บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. กล้องจุลทรรศน์ (Light microscope)
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าความละเอียด 0.01 กรัม (Electronic balance, sensitivity of 0.01g)
3. เครื่องตีผสม (stomacher)
4. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)
5. เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer)
6. เครื่องผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน (Homogenizer)
7. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-Spectrophotometer)
8. ตะเกียงบุนเสนอัตโนมัติ (Bunsen burner)
9. ตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 22.5±2.5 องศาเซลเซียส (Incubators 22.5±2.5^{o}C)
10. ตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 32.5±2.5 องศาเซลเซียส (Incubators 32.5±2.5^{o}C)
11. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow hood with heap filter or Biosafety cabinet)
12. ตู้อบร้อน (Hot air oven)
13. ตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส
14. เตาไฟฟ้า (Hot plate)
15. อ่างน้ำร้อน (Water bath)

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. กรวยกรองสำลี
2. ขวดพลาสติกฝาเกลียว ขนาด 100 มิลลิลิตร (Plastic bottles with screw cap, autoclavable size 100 mL)
3. ขวดแก้วฝาเกลียว ขนาด 40 และ 250 มิลลิลิตร (Laboratory bottles with screw cap, autoclavable size 250 mL)
4. คิวเวตพลาสติก (Plastic Cuvette)
5. จานเพาะเชื้อ (Glass Petri dishes 15x100 mm)
6. ถุงตีผสม (stomacher bag)

7. ทิป ขนาด 200 และ1,000 ไมโครลิตร (Micropipette Tip, size 200 and 1,000 µl)
8. เทอร์โมมิเตอร์ ขนาด 150 องศาเซลเซียส
9. บีกเกอร์สแตนเลส ขนาด 500 และ1,000 มิลลิลิตร (Beaker, size 500 and 1,000 mL)
10. พายสแตนเลส (paddle stainless)
11. ไมโครปิเปต (Micropipette)
12. ลูปและเข็มเขี่ยเชื้อ (Loops and needles; nichrome and platinum)
13. หลอดทดลองแก้วฝาเกลียว ขนาด 30x75 มิลลิเมตร และ 16x150 มิลลิเมตร (นำไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หรือ อบร้อนที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง)

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. Cetrimide agar medium (Cet)
2. CHROMagar™ Candida
3. Mannitol Salt Agar with egg yolk (MSA+Egg yolk)
4. Modified letheen broth (MLB) หรืออาหารเลี้ยงเชื้ออื่นที่เหมาะสม
5. Potato Dextrose Agar medium (PDA) with antibiotics หรืออาหารเลี้ยงเชื้ออื่นที่เหมาะสม
6. Pseudomonas Agar Medium for Detection of Pyocyanin (PP)
7. saline TS
8. saline TS ผสม 0.05% polysorbate 80
9. Tryptic Soy agar (TSA)
10. Tryptic Soy broth (TSB)
11. Tryptone water (TW)
12. TSB-Soy Lecithin-Polysorbate 20, 80 (TSP) หรือ neutralizing diluent อื่นที่เหมาะสม ดังแสดงในภาคผนวก ค

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ

1. *Aspergillus niger* ATCC 16404
2. *Candida albicans* ATCC 10231

3. *Candida tropicalis* สายพันธุ์ที่แยกจากตัวอย่างเครื่องสำอาง
4. *Escherichia coli* ATCC 8739
5. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
6. *Pseudomonas aeruginosa* (DMST 35549) สายพันธุ์ที่แยกจากตัวอย่างเครื่องสำอางชนิดโลชั่น
7. *Pseudomonas putida* ATCC 17522 (DMST 14732)
8. *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708
9. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
10. *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990 (DMST 5868)

การดำเนินการวิจัย

1. **การศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ 4 ชนิด คือ** *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 **และ***Aspergillus niger* ATCC 16404 **เมื่อใส่รวมกันในตัวอย่างครีมบำรุงกลางคืนได้เป็นตัวอย่างทดสอบความชำนาญ ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัว ในรายการทดสอบ** Bacteria count, Mould count **และ ตรวจหา** *P. aeruginosa*

ตัวอย่างครีมบำรุงกลางคืนที่จัดเตรียมขึ้น และผสมจุลินทรีย์ได้เป็นตัวอย่างทดสอบความชำนาญ โดยปรับเปลี่ยนปริมาณการปนเปื้อนของจุลินทรีย์เป็น 3 ระดับ คือระดับปนเปื้อนสูง มีปริมาณจุลินทรีย์รวม ในช่วง 5,000-10,000 โคโลนี/มิลลิลิตร, ระดับปนเปื้อนกลาง มีปริมาณจุลินทรีย์รวม ในช่วง 5,000-1,000 โคโลนี/มิลลิลิตร และระดับปนเปื้อนต่ำ 10-200 โคโลนี/มิลลิลิตร โดยปรับระดับการปนเปื้อนตามเกณฑ์ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เพื่อใช้ในรายการทดสอบ Total Aerobic Plate Count (TPC) และตรวจหาจุลินทรีย์ก่อโรค ได้แก่ *P. aeruginosa* รวมทั้งทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (Homogeneity testing) และความคงตัว (Stability testing) ของตัวอย่างที่จัดเตรียมขึ้น

1.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ

1.1.1 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

1.1.2 *Escherichia coli* ATCC 8739

1.1.3 *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708

1.1.4 *Aspergillus niger* ATCC 16404

1.2 การเตรียมจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการทดสอบ

เตรียมจุลินทรีย์ในตู้ปลอดเชื้อ โดยเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แต่ละชนิดจากหลอด working culture เกลี่ยบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อบ่มเพาะตามที่ระบุในตาราง 1 ล้างแบคทีเรียและ *C. albicans* จากผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย saline TS 10 มิลลิลิตร ส่วน *A. niger* ล้างเชื้อจากผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย saline TS ผสม 0.05%polysorbate 80 นำ suspension ของเซลล์ *A. niger* กรองผ่านกรวยกรองสำลีนำส่วนของสารละลาย conidias ไปใช้ จากนั้นนำ suspension ของจุลินทรีย์แต่ละชนิดไปวัดความส่งผ่านของแสง (%Transmittance) ที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร โดยใช้ spectrophotometer (ISO 21148, 2005) ปรับความส่งผ่านของแสงดังตาราง 1 ด้วย saline TS และ saline TS ผสม 0.05%polysorbate 80 ตามชนิดของจุลินทรีย์ จะได้ปริมาณเซลล์ของจุลินทรีย์ประมาณ $1x10^8$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร

ตาราง 1 แสดงสภาวะในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์และค่าความส่งผ่านของแสงของจุลินทรีย์แต่ละชนิด

ชนิดจุลินทรีย์	อาหารเลี้ยงเชื้อ	อุณหภูมิบ่มเพาะ (องศาเซลเซียส)	เวลาบ่มเพาะ	%Transmittance	ปริมาณจุลินทรีย์ (cfu/mL)
A. niger	PDA	22.5±2.5	6 ถึง 10 วัน	1.02-1.09	10^8
Candida	PDA	22.5±2.5	44 ถึง 52 ชม.	5.1-5.4	10^8
E. coli	TSA	32.5±2.5	18 ถึง 24 ชม.	79-81	10^8
Pseudomonas	TSA	32.5±2.5	18 ถึง 24 ชม.	70-75	10^8
S. choleraesuis	TSA	32.5±2.5	18 ถึง 24 ชม.	70-75	10^8
Staphylococcus	TSA	32.5±2.5	18 ถึง 24 ชม.	79-82	10^8

ที่มา: ISO 21148, 2005

เก็บ suspension ของเซลล์จุลินทรีย์ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส หากไม่ทดสอบภายใน 2 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรียและ *C. albicans* สามารถเก็บไว้ใช้ได้ภายใน 24 ชั่วโมง ส่วน *A. niger* สามารถเก็บไว้ใช้ได้นานถึง 7 วัน (USP 32-NF 27, 2010) ตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ที่เตรียมได้ โดยเจือจางเชื้อด้วยวิธี ten fold dilution โดยใช้ TW 9 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้สารละลายเจือจาง 10^6 และ 10^7 ตามลำดับ ซึ่งเป็นช่วงที่สามารถตรวจนับได้ด้วยวิธี pour plate

โดยตรวจนับจำนวนแบคทีเรียด้วยอาหาร TSA บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 32.5±2.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ถึง 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาบ่มเพาะแล้ว ตรวจนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่อยู่ในช่วง 30-300 โคโลนีต่อจาน (ISO 21149, 2006, p. 9) และตรวจนับปริมาณ *C. albicans* และ *A. niger* ด้วยอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 22.5±2.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ถึง 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาบ่มเพาะแล้วตรวจนับจำนวนโคโลนีของ *C. albicans* และ *A. niger* ที่อยู่ในช่วง 15-150 โคโลนีต่อจาน (ISO 16212, 2008, p. 7) ปริมาณจุลินทรีย์ที่ตรวจนับได้นำมาคำนวณเป็นปริมาณจุลินทรีย์ตั้งต้นก่อนนำไปใส่ในครีมหน่วยเป็นจำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตร

1.3 สูตรตำรับครีมบำรุงกลางคืน

1.3.1 จากการศึกษาสูตรตำรับเครื่องสำอางที่ผสมสารสารกันเสียชนิดต่างๆ 7 สูตรตำรับที่มีผลต่อการรักษาระดับการอยู่รอดของจุลินทรีย์ 5 ชนิด

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพสารกันเสียที่ได้จากห้องปฏิบัติการทดสอบทางชีววิทยาและความปลอดภัย สำนักเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย จึงนำไปประยุกต์ใช้ในการเตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนาญโดยคัดเลือกสูตรตำรับของเครื่องสำอางที่จุลินทรีย์สามารถอยู่รอดและมีค่า log reduction น้อยกว่า 2.0 ที่ 7 วัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสูตรตำรับที่จุลินทรีย์สามารถคงอยู่ได้ที่ 7 วัน สามารถนำมาใช้เป็นต้นแบบเพื่อจัดตรียมเป็นตัวอย่างทดสอบความชำนาญต่อไป ซึ่งจากผลการทดสอบประสิทธิภาพสารกันเสียในเครื่องสำอาง แสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง Body Lotion No.1 (หมายเลขทดสอบ S7) ซึ่งมีสารกันเสีย methylparaben 0.293 %w/w และpropylparaben 0.098 %w/w เป็นสูตรตำรับที่จุลินทรีย์ทั้ง 5 ชนิด ยังคงมีชีวิตอยู่ได้นานถึง 7 วันแต่มีปริมาณลดลง ในขณะที่ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางสูตรตำรับอื่นๆ จุลินทรีย์ทั้ง 5 ชนิดไม่สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้เนื่องจากสารกันเสียที่ใส่ในสูตรตำรับ จากผลการทดสอบจึงคัดเลือก Body Lotion No.1 ที่ผสมสารกันเสียในปริมาณดังกล่าวเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางต้นแบบในการเตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนาญ โดยลักษณะของครีมดังกล่าวเป็นอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W emulsion) ผู้วิจัยจึงตรวจยืนยันปริมาณและชนิดของสารกันเสียใน Body Lotion No.1 ที่กลุ่มทดสอบทางเคมีเครื่องสำอาง สำนักเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ผลการทดสอบพบว่า ตรวจพบ methylparaben 0.195%w/w และตรวจพบ propylparaben 0.107%w/w ผู้วิจัยจึงนำข้อมูลที่ได้มาศึกษาการเตรียมเครื่องสำอางประเภทบำรุงผิวและผสมสารกันเสียตามสูตรตำรับที่ได้เพื่อจัดเตรียมตัวอย่างขึ้นเองในการดำเนินการวิจัยต่อไป

1.3.2 การเตรียมตัวอย่างครีมบำรุงกลางคืน

เตรียมตัวอย่างเครื่องสำอางขึ้นเองซึ่งเป็นครีมบำรุงกลางคืน (Night Cream) ที่ผสมสารกันเสีย คือ methylparaben ร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนักและpropylparaben ร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก และองค์ประกอบอื่นๆดังแสดงในตาราง 2 ซึ่งครีมบำรุงกลางคืนนี้เป็นอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W emulsion)

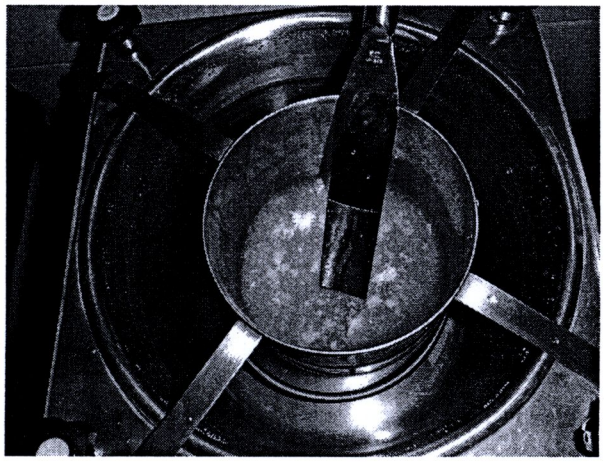
ตาราง 2 แสดงส่วนประกอบที่ใช้ในการเตรียมครีมบำรุงกลางคืน

ส่วนประกอบ		% โดยน้ำหนัก	หน้าที่
ชื่อทางการค้า	**ชื่อวิทยาศาสตร์**		
ส่วน A			
Cremophor A-6	Ceteareth-6 and stearyl alcohol	2.0	ตัวช่วยทำอิมัลชัน
Cremophor A-25	Ceteareth-25	2.0	ตัวช่วยทำอิมัลชัน
Finsolv TN	C12- C15 alcohol benzoate	15.0	ตัวช่วยทำอิมัลชัน*
WAX-C	Cetyl alcohol	2.0	เพิ่มความหนืด*
GMS	Glyceryl monostearate	6.0	ตัวทำอิมัลชัน*
ส่วน B			
Propylene glycol	Propylene glycol	3.0	ตัวช่วยทำอิมัลชัน* และเพิ่มความหนืด
Water		66.3	
ส่วน C			
Methyl paraben		0.2	สารกันเสีย
Propyl paraben		0.1	สารกันเสีย
Dipotasium	Dipotassium Glycyrrhizinate	0.1	ป้องกันการระคายเคือง
Vitamin-E		1.0	บำรุงผิว
น้ำหอม		0.3	

* เป็นองค์ประกอบประเภทไขมัน และไขแข็ง ที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้

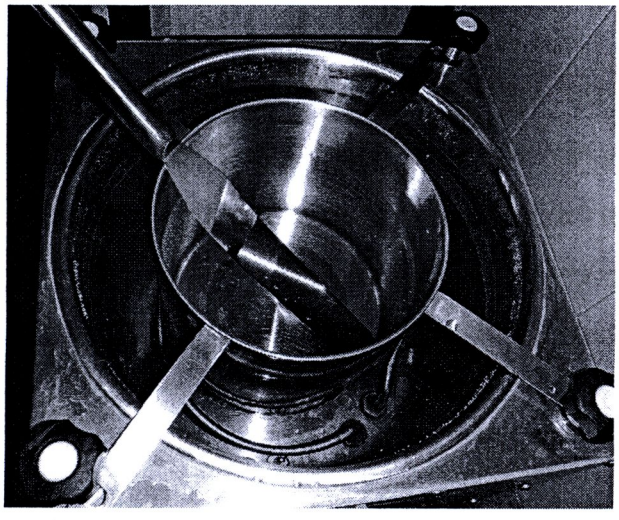
วิธีทำ

1. นำส่วน A ทั้งหมดผสมรวมกันในบีกเกอร์สแตนเลส อุ่นให้ร้อนในอ่างน้ำร้อนโดยจุ่มเทอร์โมมิเตอร์ วัดอุณหภูมิให้ได้ 80 องศาเซลเซียส ดังแสดงในภาพ 3



ภาพ 3 แสดงส่วนผสม A ในอ่างน้ำร้อน

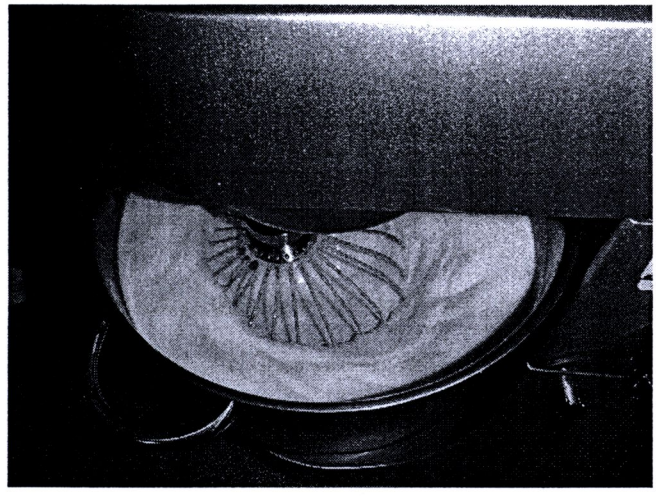
2. นำส่วน B ทั้งหมดผสมรวมกันในบีกเกอร์สแตนเลส อุ่นให้ร้อนในอ่างน้ำร้อนโดยจุ่มเทอร์โมมิเตอร์ วัดอุณหภูมิให้ได้ 80 องศาเซลเซียส ดังแสดงในภาพ 4



ภาพ 4 แสดงส่วนผสม B ในอ่างน้ำร้อน

3. เมื่อทั้งส่วน A และส่วน B ได้อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ให้เทส่วน B ลงในส่วน A

4. ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็วด้วยเครื่องตีผสมทันที โดยใช้หัวผสมแบบตะกร้อด้วยความเร็วปานกลาง ดังแสดงในภาพ 5



ภาพ 5 แสดงการผสมครีมด้วยเครื่องตีผสม

5. เมื่ออุณหภูมิของครีมลดลงถึง 50 องศาเซลเซียส จึงนำส่วน C ใส่ลงในครีม

6. ตีผสมอย่างต่อเนื่องจนได้เนื้อครีมข้น จากนั้นเก็บครีมในภาชนะมีฝาเกลียวปิดสนิทที่ปราศจากจุลินทรีย์

1.4 การเตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนาญ

เป็นการเติมจุลินทรีย์ลงในตัวอย่างเครื่องสำอางครีมบำรุงกลางคืน โดยจุลินทรีย์ที่เตรียมได้ 10^8 (จากการเตรียมในข้อ 1.2) ให้เจือจางจุลินทรีย์ด้วย saline TS 9 มิลลิลิตร สำหรับแบคทีเรีย และเจือจางด้วย saline TS ผสม 0.05%polysorbate 80 9 มิลลิลิตร สำหรับ *A. niger* เพื่อให้มีระดับการปนเปื้อนของจุลินทรีย์แตกต่างกันเป็น 3 ระดับ ตามปริมาณที่ระบุในตาราง 3 ลงในครีมบำรุงกลางคืน

ตาราง 3 แสดงระดับและปริมาณจุลินทรีย์ที่ใส่ในครีมบำรุงกลางคืน 3 ระดับ

ชนิดจุลินทรีย์	ระดับความเจือจาง / ปริมาตรที่ใส่(μL)		
	สูง	กลาง	ต่ำ
P. aeruginosa	10^{-2}/150	10^{-3}/100	10^{-4}/50
E. coli	10^{-2}/300	10^{-3}/300	10^{-4}/300
S. choleraesuis	10^{-2}/300	10^{-3}/300	10^{-4}/300
A. niger	10^{-2}/300	10^{-3}/300	10^{-4}/300

ชั่งครีมบำรุงกลางคืนที่เตรียมได้ลงในถุงตีผสม (stomacher bag) ถุงละ 300 กรัม จำนวน 3 ถุง ใส่จุลินทรีย์ 3 ระดับ ดังแสดงในตาราง 3 ใช้เครื่องตีผสม (stomacher) ผสมครีม และจุลินทรีย์ให้เข้ากันนาน 2 นาที (ISO 16140, 2008, pp. 33-35) ได้เป็นตัวอย่างทดสอบความชำนาญ (Proficiency Testing Sample, PT Sample) จากนั้นแบ่งบรรจุตัวอย่างทดสอบความชำนาญแต่ละระดับความเข้มข้นลงในขวดพลาสติกปากกว้าง ขวดละ 10±0.1 กรัม ปิดฝาให้สนิทและติดฉลากระบุหมายเลขตัวอย่าง ได้ประมาณ 30 ขวด

1.5 การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (Homogeneity testing)

1.5.1 สุ่มตัวอย่างทดสอบความชำนาญที่เตรียมได้อย่างน้อยระดับละ 10 ตัวอย่าง โดยสุ่มแบบไม่เฉพาะเจาะจง (random) และนำไปทำการทดสอบแบบไม่เฉพาะเจาะจง คือไม่เรียงลำดับตามการบรรจุหรือตามลำดับที่ติดฉลาก (random order) (ISO/TS 22117, 2010, p. 5; ISO 13528, 2005, p. 60)

1.5.2 ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันโดยทดสอบ Total Aerobic Plate Count (TPC) และตรวจหาจุลินทรีย์ก่อโรค 1 ชนิด ได้แก่ *P. aeruginosa*

1) ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันสำหรับการตรวจนับปริมาณ (Homogeneity testing for quantitative/enumeration samples) เป็นการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้หลักการประมาณค่า between-portion variance จากการทดสอบซ้ำ (repeatability) (ISO/TS 22117, 2010, p. 6) โดยตรวจนับปริมาณ Total Aerobic Plate Count (TPC) การตรวจนับจำนวนแบคทีเรีย ยีสต์และรา โดยใช้ neutralizing diluent เป็นสารละลายเจือจางเพื่อสลายฤทธิ์ของสารกันเสียในเครื่องสำอาง ดังแสดงในภาคผนวก ค (ISO 21149, 2006; ISO 16212, 2008) การตรวจนับจำนวนแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ทำโดยชั่งตัวอย่างเครื่องสำอาง 10

กรัม ใส่ลงใน TSP 90 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันได้สารละลายตัวอย่างที่ความเจือจาง 1:10 แล้วทำการเจือจางต่อโดยใช้ TSP 9 มิลลิลิตร ให้ได้ความเจือจาง 1:100 และ 1:1,000 ตามลำดับ

การตรวจนับปริมาณแบคทีเรีย ให้ดูดสารละลายตัวอย่างที่ความเจือจาง 1:10, 1:100 และ 1:1,000 ใส่ในจานเพาะเชื้อ จานละ 1 มิลลิลิตร ระดับความเจือจางละ 2 จาน แล้วเทอาหารวุ้น TSA ลงในจานเพาะเชื้อเขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ให้อาหารแข็ง กลับจานเพาะเชื้อ นำไปบ่มเพาะจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 32.5±2.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ถึง 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาบ่มเพาะแล้ว ตรวจนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่อยู่ในช่วง 30-300 โคโลนีต่อจาน

การตรวจนับปริมาณยีสต์และรา ให้ดูดสารละลายตัวอย่างที่ความเจือจาง 1:10, 1:100 และ 1:1,000 ใส่ในจานเพาะเชื้อ จานละ 1 มิลลิลิตร ระดับความเจือจางละ 2 จาน แล้วเทอาหารวุ้น PDA ลงในจานเพาะเชื้อเขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ให้อาหารแข็ง กลับจานเพาะเชื้อ นำไปบ่มเพาะจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 22.5±2.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ถึง 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาบ่มเพาะแล้ว ตรวจนับจำนวนโคโลนียีสต์และรา ที่อยู่ในช่วง 15-150 โคโลนีต่อจาน นำมาคำนวณเป็นจำนวนแบคทีเรีย ยีสต์และรา หน่วยเป็นโคโลนีต่อกรัม นำจำนวนโคโลนีที่ได้ประเมินผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันด้วย Sufficient Homogeneity test โดยค่าจากการคำนวณ s^2_{sam} น้อยกว่าหรือเท่ากับ $F_1\ (0.3\sigma_p)^2 + F_2\ s^2_{an}$ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ISO/TS 22117, 2010, pp. 22-23)

2) ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันสำหรับการตรวจหาจุลินทรีย์เชิงคุณภาพ (Homogeneity testing for qualitative (presence/absence) methods) โดยตรวจหาจุลินทรีย์ก่อโรค *P. aeruginosa* ใน enrichment broth โดยดูดสารละลายตัวอย่าง 1: 10 จำนวน 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Modified letheen broth, MLB ปริมาตร 90 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 32.5 ±2.5 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง แยกจุลินทรีย์โดยใช้ลูปขีดจุลินทรีย์ลงบนผิวหน้าอาหาร Cetrimide agar medium, Cet กลับจานเพาะเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 32.5 ±2.5 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง สังเกตุลักษณะโคโลนีที่คาดว่าจะเป็น *P. aeruginosa* โดยโคโลนีมีสีเหลือง-เขียว ของเม็ดสี (pyocyanin) และให้ fluorescense ภายใต้แสงยูวี (ISO 22717, 2006, p. 8) ประเมินผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันโดยตรวจพบ *P. aeruginosa* ทั้ง 10 ตัวอย่างที่สุ่มมาทดสอบ

1.6 การทดสอบความคงตัว (stability testing) **เมื่อเก็บรักษาตัวอย่างทดสอบความชำนาญ** (PT sample) **ที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 2 ถึง 8 องศาเซลเซียส**

1.6.1 นำตัวอย่างทดสอบความชำนาญทั้ง 3 ระดับที่เหลือจากการสุ่มทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 2 ถึง 8 องศาเซลเซียส

1.6.2 สุ่มตัวอย่างทดสอบความชำนาญที่เก็บรักษาทั้ง 2 อุณหภูมิ ระดับการปนเปื้อนละ 3 ตัวอย่าง นำมาทดสอบ TPC และตรวจหา *P. aeruginosa* วิธีการเดียวกับข้อ 1.5.2 โดยสุ่มทดสอบต่อเนื่องทุกวันจนครบ 5 วันและสุ่มทดสอบเมื่อครบ 8, 12 และ 16 วัน

1.6.3 ประเมินผลการทดสอบความคงตัวโดยใช้ 0.5 $\log_{10}$rules หรือ Poisson distribution หรือสถิติอื่นที่เหมาะสม การประเมินผลการทดสอบความคงตัวจากการตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดอยู่ในช่วง median-0.5 $\log_{10}$(cfu/g) ถึง median+0.5 $\log_{10}$(cfu/g) โดยค่า median ได้มาจากการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน ดังแสดงตัวอย่างการคำนวณในภาคผนวก ข (ISO/TS 22117, 2010, p. 13; Toombs and Connor, 1980, p.886)

จากการทดลองข้อ 1. ทำให้ทราบวิธีการเตรียมเครื่องสำอางชนิดครีม และทำให้ทราบระดับความเข้มข้นของจุลินทรีย์ที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้จัดเตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนาญต่อไป รวมทั้งได้แนวทางในการประเมินค่าความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัวของตัวอย่างทดสอบความชำนาญ ด้วยวิธีการทางสถิติ

2. **ศึกษาความคงตัวของจุลินทรีย์แต่ละชนิด จำนวน 6 ชนิดคือ** *Aspergillus niger* ATCC 16404, *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* (DMST 35549) **สายพันธุ์ที่แยกจากตัวอย่างเครื่องสำอางชนิดโลชั่น**, *Pseudomonas putida* ATCC 17522 (DMST 14732) **และ** *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 **ในตัวอย่างทดสอบความชำนาญ ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง**

2.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ศึกษา

เป็นจุลินทรีย์มาตรฐานที่สั่งซื้อจาก ATCC หรือศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์แห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างเครื่องสำอาง

2.1.1 *Aspergillus niger* ATCC 16404

2.1.2 *Candida albicans* ATCC 10231

2.1.3 *Escherichia coli* ATCC 8739

2.1.4 *Pseudomonas aeruginosa* (DMST 35549) แยกจากตัวอย่างเครื่องสำอางชนิดโลชั่น

2.1.5 *Pseudomonas putida* ATCC 17522 (DMST 14732)

2.1.6 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

2.2 การเตรียมจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการทดสอบ

การเตรียมจุลินทรีย์ ให้เตรียมจุลินทรีย์ตามวิธีในข้อ 1.2 เจือจางจุลินทรีย์ปริมาณ 10^8 โคโลนี/มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10^6 โคโลนี/มิลลิลิตร เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

2.3 การเตรียมตัวอย่างครีมบำรุงกลางคืน

เตรียมตัวอย่างเครื่องสำอางขึ้นเองซึ่งเป็นครีมบำรุงกลางคืน (Night Cream) ที่ผสมสารกันเสีย methylparaben ร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนักและpropylparaben ร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักเป็นชุดตัวอย่าง และไม่ผสมสารกันเสียเป็นชุดควบคุม ดังแสดงส่วนประกอบในตาราง 4 และวิธีการเตรียมดังนี้

ตาราง 4 แสดงส่วนประกอบที่ใช้ในการเตรียมครีมบำรุงกลางคืนที่ผสมหรือไม่ผสมสารกันเสีย

ส่วนประกอบ		ไม่ผสมสารกันเสีย (ชุดควบคุม) % โดยน้ำหนัก	ผสมสารกันเสีย (ชุดตัวอย่าง) % โดยน้ำหนัก
ชื่อทางการค้า	**ชื่อทางเคมี**		
ส่วน A			
Cremophor A-6	Ceteareth-6 and stearyl alcohol	2.0	2.0
Cremophor A-25	Ceteareth-25	2.0	2.0
Finsolv TN	C12- C15 alcohol benzoate	15.0	15.0
WAX-C	Cetyl alcohol	2.0	2.0
GMS	Glyceryl monostearate	6.0	6.0
Propyl paraben			0.1
ส่วน B			
Propylene glycol	Propylene glycol	3.0	3.0
Methyl paraben			0.2
Water		66.6	66.3

ตาราง 4 (ต่อ)

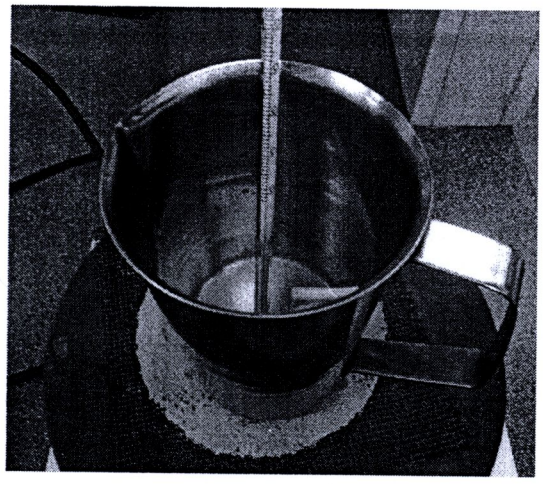
ส่วนประกอบ		ไม่ผสมสารกันเสีย (ชุดควบคุม) % โดยน้ำหนัก	ผสมสารกันเสีย (ชุดตัวอย่าง) % โดยน้ำหนัก
ชื่อทางการค้า	ชื่อทางเคมี		
ส่วน C			
Dipotasium	Dipotassium Glycyrrhizinate	0.1	0.1
Vitamin-E		1.0	1.0
น้ำหอม		0.3	0.3

วิธีทำ

1. นำส่วน A ทั้งหมดผสมรวมกันในบีกเกอร์สแตนเลส อุ่นให้ร้อนบนเตาไฟฟ้าโดยจุ่มเทอร์โมมิเตอร์ วัดอุณหภูมิให้ได้ 80 องศาเซลเซียส ดังแสดงในภาพ 6

ภาพ 6 แสดงส่วนผสม A บนเตาไฟฟ้า

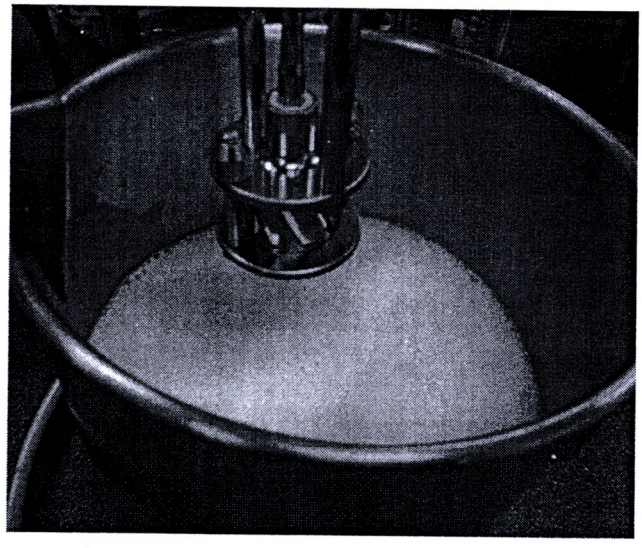
2. นำส่วน B ทั้งหมดผสมรวมกันในบีกเกอร์สแตนเลส อุ่นให้ร้อนบนเตาไฟฟ้าโดยจุ่มเทอร์โมมิเตอร์ วัดอุณหภูมิให้ได้ 80 องศาเซลเซียส ดังแสดงในภาพ 7



ภาพ 7 แสดงส่วนผสม B บนเตาไฟฟ้า

3. เมื่อทั้งส่วน A และส่วน B ได้อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ให้เทส่วน B ลงในส่วน A

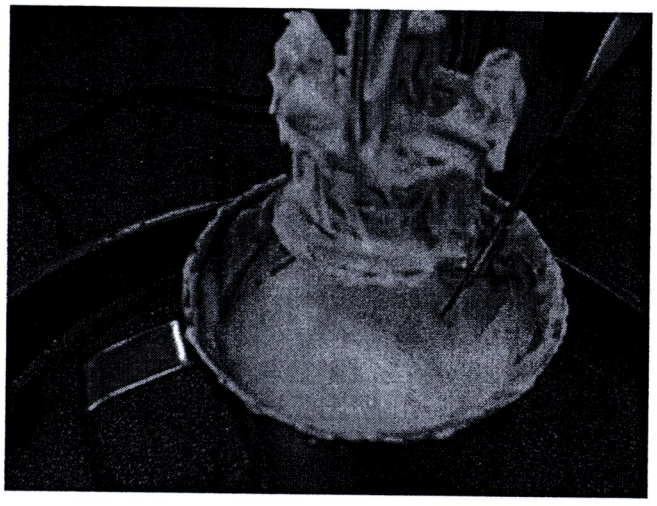
4. ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็วด้วย homogenizer ทันที ด้วยความเร็วปานกลาง ดังแสดงในภาพ 8



ภาพ 8 แสดงหัวผสมของเครื่องผสมแบบ homoginizing mixer

5. เมื่ออุณหภูมิลดลงถึง 50 องศาเซลเซียส จึงนำส่วน C ใส่ลงในครีม

6. ตีผสมอย่างต่อเนื่องประมาณ 3 ชั่วโมง จะได้เนื้อครีมข้น ดังแสดงในภาพ 9 จากนั้นเก็บครีมในภาชนะมีฝาเกลียวปิดสนิทที่ปราศจากจุลินทรีย์



ภาพ 9 แสดงเนื้อครีมข้นหลังจากตีผสมนาน 3 ชั่วโมง

2.4 **การทดสอบ** Neutralization of the antimicrobial properties of the product **ต่อจุลินทรีย์แต่ละชนิด**

ในการตรวจหาจุลินทรีย์ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางทั้งในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ และต้องมีการทดสอบ Neutralization of the antimicrobial properties of the product คู่ขนานไปกับการทดสอบทุกตัวอย่าง โดยเตรียมจุลินทรีย์ในตู้ปลอดเชื้อ เพาะเลี้ยง *S. aureus* ATCC 6538, *P. aeruginosa* ATCC 9027 และ *C. albicans* ATCC 10231 เพื่อใช้ทดสอบ Neutralization of the antimicrobial properties ทั้งในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ ซึ่งทำก่อนการทดสอบตัวอย่างหรือทำคู่ขนานกับการทดสอบตัวอย่าง เพื่อให้ทราบชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการสลายฤทธิ์ของสารกันเสีย โดยมีวิธีการทดสอบเช่นเดียวกับการทดสอบและเติมจุลินทรีย์ปริมาณน้อยลงในขวดสารละลายตั้งต้น (initial suspension) ซึ่งเลือกใช้ neutralizing diluent ที่มีสมบัติในการสลายฤทธิ์ของสารกันเสียมาใช้เป็นสารละลายตั้งต้น หรือเติมลงในขวด enrichment broth แล้วตรวจนับปริมาณหรือตรวจหาจุลินทรีย์ก่อโรค เพื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใส่ลงไปในตัวอย่างหรือสามารถตรวจพบจุลินทรีย์ที่ก่อโรคได้ในตัวอย่าง ซึ่งปริมาณที่ตรวจนับได้ต้องแตกต่างกันไม่เกินร้อยละ 50 หรือ 0.3 log ซึ่งมีวิธีทดสอบดังนี้

2.4.1 กรณีตรวจนับปริมาณ นำครีมบำรุงกลางคืนที่เตรียมได้จากข้อ 2.3 จำนวน 1 กรัม ใส่ลงใน neutralizing diluent ซึ่งในที่นี้ใช้ TSB-Soy Lecithin-Polysorbate 20, 80 (TSP) 9 มิลลิลิตร ได้เป็นสารละลายตั้งต้น (1:10) จำนวน 3 หลอด เพื่อแยกเติมจุลินทรีย์แต่ละหลอด โดยเติมจุลินทรีย์ 1 มิลลิลิตร ของ *S. aureus*, *P. aeruginosa* และ *C.albicans* ที่มีปริมาณ 10,000 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ถึง 30,000 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ลงในสารละลายตั้งต้นดังกล่าว จากนั้น pour plate ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA หรือ PDA ตามชนิดของจุลินทรีย์ และทำชุดควบคุมเพื่อเปรียบเทียบซึ่งใช้สารละลายและจุลินทรีย์ชนิดเดียวกันโดยไม่ใส่ตัวอย่าง บ่มที่อุณหภูมิและเวลาเดียวกัน และตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ที่เติมลงในสารละลายว่ามีปริมาณอยู่ในช่วงดังกล่าวจริง อ่านผลโดยนำปริมาณจุลินทรีย์ที่เติมลงในตัวอย่างเปรียบเทียบกันระหว่างชุดควบคุมและชุดตัวอย่าง ต้องแตกต่างกันไม่เกินร้อยละ 50 หรือ 0.3 log แสดงว่า neutralizing diluent ที่ใช้สามารถสลายฤทธิ์ของสารกันเสียได้

2.4.2 กรณีตรวจหาจุลินทรีย์ก่อโรค ให้นำสารละลายตั้งต้น (1:10) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงใน enrichment broth ซึ่งในที่นี้ใช้ MLB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นแบ่งenrichment brothเป็น 3 หลอดหลอดละ 10 มิลลิลิตร จำนวน 3 หลอด เพื่อแยกเติมจุลินทรีย์แต่ละหลอด โดยเติมจุลินทรีย์ 0.1 มิลลิลิตร ของ *S. aureus*, *P. aeruginosa* และ *C.albicans* ที่มีปริมาณ 100 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ถึง 300 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ลงในenrichment broth ดังกล่าว นำไปบ่มที่อุณหภูมิและเวลา พร้อมกับการทดสอบตัวอย่าง เมื่อครบเวลาบ่มเพาะนำมาstreakลงบน selective mediaตามชนิดของจุลินทรีย์ และตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ที่เติมลงในenrichment broth ว่ามีปริมาณอยู่ในช่วงดังกล่าวจริง อ่านผลโดยจะต้องตรวจพบการเจริญของจุลินทรีย์ที่เติมลงในenrichment broth แสดงว่า neutralizing diluent ที่ใช้สามารถสลายฤทธิ์ของสารกันเสียได้ (ISO 21149, 2006, pp. 13-14; ISO 16212, 2008, pp. 10-11; ISO 18416, 2007, pp.8-9; ISO 22717, 2006, pp. 8-9; ISO 22718, 2006, pp. 9-10; Microbiological Examination of Nonsterile Products: Tests for Specified Microorganisms, 2011 pp.56-58)

ถ้าจุลินทรีย์เจริญได้ดีหมายถึง neutralizing diluent ที่ใช้สามารถสลายฤทธิ์ของสารกันเสียได้ หากไม่พบการเจริญจะต้องปรับเปลี่ยนปริมาณ neutralizing diluent ให้เพิ่มมากขึ้น หรือเพิ่ม neutralizing agent ตามภาคผนวก ค หรือใช้ neutralizing diluent ต่างชนิดร่วมกัน หรือทดสอบโดยวิธีการกรอง โดยตัวอย่างครีมบำรุงกลางคืนในการศึกษาวิจัยนี้ผ่านการทดสอบกับ neutralizing diluent แล้ว ซึ่งในที่นี้คือ TSB-Soy Lecithin-Polysorbate 20, 80 (TSP) สามารถใช้เป็น neutralizing diluent ต่อไป

2.5 ศึกษาการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิดในตัวอย่างครีมบำรุงกลางคืนที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง

ศึกษาการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิดในตัวอย่างครีมบำรุงกลางคืนที่เตรียมตามวิธีการในข้อ 2.3 แบ่งการทดสอบเป็น 2 ชุด คือ ชุดควบคุมเป็นการศึกษาการเจริญของจุลินทรีย์ในครีมบำรุงกลางคืนที่ไม่ผสมสารกันเสีย และชุดตัวอย่างเป็นการศึกษาการเจริญของจุลินทรีย์ในครีมบำรุงกลางคืนที่ผสมสารกันเสีย โดยบรรจุครีมชุดควบคุมและชุดตัวอย่าง ลงในขวดพลาสติก ขวดละ 30 กรัม ชุดละ 12 ขวด

ใส่จุลินทรีย์แต่ละชนิดในข้อ 2.1 ที่ความเข้มข้น 10^6 โคโลนี/มิลลิลิตร จำนวน 150 ไมโครลิตร ลงในขวดพลาสติกของชุดควบคุม 12 ขวด และชุดตัวอย่าง 12 ขวด (ปริมาตรของจุลินทรีย์ที่ใส่ต้องอยู่ระหว่างร้อยละ 0.5 ถึงร้อยละ 1 ของน้ำหนักครีม) โดยความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10^3 โคโลนีต่อกรัม ผสมให้เข้ากันดีด้วยพายสแตนเลส (paddle stainless) กวนนาน 2 นาที เริ่มจับเวลาที่ 0 ชั่วโมงโดยใส่จุลินทรีย์ให้แต่ละขวดห่างกัน 5 นาที นำขวดไปเก็บไว้ที่ 2 อุณหภูมิ คือ อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง ตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ วัด pH และลักษณะทางกายภาพที่ปรากฏทุกๆ 24 ชั่วโมง ติดต่อกันนาน 7 วัน

ตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์แต่ละชนิดของทั้งชุดตัวอย่าง และชุดควบคุม ใช้วิธี pour plate โดยชั่งครีมจำนวน 1 กรัมลงใน TSP 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วย Vortex mixer จากนั้นเจือจางสารละลายตัวอย่างต่อโดยทำ ten-fold dilution

ตรวจนับปริมาณแบคทีเรียบนอาหาร TSA ด้วยเทคนิค pour plate ทุกๆระดับความเจือจาง ระดับความเจือจางละ 2 จาน บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 32.5±2.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72±6 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาบ่มเพาะแล้ว ตรวจนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่อยู่ในช่วง 30-300 โคโลนีต่อจาน

ตรวจนับปริมาณยีสต์และรา ทุกๆระดับความเจือจาง ระดับความเจือจางละ 2 จาน โดยใช้อาหาร PDA บ่มเพาะจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 22.5±2.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ถึง 5 วัน เมื่อครบเวลาบ่มเพาะแล้ว ตรวจนับจำนวนโคโลนีของยีสต์และราที่อยู่ในช่วง 15-150 โคโลนีต่อจาน คำนวณเป็นปริมาณจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง หน่วยเป็นโคโลนีต่อกรัมหรือมิลลิลิตรของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

จากการทดลองข้อ 2. ทำให้ทราบลักษณะการเจริญและระยะเวลาที่จุลินทรีย์แต่ละชนิดอยู่รอดในตัวอย่างครีมบำรุงกลางคืน และทราบถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาตัวอย่างทดสอบความชำนาญเพื่อให้จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีชีวิตอยู่รอดได้ยาวนานในตัวอย่างครีมบำรุงกลางคืน

3. **ศึกษาความคงตัวของปริมาณจุลินทรีย์ที่เหมาะสมเมื่อผสมรวมกันของจุลินทรีย์ 8 ชนิด คือ** *Aspergillus niger* ATCC 16404, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida tropicalis* **สายพันธุ์ที่แยกจากตัวอย่างเครื่องสำอาง**, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* (DMST 35549) **สายพันธุ์ที่แยกจากตัวอย่างเครื่องสำอางชนิดโลชั่น**, *Pseudomonas putida* ATCC 17522 (DMST 14732), *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, **และ** *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990 (DMST 5868) **ในตัวอย่างทดสอบความชำนาญ ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส**

เตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนาญโดยปรับเปลี่ยนระดับการปนเปื้อนของจุลินทรีย์และผสมชนิดจุลินทรีย์แตกต่างกัน จำนวน 6 ตัวอย่าง และตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ก่อโรคควบคู่ไปกับการตรวจหาชนิดของจุลินทรีย์ ด้วย enrichment broth และวัดค่า pH ของตัวอย่างทดสอบความชำนาญทุกวัน และศึกษาความคงตัวของจุลินทรีย์ก่อโรค 3 ชนิด คือ *S. aureus*, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* ด้วย เพื่อให้สอดคล้องกับประกาศกระทรวงสาธารณสุขในราชกิจจานุเบกษา เล่ม 127 ตอนพิเศษ 51 ง ลงวันที่ 23 เมษายน 2553 โดยเก็บรักษาตัวอย่างทดสอบความชำนาญที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส และเพื่อคัดเลือกระดับ ชนิด และปริมาณจุลินทรีย์ที่เหมาะสมเพื่อนำมาใช้จัดเตรียมเป็นตัวอย่างทดสอบความชำนาญและทดสอบสมบัติของตัวอย่างคือความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัวต่อไป

3.1 **จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา**

เป็นจุลินทรีย์มาตรฐานที่สั่งซื้อจาก ATCC หรือศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์แห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างเครื่องสำอาง รวมทั้งใช้จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆเพื่อใช้เป็นจุลินทรีย์แข่งขันในรายการตรวจหาจุลินทรีย์ก่อโรค ดังนี้

3.1.1 *Aspergillus niger* ATCC 16404

3.1.2 *Candida albicans* ATCC 10231

3.1.3 *Candida tropicalis* สายพันธุ์ที่แยกจากตัวอย่างเครื่องสำอาง

3.1.4 *Escherichia coli* ATCC 8739

3.1.5 *Pseudomonas aeruginosa* (DMST 35549) สายพันธุ์ที่แยกจากตัวอย่างเครื่องสำอางชนิดโลชั่น

3.1.6 *Pseudomonas putida* ATCC 17522 (DMST 14732)

3.1.7 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

3.1.8 *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990 (DMST 5868)

3.2 การเตรียมจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการทดสอบ

เตรียมจุลินทรีย์ตามวิธีในข้อ 1.2

จากจุลินทรีย์ที่เตรียมได้ 10^8 ให้เจือจางจุลินทรีย์ด้วย saline TS 9 มิลลิลิตร สำหรับแบคทีเรียและยีสต์ และเจือจางด้วย saline TS ผสม 0.05%polysorbate 80 9 มิลลิลิตร สำหรับ *A. niger* เพื่อให้มีระดับความเข้มข้นของเชื้อแตกต่างกันเป็น 3 ระดับ ดังแสดงในตาราง 5

3.3 ตัวอย่างเครื่องสำอางที่ใช้ในการศึกษา

ครีมบำรุงกลางคืนผสมสารกันเสีย โดยเตรียมตามวิธีการในข้อ 2.3

3.4 การเตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนาญ

เตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนาญโดยผสมจุลินทรีย์ลงในครีมบำรุงกลางคืน จำนวน 100 กรัม ปรับเปลี่ยนระดับของแบคทีเรียและผสมชนิดจุลินทรีย์แตกต่างกัน รวมทั้งตรวจหาจุลินทรีย์ก่อโรค 3 ชนิด โดยทดลองเตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนาญ 6 ตัวอย่าง คือ

A เป็นตัวอย่างทดสอบความชำนาญในรายการทดสอบ bacteria count, yeast count, mould count และตรวจหาจุลินทรีย์ก่อโรค 2 ชนิด คือ *P. aeruginosa* และ *S. aureus* โดยปรับเปลี่ยนให้มีปริมาณการปนเปื้อน 3 ระดับ คือ AH (ตัวอย่าง A ระดับปนเปื้อนสูง (high)), AM (ตัวอย่าง A ระดับปนเปื้อนปานกลาง (medium)) และ AL(ตัวอย่าง A ระดับปนเปื้อนต่ำ (low)) ดังแสดงในตาราง 5

B เป็นตัวอย่างทดสอบความชำนาญในรายการทดสอบ bacteria count, yeast count, mould count และตรวจหาจุลินทรีย์ก่อโรค 2 ชนิด คือ *P. aeruginosa* และ *C. albicans* โดยปรับเปลี่ยนให้มีปริมาณการปนเปื้อน 3 ระดับ คือ BH (ตัวอย่าง B ระดับปนเปื้อนสูง (high)), BM (ตัวอย่าง B ระดับปนเปื้อนปานกลาง (medium)) และ BL(ตัวอย่าง B ระดับปนเปื้อนต่ำ (low)) ดังแสดงในตาราง 5

ชั่งครีมบำรุงกลางคืนลงในถุงตีผสม ถุงละ 100 กรัม จำนวน 6 ถุง ใส่จุลินทรีย์ 6 ระดับดังแสดงในตาราง 5 เข้าเครื่องตีผสมให้ครีมและจุลินทรีย์ผสมเข้ากันนาน 2 นาที ได้เป็นตัวอย่างทดสอบความชำนาญ (Proficiency Testing Sample, PT Sample) จากนั้นแบ่งบรรจุตัวอย่างทดสอบความชำนาญแต่ละระดับการปนเปื้อนลงในขวดพลาสติกปากกว้าง ขวดละ 10±0.1 กรัม ปิดฝาให้สนิทและติดฉลากระบุหมายเลขตัวอย่าง ได้ประมาณ 10 ขวด เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

ตาราง 5 แสดงระดับและปริมาณจุลินทรีย์ที่ใส่ผสมรวมในครีมบำรุงกลางคืน

ชนิดจุลินทรีย์	ระดับความเจือจาง / ปริมาตรจุลินทรีย์ที่ใส่ (ไมโครลิตร)					
	AH	AM	AL	BH	BM	BL
A. niger	10^{-1}/50	10^{-1}/50	10^{-1}/50	10^{-2}/50	10^{-2}/50	10^{-2}/50
C. albicans	-	-	-	10^{-2}/100	10^{-3}/100	10^{-4}/100
C. tropicalis	10^{-2}/100	10^{-2}/100	10^{-2}/100	10^{-1}/100	10^{-2}/100	10^{-3}/100
E. coli	-	-	-	10^{-2}/100	10^{-2}/100	10^{-2}/100
P. aeruginosa	10^{-2}/100	10^{-3}/100	10^{-4}/100	10^{-2}/100	10^{-3}/100	10^{-4}/100
P. putida	10^{-1}/100	10^{-2}/100	10^{-3}/100	-	-	-
S. aureus	10^{-2}/100	10^{-3}/100	10^{-4}/100	-	-	-
S. epidermidis	10^{-1}/100	10^{-2}/100	10^{-3}/100	10^{-1}/100	10^{-2}/100	10^{-3}/100

จากตารางแสดงให้เห็นว่าการ spike จุลินทรีย์ก่อโรค 3 ชนิดคือ *P. aeruginosa*, *S. aureus* และ *C. albicans* จะspike จุลินทรีย์ในปริมาณน้อย และใส่จุลินทรีย์แข่งขันซึ่งเป็นจุลินทรีย์ใน Genus เดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์ในปริมาณมาก เพื่อใช้ทดสอบความชำนาญกับห้องปฏิบัติการสมาชิกต่อไป (ISO/TS 22117, 2010, p.5)

3.5 ทดสอบความคงตัวโดยนับปริมาณ แบคทีเรีย ยีสต์ และรา รวมทั้งตรวจหา *P. aeruginosa, S. aureus* และ *C. albicans*

3.5.1 ตรวจนับปริมาณแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ในตัวอย่าง

ตรวจนับปริมาณโดยทดสอบวิธีการเดียวกับข้อ 1.5.2, 1) และวัด pH จากขวดสารละลาย 1:10

3.5.2 ตรวจหาจุลินทรีย์ก่อโรค 3 ชนิด ได้แก่ *S. aureus*, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* โดยตรวจหาใน enrichment broth และตรวจนับปริมาณควบคู่กัน โดยทำการทดสอบต่อเนื่องกันอย่างน้อย 7 วัน

1) ตรวจหาจุลินทรีย์ก่อโรคใน enrichment broth โดยดูดสารละลายตัวอย่าง 1: 10 จำนวน 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MLB ปริมาตร 90 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 32.5 ±2.5 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง แยกจุลินทรีย์โดยใช้ลูป streakสารละลายตัวอย่าง MLB ลงบน selective media คือ Pseudomonas agar P (PP), Mannitol Salt Agar

with egg yolk (MSA+Egg yolk) และ CHROMagar™ Candida กลับจานเพาะเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 32.5 ±2.5 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง อ่านผลโดยสังเกตุลักษณะโคโลนีดังนี้

1.1) *P. aeruginosa* บนอาหาร PP มีลักษณะโคโลนีสีน้ำเงินและสีเขียวรอบๆโคโลนี (ISO 22717, 2006, pp. 6-8)

1.2) *S. aureus* บนอาหาร MSA+Egg yolk มีลักษณะโคโลนีสีเหลือง และโซนขุ่นเหลืองรอบๆโคโลนี (ISO 22718, 2006, pp. 7-8,12)

1.3) *C. albicans* บนอาหาร CHROMagar™ Candida มีลักษณะโคโลนีสีเขียว

2) ตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี spread plate โดยนำสารละลายตัวอย่างที่ความเจือจาง 1:10 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ลงบน selective media ตามชนิดของจุลินทรีย์ในข้อ 3.5.2, 1) แล้วกลิ้งสารละลายตัวอย่างให้ทั่วผิวหน้าอาหาร วางผึ่งให้แห้งใน Laminar flow เป็นเวลาประมาณ 10 นาที บ่มเพาะจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 32.5±2.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ถึง 48 ชั่วโมง โดยตรวจนับเฉพาะโคโลนีที่ให้ลักษณะเฉพาะบน selective media ตามข้อ 3.5.2, 1) (Kabara, 1984, p. 576)

หลังจากสุ่มชั่งตัวอย่างเพื่อทดสอบให้เก็บขวดทดสอบที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียสทันที เพื่อตรวจวัด pH, ตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์และตรวจหาจุลินทรีย์ก่อโรค ทุกๆ 24 ชั่วโมง ติดต่อกันนาน 5 วัน

จากการทดลองข้อ 3. ทำให้ทราบระดับจุลินทรีย์ที่เหมาะสมแบบผสมรวมกันในตัวอย่างและระยะเวลาที่จุลินทรีย์มีความคงตัวในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส และคัดเลือกจำนวน 2 ตัวอย่างเพื่อจัดเตรียมเป็นตัวอย่างทดสอบความชำนาญต่อไป

4. ศึกษาความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัวของตัวอย่างทดสอบความชำนาญที่มีปริมาณจุลินทรีย์ที่เหมาะสมเมื่อผสมรวมกันจากการทดลองที่ 3 อย่างน้อย 2 ตัวอย่าง ในรายการทดสอบ Total Aerobic Microbial Count, Total Combined Yeasts and Moulds Count **และ ตรวจหาจุลินทรีย์ก่อโรค 3 ชนิด ได้แก่** *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* **และ** *Candida albicans* **ในการเก็บรักษา ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส รวมทั้งศึกษาความคงตัวของตัวอย่างทดสอบความชำนาญที่สภาวะการขนส่ง**

4.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา

ชนิดของจุลินทรีย์ตามข้อ 3.1

4.2 การเตรียมจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการทดสอบ

การเตรียมจุลินทรีย์ ให้เตรียมจุลินทรีย์ตามวิธีในข้อ 1.2

จากจุลินทรีย์ที่เตรียมได้ 10^8 ให้เจือจางจุลินทรีย์ด้วย saline TS 9 มิลลิลิตร สำหรับแบคทีเรียและยีสต์ และเจือจางด้วย saline TS ผสม 0.05%polysorbate 80 9 มิลลิลิตร สำหรับ *A. niger* เพื่อให้มีระดับความเข้มข้นของเชื้อตามที่คัดเลือกได้จากข้อ 3

4.3 ตัวอย่างเครื่องสำอางที่ใช้ในการศึกษา

ครีมบำรุงกลางคืนผสมสารกันเสีย โดยเตรียมตามวิธีการในข้อ 2.3

4.4 การเตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนาญ

จัดเตรียมตัวอย่างให้มีปริมาณมากเพียงพอกับการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและการทดสอบความคงตัวในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียสและการทดสอบความคงตัวในสภาวะการขนส่ง เตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนาญประเภทครีม 2 ตัวอย่าง โดยผสมจุลินทรีย์ลงในครีมบำรุงกลางคืน ตัวอย่างละ 1,200 กรัม ดังแสดงในตาราง 6

ตาราง 6 แสดงปริมาณจุลินทรีย์ที่ใส่ผสมรวมในครีมบำรุงกลางคืน เพื่อจัดเตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนาญ ประเภทครีม 2 ตัวอย่าง

ชนิดจุลินทรีย์	ครีม A		ครีม B	
	ระดับความเจือจางที่ใช้	ปริมาตรจุลินทรีย์ที่ใส่ (ไมโครลิตร)	ระดับความเจือจางที่ใช้	ปริมาตรจุลินทรีย์ที่ใส่ (ไมโครลิตร)
A. niger	10^{-2}	600	10^{-2}	600
C. albicans	—	—	10^{-2}	1,200
C. tropicalis	10^{-4}	1,200	10^{-4}	1,200
E. coli	10^{-2}	1,200	10^{-2}	1,200
P. aeruginosa	10^{-3}	1,200	—	—
P. putida	10^{-2}	1,200	10^{-2}	1,200
S. aureus	10^{-3}	1,200	10^{-3}	1,200
S. epidermidis	10^{-2}	1,200	10^{-2}	1,200

4.5 ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน

4.5.1 สุ่มตัวอย่างทดสอบความชำนาญ ครีม A และครีม B ตัวอย่างละ 10 ขวด โดยสุ่มแบบไม่เฉพาะเจาะจง (random) และนำไปทำการทดสอบแบบไม่เฉพาะเจาะจงคือไม่เรียงลำดับตามการบรรจุหรือตามลำดับที่ติดฉลาก (random order) (ISO/TS 22117, 2010, p. 5; ISO 13528, 2005, p. 60)

4.5.2 ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันในรายการทดสอบ Total Aerobic Microbial Count, Total Combined Yeasts and Moulds Count และ ตรวจหาจุลินทรีย์ก่อโรค 3 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Candida albicans* โดย

1) ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันสำหรับการตรวจนับปริมาณให้ทดสอบและประเมินผลด้วยวิธีการทางสถิติ โดยใช้ Sufficient homogeneity test (ISO/TS 22117, 2010, pp. 22-23) สำหรับการตรวจนับปริมาณยีสต์และราให้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เติม chlortetracycline 40 ppm

2) ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันสำหรับการตรวจหาจุลินทรีย์เชิงคุณภาพ โดยการตรวจนับเฉพาะ target microorganisms ตามวิธีการในข้อ 3.5.2, 2) (ISO/TS 22117, 2010, pp. 7,21-23) และประเมินผลโดยเปรียบเทียบผลการตรวจพบจุลินทรีย์สอดคล้องตามที่เติมหรือไม่เติมลงในตัวอย่างทดสอบความชำนาญ

4.6 ทดสอบความคงตัวในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

4.6.1 ทดสอบความคงตัวในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส ดำเนินการทุกวันต่อเนื่องกันรวม 18 วัน โดยสุ่มตัวอย่างทดสอบความชำนาญ ครีม A และครีม B ตัวอย่างละ 3 ขวด โดยสุ่มแบบไม่เฉพาะเจาะจง (random) และนำไปทำการทดสอบแบบไม่เฉพาะเจาะจงคือไม่เรียงลำดับตามการบรรจุหรือตามลำดับที่ติดฉลาก (random order) (ISO/TS 22117, 2010, p. 7; ISO 13528, 2005, pp. 60,62)

4.6.2 ทดสอบความคงตัวในรายการทดสอบ Total Aerobic Microbial Count, Total Combined Yeasts and Moulds Count และ ตรวจหาจุลินทรีย์ก่อโรค 3 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Candida albicans* โดย

1) ทดสอบความคงตัวสำหรับการตรวจนับปริมาณให้ทดสอบและประเมินผลโดยเปรียบเทียบกับค่า $\pm 0.5 \log_{10}$median ของผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (ISO/TS 22117, 2010, p. 13)

2) ทดสอบความคงตัวสำหรับการตรวจหาจุลินทรีย์เชิงคุณภาพ โดยการตรวจนับเฉพาะ target microorganisms ตามวิธีการในข้อ 3.5.2, 2) (ISO/TS 22117, 2010,

pp. 7,21-23) และประเมินผลโดยเปรียบเทียบผลการตรวจพบจุลินทรีย์สอดคล้องตามที่เติมหรือไม่เติมลงในตัวอย่างทดสอบความชำนาญ

4.7 ทดสอบความคงตัวที่สภาวะการขนส่ง

ทดสอบความคงตัวในสภาวะการขนส่งที่มีผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ เพื่อแสดงให้เห็น "worst case" ในการขนส่งและระยะเวลาในการขนส่งที่ตัวอย่างทดสอบความชำนาญยังคงมีความคงตัวยอมรับได้ โดยสุ่มตัวอย่างทดสอบความชำนาญครีม A และครีม B ที่เหลือจากการสุ่มทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน ตัวอย่างละ 1 ขวด บรรจุกล่องโฟมและใส่ data logger เพื่อบันทึกและเก็บข้อมูลการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิขณะขนส่ง และใส่ ice pack เพื่อรักษาอุณหภูมิที่ 2-8 องศาเซลเซียส เวลา 15.30 น.ของวันที่ 8 พ.ค. 54 ดังแสดงในภาพ 10 และภาพ 11 จากนั้นกล่องโฟมนำส่งไปยังท่าอากาศยานกรุงเทพถึงจังหวัดอุดรธานี เมื่อเวลา 20.05 น. กล่องโฟมวางอยู่ในคลังสินค้าเพื่อส่งกลับมาถึงท่าอากาศยานกรุงเทพ เวลา 08.25 น. ของวันที่ 9 พ.ค. 54 ผู้วิจัยนำกล่องโฟมกลับมายังห้องปฏิบัติการเวลา 12.30 น. และทดสอบความคงตัวตามรายการทดสอบทันที รวมใช้เวลาขนส่ง 21 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างครีมทั้ง 2 ตัวอย่างเก็บรักษาในตู้เย็นที่ควบคุมอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียสเพื่อทดสอบความคงตัวทุกวันต่อเนื่องจนตัวอย่างหมด

ภาพ 10 การบรรจุตัวอย่างทดสอบความชำนาญพร้อม data logger

ภาพ 11 การรักษาอุณหภูมิตัวอย่างทดสอบความชำนาญขณะขนส่ง

จากการทดลองที่ 4 ได้ตัวอย่างทดสอบความชำนาญ 2 ตัวอย่าง ในรายการทดสอบ Total Aerobic Microbial Count, Total Combined Yeasts and Moulds Count และ ตรวจหาจุลินทรีย์ก่อโรค 3 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Candida albicans* ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน, ทดสอบความคงตัวในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส รวมทั้งศึกษาความคงตัวของตัวอย่างทดสอบความชำนาญที่สภาวะการขนส่ง