

บทที่ 2

ระเบียบวิธีวิจัย

สารเคมีและอุปกรณ์

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัยนี้ ได้แก่

Tryptic soy agar (TSA, Difco Laboratories Co.Ltd., Bacto®), U.S.A.), Tryptic soy broth (TSB, Difco Laboratories Co. Ltd., Bacto®), U.S.A.), Sodium chloride (NaCl, Merck, U.S.A.), 5.25 % Sodium hypochlorite solution (Clorox Co.Ltd., Clorox®), U.S.A.), Acetic acid (Riedel-de Haen, German), Potassium bromide (Riedel-de Haen, German), Potassium iodide (Labgard, U.S.A.), Sodium carbonate (Merck, U.S.A.), Starch (soluble, Farmitalia carlo erba, U.S.A.), Ethylendiaminetetraacetic acid sodium (Merck, U.S.A.), Disodiumhydrogen phosphate (Merck, U.S.A.), Potassium phosphate monobasic (Carlo erba, Italy), Hydrochloric acid (Baker Inco, U.S.A.) Primary standard sodium thiosulphate, (BDH Chemical, England), Primary standard potassium dichromate, (BDH Chemical, England), Potassium bromate (BDH Chemical, England), Tween 20 (บริษัทศรีจันทร์โอสธ จำกัด, กรุงเทพฯ), Tween 80 (บริษัทศรีจันทร์โอสธ จำกัด, กรุงเทพฯ), Sodium Lauryl Sulphate (บริษัทศรีจันทร์โอสธ จำกัด, กรุงเทพฯ), Sodium hydrogencarbonate (Farmitalia carlo erba, Italy)

อุปกรณ์ที่สำคัญ ได้แก่

pH meter (Orion, U.S.A.), Top-load Balance (Sartorius B3100, A120, Germany), Autoclave (Autosteam Sterillizer H 88 L4D, Biomed Group Co.Ltd., Thailand), UV Spectrophotometer (Shimadzu Corporation UV 1201, Japan), Incubator (WTC Binder Type B 400 No. 88045 7200 : Tuttligen, Germany), Vortex mixer (Scientific Industries INC, Model 6-560 E, U.S.A.), Finn pipette digital 40-200, 200-1000 µl (Labsystem, Finland), ขวดพลาสติก high density

polyethylene สำหรับบรรจุสารละลายที่ทำการศึกษา และอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการทั่วไปอื่นๆ เช่น Hot air oven, Laminar air flow, magnetic stirrer, pipette tip เป็นต้น

วิธีการวิจัย

การศึกษานี้แบ่งลักษณะงานได้เป็น 3 ส่วน ประกอบด้วย

1. การเตรียม การเก็บรักษาสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และการจำลองการใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในสภาวะใช้งาน
2. การวิเคราะห์ทางเคมีและการทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ
3. การประเมินผล จัดทำแนวปฏิบัติในการใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์

1. การเตรียม การเก็บรักษาสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และการจำลองการใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในสภาวะใช้งาน

1.1 การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์

การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ให้ได้ความเข้มข้น 0.5 % และ 1.0 % ในงานวิจัยนี้ทำได้โดย นำสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์เข้มข้น (Clorox®) ปริมาณตามที่กำหนดในตารางที่ 1-9 เติมน้ำกลั่นประมาณ 1 ใน 2 ของปริมาตรทั้งหมดที่ต้องการจะเตรียม เติมน้ำกลั่นอื่นๆในตำรับตามชนิดและปริมาณที่กำหนดในตารางที่ 1-9 ละลายสารต่างๆ ให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรจนครบตามจำนวนที่กำหนดโดยใช้น้ำกลั่น

1.2 การเก็บรักษาสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์

เมื่อเตรียมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์แล้ว นำไปเก็บในขวดพลาสติก high density polyethylene และวางไว้ในที่สว่าง เพื่อนำไปวิเคราะห์ทางเคมีและทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ

1.3 การจำลองการใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในสภาวะใช้งาน

เตรียมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ตามวิธีการในข้อ 1.1 แล้วแบ่งเป็น 2 ส่วน แต่ละส่วนนำไปเก็บในขวดพลาสติก high density polyethylene และวาง

ไว้ในที่สว่าง ส่วนที่ 2 นำไปเติมเชื้อ 4 ชนิด คือ *S. aureus*, *E. coli*, *Ps. aeruginosa* และ *B. subtilis* ทุกวัน จากนั้นนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ

2. การวิเคราะห์ทางเคมีและการทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ

2.1 การวิเคราะห์ทางเคมี ประกอบด้วย

2.1.1 การวัดค่า pH

วัดค่า pH ของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ดำรับต่างๆ ที่กำหนดในตารางที่ 1-5 โดยใช้เครื่อง pH meter ซึ่งการวัดค่า pH ของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์แต่ละดำรับนั้น ทำหลังจากเตรียมเสร็จใหม่ๆ และหลังจากเก็บไว้เป็นเวลา 7 วัน

2.1.2 การหาปริมาณ available chlorine (AvCl_2)

การหาปริมาณ available chlorine (AvCl_2) ของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ดำรับต่างๆ ที่กำหนดในตารางที่ 1-5 โดยใช้วิธี iodometric titration ซึ่งการหาปริมาณ available chlorine (AvCl_2) ของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์แต่ละดำรับนั้น จะทำหลังจากเตรียมเสร็จใหม่ๆ และหลังจากเก็บไว้เป็นเวลา 7 วัน วิธี iodometric titration ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ

การ standardization 0.1 N sodium thiosulphate solution โดยการชั่ง potassium dichromate ประมาณ 210 mg (บันทึกน้ำหนักอย่างแม่นยำ) ละลายในน้ำ 100 ml ใน glass-stoppered flask เหย้าจนละลายหมดเติม potassium iodide 3 g, sodium bicarbonate 2 g, hydrochloric acid 5 ml ลงไปอย่างรวดเร็ว เหย้าให้เข้ากันจนหมด วางไว้ในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาโดยสมบูรณ์ กลั้วจุกแก้วและผนังภายในของ flask ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไป titrate ของปริมาณ iodine อิสระที่ปลดปล่อยออกมาจากสารละลาย โดยใช้สารละลาย sodium thiosulphate ที่ต้องการ standardize เมื่อสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเขียวเหลืองจางๆ เติม starch TS 3 ml จะพบว่าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้ม ให้ทำการ titrate ต่อไปจนกระทั่งสีน้ำเงินเปลี่ยนไปเป็นใสไม่มีสีถือเป็นจุดยุติ ทำ blank เพื่อหาปริมาตรของสารละลาย sodium thiosulphate ที่ใช้สมมูลกับ potassium dichromate ในการทดลอง รายละเอียดผลการ standardize แสดงในภาคผนวก

การหาปริมาณ available chlorine (AvCl_2) โดยการตรวจสอบสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 3.0 ml อย่างแม่นยำใส่ลงใน glass-stoppered flask เจือจางด้วยน้ำกลั่นจำนวน 50 ml, เติม potassium iodide 2 g, 6 N acetic acid 10 ml เขย่าให้เข้ากัน titrate หาปริมาณ iodine อิสระ โดยใช้ 0.1 N sodium thiosulphate solution จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองจางๆ เติม starch TS 3 ml จะพบว่าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้ม titrate ต่อไปจนกระทั่งสีน้ำเงินเปลี่ยนไปเป็นในไม่มีสีถือเป็นจุดยุติ ทำ blank ด้วยเช่นกัน แต่ละชุดทำการวิเคราะห์ 2 ครั้ง และหาค่าเฉลี่ย

2.2 การทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ ประกอบด้วย

2.2.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อมี 2 ชนิด คือ

TSA (tryptic soy agar) ทำได้โดยชั่งผง tryptic soy agar 40 g เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 ml อุ่นและคนตลอดเวลา จนผง tryptic soy agar ละลายหมด ปิดฝาภาชนะ นำไปอบนิ่งใน autoclave เป็นเวลา 20 นาที นำไปเทใน sterile petri dish ซึ่งวางใน laminar air flow โดยเติม plate ละ 25 ml ทิ้งไว้เป็นเวลา 60 นาที ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว ปิดฝา และนำไปใช้ได้

TSB (tryptic soy broth) ทำได้โดยชั่งผง tryptic soy broth 30 g เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 ml อุ่นและคนตลอดเวลา จนผง tryptic soy broth ละลายหมด ปิดฝาภาชนะ นำไปอบนิ่งใน autoclave เป็นเวลา 20 นาที นำไปใส่ใน sterile test tube with screw cap ซึ่งทำใน laminar air flow ตามปริมาณที่ต้องการ และนำไปใช้ได้

2.2.2 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ มี 2 วิธี ดังนี้

Stock culture เตรียมโดยเพาะเลี้ยงเชืบบน TSA และทำ colony isolate ทุกเดือน ทำเชื้อละ 3 plates ขึ้นไป

Test culture เตรียมโดยเลือก colony ที่เหมาะสมจาก stock culture มาเพาะใน TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 18-24 ชั่วโมง และนำไปเพาะลงใน TSB บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 18-24 ชั่วโมง

2.2.3 การทำ correlation graph ระหว่าง light transmittance กับ number of colony on plate count ทำได้โดยนำ test culture ที่เพาะใน TSB มาเจือจางตามลำดับความเข้มข้นดังนี้ คือ 3 : 100, 5 : 100, 7 : 100 และ 9 : 100 โดยใช้ sterile normal saline solution จากนั้นนำไปวัดค่าการผ่านของแสงซึ่งแสดงเป็น % transmittance ที่ 500 nm (ซึ่งเป็นค่าความยาวคลื่นที่ทำการทดสอบกับเชื้อที่ศึกษาทั้ง

หมดแล้ว เลือกค่าความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่สุดคือ 500 nm) ขณะเดียวกันนำเชื้อที่เจือจางอีก 10^6 เท่า ตามลำดับนั้นแล้ว 0.4 ml ไปเพาะบน TSA โดยการเกลี่ยให้ทั่วผิวน้ำของ TSA ซึ่งแห้ง โดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อแล้วคำนวณหาจำนวนเชื้อที่มีชีวิตต่อมิลลิลิตร (cfu / ml) นำไปเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % transmittance กับ cfu / ml ดังแสดงข้อมูลในภาคผนวก

2.2.4 การหาความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำยาฆ่าเชื้อที่สามารถฆ่าเชื้อ (Minimum Incidal Concentration : MIC)

การหาความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำยาฆ่าเชื้อที่สามารถฆ่าเชื้อ (Minimum Incidal Concentration : MIC) ของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ดำรับต่างๆ ที่กำหนดในตารางที่ 6-9 ซึ่งการหาความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำยาฆ่าเชื้อที่สามารถฆ่าเชื้อ (Minimum Incidal Concentration : MIC) ของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์แต่ละดำรับนั้น จะทำหลังจากเตรียมเสร็จใหม่ๆ และหลังจากเก็บไว้เป็นเวลา 0, 3, 7, 14 วัน โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ 4 ชนิด คือ *S. aureus*, *E. coli*, *Ps. Aeruginosa*, *B. subtilis* วิธีการหาค่า MIC ทำได้โดยเตรียมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ตามลำดับต่อไปนี้ 0.5 %, 0.1 %, 0.02 %, 0.004 %, 0.0008 %, 0.00016 % โดยใช้ normal saline เป็น diluent จากนั้นนำสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นต่างๆ ที่เตรียมได้ ใส่ใน test tube with screw cap โดยใส่หลอดละ 1.95 ml และใส่เชื้อชนิดต่างๆ ในปริมาณ 0.05 ml เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบ 10 นาที ดูดสารละลายที่ได้มา 0.2 ml ใส่ใน test tube with screw cap ที่บรรจุ TSB จำนวน 1.8 ml แต่ละความเข้มข้นจะใช้ 3 หลอด ทำเช่นนี้จนครบทุกความเข้มข้น แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C 18-24 ชั่วโมง บันทึกผลโดยดูความขุ่น-ใส ของ TSB ถ้าใสบันทึกผลเป็น negative (-) และถ้าขุ่นบันทึกผลเป็น positive (+) จากนั้นนำไปคำนวณหาค่า MIC โดยความเข้มข้นของหลอดที่ใสเป็นหลอดสุดท้ายของชุดการเจือจาง เป็น MIC ของเชื้อ

ทำ positive control และ negative control ด้วยทุกครั้ง

2.2.5 การทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ (challenge test)

การทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ (challenge test) ของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ดำรับต่าง ๆ ที่กำหนดในตารางที่ 7-9 ซึ่งการทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ (challenge test) ของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอ

ไรท์แต่ละตำรับนั้น จะทำหลังจากเตรียมเสร็จใหม่ๆ และหลังจากเก็บไว้เป็นเวลา 0, 3, 7, 14 วัน โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ 4 ชนิด คือ *S. aureus*, *E. coli*, *Ps. Aeruginosa*, *B. subtilis* วิธีการทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ (challenge test) ทำได้โดย นำสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ บรรจุในขวดพลาสติก high density polyethylene แล้วเติมเชื้อทั้ง 4 ชนิด ทุกวัน วันละ 1 ครั้ง เมื่อถึงวันที่ต้องการทดสอบให้นำสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่มีเชื้อผสมอยู่มากใส่ใน test tube with screw cap โดยใส่หลอดละ 1.95 ml จากนั้นเติมเชื้อ *E. coli* จำนวน 0.05 ml เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้จับเวลา 10 นาที เมื่อครบ 10 นาที ดูดสารละลายที่ได้มา 0.5 ml ใส่ใน test tube with screw cap ที่มี 0.1 % sodium thiosulphate ในปริมาณ 4.5 ml จากนั้นดูดสารละลายที่มี 0.1 % sodium thiosulphate สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และเชื้อต่างๆ ในปริมาณ 0.4 ml ใส่ใน TSA plate เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้า plate โดยแต่ละสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ทดสอบจะใช้ 3 plate แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 18-24 ชั่วโมง บันทึกผลโดยการปรากฏของเชื้อบน TSA plate ถ้าไม่มีเชื้อขึ้นบันทึกผลเป็น negative (0) ถ้ามีเชื้อขึ้นหลายชนิดบันทึกผลเป็น positive (+) ถ้ามีเชื้อ *B. subtilis* บันทึกผลเป็น (+B) และถ้ามีเชื้อ *S. aureus*, *E. coli*, *Ps. aeruginosa* บันทึกผลเป็น จำนวน colony

3. การประมวลผล จัดทำแนวปฏิบัติในการใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์

นำผลการวิเคราะห์ทั้งทางเคมีและการทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อมาเปรียบเทียบ โดยทำเป็นตาราง เพื่อจัดทำแนวปฏิบัติในการใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ดีต่อไป

ตารางที่ 2.1 ตำรับของน้ำยามาเชื้อ ที่ใช้ในการศึกษาผลของชนิดของน้ำต่อความคงตัวของไฮโปคลอไรท์

ตำรับที่	Clorox® (g)	EDTA (g)	Water qs. to 100 ml
1	9.5238	-	น้ำประปา
2	9.5238	0.05	น้ำประปา
3	9.5238	-	น้ำกลั่น
4	9.5238	0.05	น้ำกลั่น

ตารางที่ 2.2 ตำรับของน้ำยามาเชื้อที่ใช้ในการศึกษาผลของ KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 และสารช่วยในตำรับ ที่มีต่อความคงตัวของไฮโปคลอไรท์

ตำรับที่	Clorox® (g)	EDTA (g)	SLS (g)	KH_2PO_4 (g)	Na_2HPO_4 (g)	Water qs. to (ml)
5	9.5238	-	-	0.366	0.072	100
6	9.5238	0.05	-	0.366	0.072	100
7	9.5238	-	0.01	0.366	0.072	100
8	9.5238	0.05	0.01	0.366	0.072	100

ตารางที่ 2.3 ตำรับของน้ำยามาเชื้อที่ใช้ในการศึกษาผลของ EDTA และสารช่วยในตำรับ ที่มีต่อความคงตัวของไฮโปคลอไรท์

ตำรับที่	Clorox® (g)	EDTA (g)	SLS (g)	KH_2PO_4 (g)	Na_2HPO_4 (g)	Water qs. to (ml)
9	9.5238	0.005	-	-	-	100
10	9.5238	0.05	-	-	-	100
11	9.5238	0.05	0.01	-	-	100
12	9.5238	0.05	-	0.366	0.072	100
13	9.5238	0.05	0.01	0.366	0.072	100

ตารางที่ 2.4 ตำรับของน้ำยาฆ่าเชื้อที่ใช้ในการศึกษาผลของ **surfactant** และสารช่วยในตำรับ ที่มีต่อความคงตัวของไฮโปคลอไรท์

ตำรับที่	Clorox® (g)	EDTA (g)	SLS (g)	Tween 20 (g)	Tween 80 (g)	Water qs. to (ml)
14	9.5238	-	0.01	-	-	100
15	9.5238	0.05	0.01	-	-	100
16	9.5238	-	0.1	-	-	100
17	9.5238	-	-	0.1	-	100
18	9.5238	-	-	-	0.1	100

ตารางที่ 2.5 ตำรับของน้ำยาฆ่าเชื้อที่ใช้ในการศึกษาผลของ **NaOCl** และสารช่วยในตำรับ ที่มีต่อความคงตัวของไฮโปคลอไรท์

ตำรับที่	Clorox® (g)	EDTA (g)	SLS (g)	Tween 20 (g)	Tween 80 (g)	Water qs. to (ml)
19	9.5238	-	-	-	-	100
20	9.5238	-	0.1	-	-	100
21	9.5238	-	-	0.1	-	100
22	9.5238	-	-	-	0.1	100
23	9.5238	0.005	-	-	-	100
24	19.0476	-	-	-	-	100
25	19.0476	-	0.1	-	-	100
26	19.0476	-	-	0.1	-	100
27	19.0476	-	-	-	0.1	100
28	19.0476	0.005	-	-	-	100

ตารางที่ 2.6 ตำรับของน้ำยาฆ่าเชื้อที่ใช้ในการศึกษาผลของ Surfactant ต่อค่า MIC ของไฮโปคลอไรท์ในเชื้อชนิดต่าง ๆ

ตำรับที่	Clorox® (g)	SLS (g)	Tween 80 (g)	Water qs. to (ml)
29	9.5238	-	-	100
30	9.5238	0.1	-	100
31	9.5238	-	0.1	100

ตารางที่ 2.7 ตำรับของน้ำยาฆ่าเชื้อ (ความเข้มข้นของ NaOCl เท่ากับ 0.5 % และ 1.0 %) ที่ใช้ในการศึกษาผลของสารช่วยในตำรับ

ตำรับที่	Clorox® (g)	Tween 80 (g)	Water qs. to (ml)
32	9.5238	-	100
33	9.5238	0.1	100
34	19.0476	-	100
35	19.0476	0.1	100

ตารางที่ 2.8 ตำรับของน้ำยาฆ่าเชื้อ (ความเข้มข้นของ NaOCl เท่ากับ 0.5 %) ที่ใช้ในการศึกษาผลของสารช่วยในตำรับ

ตำรับที่	Clorox® (g)	SLS (g)	Tween 20 (g)	Tween 80 (g)	EDTA (g)	Water qs. to (ml)
36	9.5238	-	-	-	-	100
37	9.5238	0.1	-	-	-	100
38	9.5238	-	0.1	-	-	100
39	9.5238	-	-	0.1	-	100
40	9.5238	-	-	-	0.005	100

ตารางที่ 2.9 ตำรับของน้ำยาฆ่าเชื้อ (ความเข้มข้นของ NaOCl เท่ากับ 1.0 %) ที่ใช้ในการศึกษาผลของสารช่วยในตำรับ

ตำรับที่	Clorox® (g)	SLS (g)	Tween 20 (g)	Tween 80 (g)	EDTA (g)	Water qs. to (ml)
41	19.0476	-	-	-	-	100
42	19.0476	0.1	-	-	-	100
43	19.0476	-	0.1	-	-	100
44	19.0476	-	-	0.1	-	100
45	19.0476	-	-	-	0.005	100