**[ร่าง] ตัวอย่าง** ขั้นตอนการปฏิบัติงานสำหรับความเหมาะสมของวิธีทดสอบการตรวจหาจุลินทรีย์แกรมลบที่ทนน้ำดี (Bile-tolerant Gram-negative Bacteria) ในผลิตภัณฑ์สมุนไพร

**[Draft]** **Example** Method suitability test for Bile-tolerant Gram-negative Bacteria detections in Herbal Products

**Disclaimers:** เอกสารฉบับที่ใช้เพื่อเป็นตัวอย่างเอกสารอ้างอิง ในการจัดเตรียมเอกสารประกอบการขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์สมุนไพรเท่านั้น ไม่สามารถใช้ทดแทนเอกสารระบบคุณภาพและไม่รวมถึงการรับรองอื่นๆ

This document is intended for usage as a guidance reference for herbal products registration only. This document cannot replace quality management system document and other certify processes.

Contents

[General considerations 3](#_Toc175750936)

[**Spread plating technique** 4](#_Toc175750937)

[[English] Analytical Procedure for Bile-tolerant Gram-negative Bacteria Enumeration in Herbal Products 4](#_Toc175750938)

[1. Purpose 4](#_Toc175750939)

[2. Scope 4](#_Toc175750940)

[3. Responsibilities 4](#_Toc175750941)

[4. Materials and Equipment 4](#_Toc175750942)

[5. Procedure 6](#_Toc175750943)

[6. Calculations 10](#_Toc175750944)

[7. Acceptance Criteria 10](#_Toc175750945)

[8. Reporting 10](#_Toc175750946)

[10. Revision History 10](#_Toc175750947)

[[ภาษาไทย] ขั้นตอนการปฏิบัติงานสำหรับการนับจำนวนจุลินทรีย์แกรมลบที่ทนน้ำดี (Bile-tolerant Gram-negative Bacteria) ในผลิตภัณฑ์สมุนไพร 11](#_Toc175750948)

[**1.** ***วัตถุประสงค์*** 11](#_Toc175750949)

[**2.** ***ขอบเขต*** 11](#_Toc175750950)

[**3.** ***ความรับผิดชอบ*** 11](#_Toc175750951)

[**4.** ***วัสดุและอุปกรณ์*** 11](#_Toc175750952)

[**5.** ***ขั้นตอนการปฏิบัติ*** 13](#_Toc175750953)

[**6.** ***การคำนวณ*** 16](#_Toc175750954)

[**7.** ***เกณฑ์การยอมรับ*** 16](#_Toc175750955)

[**8.** ***การรายงานผล*** 16](#_Toc175750956)

[**10.** ***เอกสารอ้างอิง*** 16](#_Toc175750957)

[**11.** ***ประวัติการแก้ไข*** 16](#_Toc175750958)

# General considerations

**[EN]**

1. This document was intended present in 2-language options including: English – Thai. Users can choose one language as example for document preparation in herbal registration processes.
2. Analytical Procedure for Analytical Procedure for Bile-tolerant Gram-negative Bacteria Enumeration in Herbal Products was not intended for products including: microbials as intended active ingredients.
3. The chosen of techniques e.g., pour plating, spread plating, membrane filtration are **based on properties or nature of products**.
4. This document is not covered: Growth promotion test of culture media, preservative effectiveness test and other sample preparation techniques which **should be appropriately researched and developed before commencing suitability of test method intended to establish test method parameters**.
5. This document is not covered: Manufacturing/Quality control testing sites certify processes or any others quality management system certify processes.
6. This document is not covered: Preservation and removal of culture stock from the storage system and other seeds train/bank including establishment of reference strains

**[TH]**

1. เอกสารฉบับนี้จัดเตรียมขึ้นเป็น 2 ภาษา ไทย - อังกฤษ สามารถเลือกใช้ภาษาใดภาษาหนึ่งเป็นตัวอย่างในการอ้างอิงเพื่อจัดเตรียมเอกสาร ประกอบการพิจารณาขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์สมุนไพร
2. วิธีทดสอบ Analytical Procedure for Bile-tolerant Gram-negative Bacteria Enumeration in Herbal Products ไม่สามารถใช้กับผลิตภัณฑ์ที่มีจุลินทรีย์เป็นตัวยาสำคัญ (microbials as intended active ingredients)
3. การเลือกใช้ techniques เช่น pour plating, spread plating, membrane filtration ขึ้นอยู่กับ ลักษณะและคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์
4. เอกสารฉบับนี้ ไม่ครอบคลุมถึง Growth promotion test of culture media, suitability of microbial enumeration method, preservative effectiveness test รวมถึง technique ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมของแต่ละประเภทลักษณะผลิตภัณฑ์ ซึ่งรายละเอียดของแต่ละผลิตภัณฑ์จะต้องผ่านการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสม
5. เอกสารฉบับนี้ ไม่ครอบคลุมการรับรองมาตรฐานสถานที่ผลิต และมาตรฐานสถานที่ทดสอบด้านจุลชีววิทยา และไม่รวมถึงการรับรองระบบคุณภาพอื่นๆ

### [English] Method suitability test for Bile-tolerant Gram-negative Bacteria Detections in Herbal Products

#### Purpose

To establish test parameters for the method of Bile-tolerant Gram-negative Bacteria detection in herbal finished products according to … [Reference].

#### Scope

This procedure applies to test method number: […provide internal reference number] for physical address of: […Quality control testing site address]

#### Responsibilities

* 1. Quality Control personnel
  2. Microbiology laboratory staff

#### Materials and Equipment

* 1. diluent - [e.g., peptone saline buffer, phosphate buffer...] \*
     1. [provide name and list of ingredients diluent]
     2. …

\* Diluent according to Thai herbal pharmacopeia appendix 10.2 under stock buffer solution section

* 1. Soybean-Casein Digest Broth (Tryptone Soya Broth: TSB) or [TAT]

Formula:

* Pancreatic Digest of Casein 17.0 g
* Papaic Digest of Soybean Meal 3.0 g
* Sodium Chloride 5.0 g
* Dipotassium Hydrogen Phosphate 2.5 g
* Dextrose Monohydrate 2.5 g
* Deionized Water (DI Water) 1,000 ml

Dissolve solids medium, autoclave at 121 °C for 15 minutes.

pH after sterilization 7.3 ± 0.2.

* 1. Enterobacteria Enrichment Broth Mossel (EEB)

Formula:

* Pancreatic digest of gelatin 10.0 g
* Dextrose monohydrate 5.0 g
* Dehydrated, ox bile 20.0 g
* Potassium dihydrogen phosphate 3.0 g
* Disodium hydrogen phosphate, dihydrate 8.0 g
* Brilliant green 0.015 g
* Water 1000 ml

Mix and heat at 100 °C for 30 minutes to sterilize and cool immediately. **Do not Autoclave.**

pH after sterilization: 7.2 ±0.2

* 1. Violet Red Bile Dextrose Agar (VRBA)

Formula:

* Yeast extract 3.0 g
* Pancreatic digest of gelatin 7.0 g
* Bile salts mixture 1.5 g
* Lactose 10.0 g
* Sodium chloride 5.0 g
* Dextrose monohydrate 10.0 g
* Agar 15.0 g
* Neutral red 30.0 mg
* Crystal violet 2.0 mg
* Water 1000 mL

Mix and heat boiling. Do not overheat or sterilize. Transfer at once to a water-bath maintained at about 50 °C, and pour into plates as soon as the medium has cooled.

pH after sterilization 7.4 ± 0.2.

* 1. Petri dishes
  2. [pipettes or automate pipettes]
  3. Incubator (30-35°C)
  4. Colony counter
  5. Autoclave
  6. Biosafety cabinet class II (BSC II)
  7. Sterile flask
  8. water bath
  9. Vertex mixers
  10. [Sterile loop or other mean of inoculating equipment]
  11. Test-organisms
      1. [Escherichia coli ATCC 8739]: [passage count/seed reference number]
      2. [*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027]: [passage count/seed reference number]
      3. [*Staphylococcus aureus* ATCC 6538]: [passage count/seed reference number]

#### Procedure

* 1. Culture media Preparation
     1. [Weigh …. g of TSA into …]
     2. [Add … ml of water]
     3. [Autoclave at 121 ˚C for 15 minutes]
  2. Sample Preparation
     1. Weigh … g of the herbal product aseptically
     2. Add … mL of diluent (to yield 1:10 dilution)
     3. [Mix the sample well with …]
  3. Test for absence
     1. After completed resuscitate time, transfer [ …the volume corresponding to 1 g or 1 ml or original sample] of the mixture from step 5.2.3 to sterile tube containing …-ml of Enterobacteria Enrichment Broth Mossel (EEB)\*

\* the portion of sample culture media to culture media should be at least 1:9 or 10%

* + 1. [Transfer reference strain suspension of not more than 100 CFU with volume not exceed 1% of diluted product into each sample serial dilution]
    2. [well mix the mixture]
    3. Incubate the mixture at 30 – 35 °C for 24 hours for enrichment.
    4. After completed enrichment, subculture by transfer a loopful of mixture onto plates of Violet Red Bile Dextrose Agar (VRBA).
    5. Incubate the plates at 30 – 35 °C for 18 hours.
    6. Observe the plates

**Semi-quantitative test**

* 1. Selection enrichment
     1. Transfer 1 ml of resuscitate mixture from step 5.2.3 into sterile tubes containing 9-ml of TSB to prepare 10-fold serial dilution (0.01 and 0.001 g or ml of original sample)

resuscitate   
mixture

10^-1

10^-2

… ml

10^-3

… ml

* + 1. Incubate the tubes at 30 – 35 °C for 24 hours.
    2. [Transfer reference strain suspension of not more than 100 CFU with volume not exceed 1% of diluted product into each sample serial dilution]
    3. Repeat step 5.5.1 to 5.5.3 with [ reference strain: *S. aureus* of not more than 100 CFU] as a negative control and positive control of not more than 100 CFU reference strain suspension (*E. coli* and *P. aeruginosa* respectively) in place of sample solutions.
  1. Subculture for most probability number
     1. Transfer a loopful of the enriched culture onto Violet Red Bile Dextrose Agar (VRBA)
     2. Incubate the VRBG plates at 30 – 35 °C for 18 hours

sample

… ml TSB

homogenize

resuscitate

Amount equivalent to   
… g or … ml of sample

20 – 25 °C

2 hours

resuscitated

Amount equivalent to   
1 g or 1 ml of sample

EEB

30 – 35 °C

24 hours

enriched

VRBG plates

Absence of Bile-tolerant gram-negative bacteria

No growth found

Serial Dilution 10^-1 to 10^-3

10^-2

10^-3

10^-1

Amount equivalent to   
1 g or 1 ml of sample

9x volume EEB

… ml

… ml

30 – 35 °C

24 hours

enriched

VRBG plates

30 – 35 °C

18 hours

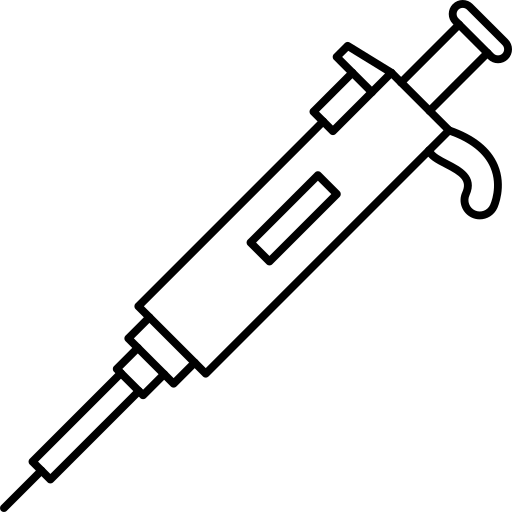
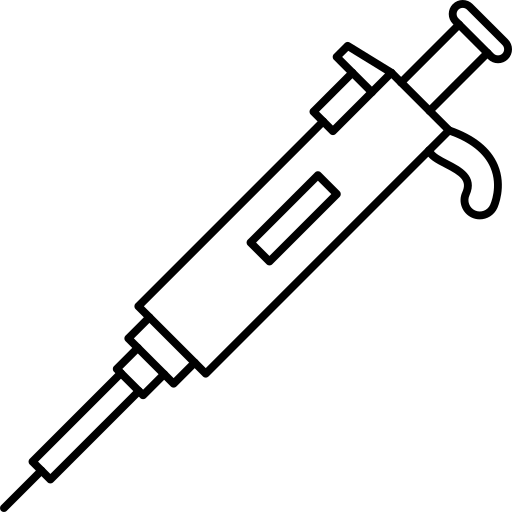
30 – 35 °C

18hours

Record PN results

Spike NMT 100 CFU of reference strains

Spike NMT 100 CFU of reference strains



* + 1. Observation and interpretation

Growth of colonies constitutes a positive result. Probable number of bacteria determine as following table:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Results for each quantity of product** | | | Probable Number (PN) of bacteria  per g or ml of product |
| 0.1 g  (or 0.1ml) | 0.01 g  (or 0.01ml) | 0.001 g  (or 0.001ml) |
| + | + | + | More than 103 |
| + | + | - | Less than 103 and more than 102 |
| + | - | - | Less than 102 and more than 10 |
| - | - | - | Less than 10 |

#### Calculations

#### Acceptance Criteria

#### Test for absence, should be positive.

#### Lowest dilution of product control should be positive.

#### Reporting

[Record results in the designated company management system]

#### References

* 1. British Pharmacopoeia 2021, Appendix XVI B. Microbiological Examination of Non-sterile Products
  2. Ph. Eur. 2.6.12 Microbiological Examination of Non-Sterile Products: Microbial Enumeration Tests
  3. Thai Herbal Pharmacopeia 2021 supplement 2023 - Appendix 10.2

#### Revision History

#### Revision 3 Established suitability based on conditions and test parameters of analytical procedure reference number…

#### Revision 2.1

#### Renamed the document from ‘Analytical Procedure for Bile-tolerant Gram-negative Bacteria **enumeration** in Herbal Products’ to ‘Analytical Procedure for Bile-tolerant Gram-negative Bacteria **detections** in Herbal Products’

#### Removed spread plate technique according to procedure not included enumeration hence test only most probability number and subsequently plating technique.

* + 1. Generally removed ‘sterile’ from equipment as known for general practice

#### Generally replaced ‘sterile diluent’ with ‘diluent’ based on suitability test

#### Removed stomacher from equipment as only optional for procedure common in non-homogenize sample

#### Replaced biosafety cabinet with Biosafety cabinet class II (BSC II)

#### Replaced Sterile pipettes with optional automate pipettes

#### Removed pre-specified amount of herbal product sample and leave as optional based on suitability test

#### Removed steps of Preparation of positive control and negative control cultures under semi-quantitative test and suitability of the test method

#### Replace EEB diluent with TSB in steps of selection enrichment under semi-quantitative test and suitability of the test method

[ภาษาไทย] ขั้นตอนการปฏิบัติงานสำหรับการนับจำนวนจุลินทรีย์แกรมลบที่ทนน้ำดี (Bile-tolerant Gram-negative Bacteria) ในผลิตภัณฑ์สมุนไพร

#### ***วัตถุประสงค์***

เพื่อการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์แกรมลบที่ทนน้ำดีในผลิตภัณฑ์สมุนไพรสำเร็จรูป ด้วยวิธี spread plating technique ตาม ... [Reference]

#### ***ขอบเขต***

ขั้นตอนนี้ใช้กับผลิตภัณฑ์สมุนไพร [ชื่อผลิตภัณฑ์, รูปแบบ] ทั้งหมดที่ผลิตหรือแปรรูปใน [สถานที่ผลิต]

#### ***ความรับผิดชอบ***

* 1. บุคลากรฝ่ายควบคุมคุณภาพ
  2. เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา

#### ***วัสดุและอุปกรณ์***

* 1. สารละลายเจือจางที่ปราศจากเชื้อ - [เช่น น้ำเปปโตน, บัฟเฟอร์ฟอสเฟต]
     1. [แสดง ชื่อและสูตรส่วนประกอบของแต่ละ diluent ที่ใช้]
     2. ...
  2. อาหารเลี้ยงเชื้อ
     1. Soybean-Casein Digest Broth (Tryptone Soya Broth: TSB)

Formula:

* Pancreatic Digest of Casein 17.0 g
* Papaic Digest of Soybean Meal 3.0 g
* Sodium Chloride 5.0 g
* Dipotassium Hydrogen Phosphate 2.5 g
* Dextrose Monohydrate 2.5 g
* Deionized Water (DI Water) 1,000 ml

Dissolve solids medium, autoclave at 121 °C for 15 minutes.

pH after sterilization 7.3 ± 0.2.

* + 1. Enterobacteria Enrichment Broth Mossel (EEB)

Formula:

* Pancreatic digest of gelatin 10.0 g
* Dextrose monohydrate 5.0 g
* Dehydrated, ox bile 20.0 g
* Potassium dihydrogen phosphate 3.0 g
* Disodium hydrogen phosphate, dihydrate 8.0 g
* Brilliant green 0.015 g
* Water 1000 ml

Mix and heat at 100 °C for 30 minutes to sterilize and cool immediately. **Do not Autoclave.**

pH after sterilization: 7.2 ±0.2

* + 1. Violet Red Bile Dextrose Agar (VRBA)

Formula:

* Yeast extract 3.0 g
* Pancreatic digest of gelatin 7.0 g
* Bile salts mixture 1.5 g
* Lactose 10.0 g
* Sodium chloride 5.0 g
* Dextrose monohydrate 10.0 g
* Agar 15.0 g
* Neutral red 30.0 mg
* Crystal violet 2.0 mg
* Water 1000 mL

Mix and heat boiling. Do not overheat or sterilize. Transfer at once to a water-bath maintained at about 50 °C, and pour into plates as soon as the medium has cooled.

* 1. pH after sterilization 7.4 ± 0.2.
  2. จานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ
  3. ปิเปตที่ปราศจากเชื้อ
  4. ตู้บ่มเชื้อ (30-35°C)
  5. เครื่องบดผสมหรือเครื่องปั่นปราศจากเชื้อ
  6. เครื่องนับโคโลนี
  7. Autoclave
  8. ตู้ปลอดเชื้อ Biosafety cabinet
  9. เครื่องแก้วปราศจากเชื้อ
  10. Water bath
  11. Vertex mixers

#### ***ขั้นตอนการปฏิบัติ***

* 1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายเจือจางที่ปราศจากเชื้อ
     1. [ ชั่ง TSA ... g ลงใน sterile Erlenmeyer flask]
     2. [ เติม diluent … ml]
     3. [ นำเข้าเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 ˚C เวลา 15 นาที]
  2. การเตรียมตัวอย่าง
     1. ชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์สมุนไพร … กรัม อย่างปราศจากเชื้อ
     2. เติมตัวทำเจือจาง (Diluent) TSB ปราศจากเชื้อ … มิลลิลิตร (เพื่อเตรียมสารเจือจาง 1:10)
     3. บดผสมในเครื่องบดผสมหรือเครื่องปั่นปราศจากเชื้อและทำการ resuscitate ที่ 20-25 ˚C เป็นเวลา 2-5 ชั่วโมง
  3. Test for absence
     1. หลังจบการ resuscitate ย้าย [ …ปริมาตรเทียบเท่า 1 กรัม หรือ 1 มิลลิลิตรของสารตั้งต้น] ของสารในข้อ 5.2.3 ลงในหลอดปราศจากเชื้อที่มี Enterobacteria Enrichment Broth Mossel (EEB) ปริมาณ 9 มิลลิลิตร
     2. [ผสมสารให้เข้ากัน]
     3. บ่มสารที่ 30 – 35 °C เป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ (enrichment)
     4. เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อ (subculture) โดยย้ายสารผสมอย่างเต็มลูป (loopful) ลงในจานเพาะที่มี Violet Red Bile Dextrose Agar (VRBA).
     5. บ่มจานเพาะเชื้อที่ 30 – 35 °C เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง
     6. สังเกตจานเพาะเชื้อ หากไม่มีการเจริญของเชื้อ ถือว่าผลิตภัณฑ์ผ่านการทดสอบว่าไม่มีจุลินทรีย์แกรมลบที่ทนน้ำดี
  4. Semi-quantitative test
     1. การเตรียม Positive control และ Negative control ของเชื้อที่ทำการเพาะ
        1. นำเอา *Escherichia coli* (เช่น ATCC 8739, DMST 15537, NCIMB 8545, C.I.P. 53.126 หรือ NBRC 3972;) ออกมาจากระบบเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ อย่างปราศจากเชื้อ
        2. นำ *Escherichia coli* อย่างเต็มลูป ลงในขวดดูรานที่มี TSB ปริมาณ 100 มิลลิลิตร
        3. คนเบาๆ จนสารเข้ากัน
        4. ทำการบ่มที่ 30 – 35 °C เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง (เพาะเลี้ยงเชื้อทิ้งไว้ข้ามคืน)
        5. นำเอาเชื้อที่เพาะออกจากเครื่องและใช้ spectrophotometer ในการวัด OD600 เพื่อเป็น standardize optical density
        6. เตรียมสารเจือจางของเชื้อที่เพาะด้วยน้ำเกลือปราศจากเชื้อ (sterile normal saline solution) ให้มีค่า OD600 ที่ประมาณ 0.1 ซึ่งใกล้เคียงกับ 1 x108 CFU/ml *ของ E. coli* และ *S. aureus* โดยให้ทำการเก็บสารที่ได้ภายในตู้เย็นที่ 2-8 °C ทันทีหลังจากมีการใช้งาน
        7. Verify สารเจือจางในข้อ 5.4.1.6 ด้วยการเจือจางสารแขวนตะกอนจาก 10-3 ไปเป็น 10-5 จากนั้นทำ plating technique โดยเชื้อที่ผ่านการเพาะข้ามคืนแล้วควรได้ผลลัพธ์ที่ 30-300

**หมายเหตุ:** กราฟแสดงการเจริญเติบโต (growth curve) เพื่อใช้สำหรับเชื้อแต่ละ strain อาจแตกต่างกันตามแต่ละห้องปฏิบัติการ It is always best practice to create a growth curve for specific requirement accuracy result

* + 1. ความเหมาะสมของวิธีการทดสอบ
       1. ใช้ปริมาณจุลชีพไม่เกิน 100 CFU/g หรือ ml ตามข้อ 5.4.1.7 สำหรับ positive control (*E. coli*) และ negative control (*S. aureus*)
  1. Selection enrichment
     1. ปิเปตสารจากข้อ 5.2.3 ปริมาณ 1 มิลลิลิตรลงบนหลอดปราศจากเชื้อที่มี Enterobacteria Enrichment Broth Mossel (EEB) ปริมาณ 9 มิลลิลิตรเพื่อเตรียม 10-fold serial dilution (0.01 และ 0.001 กรัมหรือมิลลิลิตรของสารตั้งต้น)

resuscitate   
mixture

10^-1

10^-2

… ml

10^-3

… ml

* + 1. บ่มสารที่ 30 – 35 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง
    2. ทำซ้ำข้อ 5.5.1 ถึง 5.5.2 กับ [blank solutions] เพื่อเป็น negative control
  1. การเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อนับจำนวนเชื้อ
     1. ย้าย 0.1 มิลลิลิตรของเชื้อที่ผ่านการ enriched ลงใน Violet Red Bile Dextrose Agar (VRBA)
     2. Spread inoculum ให้กระจายทั่วผิว VRBG agar โดยใช้ spreader ปราศจากเชื้อ
     3. บ่มจานเพาะ VRBG ที่ 30 – 35 °C เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง
  2. สังเกตและแปลผล

หากมีโคโลนี ถือว่าเป็นผลบวก โดยแปลผลจำนวนแบคทีเรียที่อาจมีได้ ดังตาราง

| **ผลการทดสอบของของแต่ละความเข้มข้น** | | | จำนวนแบคทีเรียที่อาจมี (Probable Number of bacteria) ต่อกรัมหรือมิลลิลิตรของผลิตภัณฑ์ |
| --- | --- | --- | --- |
| 0.1 กรัม  (หรือ 0.1 มล.) | 0.01 กรัม  (หรือ 0.01 มล.) | 0.001 กรัม  (หรือ 0.001 มล.) |
| + | + | + | มากกว่า 103 |
| + | + | - | น้อยกว่า 103 แต่มากกว่า 102 |
| + | - | - | น้อยกว่า 102 แต่มากกว่า 10 |
| - | - | - | น้อยกว่า 10 |

#### ***การคำนวณ***

-

#### ***เกณฑ์การยอมรับ***

[ระบุขีดจำกัดจุลินทรีย์แกรมลบที่ทนน้ำดีที่ยอมรับได้สำหรับผลิตภัณฑ์สมุนไพรตามข้อกำหนดมาตรฐาน]

#### ***การรายงานผล***

1. [บันทึกผลลงในระบบคุณภาพของบริษัท]

#### ***เอกสารอ้างอิง***

* 1. USP <61> การตรวจสอบทางจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์ที่ไม่ปราศจากเชื้อ: การทดสอบการนับจำนวนจุลินทรีย์
  2. Ph. Eur. 2.6.12 การตรวจสอบทางจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์ที่ไม่ปราศจากเชื้อ: การทดสอบการนับจำนวนจุลินทรีย์
  3. ตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย ปี 2021 supplement 2023

#### ***ประวัติการแก้ไข***

[บันทึกประวัติการแก้ไขของ Analytical procedure นี้]