紀錄



- 微生物試驗紀錄：
  - ✓ 試驗日期
  - ✓ 樣品編號
  - ✓ 稀釋倍率
  - ✓ 培養基批號
  - ✓ 培養條件
  - ✓ 試驗結果(含檢品及陽、陰性對照組)
  - 建議培養結果可拍照留存





# 課程大綱



案例、法規管理要求



微生物試驗

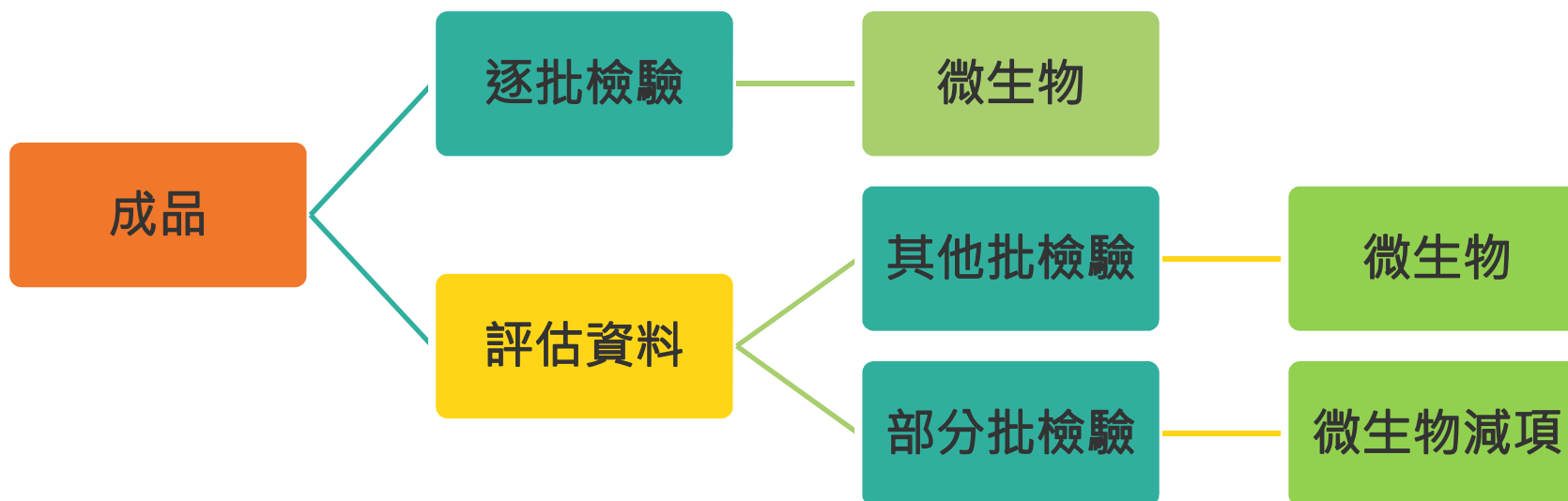


微生物試驗減項評估

# 微生物減項

## 微生物檢驗不得減項為原則

- 微生物檢驗有評估資料可佐證微生物污染風險低，得採彈性作法(部分批次減項)



# 評估資料

- 微生物部分批次減項評估，應考量：
  - ✓ 產品特性(例如水活性)
  - ✓ 歷史檢驗數據
  - ✓ 偏差紀錄
  - ✓ 製程複雜性
  - ✓ 設備密閉性
  - ✓ 環境監測



THANK YOU



衛生福利部  
食品藥物管理署  
Taiwan Food and Drug Administration

<http://www.fda.gov.tw/>