

บทคัดย่อ

จุดมุ่งหมายของการศึกษาในครั้งนี้คือการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ในระบบน้ำที่ใช้ในอุตสาหกรรมยาโดยใช้ microbial limit test ซึ่งประกอบด้วยวิธี membrane filtration และวิธี pour plate ว่าวิธีการวิเคราะห์ทดสอบนั้นมีความเหมาะสม ถูกต้อง และตรงตามวัตถุประสงค์ของการวิเคราะห์ทดสอบสำหรับการตรวจสอบจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรมยา อาหารและเครื่องดื่ม เครื่องสำอางค์ และอุตสาหกรรมอิเล็กทรอนิกส์ แนวทางที่กำหนดในตำรับยา เช่น United State of Pharmacopoeia (USP), *European Pharmacopoeia* และตำรับยาระหว่างประเทศ ในการควบคุมคุณภาพควรจะต้องตรวจสอบเพื่อยืนยันว่าขั้นตอนการวิเคราะห์ทดสอบเหมาะสมสำหรับการใช้งาน ผลลัพธ์ที่ได้จากการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทดสอบคือเพื่อให้มั่นใจได้ว่าวิธีการวิเคราะห์ทดสอบนั้นมีความเหมาะสม ถูกต้อง และตรงตามวัตถุประสงค์ของการวิเคราะห์ทดสอบ ในการการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ทดสอบ มีการศึกษาพารามิเตอร์ในการตรวจสอบที่สำคัญคือ ความแม่นยำ (accuracy) และ ความเที่ยง (precision) ประกอบด้วยการทวนซ้ำได้ (Repeatability) และ Intermediate precision สำหรับการศึกษาความแม่นยำ พบว่ามี % recovery ของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำ อยู่ในช่วง 89-117% สำหรับวิธี membrane filtration และ 75-107% สำหรับวิธี pour plate ซึ่งสอดคล้องกับเกณฑ์การยอมรับ (70-130%) สำหรับการศึกษาการทวนซ้ำได้ (Repeatability) และ Intermediate precision พบว่าสัมประสิทธิ์ร้อยละของการเปลี่ยนแปลง (%CV) อยู่ในช่วงของค่าเกณฑ์การยอมรับคือ 15, 25 หรือ 35% ส่วน negative control (peptone water) ทั้งหมดพบว่าไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์และไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อื่น ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับ ส่วน positive control (*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 6538) ทั้งหมดพบว่ามีมีการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์และไม่มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่น ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับ Pharmaceutical water samples ทั้งหมดพบว่ามีไม่มีการเจริญของจุลินทรีย์ และผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ทั้งหมดพบว่าผลทดสอบที่ได้ผ่านตามเกณฑ์การยอมรับทุกการทดสอบ โดยไม่มีการเบี่ยงเบนใด ๆ จากที่ระบุไว้ การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ทดสอบสามารถนำมาใช้สำหรับการตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในระบบน้ำที่ใช้ในอุตสาหกรรมยาและวิธีการตรวจสอบถูกเขียนเป็นมาตรฐานวิธีปฏิบัติงานของการตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ในระบบน้ำที่ใช้ในอุตสาหกรรมยาโดยใช้ microbial limit test เพื่อใช้ในการตรวจสอบในห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพ

คำสำคัญ: วิธี pour plate, วิธี membrane filtration, การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ทดสอบ, การทวนสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ทดสอบ

Abstract

The aim of this study was to verify method of microbiological examination in pharmaceutical water by microbial limit test that it is suitable for its intended use the microbial limit test including membrane method and pour plate method has been used for microbial monitoring in the pharmaceutical, food and beverage, cosmetics and electronics industrial. According to The United States Pharmacopoeia, European Pharmacopoeia and International pharmacopoeia guidelines, the quality control process should be validated to confirm that the analytical procedure employed for a specific test is suitable for its intended use. Results from the method validation can be used to judge the quality, reliability and consistency of analytical results. In analytical method verification was studied on critical verification parameters, including accuracy and precision in term of repeatability and intermediate precision. For accuracy test, the percentage recovery was in the range of 89–117% (membrane filtration method) and 75–107% (pour plate method) which complied with acceptance criteria (70–130%). For repeatability and intermediate precision tests, the percentage coefficients of variation were in the range of maximum allowable values 15, 25 or 35 %. All negative controls (peptone water) showed no growth of microorganisms complied with acceptance criteria. All positive controls (*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 6538) showed the microorganisms growth complied with acceptance criteria. There was no contamination on negative controls and positive controls complied with acceptance criteria. All Pharmaceutical water samples showed no growth of microorganisms. All analytical method verification tests passed without any deviation and out of specification. The verified method can be applied for microbiological contamination examination in pharmaceutical water and the procedures were written in standard operating procedure of microbiological examination in pharmaceutical water by microbial limit test for routine testing in quality control laboratory.

Keywords: Pour plate method, Membrane filtration method Analytical method validation, Analytical Method Verification

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรีที่ได้สนับสนุนงบประมาณสำหรับการดำเนินงานวิจัย ซึ่งเป็นทุนวิจัยหมวดเงินอุดหนุนที่ได้รับการจัดสรรจากรัฐ และขอขอบคุณห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพ โรงงานต้นแบบผลิตยาชีววัตถุแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ที่ได้อำนวยความสะดวกในการใช้พื้นที่และเครื่องมือต่างๆ สำหรับการศึกษาวิจัย สุดท้ายนี้ขอขอบคุณพนักงานของห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพ โรงงานต้นแบบผลิตยาชีววัตถุแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรีทุกท่านสำหรับความร่วมมือ คำแนะนำและข้อเสนอแนะในการทำงานวิจัย รวมถึงให้การสนับสนุนในการจัดทำรูปเล่มรายงาน จนทำให้งานวิจัยฉบับนี้เสร็จสิ้นสมบูรณ์

คณะผู้วิจัย
5 กันยายน 2559

สารบัญ (Table of Contents)

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ (Abstract) ภาษาไทยและภาษาอังกฤษ	ก-ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ (Table of Contents)	ง-จ
สารบัญตาราง (List of Tables)	ฉ
สารบัญภาพ (List of Illustrations)	ช
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)	ซ
บทที่ 1 บทนำ (Introduction)	
1.1 ที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ	5
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	5
1.4 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย	5
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6
บทที่ 2 ทฤษฎีและ/หรือแนวความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย (Literature Review)	
2.1 ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับระบบน้ำในอุตสาหกรรมยา	7
2.2 ความรู้เบื้องต้นของวิธีการตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ในระบบน้ำที่ใช้ในอุตสาหกรรมยา	8
2.3 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทดสอบที่ใช้ควบคุมคุณภาพของห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพ	10
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย (Materials and Method)	
3.1 เครื่องมือวิเคราะห์ วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้	
3.1.1 เครื่องมือวิเคราะห์	27
3.1.2 เครื่องแก้ว / วัสดุอุปกรณ์ / วัสดุสิ้นเปลือง	27
3.1.3 สารเคมี / รีเอเจนต์	
3.1.3.1 เชื้อจุลินทรีย์มาตรฐาน (Microbiological standard)	28
3.1.3.2 สารเคมีที่ใช้ (Chemical, Reagent, Media and Biological Indicator)	28
3.2 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำโดยใช้ Pour plate method	29
3.3 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำโดยใช้ Membrane Filtration method	32

สารบัญ (Table of Contents)

เรื่อง	หน้า
บทที่ 4 อภิปรายผล (Results and Discussion)	
4.1 ผลการศึกษาการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ ในน้ำโดยใช้ Pour plate method และ Membrane Filtration method	37
4.2 ผลการศึกษาการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ ในน้ำโดยใช้ Pour plate method และ Membrane Filtration method	47
บทที่ 5 สรุปและขอเสนอแนะ (Conclusions and Recommendations)	59
เอกสารอ้างอิง (References)	62
ผลงานตีพิมพ์ สิ่งตีพิมพ์เพื่อเผยแพร่ สิทธิบัตรหรือผลงานอื่นๆ จากโครงการนี้	64
ภาคผนวก (Appendix)	
ภาคผนวก ก. วิธีวิเคราะห์และการคำนวณทางสถิติ	65
ภาคผนวก ข. การเตรียมเครื่องมือ เครื่องแก้ว วัสดุอุปกรณ์ วัสดุสิ้นเปลือง สารละลายมาตรฐาน สารละลายที่ใช้ทดสอบและอาหารเลี้ยงเชื้อ	67
ภาคผนวก ค. โปรโตคอลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณ จุลินทรีย์ในน้ำโดยใช้ Pour plate method	72
ภาคผนวก ง. โปรโตคอลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณ จุลินทรีย์ในน้ำโดยใช้ Membrane filter method	96

สารบัญตาราง (List of Tables)

ตาราง	หน้า
ตารางที่ 1 แนวทางในการเลือกทดสอบ analytical performance characteristics ที่จำเป็นต้องดำเนินการ (+) และไม่จำเป็นต้องดำเนินการ (-)	11
ตารางที่ 2 เกณฑ์การยอมรับ %Recovery ตามมาตรฐานทางอาหารและยา AOAC (2002)	18
ตารางที่ 3 ผลการทดสอบของ sample blank ที่เติมสารเป้าหมายความเข้มข้นต่างๆ	22
ตารางที่ 4 แสดงการเตรียม negative control, positive control และ spiked sample plates ของ Pour Plate Method	30
ตารางที่ 5 แสดงการเตรียม negative control, positive control และ spiked sample plates ของ Membrane Filtration Method	33
ตารางที่ 6 แสดงผลการศึกษาความแม่นยำ (Accuracy) และ การทวนซ้ำได้ (Repeatability) ของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำโดยใช้ Pour Plate Method	39
ตารางที่ 7 แสดงผลการศึกษา Intermediate precision ของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณ จุลินทรีย์ในน้ำโดยใช้ Pour Plate Method ของนักวิเคราะห์แต่ละคน	42
ตารางที่ 8 แสดงผลการศึกษา Intermediate precision ของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณ จุลินทรีย์ในน้ำโดยใช้ Pour Plate Method ของนักวิเคราะห์ 3 คน	47
ตารางที่ 9 แสดงผลการศึกษาความแม่นยำ (Accuracy) และ การทวนซ้ำได้ (Repeatability) ของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำโดยใช้ Membrane Filtration Method	49
ตารางที่ 10 แสดงผลการศึกษา Intermediate precision ของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณ จุลินทรีย์ในน้ำโดยใช้ Membrane Filtration Method ของนักวิเคราะห์แต่ละคน	52
ตารางที่ 11 แสดงผลการศึกษา Intermediate precision ของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณ จุลินทรีย์ในน้ำโดยใช้ Membrane Filtration Method ของนักวิเคราะห์ 3 คน	57
ตารางที่ 12 แสดงผลในหน่วย CFU ของ negative control, positive control, water sample และspiked samples	60
ตารางที่ 13 ผลการศึกษาความแม่นยำและความเที่ยงของการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการ ตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในระบบน้ำที่ใช้ในอุตสาหกรรมยาโดยใช้วิธี Microbial limit test ประกอบด้วย วิธีpour plate และวิธี membrane filtration	61
ตารางที่14 การเจือจาง microbiological stock suspension ด้วยวิธี serial dilution	68

สารบัญภาพ (List of Illustrations)

รูป	หน้า
รูปที่ 1 Pour Plate Method	9
รูปที่ 2 Membrane Filtration Method	10
รูปที่ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานกับความเข้มข้นเฉลี่ยแต่ละ จุดลากเส้นตัดแกน y (LOD)	21
รูปที่ 4 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานกับความเข้มข้นเฉลี่ยแต่ละ จุดลากเส้นตัดแกน y (LOQ)	24
รูปที่ 5 แสดงการประกอบชุดกรองเพื่อทำการทดสอบตัวอย่างน้ำโดยวิธี Membrane Filter Method	33
รูปที่ 6 แสดงการใช้ forceps คีบเมมเบรนเปล่าวางบนจานเพาะเชื้อ sterile PCA	34
รูปที่ 7 แสดงการเจริญของจุลินทรีย์ <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> ATCC 6538 โดยใช้เทคนิค Pour Plate Method	38
รูปที่ 8 แสดงการเจริญของจุลินทรีย์ <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> ATCC 6538 โดยใช้เทคนิค Membrane Filtration Method	49

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย
(List of Abbreviations)

1. BP : British Pharmacopoeia
2. EP : European Pharmacopoeia
3. GMP : Good Manufacturing Practice
4. PM : Preventive Maintenance
5. SOP : Standard Operating Procedure
6. USP : United States Pharmacopeia