การทดสอบความสมบูรณ์ของการปิดบรรจุภัณฑ์ โดยการทดสอบการซึมผ่านของจุลินทรีย์ (การทดสอบโดยการจุ่มในของเหลวที่มีเชื้อจุลินทรีย์ สภาวะภายใต้ความดัน)

CONTRINER CLOSURE INTEGRITY TEST BY MICROBIAL INGRESS TEST (MICROBIAL CHALLENGE, LIQUID IMMERSION WITHIN A PRESSURIZED ENVIRONMENT)

กนกวรรณ วรชิราภรณ์

สหกิจศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2566

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

CONTRINER CLOSURE INTEGRITY TEST BY MICROBIAL INGRESS TEST (MICROBIAL CHALLENGE, LIQUID IMMERSION WITHIN A PRESSURIZED ENVIRONMENT)

Kanokwan Worachiraphon

A COOPERATIVE EDUCATION SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
(INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, SCHOOL OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2023

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อสหกิจศึกษา	การทดสอบความสมบูรณ์ของการปิดบรรจุภัณฑ์ โดยการทดสอบการซึมผ่านของจุลินทรีย์ (การทดสอบโดยการจุ่มในของเหลวที่มีเชื้อจุลินทรีย์ สภาวะภายใต้ความดัน)
ชื่อนักศึกษา	นางสาวกนกวรรณ วรชิราภรณ์ รหัสนักศึกษา 63050440
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2566
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.วิมลมาศ บุญมี
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	นายสมิทธ์ ลือนาม

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้สหกิจศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2566

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
นายสมิทธ์ ลือนาม ประธานกรรมการ	
ดร.วิมลมาศ บุญมี กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	
นายสมิทธ์ ลือนาม กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อสหกิจศึกษา การทดสอบความสมบูรณ์ของการปิดบรรจุภัณฑ์ โดยการทดสอบการซึมผ่านของจุลินทรีย์ (การทดสอบโดยการจุ่มในของเหลวที่มีเชื้อจุลินทรีย์ สภาวะภายใต้ความดัน)
ชื่อนักศึกษา นางสาวกนกวรรณ วรชิราภรณ์ รหัสนักศึกษา 63050440
ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา ชีววิทยา
คณะ วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา 2566
อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.วิมลมาศ บุญมี
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม นายสมิทธ์ ลือนาม

บทคัดย่อ

การทดสอบความสมบูรณ์ของการปิดบรรจุภัณฑ์ CCIT (Container closure integrity test) หลังจากบรรจุผลิตภัณฑ์เสร็จสิ้น ถือเป็นการยืนยันความปลอดภัยว่าบรรจุภัณฑ์ที่นำมาใช้สามารถป้องกันการสูญเสียผลิตภัณฑ์หรือป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ เพื่อให้มั่นใจได้ว่าผลิตภัณฑ์ที่จัดจำหน่ายยังคงมีคุณสมบัติและคุณภาพตรงตามมาตรฐานความปลอดภัย จากการศึกษาการทดสอบความสมบูรณ์ของการปิดบรรจุภัณฑ์ โดยการทดสอบการซึมผ่านของจุลินทรีย์ โดยการจุ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อแบคทีเรีย *Brevundimonas diminuta* และทดสอบต่อสภาวะภายใต้ความดัน (สภาวะสุญญากาศและสภาวะความดัน) พบว่าค่าเฉลี่ยการวัดความขุ่นอยู่ระหว่าง 2.77 - 3.84 McFarland ในการเจือจางตัวอย่างแบบ 10-fold serial dilution และเชื้อแบคทีเรียที่จะนำไปทดสอบ CCIT ไม่น้อยกว่า 10^6 CFU/มิลลิลิตร การตรวจสอบยืนยันจำนวนเชื้อแบคทีเรีย (Microbial count) มีค่าเฉลี่ยโคโลนีที่เจริญในช่วง 30-300 โคโลนี มีค่าเฉลี่ยทั้งหมดอยู่ที่ 2.79×10^{10} CFU/มิลลิลิตร และการทดสอบความสมบูรณ์ของการปิดบรรจุภัณฑ์ CCIT หลังทดสอบ จำนวน 2 ชุด ผลที่ได้คือ ขวดแก้ว (Vials) ตัวอย่างสำหรับทดสอบและชุดควบคุม (Negative control) จำนวน 42 ขวด ไม่มีความขุ่น แสดงว่าไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย และชุดควบคุม (Positive control) ที่มีรอยรั่วที่ขวดขนาด 5 ไมโครเมตร จำนวน 2 ขวด พบว่ามีความขุ่น แสดงว่ามีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย และหลังนำชุดควบคุม (Positive control) ไปทำการจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ (Microbial Identification) นำไปวิเคราะห์ต่อด้วยเครื่อง VITEK® MS พบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรีย *B. diminuta* จริง ดังนั้นบรรจุภัณฑ์จึงมีมาตรฐานความปลอดภัย และสามารถป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ได้

คำสำคัญ : การทดสอบความสมบูรณ์ของการปิดบรรจุภัณฑ์, การซึมผ่านของจุลินทรีย์, เชื้อแบคทีเรีย *Brevundimonas diminuta*, สภาวะสุญญากาศ, สภาวะความดัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Contriner closure integrity test by microbial ingress test (microbial challenge, liquid immersion within a pressurized environment)
Students	Miss Kanokwan Worachiraphon Student ID 63050440
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)
Department	Biology
School	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2023
Advisor	Dr.Wimonmat Boonmee
Co-advisor	Mr.Smith Luenam

Abstract

After the completion of product packing, the Container Closure Integrity Test (CCIT) serves as a crucial safety confirmation, ensuring that the packaging utilized effectively prevents product loss and microbial contamination. This verification is essential to guarantee that the distributed products maintain the necessary properties and quality in accordance with safety standards. The study involved testing the integrity of packaging closures by assessing microbial permeability. This was achieved through immersion in culture media containing *Brevundimonas diminuta*, followed by further testing within a pressurized environment. (Vacuum condition and pressure condition) The results indicated a mean turbidity measurement of light absorption ranging between 2.77 and 3.84 McFarland in a 10-fold serial dilution of the sample. The microorganisms tested for CCIT were not found to be less than 10^6 CFU/ml. Microbial count verification revealed an average colony growth range of 30-300 colonies, with a total average of 2.79×10^{10} CFU/mL. Following two sets of CCIT, the outcomes showed that 42 vials from both the test and control (negative control) samples exhibited no turbidity. It is anticipated that there will be no growth *of Brevundimonas diminuta* microorganisms. In contrast, the control set (positive control) with a leak size of 5 micrometers in 2 vials displayed turbidity, indicating the expected growth of *Brevundimonas diminuta* microorganisms. Subsequent to removing the control set (positive control), microbial identification revealed that it was indeed *Brevundimonas diminuta*. This confirms that the packaging adheres to safety standards and effectively prevents microbial contamination.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Keywords : CCIT (Container closure integrity test), Liquid immersion, *Brevundimonas diminuta*, Vacuum condition, Pressure condition

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ดี ด้วยความอนุเคราะห์และความกรุณาอย่างสูงจากบุคลากรหลายท่าน ขอขอบพระคุณ นายสมิทธ์ ลือนาม (ผู้จัดการแผนกประกันคุณภาพความปราศจากเชื้อ) รวมถึงบุคลากรของบริษัท โกลบอล ไบโอเทค โปรดักส์ จำกัด ที่ได้ให้คำแนะนำและคำปรึกษาในงานวิจัยในครั้งนี้จนสำเร็จตามแผนงานที่วางไว้ รวมไปถึงการสอนการใช้เทคนิคและเครื่องมือต่างๆ ที่จำเป็นต่อการทำงานวิจัยในครั้งนี้ อีกทั้งยังให้คำปรึกษาตลอดการทำวิจัยและปรับปรุงงานวิจัยฉบับนี้ให้เป็นฉบับที่สมบูรณ์ ผู้วิจัยตระหนักถึงความตั้งใจและทุ่มเทของบุคลากรของบริษัท โกลบอล ไบโอเทค โปรดักส์ จำกัด จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ ดร.วิมลมาศ บุญมี กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ที่ได้ให้คำแนะนำและคำปรึกษาในงานวิจัยในครั้งนี้จนสำเร็จ รวมไปถึงการตรวจทานงานวิจัยฉบับนี้ให้เป็นฉบับที่สมบูรณ์

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ บิดา รุ่นพี่ และเพื่อนๆ รวมถึงกำลังใจ ที่ให้ความช่วยเหลือและสนับสนุนตลอดมา จนกระทั่งผู้วิจัยประสบผลสำเร็จในการทำปริญญานิพนธ์ครั้งนี้ไปด้วยดี

กนกวรรณ วรชิราภรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข-ค

กิตติกรรมประกาศ ..... ง

สารบัญ ..... จ-ช

สารบัญตาราง ..... ซ

สารบัญภาพ ..... ฌ

คำย่อ/สัญลักษณ์ ..... ญ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 2

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

2.1 บรรจุภัณฑ์ 3

2.1.1 ขวดแก้ว (Vial) 3

2.1.2 จุกยางปิดขวดแก้ว (Rubber stopper) 4

2.1.3 ฝาปิดอะลูมิเนียม (Aluminium cap) 5

2.2 *Brevundimonas diminuta* 6

2.3 การทดสอบความท้าทายของจุลินทรีย์และวิธีการทดสอบทางกายภาพ (Microbial Challenge and Physical test Methods) 6

2.3.1 การทดสอบการท้าทายของจุลินทรีย์ (Microbial Challenge) 6-7

2.3.2 วิธีการทดสอบทางกายภาพ (Physical test Methods) 7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

2.4 สภาวะสุญญากาศและสภาวะความดัน (Vacuum condition and pressure condition) 7

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Literature review) 7-8

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 9

3.1 เครื่องมือ 9

3.2 อุปกรณ์ 9-10

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ 10

3.4 สารเคมี 10

3.5 จุลินทรีย์ 10

3.6 ขั้นตอนการดำเนินการ 11

3.6.1 การเตรียมตัวอย่างทดสอบและชุดควบคุม (Positive control) 11

3.6.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *Brevundimonas diminuta* 11-12

3.6.3 การเตรียมการทดสอบ 12-14

3.6.3.1 การวัดค่าความขุ่นของเชื้อแบคทีเรีย (Measurement) 12

3.6.3.2 การทดสอบ CCIT (Container closure integrity test) 12-13

3.6.3.3 การตรวจสอบยืนยันจำนวนเชื้อแบคทีเรีย (Microbial count) 13

3.6.3.4 การจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ (Microbial Identification) 14

บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 15

4.1 การวัดค่าความขุ่นของเชื้อแบคทีเรีย (Measurement) 15

4.2 การตรวจสอบยืนยันจำนวนเชื้อแบคทีเรีย (Microbial count) 16-17

4.3 เกจ์วัดค่าในสภาวะสุญญากาศและสภาวะความดันขณะใช้งาน (Vacuum condition and pressure condition) 17-18

4.4 การทดสอบ CCIT (Container closure integrity test) 18-21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

4.5 การจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ (Microbial Identification) 21

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ..... 22

5.1 สรุปผลการวิจัย..... 22

5.2 ข้อเสนอแนะ..... 23

เอกสารอ้างอิง..... 24-26

ภาคผนวก..... 27

ภาคผนวก ก..... 28

ภาคผนวก ข..... 29-33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

ตารางที่ 3.6.1 แสดงชนิดของขวดแก้ว (Vial) ที่นำมาทดสอบ..... 11

ตารางที่ 3.6.2 แสดงการเจือจางตัวอย่างแบบ 10-fold serial dilution..... 12

ตารางที่ 4.1.1 แสดงค่าการวัดความขุ่นของเชื้อแบคทีเรีย..... 15

ตารางที่ 4.2.1 แสดงจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เจริญในความเจือจางต่างๆ..... 16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

ภาพที่ 2.1 ภาพแสดงขวดแก้วขนาด 3 มิลลิลิตร ประเภท I (type I)..... 4

ภาพที่ 2.2 ภาพแสดงจุกยางแบบ Lyophilization Rubber Stopper..... 4

ภาพที่ 2.3 ภาพแสดงจุกยางแบบ Regular Rubber Stopper..... 5

ภาพที่ 2.4 ภาพแสดงฝาปิดอะลูมิเนียมขนาด 13 มิลลิลิตร..... 5

ภาพที่ 4.1 ภาพแสดงความสัมพันธ์ของจำนวนเชื้อแบคทีเรียเฉลี่ยที่ความเจือจางต่างๆ..... 17

ภาพที่ 4.2 ภาพแสดงเกจ์วัดค่าสภาวะสุญญากาศขณะใช้งานอยู่ที่ 0.04 เมกะปาสคาล (MPa)... 18

ภาพที่ 4.3 ภาพแสดงเกจ์วัดค่าสภาวะสุญญากาศขณะใช้งานอยู่ที่ 0.4 บาร์ (bar) 18

ภาพที่ 4.4 ภาพแสดงตัวอย่างทดสอบชุดที่ 1 (MDF 01/23) หลังบ่ม เป็นเวลา 7 วัน..... 19

ภาพที่ 4.5 ภาพแสดงตัวอย่างทดสอบชุดที่ 2 (MDF 02/23) หลังบ่ม เป็นเวลา 7 วัน..... 20

ภาพที่ 4.6 ภาพแสดงตัวอย่างทดสอบชุดที่ 1 (MDF 01/23) หลังบ่ม เป็นเวลา 14 วัน..... 20

ภาพที่ 4.7 ภาพแสดงตัวอย่างทดสอบชุดที่ 2 (MDF 02/23) หลังบ่ม เป็นเวลา 14 วัน..... 21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
CCI	Container closure integrity
CCIT	Container closure integrity testing
CCS	Container closure system
TSA	Trypticase soy agar
TSB	Tryptic soy broth
Vial	A small glass bottle, especially one containing liquid medicine

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ความสมบูรณ์ของบรรจุภัณฑ์ของผลิตภัณฑ์ปราศจากเชื้อ โดยเฉพาะระบบปิดขวดแก้ว/จุกยาง เป็นแหล่งที่มาของความกังวล การรักษาผลิตภัณฑ์ปราศจากเชื้อ จึงเป็นวัตถุประสงค์หลักของการทดสอบภาชนะบรรจุ/บรรจุภัณฑ์ของผลิตภัณฑ์ ซึ่งจะต้องแสดงให้เห็นว่าการปิดภาชนะบรรจุ/บรรจุภัณฑ์มีประสิทธิภาพต่อการป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ และเมื่อเกิดสภาวะความดันต่างกันจะไม่ส่งผลกระทบต่อความสมบูรณ์ในการปิดบรรจุภัณฑ์ ซึ่งเงื่อนไขถูกนำมาใช้เป็นการจำลองสภาวะของสิ่งแวดล้อมที่มีความดันแตกต่างกันระหว่างการจัดเก็บหรือการขนส่งผลิตภัณฑ์

โดยการทดสอบความสมบูรณ์ของการปิดบรรจุภัณฑ์นี้ จะใช้วิธีการทดสอบการจุ่มลงตัวอย่างลงไปในของเหลวที่มีเชื้อจุลินทรีย์อยู่ (Microbial Challenge, Liquid Immersion) โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ *Brevundimonas diminuta* ATCC 19146 ที่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ไม่มีการหมักเคลื่อนที่ได้ มีขนาดเล็ก (Almuzara et al., 2012) และใช้ตรวจสอบความถูกต้องของตัวกรองเมมเบรนเกรดฆ่าเชื้อ (Validation of sterilizing-grade membrane filters) (Bowman et al., 1967) มาเป็นตัวแทนของเชื้อจุลินทรีย์สำหรับการตรวจสอบนี้ และตัวอย่างทดสอบและชุดควบคุม (Negative control) ที่ใช้ ได้มาจากการจำลองการบรรจุและการปิดบรรจุภัณฑ์จากกระบวนการผลิต โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB เป็นตัวแทนของผลิตภัณฑ์บรรจุในขวดแก้วขนาด 3 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกยางและฝาอะลูมิเนียมแน่นหนา และในส่วนชุดควบคุม (Positive control) จะใช้ขวดที่มีรอยรั่วขนาด 5 ไมโครเมตร บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่เป็นตัวแทนของผลิตภัณฑ์ ปิดด้วยจุกยางและฝาอะลูมิเนียมเรียบร้อย จากนั้นมาทำการทดสอบ CCIT (Container closure integrity test) โดยนำตัวอย่างทดสอบและชุดควบคุม (Positive control) ที่เตรียมไว้จุ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียจะไม่น้อยกว่า 10^6 CFU/มิลลิลิตร จากนั้นนำไปทดสอบในสภาวะความดันที่แตกต่างกัน และนำตัวอย่างทั้งหมดไปบ่มเป็นเวลา 14 วัน เพื่อดูว่าสภาวะที่แตกต่างกัน มีผลต่อการป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์

การเลือกตัวอย่างสำหรับการทดสอบ CCIT คาดหวังว่าตัวอย่างทดสอบและชุดควบคุม (Negative control) จะไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ ไม่มีการรั่วไหลและไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *B. diminuta* ในขวดแก้วที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB หากแต่ชุดควบคุม (Positive control) ที่มีรอยรั่วขนาด 5 ไมโครเมตร ควรมีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งอาจจะเกิดการขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่บรรจุในขวดแก้ว การทดสอบนี้จึงสอดคล้องกับจุดประสงค์เพื่อศึกษาความสมบูรณ์ของการปิดบรรจุภัณฑ์สามารถป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ต่อผลิตภัณฑ์ ให้เป็นไปตามมาตรฐานของกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ปราศจากเชื้อและศึกษาว่าเมื่อมีสภาวะต่างกันจะไม่ส่งผลกระทบต่อความสมบูรณ์ในการปิดบรรจุภัณฑ์ เพื่อนำไปพัฒนาและปรับใช้ในอุตสาหกรรมยาที่มีสเกลขนาดใหญ่ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) เพื่อศึกษาความสมบูรณ์ของการปิดบรรจุภัณฑ์สามารถป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ต่อผลิตภัณฑ์ ให้เป็นไปตามมาตรฐานของกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ปราศจากเชื้อ

2) เพื่อศึกษาว่าเมื่อมีสภาวะต่างกันจะไม่ส่งผลกระทบต่อความสมบูรณ์ในการปิดบรรจุภัณฑ์

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาการทดสอบความสมบูรณ์ของการปิดบรรจุภัณฑ์ โดยนำตัวอย่างทดสอบที่เตรียมไว้จุ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อจุลินทรีย์ จากนั้นนำไปทดสอบในสภาวะความดันที่แตกต่างกัน เพื่อดูว่าสภาวะความดันที่แตกต่างกัน อาจจะมีผลต่อการทดสอบซึมผ่านของจุลินทรีย์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) บรรจุภัณฑ์สามารถป้องกันการสูญเสียผลิตภัณฑ์ ป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อให้มั่นใจได้ว่าผลิตภัณฑ์มีคุณสมบัติและคุณภาพตรงตามมาตรฐานความปลอดภัย

2) เมื่อมีสภาวะความดันต่างกันจะไม่ส่งผลกระทบต่อการปิดบรรจุภัณฑ์ บรรจุและยังคงรักษาความสมบูรณ์ต่อจุลินทรีย์โดยการทดสอบการป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 บรรจุภัณฑ์

2.1.1 ขวดแก้ว (Vial)

ภาชนะแก้วสำหรับใช้ในทางเภสัชกรรม เป็นส่วนที่จะสัมผัสกับยาโดยตรง จะต้องมีความโปร่งใสสูง มีช่วงสเปกตรัมที่มองเห็นได้ หรือมีสีได้มาจากการเติมของโลหะออกไซด์เพียงเล็กน้อยและสามารถเลือกตามสเปกตรัมที่ต้องการในการดูดกลืนแสง แก้วบอโรซิลิเกต (Borosilicate) จะมีองค์ประกอบสำคัญของปริมาณบอริกออกไซด์, อะลูมิเนียมออกไซด์, ออกไซด์ของโลหะ และอัลคาไลหรืออัลคาไลน์เอิร์ธออกไซด์ เนื่องจากมีความต้านทานต่อไฮโดรไลติกสูง ทนต่อแรงกระแทกและทนจากความร้อนสูง โดยความต้านทานต่อปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) คือ ปฏิกิริยาที่มีน้ำเข้าไปสลายพันธะ ภาชนะแก้วจำแนกได้ 3 ประเภท ดังนี้

– ภาชนะแก้วประเภท I : แก้วที่เป็นกลางและมีไฮโดรไลติกสูงความต้านทานเนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีของตัวมันเอง เหมาะสำหรับบรรจุยาสำหรับฉีดเข้าสู่หลอดเลือด

– ภาชนะแก้วประเภท II : มักเป็นแก้วโซดาไลม์ซิลิกามีความต้านทานต่อไฮโดรไลติกสูง เป็นผลจากความเหมาะสมการรักษาพื้นผิวด้านใน เหมาะสำหรับการบรรจุกรดและด่างเป็นส่วนใหญ่

– ภาชนะแก้วประเภทที่ III : โดยปกติจะเป็นแก้วโซดาไลม์ซิลิกามีความต้านทานต่อไฮโดรไลติกปานกลางเท่านั้น เหมาะสำหรับผลิตภัณฑ์ยาที่เป็นผง (ยกเว้นการเตรียมแบบแช่แข็งแห้ง (Freeze-dried) และผลิตภัณฑ์ยาที่ไม่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย

ประเภทของภาชนะแก้วที่อาจนำไปใช้กับยาประเภทต่างๆ ขึ้นอยู่กับผู้ผลิตผลิตภัณฑ์ยา ที่มีหน้าที่รับผิดชอบในการเลือกภาชนะแก้วให้เหมาะสมกับผลิตภัณฑ์

ในทางอุตสาหกรรมการผลิตวัคซีนมีการเลือกใช้ขวดแก้วขนาด 3 มิลลิลิตร เป็นขวดแก้วบอโรซิลิเกต (Borosilicate) ประเภท I ไม่มีสี เหมาะสำหรับบรรจุยาฉีด โดยขวดมีลักษณะปากเอียงและก้นเว้า ไม่มีสิ่งเจือปนและเป็นไปตาม European Pharmacopoeia หัวข้อ GLASS CONTAINERS FOR PHARMACEUTICAL USE ซึ่งในปัจจุบัน และควรเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 20 - 35 องศาเซลเซียส อายุการเก็บรักษาขึ้นอยู่กับแต่ละผลิตภัณฑ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 2.1 ภาพแสดงขวดแก้วขนาด 3 มิลลิลิตร ประเภท I (type I)

2.1.2 จุกยางปิดขวดแก้ว (Rubber stopper)

ในปัจจุบันจุกยางที่ใช้สำหรับวัคซีนเกือบทั้งหมดผลิตจากยางสังเคราะห์ Bromobutyl และ Chlorobutyl rubber (เรียกรวมว่า Halobutyl rubber) มีการนำมาใช้อย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีคุณสมบัติที่ดี เช่น ป้องกันการซึมผ่านของก๊าซและไอน้ำได้ดี ทนทานต่อกรด-ด่าง ทนทานต่อความร้อนและการถูกออกซิไดซ์ได้ดี มีความยืดหยุ่นดีที่อุณหภูมิต่ำ จุกยางมีส่วนผสมของสารเคมีอยู่หลายชนิด อาทิเช่น สารที่ช่วยทำให้โครงสร้างของยางอิ่มตัว สารที่ใช้เพิ่มหรือลดความแข็งของจุกยาง รวมทั้งสารให้สีด้วย หากจุกยางที่ผลิตไม่ได้มาตรฐาน อาจจะเกิดสารเคมีที่หลุดออกมาปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ หรือเกิดเศษชิ้นส่วนยางหลุดออกมาจากจุกยางขณะแทงด้วยเข็มฉีดยา ดังนั้น จึงจำเป็นที่จะต้องตรวจสอบคุณสมบัติของจุกยางสำหรับผลิตภัณฑ์อย่างเข้มงวด เพื่อให้เกิดความปลอดภัยต่อผู้ที่ใช้ยาตาม European Pharmacopoeia General หัวข้อ ELASTOMERIC CLOSURES FOR INJECTIONS โดยกำหนดการตรวจสอบจุกยางสำหรับวัคซีนไว้ ในทางอุตสาหกรรมการผลิตวัคซีนจะใช้จุกยางขนาด 13 มิลลิเมตร โดยจะมีการใช้งาน 2 แบบ คือ Lyophilization Rubber Stopper และ Regular Rubber Stopper มีอายุการใช้งานประมาณ 2 ปี หรือขึ้นอยู่กับผู้ผลิต และควรเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 15 - 25 องศาเซลเซียส

ภาพที่ 2.2 ภาพแสดงจุกยางแบบ Lyophilization Rubber Stopper

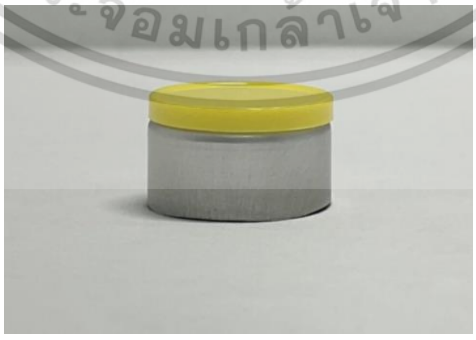
ที่มา : https://www.amazon.in/Rubber-Stopper-Lyophilization-Biomed-Solutions/dp/B09BNM2G5H

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 2.3 ภาพแสดงจุกยางแบบ Regular Rubber Stopper
ที่มา : https://pierpol.pl/en/produkt/13mm-butyl-rubber-stoppers-gray/

2.1.3 ฝาปิดอะลูมิเนียม (Aluminium cap)

ฝาปิดอะลูมิเนียม (Aluminium cap) เป็นฝาปิดดันไม่ทับกัน โดยใช้ขนาด 13 มิลลิเมตร ตัวฝาทำจากอะลูมิเนียม 8011 ที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย มีประสิทธิภาพในการกันความชื้น มีความแววาวสีเงิน-ขาว ฝาครอบรูตรงกลางซึ่งช่วยให้สามารถเข้าถึงบริเวณฉีดยาของจุกยางที่ปิดสนิทได้ทันที ฝาอะลูมิเนียมแต่ละดีไซน์มีเส้นผ่านศูนย์กลางและสีต่างกัน และที่สำคัญต้องปลอดสารพิษ เป็นเกรดบรรจุภัณฑ์ที่ใช้สำหรับอาหารได้ เทมเปอร์ H34 ด้านเดียว มีความเสถียร สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิต่ำหรือความร้อนที่เกิดขึ้นระหว่างการผลิต ซึ่งทำให้คุณสมบัติทางกลคงที่ อีกทั้งยังช่วยเพิ่มความเหนียวอีกด้วย ตัวฝาครอบพลาสติกอีพอกซีเรซินเคลือบแล็คเกอร์ ผลิตจากโพลีโพรพีลีน PPM H250 ที่ทนทานและความแข็งแรง ก่อนนำมาใช้งานฝาอะลูมิเนียมจะต้องผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการฉายรังสีแกมม่า บรรจุในถุงพลาสติกใส PE (Polypropylene) ปิดผนึกสองชั้น และฝาอะลูมิเนียมต้องปิดผนึก ไม่มีรอยขีดข่วน ก่อนนำมาใช้กับขวดแก้วขนาด 3 มิลลิลิตร ในส่วนวันหมดอายุดูตาม COA (Certificate of Analysis) หรือฉลากบนภาชนะจากผู้ผลิต และควรเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 15 - 25 องศาเซลเซียส ฝาปิดอะลูมิเนียมของคุณมีการออกแบบที่แตกต่างกัน



ภาพที่ 2.4 ภาพแสดงฝาปิดอะลูมิเนียมขนาด 13 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 *Brevundimonas diminuta*

Brevundimonas diminuta เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีขนาดเล็ก ไม่มีการหมัก สามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยแฟกเจลลัม เป็นเชื้อฉวยโอกาสที่แพร่หลายกระจายไปทั่วโลก โคโลนีมีลักษณะเป็นวงกลมชอล์กสีขาวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ไม่ก่อตัวเป็นสปอร์ ตัวเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ปรากฏเป็นแท่งเรียวยาว มักจะเจริญได้ดีเมื่อมี pH และอุณหภูมิเหมาะสม ด้วยความที่มีขนาดเล็ก ขนาดประมาณ 0.3 – 0.4 ไมโครเมตร x 0.6 – 1.0 ไมโครเมตร (Almuzara et al., 2012) จึงถูกใช้เป็นสิ่งมีชีวิตทดสอบเพื่อตรวจสอบความถูกต้องของอุปกรณ์การกรองรีเวิร์สออสโมซิส (RO) สำหรับน้ำดื่ม (Validate reverse-osmosis (RO) filtration) (Sundaram et al., 2001) และยังใช้เพื่อทดสอบการตรวจสอบตัวกรองมาตรฐานทั้งหมด สำหรับตัวกรองเกรดฆ่าเชื้อส่วนใหญ่ (Validation of membrane filters for sterilization) ASTM (2005) การศึกษาการตรวจสอบตัวกรองเฉพาะกระบวนการซึ่งเป็นมาตรฐานอุตสาหกรรมสำหรับการทดสอบการเก็บรักษาแบคทีเรียในตัวกรองเกรดการฆ่าเชื้อ การใช้เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ถูกเลือกเนื่องจากการสังเกตของ ดร.ฟรานเซส โบว์แมน (Dr. Frances Bowman) ว่าสามารถกรองผ่านเมมเบรน ขนาด 0.45 ไมโครเมตร (Bowman et al., 1967) นอกจากนั้นยังได้รับการแนะนำจาก FDA (Food and Drung Administration : องค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา) และ EMA (European Medicines Agency : องค์การยาแห่งสหภาพยุโรป) ที่เป็นมาตรฐานกลางของการงานเวชภัณฑ์อีกด้วย

ในการเลือกใช้เชื้อแบคทีเรียนี้ ซึ่งเป็นเชื้อ BSL2 เป็นเชื้อฉวยโอกาสก่อโรคได้ จึงต้องทำงานภายใต้ BSC Class ll โดยเริ่มต้นในการเตรียมเชื้อทดสอบ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อTryptic soy broth (TSB) และ Tryptic soy agar (TSA) เริ่มจากเชื้อที่สต็อกไว้ ถ่ายเชื้อเพลท ลงหลอด ลงฟลาส จากนั้นทำการเขย่าที่ความเร็ว 150-200 รอบ/นาที โดยระยะเวลาแต่ละขั้นตอนจะบ่มที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง และเตรียมปริมาตรเชื้อแบคทีเรียจะไม่น้อยกว่า 10^6 CFU/มิลลิลิตร ให้เพียงพอในการนำไปในการทดสอบโดยเชื้อแบคทีเรียที่ไม่น้อยกว่า 10^6 CFU/มิลลิลิตร เป็นไปตามกระบวนการทำให้ปราศจากเชื้อ SAL (Sterility Assurance Level)

2.3 การทดสอบความท้าทายของจุลินทรีย์และวิธีการทดสอบทางกายภาพ (Microbial Challenge and Physical test Methods)

สำหรับบรรจุภัณฑ์ยาที่ผ่านการฆ่าเชื้อส่วนใหญ่ ข้อกำหนดอัตราการรั่วไหลคือป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์เข้า ดังนั้นบรรจุภัณฑ์ดังกล่าวจึงต้องได้รับการตรวจสอบว่าป้องกันที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งการเลือกวิธีการทดสอบขึ้นอยู่กับใช้คุณสมบัติของตัวบรรจุภัณฑ์นั้น Population and Community Development Association (2016)

2.3.1 การทดสอบการท้าทายของจุลินทรีย์ (Microbial Challenge)

การทดสอบด้วยการใช้เชื้อจุลินทรีย์ เหมาะสมในการทดสอบกับการปิดหรือบรรจุภัณฑ์บางอย่างที่อาศัยเส้นทางที่คดเคี้ยว หรือข้อต่อต่างๆเพียงอย่างเดียวในการผ่านทาง,บรรจุภัณฑ์อาจไม่ทนต่อแรงดันแตกต่างที่ค่อนข้างสูงซึ่งจำเป็นสำหรับการทดสอบ มีการใช้เชื้อจุลินทรีย์เอามาทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ร่วมกับสภาะสุญญากาศ และเหมาะสำหรับการทดสอบพัฒนาและตรวจสอบการป้องกันการปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์

2.3.2 วิธีการทดสอบทางกายภาพ (Physical test Methods)

เหมาะสมต้องการสำหรับการตรวจสอบแพ็คเกจ มีวิธีการที่ละเอียดอ่อนเพียงพอซึ่งเข้ากันได้กับระบบ product-package ซึ่งใช้เครื่องมือที่มีความทันสมัย อาทิ ไมโครปิเปตต์ (Micropipette) หรือการเจาะด้วยเลเซอร์ (Laser drill) จำลองการสร้างขนาดของรอยรั่ว ต่างๆ เพื่อดูว่าเชื้อจุลินทรีย์สามารถผ่านรอยรั่วที่ขนาดที่เท่าใด แต่จะมีการนิยมใช้รอยรั่วขนาด 5 ไมโครเมตร ในการศึกษาทั่วไป

2.4 สภาวะสุญญากาศและสภาวะความดัน (Vacuum condition and pressure condition)

สภาวะสุญญากาศหรือสภาวะไร้อากาศ โดยความดันอากาศที่แตกต่างกันของสองพื้นที่ จะทำให้อากาศเคลื่อนตัวจากบริเวณที่มีความกดอากาศหรือความดันอากาศสูงกว่าไปหาบริเวณที่มีความดันอากาศต่ำกว่า และหากใช้ประโยชน์จากความดันที่แตกต่างนี้ จะสามารถบังคับเศษสิ่งสกปรกหรือฝุ่นให้เคลื่อนที่จากบริเวณที่มีความดันอากาศสูงกว่าไปสู่บริเวณที่ต่ำกว่าได้ นิยมอย่างแพร่หลายเพื่อให้ผลิตภัณฑ์ไม่ได้สัมผัสกับอากาศ และสภาวะความดันเป็นการเพิ่มการอัดแรงดันเข้าไป เพื่อดูว่ามีการรั่วซึมของบรรจุภัณฑ์ หากมีรั่วไหลของบรรจุภัณฑ์จะสามารถเห็นเส้นทางการเข้าของอากาศภายในของเหลวในบรรจุภัณฑ์ หรืออาจจะมีการเห็นเปลี่ยนแปลงของเหลวในบรรจุภัณฑ์ต่างไปจากเดิม เช่น เกิดการขุ่น การเกิดตะกอน เป็นต้น PDA. (2016)

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Literature review)

จากการศึกษาของ Helen et al. (2017) ในทดสอบการรั่วไหลของฮีเลียมและการซึมผ่านของจุลินทรีย์ ที่มีจุดมุ่งหมายเพื่อให้คำแนะนำที่ครอบคลุมและละเอียดสำหรับการประเมิน CCI สำหรับผลิตภัณฑ์ปลอดเชื้อ วิธีที่เหมาะสมที่สุดในการนำการรั่วไหลเทียมเข้าสู่ CCS รับรองการรับประกันที่เหมาะสมของ CCI ในระหว่างการผลิตผลิตภัณฑ์ยา ภายใต้เงื่อนไขการขนส่งและการเก็บรักษาในผลิตภัณฑ์ยาสถานะของแข็ง การซึมผ่านของจุลินทรีย์ ก็ยังถือเป็นวิธีการดั้งเดิมที่ได้รับความนิยมและน่าเชื่อถือ ที่ใช้ในการทดสอบปราศเชื้อของผลิตภัณฑ์ยาที่เป็นในรูปแบบเหลวหรืออาจจะมีรูปแบบของแข็งไลโอฟีไลซ์ (Lyophilize) ที่เป็นกระบวนการดึงน้ำออก ด้วยกระบวนการ freeze dry แต่ขณะเดียวกันก็ยังไม่มีมาตรฐานสำหรับวิธีทดสอบ CCI หรือสำหรับการสร้างรอยรั่วเทียมที่แน่นอน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีความยืดหยุ่นต่อแนวทาง CCI จึงต้องพิจารณาถึงการใช้งานที่ตั้งใจไว้ เช่น คุณสมบัติ CCS การผลิตตามปกติ หรือการควบคุมคุณภาพ และการออกแบบผลิตภัณฑ์ (เช่น บรรจุภัณฑ์ของเหลวเทียบกับผลิตภัณฑ์แห้ง) ร่วมด้วย

จากการศึกษาของ Roman et al. (2022) และคณะ ในทดสอบการรั่วไหลของฮีเลียมที่เป็นวิธีการทดสอบ CCI ที่ละเอียดอ่อนที่สุดในปัจจุบัน และควรใช้สำหรับการศึกษาคุณสมบัติและคุณลักษณะของระบบปิดภาชนะบรรจุเริ่มต้น (CCS) ปัจจุบัน ประสิทธิภาพของการรั่วไหลเทียมประเภทและขนาดต่างๆ รวมถึงมาตรฐานการรั่วไหลของฮีเลียมที่ผ่านการรับรองยังไม่ได้รับการระบุ

เอกสารนี้ ... ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ...

ลักษณะเฉพาะในห้องปฏิบัติการทดสอบต่างๆ ในการศึกษาแบบหลายบริษัทนี้ โดยได้แบ่งปันตัวอย่างรอยรั่วที่เตรียมไว้โดยปลอม 17 ตัวอย่าง โดยใช้รอยรั่วเทียมประเภทที่พบบ่อยที่สุดในช่วงขนาดที่กำหนดที่เกี่ยวข้อง ซึ่งมีวางจำหน่ายทั่วไปหรือสามารถเตรียมได้ง่ายในห้องปฏิบัติการ โดยใช้พารามิเตอร์การทดสอบที่กำหนดไว้ หากแต่ยังไม่มีข้อพิสูจน์ว่าสามารถเหมาะสมในการทดสอบมากกว่าการซึมผ่านของจุลินทรีย์ เพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการรับประกันความปราศเชื้อของผลิตภัณฑ์ยา ตามข้อกำหนดตามกฎหมาย

จากการศึกษาโปรโตคอล (Protocol) ที่เป็นข้อกำหนดที่ใช้เพื่อเป็นมาตรฐานสำหรับการขององค์กร ในหัวข้อเรื่องการศึกษาความสัมพันธ์ของการทดสอบการซึมผ่านของจุลินทรีย์และสภาวะสุญญากาศโดยเครื่องทดสอบการรั่วไหลของวิลโคแมต (WILCOMAT LEAK TESTER) พบว่า เมื่อนำตัวอย่างทดสอบที่ได้จากกระบวนการผลิตและที่ได้จากการจำลองการสร้างขนาดของรอยรั่วด้วยการเจาะด้วยเลเซอร์ (Laser drill) รอยรั่วขนาด 5 ไมโครเมตร เป็นจุ่มลงไปเชื้อแบคทีเรีย *B. diminuta* ATCC 19146 ที่มีการเตรียมการไว้ และนำไปทดสอบต่อในสภาวะสุญญากาศ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ 30-35 องศาเซลเซียล หลังจากครบกำหนดอ่านผล พบการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในตัวอย่างทดสอบที่เกิดรอยรั่วขนาด 5 ไมโครเมตร และตัวอย่างทดสอบที่ได้จากกระบวนการผลิต ไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียนี้ อาจจะเป็นได้ว่าสภาวะสุญญากาศไม่มีผลต่อการซึมผ่านของจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือ

3.1.1 ตู้ปลอดเชื้อ (Biosafety cabinet class II)

3.1.2 ตู้บ่มเพาะเชื้อ 30-35 องศาเซลเซียล

3.1.3 เครื่องเขย่าสารในรูปแบบเป็นวงกลม (Orbital shaker)

3.1.4 เครื่องมือวัดความขุ่นของจุลินทรีย์ (DensiCHEK^{TM} Plus)

3.1.5 เครื่องเขย่าสาร (Vortex mixer)

3.1.6 นาฬิกาตั้งเวลา

3.1.7 ไมโครปิเปต ขนาด 20-200 ไมโครลิตร

3.1.8 เครื่องควบคุมการดูดจ่ายสารละลาย (Pipette aid)

3.1.9 ปิเปตชนิดขวด (Dispenser pipette)

3.1.10 เครื่องดูดความชื้นแบบสุญญากาศและเกจวัดค่าแรงดัน (Vacuum desiccator with pressure gauge)

3.2 อุปกรณ์

3.2.1 ไมโครปิเปตทิป ขนาด 200 ไมโครลิตร

3.2.2 ทิปปิเปตที่มีตัวกรอง (Sterile combi tip)

3.2.3 หลอดทดลองแบบหนาพร้อมฝา ขนาด 20×150 มิลลิลิตร

3.2.4 หลอดทดลองแบบแล้วทิ้งพร้อมฝา ขนาด 12×75 มิลลิลิตร (Disposable test tubes)

3.2.5 หลอดเซนติฟิวก์ ขนาด 50 มิลลิลิตร (Centrifuge tube)

3.2.6 ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร (Erlenmeyer flask)

3.2.7 จุกสำสีปิดขวดรูปชมพู่ (Cotton stopper)

3.2.8 แท่งแก้วปาดเชื้อ (Spreader)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.9 ลูปเขี่ยเชื้อ (Inoculation loop)

3.2.10 ปิเปตแบบแล้วทิ้ง ขนาด 1 มิลลิลิตร, 5 มิลลิลิตร และ 10 มิลลิลิตร (Disposable pipettes)

3.2.11 บีกเกอร์ ขนาด 1,000 มิลลิลิตร

3.2.12 ปากคีบ (Forceps)

3.2.13 กระดาษเช็ด (Sterile wiper)

3.2.14 แอลกอฮอล์ 70%

3.2.15 Sterile Vesphene IIIse

3.2.16 ชุด McFarland Standards (range 0.0 to 4.0 McFarland)

3.2.17 ขวดแก้วขนาด 3 มิลลิลิตร ประเภท I ที่มีรอยรั่วขนาด 5 ไมโครเมตร

3.3 อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์

3.3.1 Tryptic soy agar plate (TSA)

3.3.2 Tryptic soy broth (TSB)

3.4 สารเคมี

3.4.1 น้ำบริสุทธิ์ (Purified water/Pure water)

3.5 จุลินทรีย์

3.5.1 *Brevundimonas diminuta* ATCC 19146

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6 ขั้นตอนการดำเนินการ

3.6.1 การเตรียมตัวอย่างทดสอบและชุดควบคุม (Positive control)

3.6.1.1 ตัวอย่างทดสอบและชุดควบคุม (Negative control) ได้มาจากการจำลองการบรรจุและการปิดบรรจุภัณฑ์ จากกระบวนการผลิตโดยใช้ TSB เป็นตัวแทนของผลิตภัณฑ์ในขวดแก้ว 3 มิลลิลิตร ตัวอย่างขวดละ 0.5 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกยางและฝาอะลูมิเนียม จำนวน 2 ชุด 42 ขวด ดังแสดงในตารางที่ 3.6.1

3.6.1.2 การเตรียมชุดควบคุม (Positive control) จะใช้ขวดแก้ว 3 มิลลิลิตร ที่มีรอยรั่วขนาด 5 ไมโครเมตร บรรจุตัวอย่างอาหาร TSB ลงในตัวอย่างขวดละ 0.5 มิลลิลิตร ปิดฝาด้วยจุกยางและฝาอะลูมิเนียมเรียบร้อย จำนวน 2 ขวด ดังแสดงในตารางที่ 3.6.1

ตารางที่ 3.6.1 แสดงชนิดของขวดแก้ว (Vial) ที่นำมาทดสอบ

ชนิดของตัวอย่าง	ตัวอย่างทดสอบชุดที่ 1	ตัวอย่างทดสอบชุดที่ 2
ตัวอย่างสำหรับทดสอบ	20 ขวด	20 ขวด
ชุดควบคุม (Negative control)	1 ขวด	1 ขวด
ชุดควบคุม (Positive control)	1 ขวด	1 ขวด
รวม	44 ขวด	

3.6.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *Brevundimonas diminuta*

3.6.2.1 แยกจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์ จากเชื้อแบคทีเรีย ที่เก็บสต็อกไว้ ด้วยวิธีการ Streak plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA จากนั้นบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

3.6.2.2 ถ่ายตัวอย่าง (inoculation) เชื้อแบคทีเรีย 1 ลูป ลงในหลอดทดลองแบบหนา ขนาด 20×150 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB บรรจุอยู่ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

3.6.2.3 ถ่ายตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย จากข้อ 3.6.2.2 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB บรรจุอยู่ปริมาตร 47.5 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำสี จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร ปรับความเร็วที่ 200 รอบ/นาที บ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.2.4 จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรีย จากข้อ 3.6.2.3 ไปทำ 10-fold serial dilution ตามตารางที่ 3.6.2 โดยเริ่มจากการทำหลอด A ก่อนเพื่อให้ทราบความเข้มข้นของเชื้อที่แน่นอน ก่อนนำใช้ในการทดสอบต่อไป

ตารางที่ 3.6.2 แสดงการเจือจางตัวอย่างแบบ 10-fold serial dilution

หลอด	A	B	C	D	E	F	G	H	I
การเจือจาง	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
ปริมาณของเชื้อ *B. diminuta*	1 ml ของ *B. diminuta*	1 ml ของหลอด A	3 ml ของหลอด B	0.1 ml ของหลอด C	0.1 ml ของหลอด D	0.1 ml ของหลอด E	0.1 ml ของหลอด F	0.1 ml ของหลอด G	0.1 ml ของหลอด H
ปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อ of TSB	9 ml	9 ml	27 ml	0.9 ml	0.9 ml	0.9 ml	0.9 ml	0.9 ml	0.9 ml
ปริมาตรทั้งหมด	10 ml	10 ml	30 ml*	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Vortex (วินาที)	10-15	10-15	10-15	10-15	10-15	10-15	10-15	10-15	10-15
Remark	วัดค่าความขุ่น (Measurement) 3.6.3.1	-	การทดสอบ CCIT (Testing) 3.6.3.2	-	-	-	การตรวจสอบยืนยันจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ (Microbial count) 3.6.3.3		

* ปริมาตรทั้งหมดของหลอด C จะมีการทำซ้ำ จำนวน 8 หลอด จึงมีปริมาตรทั้งหมด 240 มิลลิลิตร

3.6.3 การเตรียมการทดสอบ

3.6.3.1 การวัดค่าความขุ่นของเชื้อแบคทีเรีย (Measurement)

นำเชื้อแบคทีเรีย *B. diminuta* หลอด A จากตารางที่ 3.2 มาวัดค่าและหาค่าเฉลี่ยของความขุ่นเชื้อ ซึ่งควรจะมีค่าความขุ่นประมาณ 2.77–3.84 McFarland (ความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^{9}-10^{10} CFU/มิลลิลิตร) *ต้องวัดค่าความขุ่นก่อนนำไปทำ 10-fold serial dilution เนื่องจากจะได้ทราบความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียตั้งต้นก่อน*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.3.2 การทดสอบ CCIT (Container closure integrity test)

3.6.3.2.1 หลังจากมีการเตรียมตัวอย่างขวดแก้ว (Vials) (ข้อ 3.6.1) แบ่งเป็นตัวอย่างสำหรับทดสอบจำนวน 2 ชุด ชุดที่ 1 MDF 01/23 และชุดที่ 2 MDF 02/23 รวม 44 ขวด โดยแต่ละชุดตัวอย่างทดสอบจะประกอบด้วยตัวอย่างสำหรับทดสอบ 20 ขวด, ชุดควบคุม (Negative control) 1 ขวด และชุดควบคุม (Positive control) 1 ขวด รวม 22 ขวด

3.6.3.2.2 ถ่ายเชื้อแบคทีเรีย *B. diminuta* ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB จากหลอด C ในตารางที่ 3.2 ที่มีปริมาตรทั้งหมด 240 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 2 บีกเกอร์ บีกเกอร์ละ 120 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^6-10^7 CFU/มิลลิลิตร)

3.6.3.2.3 นำขวดแก้ว (Vials) 42 ขวด (ตัวอย่างสำหรับทดสอบ และชุดควบคุม (Positive control) จำนวน 2 ชุดจาก MDF 01/23 และ MDF 02/23) จุ่มในบีกเกอร์ในข้อที่ 3.6.3.3.2 เป็นเวลา 15 นาที โดยขวดแก้ว (Vials) ทั้งหมดต้องจมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.6.3.2.4 จากนั้นนำไปทดสอบในสภาวะสุญญากาศ ที่ 0.04 เมกะปาสคาล (MPa) เป็นเวลา 30 นาที และสภาวะความดัน ที่ 0.4 บาร์ เป็นเวลา 30 นาที (Vacuum condition และ Pressure condition)

3.6.3.2.5 หลังจากทำการทดสอบเสร็จ นำขวดแก้ว (Vials) มาล้างด้วยน้ำบริสุทธิ์ เช็ดด้วยกระดาษเช็ด (Sterile wiper) และสเปรย์ด้วยแอลกอฮอล์ 70% จากนั้นเช็ดด้วยกระดาษเช็ด (Sterile wiper) อีกครั้ง

3.6.3.2.6 นำขวดแก้ว (Vials) 44 ขวด (ตัวอย่างสำหรับทดสอบ, ชุดควบคุม (Positive control) และชุดควบคุม (Negative control) จำนวน 2 ชุดจาก MDF 01/23 และ MDF 02/23) บ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 7-14 วัน

3.6.3.2.7 เช็คผลวันที่ 7 และ 14 เพื่อตรวจสอบความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อภายในขวดแก้ว (Vials) เมื่อครบ 14 วัน นำชุดควบคุม (Positive control) หรือตัวอย่างสำหรับทดสอบที่มีความขุ่น มาทำการในการจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี Microbial Identification ด้วยเครื่อง VITEK® MS เพื่อยืนยันว่าเป็นเชื้อแบคทีเรีย *B. diminuta* จริง ไม่ได้มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์อื่น

3.6.3.3 การตรวจสอบยืนยันจำนวนเชื้อแบคทีเรีย (Microbial count)

ใช้ความเจือจางที่ 10^{-7}, 10^{-8} และ 10^{-9} จากหลอด G, H และ I ในตารางที่ 3.2 มาทำการตรวจสอบยืนยันจำนวนจุลินทรียด้วยวิธีการ Spread plate โดยปิเปตตัวอย่างเชื้อ 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ความเจือจางละ 3 ซ้ำ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 1-3 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.3.4 การจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ (Microbial Identification)

เมื่อบ่มตัวอย่างครบ 14 วัน นำชุดควบคุม (Positive control) หรือ ตัวอย่างสำหรับทดสอบที่มีความขุ่น มาทำการตรวจสอบยืนยันว่าเป็นเชื้อแบคทีเรีย *B. diminuta* จริง ไม่ได้มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์อื่น ด้วยวิธีการ Spread plate โดยปิเปตตัวอย่างเชื้อ 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 1-3 วัน จากนั้นทำการย้อมแกรมเพื่อดูสัณฐานวิทยา (Morphology) ก่อนนำไปวิเคราะห์ต่อด้วยเครื่อง VITEK® MS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การวัดค่าความขุ่นของเชื้อแบคทีเรีย (Measurement)

การวัดค่าความขุ่นของเชื้อแบคทีเรีย *B. diminuta* ก่อนนำไปทำ 10-fold serial dilution ก็เพื่อให้ได้ทราบความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียตั้งต้นที่แน่นอนก่อน เมื่อทำการเจือจางเชื้อลงทีละ 10 เท่า และคำนวณผลกลับก็จะทราบความเข้นข้นของเชื้อแบคทีเรีย เช่น การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าค่าการวัดความขุ่นประมาณ 2.77 - 3.84 McFarland จะมีความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียจะไม่น้อยกว่า 10^9 - 10^{10} CFU/มิลลิลิตร

จากการทำศึกษาครั้งนี้ นำหลอด A ในตารางที่ 3.6.2 มาทำการวัดค่าจำนวน 2 ครั้ง พบว่าครั้งที่ 1 วัดความขุ่นได้ 2.73 และครั้งที่ 2 วัดความขุ่นได้ 2.88 เมื่อนำค่าทั้งสองมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 2.77 - 3.84 McFarland (แสดงในตารางที่ 4.1.1) แสดงให้เห็นว่ามีความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียนี้จะไม่น้อยกว่า 10^9 - 10^{10} CFU/มิลลิลิตร ซึ่งสามารถนำไปทำ 10-fold serial dilution ในการทดสอบต่อไปได้ หากในกรณีที่ค่าความขุ่นของเชื้อแบคทีเรียน้อยกว่าช่วงที่กล่าวไปข้างต้น ก็จะต้องมีการเตรียมเชื้อแบคทีเรียตั้งแต่ขั้นตอนที่ 3.6.2.1 ถึง 3.6.2.4

ตารางที่ 4.1.1 แสดงค่าการวัดค่าความขุ่นของเชื้อแบคทีเรีย

ค่าการวัดความขุ่น ควรมีค่าประมาณ 2.77 - 3.84 McFarland (ความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียจะไม่น้อยกว่า 10^9 - 10^{10} CFU/มิลลิลิตร)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	การคำนวณค่าเฉลี่ยความขุ่น
ค่าการวัดความขุ่น	2.78	2.88	ค่าเฉลี่ย = $\frac{2.78 + 2.88}{2}$ = 2.83

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การตรวจสอบยืนยันจำนวนเชื้อแบคทีเรีย (Microbial count)

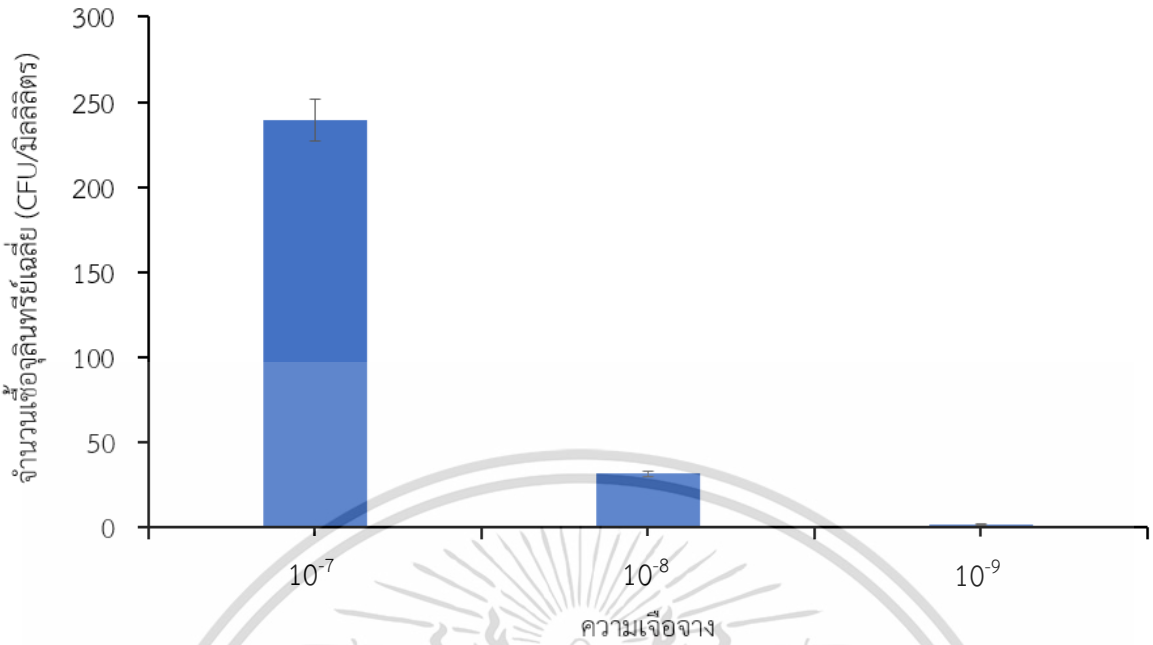
การตรวจสอบยืนยันจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *B. diminuta* เมื่อทำการ 10-fold serial dilution หรือทำการเจือจางเชื้อลงทีละ 10 เท่า จากความเจือจางที่ 10^{-7}, 10^{-8} และ 10^{-9} มาทำวิธีการ Spread plate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA เพื่อดูจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เจริญว่าอยู่ในช่วงที่สามารถนับได้ ตั้งแต่ 0-1000 โคโลนี และเมื่อคำนวณกลับก็จะสามารถทราบความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นได้

จากการทำศึกษาครั้งนี้ นำหลอด G, H และ I ในตารางที่ 3.6.2 การทำ 10-fold serial dilution มาทำการตรวจสอบยืนยันจำนวนเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้ความเจือจางที่ 10^{-7}, 10^{-8} และ 10^{-9} มาทำวิธีการ Spread plate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ความเจือจางละ 3 ซ้ำ จากนั้นทำการบ่มจนครบกำหนดและอ่านผล พบว่า จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่ความเจือจาง 10^{-7}, 10^{-8} และ 10^{-9} มีการเจริญในช่วงที่สามารถนับได้ ซึ่งมีจำนวนเชื้อแบคทีเรียค่าเฉลี่ย 239 โคโลนี, 32 โคโลนี และ 2 โคโลนี ตามลำดับ และคำนวณค่าเฉลี่ยโคโลนีที่อยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี ทั้งหมดอยู่ที่ 2.79×10^{10} CFU/มิลลิลิตร (แสดงในตารางที่ 4.2.1) ซึ่งแสดงให้เห็นได้ว่าความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียที่นำมาใช้ทดสอบเริ่มมีจำนวนเชื้อแบคทีเรียไม่น้อยกว่า 10^{9} - 10^{10} CFU/มิลลิลิตร จากความเจือจาง 10^{-7}, 10^{-8} และ 10^{-9} ที่จะมี จำนวนเชื้อแบคทีเรียเจริญในช่วง 100-1000 โคโลนี, 10-100 โคโลนี และ 0-10 โคโลนี ตามลำดับ ดังนั้นจึงสามารถใช้ตรวจสอบยืนยันจำนวนเชื้อแบคทีเรียได้

ตารางที่ 4.2.1 แสดงจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เจริญในความเจือจางต่างๆ

ความเจือจาง	ซ้ำที่	ผลการ Spread plate (โคโลนี)	ค่าเฉลี่ย (โคโลนี)	ค่าเฉลี่ยทั้งหมด (CFU/มิลลิลิตร)
10^{-7}	1	237	239	2.79×10^{10}
	2	242		
	3	239		
10^{-8}	1	33	32	
	2	31		
	3	31		
10^{-9}	1	1	2	
	2	2		
	3	3		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.1 ภาพแสดงความสัมพันธ์ของจำนวนเชื้อแบคทีเรียเฉลี่ยที่ความเจือจางต่างๆ

4.3 เกจ์วัดค่าในสภาวะสุญญากาศและสภาวะความดันก่อนและขณะใช้งาน (Vacuum condition and pressure condition)

สภาวะสุญญากาศและสภาวะความดัน เป็นการสร้างสภาวะจำลองในการขนส่งผลิตภัณฑ์หรือการเก็บรักษา ว่าเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของสภาวะภายนอกจะส่งผลต่อผลิตภัณฑ์ภายในบรรจุภัณฑ์หรือไม่ ดังนั้นก่อนการทดสอบ จึงต้องมีตรวจสอบเกจ์วัดค่าในสภาวะสุญญากาศและสภาวะความดันก่อนและขณะใช้งาน (Vacuum condition และ Pressure condition) (แสดงในภาพที่ 4.2 และ 4.3) เพื่อแสดงให้เห็นว่าเครื่องมือหรืออุปกรณ์ที่นำมาใช้งานสามารถใช้งานได้ ไม่พบข้อผิดพลาดก่อนและขณะการทดสอบ

จากการทำศึกษาครั้งนี้ มีการใช้ค่าสภาวะสุญญากาศขณะใช้งานอยู่ที่ 0.04 เมกะปาสคาล (MPa) และมีการใช้ค่าสภาวะสุญญากาศขณะใช้งานอยู่ที่ 0.4 บาร์ (bar) ซึ่งการทดสอบนี้เครื่องมือเป็นไปได้อย่างดี เกจ์วัดค่าใช้งานได้ปกติ ตัวเครื่องมือไม่มีการรั่วไหล หากใช้แรงดันมากกว่านี้ ตัวเครื่องอาจจะเกิดการระเบิดได้ เนื่องจากตัวเครื่องสามารถรับแรงดันสูงสุดได้เพียง 0.5 บาร์ (bar) เท่านั้น

* 1 บาร์ (bar) = 0.1 เมกะปาสคาล (MPa)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.2 ภาพแสดงเกจ์วัดค่าสภาวะสุญญากาศขณะใช้งานอยู่ที่ 0.04 เมกะปาสคาล (MPa)

ภาพที่ 4.3 ภาพแสดงเกจ์วัดค่าสภาวะสุญญากาศขณะใช้งานอยู่ที่ 0.4 บาร์ (bar)

4.4 การทดสอบ CCIT (Container closure integrity test)

จากการศึกษาการทดสอบ CCIT (Container closure integrity test) โดยทดสอบการซึมผ่านของเชื้อแบคทีเรีย *B. diminuta* ภายใต้สภาวะสุญญากาศด้วยเครื่องทดสอบการรั่ว (Wilcomat leak tester) พบว่า รอยรั่วที่เกิดจากการใช้การเจาะด้วยเลเซอร์ (Laser drill) ขนาด 5 ไมโครเมตร หลังทำการทดสอบมีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียนี้ เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ภายในบรรจุภัณฑ์ มีความขุ่น มีสีเปลี่ยนแปลงไปจากสีเหลืองก่อนหน้าไปเป็นสีขาวขุ่น ดังนั้นแล้วจึงมีการนำขวดแก้วที่มีรอยรั่ว ขนาด 5 ไมโครเมตรดังกล่าว มาใช้เป็นชุดควบคุม (Positive control) เนื่องจากมีการทราบแล้วว่าจะมีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียนี้อย่างแน่นอน

จากการทำศึกษาครั้งนี้ ในการศึกษาการทดสอบ CCIT (Container closure integrity test) โดยนำขวดแก้ว (vials) 44 ขวด จำนวน 2 ชุด ชุดที่ 1 MDF 01/23 และชุดที่ 2 MDF 02/23 ซึ่งประกอบไปด้วย ตัวอย่างสำหรับทดสอบ, ชุดควบคุม (Positive control) และชุดควบคุม (Negative control) จำนวนชุดละ 22 ขวดทดสอบจุ่มในบีกเกอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อแบคทีเรียไม่น้อยกว่า 10^6 CFU/มิลลิลิตร และทดสอบสภาวะภายใต้ความดัน ก่อนนำไปบ่มและครบกำหนดการอ่านผลภายในวันที่ 7 และวันที่ 14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่าชุดที่ 1 MDF 01/23 และชุดที่ 2 MDF 02/23 ตัวอย่างสำหรับทดสอบ, และชุดควบคุม (Negative control) จำนวน 42 ขวด พบว่าไม่มีความขุ่น แสดงว่าไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและชุดควบคุม (Positive control) ทั้ง 2 ชุด จำนวน 2 ขวด พบว่ามีความขุ่น แสดงว่ามีการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (แสดงในภาพที่ 4.4, 4.5, 4.6 และ 4.7)

หลังจากการอ่านผลครบทั้ง 14 วัน พบว่า ชุดควบคุม (Positive control) มีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *B. diminuta* เนื่องด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ภายในบรรจุภัณฑ์ มีความขุ่นและมีสีเปลี่ยนแปลงไปจากสีเหลืองก่อนหน้าไปเป็นสีขาวขุ่น และตัวอย่างสำหรับทดสอบและชุดควบคุม (Negative control) ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียนี้ เนื่องด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ภายในบรรจุภัณฑ์ ไม่มีความขุ่นและไม่มีสีเปลี่ยนแปลงไปจากสีเหลืองก่อนหน้าไปเป็นสีขาวขุ่นนั้น ซึ่งเป็นไปตามวัตถุประสงค์ แสดงให้เห็นว่าการปิดบรรจุภัณฑ์และตัวบรรจุภัณฑ์เอง สามารถป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ได้ แม้จะมีสภาวะที่เปลี่ยนแปลงไป

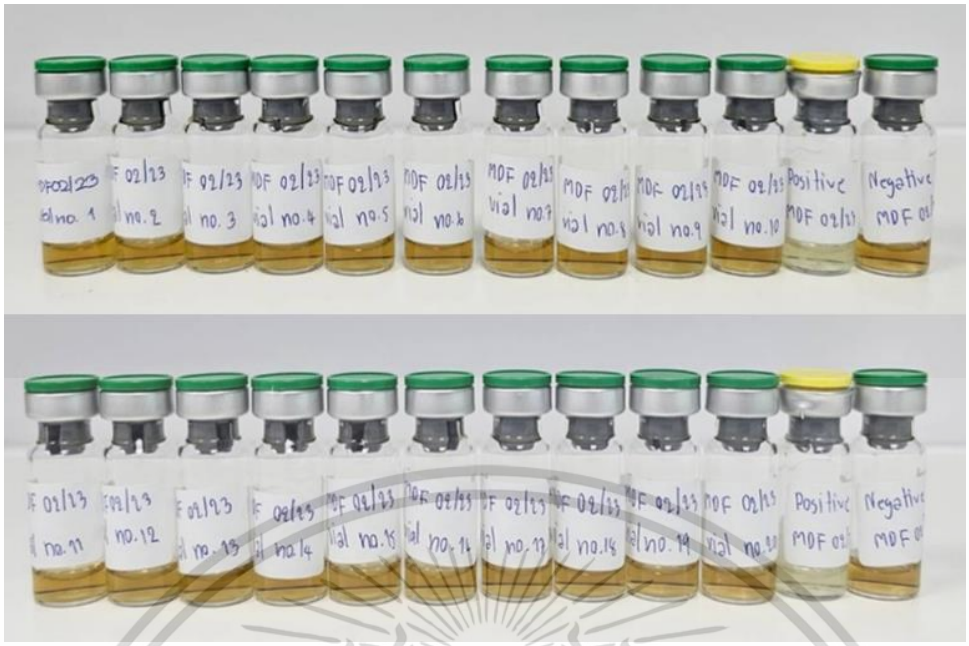
ภาพที่ 4.4 ภาพแสดงตัวอย่างทดสอบชุดที่ 1 (MDF 01/23) หลังบ่ม เป็นเวลา 7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.5 ภาพแสดงตัวอย่างทดสอบชุดที่ 2 (MDF 02/23) หลังบ่ม เป็นเวลา 7 วัน

ภาพที่ 4.6 ภาพแสดงตัวอย่างทดสอบชุดที่ 1 (MDF 01/23) หลังบ่ม เป็นเวลา 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.7 ภาพแสดงตัวอย่างทดสอบชุดที่ 2 (MDF 02/23) หลังบ่ม เป็นเวลา 14 วัน

4.5 การจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ (Microbial Identification)

การจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ (Microbial Identification) ด้วยเครื่อง VITEK® MS ที่เป็นนวัตกรรมใหม่ที่ใช้จำแนกชนิดของจุลินทรีย์และยีสต์ได้อย่างรวดเร็ว ใช้งานง่ายสามารถจำแนกเชื้อออกมาได้แต่ละชนิดได้อย่างถูกต้อง การทำงานของเครื่องใช้หลักการ MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of flight) และมีฐานข้อมูลเชื้อมากกว่า 2,500 สายพันธุ์ และการทดลอง 1 ครั้ง สามารถทำตัวอย่างเชื้อได้มากถึง 192 ตัวอย่าง สามารถลดเวลาในเทียบข้อมูลของเชื้อจุลินทรีย์ และมีความถูกต้องแม่นยำ จึงเป็นเครื่องมือที่นิยมนำมาใช้ในการจำแนกเชื้อจุลินทรีย์

จากการทำศึกษาครั้งนี้ ผลการตรวจสอบการจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ (Microbial Identification) ของชุดควบคุม (Positive control) ทั้ง 2 ชุด จำนวน 2 ขวด ซึ่งมีความขุ่น แสดงว่ามีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *B. diminuta* นำไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ให้มีการเจริญของโคโลนีเดี่ยว หลังจากนั้นนำไปย้อมแกรมเพื่อดูสัณฐานวิทยา (Morphology) เบื้องต้น พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ และเมื่อนำไปวิเคราะห์ต่อด้วยเครื่อง VITEK® MS พบว่า ชุดควบคุม (Positive control) ทั้ง 2 ชุด มีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียนี้จริง ดังนั้นการทดสอบในครั้งนี้จึงเป็นไปได้ด้วยดีและประสบผลสำเร็จ เนื่องจากมีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *B. diminuta* จริง และไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อื่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาการทดสอบความสมบูรณ์ของการปิดบรรจุภัณฑ์ โดยการทดสอบการซึมผ่านของจุลินทรีย์จากการทดสอบโดยการจุ่มในของเหลวที่มีเชื้อแบคทีเรีย *B. diminuta* ในสภาวะสุญญากาศและสภาวะความ สำหรับการทดลองนี้จะมีการใช้ตัวอย่างทดสอบและชุดควบคุม (Negative control) จำนวน 2 ชุดจำนวน 42 ขวด ที่ได้มาจากการจำลองการบรรจุและการปิดบรรจุภัณฑ์จากกระบวนการผลิต โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB เป็นตัวแทนของผลิตภัณฑ์บรรจุ ปิดด้วยจุกยางและฝาอะลูมิเนียมแน่นหนา และในส่วนชุดควบคุม (Positive control) จะใช้ขวดที่มีรอยรั่วขนาด 5 ไมโครเมตร บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่เป็นตัวแทนของผลิตภัณฑ์ ปิดด้วยจุกยางและฝาอะลูมิเนียมเรียบร้อย จากนั้นมาทำการทดสอบ CCIT (Container closure integrity test) โดยเตรียมให้ค่าเฉลี่ยการวัดความขุ่นอยู่ระหว่าง 2.77 - 3.84 McFarland ในการเจือจางตัวอย่างแบบ 10-fold serial dilution และอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อแบคทีเรีย ก่อนที่จะนำไปทดสอบ CCIT ไม่น้อยกว่า 10^6 CFU/มิลลิลิตร และการตรวจสอบยืนยันจำนวนเชื้อแบคทีเรีย (Microbial count) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ที่ความเจือจาง 10^{-7}, 10^{-8} และ 10^{-9} หลังการบ่มเป็นเวลา 3 วัน ผลมีการเจริญในช่วงที่สามารถนับได้และค่าเฉลี่ยโคโลนีที่อยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี มีค่าเฉลี่ยทั้งหมดอยู่ที่ 2.79 x 10^{10} CFU/มิลลิลิตร และการทดสอบความสมบูรณ์ของการปิดบรรจุภัณฑ์ CCIT หลังทดสอบ จำนวน 2 ชุด ในวันที่ 7 และวันที่ 14 ผลที่ได้คือ ขวดแก้ว (Vials) ตัวอย่างสำหรับทดสอบและชุดควบคุม (Negative control) ชุดที่ 1 MDF 01/23 จำนวน 21 ขวด ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ไม่มีความขุ่น เกิดจากการไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและชุดควบคุม (Positive control) ที่มีรอยรั่วที่ขวดขนาด 5 ไมโครเมตร จำนวน 1 ขวด มีการเปลี่ยนแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB มีความขุ่น เกิดจากมีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและขวดแก้ว (Vials) ตัวอย่างสำหรับทดสอบและชุดควบคุม (Negative control) ชุดที่ 2 MDF 02/23 จำนวน 21 ขวด ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ไม่มีความขุ่น เกิดจากการไม่มีการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและชุดควบคุม (Positive control) ที่มีรอยรั่วที่ขวดขนาด 5 ไมโครเมตร จำนวน 1 ขวด มีการเปลี่ยนแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB มีความขุ่น เกิดจากมีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียหลังจากนำชุดควบคุม (Positive control) ที่มีรอยรั่วที่ขวดขนาด 5 ไมโครเมตร จำนวน 2 ขวด มีความขุ่น ไปทำการจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ (Microbial Identification) ด้วยเครื่อง VITEK® MS พบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรีย *B. diminuta* จริง

ดังนั้นการทดสอบความสมบูรณ์ของการปิดบรรจุภัณฑ์ บรรจุภัณฑ์สามารถป้องกันปนเปื้อนของจุลินทรีย์ได้ แม้จะอยู่ในสภาวะที่แตกต่างกัน ทั้งสภาวะสุญญากาศและสภาวะความดัน เมื่อมีสภาวะที่ต่างกันดังกล่าวข้างต้น ไม่ส่งผลกระทบต่อการปิดบรรจุภัณฑ์ บรรจุภัณฑ์ยังคงรักษาความสมบูรณ์สามารถป้องกันการสูญเสียผลิตภัณฑ์ และป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ จึงมั่นใจได้ว่าผลิตภัณฑ์ยังมีคุณสมบัติและคุณภาพตรงตามมาตรฐานความปลอดภัยในระหว่างการจัดเก็บหรือการขนส่งผลิตภัณฑ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองดังกล่าวเป็นส่วนนึงในการทดสอบความสมบูรณ์ของการปิดบรรจุภัณฑ์ ในสภาวะความดันที่แตกต่างกัน ซึ่งได้ตัวอย่างทดสอบมาจากการจำลองการบรรจุและการปิดบรรจุภัณฑ์จากกระบวนการผลิต ในความเป็นจริงมีการผลิตผลิตภัณฑ์จำนวนมาก ซึ่งไม่สามารถตรวจครอบคลุมได้ทั้งหมด การทดสอบดังกล่าวข้างต้นอาจจะเป็นการตรวจสอบพื้นฐาน และอาจจะมีการพัฒนาในการทดสอบต่อไป เพื่อจะมั่นใจได้ว่าผลิตภัณฑ์ที่บรรจุยังมีคุณสมบัติและคุณภาพตรงตามมาตรฐานความปลอดภัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

สถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ (องค์การมหาชน). การทำให้ปราศจากเชื้อ (sterilization) ในเครื่องมือแพทย์ด้วยวิธีการฉายรังสี ตาม ISO11137 [ออนไลน์]. 2566, ค้นหาวันที่ 29 ตุลาคม 2566 แหล่งที่มา https://www.tint.or.th/download/service/Q_A%20%E0%B8%81%

สำนักงานคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร. 2561. การตรวจวิเคราะห์ Total Plate Count ด้วยวิธี Pour Plate และ Spread Plate ในน้ำและน้ำแข็ง.

Almuzara, M.N., Barberis C.M., Rodríguez C.H., Famiglietti A.M.R., Ramirez M.S. and Vay C.A. 2012. First Report of an Extensively Drug-Resistant VIM-2 Metallo-β-Lactamase-Producing *Brevundimonas diminuta* Clinical Isolate. J. Clin. Microbiol. 50:2830–2832.

American Society for Testing and Materials (ASTM). 2005. Standard Test Method for Determining Bacterial Retention of Membrane Filters Utilized for Liquid Filtration F838, 1-6

Bowman, FW., Calhoun, MP & White. 1967. M. J. Pharm. Sci., 56(2): 453–459.

Helen, B., Hanns-Christian M., James M., Alejandra N., Daniel W., Matthias S., Roman M., Juergen K., Franz S., Sascha D., Holger R., Markus H. and Klaus W. 2017.PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology March. 71(2): 147-162.

European Pharmacopoeia. 2017. ELASTOMERIC CLOSURES FOR INJECTIONS 9(1): 381.

European Pharmacopoeia. 2017. GLASS CONTAINERS FOR PHARMACEUTICAL USE. 9(1): 453.

Food and Drung Administration (FDA). 2008. Guidance for Industry Container and Closure System Integrity Testing in Lieu of Sterility Testing as a Component of the Stability Protocol for Sterile Products. U. S. Department of Health and Human Services.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kirsch, L.E., Nguyen, L., Kirsch, A.M. et al. 1999.Pharmaceutical Container/Closure Integrity V: An Evaluation of the WILCO ‘‘LFC’’ Method for Leak Testing Pharmaceutical Glass-stoppered Vials. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology. 53(5): 235–239.

Mellmann, A., Cloud J., Maier T., et al. 2008. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of Flight Mass Spectrometry in Comparison to 16S rRNA Gene Sequencing forSpeciesIdentification of Nonfermenting Bacteria. J Clin Microbiol. 46:1946–54.

Lee, H., Lee S. and Kim W. 2002. Changes in the cell size of *Brevundimonas diminuta* using differentgrowth agitation rates. PDA J Pharm Sci Technol. 56:99–108

Lipuma, J., Currie B, Peacock S, et al. 2011. *Burkholderia, Stenotrophomonas, Ralstonia, Cupriavidus, Pandoraea, Brevundimonas, Comamonas, Delftia* and *Acidovorax*. In:Versalovic J, Carroll K, Funke G, Jorgensen J, Landry M,Warnock D, editors. Manual of Clinical microbiology.10th ed. Washington: DC: ASM Press. 692–713.

Lu , B., Shi Y, Zhu F, et al. 2013. Pleuritis due to *Brevundimonas diminuta* in a previously healthy man. J MedMicrobiol. 62: 479–82.

Population and Community Development Association (PDA). 2016. PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology. “Microbial Challenge and Physical test Methods. 52: 8.

Population and Community Development Association (PDA). 2016. PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology “Vacuum/Pressure Decay)”. 52: 35-36

Rockville, MD. 2004. FDA Guidance for Industry, Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing, Current Good Manufacturing Practice. FDA CDER/CBER/ORA.

Roman, M., Klaus W., David R., Daniel W., Sascha D., Florian W., Prudvi Raj M., Debora B., Christian Müller, Kerstin Traub-Hoffmann and Henri Hebting. 2022. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology May. 76(3): 216-235

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sundaram, S., Eisenhuth J., Howard G., Jr., et al. 2001. Retention of water-borne bacteria by membranefilters. Part I: Bacterial challenge tests on 0.2 and 0.22 micron rated filters. PDA J Pharm SciTechnol. 55: 65–86.

Sundaram, S., Eisenhuth J., Howard G., et al. 2001. Method forQualifying Microbial Removal Performance of 0.1 Micron Rated Filters Part I: Characterization of Water Isolates for Potential Use as StandardChallenge Organisms to Qualify 0.1 Micron Rated Filters. PDA J Pharm Sci Technol. 55: 346–72.

Tim, S. 2017. Liquid Immersion Microbial Challenge Tests: Microbial Testing for Container Closure Integrity. 2-5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) ในการเจือจางตัวอย่างแบบ 10-fold serial dilution และการเตรียมชุดควบคุม (Positive control) สำหรับการทดสอบ CCIT (Container closure integrity test) จึงต้องจัดเตรียมประมาณ 500 มิลลิลิตร

การเตรียมอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB)

Pancreatic digest of casein	8.50	กรัม
Pancreatic digest of soybean meal	1.50	กรัม
Sodium chloride	2.50	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate	1.25	กรัม
Dextrose (Glucose)	1.25	กรัม
Purified water/Pure water	500	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

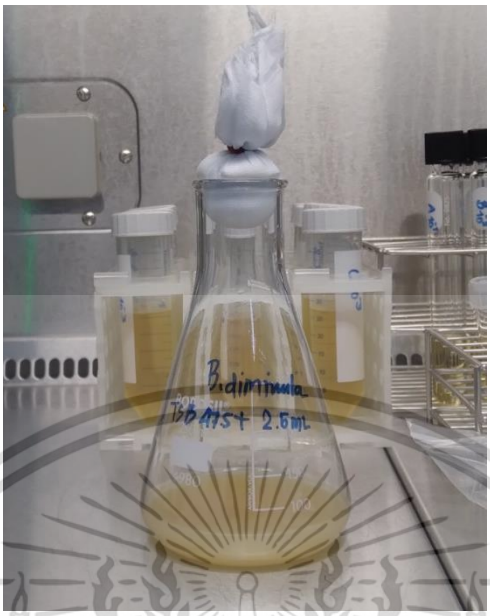
ภาคผนวก ข

- **การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *Brevundimonas diminuta***

เชื้อแบคทีเรีย *B. diminuta* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA หลังบ่มเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

เชื้อแบคทีเรีย *B. diminuta* ในหลอดทดลองแบบหนาขนาด 20×150 มิลลิลิตร
หลังบ่มเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

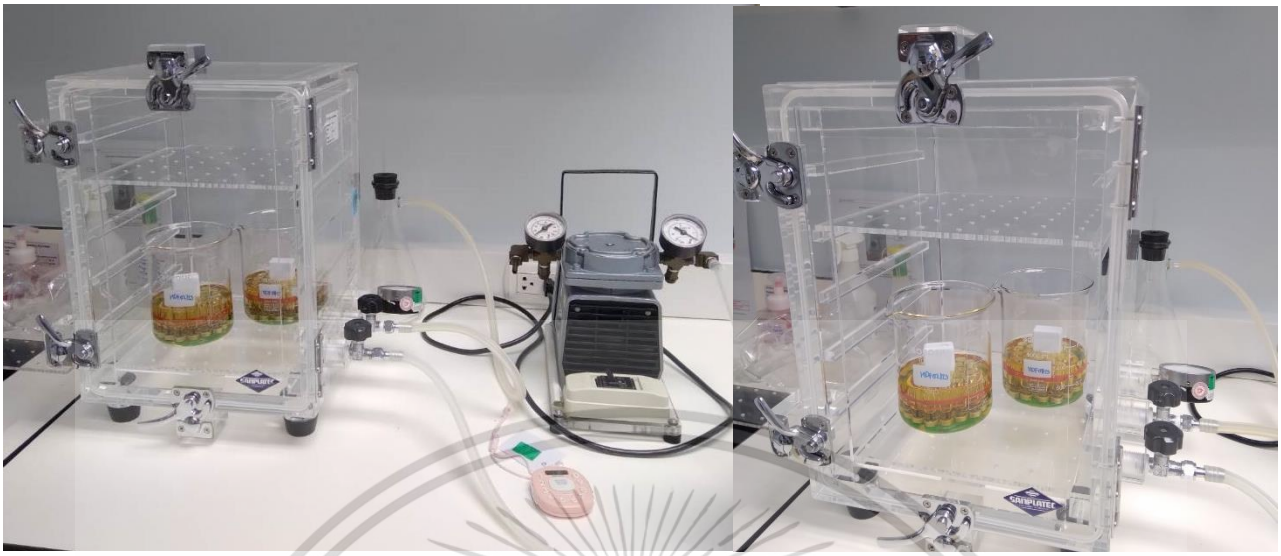


เชื้อแบคทีเรีย *B. diminuta* ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร หลังบ่มเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

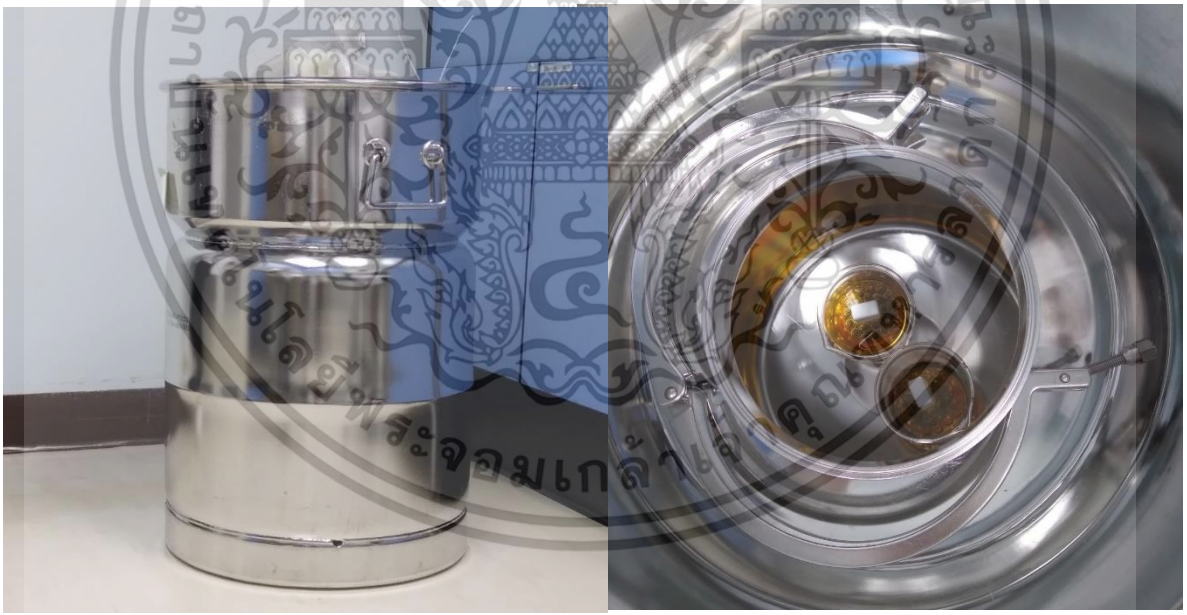
- **การทดสอบ CCIT (Container closure integrity test)**

ขวดแก้ว (Vials) ตัวอย่างสำหรับทดสอบ และชุดควบคุม (Positive control) 2 ชุด
จำนวน 42 ขวด จุ่มในบีกเกอร์อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีเชื้อแบคทีเรีย *B. diminuta*
เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



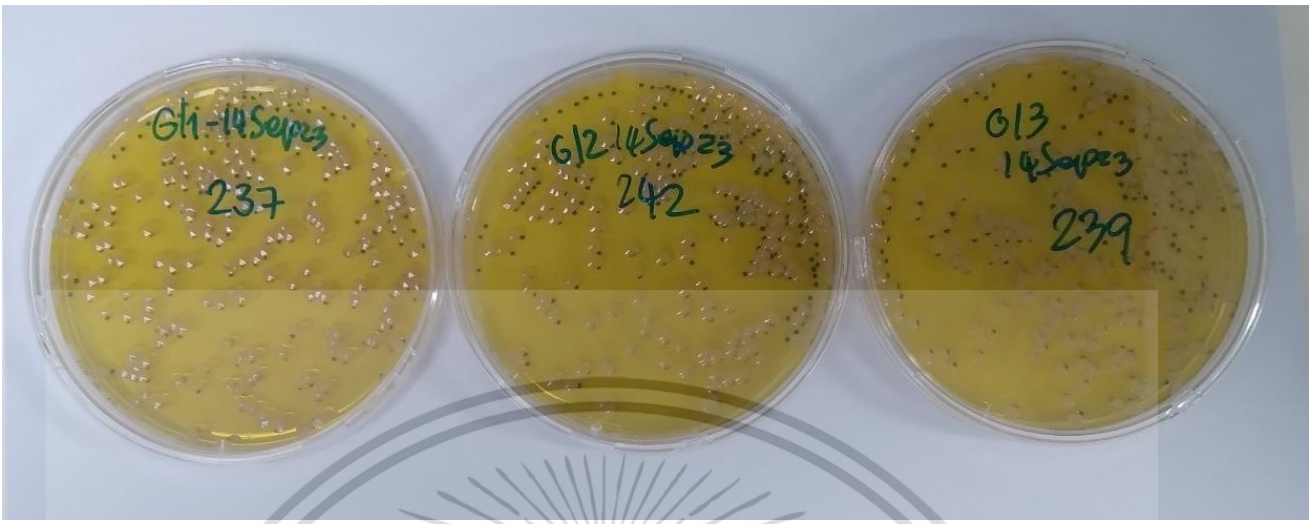
การทดสอบในสภาวะสุญญากาศ (Vacuum condition) ที่ 0.04 เมกะปาสคาล (MPa) เป็นเวลา 30 นาที



การทดสอบในสภาวะความดัน (Pressure condition) ที่ 0.4 บาร์ เป็นเวลา 30 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

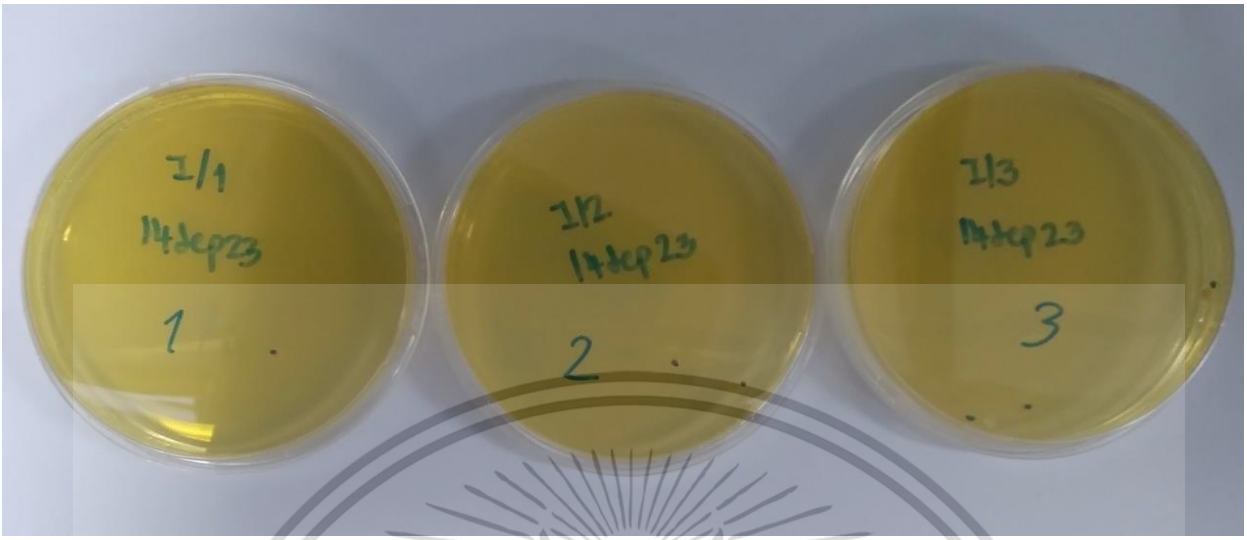
- **การตรวจสอบยืนยันจำนวนเชื้อแบคทีเรีย (Microbial count)**



จำนวนเชื้อแบคทีเรีย *B. diminuta* ที่ความเจือจางที่ 10^{-7} บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA หลังบ่มเป็นเวลา 3 วัน

จำนวนเชื้อแบคทีเรีย *B. diminuta* ที่ความเจือจางที่ 10^{-8} บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA หลังบ่มเป็นเวลา 3 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



จำนวนเชื้อแบคทีเรีย *B. diminuta* ที่ความเจือจางที่ 10^{-9} บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA หลังบ่มเป็นเวลา 3 วัน

- **การจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ (Microbial Identification)**

ชุดควบคุม (Positive control) ทั้ง 2 ชุดที่มีความขุ่น ก่อนนำไปตรวจสอบการจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ (Microbial Identification)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
คำรับรองเล่มโครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา

วันที่ 20 เดือน พฤศจิกายน พ.ศ. 2566

ข้าพเจ้า นางสาวกนกวรรณ วรชิราภรณ์ รหัสประจำตัว 63050440

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาชีววิทยา ขอรับรองว่าสหกิจศึกษา เรื่อง

ชื่อภาษาไทย การทดสอบความสมบูรณ์ของการปิดบรรจุภัณฑ์ โดยการทดสอบการซึมผ่านของจุลินทรีย์ (การทดสอบโดยการจุ่มในของเหลวที่มีเชื้อจุลินทรีย์ สภาวะภายใต้ความดัน)

ชื่อภาษาอังกฤษ Contriner closure integrity test by microbial ingress test (microbial challenge, liquid immersion within a pressurized environment)

ปีการศึกษา 2566

เป็นผลงานวิจัยที่มิได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนแบบงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากวิทยานิพนธ์ฉบับสมบูรณ์แล้ว โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์ 0.00 %

ลงชื่อ.....กนกวรรณ วรชิราภรณ์.....
(นางสาวกนกวรรณ วรชิราภรณ์)
นักศึกษา

ข้าพเจ้า ดร.วิมลมาศ บุญมี อาจารย์ที่ปรึกษาสหกิจศึกษาได้ตรวจสอบสหกิจศึกษาของนักศึกษาข้างต้นแล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ.....
(ดร.วิมลมาศ บุญมี)
อาจารย์ที่ปรึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้