

การตรวจวิเคราะห์ *Clostridium perfringens* ในสมุนไพรมตามห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ใช้วิธีแบบดั้งเดิม ซึ่งต้องใช้ระยะเวลาไม่น้อยกว่า 7 วัน อีกทั้งมีค่าใช้จ่ายสูง และมักให้ผลที่ผิดพลาด ส่งผลให้ไม่สามารถแก้ปัญหาของผู้ผลิตผลิตภัณฑ์สมุนไพรได้ทันที่ และยังทำให้ผู้บริโภคขาดความมั่นใจในความปลอดภัยต่อผลิตภัณฑ์สมุนไพรนั้น ด้วยสาเหตุดังกล่าวจึงพัฒนาวิธีการที่รวดเร็ว มีความไว จำเพาะ ถูกต้องและแม่นยำเพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์ *C. perfringens* โดยใช้ Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC) ร่วมกับไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนเป้าหมาย จากผลการทดลอง พบว่า เมื่อใช้ไพรเมอร์ CPA ที่เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในบริเวณยีน *cpa* ซึ่งพบได้ทุกสายพันธุ์ของ *C. perfringens* สามารถคำนวณค่าความจำเพาะได้เท่ากับ 100% ค่าความเข้มข้น (ดีเอ็นเอแม่แบบ) ที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิคนี้ เท่ากับ 300 เฟมโตกรัมต่อปฏิกิริยาพีซีอาร์ ค่าความไวในการตรวจ เท่ากับ 10 CFU/ml ของเชื้อบริสุทธิ์ สำหรับค่าความแม่นยำจากการทดสอบ repeatability และ reproducibility คำนวณได้จากค่า Horwitz ratio โดยค่า repeatability เท่ากับ 0.95, 0.64 และ 0.61 และของ reproducibility เท่ากับ 0.55 ซึ่งสามารถยอมรับค่าความแม่นยำของการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ได้ สำหรับค่าความไวในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างสมุนไพรมที่เติม *C. perfringens* เท่ากับ 100 CFU/g เมื่อเปรียบเทียบค่าความไวในการตรวจ *C. perfringens* ของวิธีการเลี้ยงบนจานเพาะเชื้อโดยไม่ผ่าน และผ่านการเพิ่มพูนเชื้อ เท่ากับ  $10^3$  และ 1 CFU/g ตามลำดับ สำหรับการตรวจวิเคราะห์ *C. perfringens* ในผลิตภัณฑ์ฟ้าทะลายโจรอัดเม็ด ไม่สามารถตรวจพบด้วยวิธีเพาะเลี้ยงโดยตรงบนอาหารแข็ง tryptose sulfite cycloserine แต่สามารถตรวจพบด้วยเทคนิค DHPLC โดยพบว่ามีปริมาณเชื้อประมาณ 430 CFU/g

C. perfringens detection in Thai medicinal plants in laboratory has often been used conventional method which is time-consuming at least 7 days, high expenses, and show false results. These problems affect to the manufacturer of which could not be solved immediately and in-time, and the consumers lack some confidences to the products. Thus, the method for C. perfringens detection in samples must be rapid, specific, sensitive, accurate and precise. Thus, Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC) was evaluated in this study. To detect and quantify the levels of C. perfringens in the herbal samples, DHPLC-PCR products were amplified with the optimal CPA primers of which to be specific for C. perfringens *cpa* genes. The specificity, the limit of detection (DNA template) and the sensitivity were detected approximately 100%, 300 fg/PCR reaction and 10 CFU/ml in pure culture, respectively. For the precision, the evaluation was performed under repeatability and reproducibility, and the Horwitz ratios were 0.95, 0.64 and 0.61 for repeatability and 0.55 for reproducibility which were accepted within the criteria. Measurements of the analytical sensitivity determined with spiked herbal sample contents C. perfringens were approximately 100 CFU/g. The comparative sensitivity values of spiked herbal sample on standard plate count method between enrichment and non enrichment were indicated and the sensitivity was  $10^3$  CFU/g of non enrichment and 1 CFU/g of enrichment. For C. perfringens detection in original herb could not be detected by direct count on tryptose sulfite cycloserine agar using non-enrichment method, but DHPLC method could be detect about 430 CFU/g of C. perfringens in the tablets of Andrographis paniculata used as Thai medicinal plant sample.