รายงานการวิจัย

การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์ ด้วยวิธีทดสอบทางเคมีและจุลชีววิทยา

A Study on Efficiency of Hypochlorite Disinfectants by Chemical and Microbiological Methods

ชุตินันท์	ประสิทธิ์ภูริปรีชา
อรุณศรี	ปรีเปรม
วริษฎา	ศิลาอ่อน
จันทร์วดี	โล่เสถียรกิจ
อุษณา	พัวเพิ่มพูลศิริ
เพียงเพ็ญ	ธิโสดา

สนับสนุนโดย ทุนอุดหนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ประจำปีงบประมาณ 2539

รหัสโครงการวิจัย 02008 609-0002

ISBN 974-609-059-3

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

คำนำ

น้ำยาฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์ เป็นน้ำยาฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพดีในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียและไวรัส นิยมใช้กันมากในโรงพยาบาล มีทั้งน้ำยาสำเร็จรูป และเตรียมขึ้นใช้เองในโรงพยาบาล ประสิทธิภาพของน้ำยาขึ้นกับปริมาณอนุมูลไฮโปคลอไรท์อิออนในสารละลาย ซึ่งเป็นอนุมูลที่ไม่คงตัว ถ้าสภาวะการเก็บรักษาไม่ดีพอ หรือเก็บไว้นานเกินไป จะยิ่งทำให้ประสิทธิภาพของการฆ่าเชื้อลดลง

งานวิจัยนี้มุ่งศึกษาความคงตัวและประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์ 2 ชนิด คือ สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 0.5% เมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้อง ในระยะเวลาต่าง ๆ โดยทำการวิเคราะห์ทั้งการทดสอบทางเคมี และการทดสอบทางจุลชีววิทยา คณะผู้ดำเนินการวิจัยหวังว่า งานวิจัยชิ้นนี้จะมีประโยชน์ในการนำไปเป็นแนวปฏิบัติสำหรับหน่วยงานสาธารณสุขในการจัดเตรียมและจัดเก็บน้ำยาฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์ให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสม และอาจใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาด้านอื่น ๆ อีกต่อไป ทั้งนี้ หากมีข้อบกพร่องใด ๆ ที่อาจเกิดขึ้น ผู้วิจัยขอน้อมรับไว้ปรับปรุงแก้ไขในงานต่อไป

คณะผู้วิจัย

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.บังอร ศรีพานิชกุลชัย คณบดีคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี และรองศาสตราจารย์ ดร.อรุณศรี ปรีเปรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ผู้ซึ่งริเริ่ม ให้โอกาส และจุดประกายแนวคิดในการทำงานวิจัยให้แก่คณาจารย์คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีในยุคของการเริ่มจัดตั้งคณะในขณะนั้น พร้อมทั้งกรุณาให้คำแนะนำ คำปรึกษาที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยในหลายกรณี โดยเฉพาะรองศาสตราจารย์ ดร.อรุณศรี ปรีเปรม ที่กรุณาให้โอกาสแก่คณะผู้วิจัย โดยกรุณามอบงานวิจัยที่เป็นส่วนหนึ่งในโครงการงานวิจัยของท่านที่กำลังดำเนินการอยู่ และให้คำปรึกษาตลอดจนชี้แนะแนวทางการทำวิจัยจนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีที่กรุณาสนับสนุนอุปกรณ์ และเอื้อเฟื้อสถานที่สำหรับทำงานวิจัย ขอขอบคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่มีส่วนสนับสนุนงานวิจัยนี้ และขอขอบคุณนักศึกษาผู้ช่วยวิจัยทั้ง 3 ท่าน คือ นายเด่นชัย ดอกพอง นางสาวสุชาดา ฐิตศิริวิริยะ และนางสาวสุภาภรณ์ ประทุมสา ไว้ ณ โอกาสนี้

คณะผู้วิจัย

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

บทคัดย่อ

สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ที่เตรียมขึ้นใหม่ในความเข้มข้น 5,000 ppm (0.5%)ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่นิยมเตรียมขึ้นเพื่อใช้ภายในโรงพยาบาล บรรจุในขวดแก้วสีชาปิดฝาสนิท ใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบความคงตัวและประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อเมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้อง (25±3°C) ระยะเวลาต่าง ๆ นาน 8 สัปดาห์ โดยวิเคราะห์หาปริมาณ available chlorine ($AvCl_2$) ด้วยวิธี Iodometric titration วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อด้วยวิธี use dilution method ซึ่งเป็นวิธีจำลองแบบการใช้งานจริงในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิด คือ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* พบว่า สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ มีค่าเฉลี่ย $AvCl_2$ (n=2) ที่เวลา 0 และ 8 สัปดาห์ เท่ากับ 3,922.7 และ 3,851 ppm และ มีค่า pH (n=2) เท่ากับ 11.65 และ 11.82 ตามลำดับ ส่วนสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ มีค่าเฉลี่ย $AvCl_2$ (n=2) ที่เวลา 0 และ 8 สัปดาห์ เท่ากับ 4,493 และ 4,600 ppm และ มีค่า pH (n=2) เท่ากับ 12.17 และ 12.21 ตามลำดับ แสดงว่าสารละลายชนิดเดียวกัน เมื่อเก็บไว้ที่ระยะเวลาต่าง ๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ จะให้ค่า $AvCl_2$ ไม่เปลี่ยนแปลงจากสารละลายที่เตรียมใหม่ และยังมีความสามารถในการฆ่าเชื้อทั้ง 3 ชนิดได้ หากเปรียบเทียบความคงตัวระหว่างสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ พบว่า สารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ให้ปริมาณ $AvCl_2$ สูงกว่าสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้นเท่ากัน และมีความคงตัวมากกว่า กล่าวคือ เมื่อเก็บไว้นาน 8 สัปดาห์ สารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์มีปริมาณ $AvCl_2$ เพิ่มขึ้น แต่สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์มีปริมาณ $AvCl_2$ ลดลง 2% เมื่อเจือจางสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 5,000 ppm (0.5%) ให้มีความเข้มข้นต่ำลง โดยเจือจางครั้งละ 2 เท่า จนถึงความเข้มข้น 22.29 ppm และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25±3°C) นาน 1 เดือน เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นที่มีต่อความคงตัวของไฮโปคลอไรท์อิออน พบว่า ปริมาณ $AvCl_2$ ของสารละลายเจือจางมีค่าลดลงโดยเฉลี่ย 6.24% (n=9) ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นต่ำสุดของสารละลายเจือจางที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC, n=3) *S. aureus*, *E. coli* และ *Ps. aeruginosa* มีค่าเท่ากับ 691.77 , 696.57 และ 700.2 ppm ตามลำดับ ดังนั้น หากต้องทำการเจือจางสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์เพื่อใช้ในโรงพยาบาล ไม่ควรให้ความเข้มข้นของสารละลายมีค่าต่ำกว่า 805 ppm เนื่องจากมีผลต่อความคงตัว และประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ สิ่งสำคัญที่ควรคำนึงสำหรับการใช้น้ำยาฆ่าเชื้อในโรงพยาบาล เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่มีความคงตัวและมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ คือ การเตรียมที่ได้มาตรฐาน การเก็บรักษา และการขนส่ง

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

Abstract

Solutions of sodium hypochlorite and calcium hypochlorite at the concentration of 5,000 ppm (0.5%) were freshly-prepared as the hospital use purposes. Both solutions, stored in tightly-closed amber glass container at room temperature (25±3°C) for 8 weeks were evaluated for theirs stability by using iodometric titration, pH measurement and the bactericidal effectiveness by using use dilution method. The iodometric titration analysed the available chlorine contents ($AvCl_2$) of solution. The average $AvCl_2$ (n=2) of sodium hypochlorite solution after 0 and 8 weeks storage were 3,922.7 and 3,851 ppm respectively. The pH (n=2) of sodium hypochlorite solution after 0 and 8 weeks storage were 11.65 and 11.82 respectively. Whereas the average $AvCl_2$ (n=2) of calcium hypochlorite solution after 0 and 8 weeks storage were 4,493 and 4,600 ppm respectively. The pH (n=2) of sodium hypochlorite solution after 0 and 8 weeks storage were 12.17 and 12.21 respectively. This illustrated that the $AvCl_2$ of each solutions were in the same range as those being freshly-prepared. But calcium salt was more effective and more stable than sodium salt because of the greatly liberation of $AvCl_2$. After 8 weeks storage, both solutions showed to inhibit the growth of *S. aureus*, *E. coli and Ps. aeruginosa*. The 0.5% calcium hypochlorite solutions were diluted into 22.29 ppm and kept for 1 month for the investigation of the effect concentration on the stability of the hypochlorite ions. It was found that the $AvCl_2$ of the diluted solutions decreased in average 6.24% (n=9). The average minimum inhibitory concentrations (MIC, n=3) for *S. aureus*, *E. coli* and *Ps. aeruginosa* was 691.77, 696.57 and 700.2 ppm, respectively. It was concluded that the 8-week storage calcium hypochlorite solutions at the concentration of 5,000 ppm could maintain the available chlorine in the solution to a sufficient level to exert its microbiological action for the 3 bacteria used in this study. However, at a lower concentration of the calcium hypochlorite than 805 ppm, observations of the inactive bactericidal effects could be noticed. Therefore, it is crucial for the use in hospitals to maintain the concentration of the solution by standardization of the preparation, storage and handling of the calcium hypochlorite solutions.

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
คำนำ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	3
น้ำยาฆ่าเชื้อ	3
น้ำยาฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์	4
ปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวของน้ำยาฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์	5
ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อของน้ำยาฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์	6
น้ำยาฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์	11
น้ำยาฆ่าเชื้อแคลเซียมไฮโปคลอไรท์	12
คุณสมบัติของเชื้อที่ใช้ทดสอบ	13
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	18
อุปกรณ์และสารเคมี	18
การเตรียมสารละลายไฮโปคลอไรท์	19
การวิเคราะห์เพื่อประเมินประสิทธิภาพสารละลายไฮโปคลอไรท์	20
- การทดสอบทางเคมี	20
- การทดสอบทางจุลชีววิทยา	21
วิธีการทดลอง	24
บทที่ 4 ผลการทดลอง	26

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

เรื่อง	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	39
เอกสารอ้างอิง	41
ภาคผนวก	44
ภาคผนวก ก	44
การคำนวณหาปริมาณของ available chlorine โดยวิธี Iodometric Titration	
ภาคผนวก ข	47
ความสัมพันธ์ระหว่าง light transmittance (%T) กับ number of bacterial colony on plate count (CFU/ml)	
ภาคผนวก ค	50
การประเมินประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อด้วยวิธี phenol coefficient	
ภาคผนวก ง	51
ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อของน้ำยาฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์	
ภาคผนวก จ	60
ความสามารถในการทำลายเชื้อของสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ เพื่อหาค่า MIC	

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

สารบัญตาราง

ตารางที่	เรื่อง	หน้า
ตารางที่ 1	แสดงคุณสมบัติและการใช้น้ำยาฆ่าเชื้อ	9
ตารางที่ 2	ความแตกต่างของสารละลายไฮโปคลอไรท์ในรูปเกลือโซเดียมและแคลเซียม	13
ตารางที่ 3	ปริมาณ available chlorine ($AvCl_2$)ของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) และสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ $Ca(OCl)_2$ เมื่อเก็บที่เวลาต่าง ๆ นาน 8 สัปดาห์	26
ตารางที่ 4	ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของ สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) และสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ($Ca(OCl)_2$) เมื่อเก็บที่เวลาต่าง ๆ นาน 8 สัปดาห์	30
ตารางที่ 5	ความสามารถในการฆ่าเชื้อของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 5,000 ppm (0.5%) ที่เก็บไว้เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์*	32
ตารางที่ 6	ปริมาณ $AvCl_2$ (ppm) ที่ปลดปล่อยออกมาจากสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะเวลา 1 เดือน	34
ตารางที่ 7	ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ($Ca(OCl)_2$) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อเก็บเป็นระยะเวลา 1 เดือน	36
ตารางที่ 8	ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) 3 ชนิดของสารละลายแคลเซียมคลอไรท์ เมื่อเก็บไว้ที่เวลา 1 เดือน	37
ตารางที่ 9	การ standardization หาความเข้มข้นของ Sodium thiosulfate	45
ตารางที่ 10	ปริมาตรของ $Na_2S_2O_3$ ที่ใช้ในการ titrate หาปริมาณ $AvCl_2$ ใน NaOCl และ $Ca(OCl)_2$ ที่เก็บในระยะเวลาต่าง ๆ	46
ตารางที่ 11	ความสัมพันธ์ระหว่าง % Transmittance (% T) กับ number of bacterial colony on plate count (CFU/ ml) ของเชื้อต่าง ๆ	48

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

ตารางที่	เรื่อง	หน้า
ตารางที่ 12	ผลการฆ่าเชื้อ *S. aureus* ของน้ำยาฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์ เมื่อเก็บไว้ ณ สัปดาห์ที่ 0	51
ตารางที่ 13	ผลการฆ่าเชื้อ *S. aureus* ของน้ำยาฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์ เมื่อเก็บไว้ ณ สัปดาห์ที่ 1	51
ตารางที่ 14	ผลการฆ่าเชื้อ *S. aureus* ของน้ำยาฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์ เมื่อเก็บไว้ ณ สัปดาห์ที่ 2	52
ตารางที่ 15	ผลการฆ่าเชื้อ *S. aureus* ของน้ำยาฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์ เมื่อเก็บไว้ ณ สัปดาห์ที่ 4	52
ตารางที่ 16	ผลการฆ่าเชื้อ *S. aureus* ของน้ำยาฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์ เมื่อเก็บไว้ ณ สัปดาห์ที่ 6	53
ตารางที่ 17	ผลการฆ่าเชื้อ *S. aureus* ของน้ำยาฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์ เมื่อเก็บไว้ ณ สัปดาห์ที่ 8	53
ตารางที่ 18	ผลการฆ่าเชื้อ *E. coli* ของน้ำยาฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์ เมื่อเก็บไว้ ณ สัปดาห์ที่ 0	54
ตารางที่ 19	ผลการฆ่าเชื้อ *E. coli* ของน้ำยาฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์ เมื่อเก็บไว้ ณ สัปดาห์ที่ 1	54
ตารางที่ 20	ผลการฆ่าเชื้อ *E. coli* ของน้ำยาฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์ เมื่อเก็บไว้ ณ สัปดาห์ที่ 2	55
ตารางที่ 21	ผลการฆ่าเชื้อ *E. coli* ของน้ำยาฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์ เมื่อเก็บไว้ ณ สัปดาห์ที่ 4	55
ตารางที่ 22	ผลการฆ่าเชื้อ *E. coli* ของน้ำยาฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์ เมื่อเก็บไว้ ณ สัปดาห์ที่ 6	56
ตารางที่ 23	ผลการฆ่าเชื้อ *E. coli* ของน้ำยาฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์ เมื่อเก็บไว้ ณ สัปดาห์ที่ 8	56
ตารางที่ 24	ผลการฆ่าเชื้อ *Ps.aeruginosa* ของน้ำยาฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์ เมื่อเก็บไว้ ณ สัปดาห์ที่ 0	57

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

ตารางที่	เรื่อง	หน้า
ตารางที่ 25	ผลการฆ่าเชื้อ *Ps.aeruginosa* ของน้ำยาฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์ เมื่อเก็บไว้ ณ สัปดาห์ที่ 1	57
ตารางที่ 26	ผลการฆ่าเชื้อ *Ps.aeruginosa* ของน้ำยาฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์ เมื่อเก็บไว้ ณ สัปดาห์ที่ 2	58
ตารางที่ 27	ผลการฆ่าเชื้อ *Ps.aeruginosa* ของน้ำยาฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์ เมื่อเก็บไว้ ณ สัปดาห์ที่ 4	58
ตารางที่ 28	ผลการฆ่าเชื้อ *Ps.aeruginosa* ของน้ำยาฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์ เมื่อเก็บไว้ ณ สัปดาห์ที่ 6	59
ตารางที่ 29	ผลการฆ่าเชื้อ *Ps.aeruginosa* ของน้ำยาฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์ เมื่อเก็บไว้ ณ สัปดาห์ที่ 8	59
ตารางที่ 30	ความสามารถในการทำลายเชื้อ *E.coli, S. aureus, Ps. aeruginosa* ของสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อเก็บไว้ ณ วันที่ 0	60
ตารางที่ 31	ความสามารถในการทำลายเชื้อ *E.coli, S. aureus, Ps. aeruginosa* ของสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อเก็บไว้ ณ วันที่ 3	61
ตารางที่ 32	ความสามารถในการทำลายเชื้อ *E.coli, S. aureus, Ps. aeruginosa* ของสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อเก็บไว้ ณ วันที่ 7	62
ตารางที่ 33	ความสามารถในการทำลายเชื้อ *E.coli, S. aureus, Ps. aeruginosa* ของสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อเก็บไว้ ณ วันที่ 17	63
ตารางที่ 34	ความสามารถในการทำลายเชื้อ *E.coli, S. aureus, Ps. aeruginosa* ของสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อเก็บไว้ ณ วันที่ 24	64
ตารางที่ 35	ความสามารถในการทำลายเชื้อ *E.coli, S. aureus, Ps. aeruginosa* ของสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อเก็บไว้ ณ วันที่ 31	65

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

สารบัญรูป

รูปที่	เรื่อง	หน้า
รูปที่ 1	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ available chlorine ของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ (ppm) กับ ระยะเวลาที่เก็บ	27
รูปที่ 2	ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของ $AvCl_2$ เฉลี่ยที่คงเหลือในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ (ppm) กับ ระยะเวลาที่เก็บ	28
รูปที่ 3	ค่า pH ของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 5,000 ppm (0.5%) ที่เก็บไว้เป็นระยะเวลา 0-8 สัปดาห์	31
รูปที่ 4	ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของ available chlorine ที่คงเหลือในสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นต่าง ๆ กับระยะเวลาที่เก็บ	35
รูปที่ 5	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) 3 ชนิด ของสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ แสดงผลเป็นปริมาณ available chlorine เมื่อเก็บไว้ที่เวลาต่าง ๆ เป็นเวลา 1 เดือน	38

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

บทที่ 1
บทนำ

ปัจจุบันโรงพยาบาลต่าง ๆ โดยเฉพาะโรงพยาบาลชุมชน มักเตรียมน้ำยาฆ่าเชื้อ (disinfectant) ขึ้นใช้เอง เนื่องจากสามารถเตรียมได้ง่ายและมีราคาถูกกว่าน้ำยาสำเร็จรูป น้ำยาฆ่าเชื้อที่นิยมใช้กันมากกลุ่มหนึ่ง คือ สารละลายไฮโปคลอไรท์ ซึ่งมีกลไกการออกฤทธิ์ผ่านปฏิกิริยาคลอริเนชันที่โปรตีนของจุลชีพ ทำให้คุณสมบัติของโปรตีนถูกทำลายเสียไป และยังมีฤทธิ์ออกซิไดซ์ชีวโมเลกุลของแบคทีเรียได้ การฆ่าเชื้อเกิดจากหมู่อนุมูลคลอรีนที่ออกฤทธิ์ได้ (available chlorine,$AvCl_2$) ซึ่งละลายอยู่ในน้ำ (Andrew,1904) แต่สารละลายไฮโปคลอไรท์มีปัญหาในเรื่องความคงตัวของน้ำยา เนื่องจากสารละลายไฮโปคลอไรท์มักสลายตัวได้ง่ายในภาวะเป็นกรด (Bloomfield,1985) นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอีกหลายประการที่มีผลต่อความคงตัว อาทิ เช่น อุณหภูมิ รังสีอุลตราไวโอเลต และปริมาณสารประกอบอินทรีย์เจือปนในสารละลาย เป็นต้น (Rudolph,1941) ข้อมูลความคงตัวของสารละลายไฮโปคลอไรท์จึงมีประโยชน์ต่องานบริการผู้ป่วยในโรงพยาบาล ที่จำเป็นต้องมีการเตรียมและใช้สารละลายฆ่าเชื้อที่เชื่อว่ามีประสิทธิภาพภายหลังจากเก็บไว้ระยะหนึ่ง ซึ่งในการปฏิบัติงานจริงที่ต้องเตรียมน้ำยาเก็บไว้ ไม่สามารถเตรียมใช้งานในทันทีทันใดได้เสมอ สารละลายไฮโปคลอไรท์ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaClO) เนื่องจากมีราคาถูกกว่าเกลือไฮโปคลอไรท์ชนิดอื่น ปัจจุบันมีรายงานการวิจัยมากมายที่เกี่ยวกับความคงตัวของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และผลต่อประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ (Johnson and Remeikis,1993) (ดำรงเกียรติ,2533)

อรุณศรี ปรีเปรมและคณะ (Priprem,1995) ได้ศึกษาความคงตัวและประสิทธิภาพของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 0.5% ที่บรรจุในภาชนะปิดสนิท เก็บเป็นเวลา 1 เดือนที่อุณหภูมิห้อง ($25\pm0.5^{\circ}C$) พบว่าปริมาณ $AvCl_2$ ที่วัดโดยวิธี iodometric titration ลดลงเป็น 96.36% แต่เมื่อทดสอบด้วยวิธี phenol coefficient พบว่ายังมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ 3 ชนิด คือ *S.aureus, E.coli* และ *Ps.aeruginosa* ทั้งนี้ นอกจากสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์แล้ว พบว่า สารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ($Ca(ClO)_2$) มีข้อดีเหนือสารละลายเกลือโซเดียมหลายอย่าง เช่น มีความคงตัวมากกว่า และเมื่อแตกตัวจะให้ % $AvCl_2$ สูงกว่า ถึงแม้ว่าจะมีราคาแพงกว่าก็ตาม ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาเปรียบเทียบความคงตัวและประสิทธิภาพของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์และสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น 0.5% ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่นิยมใช้ในโรงพยาบาล เมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลาต่าง ๆ กัน โดยการ

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

วิเคราะห์หาปริมาณ $AvCl_2$ ด้วยวิธี iodometric titration และทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อด้วยวิธี use dilution method ซึ่งเป็นวิธีที่จำลองแบบการใช้งานจริง นอกจากนี้ยังสนใจศึกษาถึงความคงตัวและประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ เมื่อเจือจางสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ 0.5% ให้มีความเข้มข้นต่ำลงโดยยังคงคุณภาพการฆ่าเชื้อ เพื่อการกำหนดความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ที่ยังมีฤทธิ์

วัตถุประสงค์งานวิจัย

1. ศึกษาเปรียบเทียบความคงตัวและประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ในความเข้มข้น 5,000 ppm (0.5%) เก็บที่อุณหภูมิห้อง ($25\pm3^{\circ}C$) ระยะเวลาต่าง ๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์
2. กำหนดความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ที่ต่ำที่สุดที่เจือจางใช้ในโรงพยาบาลได้ โดยที่ยังคงมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อได้

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

น้ำยาฆ่าเชื้อ

(antiseptic and disinfectant)

น้ำยาฆ่าเชื้อ หมายถึง น้ำยาที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยมีฤทธิ์เป็น bacteriostatic หรือ bacteriocidal รวมทั้งมีผลต่อ fungi, spore และ virus ด้วย ทั้งนี้แล้วแต่คุณสมบัติเฉพาะของน้ำยาแต่ละชนิด

Antiseptic หมายถึง สารเคมีที่มีฤทธิ์ฆ่า หรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ เหมาะที่จะใช้กับสิ่งมีชีวิต เช่น เนื้อเยื่อของร่างกาย

Disinfectants หมายถึง สารเคมีที่มีฤทธิ์ฆ่า หรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ เหมาะที่จะใช้กับสิ่งไม่มีชีวิต เช่น อุปกรณ์ เครื่องมือเครื่องใช้ทางการแพทย์

คุณสมบัติของ antiseptics ที่ดี

1) มีฤทธิ์ bactericidal activity มากกว่า bacteriostatic activity
2) ไม่ทำอันตรายต่อเนื้อเยื่อที่ยังมีชีวิต หรือทำให้เกิดการแพ้ (allergy)
3) ไม่มีผลรบกวนต่อการหายของบาดแผล (healing process)
4) ออกฤทธิ์ได้ดีในทุกส่วนแม้อยู่ในสารน้ำของร่างกาย (body fluids) เช่น บาดแผล น้ำลาย หนอง
5) ถูกดูดซึมเข้ากระแสโลหิตน้อย หรือแทบไม่ถูกดูดซึมเลย

คุณสมบัติของ disinfectant ที่ดี

1) ออกฤทธิ์เร็ว
2) เป็นสารที่คงตัวเป็นเวลานาน (stable substances)
3) ไม่ทำอันตรายต่อเครื่องมือเครื่องใช้ทางการแพทย์
4) ราคาถูก
5) ไม่มีสี ไม่มีกลิ่นติดบนเครื่องมือเครื่องใช้

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

น้ำยาฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์

ประวัติการใช้คลอรีนและไฮโปคลอไรท์

คลอรีนเป็นธาตุที่พบได้ทั่วไปโดยไม่พบรูปอิสระในธรรมชาติ ซึ่งจะพบในรูปของแคลเซียม, โซเดียม, โปแตสเซียม และแมกนีเซียม คลอรีนในรูปก๊าซ จะมีกลิ่นที่ระคายเคืองมาก (Gardner และคณะ,1986) คลอรีนเป็นที่รู้จักกันมานานหลายศตวรรษแล้ว และได้มีการรวมเป็นธาตุเมื่อปี ค.ศ.1809 โดย Sir. Humphrey Davy ในระยะแรกพบว่าคลอรีนมีคุณสมบัติในการฟอกสี จึงเป็นจุดเริ่มต้นของการใช้คลอรีน แล้วพัฒนามาใช้ในการผลิตขั้นอุตสาหกรรมในปี ค.ศ.1785 และในเวลาอันสั้นได้มีการพัฒนาคลอรีนมาใช้ในรูปแคลเซียม และโซเดียมไฮโปคลอไรท์ เพื่อเพิ่มความสะดวกในการใช้ยิ่งขึ้น ช่วงกลางศตวรรษที่ 19 การใช้ไฮโปคลอไรท์ได้เป็นที่ยอมรับโดยทั่วไป และได้มีการใช้อย่างแพร่หลาย คือ ใช้แคลเซียมไฮโปคลอไรท์เพื่อควบคุมและป้องกันการติดเชื้อในการคลอดที่คลินิกในกรุงเวียนนาโดย Semmelweis ในปี ค.ศ.1846 นอกจากนี้มีการใช้แคลเซียมไฮโปคลอไรท์เพื่อรักษาสภาพน้ำ ใช้เป็น disinfectant และสารดับกลิ่นในหอผู้ป่วยในลอนดอน

ในปี ค.ศ.1881 Koch ได้แสดงฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของไฮโปคลอไรท์ โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อในห้องทดลอง ในปี ค.ศ. 1886 The American Public Health Association ได้รายงานคุณสมบัติของไฮโปคลอไรท์ในการเป็น disinfectant (Hadfeild, 1957) ในปี ค.ศ. 1915 Dakin ได้เตรียมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 0.45-0.5% เพื่อใช้เป็น Disinfectant และป้องกันการติดเชื้อในแผลเปิด ซึ่ง Dakin's solution เตรียมได้จากการผสม sodium carbonate และ sodium bicarbonate กับ chlorinated lime และในปี ค.ศ. 1949 Lesser พบว่าไฮโปคลอไรท์ มีคุณสมบัติเป็น disinfectant ที่ดี

ปัจจุบันการใช้คลอรีนจึงเป็นที่นิยมอย่างแพร่หลายโดยเฉพาะในรูปของไฮโปคลอไรท์ ที่มีความนิยมสูงกว่ารูปอื่น ซึ่งมีทั้งชนิดที่เป็นผงและเป็นน้ำ

คุณสมบัติที่ดีของ hypochlorite

1. คุณสมบัติในการฆ่าเชื้ออยู่ในระดับ Intermediate ไม่สามารถทำลายสปอร์ได้ สามารถฆ่าเชื้อวัณโรค แบคทีเรีย รา และไวรัส ได้ดี
2. ฆ่าเชื้อได้เร็ว
3. ล้างออกง่าย
4. ไม่มีสี
5. ไม่ติดเสื้อผ้า

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

6. ไม่มีสารพิษตกค้าง
7. ไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ ในขนาดที่ใช้

คุณสมบัติที่ไม่ดีของ Hypochlorite

1. มีคุณสมบัติในการกัดกร่อนโลหะและเป็นสารฟอกสี เนื่องจากเป็นสารประกอบที่มี halogen
2. ละลาย blood clot ทำให้การแข็งตัวของเลือดช้าลง
3. ระเหยได้ กลิ่นเหม็นอุน ระคายเคืองต่อระบบทางเดินหายใจ และเนื้อเยื่อ
4. ฤทธิ์ฆ่าเชื้อถูกยับยั้งโดยสารอินทรีย์ เช่น เลือด เศษเนื้อเยื่อ น้ำเหลือง หนอง เป็นต้น จึงต้องใช้ความเข้มข้นที่สูงกว่า ตัวอย่างความเข้มข้นที่สามารถฆ่าเชื้อได้มาก เช่น ในกรณีพื้นผิวสะอาดใช้เพียง 100 – 1,000 ppm แต่ในสภาวะที่มีสิ่งสกปรก เลือด น้ำเหลือง ต้องใช้สูงถึง 5,000 – 10,000 ppm ของ avialable chlorine (0.5 - 1% sodium hypochlorite)
5. เกิดการแพ้ได้
6. เมื่อเจอกรดจะเกิดก๊าซคลอรีน ซึ่งมีพิษมาก
7. ไม่คงตัวทั้ง liquid form และ solid form แต่ solid form จะคงตัวมากกว่า

ปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวของน้ำยาฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์

1. pH **ของสารละลาย**

สารละลายไฮโปคลอไรท์มีฤทธิ์เป็นด่าง เมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นด่าง จะมีความคงตัวมากกว่าสภาวะที่เป็นกรด Bloomfield (1985) พบว่าสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ pH ต่ำ จะมีปริมาณ available chlorine ($AvCl_2$) คงที่เป็นระยะเวลานาน เช่น ที่ pH เท่ากับ 0 ปริมาณ $AvCl_2$ จะคงตัวอยู่ได้นานกว่า 3 เดือน

2. **แสงอุลตราไวโอเลต** (UV)

แสง UV จะกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยา oxidation มากขึ้น ทำให้ความคงตัวของสารละลายไฮโปคลอไรท์ลดลง Vincent และ Ballereau (1988) พบว่าสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ได้รับแสง UV ในระยะเวลา 5 สัปดาห์ ในภาชนะเปิด ปริมาณ $AvCl_2$ จากเริ่มต้นที่ 4,300 ppm. ลดลงเหลือ 2,300 ppm. แต่ถ้าเก็บในที่มืดเวลา 5 สัปดาห์ ปริมาณ $AvCl_2$ ลดลงเหลือ 4,200 ppm.

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

3. ก๊าซออกซิเจน

ออกซิเจนจะกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยา oxidation มากขึ้น ทำให้ความคงตัวของสารละลายไฮโปคลอไรท์ลดลง เช่นเดียวกับแสง UV (Vincent และ Ballereau, 1988)

4. อุณหภูมิ

เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น จะกระตุ้นให้สารละลายไฮโปคลอไรท์สลายเป็นเกลือ chlorite และเกลือ chloride เพิ่มขึ้น

ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อของน้ำยาฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์

1. ผลของ pH

ค่า pH มีอิทธิพลมากที่สุดต่อประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ของคลอรีน หรือสารละลายไฮโปคลอไรท์ การเพิ่มขึ้นของ pH จะทำให้ฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อลดลง (Rideal และคณะ, 1921 และ John, 1934) เนื่องจาก pH มีผลต่อความเข้มข้นของ HOCl กับ OCl^- Morris (1966) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพของ HOCl และ OCl^- ในการฆ่าเชื้อ *E. coli* (*E. coli* ลดลง 99%) อุณหภูมิ 2-5 ^{o}C และ pH ต่างๆกันในเวลา 30 นาที พบว่า HOCl มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ *E. coli* ดีกว่า OCl^- 80 เท่า (Fair และคณะ, 1948 และ Morris, 1966)

ดังนั้น สารละลายไฮโปคลอไรท์ pH ต่ำ จะมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อมากกว่าที่ pH สูง (Baker, 1959) pH เพิ่มขึ้น ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อลดลง แต่ถ้า pH ลดลง ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อจะเพิ่มขึ้น เนื่องจากการแตกตัวของ HOCl ขึ้นกับ pH ซึ่งมีผลต่อสมดุลของ HOCl และ OCl^- ในภาวะเป็นด่าง จะมี HOCl ปริมาณน้อย

จากการทดลองของ Charlton สารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น100 ppm pH 8.2 มีประสิทธิภาพในการเป็น sporicidal ต่อเชื้อ *Bacillus metiens* เท่ากับ สารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น1000 ppm pH 11.3 (Charlton และคณะ,1937) และเมื่อใช้สารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ 25 ppm ที่ pH 6, 7, 8, 9, 9.35, 10 และ12.86 ใช้เวลา 2.5, 3.6, 5, 19.5, 35.5, 131 และ 465 นาที ตามลำดับ สำหรับการออกฤทธิ์เป็น sporicidal ต่อเชื้อ *B. metiens* (Rudolph และคณะ,1941)

2. ผลของความเข้มข้น

การเพิ่มความเข้มข้นของ $AvCl_2$ จะทำให้ฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบในสภาวะเดียวกัน เช่น pH อุณหภูมิ จำนวนหรือชนิดของสารอินทรีย์ Mallman และคณะ (1932)

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

ทดลองโดยใช้สารละลายไฮโปคลอไรท์ที่ pH 9 พบว่า เมื่อเปลี่ยนความเข้มข้นของสารละลายเป็น 0.3, 0.6, 1.2 และ 2.0 ppm สามารถฆ่าเชื้อ *S.aureus* ได้สมบูรณ์แตกต่างกัน โดยที่ความเข้มข้น 0.6, 1.2 และ 2.0 ppm. ใช้เวลา 30, 10 และ 5 นาที ตามลำดับ ในขณะที่ความเข้มข้น 0.3 ppm. ไม่สามารถฆ่าเชื้อได้สมบูรณ์แม้ในเวลา 30 นาที

3. ผลของอุณหภูมิ

การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ จะทำให้ฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อของสารละลายไฮโปคลอไรท์เปลี่ยนแปลง เมื่อเพิ่มอุณหภูมิ จะเพิ่มฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ และการลดอุณหภูมิจะทำให้ฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อลดลง (Butterfield และคณะ, 1943) จากการทดลองของ Rudolph และคณะ พบว่า สารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 25 ppm มีค่า pH เท่ากับ 10 ที่อุณหภูมิ 20, 30, 35 และ 50 $^{\circ}C$ ใช้เวลาในการฆ่าเชื้อ 121, 65, 38.7 และ 9.3 นาที ตามลำดับ โดยอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นทุก 10 $^{\circ}C$ จะลดเวลาในการฆ่าเชื้อลง 60-65 % (Rudolph และคณะ,1941)

4. ผลของสารอินทรีย์

สารอินทรีย์ในสารละลายคลอรีน จะทำให้จำนวน $AvCl_2$ ลดลง มีผลต่อฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ สารอินทรีย์ต่างชนิดกันก็จะมีผลต่อน้ำยาฆ่าเชื้อต่างชนิด เช่น

- อุจจาระ พบว่า สารละลายไฮโปคลอไรท์เข้มข้น 130 ppm สามารถฆ่าเชื้อ *Samonella pallonum* ได้อย่างสมบูรณ์ แม้มีมูลไก่หรืออุจจาระปน 5% (Mc.Culloch,1945)

- สารที่ไม่มีไนโตรเจน เช่น แอลกอฮอล์ และ ไขมัน ทำให้จำนวนคลอรีนในสารละลายลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (Gueteras และคณะ,1934)

จะเห็นได้ว่าสารอินทรีย์มีผลลด $AvCl_2$ จริง แต่ผลในการฆ่าเชื้อมิได้เปลี่ยนแปลง เมื่อใช้น้ำยาที่เตรียมเสร็จใหม่ และใช้ในช่วงสั้นๆ

สารอินทรีย์ เช่น tyrosine, tryptophane, cysteine, egg albumin, peptone, body fluids, tissue, microbe, vegetable เป็นต้น เพราะจะเกิด chlorine demand โดยสารอินทรีย์เหล่านี้ ทำให้ $AvCl_2$ ลดลง(Shere,1948)

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

5. ผลของความกระด้าง

Ca^{2+} และ Mg^{2+} ในน้ำกระด้างไม่มีผลต่อประสิทธิภาพของคลอรีน และสารละลายไฮโปคลอไรท์ (Shere, 1948) สำหรับ inorganic substances เช่น Fe^{2+} , Mn^{2+}, NO^{2-} จะลดฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ เนื่องจากเป็น reducing substance ทำปฏิกิริยากับไฮโปคลอไรท์ ซึ่งเป็น oxidizing agent (Weidenkopf,1953)

6. ผลของ EDTA

EDTA ในทางการแพทย์ใช้เป็น chelating agent ในยาฉีด เพื่อเพิ่มความคงตัวของสารละลาย แต่พบว่า EDTA มีฤทธิ์เป็น antibacterial โดยเฉพาะต่อแกรมลบ (Russel และคณะ, 1967)

7. การดื้อของจุลชีพ

เชื้อแต่ละชนิดมีความต้านทานต่อการถูกทำลายต่างกัน แม้แต่เชื้อชนิดเดียวกันแต่ strain ต่างกัน ก็มีความต้านทานต่อการถูกทำลายต่างกัน แบคทีเรียที่อยู่ในรูป vegetative form จะทนและดื้อต่อคลอรีนน้อยกว่า spore form (Tonney และคณะ, 1936) ในส่วนของไวรัส, รา และสาหร่าย จะทนหรือดื้อต่อคลอรีนในสภาวะที่แตกต่างกันไป *Salmonella typhosa* ที่แยกออกมาจากที่ติดเชื้อโดยตรงหรือ specimen จะมีความต้านทานมากกว่า *S. typhosa* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร(Kapler และคณะ,1939)

8. การเติมสารอื่นๆ ลงในน้ำยาฆ่าเชื้อ

การเติม ammonia หรือ amino acid ทำให้ฤทธิ์ bactericidal ลดลง ส่วนการเติม iodine หรือ bromine ในปริมาณเล็กน้อย จะกระตุ้น bactericidal ของน้ำยาฆ่าเชื้อแคลเซียมไฮโปคลอไรท์

หมายเหตุ : Available Chlorine ($AvCl_2$) เป็นการวัด Oxidizing capacity และสมมูลกับปริมาณคลอรีน ในกรณีของไฮโปคลอไรท์ค่านี้จะบอกถึงปริมาณคลอรีนที่ใช้ในการเตรียมสารละลาย และค่านี้จะบอกถึงปริมาณคลอรีนที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

ตารางที่ 1 แสดงคุณสมบัติและการใช้น้ำยาฆ่าเชื้อ

ชนิดของน้ำยาฆ่าเชื้อในกลุ่ม Chlorine	ค่า Chlorine อิสระ (available chlorine) ใน 100 % ของ product	คุณสมบัติ	การใช้งาน
1. Sodium hypochlorite solution	5%,10%	-กัดกร่อนโลหะสูง -สลายตัวได้เร็ว ควรเตรียมหรือเจือจางก่อนใช้ และใช้วันต่อวัน -เลือกผลิตภัณฑ์ที่มีอายุไม่เกิน 4 เดือนนับแต่วันผลิต	-เข้มข้น 0.5 - 1% (5000 - 10000 ppm ของ available chlorine) ฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อน (Decontamination) ในเครื่องมือที่ผ่านการใช้กับผู้ป่วยมาแล้ว ใช้เวลา 30 นาที -เข้มข้น 0.01-0.1% (100 - 1000 ppm)ใช้ทำความสะอาด(Sanitation) พื้นผิวทั่วไป
2. ผงปูนคลอรีน (Calcium hypochlorite bleach powder)	35%	-เช่นเดียวกับ 1 -สลายตัวได้แม้เป็น Solid form -มีคราบขุ่นสีขาวตกตะกอนเมื่อละลายน้ำใช้ แต่ยังออกฤทธิ์ได้	- เช่นเดียวกับ 1

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชนิดของน้ำยาฆ่าเชื้อในกลุ่ม Chlorine	ค่า Chlorine อิสระ (available chlorine) ใน 100 % ของ product	คุณสมบัติ	การใช้งาน
3. Sodium dichoroisocyanurates (NaDCC) 2.5 gm./tab., 0.5gm./tab.,	60%	-เป็นชนิดเม็ด ซึ่งมีการสลายตัว เมื่อทิ้งไว้นานๆ -กัดกร่อนโลหะน้อยกว่าชนิดน้ำ -เมื่อละลายน้ำแล้วจะมีความคงตัวของสารที่ฆ่าเชื้อได้ดีกว่าชนิดน้ำ -ฤทธิ์ถูกยับยั้งด้วยสารอินทรีย์น้อยกว่า กัดกร่อนโลหะน้อยกว่าชนิดน้ำ -เก็บในสภาพกันความชื้น	-เช่นเดียวกับข้อ1 โดยใช้ 2.5 กรัม / ลิตร ได้1500 ppm ของ available chlorine เพราะฉะนั้นต้องใช้ 7 เม็ด / ลิตร เพื่อให้ได้ 10500 ppm ของ available chlorine
4. Virkon ® เป็นส่วนผสมของ NaCl oxidizing agent,inorganic buffer, สารป้องกันสนิมจับ, Chlorine และสาร Surfactant	4. 1% ของ Virkon® ให้ 10000 ppm ของ available chlorine	-เช่นเดียวกับข้อ 3 -ราคาแพงกว่าชนิดน้ำมาก ไม่ใช้เมื่อเปลี่ยนสีหรือผงจับกันเป็นก้อน	- เช่นเดียวกับข้อ 1 บริษัทแนะนำให้ใช้ 1% ของ Virkon ® ในการแช่ฆ่าเชื้อ

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

น้ำยาฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl)

คุณสมบัติของน้ำยาฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (Andrew และคณะ,1904)

$$2NaOH + Cl_2 \longrightarrow NaOCl + NaCl + NaCl + H_2O \quad .....(1)$$

จากสมการโซเดียมไฮโปคลอไรท์จะสมมูลกับคลอรีน 2 อะตอม เมื่อ NaOCl ละลายน้ำจะให้ HOCl ออกมาซึ่งมีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อดังสมการต่อไปนี้

$$NaOCl + H_2O \longrightarrow Na^+ + H_2O + OCl \quad .....(2)$$

$$NaOCl + H_2O \longrightarrow NaOH + HOCl \quad .....(3)$$

$$HOCl \rightleftharpoons H^+ + OCl \quad .....(4)$$

$$OCl + H_2O \longrightarrow HOCl + OH \quad .....(5)$$

กลไกการออกฤทธิ์

การออกฤทธิ์ของสารละลายไฮโปคลอไรท์ในรูป aqueous solution พบว่าใช้ปริมาณเพียงเล็กน้อย สามารถออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้อย่างรวดเร็ว เมื่อโซเดียมไฮโปคลอไรท์ละลายน้ำจะให้ hypochlorous acid ออกมา โดยจะขึ้นอยู่กับค่า pH และความสมดุลระหว่าง HOCl กับ OCl ซึ่ง HOCl มีฤทธิ์เป็น germicidal และพบว่าเมื่อค่า pH เพิ่มขึ้น ฤทธิ์นี้จะลดลง แสดงว่า HOCl มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อมากกว่า OCl และจากการศึกษาของ Chang ปี ค.ศ.1944 พบว่า OCl ไม่สามารถ penetrate เข้าไปใน cyst ของ *E. histolytica* ได้ แสดงว่าไม่มีฤทธิ์ cysticidal แต่จากสมการที่ 4 จะเห็นว่า OCl^- รวมกับ H^+ เกิดปฏิกิริยาย้อนกลับได้ HOCl ซึ่งมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้

ประโยชน์

ความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรท์จะบอกเป็นเปอร์เซ็นต์ หรือ ppm ของ available chlorine 1% NaOCl เท่ากับ 10,000 ppm available chlorine

0.1% Sodium hypochlorite สามารถนำมาใช้ควบคุมสภาวะแวดล้อม ทำลายเชื้อให้มีจำนวนน้อยลง

0.5% Sodium hypochlorite (Dakin's solutin) ใช้เป็น antiseptic ในบาดแผลสกปรก เพื่อละลายและระดับกลิ่นเนื้อเยื่อที่ตายแล้ว ถ้าระคายเคืองต่อเนื้อเยื่อมากอาจเจือจางเป็น 1/3

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

1% Sodium hypochlorite สามารถทำลายไวรัสและเชื้อโรคอื่นๆ ได้ในเครื่องมือและเครื่องใช้ที่ปนเปื้อนสิ่งขับถ่ายของผู้ป่วยโดยแช่นาน 30 นาที หรือใช้เช็ดพื้นผิวที่อาจปนเปื้อนด้วยเชื้อนี้

น้ำยาฆ่าเชื้อ Calcium hypochlorite ($Ca(OCl)_2$)

คุณสมบัติของน้ำยาฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (Andrew และคณะ,1904)

$$Cl_2 + H_2O \longrightarrow HOCl + H^+ + Cl^- \quad \text{..... (1)}$$

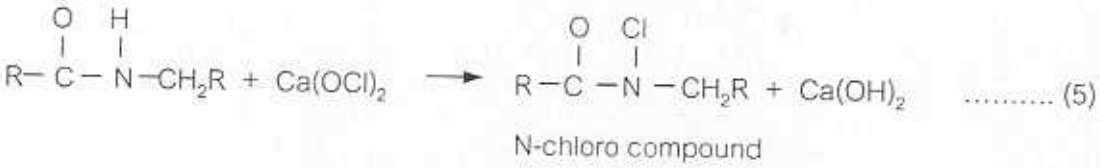
$$Ca(OCl)_2 + H_2O \longrightarrow Ca^{2+} + H_2O + 2OCl^- \quad \text{..... (2)}$$

$$Ca(OCl)_2 + 2H_2O \longrightarrow Ca(OH)_2 + 2HOCl \quad \text{..... (3)}$$

$$HOCl \longrightarrow H^+ + OCl^- \quad \text{..... (4)}$$

กลไกการออกฤทธิ์

การออกฤทธิ์ของสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ในรูป aqueous solution เนื่องจาก $AvCl_2$ ทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่ผนังเซลล์แบคทีเรีย เกิด N-chloro compound เข้าไปออกซิไดส์ส่วนประกอบภายในเซลล์แบคทีเรีย ทำให้เชื้อตาย $AvCl_2$ ที่ออกฤทธิ์มากที่สุด คือ HOCl และ OCl^- โดย HOCl มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อมากกว่า OCl^-



..... (5)

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

ตารางที่ 2 ความแตกต่างของสารละลายไฮโปคลอไรท์ในรูปเกลือโซเดียมและแคลเซียม

คุณสมบัติ	เกลือแคลเซียม	เกลือโซเดียม
1. รูปแบบผลิตภัณฑ์	ผง (powder)	ผง (powder) และสารละลาย
2. เปอร์เซนต์ available chlorine	30%	14%
3. จำนวนอะตอมที่ทำปฏิกิริยาไฮโปคลอไรท์ออออน (OCl^-) 1 โมเลกุล	2 อะตอม	1 อะตอม
4. ฤทธิ์ในการกัดกร่อนโลหะ	มากกว่า	น้อยกว่า
5. ความคงตัว	มากกว่า	น้อยกว่า
6. ราคา	แพงกว่า	ถูกกว่า

คุณสมบัติของเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ

Staphylococcus aureus

เป็นเชื้อในกลุ่มสแตฟฟิโลคอคคัส (Staphylococcus,เอกพจน์ ;staphylococci ;พหูพจน์) อยู่ใน Family Micrococcaceae โดยปกติมักพบเชื้อนี้บริเวณผิวหนังและเยื่อเมือกบริเวณลำคอส่วน oropharynx เชื้อสแตฟฟิโลคอคคัสที่พบว่าทำให้เกิดโรคในคน ได้แก่ *S.aureus*, *S.epidermidis*, *S.saprophyticus* ซึ่งเชื้อทั้ง 3 ชนิดนี้พบว่า *S.aureus* เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคบ่อยที่สุด

รูปร่างและคุณสมบัติทั่วไป

เป็นแบคทีเรียรูปร่างกลม เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.7-1.2 μm gram positive ติดสีแกรมบวก มักอยู่กันเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น ผลิต enzyme catalase การแบ่งตัวแบ่งได้ทั้งตามยาวและตามขวางเรียงตัวจับกันเป็นคู่ (pairs) หรือ คู่สี่ (tetrad) บางทีอยู่เป็นกลุ่มเรียกว่า staphyle ถ้าเพาะเลี้ยงเชื้อไปนานๆ การย้อมสี gram อาจเปลี่ยนไปเพราะขาดคุณสมบัติในการเก็บ crytal violet ไว้

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

ในผนังเซลล์ได้ เจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดา อุณหภูมิ 37°C pH 7.4 ทั้งในภาวะที่มีออกซิเจน และมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย pigment ของเชื้อ *S.aureus* เป็นสารพวกคาโรทีนอยด์ ซึ่งเชื้อสร้างที่อุณหภูมิ 37°C เมื่อเลี้ยงนาน 18 -24 ชั่วโมง สีของ pigment จะเข้มขึ้นเมื่อเติม glycerol monophosphate หรือ bromoacetate แต่เชื้อสร้าง pigment ได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 20°C ในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์สูงกว่าปกติ ไม่สร้างpigmentในภาวะที่ไร้ออกซิเจน หรือในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว หากเจริญบนวุ้นโคโลนีจะมีลักษณะกลมนูนเป็นมันขนาด1 - 2 มม. มีสีต่างๆกันเช่น *S.aureus* มีสีเลืองทอง *S.epidermidis* บนอาหารเลี้ยงเชื้อเสริมเลือด(blood agar) จะเห็นเป็นวงใสรอบโคโลนี และ *S.saprophyticus* มีโคโลนีสีขาว

การเกิดพยาธิสภาพ

การเกิดแผลจาก *S.aureus* มีลักษณะเป็นฝี หนอง โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าเชื้อจุลินทรีย์สามารถบุกรุกเข้าไปยังเนื้อเยื่อที่อยู่ลึกๆ ได้ ทำให้เชื้อมีโอกาสเข้าสู่กระแสโลหิต เกิดปรากฏการณ์ที่เรียกว่า bacteremia ซึ่งจะจำจุลินทรีย์ไปก่อโรคติดเชื้อตามอวัยวะภายในต่างๆ ทั่วร่างกายโดยง่ายปกติแล้วเชื้อมักอยู่ตามเยื่อเมือกทั่วไป ผิวหนัง จมูก ช่องปากต่อกับคอหอย ลำไส้ของทารกแรกเกิดจนเป็นผู้ใหญ่

โรคติดเชื้อจาก *S.aureus* ส่วนเกิดจากที่มีแผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวก trauma จากการผ่าตัด หรือในผู้ป่วยที่เป็นโรคเรื้อรัง เช่น เบาหวาน มะเร็ง ตับแข็ง เป็นต้น ความรุนแรงในการก่อโรคเกิดจากการผลิต enzyme coaggulase ซึ่งขับออกมาโดยเชื้อนี้จะมีคุณสมบัติทำให้เกิดการแข็งตัวของ plasma ซึ่งจะขัดขวางการทำงานของ phagocytic cell และไปเกาะอยู่ตามผิวหน้าของเซลล์แบคทีเรียทำให้เซลล์มีคุณสมบัติ antiphagocytosis เพิ่มมากขึ้น

ความทนทาน

โดยทั่วไปสแตฟฟิโลคอคคัส (Staphylococcus) ทนทานต่อสิ่งแวดล้อมต่างๆ ได้ดี เช่น สามารถทนทานต่อความร้อนสูงถึง 60°C ได้เป็นเวลา 30 นาที และมีชีวิตอยู่ในที่เย็น 4°C ได้เป็นเวลานานหลายเดือน นอกจากนี้ยังทนต่อ phenol และ mercuricchloride มากกว่าแบคทีเรียอื่นๆ เชื้อมีชีวิตอยู่รอดในน้ำเกลือที่มีความเข้มข้นสูง 6.5 % เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือ 7.5 % ได้ นอกจากนี้ สแตฟฟิโลคอคคัส (Staphylococcus) บางสายพันธุ์สามารถสร้างเอนไซม์ penicillinase ซึ่งทำให้เชื้อดื้อต่อยาเพนิซิลลินได้

Ubon Rajathanee university

Pseudomonas aeruginosa

เป็นเชื้อในตระกูล Pseudomonas อยู่ใน Family Pseudomonadaceae ซึ่งมีอยู่ 300 species แต่มีเพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่ก่อโรคในคน ซึ่งในบรรดาเชื้อเหล่านี้พบว่า *Ps. aeruginosa* มีความสำคัญอย่างมาก เพราะเป็นสาเหตุของการเกิดโรคได้มากที่สุดเมื่อเทียบกับบรรดาเชื้อในตระกูลเดียวกัน หรือเปรียบเทียบกับ bacilli แกรมลบพวกไม่เฟอร์เมนท์น้ำตาลอื่นๆ กล่าวคือ ประมาณเศษสองส่วนสามของเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาล ที่เกิดจากเชื้อฉวยโอกาส (opportunist) ชนิด bacilli แกรมลบพวกไม่เฟอร์เมนท์น้ำตาล เป็น *Ps. aeruginosa*

รูปร่างและคุณสมบัติทั่วไป

Ps. aeruginosa เป็น gram negative rod มีความยาวประมาณ 2 ไมโครเมตร มักอยู่เป็นคู่หรือต่อกันเป็นลูกโซ่สั้นๆ มี polar flagella ประมาณ 1 - 3 เส้น จึงทำให้เคลื่อนที่ได้ บางสายพันธุ์อาจพบ pili ในขณะที่บางสายพันธุ์อาจพบ capsule เชื้อชนิดนี้เป็น oxidase positive

Ps. aeruginosa สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วๆ ไปในห้องปฏิบัติการ เจริญได้ดีที่ 30°C - 37°C ต้องการออกซิเจนเพื่อการเจริญ อย่างไรก็ดี ได้เคยมีผู้พบบางสายพันธุ์ที่สามารถเจริญได้ในสภาวะไร้ออกซิเจน อีกทั้งสามารถใช้แหล่งของคาร์บอนชนิดต่างๆได้มากมาย 30-42°C และทนต่ออาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นด่างสูง สายพันธุ์ที่มาจากสิ่งส่งตรวจจะให้ hemolysis บน blood agar *Ps. aeruginosa* ผลิต pigment ได้ที่สำคัญ คือ pyocyanin (สีน้ำเงินแกมเขียว) และ fluorescein (สีเหลืองแกมเขียว) เชื้อสายพันธุ์เดียวกันอาจให้ pigment ชนิดเดียว หรือ สองชนิด อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตคือ 35°C เชื้อชนิดนี้มีความสามารถขึ้นในที่ชื้นแฉะ แม้มีสารอยู่เพียงเล็กน้อย เช่น ในยาตา น้ำยาฆ่าเชื้อ สบู่ รวมทั้งน้ำประปา

การเกิดพยาธิสภาพ

สำหรับโรคที่เกิดจาก *Ps. aeruginosa* ส่วนใหญ่มีสาเหตุสืบเนื่องมาจากสารพิษที่ปล่อยออกมา ซึ่งก่อให้เกิดพยาธิสภาพของโรคลักษณะต่างๆ กันได้ อาทิ exotoxins สามารถทำให้เกิด leukopenia, acidosis, circulatory collapse ตลอดจน liver necrosis, pulmonary edema และ tubular necrosis ของไต ส่วน enterotoxin ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วง ขณะที่ proteolytic enzyme สามารถทำลาย cornea ส่วน phospholipase จะทำลายส่วนผิวของเยื่อหุ้มปอดที่สามารถนำไปสู่สภาวะ atelectasis ได้

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

สภาวะผู้ป่วยในโรงพยาบาลที่พบว่าติดเชื้อชนิดนี้ได้ง่ายคือ cystic fibrosis แผลไฟไหม้ มะเร็ง รวมทั้งผู้ป่วยที่ต้องใช้ท่อปัสสาวะ การติดเชื้อในสภาวะดังกล่าวของผู้ป่วยอาจเป็นผลให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือด (bacteremia) หรือเป็นนิวโมเนีย หากสภาวะการติดเชื้อ *Ps. aeruginosa* ในผู้ป่วยเกิดเป็น bacteremia และ นิวโมเนีย อัตราเสี่ยงต่อการตายสูงมากถึง 60 -70 % นอกจากนี้เชื้อ *Ps. aeruginosa* ยังเป็นสาเหตุทั่วไปของการเกิด eternal otitis ซึ่งบางคนกล่าวว่า เป็นหูของนักว่ายน้ำ(swimmer's ear) การติดเชื้อ Pseudomonas ที่ตาทำให้เกิดตาอักเสบและอาจมีผลทำให้ตาบอด นอกจากนี้ เชื้อดังกล่าวยังสามารถเป็นสาเหตุของโรคอุจจาระร่วง เยื่อหุ้มสมองอักเสบ รวมทั้ง subacute endocarditis

ความทนทาน

Ps.aeruginosa ค่อนข้างทนต่อการทำลายด้วยสารเคมีมากกว่า vegetative bacteria โดยเฉพาะในที่มีความชื้น บางครั้งแยกเชื้อได้จากสารเคมีจำพวก quaternary ammonium compound และ จากสบู่ที่มี hexachlorophene แต่สารเคมี phenolic และ beta-glutaraldehyde จะใช้ได้ผลดี ในน้ำเดือดก็ฆ่าเชื้อได้

Escherichia coli

Escherichia coli เป็นแบคทีเรียที่สำคัญที่สุดใน genus นี้ คุณสมบัติทางชีวเคมีที่สำคัญ คือ ferment lactose เคลื่อนที่ได้ ferment glucose ให้กรดและก๊าซ ปกติจะอยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่น พบเป็นจำนวนมากในการตรวจอุจจาระ ไม่ทำให้เกิดโรค แต่ฉวยโอกาสได้ในกรณีที่ภูมิคุ้มกันบกพร่อง ดังนั้นจึงเป็นปัญหาสำคัญในการติดเชื้อที่โรงพยาบาล ซึ่งโรคที่เกิดแบ่งออกเป็น 3 ชนิดใหญ่ๆ คือ การติดเชื้อที่ทางเดินปัสสาวะ เยื่อหุ้มสมองอักเสบในทารก และท้องร่วง นอกเหนือจากการก่อโรค *E. coli* ยังมีความสำคัญในการตรวจเชื้อเพื่อควบคุมคุณภาพ เพราะเป็นตัวบ่งชี้ (indicator) ว่าอาจมีสิ่งปฏิกูลติดมากับผลิตภัณฑ์หรือไม่ *E. coli* เป็นแม่บทที่สำคัญในการศึกษาค้นคว้าทางวิทยาศาสตร์มากมาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งทางชีวเคมีและทางพันธุวิศวกรรมศาสตร์

ลักษณะรูปร่าง

E.coli เป็นเชื้อแบคทีเรีย gram negative รูปแท่ง ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ด้วย peritrichous flagella มี pili 2 ชนิดคือ sex pili และ adhesive fimbria บางเชื้อสายมี capsule

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

การเจริญเติบโต

E.coli จัดเป็น facultative bacteria เจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดา เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 10-40°C แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 37°C ลักษณะ colony บน different media เช่น Mac conkey agar จะมีสีชมพูแดง สามารถสลายน้ำตาลได้หลายชนิดให้กรดและก๊าซ

ความทนทาน

E.coli ทนต่อสภาพาแวดล้อมต่างๆ ได้ดี เช่น สามารถมีชีวิตอยู่ตามเสื้อผ้าแห้ง และฝุ่นละอองได้หลายวัน อยู่ในน้ำได้หลายสัปดาห์ ถูกทำลายเมื่อต้มที่อุณหภูมิ 60°C 30 นาที

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย ประกอบด้วย

pH meter (Mettler, Delta 340, Switzerland)

Top-load balance (Mettler, Mod. PM 4000, Switzerland)

เครื่องชั่งวิเคราะห์ (Mettler, AT 200, Switzerland)

โถแก้วดูดความชื้น (Glasswork "Mobilex", No.2 64147 diameter 30 cm.,Germany)

Autoclave (Kokusan Enshinki , Mod. H-88L , Japan)

Shaking water bath (Heto , Mod. SBD 50, Denmark)

UV Spectrophotometer (Spectronic, Genesys 2, USA)

Incubator (Heraeus, B 6760, Germany)

Vortex mixer (Thermolyne,Type 37600 mixer, USA)

Magnetic stirrer (Thermolyne, mod. SP47230-26 mirale, USA)

Viable count (Stuart, mod. Sc 5, England)

Hot air oven (Heraeus, T 6200, Germany)

Laminar air flow (Holten , Mod. HBB 2460 , Denmark)

นอกจากนี้ อุปกรณ์ที่ใช้อื่นๆ เป็นอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ทั่วไป ได้แก่ Beaker, Burette, Pipette, Micropipette, Glass-stoppered flask, Sterring rod, Volumetric flask, Stainless steel cylinder cup, Test-tube, ขวดแก้วสีชา เป็นต้น

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย ประกอบด้วย

Calcium hypochlorite ($Ca(HClO)_2$) 65 % (บ.เทียนหยวน มณฑลเซี่ยงไฮ้, จีน)

Sodium hypochlorite (NaHClO) (Merck KGaA, Germany)

Phenol (BDH , England)

Tryptic soy broth (TSB) (Merck KGaA , Germany)

Nutrient broth (NB) (Merck KGaA , Germany)

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

Nutrient agar (NA) (Merck KGaA , Germany)

Acetic acid glacial (CH_3COOH) (BDH , England)

Potassium iodide GR (KI) (Merck KGaA, Germany)

Sodium carbonate anhydrous RPE (Na_2CO_3) (Famitalia Carlo- erba , Italy)

Starch soluble (Merck KGaA, Germany)

Hydrochloric acid (HCl) (Merck KGaA, Germany)

Primary standard sodium thiosulfate ($Na_2S_2O_3.5H_2O$) (J.T.Baker, USA)

Primary standard potassium dicromate ($K_2Cr_2O_7$) (Fluka chemical, Switzerland)

Sodium hydrogen carbonate (Na_2HCO_3) (Famitalia Carlo - erba , Italy)

สารเคมีอื่น ๆ นอกเหนือจากนี้ เป็นสารเคมีที่ใช้ทั่วไปในห้องทดลอง

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัย ประกอบด้วย

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Escherichia coli ATCC 25922

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

เชื้อเหล่านี้ได้รับความอนุเคราะห์จาก ห้องปฏิบัติการเภสัชจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี และทำการเพาะเลี้ยงเชื้อรุ่นต่อ ๆ ไป (subculture) ทุก ๆ 2 สัปดาห์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ คือ nutrient agar

การเตรียมสารละลายไฮโปคลอไรท์

เป็นการเตรียมสารละลายตั้งต้นของไฮโปคลอไรท์ (stock solutions of hypochlorites)

1. **โซเดียมไฮโปคลอไรท์** (Sodium hypochlorite)

เตรียมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ให้ได้ความเข้มข้น 5,000 ppm (0.5% available chlorine) จำนวน 2 ลิตร โดยเจือจางสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่มี available chlorine ($AvCl_2$) 10% ด้วย sterile water for injection ที่เตรียมขึ้นใหม่ ๆ เก็บสารละลายที่เตรียมได้ในขวดแก้วสีชา ปิดฝาสนิท ที่อุณหภูมิห้อง บันทึกอุณหภูมิโดยสม่ำเสมอ

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

2. แคลเซียมไฮโปคลอไรท์ (Calcium hypochlorite)

เตรียมสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ให้ได้ความเข้มข้น 5,000 ppm (0.5% available chlorine) จำนวน 2 ลิตร โดยการละลายผงแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ (ประกอบด้วย available chlorine : 65 % $^{w}/_{w}$) จำนวน 15.38 กรัม ใน sterile water for injection 2 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ แล้วนำไปกรองผ่านกระดาษกรองจนได้สารละลายใส เก็บในขวดแก้วสีชา ปิดฝาสนิทที่อุณหภูมิห้อง บันทึกอุณหภูมิโดยสม่ำเสมอ

การวิเคราะห์เพื่อประเมินประสิทธิภาพสารละลายไฮโปคลอไรท์

นำสารละลายตั้งต้นโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ที่เตรียมได้ข้างต้นไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (25 ± 3oC) โดยปิดฝาภาชนะให้สนิท และนำมาวิเคราะห์อย่างต่อเนื่องที่เวลาต่าง ๆ กัน

การวิเคราะห์เพื่อประเมินประสิทธิภาพของสารละลายไฮโปคลอไรท์ แบ่งการวิเคราะห์เป็น 2 วิธี คือ

1. การทดสอบทางเคมี
2. การทดสอบทางจุลชีววิทยา

การทดสอบทางเคมี

1. การหาปริมาณ Available Chlorine

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณ available chlorine ที่มีอยู่ในสารละลายไฮโปคลอไรท์ โดยวิธี Iodometric titration (A.O.A.C) ประกอบด้วยวิธีการ 2 ขั้นตอน ดังนี้

1.1 วิธีการ standardization หาความเข้มข้นของ Sodium thiosulfate

อบ primary standard potassium dichromate ที่อุณหภูมิ 120 oC นาน 4 ชั่วโมง แล้วชั่งมาประมาณ 210 มิลลิกรัม (บันทึกน้ำหนักอย่างแม่นยำ) ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร ใน glass - stoppered flask ขนาด 500 มิลลิลิตร เขย่าจนละลายหมด เติม potassium iodide 3.0 กรัม, sodium bicarbonate 2.0 กรัม และ hydrochloric acid 5

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็ว เขย่าให้เข้ากันจนหมด วางไว้ในที่มืดเป็นเวลานาน 10 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาโดยสมบูรณ์ กลั้วจุกแก้วและผนังภายในของ flask ด้วยน้ำกลั่น และไตเตรทเพื่อหาปริมาณ iodine อิสระที่ปลดปล่อยออกมาจากปฏิกิริยา ด้วยสารละลาย sodium thiosulfate ที่ต้องการ standardize จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองจาง ๆ เติม starch TS 3.0 มิลลิลิตร สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้ม ให้ทำการไตเตรทต่อจนถึงจุดที่สีน้ำเงินเปลี่ยนไปเป็นใสถือเป็น จุดยุติ ทำ blank เพื่อหาปริมาตรของสารละลาย sodium thiosulfate ที่ใช้สมดุลกับ potassium dichromate

** แต่ละมิลลิลิตรของ 0.1 N sodium thiosulfate สมมูลกับ 4.903 มิลลิกรัม ของ potassium dichromate

1.2 วิธีวิเคราะห์หา Available chlorine ในสารละลายไฮโปคลอไรท์

ปิเปตสารละลายไฮโปคลอไรท์ 3.0 มิลลิลิตร ใส่ใน glass-stoppered flask ชั่งน้ำหนักอย่างแม่นยำ เจือจางด้วยน้ำ 50 มิลลิลิตร เติม potassium iodide 2.0 กรัม , 6 N acetic acid 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ไตเตรทหาปริมาณ iodine อิสระด้วย 0.1 N $Na_2S_2O_3$ จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองจาง ๆ เติม starch TS 3 มิลลิลิตร จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้ม ไตเตรทต่อไปจนถึงจุดที่สีน้ำเงินหมดไป ถือเป็นจุดยุติ

2. การหาค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ทำการวิเคราะห์หาความเป็นกรดด่าง (pH) ของสารละลายไฮโปคลอไรท์ โดยใช้ pH meter เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานก่อนใช้งาน

การทดสอบทางจุลชีววิทยา

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารชนิดแข็ง

1.1 nutrient agar : ชั่งผง nutrient agar มา 7.5 กรัม ละลายน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร นำเข้า autoclave เพื่อทำให้ปราศจากเชื้อ โดยใช้อุณหภูมิ 121 oC นาน 20 นาที ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นำมาเทลงจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปล่อยทิ้งไว้ให้แข็ง

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

1.2 Tryptic soy agar (TSA) :ชั่งผง tryptic soy agar มา 47 กรัม ละลายน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร นำเข้า autoclave เพื่อทำให้ปราศจากเชื้อ โดยใช้อุณหภูมิ 121 °C นาน 20 นาที ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นำมาเทลงจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปล่อยทิ้งไว้ให้แข็ง

ถ้าต้องการเตรียม เป็น slant หลังจากวุ้นละลายหมด นำไปใส่ในหลอดทดลอง จำนวน 10 มิลลิลิตร ปิดฝาเกลียว นำเข้า autoclave เพื่อทำให้ปราศจากเชื้อ โดยใช้อุณหภูมิ 121 °C นาน 20 นาที ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เอียงหลอดทดลองประมาณ 45 องศา ให้หน้าวุ้นเอียงไปตามความยาวของหลอด ใช้สำหรับ subculture เชื้อจุลินทรีย์

2. อาหารชนิดเหลว

2.1 nutrient broth : ชั่งผง nutrient broth มา 4 กรัม ละลายน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร นำเข้า autoclave เพื่อทำให้ปราศจากเชื้อ โดยใช้อุณหภูมิ 121 °C นาน 20 นาที ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นำมาใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 25x125 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว บรรจุหลอดละ 10 มิลลิลิตร

2.2 Tryptic soy broth (TSB) :ชั่งผง tryptic soy broth มา 30 กรัม ละลายน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร บรรจุลงในหลอดทดลอง หลอดละ 4.5 มิลลิลิตร นำเข้า autoclave เพื่อทำให้ปราศจากเชื้อ โดยใช้อุณหภูมิ 121 °C นาน 20 นาที ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว

การเตรียมเชื้อ

เชื้อจุลินทรีที่ใช้ทดสอบ

Staphylococus aureus	ATCC No. 25927
Eschericchia coli	ATCC No. 25922
Pseudomonas aeruginosa	ATCC No. 27853

เพาะเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเหลว โดยใช้ sterile loop แตะเชื้อที่เตรียมไว้ ลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ NB 10 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37°C ประมาณ 18 - 24 ชั่วโมง

เมื่อทำการทดลอง ให้นำเชื้อที่เพาะบ่ม มาทำให้เจือจางจนได้ความเข้มข้น 10^{9} CFU/ml (โดยคำนวณจาก correlation graph ระหว่าง light transmittance กับ number of colony on plate count ในภาคผนวก ข)

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

Use-dilution method

1. การเตรียมสารละลาย phenol สำหรับทดสอบ

เตรียม 5% phenol solution โดยใช้ liquified phenol ละลายในน้ำกลั่นเป็น phenol stock solution จากนั้นนำ phenol stock solution มาเจือจางเป็น dilution 1:70 โดยใช้น้ำกลั่นซึ่งได้มาจากค่า phenol coefficient 50 คูณด้วย 20 ตามวิธีการที่ระบุไว้ใน A.O.A.C. method บรรจุสารละลายสำหรับทดสอบที่เตรียมได้นี้ ลงในหลอดทดลองขนาด 25x125 มิลลิเมตร หลอดละ 10 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 20 °C

2. การเตรียม carrier โดยใช้ stainless-steel cylinder cup

ทำการเพาะเชื้อที่ใช้ทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวจำนวน 50 มิลลิลิตร บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำ sterile stainless-steel cylinder cup จำนวน 20 อัน มาแช่ในเชื้อที่เพาะเลี้ยงไว้แล้วดังกล่าว แช่ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที ใช้ sterile forcep นำ cup ที่แช่แล้วออกมาซับแห้งบนกระดาษกรองที่ทำให้ปลอดเชื้อในจานเพาะเชื้อ โดยวางในลักษณะตั้งตรง ปิดฝาจานเพาะเชื้อ นำเข้าตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เชื้อที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวนำไปทดสอบความทนทานต่อ phenol โดย phenol coefficient test (วิธีการทดสอบอยู่ในภาคผนวก ค)

3. การทดสอบความทนทานของเชื้อทดสอบต่อ phenol โดย phenol coefficient test

เติมเชื้อที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (จากข้อ 2) ลงในสารละลาย phenol (จากข้อ 1) 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เชื้อกระจายเข้ากันในสารละลาย หลังจากเติมเชื้อแล้วเป็นเวลา 5,10,15 นาที ให้สุ่มน้ำยา 1 loop เพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยสังเกตความขุ่น ถ้าขุ่นบันทึกเป็น + (มีเชื้อ) ถ้าไม่ขุ่นบันทึกเป็น - (ไม่มีเชื้อ)

4. การทดสอบสารละลายไฮโปคลอไรท์

นำ carrier ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายไฮโปคลอไรท์ (หลอดละ 10 มิลลิลิตร) ใส่ carrier หลอดละ 1 อัน จับเวลา เมื่อครบ 10 นาที นำ carrier ออกจากสารละลายมาบ่มเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว โดยให้มีสารละลายไฮโปคลอไรท์เหลือค้างบน carrier น้อยที่สุด นำอาหารเลี้ยงเชื้อพร้อม carrier ไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ทำการทดสอบสารละลายละ 10 ครั้ง

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

Broth-dilution method

ใส่น้ำยาฆ่าเชื้อแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เจือจางแล้ว หลอดละ 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB 4.5 มิลลิลิตร (ทำ dilution ละ 3 หลอด) เติมเชื้อใส่ในหลอดทดลองข้างต้น หลอดละ 0.5 ml นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยสังเกตความขุ่น ถ้าขุ่นบันทึกเป็น + (มีเชื้อ) ถ้าไม่ขุ่นบันทึกเป็น - (ไม่มีเชื้อ) หลอดแรกที่ไม่มีเชื้อขึ้น คือ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (Minimal Inhibitory Concentration) (MIC)

วิธีการทดลอง

การวิจัยนี้แบ่งการทดลองเป็น 2 ตอน คือ

ตอนที่ 1 **การประเมินประสิทธิภาพของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 5,000 ppm (0.5%) เมื่อเก็บที่เวลาต่างๆ กัน**

เป็นการทดสอบเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 5,000 ppm (0.5%) เมื่อเก็บที่เวลาต่าง ๆ กัน นาน 8 สัปดาห์ โดยวิเคราะห์อย่างต่อเนื่องที่สัปดาห์ที่ 0, 1, 2, 4, 6, 8 แบ่งการทดสอบเป็น

1.1 การทดสอบทางเคมี

1.1.1 หาปริมาณ available chlorine

1.1.2 หาค่าความเป็นกรด-ด่าง

1.2 การทดสอบทางจุลชีววิทยา ด้วยวิธี use-dilution method

ตอนที่ 2 **การประเมินประสิทธิภาพของสารละลายเจือจางแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ เมื่อเก็บที่เวลาต่าง ๆ กัน เป็นเวลา 1 เดือน**

เป็นการทดสอบเพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารละลาย 0.5% แคลเซียมไฮโปคลอไรท์ เมื่อนำมาเจือจางแบบ 2 เท่า ด้วยอัตราส่วนตั้งแต่ 1:1 ถึง 1:258 และเก็บที่เวลาต่าง ๆ กัน นาน 1 เดือน โดยวิเคราะห์อย่างต่อเนื่องในวันที่ 0, 3, 7, 17, 24 และ 31 แบ่งการทดสอบเป็น

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

2.1 การทดสอบทางเคมี

2.1.1 หาปริมาณ available chlorine

2.1.2 หาค่าความเป็นกรด-ด่าง

2.2 การทดสอบทางจุลชีววิทยา ด้วยวิธี broth-dilution method

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

บทที่ 4
ผลการทดลอง

ตอนที่ 1 **การประเมินประสิทธิภาพของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 0.5% หรือ 5,000 ppm ที่เก็บที่เวลาต่าง ๆ กัน**

1.1 การทดสอบทางเคมี

การหาปริมาณ available chlorine

การทดลองเตรียมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ จำนวนอย่างละ 2 ชุดการทดลอง (lot) ที่ความเข้มข้น 0.5% หรือ 5,000 ppm เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ($25\pm3^{\circ}C$) ระยะเวลาต่าง ๆ นาน 8 สัปดาห์ นำมาวิเคราะห์หาปริมาณ available chlorine อย่างต่อเนื่องในสัปดาห์ที่ 0, 1, 2, 4, 6 และ 8 ได้ผลตามตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ปริมาณ available chlorine ($AvCl_2$)ของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) และสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ $Ca(OCl)_2$ เมื่อเก็บที่เวลาต่าง ๆ นาน 8 สัปดาห์

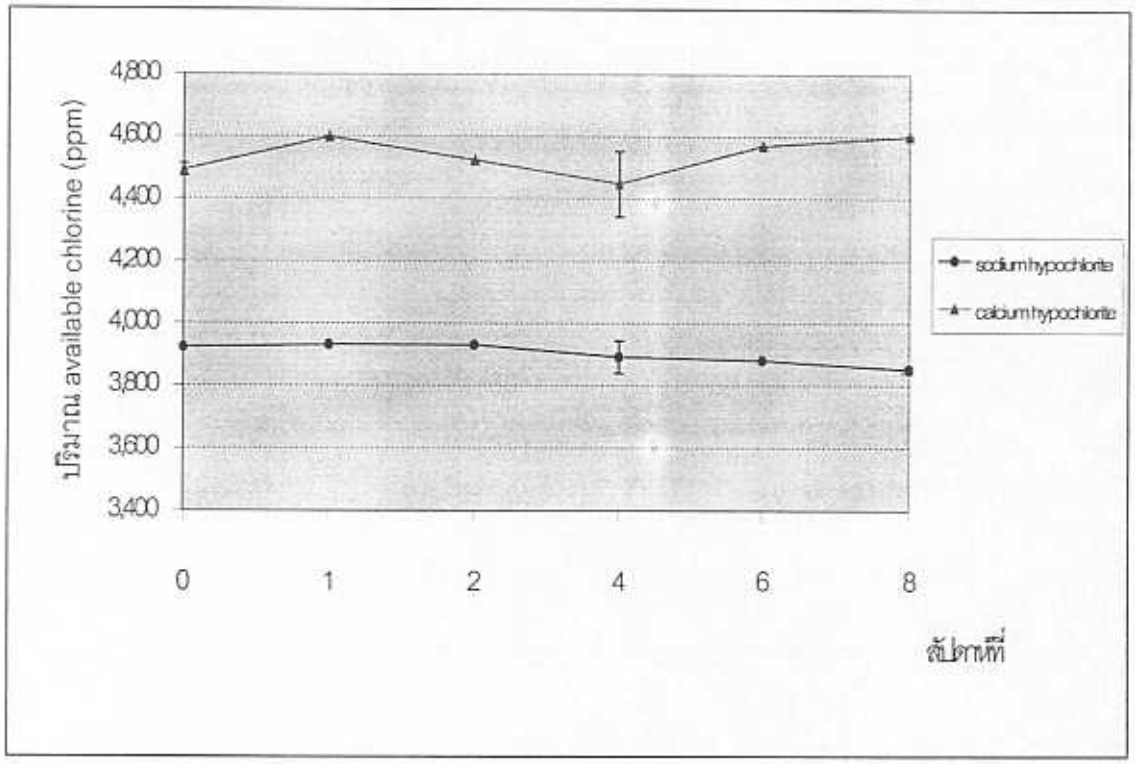
สัปดาห์ที่	อุณหภูมิขณะทดลอง (°C)	ปริมาณ $AvCl_2$ ของ NaOCl (ppm)				ปริมาณ $AvCl_2$ ของ $Ca(OCl)_2$ (ppm)			
		Lot ที่1	Lot ที่2	เฉลี่ย	SD*	Lot ที่1	Lot ที่2	เฉลี่ย	SD*
0	25.8	3,922.7	3,922.7	3,922.7	0.00	4,507.4	4,477.8	4,492.6	20.93
1	26.8	3,930.6	3,930.6	3,930.6	0.00	4,598.0	4,598.0	4,598.0	0.00
2	25.0	3,930.6	3,930.6	3,930.6	0.00	4,523.9	4,523.9	4,523.9	0.00
4	27.5	3,854.5	3,928.6	3,891.6	52.40	4,521.6	4,373.3	4,447.5	104.86
6	28.0	3,880.2	3,880.2	3,880.2	0.00	4,569.3	4,569.3	4,569.3	0.00
8	27.0	3,858.4	3,843.5	3,851.0	10.54	4,600.4	4,600.4	4,600.4	0.00

หมายเหตุ * SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยปริมาณ $AvCl_2$

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

เมื่อนำมาแสดงเป็นกราฟเปรียบเทียบปริมาณ $AvCl_2$ ที่ปลดปล่อยออกมาจากสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์และสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ให้ผลดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ available chlorine ของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์และสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ (ppm) กับ ระยะเวลาที่เก็บ

จากตารางที่ 3 และ รูปที่ 1 เปรียบเทียบปริมาณคลอรีนที่ปลดปล่อย ($AvCl_2$) ออกจากสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ซึ่งเตรียมที่ความเข้มข้น 5,000 ppm (0.5%) พบว่าสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ปลดปล่อยปริมาณคลอรีนออกมาได้มากกว่าสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ โดยที่เวลาตั้งต้น สารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์จะให้ปริมาณ $AvCl_2$ เท่ากับ 4,492.6 ppm ส่วนสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์จะให้ปริมาณ $AvCl_2$ เท่ากับ 3,922.7 ppm ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับทฤษฎี (Dychdala,1983) กล่าวคือ สารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์จะให้ $AvCl_2$ มากกว่าสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้นเท่ากัน ดังสมการ

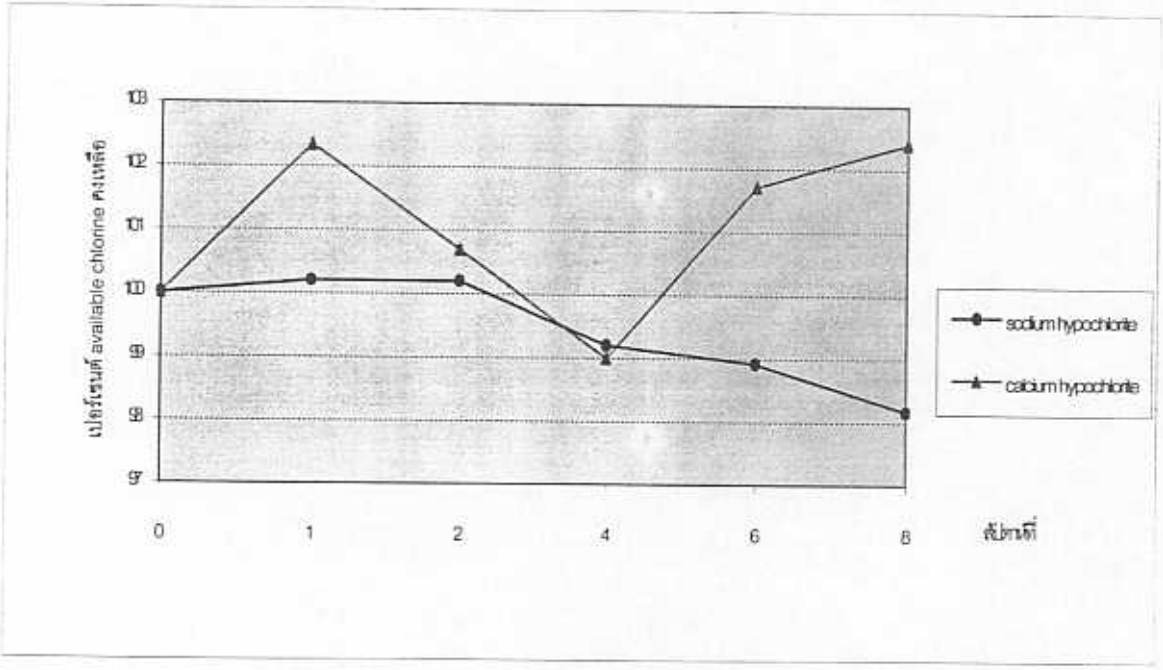
Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

$$2\ NaOH + Cl_2 \longrightarrow NaOCl + NaCl + H_2O$$

$$2\ Ca(OH)_2 + 2\ Cl_2 \longrightarrow Ca(OCl)_2 + CaCl_2 + 2\ H_2O$$

เมื่อนำข้อมูลในตารางที่ 3 ไปแปลงเป็นร้อยละของ $AvCl_2$ เฉลี่ยที่คงเหลือในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ เทียบกับเมื่อเริ่มต้น และนำมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์กับระยะเวลา ได้ผลดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของ $AvCl_2$ เฉลี่ยที่คงเหลือในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ (ppm) กับ ระยะเวลาที่เก็บ

จากรูปที่ 2 แสดงให้เห็นว่า เมื่อเก็บสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ที่อุณหภูมิห้อง ($25\pm3^{\circ}C$) ระยะเวลาต่าง ๆ นาน 8 สัปดาห์ พบว่า เมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์มีปริมาณ $AvCl_2$ ลดลง โดยในสัปดาห์ที่ 8 มีปริมาณ $AvCl_2$ คงเหลือเท่ากับ 98 % ของปริมาณเริ่มต้น ในขณะที่สารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ มีปริมาณ $AvCl_2$ เพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ที่นำมาเตรียมอยู่ในรูปผงแห้ง เมื่อนำมาละลาย จึงอาจค่อย ๆ แตกตัวให้ $AvCl_2$ อย่างสม่ำเสมอ เป็นผลให้ปริมาณ $AvCl_2$ สูงขึ้นเมื่อเทียบกับปริมาณเริ่มต้น แต่โซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่นำมาเตรียมอยู่ในรูปสารละลาย จึงมีความคงตัวน้อย

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

จะเห็นได้ว่าข้อมูลในสัปดาห์ที่ 4 มีความเบี่ยงเบนค่อนข้างสูง ดังนั้น เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลอื่นในเชิงสถิติ พบว่าข้อมูลของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ เทียบผลทุกระยะเวลาที่ศึกษา ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

การศึกษาแสดงให้เห็นว่า การเก็บรักษาสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 5,000 ppm (0.5%) ในภาชนะปิดสนิท ป้องกันแสง ที่อุณหภูมิห้อง ($25 \pm 3^{\circ}C$) สามารถเก็บได้นานถึง 8 สัปดาห์ โดยให้ปริมาณ $AvCl_2$ ไม่แตกต่าง แต่สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ จะให้ปริมาณ $AvCl_2$ ลดลง 2%

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

การหาค่าความเป็นกรด-ด่าง

เมื่อนำสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) และสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ($Ca(OCl)_2$) ความเข้มข้น 5,000 ppm (0.5%) ที่เตรียมเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ($25\pm3^{\circ}C$) ระยะเวลาต่าง ๆ นาน 8 สัปดาห์ มาวิเคราะห์หาค่า pH ด้วย pH meter อย่างต่อเนื่องในสัปดาห์ที่ 0, 1, 2, 4, 6 และ 8 โดยบันทึกอุณหภูมิขณะทดลอง ให้ผลดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของ สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) และสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ($Ca(OCl)_2$) เมื่อเก็บที่เวลาต่าง ๆ กัน นาน 8 สัปดาห์

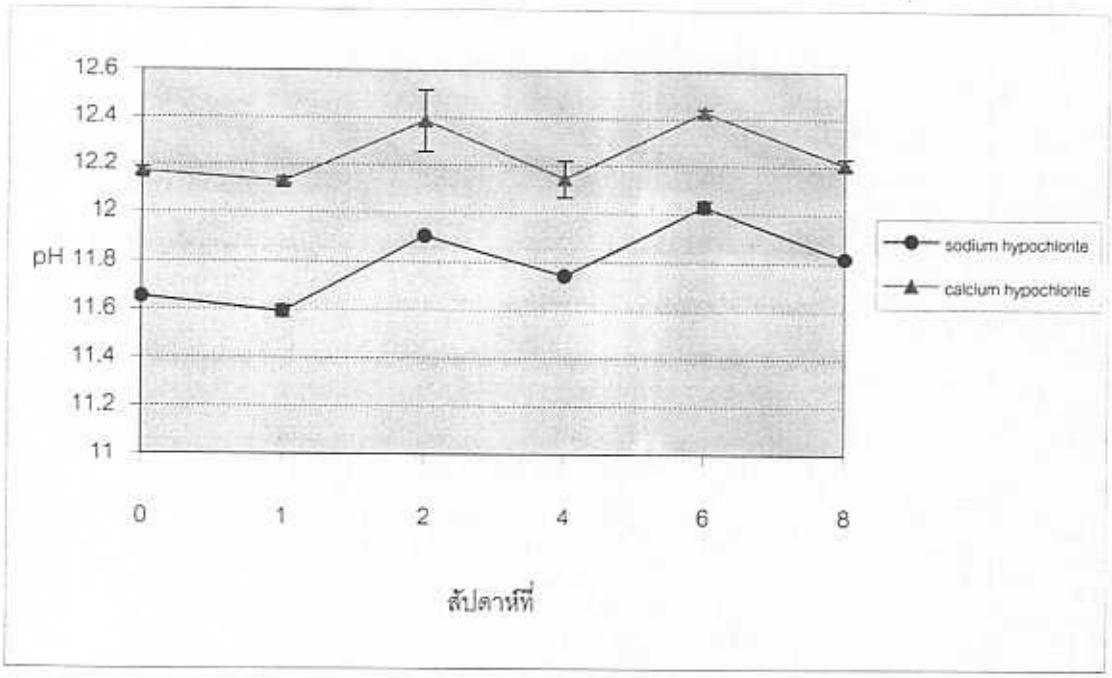
สัปดาห์ที่	อุณหภูมิขณะทดลอง ($^{\circ}C$)	pH ของ NaOCl				pH ของ $Ca(OCl)_2$			
		Lot ที่1	Lot ที่2	เฉลี่ย	SD*	Lot ที่1	Lot ที่2	เฉลี่ย	SD*
0	25.8	11.654	11.650	11.652	0.0028	12.180	12.160	12.170	0.0141
1	26.8	11.609	11.573	11.591	0.0255	12.140	12.121	12.131	0.0134
2	25.0	11.904	11.905	11.905	0.0007	12.296	12.478	12.387	0.1287
4	27.5	11.740	11.745	11.743	0.0035	12.089	12.198	12.144	0.0771
6	28.0	12.047	12.012	12.030	0.0247	12.418	12.435	12.427	0.0120
8	27.0	11.813	11.823	11.818	0.0071	12.225	12.195	12.210	0.0212

หมายเหตุ * SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเฉลี่ยของค่าความเป็นกรด-ด่าง

เมื่อนำข้อมูลในตารางที่ 4 มาแสดงเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) และสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ($Ca(OCl)_2$) กับ ระยะเวลาที่เก็บ ได้ผลดังรูปที่ 3

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university



รูปที่ 3 ค่า pH ของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 5,000 ppm (0.5%) ที่เก็บไว้เป็นระยะเวลา 0-8 สัปดาห์

จากตารางที่ 4 และรูปที่ 3 พบว่าเมื่อเตรียมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น 5,000 ppm และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ($25\pm3^{\circ}C$) เป็นระยะเวลานานถึง 8 สัปดาห์นั้น ค่าเฉลี่ยของ pH ที่ทำการตรวจวิเคราะห์ทุก 1, 2, 4, 6, 8 สัปดาห์ มีค่าไม่แตกต่างกัน คือ สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ มีค่า pH เท่ากับ 11.652 และ 11.818 ที่เวลา 0 และ 8 สัปดาห์ ตามลำดับ ส่วนสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ มีค่า pH เท่ากับ 12.17 และ 12.21 ที่เวลา 0 และ 8 สัปดาห์ ตามลำดับ

เนื่องจากค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อและความคงตัวของสารละลายไฮโปคลอไรท์ กล่าวคือ ถ้า pH สูงขึ้น ความคงตัวจะดีขึ้น แต่ประสิทธิภาพจะลดลง แต่เมื่อ pH ลดลง ประสิทธิภาพจะดีขึ้น แต่ความคงตัวจะลดต่ำลง (Baker,1959) (Bloomfield,1986) จากผลการทดลอง สารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้นเท่ากัน จะมีค่า pH สูงกว่าสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ความคงตัวโดยการหาปริมาณ $AvCl_2$ สรุปได้ว่าสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์มีความคงตัวมากกว่าสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ นอกจากนี้อุณหภูมิก็เป็นปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อและความคงตัวของสารละลายไฮโปคลอไรท์ คือ เมื่อเพิ่มอุณหภูมิ จะทำ

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

ให้เกิดการสลายเป็นเกลือ chlorite เพิ่มขึ้น และเพิ่มฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ จึงต้องทำการบันทึกอุณหภูมิขณะทดลองดังกล่าว

1.2 การทดสอบทางจุลชีววิทยา

Use-dilution method

เมื่อนำสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ 0.5% ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25±3°C) ที่ระยะเวลาต่าง ๆ นาน 8 สัปดาห์ มาทดสอบประสิทธิภาพการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยวิธี Use-dilution กับเชื้อ 3 ชนิด คือ *S. aureus* , *E. coli*, และ *Ps. aeruginosa* ให้ผลดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ความสามารถในการฆ่าเชื้อของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 5,000 ppm (0.5%) ที่เก็บไว้เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์*

เชื้อ	สัปดาห์ที่											
	0		1		2		4		6		8	
	NaOCl	$Ca(OCl)_2$	NaOCl	$Ca(OCl)_2$	NaOCl	$Ca(OCl)_2$	NaOCl	$Ca(OCl)_2$	NaOCl	$Ca(OCl)_2$	NaOCl	$Ca(OCl)_2$
S.aureus	100	100	90	100	95	95	100	100	100	95	100	100
E.coli	100	100	100	100	95	100	100	100	95	100	100	100
Ps.aeruginosa	100	100	95	100	100	100	95	100	100	100	100	100

หมายเหตุ * แสดงผลเป็นเปอร์เซนต์ของการฆ่าเชื้อ ซึ่งทำการทดสอบ 2 ชุดการทดลอง ชุดละ 10 หลอด โดยแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย (n=2) การแสดงผล 100% หมายถึง การทดลอง 10 ชุด ให้ผลฆ่าเชื้อได้ทั้งหมดทุกชุด

จากตารางที่ 5 พบว่า สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 5,000 ppm ที่เก็บไว้นานถึง 8 สัปดาห์ ยังมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อทั้ง 3 ชนิดได้ อนึ่ง การทดสอบด้วยวิธี use-dilution method (A.O.A.C.) ระบุไว้ว่า หากผลการทดลองไม่มีเชื้อขึ้นในหลอดใด ๆ ทั้ง 10 หลอด แสดงว่า น้ำยาดังกล่าวมีความเข้มข้นที่ใช้เป็น disinfectant อย่าง

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

ปลอดภัยสำหรับเชื้อที่ใช้ในกลุ่มทดสอบนี้ แต่ถ้ามีเชื้อขึ้นในหลอดใดหลอดหนึ่ง ต้องทำการทดสอบใหม่โดยใช้น้ำยาตัวอย่างที่มีความเข้มข้นมากขึ้น เพื่อหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อจาก 10 carriers ได้หมดภายใน 10 นาที และความเข้มข้นดังกล่าว จะปลอดภัยในการใช้จริงสำหรับฆ่าเชื้อในกลุ่มที่ใช้ทดสอบนั้น ซึ่งการทดลองนี้เป็นการทดสอบที่ความเข้มข้นเดียว คือ 0.5% ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่นิยมเตรียมขึ้นใช้ภายในโรงพยาบาลหรือหน่วยงาน โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อดูประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อเมื่อเก็บสารละลายไฮโปคลอไรท์ไว้ระยะเวลาหนึ่ง และผลที่มีเชื้อขึ้นนั้น มีจำนวนไม่มากนัก น่าจะมีสาเหตุมาจากการปนเปื้อนส่วนบุคคลที่อาจเกิดขึ้นได้

ตอนที่ 2 การประเมินประสิทธิภาพของสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์

2.1 การทดสอบทางเคมี

การหาปริมาณ available chlorine

จากผลการทดลองตอนที่ 1 พบว่า สารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น 5,000 ppm เมื่อเก็บไว้นาน 8 สัปดาห์ มีค่า available chlorine ไม่เปลี่ยนแปลงนัก และมีความสามารถฆ่าเชื้อได้ดี แต่เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่สูง จึงต้องการทดสอบว่ากรณีที่ความเข้มข้นต่ำลง สารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์มีค่า available chlorine ลดลงอย่างรวดเร็วหรือไม่ จึงทำการวิเคราะห์การหาปริมาณ $AvCl_2$ ที่ปลดปล่อยออกมาจากสารละลายเจือจางแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ที่เตรียมจากสารละลายข้างต้น โดยการเจือจางแบบ 2-fold dilution เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ($25\pm 3^{\circ}C$) ระยะเวลาต่าง ๆ นาน 1 เดือน ทำการวิเคราะห์ในวันที่ 0, 3, 7, 17, 24 และ 31 ความเข้มข้นเริ่มต้นของ $AvCl_2$ เท่ากับ 0.570496 % แสดงผลดังตารางที่ 6

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

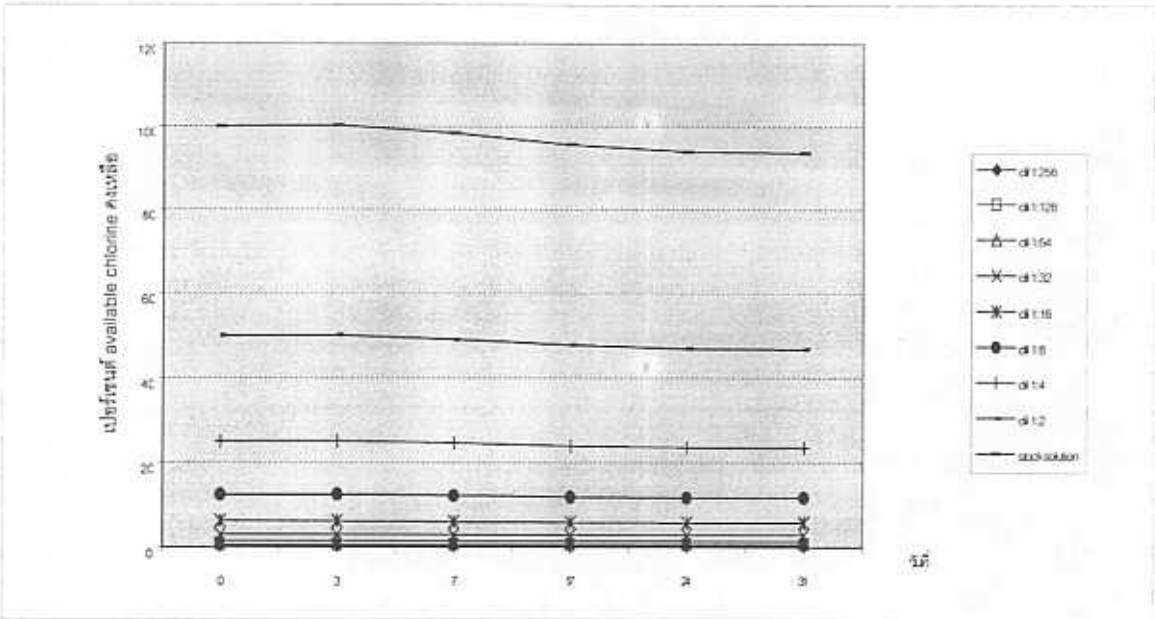
ตารางที่ 6 ปริมาณ $AvCl_2$ (ppm) ที่ปลดปล่อยออกมาจากสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะเวลา 1 เดือน

dilution	วันที่					
	0	3	7	17	24	31
1:256	22.3	22.4	21.9	21.3	21	20.9
1:128	44.6	44.7	43.9	42.6	41.9	41.7
1:64	89.1	89.5	87.7	85.3	83.8	83.5
1:32	178.3	178.9	175.5	170.5	167.5	166.9
1:16	356.6	357.8	351	341.1	335.1	333.9
1:8	713.1	715.6	701.9	682.2	670.1	667.8
1:4	1426.2	1431.2	1403.8	1364.3	1340.2	1335.5
1:2	2852.5	2862.4	2807.6	2728.6	2680.3	2671
stock solution	5705	5724.8	5615.2	5457.3	5360.7	5341.9

เมื่อนำข้อมูลในตารางที่ 6 มาแปลงเป็นร้อยละของ available chlorine ที่คงเหลือในสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ เทียบกับเมื่อเริ่มต้น โดยให้ค่า available chlorine ของสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์เริ่มต้นมีค่าเป็น 100% (รูปที่ 4)

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university



รูปที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของ available chlorine ที่คงเหลือในสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นต่าง ๆ กับระยะเวลาที่เก็บ

จากรูปที่ 4 พบว่า ค่า available chlorine ลดลงตามเวลา โดยอัตราการลดลงของ available chlorine ของสารละลายเจือจางจะใกล้เคียงกับสารละลายเริ่มต้น

การหาค่าความเป็นกรด-ด่าง

เมื่อนำสารละลายเจือจางแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ($Ca(OCl)_2$) ความเข้มข้นต่าง ๆ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ($25\pm3^{\circ}C$) ระยะเวลาต่าง ๆ นาน 1 เดือน มาวิเคราะห์หาค่า pH ด้วย pH meter อย่างต่อเนื่องในวันที่ 0, 1, 2, 4, 6 และ 8 ให้ผลดังแสดงในตารางที่ 7

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

ตารางที่ 7 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ($Ca(OCl)_2$) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อเก็บเป็นระยะเวลา 1 เดือน

dilution	วันที่					
	0	3	7	17	24	31
1:256	9.38	8.15	7.87	9.29	9.42	9.19
1:128	9.47	8.32	8.32	9.63	9.67	9.42
1:64	9.89	9.07	8.84	10.11	10.22	9.98
1:32	10.31	10.08	9.86	10.60	10.61	10.49
1:16	10.84	10.81	11.04	10.99	10.93	10.91
1:8	11.24	11.21	11.38	11.30	11.31	11.28
1:4	11.56	11.48	11.64	11.62	11.55	11.59
1:2	11.86	11.72	11.92	11.87	11.82	11.84
stock solution	12.13	12.07	12.21	12.12	12.06	12.10

จากตารางที่ 7 พบว่าเมื่อเจือจางสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ให้มีความเข้มข้นต่ำลงโดยเจือจางแบบ 2 เท่า จนถึงความเข้มข้น 1: 256 หรือ ความเข้มข้น $AvCl_2$ เท่ากับ 22.29 ppm และเก็บไว้เป็นระยะเวลานานถึง 1 เดือนนั้น ค่า pH ของสารละลายที่ความเข้มข้นเดียวกันนั้นเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ($25\pm3^{\circ}C$) ระยะเวลาต่าง ๆ นาน 1 เดือน มีค่าไม่แตกต่างกัน เป็นที่น่าสังเกตว่า เมื่อลดความเข้มข้นของสารละลายลง ค่า pH ของสารละลายมีค่าลดลงด้วย ดังนั้นเมื่อผู้เตรียมต้องการเจือจางสารละลาย ควรวัดค่า pH ด้วยทุกครั้ง

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

2.2 การทดสอบทางจุลชีววิทยา

Broth - dilution method

เป็นการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อของสารละลายแคลเซียมคลอไรท์ที่เจือจางเมื่อเก็บไว้นาน 1 เดือน ที่มีค่า available chlorine ลดลงนั้น มีความสามารถในการฆ่าเชื้อลดลงหรือไม่ จึงทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (Minimal Inhibitory Concentration)(MIC) ด้วยวิธี broth-dilution กับเชื้อ 3 ชนิด คือ *S. aureus* , *E. coli*, และ *Ps. aeruginosa* ให้ผลดังตารางที่ 8

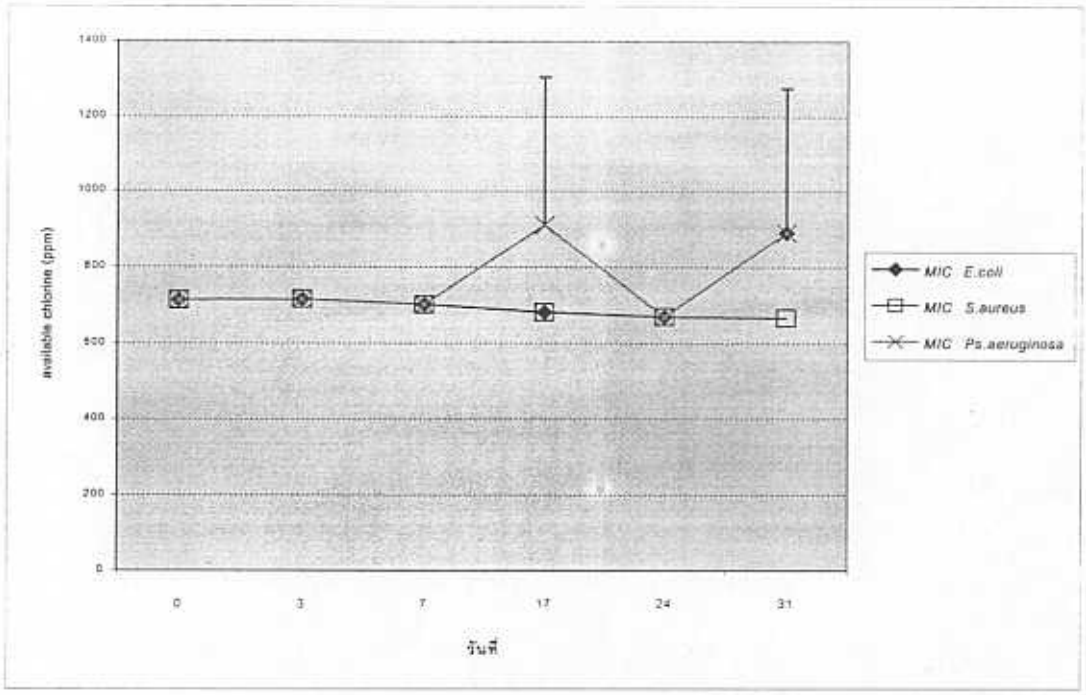
ตารางที่ 8 ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) 3 ชนิดของสารละลายแคลเซียมคลอไรท์ เมื่อเก็บไว้ที่เวลา 1 เดือน

วันที่	*E. coli*		*S. aureus*		*Ps. aeruginosa*	
	$AvCl_2$ (ppm)	SD	$AvCl_2$ (ppm)	SD	$AvCl_2$ (ppm)	SD
0	713.12	0	713.12	0	713.12	0
3	715.60	0	715.6	0	715.60	0
7	701.90	0	701.9	0	701.90	0
17	682.16	0	682.16	0	909.55	393.85
24	670.09	0	670.09	0	670.09	0
31	890.33	385.52	667.75	0	890.33	385.52

จากตารางที่ 8 พบว่า ในสัปดาห์แรก ค่า MIC เฉลี่ยต่อเชื้อ 3 ชนิด ไม่แตกต่างกัน คือ เท่ากับ 702 ppm แต่วันที่ 17 และ 31 พบว่าค่า MIC ต่อเชื้อ *E. coli* และ *Ps. aeruginosa* เพิ่มขึ้นโดยมีค่าความเบี่ยงเบนสูง เมื่อหาค่าเฉลี่ยของ MIC ต่อเชื้อ 3 ชนิด โดยไม่คิดค่าที่มีความเบี่ยงเบน พบว่า MIC เฉลี่ย ของ *S. aureus* ,*E. coli* และ *Ps. aeruginosa* มีค่าเท่ากับ 691.77 ppm, 696.57 ppm และ 700.2 ppm ตามลำดับ เมื่อนำข้อมูลในตารางที่ 8 แสดงเป็นกราฟ ได้ผลดังรูปที่ 5

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university



รูปที่ 5 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) 3 ชนิด ของสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ แสดงผลเป็นปริมาณ available chlorine เมื่อเก็บไว้ที่เวลาต่าง ๆ เป็นเวลา 1 เดือน

จากข้อมูลปริมาณ available chlorine ของสารละลายเจือจางแคลเซียมไฮโปคลอไรท์และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อทั้ง 3 ชนิด พบว่า หากต้องทำการเจือจางสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์เพื่อใช้ในโรงพยาบาล ไม่ควรให้ความเข้มข้นของสารละลายมีค่าต่ำกว่า 805 ppm (คำนวณจากค่า MIC ของเชื้อที่ให้ค่า MIC สูงที่สุด + 20% สำหรับกรณีที่มีการเตรียมผิดพลาดในระดับที่ยอมรับได้) หรือเจือจางจากสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ตั้งต้น 5,000 ppm (0.5%) ในอัตราส่วนไม่เกิน 1:4 (1,335.5 ppm)

อนึ่ง ค่า MIC เป็นค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimal Inhibitory Concentration) หากผู้เตรียมต้องการเจือจางน้ำยาฆ่าเชื้อแคลเซียมไฮโปคลอไรท์เพื่อใช้งานในโรงพยาบาล ควรทำการทดลองเพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimal Bactericidal Concentration)(MBC)เพื่อกำหนดอัตราส่วนการเจือจางที่เหมาะสมและมั่นใจได้ในประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อต่อไป

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

การเตรียมสารละลายไฮโปคลอไรท์ ทั้งสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ เพื่อใช้เป็นน้ำยาฆ่าเชื้อ (disinfectants) ในโรงพยาบาล ในขนาดความเข้มข้น 0.5% หรือ5,000 ppm นั้น สามารถเก็บรักษาไว้ในภาชนะปิดสนิท ป้องกันแสง เช่น ขวดแก้วสีชาที่ปิดฝาสนิท ที่อุณหภูมิห้อง (25±3°C) ได้นานถึง 8 สัปดาห์ โดยยังมีความคงตัว และมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย โดยเชื้อที่ใช้เป็นตัวอย่างทดสอบ คือ *Staphylococcus aureus* , *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* เนื่องจากทั้งสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ต่างก็ให้ปริมาณคลอรีนที่ปลดปล่อยออกจากสารละลาย (available chlorine) และ ค่า pH ไม่แตกต่างกัน เมื่อเก็บที่ระยะเวลา 0-8 สัปดาห์

อุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อ และความคงตัวของสารละลายไฮโปคลอไรท์ กล่าวคือ เมื่อเพิ่มอุณหภูมิ จะทำให้เกิดการสลายเป็นเกลือ chlorite เพิ่มขึ้น และเพิ่มฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ จึงต้องทำการบันทึกอุณหภูมิขณะทดลองเสมอ เชื้อแบคทีเรียทดสอบที่เลือก เป็นตัวแทนของแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ *S. aureus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก *E. coli* เป็นแบคทีเรียแกรมลบกลุ่ม Enterobacteriaceae ที่พบมากในทางเดินอาหาร ส่วน *Ps. aeruginosa* เป็นแบคทีเรียแกรมลบแท่งสั้น ที่พบเป็นสาเหตุสำคัญในการติดเชื้อที่โรงพยาบาล (nosocomial infection)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณ available chlorine ของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ที่ความเข้มข้นเดียวกัน พบว่าสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ปลดปล่อยปริมาณคลอรีนออกมาได้มากกว่าสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และเมื่อระยะเวลาการเก็บเพิ่มขึ้น สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์จะมีปริมาณ $AvCl_2$ ลดลง โดยในสัปดาห์ที่ 8 มีปริมาณ $AvCl_2$ คงเหลือเท่ากับ 98 % ของปริมาณเริ่มต้น ในขณะที่สารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ มีปริมาณ $AvCl_2$ เพิ่มขึ้น นอกจากนี้สารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้นเท่ากัน จะมีค่า pH สูงกว่าสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ สรุปได้ว่าสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์มีความคงตัวมากกว่าสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ เมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษาความคงตัวและประสิทธิภาพของสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์กับสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ได้มีรายงานการศึกษาแล้ว (อรุณศรีและคณะ,2538) พบว่า สารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ 0.5% ที่เก็บในภาชนะปิดสนิท เป็น

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

เวลา 1 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง (25±3°C) จะให้ปริมาณร้อยละ $AvCl_2$ คงเหลือ 100.32% ในขณะที่สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 0.5% ที่เก็บในภาชนะปิดสนิท เป็นเวลา 1 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง (25± 0.5°C) จะให้ปริมาณร้อยละ $AvCl_2$ คงเหลือ 96.36% แสดงว่าเกลือแคลเซียมมีความคงตัวมากกว่าเกลือโซเดียม แต่ทั้งสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์และสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ยังคงมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิด คือ *S.aureus, E.coli* และ *Ps.aeruginosa*

จากผลการทดลอง สารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์เป็นน้ำยาฆ่าเชื้อที่มีความคงตัวสูง สามารถเก็บรักษาไว้ได้เป็นระยะเวลานานถึง 8 สัปดาห์ โดยเตรียมที่ความเข้มข้น 5,000 ppm จะให้ค่า available chlorine ไม่เปลี่ยนแปลง และมีความสามารถในการฆ่าเชื้อได้ดี แต่เนื่องจากความเข้มข้น 5,000 ppm ที่นิยมเตรียมขึ้นใช้เองในหน่วยงานนั้น เป็นความเข้มข้นที่สูง ดังนั้นเมื่อเจือจางสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ให้มีความเข้มข้นต่ำลง และเก็บไว้ในระยะเวลาต่าง ๆ เป็นเวลา 1 เดือน เพื่อดูความคงตัวและประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย พบว่า การเจือจางสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ให้มีความเข้มข้นต่ำลง จะทำให้ปริมาณ available chlorine มีค่าลดลงเป็นสัดส่วนกับเวลาด้วย โดยอัตราการลดลงของ available chlorine ของสารละลายเจือจางจะใกล้เคียงกับสารละลายเข้มข้น

เมื่อทดสอบหาค่าเฉลี่ยความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ 3 ชนิด พบว่าค่าเฉลี่ยความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* มีค่าเท่ากับ 691.77 ppm , *E. coli* มีค่าเท่ากับ 696.57 ppm และ *Ps. aeruginosa* มีค่าเท่ากับ 700.2 ppm ดังนั้น การเตรียมน้ำยาฆ่าเชื้อแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ให้เจือจางลง เพื่อลดค่าใช้จ่ายของโรงพยาบาล ควรระมัดระวังในเรื่องของความคงตัวและประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อด้วย การวิจัยนี้เป็นการหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimal Inhibitory Concentration)(MIC) หากผู้เตรียมต้องการเจือจางน้ำยาฆ่าเชื้อแคลเซียมไฮโปคลอไรท์เพื่อใช้งานในโรงพยาบาล ควรทำการทดลองเพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimal Bactericidal Concentration)(MBC) เพื่อกำหนดอัตราส่วนการเจือจางที่เหมาะสมและมั่นใจได้ในประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อต่อไป

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

เอกสารอ้างอิง

Andrew FW and Orton KSP. 1904. Disinfectants action of hypochlorous acid.Zentrabl. Bakteriol.(Orig. A), 35 : 645-651,811-815.

Baker RJ. 1959 .Type and significance of chlorine residuals . J.Am.Water Works Assoc.,51:1185-1190.

Bloomfield SF and Sizer TJ. 1985 . Eusol BPC and other hypochlorite formulation used in hospital.The Pharm.J. 235(3) : 153-5,157.

Butterfield CT, Wattie E, Megregain S and Chambes CW . 1943 .Influence of pH and temperature on the survival of coli-forms and enteric pathogens when expose to free chlorine. Public health Rep.58:1837-1866.

Charlton D and Levine M. .1937.Germicidal properties of chlorine compounds.Bull. 132, Engr. Exp.Sta.

Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN and Ginsberg HS. 1980. Microbiology, 3rd edition. New York :Harper & Row.

Fair GM. 1948 .The behavior of chlorine as a water disinfectant.J. Am. Water Works Assoc, 40:1051-1061.

Gueteras AF and Schmelkes FC.1934.The comparative action of sodium hypochlorite, Chloramine-T and azochloramid on organic substrate .J.Biol.Chem,107;235-239.

Hadfield Wa.1957.Chlorine and chlorine compounds. In Antiseptic, Disinfectants, Fungicides, Chemical and Physical Sterilization. 2nd edition. Philadelphia, Lea&Febiger;558-580.

John CK .1934.Germicidal power of sodium hypochlorite.Ind.Eng.Chem.26;787-788.

John LI.1955. Microbiology .USA : Wadsworth Publishing company : 110 ,305 .

Johnson,BR; Remeikis,NA.1993.Effective shelf-life of prepared Sodium hypochlorite solution.J.Endodon.19(1):40-43.

Kapler P,Pierce GO,and Michaelson GS. 1939 .Comparative resistance of recently isolated and older laboratory strains of *E. typhosa* to the action of chloramine.J. Bacteriol,9, :1-9

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

Larry M and Judy Kandel . 1985 . Microbiology essentials and Application . USA : Mcgraw - Hill, Inc , : 337 - 339 .

Mallmann WL and Schalm O. 1932 . The influence of the hydroxyl ion on the germicidal action of chlorine in dilute solution.Bull.No. 44:3-17.

Mc. Culloch EC.1945.Disinfection and sterilization. 2nd edition. Philadelphia, Lea & Febiger;327-353.

Morris JC. 1966 .Future of chloination.J. Am. Water Work Assoc.,58,:1475-1482.

Priprem A, Chitropas P, Eiamtrakarn S and Ratchatawijin M. 1995 .The storage of 0.5% sodium hypochlorite solution. Srinagarind Med J ;10(4):358-9.

Priprem A , Chitropas P, Pongjanyakul T, Eiamtrakarn S. and Ratchatawijin M. 1995. Comparison of sodium hypochlorite formulations: Chemical and Microbiological Evaluation .Mahidol J Pharm Sci 22(4):131-136.

Rideal EK and Evans UR.1921. The effect of alkalinity on the use of hypochlorites. J.Soc.Chem.Ind.,40;64R-66R.

Russel AD. 1967. Principles and practice of Disinfection Preservation and Sterilization. 2nd edition. London .England.48-297.

Rudolph AS and Levine M.1941.Factors affecting the germicidal efficiency of the hypochlorite solutions.Bull;150,Eng.Exp.Spa,Iowa,State College.

Seymour SB.1986. Chlorine and chlorine compound and preservative : Disinfectant and Sterilization.3rd ed. Philadelphia. Lea & Febiger :152-157.

Shere L. 1948 . Somes comparisons of the disinfevting properties of hypochlorite and quaternary ammonium compounds.Milk Plant monthly,37,:66-69.

Tonney FO, Greer FE, and Liebig GF.1936.The minimal chlorine death point of bacteria.Am. J Public Health,20:503-508.

The Association of Analytical Chemistry.1990.AOAC Official Method of Analysis 15th revision.Virginia: Association of Official Analytical Chemists Inc:133-138.

Vincent and Ballerean F.1989.Sodium hypochlorite as Disinfectant for injection materials in third world rural dispensaries.Int.J.Pharm.:50(15);87-88.

Weidenkopf SJ.1953.Water chlorination. U.S.Armed Forces Med J;253-261.

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

กลุ่มเภสัชกรภาคกลาง . 2531 . น้ำยาฆ่าเชื้อ . พิมพ์ครั้งที่ 1 . กุมภาพันธ์ : 5 , 17 -18 .

คณะทำงานทบทวนคู่มือการป้องกันการติดเชื้อจากการให้บริการทางการแพทย์และสาธารณสุข . 2538 . คู่มือการปฏิบัติงานการป้องกันการติดเชื้อจากการให้บริการทางการแพทย์และสาธารณสุข(Universal Precautions) ฉบับปรับปรุงครั้งที่ 2 . พฤษภาคม : 110 - 112 .

สมหวัง ด่านชัยวิจิตร.2536 . การทำให้ปราศจากเชื้อและการทำลายเชื้อ . พิมพ์ครั้งที่ 1 . กรุงเทพฯ : เรือนแก้วการพิมพ์ .2535 : 13 - 14.

ดำรงเกียรติ ตั้งเจริญ. 2533 . ความคงตัวของ sodium hypochlorite . วารสารการแพทย์กลุ่มเครือข่าย4/2. ปีที่2 ฉบับที่ 3 ,กันยายน-ธันวาคม:21-24.

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การคำนวณหาปริมาณของ available chlorine โดยวิธี Iodometric titration

การเตรียมสารเคมี

0.1 N Sodium thiosulfate

ชั่ง sodium thiosulfate 26 กรัม อย่างแม่นยำ ใส่ลงใน beaker ขนาด 1000 มิลลิลิตรที่ tare ปริมาตรไว้แล้ว เติม sodium thiosulfate 200 กรัม เติมน้ำต้มเดือดใหม่ ๆ ลงไปละลายของแข็งใน beaker ให้หมด จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

Starch TS

โปรยแป้งมัน 2 กรัม ในน้ำอุ่น 50 มิลลิลิตร คนจนละลายหมด ทิ้งให้เย็น เก็บใส่ขวดสีชา เก็บไว้ในตู้เย็น เมื่อจะนำมาใช้ให้อุ่นใน water bath ก่อน แล้วจึงเขย่าให้เข้ากัน

6 N acetic acid

ละลาย glacial acetic 360.56 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรจนครบ 1000 มิลลิลิตร ใน Volumetric flask

การคำนวณหาความเข้มข้นของ Sodium thiosulfate

ที่จุดสมมูล

$$\text{meq } Na_2S_2O_3 = \text{meq } K_2Cr_2O_7$$

$$N \times ml = \frac{\text{น้ำหนัก } K_2Cr_2O_7(g) \times 6}{\frac{M.W}{1000}}$$

$$N = \frac{\text{น้ำหนัก } K_2Cr_2O_7(g) \times 6}{\frac{M.W. \times ml}{1000}}$$

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

ตารางที่ 9 การ standardization หาความเข้มข้นของ Sodium thiosulfate

สัปดาห์ที่	Lot ที่	น้ำหนักของ $K_2Cr_2O_7$ ที่ชั่ง (g)	ปริมาตรของ $Na_2S_2O_3$ ที่ใช้ (ml)	ความเข้มข้นของ $Na_2S_2O_3$ ที่คำนวณได้ (N)	เฉลี่ยความเข้มข้นของ $Na_2S_2O_3$(N)
0	1	0.1011	20.84	0.0989	0.0994
	2	0.1002	20.48	0.0998	
1	1	0.1041	21.4	0.0992	0.0996
	2	0.1014	20.7	0.0999	
2	1	0.1132	23.2	0.0995	0.0996
	2	0.1056	21.6	0.0997	
4	1	0.1005	20.6	0.9995	0.0996
	2	0.1114	22.8	0.9996	
6	1	0.1135	23.1	0.1002	0.1006
	2	0.1011	20.4	0.1011	
8	1	0.1100	22.5	0.0997	0.0996
	2	0.1049	21.5	0.0995	

การคำนวณหา $AvCl_2$ โดยวิธี Iodometric titration

ที่จุดสมมูล

$$\text{meq } Ca(OCl)_2 = \text{meq } Na_2S_2O_3$$

$$\frac{\text{น้ำหนัก } Ca(OCl)_2\text{(g)} \times 4}{\frac{M.W}{1000}} = N \times ml$$

$$\text{น้ำหนัก } Ca(OCl)_2\text{(g)} = \frac{N \times ml \times M.W.}{4 \times 1000}$$

$$AvCl_2\text{(ppm)} = \frac{\text{น้ำหนัก } Ca(OCl)_2\text{(g)} \times 10^6}{\text{น้ำหนัก}Ca(OCl)_2\text{ 3 ml(g)}}$$

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

ตารางที่ 10 ปริมาตรของ $Na_2S_2O_3$ ที่ใช้ในการ titrate หาปริมาณ $AvCl_2$ ใน NaOCl และ $Ca(OCl)_2$ ที่เก็บในระยะเวลาต่าง ๆ

สัปดาห์ที่	ปริมาตรของ $Na_2S_2O_3$ ใน NaOCl (ml)			ปริมาตรของ $Na_2S_2O_3$ ใน $Ca(OCl)_2$ (ml)		
	Lot ที่1	Lot ที่2	เฉลี่ย	Lot ที่1	Lot ที่2	เฉลี่ย
0	5.30	5.30	5.30	6.09	6.05	6.07
1	5.30	5.30	5.30	6.20	6.20	6.20
2	5.30	5.30	5.30	6.10	6.10	6.10
4	5.20	5.30	5.25	6.10	5.90	6.00
6	5.18	5.18	5.18	6.10	6.10	6.10
8	5.20	5.18	5.19	6.20	6.20	6.20

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

ภาคผนวก ข

ความสัมพันธ์ระหว่าง light transmittance (% T) **กับ** number of bacterial colony on plate count (CFU/ml)

วิธีการ :

1. เจือจางเชื้อ *S. aureus, E. coli, Ps. aeruginosa* ให้เป็น 1:5,1:10,1:20,1:40,1:80 โดยใช้ nutrient broth แล้ววัด %T ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร
2. นำเอา test culture เดียวกัน มาเจือจางเป็น 1:5 x 10^{11} โดยใช้ nutrient broth
3. ดูดเชื้อที่เจือจางแล้วในข้อ 2 มา 1 µl ใส่ plate ที่มี nutrient agar (ทำเชื้อละ 5 plate)
4. incubate ที่ 37 ^{o}C 18-24 ชั่วโมง
5. นับจำนวน colony ที่เกิดในแต่ละ plate หาค่าเฉลี่ย
6. คำนวณเทียบหา correlation graph ระหว่าง light transmittance กับ number of colony on plate count
7. ทำเช่นเดียวกับข้อ 3-6 แต่ดูดเชื้อที่เจือจางมา 3 µl และ 5 µl ตามลำดับ

การคำนวนหาจำนวนเชื้อ (CFU/ml)

	0.1µl		0.1µl		5 ml		0.1 µl	
stock	→	Tube1	→	Tube2	→	Tube3	→	pour plate (นับได้ N colony)
ปริมาตรสุดท้าย		10 ml		10 ml		10 ml		
เจือจาง		$\frac{1}{10^{5}}$		$\frac{1}{10^{10}}$		$\frac{1}{2x10^{10}}$		$\frac{1}{2x10^{14}}$

stock มีจำนวนเชื้อ = N x $2x10^{14}$ CFU /ml

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

ตารางที่ 11 ความสัมพันธ์ระหว่าง % Transmittance (% T) กับ number of bacterial colony on plate count (CFU/ ml) ของเชื้อต่าง ๆ ดังนี้

E. coli

dilution	% T ที่ 500 nm.	viable count (x 10^{15} CFU/ ml)
1:5	80.2	0.544
1:10	88.5	0.272
1:20	94.6	0.136
1:40	97.4	0.068
1:80	98.6	0.034

Linear regression

correlation $r^2 = 0.9926$

equation $\%T = (-3.65 \times 10^{-14})(\text{viable count}) + 99.55$

S. aureus

dilution	% T ที่ 500 nm.	viable count (x 10^{15} CFU/ ml)
1:5	80.4	0.704
1:10	88.9	0.352
1:20	94.0	0.176
1:40	97.7	0.088
1:80	99.2	0.044

Linear regression

correlation $r^2 = 0.9897$

equation $\%T = (-2.83 \times 10^{-14})(\text{viable count}) + 99.75$

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

Ps. aeruginosa

dilution	% T ที่ 500 nm.	viable count (x 10^{15} CFU/ ml)
1:5	76.6	0.848
1:10	89.0	0.424
1:20	94.3	0.212
1:40	95.5	0.106
1:80	97.4	0.053

Linear regression

correlation $r^2 = 0.9916$

equation $\%T = (-2.59 \times 10^{-14})(\text{viable count}) + 99.07$

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

ภาคผนวก ค

การประเมินประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อด้วยวิธี Phenol Coefficient test (A.O.A.C Method)

วิธีการ :

1. เจือจางน้ำยาฆ่าเชื้อด้วยน้ำ ในอัตราส่วน 1:20, 1:100, 1:200 และ 1:1000 แล้วใส่ในหลอดทดลอง หลอดละ 5 มิลลิลิตร และแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 20 °C
2. เจือจาง phenol ด้วยน้ำในอัตราส่วน 1:60 และ 1:70 แล้วใส่ในหลอดทดลองเปล่า หลอดละ 5 มิลลิลิตร และแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 20 °C
3. เติมเชื้อที่บ่มเพาะ จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ลงในน้ำยาฆ่าเชื้อ และ phenol จากข้อ 1 และ 2 เขย่าเบา ๆ ให้เชื้อกระจายทั่ว
4. แตะส่วนผสมจากข้อ 3 โดยใช้ loop ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร ในช่วงเวลา 5, 10 และ 15 นาที ลงในหลอดทดลองที่มี NB 10 มิลลิลิตร
5. บ่มเพาะหลอด NB จากข้อ 4 ที่อุณหภูมิ 37 °C 48 ชั่วโมง
6. คำนวณค่า phenol coefficient ของน้ำยาฆ่าเชื้อ โดยอาศัยสูตร ดังนี้

$$\text{phenol coefficient} = \frac{\text{ส่วนเจือจางของน้ำยาฆ่าเชื้อที่ฆ่าเชื้อได้ใน 10 นาทีแต่ไม่ได้ใน 5 นาที}}{\text{ส่วนเจือจางของ phenol ที่ฆ่าเชื้อได้ใน 10 นาทีแต่ไม่ได้ใน 5 นาที}}$$

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

ภาคผนวก ง

ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อของน้ำยาฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์

ตารางที่ 12 ผลการฆ่าเชื้อ *S. aureus* ของน้ำยาฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์ เมื่อเก็บไว้ ณ สัปดาห์ที่ 0

น้ำยาฆ่าเชื้อ	exposure time (นาที)	หลอดทดลองที่																			
		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10	
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Phenol 1:70	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$Ca(OCl)_2$	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Na(OCl)	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 13 ผลการฆ่าเชื้อ *S. aureus* ของน้ำยาฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์ เมื่อเก็บไว้ ณ สัปดาห์ที่ 1

น้ำยาฆ่าเชื้อ	exposure time (นาที)	หลอดทดลองที่																			
		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10	
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Phenol 1:70	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
$Ca(OCl)_2$	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Na(OCl)	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

ตารางที่ 14 ผลการฆ่าเชื้อ *S. aureus* ของน้ำยาฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์ เมื่อเก็บไว้ ณ สัปดาห์ที่ 2

น้ำยาฆ่าเชื้อ	exposure time (นาที)	หลอดทดลองที่																			
		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10	
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Phenol 1:70	5	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$Ca(OCl)_2$	10	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Na(OCl)	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

ตารางที่ 15 ผลการฆ่าเชื้อ *S. aureus* ของน้ำยาฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์ เมื่อเก็บไว้ ณ สัปดาห์ที่ 4

น้ำยาฆ่าเชื้อ	exposure time (นาที)	หลอดทดลองที่																			
		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10	
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Phenol 1:70	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
$Ca(OCl)_2$	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Na(OCl)	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

ตารางที่ 16 ผลการฆ่าเชื้อ *S. aureus* ของน้ำยาฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์ เมื่อเก็บไว้ ณ สัปดาห์ที่ 6

น้ำยาฆ่าเชื้อ	exposure time (นาที)	หลอดทดลองที่																			
		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10	
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Phenol 1:70	5	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
	10	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$Ca(OCl)_2$	10	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Na(OCl)	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 17 ผลการฆ่าเชื้อ *S. aureus* ของน้ำยาฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์ เมื่อเก็บไว้ ณ สัปดาห์ที่ 8

น้ำยาฆ่าเชื้อ	exposure time (นาที)	หลอดทดลองที่																			
		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10	
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Phenol 1:70	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$Ca(OCl)_2$	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Na(OCl)	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

ตารางที่ 18 ผลการฆ่าเชื้อ *E. coli* ของน้ำยาฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์ เมื่อเก็บไว้ ณ สัปดาห์ที่ 0

น้ำยาฆ่าเชื้อ	exposure time (นาที)	หลอดทดลองที่																			
		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10	
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Phenol 1:70	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$Ca(OCl)_2$	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Na(OCl)	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 19 ผลการฆ่าเชื้อ *E. coli* ของน้ำยาฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์ เมื่อเก็บไว้ ณ สัปดาห์ที่ 1

น้ำยาฆ่าเชื้อ	exposure time (นาที)	หลอดทดลองที่																			
		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10	
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Phenol 1:70	5	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$Ca(OCl)_2$	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Na(OCl)	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

ตารางที่ 20 ผลการฆ่าเชื้อ *E. coli* ของน้ำยาฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์ เมื่อเก็บไว้ ณ สัปดาห์ที่ 2

น้ำยาฆ่าเชื้อ	exposure time (นาที)	หลอดทดลองที่																			
		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10	
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Phenol 1:70	5	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$Ca(OCl)_2$	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Na(OCl)	10	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 21 ผลการฆ่าเชื้อ *E. coli* ของน้ำยาฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์ เมื่อเก็บไว้ ณ สัปดาห์ที่ 4

น้ำยาฆ่าเชื้อ	exposure time (นาที)	หลอดทดลองที่																			
		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10	
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Phenol 1:70	5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$Ca(OCl)_2$	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Na(OCl)	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

ตารางที่ 22 ผลการฆ่าเชื้อ *E. coli* ของน้ำยาฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์ เมื่อเก็บไว้ ณ สัปดาห์ที่ 6

น้ำยาฆ่าเชื้อ	exposure time (นาที)	หลอดทดลองที่																			
		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10	
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Phenol 1:70	5	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	15	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$Ca(OCl)_2$	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Na(OCl)	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 23 ผลการฆ่าเชื้อ *E. coli* ของน้ำยาฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์ เมื่อเก็บไว้ ณ สัปดาห์ที่ 8

น้ำยาฆ่าเชื้อ	exposure time (นาที)	หลอดทดลองที่																			
		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10	
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Phenol 1:70	5	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$Ca(OCl)_2$	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Na(OCl)	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

ตารางที่ 24 ผลการฆ่าเชื้อ *Ps.aeruginosa* ของน้ำยาฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์ เมื่อเก็บไว้ ณ สัปดาห์ที่ 0

น้ำยาฆ่าเชื้อ	exposure time (นาที)	หลอดทดลองที่																			
		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10	
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Phenol 1:70	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$Ca(OCl)_2$	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Na(OCl)	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 25 ผลการฆ่าเชื้อ *Ps.aeruginosa* ของน้ำยาฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์ เมื่อเก็บไว้ ณ สัปดาห์ที่ 1

น้ำยาฆ่าเชื้อ	exposure time (นาที)	หลอดทดลองที่																			
		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10	
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Phenol 1:70	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	15	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
$Ca(OCl)_2$	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Na(OCl)	10	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

ตารางที่ 26 ผลการฆ่าเชื้อ *Ps.aeruginosa* ของน้ำยาฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์ เมื่อเก็บไว้ ณ สัปดาห์ที่ 2

น้ำยาฆ่าเชื้อ	exposure time (นาที)	หลอดทดลองที่																			
		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10	
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Phenol 1:70	5	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$Ca(OCl)_2$	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Na(OCl)	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 27 ผลการฆ่าเชื้อ *Ps.aeruginosa* ของน้ำยาฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์ เมื่อเก็บไว้ ณ สัปดาห์ที่ 4

น้ำยาฆ่าเชื้อ	exposure time (นาที)	หลอดทดลองที่																			
		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10	
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Phenol 1:70	5	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$Ca(OCl)_2$	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Na(OCl)	10	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

ตารางที่ 28 ผลการฆ่าเชื้อ *Ps.aeruginosa* ของน้ำยาฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์ เมื่อเก็บไว้ ณ สัปดาห์ที่ 6

น้ำยาฆ่าเชื้อ	exposure time (นาที)	หลอดทดลองที่																			
		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10	
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Phenol 1:70	5	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	15	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$Ca(OCl)_2$	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Na(OCl)	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 29 ผลการฆ่าเชื้อ *Ps.aeruginosa* ของน้ำยาฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์ เมื่อเก็บไว้ ณ สัปดาห์ที่ 8

น้ำยาฆ่าเชื้อ	exposure time (นาที)	หลอดทดลองที่																			
		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10	
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Phenol 1:70	5	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$Ca(OCl)_2$	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Na(OCl)	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

ภาคผนวก จ

ความสามารถในการทำลายเชื้อของสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ เพื่อหาค่า MIC

ตารางที่ 30 ความสามารถในการทำลายเชื้อ *E.coli, S. aureus, Ps. aeruginosa* ของสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อเก็บไว้ ณ วันที่ 0

ความเข้มข้น $AvCl_2$ (ppm)	*E.coli*			*S.aureus*			*Ps.aeruginosa*		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
22.29	+	+	+	+	+	+	+	+	+
44.57	+	+	+	+	+	+	+	+	+
89.14	+	+	+	+	+	+	+	+	+
178.28	+	+	+	+	+	+	+	+	+
356.56	+	+	+	+	+	+	+	+	+
713.12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1426.24	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2852.48	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5704.96	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ แสดงค่าความเข้มข้นเป็นปริมาณ available chlorine

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

ตารางที่ 31 ความสามารถในการทำลายเชื้อ *E.coli, S. aureus, Ps. aeruginosa* ของสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อเก็บไว้ ณ วันที่ 3

ความเข้มข้น $AvCl_2$ (ppm)	*E.coli*			*S.aureus*			*Ps.aeruginosa*		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
22.37	+	+	+	+	+	+	+	+	+
44.73	+	+	+	+	+	+	+	+	+
89.45	+	+	+	+	+	+	+	+	+
178.90	+	+	+	+	+	+	+	+	+
357.80	+	+	+	+	+	+	+	+	+
715.60	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1431.20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2862.40	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5724.79	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ แสดงค่าความเข้มข้นเป็นปริมาณ available chlorine

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

ตารางที่ 32 ความสามารถในการทำลายเชื้อ *E.coli, S. aureus, Ps. aeruginosa* ของสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อเก็บไว้ ณ วันที่ 7

ความเข้มข้น $AvCl_2$ (ppm)	*E.coli*			*S.aureus*			*Ps.aeruginosa*		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
21.94	+	+	+	+	+	+	+	+	+
43.87	+	+	+	+	+	+	+	+	+
87.74	+	+	+	+	+	+	+	+	+
175.48	+	+	+	+	+	+	+	+	+
350.95	+	+	+	+	+	+	+	+	+
701.90	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1403.80	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2807.60	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5615.20	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ แสดงค่าความเข้มข้นเป็นปริมาณ available chlorine

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

ตารางที่ 33 ความสามารถในการทำลายเชื้อ *E.coli, S. aureus, Ps. aeruginosa* ของสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อเก็บไว้ ณ วันที่ 17

ความเข้มข้น $AvCl_2$ (ppm)	*E.coli*			*S.aureus*			*Ps.aeruginosa*		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
21.32	+	+	+	+	+	+	+	+	+
42.64	+	+	+	+	+	+	+	+	+
85.27	+	+	+	+	+	+	+	+	+
170.54	+	+	+	+	+	+	+	+	+
341.08	+	+	+	+	+	+	+	+	+
682.16	-	-	-	-	-	-	-	-	+
1364.32	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2728.63	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5457.26	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ แสดงค่าความเข้มข้นเป็นปริมาณ available chlorine

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

ตารางที่ 34 ความสามารถในการทำลายเชื้อ *E.coli, S. aureus, Ps. aeruginosa* ของสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อเก็บไว้ ณ วันที่ 24

ความเข้มข้น $AvCl_2$ (ppm)	*E.coli*			*S.aureus*			*Ps.aeruginosa*		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
20.95	+	+	+	+	+	+	+	+	+
41.89	+	+	+	+	+	+	+	+	+
83.77	+	+	+	+	+	+	+	+	+
167.53	+	+	+	+	+	+	+	+	+
335.05	+	+	+	+	+	+	+	+	+
670.09	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1340.17	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2680.33	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5360.65	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ แสดงค่าความเข้มข้นเป็นปริมาณ available chlorine

Ubon Rajathanee university

Ubon Rajathanee university

ตารางที่ 35 ความสามารถในการทำลายเชื้อ *E.coli, S. aureus, Ps. aeruginosa* ของสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อเก็บไว้ ณ วันที่ 31

ความเข้มข้น $AvCl_2$ (ppm)	*E.coli*			*S.aureus*			*Ps.aeruginosa*		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
20.87	+	+	+	+	+	+	+	+	+
41.74	+	+	+	+	+	+	+	+	+
83.47	+	+	+	+	+	+	+	+	+
166.94	+	+	+	+	+	+	+	+	+
333.88	+	+	+	+	+	+	+	+	+
667.75	+	-	-	-	-	-	+	-	-
1335.49	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2670.97	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5341.94	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ แสดงค่าความเข้มข้นเป็นปริมาณ available chlorine

Ubon Rajathanee university