

ขีดจำกัดจุลินทรีย์ในเครื่องสำอาง

มะลิ วิโรจน์แสงทอง^{1*}

¹ Ph.D. in Microbiology; รองศาสตราจารย์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330

*ติดต่อผู้พิมพ์: มะลิ วิโรจน์แสงทอง คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330

e-mail: mali.w@chula.ac.th

บทคัดย่อ

ขีดจำกัดจุลินทรีย์ในเครื่องสำอาง

มะลิ วิโรจน์แสงทอง^{1*}

ว. เภสัชศาสตร์อีสาน 2564; 17(1): 1-12

รับบทความ : 2 เมษายน 2563

แก้ไขบทความ: 29 มิถุนายน 2563

ตอบรับ: 5 ตุลาคม 2563

เครื่องสำอางเป็นผลิตภัณฑ์ที่ไม่ปราศจากเชื้อ ซึ่งสามารถพบจุลินทรีย์ได้ในขีดจำกัดทั้งปริมาณและชนิด หากปริมาณจุลินทรีย์เกินขีดจำกัด จุลินทรีย์อาจเจริญโดยใช้สารในเครื่องสำอางเป็นอาหารแล้วทำให้ผลิตภัณฑ์เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและเคมี ส่งผลกระทบต่อความคงตัวและการออกฤทธิ์ การปนเปื้อนจุลินทรีย์เกินขีดจำกัดจึงเป็นหนึ่งในปัญหาที่สำคัญในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ข้อกำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์ที่ไม่ปราศจากเชื้อทางจุลชีววิทยาในเภสัชตำรับหรือองค์กรสากล จะค่อนข้างคล้ายกัน คือกำหนดขีดจำกัดทั้งเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ แต่ชื่อวิธีตรวจและจุดเน้นต่างกัน United States Pharmacopeia (USP, edition 42) ใช้คำว่า “ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ปราศจากเชื้อที่ใช้กับผิวหนัง” และเรียกวิธีตรวจหาปริมาณเชื้อว่า “Microbial Enumeration Tests” ในขณะที่ International Organization for Standardization (ISO) 17516: 2014[E] เรียกวิธีตรวจว่า “Microbiological Limits” และใช้คำว่า “เครื่องสำอาง” ส่วน Thai Herbal Pharmacopoeia (THP) 2019 เรียกว่า “Microbial Limit Tests” และใช้คำว่า “ผลิตภัณฑ์ยาไม่ปราศจากเชื้อที่ใช้กับผิวหนังเต็มทั้งที่มีและไม่มีสมุนไพรร” ในขีดจำกัดเชิงปริมาณ USP กำหนดเชื้อทั้งหมดที่เจริญโดยใช้อากาศ และยีสต์และราทั้งหมด 1×10^2 และ 1×10^1 colony forming unit (CFU)/g หรือ ml ของผลิตภัณฑ์ ตามลำดับ ซึ่งปริมาณขีดจำกัดนั้นยอมรับได้มากที่สุด 2 เท่า ทำให้ปริมาณเท่ากับข้อกำหนดของ THP คือเชื้อทั้งหมดที่เจริญโดยใช้อากาศ และยีสต์และราทั้งหมด 2×10^2 CFU/g หรือ ml และยีสต์และราทั้งหมด 2×10^1 CFU/g หรือ ml ของผลิตภัณฑ์ ตามลำดับ ข้อกำหนดของ USP และ THP จึงเข้มงวดกว่าของ ISO ซึ่งกำหนดปริมาณเชื้อทั้งหมดที่เจริญโดยใช้อากาศ รวมกันกับยีสต์และรา 1×10^3 CFU/g หรือ ml ของผลิตภัณฑ์ ส่วนขีดจำกัดเชิงคุณภาพใน ISO 18415:2017[E], USP และ THP คือเชื้อเฉพาะที่ห้ามพบในเครื่องสำอาง ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* นอกจากนี้ ISO ยังกำหนดห้ามพบ *Candida albicans* และ *Escherichia coli* ในขณะที่กระทรวงสาธารณสุขมีประกาศ (พ.ศ. 2559) กำหนดลักษณะของเครื่องสำอางเกี่ยวกับเชื้อจุลินทรีย์ สอดคล้องกับข้อกำหนดที่กล่าวมา แต่เพิ่มเชื้อห้ามพบในเครื่องสำอางที่ผสมสมุนไพรรคือ *Clostridium* spp. วิธีตรวจปริมาณเชื้อและเชื้อเฉพาะในผลิตภัณฑ์จะแตกต่างกันในแต่ละมาตรฐาน บทความนี้จะกล่าวถึงข้อกำหนดของ ISO เป็นหลัก การประเมินความคงตัวและความเสี่ยงของเครื่องสำอางทางจุลชีววิทยาเป็นหนึ่งใน การประกันคุณภาพผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ที่มีความเสี่ยงต่ำในการปนเปื้อนจุลินทรีย์และปลอดภัยต่อผู้บริโภคจะช่วยเพิ่มคุณภาพผลิตภัณฑ์และลดความจำเป็นในการตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ในเครื่องสำอาง

คำสำคัญ: ข้อกำหนดมาตรฐาน, เครื่องสำอาง, ขีดจำกัดจุลินทรีย์, เชื้อห้ามพบ, การตรวจหาปริมาณเชื้อ



Microbiological Limits in Cosmetics

Mali Wirotasangthong^{1*}

¹ Ph.D. in Microbiology; Associated Professor, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University,
Wangmai, Pathumwan, Bangkok 10330 Thailand

* **Corresponding author:** Mali Wirotasangthong, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University,
Wangmai, Pathumwan, Bangkok 10330 Thailand
e-mail: mali.w@chula.ac.th

Abstract

Microbiological Limits in Cosmetics

Mali Wirotasangthong^{1*}

IJPS, 2021; 17(1) : 1-12

Received: 2 April 2020

Revised: 29 June 2020

Accepted: 5 October 2020

Cosmetics are non-sterile products which can be contaminated with microorganisms in limit numbers and types. If the numbers of microorganisms are excess, the microbes may grow by using ingredients in the products causing physicochemical changes and finally loss in product stability and activity. Excessive microbial contamination is a major problem in cosmetic industry. Standard requirements of United States Pharmacopeia (USP) edition 42, International Organization for Standardization (ISO) 17516: 2014[E] and Thai Herbal Pharmacopoeia (THP) 2019 for microbiological investigations in non-sterile products are quite similar in quantitative and qualitative aspects. However, the names of the test method and test focus are different. The requirement of USP concentrates on “non-sterile products for skin” and “Microbial Enumeration Tests” are the method names, while ISO 17516: 2014[E] uses the method name “Microbiological Limits” and focuses on “cosmetics”. The requirement of THP emphasizes on “non-sterile pharmaceutical products with and without herbs for intact skin” and “Microbial Limit Tests” are the test names. In quantitative aspect, USP requirements for total aerobic microbial count (TAMC) and total combined yeasts and molds count (TYMC) are $\leq 1 \times 10^2$ and $\leq 1 \times 10^1$ colony forming unit (CFU)/g or ml of product, respectively. The maximum acceptable count is 2-fold which make the numbers are equal to those of the THP (TAMC and TYMC $\leq 2 \times 10^2$ and $\leq 2 \times 10^1$ CFU/g or ml of product, respectively). Consequently, the requirements of USP and THP are more strict than that of ISO 17516: 2014[E] which combines TAMC and TYMC into $\leq 1 \times 10^3$ CFU/g or ml of product. In qualitative aspect, ISO 18415: 2017[E], USP and THP requirements for undesirable specific microorganisms are *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. Additionally, ISO requires more undesirable microorganisms which are *Candida albicans* and *Escherichia coli*. The cosmetic requirement for microbiology in an announcement B.E. 2559 of the Ministry of Public Health harmonizes with the aforementioned Pharmacopoeias and ISO except *Clostridium* spp. is an undesirably added microorganism in products with herb. The methods of microbial enumerations and specific microorganism determinations are different in each standard. This article will focus on the methods of ISO requirement. The evaluations of cosmetic products in microbiological stability and risk are the quality assurances, especially products with low microbiological risk and safe for users would increase the product quality and decrease the necessity in microbial investigation in cosmetics.

Keywords: standard requirement, cosmetics, microbial limit, microbial enumeration, undesirable microorganisms

บทนำ

เครื่องสำอางเป็นผลิตภัณฑ์ที่ไม่ปราศจากเชื้อ (non-sterile product) ตามข้อกำหนดของ United States Pharmacopeia (USP) edition 42 (USP, 2019) ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ปราศจากเชื้อสามารถพบการปนเปื้อนจุลินทรีย์ได้ในขวดจุ่ม และผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางมักอยู่ในภาชนะที่ใช้ได้หลายครั้ง (multi-dose container) จึงจำเป็นต้องใส่สารกันเสีย (preservative) ในผลิตภัณฑ์ ดังนั้นหากการปนเปื้อนจุลินทรีย์เกินขีดจำกัด และสารกันเสียไม่มีประสิทธิภาพ จุลินทรีย์เหล่านั้นอาจมีชีวิตรอดและใช้สารในเครื่องสำอางเป็นอาหารเพื่อเจริญและเพิ่มจำนวน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพ และคุณสมบัติทางเคมีของผลิตภัณฑ์ได้ เช่น กลิ่นและสีเปลี่ยนไป การตกตะกอนและการแยกชั้น pH เปลี่ยนไป เกิดกรดและแก๊ส สารถูกใช้และแปรสภาพไป ส่งผลกระทบต่อความคงตัวและการออกฤทธิ์ของสารสำคัญในเครื่องสำอาง การปนเปื้อนจุลินทรีย์ในเครื่องสำอางเกิดขึ้นได้ทั้งในวัตถุดิบก่อนผลิต สารระหว่างการผลิต และผลิตภัณฑ์ รวมทั้งเมื่อถึงมือผู้บริโภค ก็มีโอกาที่จะเกิดการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในระหว่างการเปิดใช้แต่ละครั้ง แม้ว่าจะมีสารกันเสียในผลิตภัณฑ์ หากผู้ใช้ไม่มีสุขอนามัย ใช้มือที่ไม่สะอาดสัมผัสส่วนของเครื่องสำอางที่ยังไม่ใช้ ก็มีโอกาสมากที่จะทำให้ผลิตภัณฑ์นั้นปนเปื้อนจุลินทรีย์เกินขีดจำกัด

รายงานจาก database ชื่อ European Union Rapid Information System for dangerous non- food products (Rapex) ปี ค. ศ. 2005 - 2018 (Michalek *et al.*, 2019) เกี่ยวกับการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในเครื่องสำอางที่เกิดจากการผลิต โดยเป็นผลิตภัณฑ์ที่จำหน่ายในยุโรป 31 ประเทศ พบรายงานการปนเปื้อนจุลินทรีย์ 104 ผลิตภัณฑ์ เป็นผลิตภัณฑ์สำหรับเด็ก 20 ผลิตภัณฑ์ การปนเปื้อนจุลินทรีย์ 118 ชนิด ส่วนใหญ่ (ร้อยละ 59.62) เป็นแบคทีเรียแกรมลบชนิดแท่งสั้น (Gram-negative rod-shaped bacteria) ซึ่งเป็น *Pseudomonas* spp. มากที่สุด (ร้อยละ 35.58) และ *Enterobacter* spp. (ร้อยละ 11.54) และส่วนใหญ่เป็นผลิตภัณฑ์ที่ผลิตในยุโรป ในการปนเปื้อนพบเชื้อก่อโรคทางผิวหนังซึ่งเป็นเชื้อห้ามพบในเครื่องสำอางตามมาตรฐาน International Organization for Standardization (ISO) 18415: 2017[E] (ISO 18415, 2017) ได้แก่ *P. aeruginosa* (ร้อยละ 28.84), *Staphylococcus aureus* (ร้อยละ 3.85) และ *Candida albicans* (ร้อยละ 1.92)

Bashir และ Lambert (Bashir and Lambert, 2019) รายงานการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในเครื่องสำอาง 5 ประเภท ได้แก่ ลิปสติก ลิปกอสส อายไลเนอร์ มาสคาร่า และบิต์เบลนเดอร์ (beauty blender) จำนวน 467 ผลิตภัณฑ์ ที่เกิดขึ้นจากการใช้ของผู้บริโภคในประเทศอังกฤษ ส่วนใหญ่ (ร้อยละ 79-90) เป็นแบคทีเรียในปริมาณ $10^2 - 10^3$ colony forming unit (CFU)/ml เครื่องสำอางประเภทบิต์เบลนเดอร์ พบเชื้อมากกว่า 10^6 CFU/ml ซึ่งเกินขีดจำกัดเชิงปริมาณ (ขีดจำกัดเชิงปริมาณคือ ปริมาณเชื้อมากกว่า 10^3 CFU/ml) และพบเกินขีดจำกัดเชิงคุณภาพ คือ เชื้อห้ามพบในเครื่องสำอางทั้ง 5 ประเภทตามมาตรฐาน ISO 18415: 2017[E] (ISO 18415, 2017) ได้แก่ *P. aeruginosa*, *S. aureus* และ *Escherichia coli*

การปนเปื้อนจุลินทรีย์เกินขีดจำกัดเป็นหนึ่งในปัญหาที่สำคัญในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง การกำหนดมาตรฐานเครื่องสำอางทางจุลชีววิทยา เช่น การตรวจหาปริมาณเชื้อรวมและเชื้อเฉพาะที่ไม่ควรพบในเครื่องสำอาง รวมทั้งการประเมินความคงตัวและความเสี่ยงของเครื่องสำอางทางจุลชีววิทยา จึงเป็นการควบคุมคุณภาพเครื่องสำอางทางจุลชีววิทยาและคุ้มครองผู้บริโภคให้ปลอดภัยจากการใช้เครื่องสำอาง ในบทความนี้จะกล่าวถึงข้อกำหนดมาตรฐานเครื่องสำอางทางจุลชีววิทยา การตรวจหาปริมาณเชื้อในเครื่องสำอาง การตรวจหาเชื้อเฉพาะในเครื่องสำอาง การประเมินความคงตัวและความเสี่ยงของเครื่องสำอางทางจุลชีววิทยา

ข้อกำหนดมาตรฐานเครื่องสำอางทางจุลชีววิทยา

เกสซ์ตำรับต่างๆ มีข้อกำหนดมาตรฐานเครื่องสำอางทางจุลชีววิทยาที่ค่อนข้างคล้ายกัน คือ กำหนดขีดจำกัดทั้งเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ แต่อาจมีข้อวิธีตรวจหาปริมาณเชื้อในเครื่องสำอางและจุดเน้นต่างกัน (ตารางที่ 1) เช่น USP ใช้คำว่า “ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ปราศจากเชื้อที่ใช้กับผิวหนัง” ไม่เน้นเครื่องสำอางและเรียกวิธีตรวจหาปริมาณเชื้อว่า “Microbial Enumeration Tests” ในขณะที่ ISO 17516: 2014[E] (ISO 17516, 2014) เรียกวิธีตรวจหาว่า “Microbiological Limits” และใช้คำว่า “เครื่องสำอาง” ชัดเจนกว่า USP ส่วน Thai Herbal Pharmacopoeia (THP) 2019 (THP, 2019) เรียกว่า “Microbial Limit Tests” และใช้คำว่า “ผลิตภัณฑ์ยาไม่ปราศจากเชื้อที่ใช้กับผิวหนังเต็มทั้งที่มีและไม่มีสมุนไพรร” ในการกำหนดขีดจำกัดปริมาณเชื้อในเครื่องสำอาง ISO กำหนดเป็นเชื้อรวมแบคทีเรีย

ยีสต์และรา ในขณะที่ USP และ THP จะแยกนับแบคทีเรีย ออกจากยีสต์และรา ในขีดจำกัดเชิงปริมาณ USP กำหนดเชื้อทั้งหมดที่เจริญโดยใช้อากาศ และยีสต์และราทั้งหมด $\leq 1 \times 10^2$ และ $\leq 1 \times 10^1$ CFU/g หรือ ml ของผลิตภัณฑ์ ตามลำดับ ซึ่งปริมาณขีดจำกัดนั้นยอมรับได้มากที่สุด 2 เท่า ทำให้ปริมาณเท่ากับข้อกำหนดของ THP คือ เชื้อทั้งหมดที่เจริญโดยใช้อากาศ และยีสต์และราทั้งหมด $\leq 2 \times 10^2$ CFU/g หรือ ml และยีสต์และราทั้งหมด $\leq 2 \times 10^1$ CFU/g หรือ ml ของผลิตภัณฑ์ ตามลำดับ

ข้อกำหนดของ USP และ THP จึงเข้มงวดกว่าของ ISO ซึ่งกำหนดปริมาณเชื้อทั้งหมดที่เจริญโดยใช้อากาศ รวมกันกับยีสต์และรา $\leq 1 \times 10^3$ CFU/g หรือ ml ของผลิตภัณฑ์ อย่างไรก็ตามก็ตีกรณีเป็นเครื่องสำอางที่ใช้รอบดวงตา เยื่อบุอ่อนและที่ใช้สำหรับเด็กอายุต่ำกว่า 3 ปี ISO มีข้อกำหนดที่เข้มงวดมากขึ้น คือต้องมีจำนวนรวมของแบคทีเรีย ยีสต์และราที่เจริญโดยใช้อากาศ $\leq 1 \times 10^2$ CFU/g หรือ ml

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบข้อกำหนดมาตรฐานเครื่องสำอางทางจุลชีววิทยา ในเภสัชตำรับต่างๆ

	International Organization for Standardization (ISO) 17516: 2014 [E]	United State Pharmacopeia(USP) 42, 2019	Thai Herbal Pharmacopoeia (THP) 2019
ชื่อวิธีตรวจหาปริมาณเชื้อ	Microbiological Limits	Microbial Enumeration Tests	Microbial Limit Tests
จุดเน้น	เครื่องสำอาง	ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ปราศจากเชื้อที่ใช้กับผิวหนัง	ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ปราศจากเชื้อที่ใช้กับผิวหนังเต็มทั้งที่มีและไม่มีสუნไพร
ขีดจำกัดปริมาณ			
-เชื้อเจริญโดยใช้อากาศ	$\leq 1^* \times 10^3$	$\leq 1 \times 10^2$	$\leq 2, 5^{**} \times 10^2$
-ยีสต์และรา (CFU ^{***} /g, ml)	นับรวมกับ*	$\leq 1 \times 10^1$	$\leq 2, 5^{**} \times 10^1$
เชื้อที่ห้ามพบ ใน 1 g หรือ ml	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Candida albicans</i> <i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i> ,
ความทันสมัยของข้อมูล	ไม่แน่นอน	ปรับปรุงข้อมูลทุกปี	ปรับปรุงข้อมูลทุกปี

* จำนวนรวมเชื้อเจริญโดยใช้อากาศรวมกับยีสต์และรา ถ้าเป็นเครื่องสำอางที่ใช้รอบดวงตา เยื่อบุอ่อนและที่ใช้สำหรับเด็กอายุต่ำกว่า 3 ปี ต้องมีจำนวนรวมของแบคทีเรีย ยีสต์และราที่เจริญโดยใช้อากาศ $\leq 1 \times 10^2$ CFU/g, ml

** ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ปราศจากเชื้อที่ใช้กับผิวหนังเต็ม เชื้อเจริญโดยใช้อากาศ $\leq 2 \times 10^2$ CFU/g, ml ยีสต์และรา $\leq 2 \times 10^1$ CFU/g, ml ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ปราศจากเชื้อที่ใช้กับผิวหนังเต็มที่มีสუნไพร เชื้อเจริญโดยใช้อากาศ $\leq 5 \times 10^2$ CFU/g หรือ ml ยีสต์และรา $\leq 5 \times 10^1$ CFU/g, ml

*** CFU = colony forming unit



ส่วนการระบุชนิดของเชื้อห้ามพบใน ISO, USP และ THP จะเหมือนกันตรงที่ห้ามพบ *P. aeruginosa* และ *S. aureus* แตกต่างกันที่ ISO เพิ่ม *C. albicans* และ *E. coli*

ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2559 เรื่อง กำหนดลักษณะของเครื่องสำอางที่ห้ามผลิต นำเข้า หรือขาย มีข้อกำหนดเกี่ยวกับเชื้อจุลินทรีย์ ที่ผสมผสานหลายเภสัชตำรับที่กล่าวมาเข้าด้วยกัน ได้แก่

1. เครื่องสำอางต้องไม่ตรวจพบเชื้อก่อโรค ได้แก่ *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. albicans* และ *Clostridium* spp. (เฉพาะเครื่องสำอางที่ผสมสมุนไพร) ในข้อกำหนด ISO จะต้องตรวจ *E. coli* ด้วย

2. เครื่องสำอางที่ใช้อบดวงตา เครื่องสำอางที่สัมผัสกับเยื่อบุอ่อนและเครื่องสำอางสำหรับเด็กอายุต่ำกว่า 3 ปี ต้องมีจำนวนรวมของแบคทีเรีย ยีสต์และราที่เจริญโดยใช้อากาศ (total aerobic plate count) ไม่เกิน 500 โคโลนีต่อกรัม (CFU/g) หรือ มิลลิลิตร ส่วนเครื่องสำอางอื่นๆ นอกเหนือจากนี้ต้องมีจำนวนรวมของแบคทีเรีย ยีสต์และราที่เจริญโดยใช้อากาศ ไม่เกิน 1,000 โคโลนีต่อกรัม (CFU/g) หรือ มิลลิลิตร

3. วิธีการตรวจเชื้อจุลินทรีย์ที่กล่าวถึงในข้อ 1 กับ 2 เป็นวิธีที่ใช้โดยมีที่มาจาก ISO หรือ USP หรือวิธีอื่นที่เป็นมาตรฐานสากลที่เป็นที่ยอมรับ

ที่น่าสนใจคือวิธี "Microbiological Limits" ใน ISO 17516: 2014[E] (ISO 17516, 2014) กล่าวว่าเครื่องสำอางที่มีความเสี่ยงต่ำในการปนเปื้อนจุลินทรีย์ ไม่จำเป็นต้องตรวจหาปริมาณและชนิดของเชื้อ ส่วนเครื่องสำอางที่มีความเสี่ยงต่ำมีอะไรบ้าง จะขอกล่าวในท้ายบทนี้

การตรวจหาปริมาณเชื้อในเครื่องสำอาง

การควบคุมคุณภาพของเครื่องสำอางเชิงปริมาณคือ การตรวจหาปริมาณเชื้อในเครื่องสำอางและการประเมินประสิทธิภาพของสารกันเสียในเครื่องสำอางในที่นี้ขอกล่าวเฉพาะการตรวจหาปริมาณเชื้อในเครื่องสำอาง ตาม ISO 21149: 2017[E] (ISO 21149, 2017) เป็นการตรวจและนับจำนวนแบคทีเรียที่เจริญในที่ที่มีอากาศและในอุณหภูมิปานกลาง คือ 30°ซ - 45°ซ (aerobic mesophilic bacteria) ในเครื่องสำอางและ ISO 16212: 2017[E] (ISO 16212, 2017) เป็นการตรวจและนับจำนวนยีสต์และราในเครื่องสำอาง

วิธีตรวจหาจำนวนแบคทีเรียที่เจริญในที่ที่มีอากาศและในอุณหภูมิปานกลาง (ISO 21149, 2017) ได้แก่

1. Plate count method
2. Membrane filtration method
3. Detection of bacteria by enrichment

การตรวจหาปริมาณแบคทีเรียโดยวิธี plate count method และ membrane filtration method เป็นการหาเชิงปริมาณ ในขณะที่ detection of bacteria by enrichment เป็นการหาเชิงคุณภาพ คือบอกได้ว่าพบแบคทีเรียหรือไม่พบเท่านั้น ซึ่งวิธี detection of bacteria by enrichment นี้มีแต่เฉพาะใน ISO เท่านั้น ไม่มีใน USP (USP, 2019) และ THP (THP, 2019) ข้อแตกต่างอีกข้อคือปริมาณตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจใน ISO ใช้เพียง 1 กรัมหรือมิลลิลิตร ในขณะที่ใน USP และ THP ใช้ปริมาณตัวอย่าง 10 กรัมหรือมิลลิลิตร ทั้งนี้เนื่องจากมาจากเครื่องสำอางส่วนใหญ่มีราคาแพงและปริมาณต่อภาชนะน้อย และใน USP และ THP ไม่ได้ระบุการตรวจเครื่องสำอาง แต่การตรวจเครื่องสำอางสามารถอ้างอิงมาตรฐาน USP และ THP ได้ ในฐานะผลิตภัณฑ์ไม่ปราศจากเชื้อที่ใช้กับผิวหนังเติม การตรวจหาปริมาณแบคทีเรียโดยวิธี plate count method เป็นวิธีที่นิยมมากที่สุดเนื่องจากค่าใช้จ่ายถูก ทำได้ง่าย และหาปริมาณได้ โดยการเจือจางครั้งละ 10 เท่าอย่างต่อเนื่อง (serial 10-fold dilution) ในสารเจือจาง (diluent) ที่เหมาะสม แล้วนำแต่ละสารละลายเจือจาง (dilution) มาตรวจหาปริมาณแบคทีเรียโดยวิธี pour plate หรือ spread plate ซึ่งวิธี pour plate จะเป็นที่ยอมรับมากกว่า เนื่องจากใช้ปริมาตรตัวอย่างมากกว่าและมีระดับที่สามารถตรวจพบได้ (limit detection) ต่ำกว่าวิธี spread plate การตรวจหาปริมาณแบคทีเรียตาม ISO 21149: 2017[E] (ISO 21149, 2017) ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ soybean-casein digest agar (SCDA) หรือ tryptic soy agar (TSA) หรืออาหารเลี้ยงเชื้ออื่นที่เหมาะสม สามารถหาได้จาก Annex C ใน ISO 21149: 2017[E] ส่วนระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้บ่ม คือ 32.5°ซ ± 2.5°ซ และ 72 ชม. ± 6 ชม. เกณฑ์ในการนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย ISO ให้นับเฉพาะ plates ที่มีเชื้อ 30-300 CFU/plate ส่วน USP ให้นับเฉพาะ plates ที่มีเชื้อ ≤ 250 CFU/plate

วิธีตรวจและนับจำนวนยีสต์และราในเครื่องสำอางตาม ISO 16212: 2017[E] (ISO 16212, 2017) ใช้วิธี plate count method หรือ membrane filtration method คล้ายกับการตรวจหาปริมาณแบคทีเรียใน ISO 21149: 2017[E] ต่างกันที่ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ ระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้บ่ม และวิธีการก็คล้ายกับการตรวจหาปริมาณยีสต์และราใน USP (USP, 2019) และ THP (THP, 2019) ต่างกันที่ปริมาณตัวอย่างเช่นกัน

การตรวจหาปริมาณยีสต์และราตาม ISO 16212: 2017[E] (ISO 16212, 2017) ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose agar (SDA) หรือ Sabouraud dextrose chloramphenicol agar (SDCA) หรือ อาหารเลี้ยงเชื้ออื่นที่เหมาะสม สามารถหาได้จาก Annex C ใน ISO 16212: 2017[E] ส่วนระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้บ่ม คือ $25^{\circ}\text{C} \pm 2.5^{\circ}\text{C}$, 3-5 วัน สำหรับ SDCA หรืออาหารเลี้ยงเชื้ออื่นที่มียาปฏิชีวนะ และ $22.5^{\circ}\text{C} \pm 2.5^{\circ}\text{C}$, 5-7 วัน สำหรับ SDA หรืออาหารเลี้ยงเชื้ออื่นที่ไม่มียาปฏิชีวนะ เกณฑ์ในการนับจำนวนโคโลนีของ ISO ให้เน้นเฉพาะ plates ที่มียีสต์ 30-300 CFU/plate และรา 15-150 CFU/plate

เกณฑ์ในการยอมรับสำหรับคุณภาพทางจุลชีววิทยาตามวิธี Microbiological Limits ใน ISO 17516: 2014[E] (ISO 17516, 2014) การแปลผลยึดตาม USP (USP, 2019) คือ

ปริมาณเชื้อ 10^1 CFU หมายถึงจำนวนนับอยู่ในช่วง 10 - 20 CFU

ปริมาณเชื้อ 10^2 CFU หมายถึงจำนวนนับอยู่ในช่วง 100 - 200 CFU

ปริมาณเชื้อ 10^3 CFU หมายถึงจำนวนนับอยู่ในช่วง 1,000 – 2,000 CFU

ดังนั้นการตรวจนับเชื้อในผลิตภัณฑ์ตาม USP 2019 และ ISO 17516, 2014 ในตารางที่ 1 จะแปลผลตามที่กล่าวมาข้างต้น คือมีเพดานสูงสุดให้ได้ไม่เกิน 2 เท่าของค่าที่กำหนด

ก่อนการทดสอบจะต้องตรวจสอบความเหมาะสมของวิธี เรียกว่า “suitability test” เพื่อพิสูจน์ว่าผลิตภัณฑ์ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อและสภาวะทดสอบเหมาะสมที่เชื้อจะเจริญ โดยการเพาะเชื้อมาตรฐานชนิดต่างๆ (ปริมาณเชื้อสุดท้ายใน plate ชนิดละประมาณ 100 CFU/plate) ลงในผลิตภัณฑ์ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ เปรียบเทียบกับตัวควบคุมที่ไม่มีผลิตภัณฑ์ โดยจำนวนเชื้อที่ขึ้นใน plate ทดสอบและ plate ควบคุม ต้องต่างกันไม่เกิน 2 เท่า จึงจะถือว่าผ่านการทดสอบ หากพบว่าผลิตภัณฑ์มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจะต้องทำการสะเทินฤทธิ์ยับยั้งเชื้อของผลิตภัณฑ์ (neutralization of the antimicrobial properties of the product) ตาม ISO 21149: 2017[E] (ISO 21149, 2017) และ USP 2019 (USP, 2019) ก่อน จึงจะทดสอบหาปริมาณเชื้อได้ ผลทดสอบจึงนำเชื้อถือและยอมรับได้ การที่ผลิตภัณฑ์มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อมักมาจากสารกันเสียในเครื่องสำอาง suitability test ไม่จำเป็นต้องทำทุกครั้งที่ทดสอบตัวอย่าง แต่ต้องทำเมื่อมีตัวอย่างชนิดใหม่หรือสภาวะทดสอบเปลี่ยนไป

นอกจาก suitability test แล้วจะต้องทดสอบ “growth promotion test” ด้วย ซึ่งเป็นวิธีทดสอบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถสนับสนุนการเจริญของเชื้อได้หรือไม่ โดยการเพาะเชื้อมาตรฐานชนิดต่างๆ ปริมาณน้อยๆ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดที่ใช้ทดสอบ (< 100 CFU/container) growth promotion test ไม่จำเป็นต้องทำทุกครั้งที่ทดสอบตัวอย่างเช่นกัน แต่ทำเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนรุ่นการผลิต (lot, batch) ใหม่ (ISO 16212: 2017; USP, 2019)

การตรวจหาเชื้อเฉพาะในเครื่องสำอาง

การควบคุมคุณภาพของเครื่องสำอางเชิงคุณภาพคือการตรวจหาเชื้อเฉพาะที่เจริญในที่ที่มีอากาศและในอุณหภูมิปานกลางและเป็นเชื้อห้ามพบในเครื่องสำอาง (ตารางที่ 1) ซึ่งสามารถก่อโรคบริเวณผิวหนังเยื่อเมือกและตาได้ ได้แก่ *P. aeruginosa*, *S. aureus* และ *C. albicans* ส่วน *E. coli* ไม่ได้ก่อโรคผิวหนังแต่การพบเชื้อนี้เป็นการบ่งบอกถึงการไม่มีสุขอนามัยของฝ่ายผลิต การตรวจหาเชื้อเฉพาะและเชื้อไม่เฉพาะในเครื่องสำอาง อ้างอิง ISO 18415:2017[E] (ISO 18415, 2017) ซึ่งมีแนวทางในการพิสูจน์เชื้ออยู่ใน Annex A โดยเชื้อเฉพาะหมายถึง *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. albicans* และ *E. coli* และเชื้อไม่เฉพาะหมายถึงเชื้ออื่นๆ ที่ไม่ใช่เชื้อเฉพาะทั้งสี่ชนิดดังกล่าว ซึ่งการพบเชื้อไม่เฉพาะไม่จำเป็นต้องพิสูจน์เชื้อและหากปริมาณเชื้อรวมไม่เกินกำหนดก็สามารถยอมรับได้และถือว่าผ่านเกณฑ์มาตรฐาน

ก่อนการทดสอบจะต้องตรวจสอบความเหมาะสมของวิธี (suitability test) เช่นเดียวกัน แต่ใช้เชื้อเฉพาะที่ต้องการตรวจหา เพื่อพิสูจน์ว่าผลิตภัณฑ์ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อเฉพาะและสภาวะทดสอบเหมาะสมที่เชื้อเฉพาะจะเจริญ โดยการเพาะเชื้อมาตรฐานชนิดนั้น (ปริมาณเชื้อสุดท้ายใน plate ชนิดละประมาณ 100 CFU/plate) ลงในผลิตภัณฑ์และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบเปรียบเทียบกับตัวควบคุม หากพบว่าผลิตภัณฑ์มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อเฉพาะ จะต้องทำการสะเทินฤทธิ์ยับยั้งเชื้อเฉพาะของผลิตภัณฑ์

P. aeruginosa เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งสั้น (Gram-negative rod) โคโลนีเรียบ พบได้ในสิ่งแวดล้อม เช่น ดิน และน้ำ มักพบในสบู่หรือสระว่ายน้ำ นอกจากนี้ยังพบในผิวหนังคนสุขภาพดี โดยเฉพาะบุคคลากรทางการแพทย์ที่ไม่แสดงอาการแต่สามารถถ่ายทอดเชื้อให้บุคคลอื่นได้ คำว่า “Pseudomonas” มาจากภาษากรีกกับลาติน แปลว่าหน่วยปลอม



(false unit) ส่วน “aeruginosa” มาจากภาษาละติน แปลว่า สร้างสีเขียวแกมน้ำเงิน เนื่องจากเชื้อสามารถสร้างสีฟีนานซีนที่ละลายน้ำ (soluble phenazine pigment) หรือไฟโอไซยานิน (pyocyanin) ซึ่งเป็นสีเขียวแกมน้ำเงินในอาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อนี้ทนต่อสารชะล้าง (detergent) บางชนิดและสามารถสร้างไบโอฟิล์ม (biofilm) ได้ จึงทำลายยาก หากเข้าร่างกายสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อในผิวหนัง ตา ทางเดินหายใจและทางเดินปัสสาวะ และทำให้คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางเปลี่ยนแปลงไป (ISO 22717, 2015) (Ho Sui *et al.*, 2012) รายงานจาก database ของ Rapex (Michalek *et al.*, 2019) พบการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในเครื่องสำอางที่เกิดจากการผลิต เป็น *Pseudomonas* spp. มากที่สุด (ร้อยละ 35.58) และ *P. aeruginosa* (ร้อยละ 28.84) ดังนั้นผู้ผลิตควรให้ความสำคัญกับเชื้อนี้และหาแนวทางป้องกัน

การตรวจหา *P. aeruginosa* อ้างอิง ISO 22717: 2015[E](ISO 22717, 2015) โดยการบ่มตัวอย่าง 1 g ใน 9 ml enrichment broth ชื่อ “Eugon LT 100 broth” ซึ่งมีสารยับยั้งหรือสะเทินฤทธิ์ต้านเชื้อ (neutralizer or inhibitory substances) ได้แก่ lecithin และ polysorbate 80 รวมทั้งสารช่วยการกระจายตัว (dispersing agent) คือ octoxynol 9 (ส่วน enrichment broth อื่น สามารถหาได้จาก Annex A ใน ISO 22717: 2015[E] การเลือกชนิดของ enrichment broth ให้คำนึงถึงสารอาหารและสารยับยั้งฤทธิ์ต้านเชื้อที่เหมาะสมกับองค์ประกอบในเครื่องสำอาง) บ่มตัวอย่างในอาหารที่ $32.5^{\circ}\text{C} \pm 2.5^{\circ}\text{C}$, ≥ 20 ชม. แล้วนำมา streak บน cetrimide medium ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อคัดเลือก (selective medium) เพราะเชื้อทนต่อสารชะล้าง บางชนิดได้ และสร้างไฟโอไซยานิน ทำให้เมื่อ *P. aeruginosa* เจริญ อาหารเลี้ยงเชื้อรอบโคโลนีมีสีเขียวแกมน้ำเงินหรือเขียวแกมเหลืองและโคโลนีของเชื้อเรืองแสงได้ภายใต้แสง UV เนื่องจากเชื้อสามารถสร้างสีเรืองแสงที่แพร่ได้ (diffusible fluorescent pigments) ในอาหารเลี้ยงเชื้อมี cetrimide (cetyltrimethylammonium bromide) เป็นสารชะล้างชนิด quaternary ammonium cationic และมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหลายชนิด แต่ไม่สามารถยับยั้ง *P. aeruginosa* ได้ โคโลนีของเชื้อมีกลิ่นเฉพาะตัวคล้ายกลิ่นอู่นุ่น เมื่อพบผลบวกจะต้องยืนยันด้วยการย้อมแกรมและการทดสอบทางชีวเคมี ได้แก่ oxidase test ซึ่งให้ผลบวกและอาจยืนยันด้วยการนำโคโลนีของเชื้อที่สงสัยไป streak บน *Pseudomonas* agar medium for detection of pyocyanin (*Pseudomonas* agar P) แล้วบ่มที่ $32.5^{\circ}\text{C} \pm 2.5^{\circ}\text{C}$,

นาน 24, 48 และ 72 ชม. ผลบวก คือ อาหารเลี้ยงเชื้อรอบโคโลนีมีสีเขียวแกมน้ำเงินจากการสร้างไฟโอไซยานิน และรอบโคโลนีมีสีแดงถึงน้ำตาลเข้มจากการสร้างไพโอรูบิน (pyorubin)

S. aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม ส่วนใหญ่อยู่เป็นกลุ่ม (Gram-positive cocci) ลักษณะพวงองุ่น โคโลนีกลมเรียบสีเหลืองทอง คำว่า “Staphylococcus” แปลว่า องุ่น ส่วน “aureus” แปลว่า ทอง ชื่อเชื้อจึงหมายถึงองุ่นสีทอง สามารถพบ *S. aureus* ได้ในผิวหนังคนสุขภาพดี เพราะเป็นเชื้อประจำถิ่นบนผิวหนังและโพรงจมูก (normal flora in human) จัดเป็นเชื้อก่อโรคฉวยโอกาส (opportunistic pathogen) ถ้าผิวหนังมีขีดข่วนหรือมีภาวะภูมิคุ้มกันต่ำ สามารถก่อโรคผิวหนังเฉพาะที่ เช่น ตาแดง ผื่นผิวหนัง หรืออาจแพร่ไปผิวหนังบริเวณอื่น เช่น ทำให้เกิดเซลล์เนื้อเยื่ออักเสบ (cellulitis) หรือเป็นโรคพุพอง (impetigo)(CDC, 2011) (Tong *et al.*, 2015)

การตรวจหา *S. aureus* อ้างอิง ISO 22718: 2015[E](ISO 22718, 2015) โดยการบ่มตัวอย่างใน enrichment broth คล้ายกับที่ทำการตรวจหา *P. aeruginosa* แล้วนำมา streak บน Baird Parker agar medium ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อคัดเลือกของเชื้อนี้ ในอาหารมี sodium pyruvate กระตุ้นให้ coagulase-positive staphylococcus เจริญ แต่ยับยั้งเชื้ออื่น เมื่อ *S. aureus* เจริญ โคโลนีจะเป็นสีดำนูนวาวและรอบโคโลนีใส 2 - 5 มม. เมื่อพบผลบวกจะต้องยืนยันด้วยการย้อมแกรมและการทดสอบทางชีวเคมี ได้แก่ catalase test และ coagulase test ซึ่ง *S. aureus* ให้ผลบวก

C. albicans เป็นเชื้อที่สามารถเจริญได้ทั้งแบบยีสต์ (yeast) (เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว ลักษณะโคโลนี กลมๆ คล้ายแบคทีเรียแต่ขนาดใหญ่กว่า มักเกิดในสภาวะอากาศเย็น) และแบบรา (mold) (สิ่งมีชีวิตที่มีหลายเซลล์และมีการสร้างเส้นใย (hyphae) มักพบในสภาวะอากาศร้อน) เนื่องจากเชื้อเปลี่ยนแปลงสภาพได้ ทำให้พบได้ทั้งอากาศร้อนและเย็น พบได้ตามสิ่งแวดล้อม เป็นเชื้อประจำถิ่นในผิวหนังทางเดินหายใจ ทางเดินอาหาร ทางเดินปัสสาวะในเพศหญิงเป็นเชื้อก่อโรคฉวยโอกาส (opportunistic pathogen) เมื่อมีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง คงทนเมื่ออยู่ภายนอกร่างกายและสามารถสร้างไบโอฟิล์ม ได้เนื่องจากหลั่งไฮโดรเลส (hydrolase) เช่น โปรติเอส (protease) ฟอสโฟไลเปส (phospholipase) มาป้องกันตัวเอง จึงกำจัดได้ยาก ในช่องคลอดจะมีเชื้อ Lactobacilli ซึ่งจะช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของ *C. albicans* ได้ แต่หากมีการใช้ยาปฏิชีวนะเป็นเวลานาน ภาวะเบาหวานตั้งครรภ์การใช้ยากดภูมิคุ้มกัน

นาน อาจทำให้ *Lactobacilli* ลดลงและสร้างไบโอฟิล์มได้ เพื่อป้องกันการทำลายจากระบบภูมิคุ้มกัน ทำให้เชื้อแพร่ไปตามที่ต่างๆ ได้ ทำให้เกิดโรคติดเชื้อราในช่องคลอด (vaginal candidiasis) การติดเชื้อทางผิวหนัง และฝ้าขาวในช่องปากได้ (CDC, 2019)

การตรวจหา *C. albicans* อ้างอิง ISO 18416: 2015[E] (ISO 18416, 2015) โดยการบ่มตัวอย่างใน enrichment broth คล้ายกับที่ทำการตรวจหา *P. aeruginosa* แล้วนำมา streak บน Sabouraud dextrose chloramphenicol agar (SDCA) medium แล้วบ่มที่ $32.5^{\circ}\text{C} \pm 2.5^{\circ}\text{C}$, 24-48 ชม. เมื่อ *C. albicans* เจริญ โคลิเนียมมีสีขาวถึงน้ำตาลอ่อน มีลักษณะมันนูน เมื่อพบผลบวก จะต้องยืนยันด้วยการย้อมแกรม (ซึ่งจะติดสีม่วงคล้ายแกรมบวก แต่เซลล์มีขนาดใหญ่กว่าเซลล์แบคทีเรีย รูปร่างคล้ายไข่ หรือเป็นเซลล์ยาว บางครั้งอาจเห็น budding cells) และการทดสอบการสร้าง germ tube ถ้าไม่พบจะต้องนำโคลิเนียมมาตรวจหาการสร้าง hyphae, pseudohyphae และ chlamydospore ด้วย

E. coli เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างแท่งสั้นๆ มักเจริญในสิ่งแวดล้อมที่ชื้น เช่น อากาศ น้ำ ดิน บางสายพันธุ์อาจเป็นเชื้อประจำถิ่นในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์เลื้อยคลาน ซึ่งอาจมักพบออกมากับอุจจาระ ดังนั้น การตรวจพบ *E. coli* ในเครื่องสำอาง เป็นการบ่งบอกถึงการปนเปื้อนอุจจาระหรือการขาดสุขอนามัย (CDC, 2020)

การตรวจหา *E. coli* ในเครื่องสำอางอ้างอิง ISO 21150: 2015[E] (ISO 21150, 2015) โดยการบ่มตัวอย่างใน enrichment broth คล้ายกับที่ทำการตรวจหา *P. aeruginosa* แต่ selective medium จะใช้ MacConkey agar medium (โคลิเนียมจะมีสีแดงอิฐ หรือ brick-red) และยืนยันผลด้วยการใช้ Levine eosin-methylene blue (EMB) agar medium (โคลิเนียมจะมีสีดำ น้ำเงินและสะท้อนแสงเป็นสีเขียวเงาโลหะหรือ metallic sheen) ซึ่งมี bile salts เนื่องจากเชื้อทนต่อน้ำดีได้ดี รวมทั้งย้อมแกรม และทดสอบชีวเคมี ได้แก่ catalase test ให้ผลบวก, oxidase test ให้ผลลบ, fermentation of lactose (เชื้อพวก coliform bacteria ซึ่งเป็น Gram-negative จะสามารถหมักน้ำตาลแลคโตสได้ จึงไม่จำเพาะกับ *E. coli* ชนิดเดียว) และ indole test ให้ผลบวก

Clostridium species เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างแท่ง สร้างเอนโดสปอร์อยู่ภายในเซลล์ (endospore) ทำให้ทนต่อการทำลายด้วยความร้อนมาก เจริญแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobe) มักพบในดิน พืช บางครั้งพบในลำไส้ของคนและ

สัตว์ และในทางเดินของอวัยวะสืบพันธุ์เพศหญิงที่มีสุขภาพดี *C. perfringens* และ *C. difficile* สามารถสร้างแคปซูล (capsule) มาห่อหุ้มตัวเองเพื่อป้องกันการทำลายของคอมพลีเมนต์ (complement) ในระบบภูมิคุ้มกัน *Clostridium* species หลายชนิดสามารถสร้าง exotoxin ทำให้เกิดโรคร้ายแรง เช่น *C. perfringens*, *C. novyi* และ *C. septicum* ทำให้เกิด gas gangrene ส่วน *C. tetani* ทำให้เกิดโรคบาดทะยัก (tetanus) ส่วน *C. botulinum* ทำให้เกิดพิษต่อระบบประสาทที่เรียกว่า botulism (CDC, 2020)

การตรวจหา *Clostridium* species ในเครื่องสำอางไม่มีใน ISO จึงต้องอ้างอิง USP หรือ THP ในที่นี้ขอกล่าวใน THP 2019 (THP, 2019) โดยการบ่มตัวอย่างใน reinforced medium for clostridia (2 ชุดๆ ที่หนึ่งต้องอุ่นอาหาร ที่ 80°C นาน 10 นาที แล้วรีบทำให้เย็นก่อนจะเพาะตัวอย่างลงไป ส่วนชุดที่สองไม่ต้องอุ่น ทดสอบปกติ) สภาวะที่แบบไร้อากาศ (anaerobic condition) ที่ $30-35^{\circ}\text{C}$, 48 ชม. จากนั้นนำมา streak บน Columbia agar ที่มีเจนตามัยซิน (gentamicin) สภาวะที่บ่มแบบไร้อากาศ $30-35^{\circ}\text{C}$, 48-72 ชม. หากไม่พบเชื้อ ถือว่าผ่าน หากพบเชื้อขึ้นต้องยืนยันด้วยการย้อมแกรม การสร้าง endospore และการทดสอบ catalase test ให้ผลลบ hemolysis test ให้ผลบวกบน defibrinated sheep blood agar

การประเมินความคงตัวและความเสี่ยงของเครื่องสำอางทางจุลชีววิทยา

การประเมินความคงตัวและความเสี่ยงของเครื่องสำอางทางจุลชีววิทยา เป็นหนึ่งในการประกันคุณภาพผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง มีจุดประสงค์เพื่อให้ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางมีคุณภาพและปลอดภัยต่อผู้บริโภค

การประเมินความคงตัวของเครื่องสำอางทางจุลชีววิทยา อ้างอิงจาก ISO/TR 18811: 2018[E] (ISO/TR 18811, 2018)

1) Microbiological aspects เป็นการตรวจความคงตัวของเครื่องสำอางระหว่างที่เก็บเพื่อดูการเปลี่ยนแปลง ความปลอดภัย และคุณภาพของเครื่องสำอาง คือการตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์และการประเมินประสิทธิภาพของสารกันเสียในเครื่องสำอาง

2) Testing conditions สภาวะที่ใช้ทดสอบการตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์และการประเมินประสิทธิภาพของสารกันเสียในเครื่องสำอาง จะทดสอบได้กับผลิตภัณฑ์ที่ต้องมีน้ำเป็น



องค์ประกอบเท่านั้น ควรทำตั้งแต่ก่อนการทดสอบ (T_0) และเวลาสิ้นสุดของการทดสอบความคงตัวของตัวอย่างทดสอบในสภาวะเร่งร่วมด้วย ควรทำการวิเคราะห์หาปริมาณของสารกันเสียควบคู่ไปด้วย เพื่อดูว่าสารกันเสียมีปริมาณลดลงหรือไม่ และหากเป็นผลิตภัณฑ์ของแข็งหรือมี organic solvent อาจไม่ต้องการการตรวจสอบ เนื่องจากเชื้อไม่เจริญเติบโตในสภาวะเหล่านี้ โดยควรทำการวิเคราะห์หาความเสี่ยงทางจุลชีววิทยา (microbiological risk analysis) ซึ่งจะขึ้นกับบริเวณที่นำเครื่องสำอางไปใช้ ประเภทของผู้ใช้ โอกาสที่เครื่องสำอางจะเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ และเชื้อก่อโรคที่อาจเกิดขึ้นได้

3) Microbiological specifications เป็นข้อกำหนดทางจุลชีววิทยาที่เกี่ยวข้อง ได้แก่

- ISO 17516: 2014[E] Microbiological limits (การตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ในเครื่องสำอาง)

- ISO 11930: 2019[E] Evaluation of the antimicrobial protection of a cosmetic product

(การประเมินประสิทธิภาพของสารกันเสียในเครื่องสำอาง) (ISO 11930, 2019)

การประเมินความเสี่ยงของเครื่องสำอางทางจุลชีววิทยา อ้างอิงจาก ISO 29621: 2017[E] (ISO 29621, 2017)

เป็นแนวทางในการช่วยผู้ผลิตและผู้มีอำนาจควบคุมทางกฎหมายที่จะใช้พิจารณาผลิตภัณฑ์ โดยการประเมินความเสี่ยงเพื่อให้ผลิตภัณฑ์นั้นมีความเสี่ยงต่ำในการปนเปื้อนจุลินทรีย์ไม่ว่าจะเกิดในระหว่างการผลิตหรือในระหว่างการใช้ของผู้บริโภค การประเมินความเสี่ยงกระทำโดยผู้เชี่ยวชาญ

การวิเคราะห์หาความเสี่ยงทางจุลชีววิทยา ความเสี่ยงจะขึ้นกับ

- Potential alteration of cosmetic product: โอกาสที่จะเกิดการเปลี่ยนแปลงและการเปลี่ยนแปลงที่สามารถเกิดขึ้นได้ของผลิตภัณฑ์ ถ้ามีโอกาสมากก็เสี่ยงมาก

- Pathogenicity of microorganisms: การก่อโรคของเชื้อที่มีในผลิตภัณฑ์ ถ้าก่อโรครุนแรงก็เสี่ยงมาก

- Site of application: บริเวณที่จะนำผลิตภัณฑ์ไปใช้ เช่น หากนำไปใช้ในบริเวณที่บอบบางและไวต่อบัณฑิตจากสิ่งแวดล้อม เช่น บริเวณรอบดวงตาหรือเยื่อเมือก (mucous membrane) ก็จะมีความเสี่ยงสูง

- Type of user : ประเภทของผู้ใช้ เช่น หากผู้ใช้เป็นเด็กอายุต่ำกว่า 3 ปี จะมีความเสี่ยงที่สูงกว่าบุคคลทั่วไป

ตารางที่ 2 ปัจจัยทางเคมีกายภาพของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่มีความเสี่ยงต่ำในการปนเปื้อนจุลินทรีย์ (low microbiological risk) (ISO 29621, 2017; Varvaresou *et al.*, 2009)

ปัจจัยทางเคมีกายภาพ	ระดับ	ตัวอย่างผลิตภัณฑ์
pH	≤ 3	น้ำยาลอกผิว (glycolic acid)
	≥ 10	น้ำยายืดผม สบู่ก้อน
ไม่มีน้ำ (anhydrous)	-	น้ำมันทาตัว ดินสอ
Water activity (a_w)	≤ 0.75	ลิปสติก ลิปบาล์ม บลัชออนเนื้อครีม สบู่ก้อน
อุณหภูมิที่ใช้บรรจุ	$\geq 65^\circ\text{C}$	ลิปสติก ลิปบาล์ม บลัชออนเนื้อครีม
แอลกอฮอล์	$\geq 20\%$	สเปรย์ไล่ผม tonic น้ำหอม
สารทำละลายอินทรีย์ (organic solvent): ethyl acetate	$> 10\%$	ผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารทำละลาย (solvent-based product):
butyl acetate	$> 10\%$	
สารประกอบที่เป็นด่าง		
- แอมโมเนีย	$\geq 0.5\%$	Oxidizing product: สีย้อมผม
- โมโนเอททานอลามีน	$\geq 1\%$	น้ำยาดัดผม
Aluminium chlorohydrate และเกลือ	$\geq 25\%$	ผลิตภัณฑ์ระงับเหงื่อ
Hydrogen peroxide	$\geq 3\%$	น้ำยาดัดผม น้ำยาเปลี่ยนสีผม

นอกจากนี้ ผลิตภัณฑ์ที่มีความเสี่ยงต่ำในการปนเปื้อน จุลินทรีย์ (low microbiological risk) จะช่วยลดความเสี่ยงลงได้ ผลิตภัณฑ์ที่มีความเสี่ยงต่ำ (ตารางที่ 2) ได้แก่

- Low water activity: ผลิตภัณฑ์นั้นมีค่า water activity [a_w] ≤ 0.75 หรือมีปริมาณน้ำต่ำ สารพวก water binding substances เช่น sorbitol, glycerol จะช่วยลดค่า [a_w] แบคทีเรียต้องการน้ำในการเจริญมากกว่ายีสต์และยีสต์ต้องการน้ำในการเจริญมากกว่ารา (ISO 29621, 2017; Varvaresou *et al.*, 2009)

- Osmotic pressure: hypertonic solution จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียส่วนใหญ่ ส่วน hypotonic solution ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเนื่องจากแบคทีเรียมีองค์ประกอบในโครงสร้างผนังเซลล์ (cell wall) ที่แข็งแรง คือ peptidoglycan โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวกจะมีชั้น peptidoglycan ที่หนาแน่นกว่าแบคทีเรียแกรมลบ (Brannan, 2006)

- Hydro-alcoholic products: ผลิตภัณฑ์มี alcohol $\geq 20\%$ จะทำลายจุลินทรีย์หลายชนิดได้ (ISO 29621, 2017; Varvaresou *et al.*, 2009)

- Extreme pH values: ผลิตภัณฑ์ที่มีค่า pH สูงหรือต่ำมาก (≤ 3 , ≥ 10) เชื้อเจริญที่ pH กลางๆ คือประมาณ 7 ยิ่งห่างจาก pH 7 จะยิ่งเจริญช้าลง ยิ่ง pH สูงหรือต่ำมากทำให้จุลินทรีย์เครียดและตายได้ อย่างไรก็ดี เชื้อราจะทนกรด อ่อนๆ ได้ (ISO 29621, 2017; Varvaresou *et al.*, 2009)

ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติดังกล่าวจึงไม่จำเป็นต้องตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ในเครื่องสำอาง เช่น แป้ง ยาทาเล็บสบู่น้ำยาล้างชนิดแท่ง อิมัลชันชนิด water in oil นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์บรรจุในภาชนะที่มีปากหรือคอขวดแคบ มีหัวสเปรย์ และมีแก๊สพ่น ขวดที่มีวาล์วปิดแบบไม่ย้อนกลับ (non-return valve) ภาชนะแบบใช้ครั้งเดียวทิ้ง ก็มีความเสี่ยงต่ำด้วยเช่นกัน รวมทั้งการปฏิบัติการผลิตเครื่องสำอางที่ดี (Cosmetics — Good Manufacturing Practices, GMP) ตามแนวทางของ ISO 22716: 2007 (ISO 22716, 2007; Varvaresou *et al.*, 2009) เช่น

- ปฏิบัติเทคนิคและสภาวะปลอดเชื้อ (aseptic techniques and conditions)
- ใช้ระบบน้ำที่กรองปราศจากเชื้อและรังสีทำลายเชื้อ (water filtration and radiation systems)
- ใช้ห้องผลิตที่มีระบบความดันอากาศบวก (positive pressure)

- การตรวจหาเชื้อในวัตถุดิบ (microbial testing of raw materials)

- การฆ่าเชื้อเครื่องมือ (disinfection of the equipments)
- บุคลากรได้รับการอบรมและสวมชุดทำงานที่เหมาะสม (properly trained and dressed personnel)

บทสรุป

เครื่องสำอางเป็นผลิตภัณฑ์ที่ไม่ปราศจากเชื้อ ซึ่งพบจุลินทรีย์ได้ในขีดจำกัด หากจุลินทรีย์เกินขีดจำกัด อาจส่งผลกระทบต่อความคงตัวและการออกฤทธิ์ การปนเปื้อนจุลินทรีย์เกินขีดจำกัด จึงเป็นหนึ่งในปัญหาที่สำคัญในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ข้อกำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์ไม่ปราศจากเชื้อทางจุลชีววิทยา ใน USP, ISO และ THP จะค่อนข้างคล้ายกัน คือกำหนดขีดจำกัดทั้งเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ แต่ข้อวิธีจุดเน้น และรายละเอียดต่างกัน ข้อกำหนดของ ISO สอดคล้องกับเครื่องสำอางมากที่สุด ซึ่งจะต้องประเมินความคงตัวและความเสี่ยงของเครื่องสำอางทางจุลชีววิทยาเพื่อประกันคุณภาพผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและเพื่อความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

References

- Bashir A, Lambert P. Microbiological study of used cosmetic products: highlighting possible impact on consumer health. *J Appl Microbiol.* 2020 Feb; 128(2): 598-605. doi: 10.1111/jam.14479. Epub 2019 Oct 28.
- Brannan DK. Chapter 2: Biology of microbes. In: Geis PA, editor. *Cosmetic Microbiology: A Practical Approach*. 2nd ed. New York: Taylor&Francis; 2006. 19-54. [cited 2020 June 22]. Available from: <https://books.google.co.th/books?id=2AiiDwAAQB&pg=PA27&lpg=PA27&dq=hypotonic+cosmetic&source=bl&ots=mBRvSyXpe&sig=ACfU3U1QKczuPh1CrwyPzeuFGrJhxRVgBg&hl=th&sa=X&ved=2ahUKEwimgdi6uZTqAhWX63MBHeFoD6EQ6AEwBXoECAIQAQ#v=onepage&q=hypotonic%20cosmetic&f=false>



- Centers for Disease Control and Prevention (CDC), National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Foodborne, Waterborne, and Environmental Diseases (DFWED). Fungal diseases/candidiasis [Online]. 2019 November 13 [cited 2020 March 16]. Available from: <https://www.cdc.gov/fungal/diseases/candidiasis/index.html>
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC), National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Foodborne, Waterborne, and Environmental Diseases (DFWED). *E. coli (Escherichia coli)* [Online]. 2020 February 26 [cited 2020 March 16]. Available from: <https://www.cdc.gov/ecoli/index.html>
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC), National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Foodborne, Waterborne, and Environmental Diseases (DFWED). *Staphylococcus aureus* in Healthcare Settings [Online]. 2011 January 17 [cited 2020 March 16]. Available from: <https://www.cdc.gov/hai/organisms/staph.html>
- Ho Sui SJ, Lo R, Fernandes AR, et al. Raloxifene attenuates *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin production and virulence. *Int J Antimicrob Agents* 2012; 40(3): 246 – 251.
doi:10.1016/j.ijantimicag.2012.05.009.
PMC 5511546. PMID 22819149.
- International Organization for Standardization (ISO) 11930: 2019[E], Cosmetics — Microbiology — Evaluation of the antimicrobial protection of a cosmetic product.
- International Organization for Standardization (ISO) 16212: 2017[E], Cosmetics — Microbiology — Enumeration of yeast and mould.
- International Organization for Standardization (ISO) 17516: 2014[E], Cosmetics — Microbiology — Microbiological limits.
- International Organization for Standardization (ISO) 18415:2017[E], Cosmetics — Microbiology — Detection of specified and non-specified microorganisms.
- International Organization for Standardization (ISO) 18416:2017[E], Cosmetics — Microbiology — Detection of *Candida albicans*.
- International Organization for Standardization/Technical Report (ISO/TR) 18811:2018[E] Cosmetics- Guidelines on the stability testing of cosmetic product.
- International Organization for Standardization (ISO) 21149: 2017[E] Cosmetics — Microbiology — Enumeration and detection of aerobic mesophilic bacteria.
- International Organization for Standardization (ISO) 21150: 2015[E], Cosmetics — Microbiology — Detection of *Escherichia coli*.
- International Organization for Standardization (ISO) 22716: 2007, Cosmetics — Good Manufacturing Practices (GMP) — Guidelines on Good Manufacturing Practices.
- International Organization for Standardization (ISO) 22717: 2015[E], Cosmetics — Microbiology — Detection of *Pseudomonas aeruginosa*.
- International Organization for Standardization (ISO) 22718: 2015[E], Cosmetics — Microbiology — Detection of *Staphylococcus aureus*.
- International Organization for Standardization (ISO) 29621: 2017[E], Cosmetics — Microbiology — Guidelines for the risk assessment and identification of microbiologically low-risk products.
- Michalek IM, John SM, Santos CD. Microbiological contamination of cosmetic products – observations from Europe, 2005–2018. *JEADV* 2019; 33: 2151-2157.



The Thai Herbal Pharmacopeia (THP). Department of
Medical Sciences, Ministry of Public Health; 2019.

The United State Pharmacopeia (USP) 42 and The
National Formulary (NF) 37, Asian edition Volume
4-5, Chapter 61, 1111. Rockville: USP Convention
Inc; 2019.

Varvaresou A, Papageorgiou S, Tsirivas E, *et al.* Self-
preserving cosmetics. *Int J Cos Sci* 2009; 31(3):
163-175.

Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler
VG. *Staphylococcus aureus* infections:
epidemiology, pathophysiology, clinical
manifestations, and management. *Clin Microbiol
Rev* 2015; 28(3): 603 - 661.
doi:10.1128/CMR.00134-14. PMC 4451395.
PMID 26016486