Ubon Rajathanee University

รายงานการวิจัย

การศึกษาคุณภาพของยาน้ำแผนโบราณสำหรับเด็กและสตรี ที่ผลิตในจังหวัดอุบลราชธานี

(Studies on the Quality of Traditional Liquid Preparations for Children and Women Produced in Ubon Ratchathani)

วิภาวี เสาหิน
กาญจนา มหาพล
ถนอมศักดิ์ ชิราวุฒิ
จรรยา อินทรหนองไผ่

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
หมวดเงินอุดหนุนทั่วไป ปีงบประมาณ 2543
รหัสโครงการวิจัย : 03009 122-0003

ISBN : 974-9541-44-8

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

A Research Report

Studies on the Quality of Traditional Liquid Preparations for Children amd Women Produced in Ubon Ratchathani

Wipawee Saohin
Kharnchana Mahapol
Thanomsak Chiravuth
Junya Intaranogpai

This research was financially supported from The National research Council of Thailand
In fiscal year, 2000
Research Code : 03 009 122-0003

ISBN : 974-9541-44-8

Ubon Rajathanee University

การศึกษาคุณภาพของยาน้ำแผนโบราณสำหรับเด็กและสตรีที่ผลิตในจังหวัดอุบลราชธานี

ISBN : 974-9541-44-8

หัวหน้าโครงการวิจัย นางสาววิภาวี เสาหิน[1] อาจารย์ ระดับ 7 ภ.บ.,Ph.D. (Pharmaceutics)

ผู้ร่วมโครงการวิจัย นางสาวกาญจนา มหาพล[2] เภสัชกร ระดับ 7 ภ.บ.,ส.ม.(สาธารณสุขศาสตร์)

นายถนอมศักดิ์ ชิราวุฒิ[1] อาจารย์ ระดับ 6 ภ.บ., ภ.ม.(เภสัชเคมี)

นางสาวจรรยา อินทรหนองไผ่[1] อาจารย์ ระดับ 6 ภ.บ., ภ.ม.(เภสัชเคมี)

[1] กลุ่มวิชาเภสัชเคมีและเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

โทรศัพท์ (045) 288382-3 โทรสาร (045) 288384

[2] กลุ่มงานคุ้มครองผู้บริโภคและเภสัชสาธารณสุข สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดอุบลราชธานี

โทรศัพท์ (045) 262699 โทรสาร (045) 241918

โครงการนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ หมวดเงินอุดหนุนทั่วไป ปีงบประมาณ 2543 จำนวนเงิน 172,400.-บาท ระยะเวลาทำการวิจัย 2 ปี (พ.ศ. 2543-2545)

รหัสโครงการวิจัย : 03009 122-0003

บทคัดย่อ

การศึกษาคุณภาพของยาน้ำแผนโบราณสำหรับเด็กและสตรีที่ผลิตในเขตจังหวัดอุบลราชธานีทำโดยเก็บตัวอย่างวัตถุดิบ 23 รายการและยาน้ำ 6 ตำรับ จากผู้ผลิต 3 แหล่ง เพื่อนำมาศึกษาดังนี้ 1) วัตถุดิบ โดยหาปริมาณความชื้น (Loss on Drying) 2) ยาน้ำ โดยหาการปลอมปนของสารสเตียรอยด์สองชนิดคือเพรดนิโซโลน (prednisolone) และเด็กซ่าเมทาโซน (dexamethasone), ปริมาณเอทานอล, การปลอมปนของคลอโรฟอร์มและการปนเปื้อนทางจุลินทรีย์ การศึกษาตอนที่ 1 ทำทุกรายการทั้งวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ยาน้ำ พบว่าร้อยละ 95.65 ของวัตถุดิบมีปริมาณความชื้นไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานของ The United States Pharmacopoeia 24 (NF XVIIII) 1999 ตรวจไม่พบการปลอมปนของสารสเตียรอยด์ทั้งสองชนิดทุกตัวอย่าง ตรวจพบเอทานอล 2 ตัวอย่างแต่อยู่ภายในช่วงที่กำหนดให้ใช้ได้คือไม่เกินร้อยละ 10 ตรวจพบคลอโรฟอร์มในทั้ง 6 ตัวอย่างและไม่มีตัวอย่างใดผ่านเกณฑ์มาตรฐานทางจุลินทรีย์ของ Thai Pharmacopoeia 1996 ส่วนการศึกษาตอนที่ 2 ทำเฉพาะตัวอย่างยาน้ำในด้านการปนเปื้อนทางจุลินทรีย์ ภายหลังที่ผู้ผลิตได้รับทราบผลและได้รับคำแนะนำให้ปรับปรุงเกี่ยวกับกระบวนการผลิต ได้แก่ สถานที่ผลิต การเก็บวัตถุดิบและขั้นตอนการผลิต พบว่ามียาน้ำ 3 ตำรับจาก 6 ตำรับผ่านเกณฑ์มาตรฐานทางจุลินทรีย์

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

Studies on the Quality of Traditional Liquid Preparations for Children and Women Produced in Ubon Ratchathani

ISBN : 974-9541-44-8

Head of Project Miss Wipawee Saohin[1] B.Sc. in Pharm., Ph.D. (Pharmaceutics)

Co-researchers Miss Kharnchana Mahapol[2] B.Sc. in Pharm, M.S.(Public Health)

Mr. Thanormsak Chiravuth[1] B.Sc. in Pharm, M.Sc.(Pharmaceutical Chemistry)

Miss Junya Intaranongpai[1] B.Sc. in Pharm, M.Sc.(Pharmaceutical Chemistry)

[1] Faculty of Pharmaceutical Sciences Ubon Ratchathani University

Telephone (045) 288382-3 Fax (045) 288384

[2] Consumer Protection and Public Health Pharmacy Division

Ubon Ratchathani Provincial Public Health Office

Telephone (045) 262699 Fax (045) 241918

This research was financially supported from the National Research Council of Thailand

In fiscal year 2000 for 172,400.-Bath Research duration 2 years from 2000 – 2002

Research Code : 03009 122-0003

ABSTRACT

The quality of traditional liquid preparations for children and women produced in Ubon Ratchathani province was investigated. Sample were 23 items of raw materials and 6 items of traditional liquid preparations collected from 3 manufacturers. Five tests were carried out including Loss on Drying, Test for prednisolone and dexamethasone, Test for ethanol, Test for chloroform and Microbial limit Test. All tests were included in Part I experiment. The results show that percentage loss on drying of 95.65 percent of raw materials were higher than that stated in The United States Pharmacopoeia 24 (NF XVIIII) 1999. Both prednisolone and dexamethasone were not found in any samples. Ethanol was found in 2 samples which was not exceed the maximum amount permitted in this type of preparations. All samples failed to Microbial Limit Test of Thai Pharmacopoeia 1996. Part II experiment was done after the manufacturers had known Part I results and had received the advice to improve their manufacturing processes. Only Microbial Limit Test was used in this experiment. Three from six of traditional liquid preparations were within Thai Pharmacopoeia 1996 limits.

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ดร.นงนิตย์ ธีระวัฒนสุข ที่ให้คำแนะนำเบื้องต้นเกี่ยวกับหัวข้องานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย ปีงบประมาณ 2543 ภญ.มิ่งขวัญ จองชัย, ภญ.สการินทร์ กุลกาลยืนยง, ภก.สิทธิพงษ์ อุติลา และ คุณกรชนก บุญพอ ที่ช่วยดำเนินการวิจัย อ.ภญ.เบญจภรณ์ เศรษฐบุปผา, อ.ภญ.นิธิมา สุทธิพันธ์, อ.ภญ.สุดารัตน์ หอมหวล, อ.ภญ.จันทนา เวสพันธ์, อ.ภก.ปรีชา บุญจูง, ภก.อนุสรณ์ ตั้งปณิธานนันท์ และ ภก.นภสพง ช่างสนิท ที่ช่วยให้ข้อมูลและแนะนำเทคนิคการตรวจสอบคุณภาพด้านต่างๆ

คณะผู้วิจัย

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	ก
Abstract	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ช
อักษรย่อ	ซ
อักษรย่ออาหารเลี้ยงเชื้อ	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	3
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	11
บทที่ 4 ผลการวิจัย	37
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	55
เอกสารอ้างอิง	56
ภาคผนวก	57

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 3.1 ตัวอย่างยาน้ำแผนโบราณที่การตรวจสอบ 11

ตารางที่ 3.2 ตัวอย่างวัตถุดิบของยาน้ำแผนโบราณที่ตรวจสอบ 12

ตารางที่ 3.3 Probable number of bacteria 27

ตารางที่ 3.4 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *S. aureus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ 28

ตารางที่ 3.5 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ 30

ตารางที่ 3.6 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Salmonella* spp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ 32

ตารางที่ 3.7 TPI Supplement 1996 LIMITS FOR MICROBIAL CONTAMINATION 36

ตารางที่ 4.1 แสดงปริมาณความชื้น (Loss on Drying) ของวัตถุดิบ 37

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการตรวจสอบการปลอมปนสารสเตียรอยด์ 2 ชนิด คือ เพรดนิโซโลน และเด็กซ่าเมทธาโซนในยาน้ำแผนโบราณ 38

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลและคลอโรฟอร์มในยาน้ำแผนโบราณ 39

ตารางที่ 4.4 แสดงจำนวนเชื้อที่เจริญนับได้ในตัวอย่างเมื่อเจือจางด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PB) ที่ความเข้มข้นต่างๆกันและในตัวอย่างเจือจางโดยมีเชื้อมาตรฐาน 4 ชนิด : ก่อนให้คำแนะนำแก่ผู้ผลิต 40

ตารางที่ 4.5 แสดงปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Viable Count) ยีสต์/รา และ Enterobacteria ในยาน้ำแผนโบราณ : ก่อนให้คำแนะนำแก่ผู้ผลิต 41

ตารางที่ 4.6 แสดงผลการพิสูจน์จำแนกเชื้อ *S. aureus* ในยาน้ำแผนโบราณ : ก่อนให้คำแนะนำแก่ผู้ผลิต 42

ตารางที่ 4.7 แสดงผลการพิสูจน์จำแนกเชื้อ *E.coli aureus* ในยาน้ำแผนโบราณ : ก่อนให้คำแนะนำแก่ผู้ผลิต 43

ตารางที่ 4.8 แสดงผลการพิสูจน์จำแนกเชื้อ *Salmonella* spp. ในยาน้ำแผนโบราณ : ก่อนให้คำแนะนำแก่ผู้ผลิต 44

ตารางที่ 4.9 แสดงผลการพิสูจน์จำแนกเชื้อ *Clostridium* spp. ในยาน้ำแผนโบราณ : ก่อนให้คำแนะนำแก่ผู้ผลิต 46

ตารางที่ 4.10 แสดงจำนวนเชื้อที่เจริญนับได้ในตัวอย่างเมื่อเจือจางด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PB) ที่ความเข้มข้นต่างๆกันและในตัวอย่างเจือจางโดยมีเชื้อมาตรฐาน 4 ชนิด : หลังให้คำแนะนำแก่ผู้ผลิต 47

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 3.1 ตัวอย่างยาน้ำแผนโบราณที่การตรวจสอบ 11

ตารางที่ 3.2 ตัวอย่างวัตถุดิบของยาน้ำแผนโบราณที่ตรวจสอบ 12

ตารางที่ 3.3 Probable number of bacteria 27

ตารางที่ 3.4 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *S. aureus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ 28

ตารางที่ 3.5 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ 30

ตารางที่ 3.6 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Salmonella* spp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ 32

ตารางที่ 3.7 TPI Supplement 1996 LIMITS FOR MICROBIAL CONTAMINATION 36

ตารางที่ 4.1 แสดงปริมาณความชื้น (Loss on Drying) ของวัตถุดิบ 37

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการตรวจสอบการปลอมปนสารสเตียรอยด์ 2 ชนิด คือ เพรดนิโซโลน และเด็กซ่าเมทธาโซนในยาน้ำแผนโบราณ 38

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลและคลอโรฟอร์มในยาน้ำแผนโบราณ 39

ตารางที่ 4.4 แสดงจำนวนเชื้อที่เจริญนับได้ในตัวอย่างเมื่อเจือจางด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PB) ที่ความเข้มข้นต่างๆกันและในตัวอย่างเจือจางโดยมีเชื้อมาตรฐาน 4 ชนิด : ก่อนให้คำแนะนำแก่ผู้ผลิต 40

ตารางที่ 4.5 แสดงปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Viable Count) ยีสต์/รา และ Enterobacteria ในยาน้ำแผนโบราณ : ก่อนให้คำแนะนำแก่ผู้ผลิต 41

ตารางที่ 4.6 แสดงผลการพิสูจน์จำแนกเชื้อ *S. aureus* ในยาน้ำแผนโบราณ : ก่อนให้คำแนะนำแก่ผู้ผลิต 42

ตารางที่ 4.7 แสดงผลการพิสูจน์จำแนกเชื้อ *E.coli aureus* ในยาน้ำแผนโบราณ : ก่อนให้คำแนะนำแก่ผู้ผลิต 43

ตารางที่ 4.8 แสดงผลการพิสูจน์จำแนกเชื้อ *Salmonella* spp. ในยาน้ำแผนโบราณ : ก่อนให้คำแนะนำแก่ผู้ผลิต 44

ตารางที่ 4.9 แสดงผลการพิสูจน์จำแนกเชื้อ *Clostridium* spp. ในยาน้ำแผนโบราณ : ก่อนให้คำแนะนำแก่ผู้ผลิต 46

ตารางที่ 4.10 แสดงจำนวนเชื้อที่เจริญนับได้ในตัวอย่างเมื่อเจือจางด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PB) ที่ความเข้มข้นต่างๆกันและในตัวอย่างเจือจางโดยมีเชื้อมาตรฐาน 4 ชนิด : หลังให้คำแนะนำแก่ผู้ผลิต 47

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ตารางที่ 4.11 แสดงปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Viable Count) ยีสต์/รา และEnterobacteria ในยาน้ำแผนโบราณ : หลังให้คำแนะนำแก่ผู้ผลิต 48

ตารางที่ 4.12 แสดงผลการพิสูจน์จำแนกเชื้อ *S. aureus* ในยาน้ำแผนโบราณ : หลังให้คำแนะนำแก่ผู้ผลิต 49

ตารางที่ 4.13 แสดงผลการพิสูจน์จำแนกเชื้อ *E.coli* ในยาน้ำแผนโบราณ : หลังให้คำแนะนำแก่ผู้ผลิต 50

ตารางที่ 4.14 แสดงผลการพิสูจน์จำแนกเชื้อ *Salmonella* spp. ในยาน้ำแผนโบราณ : หลังให้คำแนะนำแก่ผู้ผลิต 51

ตารางที่ 4.15 แสดงผลการพิสูจน์จำแนกเชื้อ *Clostridium* spp. ในยาน้ำแผนโบราณ : หลังให้คำแนะนำแก่ผู้ผลิต 52

ตารางที่ 4.16 แสดงการสรุปผลการตรวจสอบทางจุลินทรีย์ในยาน้ำแผนโบราณก่อนและหลังให้คำแนะนำแก่ผู้ผลิต 53

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 3.1 การพิสูจน์จำแนกเชื้อ *S. aureus* 29
รูปที่ 3.2 การพิสูจน์จำแนกเชื้อ *E. coli* 31
รูปที่ 3.3 การพิสูจน์จำแนกเชื้อ *Salmonella* spp. 33
รูปที่ 3.4 การพิสูจน์จำแนกเชื้อ *Clostridium* spp. 35

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

อักษรย่อ

kPa	=	kilo Pascal
°C	=	Celsius degree
L	=	litre
µl	=	microlitre
ml	=	millilitre
mg	=	milligram
conc.	=	concentrated
g	=	gram
v/v	=	volume per volume
w/v	=	weight per volume
h	=	hour
CFU/ml	=	colony forming unit / millilitre

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

อักษรย่อสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. BPLS	=	Brilliant-green Phenol-Red Lactose Sucrose Agar Medium
2. BSA	=	Bismuth Sulfite Agar Medium
3. EEB	=	Fluid Enterobacteria Enrichment Medium หรือ Mossel Broth Medium
4. EMB	=	Levine Eosine-Methylene Blue Agar Medium
5. LTB	=	Fluid Lactose Medium
6. MAC	=	Mac Conkey Agar Medium
7. MSA	=	Mannitol Salt Phenol-Red Agar Medium
8. RMC	=	Reinforced Medium for Clostridia
9. SCB	=	Fluid Selenite Cystine Medium
10. SDA	=	Sabouraud Dextrose Agar Medium หรือ Potato Dextrose Agar Medium
11. TSA	=	Triptic Soy Agar หรือ Soybean-Casein Digest Agar Medium
12. TSB	=	Triptic Soy Broth หรือ Fluid Soybean-Casein Digest Medium
13. TSI	=	Triple Sugar-Iron-Agar Medium
14. TTB	=	Fluid Tetrathionate Medium
15. VJA	=	Vogel-Johnson Agar Medium
16. VRBD	=	Crystal Violet-Neutral Red-Bile-Dextrose Agar Medium
17. XLD	=	Xylose-Lysine-Desoxycholate Agar Medium

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

บทที่ 1
บทนำ

แม้ว่าปัจจุบันประเทศไทยจะมีการใช้ยาแผนปัจจุบันในการรักษาโรคเป็นส่วนใหญ่เนื่องจากระบบการศึกษาอิงการแพทย์แบบตะวันตก ทว่าก็มีประชาชนบางกลุ่มโดยเฉพาะอย่างยิ่งในชนบท นิยมใช้ยาแผนโบราณยาในการบรรเทาอาการเจ็บป่วยเบื้องต้น ใช้รักษาโรคบางโรคที่ไม่มีความรุนแรงมาก หรือใช้เพื่อบำรุงสุขภาพ นับเป็นการสืบทอดภูมิปัญญาที่มีมาแต่โบราณ จนกระทั่งปัจจุบัน กระแสการพึ่งพาตนเองโดยบริโภคของที่ผลิตเองในท้องถิ่นทำให้ยาแผนโบราณเป็นที่นิยมมากขึ้น ในจังหวัดใหญ่ๆมีการขอขึ้นทะเบียนจัดตั้งโรงงานเพิ่มขึ้น สำหรับจังหวัดอุบลราชธานีมีสถานที่ผลิตยาแผนโบราณทั้งหมด 6 แห่ง ในจำนวนนี้มี 3 แห่งที่ได้รับอนุญาตให้ขึ้นทะเบียนตำรับยาถูกต้องและมีการผลิตยา, 2 แห่งยังไม่ได้รับอนุญาตให้ขึ้นทะเบียนตำรับยา ส่วนอีก 1 แห่ง ไม่มีการผลิต ตำรับยาแผนโบราณในจังหวัดอุบลราชธานีที่ขอขึ้นทะเบียนไว้มี 56 ตำรับ ในจำนวนนี้ร้อยละ 30.54 เป็นตำรับยาน้ำที่ใช้ในเด็กและสตรีที่มีปริมาณการใช้มาก การควบคุมคุณภาพให้ยาที่ผลิตได้มาตรฐาน มีความปลอดภัยในการนำไปใช้และให้ผลการรักษาตามที่ระบุบนฉลากมีความสำคัญ เนื่องจากหากมีการปนเปื้อนหรือปลอมปนสารที่เป็นอันตรายหรือมีสารบางชนิดในตำรับมากเกินไป เช่น จุลินทรีย์ ยาในกลุ่มสเตียรอยด์ เอทานอล จะก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเด็กและสตรีที่มีความแข็งแรงและความต้านทานต่ำ

ปัจจุบันการควบคุมตรวจสอบการผลิตยาแผนโบราณทำโดยพนักงานเจ้าหน้าที่ตามพระราชบัญญัติยาของสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดโดยยึดเกณฑ์ตามกฎกระทรวง,Thai Pharmacopoeia และหลักวิธีปฏิบัติที่ดีในการผลิตยาแผนโบราณ ส่วนการตรวจวิเคราะห์คุณภาพมีศูนย์วิทยาศาสตรการแพทย์เป็นผู้ให้บริการ กฎหมายยังไม่ได้มีข้อกำหนดเข้มงวดให้ยาแผนโบราณทุกรุ่นผลิตต้องมีการตรวจสอบคุณภาพให้ผ่านเสียก่อนจึงจะออกจำหน่ายได้เหมือนเช่นยาแผนปัจจุบัน การเฝ้าระวังโดยการตรวจสอบคุณภาพยาแผนโบราณจึงมีความสำคัญ ซึ่งต้องทำหลายด้านด้วยกัน เช่น ทางกายภาพ ทางเคมี และทางจุลินทรีย์

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ

1. ตรวจสอบคุณภาพของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตยาน้ำแผนโบราณสำหรับเด็กและสตรีที่ผลิตในจังหวัดอุบลราชธานี โดยหาปริมาณความชื้น

2. ตรวจสอบคุณภาพยาน้ำสำหรับสตรีและเด็ก โดยตรวจหาสเตียรอยด์ 2 ชนิด คือ ตรวจหาเพรดนิโซโลนและเด็กซ่าเมทธาโซน ตรวจหาปริมาณเอทานอล ตรวจหาคลอโรฟอร์ม และตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งก่อนและหลังที่ผู้ผลิตได้รับคำแนะนำที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิต ได้แก่ สถานที่ผลิต การเก็บวัตถุดิบและขั้นตอนการผลิต

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรม

2.1 การควบคุมคุณภาพมาตรฐานของยาน้ำ

เพื่อให้ได้ยาที่มีคุณภาพ ในการผลิตยาโดยทั่วไปต้องมีการควบคุมคุณภาพมาตรฐานดังนี้

- การควบคุมคุณภาพมาตรฐานของวัตถุดิบทางยา
- การควบคุมคุณภาพมาตรฐานสภาพสิ่งแวดล้อมในการผลิตยา
- การควบคุมคุณภาพมาตรฐานเครื่องมือและอุปกรณ์ในการผลิต
- การควบคุมคุณภาพมาตรฐานบุคลากรในการผลิต
- การควบคุมคุณภาพมาตรฐานภาชนะบรรจุ
- การควบคุมคุณภาพมาตรฐานผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป

โดยในแต่ละขั้นตอนจะมีวิธีปฏิบัติเฉพาะตามขบวนการปฏิบัติที่ดีเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพ (Good Manufacturing Practices) ซึ่งยาแต่ละรูปแบบมีข้อกำหนดในการควบคุมคุณภาพมาตรฐานเฉพาะในบางขั้นตอนแตกต่างกัน

ตัวอย่างของการควบคุมคุณภาพมาตรฐานของยาน้ำสำหรับรับประทานมีดังต่อไปนี้ [1,2]

1. การควบคุมคุณภาพมาตรฐานทางกายภาพ

- การควบคุมคุณภาพมาตรฐานปริมาณความชื้นหรือน้ำโดยวิธีการหาร้อยละปริมาณความชื้น(Loss on Drying)หรือการไตเตรตโดยเครื่องมือคาร์ลฟิชเชอร์ (Karl Fischer Titrimetry) ในวัตถุดิบ
- การควบคุมคุณภาพมาตรฐานความคงตัวของผลิตภัณฑ์ เช่น สี กลิ่น และความ เป็นกรด-ด่าง เป็นต้นในผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป

2. การควบคุมคุณภาพมาตรฐานทางเคมี

- การวิเคราะห์หาสารที่ปนเปื้อนในวัตถุดิบ เช่น โลหะหนัก ยาฆ่าแมลง
- การตรวจสอบการปลอมปนของสารสเตียรอยด์ (steroids) ในผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป
- การวิเคราะห์หาสารกันบูดที่ห้ามใช้หรือใช้ในปริมาณที่จำกัด เช่น คลอโรฟอร์ม (chloroform)
- การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในการออกฤทธิ์ให้อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

3. การควบคุมคุณภาพมาตรฐานทางจุลินทรีย์

- การตรวจสอบหาชนิดและปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่กำหนด (Microbial Limit Tests) ซึ่งประกอบด้วยการตรวจสอบปริมาณเชื้อจุลินทรีย์มีชีวิตทั้งหมด (Total viable aerobic microbial count) และการตรวจสอบหาชนิดและปริมาณของเชื้อที่กำหนดห้าม (Tests for specified micro-organisms)

- การควบคุมคุณภาพมาตรฐานประสิทธิภาพของสารกันบูด (Test for the efficacy of preservative)

2.2 การควบคุมคุณภาพมาตรฐานของยาน้ำแผนโบราณชนิดรับประทาน

ผลิตภัณฑ์ที่นำมาศึกษาในงานวิจัยนี้เป็นยาน้ำแผนโบราณชนิดรับประทานซึ่งการควบคุมคุณภาพด้านการหาปริมาณสารสำคัญยังทำได้ค่อนข้างยากเนื่องจากตำรับยาประกอบด้วยสารสำคัญหลายชนิดในรูปที่ไม่บริสุทธิ์ ดังนั้นผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นการศึกษาไปที่การควบคุมมาตรฐานทางกายภาพทางเคมีและทางจุลินทรีย์ด้วยวิธีเฉพาะสำหรับยาน้ำแผนโบราณดังต่อไปนี้

2.2.1 การควบคุมคุณภาพมาตรฐานทางกายภาพด้วยวิธีหาร้อยละปริมาณความชื้นหรือน้ำ [2-6]

วัตถุดิบทางยา (Medicinal Substance) หมายถึง วัตถุที่ได้จากธรรมชาติหรือจากการสังเคราะห์ขึ้นเพื่อนำไปใช้เป็นส่วนประกอบในการผลิตยา การตรวจหาความชื้นหรือน้ำเป็นหนึ่งในการควบคุมคุณภาพมาตรฐานวัตถุดิบทางยา เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการคำนวณหาความแรงของยาและเพื่อควบคุมการสลายตัวของตัวยา การหาปริมาณความชื้นหรือน้ำในเภสัชตำรับกำหนดให้ใช้วิธีหาร้อยละปริมาณความชื้น (Loss on Drying) หรือการไตเตรตโดยใช้เครื่องคาร์ลฟิชเชอร์ (Karl Fischer Titrimetry)

1. **การหาร้อยละปริมาณความชื้น** (Loss on Drying) เป็นการหาร้อยละน้ำหนักที่ลดลงของวัตถุดิบหรือตัวยาสำเร็จรูปภายใต้สภาวะเงื่อนไขที่กำหนด ซึ่งเภสัชตำรับกำหนดสภาวะไว้หลายแบบ ได้แก่

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

(1) บรรจุในโถดูดความชื้น (In a desiccator) : ทำให้แห้งโดยวางขวดชั่งที่บรรจุสารไว้ในโถดูดความชื้น ที่มีสารดูดความชื้น เช่น phosphorus pentoxide หรือ silica gel ที่ความดันบรรยากาศและอุณหภูมิห้อง

(2) ใช้สารดูดความชื้นในระบบสูญญากาศ (In vacuum over a desiccant) : ใช้สารดูดความชื้น เช่น phosphorus pentoxide หรือ silica gel ที่ความดัน 1.5-2.5 kPa อุณหภูมิห้อง ถ้ากำหนดให้ใช้ high vacuum จะใช้ความดันไม่เกิน 0.1 kPa

(3) ใช้อุณหภูมิที่กำหนดเฉพาะในระบบสูญญากาศ (In vacuum at a specified temperature) : ใช้ความดัน 1.5-2.5 kPa และอุณหภูมิที่กำหนดไว้ใน monograph อาจใช้ capillary - stoppered bottle แทนขวดชั่ง

(4) ใช้วิธีการชั่งหลังอบ (gravimetric method) : ต้องใช้เครื่องชั่งละเอียดที่มีความไวสูงโดยชั่งน้ำหนักวัตถุดิบอย่างถูกต้องใน evaporating dish อบที่อุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วชั่งและอบต่อและชั่งทุกๆ 1 ชั่วโมง จนผลต่างน้ำหนักไม่มากกว่า 0.0005 กรัม

2. **การหาปริมาณน้ำด้วยการไตเตรตโดยใช้เครื่องคาร์ลฟิชเชอร์** (Karl Fischer Titrimetry)

เป็นวิธีที่ใช้ในการหาปริมาณน้ำซึ่งหาได้ทั้งในวัตถุดิบและในตัวยาสำเร็จรูป โดยน้ำนั้นอาจอยู่ในรูปของน้ำผลึกหรือน้ำที่ถูกดูดซึมบนผิวของตัวยา โดยใช้เครื่องมือทางไฟฟ้า Karl Fischer Titrimetry การวิเคราะห์โดยวิธีนี้สามารถทำได้รวดเร็ว ใช้สารตัวอย่างน้อยให้ผลที่แม่นยำ และมีความเฉพาะเจาะจงกับน้ำเท่านั้น สารเคมีที่นำมาใช้ในการหาปริมาณน้ำเรียกว่า Karl Fischer reagent ซึ่งประกอบด้วย iodine, pyridine และ methanol วิธีการประกอบด้วยการไตเตรตสารตัวอย่างซึ่งละลายหรือแขวนลอยอยู่ใน methanol หรือตัวทำละลายอื่นที่เหมาะสมด้วย Karl Fischer reagent

2.2.2 **การควบคุมคุณภาพมาตรฐานทางเคมีโดยใช้วิธี** Thin Layer Chromatography (TLC)

Thin Layer Chromatography (TLC) เป็นวิธีการแยกสารโดยใช้คุณสมบัติการละลายของตัวยาในตัวทำละลายต่างๆ เป็นวิธีที่มีความเฉพาะเจาะจงพอสมควรในการตรวจเอกลักษณ์ เมื่อใช้ร่วมกับวิธีทางเคมี-ฟิสิกส์อื่นๆ จึงทำให้แน่ใจในผลการตรวจสอบมากยิ่งขึ้น การแยกของสารเกิดจากการที่สารถูกพาให้เคลื่อนที่ไปบน stationary phase ที่เคลือบเป็นชั้นบาง ๆ อยู่บนแผ่นแก้ว โลหะหรือ

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

พลาสติก โดย mobile phase ที่เป็น solvent เดี่ยวหรือส่วนผสมของ solvent หลายชนิด ซึ่งวิธีนี้มีประโยชน์ในการหาสารปลอมปนในตำรับได้เมื่อนำสารมาตรฐานของสารที่คาดว่าจะปลอมปนมาทำการตรวจสอบเปรียบเทียบ [7]

จินดาพร [8] ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาการปลอมปนของสารกลุ่มสเตียรอยด์โดยใช้วิธี TLC ในตำรับยาแผนโบราณซึ่งมีจำหน่ายในร้านขายยา ร้านขายของชำ บริเวณวัด สารกลุ่มสเตียรอยด์ที่ตรวจหามี 2 ชนิด คือ เพรดนิโซโลน (prednisolone) และเด็กซ่าเมทธาโซน (dexamethasone) พบว่ายาที่ขึ้นทะเบียนถูกต้องตามกฎหมายตรวจไม่พบการปลอมปน ส่วนตำรับยาแผนโบราณที่ไม่ได้ขึ้นทะเบียน มีการปลอมปนของสารกลุ่มสเตียรอยด์ถึงร้อยละ 50 ของตัวอย่างที่ตรวจสอบ

ในการควบคุมคุณภาพมาตรฐานทางเคมีของยาน้ำแผนโบราณนอกจากการตรวจสอบการปลอมปนของสารกลุ่มสเตียรอยด์ในตำรับยาแผนโบราณแล้ว ควรจะมีการตรวจสอบอย่างอื่นด้วย เช่น การหาปริมาณสารกลุ่มแอลกอฮอล์ที่นิยมใช้ในตำรับคือเอทานอล (ethanol) ที่สามารถใช้วิธี Gas Chromatography [9] เนื่องจากเอทานอลเป็นสารที่นิยมใช้ในการสกัดสารสำคัญจากวัตถุดิบและยังใช้เป็นส่วนประกอบในตำรับยาน้ำ ซึ่งหากมีปริมาณมากเกินไป อาจเกิดผลเสียต่อสุขภาพของผู้ใช้ยา โดยเฉพาะผู้ใช้ยาที่เป็นเด็ก

นอกจากนี้การตรวจสอบการปลอมปนของคลอโรฟอร์ม (chloroform) ก็จำเป็น เนื่องจากผู้ผลิตบางรายอาจใช้คลอโรฟอร์ม (chloroform) แช่วัตถุดิบเพื่อป้องกันเชื้อราหรือเติมลงในตำรับเพื่อใช้เป็นสารกันบูด แต่เนื่องจากสารนี้มีความเป็นพิษต่อตับสูง จึงมีข้อห้ามใช้ในตำรับยารับประทานทั้งยาแผนปัจจุบันและแผนโบราณ สารนี้ตรวจสอบได้โดยวิธี screening test (color test) และยืนยันผลได้โดยวิธี Gas Chromatography [9-10]

2.2.3 การควบคุมคุณภาพมาตรฐานทางจุลินทรีย์

ยาน้ำแผนโบราณมีโอกาสที่จะมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ได้ง่ายกว่ายารูปแบบอื่น ทั้งนี้เนื่องจากวัตถุดิบในการผลิตส่วนใหญ่ได้มาจากสมุนไพรและสารจากธรรมชาติ ในส่วนประกอบของตำรับเองที่มีน้ำเป็นส่วนประกอบที่เอื้อให้จุลินทรีย์เติบโตได้ง่าย นอกจากนี้สภาพแวดล้อมของการผลิต เครื่องมือ บุคลากร กระบวนการผลิต ภาชนะบรรจุ และการปนเปื้อนขณะใช้งาน ล้วนเป็นปัจจัยที่เพิ่มปริมาณของจุลินทรีย์ในตำรับ จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนทำให้เกิดการบูดเสียของยาเตรียมหรือทำให้

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ปริมาณตัวยาลดลงจนผลการรักษาโรคไม่ดีพอ หรืออาจเป็นผลต่อผู้ใช้ยาโดยตรงทำให้เกิดการติดเชื้อ หรือมีความผิดปกติจากผลของตัวเชื้อหรือสารที่เชื้อสร้างขึ้น

1. จุลินทรีย์ที่มักพบในยาเตรียม

แบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria) ได้แก่

1) *Staphylococcus aureus*

เชื้อชนิดนี้ค่อนข้างดื้อต่อสารกันบูดกลุ่ม phenolic เจริญได้ในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) สูงถึง 10% สามารถเจริญในที่มีอุณหภูมิ 4°C จนถึง 60°C เจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดา ที่อุณหภูมิ 37°C pH7.4 เชื้อมีลักษณะรูปร่างกลมและติดสีแกรมบวก มักอยู่รวมกันเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น ทั้งในภาวะที่มีออกซิเจนและมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย โดยปกติมักพบเชื้อนี้บริเวณผิวหนังและเยื่อเมือกบริเวณลำคอส่วน oropharynx เชื้อนี้อาจทำให้เกิดหนอง การติดเชื้อในหูชั้นกลาง pneumonia และ osteomyelitis การเจริญของเชื้อในอาหารจะให้ exotoxin ทำให้เกิด food poisoning

2) *Bacillus cereus* และ *Bacillus subtilis*

เชื้อกลุ่ม Bacillus มีลักษณะเป็นเชื้อรูปแท่ง ติดสีแกรมบวกที่มีขนาดใหญ่มักเรียงตัวกันเป็นสาย และเจริญได้ดีในที่มีอากาศ ส่วนใหญ่จะเป็นพวกที่อยู่อย่างอิสระไม่ทำให้เกิดโรค พบได้ทั่วไปในน้ำ ดินและอากาศ การปนเปื้อนจากฝุ่น เชื้อ *Bacillus cereus* อาจทำให้เกิด intestinal poisoning

3) *Clostridium* spp.

เป็น strict anaerobes แม้บางสายพันธุ์จะทนออกซิเจนได้ มักพบการปนเปื้อนของเชื้อนี้ในรูปสปอร์ เชื้อมีลักษณะแกรมบวก รูปแท่งและสร้างสปอร์ แต่ละชนิดมีความทนต่อออกซิเจนต่างกันตั้งแต่ไม่ต้องการเลยจนถึงสามารถเจริญได้เมื่อปริมาณออกซิเจนเท่าบรรยากาศปกติ ลักษณะสปอร์ที่สร้างมีทั้งรูปไข่และกลม Clostridia มีการเจริญแบบ anaerobic เนื่องจากขาด cytochromes ที่จำเป็นใน electron transport และขาดเอนไซม์ catalase, peroxidase และ superoxide dismutase ที่จำเป็นในการกำจัดสารที่เป็นพิษต่อเซลล์

-*Clostridium perfringens* (welchii) ติดเชื้อที่แผลและเกิด gas gangrene

-*Clostridium tetani* ติดเชื้อที่แผลทำให้เกิด บาดทะยัก (tetanus)

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

-*Clostridium botulinum* ติดเชื้อที่ทางเดินอาหารทำให้เกิด botulist food poisoning

แบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative bacteria) ได้แก่

1) *Pseudomonas aeruginosa*

มักอยู่เป็นคู่หรือต่อเป็นลูกโซ่สั้นๆ เชื้อชนิดนี้เป็น oxidase positive และเพาะเลี้ยงได้ในอาหารทั่วไป เจริญได้ที่ 30-37 °C ต้องการออกซิเจนในการเจริญ เชื้อนี้ผลิต pigment ที่สำคัญ 2 อย่าง คือ pyocyanin (สีน้ำเงินแกมเขียว) และ fluorescin (สีเหลืองแกมเขียว) มักพบในที่ชื้นแฉะแม้มีอาหารอยู่น้อย เช่น ในยาดา น้ำยาฆ่าเชื้อ สบู่ รวมทั้งน้ำประปา เชื้อชนิดนี้จัดเป็นเชื้อฉวยโอกาส (opportunist) โรคที่เกิดจาก *Ps. Aeruginosa* ส่วนใหญ่มีสาเหตุสืบเนื่องมาจากสารพิษที่ปล่อยออกมา ซึ่งก่อให้เกิดพยาธิสภาพของโรคต่างๆกันได้ อาทิ exotoxin สามารถทำให้เกิด leukopenea, acidosis, circulatory collapse ตลอดจน liver necrosis, pulmonary edema และ tubular necrosis ของไต ส่วน enterotoxin ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วง ขณะที่ proteolytic enzyme สามารถทำลาย cornea ส่วน phospholipase จะทำลายส่วนผิวของเยื่อหุ้มปอดที่มามารถนำไปสู่สภาวะ atelectasis ได้

2) Enterobacteriaceae

ลักษณะเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ได้ด้วย flagella ที่มีอยู่รอบตัว ยกเว้น *Shigella* spp.และ *Salmonella* spp. สามารถขึ้นได้ทั้งที่มีและไม่มีออกซิเจน พบในลำไส้คนและสัตว์เป็นส่วนใหญ่ เชื้อในกลุ่มนี้นับว่าเป็นกลุ่มที่มีความสำคัญทางการแพทย์มาก เชื้อที่สำคัญคือ *Salmonella typhi* เป็นสาเหตุของไข้ไทฟอยด์ *Escherichia coli, Salmonella* spp. และ *Shigella* spp. เป็นสาเหตุของโรคบิด

3) *E. coli*

คุณสมบัติทางชีวเคมีที่สำคัญคือ ferment lactose ให้กรดและแก๊ส เจริญได้ในอุณหภูมิต่ำจนถึง 40 °C แต่ดีที่สุดที่ 30 °C พบในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่น พบเป็นจำนวนมากในการตรวจอุจจาระ ไม่ทำให้เกิดโรคแต่ฉวยโอกาสได้ในกรณีที่ภูมิคุ้มกันบกพร่อง ดังนั้นจึงเป็นปัญหาสำคัญในการติดเชื้อในโรงพยาบาล และบางสายพันธุ์ทำให้เกิดโรคได้ในสภาวะปกติ เช่น ทำให้เกิดโรคบิดหรือทางเดินปัสสาวะอักเสบ

4) *Salmonella* spp.

ได้แก่ *Salmonella typhimurium* และ *Salmonella enteritidis* จัดเป็นแบคทีเรีย

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

แกรมลบที่ไม่ ferment lactose พบในทางเดินอาหารเป็นส่วนใหญ่ ทำให้เกิด food poisoning ซึ่งมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสียจาก toxin ของเชื้อ

5) *Klebsiella pneumonia*

เจริญได้ที่ 12-43°C แต่ดีที่สุดที่ 37°C พบในทางเดินอาหารและทางเดินหายใจ ดิน และน้ำ ทำให้เกิด bacteremia หรือติดเชื้อในทางเดินหายใจ โดยเฉพาะผู้ป่วยในโรงพยาบาลและผู้บกพร่องในภูมิคุ้มกัน

6) *Serrtia marcescens*

เจริญได้ดีที่ 30-37 °C แต่บางสายพันธุ์อาจเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำถึง 1°C การเจริญโดยใช้ออกซิเจนภายใต้อุณหภูมิต่ำกว่าปกติจะให้ pigment สีแดงของ prodigiosin พบที่ ทางเดินหายใจ ทางเดินปัสสาวะหรือบริเวณที่เกิดแผล การติดเชื้อนี้มักเกิดกับผู้ป่วยในโรงพยาบาล ทำให้เกิด bacteremia ติดเชื้อในทางเดินหายใจ ทางเดินปัสสาวะหรือตามแผล [1,12]

ยีสต์และรา (Fungi) ได้แก่

1) *Aspergillus niger*

เจริญได้หลายอุณหภูมิจนถึง 50°C แต่เจริญได้ดีที่ 24°C พบในอากาศปนเปื้อนลงในยาและเครื่องสำอางได้ ทำให้เกิดการบูดเสียหรือการเปลี่ยนสีของยาเตรียมได้

2) *Candida albican*

เป็นเชื้อราที่ก่อโรค พบที่ผิวบริเวณเยื่อเมือกทำให้เกิดเชื้อราในช่องปากและช่องคลอด

3) *Zygosaccharomyces rouxii*

เป็นยีสต์ที่เจริญใน gel และสารละลายที่ osmotic pressure สูงได้ ไม่ทำให้เกิดโรค แต่ทำให้เกิดการบูดเสียของผลิตภัณฑ์ [1]

อันตรายจากจุลินทรีย์ปนเปื้อนในยาเตรียม เป็นที่ตระหนักดี โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ที่ได้จากพืช สัตว์หรือแร่ธาตุจากธรรมชาติ และจากการขาดขบวนการผลิตที่ดีเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพ ดังนั้นในยาเตรียมสำหรับรับประทานทุกชนิดจึงจำเป็นต้องมีการตรวจสอบเพื่อหาปริมาณจุลินทรีย์มีชีวิตที่ยังหลงเหลืออยู่และตรวจหาจุลินทรีย์บางชนิดที่เป็นเชื้อก่อโรค

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

การตรวจสอบยาน้ำแผนโบราณชนิดรับประทานทางจุลินทรีย์มีการตรวจสอบ 2 ลักษณะคือ การตรวจสอบหาชนิดและปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่กำหนด (Microbial Limit Tests) และการตรวจสอบประสิทธิภาพของสารกันบูด (Test for the efficacy of preservative)

2. **การตรวจสอบหาชนิดและปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่กำหนด** (Microbial Limit Tests) แบ่งเป็น 2 ขั้นตอนคือ

1) ตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิต (Test for microbial contents)

โดยทั่วไปมุ่งเน้นที่เชื้อชนิดที่ใช้ออกซิเจน (aerobes) จึงมักเรียกการทดสอบนี้ว่า Total viable aerobic microbial count

2) ตรวจสอบหาชนิดและปริมาณของเชื้อกำหนดห้าม (Tests for specified micro-organisms)

เป็นการตรวจสอบว่าไม่มีจุลินทรีย์ที่เป็นอันตรายหรือบ่งชี้ว่าอาจมีจุลินทรีย์ที่เป็นอันตราย ซึ่งในเภสัชตำรับของแต่ละประเทศอาจระบุแตกต่างกันไป ในเภสัชตำรับของประเทศไทยได้กำหนดจุลินทรีย์ที่พึงตรวจสอบไว้หลายชนิด ได้แก่ *S.aureus*, *Ps.aeruginosa*, *E.coli* และ *Salmonella* spp.[1]

3. **การตรวจสอบประสิทธิภาพของสารกันบูด** (Test for the efficacy of preservative)

โดยหลักการทำได้โดยเติมเชื้อจุลินทรีย์ลงในผลิตภัณฑ์ที่ต้องการตรวจสอบ แล้วดูผลการออกฤทธิ์ของสารกันบูดเมื่อเก็บยานั้นไว้ในสภาพปกติ สารกันบูดต้องยับยั้งการเจริญของเชื้อหรือทำลายเชื้อได้ภายในช่วงเวลาที่เหมาะสม

การทดสอบประสิทธิภาพของสารกันบูด ควรพิจารณาใช้ในระหว่างการพัฒนาสูตรตำรับ เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของสารกันบูดที่เลือกใช้ การตรวจสอบจะเป็น Challenge Tests โดยเติมเชื้อจุลินทรีย์ตรวจสอบลงในผลิตภัณฑ์นั้นโดยตรง ควรใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์เดี่ยวๆ ในการตรวจสอบผลิตภัณฑ์เดียวกัน ช่วงเวลาในการตรวจสอบ ปกติไม่น้อยกว่า 28 วัน ในทางปฏิบัติพบว่าการตรวจสอบผลิตภัณฑ์โดยใช้เวลานานกว่านี้ค่อนข้างจำเป็น เพื่อให้ได้เวลามากพอ ในการตรวจสอบประสิทธิภาพของสารกันบูดในสูตรตำรับ ซึ่งโดยทั่วไปใช้เวลา 3 เดือน [1]

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่าง

การทดลองตอนที่ 1 เก็บตัวอย่างจากผู้ผลิตยาน้ำแผนโบราณชนิดรับประทานสำหรับเด็กและสตรี ในเขตจังหวัดอุบลราชธานี จำนวน 3 แห่ง ประกอบด้วย ตัวอย่างยาน้ำแผนโบราณจำนวน 6 ตำรับ และวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตทั้งหมด 23 รายการ โดยเก็บวัตถุดิบนอกเหนือจากที่ใช้ผลิตตำรับยาน้ำที่ใช้ในการทดลองด้วย รายละเอียดดังตารางที่ 3.1 และ 3.2

การทดลองตอนที่ 2 เก็บตัวอย่างเฉพาะยาน้ำแผนโบราณ จำนวน 6 ตำรับ จากผู้ผลิตรายเดิมภายหลังผู้ผลิตรับทราบผลการตรวจสอบทางจุลินทรีย์และได้รับคำแนะนำเกี่ยวกับการผลิต

ตารางที่ 3.1 ตัวอย่างยาน้ำแผนโบราณที่ตรวจสอบ

ผู้ผลิต	ตัวอย่าง	ประเภทยาน้ำ	สรรพคุณ [1,2]	ตัวยาสำคัญ [3]	วิธีใช้ [4,5]	คำเตือน [6]	ทะเบียน	สถานที่ผลิต	ครั้งที่หรือวันที่ผลิต
ก	1	สตรี	(1)	+	+	+	+	+	+
ข	2	เด็ก	(2)	+	-	-	+	+	+
ค	3	สตรี	(1)	+	+	+	+	+	-
ก	4	เด็ก	(2)	+	+	-	+	+	+
ก	5	สตรี	(1)	+	+	+	+	+	+
ก	6	เด็ก	(2)	+	+	-	+	+	+

+ หมายถึง มี

- หมายถึง ไม่มีหรือไม่ได้ระบุ

[1] สรรพคุณยาน้ำแผนโบราณสำหรับสตรี : เจริญอาหาร แทนการอยู่ไฟ บำรุงร่างกาย บำรุงโลหิต แก้ประจำเดือนมาไม่ปกติ แก้ประดงต่างๆ

[2] สรรพคุณยาน้ำแผนโบราณสำหรับเด็ก : แก้โรคทรางเด็ก บำรุงธาตุ ขับพยาธิเข็มหมุดและพยาธิเส้นด้าย เจริญอาหาร

[3] มี 1 ตำรับ ประกอบด้วย สนิมเหล็ก ระย่อม เจตมูลเพลิง หัวสุราโรง และอีก 2 ตำรับที่ส่วนประกอบเหมือนกัน ได้แก่ โกฐทั้ง 5 เทียนทั้ง 5 ดอกคำฝอย ฝางแดง เจตมูลเพลิง ระย่อม

[4] วิธีใช้ยาน้ำแผนโบราณสำหรับสตรี : รับประทานครั้งละ 1-2 ช้อนโต๊ะ วันละ 2 ครั้ง ก่อนอาหาร เช้า-เย็น บางตำรับให้ผสมสุราได้

[5] วิธีใช้ยาน้ำแผนโบราณสำหรับเด็ก : รับประทานครั้งละ 1-3 ช้อนโต๊ะ (ขึ้นกับอายุ) วันละ 3 ครั้ง ก่อนหรือหลังอาหาร

[6] คำเตือนยาน้ำแผนโบราณสำหรับสตรี : คนเป็นไข้และหญิงมีครรภ์ห้ามรับประทาน เขย่าขวดก่อนรินยา

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ตารางที่ 3.2 ตัวอย่างวัตถุดิบของยาน้ำแผนโบราณที่ตรวจสอบ

ผู้ผลิต	รายการวัตถุดิบ ที่ใช้ในการผลิตทุกตำรับ	รายการวัตถุดิบที่ตรวจสอบ
ก	36 รายการ (เกสรทั้ง 5, ตาลโตนด, เปลือกไข่เน่า, กระเพรา, เมล็ดสะแก, ตาลขโมย, เล็บมือนาง, ตาลหม่อน, โกฐทั้ง 5, รากมะเกลือ, สมอไทย, ตาลเสี่ยน, กระพังโหม, ตาลดำ, รากสะแก, ข่า, พริกไทยดำ, รากชะพลู, ดอกคำฝอย, เทียนทั้ง 5, โกฐทั้ง 5, เจตมูลเพลิง, ขิง, บอระเพ็ด, ดอกดีปลี, กระท่อมเลือด, รากเจตพังคี, เปลือกตะโกนา, ไพล, พิษนาศน์, หัวแห้วหมู, ชะลูด, เถามวกขาว, กะทือ, ลูกสมอไทย, เปลือกประดงแดง, ขมิ้นอ้อย, ลูกมะตูมอ่อน)	14 รายการ (เกสรทั้ง 5, ตาลโตนด, เปลือกไข่เน่า, กระเพรา, เมล็ดสะแก, ตาลขโมย, เล็บมือนาง, ข่า, พริกไทยดำ, รากชะพลู, ดอกคำฝอย, เทียนทั้ง 5, โกฐทั้ง 5, เจตมูลเพลิง)
ข	21 รายการ (ดีปลี, คำฝอย, น้ำตาลแดง,ดอกจันทร์, ลูกจัน, ดินประสิวสตุ, ข้าวเย็นเหนือ, โกฐทั้ง 5, ฝางแดง, สนิมเหล็ก, ขิงแห้ง, เจตมูลเพลิง, กระเทียม, พิมเสน, พริกไทย, ผิวมะกรูด, เทียนทั้ง 5, เกาวัลย์เปรียว, การบูร, สารส้มสตุ,)	4 รายการ (ดีปลี, ดอกคำฝอย, น้ำตาลแดง,ดอกจันทร์)
ค	10 รายการ (เกสรบัวหลวง, ดอกสารภี, ดอกมะลิ, ต้นเล็บมือนาง, กระเพราแดง, ตาลดำ, สมอไทย, ตาลขโมย, ตาลหม่อน, กระพังโหม, รากมะเกลือ)	5 รายการ (เกสรบัวหลวง, ดอกสารภี, ดอกมะลิ, ต้นเล็บมือนาง, กระเพราแดง)

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

3.2 การตรวจสอบหาปริมาณความชื้น (Loss on Drying) ของวัตถุดิบ [3-6]

สารเคมี : Silica gel สำหรับดูดความชื้น

วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ :

1. ขวดชั่งพร้อมฝาปิด
2. ขวดบรรจุผงยาพร้อมฝาปิด
3. ช้อนเขา
4. ตู้อบ (hot air oven)
5. เครื่องชั่ง (analytical balance)
6. โถดูดความชื้น (Desiccator)
7. มีด
8. เขียง
9. เครื่องปั่นย่อยขนาด

วิธีการตรวจสอบ :

สารตัวอย่างที่มีขนาดใหญ่ให้บดหรือปั่นเพื่อลดขนาดลงให้ได้เป็นผงละเอียด จากนั้นผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันเสียก่อน จึงนำมาปฏิบัติดังนี้

1. อบขวดชั่ง(นิยมใช้ขวดแบบเตี้ยมากกว่าขวดแบบสูง)เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 105 °C จากนั้นนำออกจากตู้อบวางไว้ใน desiccator จนกระทั่งเย็นเท่าอุณหภูมิห้องโดย ในช่วงนี้ใช้เวลาประมาณ 30 นาที แล้วชั่งเพื่อหาน้ำหนักของขวดชั่ง

2. ตักสารตัวอย่างใส่ลงในขวดชั่ง (ที่แห้งและทราบน้ำหนักแน่นอน) นำไปชั่งเพื่อให้ได้น้ำหนักสารตัวอย่างประมาณ 1-2 กรัม จากนั้นเกลี่ยสารตัวอย่างให้แผ่กระจายในขวดชั่ง โดยชั้นของตัวอย่างควรสูงประมาณ 5 มิลลิเมตร ถ้าเป็น bulky material ควรสูงไม่เกิน 10 มิลลิเมตร ปิดฝา แล้วชั่งน้ำหนักขวดยาและสารตัวอย่าง

3. วางขวดชั่งในตู้อบ โดยเปิดฝาไว้ อบสารตัวอย่างที่อุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง (อุณหภูมิที่ใช้ = อุณหภูมิที่กำหนด $\pm$ 2 °C)

4. เมื่อครบกำหนดเวลา เปิดตู้อบ แล้วปิดฝาขวดทันที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นใน desiccator (ประมาณ 30 นาที) จึงชั่งน้ำหนักอีกครั้ง

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

5. วิธีการนี้เป็นการหา Dry to constant weight หมายถึง การชั่งสาร (หลังจากอบแล้ว) 2 ครั้ง ติดต่อกัน น้ำหนักต้องต่างกันไม่เกิน 0.5 มิลลิกรัม โดยเมื่อชั่งน้ำหนักครั้งที่ 1 แล้วนำไปอบภายใต้สภาวะอุณหภูมิ ที่กำหนดอีกครั้ง (โดยครั้งแรกจะใช้เวลา 5 ชั่วโมงในการอบ) นำออกมาตั้งที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ชั่งน้ำหนักครั้งที่ 2 และถ้าน้ำหนักที่หายไปเกินกว่า 0.5 มิลลิกรัม ให้ทำซ้ำเช่นเดิมแต่ใช้เวลาในการอบลดลงเหลือ 1 ชั่วโมง ทำเช่นนี้จนกระทั่งผลต่างของน้ำหนักที่หายไปไม่เกิน 0.5 มิลลิกรัม

6. บันทึกผลข้อมูลและคำนวณน้ำหนักที่หายไป

$$\% \text{ Loss on Drying} = \frac{(\text{น้ำหนักทั้งหมดก่อนอบ} - \text{น้ำหนักทั้งหมดหลังอบ}) \times 100}{\text{น้ำหนักสารตัวอย่างก่อนอบ}}$$

3.3 การตรวจสอบหาการปลอมปนของสเตียรอยด์ในยาน้ำแผนโบราณ

สารเคมี :

1. Ethyl acetate
2. Chloroform
3. Benzene
4. Carbontetrachloride
5. Petroleum ether
6. Prednisolone reference standard
7. Dexamethasone reference standard
8. Ethanol 95 %
9. 2 % vanillin ใน ethanol
10. 50 % sulfuric acid ใน ethanol
11. 15 % phosphoric acid ใน ethanol
12. 10 % ammonium chloride
13. Concentrated hydrochloric acid
14. Isopropanol
15. Cyclohexane

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ :

1. Silica gel GF 254 plate
2. Heater
3. Desiccator ที่บรรจุ silica gel
4. Tank ที่จะบรรจุ plate
5. Evaporating disc
6. Water bath
7. Capillary tube หรือ Micropipette ที่สามารถหยดจุด(spot) ขนาด 1-10 µl
8. Dryer
9. เครื่องส่องโครมาโตกราฟฟี
10. Volumetric flask ขนาด 100 ml
11. Beaker ขนาด 100 ml
12. Beaker ขนาด 250 ml
13. Beaker ขนาด 1,000 ml
14. Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml.

วิธีการตรวจสอบ :

วิธีการตรวจสอบหาสารสเตียรอยด์ 2 ชนิด ได้แก่ เพรดนิโซโลน (prednisolone) และเด็กซ่าเมทธาโซน (dexamathasone) ทำตามวิธีของจินดาพร [8] โดยใช้ TLC ซึ่งเป็นวิธีการที่ง่าย เป็นที่ยอมรับและสามารถตรวจสอบปริมาณของสารได้ในระดับนาโนกรัม (10^{-9} ng) โดยมีขั้นตอนปฏิบัติดังนี้

1. การเตรียมระบบในการตรวจสอบ

1.1 ตัวดูดซับ (adsorbent or stationary phase)

ใช้ Siliga gel GF_{254} และน้ำ ในอัตราส่วน1:2 เคลือบบน plate แก้ว จากนั้นอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 110 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเก็บplateที่เคลือบแล้วใน desiccator ที่บรรจุ silica gel

1.2 ระบบตัวทำละลาย (solvent system or mobile phase)

เตรียมตัวทำละลายหลายระบบโดยเรียงตามลำดับจากตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความเป็นขั้วน้อย (non-polar organic solvent) ไปหาตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความเป็นขั้วสูง (polar organic

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

solvent) ซึ่งระบบของที่เหมาะสม (ค่า R_f อยู่ระหว่าง 0.3-0.7) ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้มี 5 ระบบ โดยมีอัตราส่วนดังนี้

1. ethyl acetate : cyclohexane (2:1)
2. ethyl acetate : chloroform (2:1)
3. ethyl acetate : benzene (3:1)
4. ethyl acetate : carbontetrachloride (3:1)
5. ethyl acetate : petrolium ether = 3:1

1.3 การตรวจสอบสเตียรอยด์ ทำได้ 3 วิธี ดังนี้

(1) ตรวจดูการเรืองแสงภายใต้แสงเหนือม่วง (ultra-violet light) โดยการนำเอาแผ่น TLC ที่ผ่านกระบวนการแล้วมาดูภายใต้แสงเหนือม่วง ซึ่งสเตียรอยด์ทั้ง 2 ชนิดนี้จะเรืองแสงในตำแหน่งที่แตกต่างกัน

(2) ตรวจสอบด้วยสารละลายที่ใช้ตรวจสอบทั่วไป (general spraying reagent) คือ 2% vanillin ใน ethanol พ่นลงไปก่อน แล้วพ่นทับด้วย 50% sulfuric acid ใน ethanol แล้ววางบนแผ่นให้ความร้อน 110 °C เป็นเวลา 10 นาที ผลการทดสอบ เพรดนิโซโลนจะให้เป็นจุดสีดำ ส่วนเด็กซ่าเมทธาโซนจะให้เป็นจุดสีเหลือง

(3) ใช้สารพ่นเฉพาะ (specific spraying reagent) คือ 15 % phosphoric acid ใน ethanol พ่นไปบนแผ่น TLC plate แล้วนำไปวางบนแผ่นให้ความร้อน 120 °C 10 นาที ผลการทดสอบ เพรดนิโซโลนจะให้เป็นจุดสีดำ ส่วนเด็กซ่าเมทธาโซนจะให้เป็นจุดสีม่วง

(4) สารมาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบในการวิจัย ได้แก่ สารอ้างอิงมาตรฐานเพรดนิโซโลน (prednisolone reference standard) และสารอ้างอิงมาตรฐานเด็กซ่าเมทธาโซน (dexamethasone reference standard)

2. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน (standard solution) ทำได้โดยละลายสารมาตรฐาน (reference standard) 1 mg ใน ethanol 1 ml

3. การเตรียมสารละลายตัวอย่างทดสอบ (test solution)

3.1 ระเหยผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง ประมาณ 50 ml ใน water bath ให้เหลือ ประมาณ 30 ml ทำให้เป็นกรดด้วย concentrated hydrochloric acid แล้วสกัดต่อด้วย chloroform ประมาณ 50 ml (อาจเติม isopropanol ช่วยแก้ไขอิมัลชันที่แยกชั้น) จากนั้นไขเอาเฉพาะสารสกัดที่อยู่ในชั้น

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

chloroform โดยสารสกัดที่ได้จะเป็นสารสกัดที่เป็นกรด (สำหรับผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรด หรือเป็นกลาง) ให้ใส่ไว้ใน evaporating disc เพื่อรอการนำไประเหยแห้ง

3.2 ส่วน Aqueous phase ที่เหลือ ทำให้เป็นด่างด้วย 10% ammmonium chloride แล้วสกัดด้วย chloroform ประมาณ 50 ml ไขเอาเฉพาะสารสกัดที่อยู่ในชั้น chloroform โดยสารสกัดที่ได้จะเป็นสารสกัดที่เป็นด่าง (สำหรับผลิตภัณฑ์ที่เป็นด่าง) ให้ใส่ไว้ใน evaporating disc เพื่อรอการนำไประเหยแห้ง

3.3 นำสารสกัดที่ได้จากข้อ 3.1 และ 3.2 มาระเหยแห้งให้เหลือประมาณ 0.5 ml บน water bath หรืออาจระเหยจนแห้งและละลายส่วนที่เหลืออยู่ (residue) ด้วย 0.5 ml ของ ethanol

4. การตรวจสอบเพื่อหาการปนปลอมของสเตียรอยด์

เตรียมระบบของตัวทำละลายที่เหมาะสม โดยมีอัตราส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์ คือ ethyl acetate : cyclohexane เป็น 2 : 1 จากนั้นทำการหยดจุด (spot) ของสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างทดสอบลงใน TLC plate ประมาณ 1-10 µl โดยใช้ capillary tube หรือ micropipette นำ plate มาวางในแนวราบไม่ให้เอียง โดยจุดที่หยดสารอยู่สูงกว่า mobile phase กะประมาณให้ mobile phase เคลื่อนที่ประมาณ 10-15 cm จากนั้นเอา plate ออกจาก tank และทำเครื่องหมายอย่างรวดเร็วก่อนที่ตัวทำละลายจะระเหยไป จากนั้นปล่อยให้แห้งเองหรือใช้ที่เป่าลมร้อนเป่าให้แห้ง

5. บันทึกผลที่ได้ จากนั้นนำมาทำการยืนยันผลต่อโดยใช้วิธีตามข้อ 1.3 ซึ่งในครั้งแรกจะใช้เพียง 1 ระบบของตัวทำละลาย ถ้าผลการตรวจสอบให้ผลว่ามีสเตียรอยด์ปลอมปนอยู่ในตัวอย่าง ก็จะทำการตรวจสอบต่อไปอีก 4 ระบบของตัวทำละลายที่เหลือ (ดังข้อ 1.2) เพื่อยืนยันผลการตรวจสอบ ถ้าผลการตรวจสอบให้ผลบวกต่อระบบของตัวทำละลายทั้ง 5 ระบบ จึงจะถือว่าการตรวจสอบนั้นพบการปลอมปนของสารสเตียรอยด์ในตัวอย่าง

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

3.4 การตรวจสอบหาปริมาณเอทานอลในยาน้ำแผนโบราณ [9]

สารเคมี :

1. Ethanol
2. n-Propanol
3. Nitrogen (make up gas)
4. Helium (mobile phase)
5. Hydrogen (ตัวจุดเปลวไฟใน detector)

วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ :

1. Gas Chromatography (Hewlett Packard HP 6890 Series GC system)
2. Packed Column ที่มี Carbowax 20 M เป็น stationary phase
3. Flame Ionization Detector
4. Gas-tight syringe

วิธีการตรวจสอบ

การสร้างกราฟมาตรฐาน

1. เตรียมสารละลาย ethanol 10 %v/v และสารละลาย n-propanol 3 %v/v
2. ดูดสารละลาย ethanol 10 %v/v ปริมาตร 5, 10, 15 และ 20 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml แล้วเติมสารละลาย n-propanol 3 %v/v ลงไป flask ละ 50 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำและผสมให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียว จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นของ ethanol 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 %v/v และในแต่ละความเข้มข้นมี n-propanol 1.5 %v/v อยู่ด้วย เพื่อเป็น internal standard
3. ฉีดสารละลายในข้อ 1. ปริมาณ 1 µl เข้าเครื่อง Gas Chromatography โดยตั้งอุณหภูมิของ injection port และ detector เป็น 180 °C
4. บันทึกโครมาโตแกรมที่ได้แล้วสร้างกราฟมาตรฐานระหว่าง peak area ratio และความเข้มข้นของเอทานอล

peak area ratio = area of alcohol peak / area of n-propanol peak

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

การหาปริมาณ ethanol ในยาน้ำแผนโบราณ

1. เตรียมสารละลายตัวอย่าง โดยดูดตัวอย่างยาน้ำแผนโบราณ 4 ml เติมลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml แล้วเติมสารละลาย n-propanol 3 %v/v ลงไป 50 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำและผสมให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียว
5. หา peak area ratio แล้วนำไปอ่านค่าความเข้มข้นของ ethanol จากกราฟมาตรฐาน

3.5 การตรวจสอบหาคลอโรฟอร์มในยาน้ำแผนโบราณ [10]

สารเคมี :

1. Sodium chloride AR Grade
2. Chloroform AR Grade
3. Nitrogen (make up gas)
4. Helium (mobile phase)
5. Hydrogen (ตัวจุดเปลวไฟใน detector)

วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ :

1. Gas Chromatography (Hewlett Packard HP 6890 Series GC system)
2. Column ที่มี Ultra 2 (crosslinked 5% PHME Siloxame) เป็น stationary phase
3. Flame Ionization Detector
4. Headspace Vial

วิธีการตรวจสอบ

การสร้าง peak อ้างอิงคลอโรฟอร์ม

ดูดสารละลายอ้างอิง 1% chloroform 2 ml ใส่ใน Headspace vial แล้วเติม sodium chloride ประมาณ 100 mg ปิดฝา นำไปเข้าเครื่อง GC Headspace

การวิเคราะห์ตัวอย่าง

ทำเหมือนเดิมแต่เปลี่ยนเป็นตัวอย่าง ถ้าโครมาโตแกรมของตัวอย่างไม่มี peak ให้ถือว่าไม่มีคลอโรฟอร์มเจือปน ถ้ามี peak ตำแหน่งใกล้เคียงกับคลอโรฟอร์ม (3.309 $\pm$ 2% นาที) และสูงกว่า 20.0 pA ให้ยืนยันโดย Spiking Technique คือทำเหมือนเดิมแต่เพิ่มตัวอย่างเข้าไป

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

3.6 การตรวจหาปริมาณและชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในยาน้ำแผนโบราณ

สารเคมี :

1. Peptone water
2. Kovacs solution
3. Mammalian plasma (Rabbit plasma)
4. 3 % hydrogen-peroxide solution
5. 1 % N,N-dimethyl-p-phenylene diamine dihydrochloride
6. Sterile phosphate buffer pH 7.2
7. Gentamicin

วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ :

1. Test tube
2. Pipette ขนาด 0.1 , 0.2 , 1 , 2 , 5 , 10 ml
3. Volumetric flask ขนาด 50 , 100 , 500 ml
4. Beaker ขนาด 50 , 100 , 250 , 500 , 1000 ml
5. Glass spreader
6. Inoculating loop
7. Petridish
8. ตะเกียงแอลกอฮอล์และไม้ขีดไฟ
9. แอลกอฮอล์และฟองน้ำทำความสะอาด
10. Stirring rod
11. Spectrophotometer
12. Laminar air flow class 100
13. Incubator
13. Hot air oven
14. Autoclave
15. เครื่องมือนับจำนวนโคโลนี

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

เชื้อมาตรฐาน :

1. *S. aureus* ATCC 6538
2. *E. coli* ATCC 8739
4. *Salmonella typhi* ATCC 6539
5. *Clostridium sporogenase* ATCC 11437

อาหารเลี้ยงเชื้อ :

1. TSB (Merck KGaA, Germany)
2. TSA (Merck KGaA, Germany)
3. PDA
4. LTB (Difco Detroit, USA)
5. EEB ((Merck KGaA, Germany)
6. VRBD (Merck KGaA, Germany)
7. MSA (Merck KGaA, Germany)
8. VJA (Merck KGaA, Germany)
9. MAC (Difco Detroit, USA)
10. EMB (Merck KGaA, Germany)
11. TSI (Difco Detroit, USA)
12. SCB (Merck KGaA, Germany)
13. TTB (Merck KGaA, Germany)
14. BPLS (Merck KGaA, Germany)
15. XLD (Merck KGaA, Germany)
16. BSA (Merck KGaA, Germany)
17. RMC (Difco Becton Dickinson, USA)
18. Columbia Agar

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

วิธีการตรวจสอบ :

การตรวจสอบเพื่อหาปริมาณและชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในยาน้ำแผนโบราณปฏิบัติตามวิธีของอรุณณี [11] ดังต่อไปนี้

1. การตรวจสอบคุณสมบัติของอาหารเลี้ยงเชื้อ
   1.1 ตรวจสอบความเหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้
   1.2 ตรวจสอบความปราศจากเชื้อของอาหารเลี้ยงเชื้อ
2. การตรวจสอบคุณสมบัติของตัวอย่างทดสอบ
   2.1 การเตรียมตัวอย่างทดสอบ
   2.2 การตรวจสอบเกี่ยวกับฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของตัวอย่าง
3. การทดสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Viable Count : TVC) เชื้อรา และ Enterobacteria
   3.1 การหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด โดยวิธี Plate count method ซึ่งสามารถทำโดย Surface count หรือ Spread plate
   3.2 การหายีสต์และรา
   3.3 การหาจำนวน Enterobacteria
4. การตรวจสอบชนิดของจุลินทรีย์ปนเปื้อนและตรวจสอบเชื้อกำหนดห้าม
   4.1 การพิสูจน์จำแนกเชื้อ *S. aureus*
   4.2 การพิสูจน์จำแนกเชื้อ *E. coli*
   4.3 การพิสูจน์จำแนกเชื้อ *Salmonella* spp.
   4.4 การพิสูจน์จำแนกเชื้อ *Clostridium* spp.

1. การตรวจสอบคุณสมบัติของอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 <u>ตรวจสอบความเหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้</u>

หลักการ : เป็นการตรวจสอบตามชนิดของอาหาร โดยใช้เชื้อมาตรฐาน แล้วดูว่าเชื้อสามารถเจริญได้ปกติในอาหารแต่ละชนิดที่เตรียมไว้นั้นหรือไม่

เชื้อมาตรฐานที่ใช้เป็นตัวแทน :

1. *S. aureus* ATCC 6538
2. *E. coli* ATCC 8739

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

3. *Ps. aeruginosa* ATCC 15442

4. *Salmonella typhi* ATCC 6539

วิธีปฏิบัติ :

1. สุ่มอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบมาอย่างละ 3 จาน
2. spread เชื้อมาตรฐานลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่สุ่มมาได้จากข้อ 1
3. นำไปบ่มเพาะเชื้อ ที่ 35-37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

การแปลผล :

ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อมีความเหมาะสมในการเจริญเติบโตของเชื้อได้ ต้องพบการเจริญของเชื้อบนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบ

1.2 ตรวจสอบความปราศจากเชื้อของอาหารเลี้ยงเชื้อ

หลักการ : เป็นการทดสอบเพื่อดูความปราศจากเชื้ออื่น ๆ ก่อนที่จะนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำการทดสอบ

วิธีปฏิบัติ :

1. สุ่มอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบมาอย่างละ 3 จาน
2. นำไปบ่มเพาะเชื้อ ที่ 35-37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโม

การแปลผล :

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเชื้อจริง จะต้องไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อใดๆ บนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ

2. การตรวจสอบคุณสมบัติของตัวอย่างทดสอบ

2.1 การเตรียมตัวอย่างทดสอบ

หลักการ : เป็นวิธีการเติมตัวทำละลายลงไปเจือจางตัวอย่าง เพื่อให้ตัวอย่างนั้นละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

วิธีปฏิบัติ :

1. เนื่องจากผลิตภัณฑ์เป็นยาน้ำแขวนตะกอน ให้เขย่าจนเป็นเนื้อเดียวกันและกลับขวดขึ้นลงอย่างน้อย 20 ครั้ง (ให้น้ำยาสัมผัสผิวด้านในของขวดทุกจุด) และทำความสะอาดผิวนอกของขวดด้วย 70 % alcohol ก่อนเปิด

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

2. ชั่งหรือตวงผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง 10 g หรือ 10 ml เติมลงใน phosphate buffer ปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml ด้วย phosphate buffer จะได้ความเข้มข้นของตัวอย่างเป็น 1: 10 (v/v หรือ w/v) เรียกว่า ความเข้มข้น A

3. เจือจางตัวอย่าง A ลงในลักษณะ ten-fold dilutions ด้วย phosphate buffer จนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการตรวจนับเชื้อ ในการทดลองนี้ให้เจือจางลงเป็น 1:100 และ 1:1000 (เรียกว่า ความเข้มข้น B และ C ตามลำดับ)

2.2 การตรวจสอบเกี่ยวกับฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง

หลักการ : เป็นการทดสอบความสามารถในการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีตัวอย่างผสมอยู่

เชื้อมาตรฐานที่ใช้เป็นตัวแทน : (เช่นเดียวกับข้อ 1.1)

วิธีปฏิบัติ :

1. ดูดตัวอย่างทดสอบที่เตรียมไว้ในข้อ 2.1 ที่ความเข้มข้น A, B และC ความเข้มข้นละ10 ml
2. เติมเชื้อจุลินทรีย์ 1 ml ลงในแต่ละหลอดของผลิตภัณฑ์ตัวอย่างทดสอบที่ผ่านการเจือจางแล้วดังกล่าว โดยเชื้อที่เติมลงไปเป็นเชื้อมาตรฐานทั้ง 4 ตัวที่ผ่านการเพาะเชื้อมาแล้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 10^3 CFU/ml
3. นำไปบ่มเพาะเชื้อ ที่ 35-37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

การแปลผล :

ถ้าไม่มีเชื้อขึ้นเลยในหลอดที่ทำการทดสอบ แสดงว่าตัวอย่างนั้นมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ จะต้องปรับสภาพให้สามารถทำการทดสอบได้ดังนี้

1. เพิ่มปริมาณ diluent โดยใช้ปริมาณตัวอย่างเท่าเดิม หรือ
2. ใส่ inactivating agents ในปริมาณที่พอเหมาะลงไปใน diluent หรือ
3. กระทำทั้งวิธีที่ 1 และ 2 เพื่อให้เชื้อเกิดขึ้นได้
4. ถ้าตัวอย่างมี preservative หรือ antimicrobial agents ผสมอยู่ด้วยต้องใช้สาร neutralize คุณสมบัติการยับยั้งการเกิดขึ้นของเชื้อ โดยใส่ soy lecithin 0.5 % หรือ polysorbate 20, 4% ลงใน culture medium
5. ถ้าตัวอย่างนั้นเป็น bactericidal agent ในตัวของมันเองและสามารถละลายน้ำได้ให้ใช้วิธีการกรองและล้างด้วย Peptone-P, 100 ml. 3 ครั้ง

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

6. ถ้าตัวอย่างไม่สามารถละลายน้ำได้ ให้เติม inhibitor ตามความเหมาะสมของตัวอย่างนั้น ๆ เช่น ยาที่เป็น Penicillin ให้เติม Penicillinase เป็นต้น

3. **การตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด** (Total Viable Count) **ยีสต์/รา และ** Enterobacteria

หลักการ: เป็นวิธีการทดสอบหาจำนวนเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อตามอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม ดังนี้

1. Aerobic incubation สำหรับ TSB และ TSA ที่ 35-37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สำหรับ bacteria

2. Aerobic incubation สำหรับ Potato Dextrose Agar Medium ที่ 20-25 °C เป็นเวลา 5 วัน สำหรับเชื้อรา

จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นต่อ g หรือ ml สามารถคำนวณได้จากจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นบนจานเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม และเชื่อถือได้

3.1 <u>การหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด โดยวิธี Plate count method (Surface count หรือ Spread plate method)</u>

วิธีปฏิบัติ :

1. ชั่งหรือดวงตัวอย่าง 10 g หรือ 10 ml ลงใน phosphate buffer ในอัตราส่วน 1:100 (v/v หรือ w/v)

2. เจือจางตัวอย่างด้วย phosphate buffer ให้ได้ 1:100 , 1:1000 หรือเจือจางต่อไปตามความเหมาะสม

3. ดูดตัวอย่าง 0.1 ml จากความเข้มข้น 1:10 , 1:100 , 1:1000 ลงบนผิวของ TSA ซึ่งแข็งแล้วอยู่ในจานเลี้ยงเชื้อ dilution ละ 3 จาน

4. ใช้แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยม หรือ glass spreader เกลี่ยให้ตัวอย่างกระจายทั่วพื้นผิว

5. นำไปบ่มเพาะเชื้อ ที่ 35-37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง โดยให้ฝาจานอยู่ด้านล่าง เพื่อป้องกันไม่ให้หยดน้ำบนฝาตกลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

6. นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น ย้อม gram strain ปริมาณโคโลนีที่ยอมรับได้ควรอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี และต้องมีจำนวนใกล้เคียงกันในทั้ง 3 จาน ที่มีความเข้มข้นเท่ากัน

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

7. จำนวนเชื้อจุลินทรีย์คำนวณได้จากสมการ ดังนี้

$$\frac{\text{ค่าเฉลี่ยของโคโลนีที่เกิดขึ้น}}{\text{dilution factor (เช่น } 10^{-2}\text{)}} = \text{จำนวนเชื้อ / g หรือ ml}$$

3.2 การหายีสต์ และรา ควรทำไปพร้อมกับการหาแบคทีเรีย

วิธีปฏิบัติ :

1. ทำตามข้อ 1-6 ของวิธี spread plate ยกเว้นการใช้ PDA แทน TSA
2. นำไปบ่มเพาะเชื้อ ที่ 20-25 °C เป็นเวลา 5 วัน โดยไม่ต้องกลับจานเพาะเชื้อ
3. การแปลผลทำเช่นเดียวกับวิธี Plate Count

3.3 การหาจำนวนของ Enterobacteria

วิธีปฏิบัติ :

1. ชั่งหรือตวงตัวอย่าง 10 g หรือ 10ml ลงใน LTB ในอัตราส่วน 1:100 (v/v หรือ w/v)
2. นำไปบ่มเพาะเชื้อ ที่ 35-37 °C เป็นเวลา 2-5 ชั่วโมง
3. ดูดตัวอย่างที่เตรียมไว้ในข้อ 1 , 10 ml ลงใน 100 ml ของ EEB
4. นำไปบ่มเพาะเชื้อ ที่ 35-37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง
5. ถ่ายเชื้อที่ได้ลงใน VRBD
6. นำไปบ่มเพาะเชื้อที่ 35-37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
7. สังเกตและบันทึกลักษณะของโคโลนีที่เกิดขึ้น ซึ่งจะเป็นสีแดงเทียบกับเชื้อมาตรฐานและย้อม gram strain
8. ถ้าผลที่ได้เป็นผลลบ แสดงว่าตัวอย่างนี้ไม่มีการปนเปื้อนของ Enterobacteria
9. ถ้าผลที่ได้เป็นผลบวก ต้องเตรียมตัวอย่างใหม่ ทำตามข้อ 1 เจือจางตัวอย่างต่อไปด้วย LTB ให้ได้ความเข้มข้นที่ 1:100 และ 1:1000
10. นำไปบ่มเพาะเชื้อ ที่ 35-37 °C เป็นเวลา 2-5 ชั่วโมง
11. ดูดตัวอย่างที่เตรียมไว้ในข้อ 10,10 ml ลงใน 100 ml EEB ความเข้มข้นละ 1 ขวด
12. นำไปบ่มเพาะเชื้อ ที่ 35-37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
13. ถ่ายเชื้อที่ได้จากแต่ละความเข้มข้นลงใน VRBD ความเข้มข้นละ 3 จาน

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

14. นำไปบ่มเพาะเชื้อ ที่ 35-37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

15. โคโลนีสีแดงที่เกิดขึ้นแสดงว่าให้ผลบวก บันทึกผลบวกและผลลบที่เกิดขึ้น

16.จำนวนของ Enterobacteria สามารถแปลผลได้จาก ตารางที่ 3.3 Probable number of bacteria

17. ถ้าค่าที่อ่านได้มากกว่า 10^2 ต้องเจือจางตัวอย่างใหม่ด้วย phosphate buffer ให้ได้ความเข้มข้นที่ 1:10 , 1:100 และ 1:1000 และทำวิธี Plate Count Method โดยใช้ VRBG แทน TSA

ตารางที่ 3.3 Probable number of bacteria

Results for each quantity of product			Probable number of bacteria per gram of product
1.0g or 1.0 ml.	0.1g or 0.1 ml.	0.01g or 0.01ml.	
+	+	+	more than 10^2
+	+	-	fewer than 10^2 but more than 10
+	-	-	fewer than 10 but more than 1
-	-	-	fewer than 1

4. การตรวจสอบชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนและตรวจสอบเชื้อกำหนดห้าม

4.1 การพิสูจน์จำแนกเชื้อ *S. aureus*

หลักการ : 1. *S. aureus* เป็นแบคทีเรียที่ให้ลักษณะและสีของโคโลนีบนพื้นผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ

2. ให้ผลบวกแน่นอนในการทดสอบ Coagulase Test ซึ่งเป็นคุณสมบัติเฉพาะของเชื้อชนิดนี้

เชื้อมาตรฐาน : *S. aureus* ATCC 6538

วิธีปฏิบัติ:

1. ชั่งหรือตวงตัวอย่าง 10 g หรือ 10 ml ลงใน 100 ml
2. นำไปบ่มเพาะเชื้อ ที่ 35-37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

3. ใช้ inoculating loop เพาะเชื้อลงใน MSA และ VJA พร้อมทำ positive control โดยใช้เชื้อมาตรฐาน

4. นำไปบ่มเพาะเชื้อ ที่ 35-37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

5. บันทึกลักษณะของโคโลนีที่เกิดขึ้น เปรียบเทียบกับลักษณะของโคโลนีกับตารางที่แสดงไว้และกับเชื้อมาตรฐาน

6. ย้อมสี gram strain

ตารางที่ 3.4 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *S.aureus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ

อาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ	VJA	MSA
ลักษณะของโคโลนี	สีดำล้อมรอบด้วยโซนสีเหลือง	โคโลนีเหลืองล้อมรอบด้วยโซนสีเหลือง
Gram stain	Positive cocci	Positive cocci

7. ถ้าได้ผลบวกดังตารางที่ 3 ให้ทำการตรวจยืนยันโดย Coagulase Test ดังนี้

7.1 ใช้ loop เขี่ยโคโลนีที่สงสัยลงใน 0.5 ml TSB

7.2 นำไปบ่มเพาะเชื้อ ที่ 35-37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

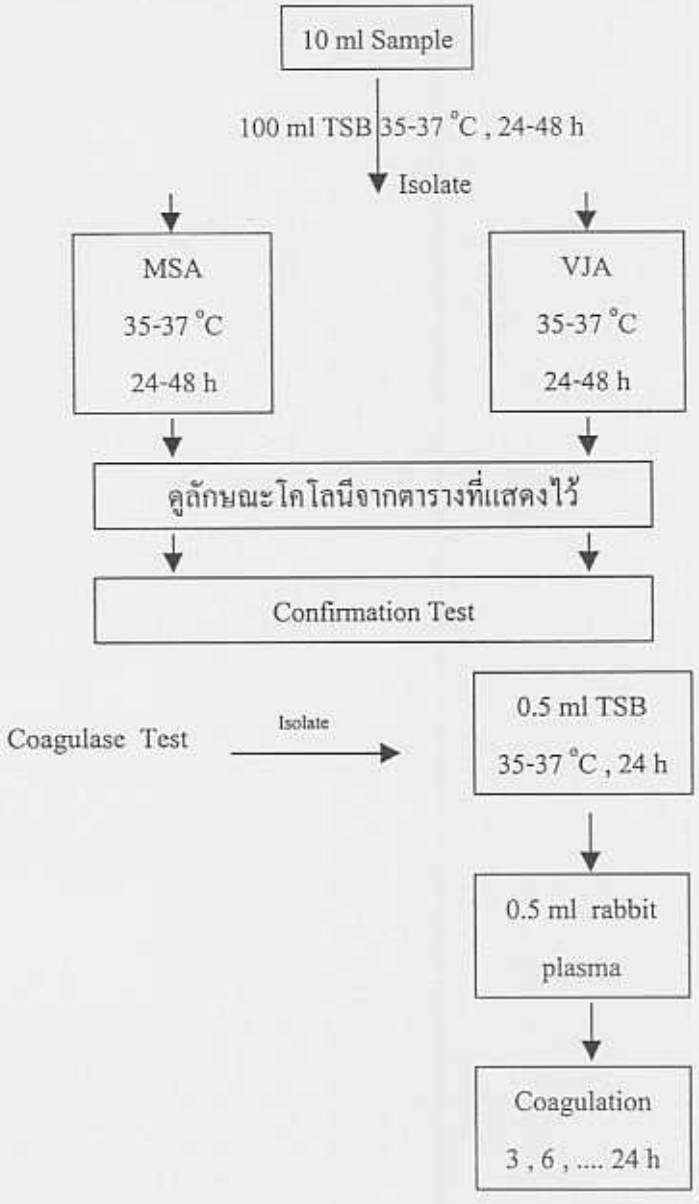
7.3 เติม 0.5 ml ของ rabbit plasma

7.4 สังเกตการ clot ทุก 3 , 6 จนครบ 24 ชั่วโมง ทำ positive control ด้วย

7.5 ถ้ามี coagulation เกิดขึ้น แสดงว่าให้ผลบวก คือ ตัวอย่างนี้มี *S.aureus*

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University



รูปที่ 3.1 การพิสูจน์จำแนกเชื้อ *S.aureus*

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

4.2 การพิสูจน์จำแนกเชื้อ *E. coli*

หลักการ : 1. *E. coli* เป็นแบคทีเรียที่สามารถหมักย่อยน้ำตาล lactose ได้ที่ 45 °C และเกิดแก๊ซ

2. ให้ลักษณะและสีของโคโลนีเฉพาะบนพื้นผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ

เชื้อมาตรฐาน : *E. coli* ATCC 8739

วิธีปฏิบัติ :

1. ชั่งหรือตวงตัวอย่าง 10 g หรือ 10 ml ลงใน TSB 100 ml.

2. นำไปบ่มเพาะเชื้อ ที่ 35-37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

3. ใช้ Inoculating loop เพาะเชื้อลงใน MAC พร้อมทำ positive control โดยใช้เชื้อมาตรฐาน

4. นำไปบ่มเพาะเชื้อ ที่ 35-37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

5. ถ้ามีเชื้อขึ้นตรงกับลักษณะของโคโลนี ดังตารางที่แสดงไว้ ให้ใช้ loop เขี่ยโคโลนีเดี่ยวจาก MAC ลงเพาะใน EMB

6. นำไปบ่มเพาะเชื้อ ที่ 35-37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

7.บันทึกลักษณะของโคโลนีที่เกิดขึ้น เปรียบเทียบกับลักษณะของโคโลนีกับตารางที่แสดงไว้และกับเชื้อมาตรฐาน

8. ย้อมสี gram strain

ตารางที่ 3.5 ตารางแสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ

อาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ	MAC	EMB
ลักษณะโคโลนี	สีแดงอิฐ อาจมีโซนล้อมรอบด้วย precipitated bile	สีเงินวาวภายใต้การสะท้อนแสง
Gram stain	Negative rods	Negative rods

9. ถ้าได้ผลบวกดังตารางที่ 3.5 ให้ทำการตรวจยืนยันโดย Indole Test และการใช้ TSI Agar

9.1 Indole Test

1. เพาะเชื้อใน Peptone water , นำไปบ่มเพาะเชื้อที่ 35-37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. เติมน้ำยา Kovacs 0.2 ml

Ubon Rajathanee University

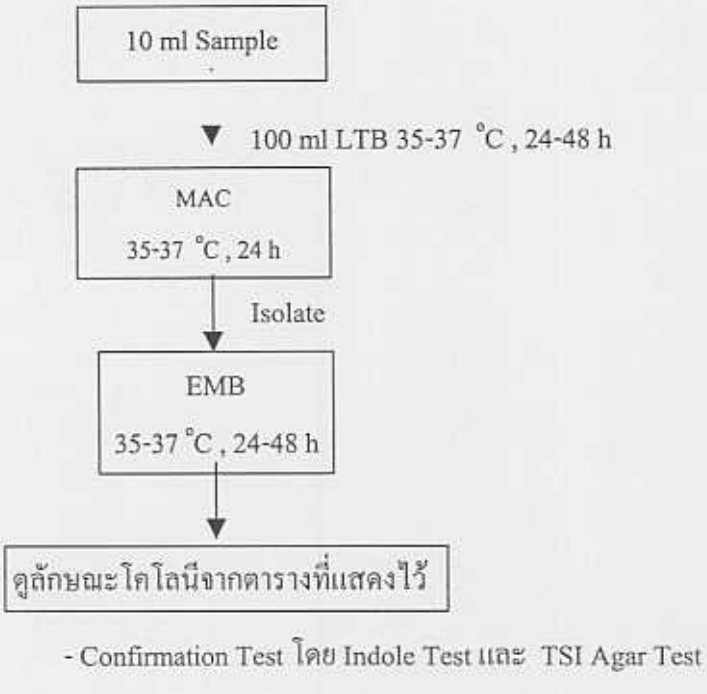
Ubon Rajathanee University

3. ถ้าชั้นบนมีสีแดงชัดเจน แสดงว่าให้ผลบวก

9.2 TSI agar Test

1. ใช้เข็มเขี่ยเชื้อที่ขึ้นเป็นโคโลนีเดี่ยว เพาะลงใน TSI agar โดยใช้เข็มแทงลง ไปใน agar แล้ว streak บนผิวของ slant เพาะเชื้อที่ 35-37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. สีแดงของ Alkaline Slant เปลี่ยนเป็นสีเหลือง และมี gas ดัน slant ขึ้นมาจากก หลอด แสดงว่าให้ผลบวก



รูปที่ 3.2 การพิสูจน์จำแนกเชื้อ *E. coli*

4.3 <u>การพิสูจน์จำแนกเชื้อ</u> *Salmonella* spp.

หลักการ : 1. *Salmonella* เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ให้ลักษณะโคโลนีเด่นชัดบนพื้นผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ

2. *Salmonella* ที่ปนเปื้อนมักมีจำนวนน้อยและปะปนมากับเชื้อจำพวก Enterobacteriaceae หรือเชื้อตระกูลอื่น ฉะนั้นจึงจำเป็นที่จะต้อง pre-enrich และ enrich ในอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนนำมาทำการทดสอบ

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

เชื้อมาตรฐาน : Salmonella typhi ATCC 6539

วิธีปฏิบัติ:

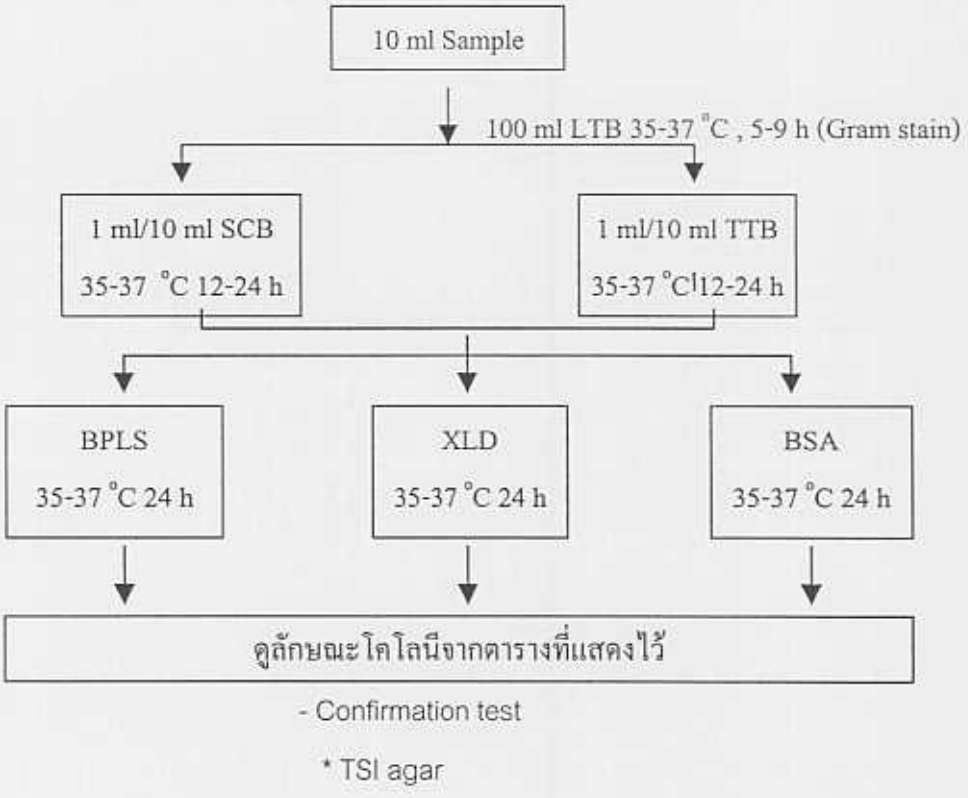
1. ชั่งหรือตวงตัวอย่าง 10 g หรือ 10 ml ลงใน LTB 100 ml.
2. นำไปบ่มเพาะเชื้อ ที่ 35-37 °C เป็นเวลา 5-24 ชั่วโมง
3. ถ้ามีเชื้อเกิดขึ้นให้นำไปย้อม gram strain และนำไปทดสอบหา *Salmonella spp.*
4. ดูดตัวอย่างในข้อ 3 , 1 ml ลงใน SCB และ TTB หลอดละ 10 ml
5. นำไปบ่มเพาะเชื้อ ที่ 35-37 °C เป็นเวลา 5-24 ชั่วโมง
6. ใช้ Inoculating loop เพาะเชื้อจาก SCB และ TTB ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่มี BPLS, XLD และ BSA อย่างละ 3 จาน ตามลำดับ โดยใช้เชื้อมาตรฐานเป็น positive control
7. นำไปบ่มเพาะเชื้อ ที่ 35-37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
8. บันทึกลักษณะและสีของโคโลนีที่เกิดขึ้น เทียบกับเชื้อมาตรฐาน และตารางที่แสดงไว้
9. ย้อมสี gram strain
10. ถ้าเชื้อที่เกิดขึ้นให้ผลบวก และเป็นแกรมลบ ใช้เข็มเขี่ยเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยวเพาะลงใน TSI agar โดยครั้งแรกเพาะเชื้อลงใน agar butt แล้วลากขึ้น streak บนผิวของ slant
11. นำไปบ่มเพาะเชื้อ ที่ 35-37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
12. ถ้าเป็นเชื้อ *Salmonella* จะให้ผลบวกเป็น butt acid (สีเหลือง) และ slant alkaline (สีแดง) อาจจะมี H_2S หรือไม่มี H_2S ก็ได้

ตารางที่ 3.6 ตารางแสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Salmonella* spp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ

อาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ	ลักษณะโคโลนี
Brillian-green Phenol-Red Lactrose Sucrose Agar Medium	ขนาดเล็ก , โปร่งใส , ไม่มีสีหรือมีสีชมพูอ่อนถึงสีขาวขุ่น (มักพบว่าล้อมรอบด้วยสีชมพูหรือสีแดงเป็นโซน)
Xylose-Lysine-Desoxycholate Agar	สีแดง , อาจมีหรือไม่มีจุดสีดำตรงกลางก็ได้
Bismuth Sulfite Agar	จะปรากฏเป็นสีน้ำตาลในตอนแรก และจะกลายเป็นสีดำในเวลาต่อมาเมื่อใช้เวลาบ่มเพาะนานขึ้น หรืออาจพบเป็นโคโลนีสีเขียวขนาดเล็ก

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University



รูปที่ 3.3 การพิสูจน์จำแนกเชื้อ *Salmonella* spp.

4.4 <u>การพิสูจน์จำแนกเชื้อ</u> *Clostridium* spp.

หลักการ : Clostridium spp. เป็นแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ในสภาพไร้อากาศ

เชื้อมาตรฐาน : Clostridium sporogenes ATCC 11437

วิธีปฏิบัติ :

1. ชั่งหรือตวงตัวอย่าง 10 g หรือ 10 ml ลงใน phosphate buffer 100 ml
2. ดูดตัวอย่าง 20 ml ลงในหลอด 2 หลอด A และ B
3. หลอด A นำไปให้ความร้อนที่ 80 °C เป็นเวลา 10 นาที และทำให้เย็นทันที หลอด B ไม่ต้องให้ความร้อน
4. ดูดตัวอย่าง 10 ml จากหลอด A และ B ลงใน RMC 100 ml อย่างละ 1 หลอดตามลำดับ

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

5. นำไปบ่มเพาะเชื้อ ที่ 35-37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใน anaerobic jar

6. ใช้ Inoculating loop ถ่ายเชื้อจากหลอด a และ B ลงใน CBA+G

7. นำไปบ่มเพาะเชื้อ ที่ 35-37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใน anaerobic jar

8. ถ้ามีเชื้อเกิดขึ้นใช้ loop เขี่ยเชื้อจากโคโลนีเดี่ยว ลงใน CBA-G

9. นำไปบ่มเพาะเชื้อ ที่ 35-37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใน aerobe และ anaerobe

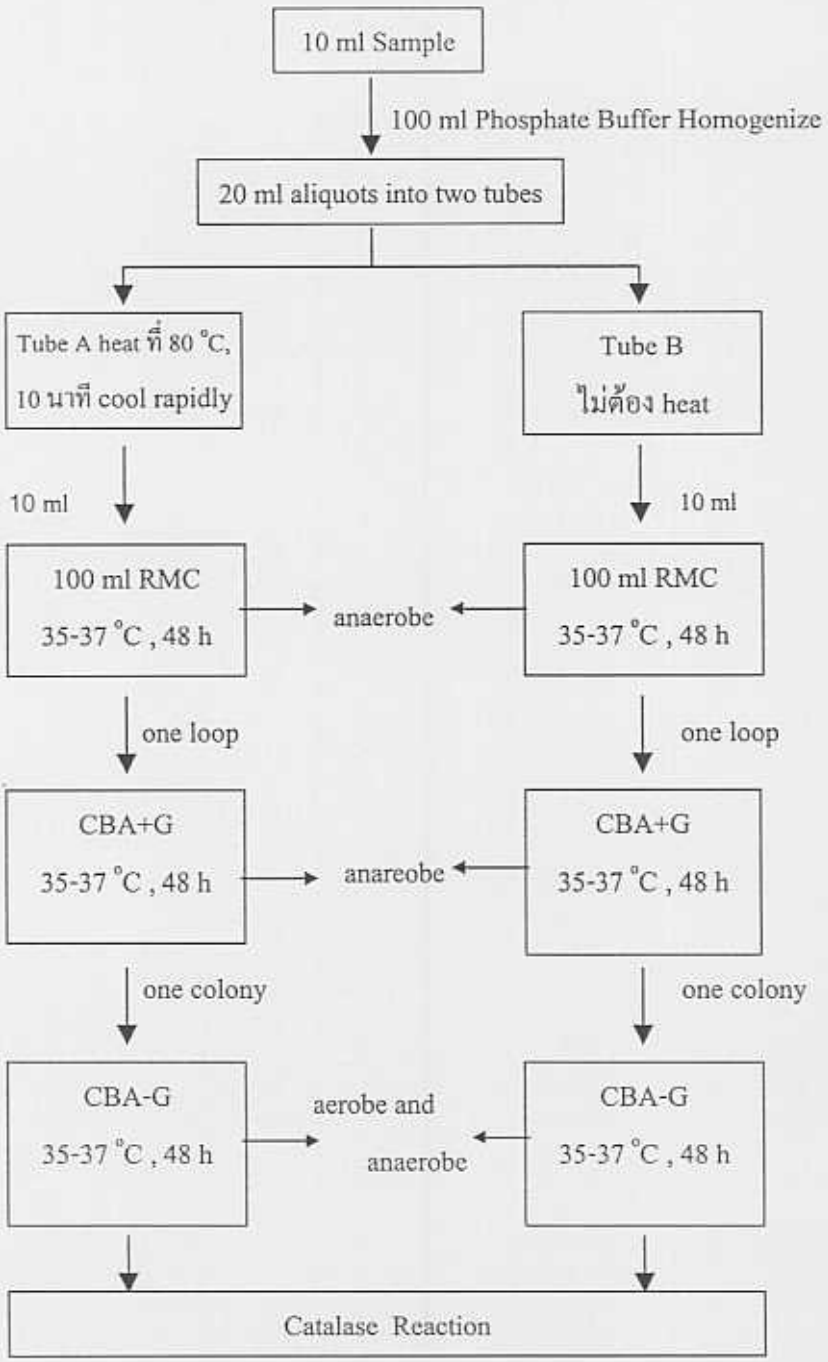
10. เชื้อซึ่งเกิดขึ้นในสภาพที่ไร้อากาศที่เป็นแกรมบวกมีสปอร์ หรือไม่มีสปอร์ก็ตามให้ผลลบกับ Catalase Reaction แสดงว่าเชื้อนั้นเป็น *Clostridium spp.*

11. Catalase Reaction ทำได้โดยการใช้ Inoculating loop ถ่ายเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยวที่มีลักษณะชัดเจน ลงบน glass slide ใช้ dilute hydrogen peroxide solution R (3%) หยดลงไป 1 หยด

12. ถ้ามี gas เกิดขึ้น แสดงว่า Catalase Reaction นั้นให้ผลบวก เชื้อนั้นอาจจะเป็น aerobic หรือ anaerobic *Bacillus spp.* เพราะฉะนั้นเชื้อ *Clostridium spp.* ซึ่งเป็นเชื้อกรัมบวกที่เจริญได้เฉพาะในสภาพไร้อากาศ โดยอาจมีหรือไม่มีสปอร์ก็ได้ แต่ต้องให้ผลลบกับ Catalase reaction

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University



รูปที่ 3.4 การพิสูจน์จำแนกเชื้อ *Clostridium* spp.

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

จากการตรวจหาปริมาณและชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในยาน้ำแผนโบราณดังที่กล่าวมาทั้งหมดนั้นผลที่ได้นำมาเปรียบเทียบกับมาตรฐานตามไทยเภสัชตำรับ (Thai Pharmacopoeia) ปี 1996 ที่ว่าด้วยเรื่องของ Limits for microbial contamination ดังตารางที่ 3.7

ตารางที่ 3.7 TP1 Supplement 1996 LIMITS FOR MICROBIAL CONTAMINATION [5]

Criteria	Other internally used preparations with contain whole or ground crude drugs
Limit of Total Aerobic Microbial Count	does not exceed 5.0×10^5 per g (ml)
Yeasts and moulds	does not exceed 5.0×10^3 per g (ml)
E. coli	does not exceed 50 per g (ml)
Enterobacteria	does not exceed 5.0×10^3 per g (ml)
S. aureus	Absence in 1-g (ml)
Clostridium spp. and *Salmonella spp.*	Absence in 10-g (ml)

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ผลการตรวจสอบหาปริมาณความชื้น (Loss on Drying) ของวัตถุดิบ

ตารางที่ 4.1 แสดงปริมาณความชื้น (Loss on Drying) ของวัตถุดิบ

ตัวอย่างวัตถุดิบ	น้ำหนักวัตถุดิบ (กรัม)		ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)
	น้ำหนักก่อนอบ	น้ำหนักหลังอบ	
1. เกสรทั้ง 5	1.9980	1.7481	12.51
2. ดาลโตนด	2.1413	1.8465	13.77
3. เปลือกไข่เน่า	2.0819	1.8423	11.51
4. กระเพรา	2.1272	1.8064	15.08
5. เมล็ดสะแก	2.1199	1.8862	11.02
6. ตานขโมย	2.4431	2.1683	11.25
7. เล็บมือนาง	2.0888	1.8469	11.58
8. ข่า	2.1121	1.8134	14.14
9. พริกไทยดำ	2.3772	2.0847	12.30
10. รากชะพลู	2.1140	1.8782	11.15
11. ดอกคำฝอย	2.0751	1.8196	12.31
12. เทียนทั้ง 5	2.0677	1.8571	10.18
13. โกฐทั้ง 5	2.1913	1.7332	20.91
14. เจตมูลเพลิง	2.3633	1.9312	18.28
15. ดีปลี	2.483	1.7765	17.31
20. ดอกคำฝอย	2.0795	1.7938	13.74
21. น้ำตาลแดง	2.0470	1.9562	4.44
22. ดอกจันทร์	2.1845	1.9524	10.62
23. เกสรบัวหลวง	2.0801	1.8183	12.58
24. ดอกสารภี	2.1622	1.8443	14.70
25. ดอกมะลิ	2.1215	1.7845	15.88
26. ต้นเล็บมือนาง	1.9976	1.7500	12.39
27. กระเพราแดง	2.1923	1.9147	12.66

รายการที่ 1-14 จากผู้ผลิต ก รายการที่ 14-22 จากผู้ผลิต ข รายการที่ 23-27 จากผู้ผลิต ค

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ค่าร้อยละปริมาณความชื้น (Loss on Drying) ในวัตถุดิบ ที่กำหนดไว้ตามมาตรฐาน ของ USP 24 [3] คือต้องไม่เกินร้อยละ 5 แต่จากการตรวจสอบวัตถุดิบทั้ง 23 รายการ พบว่า ร้อยละ 95.65 ของวัตถุดิบจากทุกแหล่งผลิตไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด โดยมีค่าร้อยละปริมาณความชื้นตั้งแต่ 10.18 - 20.91 ยกเว้นเพียงน้ำตาลแดง เท่านั้นที่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด คือ มีค่าร้อยละปริมาณความชื้นเป็น 4.44 ดังแสดงในตารางที่ 4.1

4.2 ผลการตรวจสอบการปลอมปนของสเตียรอยด์ในยาน้ำแผนโบราณ

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการตรวจสอบการปลอมปนสารสเตียรอยด์ 2 ชนิด คือ เพรดนิโซโลนและเด็กซ่าเมทธาโซนในยาน้ำแผนโบราณ

ตัวอย่างที่	ค่า R_f		วิธีการตรวจสอบ		
	สภาวะกรด	สภาวะด่าง	การเรืองแสงภายใต้แสงเหนือม่วง	2 % vanillin ใน ethanol และ 50 % sulfuric acid ใน ethanol	20 % phosphoric acid ใน ethanol
1	0.33 , 0.55	0.33 , 0.55	+	-	-
2	0.31 , 0.54	0.31 , 0.53	+	-	-
3	0.34,0.55,0.72	0.29,0.53,0.72	+	-	-
4	0.32 , 0.21	0.32 , 0.68	+	-	-
5	0.54 , 0.55	0.55 , 0.56	+	-	-
6	0.80	0.79	+	-	-
สารมาตรฐานเพรดนิโซโลน	0.24		เรืองแสง	ดำ	ดำ
สารมาตรฐานเด็กซ่าเมทธาโซน	0.31		เรืองแสง	เหลือง	ม่วง

อัตราส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์ คือ ethyl acetate : cyclohexane เป็น 2 :1

\+ หมายถึง ให้ผลการตรวจสอบเช่นเดียวกับผลของสารมาตรฐาน

\- หมายถึง ให้ผลการตรวจสอบต่างจากผลของสารมาตรฐาน

ค่า R_f ของตัวอย่างที่ปรากฏในสภาวะกรดและด่าง พบว่า มีมากกว่า 1 ค่า เนื่องจากพบการเรืองแสงภายใต้แสงเหนือม่วง (ultra-violet light) มากกว่า 1 ตำแหน่ง

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

จากตารางที่ 4.2 แสดงผลการตรวจสอบหาสารเพรดนิโซโลนและเด็กซ่าเมทธาโซนในตัวอย่าง โดยใช้อัตราส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์เพียง 1 ระบบ คือ ethyl acetate :cyclohexane เป็น 2 :1 พบว่า ตัวอย่างทั้งหมด มีค่า R_f ต่างจากที่ตรวจพบในสารมาตรฐาน แต่สามารถเรืองแสงภายใต้แสงเหนือม่วงได้ และผลการตรวจสอบโดยการพ่นด้วย 20 % vanillin ใน ethanol กับ 50 % sulfuric acid ใน ethanol ซึ่งเป็นสารพ่นทั่วไป และ 20 % phosphalic acid ใน ethanol ซึ่งเป็นสารพ่นเฉพาะ พบว่าให้ผลต่างจากที่ตรวจพบในสารมาตรฐาน ดังนั้นสรุปได้ว่าตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบทั้งหมดตรวจไม่พบการปลอมปนของสารสเตียรอยด์ทั้ง 2 ชนิด ดังกล่าว

4.3 ผลการตรวจหาปริมาณเอทานอลและการตรวจหาคลอโรฟอร์ม

จากตารางที่ 4.3 ตรวจไม่พบเอทานอลในตัวอย่างที่ 2, 3, 5 และ 6 แต่พบในตัวอย่างที่ 1 และมีปริมาณไม่เกินร้อยละ10 ซึ่งอยู่ในช่วงที่ปลอดภัยสำหรับยาประเภทนี้ ทุกตำรับตรวจพบคลอโรฟอร์ม สารนี้เคยมีข้อบ่งใช้เป็นสารกันบูด ปัจจุบันถูกห้ามใช้เนื่องจากมีรายงานความเป็นพิษ แต่ยังมีผู้ผลิตบางรายใช้เก็บรักษาวัตถุดิบสมุนไพรเพื่อหวังผลในการป้องกันการเจริญของเชื้อรา การตรวจพบสารดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าผู้ผลิตยังขาดความรู้เรื่องการเกี่ยวกับการเก็บรักษาวัตถุดิบและการเลือกสารปรุงแต่งในตำรับยาให้เหมาะสม อีกทั้งไม่ได้ตระหนักถึงอันตรายของสารนี้หากผู้บริโภคได้รับในปริมาณที่มากเกินไป

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการตรวจหาปริมาณเอทานอลและการตรวจหาคลอโรฟอร์มในยาน้ำแผนโบราณ

ตัวอย่างที่	%v/v ethanol (SD) n=3	chloroform	
		+ ตรวจพบ	- ตรวจไม่พบ
1	6.901 (0.3094)	+	
2	0	+	
3	0	+	
4	3.485 (0.3097)	+	
5	0	+	
6	0	+	

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

4.4 ผลการตรวจสอบการหาปริมาณและชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในยาน้ำแผนโบราณ

ผลการทดลองตอนที่ 1 : ก่อนให้คำแนะนำแก่ผู้ผลิต

n. การตรวจสอบเกี่ยวกับฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของตัวอย่าง

ตารางที่ 4.4 แสดงจำนวนเชื้อที่เจริญในตัวอย่างเมื่อเจือจางด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PB) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน และในตัวอย่างเจือจางโดยมีเชื้อมาตรฐาน 4 ชนิด

ตัวอย่างที่	จำนวนเท่าที่เจือจางด้วย PB	จำนวนเชื้อ (CFU / ml) : mean (SD) , n = 3				
		ตัวอย่างเจือจาง	ตัวอย่างเจือจาง + S. aureus	ตัวอย่างเจือจาง + E.coli	ตัวอย่างเจือจาง + Ps. aeruginosa	ตัวอย่างเจือจาง + Salmonella typhi
1	10^{-1}	116(17.62)	>300	>300	>300	>300
	10^{-2}	11(2.08)	176(19.20)	113(8.08)	239(15.50)	104(2.31)
	10^{-3}	-	<30	<30	<30	<30
2	10^{-1}	68(13.65)	>300	>300	>300	>300
	10^{-2}	<30	82(14.42)	158(6.81)	>300	>300
	10^{-3}	<30	<30	<30	<30	<30
3	10^{-1}	37(1.53)	>300	>300	>300	>300
	10^{-2}	32(4.51)	80(22.91)	283(11.27)	285(14.57)	147(36.68)
	10^{-3}	-	<30	61(10.26)	<30	<30
4	10^{-1}	54(6.81)	>300	>300	>300	>300
	10^{-2}	<30	117(16.37)	133(16.29)	113(7.64)	117(8.54)
	10^{-3}	-	<30	<30	<30	<30
5	10^{-1}	39(4.93)	>300	>300	>300	>300
	10^{-2}	<30	>300	>300	>300	>300
	10^{-3}	<30	<30	36(4.72)	<30	123(15.18)
6	10^{-1}	61(10.54)	>300	>300	>300	>300
	10^{-2}	<30	49(11.02)	34(2.08)	>300	133(19.50)
	10^{-3}	-	<30	<30	154(14.42)	47(12.53)

- หมายถึง ตรวจไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อ

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ก่อนตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อของตัวอย่าง ได้ตรวจสอบความเหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อและความปราศจากเชื้อของอาหารเลี้ยงเชื้อ ตามวิธีในข้อ 1.1 และ 1.2 หน้า 22 และ 23 แล้ว อาหารเลี้ยงเชื้อผ่านการตรวจสอบ จากนั้นตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อของตัวอย่าง ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.4 จะเห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของตัวอย่างลดลงการเจริญเติบโตของเชื้อจะลดลง ซึ่งหากตัวอย่างมีผลในการยับยั้งเชื้อจริง ณ ที่ความเข้มข้นของตัวอย่างสูงเชื้อจะต้องไม่เจริญหรือเจริญได้น้อยกว่าที่ความเข้มข้นต่ำกว่า แต่จากผลการตรวจสอบ พบว่าที่ความเข้มข้นลดลงปริมาณเชื้อจะคงที่หรือลดลงตามไปด้วย ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าตัวอย่างดังกล่าวไม่พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

ข. การตรวจสอบหาปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด, ยีสต์/รา และ Enterobacteria

ตารางที่ 4.5 แสดงปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Viable Count) ยีสต์/รา และ Enterobacteria ในยาน้ำแผนโบราณ : ก่อนให้คำแนะนำแก่ผู้ผลิต

ตัวอย่างที่	Total Viable Count (CFU/ml) : mean (SD) , n = 3	ยีสต์/รา (CFU/ml) : mean (SD) , n = 3	Enterobacteria (CFU/ml) : mean (SD) , n = 3
1	2.83×10^6 (1.53)	343(1.53)	-
2	8.66×10^5 (3.05)	-	-
3	1.83×10^6 (2.08)	435(4.95)	-
4	1.25×10^6 (1.73)	-	2.5×10^6 (31.34)
5	6.00×10^6 (1.73)	-	-
6	-	-	-

สำหรับช่อง Viable count - หมายถึง มีการเจริญของเชื้อน้อยกว่า 15 โคโลนี
สำหรับช่องยีสต์/รา - หมายถึง มีการเจริญของเชื้อน้อยกว่า 30 โคโลนี
สำหรับช่อง Enterobacteria - หมายถึง ตรวจไม่พบการปนเปื้อน

Thai Pharmacopoeia 1996 [5] กำหนดมาตรฐานไว้ว่า ผลิตภัณฑ์ยาใช้ภายในที่มีสมุนไพรเป็นองค์ประกอบต้องมีปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดไม่เกิน 5×10^5 โคโลนี มีปริมาณยีสต์/รา และ Enterobacteria อย่างละไม่เกิน 5×10^3 โคโลนี ใน 1 กรัม หรือ 1 มิลลิลิตรของตัวอย่างผลิต

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ภัณฑ์ที่ใช้ตรวจสอบ ข้อมูลในตารางที่ 4.5 แสดงให้เห็นว่า มีเพียงตัวอย่างที่ 6 เท่านั้นพบว่ามีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน ทุกตัวอย่างมีปริมาณยีตส์/ราอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน และพบว่าตัวอย่างที่ 1, 2, 3, 5 และ 6 มี Enterobacteria อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน

ค. การตรวจสอบชนิดของจุลินทรีย์ปนเปื้อนและตรวจสอบเชื้อกำหนดห้าม

(1) การพิสูจน์จำแนกเชื้อ *S. aureus*

ตารางที่ 4.6 แสดงผลการพิสูจน์จำแนกเชื้อ *S. aureus* ในยาน้ำแผนโบราณ : ก่อนให้คำแนะนำแก่ผู้ผลิต

ตัวอย่างที่	การเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ		ผลการยืนยันโดย Coagulase Test
	MSA	VJA	
1	+	+	+
2	+	+	-
3	-	-	*
4	-	-	*
5	-	-	*
6	+	+	+
เชื้อมาตรฐาน	โคโลนีสีเหลือง ล้อมรอบด้วยโซนสีเหลือง	โคโลนีสีดำ ล้อมรอบด้วยโซนสีเหลือง	เกิดการจับกลุ่มของ rabbit plasma

\+ หมายถึง ผลที่เกิดมีลักษณะเช่นเดียวกับเชื้อมาตรฐาน

\- หมายถึง ผลที่เกิดขึ้นต่างจากเชื้อมาตรฐาน

* หมายถึง ไม่ได้นำมาทำการทดลองเนื่องจากไม่ได้ให้ผลบวกในขั้นตอนแรก

Thai Pharmacopoeia 1996 [5] กำหนดมาตรฐานว่า ผลิตภัณฑ์ยาใช้ภายในที่มีสมุนไพรเป็นองค์ประกอบต้องตรวจไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* ใน 1 กรัม หรือ 1 มิลลิลิตร ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ใช้ตรวจสอบ ผลการทดลองในตารางที่ 4.6 พบว่าตัวอย่างที่ 3,4 และ 5 ให้ผลลบกับอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ ส่วนตัวอย่างที่ 1, 2 และ 6 ให้ผลบวกกับอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ ได้แก่ MSA และ VJA จึงต้องนำมาตรวจสอบเพื่อยืนยันผลต่อไปดยใช้วิธี Coagulase Test

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

และย้อม Gram stain พบว่า ตัวอย่างที่ 1 และ 6 เท่านั้นที่ให้ผลบวกกับ Coagulase Test และย้อม Gram stain ติดสีม่วง เห็นรูปร่างลักษณะกลม ดังนั้นจึงสรุปว่า ตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อ *S. aureus* ในตัวอย่างที่ 1 และ 6

(2) การพิสูจน์จำแนกเชื้อ *E. coli*

ตารางที่ 4.7 แสดงผลการพิสูจน์จำแนกเชื้อ *E. coli* ในยาน้ำแผนโบราณ : ก่อนให้คำแนะนำแก่ผู้ผลิต

ตัวอย่างที่	การเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ		ผลการยืนยัน	
	MAC	EMB	TSI Agar Test	Indole Test
1	+	-	+	-
2	-	-	*	*
3	-	-	*	*
4	+	-	+	-
5	-	-	*	*
6	+	-	+	-
เชื้อมาตรฐาน	โคโลนีสีเหลือง ล้อมรอบด้วยโซนสีเหลือง	โคโลนีสีดำ ล้อมรอบด้วยโซนสีเหลือง	สีแดงของอาหารเป็นสีเหลือง,มีแก๊ส	ได้สีแดง

\+ หมายถึง ผลที่เกิดขึ้นมีลักษณะเช่นเดียวกับเชื้อมาตรฐาน

\- หมายถึง ผลที่เกิดขึ้นต่างจากเชื้อมาตรฐาน

* หมายถึง ไม่ได้นำมาทำการทดลองเนื่องจากไม่ได้ให้ผลบวกในขั้นตอนแรก

จากการตรวจสอบ พบว่าตัวอย่างที่ 1, 4 และ 6 มีการเจริญเติบโตของเชื้อใน MAC เกิดขึ้นในลักษณะเช่นเดียวกับเชื้อมาตรฐาน แสดงว่าให้ผลบวก ส่วนตัวอย่างที่ 2 , 3 และ 5 มีการเจริญเติบโตของเชื้อใน MAC ในลักษณะที่แตกต่างออกไปจากเชื้อมาตรฐาน แสดงว่าให้ผลลบ แต่เมื่อถ่ายเชื้อจาก MAC ลงใน EMB ผลปรากฏว่าไม่มีตัวอย่างใดเลยที่ให้ผลบวก และผลจากการย้อม Gram Stain ของเชื้อมาตรฐาน *E. coli* พบว่าติดสีแดงและมีลักษณะรูปแท่ง ซึ่งตัวอย่างที่ 1 , 4 และ 6 ไม่ได้ให้ผลการย้อม Gram Stain เช่นเดียวกับเชื้อมาตรฐาน *E. coli* แต่ทั้งนี้ทั้งนั้นเรายังไม่สามารถสรุปแน่นอนได้ว่าตัวอย่างที่ 1 , 2 , 3 , 4 , 5 และ 6 ไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ดังนั้น

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

จึงต้องมีการยืนยันผลด้วย TSI Agar Test และ Indole Test ต่อไปดังแสดงในตารางที่ 4.7 ตัวอย่างที่ 1, 4 และ 6 ให้ผลบวกกับ TSI Agar Test แต่เนื่องจาก TSI Agar Test ให้ผลบวกต่อหลายๆเชื้อ เช่น *Salmonella* spp. เป็นต้น ดังนั้นต้องใช้ Indole Test ซึ่งมีความเฉพาะเจาะจงต่อเชื้อ *E. coli* มากกว่าเชื้ออื่นๆ ประกอบด้วย ตัวอย่างที่ 1, 4 และ 6 ให้ผลลบกับ Indole Test อีกทั้งเมื่อย้อม Gram stainให้ผลเป็นสีแดง รูปร่างกลม ซึ่งต่างจากเชื้อมาตรฐานซึ่งให้สีแดง รูปแท่ง จึงสรุปได้ว่าในการตรวจพิสูจน์แยกเชื้อ *E. coli* นั้น ไม่พบว่ามีตัวอย่างใดที่มีการปนเปื้อนของเชื้อดังกล่าว

(3) การพิสูจน์แยกเชื้อ *Samonella* spp.

ตารางที่ 4.8 แสดงผลการพิสูจน์จำแนกเชื้อ *Salmonella* spp. ในยาน้ำแผนโบราณ : ก่อนให้คำแนะนำแก่ผู้ผลิต

ตัวอย่างที่	การเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ			ผลการยืนยัน
	BPLS	XLD	BSA	TSI Agar Test
1	+	+	+	+
2	-	-	-	*
3	-	-	-	*
4	+	+	+	+
5	+	-	+	+
6	-	-	-	*
เชื้อมาตรฐาน	ใส ไม่มีสีจนถึงเหลืองส้ม ล้อมรอบด้วยสีส้ม	สีชมพู ล้อมรอบด้วยสีชมพูบานเย็น	สีน้ำตาลเข้มออกดำ หรือสีเขียวเข้ม	Butt acid(เหลือง) , slant alkaline (แดง) อาจมี H_2S ด้วยหรือไม่ก็ได้

\+ หมายถึง ผลที่เกิดขึ้นมีลักษณะเช่นเดียวกับเชื้อมาตรฐาน

\- หมายถึง ผลที่เกิดขึ้นต่างจากเชื้อมาตรฐาน

* หมายถึง ไม่ได้นำมาทำการทดลองเนื่องจากไม่ได้ให้ผลบวกในขั้นตอนแรก

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

จากการตรวจสอบ พบว่า ตัวอย่างที่ 1 และ 4 ให้ผลการตรวจสอบที่น่าเชื่อถือที่สุด เนื่องจากมีการเจริญของเชื้อเกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะทั้ง 3 ชนิด ซึ่งได้แก่ BPLS, XLD และ BSA โดยมีลักษณะการเจริญของเชื้อเช่นเดียวกับเชื้อมาตรฐาน ดังนั้นจึงน่าจะมีเชื้อ *Salmonella* ปนเปื้อนอยู่ในผลิตภัณฑ์ แต่ต้องยืนยันผลการตรวจสอบต่อด้วย TSI Agar Test สำหรับตัวอย่างที่ 2, 3 และ 6 ตรวจไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ จึงสรุปได้ว่าตัวอย่างดังกล่าวตรวจไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ส่วนตัวอย่างที่ 5 มีการเจริญของเชื้อเช่นเดียวกับเชื้อมาตรฐานเฉพาะในอาหาร BGA และ BSA เท่านั้น จึงต้องทำการยืนยันผลต่อด้วย TSI Agar เพื่อดูผลให้ชัดเจนต่อไป ผลการตรวจสอบเป็นดังตารางที่ 4.8 ทุกตัวอย่างให้ผลการยืนยันเช่นเดียวกับเชื้อมาตรฐาน แต่เนื่องจากว่า TSI Agar Test ให้ผลบวกต่อหลายๆเชื้อ เช่น *E. coli* ด้วย อีกทั้งจากผลการย้อม Gram stain พบว่าตัวอย่างที่ 1 , 4 และ 5 ให้ผลต่างจากเชื้อมาตรฐาน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าทุกตัวอย่างตรวจไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp.

(4) การพิสูจน์จำแนกเชื้อ *Clostridium* spp.

ผลการตรวจสอบแสดงในตารางที่ 4.9 พบว่า ตัวอย่าง ที่ 2 (B) , 3 (A,B) , 4 (B) และ 6 (B) เท่านั้นที่พบการเจริญเติบโตของเชื้อในลักษณะที่เป็นโคโลนีสีขาวใส แต่พบการเจริญในปริมาณที่น้อยมาก จากผลดังกล่าวยังไม่อาจสรุปได้ว่าตัวอย่างนั้นจะมีการปนเปื้อนจริง ต้องทำการตรวจสอบขั้นต่อไป ภายหลังจากการถ่ายเชื้อจาก Columbia Agar + Gentamicin มาลง Columbia Agar – Gentamicin พบว่า ตัวอย่างที่ถ่ายเชื้อมามีการเจริญเติบโตของเชื้อได้ ดังนั้นจึงต้องมาทำการตรวจสอบด้วยวิธี Catalase Test เพื่อดูผลการเกิดปฏิกิริยากับ 5% H_2O_2 ว่ามีฟองก๊าซเกิดขึ้นหรือไม่ ถ้าไม่มีฟองก๊าซแสดงว่าตรวจพบการเจริญเติบโตของเชื้อ*Clostridium sporogenes* มีเพียงตัวอย่างที่ 3 เท่านั้นที่ตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อ *Clostridium* spp.

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ตารางที่ 4.9 แสดงผลการพิสูจน์จำแนกเชื้อ *Clostridium* spp. ในยาน้ำแผนโบราณ : ก่อนให้คำแนะนำแก่ผู้ผลิต

ตัวอย่างที่	การเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ			
	Columbia Agar + gentamicin		การยืนยันผลโดย Catalase Test กับเชื้อที่เจริญในอาหาร Columbia Agar- gentamicin	
	A	B	A	B
1	-	-	*	*
2	-	+	*	√
3	+	+	x	√
4	-	+	*	√
5	-	-	*	*
6	-	+	*	√

\+ หมายถึง ตรวจพบการเจริญเติบโตของเชื้อ

\- หมายถึง ตรวจไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อ

* หมายถึง ไม่ได้นำมาทำการตรวจสอบด้วยเนื่องจากไม่มีเชื้อมาตรฐาน

x หมายถึง ไม่พบการเปลี่ยนแปลงเมื่อตรวจสอบกับ 5 %H_2O_2

√ หมายถึง เกิดปฏิกิริยากับการตรวจสอบกับ 5 %H_2O_2 คือ มีฟองก๊าซเกิดขึ้น

A หมายถึง เป็นการตรวจสอบหาเชื้อ *Clostridium* spp.

B หมายถึง เป็นการตรวจสอบหาเชื้อ *Bacillus* spp.

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ผลการทดลองตอนที่ 2 : หลังให้คำแนะนำแก่ผู้ผลิต

ก. การตรวจสอบเกี่ยวกับฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของตัวอย่าง

ตารางที่ 4.10 แสดงจำนวนเชื้อที่เจริญนับได้ในตัวอย่างเมื่อเจือจางด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PB) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน และในตัวอย่างเจือจางโดยมีเชื้อมาตรฐาน 4 ชนิด

ตัวอย่างที่	จำนวนเท่าที่เจือจางด้วย PB	จำนวนเชื้อ (CFU / ml) : mean (SD) , n = 3				
		ตัวอย่างเจือจาง	ตัวอย่างเจือจาง + *S. aureus*	ตัวอย่างเจือจาง + *E.coli*	ตัวอย่างเจือจาง + *Ps. aeruginosa*	ตัวอย่างเจือจาง + *Salmonella typhi*
1	10^{-1}	>300	>300	>300	>300	>300
	10^{-2}	>300	>300	>300	>300	>300
	10^{-3}	>300	<300	<300	<300	<300
2	10^{-1}	>300	>300	>300	>300	>300
	10^{-2}	>300	>300	>300	>300	>300
	10^{-3}	>300	>300	>300	>300	>300
3	10^{-1}	>300	>300	>300	>300	>300
	10^{-2}	>300	>300	>300	>300	>300
	10^{-3}	>300	>300	>300	>300	>300
4	10^{-1}	>300	>300	>300	>300	>300
	10^{-2}	>300	>300	>300	>300	>300
	10^{-3}	>300	>300	>300	>300	>300
5	10^{-1}	>300	>300	>300	>300	>300
	10^{-2}	>300	>300	>300	>300	>300
	10^{-3}	>300	>300	>300	>300	>300
6	10^{-1}	>300	>300	>300	>300	>300
	10^{-2}	>300	>300	>300	>300	>300
	10^{-3}	-	<30	<30	154(14.42)	47(12.53)

การตรวจสอบส่วนนี้ทำตามขั้นตอนเช่นเดียวกับการทดลองตอนที่ 1 : ก่อนให้คำแนะนำแก่ผู้ผลิต ที่กล่าวไว้ในหน้า 41 จากตารางที่ 4.10 จะเห็นว่าเชื้อเจริญเติบโตได้ดีมากในทุกความเข้มข้นที่เจือจางลง แสดงว่าตัวอย่างดังกล่าวไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ข. การตรวจสอบหาปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด , ยีสต์/รา และ Enterobacteria

ตารางที่ 4.11 แสดงปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Viable Count) ยีสต์/รา และ Enterobacteria ในยาน้ำแผนโบราณ : หลังให้คำแนะนำแก่ผู้ผลิต

ตัวอย่างที่	Total Viable Count (CFU/ml) : mean (SD) , n = 3	ยีสต์และรา (CFU/ml) : mean (SD) , n = 3	Enterobacteria (CFU/ml) : mean (SD) , n = 3
1	-	-	-
2	-	>300	-
3	-	>300	-
4	-	1.18×10^2 (17.56)	-
5	-	>300	-
6	-	-	-

หมายเหตุ : สำหรับช่อง Viable count - หมายถึง มีการเจริญของเชื้อน้อยกว่า 15 โคโลนี
สำหรับช่องยีสต์และรา - หมายถึง มีการเจริญของเชื้อน้อยกว่า 30 โคโลนี
สำหรับช่อง Enterobacteria - หมายถึง ตรวจไม่พบการปนเปื้อน

ข้อมูลในตารางที่4.11แสดงให้เห็นว่าทุกตัวอย่างมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและ Enterobacteria อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน ยกเว้นตัวอย่างที่ 2, 3 และ 5 ที่พบว่ามีปริมาณยีสต์/ราเกินมาตรฐาน คือมากกว่า $5X10^3$ โคโลนี ใน 1 กรัมหรือ 1 มิลลิลิตรของตัวอย่าง

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ค. การตรวจสอบชนิดของจุลินทรีย์ปนเปื้อนและตรวจสอบเชื้อกำหนดห้าม

(1) การพิสูจน์จำแนกเชื้อ *S. aureus*

ตารางที่ 4.12 แสดงผลการพิสูจน์จำแนกเชื้อ *S. aureus* ในยาน้ำแผนโบราณ : หลังให้คำแนะนำแก่ผู้ผลิต

ตัวอย่างที่	การเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ		ผลการยืนยันโดย Coagulase Test
	MSA	VJA	
1	-	-	*
2	-	-	*
3	-	-	*
4	-	-	*
5	-	-	*
6	-	-	*
เชื้อมาตรฐาน	โคโลนีสีเหลือง ล้อมรอบด้วยโซนสีเหลือง	โคโลนีสีดำ ล้อมรอบด้วยโซนสีเหลือง	เกิดการจับกลุ่มของ rabbit plasma

\+ หมายถึง ผลที่เกิดขึ้นเกิดในลักษณะเช่นเดียวกับเชื้อมาตรฐาน

\- หมายถึง ผลที่เกิดขึ้นต่างจากเชื้อมาตรฐานหรือไม่มีเชื้อขึ้น

* หมายถึง ไม่ได้นำมาทำการทดลองเนื่องจากไม่ได้ให้ผลบวกในขั้นตอนแรก

จากผลการตรวจสอบในตารางที่ 4.12 พบว่าไม่มีตัวอย่างใดให้ลักษณะโคโลนีเช่นเดียวกับเชื้อมาตรฐาน ทั้ง MSA และ VJA ดังนั้นจึงไม่ต้องตรวจสอบต่อด้วย Coagulase Test และสรุปได้ว่าตรวจไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อดังกล่าว

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

(2) การพิสูจน์จำแนกเชื้อ *E. coli*

ตารางที่ 4.13 แสดงผลการพิสูจน์จำแนกเชื้อ *E. coli* ในยาน้ำแผนโบราณ : หลังให้คำแนะนำแก่ผู้ผลิต

ตัวอย่างที่	การเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ		ผลการยืนยัน	
	MAC	EMB	TSI Agar Test	Indole Test
1	-	-	*	*
2	-	-	*	*
3	-	-	*	*
4	-	-	*	*
5	-	-	*	*
6	-	-	*	*
เชื้อมาตรฐาน	โคโลนีสีเหลือง ล้อมรอบด้วยโซนสีเหลือง	โคโลนีสีดำ ล้อมรอบด้วยโซนสีเหลือง	สีแดงของอาหารเป็นสีเหลือง,มีแก๊ส	ได้สีแดง

\+ หมายถึง ผลที่เกิดขึ้นเกิดในลักษณะเช่นเดียวกับเชื้อมาตรฐาน

\- หมายถึง ผลที่เกิดขึ้นต่างจากเชื้อมาตรฐานหรือไม่มีเชื้อขึ้น

* หมายถึง ไม่ได้นำมาทำการทดลองเนื่องจากไม่ได้ให้ผลบวกในขั้นตอนแรก

จากการตรวจสอบ พบว่าไม่มีตัวอย่างใดให้ผลบวกกับอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะทั้ง 2 ชนิด คือ MAC และ EMB ดังนั้นจึงไม่ต้องตรวจสอบต่อด้วย TSI Agar Test และ Indole Test สรุปได้ว่าในการตรวจพิสูจน์แยกเชื้อ *E. coli* นั้น ไม่พบว่ามีตัวอย่างใดที่มีการปนเปื้อนของเชื้อดังกล่าว

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

(3) การพิสูจน์แยกเชื้อ *Samonella* spp.

ตารางที่ 4.14 แสดงผลการพิสูจน์จำแนกเชื้อ *Salmonella* spp. ในยาน้ำแผนโบราณ : หลังให้คำแนะนำแก่ผู้ผลิต

ตัวอย่างที่	การเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ			ผลการยืนยัน
	BPLS	XLD	BSA	TSI Agar Test
1	-	-	-	•
2	-	-	-	•
3	-	-	+	-
4	-	-	-	•
5	-	-	-	•
6	-	-	-	•
เชื้อมาตรฐาน	ใส ไม่มีสีจนถึงเหลืองส้ม ล้อมรอบด้วยสีส้ม	สีชมพู ล้อมรอบด้วยสีชมพูบานเย็น	สีน้ำตาลเข้มออกดำหรือสีเขียวเข้ม	Butt acid(เหลือง) , slant alkaline (แดง) อาจมี H_2S ด้วยหรือไม่ก็ได้

\+ หมายถึง ผลที่เกิดขึ้นเกิดในลักษณะเช่นเดียวกับเชื้อมาตรฐาน

\- หมายถึง ผลที่เกิดขึ้นต่างจากเชื้อมาตรฐานหรือไม่มีเชื้อขึ้น

• หมายถึง ไม่ได้นำมาทำการทดลองเนื่องจากไม่ได้ให้ผลบวกในขั้นตอนแรก

จากการตรวจสอบ ทุกตัวอย่างไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อใน BPLS, XLD และ BSA จึงไม่ต้องยืนยันผลต่อด้วย TSI Agar Test ยกเว้นตัวอย่างที่ 3 ที่เกิดโคโลนีคล้ายเชื้อมาตรฐานใน BSA แต่เมื่อทดสอบด้วย TSI Agar Test แล้วให้ผลลบ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าตรวจไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp.

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

(4) การพิสูจน์จำแนกเชื้อ *Clostridium* spp.

ตารางที่ 4.15 แสดงผลการพิสูจน์จำแนกเชื้อ *Clostridium* spp.ในยาน้ำแผนโบราณ : หลังให้คำแนะนำแก่ผู้ผลิต

ตัวอย่างที่	การเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ			
	Columbia Agar + gentamicin		การยืนยันผลโดย Catalase Test กับเชื้อที่เจริญในอาหาร Columbia Agar- gentamicin	
	A	B	A	B
1	-	-	*	*
2	-	-	*	*
3	-	-	*	*
4	-	-	*	*
5	-	-	*	*
6	-	-	*	*

\+ หมายถึง ตรวจพบการเจริญเติบโตของเชื้อ

\- หมายถึง ตรวจไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อ

* หมายถึง ไม่ได้นำมาทำการตรวจสอบด้วยเนื่องจากไม่มีเชื้อมาตรฐาน

x หมายถึง ไม่พบการเปลี่ยนแปลงเมื่อตรวจสอบกับ 5 %H_2O_2

√ หมายถึง เกิดปฏิกิริยากับการตรวจสอบกับ 5 %H_2O_2 คือ มีฟองก๊าซเกิดขึ้น

A หมายถึง เป็นการตรวจสอบหาเชื้อ *Clostridium* spp

B หมายถึง เป็นการตรวจสอบหาเชื้อ *Bacillus* spp.

จากการตรวจสอบ พบว่าทุกตัวอย่างไม่มีการเจริญของเชื้อใน Columbia Agar + gentamicin ทั้งแบบที่ตรวจหา *Clostridium* spp (A) และ *Bacillus* spp (B) ดังนั้นจึงไม่ต้องมีการยืนยันผลด้วยวิธี Catalase Test และสรุปได้ว่าตรวจไม่พบเชื้อดังกล่าว

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ตารางที่ 4.16 แสดงสรุปผลการตรวจสอบทางจุลินทรีย์ในยาน้ำแผนโบราณก่อนและหลังให้คำแนะนำแก่ผู้ผลิต

ตัวอย่างที่	การตรวจสอบหาปริมาณเชื้อ						*S.aureus*		*E. coli*		*Salmonella* spp.		*Clostidium* spp.		ผลสรุปรวม	
	เชื้อทั้งหมด		ยีสต์/รา		Entero-bacteria											
	ก่อน	หลัง	ก่อน	หลัง	ก่อน	หลัง	ก่อน	หลัง	ก่อน	หลัง	ก่อน	หลัง	ก่อน	หลัง	ก่อน	หลัง
1	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	F	P
2	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	F
3	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	F	F
4	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	P
5	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	F
6	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	F	P

\+ หมายถึง มีปริมาณเชื้อทั้งหมด , ยีสต์และรา, Enterobacteria ไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานหรือตรวจพบเชื้อกำหนดห้าม

\- หมายถึง มีปริมาณเชื้อทั้งหมด , ยีสต์และรา, Enterobacteria ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน หรือตรวจไม่พบเชื้อกำหนดห้าม

P หมายถึง ผ่านเกณฑ์การตรวจสอบทางจุลินทรีย์ทุกรายการ

F หมายถึง ไม่ผ่านเกณฑ์การตรวจสอบทางจุลินทรีย์ทุกรายการ

Thai Pharmacopoeia 1996 [5] กำหนดมาตรฐานทางจุลินทรีย์ไว้ว่าผลิตภัณฑ์ยาใช้ภายในที่มีสมุนไพรเป็นองค์ประกอบต้องมีปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดไม่เกิน $5x10^5$ โคโลนี มีปริมาณยีตส์หรือราและ Enterobacteria อย่างละไม่เกิน $5x10^3$ โคโลนี ใน 1 กรัม หรือ 1 มิลลิลิตรของตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ใช้ตรวจสอบและต้องไม่พบเชื้อกำหนดห้าม คือ *S.aureus*, *E.coli*, *Salmonella* spp. และ *Clostridium* spp.

สรุปข้อมูลการตรวจสอบทางจุลินทรีย์แสดงไว้ในตารางที่ 4.16 ซึ่งจะเห็นว่าก่อนที่ผู้ผลิตจะได้รับทราบผลการตรวจสอบและได้รับคำแนะนำเกี่ยวกับการผลิต ไม่มีตัวอย่างใดเลยผ่านเกณฑ์มาตรฐานทางจุลินทรีย์ โดยพบว่าทุกตัวอย่างมีปริมาณยีตส์และราอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน แต่ตัวอย่างที่ 1 ถึง 5 มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดเกินเกณฑ์มาตรฐาน และพบว่าตัวอย่างที่ 4 มี Enterobacteria เกินเกณฑ์มาตรฐาน ทั้งยังตรวจพบเชื้อกำหนดห้าม 2 ชนิด คือ *S. aureus* (ตัวอย่างที่ 1 และ 6) และ *Clostridium* spp. (ตัวอย่างที่ 3) เมื่อผู้ผลิตได้รับทราบผลการตรวจสอบ

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

และมีการให้คำแนะนำเกี่ยวกับการผลิตแล้วเก็บตัวอย่างมาตรวจสอบอีก พบว่ายาน้ำ 3 ตำรับผ่านมาตรฐานทางจุลินทรีย์ (ตัวอย่างที่ 1, 4 และ 6) โดยยาน้ำทุกตัวอย่างมีปริมาณเชื้อปนเปื้อนทั้งหมดอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน ยาน้ำ 3 ตำรับ (ตัวอย่างที่ 2, 3 และ 5) มีปริมาณยีสต์และราเกินมาตรฐาน ตรวจไม่พบเชื้อกำหนดห้ามในทุกตัวอย่าง

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย

การตรวจสอบคุณภาพของวัตถุดิบในการผลิตยาน้ำแผนโบราณสำหรับเด็กและสตรีที่ผลิตในจังหวัดอุบลราชธานี โดยการหาร้อยละของปริมาณความชื้น (Loss on Drying) พบว่าวัตถุดิบร้อยละ 95.65 มีปริมาณความชื้นเกินมาตรฐานที่กำหนด การวัดปริมาณความชื้นของวัตถุดิบเป็นการตรวจสอบเบื้องต้นที่บอกถึงความเสี่ยงที่จะมีเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ที่ไม่ได้ถูกนำไปผ่านกระบวนการทำลายเชื้อหรือทำให้ปราศจากเชื้ออีก ผลที่ได้สอดคล้องกับผลการตรวจสอบทางจุลินทรีย์ของยาน้ำแผนโบราณ ซึ่งพบว่าไม่มียาน้ำตัวอย่างใดผ่านเกณฑ์มาตรฐานทางจุลินทรีย์ในการตรวจสอบครั้งที่ 1 เมื่อผู้ผลิตทราบข้อมูลและได้รับคำแนะนำให้ปรับปรุงเกี่ยวกับการผลิตแล้วตรวจซ้ำ พบว่ายาน้ำแผนโบราณสำหรับเด็กและสตรี 3 ตำรับจาก 6 ตำรับผ่านมาตรฐานทางจุลินทรีย์

ตัวอย่างยาน้ำที่ศึกษาทั้งหมดไม่มีปัญหาเรื่องการปลอมปนของสเตียรอยด์ทั้งเพรดนิโซโลนและเด็กซ่าเมทธาโซนรวมทั้งปริมาณอัลกอฮอล์ที่ใช้ แต่พบการปนเปื้อนของคลอโรฟอร์มทุกตัวอย่าง

โดยสรุปปัญหาสำคัญเรื่องคุณภาพของยาน้ำแผนโบราณสำหรับเด็กและสตรีที่พบ ได้แก่ การปนเปื้อนของจุลินทรีย์และคลอโรฟอร์ม จึงควรมีการให้ความรู้แก่ผู้ผลิตในส่วนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตด้านต่างๆ ได้แก่ การเก็บวัตถุดิบ การเตรียมวัสดุอุปกรณ์ สถานที่ผลิตและขั้นตอนการผลิตที่ถูกสุขลักษณะ หลักเกณฑ์และวิธีการผลิตที่ดีของยาแผนโบราณ ตลอดจนให้คำแนะนำเรื่องการเลือกใช้สารปรุงแต่งหรือสารเคมีในกระบวนการผลิตที่เหมาะสม ควบคู่ไปกับการกำหนดมาตรฐานและการควบคุมตรวจสอบคุณภาพของยาน้ำแผนโบราณอย่างเป็นระบบ เพื่อให้ได้ยาน้ำแผนโบราณที่มีคุณภาพได้มาตรฐานและปลอดภัยต่อผู้บริโภค

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

เอกสารอ้างอิง

1. จันทนา เวสพันธ์. **เอกสารประกอบการสอนวิชาชีวเภสัชศาสตร์** 5. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร.
2. สมพงษ์ กิตติพงษ์หรรษา. 2541. **การควบคุมวัตถุดิบทางยา**. กองวิเคราะห์ยา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข กรุงเทพฯ.
3. The United States Pharmacopoeial Convention, Inc. The United States Pharmacopoeia 24 (NF XVIIII) 1999. Easton. 1954-1955.
4. นิดาพันธุ์ เรืองฤทธิ์นนท์. 2541. Loss on Drying. กองวิเคราะห์ยา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข กรุงเทพฯ.
5. Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. 1996. Thai Pharmacopeia. Nonthaburi. 399, 1573, 1574.
6. Her Majesty's stationary Office. 1993. The British Pharmacopoeia. London. Appendix XVI A189.
7. นิดาพรรณ เรืองฤทธิ์นนท์. Thin Layer Chromatography. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข กรุงเทพฯ.
8. จินดาพร ภูริพัฒนาวงษ์. 2538. **การตรวจสอบสารสเตียรอยด์ในยาแผนโบราณ**. วารสารสงขลานครินทร์. 2 (17) : 188-193.
9. ธานี โชคเจริญรัตน์. 2541. Alcohol Determination in Oral Traditional Liquid Extracts by Gas Chlomatography. กองวิเคราะห์ยา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข กรุงเทพฯ.
10. อนุสรณ์ ตั้งปณิธานนันท์. 2543. Identification of Chloroform in Herbal Liquid Medicines by Automatic Gas Chromatograph and Headspace. ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์อุบลราชธานี.
11. อรุณณี จันทกิจ. 2541. **การตรวจหาปริมาณและชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนในยา**. กองวิเคราะห์ยา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข กรุงเทพฯ.

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ภาคผนวก

วิธีการเตรียม Sterile Normal Saline Solution

ละลาย sodium chloride 9 g ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรจนครบ 1000 ml ใน volumetric flask แล้วนำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที

วิธีการเตรียม Sterile Phosphate Buffer Solution

Stock solution : ละลาย monobasic potassium phosphate 34 g ในน้ำกลั่น 500 ml ใน volumetric flask ขนาด 1000 ml จากนั้นทำการปรับ pH ให้ได้ 7.2 (โดยใช้ sodium hydroxide TS ประมาณ 175 ml) แล้วจึงปรับปริมาตรจนครบ 1000 ml ด้วยน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที ถ้ายังไม่ใช้ในทันทีให้เก็บรักษาไว้ในที่ที่อุณหภูมิต่ำ 8-15 °C

การเตรียม sodium hydroxide TS : ละลาย sodium hydroxide 4 g ในน้ำกลั่น 100 ml

Working solution : เจือจาง Stock solution ในอัตราส่วน 1 : 800 ก่อนการนำไปใช้ทุกครั้ง ให้นำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที

วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

TSB (Triptic Soy Broth หรือ Fluid Soybean-Casein Digest Medium) ทำได้โดยชั่งผง Triptic soy broth 30 g ละลายน้ำกลั่น 1000 ml อุ่นและคนตลอดเวลาจนผง Triptic soy broth ละลายหมด แล้วนำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที

LTB (Fluid Lactose Medium) ทำได้โดยชั่งผง Lactose 13 g ละลายน้ำกลั่น 1000 ml อุ่นและคนตลอดเวลาจนละลายหมด แล้วนำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

EEB (Fluid Enterobacteria Enrichment Medium หรือ Mossel Broth Medium) ทำโดยชั่งผง Mossel Broth 45 g ละลายน้ำกลั่น 1000 ml อุ่นและคนตลอดเวลาจนละลายหมด แล้วนำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 5 นาที

SCB (Fluid Selenite Cystine Medium) ทำได้โดยชั่งผง Selenite Cystine 23 g ละลายในน้ำกลั่น 1000 ml ถ้าจำเป็นให้ใช้ความร้อนได้ในช่วงระยะเวลาสั้น ๆ (อุณหภูมิสูงสุด 60 °C) ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองแล้วเก็บไว้ในภาชนะปิดสนิท (ห้ามอบนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave)

TTB (Fluid tetrathionate Medium) ทำได้โดยการชั่งผง tetrathionate 46 g ละลายในน้ำกลั่น 1000 ml (ห้ามอบนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave) ก่อนจะนำมาใช้ให้เติม 20 ml/L ของ Iodine potassium iodide solution (เตรียมได้โดยละลาย 6 g ของ iodine และ 5 g ของ potassium iodine ในน้ำกลั่น 20 ml) ถ้าเป็นไปได้ให้เติม 10 ml/L ของ 0.1% briliant green solution และถ้าจำเป็นให้เติม 0.04 g/L ของ Novobiocin

2. อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง

TSA (Triptic Soy Agar หรือ Soybean-Casein Digest Agar Medium) ทำได้โดยชั่งผง Triptic soy broth 30 g และ ผง agar 15 g ละลายในน้ำกลั่น 1000 ml อุ่นและคนตลอดเวลาจนผง Triptic soy broth และผง agar ละลายหมด นำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที

TSI (Triple Sugar-Iron-Agar Medium) ทำได้โดยการชั่งผง Triple Sugar-Iron-Agar 65 g ละลายน้ำกลั่น 1000 ml อุ่นและคนตลอดเวลาจนผง Triple Sugar-Iron-Agar ละลายหมด แล้วนำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที

SAD (Sabouraud Dextrose Agar Medium หรือใช้ Potato Dextrose Agar Medium) ทำได้โดยชั่งผง Potato agar 39 g ละลายน้ำกลั่น 1000 ml อุ่นและคนตลอดเวลาจนผง Potato agar ละลายหมด แล้วนำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นปรับ pH ให้ได้ 3.5 แล้วเติม 1.6 ml ของ sterile 1:10 tartaric acid USP ต่ออาหาร 100 ml (หลังจากเติมสารแล้ว ห้ามถูกความร้อน)

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

VRBD (Crystal Violet-Neutral Red-Bile-Dextrose Agar Medium) ทำได้โดยชั่งผง Crystal Violet-Neutral Red-Bile-Dextrose Agar 39.5 g ละลายน้ำกลั่น 1000 ml อุ่นและคนตลอดเวลาจนละลายหมด จากนั้นอุ่นต่อไปอีกไม่เกิน 2 นาที (ห้ามอบนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave และห้ามถูกความร้อนสูงเกินไป)

MSA (Mannitol Salt Phenol-Red Agar Medium) ทำได้โดยการชั่งผง Mannitol salt phenol-red agar 108 g ละลายน้ำกลั่น 1000 ml อุ่นและคนตลอดเวลาจนผง Mannitol salt agar ละลายหมด แล้วนำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที

VJA (Vogel-Johnson Agar Medium) ทำได้โดยการชั่งผง Vogel-Johnson agar 60 g ละลายน้ำกลั่น 1000 ml อุ่นและคนตลอดเวลาจนละลายหมด แล้วนำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที (เติม 20 ml.ของ Bacto chapman Tellurite Solution 1 % ลงในอาหารที่อุณหภูมิ 45-50 °C ผสมให้เข้ากัน)

MAC (Mac Conkey Agar Medium) ทำได้โดยการชั่งผง Mac Conkey agar 50 g ละลายน้ำกลั่น 1000 ml อุ่นและคนตลอดเวลาจนละลายหมด แล้วนำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที

EMB (Levine Eosine-Methylene Blue Agar Medium) ทำได้โดยการชั่งผง Levine Eosine-Methylene Blue Agar 36 g ละลายน้ำกลั่น 1000 ml อุ่นและคนตลอดเวลาจนละลายหมด แล้วนำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที

BPLS (Brilliant-green Phenol-Red Lactose Sucrose Agar Medium) ทำได้โดยการชั่งผง Brilliant-green Phenol-Red Lactose Sucrose Agar 51 g ละลายน้ำกลั่น 1000 ml อุ่นและคนตลอดเวลาจนละลายหมด แล้วนำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

XLD (Xylose-Lysine-Desoxycholate Agar Medium) ทำได้โดยการชั่งผง Xylose-Lysine-Desoxycholate Agar 55 g ละลายน้ำกลั่น 1000 ml อุ่นและคนตลอดเวลาจนละลายหมด (ห้ามอบนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave) อาจพบว่ามีตะกอนเกิดขึ้น แต่ไม่มีผลต่อการนำไปใช้

BSA (Bismuth Sulfite Agar Medium) ทำได้โดยการชั่งผง Bismuth Sulfite Agar 47.5 g ละลายน้ำกลั่น 1000 ml ให้ความร้อนเพื่อช่วยให้ละลาย (ห้ามอบนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave) กระจายผงตะกอนอาหารให้เข้ากัน จากนั้นเทลง plate โดยเทให้อาหารมีความหนาที่เหมาะสม

Columbia Agar ทำได้โดยการชั่งผง Columbia Agar 42 g ละลายน้ำกลั่น 1000 ml นและคนตลอดเวลาจนละลายหมด แล้วนำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที (ในกรณีที่ต้องการเติมสารอื่น ๆ ให้ทิ้งไว้จนได้อุณหภูมิประมาณ 50-45 °C) จากนั้นเติม Gentamicin Solution ลงไป แล้วผสมให้เข้ากัน

วิธีการเตรียม Gentamicin Solution ความแรง 8.3 % / 0.11 ml : ใช้ Gentamicin sulfate inj. ที่มีความแรง 80 mg/2 ml ดูดมา 0.3 ml ผสมลงใน Columbia Agar

RMC (Reinforced medium for clostridia) ทำได้โดยการชั่งผง Reinforced medium for clostridia 38 g ละลายน้ำกลั่น 1000 ml อุ่นและคนตลอดเวลาจนละลายหมด แล้วนำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที

Ubon Rajathanee University