**[ร่าง] ตัวอย่าง** ขั้นตอนการปฏิบัติงานสำหรับความหมาะสมของวิธีทดสอบการนับจำนวนปริมาณเชื้อยีสต์และราทั้งหมดทั้งหมดที่เจริญเติบโตโดยใช้ออกซิเจน (TYMC) ในผลิตภัณฑ์สมุนไพร

**[Draft]** **Example** Method suitability test for Total Yeast and Mold Count (TYMC) 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](#_Toc172795800)

[**Pour plating technique** 4](#_Toc172795801)

[[English] Analytical Procedure for Total Yeast and Mold Count (TYMC) 4](#_Toc172795802)

[1. Purpose 4](#_Toc172795803)

[2. Scope 4](#_Toc172795804)

[3. Responsibilities 4](#_Toc172795805)

[4. Materials and Equipment 4](#_Toc172795806)

[5. Procedure 5](#_Toc172795807)

[6. Calculations 7](#_Toc172795808)

[7. Acceptance Criteria 7](#_Toc172795809)

[8. Reporting 7](#_Toc172795810)

[9. References 7](#_Toc172795811)

[10. Revision History 7](#_Toc172795812)

[[ภาษาไทย] ขั้นตอนการปฏิบัติงานสำหรับการนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่เจริญเติบโตโดยใช้ออกซิเจน (TAMC) ในผลิตภัณฑ์สมุนไพร 8](#_Toc172795813)

[**1.** ***วัตถุประสงค์*** 8](#_Toc172795814)

[**2.** ***ขอบเขต*** 8](#_Toc172795815)

[**3.** ***ความรับผิดชอบ*** 8](#_Toc172795816)

[**4.** ***วัสดุและอุปกรณ์*** 8](#_Toc172795817)

[**5.** ***ขั้นตอนการปฏิบัติ*** 9](#_Toc172795818)

[**6.** ***การคำนวณ*** 10](#_Toc172795819)

[**7.** ***เกณฑ์การยอมรับ*** 11](#_Toc172795820)

[**8.** ***การรายงานผล*** 11](#_Toc172795821)

[**9.** ***เอกสารอ้างอิง*** 11](#_Toc172795822)

[**10.** ***ประวัติการแก้ไข*** 11](#_Toc172795823)

# 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 Total Yeast and Mold Count (TYMC) in Herbal Products was not intended for products including: Yeast and Mold 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 Total Yeast and Mold Count (TYMC) ไม่สามารถใช้กับผลิตภัณฑ์ที่มียีสต์และราเป็นตัวยาสำคัญ (Yeast and Mold 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

## **Pour plating technique**

### [English] Method suitability for Total Yeast and Mold Count (TYMC)

#### Purpose

To establish test parameter for the method total aerobic yeast and mold enumeration in herbal finished products by pour plating technique 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. Sabouraud dextrose agar (SDA) ±Antibiotics: …
     1. [provide name and list of ingredients culture media]
     2. …
  2. Petri dishes
  3. [pipettes or automate pipettes]
  4. Incubator (30-35°C)
  5. Colony counter
  6. Autoclave
  7. Biosafety cabinet class II (BSC II)
  8. Sterile flask
  9. water bath
  10. Vertex mixers
  11. [Sterile loop or other mean of inoculating equipment]
  12. Test-organism:
      1. [*Candida albicans* ATCC 10231]: [passage count/seed reference number]
      2. [*Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404]: [passage count/seed reference number]

#### Procedure

* 1. Culture media Preparation
     1. [Weigh …. g of SDA 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, 10^-1)
     3. [Mix the sample well with …]
  3. Serial Dilution
     1. Prepare a series of 10-fold dilutions (10^-1 to 10^-2 or suitable dilution)
     2. Use … mL of sample and … mL of diluent for each dilution

Sample

10^-1

10^-2

… ml

* 1. Spike reference strain (positive product control: PPC = product + reference strain)
     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. Plating
     1. Pipette 1 mL from each dilution onto separate sterile Petri dishes for at least 2 replications
     2. [suitable amount of antibiotics: Chloramphenicol maybe added in this step]
     3. Pour 15-20 mL of molten Sabouraud Dextrose Agar (cooled to 45°C)

Sample dilutions

2 replications

diluent

2 replications

1 ml

1 ml

1 ml

1 ml



15-20 ml

Molten SDA



15-20 ml

Molten SDA

* + 1. Mix gently and allow to solidify
    2. Repeat step 5.5.1 to 5.5.4 above with [blank solutions] as a negative control and positive control of not more than 100 CFU in place of sample solutions
  1. Incubation
     1. Incubate the plates at 20-25 °C for 5 Days
  2. Colony Counting
     1. After incubation, count the number of colonies on plates containing not more than 50 colonies. In case of ‘Spreader colony’ found, counting whole colony as 1 colony also apply for merged colonies
     2. Calculate the TYMC per gram of sample according to section 6. And record the results as per section 8.

#### Calculations

TYMC (CFU/g) = Number of colonies × Dilution factor

#### Acceptance Criteria

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

#### The mean of any test microorganisms as prescribed in section 4.13 should not differing by a factor greater than 2 from the value of the positive control and without any growth in negative control.

#### Reporting

[Record results in the designated company management system]

In case no colony was found on any dilutions, check lowest dilutions and multiply by 1 as a dilution factor and report back as < 1 CFU, for example analytes dilution was 10^-1 and 10^-2; no colony was found on any plates; the report should be <1 x 10^1 CFU/g or ml or CFU/g

**Remark:** In any sample dilution steps, absolute different should not exceed …%.   
In case absolute different exceed …%, appropriate measurement including investigation should be commenced.

#### Reference

* 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 TAMC analytical procedure reference number…

#### Revision 2.1

#### 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 ‘sample weight’ denominator term from the erroneously adds calculations formula

#### Added more flexible serial dilutions suitable dilutions

#### Added more flexible step in between plating step to enable addition of antibiotics: Chloramphenicol into molten SDA based on suitability

### [ภาษาไทย] ขั้นตอนการปฏิบัติงานสำหรับการนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่เจริญเติบโตโดยใช้ออกซิเจน (TAMC) ในผลิตภัณฑ์สมุนไพร

#### ***วัตถุประสงค์***

เพื่อการวิเคราะห์จำนวนจุยีสต์และราทั้งหมดในผลิตภัณฑ์สมุนไพรสำเร็จรูป ด้วยวิธี pour 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 Sabouraud dextrose Agar (SDA)
     1. [แสดง ชื่อและสูตรส่วนประกอบของแต่ละ Culture media ที่ใช้]
     2. …
  3. จานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ
  4. ปิเปตที่ปราศจากเชื้อ
  5. ตู้บ่มเชื้อ (30-35°C)
  6. เครื่องบดผสมหรือเครื่องปั่นปราศจากเชื้อ
  7. เครื่องนับโคโลนี
  8. Autoclave
  9. ตู้ปลอดเชื้อ Biosafety cabinet
  10. เครื่องแก้วปราศจากเชื้อ
  11. Water bath
  12. Vertex mixers

#### ***ขั้นตอนการปฏิบัติ***

* 1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายเจือจางที่ปราศจากเชื้อ
     1. [ ชั่ง SDA ... 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. เติมสารละลายเจือจางที่ปราศจากเชื้อ … มิลลิลิตร (เพื่อเตรียมเป็น 1:10 dilution)
     3. บดผสมในเครื่องปั่น/บด เป็นเวลา … นาที
  3. Serial Dilution
     1. เตรียมสารละลายเจือจางแบบ 10 เท่า (10^-1 ถึง 10^-6)
     2. ใช้ตัวอย่างที่บดผสมแล้ว … มิลลิลิตร และสารละลายเจือจางที่ปราศจากเชื้อ … มิลลิลิตร   
        สำหรับแต่ละ ความเจือจาง

Sample

10^-1

10^-2

… ml

* 1. การเพาะเชื้อบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ
     1. ปิเปตสารละลายจาก แต่ละความเจือจาง 1 มิลลิลิตร ลงบนจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อแยกกัน อย่างน้อย 2 replications
     2. เทอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud Dextrose Agar ที่หลอมเหลว (เย็นลงที่ 45°C ใน water bath) 15-20 มิลลิลิตร

Sample dilutions

2 replications

Control solution

2 replications

1 ml

1 ml

1 ml

1 ml



15-20 ml

Molten SDA



15-20 ml

Molten SDA

* + 1. ผสมเบาๆ เพื่อให้อาหารเลี้ยงเชื้อและตัวอย่างผสมกัน และปล่อยให้แข็งตัว
    2. ทำขั้นตอน 5.4.1 ถึง 5.4.3 เช่นเดียวกันโดย ใช้ [...] เป็น control แทนสารละลายตัวอย่าง
  1. การบ่มเชื้อ
     1. บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 20-25 °C เป็นเวลา 5-7 วัน
  2. การนับโคโลนี
     1. หลังการบ่มเชื้อ เลือกนับจำนวนโคโลนีบนจานที่มีโคโลนีไม่เกิน 50 โคโลนี

กรณีพบโคโลนีแผ่กว้าง (Spreader) ให้นับ 1 กลุ่มเป็น 1 โคโลนี ถ้าโคโลนีติดกันให้นับเป็น 1 โคโลนี

* + 1. คำนวณค่า TAMC ต่อกรัมของตัวอย่าง ตามข้อ 6. และบันทึกผลตาม ข้อ 8.

#### ***การคำนวณ***

TYMC (CFU/g) = จำนวนโคโลนี × ค่าการเจือจาง / น้ำหนักตัวอย่าง

#### ***เกณฑ์การยอมรับ***

[ระบุขีดจำกัด TYMC ที่ยอมรับได้สำหรับผลิตภัณฑ์สมุนไพรตามข้อกำหนดมาตรฐาน]

#### ***การรายงานผล***

ให้รายงานผลเป็นจำนวนแบคทีเรีย cfu/g หรือ ml ของแต่ละ replications ตาม [เอกสาร...]

[บันทึกผลลงในระบบคุณภาพของบริษัท]

กรณี ไม่พบโคโลนีในทุก dilution ที่ทำการวิเคราะห์ ให้ดูที่ dilution ต่ำสุด แล้วนำ 1 คูณด้วย dilution factor ที่ต่ำสุดแล้วรายงานว่า < 1 CFU คูณกลับด้วย dilution นั้น เช่น dilution ที่ทำการวิเคราะห์ คือ 10^-1 และ   
10^-2 และไม่มีโคโลนีขึ้นทุก plate ให้รายงานผลว่า <1 x 10^1 CFU/g or ml หรือ < 10 cfu/g

**หมายเหตุ:** ในแต่ละ sample dilutions ควร ได้ผลวิเคราะห์ไม่แตกต่างกันเกิน ... %   
กรณี ผลวิเคราะห์ไม่แตกต่างกันเกิน ... %, appropriate measurement including investigation should be commenced.

#### ***เอกสารอ้างอิง***

* 1. USP <61> การตรวจสอบทางจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์ที่ไม่ปราศจากเชื้อ: การทดสอบการนับจำนวนจุลินทรีย์
  2. Ph. Eur. 2.6.12 การตรวจสอบทางจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์ที่ไม่ปราศจากเชื้อ: การทดสอบการนับจำนวนจุลินทรีย์
  3. ตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย ปี 2021 supplement 2023 – Appendix 10

#### ***ประวัติการแก้ไข***

[บันทึกประวัติการแก้ไขของ Analytical procedure นี้]