

## 中藥製劑中微生物之調查(II)

林雅姿 謝佳霖 劉宜祝 施養志

食品藥物管理署研究檢驗組

### 摘要

本調查為了解中藥製劑中微生物之現況，於101年度收集中藥製劑產品共171件，以中華藥典上所載之方法進行好氧性微生物總數(total aerobic microbial count)、大腸桿菌(*Escherichia coli*)、沙門氏桿菌(*Salmonella*)及酵母菌與黴菌總數(total combined yeasts and molds count)之檢驗，並依中醫藥司公告中藥濃縮製劑中好氧性微生物總數、大腸桿菌及沙門氏桿菌之限量標準進行判定，結果顯示87件中藥濃縮製劑均符合規範。另，因酵母菌與黴菌總數尚未納入公告限量標準中，因無相關規範，該試驗項目不允判定。此外，84件中藥粉末單味製劑，目前亦未制定微生物限量之相關規範，本調查結果將提供行政主管機關作為行政管理之參考。

**關鍵詞：**中藥製劑、好氧性微生物總數、大腸桿菌、沙門氏桿菌、酵母菌與黴菌總數

### 前言

台灣環境高溫多濕，對於中藥製劑所使用之藥材或賦形劑，皆利於微生物生長而破壞藥物成分或甚至對人體產生危害，導致藥品品質不良，進而影響民眾用藥衛生及安全性。

中藥製劑可分傳統劑型(丸、散、膏、丹、煎劑)及濃縮劑型，傳統劑型中之丸及散劑係將藥材直接研粉後做成製劑，製造過程大都未經加熱處理，然濃縮製劑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，濃縮製劑之微生物數量及種類理應較傳統劑型為少，所以傳統製劑原料微生物之管控更為重要。

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好氧性微生物總數(total aerobic microbial count)及特定致病菌存在情形，包含95年公告<sup>(1)</sup>中藥製劑碎片劑型之微生物限量標準，99年公告<sup>(2)</sup>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<sup>(3)</sup>更擴大要求單味濃縮製劑(100方)亦需符合相關微生物限量標準，並規定單味濃縮製劑於101年7月1日起皆需符合該限量規定。

為了解中藥廠執行產品微生物檢驗之現況，曾於99至100年間針對中藥製劑中之微生物進行調查<sup>(4)</sup>，結果顯示公告限量後好氧性微生物總數有逐漸下降趨勢，但仍須持續管理及監控。故本調查於101年收集171件中藥製劑產品，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(包括單味濃縮製劑、複方濃縮製劑及中藥粉末單味製劑)進行微生物之調查，所收集之檢體均為公告需做微生物檢驗後所製造之產品。本調查除檢驗好氧性微生物總數、大腸桿菌及沙門氏桿菌外，增加了酵母菌與黴菌總數之檢驗，且中藥粉末單味製劑目前尚無公告限量規範，本調查之結果將可提供作為行政管理之參考。了解藥廠對於已規範及未規範產品間微生物之分布情況，確實檢驗並嚴格把關藥品品質安全及衛生，方可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

101年收集檢體171件，包括由各縣市衛生局抽驗產品73件(37品項)、中藥廠申請國產查驗登記藥品14件(單味濃縮製劑3件及複方濃縮製劑11件)及中藥粉末單味製劑84件(35品項)，進行微生物調查。

#### (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)、平板計數瓊脂培養基(Plate Count Agar)、胰化蛋白培養基(Tryptone Broth)、甲基紅－歐普氏培養基(MR-VP Broth)、柯塞爾氏檸檬酸鹽培養基(Koser's Citrate Broth)、亞硒酸鹽胱胺酸培養基(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)及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。馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基(Potato Dextrose Agar Medium)及油酸聚醇山梨酯購自Merck，德國。酒石酸溶液購自J.T.Baker，義大利。

### 二、儀器設備

(一)乾熱滅菌器(INE600, Memmert, 德國)

(二)高壓滅菌釜(YTM-B直立式全自動型，巨興

化學儀器有限公司，台灣)

(三)恆溫培養箱(Hipoint-740，巨興化學儀器有限公司，台灣)

(四)無菌塑膠培養皿(60 × 15 mm，Greiner，德國)

(五)pH測定儀(S220，Mettler Toledo，瑞典)

(六)無菌濾膜(P/N 66068，PALL，美國)

(七)精密天平(GR-200，Mettler Toledo，瑞典)

(八)生化試驗鑑定系統(VITEK 2 Compact，Biomerieux，法國)

### 三、實驗方法

#### (一)好氧性微生物總數檢驗方法

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，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)。

#### (二)酵母菌與黴菌總數檢驗方法

準照測定好氧性微生物總數之培養皿法操作，惟將大豆分解蛋白質－乾酪素瓊脂培養基改用馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基，並將培養溫度及時間分別改為20-25°C及5-7日。

#### (三)大腸桿菌檢驗方法

1. 取檢品10.0 g，加乳糖培養基使全量成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上取2個可疑菌落或比較可疑之菌落移殖於平板計數瓊脂培養基斜面上，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，則以生化試驗鑑定系統VITEK 2 Compact進行確認。

IMViC試驗如下：

- (1)吲哚試驗(Indole Test)：自平板計數瓊脂培養基斜面上鈎菌接種於胰化蛋白培養基中，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)：自平板計數培養基斜面上鈎菌接種於甲基紅-歐普氏培養基(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)：自平板計數瓊脂培養基斜面上鈎菌接種於柯塞爾氏檸檬酸鹽培養基中，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至亞硒酸鹽胱氨酸培養基及四硫磺酸鹽培養基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、亞硫酸鈹瓊脂培養基及木糖離胺酸去氧膽酸鹽瓊脂培養基之表面，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，如為正反應，則以生化試驗鑑定系統VITEK 2 Compact檢測進行確認。

### 結果與討論

中藥製劑並非要求無菌，依照行政院衛生署公告<sup>(2,3)</sup>「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，且好氧性微生物總數不得超過 $10^5$  CFU/g。「酵母菌與黴菌總數」除中藥碎片劑型之製劑已有規範<sup>(1)</sup>外，其餘劑型至今尚未訂定，本調查擬增加該項之檢驗，以了解酵母菌與黴菌總數在製劑中存在情形。

本調查之中藥製劑分別來自28家中藥廠，檢體來源包括各縣市衛生局抽驗及廠商申請查驗登記時送驗之檢品，其種類涵蓋單味濃縮製劑、複方濃縮製劑及中藥粉末單味製劑，共取得檢體171件。檢驗方法係以中華藥典第七版「微生物限量檢驗法」及「微生物污染檢驗法」進行中藥製劑

中藥製劑中微生物之調查(II)

表一、101年中藥濃縮製劑中微生物調查結果

檢品種類	件數	好氧性微生物總數 (CFU/g)					酵母菌與黴菌總數 (CFU/g)			大腸桿菌	沙門氏桿菌	廠家數
		10 <sup>2</sup> 以下	10 <sup>2</sup> 以上	10 <sup>3</sup> 以上	10 <sup>4</sup> 以上	10 <sup>5</sup> 以上	10以下	10 <sup>1</sup> 以上	10 <sup>2</sup> 以上			
單方*	3	1	2	0	0	0	1	2	0	未檢出	未檢出	3
複方*	11	1	3	6	1	0	6	5	0	未檢出	未檢出	7
複方**	73	16	25	20	12	0	31	34	8	未檢出	未檢出	20
共計(件)	87	18	30	26	13	0	38	41	8			

\*中藥廠申請國產查驗登記藥品；\*\*各縣市衛生局抽驗產品

好氧性微生物總數、酵母菌與黴菌總數、大腸桿菌及沙門氏桿菌之檢驗。為確保檢驗結果之正確性，於試驗前均有進行藥典<sup>(5)</sup>所規範之預試驗，以確保檢品本身不具抑菌作用。

101年收集中藥濃縮製劑檢體87件，其製造日期均為行政院衛生署公告<sup>(3)</sup>需執行微生物檢驗之後所製造。好氧性微生物總數之檢驗結果以在10<sup>2</sup> CFU/g以上為最多，未有超過10<sup>5</sup> CFU/g規範者，而10<sup>4</sup> CFU/g以上接近不合格者則有13件；酵母菌與黴菌總數在各縣市衛生局抽驗產品中，檢驗調查結果超過10<sup>2</sup> CFU/g者有8件(11.0%)，而中藥廠查驗登記之藥品則皆在10<sup>2</sup> CFU/g以下。101年中藥濃縮製劑檢體均未檢出可能致病之大腸桿菌及沙門氏桿菌(表一)。

由表一得知，衛生局抽驗之73件複方濃縮製劑是分別來自20家廠商，經分析發現好氧性微生物總數在10<sup>4</sup> CFU/g以上有12件，係集中於6家廠商(A-F)，見表二。廠商C及D各抽驗檢體4件，好氧性微生物總數超過10<sup>4</sup> CFU/g以上者各有3件，高達75%，且此二家廠商之酵母菌與黴菌總數有5件超過10<sup>2</sup> CFU/g以上(62.5%)。

分析99、100及101年衛生局抽驗中藥濃縮製劑調查結果，99及100年<sup>(4)</sup>好氧性微生物總數超過10<sup>4</sup> CFU/g之產品分別為33.3%及21.0%，101年為16.4%，有逐年下降趨勢(表三)，顯示行政院衛生署公告微生物限量後，各廠家對於所生產之中藥濃縮製劑之品管工作已逐漸落實。雖然藥品上市前均需送檢並取得藥品許可證，但上市後的品質更為重要，需持續執行調查及監控，以了解中藥

表二、101年度衛生局抽驗結果廠家間之比較

廠家	抽樣件數	好氧性微生物總數 > 10 <sup>4</sup> CFU/g 件數(%)	酵母菌與黴菌總數 > 10 <sup>2</sup> CFU/g 件數(%)
A	2	1 (50)	-
B	4	1 (25)	-
C	4	3 (75)	4 (100)
D	4	3 (75)	1 (25)
E	3	2 (66.7)	-
F	4	2 (50)	-

表三、99、100及101年衛生局抽驗中藥濃縮製劑抽驗檢體好氧性微生物總數之比較

年度	項目 > 10 <sup>5</sup> CFU/g件數/抽樣件數(%)	> 10 <sup>4</sup> CFU/g件數/抽樣件數(%)
99	5/48 (10.4)	16/48 (33.3)
100	1/62 (1.6)	13/62 (21.0)
101	0/73 (0)	12/73 (16.4)

濃縮製劑的品質及安全。

此外，本年度針對天麻等30個品項之中藥粉末單味製劑共84件，執行微生物之檢驗，結果如表四。好氧性微生物總數超過10<sup>5</sup> CFU/g者共計10件(11.9%)，但在10<sup>4</sup> CFU/g以上之檢體亦有23件(27.4%)。此次收集之中藥粉末單味製劑分別來自18家廠商，經分析好氧性微生物總數在10<sup>4</sup> CFU/g以上(33件)之檢體來源廠商，分別分散在14家廠商，見表五；酵母菌及黴菌總數完全無生長者(33.3%)；超過10<sup>4</sup> CFU/g者有3件(3.6%)，分

表四、101年中藥粉末單味製劑之好氧性微生物總數調查結果

檢品種類	件數	好氧性微生物總數(CFU/g)(件)				
		10 <sup>2</sup> 以下	10 <sup>2</sup> 以上	10 <sup>3</sup> 以上	10 <sup>4</sup> 以上	10 <sup>5</sup> 以上
黃耆	2	-	-	-	2	-
獨活	2	-	1	-	-	1
山藥	3	-	-	3	-	-
木香	2	1	-	1	-	-
白芷	3	-	-	1	2	-
鬱金	2	-	-	1	-	1
續斷	2	-	2	-	-	-
葛根	3	-	2	1	-	-
三七	3	1	-	2	-	-
山豆根	1	-	-	-	1	-
地榆	1	1	-	-	-	-
巴戟天	1	-	-	-	1	-
桔梗	4	1	-	2	1	-
黃芩	3	-	-	3	-	-
天麻	3	2	-	-	-	1
澤瀉	3	-	1	1	-	1
肉蓯蓉	3	-	1	-	2	-
川芎	2	-	-	-	2	-
知母	2	-	-	-	1	1
藕節	2	-	1	-	1	-
三稜	3	-	1	2	-	-
麻黃	2	-	-	-	1	1
桂枝	3	-	-	2	1	-
肉桂	5	-	1	3	1	-
厚朴	1	-	-	1	-	-
杜仲	3	-	1	-	1	1
黃柏	2	1	-	-	1	-
桑白皮	1	-	1	-	-	-
陳皮	3	-	3	-	-	-
使君子	2	-	-	1	-	1
青皮	1	-	-	1	-	-
番瀉葉	2	-	-	-	2	-
款冬花	2	-	-	-	1	1
地龍	3	-	1	-	1	1
茯苓	4	2	1	-	1	-
共計件數 (%)	84	9 (10.7)	17 (20.2)	25 (29.8)	23 (27.4)	10 (11.9)

中藥製劑中微生物之調查(II)

表五、中藥粉末單味製劑各廠家好氧性微生物總數分佈情形

廠家	件數	好氧性微生物總數(CFU/g) (件)		
		10 <sup>4</sup> 以上	10 <sup>5</sup> 以上	(%)
A	11	4	-	36.4
B	3	1	-	33.3
C	6	-	-	0
D	3	2	-	66.7
E	7	1	3	57.1
G	2	1	1	100
H	2	-	-	0
I	2	-	1	50
J	18	6	3	50
K	5	-	1	20
L	1	1	-	100
M	8	3	1	50
N	3	1	-	33.3
O	3	1	-	33.3
P	5	1	-	20
Q	2	-	-	0
R	1	1	-	100
S	2	-	-	0

屬3家廠商(E、J及M)；在10<sup>3</sup> CFU/g以上者有5件(6.0%)，亦分屬3家廠商(J、M及N)，與前者有2家重覆(表六)。中藥粉末單味製劑檢體均未檢出可能致病之大腸桿菌及沙門氏桿菌。

本調查結果若依行政院衛生署對三七等100項單味濃縮製劑訂定之規範<sup>(5)</sup>為標準，好氧性微生物總數則有10件屬不合格案件，但目前中藥粉末單味製劑尚未訂定與微生物相關之規範，本調查結果係背景值可供行政單位制定限量規範參考。

表六、中藥粉末單味製劑酵母菌與黴菌總數之調查結果

項目	件數	酵母菌與黴菌總數(CFU/g)			
		完全無生長	10 <sup>2</sup> 以下	10 <sup>2</sup> 以上	10 <sup>3</sup> 以上
廠商數	13	15	4	3	3
單味製劑(84件)	28	42	6	5	3
百分比(%)	33.3	50	7.1	6	3.6

對於中藥品質管理應包括前端藥品上市前之查驗登記及上市後之品質監測，方可掌控藥品之品質，讓民眾使用安全無虞之產品，希藉由每年的中藥品質調查及監控，以督促藥廠提供安全、有效及良好品質的藥品，保障國人用藥安全。

參考文獻

1. 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。
2. 行政院衛生署。2010。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。
3. 行政院衛生署。2011。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。
4. 林雅姿、謝佳霖、劉宜祝、施養志、羅吉方。2012。中藥製劑中微生物之調查(I)。食品藥物研究年報，3: 404-409。
5. 行政院衛生署中華藥典編修委員會。2011。中華藥典。第七版。行政院衛生署，台北市。

## Investigation of the Microorganism in Chinese Medicinal Preparations (II)

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

Division of Research and Analysis, FDA

### ABSTRACT

One hundred and seventy one samples of Chinese medicinal preparations (CMP) including Chinese medicinal concentrated preparations and single herbal powder preparations were randomly collected to investigate the microorganisms contamination during the fiscal year 2012. The total aerobic microbial counts and microorganisms including *Escherichia coli*, *Salmonella*, total combined yeasts and molds count were determined by methods reported in the Chinese Pharmacopoeia VII. The permitted limit of total aerobic microbial counts, *E. coli* and *Salmonella* of Chinese medicinal concentrated preparations are promulgated by Committee on Chinese Medicine and Pharmacy (CCMP). The results indicated that all samples met the requirements. No rule of total combined yeasts and molds count, single herbal powder preparations has been set yet. This survey was a preliminary study and would provide as a reference for the administration authority.

Key words: Chinese medicinal preparations, total aerobic microbial counts, *Escherichia coli* and *Salmonella*, total combined yeasts and molds counts