

化粧品防腐效能試驗指引

衛生福利部食品藥物管理署

中華民國 110 年 5 月

目 錄

頁 次

1. 前言.....	1
2. 目的.....	1
3. 適用範圍.....	1
4. 檢驗器具及試劑.....	1
4.1 工作環境.....	1
4.2 器具及材料.....	1
4.3 70%乙醇溶液.....	2
4.4 細菌及白色念珠菌稀釋液.....	2
4.5 黑麴菌稀釋液.....	2
4.6 培養基.....	2
4.7 試驗微生物菌株.....	4
5. 檢驗方法.....	4
5.1 細菌接種菌液製備.....	4
5.2 白色念珠菌接種菌液製備.....	4
5.3 黑麴菌接種菌液製備.....	5
5.4 中和劑效能之驗證.....	6
5.5 試驗檢體製備.....	6
5.6 檢體菌落數檢驗.....	7
5.7 對數減少值計算方法.....	8
5.8 化粧品防腐效能試驗評估標準.....	8
6. 參考資料.....	9

化粧品防腐效能試驗指引

1. 前言

本指引旨在用於化粧品防腐系統保護產品的總體評估。產品避免微生物污染保護源自化學防腐劑、配方本身固有之特性、包裝設計以及製造過程等。該指引說明評估化粧品整體防腐效能試驗時應採取的一系列步驟以及評估標準。

2. 目的

用於化粧品防腐系統保護產品的總體評估。

3. 適用範圍

本方法適用於化粧品適用液、乳、膏、霜劑等常見化粧品防腐劑效能之檢驗，在產品中接種若干種類、一定數量的微生物，定期檢測樣品中微生物的數量，根據數量的變化評估其防腐效能。

4. 檢驗器具及試劑

4.1 工作環境：

工作平台須寬敞、潔淨、光線良好，操作平台光度為 100 呎燭光以上，密閉室內換氣良好，儘可能沒有灰塵及流動空氣。每 15 分鐘落菌數不得超過 15 CFU/培養皿。

4.2 器具及材料：

- 4.2.1 生物安全操作櫃(Biological safety cabinet, BSC)：第二等級(class II)(含)以上者。
- 4.2.2 高壓滅菌釜：可達 121°C 以上者。
- 4.2.3 培養箱：能維持內部溫度溫差 $\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 以內者。
- 4.2.4 天平：可秤量到 2000 g，靈敏度為 0.1 g；可秤量到 120 g，靈敏度為 5 mg。
- 4.2.5 旋渦混合器(Vortex mixer)。
- 4.2.6 酸鹼度測定儀(pH meter)。
- 4.2.7 菌落計數器：適用於菌落之計算者。
- 4.2.8 吸管輔助器(Pipette aid)。
- 4.2.9 吸管(Pipette)：已滅菌。1 mL 吸管應有 0.01 mL 之刻度；5 mL 及 10 mL 吸管應有 0.1 mL 刻度。
- 4.2.10 玻璃珠：直徑約 5~7 mm，已滅菌。

化粧品防腐效能試驗指引

- 4.2.11 培養皿：已滅菌，內徑約 90 mm，深度約 15 mm，底皿之內外面應平坦，無氣泡、刮痕或其他缺點。
- 4.2.12 稀釋用容器：無菌袋或有 100 mL、50 mL 或 10 mL 標記附蓋(栓)之可滅菌廣口瓶或試管。
- 4.2.13 彎曲塗抹玻棒、紗布墊、藥勺、抹刀、剪刀及鑷子：可滅菌或可拋棄式者。
- 4.2.14 離心機：能夠承受 2000g 的離心力。
- 4.2.15 試藥：氯化鈉、95%乙醇及聚山梨醇酯 80 (Polysorbate 80, Tween 80)、鹽酸(HCl,調整 pH 值)、氫氧化鈉(NaOH,調整 pH 值)均採用試藥級；Letheen 培養液(Letheen broth)、Letheen 洋菜(Letheen agar)、胰化酪蛋白胨(trypticase peptone)、硫蛋白胨(thiotone peptone)、酵母抽出物(yeast extract)及洋菜(agar)均採用微生物級。

4.3 70%乙醇溶液：

取 95%乙醇 560 mL，溶於蒸餾水 200 mL，混合均勻。

4.4 細菌及白色念珠菌稀釋液(生理食鹽水)：

取 8.5 g 氯化鈉(Sodium chloride, NaCl)，溶於蒸餾水 1000 mL，混合均勻，分裝於適當容器中，經 121°C 滅菌 15 分鐘。

4.5 黑麴菌稀釋液(Polysorbate 80 溶液)：

取 0.5 g Tween 80 (Polysorbate 80)加入 1 L 生理食鹽水(參照 4.4)中，加熱攪拌混合均勻直至完全溶解，分裝於適當容器中，經 121°C 滅菌 15 分鐘。

4.6 培養基：

4.6.1 改良式 Letheen 培養液(Modified Letheen broth, MLB)：

Letheen 培養液(Letheen broth)	25.7 g
胰化酪蛋白胨(trypticase peptone)	5 g
硫蛋白胨(thiotone peptone)	10 g
酵母抽出物(yeast extract)	2 g
亞硫酸氫鈉(NaHSO ₃)	0.1 g
蒸餾水	1000 mL

攪拌溶解後，分裝於適當容器中，經 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.2 ± 0.2。

化粧品防腐效能試驗指引

4.6.2 改良式 Lethen 培養基(Modified Lethen agar, MLA)：

Lethen 洋菜(Lethen agar)	32 g
胰化酪蛋白朊(trypticase peptone)	5 g
硫蛋白朊(thiotone peptone)	10 g
酵母抽出物(yeast extract)	2 g
氯化鈉	5 g
亞硫酸氫鈉(NaHSO ₃)	0.1 g
洋菜(agar)	5 g
蒸餾水	1000 mL

加熱攪拌溶解後，分裝於適當容器中，經 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.2 ± 0.2。

4.6.3 胰蛋白大豆培養基(Tryptic soy agar, TSA)：

胰酶消化酪蛋白朊 (pancreatic digest of casein)	15 g
大豆粉木瓜蛋白酶消化物 (papain digest of soybean meal)	5 g
氯化鈉	5 g
洋菜(agar)	15 g
蒸餾水	1000 mL

加熱攪拌溶解後，分裝於適當容器中，經 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.3 ± 0.2。

4.6.4 沙氏葡萄糖培養基(Sabouraud Dextrose Agar, SDA)：

葡萄糖 (Dextrose)	40 g
胰酶消化酪蛋白朊 (pancreatic digest of casein)	5 g
動物組織肉蛋白朊 (peptic digest of animal tissue)	5 g
洋菜(agar)	15 g
蒸餾水	1000 mL

加熱攪拌溶解後，分裝於適當容器中，經 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 5.6 ± 0.2。

4.6.5 馬鈴薯葡萄糖培養基(Potato Dextrose Agar, PDA)：

馬鈴薯抽出物 (potato infusion)	200 g
葡萄糖 (Dextrose)	20 g
洋菜(agar)	20 g
蒸餾水	1000 mL

加熱攪拌溶解後，分裝於適當容器中，經 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值須調整為 5.6 ± 0.2。

4.7 試驗微生物菌株：

繼代代數均不超過 5 代，可視需求增加其他菌株作為試驗菌株。

4.7.1 大腸桿菌(*Escherichia coli*) ATCC8739。

4.7.2 綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*) ATCC9027。

4.7.3 金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC6538。

4.7.4 白色念珠菌(*Candida albicans*) ATCC10231。

4.7.5 黑麴菌(*Aspergillus brasiliensis*) ATCC16404。

5. 檢驗方法：

5.1 細菌接種菌液製備：

5.1.1 將細菌分別接種到胰蛋白大豆培養基(TSA)上，於 $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$ 培養箱培養 18~24 小時。

5.1.2 取 10 mL 生理食鹽水(參照 4.4)加入長滿菌之胰蛋白大豆培養基上，反覆將菌落沖洗下來。

5.1.3 分別用吸管(Pipette)將每種菌種懸液移至相應的無菌試管中，使用旋渦混合器(Vortex mixer)震盪混合不超過 3 分鐘。

5.1.4 將每種菌種懸浮液以生理食鹽水稀釋至接種所需濃度 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ CFU/mL。

5.1.5 菌液製備後若在室溫下放置，應在 2 小時內使用。

5.1.6 在開始進行樣品檢測的同時，取上述菌液 1 mL 加入到 9 mL 生理食鹽水試管中充分混勻，製成 1:10 稀釋液，以此類推製成 1:100、1:1,000 等適宜的稀釋倍數。取 2~3 個適宜稀釋倍數的稀釋液（一般取稀釋倍數為 1:100,000、1:1,000,000 和 1:10,000,000 的稀釋液），各取 1 mL 至培養皿中，每一倍數稀釋液各進行二重複檢驗。

5.1.7 將冷卻至約 $45^\circ\text{C} \sim 50^\circ\text{C}$ 胰蛋白大豆培養基傾注到上述培養皿內，每皿約 15~20 mL，隨即轉動培養皿，使樣品與培養基充分混勻，待瓊脂凝固後，倒置於 $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$ 培養箱內培養 24~48 小時，然後進行菌落計數，此計數所得之值為 N。

5.2 白色念珠菌接種菌液製備：

- 5.2.1 將白色念珠菌接種到沙氏葡萄糖培養基(SDA)上，於 32.5 ± 2.5 °C 培養箱培養 18~24 小時。
- 5.2.2 取 10 mL 生理食鹽水(參照 4.4)加入長滿菌之沙氏葡萄糖培養基上，反覆將菌落沖洗下來。
- 5.2.3 用吸管(Pipette)將白色念珠菌懸液移至相應的無菌試管中，使用混合器(vortex)震盪混合不超過 3 分鐘。
- 5.2.4 將白色念珠菌懸浮液以生理食鹽水(參照 4.4)稀釋至接種所需濃度 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ CFU/mL。
- 5.2.5 菌液製備後若在室溫下放置，應在 2 小時內使用。
- 5.2.6 在開始進行樣品檢測的同時，取上述菌液 1 mL 加入到 9 mL 生理食鹽水試管中充分混勻，製成 1:10 稀釋液，以此類推製成 1:100、1:1,000 等適宜的稀釋倍數。取 2~3 個適宜濃度倍數的稀釋液（一般取稀釋倍數為 1:100,000、1:1,000,000 和 1:10,000,000 的稀釋液），各取 1 mL 至培養皿中，每一倍數稀釋液各進行二重複檢驗。
- 5.2.7 將冷卻至約 $45^\circ\text{C} \sim 50^\circ\text{C}$ 沙氏葡萄糖培養基傾注到上述培養皿內，每皿約 15~20 mL，隨即轉動培養皿，使樣品與培養基充分混勻，待瓊脂凝固後，倒置於 32.5 ± 2.5 °C 培養箱內培養 24~48 小時，然後進行菌落計數，此計數所得之值為 N。

5.3 黑麴菌接種菌液製備：

- 5.3.1 將黑麴菌接種到馬鈴薯葡萄糖培養基(PDA)上，於 22.5 ± 2.5 °C 培養箱培養 7~11 天。
- 5.3.2 取 10 mL Polysorbate 80 溶液(參照 4.5)加入長滿菌之馬鈴薯葡萄糖培養基上，輕輕將菌落表面上的孢子沖洗下來(小心勿將黴菌菌絲取下)。
- 5.3.3 用吸管(Pipette)將黑麴菌懸液移至相應的無菌試管中，使用旋渦混合器(Vortex mixer)震盪混合約 1 分鐘。
- 5.3.4 黑麴菌懸液以 $40 \mu\text{m} \sim 100 \mu\text{m}$ 濾膜過濾。
- 5.3.5 將過濾後之黑麴菌懸浮液以 Polysorbate 80 溶液稀釋至接種所需濃度 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ Spores/mL。
- 5.3.6 菌液製備後可保存在 $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 下，但應在 24 小時內使用。
- 5.3.7 在開始進行樣品檢測的同時，取上述菌液 1 mL 加入到 9 mL Polysorbate 80 溶液試管中充分混勻，製成 1:10 稀釋液，以此類推製成 1:100、1:1,000 等適宜的稀釋倍數。取 2~3 個適宜稀釋

化粧品防腐效能試驗指引

倍數的稀釋液（一般取稀釋倍數為 1:100,000、1:1,000,000 和 1:10,000,000 的稀釋液），各取 1 mL 至培養皿中，每一倍數稀釋液各進行二重複檢驗。

5.3.8 將冷卻至約 45°C~50°C 馬鈴薯葡萄糖培養基傾注到上述培養皿內，每皿約 15~20 mL，隨即轉動培養皿，使樣品與培養基充分混勻，待瓊脂凝固後，置於 22.5±2.5 °C 培養箱內培養 3~5 天，然後進行菌落計數，此計數所得之值為 N。

5.4 中和劑效能之驗證：

為有效評估防腐效能，建議可參考 ISO11930:2019 方法進行中和劑效能之驗證。

5.5 試驗檢體製備：

5.5.1 在無菌條件下稱取待測化粧品檢體於無菌樣品瓶中，每瓶 20 g 或 20 mL，每一檢體共準備 5 份。

5.5.2 在每一份稱好的化粧品檢體中加入 0.2 mL 的單一菌液。

5.5.3 將菌液和檢體充分混合均勻，置於室溫（20°C~25°C）保存。

5.5.4 第 0 天的菌落數 N_0 計算方式為: $N/100$ 。

5.5.5 分別於加菌後第 7 (T7)、14 (T14) 和 28 (T28) 天檢測化粧品檢體中的菌落數。

5.5.6 檢體於開封取樣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。

5.5.7 液態檢體：

精確稱取檢體 1 mL，置於滅菌試管，加入 9 mL MLB 或其他經證實之中和劑，混合均勻，作為 10 倍稀釋檢液，靜置於室溫 30±15 分鐘。

5.5.8 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 8 mL MLB 或其他經證實之中和劑，混合均勻，作為 10 倍稀釋檢液，靜置於室溫 30±15 分鐘。

5.5.9 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 8 mL MLB 或其他經證實之中和劑，混合均勻，作為 10 倍稀釋檢液，靜置於室溫 30±15 分鐘。

5.5.10 噴霧劑：

化粧品防腐效能試驗指引

以 70%乙醇溶液濕潤之紗布消毒噴霧器之噴嘴，先從噴嘴噴出部分檢體於無菌紗布墊，丟棄，再將檢體噴灑於稀釋瓶中，精確稱取檢體 1 g，置於滅菌試管，加入 9 mL MLB 或其他經證實之中和劑，混合均勻，作為 10 倍稀釋檢液，靜置於室溫 30 ± 15 分鐘。

5.6 檢體菌落數檢驗：

- 5.6.1 使用已滅菌之吸管，吸取上述(參照 5.5.7~10)之 10 倍稀釋檢液 1 mL，加至 9 mL MLB 或其他經證實之中和稀釋液中，依序作成 $10^2 \sim 10^6$ 倍等系列稀釋檢液。
- 5.6.2 將稀釋檢液或原液充分振搖，混合均勻。
- 5.6.3 分別吸取各加入細菌之檢體稀釋檢液 0.1 mL 至 MLA，以無菌曲玻棒塗抹，各稀釋檢液至少進行二重複。
- 5.6.4 待檢液被培養基吸收後，將培養基倒置，於 $32.5^\circ\text{C} \pm 2.5^\circ\text{C}$ 培養箱培養 48~72 小時。
- 5.6.5 分別吸取加入白色念珠菌之檢體稀釋檢液 0.1 mL 至 SDA，以無菌曲玻棒塗抹，各稀釋檢液至少進行二重複。
- 5.6.6 待檢液被培養基吸收後，將培養基倒置，於 $32.5^\circ\text{C} \pm 2.5^\circ\text{C}$ 培養箱培養 48~72 小時。
- 5.6.7 分別吸取加入黑麴菌之檢體稀釋檢液 0.1 mL 至 PDA，以無菌曲玻棒塗抹，各稀釋檢液至少進行二重複。
- 5.6.8 待檢液被培養基吸收後，將培養基倒置，於 $22.5^\circ\text{C} \pm 2.5^\circ\text{C}$ 培養箱培養 3~5 天。
- 5.6.9 經培養後，分別選取細菌、白色念珠菌 25~250 個菌落及黑麴菌 15~150 個菌落之稀釋倍數平板來計數，將該稀釋倍數之兩個平板之菌落數平均值乘其稀釋倍數除以接種體積(0.1 mL)，即得其菌落數，單位為 CFU/g 或 CFU/mL。
- 5.6.10 此計數所得之值為 N_x 。

化粧品防腐效能試驗指引

5.7 對數減少值計算方法：

化粧品的防腐效能可以以菌落數的對數減少值 (R_x) 作為評估參數指標。

R_x 計算方式如下：

$$R_x = \lg N_0 - \lg N_x$$

公式中：

N_0 ——菌液在檢體中的第 0 天菌落數；

N_x ——檢體在不同檢測時間的菌落數。

5.8 化粧品防腐效能試驗評估標準：

評估參數：對數減少值 R_x								
菌種類型	細菌			白色念珠菌			黑麴菌	
取樣時間(天數)	T7	T14	T28	T7	T14	T28	T14	T28
標準 A*	≥3	≥3 或 NI ^b	≥3 或 NI ^b	≥1	≥1 及 NI ^b	≥1 及 NI ^b	≥0 ^c	≥1 及 NI ^b
標準 B*	-	≥3	≥3 或 NI ^b	-	≥1	≥1 及 NI ^b	≥0 ^c	≥0 ^c 及 NI ^b
a:在挑戰測試中，可接受偏差範圍為 0.5log。								
b:NI 表示與前一個測試時間相比未增加。								
c: $R_x=0$ 表示菌落數與第 0 天相比未增加。								

*符合標準 A：產品微生物汙染風險受到管控，可保護產品避免受到潛在微生物汙染之風險。

符合標準 B：產品仍存在微生物汙染風險，需再評估並增加其他附加控制條件，產品微生物風險才能受到管控。

6. 參考資料：

- 6.1 ISO 11930:2019 Cosmetics — Microbiology — Evaluation of the antimicrobial protection of a cosmetic product.
- 6.2 衛生福利部食品藥物管理署 109.07.28 公布建議檢驗方法-化粧品中微生物檢驗方法。