ประกาศกระทรวงสาธารณสุข

(ฉบับที่ ๑๑) พ.ศ. ๒๕๓๖

ออกตามความในพระราชบัญญัติเครื่องสำอาง พ.ศ. ๒๕๓๕

เรื่อง ผ้าเย็นหรือกระดาษเย็น

อาศัยอำนาจตามความในมาตรา ๕ (๒) และมาตรา ๒๗ แห่งพระราชบัญญัติเครื่องสำอาง พ.ศ. ๒๕๓๕ รัฐมนตรีว่าการกระทรวงสาธารณสุขออกประกาศไว้ดังต่อไปนี้

ข้อ ๑ ให้ผ้าเย็นหรือกระดาษเย็น เป็นเครื่องสำอางควบคุม

ข้อ ๒ ในประกาศนี้

"ผ้าเย็นหรือกระดาษเย็น" หมายความว่า ผ้าเย็นหรือกระดาษเย็นสำหรับเช็ดผิวหนังเพื่อความสะอาด ซึ่งบรรจุในภาชนะบรรจุที่ปิด

"การทำให้สะอาดและถูกสุขลักษณะ" หมายความว่า ทำให้ผ้าเย็นหรือกระดาษเย็น สะอาด โดยมีคุณสมบัติทางจุลชีววิทยาตามมาตรฐานที่กำหนดไว้ ดังนี้

แบคทีเรีย ยีสต์และราทั้งหมด (total colony count)	น้อยกว่า ๑๐๐๐ โคโลนีต่อกรัม
สตาฟิโลคอกคัส ออเรอุส (Staphylococcus aureus)	ไม่พบ
ซูโดโมนาส แอรูจิโนซา (Pseudomonas aeruginosa)	ไม่พบ

โคลสตริดิอุม (Clostridium spp.)	ไม่พบ
โคลิฟอร์ม แบคทีเรีย (coliform bacteria)	น้อยกว่า ๑๐ MPN (Most Probable Number) ต่อกรัม
เอสเชอริเชีย โคไล (Escherichia coli)	ไม่พบ

ข้อ ๓ ผ้าเย็นหรือกระดาษเย็น ต้องผลิตขึ้นโดยมีความชุ่มชื้นที่เกิดขึ้นจากน้ำเอทานอล (ethanol) และ/หรือ ๒ - โพรพานอล (๒ - propanol) วัตถุแต่งกลิ่นและหรือวัตถุอื่น ๆ ที่กระทรวงสาธารณสุขรับรองให้ใช้ สำหรับเช็ดผิวหนังเพื่อความสะอาด และจะต้องผ่านการทำให้สะอาดและถูกสุขลักษณะ

คุณภาพมาตรฐานของผ้าเย็นหรือกระดาษเย็น ต้องผ่านการตรวจสอบโดยใช้วิธีการตรวจผ้าเย็นหรือกระดาษเย็นทางจุลชีววิทยา ที่แนบท้ายประกาศนี้

ประกาศฉบับนี้ให้ใช้บังคับเมื่อพ้นกำหนดเก้าสิบวันนับแต่วันถัดจากวันประกาศในราชกิจจานุเบกษาเป็นต้นไป

ประกาศ ณ วันที่ ๑๖ ธันวาคม ๒๕๓๖
อาทิตย์ อุไรรัตน์
รัฐมนตรีว่าการกระทรวงสาธารณสุข

การตรวจผ้าเย็นหรือกระดาษเย็นทางจุลชีววิทยา

1. เครื่องมือ (ผ่านการฆ่าเชื้อ นอกจากข้อ 8,9,10,11)
   (1) กรรไกร
   (2) ปากคีบ
   (3) ปิเปตมีขีดแบ่งปริมาตรความจุ 1.0, 2.0 มิลลิลิตร
   (4) จานเลี้ยงเชื้อขนาด 150x30 มิลลิเมตร, 100x15 มิลลิเมตร
   (5) ขวดฝาเกลียวปริมาตร 250 มิลลิลิตร, ขวดแก้วรูปกรวยขนาด 125 มิลลิลิตร
   (6) หลอดแก้วขนาด 13x100 มิลลิเมตร , 20x150 มิลลิเมตร
   (7) แผ่นอะลูมิเนียมเปลว (aluminium foil)
   (8) เครื่องชั่งที่ชั่งได้ละเอียดถึง 0.01 กรัม
   (9) ตู้อบเพาะเชื้อ 35±2 องศาเซลเซียส, 25-30 องศาเซลเซียส
   (10) เครื่องนับโคโลนี
   (11) ตู้อบสูญญากาศ 35±2 องศาเซลเซียส

2. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายต่างๆ
   (1) สารละลายผสมของ Ethanol 80 % และ Hydrochloric acid 1 % ในอัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร
   (2) แอลกอฮอล์ (Ethanol) 70 % โดยปริมาตร
   (3) สารละลายเจือจางฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (USP)
   (4) อาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ ซึ่งจะได้กล่าวถึงในแต่ละขั้นตอน

3. การเตรียมตัวอย่าง
   3.1 ใช้ผ้าเย็นหรือกระดาษเย็นตัวอย่างอย่างน้อย 10 ซอง (น้ำหนักสิ่งบรรจุภายในรวมไม่น้อยกว่า 30 กรัม) ทำความสะอาดภาชนะภายนอกซองด้วยสารละลายผสมของ Ethanol 80 % และ Hydrochloric acid 1 % หรือ Ethanol 70 % ก่อนตัดซอง
   3.2 ใช้ปากคีบจับตัวอย่างวางลงในจานเลี้ยงเชื้อขนาด 150x30 มิลลิเมตร แล้วใช้กรรไกรตัดตัวอย่างออกเป็นชิ้นเล็กๆ ให้ได้น้ำหนักประมาณ 20 กรัมนำไปชั่ง การชั่งให้วางชิ้นตัวอย่างลงบนแผ่นอะลูมิเนียมเปลว แล้วชั่งให้ได้น้ำหนัก 10.0 กรัม (ที่เหลืออีก 10 กรัม เก็บไว้ตรวจหาเชื้ออื่น เช่น S. aureus, P. aeruginosa, Clostridium spp.) ใช้ปากคีบจับชิ้นตัวอย่างใส่ลงในขวดฝาเกลียวที่มีสารละลายเจือจางฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 90.0 มิลลิลิตร จะได้ตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 1 ใน 10 (10^{-1}) เขย่าให้เข้ากันนาน 15 ถึง 30 นาที แล้วดำเนินการตรวจตามวิธีที่กำหนดต่อไป

4. การตรวจหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด

วิธีวิเคราะห์

4.1 เตรียมและแสดงฉลากบนจานเลี้ยงเชื้อขนาด 100x15 มิลลิเมตร จำนวน 6 คู่ สำหรับใส่ตัวอย่างที่มีความเจือจางตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-6}

4.2 เจือจางตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 10^{-1} (ข้อ 3.2) ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยดูดตัวอย่าง 1.0 มิลลิลิตร ใส่ลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 9.0 มิลลิลิตร ในหลอดแก้วฝาเกลียวขนาด 13x100 มิลลิเมตร จะได้ตัวอย่างที่มีความเจือจาง 10^{-2} ทำต่อไปจนได้ตัวอย่างที่มีความเจือจางครบตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-6}

4.3 ดูดตัวอย่างที่เจือจางแล้วในข้อ 4.2 ที่ความเจือจางละ 1.0 มิลลิลิตร ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่แสดงฉลากไว้ในข้อ 4.1

4.4 เทอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar ที่ละลายและทำให้เย็นลงถึงอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ประมาณ 15 ถึง 20 มิลลิลิตร ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีตัวอย่าง แล้วขยับจานเลี้ยงเชื้อให้ตัวอย่างและอาหารเลี้ยงเชื้อเข้ากัน ปล่อยทิ้งไว้ให้แข็ง กลับจานเลี้ยงเชื้อ นำเข้าตู้อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

4.5 นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นเฉพาะจานที่มีโคโลนี 30 ถึง 300 โคโลนี หาค่าเฉลี่ยแต่ละความเจือจางแล้วคูณด้วย dilution factor จะได้จำนวนโคโลนีของแบคทีเรียต่อตัวอย่าง 1 กรัม

5. การตรวจหายีสต์และรา

วิธีวิเคราะห์

5.1 ทำเช่นเดียวกับข้อ 4.1 - 4.3

5.2 เทอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud Dextrose Agar ที่ละลายและทำให้เย็นลงถึงอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ประมาณ 15 ถึง 20 มิลลิลิตร ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีตัวอย่าง ขยับจานเลี้ยงเชื้อให้อาหารเลี้ยงเชื้อและตัวอย่างเข้ากัน ปล่อยทิ้งไว้ให้แข็ง กลับจานเลี้ยงเชื้อ นำเข้าตู้อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25 - 30 องศาเซลเซียส นาน 5 ถึง 7 วัน

5.3 นับจำนวนโคโลนีแล้วหาค่าเฉลี่ยของทุกความเจือจาง คูณด้วย dilution factor จะได้จำนวนโคโลนีของยีสต์และราต่อตัวอย่าง 1 กรัม

หมายเหตุ วิธีคำนวณปริมาณแบคทีเรีย ยีสต์และราทั้งหมด (Total Colony Count) นำผลในข้อ 4.5 และ 5.3 มารวมกันด้วยวิธีทางคณิตศาสตร์ โดยใช้ dilution factor เท่ากัน

6. การตรวจหาโคโลนีของ สตาฟิโลคอกคัส ออเรอุส (Staphylococcus aureus)
วิธีวิเคราะห์

6.1 ชั่งตัวอย่างชิ้นผ้าเย็นที่เหลือ 2.0 กรัม ใส่ลงในหลอดแก้วฝาเกลียวขนาด 20X150 มิลลิเมตร ที่มี Tryptic Soy Broth (ที่มี NaCl 7.5% น้ำหนักต่อปริมาตร) 18.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำเข้าตู้อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส นาน 24 ถึง 48 ชั่วโมง

6.2 ถ่ายเชื้อจากข้อ 6.1 มา 1 ลูป นำไปเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Vogel Johnson Agar นำเข้าตู้อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส นาน 24 ถึง 48 ชั่วโมง

6.3 เลือกโคโลนีที่มีลักษณะโค้งนูนดำเป็นมัน อาจมีสีเหลืองโดยรอบโคโลนีหรือไม่ก็ได้มาอย่างน้อย 1 โคโลนี ถ่ายเชื้อลงใน Tryptic Soy Agar Slant นำไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส นาน 18 ถึง 24 ชั่วโมง จนมีการเจริญของเชื้ออย่างชัดเจน

6.4 ถ่ายเชื้อจากข้อ 6.3 ลงในหลอดทดลองขนาด 13X100 มิลลิเมตร ที่มี Brain Heart Infusion Broth 0.2 มิลลิลิตร เติม Plasma 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส ตรวจดูปฏิกริยา Coagulase positive ว่ามีการจับตัวเป็นก้อนแข็งหรือไม่ ทุก 3 ชั่วโมงจนครบ 24 ชั่วโมง โดยใช้จุลินทรีย์ที่ทราบว่าเป็นชนิด Coagulase positive และ Coagulase negative เป็นตัวเปรียบเทียบ ถ้าได้ผลบวกก็แสดงว่ามี Staphylococcus aureus

7. การตรวจหาซูโดโมนาส แอรูจิโนซา (Pseudomonas aeruginosa)
วิธีวิเคราะห์

7.1 ใช้ตัวอย่างผ้าเย็นหรือกระดาษเย็นที่เหลือจำนวนอีก 2.0 กรัม ใส่ลงในหลอดแก้วฝาเกลียว ขนาด 25X150มิลลิเมตรที่มี Tryptic Soy Broth 18.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง

7.2 ถ่ายเชื้อจากข้อ 7.1 มา 1 ลูป เกลี่ยบนจานที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Cetrimide Agar นำไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง

7.3 เลือกโคโลนีที่มีสีเขียวบน Cetrimide Agar เขี่ยเชื้อแล้วนำมาเกลี่ยบนจานที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Pseudomonas aeruginosa Agar P และ Pseudomonas Agar F นำไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียสนาน 24 ถึง 48 ชั่วโมง ตรวจดูการเรืองแสงของโคโลนีภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต (รายละเอียดตามตารางที่ 1)

7.4 ยืนยันผลในข้อ 7.3 โดยการเขี่ยเชื้อของโคโลนีที่สงสัย (ตามตารางที่ 1) ลงบนแถบของกระดาษกรอง ซึ่งชุบสารละลาย N,N-dimethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride ถ้ากระดาษกรองเปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีม่วง แสดงว่าอาจมี Pseudomonas aeruginosa ถ้าต้องการยืนยันผลแน่นอน ให้ทดสอบทางชีวเคมี

ตารางที่ 1 Morphologic and Diagnostic Characteristics of Pseudomonas aeruginosa on Selective and diagnostic Agar Media

Media	Cetrimide Agar Medium	Pseudomonas Agar Medium for Detection of Fluorescin	Pseudomonas Agar Medium for Detection of Pyocyanin
Characteristic Colonial Morphology	Generally greenish	Generally Colourless to yellowish	Generally greenish
Fluorescence in UV Light	Greenish	Yellowish	Blue
Oxidase Test	Positive	Positive	Positive
Gram Stain	Negative rods	Negative rods	Negative rods

8. การตรวจหาโคลสตริดิอุม (Clostridium spp.)

8.1 ใช้ตัวอย่างผ้าเย็นหรือกระดาษเย็น 2.0 กรัม ใส่ลงในหลอดแก้วฝาเกลียวขนาด 20X150 มิลลิเมตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Cook Meat Medium 20.0 มิลลิลิตร ซึ่งต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสประมาณ 2-3 นาที แล้วทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จำนวน 2 หลอด (เพื่อแยกระหว่างเชื้อที่สร้างสปอร์และไม่สร้างสปอร์) หลอดแรกปิดผิวหน้าด้วยพาราฟินที่ฆ่าเชื้อแล้ว ส่วนหลอดที่สองต้มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที แล้วจึงปิดทับด้วยพาราฟินที่ฆ่าเชื้อแล้วเช่นกัน

8.2 นำหลอดทั้งสองไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส โดยตรวจดูทุก 24 ชั่วโมง นาน 4 วัน ถ้าไม่มีการเจริญของเชื้อทั้ง 2 หลอด แสดงว่าไม่มี Clostridium spp.และ anaerobic bacteria ตัวอื่น

8.3 ถ้ามีการเจริญเติบโตของเชื้อให้ทดสอบและยืนยันผลตามวิธีใน Thai Pharmacopoeia 1987 เล่มที่ 1 หน้า 486-487

9. การตรวจหาจำนวนโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และเอสเชอริเชีย โคไล (Coliform bacteria and Escherichia coli)

9.1 การตรวจหาโคลิฟอร์มแบคทีเรีย

9.1.1 นำน้ำแช่ผ้าเย็นหรือกระดาษเย็นที่เตรียมไว้ในข้อ 3.2 ซึ่งมีความเข้มข้น 10^{-1} มาเจือจางเป็น 10^{-2} และ 10^{-3} โดยใช้สารละลายเจือจางฟอสเฟตบัฟเฟอร์

9.1.2 ใช้ปิเปตถ่ายตัวอย่างแต่ละความเจือจางลงใน Lauryl Sulfate Tryptone Broth ที่มีหลอดเก็บก๊าซ 3 หลอดๆ ละ 1.0 มิลลิลิตร นำไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส นาน 48±2 ชั่วโมง เมื่อครบ 24 ชั่วโมง ให้ตรวจดูก๊าซในแต่ละหลอด เช่น ดูการแทนที่ของอากาศในหลอดเก็บก๊าซ หรือเป็นฟองปุดเมื่อเขย่าหลอดเบาๆ หลอดที่ให้ผลบนำกลับไปอบเพาะเชื้อต่ออีก 24 ชั่วโมง แล้วตรวจดูก๊าซเช่นเดียวกัน

9.1.3 ตรวจยืนยันโคลิฟอร์มแบคทีเรีย โดยเขย่าหลอดที่ให้ผลบวกเบาๆ แล้วถ่ายตัวอย่าง 1 ลูป ลงในหลอดที่มี Brilliant Green Lactose Bile Broth นำไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ตรวจดูผลและบันทึกผลหลอดที่เกิดก๊าซ แล้วเทียบหาจำนวนโคลิฟอร์มแบคทีเรีย จากตารางการหาดัชนี เอ็มพีเอ็น

9.2 การตรวจเอสเชอริเชีย โคไล (Escherichia coli)

9.2.1 จากข้อ 9.1.2 ถ่ายเชื้อจากหลอดที่เกิดก๊าซ 1 ลูป ลงในหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ EC Broth นำไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 45.5±0.05 องศาเซลเซียส นาน 48±2 ชั่วโมง ตรวจดูผลของการเกิดก๊าซ ที่ 24 ชั่วโมงถ้าไม่มีให้ตรวจดูเมื่อครบ 48 ชั่วโมง ถ้ายังไม่มีก๊าซให้ถือว่าไม่มี เอสเชอริเชีย โคไล

9.2.2 สำหรับหลอดที่มีก๊าซเกิดขึ้น ให้ถ่ายตัวอย่างด้วยห่วงถ่ายเชื้อแล้วเกลี่ยเชื้อเพาะลงบน Levine's Eosin-Methylene Blue Agar นำไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส นาน 18 ถึง 24 ชั่วโมง ตรวจดูโคโลนีที่สงสัยจะเป็น - เอสเชอริเชีย โคไล คือ โคโลนีสีม่วงคล้ำมีจุดดำตรงกลาง อาจมีสีเลื่อมโลหะด้วยก็ได้

9.2.3 เลือกโคโลนีที่สงสัย จำนวน 2 โคโลนี ถ่ายลงใน plate count agar slant นำไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส นาน 18 ถึง 24 ชั่วโมง นำไปย้อมสีแกรม และตรวจทางชีวเคมีต่อไปถ้าจำเป็น

9.2.4 ถ้าผลจากการย้อมได้เป็นแกรมลบแท่งสั้นหรือกลม ให้ทดสอบทางชีวเคมี (IMVIC Test) ดังนี้

(1) การเกิด Indole : - ถ่ายเชื้อจากข้อ 9.2.3 ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptophan Broth และอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส นาน 24±2 ชั่วโมง แล้วเติม Kovacs reagent 0.2 มิลลิลิตร ถ้าชั้นบนมีสีแดงชัดเจน แสดงว่าปฏิกริยาเป็นบวก

(2) การทดสอบ Voges Proskauer : - ถ่ายเชื้อจากข้อ 9.2.3 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Buffer Glucose Broth นำไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส นาน 48±2 ชั่วโมง แบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อมา 1 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย A (alphanaphthol 3 กรัม ใน ethanol 100 มิลลิลิตร) 0.6 มิลลิลิตร และสารละลาย B (KOH 40 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร) 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน หลังจากนั้น 5 นาที ถ้าปรากฏสีแดง แสดงว่าปฏิกริยาเป็นบวก ถ้าปรากฏสีทองแดงแสดงว่า ปฏิกริยาเป็นลบ

(3) การทดสอบ Methyl Red : - นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหลือจากการแบ่งไปทดสอบ Voges Proskauer แล้ว ไปอบเพาะเชื้อต่อไปอีก 48±2 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลาย Methyl Red 0.3 มิลลิลิตร ลงในหลอดดังกล่าว ถ้าเป็นสีแดงชัดเจน แสดงว่าปฏิกริยาเป็นบวก

(4) การทดสอบการใช้ Citrate : - ถ่ายเชื้อจากข้อ 9.2.3 จำนวนน้อยๆ ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ Citrate Broth เลือกใช้หลอดที่ใส นำไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส นาน 96±2 ชั่วโมง หลอดที่ให้ผลบวกจะเห็นความขุ่นชัด

การอ่านผล

ผลการทดสอบทั้ง 4 ครั้ง เป็น + + - - หรือ - + - - แสดงว่าเชื้อนั้นเป็น เอสเชอริเชีย โคไล

หมายเหตุ

- สารละลายเจือจางฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ทำตาม U.S.P (XXII) หน้า 1785
- อาหารเลี้ยงเชื้อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปของ Difco

เอกสารอ้างอิง

1. Madden N.J.1979. Microbiological Method for Cosmetics. FDA BACTERIOLOGICAL 5th Edition.
2. U.S.P XXII.P. 1479-1484.
3. Lucas P.J., 1977. Microbiological Examination of Cosmetics. Manual of Cosmetic Analysis 2nd Edition. p. 132-140.
4. มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง (มอก. 152-2518)
5. Thai Pharmacopoeia, 1987. vol. 1 p. 48.