

บทที่ 3 การออกแบบ และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุที่ใช้ในงานวิจัย

สำหรับวัตถุดิบที่ใช้เตรียมวัสดุผสมในงานวิจัยนี้ประกอบไปด้วยพอลิเมอร์ 6 ชนิดได้แก่ พอลิเอทิลีนความหนาแน่นต่ำ พอลิเอทิลีนความหนาแน่นปานกลาง พอลิเอทิลีนความหนาแน่นสูง พอลิโพรพิลีน พอลิสไตรีน และพอลิไวนิลคลอไรด์ สารยับยั้งแบคทีเรียชนิดไตรโคลซาน และสารตัวเติมชนิดแคลเซียมคาร์บอเนต โดยมีรายละเอียดแสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 คุณลักษณะของวัสดุและสารเคมีในงานวิจัย

วัสดุและสารเคมี	ชื่อการค้า	บริษัท	ข้อมูลเฉพาะ
พอลิเอทิลีนความหนาแน่นต่ำ (Low density polyethylene, LDPE)	1902F	SCG public co. ltd. (ประเทศไทย)	ความหนาแน่นเท่ากับ 0.919 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร อุณหภูมิหลอมเหลวเท่ากับ 110 องศาเซลเซียส อุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้วเป็นคลาซยางเท่ากับ -110 องศาเซลเซียส
พอลิเอทิลีนความหนาแน่นปานกลาง (Medium density polyethylene, MDPE)	M380RU/RUP	Thai polyethylene co., ltd. (ประเทศไทย)	ความหนาแน่นเท่ากับ 0.940 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร อุณหภูมิหลอมเหลวเท่ากับ 126 องศาเซลเซียส อุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้วเป็นคลาซยางเท่ากับ -100 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 3.1 คุณลักษณะของวัสดุและสารเคมีในงานวิจัย (ต่อ)

วัสดุและสารเคมี	ชื่อการค้า	บริษัท	ข้อมูลเฉพาะ
พอลิเอทิลีนความหนาแน่นสูง (High density polyethylene, HDPE)	HD6000F	PTT polymer marketing co. ltd. (ประเทศไทย)	ความหนาแน่นเท่ากับ 0.956 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร อุณหภูมิหลอมเหลวเท่ากับ 131 องศาเซลเซียส อุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้วเป็นคลาซยางเท่ากับ -90 องศาเซลเซียส
พอลิโพรพิลีน (Polypropylene, PP)	401S	SCG public co. ltd. (ประเทศไทย)	ความหนาแน่นเท่ากับ 0.910 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร อุณหภูมิหลอมเหลวเท่ากับ 163 องศาเซลเซียส อุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้วเป็นคลาซยางเท่ากับ -20 องศาเซลเซียส
พอลิสไตรีน (Polystyrene, PS)	Styron 656D267	Siam polystyrene co. ltd. (ประเทศไทย)	ความหนาแน่นเท่ากับ 1.05 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร อุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้วเป็นคลาซยางเท่ากับ 95 องศาเซลเซียส
พอลิไวนิลคลอไรด์ (Polyvinylchloride, PVC)	SIAMVIC 258RB	V.P. wood co. ltd. (ประเทศไทย)	ความหนาแน่นเท่ากับ 1.38 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร อุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้วเป็นคลาซยางเท่ากับ 82 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 3.1 คุณลักษณะของวัสดุและสารเคมีในงานวิจัย (ต่อ)

วัสดุและสารเคมี	ชื่อการค้า	บริษัท	ข้อมูลเฉพาะ
แคลเซียมคาร์บอเนต (Calcium carbonate, CaCO_3)	Hicoat 410	Sand and Soil Industry co. Ltd. (ประเทศไทย)	เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 1 ไมโครเมตร
ไทรโคลซาน (Triclosan, 2,4,4'- trichloro-2'- hydroxydiphenylether)	24 USP grade	Goventure co. Ltd. (ประเทศไทย)	เป็นผงสีขาว และมีขนาด เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยใน ระดับไมโครเมตร อุณหภูมิหลอมเหลว เท่ากับ 56-58 องศา เซลเซียส อุณหภูมิการเสื่อมสลาย มากกว่า 280 องศา เซลเซียส
วุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ (Nutrient agar)	B02-122-06	Laboratorios Britania (ประเทศอาร์เจนตินา)	Standard formular Ingredient(g/litre) Plurypeptone 5.00 Beef extract 3.00 Sodium chloride 8.00 Agar 15.00 pH 7.3 ± 0.2
อาหารเลี้ยงเชื้อ แบบเหลว (Nutrient broth)	B02-123-06	Laboratorios Britania (ประเทศอาร์เจนตินา)	Standard formular Ingredient(g/litre) Plurypeptone 5.00 Beef extract 3.00 pH 6.9 ± 0.2

ตารางที่ 3.1 คุณลักษณะของวัสดุและสารเคมีในงานวิจัย (ต่อ)

วัสดุและสารเคมี	ชื่อการค้า	บริษัท	ข้อมูลเฉพาะ
วุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับทำกรนับ จำนวนโคโลนีของเชื้อ (Plate count agar)	M 091	Himedia (ประเทศอินเดีย)	Standard formular Ingredient(g/litre) Casein encymic hydrolysis 5.00 Yeast extract 2.50 Dextrose 1.00 Agar 15.00 final pH(at 25°C) 7.0±0.2
เปปโตน (Peptone)	RM 001-500G	Himedia (ประเทศอินเดีย)	Chemical Analysis : Total Nitrogen : $\geq$ 11.5% Amino Nitrogen : $\leq$ 5.0% Ash : $\geq$ 9.0% Loss on drying : $\leq$ 5.0% Sodium chloride : $\leq$ 5.0%

3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัยประกอบด้วย ไมโครปิเปต ตู้บ่มเพาะเชื้อ ตู้บ่มเพาะเชื้อ ขวดรูปชมพู่ ปีกเกอร์ ขวดขนาด 500 มิลลิลิตร บัวงเจียเชื้อ ตะเกียงแอลกอฮอล์ กระบอกตวง จานเลี้ยงเชื้อ เข็มเจียเชื้อ และ คีมคีบ โดยมีรายละเอียดแสดงดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 รายละเอียดของอุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในงานวิจัย

ชื่อ	ข้อมูลเฉพาะ	แหล่งที่มา	รูป
ไมโครปิเปต (Micro - Pipette)	ยี่ห้อ Transferpette	Brandtech Scientific, Inc. (ประเทศเยอรมันนี)	
เครื่องอบฆ่าเชื้อ (Autoclave หรือ Auto - Steam Sterilizer)	ยี่ห้อ Vision Scientific Model: VS - 1321 - 60 ขนาด 60 ลิตร 2.5 kW	Vision Scientific Co., Ltd. (ประเทศเกาหลี)	
ตู้อบเพาะเชื้อ (Incubator)	ยี่ห้อ Sanyo Model: MIR - 153 ขนาด 60 ลิตร 2.5 kW	Sanyo E&E Europe BV, Biomedical Division (สหราชอาณาจักร)	
เครื่องเขย่าแบบบ่ม (Shaker incubater)	ยี่ห้อ JISICO Model: J - SIL (220 Volts 1 kW 60°C (Temp. max.))	Jeil Scientific Ind. Co., Ltd. (ประเทศเกาหลี)	
ตู้อบเครื่องแก้ว (Heater)	ยี่ห้อ Memmert Model: ULE 500 (280 Volts 2 kW 200°C (Temp. max.))	PRO Scientific Inc. (สหราชอาณาจักร)	

ตารางที่ 3.2 รายละเอียดของอุปกรณ์ต่างๆที่ใช้ในงานวิจัย (ต่อ)

ชื่อ	ข้อมูลเฉพาะ	แหล่งที่มา	รูป
ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer Flask)	ขนาด 250 ml (Pyrex #4980)	MRS Scientific Co., Ltd. (ประเทศไทย)	-
บีกเกอร์ (Beaker)	ขนาด 100, 600, 1,000 ml (Pyrex#1000)		
ขวดใส่สาร	ขนาด 500 และ 1,000 ml (Duran)		
บ่วงเขี่ยเชื้อ	ลวดเก็บเชื้อตัวอย่าง		
ตะเกียงแอลกอฮอล์	ทำด้วยโลหะหรือแก้วใสทน ความร้อน		
กระบอกตวง	ขนาด 1,000 ml		
จานเพาะเชื้อ	15 x 100 mm		
เข็มเขี่ยเชื้อ	เข็มเขี่ยเชื้อ		
คีมคีบ	ขนาด 125 mm (Stainless steel)		

3.3 เชื้อแบคทีเรียทดสอบ

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบในงานวิจัยนี้ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียแกรมบวกชนิด *Staphylococcus aureus* และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบชนิด *Escherichia coli* โดยมีรายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย

เชื้อแบคทีเรียทดสอบ	ข้อมูลเฉพาะ	แหล่งที่มา
<i>Staphylococcus aureus</i> 	เชื้อจุลินทรีย์ แกรมบวก (ATCC 25922)	สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
<i>Escherichia coli</i> 	เชื้อจุลินทรีย์ แกรมลบ (ATCC 25923)	

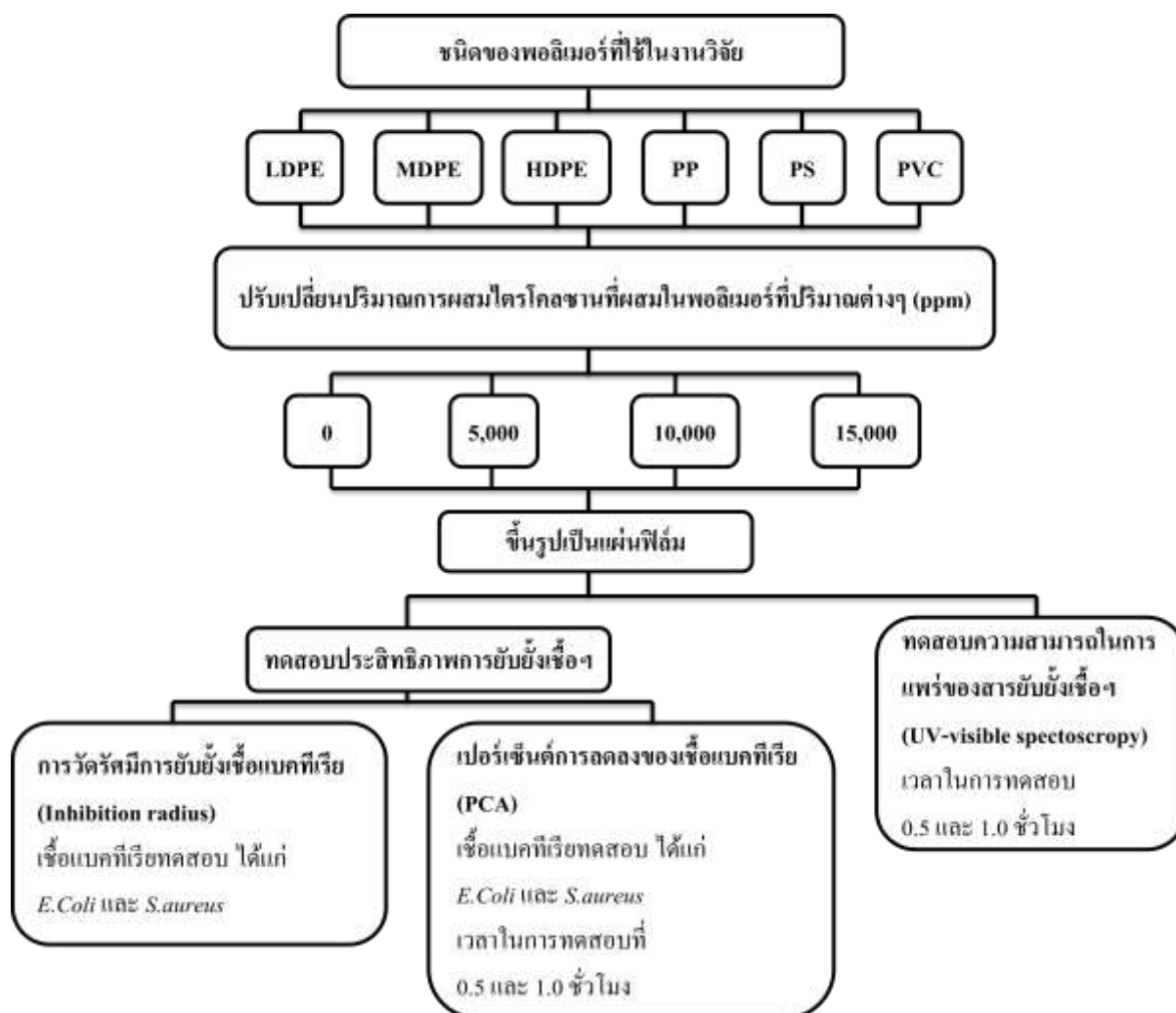
3.4 การออกแบบการทดลอง

แผนการดำเนินงานในงานวิจัยนี้ สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กรณีดังนี้

- 3.4.1 การศึกษาอิทธิพลของปริมาณไตรโคลซานที่มีต่อประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในพอลิเมอร์ชนิดต่างๆ โดยมีแผนภาพการดำเนินงานวิจัยดังรูปที่ 3.1
- 3.4.2 การศึกษาอิทธิพลของปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่มีต่อประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในพอลิเมอร์ ชนิดต่างๆ โดยมีแผนภาพการดำเนินงานวิจัยดังรูปที่ 3.2

3.4.1 การศึกษาอิทธิพลของปริมาณไตรโคลซานที่มีต่อประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในพอลิเมอร์ชนิดต่างๆ

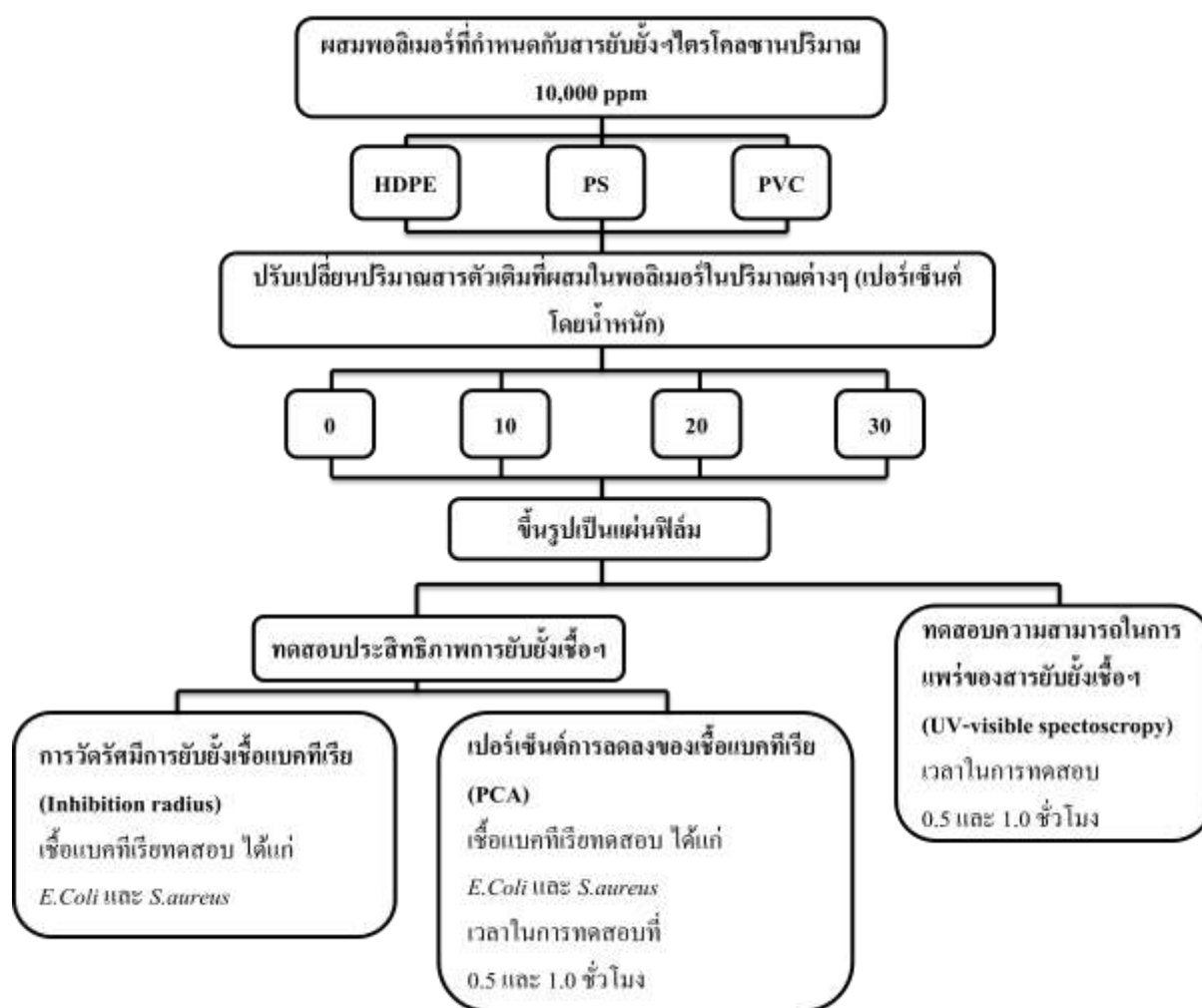
รูปที่ 3.1 แผนการดำเนินงานเริ่มต้นโดยการศึกษาชนิดของพอลิเมอร์ 6 ชนิดได้แก่ พอลิเอทิลีนความหนาแน่นต่ำ พอลิเอทิลีนความหนาแน่นปานกลาง พอลิเอทิลีนความหนาแน่นสูง พอลิโพรพิลีน พอลิสไตรีน และพอลิไวนิลคลอไรด์ รวมถึงผลของสัดส่วนการผสมไตรโคลซานในช่วงตั้งแต่ 0 - 15,000 ppm โดยการผสมจะใช้เครื่องหลอมผสมภายใน (Internal mixer) แล้วไปขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์ม โดยใช้เครื่องอัดขึ้นรูปด้วยระบบแรงดัน (Compression molding) จากนั้นนำชิ้นงานที่ได้ไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 2 วิธีได้แก่ 1) การวัดรัศมีการยับยั้งเชื้อฯ และ 2) เพอร์เซ็นต์การลดลงของเชื้อแบคทีเรีย และวัดการแพร่โดยใช้เครื่องมือ UV-Vis spectrophotometer ทั้งนี้ทดสอบที่เวลา 0.5 และ 1.0 ชั่วโมง



รูปที่ 3.1 ภาพการดำเนินงานการศึกษาอิทธิพลของปริมาณไตรโคลซานที่มีต่อประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในพอลิเมอร์ชนิดต่างๆ

3.4.2 การศึกษาอิทธิพลของปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่มีต่อประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในพอลิเมอร์ชนิดต่างๆ

รูปที่ 3.2 แสดงแผนผังการดำเนินงานในกรณีที่มีการใส่สารตัวเติมลงไปในพอลิเมอร์ที่กำหนด 3 ชนิด ได้แก่ พอลิเอทิลีนความหนาแน่นสูง พอลิสไตรีน และ พอลิไวนิลคลอไรด์ จากนั้นผสมพอลิเมอร์เข้ากับแคลเซียมคาร์บอเนตในสัดส่วน 10 เปอร์เซ็นต์ 20 เปอร์เซ็นต์ และ 30 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก โดยทุกสัดส่วนการผสม จะมีการเติมสารยับยั้งแบคทีเรียลงไป 10,000 ppm



รูปที่ 3.2 ภาพการดำเนินการศึกษาอิทธิพลของปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่มีต่อประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในพอลิเมอร์ชนิดต่างๆ

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 การเตรียมวัสดุผสม

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของพอลิเมอร์ชนิดต่างๆ จำนวน 6 ชนิดได้แก่ พอลิเอทิลีนความหนาแน่นต่ำ พอลิเอทิลีนความหนาแน่นปานกลาง พอลิเอทิลีนความหนาแน่นสูง พอลิโพรพิลีน พอลิสไตรีน และพอลิไวนิลคลอไรด์ กับสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิดไตรโคลซาน และสารตัวเติมแคลเซียมคาร์บอเนตในสัดส่วนที่ต่างกัน โดยเริ่มจาก

- การเตรียมวัสดุผสมโดย
 - นำพอลิเมอร์แต่ละชนิดผสมกับสารไตรโคลซานในสัดส่วน 5,000 10,000 15,000 ppm
 - ในกรณีที่มีการผสมสารตัวเติมแคลเซียมคาร์บอเนตทำได้ โดยผสมในอัตราส่วน 10 เปอร์เซ็นต์ 20 เปอร์เซ็นต์ และ 30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยทุกสัดส่วนการผสมมีการใส่สารไตรโคลซาน 10,000 ppm
- วิธีการผสมจะใช้เครื่องหลอมผสมภายในรุ่น Haake Rheomix 5000 ของบริษัท Haake จำกัด (ประเทศเยอรมัน) ดังรูปที่ 3.3 โดยใช้ความเร็วของสกรู 50 รอบต่อนาที และใช้เวลาในการผสม 30 นาที สำหรับอุณหภูมิที่ใช้ในการผสมของแต่ละพอลิเมอร์คือ
 - พอลิเอทิลีนความหนาแน่นต่ำเท่ากับ 160 องศาเซลเซียส
 - พอลิเอทิลีนความหนาแน่นปานกลางเท่ากับ 170 องศาเซลเซียส
 - พอลิเอทิลีนความหนาแน่นสูงเท่ากับ 180 องศาเซลเซียส
 - พอลิโพรพิลีนเท่ากับ 210 องศาเซลเซียส
 - พอลิสไตรีนเท่ากับ 170 องศาเซลเซียส
 - พอลิไวนิลคลอไรด์ไม่สามารถหลอมผสมด้วยวิธีนี้ได้เนื่องจากจะเกิดการสลายตัวทางความร้อนไป จึงใช้วิธีการผสมโดยวิธีผสมแบบแห้ง (Dry blend) ที่อุณหภูมิห้อง 25 องศาเซลเซียส
- หลังจากนั้นจะได้พอลิเมอร์ผสมออกมาซึ่งจะมีลักษณะดังรูปที่ 3.4 หลังจากนั้นจึงนำไปบด วัสดุผสมที่ได้มีลักษณะดังรูปที่ 3.5



รูปที่ 3.3 เครื่องหลอมผสมภายในรุ่น Haake Rheomix



รูปที่ 3.4 ตัวอย่างพอลิเมอร์ผสมที่ได้จากเครื่องหลอมผสมภายใน



รูปที่ 3.5 ตัวอย่างพอลิเมอร์ผสมที่ผ่านการบด

3.5.2 การขึ้นรูปแผ่นฟิล์มทดสอบ

- การผลิตแผ่นฟิล์มทดสอบเริ่มจากนำเอาพอลิเมอร์ผสมที่ได้ประมาณ 10 กรัม ใส่ลงในแม่พิมพ์ ลักษณะแม่พิมพ์แสดงดังรูปที่ 3.6
- จากนั้นนำไปขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มด้วยเครื่องอัดขึ้นรูปด้วยความร้อน (Compression molding) ลักษณะของเครื่องอัดขึ้นรูปด้วยความร้อนแสดงดังรูปที่ 3.7 โดยแผนภาพแสดงการขึ้นรูปแสดงดังรูปที่ 3.8 สำหรับสถานะในการขึ้นรูปมีขั้นตอนดังนี้
 - อุณหภูมิผสม เป็นเวลา 2 นาที
 - เพิ่มความดันที่แม่พิมพ์ไปที่ 50 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 3 นาที
 - เพิ่มความดันที่แม่พิมพ์ไปที่ 100 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 5 นาที

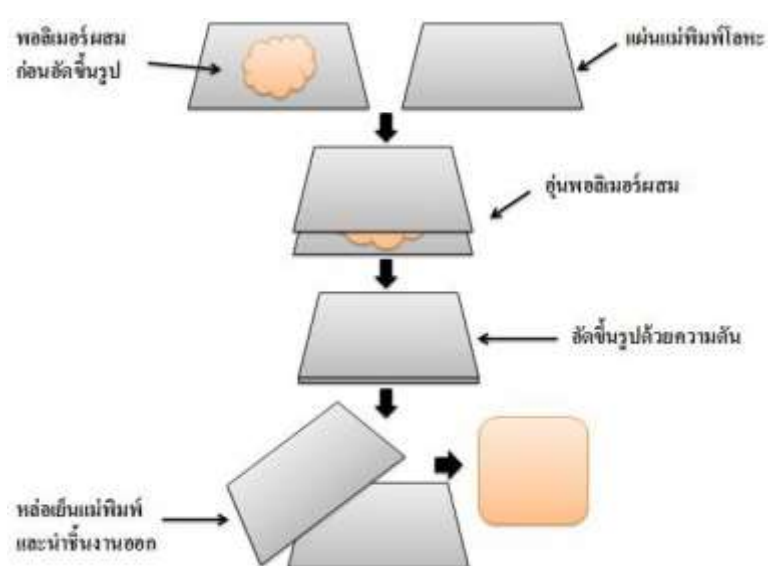
- ทำการหล่อเย็นแม่พิมพ์เป็นเวลา 5 นาที
- หลังจากนั้นจะได้ชิ้นงานแผ่นฟิล์มที่มีความหนาประมาณ 0.2 มิลลิเมตร มีลักษณะดังรูปที่ 3.9



รูปที่ 3.6 ตัวอย่างแม่พิมพ์ที่ใช้



รูปที่ 3.7 เครื่องอัดขึ้นรูปด้วยความร้อน



รูปที่ 3.8 ขั้นตอนการขึ้นรูปแผ่นฟิล์มด้วยเครื่องอัดขึ้นรูปด้วยความร้อน



รูปที่ 3.9 ตัวอย่างแผ่นฟิล์มที่ขึ้นรูปออกมาด้วยเครื่องอัดขึ้นรูปด้วยความร้อน

3.5.3 การเตรียมชิ้นงานทดสอบ

การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในงานวิจัยนี้จะแบ่งชิ้นงานออกเป็นสองรูปแบบได้แก่ ชิ้นงานสำหรับทดสอบการวัดระสีการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และชิ้นงานทดสอบเปอร์เซ็นต์การลดลงของเชื้อแบคทีเรีย

- ชิ้นงานทดสอบการวัดระสีการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Halo test)

นำแผ่นฟิล์มที่เตรียมได้จากหัวข้อที่ 3.5.2 ไปตัดเป็นวงกลมให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ซึ่งมีลักษณะดังรูปที่ 3.10



รูปที่ 3.10 ตัวอย่างชิ้นงานที่ใช้ทดสอบการวัดระสีการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

- ชิ้นงานทดสอบเปอร์เซ็นต์การลดลงของเชื้อแบคทีเรีย และทดสอบความสามารถในการแพร่
- นำแผ่นฟิล์มที่เตรียมได้จากหัวข้อที่ 3.5.2 ตัดให้มีขนาด 2.5 x 5 ตารางเซนติเมตร ซึ่งจะมีลักษณะดังรูปที่ 3.11

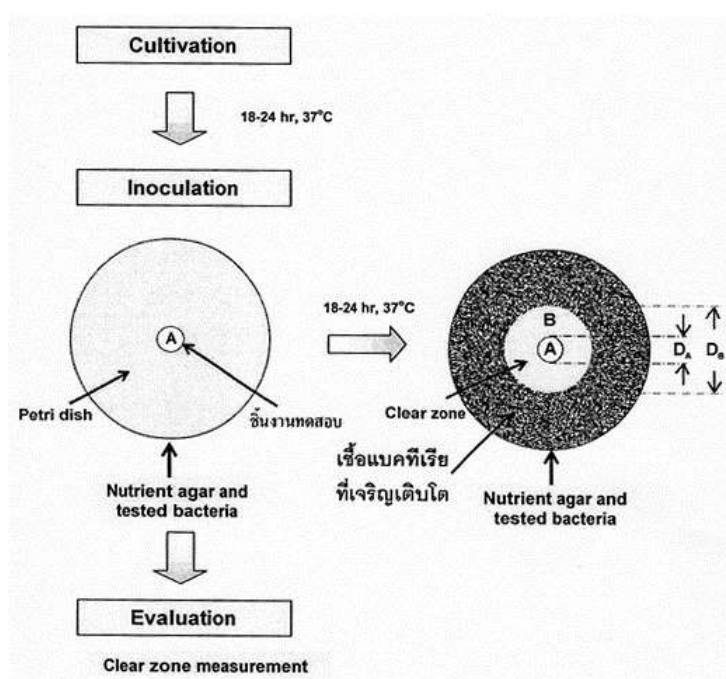


รูปที่ 3.11 ตัวอย่างชิ้นงานที่ใช้ทดสอบเปอร์เซ็นต์การลดลงของเชื้อแบคทีเรียและทดสอบความสามารถในการแพร่

3.5.4 วิธีการทดสอบการวัดรัศมีการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

การทดสอบรัศมีการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Halo Test) ใช้วิธีตามมาตรฐาน AATCC90 สามารถทำได้โดยสังเกตบริเวณที่ปราศจากเชื้อแบคทีเรียหรือบริเวณที่เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถเจริญเติบโตได้รอบๆ ชิ้นงานทดสอบ (Clear Zone) ซึ่งถือเป็นการบ่งบอกประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในเชิงคุณภาพของชิ้นงานทดสอบได้ ซึ่งในขั้นตอนการทดสอบรัศมีการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Halo Test) นี้ก็จะมีขั้นตอนหลักอยู่ 3 ขั้นตอนโดยสามารถแสดงเป็นแผนภาพได้ดังรูปที่ 3.12

- 1) การเตรียมเชื้อแบคทีเรียทดสอบ (Cultivation)
- 2) การเพาะเชื้อแบคทีเรียบนวัสดุที่มีสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียผสมอยู่ (Inoculation)
- 3) การแปลผลการทดสอบ (Evaluation)



รูปที่ 3.12 แผนภาพแสดงขั้นตอนการทดสอบ Halo Test

1) การเตรียมเชื้อแบคทีเรียสำหรับทดสอบ

กระบวนการเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

- เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวุ้น (Plate count agar) ประมาณ 9.4 กรัมต่อน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน จะได้เป็นลักษณะดังรูปที่ 3.13



รูปที่ 3.13 ขวดที่บรรจุสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวุ้น

- เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (Nutrient broth) ประมาณ 0.4 กรัมต่อน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน จะได้เป็นลักษณะดังรูปที่ 3.14



รูปที่ 3.14 ขวดที่บรรจุสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

- หลังจากนั้นให้นำขวดสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิดที่เตรียมไปทำการนึ่งฆ่าเชื้อปนเปื้อนด้วยเครื่องอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) ดังรูปที่ 3.15 โดยจะทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ภายใต้แรงดันเป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง

(หมายเหตุ: ควรทำการคลายเกลียวของขวดสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อไว้เล็กน้อยเพื่อลดแรงดันที่เกิดขึ้นภายในขวดในขณะที่ทำการอบฆ่าเชื้อ)



รูปที่ 3.15 เครื่องอบฆ่าเชื้อ

- หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อมาแล้ว ให้นำขวดสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อมาปิดฝาเกลียวให้แน่นและทิ้งเอาไว้จนกว่าจะเย็นจนสามารถจับได้ด้วยมือเปล่า (ทั้งนี้ไม่ควรเย็นเกินไปเพราะวุ้นจะแข็งตัวก่อนที่จะทำการเทลงบนจานเพาะเชื้อ)
- นำสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้นมาทำการเทลงในจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยมีขั้นตอนการเทแสดงดังรูปที่ 3.16 ในประมาณ 5 มิลลิลิตรต่อหนึ่งเพลท หลังจากนั้นรอนจนกระทั่งวุ้นแข็งตัวแล้วจึงทำการคว่ำจานเพาะเชื้อลงเพื่อป้องกันการกลั่นตัวของไอน้ำที่บริเวณฝาจานเพาะเชื้อซึ่งอาจหยดลงบนวุ้นเลี้ยงเชื้อได้



รูปที่ 3.16 การเทอาหารเลี้ยงเชื้อลงบนเพลท

การเตรียมเชื้อแบคทีเรียเพื่อทดสอบ (Fresh Up)

- เตรียมหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาแล้ว และหลอดเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบ หลังจากนั้นใช้ทำการดูดสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่เตรียมไว้ประมาณ 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง ดังรูปที่ 3.17 (a) จากนั้นนำลวดเขี่ยเชื้อ (Loop) มาเผาไฟแสดงในรูปที่ 3.17 (b) รอให้เย็น

แล้วจึงนำไปเจียเชื้อในหลอดเลี้ยงเชื้อที่เตรียมมา แล้วจึงใส่เชื้อลงไปหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว หลังจากนั้นนำเอาหลอดทดลองที่เตรียมนี้ไปเข้าตู้อบเพาะเชื้อ (Incubator) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง



(a)



(b)

รูปที่ 3.17 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียเพื่อทดสอบโดย (a) ปิเปตสารใส่หลอดทดลองและ (b) เผาลวดเจียเชื้อ

- ขั้นตอนมาเป็นการกระจายเชื้อเพื่อให้เกิดเป็น Single colony โดยเริ่มจากนำลวดเจียเชื้อที่ผ่านการเผาฆ่าเชื้อแล้ว มาแตะสารละลายอาหารเหลวที่มีเชื้อแบคทีเรียในขั้นตอนที่ผ่านมา จากนั้นให้นำลวดเจียเชื้อนี้ไปกระจายเชื้อบนวุ้นเลี้ยงเชื้อในจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ ดังรูปที่ 3.18 (a) จากนั้นนำเพลทที่ผ่านการกระจายเชื้อแล้วไปบ่มในตู้อบเพาะเชื้อเป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ลักษณะของ Single colony แสดงดังรูปที่ 3.18 (b)



(a)



(b)

รูปที่ 3.18 ขั้นตอนการเตรียมเลี้ยงเชื้อโดย (a) วิธีการกระจายเชื้อบนเพลท (b) ตัวอย่างโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรีย *E.coli*

- ทำการเจียเอาโคโลนีเดี่ยวมาหนึ่งโคโลนีโดยแสดงขั้นตอนการเจียโคโลนีเดี่ยวดังรูปที่ 3.19 (a) จากนั้นนำเชื้อที่ได้ไปใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้ จากนั้นจึงนำหลอดทดลองไปบ่มเพาะเชื้อ เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เชื้อที่ได้จะมีลักษณะเช่น ดังรูปที่ 3.19 (b) ซึ่งใช้เป็นเชื้อตั้งต้นสำหรับทดสอบหรืออินโนคูลัม (Innoculum)



(a)



(b)

รูปที่ 3.19 การเตรียมเชื้อตั้งต้นโดย (a) แสดงการเขี่ยเชื้อโคโลนีเดี่ยว (b) เชื้อตั้งต้นในการทดสอบ

2) การเพาะเชื้อแบคทีเรียบนวัสดุที่สารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียผสมอยู่ (Inoculation)

- เตรียมวุ้นเลี้ยงเชื้อ ระบุชื่อเชื้อและชิ้นงานที่ใช้รวมถึงจุดที่วางชิ้นงาน จากนั้นนำอินโนคูลัม (Inoculums) มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อตามที่ต้องการ โดยการวัดค่า OD ของเชื้อให้อยู่ที่ 0.1 (Optical Density, ค่า OD คือค่าแทนความเข้มข้นของเซลล์) ซึ่งค่า OD นี้สามารถวัดค่าได้โดยนำสารละลายเลี้ยงเชื้อที่เจือจางมาใส่ในเซลล์ใสสารตัวอย่าง (รูปที่ 3.20 (a)) และใช้เครื่อง UV-Vis spectrophotometer รุ่น HACH DR/4000U (รูปที่ 3.20 (b)) ในการวัดค่า OD



(a)



(b)

รูปที่ 3.20 การวัดค่า OD โดย (a) เซลล์ใสสารละลายที่มีเชื้อแบคทีเรีย และ (b) เครื่อง UV-Vis spectrophotometer ในการวัดค่า OD

- นำเชื้อที่ได้ใส่ในขวดรูปชมพู่ (Flask) ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวจากนั้นเขย่าขวดรูปชมพู่ด้วยเครื่องเขย่า (Incubator shaker) แสดงดังรูปที่ 3.21 จนเชื้ออยู่ในช่วง Log phase และมีค่า OD ประมาณ 0.5



รูปที่ 3.21 เครื่อง Incubator shaker

- เตรียม Soft agar โดยการผสมวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 และทำการเจือจางเชื้อให้มีค่า OD เท่ากับ 0.1 จากนั้นทำการผสม Soft agar กับเชื้อที่เตรียมไว้ด้วยการคำนวณจากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$ ซึ่งมีตัวอย่างการคำนวณดังนี้

$$(OD)_1 \times V_1 = (OD)_2 \times V_2$$

เมื่อ $(OD)_1$ คือ ค่า OD_{600} ของเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้น ซึ่งในที่นี้มีค่าเท่ากับ 0.5

V_1 คือ ปริมาตรของเชื้อเริ่มต้นที่ต้องใช้ในการเจือจาง

$(OD)_2$ คือ ค่า OD ของเชื้อแบคทีเรียทดสอบซึ่งในที่นี้กำหนดให้มีความเท่ากับ 0.1

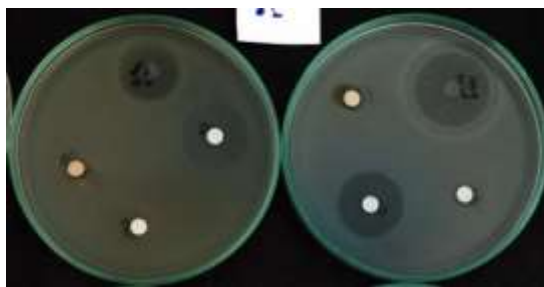
V_2 คือ ปริมาตรของเชื้อทดสอบซึ่งกำหนดให้มีปริมาตรเท่ากับ 5 มิลลิลิตร

$$0.5 \times V_1 = 0.1 \times 5 \text{ ml}$$

$$V_1 = 1 \text{ ml}$$

ดังนั้น ต้องใช้เชื้อเริ่มต้นที่มีค่า OD เท่ากับ 0.5 จำนวน 1 มิลลิลิตร

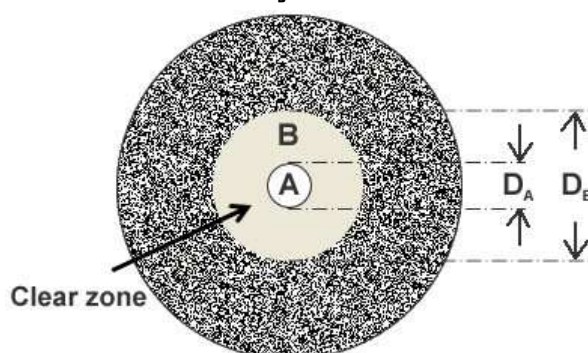
- จากนั้นเท Soft Agar ที่เตรียมได้ลงบนวุ้นเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ในตอนแรก รอจน Soft Agar แข็งแล้วจึงใส่ชิ้นงานลงไป จากนั้นนำจานเพาะเชื้อที่ได้ไปบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตการเกิดบริเวณการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียรอบชิ้นงาน แสดงตัวอย่างการเกิดรัศมีการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดังในรูปที่ 3.22



รูปที่ 3.22 ตัวอย่างการเกิดรัศมีการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิด *E.coli*

3) การแปลผลทดสอบ (Evaluation)

การวัดประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจากรัศมีการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย สามารถคำนวณจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรัศมีการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดังในรูปที่ 3.23



รูปที่ 3.23 แบบจำลองการวัดขนาด Clear zone

การคำนวณรัศมีการยับยั้งเชื้อสามารถทำได้ดังสมการ 3.1 ดังนี้

$$D_{\text{Clear zone}} = \frac{D_B - D_A}{2} \quad (3.1)$$

โดย D_A คือ เส้นผ่านศูนย์กลางชิ้นงานทดสอบ; หน่วย มิลลิเมตร

D_B คือ ผลรวมเส้นผ่านศูนย์กลางชิ้นงานทดสอบและ Clear zone; หน่วย มิลลิเมตร

D_C คือ ความกว้างของ Clear zone; หน่วย มิลลิเมตร

3.5.5 วิธีทดสอบเปอร์เซ็นต์การลดลงของแบคทีเรีย (Plate count agar, PCA)

วิธีการนี้เป็นการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียในเชิงปริมาณ โดยสามารถคำนวณการลดลงของเชื้อแบคทีเรีย (Percentage reduction) ตามวิธีการทดสอบมาตรฐานตาม ASTM E2149-01 ซึ่งมีขั้นตอนและหลักการ เช่นเดียวกับวิธี Shake flask method (KSM0146-2003) [46-48] ประกอบด้วย

- 1) การเตรียมเชื้อแบคทีเรียทดสอบ (Cultivation)
- 2) การเจือจางเชื้อแบคทีเรียแบบ Ten-fold serial dilution
- 3) การเพาะเชื้อแบคทีเรียบนวัสดุที่มีสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียผสมอยู่ (Inoculation)
- 4) การนับจำนวนเชื้อแบคทีเรีย (Plate count agar)
- 5) การคำนวณและแปลผลการทดสอบ (Evaluation)

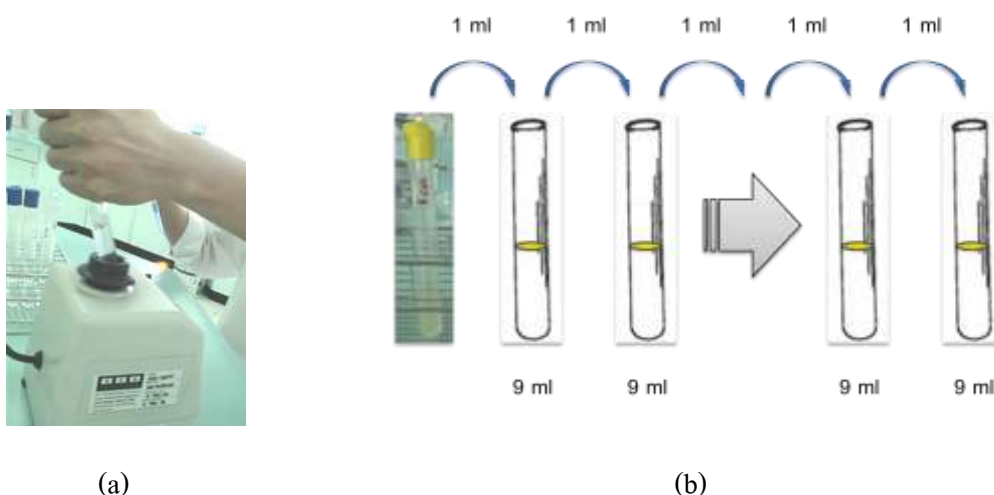
1) การเตรียมเชื้อแบคทีเรียทดสอบ

ขั้นตอนนี้ใช้วิธีเดียวกับกรณีการเตรียมการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยการวัดรัศมีการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

2) การเจือจางเชื้อแบคทีเรียแบบ Ten-fold serial dilution

- นำสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการบ่มเพาะเชื้อมาแล้วออกจากตู้บ่ม ใช้ออโตไมโครปิเปตทำการดูดสารละลายดังกล่าวมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร (ผ่านการฆ่าเชื้อมาแล้ว)
- นำเอาหลอดทดลองนี้ไปทำให้สารละลายเชื้อแบคทีเรียกระจายตัวสม่ำเสมอด้วยเครื่อง Vortex mixer แสดงดังรูปที่ 3.24 (a) หลังจากนั้นใช้ออโตปิเปตดูดเอาสารละลายในหลอดที่ได้มา 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปใส่ในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วทำการเจือจางต่อไปเรื่อยๆ แสดงดังรูปที่ 3.24 (b) จนอยู่ในช่วงที่สามารถนับเชื้อได้

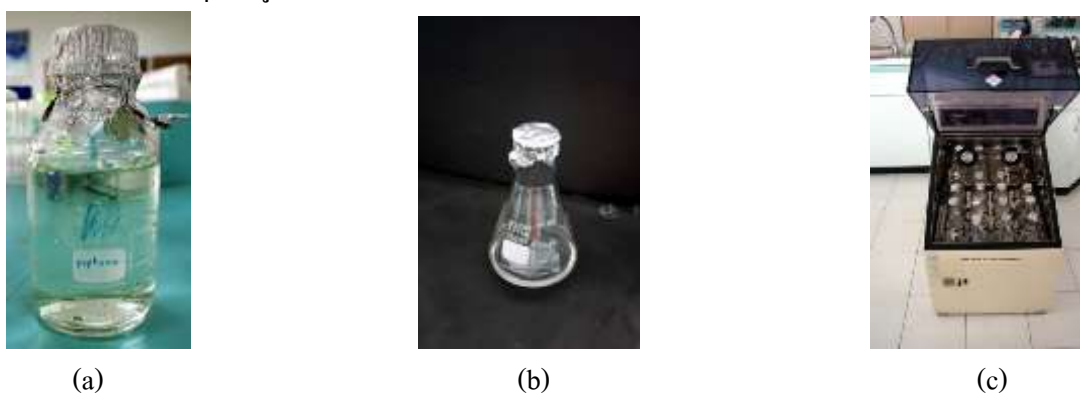
หมายเหตุ : ปกติการนับเชื้อแบคทีเรียที่เจริญอยู่บนวุ้นในจานเพาะเชื้อนั้นจะนิยมนับเชื้อที่มีโคโลนีขึ้นอยู่ในช่วงระหว่าง 30 - 300 โคโลนีเท่านั้น เพราะฉะนั้นเพื่อที่จะทำให้สามารถนับเชื้อแบคทีเรียในช่วงดังกล่าวได้นั้นจำเป็นที่จะต้องทำการเจือจางเชื้อเริ่มต้นมาก่อน(เชื้อเริ่มต้นนั้นมีความเข้มข้นมากไม่สามารถนับได้) โดยทั่วไปในการเจือจางจะทำการเป็นลำดับๆ ละ 10 เท่า (Serial dilution) แล้วจึงนำเชื้อในแต่ละลำดับการเจือจางมาเลี้ยงลงบนวุ้นเพาะเชื้อ เพื่อหาลำดับของการเจือจางที่เหมาะสมต่อการนับเชื้อ เมื่อเชื้อเจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วจึงทำการนับจำนวนโคโลนีเพื่อนำไปทำการคำนวณหา Colony forming unit (CFU) หรือปริมาณแบคทีเรียต่อกรัมหรือมิลลิลิตรของตัวอย่างได้ (ทำการนับเป็นโคโลนีเพราะไม่สามารถทราบได้ว่าใน 1 โคโลนีนั้นมีจำนวนเซลล์แบคทีเรียอยู่จำนวนเท่าใด)



รูปที่ 3.24 ขั้นตอนการเจือจางเชื้อ โดย (a) การผสมเชื้อแบคทีเรียให้เข้ากัน โดยใช้ Vortex Shaker (b) การเจือจางเชื้อแบบ Ten-fold serial dilution

3) การเพาะเชื้อแบคทีเรียบนวัสดุที่มีสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียผสมอยู่ (Inoculation)

- เตรียมตัวกลางสำหรับทดสอบซึ่งในที่นี้จะใช้สารละลายเปปโตน (Peptone buffer, pH 6.8 – 7.2) แสดงดังรูปที่ 3.25 (a) นำตัวกลางนี้ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ 45 มิลลิลิตร และนำสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่เจือจางแล้วมาใส่ลงไป 5 มิลลิลิตร (ในงานวิจัยนี้ใช้เชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการเจือจางเป็นครั้งที่ 3 และเมื่อนำเชื้อที่ผ่านการเจือจางมาใส่ลงในสารละลายในขวดรูปชมพู่ นับว่าเป็นการเจือจางครั้งที่ 4)
- จากนั้นใส่ชั้นงานทดสอบลงไป 2 ชั้น แล้วจึงนำพาราฟินฟิล์ม (Paraffin film) มาปิดปากขวด และต่อด้วยกระดาษฟรอยด์อีกชั้นหนึ่ง แสดงดังรูปที่ 3.25 (b)
- จากนั้นนำเอาขวดทดสอบไปใส่ในเครื่องเขย่าดังรูปที่ 3.25 (c) โดยใช้ความถี่ในการเขย่าประมาณ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0.5 และ 1 ชั่วโมง ตามลำดับ



รูปที่ 3.25 การเตรียมตัวกลางสำหรับเลี้ยงเชื้อโดยใช้ (a) สารละลายเปปโตน และ (b) ขวดรูปชมพู่ที่ผสมสารละลายเปปโตนกับสารละลายที่มีเชื้อเจือจาง จากนั้นใส่ลงใน (c) เครื่องเขย่า

4) การนับจำนวนเชื้อแบคทีเรีย (Plate count agar, PCA)

- เมื่อถึงเวลาตามกำหนด (0.5 และ 1 ชั่วโมง) ให้นำเอาขวดรูปชมพู่ขึ้นมาทำการปิเปตสารละลาย 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร (เป็นการเจือจางเชื้อครั้งที่ 5) และทำการเจือจางจนถึงครั้งที่ 6 (เป็นช่วงที่เชื้ออยู่ในช่วง 30 – 300 colony)
- นำปิเปตเอาสารละลายที่เจือจางครั้งที่ 6 มา 100 ไมโครลิตร แล้วใส่ลงบนจานวุ้นเลี้ยงเชื้อ แสดงดังรูปที่ 3.26 (a) หลังจากนั้นใช้แท่งแก้วอ (Spreader) ทำการเกลี่ยเชื้อให้ทั่วจาน แสดงดังรูปที่ 3.26 (b) เรียกวิธีนี้ว่าการ Spread plate โดยจะทำซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง (Triplication)
- จากนั้นนำเอจานเพาะเชื้อที่ได้ไปบ่มเพาะเชื้อในตู้บ่มเป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แสดงดังรูปที่ 3.26 (c)



(a)



(b)



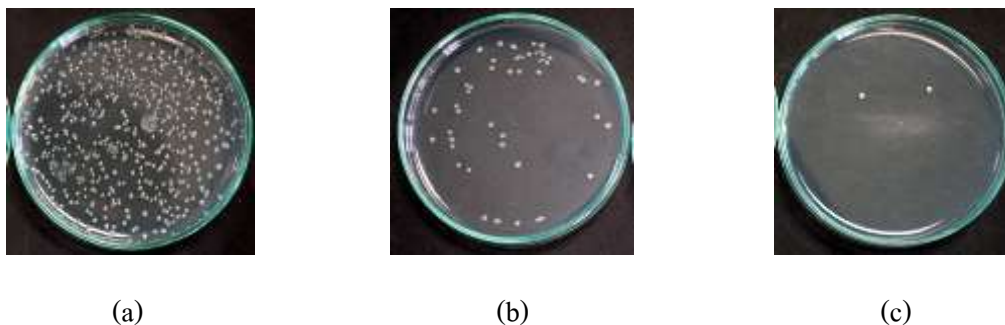
(c)

รูปที่ 3.26 การเตรียมขั้นตอนการกระจายเชื้อโดย (a) การใส่เชื้อ (b) การเกลี่ยเชื้อ และ (c) นำจานเพาะเชื้อไปบ่ม

- เมื่อผ่านเวลาตามที่กำหนดให้นำเอจานเลี้ยงเชื้อมาทำการนับเชื้อแบคทีเรียโดยใช้เครื่องนับ (Colony counter) แสดงดังรูปที่ 3.27 โดยเชื้อที่ใช้ได้ควรจะอยู่ในช่วง 30 – 300 โคโลนี สามารถแสดงตัวอย่างดังรูปที่ 3.28



รูปที่ 3.27 เครื่องนับเชื้อแบคทีเรีย



รูปที่ 3.28 ตัวอย่างการเกิดโคโลนีของเชื้อ (a) >300 colonies (b) 30 – 300 colonies และ(c) < 30 colonies

5) การคำนวณและแปลผลการทดสอบ (Evaluation)

การแปลผลการยับยั้งแบคทีเรียในเชิงปริมาณทำได้โดยสมการ 3.2 ดังนี้

$$\text{cfu/ml} = \frac{\text{Average number of colonies}}{\text{Dilution factor} \times \text{Sample volume}} \quad (3.2)$$

โดย cfu/ml คือ จำนวนโคโลนี (Colony forming unit) ต่อ มิลลิลิตร

Average number of colonies คือ จำนวนโคโลนีเฉลี่ย

Dilution factor คือ 10^{-n} (n = จำนวนครั้งของการเจือจาง)

Sample volume คือ ปริมาตรสารละลายแบคทีเรียทดสอบ (มิลลิลิตร)

การแปลผลประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียเชิงปริมาณในงานวิจัยนี้ จะใช้สมการชื่อ “Bacteriostatic rate” ซึ่งจะแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์การลดลงของแบคทีเรีย (Percentage Reduction) แสดงดังสมการ 3.3 ดังนี้

$$\text{Bacterio static rate (\%)} = \frac{B - C}{B} \times 100 \quad (3.3)$$

โดย B คือ จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่มีชีวิตอยู่หลังทดสอบในเวลาที่กำหนด
: กรณีชิ้นงานทดสอบไม่มีสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

C คือ จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่มีชีวิตอยู่หลังทดสอบในเวลาที่กำหนด
: กรณีชิ้นงานทดสอบมีสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

3.5.6 วิธีทดสอบประสิทธิภาพในการแพร่ของสารยับยั้งในพอลิเมอร์ชนิดต่างๆ

ในงานวิจัยนี้จะทำการวัดความสามารถในการแพร่ของสารยับยั้ง [33, 38] โดยใช้เครื่อง UV-Vis spectrophotometer รุ่น HACH DR/4000U ของบริษัท Hach จำกัด (ประเทศสหรัฐอเมริกา) ในการวัดโดยจะมีขั้นตอนดังนี้

- เตรียมสารละลาย EtOH 95% (ตัวกลาง) นำไปใส่ลงในขวดรูปชมพู่ 50 มิลลิลิตร ตามด้วยการใส่ชิ้นงานที่จะทดสอบลงไป โดยขั้นตอนการทดสอบจะคล้ายกับการทดสอบ Plate count agar โดยนำขวดรูปชมพู่ไปเขย่าและทำการเก็บสารตัวอย่างตามเวลาที่ต้องการมาทำการวัดอัตราการแพร่โดยใส่ลงในเซลล์เก็บสารตัวอย่าง (ทดสอบเสร็จแล้วใส่กลับลงในขวดรูปชมพู่ดังเดิม)
- การทดสอบจะดูจากค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) โดยในการทดสอบจะตั้งค่าช่วงความยาวคลื่นในการดูดกลืนแสงไว้ที่ 280 – 300 นาโนเมตร (เป็นช่วงการดูดกลืนแสงที่เหมาะสมของสารยับยั้งไตรโคลซาน) จากนั้นจึงอ่านค่าที่ได้
- ก่อนทดสอบควรทำ Caribration curve ไว้ก่อน ซึ่งทำได้โดยนำสารละลายที่ทราบน้ำหนักไตรโคลซานไปวัดค่าการดูดกลืน จากนั้นทำการเปลี่ยนน้ำหนักไตรโคลซานและวัดค่าการดูดกลืนไปเรื่อยๆ แล้วจึงนำเอาค่าที่ได้มาทำการพลอตกราฟ จะทำให้ได้กราฟมาตรฐานออกมา ทั้งนี้การทำการพลาตมาตรฐานก็เพื่อนำเอาค่าการดูดกลืนแสงของการปลดปล่อยสารออกมาจากชิ้นงานไปเทียบเพื่อให้ได้เป็นน้ำหนักแท้จริง

3.5.7 การศึกษาผลของสารไตรโคลซานต่อการเปลี่ยนแปลงของสีในพอลิเมอร์ชนิดต่างๆ

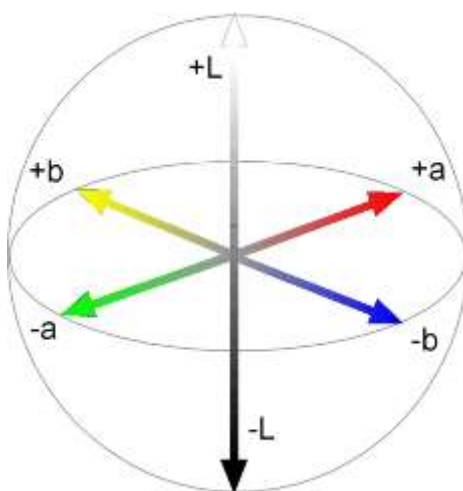
ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสีในพอลิเมอร์ชนิดต่างๆด้วยเครื่อง UV-VIS-NIR Recording Spectrophotometer ที่แสดงไว้ในรูปที่ 3.29 โดยการเปลี่ยนแปลงสีจะวัดค่าการสะท้อนรังสีในช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 380 ถึง 780 นาโนเมตร และคำนวณค่าสีที่ได้ตามมาตรฐาน CIE-L*a*b* [45] โดยผลที่ได้เป็นค่า L*a*b* ที่แสดงสีตามแกนในรูปที่ 3.30 ซึ่งค่า L* แสดงถึงความสว่าง (Brightness) โดยค่าความสว่าง (L*) มีค่าตั้งแต่ 0 (สีดำ) ไปจนถึง 100 (สีขาว) ส่วนค่า a* แสดงถึงแกนสีแดง-สีเขียว โดยค่า a* มีค่าตั้งแต่ -60 (สีเขียว) ถึง +60 (สีแดง) และค่า b* แสดงถึงแกนสีน้ำเงิน-สีเหลือง ซึ่งมีค่าตั้งแต่ -60 (สีน้ำเงิน) ถึง +60 (สีเหลือง) นอกจากนี้ยังสามารถคำนวณค่าการเปลี่ยนแปลงสีโดยรวมได้จากสมการ 3.4

$$\Delta E^* = \sqrt{(L_2^* - L_1^*)^2 + (a_2^* - a_1^*)^2 + (b_2^* - b_1^*)^2} \quad (3.4)$$

ค่า ΔE^* ที่ได้จากสมการเป็นค่าการเปลี่ยนแปลงสีโดยรวมของพอลิเมอร์ชนิดต่างๆ หลังจากมีการผสมสารไตรโคลซานเข้าไป 15,000 ppm



รูปที่ 3.29 เครื่องวัดการเปลี่ยนแปลงสีของพอลิเมอร์ต่างๆ UV-VIS-NIR Recording Spectrophotometer



รูปที่ 3.30 แกนเทียบสีตามมาตรฐาน CIE-L*a*b*