วารสารวิชาการสาธารณสุข
ปีที่ 26 ฉบับเพิ่มเติม 2, กันยายน - ตุลาคม 2560

Journal of Health Science
Vol. 26 Supplement 2, September - October 2017

นิพนธ์ต้นฉบับ *Original Article*

การผลิตตัวอย่างทดสอบความชำนาญด้านเครื่องสำอาง โดยใช้จุลินทรีย์ในรูปผงแห้ง

สิริมา สายรวมญาติ วท.บ., วท.ม.
กนกอร กรีเหลี่ยง วท.บ.
จรรยา มีศรี วท.บ.
สำนักเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

บทคัดย่อ สำนักเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย เป็นหน่วยงานภายใต้กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงของประเทศ และระดับภูมิภาคอาเซียนด้านการทดสอบจุลินทรีย์ปนเปื้อนในเครื่องสำอาง ซึ่งการเป็นผู้ดำเนินการแผนการทดสอบความชำนาญเป็นกิจกรรมของห้องปฏิบัติการอ้างอิง และการให้บริการแผนการทดสอบความชำนาญด้านการทดสอบจุลินทรีย์ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางยังไม่มีหน่วยงานใดให้บริการในประเทศไทย มีให้บริการในต่างประเทศแต่มีค่าใช้จ่ายสูง และรายการทดสอบไม่ตรงกับความต้องการของห้องปฏิบัติการภายในประเทศ สำนักเครื่องสำอางและวัตถุอันตรายจึงเริ่มดำเนินการให้บริการแผนการทดสอบความชำนาญแก่ห้องปฏิบัติการภายในประเทศด้านการทดสอบจุลินทรีย์ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง โดยการผสมเชื้อโดยตรงลงในครีมเบสเครื่องสำอางและแบ่งบรรจุ ส่งให้ห้องปฏิบัติการสมาชิก ซึ่งพบว่าตัวอย่างทดสอบความชำนาญมีความคงตัวเพียง 3 วัน และสมาชิกต้องเดินทางมารับตัวอย่างทดสอบความชำนาญด้วยตนเอง จึงได้พัฒนารูปแบบเชื้อเป็นผงแห้ง เพื่อใช้ในการผลิตตัวอย่างทดสอบความชำนาญให้มีความคงตัวนานมากกว่า 3 วัน และสามารถใช้ระบบโลจิสติกตามปกติได้การดำเนินงานวิจัยมี 2 ขั้นตอน ได้แก่ ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนาญ และขั้นตอนการทดสอบสมบัติตัวอย่างทดสอบความชำนาญ จากผลการทดสอบสมบัติของตัวอย่างทดสอบความชำนาญ พบว่ามีความเป็นเนื้อเดียวกัน และมีความคงตัวเมื่อเก็บรักษาจุลินทรีย์ในรูปผงแห้งที่อุณหภูมิ 2 ถึง 8 องศาเซลเซียส ได้นาน 12 วัน มีรายการทดสอบตรงตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข และมีรูปแบบที่สะดวกในการจัดส่งพัสดุไปรษณีย์ตรงความต้องการของห้องปฏิบัติการสมาชิกภายในประเทศ สามารถนำมาใช้ขยายการให้บริการทดสอบความชำนาญได้

คำสำคัญ: **ตัวอย่างทดสอบความชำนาญ, เครื่องสำอาง, ผงแห้ง**

บทนำ

ความถูกต้องและแม่นยำของผลการทดสอบที่สม่ำเสมอของห้องปฏิบัติการเป็นส่วนที่ห้องปฏิบัติการลูกค้าของห้องปฏิบัติการและหน่วยรับรองห้องปฏิบัติการหรือหน่วยควบคุมตามกฎหมายให้ความสำคัญ ตรวจสอบโดยดำเนินการตามระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการ เช่น ระบบมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025 ซึ่งข้อกำหนดในมาตรฐานดังกล่าวเพื่อเป็นการประกันคุณภาพผลการทดสอบ ห้องปฏิบัติการจะต้องเข้าร่วมในโปรแกรมเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ระหว่างห้องปฏิบัติการหรือการทดสอบความชำนาญ[1] การทดสอบความชำนาญเป็นการใช้ผลของการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ

เพื่อประเมินสมรรถนะของการทดสอบของห้องปฏิบัติการแต่ละแห่ง ดังนั้น การเข้าร่วมโปรแกรมการทดสอบความชำนาญจึงเป็นเครื่องมือที่เป็นรูปธรรมในการตรวจประเมิน และแสดงความน่าเชื่อถือของผลการทดสอบ ในการให้บริการทดสอบความชำนาญ ผู้ดำเนินการจะต้องจัดเตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนาญ (PT Sample) เพื่อส่งให้ห้องปฏิบัติการสมาชิกวิเคราะห์และส่งผลวิเคราะห์ให้ผู้ดำเนินการประเมินความสามารถโดยใช้สถิติที่เหมาะสม ซึ่งผู้ดำเนินการจะต้องทดสอบความใช้ได้ (validation) ของตัวอย่าง ทดสอบความชำนาญในหัวข้อความเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity) และความคงสภาพ (stability) ของตัวอย่างทดสอบด้วย[2] นอกจากนี้จะต้องคำนึงถึงภาชนะบรรจุ การขนส่งและการเก็บรักษาตัวอย่างทดสอบด้วยเพื่อให้ตัวอย่างทดสอบมีสภาพสมบูรณ์และไม่มีผลกระทบต่อผลวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการสมาชิก

ในการประชุมคณะกรรมการเครื่องสำอางอาเซียน (ASEAN Cosmetic Committee, ACC) เมื่อวันที่ 12-13 ธันวาคม 2550 ณ ประเทศเวียดนาม ACC ได้รับรองให้ห้องปฏิบัติการสำนักเครื่องสำอางและวัตถุอันตรายเป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงอาเซียน (ASEAN Cosmetic Reference Laboratory, ACRL) ด้านการทดสอบจุลินทรีย์ปนเปื้อนในเครื่องสำอาง ซึ่งการเป็นผู้ดำเนินการแผนการทดสอบความชำนาญเป็นกิจกรรมหนึ่งของห้องปฏิบัติการอ้างอิงและในประเทศไทยยังไม่มีหน่วยงานใดให้บริการแผนการทดสอบความชำนาญด้านการทดสอบจุลินทรีย์ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง แต่มีให้บริการในต่างประเทศซึ่งมีค่าใช้จ่ายสูง และรายการทดสอบไม่ตรงกับความต้องการของห้องปฏิบัติการภายในประเทศ

ปีงบประมาณ พ.ศ. 2552 สำนักเครื่องสำอางและวัตถุอันตรายจึงเริ่มดำเนินการให้บริการแผนการทดสอบความชำนาญแก่ห้องปฏิบัติการภายในประเทศด้านการทดสอบจุลินทรีย์ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง จำนวน 2 รายการทดสอบ และขยายรายการทดสอบที่ให้บริการอย่างต่อเนื่อง ในปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 ให้บริการจำนวน 6 รายการทดสอบครบตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข การให้บริการตั้งแต่ปีงบประมาณ พ.ศ. 2552 ถึง 2558 เป็นการเตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนาญโดยการผสมเชื้อโดยตรงลงในครีมเบสเครื่องสำอางและแบ่งบรรจุ ส่งให้ห้องปฏิบัติการสมาชิกที่อยู่ในกรุงเทพมหานคร และปริมณฑล ปัญหาคือตัวอย่างทดสอบความชำนาญมีความคงตัวเพียง 3 วัน และสมาชิกต้องเดินทางมารับตัวอย่างทดสอบความชำนาญด้วยตนเองที่สำนักเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย จังหวัดนนทบุรี และนำกลับไปทดสอบภายใน 3 วัน

จากปัญหาดังกล่าว สำนักเครื่องสำอางและวัตถุอันตรายจึงได้พัฒนารูปแบบการเตรียมจุลินทรีย์เป็นรูปผงแห้งเพื่อให้มีความคงตัวยาวนานขึ้น โดยออกแบบการดำเนินงานวิจัย 2 ขั้นตอน ได้แก่ ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนาญ และขั้นตอนการทดสอบสมบัติตัวอย่างทดสอบความชำนาญ โดยขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนาญประกอบด้วยการเตรียมครีมเบสเครื่องสำอางและการเตรียมจุลินทรีย์ในรูปผงแห้ง ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ รา และ จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค 3 ชนิด คือ *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Candida albicans* ใช้ผสมลงในครีมเบสเครื่องสำอางที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันเพื่อให้สอดคล้องกับเกณฑ์กำหนดตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ในราชกิจจานุเบกษา เล่ม 127 ตอนพิเศษ 51ง ลงวันที่ 23 เมษายน 2553 เรื่อง กำหนดลักษณะของเครื่องสำอางที่ห้ามผลิต นำเข้า หรือ ขาย ซึ่งกำหนดให้เครื่องสำอางอื่นนอกเหนือจากเครื่องสำอางรอบดวงตา เครื่องสำอางที่สัมผัสเยื่อบุอ่อน และเครื่องสำอางสำหรับเด็กอายุต่ำกว่า 3 ปี ที่ตรวจพบจำนวนรวมของแบคทีเรีย ยีสต์และราที่เจริญโดยใช้อากาศ (aerobic plate count) ได้ไม่เกิน 1,000 โคโลนีต่อกรัม หรือลูกบาศก์เซนติเมตร และตรวจพบจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคดังต่อไปนี้ คือ *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* และ *Clostridium* spp. (เฉพาะเครื่องสำอาง

ผสมสมุนไพร) เป็นเครื่องสำอางที่ห้ามผลิต นำเข้าหรือขาย[3] เมื่อครีมเบสเครื่องสำอางผสมกับจุลินทรีย์ในรูปผงแห้ง ได้เป็นตัวอย่างทดสอบความชำนาญ และขั้นตอนการทดสอบสมบัติตัวอย่างทดสอบความชำนาญดำเนินการตาม ISO/TS 22117 ได้แก่ ความเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity) ในรายการทดสอบการตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ ประเมินผลทางสถิติโดยใช้ sufficient homogeneity test และทดสอบความคงตัว (stability)[4] ในสภาวะจัดเก็บจุลินทรีย์แห้งที่อุณหภูมิ 2 ถึง 8°C และที่สภาวะเร่งโดยเก็บในตู้บ่มเพาะเชื้อ 40°C

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตตัวอย่างทดสอบความชำนาญให้มีความคงตัวนานมากกว่า 3 วันและสามารถใช้ระบบโลจิสติกตามปกติได้

วิธีการศึกษา

วัสดุ

1. เครื่องมือและอุปกรณ์ กล้องจุลทรรศน์ เครื่องชั่งไฟฟ้าความละเอียด 0.01 กรัม เครื่องตีผสม เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ เครื่องผสมสารละลาย เครื่องผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน เครื่องทำแห้งเยือกแข็ง เครื่องวัดการดูดกลืนแสงตะเกียงบุนเสนอัตโนมัติ ตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 22.5±2.5°C, 32.5±2.5°C และ 40±2°C ตู้ปลอดเชื้อ ตู้อบร้อน ตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิ 2-8°C เตาไฟฟ้า และอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 45°C

2. สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ Aqueous solution of 70% ethanol, Cetrimide agar medium (Cet), CHROMagar™ Candida, Columbia Agar, NP Diluent (pancreatic digest of casein 0.1%+sodium chloride 0.85%), Skim milk, Liquid Paraffin, Mannitol Salt Agar with egg yolk (MSA+Egg yolk), Modified letheen broth (MLB), Polysorbate solution (0.05% polysorbate 80), Potato Dextrose Agar medium (PDA) with antibiotics, Tryptic Soy agar (TSA), Tryptone water (TW) และ TSB-Soy Lecithin-Polysorbate 20, 80 (TSP)

3. เครื่องแก้ว

เครื่องแก้วและอุปกรณ์ทำให้ปราศจากเชื้อโดย autoclave ที่ 121°C นาน 15-20 นาที อุปกรณ์ stainless steel ที่ต้องฆ่าเชื้อก่อนใช้ ได้แก่ spatulas, forceps, กรรไกร อาจใส่ในกระบอก stainless steel หรือห่อด้วย aluminium foil และทำให้ปราศจากเชื้อโดยอบในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 170°C นาน 2 ชั่วโมง สำหรับอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องอื่นๆ เช่น คิวเวตพลาสติก ขนาด 1.6 ml จานเพาะเชื้อ ขนาด 85x100 mm หลอดทดลองชนิดฝาเกลียว ขนาด 16 x 150 และ 27 x 75 mm, ขวดแก้ว ฝาเกลียว ขนาด 250 ml, ice pack, เทอร์โมมิเตอร์ ขนาด 150°C, บีกเกอร์สแตนเลส ขนาด 4000 ml บีกเกอร์แก้ว ขนาด 50, 250, 500, 1000 ml, Pipettes ชนิด graduated ขนาด 10 ml แผ่นผ้าก๊อซหรือสำลี ขวดแก้วสีชา ขนาด 10 ml และฝาจุกยาง Loops และ needles; nichrome และ Platinum fix-volume autopipette: 100, 1000 µl

4. จุลินทรีย์มาตรฐาน (standard cultures)

4.1 จุลินทรีย์เป้าหมาย

- *Candida albicans* ATCC 10231
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

4.2 จุลินทรีย์แข่งขัน

- *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404
- *Candida tropicalis* (แยกเชื้อจากตัวอย่างครีม)
- *Escherichia coli* ATCC 8739
- *Pseudomonas putida* ATCC 17522 (DMST 14732)
- *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990 (DMST 5868)

5. การเตรียมสูตรตำรับสำหรับการทำผงแห้ง

เตรียม skim milk ในน้ำอุ่นคนให้ละลายเบาๆ ไม่ให้เกิดฟอง นำเข้าเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C นาน 5 นาที

ขั้นตอนการศึกษา

1. การเตรียมครีมเบสเครื่องสำอาง

เตรียมตัวอย่างเครื่องสำอางขึ้นเองซึ่งเป็นครีมบำรุงกลางคืน (night cream) ที่ผสมสารกันเสีย คือ methylparaben ร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก และpropylparaben ร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก ซึ่งครีมบำรุงกลางคืนนี้เป็นอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W emulsion) แบ่งบรรจุครีม 50 กรัม ลงในกระปุกพลาสติกปราศจากเชื้อฝาเกลียว[5]

2. การเตรียมเชื้อสำหรับการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

2.1 การเตรียมแบคทีเรีย ยีสต์ และรา เพาะเลี้ยงเชื้อโดยถ่ายเชื้อต่อเนื่องอย่างน้อย 2 ครั้ง สำหรับแบคทีเรียเพาะเลี้ยงบน TSA plate สำหรับยีสต์เพาะเชื้อบน PDA plate บ่มเพาะที่ 32.5±2.5°C, 24 ชั่วโมง ในครั้งที่ 3 ทำการล้างเชื้อ และปรับปริมาณ ด้วย NP diluent ส่วนการเตรียมเชื้อรา ใช้เชื้อที่เพาะเลี้ยงบน PDA บ่มที่ 22.5°C นาน 6-10 วัน ล้างด้วย 10 ml polysorbate solution ปรับปริมาณเชื้อทั้ง 8 ชนิดให้มีปริมาณ 10^7-10^8 cfu/mL โดยใช้วิธีตรวจวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 620 nm.[6]

2.2 ตรวจนับปริมาณเชื้อตั้งต้น โดยเจือจางเชื้อด้วย NP diluent หรือ TW และนับปริมาณด้วยวิธี pour plate ด้วย TSA และ PDA

ใช้ skim milk[7] เป็นสารละลายผสมสำหรับการทำแห้งแบบเยือกแข็ง โดยปรับปริมาณเชื้อตั้งต้น ตามข้อ 2.1 และเจือจางเชื้อที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ 2 รูปแบบ คือ Mix A และ Mix B ด้วย 9 ml skim milk โดยในขั้นตอนการเตรียมเชื้อของ Mix A เติม *S. aureus* และ *P. aeruginosa* ส่วนการเตรียมเชื้อของ Mix B เติม *S. aureus* และ *C. albicans* ตามตารางที่ 1 โดยเตรียมรูปแบบละ 100 ml ลงในบีกเกอร์ แล้วเขย่าให้เข้ากัน

2.3 บรรจุสารละลายผสม ปริมาตร 2.5 ml ในขวดแก้วสีชา ขนาด 10 ml ภายใต้ตู้ปลอดเชื้อ ปิดขวดด้วยจุกยางในระดับครึ่งจุกยาง และนำเข้าเครื่องทำแห้ง

3. การทำแห้ง

กระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง โดยใช้เครื่องทำแห้งยี่ห้อ FTS*SYSTEMS* รุ่น Dura-Stop MP โดยเครื่องจะหาสภาวะการทำแห้งที่เหมาะสมอัตโนมัติ เมื่อเชื้อเป็นผงแห้งแล้ว ปิดจุกยางให้สนิท และครอบทับด้วยฝาโลหะผนึกสนิท จากนั้นนำเก็บในตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิ 2-8°C

4. การเตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนาญ

ละลายเชื้อผงแห้งโดยใส่ TW 5 ml ลงในขวดเชื้อผงแห้ง เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืด นาน 30 นาที จากนั้นเทสารละลายเชื้อทั้งหมดลงในกระปุกครีมเบสเครื่องสำอาง 50 กรัม กวนให้เข้ากันด้วยพายสเตนเลส นาน 3 นาที ได้เป็นตัวอย่างทดสอบความชำนาญ ครีม

ตารางที่ 1 ระดับความเข้มข้นจุลินทรีย์ที่ใช้ผสมเป็น Mix A และ Mix B

จุลินทรีย์	Mix A		Mix B	
	ระดับความเจือจางที่ใช้	ปริมาณ (ml)	ระดับความเจือจางที่ใช้	ปริมาณ (ml)
Aspergillus brasiliensis ATCC 16404	10^{-2}	15	10^{-2}	15
Candida albicans ATCC 10231	-	-	10^{-2}	15
Candida tropicalis (เชื้อจากตัวอย่างครีม)	10^{-2}	15	10^{-4}	15
Escherichia coli ATCC 8739	10^{-2}	15	10^{-2}	15
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027	10^{-3}	15	-	-
Pseudomonas putida ATCC 17522	10^{-2}	15	10^{-2}	15
Staphylococcus aureus ATCC 6538	10^{-3}	15	10^{-3}	15
Staphylococcus epidermidis ATCC 14990	10^{-2}	15	10^{-2}	15

A และครีม B และทดสอบสมบัติตัวอย่างทดสอบความชำนาญต่อไป

5. ทดสอบสมบัติตัวอย่างทดสอบความชำนาญ

5.1 ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน

สุ่มตัวอย่างทดสอบความชำนาญ ครีม A และครีม B ตัวอย่างละ 10 ขวด โดยสุ่มแบบไม่เฉพาะเจาะจง (random) และนำไปทำการทดสอบแบบไม่เฉพาะเจาะจง คือ ไม่เรียงลำดับตามการบรรจุหรือตามลำดับที่ติดฉลาก (random order)[8]

1) ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันเชิงปริมาณในรายการทดสอบ Ttotal Aerobic Plate Count, Yeast and Mould Count โดยตรวจนับปริมาณด้วยวิธี pour plate ทดสอบตาม ISO 21149 และ ISO 16212 ตามลำดับ[9,10] ทำการทดสอบซ้ำ 2 ครั้ง แปลงค่าการตรวจนับให้อยู่ในรูปของ $\log_{10}$ ประเมินผลด้วยวิธีการทางสถิติโดยใช้ sufficient homogeneity test[4]

2) ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันเชิงคุณภาพในการตรวจหาจุลินทรีย์ก่อโรค 3 ชนิด ได้แก่ *P. aeruginosa*, *S. aureus* และ *C. albicans* โดยวิธี Enrichment ทดสอบตาม ISO 22717, ISO 22718 และ ISO 18416 ตามลำดับ[11-13] ประเมินผลโดยเปรียบเทียบผลการตรวจพบจุลินทรีย์สอดคล้องตามที่ผสมหรือไม่ผสมลงในขั้นตอนการเตรียมเชื้อ

5.2 ทดสอบความคงตัวในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8°C

ทดสอบความคงตัวในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8°C โดยสุ่มตัวอย่างทดสอบความชำนาญ ครีม A และครีม B นำตัวอย่างมาทดสอบทั้งในเชิงปริมาณโดยวิธี pour plate และเชิงคุณภาพโดยวิธี enrichment ซึ่งทดสอบเช่นเดียวกับการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน ตัวอย่างละ 5 ขวด[8] ที่ระยะเวลา 2, 5, 9 และ 12 วัน ในรายการทดสอบเชิงปริมาณ และประเมินผลโดยเปรียบเทียบกับค่า ± 0.5 $\log_{10}$ median ของผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน[4] ส่วนการทดสอบความคงตัวสำหรับการตรวจหาจุลินทรีย์เชิงคุณภาพ โดยการตรวจนับเฉพาะ target microorganisms และประเมินผลโดยเปรียบเทียบผลการตรวจพบจุลินทรีย์สอดคล้องตามที่ผสมหรือไม่ผสมลงในขั้นตอนการเตรียม

5.3 ทดสอบความคงตัวในสภาวะเร่ง

การประเมินความคงตัวของเชื้อผงแห้งที่เตรียมขึ้นดูจากการลดลงของปริมาณเชื้อในสภาวะเร่ง หลังเก็บที่อุณหภูมิ 40°C โดยสุ่มเชื้อผงแห้ง Mix A และ Mix B ที่เก็บในตู้อบเพาะเชื้อ 40°C นำมาทดสอบความคงตัวทั้งในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ ตัวอย่างละ 5 ขวดต่อเนื่องกัน เป็นเวลารวม 12 วัน โดยเทียบกับการเก็บเชื้อผงแห้งที่อุณหภูมิ 2-8°C

ผลการศึกษา

1. ลักษณะทางกายภาพของเชื้อหลังการทำเป็นผงแห้ง

ลักษณะทางกายภาพของเชื้อหลังการทำผงแห้ง (ภาพที่ 1) มีลักษณะเป็นก้อนสีขาวแห้ง อัดแน่น ไม่มี รูพรุน เมื่อเคาะไม่เกิดการยุบตัว และไม่แตกเป็นชิ้น ๆ

2. ผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน

2.1 ผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน เชิงปริมาณในรายการทดสอบ Total Aerobic Plate Count และ Yeast and Mould Count ของครีม A และครีม B โดยวิธี pour plate ประเมินผลการทดสอบด้วยวิธีการทางสถิติ โดยใช้

ภาพที่ 1 ลักษณะทางกายภาพหลังการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

Sufficient homogeneity test พบว่า $s^2_{sam} \leq F_1 (0.3\sigma_p)^2 + F_2 s^2_{an}$ พบว่าทั้ง 2 รายการทดสอบอยู่ในเงื่อนไข แสดงว่าตัวอย่างทดสอบความชำนาญครีม A และครีม B มีความเป็นเนื้อเดียวกันเพียงพอ

2.2 ผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันเชิงคุณภาพ ในรายการทดสอบการตรวจหา *S. aureus*, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* โดยวิธี Enrichment ประเมินผลการทดสอบโดยเปรียบเทียบกับการเตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนาญ พบว่าตรวจพบจุลินทรีย์ก่อโรค 2 ชนิด สอดคล้องกับการเตรียมเชื้อ ยกเว้นรายการทดสอบหา *C. albicans* ตรวจไม่พบจุลินทรีย์ในตัวอย่างทดสอบ ดังตารางที่ 2

3. ผลการทดสอบความคงตัวในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8°C

ผลการทดสอบความคงตัวในรายการทดสอบ Total Aerobic Plate Count, Yeast and Mould Count, Detection of *S. aureus*, Detection of *P. aeruginosa* และ Detection of *C. albicans* ของตัวอย่างทดสอบความชำนาญครีม A และครีม B เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8°C โดยสุ่มตัวอย่างมาทดสอบทั้งในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ ตัวอย่างละ 5 ขวด ที่เวลา 2, 5, 9 และ 12 วัน

3.1 ผลการทดสอบความคงตัวในรายการที่ตรวจนับปริมาณ โดยวิธี pour plate แปลงค่าการตรวจนับแต่ละวันให้อยู่ในรูปของ $\log_{10}$ และรายงานเป็นค่าเฉลี่ยจาก 5 ขวด พบว่าผลการทดสอบมีค่าอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ $\pm 0.5 \log_{10}$ median ของผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน ทั้งตัวอย่างทดสอบความชำนาญครีม A และครีม B

3.2 ผลการทดสอบความคงตัวในรายการทดสอบเชิงคุณภาพ สำหรับรายการทดสอบ Detection of *S. aureus*, Detection of *P. aeruginosa* และ Detection of *C. albicans* ของครีม A และครีม B ประเมินผลการทดสอบความคงตัวโดยผลสอดคล้องกับการผสมหรือไม่ผสมในขั้นตอนการเตรียมเชื้อ พบว่าความคงตัวของจุลินทรีย์ก่อโรค 2 ชนิด คือ *S. aureus*, *P. aeruginosa* มีความคงตัวในตัวอย่างทดสอบความชำนาญทั้งครีม A และครีม B ได้นานถึง 12 วัน ยกเว้น *C. albicans* ไม่มีความคงตัวในตัวอย่างทดสอบความชำนาญ ดังตารางที่ 3

4. ผลการทดสอบความคงตัวในสภาวะเร่ง

การประเมินความคงตัวของเชื้อแบบผงแห้งที่เตรียมขึ้น ดูจากการลดลงของปริมาณเชื้อในสภาวะเร่ง หลังเก็บที่อุณหภูมิ 40±2°C โดยสุ่มเชื้อในรูปผงแห้ง Mix A และ Mix B มาทดสอบทั้งในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ ตัวอย่างละ 5 ขวดต่อเนื่องกัน เป็นเวลารวม 12 วัน โดยเทียบกับการเก็บเชื้อผงแห้งที่อุณหภูมิ 2-8°C พบว่าเชื้อผงแห้งที่เก็บรักษาในตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิที่ 2-8°C มีปริมาณเชื้ออยู่ในช่วง $\pm 0.5 \log_{10}$ (cfu/g) ระยะเวลา 12 วันทั้ง 2 รูปแบบ Mix A และ Mix B แต่เชื้อในรูปผงแห้งที่เก็บรักษาในสภาวะบ่มเร่งที่ 40°C มีปริมาณเชื้อลดลงอย่างรวดเร็วและอยู่นอกช่วง $\pm 0.5 \log_{10}$ (cfu/g) ทั้ง 2 รูปแบบ ดังแสดงในภาพที่ 2 และ 3 ตามลำดับ

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันในรายการทดสอบ Detection of *S. aureus*, Detection of *P. aeruginosa* และ Detection of *C. albicans* ของครีม A และครีม B

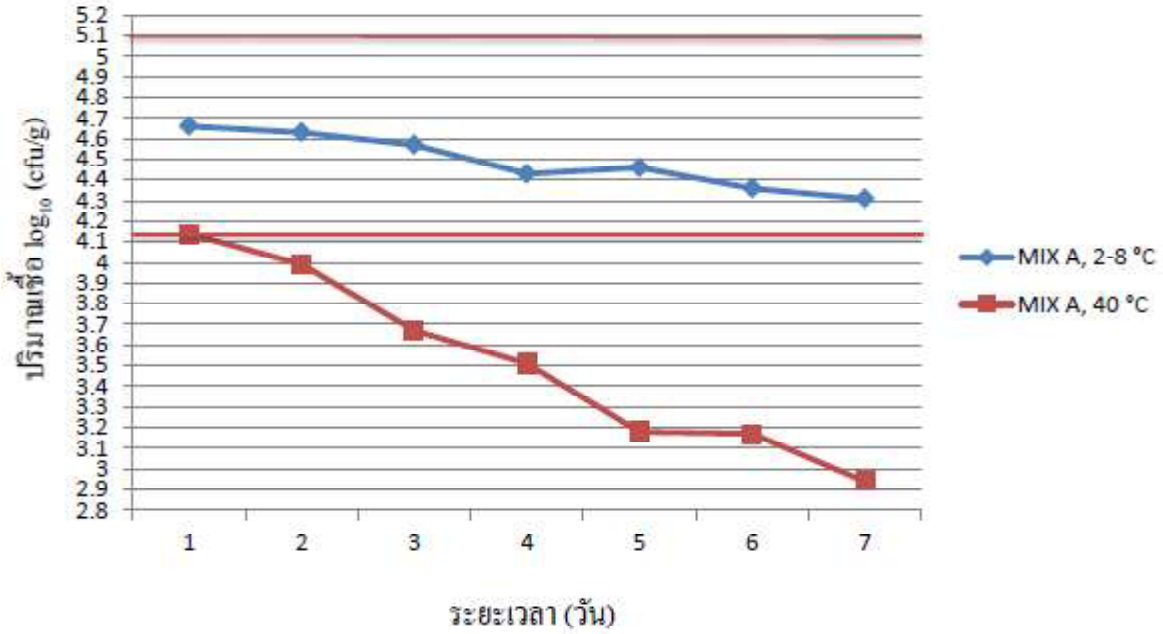
รายการทดสอบ	ครีม A			ครีม B		
	การเติมจุลินทรีย์	ผลการทดสอบ	สรุปผล*	การเติมจุลินทรีย์	ผลการทดสอบ	สรุปผล*
Detection of *S. aureus*	เติม	พบ	ผ่าน	เติม	พบ	ผ่าน
Detection of *P. aeruginosa*	เติม	พบ	ผ่าน	ไม่เติม	ไม่พบ	ผ่าน
Detection of *C. albicans*	ไม่เติม	ไม่พบ	ผ่าน	เติม	ไม่พบ	ไม่ผ่าน

หมายเหตุ: * ตัวอย่างทดสอบความชำนาญมีความเป็นเนื้อเดียวกันเพียงพอในรายการทดสอบ detection เมื่อตรวจพบจุลินทรีย์ก่อโรคสอดคล้องกับการเติมจุลินทรีย์ลงในตัวอย่างครีมเบสเครื่องสำอาง ยกเว้น ใน รายการทดสอบ detection of *C. albicans*

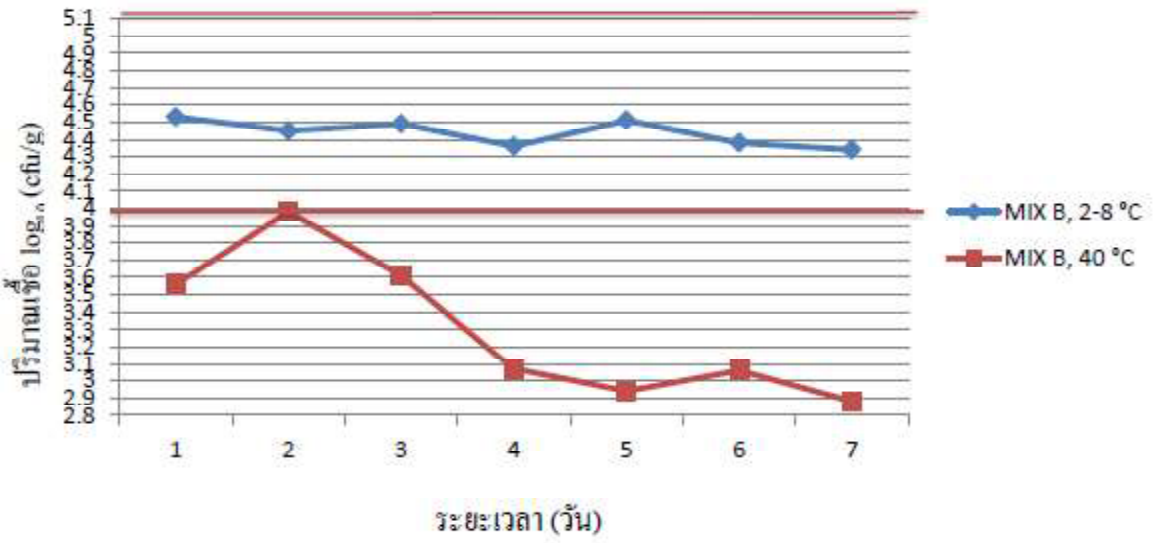
ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความคงตัวในรายการทดสอบเชิงคุณภาพ

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
2	พบ	พบ	พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
5	พบ	พบ	พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
9	พบ	พบ	พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
12	พบ	พบ	พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
สรุปผล	**ผ่าน**	**ผ่าน**	**ผ่าน**	**ผ่าน**	**ผ่าน**	**ไม่ผ่าน**

ภาพที่ 2 ผลการตรวจนับปริมาณเชื้อแบบผงแห้ง Mix A ที่เก็บในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 40°C



ภาพที่ 3 ผลการตรวจนับปริมาณเชื้อแบบผงแห้ง Mix B ที่เก็บในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 40°C



วิจารณ์

จากการศึกษาการผลิตตัวอย่างทดสอบความชำนาญด้านเครื่องสำอางโดยใช้จุลินทรีย์ในรูปผงแห้ง เมื่อดูลักษณะทางกายภาพที่เหมาะสมของเชื้อในรูปผงแห้งที่จัดเตรียมจากการผสมจุลินทรีย์ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็น 2 รูปแบบ Mix A และ Mix B พบว่า ลักษณะทางกายภาพหลังการทำแห้งเป็นก้อนอัดแน่น ไม่มีรูพรุน เมื่อเคาะจะไม่แตกเป็นชิ้น ๆ (ภาพที่ 1) ซึ่งเป็นลักษณะที่ดีที่เรียกว่า uniform distribution[14] เมื่อนำมาจัดเตรียมเป็นตัวอย่างทดสอบความชำนาญ โดยการนำเชื้อในรูปผงแห้งมาละลาย และนำมากวนผสมกับครีมเบสเครื่องสำอางให้เข้ากัน ได้เป็นครีม A และ ครีม B จากนั้น ทดสอบสมบัติของตัวอย่างทดสอบความชำนาญ คือทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน และความคงตัว พบว่า ตัวอย่างทดสอบความชำนาญทั้งครีม A และ ครีม B มีความเป็นเนื้อเดียวกันเพียงพอและมีความคงตัวในรายการทดสอบ Total Aerobic Plate Count, Yeast and Mould Count, Detection of *S. aureus* และ Detection of *P. aeruginosa* มีความคงตัวยาวนานถึง 12 วัน เมื่อเก็บเชื้อในรูปผงแห้งที่ 2-8°C ยกเว้นในรายการทดสอบ Detection of *C. albicans* ไม่มีความเป็นเนื้อเดียวกัน และความคงตัว เนื่องจากตรวจไม่พบเชื้อในตัวอย่างทดสอบความชำนาญทั้งครีม A และครีม B แสดงถึงสูตรตำรับการทำแห้งนั้นไม่เหมาะสมกับ *C. albicans*[15] สำหรับการทดสอบความคงตัวในสภาวะเร่งของเชื้อในรูปผงแห้งที่เตรียมขึ้นหลังเก็บที่อุณหภูมิ 40°C เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อในรูปผงแห้งที่เก็บรักษาในตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิที่ 2-8°C พบว่า เชื้อในรูปผงแห้งที่เก็บรักษาในตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิที่ 2-8°C มีปริมาณเชื้ออยู่ในช่วง $\pm 0.5 \log_{10}$ (cfu/g) ระยะเวลา 12 วันทั้ง 2 รูปแบบ Mix A และ Mix B แต่เชื้อในรูปผงแห้งที่เก็บรักษาในสภาวะบ่มเร่งที่ 40°C มีปริมาณเชื้อลดลงอย่างรวดเร็วและอยู่นอกช่วง $\pm 0.5 \log_{10}$ (cfu/g) ทั้ง 2 รูปแบบ เป็นที่ทราบดีว่าการเก็บรักษาเชื้อในรูปผงแห้งนั้นสามารถเก็บรักษาได้นานถึง 2-3 ปีที่อุณหภูมิห้อง[16, 17] และมีรายงานการศึกษาผลของ skim milk และ saccharose ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้แก่ -20°C, 4°C, room temperature (16-25°C) และ 45°C ของ long-term preservation โดยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง bioluminescence ของ *Photobacterium phosphoreum*[7] ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสามารถเก็บรักษาเชื้อในรูปผงแห้งที่อุณหภูมิห้องได้

จากผลการศึกษาการผลิตตัวอย่างทดสอบความชำนาญโดยใช้เชื้อในรูปผงแห้ง เมื่อเปรียบเทียบกับการเตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนาญรูปแบบเดิม ซึ่งใช้เชื้อในรูปสารละลายใส่ลงไปโดยตรงในครีมเบส แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างทดสอบความชำนาญมีความเป็นเนื้อเดียวกันและมีความคงตัว เมื่อเก็บรักษาตัวอย่างที่อุณหภูมิ 2 ถึง 8°C ได้นานถึง 12 วัน ซึ่งมีความคงตัวมากกว่ารูปแบบเดิมที่มีความคงตัวเพียง 3 วัน ตรงตามวัตถุประสงค์ของการศึกษาทำให้ได้ตัวอย่างทดสอบความชำนาญที่มีความคงตัวนานขึ้น มีรูปแบบที่เหมาะสมสามารถขยายการให้บริการทดสอบความชำนาญด้านจุลชีววิทยาในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางเพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพการทดสอบ มีรายการทดสอบตรงตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข และมีรูปแบบที่สะดวกในการจัดส่งพัสดุไปรษณีย์ตรงความต้องการของห้องปฏิบัติการสมาชิกภายในประเทศ และหากห้องปฏิบัติการสมาชิกไม่ทดสอบทันทีที่ได้รับตัวอย่าง สามารถเก็บรักษาตัวอย่างทดสอบความชำนาญที่ผ่านการขนส่งต่อในตู้เย็นที่ควบคุมอุณหภูมิได้ ทั้งนี้จากผลการทดสอบสภาวะเร่งแสดงให้เห็นว่าในการขนส่งตัวอย่างยังต้องรักษาอุณหภูมิขณะขนส่งตัวอย่างไปยังห้องปฏิบัติการสมาชิกด้วย ice pack อย่างไรก็ตาม จากผลการศึกษาในรายการทดสอบ Detection of *C. albicans* พบว่าไม่สามารถอยู่รอดได้นั้นต้องมี การศึกษาหาสูตรตำรับที่เหมาะสมในการทำผงแห้งของ *C. albicans* และเชื้อแบบผสมรวมให้สามารถอยู่รอดได้หลังการทำแห้งที่อุณหภูมิห้อง เพื่อสะดวกต่อการขนส่งไปยังห้องปฏิบัติการสมาชิกมากยิ่งขึ้นโดยไม่ต้องควบคุมอุณหภูมิ อีกทั้งมีรายการทดสอบครบถ้วนตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. International Standard. ISO/IEC 17025 General Requirement for the Competence of Testing and Calibration Laboratories. 2nd edition. Geneva: International Standard; 2005.
2. International Standard. ISO/IEC 17043 Conformity assessment – General requirements for proficiency testing. Geneva: International Standard; 2010.
3. พระราชบัญญัติเครื่องสำอาง พ.ศ. 2535. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง กำหนดลักษณะของเครื่องสำอางที่ห้ามผลิต นำเข้า หรือขาย พ.ศ. 2553, ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 127, ตอนพิเศษ 51 ง. (ลงวันที่ 23 เมษายน 2553).
4. International Standard. ISO/TS 22117 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Specific requirements and guidance for proficiency testing by interlaboratory comparison. Geneva: International Standard; 2010.
5. พิมพร ลีลาพรพิสิฐ. อิมัลชันทางเครื่องสำอาง. กรุงเทพมหานคร: โอ.เอส.พริ้นติ้ง เฮ้าส์; 2540.
6. International Standard. ISO/DIS 11930 Cosmetics-Microbiology-Efficacy test and evaluation of the preservation of a cosmetic product. Geneva: International Standard; 2010.
7. Tran HT, Chang JW, Kim BY, Yoon YJ, Koo MY, Kim KE, et al. Long-term preservation of high initial bioluminescence of lyophilized *Photobacterium phosphoreum*: Effect of skin milk and saccharose at various temperatures. Korean J Chem Eng 2007;24:1053-57.
8. International Standard. ISO 13528 Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons. Geneva: International Standard; 2005.
9. International Standard. ISO 21149 Cosmetics-Microbiology-Enumeration and detection of aerobic mesophilic bacteria. Geneva: International Standard; 2006.
10. International Standard. ISO 16212 Cosmetics-Microbiology-Enumeration of yeast and mould. Geneva: International Standard; 2008.
11. International Standard. ISO 22717 Cosmetics-Microbiology-Detection of *Pseudomonas aeruginosa*. Geneva: International Standard; 2006.
12. International Standard. ISO 22718 Cosmetics-Microbiology-Detection of *Staphylococcus aureus*. Geneva: International Standard; 2006.
13. International Standard. ISO 18416 Cosmetics-Microbiology-Detection of *Candida albicans*. Geneva: International Standard; 2007.
14. ณัฐกานต์ มิ่งงามทรัพย์, อัศจรรย์ อาเมน และสุภาพร ภูมิอมร. การทำแห้งไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดี่ยวเชื้อเป็น เพื่อใช้เป็นวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานของประเทศ. วารสารวิชาการสาธารณสุข 2559;25:897-907.
15. Lago NB, Romero JAT, Prado NS. Evaluation of the lyophilization culture of *Candida albicans* used in quality certification schemes. Revista Cubana de Higieney Epidemiologia 2014;52:321-9.
16. Rey L, May JC, editors. Freeze-drying/lyophilization of pharmaceutical and biological products. 3rd edition. New York: Marcel Dekker Publisher; 2006.
17. Phillips T. How to freeze dry a bacterial culture (lyophilization). Biotech and Pharmaceutical Industries [Internet]. 2016 [cited 2017 Feb 19]. Available from: https://www.thebalance.com/how-to-freeze-dry-a-bacterial-culture-lyophilization-375685

Abstract: Production of Lyophilized Microorganisms in Cosmetic Product for Proficiency Testing

Sirima Sairuomyart, B.Sc., M.Sc.; Kanok-on Kreelieng, B.Sc.; Junya Meesri, B.Sc.

Bureau of Cosmetics and Hazardous Substances, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Thailand

Journal of Health Science 2017;26:S328-337.

Bureau of Cosmetics and Hazardous Substances, Department of Medical Sciences is appointed to be the ASEAN Cosmetic Reference Laboratory (ACRL) for Microbial Limit Test of cosmetic products. Proficiency testing (PT) is an important activity of ACRL but there is limited for finding the PT provider that fit for purposed. Thus, the bureau is necessary to develope the artificially contaminated cosmetic PT samples. Previously, we faced on the problems of stability of PT sample, only 3 days. This study aimed to get long stability by using the lyophilized microorganisms and sufficiently homogeneity and stability of target microorganisms which conform to the standard. The result found that all levels of target microorganisms in PT sample could be stable until 12 days at 2-8°C and the bulk material was sufficiently homogeneity and stability to be the PT sample.

Key words: **proficiency testing sample, cosmetic, lyophilize**