บทที่ 4

ผลการทดลองและการอภิปรายผล

ผลการดำเนินการวิจัยและอภิปรายผล

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

1.1 ผลการเตรียมตัวอย่างครีมบำรุงกลางคืนที่ผสมสารกันเสีย คือ methylparaben ร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนักและpropylparaben ร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก โดยการอุ่นส่วนผสมให้ร้อนในอ่างน้ำร้อน จากนั้นตีผสมโดยใช้หัวผสมแบบตะกร้อ พบว่าครีมใช้เวลานานในการขึ้นตัวแน่นเป็นเนื้อครีมและมีฟองอากาศขนาดใหญ่ ครีมขึ้นฟู ต้องนำครีมที่ได้ไปอุ่นให้ร้อนในอ่างน้ำร้อน เมื่อฟองยุบตัวจึงเข้าเครื่องตีผสมใหม่ ทำซ้ำเช่นนี้ 3 ครั้งจึงจะได้เนื้อครีมแน่น

ภาพ 12 เนื้อครีมจากการใช้หัวผสมแบบตะกร้อ

จากเทคนิควิธีการเตรียมตัวอย่างครีมบำรุงกลางคืน ซึ่งใช้การผสมด้วยหัวผสมแบบตะกร้อ เป็นสาเหตุให้เกิดฟองอากาศขนาดใหญ่เข้าไปแทรกกับเนื้อครีมทำให้เนื้อครีมหยาบ เบาฟู

และผิวหน้าครีมไม่เรียบ ดังแสดงในภาพ 12 รวมทั้งการนำครีมไปให้ความร้อนเพื่อกำจัดฟองอากาศออกจากเนื้อครีมทำให้โครงสร้างของครีมเปลี่ยนสภาพได้ จึงควรศึกษาเทคนิคการเตรียมเครื่องสำอางชนิดครีมเพิ่มเติม

1.2 ผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันในรายการทดสอบ Bacteria count และ Mould count ของแต่ละระดับการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ใส่ผสมรวมกัน คือ สูง, กลาง และต่ำ โดยผลการนับปริมาณจุลินทรีย์ตั้งต้นแต่ละชนิดและคำนวณเป็นความเข้มข้นสุดท้ายเมื่ออยู่ในตัวอย่างเป็น cfu/g ดังแสดงในตาราง 7

ตาราง 7 ปริมาณจุลินทรีย์ตั้งต้นในตัวอย่างครีมบำรุงกลางคืน 3 ระดับการปนเปื้อน

ชนิดจุลินทรีย์	ปริมาณตั้งต้น (cfu/mL)	ความเข้มข้นสุดท้าย (cfu/g)		
		สูง	กลาง	ต่ำ
P. aeruginosa	2.7×10^8	1,350	900	4.5
E. coli	4.0×10^8	4,000	400	40
S. choleraesuis	1.8×10^7	180	18	1.8
A. niger	8.9×10^6	89	8.9	0.89

ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันโดยสุ่มตัวอย่างทดสอบความชำนาญระดับการปนเปื้อนละ 10 ขวด ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันโดยวิธี pour plate ประเมินผลการทดสอบด้วยวิธีการทางสถิติ โดยใช้ Sufficient homogeneity test พบว่า $s^2_{sam} \leq F_1 (0.3\sigma_p)^2 + F_2 s^2_{an}$ แสดงว่าตัวอย่างทดสอบความชำนาญมีความเป็นเนื้อเดียวกัน แสดงในตาราง 8

ตาราง 8 ผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของปริมาณเชื้อทั้ง 3 ระดับการปนเปื้อน

การนับปริมาณ	ระดับการปนเปื้อน	s^2_{sam}	$F_1 (0.3\sigma_p)^2 + F_2 s^2_{an}$	สรุปผล *
แบคทีเรีย	สูง	0.00831	0.01566	ผ่าน
	กลาง	0.00671	0.01292	ผ่าน
	ต่ำ	0.00356	0.02278	ผ่าน
รา	สูง	0.00595	0.02178	ผ่าน
	กลาง	0.00661	0.04285	ผ่าน
	ต่ำ	ไม่ประเมิน	ไม่ประเมิน	ไม่ประเมิน

* ตัวอย่างทดสอบความชำนาญมีความเป็นเนื้อเดียวกัน เมื่อ $s^2_{sam} \leq F_1 (0.3\sigma_p)^2 + F_2 s^2_{an}$

ส่วนผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันในการตรวจหา *P. aeruginosa* พบว่า ตรวจพบ *P. aeruginosa* ทั้ง 10 ขวดสอดคล้องกับการเติมจุลินทรีย์ในตัวอย่างครีมบำรุงกลางคืน จากผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน พบว่าความเป็นเนื้อเดียวกันของการปนเปื้อนจุลินทรีย์ทั้ง 3 ระดับมีความเป็นเนื้อเดียวกันเพียงพอที่จะนำไปใช้เป็นตัวอย่างทดสอบความชำนาญ ยกเว้นปริมาณราในระดับความเข้มข้นต่ำไม่สามารถประเมินผลได้ เนื่องจากตัวอย่างดังกล่าวมีเชื้อตั้งต้นปริมาณต่ำประมาณ 1 เซลล์ต่อกรัม (ตาราง 7) ทำให้มีจุลินทรีย์ที่นับได้น้อยมาก จึงไม่สามารถประเมินค่าได้ ซึ่งการประเมินผลทางสถิติด้วย Sufficient Homogeneity test แสดงให้เห็นว่าค่าจากการคำนวณค่า s^2_{sam} น้อยกว่าหรือเท่ากับ $F_1 (0.3\sigma_p)^2 + F_2 s^2_{an}$ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ทั้ง 3 ระดับและทุกรายการทดสอบ แสดงว่าตัวอย่างทดสอบความชำนาญที่เตรียมได้มีความเป็นเนื้อเดียวกัน ซึ่งตัวอย่างการคำนวณ Sufficient Homogeneity test แสดงในภาคผนวก 1 (ISO/TS 22117, 2010, pp. 22-23) และจากผลการนับปริมาณจุลินทรีย์ที่เติมลงในครีมบำรุงกลางคืนแสดงให้เห็นว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ซึ่งในที่นี้ คือ *P. aeruginosa*, *E. coli* และ *S. choleraesuis* และรา 1 สายพันธุ์ คือ *A. niger* พบว่ามีความเป็นเนื้อเดียวกันทั้ง 3 ระดับการปนเปื้อน แต่ในการนำไปใช้ในการทดสอบความชำนาญควรมีชนิดและปริมาณการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ใกล้เคียงกับประกาศกระทรวงสาธารณสุข

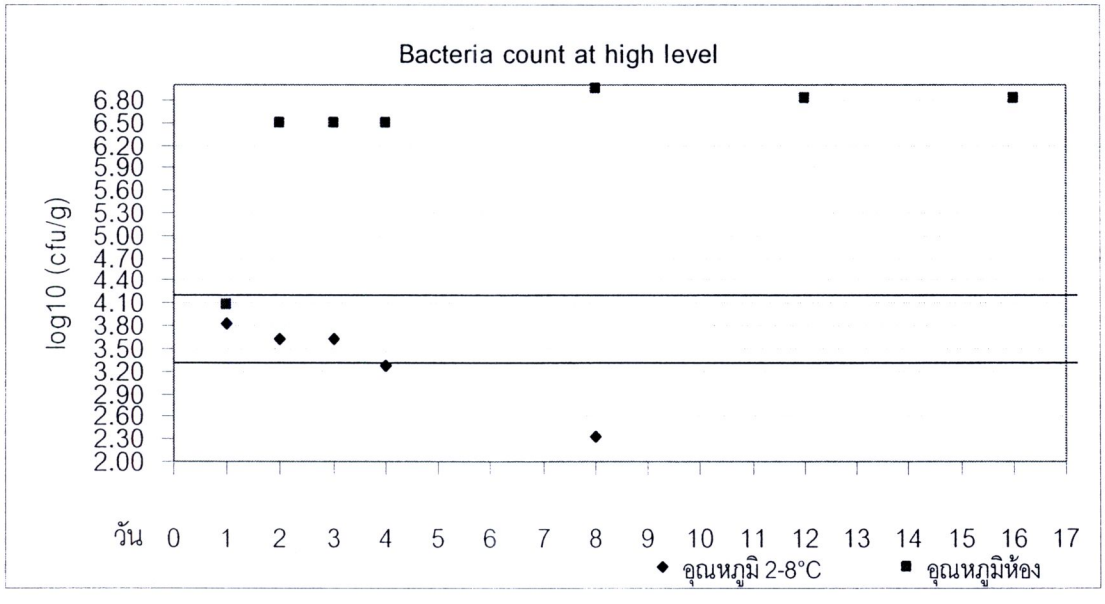
1.3 ผลการทดสอบความคงตัวในรายการทดสอบ Bacteria count และ Mould count ของตัวอย่างทดสอบความชำนาญแต่ละระดับการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ใส่ผสมรวมกัน คือ สูง, กลาง และต่ำ เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 2 ถึง 8 องศาเซลเซียส โดยสุ่มตัวอย่างมาทดสอบระดับการปนเปื้อนละ 3 ขวดทุกวัน เป็นเวลารวม 16 วัน โดยวิธี pour plate แปลงค่าการตรวจนับแต่ละวันให้อยู่ในรูปของ $\log_{10}$ และรายงานเป็นค่าเฉลี่ยของ $\log_{10}$จากการตรวจนับ 3 ขวด โดยผลการทดสอบมีค่าอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ $\pm$ 0.5 $\log_{10}$ median ของผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันดังแสดงในตาราง 9 และแสดงกราฟโดยเปรียบเทียบค่าความคงตัวกับเกณฑ์ยอมรับ โดยใช้ upper limit คือ +0.5 $\log_{10}$ median ของผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน และlower limit คือ -0.5 $\log_{10}$ median ของผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน ดังแสดงในภาพ 13 ถึง ภาพ 17

ตาราง 9 เกณฑ์ยอมรับ $\pm$ 0.5 $\log_{10}$ median ของผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของ 3 ระดับการปนเปื้อน

รายการทดสอบ	ระดับการปนเปื้อน	ผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน	
		$\log_{10}$ median	$\pm$ 0.5 $\log_{10}$ median
Bacteria count	สูง	3.89	3.39-4.39
	กลาง	3.56	3.06-4.06
	ต่ำ	2.20	1.70-2.70
Mould count	สูง	2.57	2.07-3.07
	กลาง	1.84	1.34-2.34

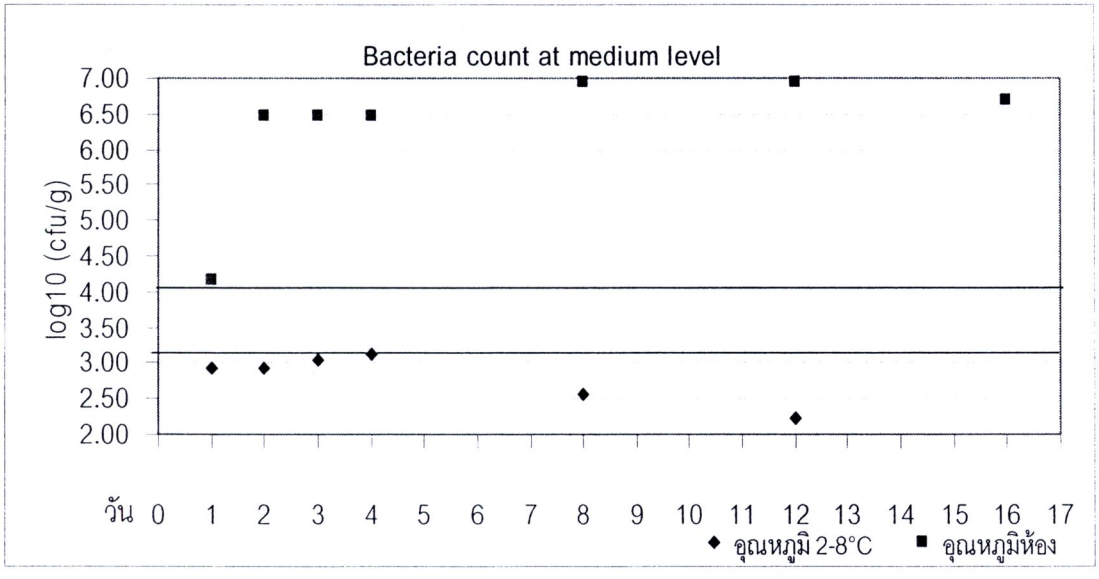
จากการทดสอบความคงตัวในรายการทดสอบ Bacteria count ที่ระดับปนเปื้อนสูง โดยเปรียบเทียบกับเกณฑ์ยอมรับ $\pm$ 0.5 $\log_{10}$ median ของผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน คือ upper limit เท่ากับ 4.39 และ lower limit เท่ากับ 3.39 ดังแสดงค่าเกณฑ์ยอมรับในตาราง 9 พบว่า เมื่อเก็บรักษาตัวอย่างทดสอบความชำนาญที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส มีความคงตัวเมื่อเปรียบเทียบกับเกณฑ์ยอมรับได้นาน 3 วัน และจุลินทรีย์จะลดจำนวนลง ส่วนการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง จุลินทรีย์มีความคงตัว 1 วัน และเจริญเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว และคงที่จนถึง 16 วัน ดังแสดงในภาพ 13 สาเหตุที่เป็นเช่นนั้นเพราะปริมาณจุลินทรีย์ที่เติมลงในครีม

บำรุงกลางคืนมีปริมาณการปนเปื้อนสูง และสารกันเสียที่อยู่ในตัวอย่างเครื่องสำอาง คือ methylparaben และ propylparaben สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ไม่ดี จุลินทรีย์มีความต้านทานต่อสารกันเสียได้ และจุลินทรีย์บางชนิด เช่น Pseudomonas ที่เติมลงไปสามารถใช้สารที่เป็นส่วนประกอบในตัวอย่างเครื่องสำอางเป็นสารอาหารในการเจริญ และเพิ่มจำนวนได้ จุลินทรีย์จึงเพิ่มปริมาณได้ดีที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Close and Nielsen (1976) ที่ระบุว่า Pseudomonas สามารถใช้ propyl ester เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ และตัวอย่างครีมบำรุงกลางคืนที่ใช้ในการวิจัยนี้เป็นอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ ซึ่งเป็นอิมัลชันที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Baird (1977) ที่ตรวจพบจุลินทรีย์ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง จำนวน 147 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบปนเปื้อน ร้อยละ 6.1 และเป็น *Pseudomonas* spp. ปนเปื้อนร้อยละ 4.1 ของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางทั้งหมด โดยพบว่าผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่พบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ เป็นผลิตภัณฑ์ชนิดน้ำ (Cleanser) มากกว่าผลิตภัณฑ์ชนิดน้ำมัน (Eye make-up) ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่พบการปนเปื้อนมากที่สุด คือ ครีม และโลชั่น ในขณะที่เมื่อเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิต่ำ จุลินทรีย์มีความคงตัวนานถึง 3 วัน เนื่องจากที่อุณหภูมิต่ำ เมตาบอลิซึมของเซลล์ต่ำ จุลินทรีย์จะเจริญได้ช้าลง แต่เนื่องจากระดับการปนเปื้อนสูงจึงทำให้จุลินทรีย์ลดจำนวนลงอย่างช้าๆและเนื่องจากมีสารกันเสียที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญผสมอยู่ด้วยจึงมีผลให้จุลินทรีย์ค่อยๆลดจำนวนลงไป



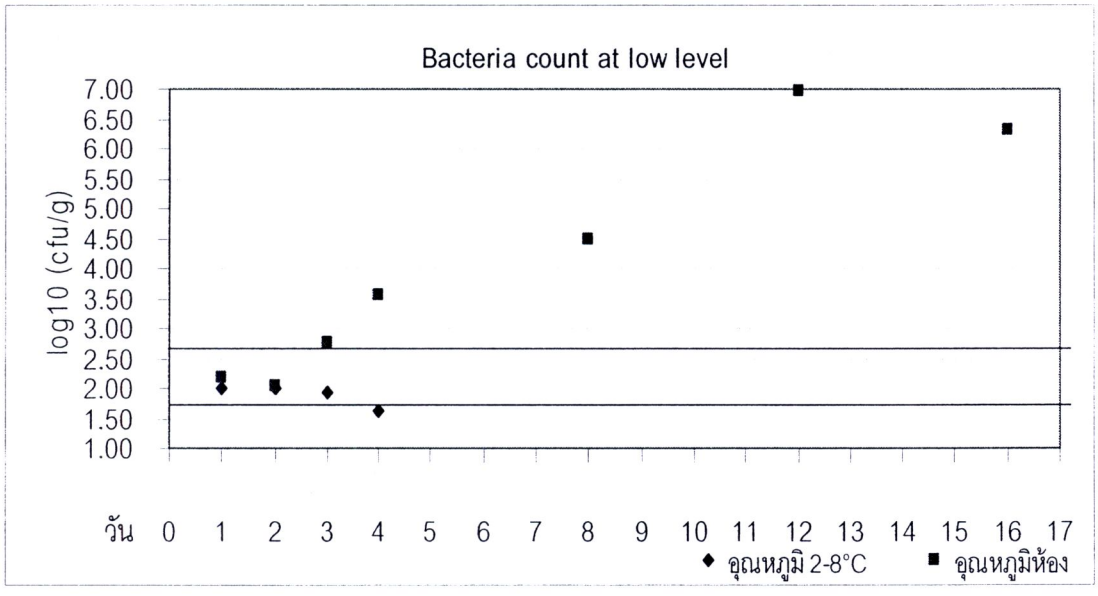
ภาพ 13 ผลการทดสอบความคงตัวของแบคทีเรียที่ระดับปนเปื้อนสูง

จากการทดสอบความคงตัวในรายการทดสอบ Bacteria count ที่ระดับปนเปื้อนกลาง โดยเปรียบเทียบกับเกณฑ์ยอมรับ $\pm$ 0.5 $\log_{10}$ median ของผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน คือ upper limit เท่ากับ 4.06 และ lower limit เท่ากับ 3.06 ดังแสดงค่าเกณฑ์ยอมรับในตาราง 9 พบว่าตัวอย่างไม่มีความคงตัวเมื่อเก็บรักษาทั้ง 2 อุณหภูมิ โดยเมื่อเก็บรักษาตัวอย่างที่อุณหภูมิห้องจุลินทรีย์เจริญเพิ่มมากขึ้นเกินเกณฑ์ตรงกันข้ามกับที่อุณหภูมิต่ำจุลินทรีย์ลดจำนวนลง แต่สามารถสังเกตได้ว่าที่อุณหภูมิต่ำปริมาณจุลินทรีย์ที่พบในตัวอย่างมีค่าใกล้เคียงกับเกณฑ์ lower limit มาก ดังแสดงในภาพ 14 สาเหตุที่เป็นเช่นนั้นเพราะสารกันเสียที่อยู่ในเครื่องตัวอย่างเครื่องสำอาง คือ methylparaben และ propylparaben สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ไม่ดี จุลินทรีย์มีความต้านทานต่อสารกันเสียได้ และจุลินทรีย์บางชนิด เช่น Pseudomonas ที่เติมลงไปสามารถใช้สารที่เป็นส่วนประกอบในตัวอย่างเครื่องสำอางเป็นสารอาหารในการเจริญและเพิ่มจำนวนได้ จุลินทรีย์จึงเพิ่มปริมาณได้ดีที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ในขณะที่เมื่อเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิต่ำ จุลินทรีย์ลดจำนวนลงเนื่องจากที่อุณหภูมิต่ำ เมตาบอลิซึมของเซลล์ต่ำ จุลินทรีย์จะเจริญได้ช้าลง และเนื่องจากมีสารกันเสียที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญผสมอยู่ด้วยจึงมีผลให้จุลินทรีย์ค่อยๆลดจำนวนลงไป ผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Close and Nielsen (1976) ที่ระบุว่า Pseudomonas สามารถใช้ propyl ester เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ และแบคทีเรียแกรมลบมีความต้านทานต่อสารกันเสียได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก รวมถึงยีสต์และรา (Kabara, 1984, p. 23)



ภาพ 14 ผลการทดสอบความคงตัวของแบคทีเรียที่ระดับปนเปื้อนกลาง

จากการทดสอบความคงตัวในรายการทดสอบ Bacteria count ที่ระดับปนเปื้อนต่ำ โดยเปรียบเทียบกับเกณฑ์ยอมรับ upper limit เท่ากับ 2.70 และ lower limit เท่ากับ 1.70 ดังแสดงค่าเกณฑ์ยอมรับในตาราง 9 พบว่าเมื่อเก็บรักษาตัวอย่างทดสอบความชำนาญที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส มีความคงตัวเมื่อเปรียบเทียบกับเกณฑ์ยอมรับได้นาน 3 วัน และลดจำนวนลง ส่วนการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องมีความคงตัว 2 วันและเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างช้าๆ ดังแสดงในภาพ 15 ทั้งนี้เพราะว่าในปริมาณการปนเปื้อนต่ำ ที่อุณหภูมิห้องสารกันเสียที่อยู่ในตัวอย่างเครื่องสำอาง คือ methylparaben และ propylparaben สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ไม่ดี จุลินทรีย์มีความต้านทานต่อสารกันเสียได้ และจุลินทรีย์บางชนิด เช่น Pseudomonas ที่เติมลงไปสามารถใช้สารที่เป็นส่วนประกอบในตัวอย่างเครื่องสำอางเป็นสารอาหารในการเจริญและเพิ่มจำนวนได้ จุลินทรีย์จึงเพิ่มปริมาณได้แต่เพิ่มปริมาณอย่างช้าๆ ส่วนการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ จุลินทรีย์มีความคงตัวได้นาน 3 วันและลดจำนวนลง สาเหตุอาจเนื่องมาจากที่อุณหภูมิต่ำ เมตาบอลิซึมของเซลล์ต่ำ จุลินทรีย์จะเจริญได้ช้าลง แต่เนื่องจากปริมาณการปนเปื้อนต่ำจึงทำให้จุลินทรีย์มีความคงตัวอยู่ได้และลดจำนวนลงอย่างช้าๆ เนื่องจากมีสารกันเสียที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญผสมอยู่ด้วยจึงมีผลให้จุลินทรีย์ค่อยๆลดจำนวนลงไปสอดคล้องกับการเจริญของแบคทีเรียในระดับปนเปื้อนสูง

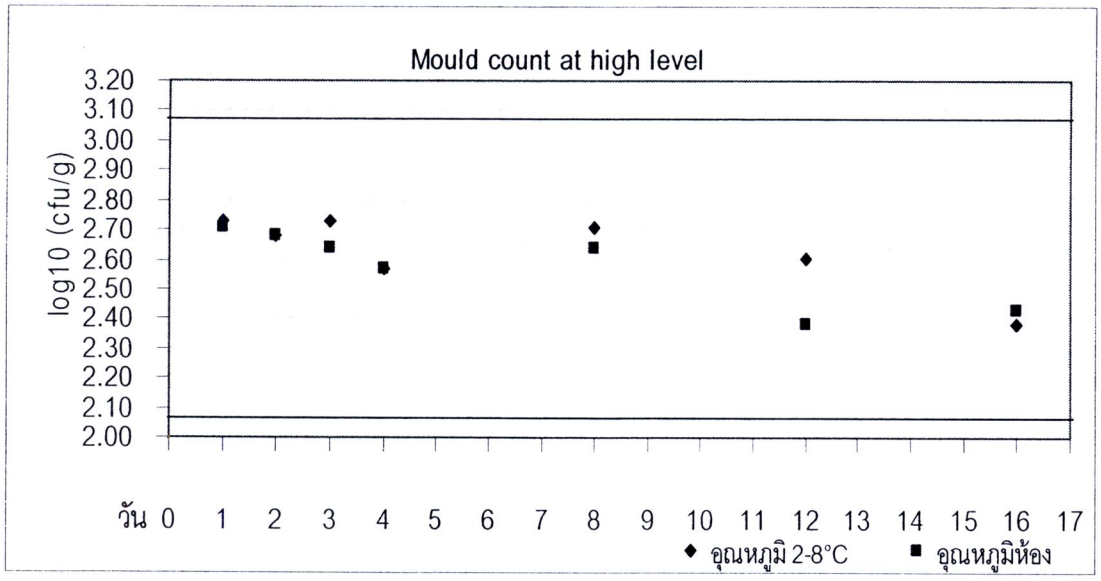


ภาพ 15 ผลการทดสอบความคงตัวของแบคทีเรียที่ระดับปนเปื้อนต่ำ

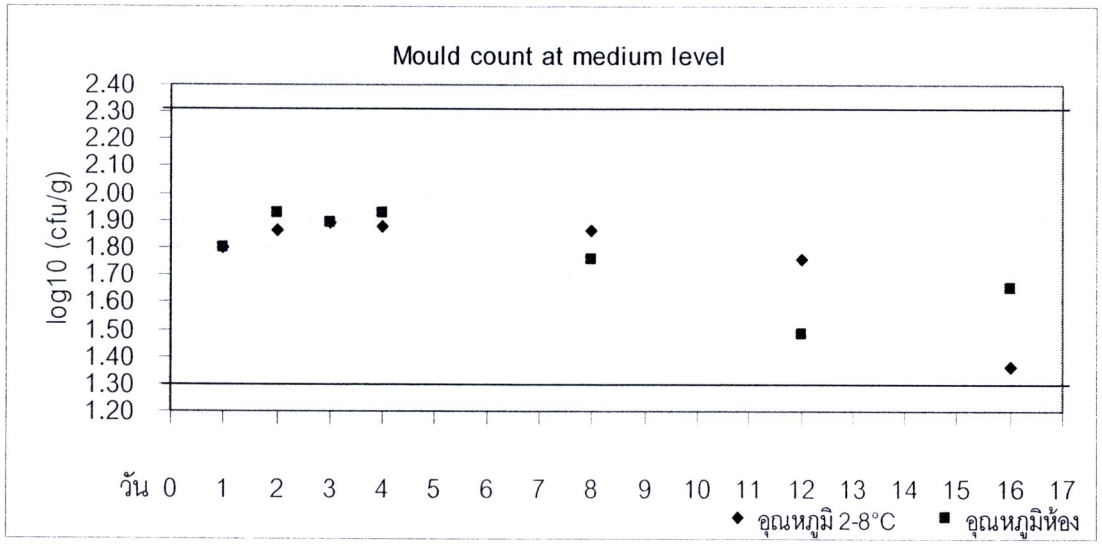
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

จากผลการทดสอบความคงตัวในรายการทดสอบ Bacteria count ของปริมาณการปนเปื้อนทั้ง 3 ระดับ เมื่อเก็บรักษาตัวอย่างทดสอบความชำนาญที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 2 - 8 องศาเซลเซียส ซึ่งจากการทดสอบความคงตัวเมื่อใส่จุลินทรีย์แบบผสมรวมกัน โดยการตรวจนับปริมาณพบว่าทุกระดับการปนเปื้อนของแบคทีเรียเจริญเพิ่มขึ้น หลังจาก 96 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ในขณะที่การเก็บรักษาตัวอย่างทดสอบความชำนาญที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส มีความคงตัวยาวนานกว่าและลดลงหลังจาก 120 ชั่วโมง ชี้ให้เห็นว่าที่อุณหภูมิห้องสารกันเสียไม่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ และระดับการปนเปื้อนสามารถรักษาตัวอย่างให้คงตัวอยู่ได้ระยะหนึ่งแต่จุลินทรีย์จะเจริญเพิ่มจำนวนขึ้นตามระดับการปนเปื้อน นอกจากนี้พบว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำจุลินทรีย์สามารถคงตัวอยู่ได้และจะลดจำนวนลงไปเนื่องจากการออกฤทธิ์ของสารกันเสีย โดยระดับการปนเปื้อนไม่มีผลต่อความคงตัวที่อุณหภูมิต่ำ และพบว่าการเก็บรักษาตัวอย่างทดสอบความชำนาญที่อุณหภูมิต่ำเหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาตัวอย่างทดสอบความชำนาญ

จากการทดสอบความคงตัวในรายการทดสอบ Mould count ที่ระดับปนเปื้อนสูงและระดับปนเปื้อนกลาง โดยเปรียบเทียบกับเกณฑ์ยอมรับ $\pm$ 0.5 $\log_{10}$ median ของผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน คือ upper limit เท่ากับ 3.07 และ lower limit เท่ากับ 2.07 และ upper limit เท่ากับ 2.34 และ lower limit เท่ากับ 1.34 ตามลำดับ ดังแสดงค่าเกณฑ์ยอมรับในตาราง 9 พบว่าตัวอย่างทดสอบความชำนาญทั้ง 2 ระดับปนเปื้อนมีความคงตัวนานถึง 16 วันตลอดช่วงการเก็บรักษาทั้ง 2 อุณหภูมิ ดังแสดงในภาพ 16 และภาพ 17 ผลที่ได้สามารถอธิบายได้ว่าเชื้อราซึ่งในที่นี้คือ *A. niger* ATCC 16404 มีความคงตัวอยู่ได้นานตลอดระยะเวลาในการเก็บรักษาทั้ง 2 อุณหภูมิในทุกระดับการปนเปื้อน ทั้งนี้อาจเนื่องจากการเตรียมเชื้อราก่อนนำมาใช้ในการศึกษา โดยการเลี้ยงเชื้อให้เจริญบนอาหาร PDA เมื่อครบเวลาบ่มเพาะล้างส่วนเส้นใยออกจากหน้าวุ้นแล้วนำมากรองเพื่อนำเฉพาะส่วนของ conidia มาใส่ลงในตัวอย่างครีมบำรุงกลางคืน เชื้อราจึงไม่มีการงอกเนื่องจากสารกันเสียยับยั้งการงอก (germination) จึงสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสปอร์เชื้อรา และ vegetative cell ของแบคทีเรียได้ (Block, 2001, pp. 530-533)



ภาพ 16 ผลการทดสอบความคงตัวของราที่ระดับปนเปื้อนสูง



ภาพ 17 ผลการทดสอบความคงตัวของราที่ระดับปนเปื้อนกลาง

ส่วนผลการทดสอบความคงตัวในการตรวจหา *P. aeruginosa* ของตัวอย่างทดสอบความชำนาญแต่ละระดับการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ใส่ผสมรวมกัน คือ สูง, กลาง และต่ำ เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 2 ถึง 8 องศาเซลเซียส โดยสุ่มตัวอย่างมาทดสอบระดับการปนเปื้อนละ 3 ขวดทุกวัน เป็นเวลารวม 16 วัน รายงานผลรวมจากการทดสอบ 3 ขวด โดย

ทดสอบระยะเวลาการมีชีวิตในตัวอย่างทดสอบความชำนาญ ดังแสดงในตาราง 10 ซึ่งพบว่า *P. aeruginosa* มีความคงตัวที่ระดับการปนเปื้อนสูงและระดับปนเปื้อนกลางของการเก็บรักษาอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส *P. aeruginosa* มีความคงตัว 2 วัน อาจเนื่องจาก protective effect ของสารที่อยู่ในครีมบำรุงกลางคืนที่ป้องกันเซลล์ไม่ให้ถูกทำลาย จึงทำให้จุลินทรีย์สามารถตรวจพบได้ที่อุณหภูมิต่ำ ยกเว้นที่อุณหภูมิห้องพบว่าที่ระดับปนเปื้อนสูง *P. aeruginosa* มีความคงตัวนานถึง 16 วัน เนื่องจากระดับการปนเปื้อนสูง และสารกันเสียในที่นี้ คือ methylparaben และ propylparaben ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบได้ ส่วนที่ระดับการปนเปื้อนต่ำซึ่งมีปริมาณเซลล์ 4.5 โคโลนีต่อกรัม (จากตาราง 7) ไม่สามารถตรวจพบ *P. aeruginosa* ทั้ง 2 อุณหภูมิ แสดงให้เห็นว่าระดับการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในตัวอย่างมีผลต่อการอยู่รอดของจุลินทรีย์

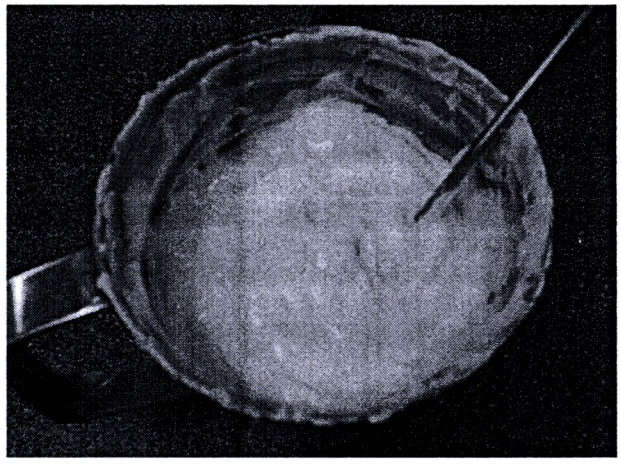
ตาราง 10 สรุปผลการทดสอบความคงตัวจากการตรวจหา *P. aeruginosa* ATCC 9027

ความคงตัว (วัน)	ตรวจหา *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027					
	ระดับปนเปื้อนสูง		ระดับปนเปื้อนกลาง		ระดับปนเปื้อนต่ำ	
	2-8°C	อุณหภูมิห้อง	2-8°C	อุณหภูมิห้อง	2-8°C	อุณหภูมิห้อง
1	**พบ**	**พบ**	**พบ**	**พบ**	ไม่พบ	ไม่พบ
2	**พบ**	**พบ**	**พบ**	**พบ**	ไม่พบ	ไม่พบ
3	ไม่พบ	**พบ**	ไม่พบ	**พบ**	ไม่พบ	ไม่พบ
4	ไม่พบ	**พบ**	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
8	ไม่พบ	**พบ**	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
12	ไม่พบ	**พบ**	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
16	ไม่พบ	**พบ**	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ

จากการทดลองข้อ 1 ควรตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ก่อโรคควบคู่ไปด้วยเพื่อจะทำให้ทราบแนวโน้มการอยู่รอดของเชื้อก่อโรคในตัวอย่าง วัดกรด-ด่างของตัวอย่างทดสอบความชำนาญทุกวัน และควรศึกษาความคงตัวของจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดอื่น เช่น *Staphylococcus aureus* และ *Candida albicans* เพื่อให้สอดคล้องกับเกณฑ์กำหนดตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขและอาจคัดเลือกชนิดจุลินทรีย์ที่ตรวจพบและแยกได้จากผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางทั่วไป

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

2.1 ผลการเตรียมครีมบำรุงกลางคืนชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W emulsion) จากการปรับเปลี่ยนเทคนิคการเตรียมครีมบำรุงกลางคืนโดยการอุ่นส่วนผสมให้ร้อนบนเตาไฟฟ้าและเปลี่ยนเครื่องมือในการตีผสมจากหัวผสมตะกร้อเป็น diagonal slotted disintegrating head จึงทำให้ครีมที่มีเนื้อเนียน ละเอียด ไม่เป็นฟองฟูและคงตัวดี เหมาะสมในการนำมาใช้เป็นตัวอย่างทดสอบความชำนาญต่อไป ดังแสดงในภาพ 18



ภาพ 18 แสดงลักษณะครีมที่ได้จากการใช้เครื่องผสมแบบ homoginizing mixer

การเตรียมอิมัลชันให้มีลักษณะที่ดี คือ สวยงามน่าใช้ เนื้อเนียนเรียบ มีความคงตัวโดยไม่แยกชั้น มีความหนืดและได้ชนิดที่ต้องการนั้น มีปัจจัยที่เกี่ยวข้อง 2 ประการ คือ

1. มีความรู้ความเข้าใจในพื้นฐานเกี่ยวกับกลไกการเกิดอิมัลชัน ตัวทำอิมัลชันและคุณสมบัติต่างๆของอิมัลชัน

2. มีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับเทคนิคที่ถูกต้องในการเตรียมอิมัลชัน เครื่องมือที่ใช้ผลิต การผสมเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความสม่ำเสมอ และคงตัวดี (พิมพร ลีลาพร พิสิฐ, 2540, หน้า 4)

จากข้อมูลที่ได้ค้นคว้าเพิ่มเติมจึงทำให้ปรับเปลี่ยนขั้นตอนการเตรียมดังนี้

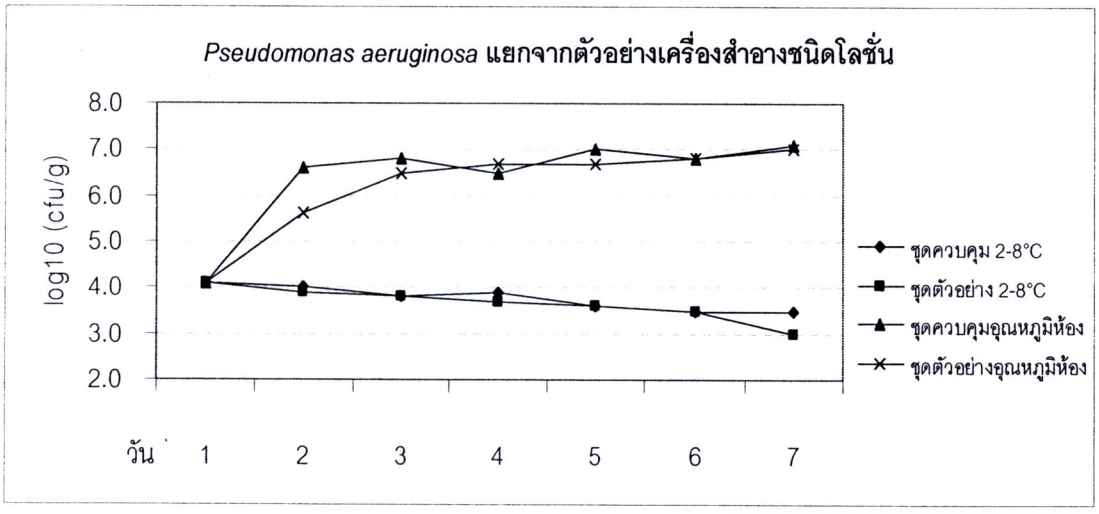
1. แยกการใส่สารกันเสีย 2 ชนิดในสูตรตำรับโดยใส่ propyl paraben ในวัฏภาค (phase) น้ำมัน และใส่ methyl paraben ในวัฏภาคน้ำ เมื่อใช้ร่วมกันจึงทำให้สามารถออกฤทธิ์ได้กว้างขึ้นทั้งในวัฏภาคน้ำและวัฏภาคน้ำมัน (Block, 2001, p.1275)

2. ควบคุมอุณหภูมิในขั้นตอนการเตรียมของทั้งวัฏภาคน้ำและวัฏภาคน้ำมันให้ได้ 80 องศาเซลเซียสก่อนนำมาผสมรวมกัน

3. เปลี่ยนเครื่องมือที่ใช้ในการคนผสม ซึ่งเครื่องมือที่ใช้ผสมมีผลต่อรูปแบบการไหล (flow pattern) ของของเหลว ถ้าเครื่องทำให้เกิดการไหลวน (turbulent flow) จะทำให้การผสมเข้ากันดีที่สุด ส่งผลให้อิมัลชันมีความคงตัว จึงเปลี่ยนเครื่องผสมที่มีหัวผสมแบบตะกร้อเป็น Homoginizer mixer ซึ่งเป็นเครื่องผสมที่มีการออกแบบหัวหมุนให้เกิดการโฮโมจิไนส์ไปพร้อมกับการผสม มีความเหมาะสมมากในการเตรียมอิมัลชัน เพราะจะได้อิมัลชันที่มีขนาดอนุภาคเล็กละเอียดและการกระจายขนาดมีความสม่ำเสมอ ทำให้ได้อิมัลชันเนื้อเนียนน่าใช้และคงตัวดีขึ้น หัวหมุนประกอบด้วยใบพัดและรอบใบพัดเป็นวงแหวนซึ่งเจาะเป็นรูขนาดเล็กมาก เพื่อให้ได้อิมัลชันที่เกิดขึ้นจากการผสมไหลผ่านรูเล็กๆเหล่านี้ในขณะที่ถูกผสม ซึ่งในที่นี้ใช้ diagonal slotted disintegrating head ดังแสดงในภาพ 8 (พิมพร ลีลาพรพิสิฐ, 2540, หน้า 166)

2.2 ผลการศึกษาการเจริญของเชื้อแต่ละชนิดในตัวอย่างครีมบำรุงกลางคืนเปรียบเทียบระหว่างชุดควบคุมกับชุดตัวอย่าง ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียสและที่อุณหภูมิห้อง โดย ชุดควบคุม คือตัวอย่างครีมบำรุงกลางคืนที่ไม่ผสมสารกันเสีย ส่วนชุดตัวอย่างคือตัวอย่างครีมบำรุงกลางคืนที่ผสมสารกันเสีย methylparaben ร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนักและpropylparaben ร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก ดังแสดงในภาพ 19 ถึง ภาพ 24

จากการศึกษาการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิดในตัวอย่างครีมบำรุงกลางคืนเปรียบเทียบระหว่างชุดควบคุมกับชุดตัวอย่าง เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้อง พบว่า แบคทีเรียแกรมลบ คือ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ที่แยกจากตัวอย่างเครื่องสำอางชนิดโลชั่น, *Pseudomonas putida* ATCC 17522 (DMST 14732) และ *Escherichia coli* ATCC 8739 เจริญอย่างรวดเร็วและคงที่หลังจากวันที่ 3 ทั้งชุดควบคุมและชุดตัวอย่างเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ดังแสดงในภาพ 19 ถึง ภาพ 21



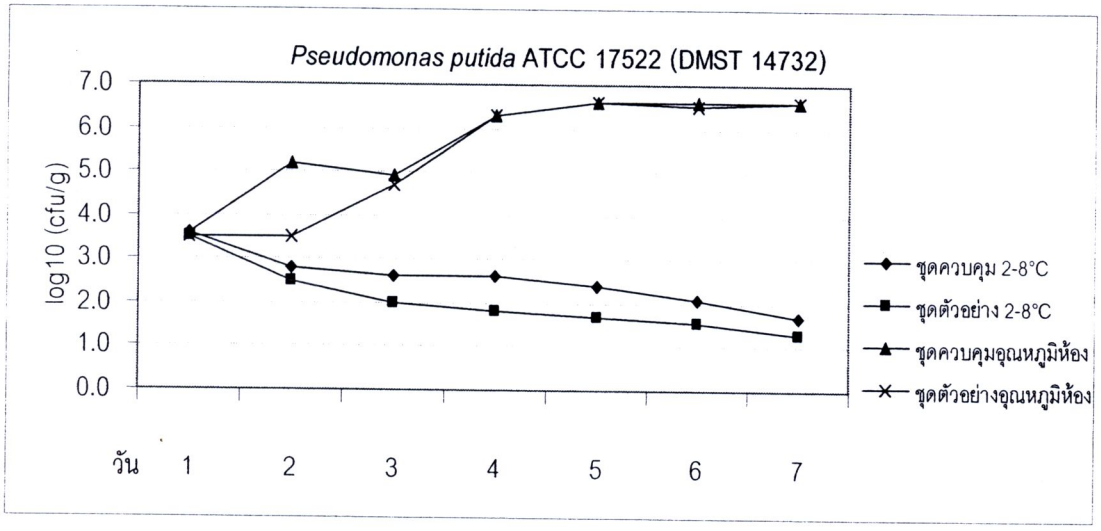
ภาพ 19 แสดงการเจริญในครีมบำรุงกลางคืนของ *Pseudomonas aeruginosa* (DMST 35549) สายพันธุ์ที่แยกจากตัวอย่างเครื่องสำอางชนิดโลชั่น

หมายเหตุ: (♦) การเจริญในครีมบำรุงกลางคืนที่ไม่ผสมสารกันเสียที่อุณหภูมิ 2-8°C

(■) การเจริญในครีมบำรุงกลางคืนที่ผสมสารกันเสีย methylparaben 0.2 %w/w และpropylparaben 0.1 %w/w ที่อุณหภูมิ 2-8°C

(▲) การเจริญในครีมบำรุงกลางคืนที่ไม่ผสมสารกันเสียที่อุณหภูมิห้อง

(×) การเจริญในครีมบำรุงกลางคืนที่ผสมสารกันเสีย methylparaben 0.2 %w/w และpropylparaben 0.1 %w/w ที่อุณหภูมิห้อง



ภาพ 20 แสดงการเจริญของ *Pseudomonas putida* ATCC 17522 ในครีมบำรุงกลางคืน

หมายเหตุ: (♦) การเจริญในครีมบำรุงกลางคืนที่ไม่ผสมสารกันเสียที่อุณหภูมิ 2-8°C

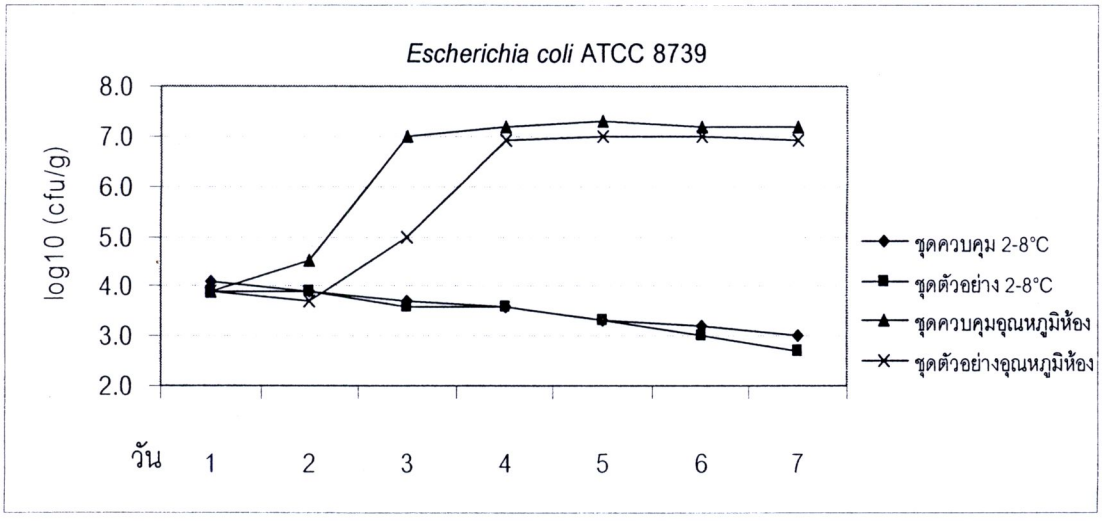
(■) การเจริญในครีมบำรุงกลางคืนที่ผสมสารกันเสีย methylparaben 0.2 %w/w และpropylparaben 0.1 %w/w ที่อุณหภูมิ 2-8°C

(▲) การเจริญในครีมบำรุงกลางคืนที่ไม่ผสมสารกันเสียที่อุณหภูมิห้อง

(×) การเจริญในครีมบำรุงกลางคืนที่ผสมสารกันเสีย methylparaben 0.2 %w/w และpropylparaben 0.1 %w/w ที่อุณหภูมิห้อง

จากผลการเจริญของ Pseudomonas ทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่าที่อุณหภูมิห้องการเจริญในครีมบำรุงกลางคืนที่ไม่ผสมสารกันเสีย และในครีมบำรุงกลางคืนที่ผสมสารกันเสีย methylparaben ร้อยละ 0.2 น้ำหนักต่อน้ำหนัก และpropylparaben ร้อยละ 0.1 น้ำหนักต่อน้ำหนัก เห็นได้ว่า Pseudomonas เจริญอย่างรวดเร็ว และคงที่หลังจากวันที่ 3 ชี้ให้เห็นว่าสารกันเสียที่ใส่ไม่มีผลต่อการเจริญของ Pseudomonas ที่อุณหภูมิห้อง ทั้งนี้สอดคล้องกับข้อมูลระบุว่า Pseudomonas สามารถใช้ propyl ester เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ (Close and Nielsen, 1976, p. 1) และในปี 1974 Baird ได้สำรวจผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่ขายตามร้านค้ารวม 147 ตัวอย่าง พบแบคทีเรียแกรมลบร้อยละ 6.1 และพบ Pseudomonas spp. ร้อยละ 4.1 จากตัวอย่างทั้งหมด และพบว่าผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่พบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ เป็นผลิตภัณฑ์ชนิดน้ำ (Cleanser) มากกว่าผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางชนิดน้ำมัน (Eye make-up) ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่พบการปนเปื้อนมากที่สุด คือ ครีม และโลชั่น (Baird, 1977) ส่วนที่อุณหภูมิ 2-8 องศา

เซลเซียส ทั้งการเจริญในในครีมบำรุงกลางคืนที่ไม่ผสมสารกันเสียและในครีมบำรุงกลางคืนที่ผสมสารกันเสียจุลินทรีย์ลดจำนวนลงอย่างช้าๆ เป็นไปในทางเดียวกัน



ภาพ 21 แสดงการเจริญของ *Escherichia coli* ATCC 8739 ในครีมบำรุงกลางคืน

หมายเหตุ: (♦) การเจริญในครีมบำรุงกลางคืนที่ไม่ผสมสารกันเสียที่อุณหภูมิ 2-8°C

(■) การเจริญในครีมบำรุงกลางคืนที่ผสมสารกันเสีย methylparaben 0.2 %w/w และpropylparaben 0.1 %w/w ที่อุณหภูมิ 2-8°C

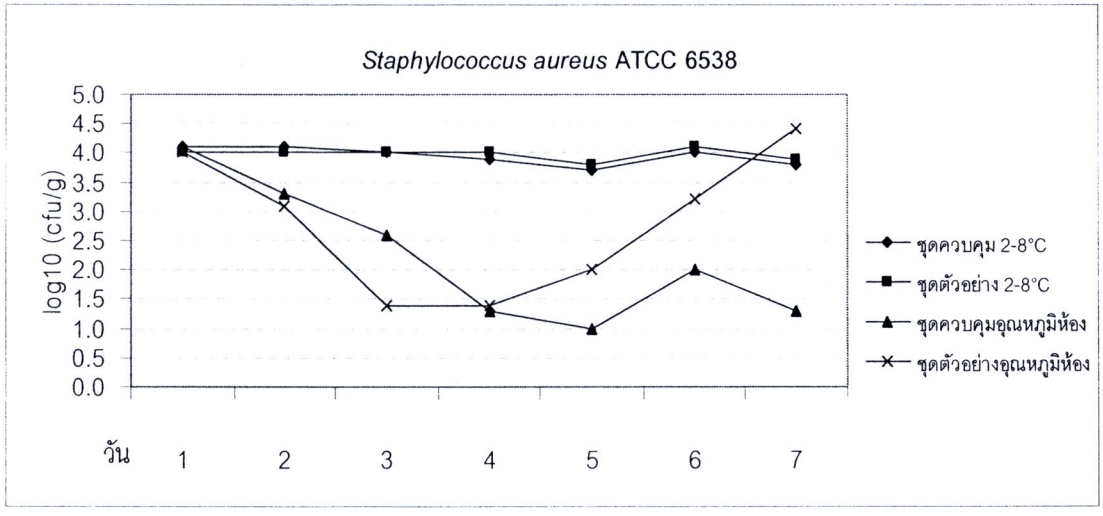
(▲) การเจริญในครีมบำรุงกลางคืนที่ไม่ผสมสารกันเสียที่อุณหภูมิห้อง

(×) การเจริญในครีมบำรุงกลางคืนที่ผสมสารกันเสีย methylparaben 0.2 %w/w และpropylparaben 0.1 %w/w ที่อุณหภูมิห้อง

จากผลการเจริญของ *Escherichia coli* ATCC 8739 ในครีมบำรุงกลางคืน พบว่าที่อุณหภูมิห้องการเจริญในครีมบำรุงกลางคืนที่ไม่ผสมสารกันเสีย และในครีมบำรุงกลางคืนที่ผสมสารกันเสีย methylparaben ร้อยละ 0.2 น้ำหนักต่อน้ำหนัก และpropylparaben ร้อยละ 0.1 น้ำหนักต่อน้ำหนัก เห็นได้ว่า *Escherichia coli* เจริญอย่างรวดเร็วและคงที่หลังจากวันที่ 3 ส่วนที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส ทั้งการเจริญในในครีมบำรุงกลางคืนที่ไม่ผสมสารกันเสีย และในครีมบำรุงกลางคืนที่ผสมสารกันเสีย จุลินทรีย์ลดจำนวนลงอย่างช้าๆ เป็นไปในทางเดียวกัน ชี้ให้เห็นว่าลักษณะการเจริญเป็นไปในทางเดียวกัน กับPseudomonasเนื่องจากเป็นแบคทีเรียแกรมลบเหมือนกันและจากองค์ประกอบของผนังเซลล์พบว่าข้อแตกต่างระหว่างแบคทีเรียแกรมลบ

และแบคทีเรียแกรมบวกคือ ในแบคทีเรียแกรมบวกผนังเซลล์ประกอบด้วย peptidoglycan ถึงร้อยละ 90 ส่วนในแบคทีเรียแกรมลบผนังเซลล์ มีผนังชั้นนอกว่า ชั้นlipopolysaccharide ดังแสดงในภาพ 1 (แคมเบลล์, ม.ป.ป.) ข้อแตกต่างของชั้น lipopolysaccharideนี้ ทำให้แบคทีเรียแกรมลบมีความต้านทานต่อสารกันเสียได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก รวมถึงยีสต์และรา (Kabara, 1984, p. 23) ปัจจุบันนิยมใช้สารกันเสียร่วมกันหลายชนิดเพื่อเพิ่มการออกฤทธิ์ ลดความเป็นพิษเพราะใช้แต่ละชนิดน้อยลงป้องกันการดื้อของจุลินทรีย์ต่อสารกันเสียชนิดเดียว เช่น การใช้ bronopol ร่วมกับ parabens ในผลิตภัณฑ์พีเอชด่าง (พิมพร ลีลาพรพิสิฐ, 2540, หน้า 105-107)

ในขณะที่แบคทีเรียแกรมบวกคือ *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 ลดลงอย่างรวดเร็วถึง 4 log cycles ภายใน 3 วันทั้งชุดควบคุมและชุดตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง ส่วนการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส พบว่าทั้งชุดควบคุมและชุดตัวอย่าง มีการเจริญคงที่ตลอด 7 วัน ดังแสดงในภาพ 22



ภาพ 22 แสดงการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 ในครีมบำรุงกลางคืน

หมายเหตุ: (♦) การเจริญในครีมบำรุงกลางคืนที่ไม่ผสมสารกันเสียที่อุณหภูมิ 2-8°C

(■) การเจริญในครีมบำรุงกลางคืนที่ผสมสารกันเสีย methylparaben 0.2 %w/w และpropylparaben 0.1 %w/w ที่อุณหภูมิ 2-8°C

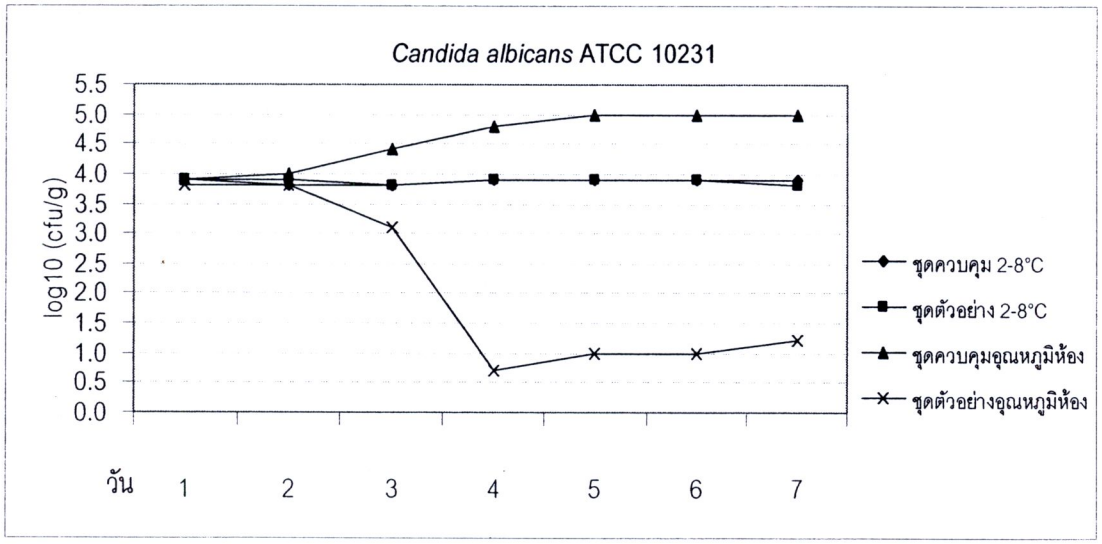
(▲) การเจริญในครีมบำรุงกลางคืนที่ไม่ผสมสารกันเสียที่อุณหภูมิห้อง

(×) การเจริญในครีมบำรุงกลางคืนที่ผสมสารกันเสีย methylparaben 0.2 %w/w และpropylparaben 0.1 %w/w ที่อุณหภูมิห้อง

จากผลการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 ในครีมบำรุงกลางคืน พบว่าที่อุณหภูมิห้อง *Staphylococcus aureus* ลดลงอย่างรวดเร็วถึง 4 log cycles ภายใน 3 วัน ในครีมบำรุงกลางคืนที่ไม่ผสมสารกันเสียและในครีมบำรุงกลางคืนที่ผสมสารกันเสีย methylparaben ร้อยละ 0.2 น้ำหนักต่อน้ำหนัก และpropylparaben ร้อยละ 0.1 น้ำหนักต่อน้ำหนัก แสดงให้เห็นว่าที่อุณหภูมิห้อง protective effect ไม่มีการป้องกันการถูกทำลายของจุลินทรีย์ และมีผลมาจากสารกันเสียเนื่องจากที่ชุดตัวอย่างซึ่งเป็นครีมบำรุงกลางคืนที่ผสมสารกันเสีย พบว่าจุลินทรีย์ลดจำนวนลงมากกว่าชุดควบคุม ส่วนที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส *S. aureus* มีการเจริญคงที่ตลอด 7 วันทั้งในครีมบำรุงกลางคืนที่ผสมและไม่ผสมสารกันเสีย ชี้ให้เห็นว่าที่อุณหภูมิต่ำ protective effect ขององค์ประกอบในครีมมีผลต่อการเจริญของ *S. aureus* ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลศึกษาซึ่งพบว่า จุลินทรีย์จะเจริญในองค์ประกอบสารอินทรีย์ (organic compound) ในเครื่องสำอาง (Flores, Morillo and Crespo, 1997, p.159) และจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตในอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W emulsion) ได้ดีกว่าอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (W/O emulsion) (Umbach, 1936, p. 274) ซึ่งครีมบำรุงกลางคืนในที่นี้เป็นอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ และมี cetyl alcohol และ propylene glycol ในสูตรตำรับซึ่งเป็นองค์ประกอบประเภท ไขมัน และไขแข็ง ที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ โดยจุลินทรีย์จะเก็บสะสมไขมันและนำไปใช้ประโยชน์ทำให้มีความต้านทานเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะสารกันเสียกลุ่ม phenolic และ parahydroxybenzoic acid (Kabara, 1984, pp. 390-392)

ส่วนการเจริญของ *Candida albicans* ATCC 10231 ในครีมบำรุงกลางคืน พบว่าที่อุณหภูมิห้องการเจริญของ *C. albicans* ลดลงอย่างรวดเร็วภายใน 4 วัน และคงที่จนถึง 7 วันในครีมบำรุงกลางคืนที่ผสมสารกันเสีย methylparaben ร้อยละ 0.2 น้ำหนักต่อน้ำหนัก และ propylparaben ร้อยละ 0.1 น้ำหนักต่อน้ำหนัก ชี้ให้เห็นว่าสารกันเสียมีผลยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* ที่อุณหภูมิห้องอย่างชัดเจน เนื่องจากเชื้อลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว ส่วนการเจริญของ *C. albicans* ที่อุณหภูมิห้องในครีมบำรุงกลางคืนที่ไม่ผสมสารกันเสีย มีการเจริญเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างช้าๆ ในขณะที่การเจริญของ *C. albicans* ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส พบว่ามีการเจริญคงที่ตลอด 7 วันทั้งในครีมบำรุงกลางคืนที่ผสมและไม่ผสมสารกันเสีย ดังแสดงในภาพ 23 ทั้งนี้เนื่องจากที่อุณหภูมิต่ำ protective effect ของตัวอย่างครีมบำรุงกลางคืนสามารถรักษาระดับการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ให้คงที่ได้ตลอดช่วงเวลา ซึ่งที่อุณหภูมิต่ำมีลักษณะการเจริญเหมือนกับ *S. aureus* ซึ่ง methyl paraben และpropyl paraben ออกฤทธิ์ต่อเชื้อรา ยีสต์ และแบคทีเรียแกรม

บวก แต่หากต้องการให้ออกฤทธิ์ครอบคลุมแบคทีเรียแกรมลบอาจต้องใช้ร่วมกับสารกันเสียกลุ่มอื่น (Block, 2001, p.1275; Croshaw, 1977, p. 10)



ภาพ 23 แสดงการเจริญของ *Candida albicans* ATCC 10231 ในครีมบำรุงกลางคืน

หมายเหตุ: (♦) การเจริญในครีมบำรุงกลางคืนที่ไม่ผสมสารกันเสียที่อุณหภูมิ 2-8°C

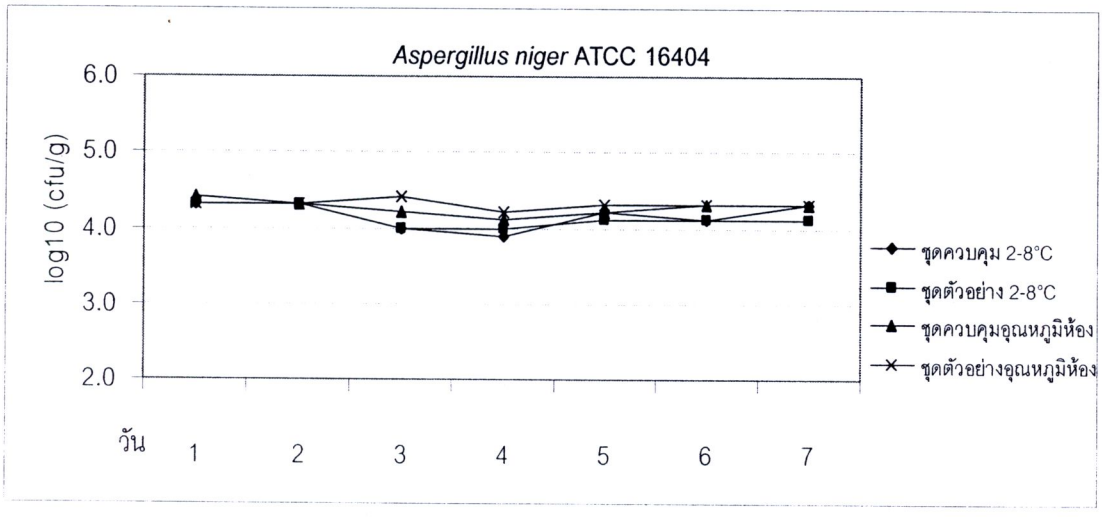
(■) การเจริญในครีมบำรุงกลางคืนที่ผสมสารกันเสีย methylparaben 0.2 %w/w และpropylparaben 0.1 %w/w ที่อุณหภูมิ 2-8°C

(▲) การเจริญในครีมบำรุงกลางคืนที่ไม่ผสมสารกันเสียที่อุณหภูมิห้อง

(×) การเจริญในครีมบำรุงกลางคืนที่ผสมสารกันเสีย methylparaben 0.2 %w/w และpropylparaben 0.1 %w/w ที่อุณหภูมิห้อง

ส่วนการเจริญของ *Aspergillus niger* ATCC 16404 ในครีมบำรุงกลางคืน พบว่ามีการเจริญคงที่ทั้งการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องในครีมบำรุงกลางคืนที่ผสมและไม่ผสมสารกันเสีย และมีการเจริญคงที่ทั้งอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียสในครีมบำรุงกลางคืนที่ผสมและไม่ผสมสารกันเสีย ดังแสดงในภาพ 24 แสดงให้เห็นว่าสารกันเสียไม่มีผลต่อการเจริญ ทั้งนี้อาจมีผลจากส่วนประกอบในสูตรตำรับของครีมบำรุงกลางคืนที่เป็นสภาพไม่เหมาะสมต่อการงอกของเชื้อรา จึงทำให้เชื้อราคงตัวอยู่ได้ในครีมบำรุงกลางคืนที่ไม่มีสารกันเสีย นอกจากนี้ในครีมบำรุงกลางคืนที่ผสมสารกันเสีย เชื้อราสามารถคงตัวอยู่ได้ เป็นผลมาจากสารกันเสียที่ใส่ในสูตรตำรับ methyl paraben และpropyl paraben ซึ่งเป็นสภาพที่ไม่เหมาะสมต่อการงอกของสปอร์ เนื่องจากนำ

เฉพาะส่วนของ conidia มาใส่ลงในตัวอย่างครีมบำรุงกลางคืน และสารกันเสียมีผลต่อการซึมผ่านของสารต่างๆ ผ่านผนังเซลล์ของเชื้อ ยับยั้งการสังเคราะห์ DNA และ RNA รวมทั้งเอนไซม์และโปรตีน oxidation หรือ reductionรวมถึง hydrolysis และยับยั้งการงอก (germination) จึงสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสปอร์เชื้อรา และ vegetative cell ของแบคทีเรียได้ (Abrutyn, 2010, p. 24; Block, 2001, pp. 534-535,1269) และพบว่าสารยับยั้งการงอกของสปอร์ ประกอบด้วย phenols และ cresols, parabens, alcohols, glutaraldehyde (Block, 2001)



ภาพ 24 แสดงการเจริญของ *Aspergillus niger* ATCC 16404 ในครีมบำรุงกลางคืน

หมายเหตุ: (♦) การเจริญในครีมบำรุงกลางคืนที่ไม่ผสมสารกันเสียที่อุณหภูมิ 2-8°C

(■) การเจริญในครีมบำรุงกลางคืนที่ผสมสารกันเสีย methylparaben 0.2 %w/w และpropylparaben 0.1 %w/w ที่อุณหภูมิ 2-8°C

(▲) การเจริญในครีมบำรุงกลางคืนที่ไม่ผสมสารกันเสียที่อุณหภูมิห้อง

(×) การเจริญในครีมบำรุงกลางคืนที่ผสมสารกันเสีย methylparaben 0.2 %w/w และpropylparaben 0.1 %w/w ที่อุณหภูมิห้อง

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเจริญของจุลินทรีย์คงที่เมื่อเก็บรักษาตัวอย่างทดสอบความชำนาญที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียสดีกว่าเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ทั้งนี้จากผลการทดลองที่ได้จะทำให้สามารถนำไปเป็นข้อมูลในการใส่เชื้อแบบผสมรวมกันลงในตัวอย่างทดสอบความชำนาญต่อไป

3. **ผลการศึกษาความคงตัวของปริมาณจุลินทรีย์ที่เหมาะสมเมื่อผสมรวมกันของจุลินทรีย์ 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**

3.1 ผลการตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ตั้งต้น ในตัวอย่างทดสอบความชำนาญ A และ B โดยปรับเปลี่ยนปริมาณการปนเปื้อนของแบคทีเรียเพื่อใช้เตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนาญ 6 ตัวอย่าง คือ AH, AM, AL, BH, BM และ BL ดังแสดงในตาราง 11 ซึ่งกำหนดให้

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

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

ตาราง 11 ปริมาณจุลินทรีย์ ณ 0 วัน (log_{10}cfu) ของตัวอย่างทดสอบความชำนาญ A และ B โดยปรับเปลี่ยนความเข้มข้น (AH, AM, AL, BH, BM และ BL)

PT	ปริมาณแบคทีเรีย		ปริมาณยีสต์		ปริมาณรา	
samples	Log_{10}cfu	$\pm0.5log_{10}$cfu	Log_{10}cfu	$\pm0.5log_{10}$cfu	Log_{10}cfu	$\pm0.5log_{10}$cfu
AH	4.0	3.5-4.5	2.6	2.1-3.1	2.5	2.0-3.0
AM	3.0	2.5-3.5	2.7	2.2-3.2	2.8	2.3-3.3
AL	2.1	1.6-2.6	2.6	2.1-3.1	2.6	2.1-3.1
BH	4.0	3.5-4.5	3.9	3.4-4.4	2.2	1.7-2.7
BM	3.0	2.5-3.5	2.7	2.2-3.2	1.8	1.3-2.3
BL	2.8	2.3-3.3	2.0	1.5-2.5	1.9	1.4-2.4

3.2 ผลการทดสอบความคงตัวในรายการตรวจนับแบคทีเรีย, ตรวจนับยีสต์ และตรวจนับรา โดยใส่จุลินทรีย์แบบผสมรวมกันและปรับแปลี่ยนระดับความเข้มข้นของจุลินทรีย์และผสมชนิดจุลินทรีย์แตกต่างกันในตัวอย่างทดสอบความชำนาญ จำนวน 6 ตัวอย่าง ประเมินผลการทดสอบความคงตัวของแต่ละรายการทดสอบโดยปริมาณที่ตรวจนับได้แต่ละรายการทดสอบต้องอยู่ในช่วงเกณฑ์ยอมรับ $\pm0.5log_{10}$cfu ของปริมาณเชื้อ ณ. 0 วัน ซึ่งเป็นระยะ equilibrium ของจุลินทรีย์เมื่ออยู่ในครีมบำรุงกลางคืนมาใช้เป็นเกณฑ์ ดังตาราง 11 ดังแสดงผลการทดสอบความคงตัวแต่ละรายการทดสอบในตาราง 12 ถึงตาราง 14

การทดสอบความคงตัวในรายการตรวจนับปริมาณแบคทีเรียและรายการตรวจนับปริมาณยีสต์ ประเมินผลการทดสอบความคงตัวโดยปริมาณที่ตรวจนับได้ต้องอยู่ในช่วงเกณฑ์ยอมรับ $\pm0.5log_{10}$cfu ของปริมาณเชื้อ ณ. 0 วัน จากผลการตรวจนับปริมาณแบคทีเรียและยีสต์ในตัวอย่างทดสอบความชำนาญที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส พบว่ามีความคงตัวถึง 4 วัน ดังแสดงในตาราง 12 และตาราง 13 แสดงให้เห็นว่าปริมาณการปนเปื้อนทั้ง 3 ระดับในทั้ง 2 รูปแบบของแบคทีเรียและยีสต์ที่เติมลงในครีมบำรุงกลางคืนที่อุณหภูมิต่ำนั้น protective effect ของสารที่ผสมในครีมบำรุงกลางคืน เช่น propylene glycol สามารถป้องกันเซลล์จากการถูกทำลาย จึงทำให้จุลินทรีย์มีความคงตัวที่อุณหภูมิต่ำได้

ตาราง 12 ความคงตัวของแบคทีเรียที่ 6 ระดับการปนเปื้อนในตัวอย่างทดสอบความชำนาญ

วัน	AH	AM	AL	BH	BM	BL
1	4.0	2.9	1.7	3.9	3.1	2.9
2	3.9	3.1	1.7	3.9	3.2	3.0
3	3.6	2.9	2.2	3.9	2.9	2.8
4	3.7	3.0	2.4	3.8	2.8	2.4
$\pm 0.5 \log_{10}$cfu*	3.5-4.5	2.5-3.5	1.6-2.6	3.5-4.5	2.5-3.5	2.3-3.3
สรุป	**ผ่าน**	**ผ่าน**	**ผ่าน**	**ผ่าน**	**ผ่าน**	**ผ่าน**

* ช่วงเกณฑ์ยอมรับ $\pm 0.5 \log_{10}$cfu ของปริมาณเชื้อ ณ. 0 วัน ของการตรวจนับแบคทีเรีย

ตาราง 13 ความคงตัวของยีสต์ที่ 6 ระดับการปนเปื้อนในตัวอย่างทดสอบความชำนาญ

วัน	AH	AM	AL	BH	BM	BL
1	2.6	2.8	2.4	3.9	2.9	1.9
2	2.6	2.8	2.6	3.7	2.9	1.9
3	2.5	2.7	2.7	3.8	2.8	1.8
4	2.8	2.8	2.7	3.8	2.7	2.0
$\pm 0.5 \log_{10}$cfu	2.1-3.1	2.2-3.2	2.1-3.1	3.4-4.4	2.2-3.2	1.5-2.5
สรุป	**ผ่าน**	**ผ่าน**	**ผ่าน**	**ผ่าน**	**ผ่าน**	**ผ่าน**

* ช่วงเกณฑ์ยอมรับ $\pm 0.5 \log_{10}$cfu ของปริมาณเชื้อ ณ. 0 วัน ของการตรวจนับยีสต์

สำหรับความคงตัวในรายการตรวจนับปริมาณรา ในตัวอย่างทดสอบความชำนาญเมื่อเก็บที่ 2-8 องศาเซลเซียส มีความคงตัวนาน 4 วัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในข้อ 1 และข้อ 2 ที่พบว่าการใช้สปอร์เติมลงในตัวอย่างครีมบำรุงกลางคืนจะทำให้เชื้อรามีความคงตัวอยู่ในตัวอย่างได้นาน ยกเว้นที่ระดับการปนเปื้อนสูงในตัวอย่าง B (BH) มีค่าอยู่นอกช่วงเกณฑ์ยอมรับทั้ง 4 วัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากที่ระดับการปนเปื้อนสูงของ BH มีการเจริญทับซ้อนกันของเชื้อราและยีสต์อยู่หนาแน่นจึงทำให้การแยกตรวจนับเป็นไปได้ยาก ดังแสดงในตาราง 14

ตาราง 14 ความคงตัวของราที่ 6 ระดับการปนเปื้อนในตัวอย่างทดสอบความชำนาญ

วัน	AH	AM	AL	BH	BM	BL
1	2.8	2.8	3.0	2.8	2.0	2.0
2	2.6	2.8	2.7	2.9	1.9	2.1
3	2.6	2.6	2.8	1.0	2.1	2.1
4	2.8	2.8	2.6	1.0	1.8	1.4
$\pm 0.5 \log_{10}$cfu	2.0-3.0	2.3-3.3	2.1-3.1	1.7-2.7	1.3-2.3	1.4-2.4
สรุป	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	**ไม่ผ่าน**	ผ่าน	ผ่าน

* ช่วงเกณฑ์ยอมรับ $\pm 0.5 \log_{10}$cfu ของปริมาณเชื้อ ณ. 0 วัน ของการตรวจนับรา

จากผลการทดสอบความคงตัวของจุลินทรีย์แบบผสมรวมกันเมื่อเปรียบเทียบกับความคงตัวของจุลินทรีย์ที่เจริญในตัวอย่างเพียงชนิดเดียว เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส ซึ่งจากผลการทดลองนี้จุลินทรีย์ที่เติมลงในตัวอย่างทดสอบความชำนาญปรับเปลี่ยนเฉพาะแบคทีเรียเป็นหลัก พบว่าตัวอย่างทดสอบความชำนาญมีความคงตัวนานมากขึ้นถึง 4 วัน คือมีปริมาณอยู่ในช่วงเกณฑ์ยอมรับเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณจุลินทรีย์ ณ. 0 วัน ในตัวอย่างครีมบำรุงกลางคืน ชี้ให้เห็นว่าการเติมแบคทีเรียแบบผสมรวมกันมีความคงตัวนานกว่าแบคทีเรียชนิดเดียวเพราะจุลินทรีย์บางชนิด เช่น Pseudomonas ที่เติมลงไปสามารถใช้สารที่เป็นส่วนประกอบในตัวอย่างเครื่องสำอางเป็นสารอาหารในการเจริญและเพิ่มจำนวนได้ ในขณะที่จุลินทรีย์บางชนิด เช่น *S. aureus* มีการเจริญคงที่ในอุณหภูมิต่ำได้นานถึง 7 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองที่ 2 ที่แบคทีเรียแกรมลบจะลดจำนวนลงถึง 2 log cycle ภายใน 7 วัน ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

นอกจากนี้ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่ายีสต์และรามีความคงตัวยาวนานในตัวอย่างทดสอบความชำนาญทั้งการใส่แบบผสมรวมกันหรือการใส่ชนิดเดียวดังแสดงจากการทดลองที่ 2 พบว่าตัวอย่างทดสอบความชำนาญมีความคงตัวนานมากขึ้นถึง 4 วัน คือมีปริมาณอยู่ในช่วงเกณฑ์ยอมรับเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเชื้อ ณ. 0 วันในตัวอย่างครีมบำรุงกลางคืน แต่จากผลการทดลองพบว่าในการทดลองที่ 3 นี้ จุลินทรีย์มีความคงตัวอยู่ในตัวอย่างทดสอบความชำนาญได้ยาวนานกว่า เนื่องจากการปรับเทคนิคการเตรียมครีมบำรุงกลางคืน ซึ่งไม่เป็นฟองฟู เนื้อแน่น เนียนเรียบ ซึ่ง protective effect ของตัวอย่างครีมสามารถออกฤทธิ์ได้ดี ป้องกันเซลล์จุลินทรีย์ไม่ให้ถูกทำลายได้ดีขึ้น และการแยกใส่สารกันเสีย 2 ชนิดในสูตรตำรับโดยใส่ propyl paraben ในวัฏภาค (phase) น้ำมัน และใส่ methyl paraben ในวัฏภาคน้ำ เมื่อใช้ร่วมกันจึงทำให้สามารถออกฤทธิ์ได้กว้างขึ้นทั้งในวัฏภาคน้ำและวัฏภาคน้ำมัน (Block, 2001, p.1275) อีกทั้งมีการเพิ่มชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ที่เติมลงในตัวอย่างทดสอบความชำนาญเพิ่มขึ้น จึงทำให้จำนวนรวมของการตรวจนับแบคทีเรียมีความคงตัวในตัวอย่างทดสอบความชำนาญได้นานขึ้น

3.3 ผลการตรวจหาจุลินทรีย์ก่อโรค 3 ชนิด ได้แก่ *P. aeruginosa, S. aureus* และ *C. albicans* โดยทำการตรวจนับปริมาณเฉพาะจุลินทรีย์ก่อโรค 3 ชนิดจากสารละลายตั้งต้น (1:10) บน selective media ควบคู่ไปกับการตรวจหาโดยวิธี enrichment ของตัวอย่างทดสอบความชำนาญ จำนวน 6 ตัวอย่าง ดังแสดงผลในตาราง 15 และภาพ 25 ถึง ภาพ 27

ผลการตรวจนับปริมาณและตรวจหาจุลินทรีย์ก่อโรค 3 ชนิด ดังแสดงในตาราง 15 แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ก่อโรคได้แก่ *Staphylococcus aureus* ในตัวอย่างทดสอบความชำนาญ A ทั้ง AH, AM และ AL และ *Pseudomonas aeruginosa* ในตัวอย่างทดสอบความชำนาญทั้ง A และ B รวม 6 ตัวอย่าง สามารถตรวจพบได้ในทุกระดับการปนเปื้อนเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส แม้ว่าตรวจนับได้ในปริมาณน้อย ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ 2 ซึ่งจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดคงตัวอยู่ได้และลดลงอย่างช้าๆ ซึ่งผลเกิดจากองค์ประกอบของครีมบำรุงกลางคืนที่มีสารกันเสีย และprotectant ยกเว้น *Candida albicans* ตรวจไม่พบในตัวอย่าง B ทุกระดับการปนเปื้อน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเจริญแข่งขันของแบคทีเรียและยีสต์ เพราะในตัวอย่างทดสอบความชำนาญ B ทั้ง 3 ตัวอย่าง คือ BH, BM และ BL ใส่แบคทีเรีย 2 ชนิดและยีสต์อีก 1 ชนิด คือ *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *C. tropicalis* ซึ่งจากผลการตรวจนับจุลินทรีย์ก่อโรคที่สารละลายตั้งต้น 1:10 ควบคู่ไปกับการตรวจหาจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี enrichment พบว่า *P. aeruginosa* เจริญแข่งขันกับ *C. albicans* ในขั้นตอนของการตรวจหาด้วยวิธี enrichment เพราะเมื่อตรวจนับจุลินทรีย์ก่อโรคที่สารละลายตั้งต้น 1:10 สามารถตรวจนับปริมาณ *C. albicans*

ได้เป็นจำนวนมากก็ตาม แต่จากขั้นตอนการ enrichment ในการตรวจหาจุลินทรีย์ก่อโรคทั้ง 3 ชนิด ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MLB ในขวดเดียวกัน แล้วไม่สามารถตรวจพบ *C. albicans* ด้วยวิธี enrichment ซึ่งจากการวินิจฉัยจุลินทรีย์ที่เจริญแข่งขันบน selective media เมื่อนำ enrichment broth มาstreak พบว่า จุลินทรีย์ที่เจริญแข่งขันบน selective media เป็น *P. aeruginosa* ที่ทำให้ไม่สามารถตรวจพบ *C. albicans*

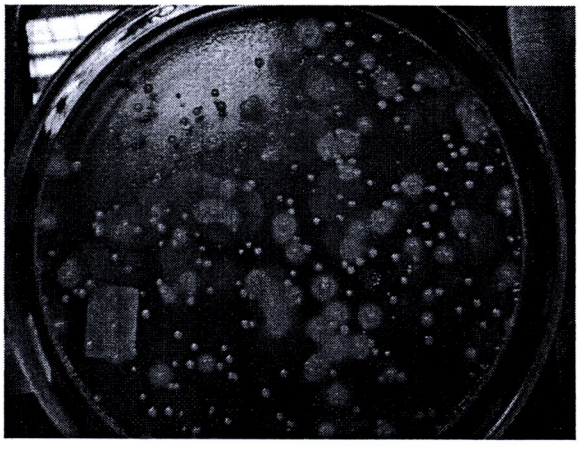
ตาราง 15 แสดงผลการตรวจนับปริมาณและตรวจหาจุลินทรีย์ก่อโรค 3 ชนิดใน 6 ตัวอย่าง

ตัวอย่าง	รายการทดสอบ	วัน				
		0	1	2	3	4
AH	pH	7.16	7.09	7.09	7.07	7.03
ตรวจหา	นับปริมาณ (cfu/g)	960	800	360	0	370
P. aeruginosa	enrichment broth	พบ	พบ	พบ	พบ	พบ
ตรวจหา	นับปริมาณ (cfu/g)	1050	1480	1100	670	820
S.aureus	enrichment broth	พบ	พบ	พบ	พบ	พบ
AM	pH	7.16	7.09	7.09	7.07	7.01
ตรวจหา	นับปริมาณ (cfu/g)	170	260	60	0	0
P. aeruginosa	enrichment broth	พบ	พบ	พบ	พบ	พบ
ตรวจหา	นับปริมาณ (cfu/g)	130	210	150	90	100
S.aureus	enrichment broth	พบ	พบ	พบ	พบ	พบ
AL	pH	7.16	7.09	7.06	7.06	7.03
ตรวจหา	นับปริมาณ (cfu/g)	40	0	10	0	0
P. aeruginosa	enrichment broth	พบ	พบ	พบ	พบ	พบ
ตรวจหา	นับปริมาณ (cfu/g)	10	10	20	0	0
S.aureus	enrichment broth	พบ	พบ	พบ	พบ	พบ
BH	pH	7.16	7.09	7.09	7.05	7.04
ตรวจหา	นับปริมาณ (cfu/g)	760	1060	1860	230	690
P. aeruginosa	enrichment broth	พบ	พบ	พบ	พบ	พบ
ตรวจหา	นับปริมาณ (cfu/g)	-	1170	1100	1050	1050
C. albicans	enrichment broth	**ไม่พบ**	**ไม่พบ**	**ไม่พบ**	**ไม่พบ**	**ไม่พบ**
BM	pH	7.16	7.09	7.07	7.05	7.04
ตรวจหา	นับปริมาณ (cfu/g)	200	110	860	10	0
P. aeruginosa	enrichment broth	พบ	พบ	พบ	พบ	พบ
ตรวจหา	นับปริมาณ (cfu/g)	0	190	210	160	70
C. albicans	enrichment broth	**ไม่พบ**	**ไม่พบ**	**ไม่พบ**	**ไม่พบ**	**ไม่พบ**
BL	pH	7.16	7.09	7.05	7.08	7.03
ตรวจหา	นับปริมาณ (cfu/g)	50	40	0	0	0
P. aeruginosa	enrichment broth	พบ	พบ	พบ	พบ	พบ
ตรวจหา	นับปริมาณ (cfu/g)	0	40	30	10	0
C. albicans	enrichment broth	**ไม่พบ**	**ไม่พบ**	**ไม่พบ**	**ไม่พบ**	**ไม่พบ**

ในการตรวจหาจุลินทรีย์ก่อโรค 3 ชนิด คือ *P. aeruginosa*, *S. aureus* และ *C. albicans* จะทำการตรวจนับปริมาณเฉพาะจุลินทรีย์ก่อโรค 3 ชนิดจากสารละลายตั้งต้น (1:10) ควบคู่ไปกับการตรวจหาโดยวิธี enrichment โดยจะตรวจนับเฉพาะโคโลนีที่มีคุณลักษณะเฉพาะบน selective media เท่านั้น ดังแสดงในภาพ 25 ถึง ภาพ 27 ซึ่งการตรวจนับ *P. aeruginosa* บนอาหาร PP จะนับเฉพาะลักษณะโคโลนีสีน้ำเงินและสีเขียวรอบๆโคโลนี ดังแสดงในภาพ 25

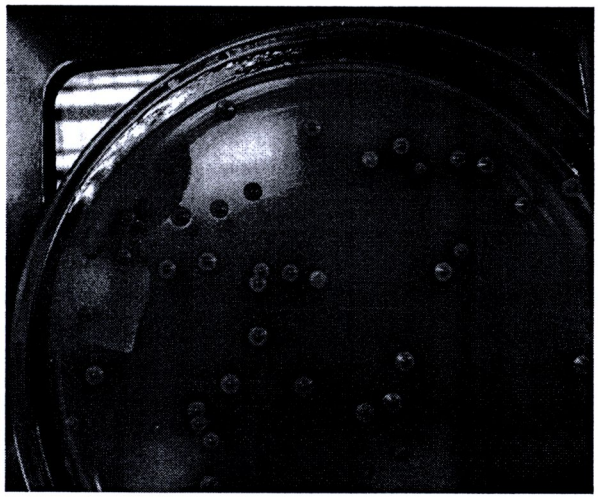
ภาพ 25 แสดงลักษณะเฉพาะของโคโลนี *P. aeruginosa* ที่ตรวจนับบน PP

ส่วนการตรวจนับ *S. aureus* บนอาหาร MSA+Egg yolk จะนับเฉพาะลักษณะโคโลนีสีเหลืองและโซนขุ่นเหลืองรอบๆโคโลนี ดังแสดงในภาพ 26



ภาพ 26 แสดงลักษณะเฉพาะของโคโลนี *S. aureus* ที่ตรวจนับบน MSA + egg yolk

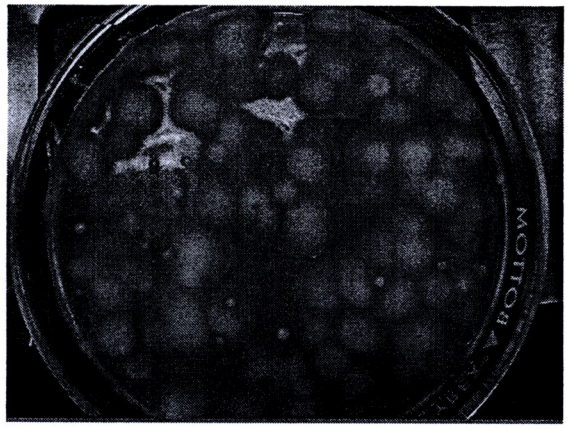
ส่วนการตรวจนับ *C. albicans* บนอาหาร CHROMagar™ Candida จะตรวจนับเฉพาะลักษณะ โคโลนีสีเขียว ดังแสดงในภาพ 27



ภาพ 27 แสดงลักษณะเฉพาะของโคโลนี *C. albicans* ที่ตรวจนับบนCHROMagar™Candida

จากผลการตรวจหา *C. albicans* ในตัวอย่างทดสอบความชำนาญทั้ง BH, BM และ BL พบว่า *C. albicans* ไม่สามารถเจริญแข่งขันกับเชื้ออื่นๆได้เมื่อใส่แบบผสมรวมกันใน enrichment broth ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ใน ขั้นตอน enrichment เพราะในที่นี้ใช้ MLB เพียงชนิดเดียวร่วมกันในการตรวจหาจุลินทรีย์ก่อโรคทั้ง 3 ชนิด ซึ่งแบคทีเรียเจริญได้ดี ควรเป็น selective broth ที่คัดเลือกเฉพาะยีสต์ให้เจริญ และเซลล์พวกโปรคาร์ริโอต (Prokaryotic cell) เช่น แบคทีเรีย เจริญเติบโตได้รวดเร็วกว่า เซลล์พวกยูคาร์ริโอต (Eukaryotic cell) เช่น ยีสต์

3.4 จากผลการตรวจนับปริมาณแบคทีเรีย ยีสต์และรา ทั้ง 6 ตัวอย่าง แสดงให้เห็นว่ารา ซึ่งในที่นี้คือ *A. niger* สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ตรวจนับแบคทีเรียคือ TSA และผู้วิจัยสังเกตได้จากการตรวจนับพบว่าเชื้อราเจริญได้รวดเร็วกว่าการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยเจริญอย่างรวดเร็วภายใน 48 ชั่วโมงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA นอกจากนี้ปริมาณแบคทีเรียและรา มีปริมาณใกล้เคียงกันมากในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ทำให้รบกวนการอ่านผลและอาจแปรผลผิดได้ ดังแสดงในภาพ 28



ภาพ 28 แสดงเชื้อราเจริญปกคลุมบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ที่เวลา 48 ชั่วโมง

ดังนั้นผู้วิจัยจึงศึกษาเพิ่มเติมถึงจุลินทรีย์ที่คัดเลือกนำมาใช้ผสมในตัวอย่างครีมบำรุงกลางคืนเพื่อจัดเตรียมเป็นตัวอย่างทดสอบความชำนาญเพื่อศึกษาเชื้อชนิดใดสามารถเจริญได้ทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ตรวจนับแบคทีเรีย และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ตรวจนับยีสต์และรา ผลการศึกษาเพิ่มเติมโดยเตรียมเชื้อตั้งต้นในปริมาณเท่ากัน จากนั้นตรวจนับปริมาณด้วยการ pour plate ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA และ PDA ที่เติม chloramphenicol ซึ่งผลการตรวจนับดังแสดงในตาราง 16

ตาราง 16 แสดงผลการตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์โดยเปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด

ชนิดจุลินทรีย์	TSA		PDA ที่เติม chloramphenicol	
	ปริมาณเชื้อ (cfu/g)	Log_{10}	ปริมาณเชื้อ (cfu/g)	Log_{10}
C. albicans	$1.2x10^8$	8.08	$1.2x10^8$	8.08
C. tropicalis	$9.6x10^7$	7.98	$8.4x10^7$	7.92
E. coli	$1.4x10^8$	8.15	~ <10	1.00
P. aeruginosa	$1.0x10^8$	8.00	$1.3x10^8$	8.11
P. putida	$7.4x10^7$	7.87	$4.4x10^7$	7.64
S. aureus	$1.5x10^8$	8.18	~ <10	1.00
S. epidermidis	$5.5x10^7$	7.74	~ <10	1.00

จากผลการตรวจนับในตาราง 16 พบจุลินทรีย์ 4 ชนิด สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิดในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน คือ *C. albicans* ATCC 10231, *C. tropicalis* สายพันธุ์ที่แยกจากตัวอย่างเครื่องสำอาง, *P. aeruginosa* สายพันธุ์ที่แยกจากตัวอย่างเครื่องสำอางชนิดโลชั่น, *P. putida* ATCC 17522 (DMST 14732) และ *A. niger* ATCC 16404

จากการศึกษาเพิ่มเติมนี้ทำให้ทราบว่าเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Pseudomonas สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการตรวจนับยีสต์และราได้ ซึ่งในที่นี้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เติม chloramphenicol ซึ่งทำให้การตรวจนับปริมาณยีสต์ในตัวอย่างทดสอบความชำนาญอาจได้ผลการตรวจนับเกินจริงเพราะอาจนับซ้ำแบคทีเรียร่วมด้วย ดังนั้นควรปรับปรุงอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ตรวจนับยีสต์และราเพื่อแก้ปัญหาการนับซ้ำหากเป็นตัวอย่างที่ใช้ทดสอบความชำนาญของผู้วิเคราะห์

3.5 จากผลการตรวจหาจุลินทรีย์ก่อโรคทั้ง 3 ชนิด แสดงให้เห็นว่า*P. aeruginosa* และ *S. aureus* สามารถตรวจพบได้ทั้งการตรวจหาใน enrichment broth และตรวจนับปริมาณ ถึงแม้จะมีปริมาณปนเปื้อนน้อยในตัวอย่างดังแสดงผลในตาราง 13 แต่ *C. albicans* ตรวจไม่พบในตัวอย่างถึงแม้จะใส่เชื้อในปริมาณมากก็ตาม ผู้วิจัยจึงศึกษาเพิ่มเติมโดยทดลองผสมเชื้อรวมกันแต่ไม่ใส่เชื้อแข่งขันคือ *C. tropicalis* ผลการทดลองพบว่ายังคงตรวจไม่พบ *C. albicans* ถึงแม้จะใส่เชื้อปริมาณมากถึง 6,500 โคโลนีต่อกรัมและลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวมและเชื้อราแล้ว นอกจากนี้ผู้วิจัยศึกษาเพิ่มเติมโดยใส่ *C. albicans* และ*C. tropicalis* เพียงชนิดเดียวลงในครีมบำรุงกลางคืนในปริมาณน้อยคือ 10-20 โคโลนี ใน enrichment broth และตรวจหาตามวิธีการในข้อ 3.5.2 ซึ่งผลการทดลองพบว่า *C. albicans* และ *C. tropicalis* ตรวจพบในอาหารเลี้ยงเชื้อ CHROMagar™ Candida ได้ ชี้ให้เห็นว่ายีสต์สามารถเจริญ และตรวจพบได้ถึงแม้จะปนเปื้อนในปริมาณน้อยเมื่อใส่เพียงชนิดเดียวไม่ใส่แบบผสมรวมกัน และพบว่า *C. albicans* ไม่สามารถเจริญแข่งขันกับเชื้ออื่นได้เมื่อใส่แบบผสมรวมกันซึ่งอาจเนื่องมาจาก enrichment broth ที่ใช้ในการตรวจหาตามวิธีทดสอบต้องใช้ร่วมกันกับแบคทีเรีย ซึ่ง Candida ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ทันกับแบคทีเรียซึ่งมีการเจริญที่รวดเร็วกว่า

จากการทดลองข้อ 3 นี้แสดงให้เห็นว่าการจัดเตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนาญซึ่งต้องใส่จุลินทรีย์แบบผสมรวมกัน ในรายการตรวจนับแบคทีเรีย, ตรวจนับยีสต์, ตรวจนับรา และตรวจหาจุลินทรีย์ก่อโรค 3 ชนิด ได้แก่ *P. aeruginosa*, *S. aureus* และ *C. albicans* นั้น นอกจากการปรับเปลี่ยนระดับจุลินทรีย์แต่ละชนิดให้เหมาะสมเมื่อต้องผสมรวมกัน ควรปรับเปลี่ยนชนิดของจุลินทรีย์ที่ตรวจหาเมื่อต้องใส่แบบผสมรวมกัน เพื่อไม่ให้เกิดการเจริญแข่งขันจนไม่สามารถตรวจ

พบได้โดยต้องไม่ใส่จุลินทรีย์ในกลุ่ม Pseudomonas รวมกับ *Candida albicans* ในรายการทดสอบ Detection of *Candida aibicans*

4. ผลการศึกษาความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัวของตัวอย่างทดสอบความชำนาญที่มีปริมาณจุลินทรีย์ที่เหมาะสมเมื่อผสมรวมกันจากข้อ 3 อย่างน้อย 2 ตัวอย่างในรายการทดสอบ 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 ผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน โดยสุ่มตัวอย่างทดสอบความชำนาญครีม A และครีม B ตัวอย่างละ 10 ขวด โดยสุ่มแบบไม่เฉพาะเจาะจงและทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันแบบไม่เฉพาะเจาะจง ได้ผลการทดสอบดังนี้

4.1.1 ผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันในรายการทดสอบ Total Aerobic Microbial Count และ Total Combined Yeasts and Moulds Count ของครีม A และครีม B โดยวิธี pour plate ประเมินผลการทดสอบด้วยวิธีการทางสถิติ โดยใช้ Sufficient homogeneity test พบว่า $s^2_{sam} \leq F_1 \ (0.3\sigma_p)^2 + F_2 \ s^2_{an}$ แสดงว่าตัวอย่างทดสอบความชำนาญมีความเป็นเนื้อเดียวกัน ดังตาราง 17 ซึ่งเกิดจากวิธีการเตรียมตัวอย่างครีมบำรุงกลางคืนที่ดีทำให้ได้ matrix ที่มีเนื้อเนียนแน่นและมีการกระจายตัวของสารกันเสียทั้ง 2 วัฏภาค อีกทั้งในขั้นตอนการผสมจุลินทรีย์กับmatrix ต้องมีการกระจายของจุลินทรีย์ทั่วถึงและสม่ำเสมอ จึงทำให้ได้ตัวอย่างทดสอบความชำนาญที่มีความเป็นเนื้อเดียวกัน

ตาราง 17 ผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันในรายการทดสอบ Total Aerobic Microbial Count **และ**Total Combined Yeasts and Moulds Count **ของครีม** A **และครีม** B

รายการทดสอบ	**ครีม A**			**ครีม B**		
	S^2_{sam}	$F_1 (0.3\sigma_p)^2 + F_2 S^2_{an}$	สรุปผล*	S^2_{sam}	$F_1 (0.3\sigma_p)^2 + F_2 S^2_{an}$	สรุปผล*
Total Aerobic Microbial Count	0.00037	0.01383	ผ่าน	0.00132	0.01929	ผ่าน
Total Combined Yeasts and Moulds Count	0.00998	0.01616	ผ่าน	0.00230	0.01485	ผ่าน

* ตัวอย่างทดสอบความชำนาญมีความเป็นเนื้อเดียวกัน เมื่อ $s^2_{sam} \leq F_1 (0.3\sigma_p)^2 + F_2 s^2_{an}$

4.1.2 ผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันในรายการทดสอบ Detection of *Staphylococcus aureus*, Detection of *Pseudomonas aeruginosa* และ Detection of *Candida albicans* โดยวิธี Enrichment ประเมินผลการทดสอบโดยเปรียบเทียบกับการเตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนาญ ดังตาราง 18 พบว่าตรวจพบจุลินทรีย์ก่อโรค 3 ชนิดสอดคล้องกับการเติมจุลินทรีย์ลงในตัวอย่างครีมบำรุงกลางคืน แสดงว่าตัวอย่างทดสอบความชำนาญมีความเป็นเนื้อเดียวกันเพียงพอในรายการทดสอบ detection ทั้ง 3 รายการ

ตาราง 18 ผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันในรายการทดสอบ Detection of *Staphylococcus aureus*, Detection of *Pseudomonas aeruginosa* **และ** Detection of *Candida albicans* **ของครีม** A **และครีม** B

รายการทดสอบ	ครีม A			ครีม B		
	การเติมจุลินทรีย์	ผลการทดสอบ	สรุปผล*	การเติมจุลินทรีย์	ผลการทดสอบ	สรุปผล*
Detection of *Staphylococcus aureus*	เติม	พบ	ผ่าน	เติม	พบ	ผ่าน
Detection of *Pseudomonas aeruginosa*	เติม	พบ	ผ่าน	ไม่เติม	ไม่พบ	ผ่าน
Detection of *Candida albicans*	ไม่เติม	ไม่พบ	ผ่าน	เติม	พบ	ผ่าน

* ตัวอย่างทดสอบความชำนาญมีความเป็นเนื้อเดียวกันเพียงพอในรายการทดสอบ detection เมื่อตรวจพบจุลินทรีย์ก่อโรคสอดคล้องกับการเติมจุลินทรีย์ลงในตัวอย่างครีมบำรุงกลางคืน

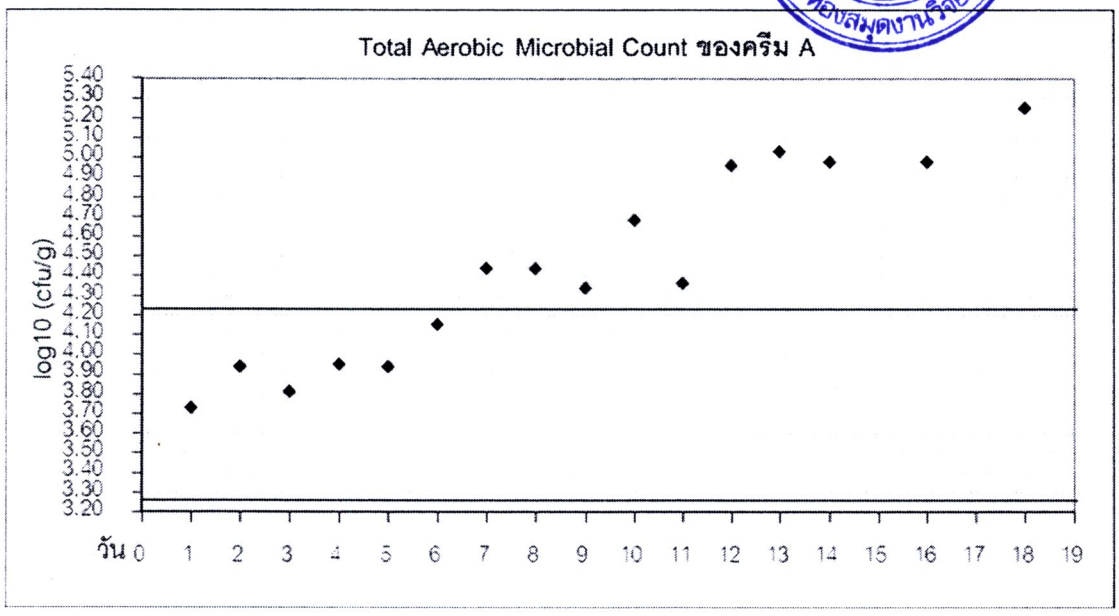
4.2 ผลการทดสอบความคงตัวในรายการทดสอบ Total Aerobic Microbial Count, Total Combined Yeasts and Moulds Count, Detection of *Staphylococcus aureus*, Detection of *Pseudomonas aeruginosa* และ Detection of *Candida albicans* ของตัวอย่างทดสอบความชำนาญครีม A และครีม B เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส โดยสุ่มตัวอย่างมาทดสอบทั้งในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ ตัวอย่างละ 3 ขวดทุกวันต่อเนื่องกัน เป็นเวลารวม 18 วัน โดยในรายการที่ตรวจนับปริมาณ ทดสอบความคงตัวโดยวิธี pour plate แปลงค่าการตรวจนับแต่ละวันให้อยู่ในรูปของ $\log_{10}$ และรายงานเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 ขวด โดยผลการทดสอบมีค่าอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ $\pm$ 0.5 $\log_{10}$ median ของผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันดังแสดงในตาราง 19 และแสดงกราฟโดยเปรียบเทียบค่าความคงตัวกับเกณฑ์ยอมรับ โดยใช้ upper limit คือ +0.5 $\log_{10}$ median ของผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน และ lower limit คือ -0.5 $\log_{10}$ median ของผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน ส่วนผลการทดสอบความคงตัวในเชิงคุณภาพ

ของการตรวจหาจุลินทรีย์ก่อโรค ประเมินผลโดยต้องตรวจพบจุลินทรีย์สอดคล้องกับการเติมลงในตัวอย่างครีม

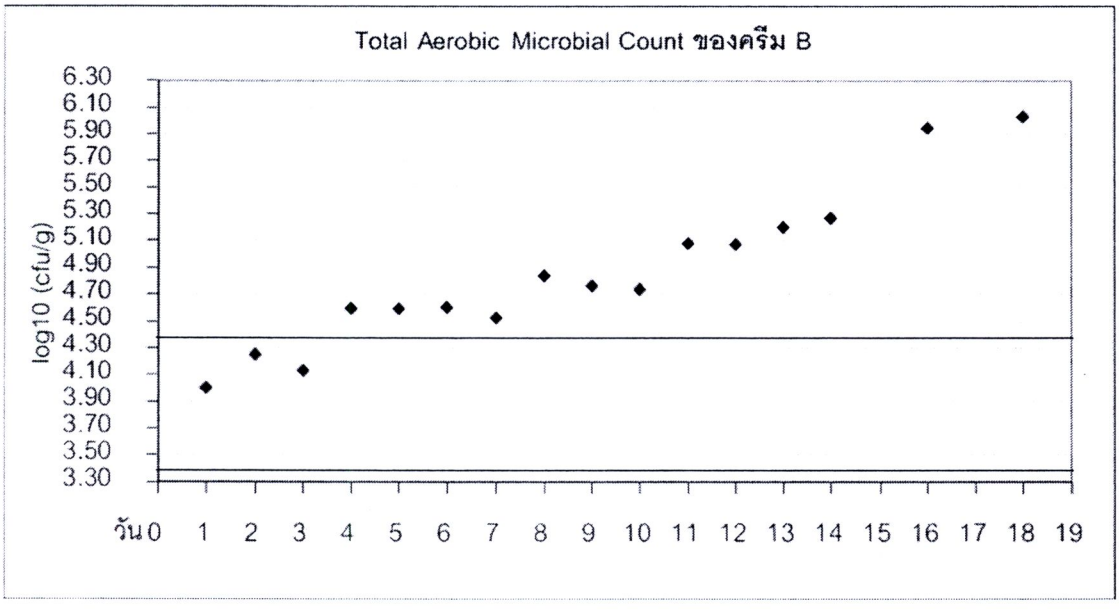
ตาราง 19 เกณฑ์ยอมรับ ± 0.5 $\log_{10}$ median ของผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่างทดสอบความชำนาญ ครีม A และครีม B ในรายการทดสอบ Total Aerobic Microbial Count และ Total Combined Yeasts and Moulds Count

รายการทดสอบ	ตัวอย่างทดสอบความชำนาญ	ผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน	
		$\log_{10}$ median	$\pm$ 0.5 $\log_{10}$ median
Total Aerobic Microbial Count	ครีม A	3.74	3.24-4.24
	ครีม B	3.86	3.36-4.36
Total Combined Yeasts and Moulds Count	ครีม A	2.10	1.60-2.60
	ครีม B	3.46	2.96-3.96

4.2.1 การทดสอบความคงตัวในรายการทดสอบ Total Aerobic Microbial Count ของตัวอย่างทดสอบความชำนาญครีม A ทุกวันต่อเนื่องกัน รวม 18 วัน โดยเปรียบเทียบกับเกณฑ์ยอมรับ ± 0.5 $\log_{10}$ median ของผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน คือ upper limit เท่ากับ 4.24 และ lower limit เท่ากับ 3.24 ดังแสดงค่าเกณฑ์ยอมรับในตาราง 19 พบว่าตัวอย่างทดสอบความชำนาญครีม A เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส มีความคงตัวได้นานถึง 6 วัน ดังแสดงในภาพ 29 ส่วนผลการทดสอบความคงตัวของตัวอย่างทดสอบความชำนาญครีม B ในรายการทดสอบ Total Aerobic Microbial Count ซึ่งมีค่า upper limit เท่ากับ 4.36 และ lower limit เท่ากับ 3.36 พบว่าตัวอย่างทดสอบความชำนาญครีม B เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส มีความคงตัวได้นาน 3 วัน ดังแสดงในภาพ 30 ทั้งนี้อาจเนื่องจากอุณหภูมิต่ำที่เก็บรักษาทำให้จุลินทรีย์มีเมตาบอลิซึมต่ำ และprotective effect ของสารที่มีอยู่ในองค์ประกอบของตัวอย่างครีมบำรุงกลางคืน ทำให้จุลินทรีย์ที่ผสมรวมกันในตัวอย่างครีมบำรุงกลางคืนสามารถคงตัวอยู่ได้ในช่วงระยะหนึ่งแล้วเพิ่มจำนวนขึ้น เนื่องจากมีจุลินทรีย์บางชนิด เช่น Pseudomonas ที่เติมลงไปสามารถใช้สารที่เป็นส่วนประกอบในตัวอย่างเครื่องสำอางเป็นสารอาหารในการเจริญและเพิ่มจำนวนได้ ผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Close and Nielsen (1976) ที่ระบุว่า Pseudomonas สามารถใช้ propyl ester เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งพลังงานได้

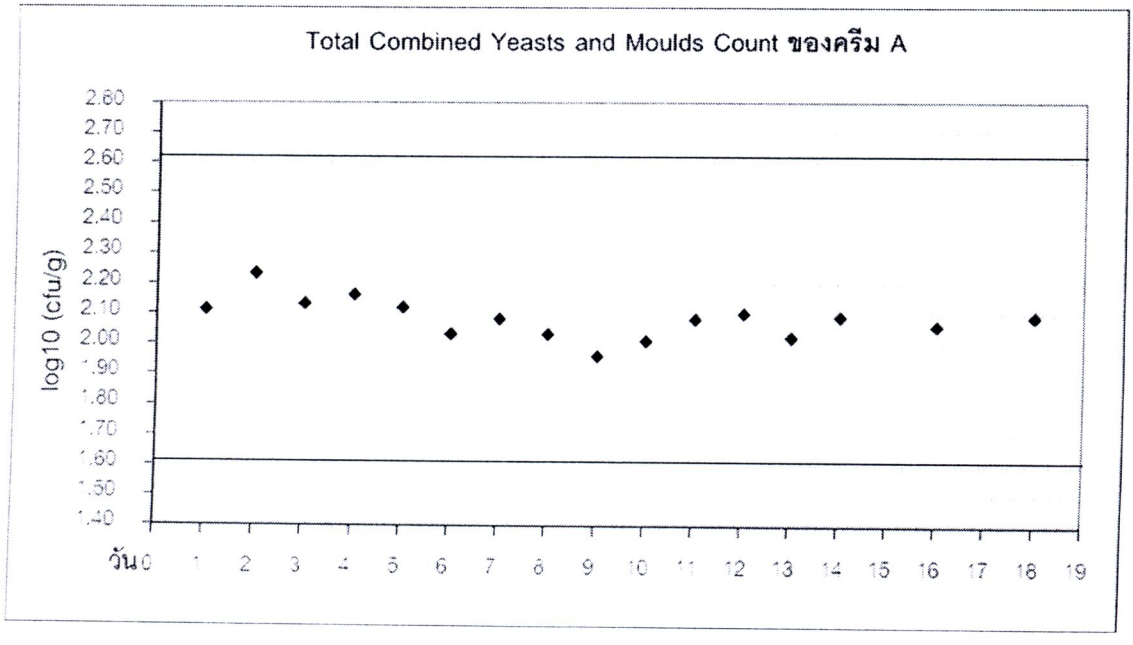


ภาพ 29 ความคงตัวในรายการทดสอบ Total Aerobic Microbial Count ของครีม A

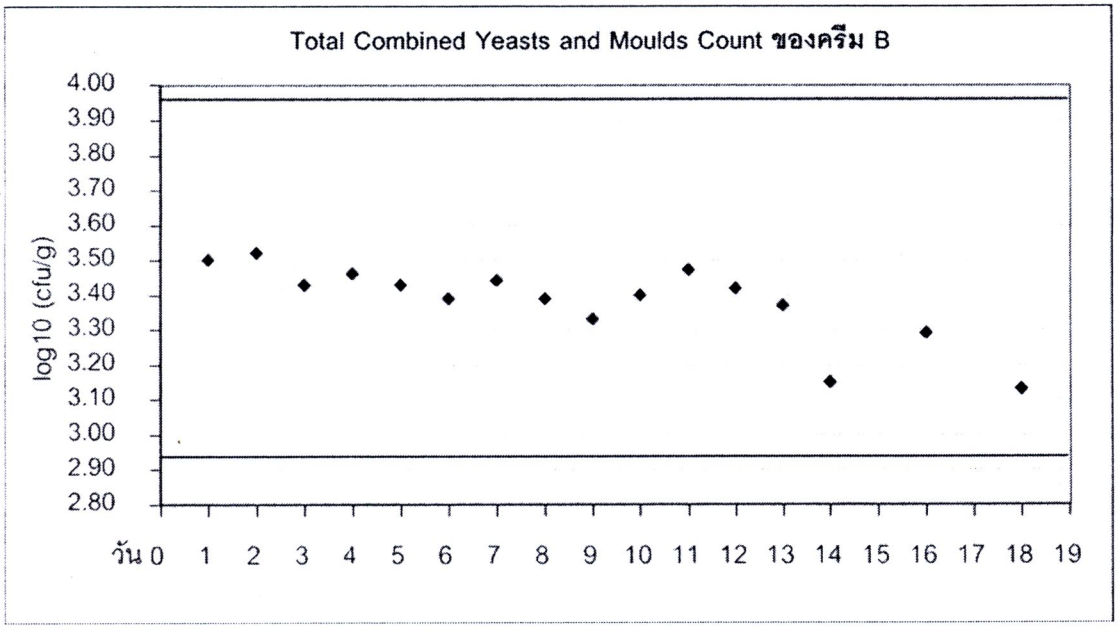


ภาพ 30 ความคงตัวในรายการทดสอบ Total Aerobic Microbial Count ของครีม B

4.2.2 ผลการทดสอบความคงตัวในรายการทดสอบ Total Combined Yeasts and Moulds Count โดยวิธี pour plate ของตัวอย่างทดสอบความชำนาญครีม A และครีม B ทุกวันต่อเนื่องกัน รวม 18 วัน นำผลแต่ละวันมาหาค่าเฉลี่ยของ $\log_{10}$ โดยผลการทดสอบมีค่าอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ $\pm$ 0.5 $\log_{10}$ median ของผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน ซึ่งตัวอย่างทดสอบความชำนาญครีม A มีค่า upper limit เท่ากับ 2.06 และ lower limit เท่ากับ 1.06 และตัวอย่างทดสอบความชำนาญครีม B มีค่า upper limit เท่ากับ 3.96 และ lower limit เท่ากับ 2.96 ดังแสดงค่าเกณฑ์ยอมรับในตาราง 19 พบว่าตัวอย่างทดสอบความชำนาญทั้ง ครีม A และครีม B มีความคงตัวนานถึง 18 วันตลอดช่วงการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส ดังภาพ 31 และ ภาพ 32 ทั้งนี้เนื่องจาก protective effect ของสารที่มีอยู่ในองค์ประกอบของตัวอย่างครีมบำรุงกลางคืน ทำให้จุลินทรีย์ที่ผสมรวมกันในตัวอย่างครีมบำรุงกลางคืนสามารถคงตัวอยู่ได้ รวมทั้งการนำเฉพาะส่วนสปอร์ของเชื้อราที่นำมาใส่ลงในตัวอย่างครีมบำรุงกลางคืน ซึ่งสารกันเสียในกลุ่ม paraben ยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ จึงทำให้ยีสต์และรา สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ตลอดช่วงระยะเวลานาน สอดคล้องกับงานวิจัย ที่พบว่าสารยับยั้งการงอกของสปอร์ ประกอบด้วย phenols และ cresols, parabens, alcohols, glutaraldehyde (Block, 2001)



ภาพ 31 ความคงตัวในรายการทดสอบ Total Combined Yeasts and Moulds Count ของครีม A



ภาพ 32 ความคงตัวในรายการทดสอบ Total Combined Yeasts and Moulds Count **ของครีม** B

4.2.3 ผลการทดสอบความคงตัวทุกวันต่อเนื่องกัน รวม 18 วัน ในรายการทดสอบ Detection of *Staphylococcus aureus*, Detection of *Pseudomonas aeruginosa* และ Detection of *Candida albicans* ของครีม A และครีม B ซึ่งในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนาญครีม A เติม *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas aeruginosa* ลงในตัวอย่างครีมบำรุงกลางคืน ส่วนตัวอย่างทดสอบความชำนาญครีม B เติม *Staphylococcus aureus* และ *Candida albicans* ลงในตัวอย่างครีมบำรุงกลางคืน ประเมินผลการทดสอบความคงตัวโดยผลสอดคล้องกับการเติมจุลินทรีย์ลงในตัวอย่างครีมบำรุงกลางคืน ดังตาราง 20 จากตารางแสดงให้เห็นว่า ความคงตัวของจุลินทรีย์ก่อโรคทั้ง 3 ชนิด คือ *S. aureus*, *P. aeruginosa* และ*C. albicans* มีความคงตัวในตัวอย่างทดสอบความชำนาญทั้งครีม A และครีม B ได้นานถึง 13 วัน โดยเฉพาะ *P. aeruginosa* สามารถคงตัวอยู่ในตัวอย่างทดสอบความชำนาญครีม A ได้นานมากที่สุดถึง 18 วัน ทั้งนี้แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ก่อโรคทั้ง 3 ชนิด สามารถอยู่รอดได้ในครีมบำรุงกลางคืนชนิดน้ำมันในน้ำนี้ สอดคล้องกับการทดลองข้อ 1 และการทดลองข้อ 2 และงานวิจัยที่ตรวจพบจุลินทรีย์ปนเปื้อนในเครื่องสำอางที่ผสม paraben เป็นสารกันเสีย (Flores, 1997; Umbach, 1936)

ตาราง 20 การทดสอบความคงตัวในรายการทดสอบ Detection of *Staphylococcus aureus*, Detection of *Pseudomonas aeruginosa* **และ** Detection of *Candida albicans* **ของครีม** A **และครีม** B

วัน	ผลการทดสอบ					
	Detection of *S. aureus*		Detection of *P. aeruginosa*		Detection of *C.albicans*	
	ครีม A	**ครีมน** B	**ครีม** A	**ครีม** B	**ครีม** A	**ครีม** B
1	**พบ**	**พบ**	**พบ**	ไม่พบ	ไม่พบ	**พบ**
2	**พบ**	**พบ**	**พบ**	ไม่พบ	ไม่พบ	**พบ**
3	**พบ**	**พบ**	**พบ**	ไม่พบ	ไม่พบ	**พบ**
4	**พบ**	**พบ**	**พบ**	ไม่พบ	ไม่พบ	**พบ**
5	**พบ**	**พบ**	**พบ**	ไม่พบ	ไม่พบ	**พบ**
6	**พบ**	**พบ**	**พบ**	ไม่พบ	ไม่พบ	**พบ**
7	**พบ**	**พบ**	**พบ**	ไม่พบ	ไม่พบ	**พบ**
8	**พบ**	**พบ**	**พบ**	ไม่พบ	ไม่พบ	**พบ**
9	**พบ**	**พบ**	**พบ**	ไม่พบ	ไม่พบ	**พบ**
10	**พบ**	**พบ**	**พบ**	ไม่พบ	ไม่พบ	**พบ**
11	**พบ**	**พบ**	**พบ**	ไม่พบ	ไม่พบ	**พบ**
12	**พบ**	**พบ**	**พบ**	ไม่พบ	ไม่พบ	**พบ**
13	**พบ**	**พบ**	**พบ**	ไม่พบ	ไม่พบ	**พบ**
14	ไม่พบ	**พบ**	**พบ**	ไม่พบ	ไม่พบ	**พบ**
16	ไม่พบ	ไม่พบ	**พบ**	ไม่พบ	ไม่พบ	**พบ**
18	ไม่พบ	ไม่พบ	**พบ**	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ

4.3 ผลการทดสอบความคงตัวในสภาวะการขนส่งที่มีผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ แสดงให้เห็น “worst case” ในการขนส่งและระยะเวลาในการขนส่งที่ตัวอย่างทดสอบความชำนาญยังคงมีความคงตัวยอมรับได้ โดยสุ่มตัวอย่างทดสอบความชำนาญครีม A และครีม B ที่เหลือจากการสุ่มทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน ตัวอย่างละ 1 ขวด บรรจุกล่องโฟมและใส่ data logger เพื่อบันทึกและเก็บข้อมูลการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิขณะขนส่ง และใส่

ice pack เพื่อรักษาอุณหภูมิที่ 2-8 องศาเซลเซียส นำส่งไปยังจังหวัดอุดรธานี รวมระยะเวลาขนส่งนาน 21 ชั่วโมง ตั้งแต่เวลา 15.30 น. ของวันที่ 8 พ.ค. 54 ถึง เวลา 12.30 น. ของวันที่ 9 พ.ค. 54 เมื่อตัวอย่างทดสอบความชำนาญส่งกลับมาถึงห้องปฏิบัติการได้ดำเนินการตามรายการทดสอบทั้งหมดทันทีและนำตัวอย่างที่เหลือเก็บรักษาต่อในตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิ เพื่อทดสอบความคงตัวในวันต่อไปจนกระทั่งตัวอย่างหมด

4.3.1 ผลการทดสอบความคงตัวในสภาวะการขนส่ง ในรายการทดสอบ Total Aerobic Microbial Count และ Total Combined Yeasts and Moulds Count โดยเปรียบเทียบกับเกณฑ์ยอมรับ $\pm$ 0.5 $\log_{10}$ median ของผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน คือ upper limit และ lower limit ดังแสดงค่าเกณฑ์ยอมรับในตาราง 19 พบว่าตัวอย่างทดสอบความชำนาญทั้งครีม A และครีม B ที่ผ่านการขนส่งนาน 21 ชั่วโมงและเก็บรักษาต่อที่ตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิ มีความคงตัวทั้ง 2 รายการทดสอบ ดังตาราง 21 และตาราง 22

ตาราง 21 ผลการทดสอบความคงตัวในสภาวะการขนส่งในรายการทดสอบ Total Aerobic Microbial Count **ของครีม** A **และครีม** B

วันที่ทดสอบ	Total Aerobic Microbial Count	
	ครีม A	**ครีม** B
9 พฤษภาคม 2554	3.60	3.97
10 พฤษภาคม 2554	3.85	4.15
11 พฤษภาคม 2554	3.91	4.14
เกณฑ์ยอมรับ*	3.24 – 4.24	3.36 – 4.36
สรุปผล	**ผ่าน**	**ผ่าน**

* เกณฑ์ยอมรับ $\pm$ 0.5 $\log_{10}$ median ของผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน คือ upper limit และ lower limit

ตาราง 22 ผลการทดสอบความคงตัวในสภาวะการขนส่งในรายการทดสอบ Total Combined Yeasts and Moulds Count ของครีม A และครีม B

วันที่ทดสอบ	Total Combined Yeasts and Moulds Count	
	ครีม A	ครีม B
9 พฤษภาคม 2554	2.15	3.50
10 พฤษภาคม 2554	2.23	3.50
11 พฤษภาคม 2554	2.22	3.52
เกณฑ์ยอมรับ	1.60-2.60	2.96-3.96
สรุปผล	**ผ่าน**	**ผ่าน**

* เกณฑ์ยอมรับ $\pm$ 0.5 $\log_{10}$ median ของผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน คือ upper limit และ lower limit

4.3.2 ผลการทดสอบความคงตัวในสภาวะการขนส่ง ในรายการทดสอบ Detection of *Staphylococcus aureus*, Detection of *Pseudomonas aeruginosa* และ Detection of *Candida albicans* ของตัวอย่างทดสอบความชำนาญครีม A และครีม B ประเมินผลการทดสอบความคงตัวโดยผลสอดคล้องกับการเติมจุลินทรีย์ลงในตัวอย่างครีมบำรุงกลางคืน คือในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนาญครีม A เติม *S. aureus* และ *P. aeruginosa* ลงในตัวอย่างครีมบำรุงกลางคืน ส่วนตัวอย่างทดสอบความชำนาญครีม B เติม *S. aureus* และ *C. albicans* ลงในตัวอย่างครีมบำรุงกลางคืน ดังตาราง 23 จากตารางแสดงให้เห็นว่า ตัวอย่างทดสอบความชำนาญทั้งครีม A และครีม B มีความคงตัวของจุลินทรีย์ก่อโรคทั้ง 3 ชนิด คือ *S. aureus*, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* ในตัวอย่างทดสอบความชำนาญที่ผ่านการขนส่งนาน 21 ชั่วโมงและเก็บรักษาต่อในตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิ

ตาราง 23 การทดสอบความคงตัวในสภาวะการขนส่ง รายการทดสอบ Detection of *Staphylococcus aureus*, Detection of *Pseudomonas aeruginosa* **และ** Detection of *Candida albicans* **ของครีม** A **และครีม** B

วัน	ผลการทดสอบ					
	Detection of *S. aureus*		Detection of *P. aeruginosa*		Detection of *C.albicans*	
	ครีม A	**ครีม B**	**ครีม A**	**ครีม B**	**ครีม A**	**ครีม B**
9 พฤษภาคม 2554	**พบ**	**พบ**	**พบ**	ไม่พบ	ไม่พบ	**พบ**
10 พฤษภาคม 2554	**พบ**	**พบ**	**พบ**	ไม่พบ	ไม่พบ	**พบ**
11 พฤษภาคม 2554	**พบ**	**พบ**	**พบ**	ไม่พบ	ไม่พบ	**พบ**
สรุปผล*	**ผ่าน**	**ผ่าน**	**ผ่าน**	**ผ่าน**	**ผ่าน**	**ผ่าน**

* ความคงตัวในรายการทดสอบ detection ผลผ่าน เมื่อตรวจพบจุลินทรีย์ก่อโรคสอดคล้องกับการเติมจุลินทรีย์ลงในตัวอย่างครีม A และครีม B

4.3.3 ผลการเก็บข้อมูลอุณหภูมิของ data logger ที่ใส่ในกล่องโฟมเพื่อบันทึกอุณหภูมิขณะขนส่ง จากห้องปฏิบัติการไปยังจังหวัดอุดรธานี และส่งกลับมาทดสอบความคงตัวยังห้องปฏิบัติการทดสอบทางชีววิทยาและความปลอดภัย สำนักเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย รวมใช้เวลาขนส่งทั้งหมด 21 ชั่วโมง โดย data logger จะบันทึกอุณหภูมิขณะขนส่งตัวอย่างทดสอบความชำนาญทุกๆ 30 นาที ซึ่งเวลาและรายละเอียดในการขนส่งแสดงในตาราง 24 ซึ่งพบว่าการขนส่งตัวอย่างทดสอบความชำนาญโดยการรักษาอุณหภูมิด้วย ice pack สามารถรักษาอุณหภูมิของตัวอย่างทดสอบความชำนาญได้ยาวนานตลอดช่วงการขนส่ง ดังแสดงในภาพ 33 ถึง ภาพ 35

ตาราง 24 สรุปอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงและระยะเวลาขณะขนส่งตัวอย่างทดสอบความชำนาญ

วันที่	เวลา (นาฬิกา)	รายการขนส่ง	อุณหภูมิ ณ. เวลาเริ่มต้น – สิ้นสุด (องศาเซลเซียส)
8 พ.ค. 54	15.30-16.40	บรรจุตัวอย่าง และdata loggerลงกล่องโฟม นำส่งตัวอย่างไปยังท่าอากาศยานกรุงเทพ	11.0-4.0
	17.00-17.40	กล่องโฟมวางอยู่ที่คลังสินค้าท่าอากาศยานกรุงเทพรอลำเลียงขึ้นเครื่องบิน	2.5-1.5
	18.00-20.10	เครื่องบินออกจากท่าอากาศยานกรุงเทพ เวลา 19.00 น. ถึงสนามบินจังหวัดอุดรธานี เวลา 20.05 น.	1.0-0.5
	20.40-23.40	กล่องโฟมวางอยู่ที่คลังสินค้าสนามบินอุดรธานี	0.5-1.0
9 พ.ค. 54	01.00-05.40	กล่องโฟมวางอยู่ที่คลังสินค้าสนามบินอุดรธานีรอลำเลียงขึ้นเครื่องบิน	1.0-2.5
	06.00-8.40	เครื่องบินออกจากสนามบินจังหวัดอุดรธานี เวลา 07.35 น. ถึงท่าอากาศยานกรุงเทพ เวลา 08.35 น.	3.0-4.0
	9.00-11.10	กล่องโฟมวางอยู่ที่คลังสินค้าท่าอากาศยานกรุงเทพ	4.0-5.0
	11.30-12.30	กล่องโฟมนำกลับมายังห้องปฏิบัติการ	5.5

โดยผลการเก็บข้อมูลอุณหภูมิของ data logger ที่ใส่ในกล่องโฟมเพื่อบันทึกอุณหภูมิขณะขนส่ง จากห้องปฏิบัติการไปยังจังหวัดอุดรธานีและส่งกลับมาทดสอบความคงตัวยังห้องปฏิบัติการทดสอบทางชีววิทยาและความปลอดภัย สำนักเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย ทุกๆ 30 นาทีรวมใช้เวลาขนส่งทั้งหมด 21 ชั่วโมง ตั้งแต่วันที่ 8 พ.ค. 54 เวลา 15.30 น. ถึงวันที่ 9 พ.ค.54 เวลา 03.41 น. พบว่าอุณหภูมิต่ำลงถึง 0.5 องศาเซลเซียส ดังแสดงในภาพ 33 และวันที่ 9 พ.ค.54 เวลา 03.41 น.ถึงเวลา 13.41 น. พบว่าอุณหภูมิยังคงอยู่ในช่วง 2-8 องศาเซลเซียส ดังแสดงในภาพ 34

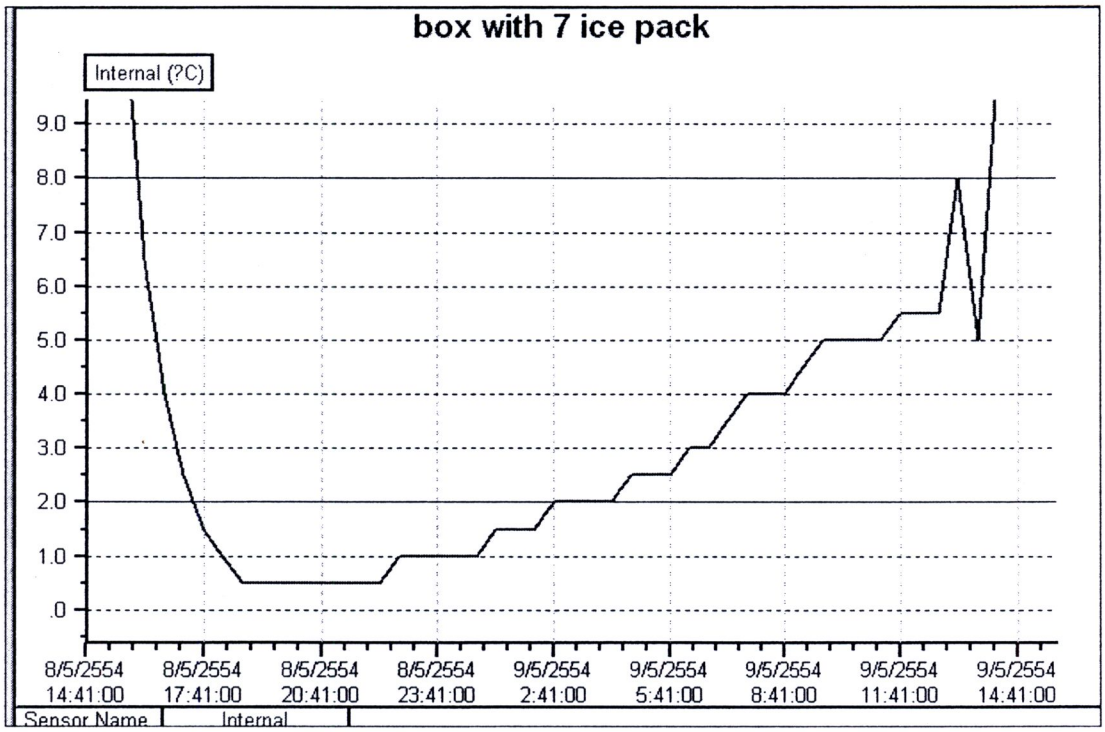
Index	Elapsed Time	Date	Time	Internal (?C)
1640	34 Days 03:30:00	8/5/2554	15:11:00	24.5
1641	34 Days 04:00:00	8/5/2554	15:41:00	11.0
1642	34 Days 04:30:00	8/5/2554	16:11:00	6.5
1643	34 Days 05:00:00	8/5/2554	16:41:00	4.0
1644	34 Days 05:30:00	8/5/2554	17:11:00	2.5
1645	34 Days 06:00:00	8/5/2554	17:41:00	1.5
1646	34 Days 06:30:00	8/5/2554	18:11:00	1.0
1647	34 Days 07:00:00	8/5/2554	18:41:00	.5
1648	34 Days 07:30:00	8/5/2554	19:11:00	.5
1649	34 Days 08:00:00	8/5/2554	19:41:00	.5
1650	34 Days 08:30:00	8/5/2554	20:11:00	.5
1651	34 Days 09:00:00	8/5/2554	20:41:00	.5
1652	34 Days 09:30:00	8/5/2554	21:11:00	.5
1653	34 Days 10:00:00	8/5/2554	21:41:00	.5
1654	34 Days 10:30:00	8/5/2554	22:11:00	.5
1655	34 Days 11:00:00	8/5/2554	22:41:00	1.0
1656	34 Days 11:30:00	8/5/2554	23:11:00	1.0
1657	34 Days 12:00:00	8/5/2554	23:41:00	1.0
1658	34 Days 12:30:00	9/5/2554	0:11:00	1.0
1659	34 Days 13:00:00	9/5/2554	0:41:00	1.0
1660	34 Days 13:30:00	9/5/2554	1:11:00	1.5
1661	34 Days 14:00:00	9/5/2554	1:41:00	1.5
1662	34 Days 14:30:00	9/5/2554	2:11:00	1.5
1663	34 Days 15:00:00	9/5/2554	2:41:00	2.0
1664	34 Days 15:30:00	9/5/2554	3:11:00	2.0
1665	34 Days 16:00:00	9/5/2554	3:41:00	2.0

ภาพ 33 แสดงการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิทุก 30 นาที วันที่ 8 พ.ค. 54 ขณะขนส่งตัวอย่างทดสอบความชำนาญ

Index	Elapsed Time	Date	Time	Internal (?C)
1664	34 Days 15:30:00	9/5/2554	3:11:00	2.0
1665	34 Days 16:00:00	9/5/2554	3:41:00	2.0
1666	34 Days 16:30:00	9/5/2554	4:11:00	2.0
1667	34 Days 17:00:00	9/5/2554	4:41:00	2.5
1668	34 Days 17:30:00	9/5/2554	5:11:00	2.5
1669	34 Days 18:00:00	9/5/2554	5:41:00	2.5
1670	34 Days 18:30:00	9/5/2554	6:11:00	3.0
1671	34 Days 19:00:00	9/5/2554	6:41:00	3.0
1672	34 Days 19:30:00	9/5/2554	7:11:00	3.5
1673	34 Days 20:00:00	9/5/2554	7:41:00	4.0
1674	34 Days 20:30:00	9/5/2554	8:11:00	4.0
1675	34 Days 21:00:00	9/5/2554	8:41:00	4.0
1676	34 Days 21:30:00	9/5/2554	9:11:00	4.5
1677	34 Days 22:00:00	9/5/2554	9:41:00	5.0
1678	34 Days 22:30:00	9/5/2554	10:11:00	5.0
1679	34 Days 23:00:00	9/5/2554	10:41:00	5.0
1680	34 Days 23:30:00	9/5/2554	11:11:00	5.0
1681	35 Days 00:00:00	9/5/2554	11:41:00	5.5
1682	35 Days 00:30:00	9/5/2554	12:11:00	5.5
1683	35 Days 01:00:00	9/5/2554	12:41:00	5.5
1684	35 Days 01:30:00	9/5/2554	13:11:00	8.0
1685	35 Days 02:00:00	9/5/2554	13:41:00	5.0
1686	35 Days 02:30:00	9/5/2554	14:11:00	10.0
1687	35 Days 03:00:00	9/5/2554	14:41:00	22.5
1688	35 Days 03:30:00	9/5/2554	15:11:00	24.5
1689	35 Days 04:00:00	9/5/2554	15:41:00	26.5

ภาพ 34 แสดงการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิทุก 30 นาที วันที่ 9 พ.ค. 54 ขณะขนส่งตัวอย่างทดสอบความชำนาญ

ทั้งนี้ผลการเก็บข้อมูลอุณหภูมิของ data logger ที่ใส่ในกล่องโฟมเพื่อบันทึกอุณหภูมิขณะขนส่ง จากห้องปฏิบัติการไปยังจังหวัดอุดรธานีและส่งกลับมาทดสอบความคงตัวยังห้องปฏิบัติการ ทุกๆ 30 นาทีรวมใช้เวลาขนส่งทั้งหมด 21 ชั่วโมง แสดงในรูปของกราฟอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงในช่วงเกณฑ์ 2-8 องศาเซลเซียส ดังภาพ 35



ภาพ 35 กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิทุก 30 นาทีขณะขนส่งตัวอย่างทดสอบความชำนาญ

และเมื่อเปิดกล่องโฟมเมื่อตัวอย่างถึงห้องปฏิบัติการพบว่า ice pack จำนวน 7 ซอง ทุกซองละลายเหลือครึ่งซองแต่ยังคงรักษาอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 2-8 องศาเซลเซียส ซึ่งเมื่อเปิดกล่องโฟมพบว่ามีอุณหภูมิ 5.5 องศาเซลเซียส ดังภาพ 36

ภาพ 36 แสดงอุณหภูมิเมื่อตัวอย่างทดสอบความชำนาญส่งกลับมาถึงห้องปฏิบัติการ

จากผลการทดสอบความคงตัวในสภาวะการขนส่งที่มีผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ "worst case" จากการขนส่งตัวอย่างทดสอบความชำนาญทางเครื่องบินรวมระยะเวลาขนส่งนาน 21 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าผลการทดสอบความคงตัวผ่านทุกรายการทดสอบเนื่องจากการควบคุมอุณหภูมิด้วย ice pack ของตัวอย่างทดสอบความชำนาญทำให้อุณหภูมิอยู่ในช่วง 2-8 องศาเซลเซียสได้ตลอดระยะเวลาในการขนส่ง ซึ่งการเก็บตัวอย่างทดสอบความชำนาญที่อุณหภูมิต่ำจะสามารถรักษาจุลินทรีย์ให้มีความคงตัวได้นาน 3 วัน สอดคล้องกับการทดลองข้อ 1, การทดลองข้อ 2 และการทดลองข้อ 3