

嘉南藥理大學 110 年度 研究計畫成果報告

計畫名稱：安心藥粧加值研發 子計畫 2：藥粧品
安全性研究與檢測平台

■ 重點(整合型)研究計畫

與業界廠商合作之研究計畫

執行期間：**110**年 01 月 01 日至 12 月 31 日

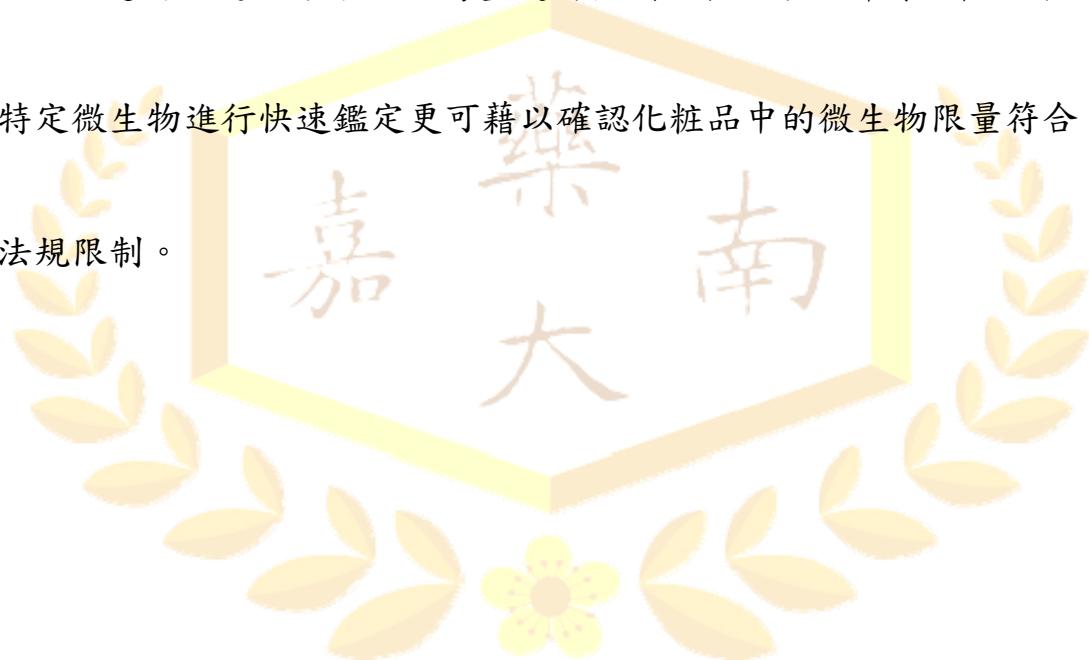
總計畫主持人：施美份

本（子）計畫主持人：張書林、何文岳

中華民國 110 年 02 月 **14** 日

(一)摘要

藥粧品的安全性是化粧品品質管控的一大環節，其中微生物的檢測分析更有其必要性與重要性。本研究利用不同的去氧核醣核酸(DNA)提取方法結合聚合酶鏈鎖反應(PCR)技術藉以檢測並定量化粧品中的微生物。透過上述以分子生物為基礎的檢測流程，除可針對化粧品中的特定微生物進行快速鑑定更可藉以確認化粧品中的微生物限量符合法規限制。



(二)本文

化粧品是用於保持和改善人體皮膚健康狀況的產品[1-4]，由於施用於人體，因此，對於化粧品的安全性，每個層級的品質管控都是十分重要的環節[5-7]。化粧品的製造必須符合國際標準化組織（ISO）所公告的優良製造準則(GMP)標準 DS/EN ISO 22716:2007等原則，這包含了化粧品的生產，控制，儲存和產品運輸等所有方面[6-10]。GMP的主要目標是定義化粧品標準，以確保消費者的安全 [6-8,11]。

微生物的檢測分析是化粧品品質管控的重要環節，而針對化粧品的微生物監測，一般多採用平板計數法進行分析。為縮短檢驗時間並提升效能，本研究利用不同的去氧核糖核酸(DNA)提取方法結合聚合酶鏈鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)技術藉以檢測化粧品中的特定微生物。

首先，為利用 PCR 方式將不同微生物的特定 DNA 片段進行偵測，本研究分別針對各待測微生物的染色體去氧核糖核酸(genomic DNA)進行序列分析，以設計 PCR 反應中所添加的專一性引子(primers)序列，以利後續在 PCR 反應中增幅各微生物的特定 DNA 片段。

PCR 反應所添加的引子(primers)序列設計如 **Table 1**所示：

Table 1. 本研究所使用的引子(primers)序列

Bacterial target	Forward(F) and Reverse(R) primer	Gene amplified	PCR size (bp)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	F: 5'-ATGGAAATGCTGAAATT CGGC-3' R: 5'-CTTCTTCAGCTCGACGCGACG-3'	oprL	504
<i>Escherichia coli</i>	F: 5'-ATGTTACGTC CTGTAGAAC-3' R: 5'-ACCACCTGCCAGTCAACAGA-3'	uidA	620
<i>Staphylococcus aureus</i>	F: 5'-ATGGCAATTGTTCAATATTAC-3' R: 5'-TGACGAACTAAAGCTTCGTT-3'	nucA	521

後續，本研究將已知數量的待測微生物摻入化粧品中以模擬化粧品受污染的情形；研究過程選用(1)水溶性液體樣品與(2)含油量高粉霜樣品等二種不同類型的化粧品樣品，各自加入三種不同待測微生物分別為綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、大腸桿菌(*Escherichia coli*)及金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)，然後再依不同劑型進行取樣及製備，分別說明如下：

(1) 水溶性液體樣品

於無菌操作下量取1 mL 樣品加入已滅菌之8 mL MLB，再分別加入1 mL (10^5 CFU/mL) 綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、大腸桿菌(*Escherichia coli*)或金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)等三種待測微生物並混合均勻。

(2) 含油量高粉霜樣品

於無菌操作下秤取1g 樣品至含有1 mL 已滅菌的 Tween 80以及7 mL 無菌 MLB，再分別加入1 mL (10^5 CFU/mL) 綠膿桿菌

(*Pseudomonas aeruginosa*)、大腸桿菌(*Escherichia coli*)或金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) 等三種待測微生物並使其均勻混合。

此外，由於不同細胞裂解方法對提取染色體去氧核糖核酸(genomic DNA)各有其優勢，本研究進一步透過機械性細胞裂解核酸提取法(Qiagen DNeasy Power soil kit)與酵素消化核酸提取法(Qiagen QIAamp mini DNA kit)，藉以比較不同的去氧核糖核酸提取法對後續PCR試驗分析的影響。

完成染色體去氧核糖核酸的提取後，再將上述提取的去氧核糖核酸進行聚合酶連鎖反應(PCR)藉以增幅各微生物的特定DNA片段，反應材料如下 **Table 2** 所示：

Table 2. 聚合酶連鎖反應(PCR)使用之試劑

PCR materials	
DNA sample	5 μ l
10x PCR buffer	5 μ l
primer mix (5uM each)	4 μ l
Taq DNA polymerase (2.5U)	0.5 μ l
dNTP mix	2 μ l
ddH ₂ O	33.5 μ l
Total volume	50 μ l

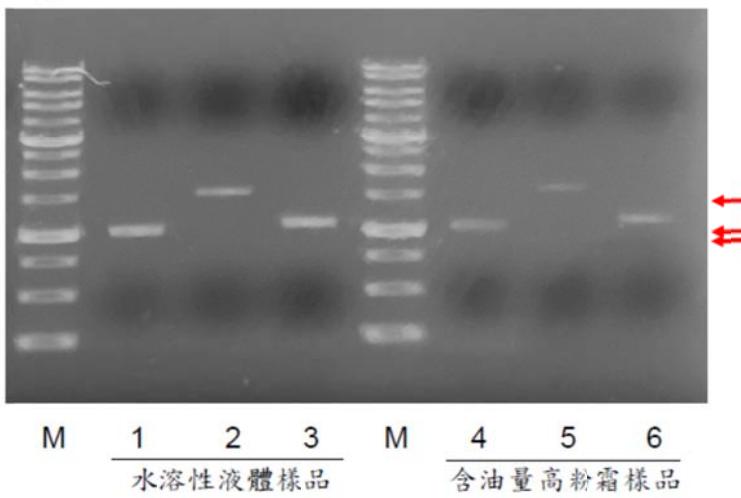
將 **Table 2** 所列試劑置入200 μ L 微量離心管中，之後使用 **Table 3** 設定條件，在聚合酶連鎖反應儀中反應~2小時，其反應條件如下：

Table 3. 聚合酶連鎖反應(PCR)之反應條件

PCR condition			
Initial denature	94°C	2 min	
Loop 1 (30 Cycles)			
Seq	94°C	20 sec	max
Seq	55°C	30 sec	0.1°C/sec
Seq	68°C	1 min	0.2°C/sec
Final extension	68°C	2 min	

後續將 PCR 反應物，利用瓊脂糖凝膠(agarose gel)進行膠體電泳分析。本實驗以 TAE (Tris-acetate-EDTA)緩衝液與瓊脂糖凝膠配製成所須的濃度(1.2%)，放入微波爐中加熱使其完全溶解，再待降溫約至 60°C，加入溴化乙銨(ethidium bromide, EtBr)並使其混和均勻，即可倒入插有齒梳的製膠槽，待其冷卻定型後將齒梳向上拉開，即可進行電泳分析。完成膠體電泳後即將膠體取出，PCR 的反應物 DNA 會在膠體運動過程與膠體中的 EtBr 結合，再以紫外線透照儀觀察膠體，藉以確認 DNA 的位置，最後使用電泳膠片影像擷取系統紀錄並分析數據，所得的電泳結果如圖所示。

Figure 1. 酵素消化核酸提取法



M : DNA ladder

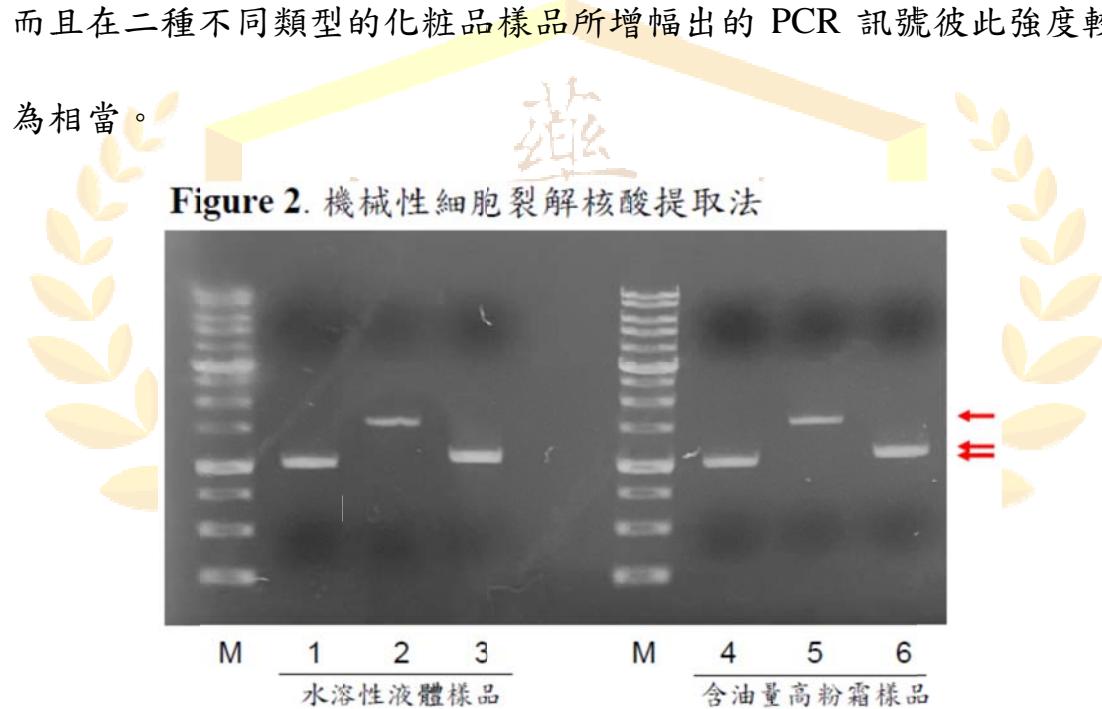
- 1 : 綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*) genomic DNA
- 2 : 大腸桿菌(*Escherichia coli*) genomic DNA
- 3 : 金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) genomic DNA
- 4 : 綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*) genomic DNA
- 5 : 大腸桿菌(*Escherichia coli*) genomic DNA
- 6 : 金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) genomic DNA

本研究將已知數量的待測微生物摻入不同劑型的化粧品中藉以模擬化粧品受污染的情形；劑型方面我們採用(1)水溶性液體樣品與(2)含油量高粉霜樣品等二種不同類型的化粧品樣品，各自加入三種不同的待測微生物如綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、大腸桿菌(*Escherichia coli*)或金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)。

由 **Figure 1.** 結果顯示，不論是水溶性液體樣品(Lane 1, 2, 3)或是含油量高粉霜樣品(Lane 4, 5, 6)，若以酵素消化核酸提取法(Qiagen QIAmp mini DNA kit)獲取樣品中的DNA並以PCR反應增幅特定片段，三種待測微生物的特定基因都可被專一性地予以偵測，只是含油

量高粉霜樣品(Lane 4, 5, 6)所增幅出的訊號相對較水溶性液體樣品(Lane 1, 2, 3)所增幅出的訊號弱。

然而，若是以機械性細胞裂解核酸提取法(Qiagen DNeasy Power soil kit) 獲取樣品中的DNA並進行PCR增幅反應，Figure 2.結果顯示，不論是水溶性液體樣品(Lane 1, 2, 3)或是含油量高粉霜樣品(Lane 4, 5, 6)，三種待測微生物的特定基因不僅都可被專一性地予以偵測，而且在二種不同類型的化粧品樣品所增幅出的PCR訊號彼此強度較為相當。



M : DNA ladder

- 1 : 綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*) genomic DNA
- 2 : 大腸桿菌(*Escherichia coli*) genomic DNA
- 3 : 金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) genomic DNA
- 4 : 綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*) genomic DNA
- 5 : 大腸桿菌(*Escherichia coli*) genomic DNA
- 6 : 金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) genomic DNA

(三)總論

以台灣目前現行的化粧品衛生安全管理法而言，除規定不得檢出大腸桿菌(*Escherichia coli*)、綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)或白色念珠菌(*Candida albicans*)外，總生菌數的部分，除特殊產品類型如嬰兒用、眼部周圍用及使用於接觸黏膜部位之化粧品容許基準為100 CFU/g 或CFU/mL 以下外，其他類化粧品的容許基準則為1,000 CFU/g 或CFU/mL 以下。然而，傳統上針對化粧品微生物的檢測，多是採用平板計數法進行分析，此檢測過程至少需經2至3日。而針對大腸桿菌(*Escherichia coli*)、綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) 或白色念珠菌(*Candida albicans*)等不得檢出菌的檢測，除需在特殊的鑑別性培養基進行培養，還會佐以生化鑑定等方式進行菌種確認。如大腸桿菌(*Escherichia coli*)的檢測，需先以馬康奇瓊脂培養基(MacConkey Agar)培養24至48小時，再以伊紅亞甲藍瓊脂培養基(Eosin Methylene Blue Agar)培養24至48小時，最後再將可疑菌進行必要之生化試驗進行確認；而如綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)的檢測，需先以溴棕三甲銨瓊脂培養基(Cetrimide Agar)培養24至48小時，再以綠膿菌素測定用培養基(PDP Agar)培養24至48小時，最後再將可疑菌進行必要之生化試驗進行確

認；另外如金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的檢測，需先以巴德派克瓊脂(Baird Parker Agar Medium)培養24至48小時，再以甘露醇鹽瓊脂(Mannitol salt agar)培養24至48小時，最後再將可疑菌進行必要之生化試驗進行確認。然而，上述各檢測過程除了培養過程費時頗長，還需各自配製鑑別性培養基以及建立特定的生化鑑定方法，因此，建構一套快速且靈敏的微生物檢測系統將可大幅縮短檢測所耗費的時間與各方面的成本。

分子生物學的技術已運用在許多微生物學的先端研究領域中[9-12]。相較於傳統的平板生長計數法，不但勞動力需求大，且需數天的時間才可完成微生物的檢測與鑑定[13-21]，本研究結合去氧核糖核酸(DNA)提取法以及聚合酶鏈鎖反應(PCR)技術，除了可展現高的靈敏度，更可縮減工作流程。

本研究採用分子生物學的技術作為偵測的方法，從樣品採集開始約4個小時即可產生分析結果，不但可展現聚合酶鏈鎖反應(PCR)的高靈敏度，更可縮減工作流程並降低勞動成本，因此本研究的方法學建立有其實質重要性且符合市場的需求。

參考文獻

1. van der Maren, L. Guidelines for Good Manufacturing Practice of Cosmetic Products (GMPC). Council of Europe, Health Protection of the Consumer. Available online: <https://book.coe.int/en/health-protection-of-theconsumer/32-pdf-guidelines-for-good-manufacturing-practice-of-cosmetic-products-gmpc.html>.
2. Barel, A.O.; Paye, M.; Maibach, H.I. Handbook of Cosmetic Science and Technology Second Edition 2005. Available online: https://www.academia.edu/28676594/Barel_Paye_Maibach_Handbook_of_Cosmetic_Science_and_Technology.
3. Jimenez, L.; Ignar, R.; Smalls, S.; Grech, P.; Hamilton, J.; Bosko, Y.; English, D. Molecular detection of bacterial indicators in cosmetic/pharmaceuticals and raw materials. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, 22, 93–95.
4. Huang, J.H.; Hitchins , A.D.; Tran, T.T.; McCarron, J.E. Bam Chapter 23: Methods for Cosmetics; FDA: Silver Spring, MD, USA, 2017.
5. Iso 22716:2007(en) Cosmetics—Good Manufacturing Practices (gmp)—Guidelines on Good Manufacturing Practices. 2007. Available online: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:22716:ed-1:v2:en>.
6. Iso 29621:2017(en) Cosmetics—Microbiology—Guidelines for the Risk Assessment and Identification of Microbiologically Low-Risk Products. 2017. Available online: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:29621:ed-2:v1:en>.
7. Jaccard, M. The Objective Is Quality, 1st ed.; EPFL Press: Lausanne, Switzerland, 2013.
8. Halla, N.; Fernandes, I.P.; Heleno, S.A.; Costa, P.; Boucherit-Otmani, Z.; Boucherit, K.; Rodrigues, A.E.; Ferreira, I.; Barreiro, M.F. Cosmetics preservation: A review on present strategies. *Molecules* **2018**, 23, 1571.
9. Murakami, S.; Shimamoto, T.; Nagano, H.; Tsuruno, M.; Okuhara, H.; Hatanaka, H.; Funato, K. Producing human ceramide-NS by metabolic engineering using yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci. Rep.* **2015**, 5, 16319.
10. Ricchi, M.; Bertasio, C.; Boniotti, M.B.; Vicari, N.; Russo, S.; Tilola, M.; Bellotti, M.A.; Bertasi, B. Comparison among the quantification of bacterial pathogens by qPCR, dPCR, and cultural methods. *Front.*

- Microbiol. **2017**, *8*, 1174.
- 11. Versalovic, J.; Lupski, J.R. Molecular detection and genotyping of pathogens: More accurate and rapid answers. *Trends Microbiol.* **2002**, *10*, s15–s21.
 - 12. Tsalik, E.L.; Bonomo, R.A.; Fowler, V.G., Jr. New molecular diagnostic approaches to bacterial infections and antibacterial resistance. *Annu. Rev. Med.* **2018**, *69*, 379–394.
 - 13. Buchan, B.W.; Ledeboer, N.A. Emerging technologies for the clinical microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Rev.* **2014**, *27*, 783–822.
 - 14. Jongenburger, I.; Reij, M.W.; Boer, E.P.; Gorris, L.G.; Zwietering, M.H. Factors influencing the accuracy of the plating method used to enumerate low numbers of viable micro-organisms in food. *Int. J. Food Microbiol.* **2010**, *143*, 32–40.
 - 15. Eibl, R.; Meier, P.; Stutz, I.; Schildberger, D.; Huhn, T.; Eibl, D. Plant cell culture technology in the cosmetics and food industries: Current state and future trends. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *102*, 8661–8675.
 - 16. Grudlewska-Buda, K.; Skowron, K.; Gospodarek-Komkowska, E. Comparison of the intensity of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* using classical culture-based method and digital droplet PCR. *AMB Express* **2020**, *10*, 75.
 - 17. Nauta, M.J.; van der Giessen, J.W. Human exposure to *Mycobacterium paratuberculosis* via pasteurized milk: A modelling approach. *Vet. Rec.* **1998**, *143*, 293–296.
 - 18. Biesta-Peters, E.G.; Reij, M.W.; Joosten, H.; Gorris, L.G.M.; Zwietering, M.H. Comparison of two optical-density-based methods and a plate count method for estimation of growth parameters of *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 1399–1405.
 - 19. Clais, S.; Boulet, G.; Van Kerckhoven, M.; Lanckacker, E.; Delputte, P.; Maes, L.; Cos, P. Comparison of viable plate count, turbidity measurement and real-time PCR for quantification of *Porphyromonas gingivalis*. *Lett. Appl. Microbiol.* **2015**, *60*, 79–84.
 - 20. Haas, C.N. Quantitative microbial risk assessment (QMRA) and molecular biology—Paths to integration. *Environ. Sci. Technol.* **2020**.
 - 21. Quigley, L.; O’Sullivan, O.; Beresford, T.P.; Ross, R.; Fitzgerald, G.F.; Cotter, P.D. A comparison of methods used to extract bacterial DNA from raw milk and raw milk cheese. *J. Appl. Microbiol.* **2012**, *113*, 96–105.