

วิธีการ

1.ศึกษาวิธีและสถานะที่เหมาะสมในการสกัดสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียจากขมิ้นชัน

1.1 ศึกษาวิธีการสกัดที่เหมาะสม

นำวัตถุดิบคือเหง้าขมิ้นชันแห้งที่มีความชื้นไม่เกิน 10% และมีปริมาณเถ้ารวมไม่เกิน 8 % ตามข้อกำหนดมาตรฐานของการผลิตขมิ้นชันของสถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (2544) (วิธีวิเคราะห์ความชื้นและปริมาณเถ้าแสดงในภาคผนวก ข) มาบดให้มีขนาดเล็กลงด้วยเครื่องบด(Blender) ซึ่งนำหนักเริ่มต้นและนำมาสกัดสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธีการสกัด 3 วิธีคือ

1.1.1 วิธีสกัดร้อน (Soxhlet extraction)

นำวัตถุดิบห่อด้วยกระดาษกรองและบรรจุลงใน cellulose thimble จากนั้นบรรจุ cellulose thimble ลงในคอถักของชุด Soxhlet apparatus ต่อ Soxhlet apparatus เข้ากับส่วนบนของขวดก้นกลม เติมตัวทำละลายคือ 95% เอทิลแอลกอฮอล์ลงใน Soxhlet apparatus ให้ท่วม cellulose thimble ตัวทำละลายจะไหลลงมายังขวดก้นกลมด้านล่าง อัตราส่วนของวัตถุดิบต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1 กรัม ต่อ 36 มิลลิลิตร จากนั้นต่อ condenser ที่ควบคุมอุณหภูมิด้วยเครื่องทำความเย็น(Cooling) เข้าที่ปลายด้านบนของชุด Soxhlet apparatus ทำการสกัดเป็นเวลา 12 ชั่วโมง สารที่สกัดได้นำไประเหยเอา 95% เอทิลแอลกอฮอล์ออกโดยใช้เครื่องระเหยระบบสุญญากาศ (Rotary vacuum evaporator) สารสกัดที่ได้เรียกว่า crude ethanol extracts เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ศิริพร, 2523) ทำการทดลอง 2 ขั้ว จากนั้นคำนวณค่าร้อยละของผลผลิตที่ได้

1.1.2 วิธีสกัดเย็น (Maceration)

นำวัตถุดิบใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลายคือ 95% เอทิลแอลกอฮอล์ลงไป อัตราส่วนของวัตถุดิบต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1 กรัม ต่อ 7.5 มิลลิลิตร เขย่าเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพในการสกัด ปิดฝาให้สนิท ควบคุมอุณหภูมิด้วยอ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ที่ 40 องศาเซลเซียส ทำการสกัดเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำสารละลายที่สกัดได้กรองด้วย

กระดาษกรองเบอร์ 4 และเทตัวทำละลายลงในขวดสุญญากาศเพื่อสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง (หรือจนกว่าสีของตัวทำละลายจะใส) และนำสารสกัดที่ได้ไประเหย 95% เอทิลแอลกอฮอล์ออกให้หมดด้วยเครื่องระเหยระบบสุญญากาศ (Rotary vacuum evaporator) สารสกัดที่ได้เรียกว่า crude ethanol extracts เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการทดลอง 2 ครั้ง จากนั้นคำนวณค่าร้อยละของผลผลิตที่ได้

1.1.3 การกลั่นด้วยน้ำ (Hydrodistillation)

นำวัตถุดิบใส่ลงในขวดก้นกลมขนาด 1000 มิลลิลิตรปริมาณ 100 กรัม เติมน้ำลงไป 500 มิลลิลิตร ใส่ boiling chip ลงในขวดก้นกลม ต่อชุดเครื่องกลั่นเข้ากับส่วนบนของขวดก้นกลม ควบคุมอุณหภูมิ condenser ของชุดเครื่องกลั่นด้วยเครื่องทำความเย็น (Cooling) ให้ความร้อนกับพืชวัตถุดิบในขวดก้นกลมด้วยเตาบนวม โดยรักษาระดับความร้อนให้น้ำภายในระเหยอย่างช้าๆ เพื่อป้องกันไม่ให้พืชวัตถุดิบไหม้ รอจนน้ำมันควบแน่นออกมาพร้อมน้ำ กลั่นต่อเนื่องเป็นเวลา 60 ชั่วโมง น้ำมันหอมระเหยที่ได้จะอยู่ส่วนบนของน้ำ แยกโดยไข่น้ำออกจากวาล์วก่อน แล้วจึงไขน้ำมันหอมระเหยออก เติม Sodium sulfate anhydrous แล้วเขย่าตั้งทิ้งไว้เพื่อให้ Sodium sulfate anhydrous จับกับน้ำ แยกน้ำมันหอมระเหยเก็บไว้ในขวดสีชา จากนั้นคำนวณค่าร้อยละของผลผลิตที่ได้

1.2 หลักเกณฑ์ที่ใช้ในการคัดเลือกวิธีที่เหมาะสมในการสกัดสารจากขมิ้นชัน

สารสกัดและน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการสกัดทั้ง 3 วิธี จะนำไปวิเคราะห์สารองค์ประกอบร่วมกับน้ำมันหอมระเหยขมิ้นชันที่มีจำหน่ายในท้องตลาด โดยวิธี แก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโตรเมทรี (Gas Chromatography/ Mass spectrometry; GC-MS) โดยส่งวิเคราะห์ที่บริษัท ห้องปฏิบัติการกลางตรวจสอบผลิตภัณฑ์เกษตรและอาหาร จำกัด (LCFA) ตามสถานะที่เหมาะสม (Caichompoo, 1999) ดังนี้

คอลัมน์	capillary column DB-5 (0.25 มิลลิเมตร*30 เมตร)
ความหนาของฟิล์ม	0.25 ไมโครเมตร
แก๊สตัวพา	Helium
อัตราการไหล	1 มิลลิลิตร/นาที
โปรแกรมอุณหภูมิ	เริ่มต้น 50 องศาเซลเซียสและสุดท้าย 300 องศาเซลเซียส

โหมคการนิจ	แบบไม่ทิ้งสาร(splitless)
ปริมาณการนิจ	1 ไมโครลิตร

จากนั้นนำสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการสกัดทั้ง 3 วิธี ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* ร่วมกับน้ำมันหอมระเหยมีนชันที่มีจำหน่ายในท้องตลาดจำนวน 3 ยี่ห้อ โดยวิธี Broth dilution method เหน้กัการคัดเลือกวิธีสกัดที่เหมาะสม พิจรณาจาก ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียร่วมกับค่าอัตราส่วนของร้อยละของผลผลิตที่ได้กับต้นทุนการผลิต

1.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีสกัดที่คัดเลือกได้

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีสกัดที่คัดเลือกได้ โดยปัจจัยที่ศึกษาถึ่ชนิตตัวทำละลายคือ ปิโตรเลียมอีเทอร์และ 95% เอทิลแอลกอฮอล์ และระยะเวลาในการสกัด 6 ชั่วโมง, 12 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง วางแผนการทดลองแบบ factorial ได้สิ่งทดลองทั้งหมด 6 สิ่งทดลอง จากนั้นนำทุกสิ่งทดลองที่ได้จากการวางแผนมาวิเคราะห์หาปริมาณสารองค์ประกอบหลักโดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปคโตรเมทรี (Gas Chromatography/ Mass spectrometry;GC-MS) และคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมจากสิ่งทดลอง (treatment) ที่ให้ปริมาณสารองค์ประกอบหลักสูงสุด ร่วมกับให้ค่าอัตราส่วนของร้อยละของผลผลิตที่ได้กับต้นทุนการผลิตสูงสุด

2. ศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากขมิ้นชัน

2.1 เชื้อแบคทีเรียสำหรับทดสอบ (จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย)

ในขั้นตอนการคัดเลือกวิธีที่เหมาะสมในการสกัดสารจากขมิ้นชันจะนำสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการสกัดทั้ง 3 วิธี ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* ร่วมกับน้ำมันหอมระเหยมีนชันที่มีจำหน่ายในท้องตลาดจำนวน 3 ยี่ห้อ ส่วนขั้นตอนการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีสกัดที่คัดเลือกได้จะนำสารสกัดที่ได้จากสภาวะที่เหมาะสมของวิธีสกัดที่คัดเลือกได้ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อกับแบคทีเรีย 10 ชนิด ดังต่อไปนี้

- *Escherichia coli* (Human stool isolated) TISTR 073
- *Escherichia coli* (Human stool isolated) TISTR 074
- *Escherichia coli* O157:H7
- *Escherichia coli* (Human stool isolated) TISTR 780
- *Staphylococcus lugdunensis* (Axillary lymph node isolated)
- *Staphylococcus epidermidis* (Nose isolated)
- *Staphylococcus simulans* (Human skin isolated)
- *Staphylococcus capitis* (Human skin isolated)
- *Staphylococcus auricularis* (Human external ear isolated)
- *Salmonella* spp.

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้รับมาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยในลักษณะหลอดเชื้อแห้งแข็งไปทำการเพาะเชื้อ (Revival of freeze-dried cultures) (วิธีเพาะเชื้อแสดงในภาคผนวก จ) จากนั้นคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวจากจานอาหารแข็ง Nutrient agar (NA) ถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar ชนิดเอียง (PCA slant) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อนำไปทดสอบทางชีวเคมีสำหรับแต่ละเชื้อ (วิธีทดสอบแสดงในภาคผนวก ง) จากนั้นเก็บเชื้อจุลินทรีย์ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar ชนิดเอียง (NA slant) ที่ผ่านการยืนยันผลด้วยการทดสอบทางชีวเคมีแล้วในตู้เย็น 10 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นก่อนทำการทดลองแต่ละครั้งจะนำหลอดเก็บเชื้อจุลินทรีย์ออกมาจากตู้เย็น ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมงก่อนเจียวเชื้อโดยวิธี Streak plate ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ (Selective media) สำหรับเชื้อแต่ละชนิดที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อโดยเตรียมทั้งไว้ข้ามคืนและมีผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแห้งสนิท สำหรับเชื้อ *Escherichia coli* ใช้อาหาร Eosine methylene blue agar (EMB) เชื้อ *Staphylococcus* ใช้อาหาร Mannitol salt phenol red agar (MS) และเชื้อ *Salmonella* spp. ใช้อาหาร (XLD) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะเพียงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงต่อเนื่องกัน 2 ครั้งและถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar ชนิดเอียง (NA slant) อีก 1 ครั้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อใช้

เป็นกล้าเชื้อ (inoculum) โดยเชื้อ *Staphylococcus* ใช้กล้าเชื้ออายุ 18 ชั่วโมงสำหรับเชื้อ *Escherichia coli* และ *Salmonella* spp. ใช้กล้าเชื้ออายุ 24 ชั่วโมง

2.2 การเตรียมสารสกัดสำหรับทดสอบ

นำสารสกัดที่ได้จากการสกัดขมิ้นชันทั้ง 3 วิธีเตรียมตามความเข้มข้นที่เหมาะสมโดยใช้ Dimethylsulfoxide (DMSO) เป็นตัวทำละลาย ทำการทดสอบร่วมกับน้ำมันหอมระเหยขมิ้นชันที่มีจำหน่ายในท้องตลาด ที่เตรียมในความเข้มข้นที่เท่ากัน

2.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันต่อเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี Broth dilution method (Baron and Finegold, 1990)

เตรียมหลอดทดลอง จำนวน 12 หลอด ทำการปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth ที่ผ่านการนิ่งมาเชื้อ จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองหลอดที่ 2-11 สำหรับหลอดที่ 12 เติมน้ำอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปต 1 มิลลิลิตรของสารสกัดลงในหลอดทดลองที่ 1 และหลอดที่ 2 ผสมสารหลอดที่ 2 ให้เข้ากันจึงปิเปต 1 มิลลิลิตรของหลอดที่ 2 ลงในหลอดที่ 3 และทำซ้ำวิธีการเดียวกันจนถึงหลอดที่ 10 จากนั้นเจือจางเชื้อที่ใช้ทดสอบด้วยน้ำกลั่นให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland No.5 ซึ่งจะมีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1.5×10^8 cfu/ml ปรับให้เชื้อทดสอบมีปริมาณ 1×10^6 cfu/ml โดยเจือจาง 0.1 มิลลิลิตรของเชื้อทดสอบด้วย 19.9 มิลลิลิตร ของ Nutrient Broth (Baron, 1990) นำเชื้อที่ได้ไปทำการเจือจางด้วยระดับการเจือจาง(dilution)ที่เหมาะสมและทำการกระจายเชื้อให้ทั่วจานเลี้ยงเชื้อโดยใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมโดยวิธี spread plate จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อตรวจสอบจำนวนเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ จากนั้นปิเปตเชื้อทดสอบ 1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองทุกหลอดยกเว้นหลอดที่ 12 เป็น broth control จากนั้นทำการบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยดูว่าหลอดทดลองใดที่เชื้อไม่เจริญสารละลายในหลอดจะมีลักษณะใสและไม่มีตะกอนของเชื้อที่ก้นหลอด ถือว่าความเข้มข้นที่หลอดนั้นเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการต้านการเจริญของเชื้อ (MICs; Minimum Inhibitory Concentrations) ทำการปิเปต 0.01 มิลลิลิตรของหลอดทดลองที่ไม่มีการเจริญของเชื้อ นำมาถ้ายเชื้อโดยวิธี streak plate ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar ที่ผ่านการนิ่งมาเชื้อ จากนั้นบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยดูว่าที่

ความเข้มข้นใดเชื้อไม่เจริญถือว่าเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์(MBCs; Minimum Bactericidal Concentrations)

3. วิเคราะห์หาปริมาณสารองค์ประกอบหลักของสารสกัดจากขมิ้นชันโดยวิธี แก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโตรเมตรี (Gas Chromatography/ Mass spectrometry; GC-MS)

ในขั้นตอนการคัดเลือกวิธีที่เหมาะสมในการสกัดสารจากขมิ้นชันจะนำสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการสกัดทั้ง 3 วิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารองค์ประกอบร่วมกับน้ำมันหอมระเหยขมิ้นชันที่มีจำหน่ายในท้องตลาดและขั้นตอนการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีสกัดที่คัดเลือกได้จะนำสารสกัดที่ได้จากสภาวะที่เหมาะสมของวิธีสกัดที่คัดเลือกได้วิเคราะห์หาปริมาณสารองค์ประกอบโดยวิธี GC-MS โดยส่งวิเคราะห์ที่บริษัท ห้องปฏิบัติการกลางตรวจสอบผลิตภัณฑ์เกษตรและอาหาร จำกัด (LCFA) ตามสภาวะเดียวกับข้อ 1.2

4. ดำรวจพฤติกรรมและความต้องการของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์เจลทำความสะอาดมือ

4.1 ทำการศึกษาข้อมูลเบื้องต้นของผู้บริโภค ด้วยวิธีการอภิปรายกลุ่ม (Focus group discussion)

ทำการอภิปรายกลุ่มกับผู้บริโภคจำนวน 8-10 คน โดยคัดเลือกผู้ที่เคยใช้ผลิตภัณฑ์เจลทำความสะอาดมือหรือผู้ที่มีแนวโน้มอาจจะใช้เจลทำความสะอาดมือโดยทำการศึกษาข้อมูลดังต่อไปนี้

4.1.1 พฤติกรรมเกี่ยวกับการใช้ผลิตภัณฑ์เจลทำความสะอาดมือ

โดยถามคำถามเกี่ยวกับรูปแบบและลักษณะของผลิตภัณฑ์เจลทำความสะอาดมือที่เคยใช้,วิธีการใช้, ความถี่ในการใช้, ยี่ห้อของผลิตภัณฑ์ที่เคยใช้หรือที่ใช้อยู่เป็นประจำ, เหตุผลในการใช้, ปัจจัยในการเลือกซื้อ, ค่าใช้จ่ายในการซื้อ/ครั้ง และปัญหาในการใช้ผลิตภัณฑ์

4.1.2 ข้อมูลเกี่ยวกับความต้องการและการพัฒนาผลิตภัณฑ์เจลทำความสะอาดมือที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากขมิ้นชัน

ถามคำถามเกี่ยวกับความต้องการในด้านคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ เช่น ลักษณะของผลิตภัณฑ์, ความต้องการที่จะให้ผสมสารชนิดอื่นเพื่อเพิ่มคุณภาพ, สีของผลิตภัณฑ์, กลิ่น, ภาชนะบรรจุ, ราคา, ความสนใจซื้อผลิตภัณฑ์, ข้อเสนอแนะ รวมถึงทัศนคติและความคิดเห็นที่มีต่อผลิตภัณฑ์

4.1.3 ข้อมูลเกี่ยวกับการทดลองใช้ผลิตภัณฑ์เจลทำความสะอาดมือที่มีจำหน่ายในท้องตลาด

คัดเลือกผลิตภัณฑ์เจลทำความสะอาดมือซึ่งมีวางจำหน่ายในท้องตลาดจำนวน 5 ยี่ห้อให้ทดลองใช้ และให้เปรียบเทียบคุณลักษณะต่างๆของผลิตภัณฑ์เจลทำความสะอาดมือแต่ละยี่ห้อว่ามีลักษณะและให้ความรู้สึกในการใช้แตกต่างกันอย่างไรบ้าง เพื่อให้ทราบถึงคุณลักษณะที่ดีและไม่ดีของผลิตภัณฑ์เจลทำความสะอาดมือแต่ละยี่ห้อ

4.2 ทำการสำรวจผู้บริโภคกลุ่มเป้าหมายโดยการออกแบบสอบถาม

นำผลจากการอภิปรายกลุ่มมาเป็นแนวทางในการออกแบบสอบถามเพื่อหาผู้บริโภคกลุ่มเป้าหมายและเพื่อให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับพฤติกรรมการใช้ผลิตภัณฑ์เจลทำความสะอาดมือและความต้องการของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์เจลทำความสะอาดมือที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากขมิ้นชัน โดยการออกแบบสอบถามกับผู้บริโภค โดยมีขั้นตอนการศึกษาดังนี้

4.2.1 ออกแบบสอบถามและทดลองใช้แบบสอบถามกับกลุ่มตัวอย่าง 10 คนเพื่อทดสอบข้อบกพร่องของคำถามที่ใช้ถามในแบบสอบถามและทำการปรับปรุงแบบสอบถามให้สมบูรณ์

4.2.2 ทำการสำรวจผู้บริโภคโดยใช้แบบสอบถามกับกลุ่มตัวอย่างจำนวน 30 คน ซึ่งข้อมูลที่ได้จะนำไปใช้เป็นส่วนสำคัญของประชากรที่คาดว่าจะสนใจใช้ผลิตภัณฑ์ เพื่อแทนค่าในสูตรการคำนวณหาขนาดของกลุ่มตัวอย่าง

4.2.3 คำนวณขนาดของกลุ่มตัวอย่างจากสูตร (Cooper, 1998)

$$n = Z^2 pq / E^2$$

- n = ขนาดของกลุ่มตัวอย่าง
 p = สัดส่วนของประชากรที่คาดว่าจะสนใจซื้อผลิตภัณฑ์
 q = 1-p
 E = ค่าความคลาดเคลื่อนที่ยอมให้เกิดขึ้นได้ (ร้อยละ 5)
 Z = ความเชื่อมั่นที่กำหนด (ร้อยละ 95) = 1.96

4.2.4 ทำการสำรวจผู้บริโภคโดยใช้แบบสอบถาม (แสดงในภาคผนวก ก) ตามขนาดของกลุ่มตัวอย่างที่คำนวณได้จากข้อ 4.2.3 แบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็นกลุ่มตามช่วงอายุตั้งแต่ 15-19 ปี, 20-30 ปี, 31-40 ปี, 41-50 ปีและ 50 ปีขึ้นไป ใช้การวิเคราะห์ข้อมูลในเชิงพรรณนา (Descriptive analysis) โดยนำข้อมูลที่ได้จากแบบสอบถามมาแจกแจงนับความถี่ของแต่ละรายการ นำเสนอข้อมูลในรูปตารางเปรียบเทียบร้อยละ

5. พัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์เจลทำความสะอาดมือที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากขมิ้นชัน

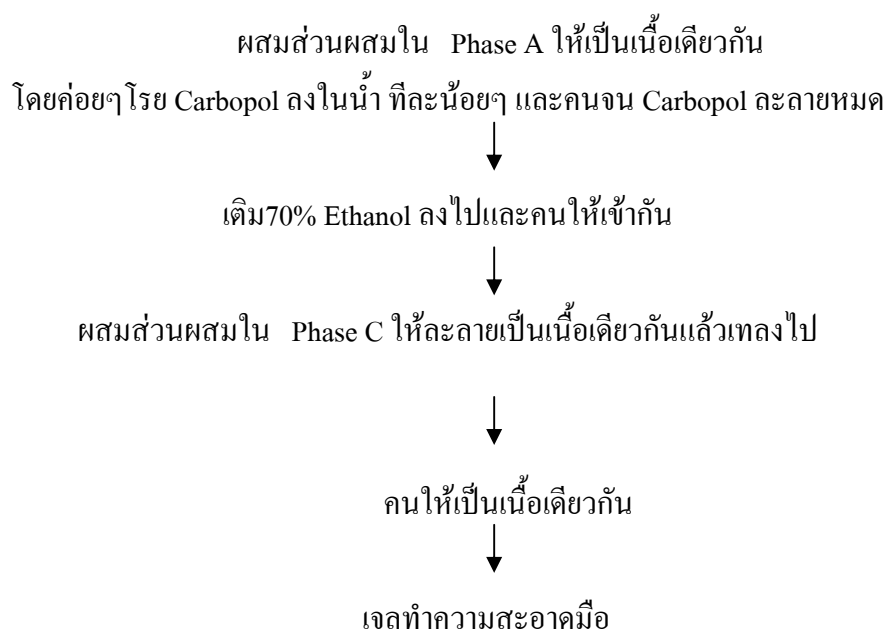
5.1 ศึกษาสูตรพื้นฐานของผลิตภัณฑ์

ทำการคัดเลือกส่วนผสมหลักจากสูตรของผลิตภัณฑ์เจลทำความสะอาดมือมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เจลทำความสะอาดมือสูตรพื้นฐานซึ่งมีส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ส่วนประกอบของสูตรพื้นฐานของผลิตภัณฑ์เจลทำความสะอาดมือ (%w/w)

Phase	สารเคมี	หน้าที่	ร้อยละ
A	น้ำ	ตัวทำละลาย	43.55
	Carbopol	สารก่อเจล	0.40
B	70% Ethanol	ฆ่าเชื้อ	50.00
C	น้ำ	ตัวทำละลาย	11.6
Triethanolamine		ปรับ pH ให้เป็นกลาง	0.40

ขั้นตอนการผลิตผลิตภัณฑ์เจลทำความสะอาดมือ (แผนภาพการผลิตแสดงในภาคผนวก ข)



ภาพที่ 1 กรรมวิธีการผลิตผลิตภัณฑ์เจลทำความสะอาดมือ

ที่มา: ดัดแปลงจากการผลิตผลิตภัณฑ์เจลทำความสะอาดมือของโครงการส่วนพระองค์สวนจิตรดา
(2546)

จากนั้นนำสูตรพื้นฐานที่ผลิตได้มาวัดค่าคุณภาพทางประสาทสัมผัส โดยใช้แบบทดสอบ 9 – point Hedonic scale สอบถามความชอบที่มีต่อผลิตภัณฑ์ในด้านกลิ่นแอลกอฮอล์, ความหนืดของเจล, การซึมซาบเข้าสู่ผิวของเนื้อเจล, ความเนียนนุ่มมือหลังการใช้และความชอบโดยรวมและแบบทดสอบ Just about right สอบถามทิศทางการปรับปรุงผลิตภัณฑ์กับผู้ทดสอบจำนวน 30 คน

5.2 การพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์เจลทำความสะอาดมือ

นำสูตรพื้นฐานที่ได้ในข้อ 5.1 มาปรับสูตรเพื่อให้ได้สูตรที่เหมาะสม โดยพิจารณาจากผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสว่ามีคุณลักษณะใดบ้างที่ผู้ทดสอบต้องการให้ทำการปรับปรุง จากนั้นทำการคัดเลือกปัจจัยในสูตรของผลิตภัณฑ์เจลทำความสะอาดมือที่มีผลต่อคุณลักษณะที่ต้องการปรับปรุงมาวางแผนการทดลองที่เหมาะสมเพื่อปรับระดับของปัจจัยในสูตรของผลิตภัณฑ์ให้เหมาะสมโดยการทดสอบความชอบที่มีต่อผลิตภัณฑ์โดยใช้แบบทดสอบ 9 – point Hedonic scale และสอบถามทิศทางการปรับปรุงผลิตภัณฑ์ด้วยแบบทดสอบ Just about right กับผู้ทดสอบจำนวน 30 คน

5.3 ศึกษาค่าคุณภาพของผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด

ทำการตรวจสอบคุณภาพด้านเคมีของผลิตภัณฑ์เจลทำความสะอาดมือที่มีจำหน่ายในท้องตลาด ที่ผู้บริโภคนิยมเลือกซื้อมากที่สุดจากแบบสอบถามในข้อ 4.2 โดยการวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่อง pH Meter และนำมากำหนดช่วงค่าคุณภาพด้านเคมีเพื่อพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์เจลทำความสะอาดมือให้มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วงของท้องตลาด

5.4 การเติมสารสกัดขมิ้นชันใส่ในผลิตภัณฑ์เจลทำความสะอาดมือ

กำหนดระดับปริมาณของสารสกัดขมิ้นชันที่ใส่ในผลิตภัณฑ์เจลทำความสะอาดมือ สูตรที่ทำการปรับปรุงคุณภาพด้านกายภาพและคุณภาพด้านเคมีแล้วจากค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (MBCs; Minimum Bactericidal Concentrations) จากการทดสอบด้วยวิธีโดยวิธี Broth dilution method

5.5 การพัฒนากลิ่นของผลิตภัณฑ์เจลทำความสะอาดมือที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากขมิ้นชัน

คัดเลือกกลิ่นที่ผู้บริโภคต้องการมากที่สุดจากการทำแบบสอบถามในข้อ 4.2 และ ทำการศึกษาชนิดและอัตราส่วนที่เหมาะสมโดยการคัดเลือกกลิ่นที่ผู้บริโภคต้องการมากที่สุดมาจำนวน 3 กลิ่น เพื่อนำมาผลิตเจลทำความสะอาดมือ 3 สูตร โดยเติมลงในผลิตภัณฑ์ที่ระดับร้อยละ 0.5 จากนั้นทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี 9 – point Hedonic scale ให้ผู้ทดสอบให้คะแนนความชอบที่มีต่อกลิ่นและให้คะแนนความรู้สึกต่อความแรงของกลิ่นด้วยแบบทดสอบ Just about right เพื่อคัดเลือกกลิ่นที่ผู้บริโภคต้องการมากที่สุดให้เหลือเพียง 1 กลิ่นที่จะนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์และปรับอัตราส่วนของกลิ่นที่ใช้ในผลิตภัณฑ์ให้เหมาะสม

6. การศึกษาค่าคุณภาพของผลิตภัณฑ์เจลทำความสะอาดมือที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากขมิ้นชันที่ผ่านการพัฒนาแล้ว

ทำการผลิตผลิตภัณฑ์เจลทำความสะอาดมือที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากขมิ้นชันตามสูตรที่พัฒนาได้ แล้วนำมาวัดค่าคุณภาพทางกายภาพ คุณภาพทางเคมี คุณภาพทางจุลินทรีย์และทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์ ดังนี้

6.1 คุณภาพทางกายภาพ

6.1.1 วัดความหนืดโดยใช้เครื่อง Brookfield Viscometer Model DV II

6.1.2 วัดค่าสีด้วยเครื่อง Spectrophotometer ยี่ห้อ MINOLTA รุ่น CM-3500d

6.2 คุณภาพทางเคมี (มอก. 152-2539)

6.2.1 วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่อง pH Meter

6.3 คุณภาพทางจุลินทรีย์ (มอก. 152 - 2539)

6.3.1 จำนวนแบคทีเรีย ยีสต์ และราทั้งหมด (Total colony count) น้อยกว่า 1000 โคโลนีต่อกรัมหรือลูกบาศก์เซนติเมตร

6.3.2 Coliform bacteria โดยวิธี MPN น้อยกว่า 10 MPN ต่อกรัมหรือลูกบาศก์เซนติเมตร

6.3.3 *Staphylococcus aureus*. ต้องไม่พบ

6.3.4 *Salmonella* spp. ต้องไม่พบ

6.3.5 *Escherichia coli* ต้องไม่พบ

6.4 ทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์

ทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์ด้วยวิธี Cooling – Thaw cycle โดยดัดแปลงวิธีจาก พิมพ์ (2540) โดยนำผลิตภัณฑ์มาเก็บที่สภาวะ Cooling ที่อุณหภูมิ 1 °C นาน 24 ชั่วโมง และ Thaw ที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 24 ชั่วโมง นับเป็น 1 รอบ ทำซ้ำด้วยวิธีเดียวกันจำนวน 6 รอบ ดูลักษณะปรากฏและการแยกชั้น

7. ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียบนมือของผลิตภัณฑ์เจลทำความสะอาดมือที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากขมิ้นชันที่ผ่านการพัฒนาแล้ว

หาเปอร์เซ็นต์การลดลงของเชื้อแบคทีเรียบนมือภายหลังการใช้ผลิตภัณฑ์เจลทำความสะอาดมือที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากขมิ้นชันที่ผ่านการพัฒนาแล้วเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์เจลทำความสะอาดมือสูตรพื้นฐานที่ไม่มีสารสกัดจากขมิ้นชันด้วยวิธี glove juice method ซึ่งดัดแปลงวิธีจาก ASTM (1987) โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

7.1 เชื้อแบคทีเรียสำหรับทดสอบ

นำเชื้อ *Serratia marcescens* (TISTR 1354) ที่ได้รับมาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยในลักษณะหลอดเชื้อแห้งแข็งไปทำการเพาะเชื้อ (Revival of freeze-dried cultures) (วิธีเพาะเชื้อแสดงในภาคผนวก จ) หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกลโคโลนีสีแดงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA) มา 1 โคโลนี
 ถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar ชนิดเอียง (NA slant) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศา
 เซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อนำไปศึกษาโดยการย้อมสีแกรม (วิธีย้อมสีแกรมแสดงใน
 ภาคผนวก จ) ซึ่งเชื้อ *Serratia marcescens* จัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) ลักษณะ
 เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่ง (bacillus) จากนั้นเก็บเชื้อจุลินทรีย์ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar
 ชนิดเอียง (NA slant) ที่ผ่านการยืนยันผลด้วยการย้อมสีแกรมแล้วในตู้เย็น 10 องศาเซลเซียส
 หลังจากนั้นก่อนทำการทดลองแต่ละครั้งจะนำหลอดเก็บเชื้อจุลินทรีย์ออกมาจากตู้เย็น ตั้งทิ้งไว้
 ประมาณ 1 ชั่วโมงก่อนจะเชื้อโดยวิธี Streak plate ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar
 (TSA) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อโดยเตรียมทิ้งไว้ข้ามคืนและมีผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแห้งสนิท จากนั้น
 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ
 บริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA) เชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB)
 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงต่อเนื่องกัน 2 ครั้งและถ่ายเชื้อลงใน
 อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar ชนิดเอียง (NA slant) อีก 1 ครั้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซล
 เซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ (inoculum)

7.2 การหาปริมาณจุลินทรีย์ปนเปื้อนเริ่มต้น

ใช้ผู้ทดสอบทั้งสิ้น 6 คนในการทดลองโดยแบ่งเป็นการทดสอบผลิตภัณฑ์เจลทำความสะอาด
 สะอาดมือสูตรที่พัฒนาได้และผลิตภัณฑ์เจลทำความสะอาดสะอาดมือสูตรพื้นฐานที่ไม่ได้เติมสารสกัด
 ขมิ้นชันอย่างละ 3 คน โดยผู้ทดสอบทุกคนต้องหยุดการใช้ผลิตภัณฑ์ล้างมือที่มีสารที่มีฤทธิ์ทำลาย
 จุลินทรีย์ก่อนการทดลองอย่างน้อย 1 สัปดาห์ เพื่อเป็นการคงสภาพของจุลินทรีย์ที่อยู่บนมือ
 ตามปกติ เจือจางเชื้อด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อจนมีปริมาณเซลล์เท่ากับ 10^8 CFU/มิลลิลิตร โดยเทียบ
 กับ McFarland no. 0.5 (Victor, 1980) (วิธีเตรียมแสดงในภาคผนวก ค) และปรับปริมาณเชื้อเริ่มต้น
 ที่ใช้ให้เท่ากับ 10^6 CFU/มิลลิลิตรโดยการเจือจางเชื้อด้วย phosphate buffer ที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำ
 เชื้อที่ได้ไปทำการเจือจางด้วยระดับการเจือจาง (dilution) ที่เหมาะสมและทำการกระจายเชื้อให้ทั่ว
 จานเลี้ยงเชื้อโดยใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมโดยวิธี spread plate จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศา
 เซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อตรวจสอบจำนวนเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ เริ่มต้นการทดลองให้ผู้
 ทดสอบล้างมือด้วยสบู่ที่ไม่มีส่วนผสมของสารที่มีฤทธิ์ทำลายจุลินทรีย์จากนั้นหยดซัสเพนชันเชื้อ 5
 มิลลิลิตรลงบนมือผู้ทดสอบให้ผู้ทดสอบถูมือให้เชื้อกระจายทั่วมือทั้ง 2 ข้างเป็นเวลา 45 วินาทีและ
 ทิ้งให้แห้ง 1 นาที สวมถุงพลาสติกกลบนมือของผู้ทดสอบและเท surfactant buffer ที่ฆ่าเชื้อแล้ว

(วิธีเตรียมแสดงในภาคผนวก ก) ลงไป 75 มิลลิลิตร นวดมือภายในสารละลายภายในถุงพลาสติก 60 วินาที ทำการเจือจางสารละลายตัวอย่างด้วย phosphate buffer ให้มีปริมาณเซลล์อยู่ในช่วง 25-250 CFU/มิลลิลิตร ปิเปตซ์สเฟนชั้นตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตรมา spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงจึงนำมานับจำนวนโคโลนี

7.3 การหาปริมาณจุลินทรีย์หลังการใช้ผลิตภัณฑ์เจลทำความสะอาดมือสูตรที่พัฒนาได้เปรียบเทียบกับสูตรพื้นฐาน

ให้ผู้ทดสอบล้างมือด้วยสบู่ที่ไม่มีส่วนผสมของสารที่มีฤทธิ์ทำลายจุลินทรีย์ จากนั้นหยดสเฟนชั้นเชื้อ 5 มิลลิลิตรลงบนมือผู้ทดสอบให้ผู้ทดสอบถูมือให้เชื้อกระจายทั่วมือทั้ง 2 ข้างเป็นเวลา 45 วินาทีและทิ้งให้แห้ง 1 นาที หยดเจลทำความสะอาดมือลงบนมือ 3 มิลลิลิตรให้อาสาสมัครถูมือให้เจลทำความสะอาดมือกระจายทั่วมือทั้ง 2 ข้างเป็นเวลา 45 วินาทีและทิ้งให้แห้ง 5 นาที สวมถุงพลาสติกลงบนมือของผู้ทดสอบแล้วทำการเก็บตัวอย่างและเพาะเชื้อเหมือนวิธีการในข้อ 7.2 หลังจากนั้นทำการทดลองซ้ำ 10 ครั้งโดยแต่ละครั้งของการล้างมือให้เวลาห่างกัน 5 นาที

8. ศึกษาการยอมรับของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์เจลทำความสะอาดมือที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากขมิ้นชันที่ผ่านการพัฒนาแล้ว

นำผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการพัฒนาแล้วทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคด้วยวิธี Home Use Test กับผู้บริโภคกลุ่มเป้าหมาย โดยให้ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ไปทดลองใช้เป็นเวลา 1 สัปดาห์และสอบถามข้อมูลทั่วไปของผู้บริโภค, การยอมรับของผู้บริโภคและทดสอบความชอบของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์โดยใช้แบบสอบถาม 9 – point Hedonic scale (ดังแสดงในภาคผนวก ก)

9. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของผลิตภัณฑ์เจลทำความสะอาดมือที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากขมิ้นชันในระหว่างการเก็บรักษา

นำผลิตภัณฑ์เจลทำความสะอาดมือที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากขมิ้นชันที่พัฒนาได้บรรจุในหลอด polyethylene ปริมาณ 40 กรัม มาทำการศึกษาโดยเก็บที่อุณหภูมิห้องและเก็บใน

สภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 35 °C และ 45 °C เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ (1 เดือน) จากนั้นสุ่มตัวอย่าง แล้วนำมาวัดค่าคุณภาพทุกๆ 7 วัน ซึ่งคุณภาพที่ทำการศึกษา ได้แก่

9.1 คุณภาพทางกายภาพ

- วัดความหนืดโดยใช้เครื่อง Brookfield Viscometer Model DV II
- วัดค่าสีด้วยเครื่อง Spectrophotometer ยี่ห้อ MINOLTA รุ่น CM-3500d

9.2 คุณภาพทางเคมี

- วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่อง pH Meter (มอก. 152-2539)

9.3 ทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของผลิตภัณฑ์เจลทำความสะอาดมือที่มี ส่วนผสมของสารสกัดจากขมิ้นชันที่ผ่านการพัฒนาด้วยวิธี Broth dilution method (Baron and Finegold,1990)

9.4 คุณภาพทางประสาทสัมผัส

โดยใช้แบบสอบถาม 9 – point Hedonic scale (แสดงในภาคผนวก ก) ทดสอบ ความชอบของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์ในด้านสี, ความหนืด, การซึมซาบสู่ผิว, กลิ่น, ความชุ่มชื้น ผิวหลังการใช้และความชอบโดยรวม

10. สถานที่ดำเนินงานวิจัย

ภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

11. ระยะเวลาในการดำเนินงานวิจัย

1 กรกฎาคม 2547 – 28 กุมภาพันธ์ 2549