

中藥製劑中微生物之調查(I)

林雅姿 謝佳霖 劉宜祝 施養志 羅吉方

食品藥物管理局研究檢驗組

摘要

本調查為了解中藥製劑中微生物之現況，於99至100年間收集中藥濃縮製劑產品共330件，以中華藥典上所載之方法進行總生菌數(aerobic microorganisms)、大腸桿菌(*Escherichia coli*)及沙門氏桿菌(*Salmonella*)之檢驗。結果顯示總生菌數超過 10^5 CFU/g者共13件，佔3.9%，所有檢體均未檢出大腸桿菌及沙門氏桿菌。本調查結果將作為行政管理之參考。

關鍵詞：中藥製劑、總生菌數、大腸桿菌、沙門氏桿菌

前言

中藥之使用已有數千年之歷史。近幾年來，隨著資訊取得容易，民眾對用藥及保健知識了解愈多，對於自身所使用藥物之品質也相對注意。中藥製劑目前已廣泛地被民眾所接受並使用，此情形引起許多醫、藥界人士對中藥產生濃厚的興趣。

中藥製劑所使用之藥材來自動物、植物及礦物，其中動、植物含有豐富營養源，若保存不當，易受微生物污染繁殖；中藥製劑可分傳統劑型(丸、散、膏、丹)及濃縮劑型，傳統劑型係將藥材直接研粉後做成各製劑，然濃縮劑型則需先將藥材以沸水煎煮、過濾後，濃縮成浸膏再進行噴霧造粒。二者相較，濃縮劑型之微生物數量及種類理應較傳統劑型為少。

頗耐人尋味的是許多中藥材本身即具有抑菌作用，如：黃連、黃柏、大黃及桂皮等藥材^(1,2)，而且整個製藥環境之監控情形及藥材清洗潔淨與否，均會影響藥品中微生物存在情形。

行政院衛生署自95年起陸續公告許多有關製劑中微生物之限量標準，目的在於監測藥品自原料至最終成品中總生菌數(aerobic microorganisms)及特定致病菌存在情形，最早公告⁽³⁾為中藥製劑

碎片劑型之微生物限量標準，99年公告⁽⁴⁾所有複方濃縮製劑均應進行微生物總生菌數、大腸桿菌及沙門氏桿菌之檢驗，100年公告⁽⁵⁾更擴大至單味濃縮製劑(100方)亦需符合相關微生物之限量標準，並規定單味濃縮製劑於101年7月1日起需符合該限量規定。

為進一步了解目前各中藥製劑中微生物分布情形，所以於99至100年間收集330件之中藥製劑產品，其來源包括由各縣市衛生局至其轄區藥廠抽驗之產品及中藥廠申請國產查驗登記之藥品(包括傳統劑型、單味濃縮製劑及複方濃縮製劑)進行微生物之調查。其中99年所收集之檢體183件均為公告需做微生物檢驗前所製造之產品，而100年所收集之檢體147件則為公告需做微生物檢驗後所製造之產品，以了解公告前、後藥廠對於產品中微生物之管控情形，藥品品質安全及衛生攸關國民健康，確實檢驗，嚴格把關，才能製造出高品質之藥品，以維護民眾用藥安全。

材料與方法

一、材料

(一)檢體來源

99年收集檢體183件，包括由各縣市衛生局抽

驗產品48件(3品項)及中藥廠申請國產查驗登記藥品135件(傳統製劑5件、單味濃縮製劑70件及複方濃縮製劑60件)；100年收集檢體147件，包括由各縣市衛生局抽驗產品62件(32品項)及中藥廠申請國產查驗登記藥品85件(傳統劑型3件及複方濃縮製劑82件)，進行微生物之調查。

(二)培養基及藥品

大豆分解蛋白質－乾酪素瓊脂培養基(Soybean-Casein Digest Agar Medium)、乳糖培養基(Fluid Lactose Medium)、馬康奇瓊脂培養基(MacConkey Agar Medium)、平板計數培養基(Plate Count Agar)、胰化蛋白胨培養液(Tryptone Broth)、甲基紅－歐普氏培養液(MR-VP Broth)、柯塞爾氏檸檬酸鹽培養液(Koser's Citrate Broth)、亞硒酸鹽胱氨酸培養基(Fluid Selenite Cystine Medium)、四硫磺酸鹽培養基(Fluid Tetrathionate Medium)、煌綠瓊脂培養基(Brilliant Green Agar Medium)、亞硫酸鈹瓊脂培養基(Bismuth Sulfite Agar Medium)、木糖離胺酸去氧膽酸鹽瓊脂培養基(Xylose-Lysine-Desoxycholate Agar Medium)、三糖鐵瓊脂培養基(Triple Sugar-Iron Agar Medium)、沙門氏桿菌多價本體(O)抗血清(*Salmonella* polyvalent somatic (O) antiserum)均購自BD (Difco™)，美國。大豆分解蛋白質－乾酪素培養基(Soybean-Casein Digest Medium)購自BD (Bacto™)，美國。伊紅亞甲藍瓊脂培養基(Levine's Eosin-Methylene Blue Agar Medium, L-EMB)購自BD (BBL™)，美國。油酸聚醇山梨酯購自MERCK，德國。API 20E生化檢測套組購自BIOMERIEUX，法國。

二、儀器裝置

- (一)乾熱滅菌器，memmer，德國
- (二)高壓滅菌釜，YTM-B，台灣
- (三)恆溫培養箱，HIPOINT-740，台灣
- (四)無菌塑膠培養皿，Greiner，德國

(五)pH測定儀，METTLER (Seven Easy pH Meter)，瑞典

(六)無菌濾膜，PALL (P/N 66068)，美國

(七)精密天平，METTLER TOLEDO (AND GR-200)，瑞典

三、實驗方法

所有實驗均依據中華藥典⁽⁶⁾所載之方法進行，且皆需於無菌操作檯(Laminar Flow)執行試驗。

(一)微生物抑菌試驗檢驗方法

秤取檢品10.0 g，加入pH 7.2大豆分解蛋白質－乾酪素培養基(Soybean-Casein Digest Medium)，使全量為100 mL，取標準菌大腸桿菌(*Escherichia coli*)及沙門氏桿菌(*Salmonella*)等菌種，加入約 10^3 CFU/mL之菌液1 mL，35°C培養24小時。檢測檢品細菌數，測定檢品是否有抑菌作用。

若試驗結果某菌種於其接種之培養基中不生長，顯示檢品具抑菌作用，則該部分檢驗結果無效，故所有檢驗方法皆須採下述任一處理法調整，之後再重新執行該試驗。

1. 增加菌種稀釋液之量，但檢品量不變。
2. 於檢品稀釋液中加入適量之不活化劑，如：4.0%油酸聚醇山梨酯20。
3. 兼採1及2方法處理，以抵消檢品之抑菌作用。

(二)總生菌數檢驗方法

秤取檢品10.0 g，加入pH 7.2大豆分解蛋白質－乾酪素培養基(Soybean-Casein Digest Medium)，使全量為100 mL，並做一系列稀釋。將每個稀釋倍數之稀釋液各吸取1.0 mL，分別置入二個已滅菌之培養皿中，迅速各加已先溶化並冷卻至45°C之大豆分解蛋白質－乾酪素瓊脂培養基(Soybean-Casein Digest Agar Medium) 15-20 mL，於室溫下凝固，倒置於30-35°C培養48至72小時後，計算其菌落數(取生成之菌落數落在30至300個之間者進行計算)。

(三)大腸桿菌檢驗方法

1. 取檢品10.0 g，加乳糖培養基(Fluid Lactose Medium)使全量成100 mL，混合均勻，於30-35°C培養24至48小時，觀察微生物生長情形。若有菌落產生(混濁)，則以接種環沾取菌液，劃線接種於馬康奇瓊脂培養基(MacConkey Agar Medium)之表面，加蓋，倒置於30-35°C培養24至48小時。觀察菌落型態，典型大腸桿菌菌落為磚紅色菌落圍有膽汁沉澱環。若無典型菌落即表示此檢品符合無大腸桿菌之規定。
2. 若培養後之馬康奇瓊脂培養基(MacConkey Agar Medium)有可疑菌落，則以接種環將各可疑菌落分別接種在伊紅亞甲藍瓊脂培養基(Levine Eosine-Methylene Blue Agar Medium)之表面，加蓋，於30-35°C培養24至48小時。觀察其菌落之外觀，自每一片伊紅亞甲藍瓊脂培養基(Levine Eosine-Methylene Blue Agar Medium)上取2個可疑菌落或比較可疑之菌落移殖於平板計數培養基(Plate Count Agar)斜面上，並於35°C培養18-24小時，以下述(1)-(4)生化試驗(IMViC試驗)再確認，如此4種試驗反應均符合，則大腸桿菌為陽性。

- (1)吲哚試驗(Indole Test)：自平板計數培養基(Plate Count Agar)斜面上鉤菌接種於胰化蛋白胨培養液(Tryptone Broth)中，於35°C培養24±2小時後加入柯瓦克氏試劑(Kovac's reagent) 0.2-0.3 mL，輕輕搖動後靜置10分鐘，上層呈現紅色者，為正反應(+)，否則為負反應(-)。大腸桿菌通常為正反應，有時亦呈負反應。
- (2)歐普氏試驗(VP Test)：自平板計數培養基(Plate Count Agar)斜面上鉤菌接種於甲基紅-歐普氏培養液(MR-VP Broth)中，於35°C培養48±2小時後，取1 mL培養液至另一已滅菌之試管中，加入歐普氏試劑A (Voges-Proskauer reagents A) 0.6 mL及歐普氏試劑B (Voges-Proskauer reagents B) 0.2 mL後，再加入少許肌酸

(Creatine)，輕輕搖勻，靜置2小時後觀察結果，呈現粉紅色者，為正反應(+); 否則為負反應(-)。大腸桿菌為負反應。

- (3)甲基紅試驗(MR Test)：將上述(2)節剩餘之甲基紅-歐普氏培養液於35°C再培養48±2小時後，加入甲基紅指示劑5滴，輕輕搖勻，培養液呈紅色，則為正反應(+); 否則為負反應(-)。大腸桿菌為正反應。
- (4)檸檬酸鹽利用試驗(Citrate Utilization Test)：自平板計數培養基(Plate Count Agar)斜面上鉤菌接種於柯塞爾氏檸檬酸鹽培養液(Koser's Citrate Broth)中，於35°C培養96小時後，呈現混濁狀者，為正反應(+); 維持原澄清狀者，則為負反應(-)。大腸桿菌為負反應。

(四)沙門氏桿菌檢驗方法

1. 取檢品10.0 g，加乳糖培養基(Fluid Lactose Medium)使全量成100 mL，混合均勻，於30-35°C培養24至48小時，觀察微生物生長情形。若有菌落產生(混濁)，則輕輕搖混合均勻，並以無菌吸管分別吸取菌液1.0 mL至亞硒酸鹽胱胺酸培養基(Fluid Selenite Cystine Medium)及四硫磺酸鹽培養基(Fluid Tetrathionate Medium) 10 mL之試管中，混合均勻，於30-35°C培養12至24小時後，以接種環沾取上述菌液，劃線接種於煌綠瓊脂培養基(Brilliant Green Agar Medium)、亞硫酸鉍瓊脂培養基(Bismuth Sulfite Agar Medium)及木糖離胺酸去氧膽酸鹽培養基(Xylose-Lysine-Desoxycholate Agar Medium)之表面，加蓋，倒置於30-35°C培養24至48小時，觀察菌落外觀。若無典型菌落即表示此檢品符合無沙門氏桿菌之規定。
2. 若有可疑典型沙門氏菌落，則將菌落同時以穿刺及斜面劃線於三糖鐵瓊脂培養基(Triple Sugar-Iron Agar Medium)中，於35°C培養24±2小時後觀察，其結果若斜面呈紅色反應，底部呈黃色(或無色)反應，且培養基顏色不論有無變黑，皆可能是沙門氏

中藥製劑中微生物之調查(I)

桿菌，將繼以下述方式進一步確認之。

3. 可疑的菌落須進行多價本體(O)抗血清試驗及API 20E生化檢測套組檢測，如二者均為正反應，則判定沙門氏桿菌為陽性。

結果與討論

中藥製劑並非要求無菌，依照本署公告^(4,5)之「中藥濃縮製劑含異常物質之限量」係不得檢出病原性微生物大腸桿菌及沙門氏桿菌，且總生菌數不得超過 10^5 CFU/g。本調查之中藥製劑分別來自30家中藥廠，檢體種類涵蓋傳統劑型、單方濃縮製劑及複方濃縮製劑，共取得檢體330件。檢驗方法係以中華藥典第六版「微生物限量檢驗法」進行中藥製劑總生菌數、大腸桿菌和沙門氏桿菌之檢驗。

本調查所收集330件檢體，於檢測總生菌數、大腸桿菌和沙門氏桿菌前均先進行抑菌試驗。330件檢體中共有6件檢體有抑菌現象，故於菌種稀釋液中先加入4.0%油酸聚醇山梨酯20，以抵消檢品

之抑菌作用。

99年檢體總件數為183件，皆屬99年7月1日前生產製造之產品，經檢驗，其結果總生菌數以在 10^3 CFU/g以上為最多，共41件；若以現行之規範總生菌數不得超過 10^5 CFU/g，則有12件檢體不符合此規格範圍。以劑型種類來區分比較總生菌數，中藥廠申請國產查驗登記之檢體，計有傳統製劑1件、單味濃縮製劑3件、複方濃縮製劑3件及各縣市衛生局抽驗複方濃縮製劑5件超出此規範(表一)。

100年收集147件檢體，其製造日期均為衛生署公告需執行微生物檢驗之後所製造，其總生菌數之檢驗結果亦是以在 10^3 CFU/g以上為最多，而總生菌數超過 10^5 CFU/g規範者則只有1件(表二)。99及100年共330件檢體均未檢出可能致病的大腸桿菌及沙門氏桿菌。

雖多數檢體之總生菌數是在 10^3 CFU/g以上，但在 10^4 CFU/g以上之檢體亦已接近不合格範圍，實不容小覷。99年檢體來源為查驗登記，總生

表一、99年中藥製劑中微生物調查結果

檢品種類	件數	總生菌數(CFU/g)					大腸桿菌	沙門氏桿菌	廠家數
		10 ² 以下	10 ² 以上	10 ³ 以上	10 ⁴ 以上	10 ⁵ 以上			
傳統*	5	1	2	0	1	1	未檢出	未檢出	4
單方*	70	7	32	18	10	3	未檢出	未檢出	11
複方*	60	7	23	16	11	3	未檢出	未檢出	18
複方**	48	1	19	7	16	5	未檢出	未檢出	11
共計(件)	183	16	76	41	38	12			

備註：*中藥廠申請國產查驗登記藥品 **各縣市衛生局抽驗產品

表二、100年中藥製劑中微生物調查結果

檢品種類	件數	總生菌數(CFU/g)					大腸桿菌	沙門氏桿菌	廠家數
		10 ² 以下	10 ² 以上	10 ³ 以上	10 ⁴ 以上	10 ⁵ 以上			
傳統*	3	1	1	0	1	0	未檢出	未檢出	3
複方*	82	19	36	23	4	0	未檢出	未檢出	13
複方**	62	14	21	13	13	1	未檢出	未檢出	20
共計(件)	147	34	58	36	18	1			

備註：*中藥廠申請國產查驗登記藥品 **各縣市衛生局抽驗產品

表三：99及100年度檢品總生菌數(CFU/g)於 10^4 以上之百分比

年度	項目	> 10^4 CFU/g件數/總件數	%
99*		22/135	16.3
99**		16/48	33.3
100*		5/85	5.9
100**		13/62	21.0

備註：*中藥廠申請國產查驗登記藥品
**各縣市衛生局抽驗產品

表四、99年度各處方抽驗檢體總生菌數超過 10^5 CFU/g 件數之百分比

品名	小青龍湯	補中益氣湯	葛根湯
> 10^5 CFU/g件數/抽樣件數(%)	2/15 (13.3)	3/15 (20)	0/18 (0)

表五、99及100年度抽驗檢體總生菌數超過 10^5 CFU/g 百分比之比較

年度/項目	> 10^5 CFU/g件數/抽樣件數	%
99	5/48	10.4
100	1/62	1.6

菌數之檢驗結果於 10^4 CFU/g以上者有22件，占16.3%；檢體來源為衛生局抽驗，其結果於此區間有16件，占33.3%。100年檢體來源為查驗登記，總生菌數之檢驗結果於 10^4 CFU/g以上者有5件，占5.9%；檢體來源為衛生局抽驗，其結果於此區間有13件，占21.0% (表三)。顯而易見，不論檢體來源為何，衛生署公告微生物限量後市售產品總生菌數之數量均明顯下降。

本調查所收集之傳統製劑只有8件，分屬5家藥廠，其中有1件總生菌數超過 10^5 CFU/g，超過 10^4 CFU/g以上有2件，雖均未檢出大腸桿菌及沙門氏桿菌，但與濃縮製劑相比較，其總生菌數有些微偏高之傾向(表一及二)。

99年度衛生局抽驗之品項係選擇市場需求量

大且易購得之小青龍湯、補中益氣湯及葛根湯濃縮製劑共48件進行微生物調查，有5件總生菌數超過 10^5 CFU/g，占10.4%，其中小青龍湯及補中益氣湯分別有2和3件，各占13.3及20.0% (表四)；100年此三品項共有14件，均合格。

100年度衛生局抽驗之品項主要是以100年公告⁽²⁾之33方濃縮製劑為主，分別來自20家不同藥廠，共62件。其中只有1件總生菌數超過衛生署所規範之規格範圍，屬不合格案件。

分析比較99及100年衛生局抽驗檢體之檢驗結果，檢體不合格率從10.4%下降至1.6% (表五)，結果顯示衛生署公告限量後，各廠家對於所生產之中藥濃縮製劑在微生物部分已開始落實品管工作，但仍需擴大執行本調查始能更深入了解中藥濃縮製劑的品質及安全性。持續對中藥濃縮製劑進行嚴謹的管理，方能有效地提供消費者一個安全無虞的用藥空間。

參考文獻

1. 高木敬次郎、木村正康、原田正敏、大塚恭男編。1992。和漢藥物學。國立中國醫藥研究所出版，台北市。
2. 許鴻源、陳玉盤、許順吉、許照信、陳建志、張憲昌合著。1985。簡明藥材學。新醫藥出版社，台北市。
3. 行政院衛生署。2006。藥事法第二十一條第三款所稱「藥品中一部或全部含有污穢者」，關於中藥製劑部分之解釋。95.10.26署授藥字第0950003236號令。
4. 行政院衛生署。2010。公告修定「中藥濃縮製劑含異常物質之限量」。99.05.28署授藥字第0990003141號公告。
5. 行政院衛生署。2011。公告修正「中藥濃縮製劑含異常物質之限量」之適用範圍及其實施日期。100.08.29署授藥字第1000002752號公告。
6. 中華藥典編修委員會。2006。中華藥典第六版。行政院衛生署，台北市。

Investigation of the Microorganism in Chinese Medicinal Preparations (CMP)

YA-TZE LIN, JIA-LIN HSIEH, YI-CHU LIU, DANIEL YANG-CHIH SHIH AND
CHI-FANG LO

Division of Research and Analysis, FDA

ABSTRACT

Three hundred and thirty samples were randomly collected for investigating the microorganisms' contamination in CMP during fiscal years of 2010 and 2011. The total viable aerobic counts and microorganisms including *Escherichia coli* and *Salmonella* were determined by methods reported in the Chinese Pharmacopoeia VI. The results indicated that 3.9% of 330 samples were out of specifications (10^5 CFU/g) by aerobic microorganisms, and neither pathogen *Escherichia coli* nor *Salmonella* was detected. This survey was a preliminary study and would provide as a reference of the administration.

Key words: Chinese medicinal preparations, aerobic microorganisms, *Escherichia coli*, *Salmonella*