

รายงานฉบับสมบูรณ์

การศึกษาปริมาณสารสำคัญในสารละลายที่ผลิตได้จากเครื่องผลิตน้ำยาฆ่าเชื้อ
จากเกลืออเนกประสงค์ Hypo Plus และประสิทธิภาพของสารสำคัญ
ในสารละลายนั้นในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์

Study of concentration of active compounds in solution produced
from Hypo Plus device and their antimicrobial effectiveness

เสนอ

บริษัท โปรลอก ไทเทเนียม คอร์ปอเรชั่น จำกัด

คณะผู้วิจัย

ดร.ดวงพร พลพานิช	หัวหน้าโครงการ
ดร.คมสันต์ สุทธิสินทอง	ผู้ร่วมโครงการ
ดร.รวิวรรณ ภิรมนัส	ผู้ร่วมโครงการ
นายณรงค์พล แก้วจังหวัด	ผู้ร่วมโครงการ
นางสาวกรกต ศุภนคร	ผู้ร่วมโครงการ
นายยศธร วงศ์งาม	ผู้ร่วมโครงการ

ทีมวิจัยนาโนเทคโนโลยีเพื่อคุณภาพชีวิตและเวชสำอาง

ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ

สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

บทสรุปผู้บริหาร (Executive Summary)

ชื่อโครงการ: การศึกษาปริมาณสารสำคัญในสารละลายที่ผลิตได้จากเครื่องผลิตน้ำยาฆ่าเชื้อจากเกลือ
อเนกประสงค์ Hypo Plus และประสิทธิภาพของสารสำคัญในสารละลายนั้นในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์

ระยะเวลาโครงการ: 6 เดือน (1 ธันวาคม 2563 – 31 พฤษภาคม 2564)

งบประมาณโครงการ: 580,000 บาท (ไม่รวมภาษีมูลค่าเพิ่ม)

รหัสโครงการ: P2052136

เลขที่สัญญา: RSA-NN-2563-12899-TH

โครงการนี้เป็นโครงการรับจ้างวิจัยและพัฒนา ร่วมกับ บริษัท โปรลอก ไทเทเนียม คอร์ปอเรชั่น จำกัด
มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาและวิเคราะห์ผลประสิทธิภาพของสารละลายฆ่าเชื้อที่ได้จากการเตรียมด้วยอุปกรณ์
Hypo Plus ที่เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัทฯ ใจปัจจุบัน เพื่อขยายผลสำหรับการโฆษณาด้วยผลทางวิชาการ
สอดคล้องตามมาตรฐานการทดสอบสากล

บริษัทฯ เป็นผู้ผลิตเครื่องผลิตสารละลายฆ่าเชื้อ Hypo Plus จากส่วนประกอบของน้ำ กรดอะซิติก
และเกลือ ที่สามารถผลิตกรดไฮโปคลอรัส (hypochlorous acid; HOCl) และโซเดียมไฮโปคลอไรต์
(hypochlorous acid, sodium salt หรือ sodium hypochlorite; NaOCl) ที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ
เนื่องจากเป็นกรดชนิดเดียวกันกับที่เซลล์เม็ดเลือดขาวในร่างกายมนุษย์ผลิตขึ้นมาเพื่อฆ่าเชื้อโรค แบคทีเรีย
ไวรัส และเชื้อรา จึงเป็นที่ใช้แพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหารและการแพทย์ อย่างไรก็ตาม เนื่องด้วยผลิตภัณฑ์
ของบริษัทฯ ไม่ใช่สารฆ่าเชื้อแต่เป็นอุปกรณ์ที่ใช้ผลิตสารดังกล่าว บริษัทฯ จึงมีแนวคิดในการเพิ่มความมั่นใจให้
ผู้บริโภคว่าสารละลายที่เตรียมได้เองนั้นมีประสิทธิภาพที่อ้างอิงมาตรฐานสากล ทีมวิจัยจึงได้ทำการศึกษาถึง
กรรมวิธีการเตรียมจากอัตราส่วนของกรดอะซิติกและเกลือแกง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ ได้แก่ กรดไฮ
โปคลอรัส (HOCl) และโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaOCl) รวมถึงการทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย
(ตามประกาศของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา) เชื้อรา และเชื้อไวรัส ที่บริษัทฯ ต้องการใช้ในการ
โฆษณา โดยพบว่าสารละลายที่มีค่า available chlorine ที่สูงกว่า จะส่งผลให้มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อที่
สูงขึ้น และสูตรที่เตรียมขึ้นปราศจากกรดอะซิติกนั้นสามารถคงประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อแบคทีเรียและเชื้อไวรัส
ได้ยาวนานถึง 48 ชั่วโมง โดยรายละเอียดสามารถศึกษาได้ต่อไปในรายงานฉบับสมบูรณ์นี้

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
1. บทนำ.....	1
1.1 ที่มาของโครงการ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ	2
1.3 เป้าหมาย.....	2
2. ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 การผลิตกรดไฮโปคลอรัสและโซเดียมไฮโปคลอไรต์ โดยอาศัยหลักการ Electrochlorination.....	3
2.2 ปริมาณคลอรีนทั้งหมดที่เป็นส่วนประกอบ (available chlorine) ด้วยการไตเตรท (titration method).....	4
3. วิธีการวิจัย.....	5
3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการศึกษา.....	5
3.2 การดำเนินงานวิจัยแบ่งออกเป็น 7 ส่วนหลัก ดังต่อไปนี้	7
3.2.1 การเตรียมสารละลายด้วยเครื่อง Hypo Plus Standard	7
3.2.2 การตรวจสอบ pH ของสารละลาย	9
3.2.3 การตรวจสอบค่า ORP ของสารละลาย	10
3.2.4 การตรวจสอบ available chlorine ของสารละลาย.....	11
3.2.5 การตรวจสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion assay และ Broth dilution assay	13
3.2.6 การตรวจสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ตามประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.).....	15
3.2.7 การตรวจสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อไวรัส	15
4. ผลและอภิปรายผลการวิจัย.....	17
4.1 ผลการเตรียมสารละลายด้วยเครื่อง Hypo Plus	17
4.2 ผลการตรวจสอบ pH ของสารละลาย	19
4.3 ผลการตรวจสอบค่า ORP ของสารละลาย.....	25

4.4 การไทเตรทหาปริมาณคลอรีนทั้งหมดที่เป็นส่วนประกอบ (available chlorine) ของสารละลายที่เตรียมด้วยเครื่อง Hypo Plus.....	30
4.5 ผลการตรวจสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ.....	37
4.5.1 ผลการทดสอบด้วยเทคนิค Disc diffusion assay	37
4.5.2 ผลการทดสอบด้วยเทคนิค Broth dilution assay	42
4.5.3 การตรวจสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียหลังจากเก็บสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ ไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง	45
4.6 ผลการตรวจสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ตามประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.).....	48
4.7 ผลการตรวจสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อไวรัส.....	51
5. สรุปผลการวิจัย.....	54
6. เอกสารอ้างอิง.....	55
ภาคผนวก	57
ภาคผนวก ก. ผลการไทเตรทเพื่อศึกษาอิทธิพลของน้ำส้มสายชู (5%) ต่อปริมาณปริมาณคลอรีนทั้งหมดที่เป็นส่วนประกอบ (available chlorine) ของสารละลาย Prolog สูตรที่ 2 แบบไม่เจือจาง (Prolog F2 UD).....	57

สารบัญตาราง

เรื่อง

หน้า

ตารางที่ 1 สารเคมีที่ใช้ในการดำเนินโครงการ	5
ตารางที่ 2 การกำหนดรหัสของตัวอย่าง	7
ตารางที่ 3 ลักษณะปรากฏของสารละลายสูตร Prolog F1, Prolog F2 และ Prolog F3 ที่ความเข้มข้นต่างๆ และเตรียมในภาชนะปากกว้าง.....	17
ตารางที่ 4 ค่า pH ของสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ เมื่อเตรียมในภาชนะปากกว้าง แบบเตรียมเสร็จใหม่ (freshly prepared sample) และแบบที่เก็บตัวอย่าง ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (after kept at RT for 24 h) และ 48 ชั่วโมง (after kept at RT for 48 h)	20
ตารางที่ 5 ค่า pH ของสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ ที่เตรียมในภาชนะปากกว้าง และภาชนะปากแคบ แบบเตรียมเสร็จใหม่ (freshly prepared sample) และแบบตัวอย่างที่เก็บ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (after kept at RT for 24 h).....	23
ตารางที่ 6 ค่า pH ของสารละลายที่เตรียมจากสูตร Prolog F1 UD ที่ผลิตจากเครื่อง Hypo Plus รุ่น Wash (Prolog W), รุ่น Compact 7 ลิตร (Prolog C-7), รุ่น Tower 50 ลิตร (Prolog T-50) และรุ่น Max 200 ลิตร (Prolog M-200).....	24
ตารางที่ 7 ค่า ORP ของสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ เมื่อเตรียมในภาชนะปากกว้าง แบบเตรียมเสร็จใหม่ (freshly prepared sample) และแบบที่เก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (after kept at RT for 24 h) และ 48 ชั่วโมง (after kept at RT for 48 h)	26
ตารางที่ 8 ค่า ORP ของสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ เมื่อเตรียมในภาชนะปากกว้างและปากแคบ แบบเตรียมเสร็จใหม่ (freshly prepared sample) และแบบที่เก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (after kept at RT for 24 h)	28
ตารางที่ 9 ค่า ORP ของสารละลายที่เตรียมจากสูตร Prolog F1 UD ที่ผลิตจากเครื่อง Hypo Plus รุ่น Wash (Prolog W), รุ่น Compact 7 ลิตร (Prolog C-7), รุ่น Tower 50 ลิตร (Prolog T-50) และรุ่น Max 200 ลิตร (Prolog M-200).....	29
ตารางที่ 10 ปริมาณ available chlorine ของสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ เมื่อเตรียมในภาชนะปากกว้าง แบบเตรียมเสร็จใหม่ (freshly prepared sample) และแบบที่เก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (after kept at RT for 24 h).....	31
ตารางที่ 11 ปริมาณ available chlorine ของสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ ที่เตรียมในภาชนะปากแคบ แบบเตรียมเสร็จใหม่ (freshly prepared sample) และแบบที่เก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (after kept at RT for 24 h).....	33

ตารางที่ 12 ปริมาณ available chlorine ของสารละลายที่เตรียมจากสูตร Prolog F1 UD ที่ผลิตจากเครื่อง Hypo Plus รุ่น Wash (Prolog W), รุ่น Compact 7 ลิตร (Prolog C-7), รุ่น Tower 50 ลิตร (Prolog T-50) และรุ่น Max 200 ลิตร (Prolog M-200).....	35
ตารางที่ 13 เส้นผ่านศูนย์กลาง (diameter of inhibition zone) ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ ที่เตรียมแบบไม่ได้จุ่ม probe (NP).....	37
ตารางที่ 14 เส้นผ่านศูนย์กลาง (diameter of inhibition zone) ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ ที่เตรียมแบบจุ่ม probe.....	40
ตารางที่ 15 ค่า MIC และ MBC ของสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ แบบ undilute และที่เจือจางในอัตราส่วนต่างๆ.....	42
ตารางที่ 16 ค่า MIC และ MBC ของสารละลายสูตร Prolog F1, Prolog F2 และ Prolog F3 ในการยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรีย <i>E. coli</i> และ <i>S. aureus</i>	43
ตารางที่ 17 ค่า MIC และ MBC ของสารละลายสูตร Prolog F1, Prolog F2 และ Prolog F3 แบบ undilute และแบบที่เจือจางที่อัตราส่วนต่างๆ หลังเก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (after kept at RT for 24 h) และ 48 ชั่วโมง (after kept at RT for 48 h).....	45
ตารางที่ 18 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อแบคทีเรียและราของสารละลาย Prolog F1 แบบ undilute และแบบที่เจือจางที่อัตราส่วนต่างๆ.....	49
ตารางที่ 19 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อแบคทีเรียและราของสารละลาย Prolog F2 แบบ undilute และแบบที่เจือจางที่อัตราส่วนต่างๆ.....	49
ตารางที่ 20 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อแบคทีเรียและราของสารละลาย Prolog F3 แบบ undilute และแบบที่เจือจางที่อัตราส่วนต่างๆ.....	50
ตารางที่ 21 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อไวรัสของสารละลาย Prolog F1 แบบ undilute และแบบที่เจือจางที่อัตราส่วนต่างๆ	52
ตารางที่ 22 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อไวรัสของสารละลาย Prolog F2 แบบ undilute และแบบที่เจือจางที่อัตราส่วนต่างๆ	52
ตารางที่ 23 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อไวรัสของสารละลาย Prolog F3 แบบ undilute และแบบที่เจือจางที่อัตราส่วนต่างๆ	53
ตารางที่ 24 อิทธิพลของลำดับการเติมน้ำส้มสายชูที่ส่งผลต่อปริมาณคลอรีนทั้งหมด (available chlorine) ในสารละลาย	57

สารบัญรูป

เรื่อง

หน้า

รูปที่ 1 การตรวจสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี Disc diffusion assay (ก.) และ Broth dilution assay (ข.)	15
รูปที่ 2 ค่า pH ของสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ เมื่อเตรียมในภาชนะปากกว้าง แบบเตรียมเสร็จใหม่ (freshly prepared sample) และแบบที่เก็บตัวอย่าง ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (after kept at RT for 24 h) และ 48 ชั่วโมง (after kept at RT for 48 h)	20
รูปที่ 3 ค่า pH ของสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ ที่เตรียมในภาชนะปากกว้างและภาชนะปากแคบ แบบเตรียมเสร็จใหม่ (freshly prepared sample) (ซ้าย) และแบบที่เก็บ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (after kept at RT for 24 h) (ขวา)	22
รูปที่ 4 ค่า pH ของสารละลายที่เตรียมจากสูตร Prolog F1 UD ที่ผลิตจากเครื่อง Hypo Plus รุ่น Wash (Prolog W), รุ่น Compact 7 ลิตร (Prolog C-7), รุ่น Tower 50 ลิตร (Prolog T-50) และรุ่น Max 200 ลิตร (Prolog M-200)	24
รูปที่ 5 ค่า ORP ของสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ เมื่อเตรียมในภาชนะปากกว้าง แบบเตรียมเสร็จใหม่ (freshly prepared sample) และแบบที่เก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (after kept at RT for 24 h) และ 48 ชั่วโมง (after kept at RT for 48 h)	25
รูปที่ 6 ค่า ORP ของสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ เมื่อเตรียมในภาชนะปากกว้างและปากแคบ แบบเตรียมเสร็จใหม่ (freshly prepared sample) (ซ้าย) และแบบที่เก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (after kept at RT for 24 h) (ขวา)	27
รูปที่ 7 ค่า ORP ของสารละลายที่เตรียมจากสูตร Prolog F1 UD ที่ผลิตจากเครื่อง Hypo Plus รุ่น Wash (Prolog W), รุ่น Compact 7 ลิตร (Prolog C-7), รุ่น Tower 50 ลิตร (Prolog T-50) และรุ่น Max 200 ลิตร (Prolog M-200)	29
รูปที่ 8 ปริมาณ available chlorine ของสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ เมื่อเตรียมในภาชนะปากกว้าง (ก.) แบบเตรียมเสร็จใหม่ (freshly prepared sample) และ (ข.) แบบที่เก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (after kept at RT for 24 h)	32
รูปที่ 9 ปริมาณ available chlorine ของสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ เมื่อเตรียมในภาชนะปากแคบ (ก.) แบบเตรียมเสร็จใหม่ (freshly prepared sample) และ (ข.) แบบที่เก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (after kept at RT for 24 h)	34

รูปที่ 10 ปริมาณ available chlorine ของสารละลายที่เตรียมจากสูตร Prolog F1 UD ที่ผลิตจากเครื่อง Hypo Plus รุ่น Wash (Prolog W), รุ่น Compact 7 ลิตร (Prolog C-7), รุ่น Tower 50 ลิตร (Prolog T-50) และรุ่น Max 200 ลิตร (Prolog M-200).....	36
รูปที่ 11 การตรวจสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย <i>E. coli</i> และ <i>S. aureus</i> โดยวิธี Disc diffusion assay ของสารละลาย Prolog สูตร F1, F2 และ F3 ที่เตรียมไม่ได้จุ่ม probe (NP).....	39
รูปที่ 12 การตรวจสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย <i>E. coli</i> และ <i>S. aureus</i> โดยวิธี Disc diffusion assay ของสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ ที่เตรียมแบบจุ่ม probe	41
รูปที่ 13 การตรวจสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรีย <i>E. coli</i> และ <i>S. aureus</i> ของสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ แบบ undilute และแบบที่เจือจางในอัตราส่วนต่างๆ โดยวิธี Broth dilution assay	44
รูปที่ 14 การตรวจสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ แบบ undilute และแบบที่เจือจางในอัตราส่วนต่างๆ หลังเก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (after kept at RT for 24 h) และ 48 ชั่วโมง (after kept at RT for 48 h) โดยวิธี Broth dilution assay	47
รูปที่ 15 กราฟแสดงความแตกต่างของปริมาณ available chlorine ในการเตรียมสารละลาย Prolog F2 UD (freshly prepared sample) เพื่อศึกษาอิทธิพลของลำดับการเติมน้ำส้มสายชู.....	58

1. บทนำ

1.1 ที่มาของโครงการ

โรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (Coronavirus Disease 2019; Covid-19) เป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสโคโรนาหรือเชื้อ SARS-CoV-2 ซึ่งเป็นเชื้อที่จัดอยู่ในสายพันธุ์กลุ่มอาการทางเดินหายใจเฉียบพลันรุนแรง (severe acute respiratory syndrome) สัญญาณที่บ่งบอกของการติดเชื้อ ได้แก่ มีไข้ ไอ หายใจถี่ และหายใจลำบาก ในกรณีที่รุนแรงมากขึ้นอาจพบอาการปอดอักเสบ โรคทางเดินหายใจเฉียบพลันรุนแรง ไตวาย จนถึงขั้นเสียชีวิต สำหรับประเทศไทย กระทรวงสาธารณสุข ได้ติดตามสถานการณ์โรค ทั้งในประเทศและต่างประเทศ อย่างใกล้ชิดและเสริมสร้างความเข้มแข็งของระบบการเฝ้าระวังค้นหาผู้ป่วยโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 โดยการทำงานแบบบูรณาการทุกกระทรวงรวมทั้งประสานงานกับองค์การอนามัยโลก (World Health Organization; WHO) และประเทศในอาเซียน เพื่อดำเนินการอย่างมีประสิทธิภาพ ด้วยมาตรฐานระดับสูงสุดในการป้องกันควบคุมโรคติดต่อ

แนวทางในการควบคุมและป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อโรคอย่างมีประสิทธิภาพ โดย WHO ได้แนะนำสารฆ่าเชื้อ (disinfectant) 3 ชนิดที่สามารถทำลายเชื้อไวรัสนี้ได้ภายในระยะเวลาสั้น (ภายใน 1 นาที) ได้แก่ สารประกอบโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 0.1% (1,000 ppm) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (accelerated) 0.5% (5,000 ppm) และแอลกอฮอล์ 70% เพื่อป้องกันการแพร่กระจายเชื้อโรคที่ปนเปื้อนอยู่ในสภาพแวดล้อม

ปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงในการเลือกใช้น้ำยาฆ่าเชื้อ คือ สมบัติของเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการทำลาย เช่น สปอร์ของแบคทีเรีย (bacterial spore) จะมีความทนทานต่อการทำลายมากกว่า mycobacteria หรือเชื้อ mycobacteria จะมีความทนทานต่อการทำลายมากกว่าเชื้อไวรัส และเชื้อรา เป็นต้น ดังนั้น สารฆ่าเชื้อที่ดีที่สุดคือสารที่มีความสามารถในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในวงกว้าง นอกจากนี้ การใช้น้ำยาฆ่าเชื้อให้ได้ผล ขึ้นอยู่กับจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ ความดื้อหรือความไวของเชื้อจุลินทรีย์ต่อน้ำยาฆ่าเชื้อที่ใช้ ความเข้มข้นของน้ำยาฆ่าเชื้อที่ใช้ ระยะเวลาในการใช้น้ำยาฆ่าเชื้อในการทำความสะอาดพื้นผิว อุณหภูมิ เนื่องจากอุณหภูมิมีผลต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาทางชีววิทยาและทางเคมี และค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่อาจมีผลต่อการเกิด ionization ของสารเคมีและกระบวนการทางชีววิทยาที่เกิดขึ้นภายในเซลล์เชื้อจุลินทรีย์

โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (hypochlorous acid, sodium salt หรือ sodium hypochlorite; NaOCl) เป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่กว้าง (broad spectrum) สามารถฆ่าเชื้อได้ดีขึ้นกับความเข้มข้นที่ใช้ เป็นได้ทั้ง antiseptic เพื่อกำจัดเชื้อจุลินทรีย์บนผิวหรือเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต (ใช้ล้างแผลสกปรก เพื่อละลายและดับกลิ่นเนื้อเยื่อที่ตายแล้ว และใช้ล้างคลองรากฟันในงานทันตกรรม) และ disinfectant เพื่อกำจัดเชื้อจุลินทรีย์บนพื้นผิวสิ่งของต่างๆ ที่ไม่มีชีวิต เพื่อยับยั้งการแพร่กระจายของเชื้อในบ้านเรือนหรือทางสาธารณสุข โดยความเข้มข้นจะแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของ sodium hypochlorite หรือ available chlorine (ppm) (1% sodium hypochlorite = 10,000 ppm available chlorine)

บริษัท โพรลอก ไทเทเนียม คอร์ปอเรชั่น จำกัด เป็นบริษัทผู้ผลิตเครื่อง Hypo Plus สำหรับผลิตสารละลายฆ่าเชื้อจากน้ำส้มสายชู (กรดอะซิติก 5%) และเกลือแกง (NaCl) ที่สามารถผลิตสารฆ่าเชื้อกรดไฮโปคลอรัส (hypochlorous acid; HOCl) และโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (hypochlorous acid, sodium salt หรือ sodium hypochlorite; NaOCl) ซึ่งกรดไฮโปคลอรัสเป็นสารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อที่มีความน่าสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ และเป็นกรดชนิดเดียวกันกับที่เซลล์เม็ดเลือดขาวในร่างกายมนุษย์ผลิตขึ้นมาเพื่อฆ่าเชื้อโรค แบคทีเรีย ไวรัส และเชื้อรา ปัจจุบัน ได้มีการนำกรดชนิดนี้มาใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น การแพทย์และสาธารณสุข และอาหาร เป็นต้น

ทั้งนี้ บริษัทฯ มีความประสงค์จะศึกษาถึงปริมาณของกรดไฮโปคลอรัสและโซเดียมไฮโปคลอไรต์ ที่เกิดขึ้นในสารละลาย ที่ผลิตจากปริมาณ NaCl และน้ำส้มสายชูที่แตกต่างกัน เพื่อทราบถึงช่วง pH ปริมาณของ NaCl และกรดที่เหมาะสม ที่ส่งผลให้ปริมาณของ HOCl และ NaOCl (ตรวจสอบในรูปของ available chlorine) ในสารละลายที่ผลิตจากเครื่อง HYPO PLUS standard มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ราและไวรัสได้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1.2.1. ตรวจสอบปริมาณของกรดไฮโปคลอรัส (hypochlorous acid; HOCl) และโซเดียม ไฮโปคลอไรต์ (sodium hypochlorite; NaOCl) ในรูปของ available chlorine ในสารละลายที่ผลิตจากเครื่อง HYPO PLUS โดยใช้สภาวะการผลิตตามคู่มือการใช้ HYPO PLUS Standard: วิธีการใช้ HYPO PLUS เพื่อทำสเปรย์ฆ่าเชื้อโรค (Covid-19) สูตรกรดไฮโปคลอรัส ที่ pH ต่างๆ โดยการปรับความเข้มข้นของน้ำส้มสายชู

1.2.2 ตรวจสอบค่า oxidation-reduction potential (ORP) ของสารละลายในข้อ 1.2.1

1.2.3 ตรวจสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียจำนวน 3 ชนิด และเชื้อราจำนวน 1 ชนิด ของสารละลายในข้อ 1.2.1 ที่ระดับการเจือจาง (dilution) ต่างๆ

1.2.4 ตรวจสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อไวรัส จำนวน 3 ชนิด ของสารละลายในข้อ 1.2.1 ที่ระดับการเจือจาง (dilution) ต่างๆ

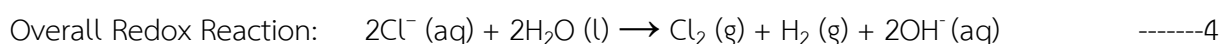
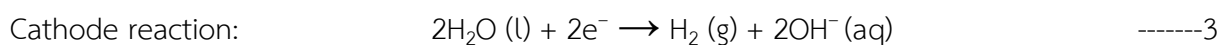
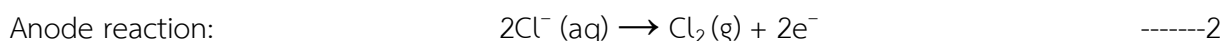
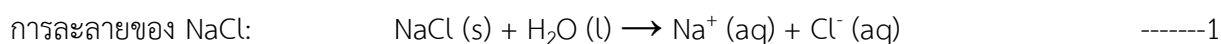
1.2.5 ตรวจสอบปริมาณของ available chlorine และค่า pH ของสารละลายที่ผลิตจากเครื่อง Hypo Plus Wash และ Hypo Plus Compact 7 ลิตร ที่เตรียมจากสัดส่วนของเกลือแกงและน้ำส้มสายชู ที่ให้ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย รา และไวรัสได้ดีที่สุด จากการตรวจสอบในข้อ 1.2.3 และ 1.2.4

1.3 เป้าหมาย

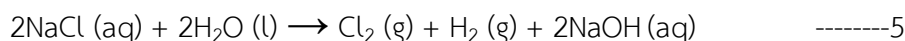
สามารถกำหนดช่วง pH และความเข้มข้นของน้ำส้มสายชูที่เหมาะสม ที่ส่งผลให้ปริมาณของ HOCl และ NaOCl (ตรวจสอบในรูปของ available chlorine) ในสารละลายที่ผลิตจากเครื่อง HYPO PLUS มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ราและไวรัส

2. ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

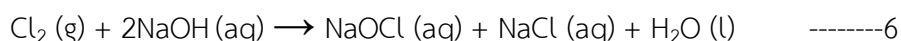
2.1 การผลิตกรดไฮโปคลอรัสและโซเดียมไฮโปคลอไรต์ โดยอาศัยหลักการ Electrochlorination กล่าวคือ การใช้ไฟฟ้ากระแสตรง (DC current) ผ่านขั้ว anode และ cathode ในสารละลายเกลือแกง (sodium chloride; NaCl) ปฏิกิริยาเกิดขึ้น แสดงดังสมการที่ 1-4



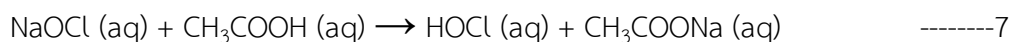
และเมื่อเขียนสมการที่รวม Sodium ion (Na^+) เข้าไป จะได้สมการที่ 5



โดยสรุป เมื่อเกิดปฏิกิริยา redox จะเกิดการสังเคราะห์ molecular chlorine (Cl_2) และ hydroxide ion (OH^-) ขึ้นมาภายในสารละลาย สารสองตัวดังกล่าวจะทำปฏิกิริยากันเพื่อเกิดเป็น NaOCl ดังสมการที่ 6



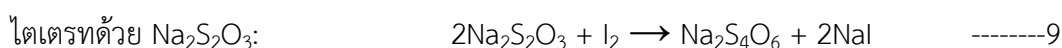
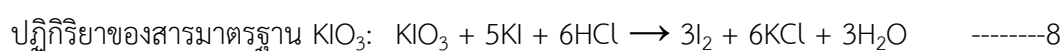
และเมื่อ sodium hypochlorite (NaOCl) อยู่ในสารละลายที่มีกรดอะซิติก (acetic acid; CH_3COOH) จะเกิดเป็นกรดไฮโปคลอรัส ได้ดังสมการที่ 7



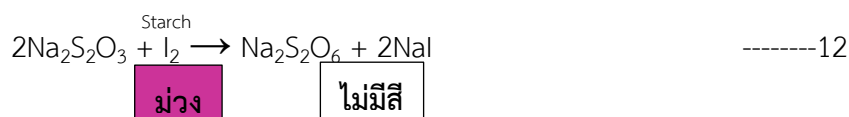
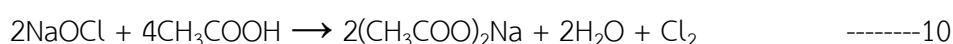
จะเห็นว่าในการปัจจัยที่ควบคุมปริมาณของ HOCl และ NaOCl ที่เกิดขึ้นในระบบ คือ ปริมาณเริ่มต้นของ NaCl และค่า pH ของสารละลาย

2.2 ปริมาณคลอรีนทั้งหมดที่เป็นส่วนประกอบ (available chlorine) ด้วยการไทเตรท (titration method) [1,2]

การตรวจสอบปริมาณคลอรีนทั้งหมดที่เป็นส่วนประกอบในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ด้วยการไทเตรทเป็นวิธีที่นิยมและมีรายงานเป็นจำนวนมาก เนื่องจากเป็นวิธีการที่ง่ายและรวดเร็ว อีกทั้งผลการทดสอบที่ได้ยังมีความน่าเชื่อถือ แต่การไทเตรทหาปริมาณสารคลอรีนมักจะหลีกเลี่ยงการใช้สารคลอรีนโดยตรงในการทำปฏิกิริยา แต่จะเปลี่ยนไอออนที่ทำปฏิกิริยาเป็นไอโอดีนก่อน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและความแม่นยำในการตรวจวัดเชิงปริมาณ รวมทั้งไอโอดีนยังง่ายต่อการติดตามปฏิกิริยากว่าการใช้คลอรีนโดยตรง สารมาตรฐานที่นิยมใช้ในการหาปริมาณคลอรีนทั้งหมดที่เป็นส่วนประกอบในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ คือ โซเดียมไทโอซัลเฟต (Sodium thiosulfate, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) ก่อนที่จะนำสารโซเดียมไทโอซัลเฟตมาใช้ในการตรวจสอบปริมาณคลอรีนนั้น จะทำการไทเตรทเพื่อสอบเทียบ (calibrate) ด้วยสารมาตรฐานโพแทสเซียมไอโอเดต (Potassium iodate, KIO_3) ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน ซึ่งปฏิกิริยาเกิดขึ้น แสดงดังสมการที่ 8 – 9



จากนั้น จะสามารถคำนวณความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ที่แน่นอนได้ เพื่อนำไปใช้ตรวจสอบปริมาณคลอรีนในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ โดยในการไทเตรทสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ จะมีการเติมกรดอะซิติก (CH_3COOH) เพื่อให้ได้สารคลอรีน แล้วจึงเติมโพแทสเซียมไอโอไดด์ (Potassium iodide, KI) เพื่อให้เกิดการแลกเปลี่ยนประจุระหว่างคลอรีนกับไอโอดีน แล้วไทเตรทด้วย $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ โดยใช้แป้ง (starch) เป็นอินดิเคเตอร์ เมื่อถึงจุดยุติ น้ำแป้งจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นใสไม่มีสี ปฏิกิริยาการไทเตรทเกิดขึ้นดังสมการที่ 10 – 12



จากนั้น นำปริมาณสารละลาย $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ที่ใช้จนถึงจุดยุติ ไปคำนวณเป็นปริมาณของคลอรีนทั้งหมดที่เป็นส่วนประกอบในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ในอัตราส่วน 2 ส่วนของสารละลาย $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ เทียบกับปริมาณ 1 ส่วนของสารคลอรีน

3. วิธีการวิจัย

3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการศึกษา

เครื่องมือและอุปกรณ์ในการศึกษา

- 1) pH meter (Mettler Toledo, SevenEasy) โดยใช้หัว probe InLab Expert Pro สำหรับวัดค่า pH และ ORP electrode InLab Redox สำหรับวัดค่า oxidation-reduction potential (ORP)
- 2) อุปกรณ์และเครื่องแก้วสำหรับการทำ titration
- 3) ตู้ Biosafety cabinet, เครื่องแก้ว, จานเพาะเชื้อ (petridish) และ facility สำหรับ antibacterial testing (Biosafety level 2)

สารเคมีในการศึกษา

สารเคมีที่ใช้ในการดำเนินโครงการวิจัยนี้ แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สารเคมีที่ใช้ในการดำเนินโครงการ

ชื่อสารเคมี	CAS No.	ชื่อทางการค้า	ความบริสุทธิ์
เกลือแกง (sodium chloride)		สารจากบริษัทฯ	
น้ำส้มสายชู (acetic acid)		ภูเขาทอง	-
น้ำ	-	คริสตัล	-
โพแทสเซียมไอโอไดด์ (potassium iodide)	7681-11-0	TCI chemical	>99.5%
โพแทสเซียมไอโอเดต (potassium iodate)	7756-05-6	SIGMA-ALDRICH	99.5%
กรดกลูเซิลแอซิดิก (acetic acid glacial)	64-19-7	CARLO ERBA	≥99.9%
แป้งมันสำปะหลัง	-	ทั่วไป	-
โซเดียมไทโอซัลเฟต เพนตะไฮเดรต (sodium thiosulfate pentahydrate)	10102-17-7	TCI chemical	>99.0%

ตารางที่ 1 สารเคมีที่ใช้ในการดำเนินโครงการ (ต่อ)

ชื่อสารเคมี	Cas no.	Brand	Purity
กรดไฮโดรคลอริก	7647-	CARLO	37%
ริก	01-0	ERBA	
(hydrochloric acid)			
Difco™	LOT	Becton,	-
Mueller	8170915	Dickinson	
Hinton Broth	REF	(BD)	
(MHB)	275730		
Bacto™ Agar	LOT	Becton,	-
	7009856	Dickinson	
	REF	(BD)	
	214010		
บัฟเฟอร์	pH 4.01	Mettler	-
สำหรับสอบ	LOT	Toledo	
เทียบเครื่อง pH	1E143C		
meter	pH 7.00		
	LOT		
	1E140C		
	pH 9.21		
	LOT		
	1E142A		
สารละลาย	200	Mettler	-
มาตรฐาน	mV/pH	Toledo	
สำหรับสอบ	7 LOT		
เทียบ ORP	1F293C		
electrode			

3.2 การดำเนินงานวิจัยแบ่งออกเป็น 7 ส่วนหลัก ดังต่อไปนี้

3.2.1 การเตรียมสารละลายด้วยเครื่อง Hypo Plus Standard ตามคู่มือการใช้งานของเครื่อง (อ้างอิงจากวิธีการใช้ Hypo Plus เพื่อทำสเปรย์ฆ่าเชื้อโรค (Covid-19) สูตรกรดไฮโปคลอรัส) ดังนี้

- นำน้ำดื่มปริมาตร 0.5 ลิตร ผสมกับเกลือแกง (NaCl) และน้ำส้มสายชูที่ปริมาณต่างๆ ดังนี้

สูตรที่ 1: เกลือแกง 1 ช้อนโต๊ะ (18 กรัม) ไม่เติมน้ำส้มสายชู

สูตรที่ 2: เกลือแกง 1 ช้อนชา (6 กรัม) และน้ำส้มสายชู 0.5 ช้อนชา (2.5 กรัม)

สูตรที่ 3: เกลือแกง 1 ช้อนชา (6 กรัม) และน้ำส้มสายชู 1 ช้อนชา (5 กรัม)

หมายเหตุ: 1) เกลือแกง 1 ช้อนชา เทียบเท่ากับ 6 กรัม

2) น้ำส้มสายชู 1 ช้อนชา เทียบเท่ากับ 5 กรัม

3) 1 ช้อนโต๊ะ เทียบเท่ากับ 3 ช้อนชา

- คนให้ของผสมเข้ากันและ NaCl ละลายหมด
- จุ่มส่วนปลายของ Hypo Plus ลงในสารละลาย เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยทางทีมวิจัยเปลี่ยนแบตเตอรี่ของเครื่องใหม่ทุกครั้งที่ทำกรเตรียมสารละลาย

ทั้งนี้ ในขั้นตอนการเตรียมสารละลายทั้ง 3 สูตรข้างต้น ทีมวิจัยได้ทดลองเตรียมในภาชนะ 2 แบบ คือ (1) ภาชนะปากกว้าง (บีกเกอร์ขนาด 600 มิลลิลิตร) และ (2) ภาชนะปากแคบ (ขวดน้ำดื่มพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร) และได้ตรวจสอบค่า pH, ORP และ available chlorine ของสารละลายทั้ง 3 สูตร ที่ dilution ต่างๆ ตามขั้นตอนที่ระบุในหัวข้อ **3.2.2** (ค่า pH), **3.2.3** (ค่า ORP) และ **3.2.4** (ค่า available chlorine) หลังจากเตรียมเสร็จทันที (freshly prepared sample) นอกจากนี้ ยังได้ทำการเก็บตัวอย่างสารละลายทุกสูตร ในขวดน้ำดื่มพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร ที่ปิดฝาสนิท ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (after kept at RT for 24 h) และ 48 ชั่วโมง (after kept at RT for 48 h) เพื่อตรวจวัดค่า pH, ORP และ available chlorine และเปรียบเทียบกับ freshly prepared sample

ทีมวิจัยได้กำหนดรหัสของตัวอย่างที่เตรียมและเก็บที่ระยะเวลาต่างๆ มีรายละเอียดดัง**ตารางที่ 2**

ตารางที่ 2 การกำหนดรหัสของตัวอย่าง

สูตรที่ใช้	ความ	ชื่อ
เตรียม	เข้มข้น	ตัวอย่าง
สารละลาย		

ของ		
สารละลาย		
สูตรที่ 1	Undilute	Prolog F1 UD
	Dilute 1:1	Prolog F1 D1- 1
	Dilute 1:2	Prolog F1 D1- 2
	Dilute 1:4	Prolog F1 D1- 4
สูตรที่ 2	Undilute	Prolog F2 UD
	Dilute 1:1	Prolog F2 D1- 1
	Dilute 1:2	Prolog F2 D1- 2
	Dilute 1:4	Prolog F2 D1- 4
สูตรที่ 3	Undilute	Prolog F3 UD
	Dilute 1:1	Prolog F3 D1- 1

Dilute 1:2	Prolog
	F3 D1-
	2
Dilute 1:4	Prolog
	F3 D1-
	4

3.2.2 การตรวจสอบ pH ของสารละลาย ที่ความเข้มข้น undilute และที่อัตราส่วนความเข้มข้นที่เจือจางด้วยน้ำดื่ม (dilution) 1:1, 1:2 และ 1:4 มีขั้นตอนดังนี้

การสอบเทียบ pH electrode

1. เปิดเครื่อง pH meter ที่ต่อกับหัววัด InLab Expert Pro และ warm เครื่องประมาณ 5 นาที
2. ล้าง pH electrode ด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water) 3 รอบ
3. สอบเทียบ pH electrode โดยจุ่ม electrode ลงใน InLab technical buffer solution pH 4.01 กด CAL
4. ล้าง pH electrode ด้วยน้ำปราศจากไอออน และสอบเทียบโดยจุ่ม pH electrode ลงใน InLab technical buffer solution pH 7.00 กด CAL
5. ล้าง pH electrode ด้วยน้ำปราศจากไอออน และสอบเทียบโดยจุ่ม pH electrode ลงใน InLab technical buffer solution pH 9.21 กด CAL
6. ล้าง pH electrode ด้วยน้ำปราศจากไอออน บันทึกอุณหภูมิในการทดลอง
7. เครื่อง pH meter พร้อมใช้งานในการวัด pH ของตัวอย่างสารละลาย

การวัดค่า pH ของสารละลาย

8. ล้าง pH electrode ด้วยน้ำปราศจากไอออน
9. จุ่ม pH electrode ลงในสารละลายที่ต้องการตรวจสอบค่า pH
10. กดปุ่ม Read เพื่ออ่านค่า pH ของสารละลาย บันทึกผลที่เครื่องอ่านได้
11. ล้าง pH electrode ด้วยน้ำปราศจากไอออน

12. เครื่องมือพร้อมใช้งานในการวัดค่า pH ของตัวอย่างต่อไป
13. เก็บสารละลายตัวอย่าง เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วทำการทดลองซ้ำตั้งแต่ขั้นตอนที่ 8 – 12

การวัดค่า pH ของสารละลายฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตจากเครื่อง Hypo Plus รุ่น Wash, รุ่น Compact 7 ลิตร, รุ่น Tower 50 ลิตร และรุ่น Max 200 ลิตร

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 8 ถึง 12

3.2.3 การตรวจสอบค่า ORP ของสารละลาย ด้วยเครื่อง pH meter โดยใช้หัววัด InLab Redox ตามมาตรฐาน ASTM D1498 – 14 [3] มีขั้นตอนดังนี้

การสอบเทียบ ORP electrode

1. เปิดเครื่อง pH meter ที่ต่อกับหัววัด InLab Redox และ warm เครื่องประมาณ 5 นาที
2. ล้าง ORP electrode ด้วยน้ำปราศจากไอออน 3 รอบ
3. เปลี่ยนโหมดเครื่องมือให้อ่านค่า mV โดยกดปุ่ม pH/mV
4. สอบเทียบโดยจุ่ม ORP electrode ลงใน InLab redox buffer solution 220 mV/pH 7 กด Read
5. บันทึกค่า ORP ที่วัดได้ และคำนวณผลต่างของค่า ORP ที่วัดได้กับค่า ORP ของสารละลาย buffer มาตรฐาน ที่ระบุใน specification (220 mV) เพื่อใช้เป็น correction value
6. ล้าง ORP electrode ด้วยน้ำปราศจากไอออน บันทึกอุณหภูมิในการทดลอง
7. เครื่องมือพร้อมใช้งานในการวัด ORP ของตัวอย่าง

การวัดค่า ORP ของตัวอย่าง

8. ล้าง ORP electrode ด้วยน้ำปราศจากไอออน
9. จุ่ม ORP electrode ลงในตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบค่า ORP
10. กดปุ่ม Read เพื่ออ่านค่า ORP จากเครื่องมือ
11. หักลบกับค่า correction value ที่คำนวณได้จากการสอบเทียบข้างต้น และบันทึกผล
12. ล้าง ORP electrode ด้วยน้ำปราศจากไอออน
13. เครื่องมือพร้อมใช้งานในการวัด ORP ของตัวอย่างครั้งต่อไป
14. เก็บสารละลายตัวอย่าง เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วทำการทดลองซ้ำตั้งแต่ขั้นตอนที่ 8 – 13

การวัดค่า ORP ของสารละลายฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตจากเครื่อง Hypo Plus รุ่น Wash, รุ่น Compact 7 ลิตร, รุ่น Tower 50 ลิตร และรุ่น Max 200 ลิตร

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 8 ถึง 13

3.2.4 การตรวจสอบ available chlorine ของสารละลาย ที่ความเข้มข้น undilute และที่อัตราส่วนความเข้มข้นที่เจือจางด้วยน้ำดื่ม (dilution) 1:1, 1:2 และ 1:4 ด้วยเทคนิค titration อ้างอิง มอก. 225-2542 [4] มีขั้นตอน ดังนี้

การเตรียมสารเคมีสำหรับการไตเตรท

1. ผลึกโพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI)
2. กรดกลูเซียมแอซิติก (Glacial acetic acid)
3. น้ำแป้ง (แป้งมันสำปะหลัง) 0.5 กรัม ในน้ำอุ่น 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร
4. สารละลายมาตรฐานโซเดียมไทโอซัลเฟต 0.01 โมลต่อลิตร (โมลาร์) ซึ่งเตรียมได้ดังนี้
 - ชั่งสารโซเดียมไทโอซัลเฟต 2.4818 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นในขวดปริมาตรขนาด 1,000 ลูกบาศก์เซนติเมตร
 - เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร และเก็บไว้ในที่ป้องกันแสงได้

การสอบเทียบมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไทโอซัลเฟต 0.01 โมลต่อลิตร กับสารมาตรฐานโพแทสเซียมไอโอเดต

1. ชั่งสารโพแทสเซียมไอโอเดต 0.2140 กรัม (ที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 103 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง และทำให้เย็น) ใส่ลงในขวดปริมาตรขนาด 1,000 ลูกบาศก์เซนติเมตร และเติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร
2. ปิเปตสารละลายโพแทสเซียมไอโอเดต 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่ในขวดรูปกรวยขนาด 500 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร
3. เติมสารโพแทสเซียมไอโอไดด์ ปริมาณ 1.00 กรัม

4. เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 15 ลูกบาศก์เซนติเมตร
5. ปิดปากขวดด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ แล้วเก็บไว้ในที่ไม่มีแสงเป็นเวลา 10 นาที
6. ทำการไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไทโอซัลเฟต จนสารละลายเปลี่ยนจากสีส้มเป็นสีเหลืองอ่อน
7. เติมน้ำแปป 1 มิลลิลิตร (สารละลายเปลี่ยนเป็นสีม่วง)
8. ไทเทรตต่อจนกระทั่งจนถึงจุดยุติ (สารละลายเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสารละลายใส ไม่มีสี) บันทึกปริมาตรสารที่ใช้ และคำนวณความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไทโอซัลเฟต

การไทเทรตหาปริมาณคลอรีนทั้งหมดที่เป็นส่วนประกอบ (available chlorine) ในสารละลาย

1. ชั่งสารละลายตัวอย่าง ปริมาณ 20.00 กรัม (ทราบปริมาณแน่นอน) ใส่ในขวดปริมาตรขนาด 1,000 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วเติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร
2. ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร
3. เติมสารโพแทสเซียมไอโอไดด์ ปริมาณ 1.00 กรัม (สารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลือง)
4. เติมกรดเกลเซียลแอซิดิก ปริมาตร 4 มิลลิลิตร
5. เติมน้ำแปป ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (สารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน-ม่วง)
6. ไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไทโอซัลเฟต (ที่ผ่านการสอบเทียบมาตรฐานและทราบความเข้มข้นที่แน่นอนแล้ว) จนถึงจุดยุติ (สารละลายเปลี่ยนสีเป็นใส ไม่มีสี)
7. บันทึกปริมาตรสารละลายมาตรฐานโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้ และคำนวณหาปริมาณ available chlorine
8. ทำการทดลองซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้ง เพื่อหาค่าเฉลี่ยและค่าความคลาดเคลื่อน
9. เก็บสารละลายตัวอย่างที่เตรียมได้จากเครื่อง Hypo Plus เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการทดลองซ้ำตั้งแต่ขั้นตอนที่ 9 – 16

การไทเทรตหาปริมาณคลอรีนทั้งหมดที่เป็นส่วนประกอบ (available chlorine) ของสารละลายฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตจากเครื่อง Hypo Plus รุ่น Wash, รุ่น Compact 7 ลิตร, รุ่น Tower 50 ลิตร และรุ่น Max 200 ลิตร

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อที่ 9-16

3.2.5 การตรวจสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion assay และ Broth dilution assay

การตรวจสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ATCC 25922 (*E. coli*) และ *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (*S. aureus*) ซึ่งใช้เป็นตัวแทนแบคทีเรียชนิดแกรมลบและแกรมบวก ด้วยวิธี Disc diffusion assay และ Broth dilution assay ดำเนินการ ณ ห้องปฏิบัติการที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีเพื่อคุณภาพชีวิตและเวชสำอาง ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ สวทช. ตัวอย่างสารละลาย (เตรียมจากสูตรที่ระบุไว้ในขั้นตอน 3.2.1) ถูกแบ่งเป็น 2 กลุ่มการทดลอง คือตัวอย่างที่จุ่ม probe Hypo Plus และไม่จุ่ม probe (มีตัวย่อ NP ระบุที่ท้ายชื่อของตัวอย่าง) ขั้นตอนการตรวจสอบ มีดังนี้

วิธี Disc diffusion assay (แสดงดังรูปที่ 1 (ก))

1. ปรับความเข้มข้นเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Broth (MHB) ให้มีค่า optical density ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) เท่ากับ 0.1 จะได้ความเข้มข้นของเชื้อ *E. coli* ประมาณ 10^8 (colony forming unit/mL, cfu/mL) และเชื้อ *S. aureus* ประมาณ 10^{12} cfu/mL
2. ใช้ไม้พันสำลีปลอดเชื้อ (sterile cotton swab) ป้ายเชื้อ (swab) ลงบนอาหารแข็ง Mueller Hinton Agar (MHA)
3. หยดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบน disc สำหรับทดสอบ (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) และวาง disc ที่มีตัวอย่างบนอาหารแข็งที่ผ่านการป้ายเชื้อแล้ว จากนั้น บ่มในตู้บ่ม ณ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 – 17 ชั่วโมง

วิธี Broth diffusion assay (แสดงดังรูปที่ 1 (ข))

4. ปรับความเข้มข้นเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ให้มีความเข้มข้นของเชื้อ *E. coli* และเชื้อ *S. aureus* ประมาณ 10^7 cfu/mL

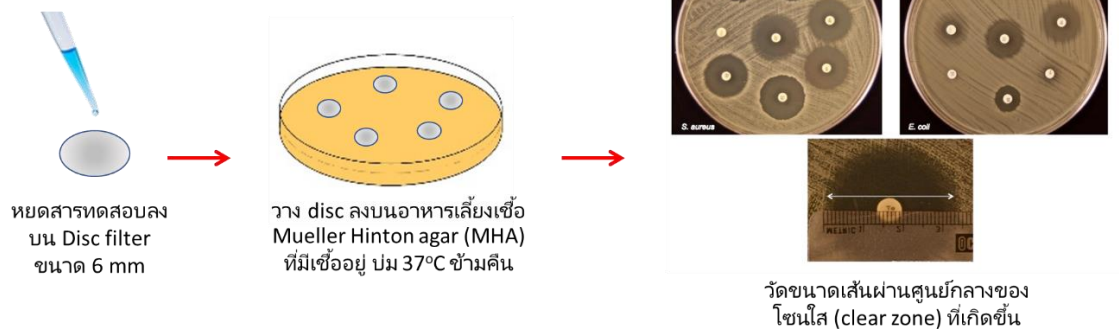
5. เจือจางตัวอย่างด้วย MHB แบบ 2-fold serial dilution ใน 96-well plate มีหลุมควบคุมเป็น broth ที่ไม่มีสารตัวอย่าง โดยปริมาตรในแต่ละหลุม เท่ากับ 100 ไมโครลิตร
6. เติม stock เชื้อที่ปริมาตรเท่ากับ 100 ไมโครลิตร ให้เท่ากันทุกหลุม จากนั้น บ่มในตู้บ่ม ณ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 – 17 ชั่วโมง คิดเป็นปริมาณเชื้อทดสอบประมาณ 10^6 cfu
7. เมื่อครบระยะเวลาบ่ม นำ 96-well plate ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยเทียบกับหลุมควบคุม หากค่า OD₆₀₀ ของหลุมตัวอย่างน้อยกว่าหลุมควบคุมและมีความใส คาดได้ว่าไม่มีเชื้ออยู่ จะถูกรายงานเป็นค่าความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ หรือค่า minimal inhibitory concentration (MIC)
8. ทำการ subculture เชื้อจาก broth ในหลุมตัวอย่างที่มีความใส (ตั้งแต่ช่วง MIC ขึ้นไป) streak บน MHA จากนั้น บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 – 17 ชั่วโมง โดยความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ กล่าวคือ ไม่มีเชื้อเจริญขึ้นบน MHA จะเรียกว่าค่าความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ หรือค่า minimal bactericidal concentration (MBC)

(ก)

การตรวจสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธี Disc diffusion assay

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ:

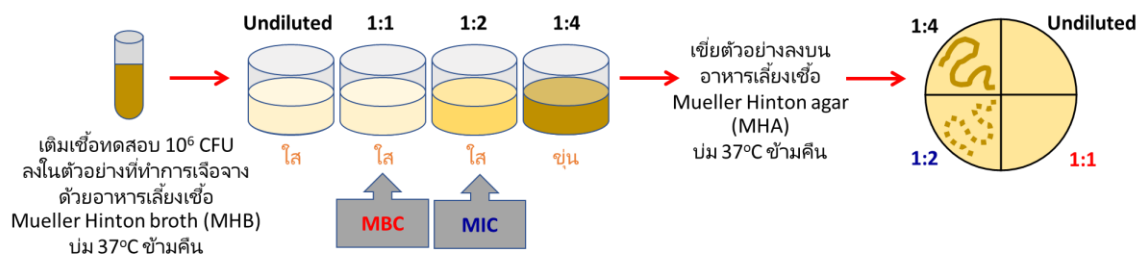
- ตัวแทนแกรมลบ คือ *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 25922
- ตัวแทนแกรมบวก คือ *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 6538



<http://www.microbeworld.org/component/jlibrary/?view=article&id=12255>

(ข)

การตรวจสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธี Broth dilution assay



ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC)

➢ พิจารณาจาก ความขุ่นใส ของตัวอย่างหลังจากบ่มไว้ 16-17 h ที่ 37°C

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC)

➢ พิจารณาจาก การไม่มีเชื้อ แบคทีเรียเจริญเติบโตบนอาหารแข็ง MHA

รูปที่ 1 การตรวจสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี Disc diffusion assay (ก.) และ Broth dilution assay (ข.)

3.2.6 การตรวจสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ตามประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) เรื่อง “วิธีการทดสอบและเกณฑ์ตัดสินผลการทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อโรคบนพื้นแข็งที่ไม่มีรูพรุนของผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อโรค ชนิดฉีดพ่นธรรมดา หรือฉีดพ่นอัดก๊าซ” (แบบ one step cleaner) ของสารละลายสูตรต่างๆ แบบ freshly prepared sample ที่เตรียมในภาชนะปากกว้าง ดำเนินการ ณ คณะเทคนิคการแพทย มหาวิทยาลัยมหิดล โดยตรวจสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ดังต่อไปนี้ *Salmonella enterica* (choleraesuis) ATCC 10708, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* PRD 10 ATCC 15442 (เป็นตัวแทนของเชื้อแบคทีเรียในสถานพยาบาล) และเชื้อรา *Trichophyton mentagrophytes* clinical isolate โดยทำการทดสอบกับสารละลายที่ความเข้มข้น undilute และที่อัตราส่วนความเข้มข้นที่เจือจางด้วยน้ำดื่ม และใช้เวลาที่เชื้อสัมผัสกับสารละลาย (exposure time) เป็นเวลา 10 นาที

3.2.7 การตรวจสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อไวรัส

การทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อไวรัสของสารละลายสูตรต่างๆ แบบ freshly prepared sample ที่เตรียมในภาชนะปากกว้าง ดำเนินการ ณ คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล โดยทำการทดสอบกับสารละลายที่ความเข้มข้น undilute และที่อัตราส่วนความเข้มข้นที่เจือจางด้วยน้ำดื่ม (dilution) 1:1, 1:2 และ 1:4 มีวิธีทดสอบอย่างย่อ ดังนี้

1. การทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อไวรัส Influenza A virus subtype H1N1 ซึ่งเป็นไวรัสก่อโรคไข้หวัดใหญ่ ทำโดยบ่มตัวอย่างสารละลายกับเชื้อไวรัสเป็นเวลา 1 นาที และตรวจวัดการรอดชีวิตของไวรัสในเซลล์ Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) cells โดยวิธี CDC real time-reverse transcription

polymerase chain reaction (rRT-PCR) protocol (อ้างอิงตามวิธีของ WHO Collaborating Centre for influenza at CDC Atlanta, United State of America) ประสิทธิภาพในการต้านไวรัสของตัวอย่างจะเปรียบเทียบโดยการวัดจำนวน copy number ของไวรัสเทียบกับตัวควบคุม (ไม่มีสารทดสอบ)

2. การทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อไวรัส Porcine epidemic diarrhea virus (PED virus หรือ PEDV) ซึ่งเป็นไวรัสกลุ่ม Corona เช่นเดียวกับ SARS-CoV2 ซึ่งก่อโรค Coronavirus disease ในปี 2019 (COVID-19) ทำโดยการบ่มตัวอย่างสารละลายกับเชื้อไวรัสเป็นเวลา 1 นาที และตรวจวัดการรอดชีวิตของไวรัสในเซลล์ Vero (African green monkey's kidney) cells หลังจากบ่มไวรัสกับเซลล์ในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน โดยวิธี plaque reduction neutralization test (PRNT) ตามวิธีของ Wang และคณะ 2005 [5] ประสิทธิภาพในการต้านไวรัสของตัวอย่างจะเปรียบเทียบโดยการนับจำนวน plaque number ของไวรัสเทียบกับตัวควบคุม (ไม่มีสารทดสอบ)

3. การทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อไวรัส enterovirus 71 (EV 71) ซึ่งจัดเป็นไวรัสชนิดไม่มีเปลือกหุ้ม non-enveloped virus ซึ่งก่อโรคมือเท้าปาก ทำโดยการบ่มตัวอย่างสารละลายกับเชื้อไวรัสเป็นเวลา 1 นาที และตรวจวัดการรอดชีวิตของไวรัสในเซลล์ Vero (African green monkey's kidney) cells หลังจากบ่มไวรัสกับเซลล์ในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน โดยวิธี plaque reduction neutralization test (PRNT) ตามวิธีของ Yin และคณะ 2019 [6] ประสิทธิภาพในการต้านไวรัสของตัวอย่างจะเปรียบเทียบโดยการนับจำนวน plaque number ของไวรัส เทียบกับตัวควบคุม (ไม่มีสารทดสอบ)

4. ผลและอภิปรายผลการวิจัย

4.1 ผลการเตรียมสารละลายด้วยเครื่อง Hypo Plus

สารละลายที่เตรียมได้จากสูตร Prolog F1, Prolog F2 และ Prolog F3 ทั้งแบบ undilute และที่เจือจางที่อัตราส่วนต่างๆ ด้วยน้ำดื่ม ในภาชนะปากกว้าง มีลักษณะปรากฏ ดังตารางที่ 3 พบว่า สารละลายมีความใส ไม่มีสี และมีกลิ่นของคลอรีนชัดเจน โดยตัวอย่างที่มีความเข้มข้นสูงจะได้กลิ่นของคลอรีนสูงกว่าตัวอย่างที่ทำการเจือจางที่ dilution ต่างๆ

ตารางที่ 3 ลักษณะปรากฏของสารละลายสูตร Prolog F1, Prolog F2 และ Prolog F3 ที่ความเข้มข้นต่างๆ และเตรียมในภาชนะปากกว้าง

สูตรที่ใช้ เตรียม สารละลาย	ชื่อ ตัวอย่าง	ลักษณะปรากฏ
สูตรที่ 1	Prolog F1 UD	

	Prolog F1 D1- 1	
	Prolog F1 D1- 2	
	Prolog F1 D1- 4	
สูตรที่ 2	Prolog F2 UD	

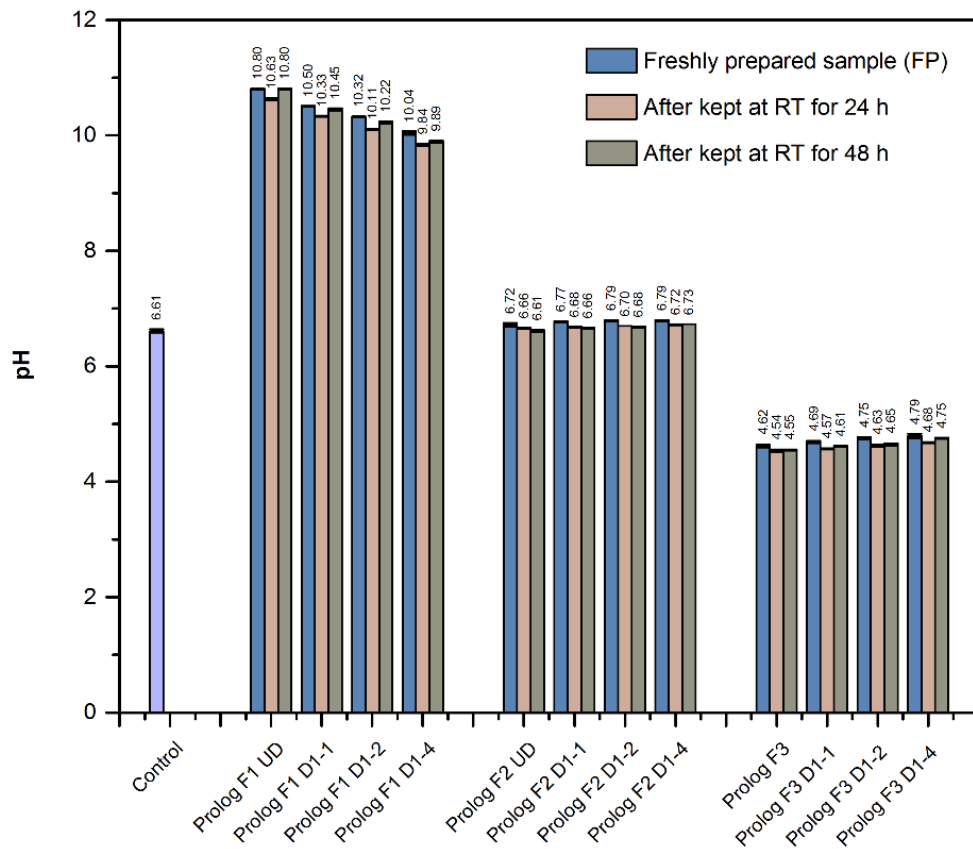
ตารางที่ 3 ลักษณะปรากฏของสารละลายสูตร Prolog F1, Prolog F2 และ Prolog F3 ที่ความเข้มข้นต่างๆ และเตรียมในภาชนะปากกว้าง (ต่อ)

สูตรที่ใช้ เตรียม สารละลาย	ชื่อ ตัวอย่าง	ลักษณะปรากฏ
สูตรที่ 2	Prolog F2 D1- 1	
	Prolog F2 D1- 2	

	Prolog F2 D1- 4	
สูตรที่ 3	Prolog F3 UD	
	Prolog F3 D1- 1	
	Prolog F3 D1- 2	
	Prolog F3 D1- 4	

4.2 ผลการตรวจสอบ pH ของสารละลาย

ค่า pH ของสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ ที่เตรียมในภาชนะปากกว้าง แบบเตรียมเสร็จใหม่ (freshly prepared sample) และแบบที่เก็บตัวอย่าง ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (after kept at RT for 24 h) และ 48 ชั่วโมง (after kept at RT for 48 h) แสดงรูปที่ 2 และตารางที่ 4



รูปที่ 2 ค่า pH ของสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ เมื่อเตรียมในภาชนะปากกว้าง แบบเตรียมเสร็จใหม่ (freshly prepared sample) และแบบที่เก็บตัวอย่าง ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (after kept at RT for 24 h) และ 48 ชั่วโมง (after kept at RT for 48 h)

ตารางที่ 4 ค่า pH ของสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ เมื่อเตรียมในภาชนะปากกว้าง แบบเตรียมเสร็จใหม่ (freshly prepared sample) และแบบที่เก็บตัวอย่าง ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (after kept at RT for 24 h) และ 48 ชั่วโมง (after kept at RT for 48 h)

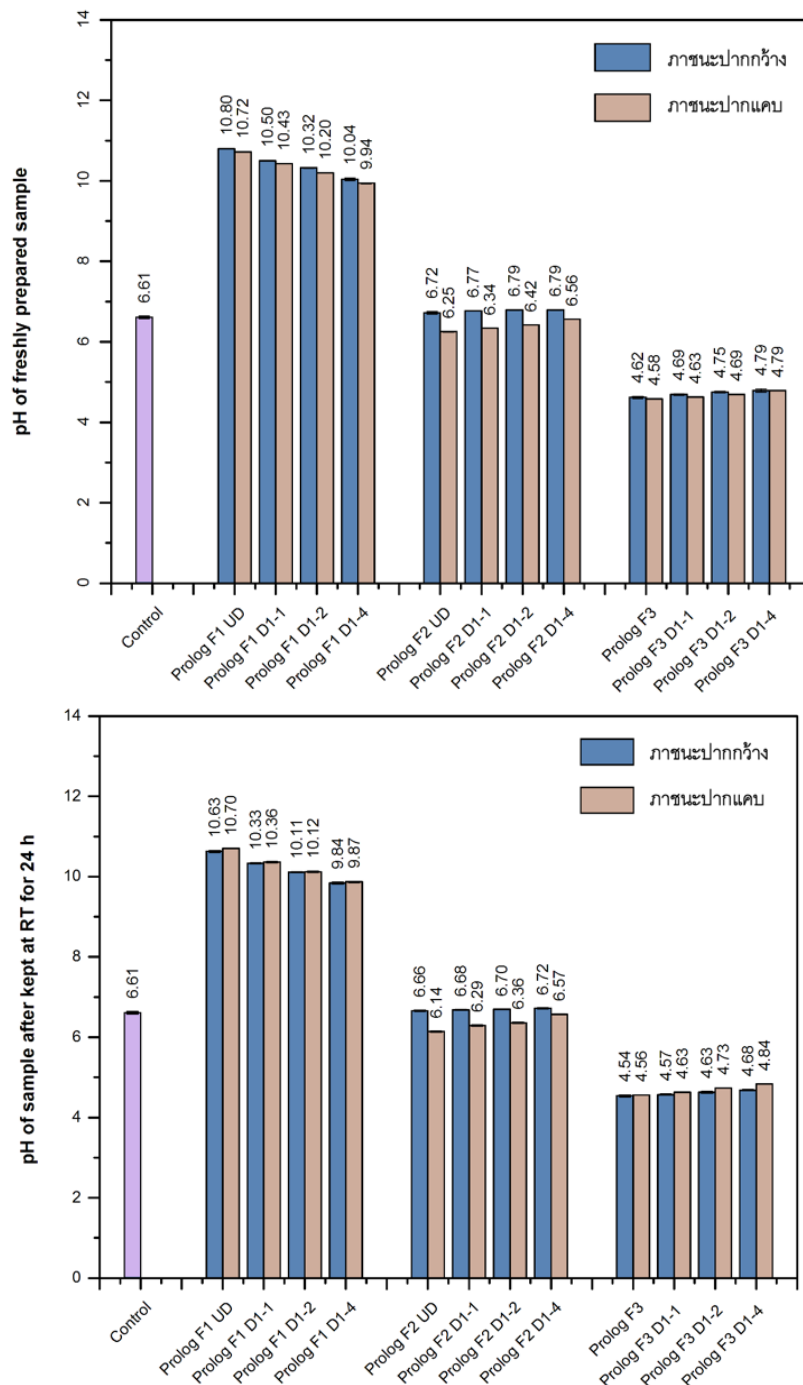
Sample name	pH
-------------	----

รายงานฉบับนี้จัดทำขึ้นโดยศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ สวทช.

	Freshly prepared sample	After kept at RT for 24 h	After kept at RT for 48 h
Control	6.61 ± 0.03	-	-
Prolog F1 UD	10.8 ± 0.01	10.63 ± 0.02	10.80 ± 0.01
Prolog F1 D1-1	10.50 ± 0.01	10.33 ± 0.01	10.45 ± 0.02
Prolog F1 D1-2	10.32 ± 0.01	10.11 ± 0.01	10.22 ± 0.02
Prolog F1 D1-4	10.04 ± 0.03	9.84 ± 0.02	9.89 ± 0.02
Prolog F2 UD	6.72 ± 0.03	6.66 ± 0.01	6.61 ± 0.02
Prolog F2 D1-1	6.77 ± 0.01	6.68 ± 0.01	6.66 ± 0.01
Prolog F2 D1-2	6.79 ± 0.01	6.70 ± 0.00	6.68 ± 0.01
Prolog F2 D1-4	6.79 ± 0.01	6.72 ± 0.01	6.73 ± 0.00
Prolog F3 UD	4.62 ± 0.03	4.54 ± 0.02	4.55 ± 0.01
Prolog F3 D1-1	4.69 ± 0.02	4.57 ± 0.01	4.61 ± 0.01
Prolog F3 D1-2	4.75 ± 0.02	4.63 ± 0.02	4.65 ± 0.02
Prolog F3 D1-4	4.79 ± 0.04	4.68 ± 0.01	4.75 ± 0.01

จากรูปที่ 2 และตารางที่ 4 พบว่า ค่า pH ของ Prolog F1 ทุก dilution สูงกว่าค่า pH ของตัวอย่างควบคุม (control) (น้ำดื่มยี่ห้อคริสตัล) โดยค่า pH ลดลงเล็กน้อยเมื่อตัวอย่างถูกเจือจางมากขึ้น และค่า pH ของ Prolog F2 ทุก dilution ใกล้เคียงกับค่า pH ของ control ในขณะที่ ค่า pH ของ Prolog F3 ทุก dilution ต่ำกว่าค่า pH ของ control โดยเมื่อเปรียบเทียบค่า pH ของทั้ง 3 สูตร พบว่า ค่า pH ของ Prolog F1 (9.8-10.8) มีค่าสูงที่สุด และ Prolog F2 (6.6-6.8) และ Prolog F3 (4.5-4.8) มีค่า pH น้อยลงตามลำดับ โดยค่า pH ของสารละลายเตรียมเสร็จใหม่ (freshly prepared sample) ทั้ง 3 สูตร ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบแบบตัวอย่างที่เก็บ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (after kept at RT for 24 h) และ 48 ชั่วโมง (after kept at RT for 48 h)

เมื่อทำการตรวจวัดค่า pH ของสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ ที่เตรียมในภาชนะปากกว้าง และภาชนะปากแคบ ทั้งแบบเตรียมเสร็จใหม่ (freshly prepared sample) และหลังจากเก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (After kept at RT for 24 h) ผลการวัดแสดงดังรูปที่ 3 และตารางที่ 5



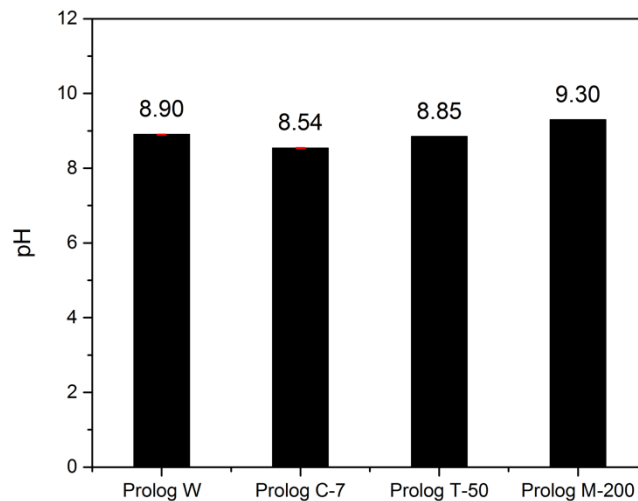
รูปที่ 3 ค่า pH ของสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ ที่เตรียมในภาชนะปากกว้างและภาชนะปากแคบ แบบเตรียมเสร็จใหม่ (freshly prepared sample) (บน) และแบบที่เก็บ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (after kept at RT for 24 h) (ล่าง)

ตารางที่ 5 ค่า pH ของสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ ที่เตรียมในภาวะปากกว้าง และภาวะปากแคบ แบบเตรียมเสร็จใหม่ (freshly prepared sample) และแบบตัวอย่างที่เก็บ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (after kept at RT for 24 h)

Sample name	pH			
	Freshly prepared sample		After kept at RT for 24 h	
	ภาวะปากกว้าง	ภาวะปากแคบ	ภาวะปากกว้าง	ภาวะปากแคบ
Control	6.61 ± 0.03	-	-	-
Prolog F1 UD	10.80 ± 0.01	10.72 ± 0.01	10.63 ± 0.02	10.70 ± 0.00
Prolog F1 D1-1	10.50 ± 0.01	10.43 ± 0.00	10.33 ± 0.01	10.36 ± 0.01
Prolog F1 D1-2	10.32 ± 0.01	10.20 ± 0.00	10.11 ± 0.01	10.12 ± 0.01
Prolog F1 D1-4	10.04 ± 0.03	9.94 ± 0.01	9.84 ± 0.02	9.87 ± 0.01
Prolog F2 UD	6.72 ± 0.03	6.25 ± 0.01	6.66 ± 0.01	6.14 ± 0.01
Prolog F2 D1-1	6.77 ± 0.01	6.34 ± 0.00	6.68 ± 0.01	6.29 ± 0.01
Prolog F2 D1-2	6.79 ± 0.01	6.42 ± 0.00	6.70 ± 0.00	6.36 ± 0.01
Prolog F2 D1-4	6.79 ± 0.01	6.56 ± 0.00	6.72 ± 0.01	6.57 ± 0.01
Prolog F3 UD	4.62 ± 0.03	4.58 ± 0.00	4.54 ± 0.02	4.56 ± 0.00
Prolog F3 D1-1	4.69 ± 0.02	4.63 ± 0.00	4.57 ± 0.01	4.63 ± 0.00
Prolog F3 D1-2	4.75 ± 0.02	4.69 ± 0.00	4.63 ± 0.02	4.73 ± 0.00
Prolog F3 D1-4	4.79 ± 0.04	4.79 ± 0.00	4.68 ± 0.01	4.84 ± 0.00

จากรูปที่ 3 และตารางที่ 5 พบว่า ค่า pH ของสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเตรียมสารละลายในภาวะปากกว้างหรือภาวะปากแคบ และสารละลายเมื่อเก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (after kept at RT for 24 h) มีค่า pH ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับตัวอย่างเตรียมเสร็จใหม่ (freshly prepared sample)

รูปที่ 4 และตารางที่ 6 แสดงค่า pH ของสารละลายที่เตรียมจากสูตร Prolog F1 UD ที่ผลิตจากเครื่อง Hypo Plus รุ่น Wash (Prolog W), รุ่น Compact 7 ลิตร (Prolog C-7), รุ่น Tower 50 ลิตร (Prolog T-50) และรุ่น Max 200 ลิตร (Prolog M-200) ณ บริษัท โปรลอก ไทเทเนียม คอร์ปอเรชั่น จำกัด



รูปที่ 4 ค่า pH ของสารละลายที่เตรียมจากสูตร Prolog F1 UD ที่ผลิตจากเครื่อง Hypo Plus รุ่น Wash (Prolog W), รุ่น Compact 7 ลิตร (Prolog C-7), รุ่น Tower 50 ลิตร (Prolog T-50) และรุ่น Max 200 ลิตร (Prolog M-200)

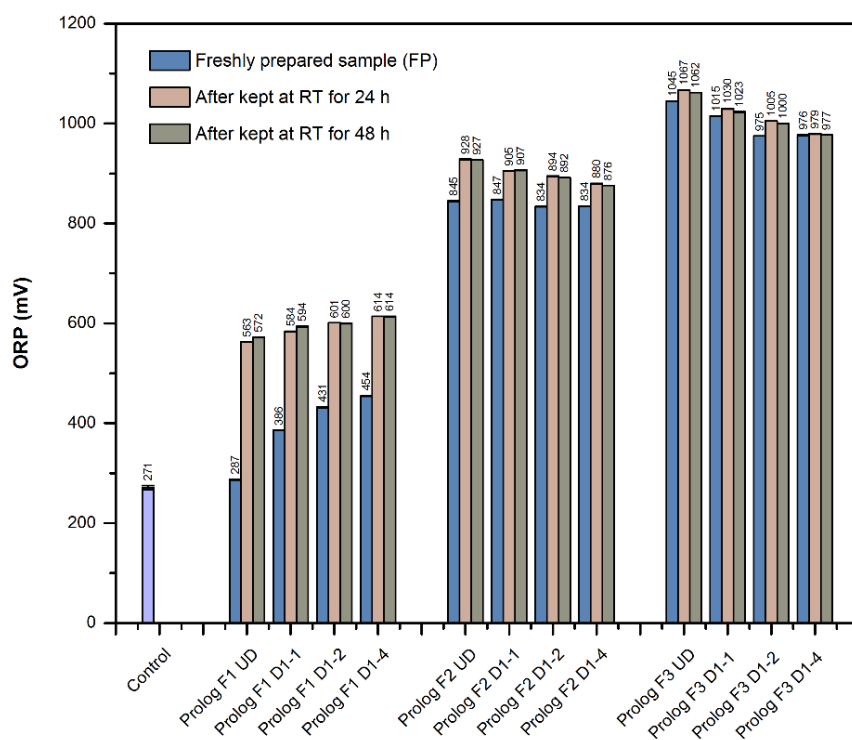
ตารางที่ 6 ค่า pH ของสารละลายที่เตรียมจากสูตร Prolog F1 UD ที่ผลิตจากเครื่อง Hypo Plus รุ่น Wash (Prolog W), รุ่น Compact 7 ลิตร (Prolog C-7), รุ่น Tower 50 ลิตร (Prolog T-50) และรุ่น Max 200 ลิตร (Prolog M-200)

Sample name	pH
Prolog W	8.90 ± 0.01
Prolog C-7	8.54 ± 0.01
Prolog T-50	8.85 ± 0.00
Prolog M-200	9.30 ± 0.00

จากรูปที่ 4 และตารางที่ 6 พบว่า สารละลายที่ผลิตด้วยเครื่อง Hypo Plus รุ่น Compact 7 ลิตร มีค่าน้อยที่สุด ในขณะที่ สารละลายที่ผลิตจากเครื่อง Hypo Plus รุ่น Wash และรุ่น Tower 50 ลิตร มีค่า pH ใกล้เคียงกัน โดยค่า pH ของสารละลายที่ผลิตจากเครื่อง Hypo Plus รุ่น Max 200 ลิตร (Prolog M-200) มีค่ามากที่สุดและมีค่ามากกว่าสารละลายที่ผลิตจากเครื่องรุ่นอื่นอย่างมีนัยสำคัญ

4.3 ผลการตรวจสอบค่า ORP ของสารละลาย

ค่า ORP ของสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ แบบเตรียมเสร็จใหม่ (freshly prepared sample) ใน ภาชนะปากกว้าง และที่เก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 (after kept at RT for 24 h) และ 48 ชั่วโมง (after kept at RT for 48 h) แสดงรูปที่ 5 และตารางที่ 7



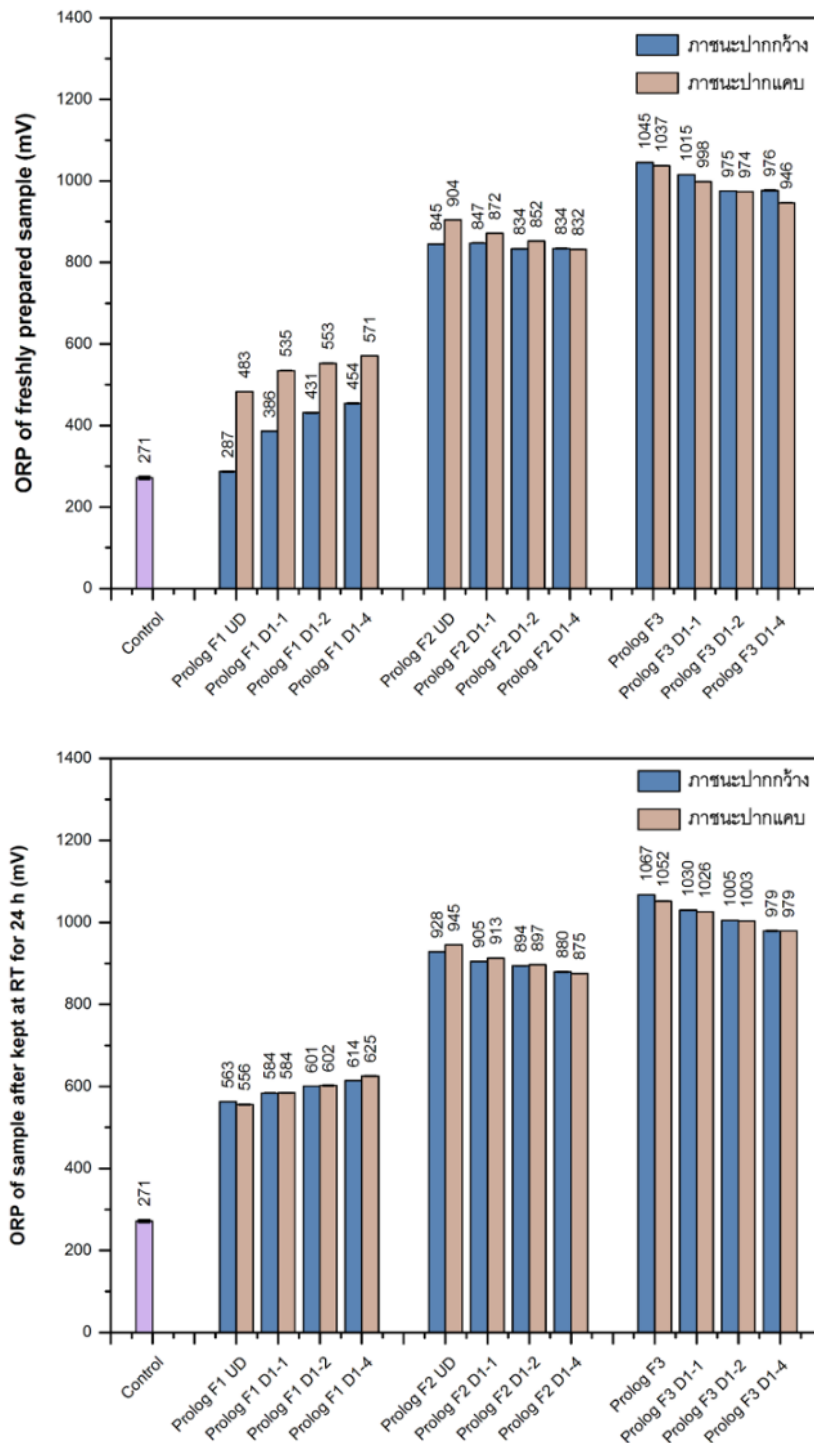
รูปที่ 5 ค่า ORP ของสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ เมื่อเตรียมในภาชนะปากกว้าง แบบเตรียมเสร็จใหม่ (freshly prepared sample) และแบบที่เก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (after kept at RT for 24 h) และ 48 ชั่วโมง (after kept at RT for 48 h)

ตารางที่ 7 ค่า ORP ของสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ เมื่อเตรียมในภาชนะปากกว้าง แบบเตรียมเสร็จใหม่ (freshly prepared sample) และแบบที่เก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (after kept at RT for 24 h) และ 48 ชั่วโมง (after kept at RT for 48 h)

Sample name	ORP (mV)		
	Freshly prepared sample	After kept at RT for 24 h	After kept at RT for 48 h
Control	271.33 ± 3.79		
Prolog F1 UD	287.00 ± 1.00	563.00 ± 0.00	571.67 ± 0.58
Prolog F1 D1-1	386.00 ± 0.00	583.67 ± 0.58	593.67 ± .58
Prolog F1 D1-2	431.00 ± 1.00	601.00 ± 0.00	599.67 ± 0.58
Prolog F1 D1-4	454.33 ± 0.58	614.00 ± 0.00	613.67 ± 0.58
Prolog F2 UD	844.67 ± 0.58	928.33 ± 0.58	927.00 ± 0.00
Prolog F2 D1-1	847.33 ± 0.58	905.00 ± 0.00	906.67 ± 0.58
Prolog F2 D1-2	833.67 ± 0.58	894.33 ± 0.58	892.00 ± 0.00
Prolog F2 D1-4	834.33 ± 0.58	879.67 ± 0.58	876.00 ± 0.00
Prolog F3 UD	1045.00 ± 0.00	1067.00 ± 0.00	1062.00 ± 0.00
Prolog F3 D1-1	1015.00 ± 0.00	1029.67 ± 0.58	1023.33 ± 0.58
Prolog F3 D1-2	975.00 ± 0.00	1005.00 ± 0.00	1000.00 ± 0.00
Prolog F3 D1-4	976.33 ± 1.15	979.33 ± 0.58	977.00 ± 0.00

จากรูปที่ 5 และตารางที่ 7 พบว่า สูตร Prolog F1 ค่า ORP เพิ่มขึ้นตามการ dilution ที่มากขึ้น ซึ่งแตกต่างจากสูตรที่ 2 และสูตรที่ 3 พบว่า ค่า ORP มีแนวโน้มลดลงตามการ dilution ที่มากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสูตร พบว่า ค่า ORP ของสารละลายสูตร Prolog F3 มีค่าสูงที่สุด รองลงมาคือ Prolog F2 และ Prolog F1 ตามลำดับ หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคือค่า ORP เพิ่มขึ้นเมื่อค่า pH ของสารละลายลดลง (ปริมาณน้ำส้มสายชูมากขึ้น) อย่างไรก็ตาม สารละลายทุกสูตรเมื่อบ่มไว้นาน 24 ชั่วโมง (after kept at RT for 24 h) พบว่า ค่า ORP มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น และเมื่อบ่มตัวอย่างไว้นาน 48 ชั่วโมง (after kept at RT for 48 h) ค่า ORP ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับตัวอย่างที่บ่มไว้นาน 24 ชั่วโมง

เมื่อทำการตรวจวัดค่า ORP ของสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ ที่เตรียมในภาชนะปากกว้าง และภาชนะปากแคบ ทั้งแบบเตรียมเสร็จใหม่ (freshly prepared sample) และหลังจากเก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (after kept at RT for 24 h) ผลการวัดแสดงดังรูปที่ 6 และตารางที่ 8



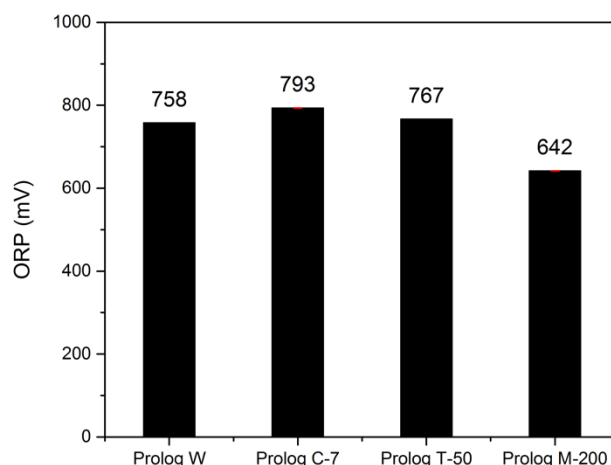
รูปที่ 6 ค่า ORP ของสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ เมื่อเตรียมในภาชนะปากกว้างและปากแคบ แบบเตรียมเสร็จใหม่ (freshly prepared sample) (บน) และแบบที่เก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (after kept at RT for 24 h) (ล่าง)

ตารางที่ 8 ค่า ORP ของสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ เมื่อเตรียมในภาชนะปากกว้างและปากแคบ แบบเตรียมเสร็จใหม่ (freshly prepared sample) และแบบที่เก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (after kept at RT for 24 h)

Sample name	ORP (mV)			
	Freshly prepared sample		After kept at RT for 24 h	
	ภาชนะปากกว้าง	ภาชนะปากแคบ	ภาชนะปากกว้าง	ภาชนะปากแคบ
Control	271.33 ± 3.79	-	-	-
Prolog F1 UD	287.00 ± 1.00	483.00 ± 0.00	563.00 ± 0.00	555.67 ± 0.58
Prolog F1 D1-1	386.00 ± 0.00	534.67 ± 0.58	583.67 ± 0.58	584.33 ± 0.58
Prolog F1 D1-2	431.00 ± 1.00	552.67 ± 0.58	601.00 ± 0.00	602.33 ± 0.58
Prolog F1 D1-4	454.33 ± 0.58	571.00 ± 0.00	614.00 ± 0.00	625.33 ± 0.58
Prolog F2 UD	844.67 ± 0.58	904.00 ± 0.00	928.33 ± 0.58	945.00 ± 0.00
Prolog F2 D1-1	847.33 ± 0.58	872.00 ± 0.00	905.00 ± 0.00	912.67 ± 0.58
Prolog F2 D1-2	833.67 ± 0.58	852.33 ± 0.58	894.33 ± 0.58	897.00 ± 0.00
Prolog F2 D1-4	834.33 ± 0.58	832.33 ± 0.58	879.67 ± 0.58	875.33 ± 0.58
Prolog F3 UD	1045.00 ± 0.00	1037.33 ± 0.58	1067.00 ± 0.00	1052.33 ± 0.58
Prolog F3 D1-1	1015.00 ± 0.00	998.33 ± 0.58	1029.67 ± 0.58	1026.00 ± 0.00
Prolog F3 D1-2	975.00 ± 0.00	974.00 ± 0.00	1005.00 ± 0.00	1003.00 ± 0.00
Prolog F3 D1-4	976.33 ± 1.15	946.33 ± 0.58	979.33 ± 0.58	979.00 ± 0.00

จากรูปที่ 6 และตารางที่ 8 พบว่า ค่า ORP ของสารละลายสูตร Prolog F1 ที่เตรียมในภาชนะปากแคบ มีค่าเพิ่มขึ้นตามการ dilution ที่มากขึ้น เช่นเดียวกับสารละลายที่เตรียมในภาชนะปากกว้าง โดยค่า ORP ของสารละลายที่เตรียมในภาชนะปากแคบมีค่าสูงกว่าการเตรียมในภาชนะปากกว้าง ทั้งนี้ ค่า ORP ของสารละลายสูตร Prolog F2 และ Prolog F3 ที่เตรียมในภาชนะปากกว้างและภาชนะปากแคบมีค่าใกล้เคียงกัน นอกจากนี้เมื่อเก็บตัวอย่างไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (after kept at RT for 24 h) พบว่า ค่า ORP ของสารละลายที่เตรียมในภาชนะปากกว้างและภาชนะปากแคบ มีค่าใกล้เคียงกัน

รูปที่ 7 และตารางที่ 9 แสดงค่า ORP ของสารละลายที่เตรียมจากสูตร Prolog F1 UD ที่ผลิตจากเครื่อง Hypo Plus รุ่น Wash (Prolog W), รุ่น Compact 7 ลิตร (Prolog C-7), รุ่น Tower 50 ลิตร (Prolog T-50) และรุ่น Max 200 ลิตร (Prolog M-200) ณ บริษัท โปรลอก ไทเทเนียม คอร์ปอเรชั่น จำกัด



รูปที่ 7 ค่า ORP ของสารละลายที่เตรียมจากสูตร Prolog F1 UD ที่ผลิตจากเครื่อง Hypo Plus รุ่น Wash (Prolog W), รุ่น Compact 7 ลิตร (Prolog C-7), รุ่น Tower 50 ลิตร (Prolog T-50) และรุ่น Max 200 ลิตร (Prolog M-200)

ตารางที่ 9 ค่า ORP ของสารละลายที่เตรียมจากสูตร Prolog F1 UD ที่ผลิตจากเครื่อง Hypo Plus รุ่น Wash (Prolog W), รุ่น Compact 7 ลิตร (Prolog C-7), รุ่น Tower 50 ลิตร (Prolog T-50) และรุ่น Max 200 ลิตร (Prolog M-200)

Sample name	ORP (mV)
Prolog W	758.00 ± 0.00
Prolog C-7	793.33 ± 0.58
Prolog T-50	767.00 ± 0.00
Prolog M-200	641.67 ± 0.58

จากรูปที่ 7 และตารางที่ 8 พบว่า ค่า ORP ของสารละลายสูตร Prolog F1 UD ที่เตรียมจากเครื่อง Hypo Plus รุ่น Wash (Prolog W), รุ่น Compact 7 ลิตร Prolog C-7) และ รุ่น Tower 50 ลิตร (Prolog T-50) มีค่าใกล้เคียงกัน (~750-800 mV) ในขณะที่ ค่า ORP ของสารละลาย Prolog สูตร Prolog F1 UD ที่ผลิตจากเครื่อง Hypo Plus รุ่น Max 200 ลิตร (Prolog M-200) มีค่าต่ำสารละลายที่ผลิตจากเครื่องอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ (~640 mV)

4.4 การไทเตรทหาปริมาณคลอรีนทั้งหมดที่เป็นส่วนประกอบ (available chlorine) ของสารละลายที่เตรียมด้วยเครื่อง Hypo Plus

ทีมวิจัยได้ไทเตรทหาปริมาณคลอรีนทั้งหมดที่เป็นส่วนประกอบ (available chlorine) ของสารละลายสูตร Prolog F1 ถึงสูตร Prolog F3 และตัวอย่างที่เจือจางด้วยน้ำดื่มในอัตราส่วน 1:1, 1:2 และ 1:4 ของแต่ละสูตร ตามลำดับ แบบเตรียมเสร็จใหม่ (freshly prepared sample) ของทั้งสภาวะการเตรียมในภาชนะปากกว้างและภาชนะปากแคบ นอกจากนี้ ยังได้ทำการเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ available chlorine ของสารละลายหลังเก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (after kept at RT for 24 h) ด้วย

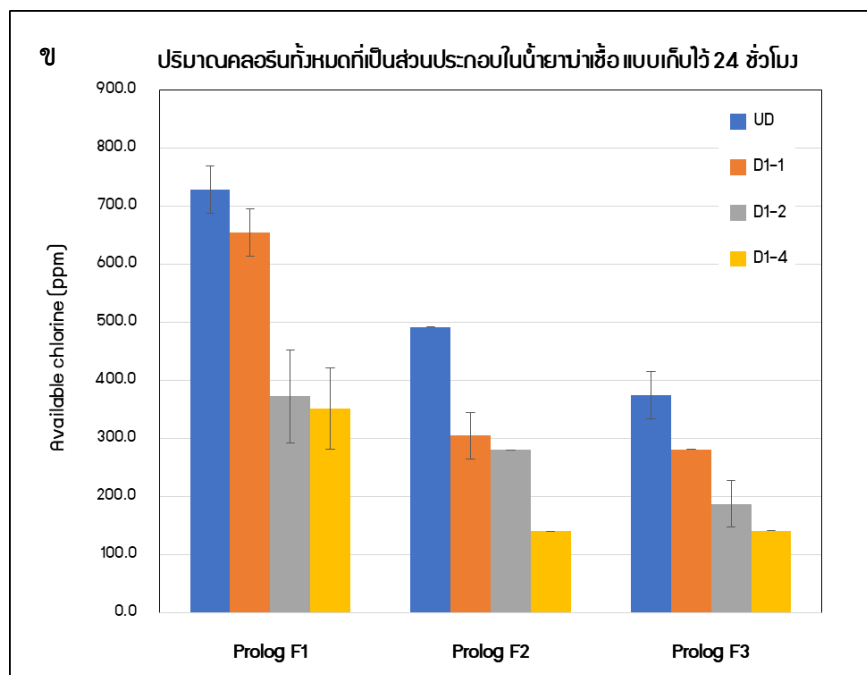
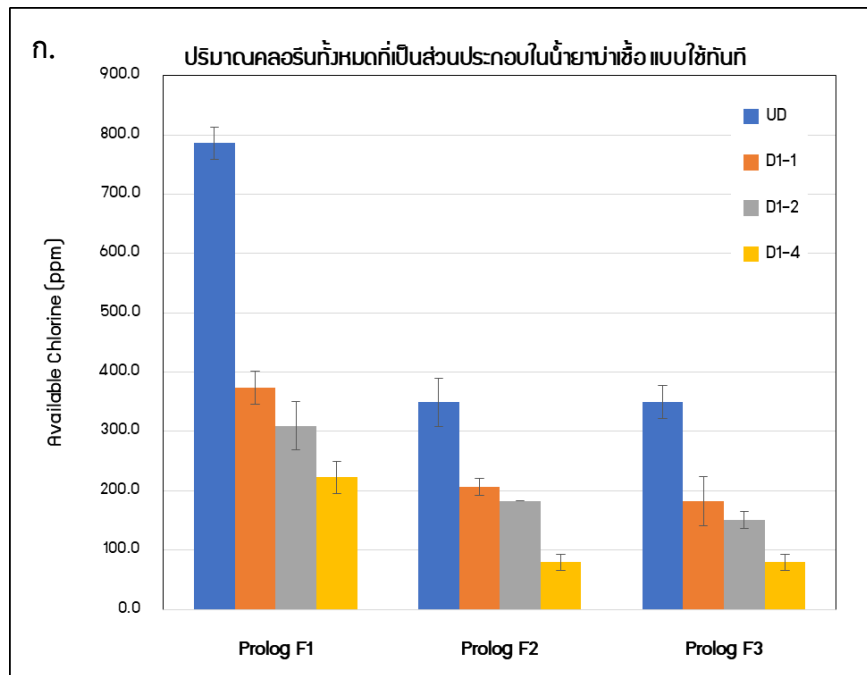
4.3.1 ผลการไทเตรทหาปริมาณคลอรีนทั้งหมดที่เป็นส่วนประกอบ (available chlorine) ของสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ ที่เตรียมในภาชนะปากกว้าง

ผลการตรวจหาปริมาณ available chlorine ของสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ เมื่อเตรียมในภาชนะปากกว้าง แบบเตรียมเสร็จใหม่ (freshly prepared sample) และแบบที่เก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (after kept at RT for 24 h) แสดงดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ปริมาณ available chlorine ของสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ เมื่อเตรียมในภาชนะปากกว้าง แบบเตรียมเสร็จใหม่ (freshly prepared sample) และแบบที่เก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (after kept at RT for 24 h)

ตัวอย่าง	Available chlorine (ppm)	
	Freshly prepared sample	After kept at RT for 24 h
Prolog F1 UD	786.0 $\pm$ 27.5	728.5 $\pm$ 40.7
Prolog F1 D1-1	373.8 $\pm$ 27.6	654.0 $\pm$ 40.5
Prolog F1 D1-2	309.6 $\pm$ 41.2	371.9 $\pm$ 80.5
Prolog F1 D1-4	222.7 $\pm$ 27.4	350.9 $\pm$ 70.2
Prolog F2 UD	349.1 $\pm$ 41.2	491.2 $\pm$ 0.0
Prolog F2 D1-1	206.7 $\pm$ 13.8	304.3 $\pm$ 40.5
Prolog F2 D1-2	182.9 $\pm$ 0.0	279.9 $\pm$ 0.0
Prolog F2 D1-4	79.5 $\pm$ 13.8	140.1 $\pm$ 0.0
Prolog F3 UD	349.9 $\pm$ 27.5	374.3 $\pm$ 40.5
Prolog F3 D1-1	182.8 $\pm$ 41.3	280.7 $\pm$ 0.0
Prolog F3 D1-2	151.0 $\pm$ 13.8	187.0 $\pm$ 40.5
Prolog F3 D1-4	79.6 $\pm$ 13.8	140.2 $\pm$ 0.0

จาก**ตารางที่ 10** พบว่า สารละลายสูตร Prolog F1 UD ที่เตรียมในภาชนะปากกว้าง มีปริมาณ available chlorine เท่ากับ 786.0 ± 27.5 ppm เมื่อวิเคราะห์ในตัวอย่างแบบเตรียมเสร็จใหม่ (freshly prepared sample) ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงที่สุดที่เตรียมได้ในภาชนะปากกว้าง และเมื่อเจือจางสูตรดังกล่าวในอัตราส่วน 1:1 พบว่า มีปริมาณ available chlorine ใกล้เคียงกับสารละลายสูตร Prolog F2 UD และ Prolog F3 UD เมื่อเปรียบเทียบกับกราฟ**รูปที่ 8 (ก.)** ปริมาณ available chlorine ของสูตร Prolog F1 ที่ทำการเจือจางจะลดลงจากสูตรไม่เจือจาง (UD) อย่างเห็นได้ชัด โดยเมื่อเก็บตัวอย่างไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (After kept at RT for 24 h) พบว่า ปริมาณ available chlorine ของสารละลายสูตร Prolog F1 UD มีค่าลดลงกว่า freshly prepared sample แต่อย่างไรก็ดี ปริมาณ available chlorine ของสารละลายสูตร Prolog F1, Prolog F2 และ Prolog F3 มีแนวโน้มโดยรวมที่ค่าจะสูงขึ้นเมื่อเก็บตัวอย่างไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (after kept at RT for 24 h) (**รูปที่ 8, ข.**)



รูปที่ 8 ปริมาณ available chlorine ของสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ เมื่อเตรียมในภาชนะปากกว้าง (ก.) แบบเตรียมเสร็จใหม่ (freshly prepared sample) และ (ข.) แบบที่เก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (after kept at RT for 24 h)

4.4.2 ผลการไตเตรทหาปริมาณคลอรีนทั้งหมดที่เป็นส่วนประกอบ (available chlorine) ของสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ ที่เตรียมในภาชนะปากแคบ

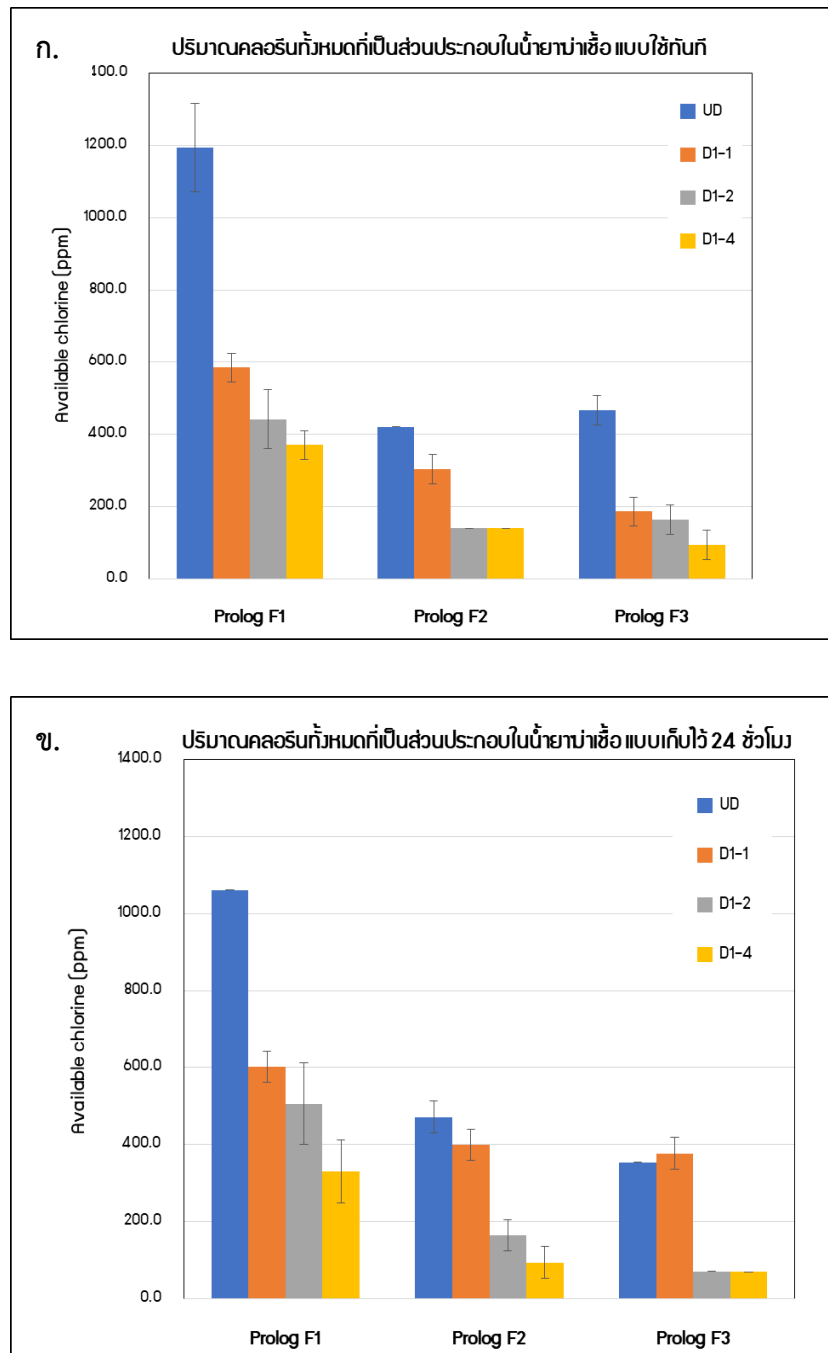
ผลการตรวจสอบปริมาณ available chlorine ของสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ ที่เตรียมในภาชนะปากแคบ แบบเตรียมเสร็จใหม่ (freshly prepared sample) และแบบที่เก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (after kept at RT for 24 h) แสดงดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ปริมาณ available chlorine ของสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ ที่เตรียมในภาชนะปากแคบ แบบเตรียมเสร็จใหม่ (freshly prepared sample) และแบบที่เก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (after kept at RT for 24 h)

ตัวอย่าง	Available chlorine (ppm)	
	Freshly prepared sample	After kept at RT for 24 h
Prolog F1 UD	1193.6 ± 121.6	1060.6 ± 0.0
Prolog F1 D1-1	584.8 ± 40.5	602.6 ± 40.1
Prolog F1 D1-2	442.2 ± 80.6	506.4 ± 105.5
Prolog F1 D 1-4	370.4 ± 40.1	330.3 ± 81.7
Prolog F2 UD	420.6 ± 0.0	471.6 ± 40.8
Prolog F2 D1-1	304.2 ± 40.5	399.1 ± 40.7
Prolog F2 D1-2	140.4 ± 0.0	164.0 ± 40.6
Prolog F2 D1-4	139.8 ± 0.0	94.4 ± 40.9
Prolog F3 UD	467.4 ± 40.5	354.4 ± 0.0
Prolog F3 D1-1	186.5 ± 40.4	377.5 ± 40.9
Prolog F3 D1-2	163.7 ± 40.5	70.8 ± 0.0
Prolog F3 D1-4	93.6 ± 40.5	69.6 ± 0.0

จากตารางที่ 10 และ ตารางที่ 11 การเตรียมสารละลาย Prolog ในภาชนะปากแคบ ให้ปริมาณ available chlorine สูงกว่าการเตรียมในภาชนะปากกว้างอย่างชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบสารละลาย Prolog F1 UD ที่เตรียมในภาชนะปากแคบ พบปริมาณ available chlorine เท่ากับ 1193.6 ± 121.6 ppm ซึ่งสูงกว่าปริมาณที่พบในสารละลายที่เตรียมในภาชนะปากกว้าง (ตารางที่ 10) ประมาณ 400 ppm ทั้งนี้ เนื่องจากการเตรียมในภาชนะปากกว้างหรือภายใต้สภาวะเปิดทำให้เกิดการสูญเสียก๊าซคลอรีน (Cl_2) ได้ตลอดเวลาที่มีการ

เตรียมสารละลายด้วยเครื่อง Hypo Plus นอกจากนี้ ปริมาณ available chlorine ที่พบในสารละลายที่เตรียมในภาชนะปากแคบ สูตร Prolog F1 D1-1 ลดลงมากกว่าร้อยละ 50 ของสูตร Prolog F1 UD ทั้งตัวอย่างแบบเตรียมเสร็จใหม่ (freshly prepared sample) และแบบที่เก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (after kept at RT for 24 h) (รูปที่ 9 (ก.) และ (ข.))



รูปที่ 9 ปริมาณ available chlorine ของสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ เมื่อเตรียมในภาชนะปากแคบ (ก.) แบบเตรียมเสร็จใหม่ (freshly prepared sample) และ (ข.) แบบที่เก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (after kept at RT for 24 h)

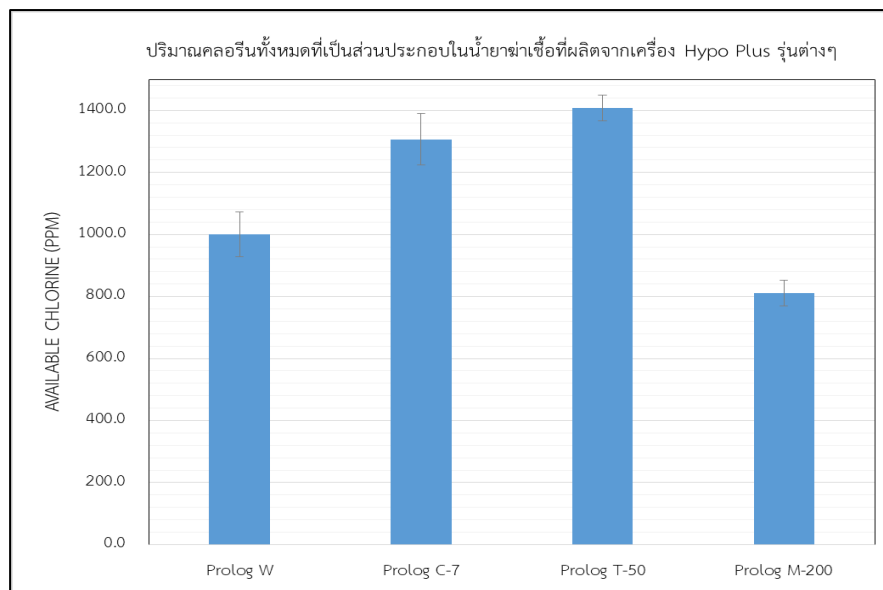
4.4.3 ผลการไทเตรทหาปริมาณคลอรีนทั้งหมดที่เป็นส่วนประกอบ (available chlorine) ของสารละลายสูตร Prolog F1 UD ที่ผลิตจากเครื่อง Hypo Plus รุ่น Wash, รุ่น Compact 7 ลิตร, รุ่น Tower 50 ลิตร และรุ่น Max 200 ลิตร

ทีมวิจัยได้รับตัวอย่างสารละลายสูตร Prolog F1 UD ที่เตรียมจากทางบริษัทฯ จำนวน 4 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 5 ลิตร โดยแต่ละตัวอย่างเตรียมมาจากเครื่อง Hypo Plus ที่มีรุ่น และขนาดของเครื่องที่แตกต่างกัน ได้แก่ รุ่น Wash, รุ่น Compact 7 ลิตร, รุ่น Tower 50 ลิตร และรุ่น Max 200 ลิตร และผลการวิเคราะห์ปริมาณ Available chlorine แสดงดังตารางที่ 12 และรูปที่ 10

ตารางที่ 12 ปริมาณ available chlorine ของสารละลายที่เตรียมจากสูตร Prolog F1 UD ที่ผลิตจากเครื่อง Hypo Plus รุ่น Wash (Prolog W), รุ่น Compact 7 ลิตร (Prolog C-7), รุ่น Tower 50 ลิตร (Prolog T-50) และรุ่น Max 200 ลิตร (Prolog M-200)

ตัวอย่าง	Available chlorine (ppm)
Prolog W	1000.3 $\pm$ 71.5
Prolog C-7	1306.7 $\pm$ 82.3
Prolog T-50	1407.3 $\pm$ 41.3
Prolog M-200	810.6 $\pm$ 41.3

จากตารางที่ 12 และรูปที่ 10 แสดงปริมาณ available chlorine ที่พบในสารละลายสูตร Prolog F1 UD ที่เตรียมจากเครื่อง Hypo Plus รุ่นต่างๆ พบว่า เครื่อง Hypo Plus รุ่น Tower 50 ลิตร (Prolog T-50) ให้ปริมาณ available chlorine มากที่สุด ตามด้วยรุ่น Compact 7 ลิตร, รุ่น Wash และ Max 200 ลิตร ตามลำดับ



รูปที่ 10 ปริมาณ available chlorine ของสารละลายที่เตรียมจากสูตร Prolog F1 UD ที่ผลิตจากเครื่อง Hypo Plus รุ่น Wash (Prolog W), รุ่น Compact 7 ลิตร (Prolog C-7), รุ่น Tower 50 ลิตร (Prolog T-50) และรุ่น Max 200 ลิตร (Prolog M-200)

4.5 ผลการตรวจสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ

4.5.1 ผลการทดสอบด้วยเทคนิค Disc diffusion assay

เทคนิค Disc diffusion assay จัดเป็นเทคนิคมาตรฐานที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในการตรวจสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของตัวอย่าง เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่ายและสามารถตรวจวัดตัวอย่างจำนวนมากต่อครั้ง โดยจะประเมินผลจากการวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของอาหารแข็งบริเวณที่มีความใส (diameter of inhibition zone or clear zone) หลังจากบ่มกับตัวอย่างที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน และถูกหยดลงในกระดาษกรอง (disc) ณ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 – 17 ชั่วโมง

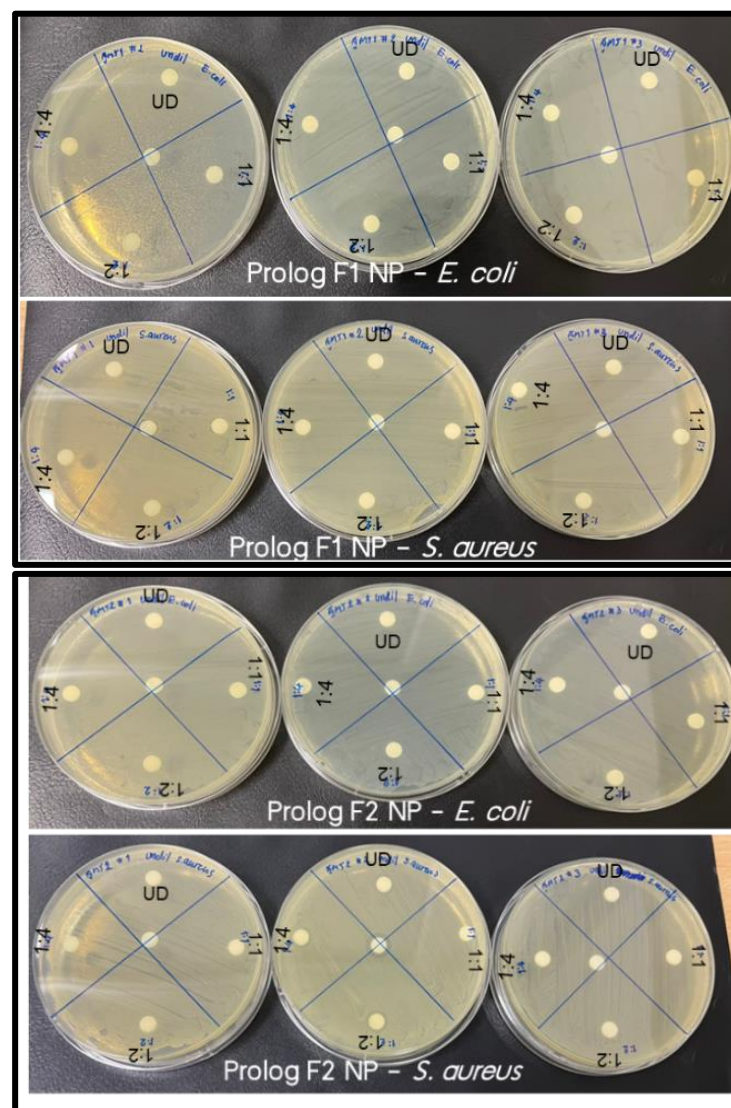
ตารางที่ 13 และ รูปที่ 11 แสดงค่าเส้นผ่านศูนย์กลางในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (diameter of inhibition zone) ของสารละลายสูตร Prolog F1, F2, และ F3 ที่เตรียมแบบไม่จุ่ม probe (NP) โดยทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิด คือ *E. coli* (gram-negative bacteria) และ *S. aureus* (gram-positive bacteria) พบว่าสูตรสารละลาย Prolog ที่เตรียมขึ้นทุกสูตรแบบที่ไม่จุ่ม probe มี diameter of inhibitor เท่ากับ 6 มิลลิเมตร ซึ่งมีขนาดเท่ากับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของตัวอย่างควบคุม (control) และเท่ากับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ disc ที่ใช้ในการทดสอบ หรืออาจกล่าวได้ว่าสารละลายสูตร Prolog F1, F2, และ F3 ที่เตรียมแบบไม่จุ่ม probe (NP) ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ทั้งแบบ undilute และแบบ dilution 1:1, 1:2 และ 1:4

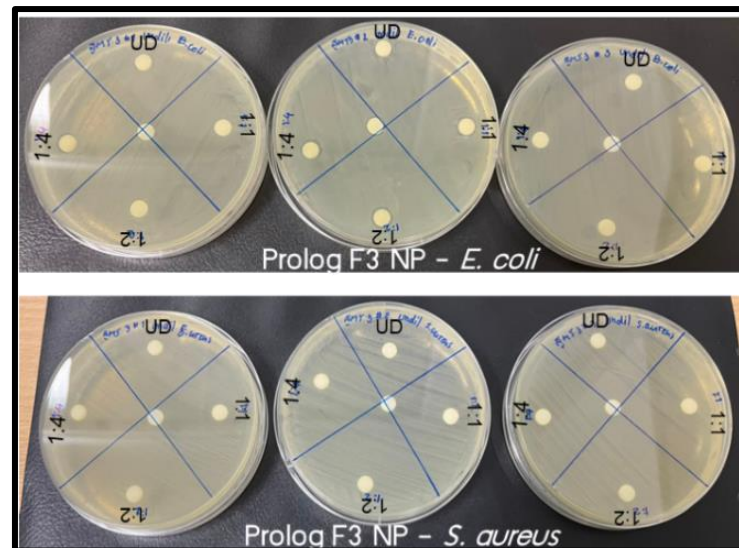
ตารางที่ 13 เส้นผ่านศูนย์กลาง (diameter of inhibition zone) ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ ที่เตรียมแบบไม่ได้จุ่ม probe (NP)

สูตร	เส้นผ่านศูนย์กลางในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (diameter of inhibition zone) (mm)	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Prolog F1 UD NP	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0
Prolog F1 D1-1 NP	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0
Prolog F1 D1-2 NP	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0
Prolog F1 D1-4 NP	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0
Prolog F2 UD NP	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0
Prolog F2 D1-1 NP	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0
Prolog F2 D1-2 NP	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0
Prolog F2 D1-4 NP	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0

Prolog F3 UD NP	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0
Prolog F3 D1-1 NP	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0
Prolog F3 D1-2 NP	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0
Prolog F3 D1-4 NP	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0
Control	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0

หมายเหตุ; control เป็นน้ำดื่มบริสุทธิ์, และ Filter disc ขนาด 6 mm





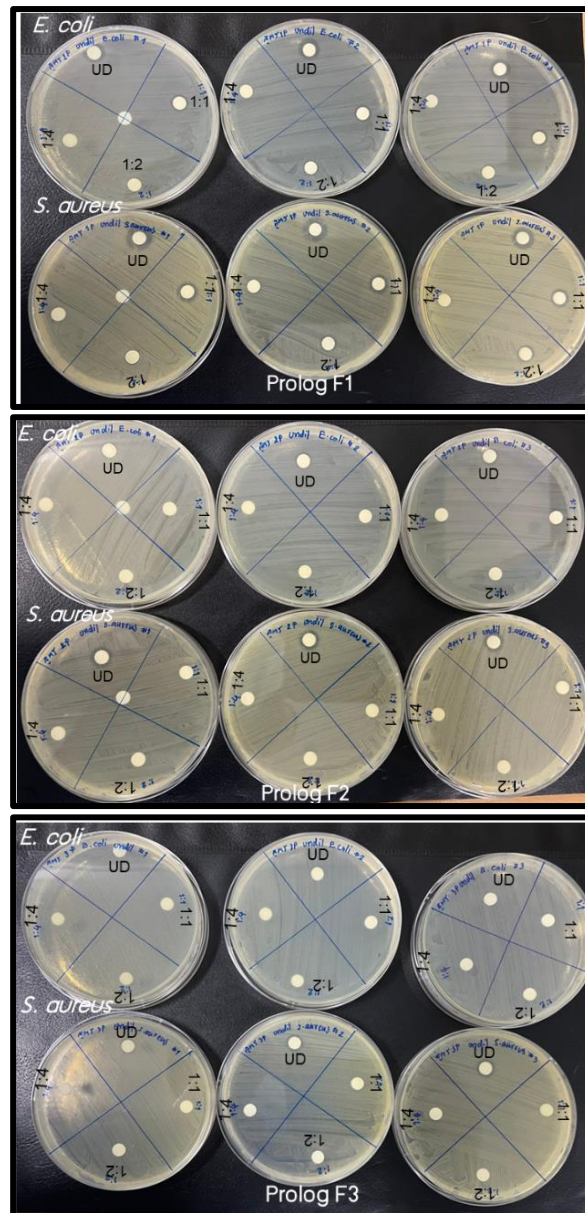
รูปที่ 11 การตรวจสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. aureus* โดยวิธี Disc diffusion assay ของสารละลาย Prolog สูตร F1, F2 และ F3 ที่เตรียมไม่ได้จุ่ม probe (NP)

จากนั้น ทีมวิจัยได้ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารละลายสูตร Prolog F1, F2, และ F3 ที่เตรียมแบบจุ่ม probe ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 14 และรูปที่ 12 พบว่า สารละลายสูตร Prolog F1 UD มี diameter ของ inhibition zone (clear zone) กว้างที่สุด ทั้งการทดสอบกับเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ตามด้วยสารละลายสูตร Prolog F2 UD ในขณะที่ สารละลายสูตร Prolog F3 UD ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* แต่ยังสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้แบบ partial inhibition จะสังเกตได้ว่า สารละลายแบบ undilute (UD) ทุกสูตร มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ดีกว่าเชื้อ *E. coli* โดยเมื่อทำการเจือจางสารละลายสูตร Prolog F1 UD ที่ dilution 1:1 และ 1:2 พบว่า diameter of inhibition zone มีขนาดเล็กลง บ่งชี้ว่า สารละลายดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด ลดลง ในขณะที่ สารละลายสูตร Prolog F2 และ Prolog F3 ที่เจือจางที่ dilution ต่างๆ ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดได้

ตารางที่ 14 เส้นผ่านศูนย์กลาง (diameter of inhibition zone) ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ ที่เตรียมแบบจุ่ม probe

สูตร	Dilution	เส้นผ่านศูนย์กลาง (diameter of inhibition zone) ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (mm)	
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Prolog F1 UD	Undilute	10.5 ± 0.0	11.0 ± 0.0
Prolog F1 D1-1	1:1	8.17 ± 0.24	9.67 ± 0.47
Prolog F1 D1-2	1:2	6.83 ± 0.24	8.17* ± 0.24*
Prolog F1 D1-4	1:4	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0
Prolog F2 UD	Undilute	8.0* ± 0.0*	10.0* ± 0.0*
Prolog F2 D1-1	1:1	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0
Prolog F2 D1-2	1:2	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0
Prolog F2 D1-4	1:4	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0
Prolog F3 UD	Undilute	6.0 ± 0.0	8.0* ± 0.41*
Prolog F3 D1-1	1:1	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0
Prolog F3 D1-2	1:2	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0
Prolog F3 D1-4	1:4	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0
Control	-	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0

หมายเหตุ: control เป็นน้ำดื่มบริสุทธิ์, Filter disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm และ * หมายถึง partial inhibition zone ที่ยังปรากฏโคโลนีของแบคทีเรียขึ้นเล็กน้อย



รูปที่ 12 การตรวจสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. aureus* โดยวิธี Disc diffusion assay ของสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ ที่เตรียมแบบจุ่ม probe

4.5.2 ผลการทดสอบด้วยเทคนิค Broth dilution assay

เทคนิค Broth dilution assay เป็นเทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบค่าความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ หรือค่า minimal inhibitory concentration (MIC) และค่าความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ หรือค่า minimal bactericidal concentration (MBC) โดยในการวิจัยนี้ทดสอบกับเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ซึ่งเป็นตัวแทนของเชื้อ gram-negative bacteria และ gram-positive bacteria

ตารางที่ 15-16 และรูปที่ 13 แสดงผลการตรวจสอบค่า MIC และ NBC ของสารละลาย Prolog F1, Prolog F2 และ Prolog F3 แบบ undilute และที่เจือจางในอัตราส่วนต่างๆ

ตารางที่ 15 ค่า MIC และ MBC ของสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ แบบ undilute และที่เจือจางในอัตราส่วนต่างๆ

สูตร	ค่าความเข้มข้นในการยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรีย			
	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC
Prolog F1	1:1	1:1	1:2	1:2
UD				
Prolog F1	Undilute	Undiluted	1:1	1:1
D1-1				
Prolog F1	-	-	1:1	Undilute
D1-2				
Prolog F1	-	-	Undilute	-
D1-4				
Prolog F2	Undilute	-	1:1	Undilute
UD				
Prolog F2	-	-	Undilute	-
D1-1				
Prolog F2	-	-	-	-
D1-2				
Prolog F2	-	-	-	-
D1-4				

Prolog UD	F3	-	-	1:1	Undilute
Prolog D1-1	F3	-	-	Undilute	-
Prolog D1-2	F3	-	-	-	-
Prolog D1-4	F3	-	-	-	-
Control		-	-	-	-

หมายเหตุ -ความเข้มข้นของเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ที่ใช้ทดสอบ $\approx 10^6$ cfu

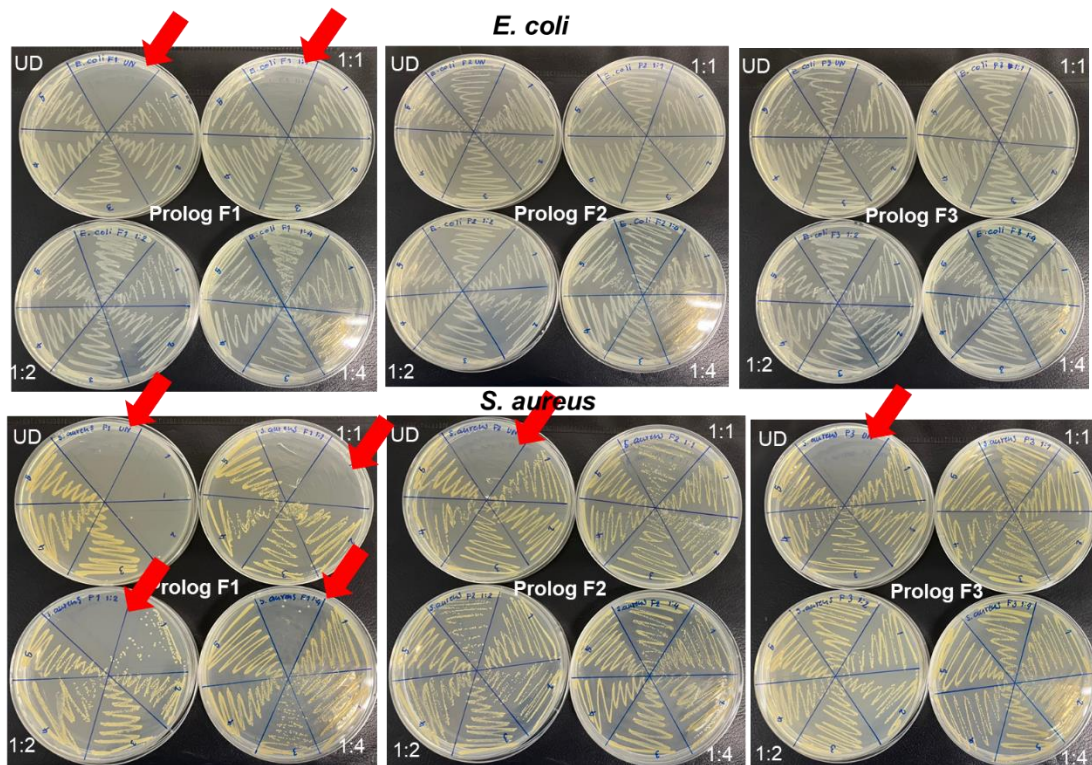
-Control: คือเชื้อแบคทีเรียที่บ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB (ไม่มีการเติมสารทดสอบ)

-ค่า MIC: พิจารณาจากความขุ่นใสของตัวอย่างหลังจากบ่มไว้เป็นเวลา 16 -17 ชั่วโมง ณ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

-ค่า MBC: สังเกตจากการเจริญโตของเชื้อแบคทีเรียบนอาหารแข็ง MHA

ตารางที่ 16 ค่า MIC และ MBC ของสารละลายสูตร Prolog F1, Prolog F2 และ Prolog F3 ในการยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. aureus*

สูตร	MIC/MBC ของเชื้อ <i>E. coli</i>	MIC/MBC ของเชื้อ <i>S. aureus</i>
Prolog F1	1:1 (MIC) / 1:1 (MBC)	1:4 (MIC) / 1:2 (MBC)
Prolog F2	Undilute (MIC) / ไม่มีค่า MBC	1:1 (MIC)/Undilute (MBC)
Prolog F3	ไม่มีค่า MIC / ไม่มีค่า MBC	1:1 (MIC)/Undilute (MBC)



รูปที่ 13 การตรวจสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. aureus* ของสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ แบบ undilute และแบบที่เจือจางในอัตราส่วนต่างๆ โดยวิธี Broth dilution assay

จากผลการทดลอง พบว่า เมื่อพิจารณาสารละลายแบบ undilute (UD) สารละลายสูตร Prolog F1 UD มีประสิทธิภาพในการยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุด และสูตรที่มีประสิทธิภาพในลำดับถัดมาคือสูตร Prolog F2 UD และ Prolog F3 UD ตามลำดับ โดยค่า MIC และค่า MBC โดยสารละลายทุกสูตรมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* มากกว่า *E. coli* ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้จากเทคนิค Disc diffusion assay อาจเนื่องมาจากแบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli*) มีความสามารถในการต้านทานสภาวะที่เป็นด่างได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก (*S. aureus*) [7, 8]

เมื่อพิจารณาหลักการของเครื่อง Hypo Plus คือเมื่อจุ่ม probe ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา electrochlorination ในสารละลายของเกลือแกง (NaCl) จะเกิดเป็น sodium hypochlorite (NaOCl) ดังสมการที่ (1)-(7) ในหัวข้อ 2.1 โดยสารละลายสูตร Prolog F1 มีปริมาณของเกลือแกง (NaCl) ที่ถูกเติมลงในสารละลายสูงกว่าสูตร Prolog F2 และ F3 จึงคาดว่าสารละลายสูตร Prolog F1 จะมีปริมาณของ sodium hypochlorite (NaOCl) ที่เกิดขึ้น สูงกว่าสารละลายสูตร Prolog F2 และ F3 ในขณะที่ สารละลายสูตร Prolog F2 และ Prolog F3 ที่มีปริมาณเกลือในสูตรเท่ากันแต่ปริมาณของน้ำส้มสายชูที่เติมลงในสูตรแตกต่างกัน โดยที่สูตร Prolog F3 มีปริมาณของน้ำส้มสายชูสูงกว่า สูตร Prolog F2 จากการตรวจสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย พบว่า สูตร Prolog F2 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่า สูตร Prolog F3 เนื่องจากน้ำส้มสายชูที่เติมลงไป อาจจะเร่งอัตราการสลายตัว (decomposition rate) ของ NaOCl ซึ่งโดยปกติ NaOCl

จะคงตัวเมื่อค่า pH ของสารละลายมากกว่า 9.0 [9] จึงอาจเป็นไปได้ว่าสูตร Prolog F3 ที่มีปริมาณของน้ำส้มสายชูสูงกว่า (pH ต่ำกว่า) อาจจะมีฤทธิ์การสลายตัวของ NaOCl ได้มากกว่า สูตร Prolog F2 ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของ สูตร Prolog F2 ดีกว่า สูตร Prolog F3

4.5.3 การตรวจสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียหลังจากเก็บสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ ไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง

ผลการตรวจสอบค่า MIC และ MBC ของสารละลายสูตร Prolog สูตรต่างๆ เมื่อเก็บตัวอย่างไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (after kept at RT for 24 h) และ 48 ชั่วโมง (after kept at RT for 48 h) และทดสอบกับเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* แสดงดังตารางที่ 17 และรูปที่ 14

ตารางที่ 17 ค่า MIC และ MBC ของสารละลายสูตร Prolog F1, Prolog F2 และ Prolog F3 แบบ undilute และแบบที่เจือจางที่อัตราส่วนต่างๆ หลังเก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (after kept at RT for 24 h) และ 48 ชั่วโมง (after kept at RT for 48 h)

สูตร	ค่าความเข้มข้นในการยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรีย							
	After kept at RT for 24 h				After kept at RT for 48 h			
	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Prolog F1 UD	1:1	1:1	1:4	1:2	1:1	undilute	1:4	1:2
Prolog F1 D1-1	Undilute	Undilute	1:2	1:1	Undilute	-	1:2	1:1
Prolog F1 D1-2	-	-	1:1	1:1	-	-	1:1	1:1

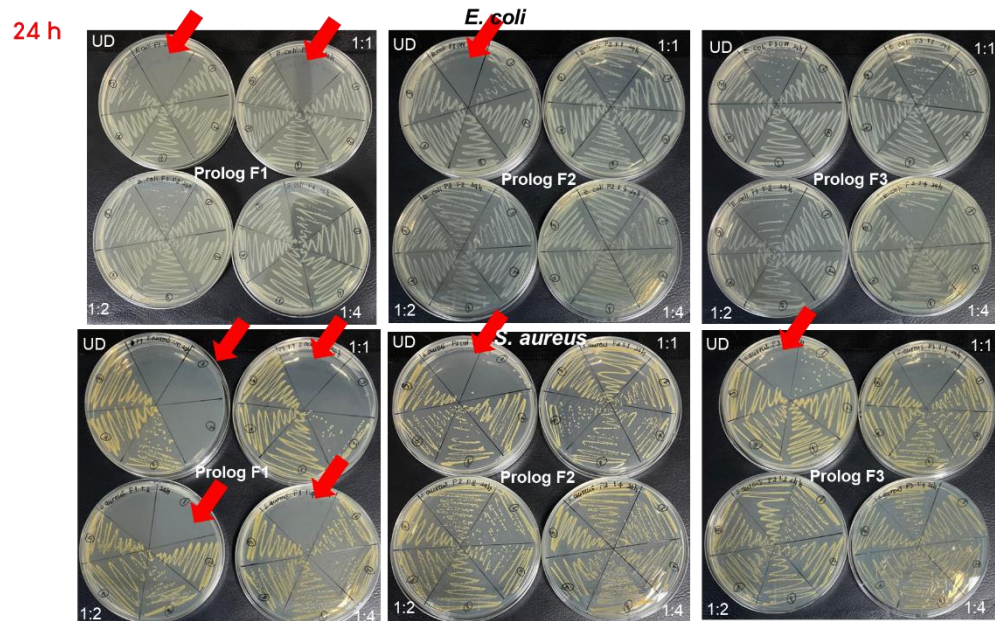
Prolog F1 D1-4	-	-	1:1	Undilute	-	-	1:1	Undilute
Prolog F2 UD	Undilute	Undilute	1:2	Undilute	Undilute	Undilute	1:1	1:1
Prolog F2 D1-1	-	-	undilute	-	-	-	Undilute	-
Prolog F2 D1-2	-	-	-	-	-	-	-	-
Prolog F2 D1-4	-	-	-	-	-	-	-	-
Prolog F3 UD	Undilute	-	1:1	Undilute	Undilute	-	1:1	Undilute
Prolog F3 D1-1	-	-	1:1	-	-	-	1:1	-
Prolog F3 D1-2	-	-	Undilute	-	-	-	Undilute	-
Prolog F3 D1-4	-	-	-	-	-	-	-	-
Control		-	-	-	-	-	-	-

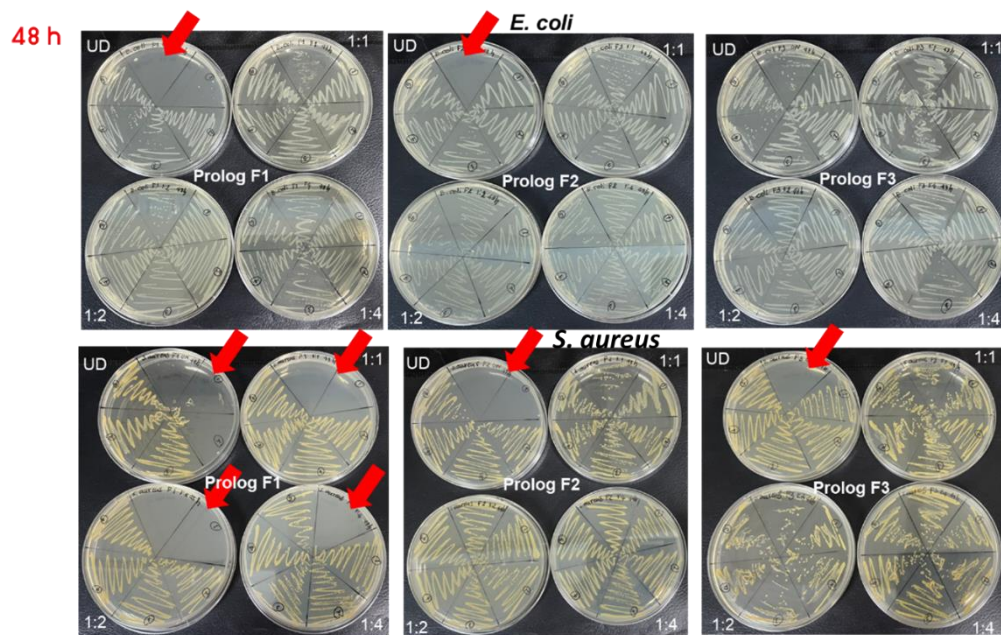
หมายเหตุ -ความเข้มข้นของเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ที่ใช้ทดสอบ $\approx 10^6$ cfu

-Control: คือเชื้อแบคทีเรียที่บ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB (ไม่มีการเติมสารทดสอบ)

-ค่า MIC: พิจารณาจากความขุ่นใสของตัวอย่างหลังจากบ่มไว้เป็นเวลา 16 -17 ชั่วโมง ณ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

-ค่า MBC: สังเกตจากการเจริญโตของเชื้อแบคทีเรียบนอาหารแข็ง MHA





รูปที่ 14 การตรวจสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ แบบ undilute และแบบที่เจือจางในอัตราส่วนต่างๆ หลังเก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (after kept at RT for 24 h) และ 48 ชั่วโมง (after kept at RT for 48 h) โดยวิธี Broth dilution assay

จากผลการทดลองในตารางที่ 17 และรูปที่ 14 พบว่า ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ *E. coli* ที่ความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^6 cfu ของสารละลายสูตร Prolog F1 มีประสิทธิภาพดีที่สุด เพราะสามารถฆ่าได้ถึง Dilution 1:1 (Prolog F1 D1-1) และประสิทธิภาพจะมีตั้งแต่หลังเตรียมเสร็จใหม่ (freshly prepared sample) ไปจนถึงหลังเก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (after kept at RT for 24 h) และลดลงที่ 48 ชั่วโมง (after kept at RT for 48 h) โดยหลังจากเก็บตัวอย่างไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะมีเพียงสารละลายสูตร Prolog F1 UD เท่านั้นที่ยังฆ่าเชื้อ *E. coli* ได้ ในขณะที่ สารละลายสูตร Prolog F1 D1-1 ยังสามารถฆ่าเชื้อได้หลังจากเก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนสารละลายสูตร Prolog F2 UD สามารถฆ่าเชื้อ *E. coli* ได้ หลังจากเก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง แต่อย่างไรก็ดี พบว่า สารละลายสูตร Prolog F3 UD ไม่สามารถฆ่าเชื้อ *E. coli* ได้ หลังจากเก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง

สำหรับประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ *S. aureus* ที่ความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^6 cfu พบว่า สารละลายสูตร Prolog F1 มีประสิทธิภาพดีที่สุด เพราะสามารถฆ่าได้ถึง Dilution 1:4 (Prolog F1 D1-4) โดยประสิทธิภาพของสารละลายสูตร Prolog F1 UD, Prolog F1 D1-1 และ Prolog F1 D1-2 จะมีประสิทธิภาพสูงสุดหลังเก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (after kept at RT for 24 h) และคงที่หลังจากเก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง (after kept at RT for 48 h) ในขณะที่ สารละลายสูตร Prolog F1 D1-4 จะมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ *S. aureus* หลังจากเก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

(after kept at RT for 24 h) และ 48 ชั่วโมง (after kept at RT for 48 h) ส่วนสารละลายสูตร Prolog F2 และ Prolog F3 จะฆ่าเชื้อ *S. aureus* ได้เฉพาะแบบ undilute โดยมีประสิทธิภาพตั้งแต่หลังเตรียมเสร็จใหม่ (freshly prepared sample) จนกระทั่งหลังจากเก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง (after kept at RT for 48 h) โดยสังเกตว่า สารละลายสูตร Prolog F2 UD จะมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ *S. aureus* เพิ่มขึ้นเล็กน้อย หลังจากเก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (after kept at RT for 48 h)

โดยภาพรวมสารละลายสูตร Prolog F1, 2 และ 3 แบบ undilute (UD) ส่วนใหญ่จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งและฆ่าเชื้อสูงสุดหลังเก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (after kept at RT for 24 h) และ คงที่หรือลดลงเล็กน้อยหลังเก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (after kept at RT for 48 h) ซึ่ง สอดคล้องกับแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของค่า available chlorine

4.6 ผลการตรวจสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ตามประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.)

การตรวจสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ตามประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) เรื่อง “วิธีการทดสอบและเกณฑ์ตัดสินผลการทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อโรคบนพื้นแข็งที่ไม่มีรูพรุน ของผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อโรค ชนิดฉีดพ่นธรรมดา หรือฉีดพ่นอัดก๊าซ” (แบบ one step cleaner) ของสารละลายสูตร ต่างๆ แบบ freshly prepared sample ที่เตรียมในภาชนะปากกว้าง โดยตรวจสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อ แบคทีเรีย ดังต่อไปนี้ *Salmonella enterica (choleraesuis)* ATCC 10708, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* PRD 10 ATCC 15442 (เป็นตัวแทนของเชื้อแบคทีเรียในสถานพยาบาล) และเชื้อรา *Trichophyton mentagrophytes* clinical isolate โดยจะใช้เวลาที่เชื้อสัมผัสกับสารละลาย (exposure time) เป็นเวลา 10 นาที ทำการทดสอบกับสารละลายที่ความเข้มข้น undilute และที่อัตราส่วน ความเข้มข้นที่เจือจางด้วยน้ำดื่ม (dilution) 1:1, 1:2 และ 1:4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ แสดงดังตารางที่ 18-20 โดยเกณฑ์ตัดสินผลการทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อโรคบนพื้นแข็งที่ไม่มีรูพรุน ของ

ผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อโรคชนิดฉีดพ่นธรรมดาหรือฉีดพ่นอัดก๊าซ ผลิตภัณฑ์ที่ฆ่าเชื้อได้จะต้องฆ่าเชื้อได้ไม่น้อยกว่า 59 carriers จาก 60 carriers

ตารางที่ 18 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อแบคทีเรียและราของสารละลาย Prolog F1 แบบ undilute และแบบที่เจือจางที่อัตราส่วนต่างๆ

เชื้อที่ทำการทดสอบ	Bacterial/ fungal growth after exposure of 60 soil-load contaminated carriers			
	Prolog F1 UD	Prolog F1 D1-1	Prolog F1 D1-2	Prolog F1 D1-4
เชื้อแบคทีเรีย				
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	0/60	1/60	4/60	ND
<i>Salmonella entérica</i> (choleraesuis) (ATCC 10708)	0/60	0/60	6/60	ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 15442)	0/60	0/60	1/60	ND
เชื้อรา				
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> clinical isolate	1/60	20/60	34/60	ND

หมายเหตุ ND = Not determined

ตารางที่ 19 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อแบคทีเรียและราของสารละลาย Prolog F2 แบบ undilute และแบบที่เจือจางที่อัตราส่วนต่างๆ

เชื้อที่ทำการทดสอบ	Bacterial/ fungal growth after exposure of 60 soil-load contaminated carriers			
	Prolog F2 UD	Prolog F2 D1-1	Prolog F2 D1-2	Prolog F2 D1-4
เชื้อแบคทีเรีย				
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	0/60	14/60	ND	ND
<i>Salmonella entérica</i> (choleraesuis) (ATCC 10708)	1/60	23/60	ND	ND

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 15442)	0/60	7/60	ND	ND
เชื้อรา				
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> clinical isolate	1/60	49/60	ND	ND
หมายเหตุ ND = Not determined				

ตารางที่ 20 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อแบคทีเรียและราของสารละลาย Prolog F3 แบบ undilute และแบบที่เจือจางที่อัตราส่วนต่างๆ

เชื้อที่ทำการทดสอบ	Bacterial/ fungal growth after exposure of 60 soil-load contaminated carriers			
	Pro log F3	Pro log F3	Pro log F3	Pro log F3

	F3 UD	D1- 1	D1- 2	D1- 4
เชื้อแบคทีเรีย				
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	0/6 0	8/6 0	ND	ND
<i>Salmonella enterica</i> (choleraesuis) (ATCC 10708)	0/6 0	31/ 60	ND	ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 15442)	0/6 0	5/6 0	ND	ND
เชื้อรา				
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> clinical isolate	1/6 0	48/ 60	ND	ND

หมายเหตุ ND = Not determined

เมื่อพิจารณาผลการทดสอบร่วมกับเกณฑ์การตัดสินที่ระบุไว้ด้านบน พบว่า สารละลายสูตร Prolog F1 UD, Prolog F2 UD และ Prolog F3 UD มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดและเชื้อรา โดยเมื่อทำการเจือจางสารละลายที่อัตราส่วน 1:1 พบว่า มีเพียงสารละลายสูตร Prolog F1 D1-1 ที่ยังคงมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด แต่ไม่มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อรา และเมื่อทำการเจือจางสารละลายที่อัตราส่วน 1:2 พบว่า สารละลายสูตร Prolog F1 D1-2 ไม่มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา

4.7 ผลการตรวจสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อไวรัส

การทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อไวรัสจำนวน 3 ชนิด คือ Influenza A H1N1, Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) และ Enterovirus 71 (EV 71) ของสารละลาย Prolog สูตรต่างๆ แบบ freshly prepared sample ที่เตรียมในภาชนะปากกว้าง ทำการทดสอบกับสารละลายที่ความเข้มข้น undilute และที่อัตราส่วนความเข้มข้นที่เจือจางด้วยน้ำดื่ม (dilution) 1:1, 1:2 และ 1:4 และที่ contact time 1 นาที ผลการ

ทดลองแสดงดังตารางที่ 22-24 โดยเกณฑ์ตัดสินผลการทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อไวรัส คือ สารละลายมี percent efficacy มากกว่า 99.9% หรือมี log reduction มากกว่า 3

ตารางที่ 21 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อไวรัสของสารละลาย Prolog F1 แบบ undilute และแบบที่เจือจางที่อัตราส่วนต่างๆ

เชื้อไวรัส/ ตัวอย่าง	Results for the inhibitory effect	
	Efficacy (%)	Log reduction
Influenza A H1N1		
Prolog F1 UD	99.96	3.363
Prolog F1 D1-1	99.94	3.195
Prolog F1 D1-1	99.92	3.105
Prolog F1 D1-4	99.91	3.030
Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV)		
Prolog F1 UD	99.99	3.966
Prolog F1 D1-1	99.98	3.815
Prolog F1 D1-1	99.98	3.621
Prolog F1 D1-4	99.92	3.101
Enterovirus 71 (EV 71)		
Prolog F1 UD	99.99	3.995
Prolog F1 D1-1	99.99	3.837
Prolog F1 D1-1	99.97	3.540
Prolog F1 D1-4	99.96	3.393

ตารางที่ 22 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อไวรัสของสารละลาย Prolog F2 แบบ undilute และแบบที่เจือจางที่อัตราส่วนต่างๆ

เชื้อไวรัส/ ตัวอย่าง	Results for the inhibitory effect	
	Efficacy (%)	Log reduction

รายงานฉบับนี้จัดทำขึ้นโดยศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ สวทช.

Influenza A H1N1		
Prolog F2 UD	99.99	3.947
Prolog F2 D1-1	99.93	3.162
Prolog F2 D1-1	99.91	3.032
Prolog F2 D1-4	99.84	2.793
Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV)		
Prolog F2 UD	99.99	4.000
Prolog F2 D1-1	99.97	3.516
Prolog F2 D1-1	99.94	3.260
Prolog F2 D1-4	97.32	1.572
Enterovirus 71 (EV 71)		
Prolog F2 UD	99.99	3.900
Prolog F2 D1-1	99.98	3.765
Prolog F2 D1-1	99.95	3.326
Prolog F2 D1-4	99.84	2.807

ตารางที่ 23 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อไวรัสของสารละลาย Prolog F3 แบบ undilute และแบบที่เจือจางที่อัตราส่วนต่างๆ

เชื้อไวรัส/ ตัวอย่าง	Results for the inhibitory effect	
	Efficacy (%)	Log reduction

Influenza A H1N1		
Prolog F3 UD	99.98	3.696
Prolog F3 D1-1	99.93	3.183
Prolog F3 D1-1	99.86	2.870
Prolog F3 D1-4	99.80	2.708
Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV)		
Prolog F3 UD	99.98	3.777
Prolog F3 D1-1	99.96	3.371
Prolog F3 D1-1	99.88	2.904
Prolog F3 D1-4	97.08	1.535
Enterovirus 71 (EV 71)		
Prolog F3 UD	99.99	3.932
Prolog F3 D1-1	99.99	3.900
Prolog F3 D1-1	99.85	2.837
Prolog F3 D1-4	99.48	2.280

เมื่อพิจารณาผลการทดสอบร่วมกับเกณฑ์การตัดสินที่ระบุไว้ด้านบน พบว่า สารละลายสูตร Prolog F1 UD, Prolog F2 UD และ Prolog F3 UD มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อไวรัสทั้ง 3 ชนิด โดยเมื่อทำการเจือจางสารละลาย Prolog F1 ที่อัตราส่วน 1:1, 1:2 และ 1:4 ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อไวรัสทั้ง 3 ชนิด มีแนวโน้มลดลง แต่ยังคงผ่านเกณฑ์การตัดสิน ในส่วนของสารละลาย Prolog F2 และ Prolog F3 ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อไวรัสทั้ง 3 ชนิด มีแนวโน้มลดลงเช่นเดียวกับสารละลาย Prolog F1 เมื่ออัตราส่วนการเจือจางด้วยน้ำมากขึ้น โดยประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อไวรัสของสารละลาย Prolog F2 D1-1, Prolog F2 D1-2 และ Prolog F3 D1-1 ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อไวรัสทั้ง 3 ชนิด ยังคงผ่านเกณฑ์การตัดสิน

5. สรุปผลการวิจัย

จากการดำเนินการวิจัยในโครงการนี้ สามารถสรุปผลการวิจัยได้ว่า สารละลายสูตรที่ 1 (Prolog F1 UD) (สูตรที่ 1: เกลือแกง 1 ช้อนโต๊ะ (18 กรัม) ไม่เติมน้ำส้มสายชู) ที่เตรียมขึ้นจากเครื่อง Hypo Plus มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย รา และไวรัส ได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับสารละลายสูตรที่ 2 (Prolog F2 UD) (สูตรที่ 2: เกลือแกง 1 ช้อนชา (6 กรัม) และน้ำส้มสายชู 0.5 ช้อนชา (2.5 กรัม)) และสารละลายสูตรที่ 3 (Prolog F3 UD) (สูตรที่ 3: เกลือแกง 1 ช้อนชา (6 กรัม) และน้ำส้มสายชู 1 ช้อนชา (5 กรัม)) โดยเมื่อทำการเจือจางสารละลายด้วยน้ำดื่ม (dilution) ที่อัตราส่วน 1:1, 1:2 และ 1:4 และทำการตรวจสอบค่า pH, ORP และ available chlorine พบว่า ค่า pH และ ORP ของสารละลายสูตรที่ 1 แบบไม่เจือจาง (Prolog F1 UD) มีค่าเท่ากับ 10.80 ± 0.01 และ 287.0 ± 1.0 mV ตามลำดับ โดยค่า available chlorine ของสารละลายมีแนวโน้มสัมพันธ์กับประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ กล่าวคือ ค่า available chlorine ที่สูงกว่า จะส่งผลให้สารละลายที่เตรียมมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อที่สูงขึ้น โดยสารละลายสูตรที่ 1 (freshly prepared sample) ที่มีค่า available chlorine เท่ากับ 786.0 ± 27.5 ppm ซึ่งสูงกว่าค่า available chlorine ของสารละลายสูตรที่ 2 (349.1 ± 41.2 ppm) และสูตรที่ 3 (349.9 ± 27.5 ppm) มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด โดยสารละลายที่ทำการเจือจางด้วยน้ำดื่มที่อัตราส่วน 1:4 (Prolog F1 1-4) ยังคงมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อไวรัส Influenza A H1N1, Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) และ Enterovirus 71 (EV 71) โดยมี percent efficacy มากกว่า 99.9% และมี log reduction มากกว่า 3.0 ในขณะที่ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของสารละลายสูตรที่ 1 ยังคงผ่านเกณฑ์การตัดสินใจ เมื่อทำการเจือจางสารละลายด้วยน้ำดื่ม (dilution) ที่อัตราส่วน 1:1 (Prolog F1 D1-1) แต่อย่างไรก็ดี หากต้องการให้สารละลายสูตรที่ 1 มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อราจะต้องใช้สารละลายดังกล่าวแบบไม่เจือจาง (Prolog F1 UD)

6. เอกสารอ้างอิง

- [1] American Public Health Association (1992), APHA Method 4500-CL: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 18th edition, Water Environment Federation: Washington, D.C., USA.
- [2] Willson, V. A., et al. "Determination of Available Chlorine in Hypochlorite Solution by Direct Titration with Sodium Thiosulfate", 1935, *Ind. Eng. Chem. Anal.* 7: 44-45.
- [3] ASTM D1498-14, Standard Test Method for Oxidation-Reduction Potential of Water, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2014, www.astm.org.
- [4] สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (มอก. 225-2542), มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม ไฮโปคลอไรต์, กระทรวงอุตสาหกรรม, กรุงเทพฯ
- [5] Wang, S., et al. "Assays for the Assessment of Neutralizing Antibody Activities against Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) Associated Coronavirus (SCV)", 2005, *J. Immunol. Methods*. 301: 21-30.
- [6] Yin, Y., et al. "An Antiviral Drug Screening System for Enterovirus 71 Based on an Improved Plaque Assay: A Potential High-throughput Method". 2019, *J. Med. Virol.* 91: 1440-1447.
- [7] Kang, S.N., et al. "Effect of Antimicrobial Activity of Sodium Hypochlorite and Organic Acids on Various Foodborne Pathogens in Korean Ginseng Root". 2013, *Afr. J. Microbiol. Res.*, 7: 2724-2729.
- [8] Mazzola, P.G., et al. "Chemical Resistance of the Gram-negative Bacteria to Different Sanitizers in a Water Purification System". 2006, *BMC Infect. Dis.*, 6: 131.
- [9] Pişkin, B., et al. "Stability of Various Sodium Hypochlorite Solutions". 1995, *J. Endod.*, 21: 253-255.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก. ผลการไต่ตรวหาเพื่อศึกษาอิทธิพลของน้ำส้มสายชู (5%) ต่อปริมาณปริมาณคลอรีนทั้งหมดที่เป็นส่วนประกอบ (available chlorine) ของสารละลาย Prolog สูตรที่ 2 แบบไม่เจือจาง (Prolog F2 UD)

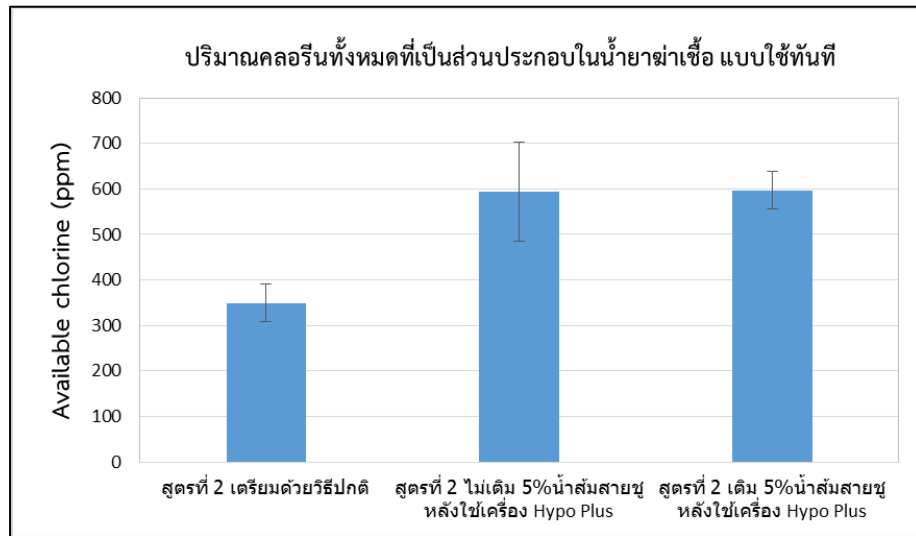
ทางบริษัทฯ ได้ตั้งสมมติฐานเกี่ยวกับประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อโรค และเชื่อจลนทรีย์ว่าเป็นผลมาจากสมดุลระหว่างสารละลายกรดไฮโปคลอรัส และโซเดียมไฮโปคลอไรต์ที่ผลิตได้จากเครื่อง Hypo Plus และจากทฤษฎีที่เกี่ยวกับในการผลิตกรดไฮโปคลอรัส (หัวข้อที่ 2.1) การปรับค่า pH จะส่งผลต่อสมดุลของการผลิตสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ และกรดไฮโปคลอรัส (แสดงดังสมการที่ 7) ดังนั้น จะเห็นได้ว่าการปรับค่า pH ส่งผลต่อประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อโรค และส่งผลโดยตรงต่อปริมาณ available chlorine ในสารละลาย แต่เมื่อทีมวิจัยได้ทำการพัฒนาสูตรที่มีการเติมน้ำส้มสายชู เพื่อปรับให้สารละลายมีความเป็นกรดมากยิ่งขึ้น กลับพบว่า ปริมาณของคลอรีนทั้งหมดที่เป็นส่วนประกอบของสารละลายมีแนวโน้มลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรที่ 1 ที่ไม่มีการเติมน้ำส้มสายชู เพื่อพิสูจน์สมมติฐานนี้ ทีมวิจัยจึงศึกษาอิทธิพลของการเติมน้ำส้มสายชูก่อน และหลังจากจุ่มเครื่อง Hypo Plus เพื่อผลิตสารละลายฆ่าเชื้อโรค ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 24 และกราฟแสดงความแตกต่างของปริมาณ available chlorine แสดงดังรูปที่ 15

ตารางที่ 24 อิทธิพลของลำดับการเติมน้ำส้มสายชูที่ส่งผลต่อปริมาณคลอรีนทั้งหมด (available chlorine) ในสารละลาย

ตัวอย่าง Prolog F2 UD	Available chlorine (ppm)
เติมน้ำส้มสายชูก่อนจุ่มเครื่อง Hypo Plus	349.1 ± 41.2
เติมน้ำส้มสายชูหลังจุ่มเครื่อง Hypo Plus	596.3 ± 41.3
ไม่เติมน้ำส้มสายชู	593.1 ± 108.7

จากผลการไต่ตรวหาปริมาณคลอรีนทั้งหมดที่เป็นส่วนประกอบในน้ำยาฆ่าเชื้อ ตารางที่ 24 สูตรที่เตรียมโดยไม่มีการเติมน้ำส้มสายชู พบปริมาณ available chlorine ที่ 593.1 ± 108.7 ppm ซึ่งสูงกว่าสูตรที่ 2 ที่มีการเติมน้ำส้มสายชูก่อนการใช้เครื่อง สำหรับสูตรที่เติมน้ำส้มสายชูหลังจากการผลิตน้ำยาฆ่าเชื้อจลนทรีย์ด้วยเครื่อง Hypo Plus พบว่าปริมาณ available chlorine กลับมีค่าใกล้เคียงกับสารละลายที่ไม่มีการเติมน้ำส้มสายชู (596.3 ± 41.3 ppm) จากผลการทดสอบสามารถสรุปได้ว่าปริมาณ available chlorine ไม่ได้

ขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำส้มสายชูในระหว่างการเตรียมสารละลาย แต่ขึ้นอยู่กับปริมาณเกลือแกงที่ใช้ในการเตรียมน้ำยาฆ่าเชื้อ



รูปที่ 15 กราฟแสดงความแตกต่างของปริมาณ available chlorine ในการเตรียมสารละลาย Prolog F2 UD (freshly prepared sample) เพื่อศึกษาอิทธิพลของลำดับการเติมน้ำส้มสายชู