รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

การประเมินประสิทธิภาพฤทธิ์ในการต้านจุลชีพและความปลอดภัย ในการใช้งานของน้ำอิเล็กโทรไลต์และ สาร Benzalkonium Chloride เพื่อใช้เป็นสารฆ่าเชื้อโรค

Evaluation of the antimicrobial activity and safety applications of electrolyzed water and Benzalkonium Chloride using as microbial disinfectant

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พรรณนภา เภาทอง

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สนับสนุนโดย

สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต

2563

ชื่อเรื่อง : การประเมินประสิทธิภาพฤทธิ์ในการต้านจุลชีพและความปลอดภัยในการใช้งานของน้ำอิเล็กโทรไลต์และ สาร Benzalkonium Chloride เพื่อใช้เป็นสารฆ่าเชื้อโรค
ผู้วิจัย : ผศ.ดร.พรรณนภา เภาทอง สถาบัน: ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต
ปีที่พิมพ์ : 2564 สถานที่พิมพ์: ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต
แหล่งที่เก็บรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ : สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต
จำนวนหน้างานวิจัย 69 หน้า คำสำคัญ: สารฆ่าเชื้อโรค, น้ำอิเล็กโทรไลต์, สาร Benzalkonium Chloride, ความเป็นพิษต่อเซลล์, สารต้านจุลชีพ,คุณสมบัติทางกายภาพ
ลิขสิทธิ์ : ผศ.ดร.พรรณนภา เภาทอง

บทคัดย่อ

น้ำอิเล็กโทรไลต์ (EW) และ Benzalkonium Chloride เป็นกลุ่มของสารฆ่าเชื้อแบบใหม่ที่มีแนวโน้มว่าจะเพิ่งได้รับการเสนอให้เป็นอีกทางเลือกแทนวิธีการขจัดสิ่งปนเปื้อนทั่วไป เช่น ความร้อนและน้ำยาฆ่าเชื้อด้วยสารเคมี การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติต่าง ๆ ของน้ำอิเล็กโทรไลต์และ Benzalkonium Chloride เพื่อความปลอดภัยและเป็นแนวทางปฏิบัติด้านสุขอนามัยที่เหมาะสมต่อไป โดยทำการตรวจสอบคุณสมบัติคุณสมบัติ ทั้งทางกายภาพ ทางเคมี ทางจุลชีววิทยา และความเป็นพิษต่อเซลล์ OMUF ไฟโบรบลาสต์ อีกทั้งยังได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพของเทคนิคการฆ่าเชื้อ (การแช่และการพ่น) ของสารฆ่าเชื้อทั้งสองชนิดนี้อีกด้วย ผลการทดลอง พบว่าน้ำอิเล็กโทรไลต์มีคุณสมบัติเป็นด่างและอายุการเก็บรักษาคงที่ตลอด 7 วัน ทั้งน้ำอิเล็กโทรไลต์และ Benzalkonium Chloride มีความสามารถในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ทุกชนิดรวมถึงแบคทีเรียและเชื้อราหลังจากสัมผัสภายใน 1-3 นาทีและ 3-5 นาทีตามลำดับ อย่างไรก็ตาม พบว่าเทคนิคการแช่ตั้งแต่ 3-5 นาทีขึ้นไปมีประสิทธิภาพมากกว่าการพ่นน้ำยาฆ่าเชื้อบนพื้นผิวและ/หรือวัตถุโดยสรุป ทั้งน้ำอิเล็กโทรไลต์และ Benzalkonium Chloride มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อพื้นผิวของวัตถุและผ้า และปลอดภัยสำหรับการทำความสะอาดพื้นผิว เสื้อผ้า และอุปกรณ์อื่น ๆ อย่างไรก็ตาม การฉีดพ่น Benzalkonium Chloride บนร่างกายอาจไม่เหมาะสมเนื่องจากมีความเป็นพิษสูง งานวิจัยนี้เป็นส่วนช่วยเพิ่มความมั่นใจในการรักษาความปลอดภัยและเป็นแนวทางปฏิบัติเพื่อสุขอนามัยที่ดีและเหมาะสมในอนาคต

Title: Evaluation of the antimicrobial activity and safety applications of electrolyzed water and Benzalkonium Chloride using as microbial disinfectant

Researcher: Pannapa Powthong Ph.D.

Institution: Department of Medical Sciences, Faculty of Science, Rangsit University

Year of Publication: 2021 Publisher: Department of Medical Sciences, Faculty of Science, Rangsit University

Sources: Research Institute No. of page: 69 pages

Keywords: disinfectant, electrolyzed water, Benzalkonium Chloride, anti-microbial, cytotoxicity, physical property

Copyright: Pannapa Powthong Ph.D.

ABSTRACT

Electrolyzed water (EW) and Benzalkonium Chloride are group of the promising novel disinfectant agents that have recently been proposed as the alternative to conventional decontamination methods such as heat and chemical sanitizers. The objective of this research was to examine various properties of electrolyzed water and Benzalkonium Chloride to ensure safety and to further proper hygiene practical guideline. The tests are performed by evaluated the properties of physical, chemical, microbiological and cytotoxicity to OMUF fibroblasts was also assessed. Moreover, the efficacy of sterilization techniques (soaking and spraying) of these two disinfectants was compared as well. The results showed that electrolyte has an alkaline properties and shelf life was stable over 7 days. Both electrolyzed water and Benzalkonium Chloride has an ability to kill all types of microbes include bacteria and fungi after contact within 1-3 minutes and 3-5 minutes respectively. However, immersion technique up to 3-5 minutes onwards was revealed the most effective than spray technique for surface and/or objects disinfectant. In summary, both electrolyte water and Benzalkonium Chloride are effective in disinfecting surfaces of objects and fabrics and safe for cleaning surfaces, clothing and other equipment. However, sprayed on the body with benzalkonium chloride may not be suitable due to its high toxicity. This research contributes to increasing confidence in safety and as a guideline to carry out for the better and suitable hygiene in the future.

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ โดยได้รับความอนุเคราะห์จากผู้มีพระคุณหลายท่าน โดยเฉพาะ ผศ.บาจรีย์ จันทรภานุกรณ์ และ อาจารย์วรางคณา เล็กตระกูล อาจารย์คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต ที่ได้สละเวลาให้คำปรึกษาแนะนำ ปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ รวมทั้งให้คำแนะนำทั้งในด้านทฤษฎีและปฏิบัติ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในทุกๆ ด้านของการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยมหาวิทยาลัยรังสิต และเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้อง ในการสนับสนุนทุนวิจัยในครั้งนี้ ทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิตทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือ อำนวยความสะดวกในการจัดหาอุปกรณ์, สารเคมี และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้

ประโยชน์ที่พึงได้รับจากรายงานวิจัยฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบให้ทุกท่านที่มีส่วนสำคัญต่อความสำเร็จของการวิจัยครั้งนี้

ผศ.ดร.พรรณนภา เภาทอง

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(4)
สารบัญรูปภาพ	(6)
สัญลักษณ์และคำย่อ	(7)
บทที่ 1 บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของโครงการ	2
ขอบเขตของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับสารฆ่าเชื้อโรค	4
2.2 ชนิดของน้ำยาฆ่าเชื้อกลุ่มที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย	4
2.2.1 ฟีนอลและอนุพันธ์	4
2.2.2 ฮาโลเจน	5
2.2.3 Chlorhexidine salts	6
2.2.4 สารประกอบไอโอดีน	7
2.2.5 แอลกอฮอล์	8
2.2.6 สารลดแรงตึงผิว	9
2.2.7 อัลดิไฮด์	9
2.2.8 ควอเทอนารีแอมโมเนียมคอมเพานด์	10
2.2.9 ควอเทอนารีแอมโมเนียมคอมเพานด์ผสมแอลกอฮอล์ หรือ ควอทแอลกอฮอล์	11
2.3 กลไกการออกฤทธิ์ของสารฆ่าเชื้อจุลชีพ	13
2.4 อาการเกิดพิษของสารเคมีฆ่าเชื้อ	14

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.5 Benzalkonium chloride	15
2.6 น้ำอิเล็กโทรไลต์	16
2.7 วิธีทดสอบสารเคมีฆ่าเชื้อ	17
2.8 รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	17
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	19
3.1 การออกแบบการวิจัย	19
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์	19
3.2.1 เครื่องมือ	19
3.2.2 อุปกรณ์	20
3.2.3 สารเคมี	20
3.2.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ และอาหารทดสอบชีวเคมี	21
3.3 วิธีการทดลอง	21
3.3.1 การเตรียมสาร Benzalkonium chloride และ อิเล็กโทรไลต์	21
3.3.2 การทดสอบคุณสมบัติทางเคมีของน้ำอิเล็กโทรไลต์ชนิดต่าง ๆ	22
3.3.3 การทดสอบคุณสมบัติทางจุลชีววิทยาของน้ำอิเล็กโทรไลต์ เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ	22
3.3.3.1 กลุ่มแบคทีเรียก่อโรคทางการแพทย์ที่ใช้ในการทดสอบ	22
3.3.3.2 ยีสต์ก่อโรคทางการแพทย์ที่ใช้ในการทดสอบ	22
3.3.4 การเตรียมเชื้อและ cell suspension ที่ใช้ในการทดสอบ	23
3.3.5 การทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำอิเล็กโทรไลต์ และ benzalkonium chloride	23
3.3.6 การวัด Intracellular protein leaking ด้วย วิธี dye-binding (Bradford)	24
3.3.7 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำอิเล็กโทรไลต์ และ benzalkonium chloride กับสารฆ่าเชื้อชนิดต่าง ๆ	24

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.3.8 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำอิเล็กโทรไลต์และ benzalkonium chloride (ความเข้มข้น 0.05 %) ในการฆ่าเชื้อด้วยเทคนิคการสัมผัสรูปแบบต่าง ๆ	25
3.3.9 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity Assay) ที่ไม่ใช่เซลล์มะเร็งของน้ำอิเล็กโทรไลต์ และ benzalkonium chloride ด้วยวิธี MTT assay	26
3.4 การรวบรวมข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	26
บทที่ 4 ผลการทดลอง	28
4.1 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางเคมีของน้ำอิเล็กโทรไลต์ด้วยพารามิเตอร์รูปแบบต่าง ๆ	28
4.2 การทดสอบคุณสมบัติทางจุลชีววิทยาของน้ำอิเล็กโทรไลต์และbenzalkonium chloride	30
4.2.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำอิเล็กโทรไลต์ และ benzalkonium chloride และbenzalkonium chloride	30
4.3 การวัด Intracellular protein leaking ด้วย วิธี dye-binding (Bradford)	34
4.4 ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำอิเล็กโทรไลต์ และ benzalkonium chloride กับสารฆ่าเชื้อชนิดต่าง ๆ	38
4.5 ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำอิเล็กโทรไลต์ ในการฆ่าเชื้อด้วยเทคนิคการสัมผัสรูปแบบต่าง ๆ	41
4.6 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ OMUF fibroblast ของน้ำอิเล็กโทรไลต์และสาร benzalkonium chloride	47
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย	**50**
บรรณานุกรม	**55**
ภาคผนวก	**60**
ประวัติผู้วิจัย	**64**

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ความเข้มข้นของสารประกอบคลอรีนที่ใช้ทำความสะอาด	7
2.2	สารฆ่าเชื้อและความเข้มข้นที่สามารถฆ่าเชื้อ coronavirus	13
4.1	คุณสมบัติทางเคมีของน้ำอิเล็กโทรไลต์โซเดียมไฮโปคลอไรต์และน้ำกลั่น	29
4.2	การทดสอบความคงตัวของคุณสมบัติทางเคมี pH และ ORPของน้ำอิเล็กโทรไลต์ตั้งแต่วันที่ 1 ถึง 7 หลังการผลิต	29
4.3	ผลการทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ของ 0.6% Sodium hypochlorite (Positive control) แสดงค่าในรูป mean±SD จาก 3 การทดสอบที่เหมือนกัน	31
4.4	ผลการทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำอิเล็กโทรไลต์ แสดงค่าในรูป mean±SD จาก 3 การทดสอบที่เหมือนกัน	32
4.5	ผลการทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ของ 0.05% benzalkonium chloride แสดงค่าในรูป mean±SD จาก 3 การทดสอบที่เหมือนกัน	33
4.6	ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำอิเล็กโทรไลต์ และ benzalkonium chloride กับสารฆ่าเชื้อชนิดต่าง ๆแสดงค่าในรูป mean±SD จาก 3 การทดสอบที่เหมือนกัน	39
4.7	ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำอิเล็กโทรไลต์ และ 0.05% benzalkonium chloride ในการฆ่าเชื้อบนแผ่นพลาสติกด้วยเทคนิคการสัมผัสแบบแช่ แสดงค่าในรูป mean±SD จาก 3 การทดสอบที่เหมือนกัน	43
4.8	ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำอิเล็กโทรไลต์ และ 0.05% benzalkonium chloride ในการฆ่าเชื้อบนแผ่นพลาสติกด้วยเทคนิคการสัมผัสแบบสเปรย์ แสดงค่าในรูป mean±SD จาก 3 การทดสอบที่เหมือนกัน	44

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4.9	ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำอิเล็กโทรไลต์ และ 0.05% benzalkonium chloride ในการฆ่าเชื้อบนแผ่นผ้าด้วยเทคนิคการสัมผัสแบบแช่ แสดงค่าในรูป mean±SD จาก 3 การทดสอบที่เหมือนกัน	45
4.10	ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำอิเล็กโทรไลต์ และ 0.05% benzalkonium chloride ในการฆ่าเชื้อบนแผ่นผ้าด้วยเทคนิคการสัมผัสแบบสเปรย์ แสดงค่าในรูป mean±SD จาก 3 การทดสอบที่เหมือนกัน	43

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
2.1	โครงสร้างทางเคมีของ benzalkonium chloride	15
4.1	ปริมาณโปรตีนที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากเซลล์จุลินทรีย์ทดสอบที่ถูกทำลายด้วย 0.6% Sodium hypochlorite ที่เวลาต่าง ๆ เปรียบเทียบกับเมื่อเชื้อสัมผัสกับสารละลาย 0.85% NSSแสดงค่าในรูป mean ± SD จาก 3 การทดสอบที่เหมือนกัน	35
4.2	ปริมาณโปรตีนที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากเซลล์จุลินทรีย์ทดสอบที่ถูกทำลายด้วยน้ำอิเล็กโทรไลต์ ที่เวลาต่าง ๆ เปรียบเทียบกับเมื่อเชื้อสัมผัสกับสารละลาย 0.85% NSSแสดงค่าในรูป mean±SD จาก 3 การทดสอบที่เหมือนกัน	36
4.3	ปริมาณโปรตีนที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากเซลล์จุลินทรีย์ทดสอบที่ถูกทำลายด้วย 0.05% benzalkonium chloride ที่เวลาต่าง ๆ เปรียบเทียบกับเมื่อเชื้อสัมผัสกับสารละลาย 0.85% NSS แสดงค่าในรูป mean±SD จาก 3 การทดสอบที่เหมือนกัน	37
4.4	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ OMUF fibroblast ของน้ำอิเล็กโทรไลต์	48
4.5	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ OMUF fibroblast ของ Benzalkonium chloride	49

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สัญลักษณ์และคำย่อ

CFU	=	ColonyForming Unit
Co.,Ltd	=	Company Limited
°C	=	Degree Celsius
et al.	=	and others
g	=	gram
µl	=	Microliter
mg	=	Milligram
ml	=	Milliliter
mM	=	Milimolar
TSA	=	Tryptic soy agar
TSB	=	Tryptic soy broth
NaCl	=	Sodium Choride
Nm	=	Nanometer
OD	=	optical density
%	=	Percent
spp./ sp.	=	species
v/v	=	volume/volume

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 1
บทนำ

ที่มาของปัญหา

โรคติดเชื้อเกิดจากการที่ร่างกายได้รับเชื้อก่อโรคเข้าสู่ร่างกายในปริมาณเพียงพอจนสามารถก่อโรคได้ เชื้อก่อโรคสามารถเข้าสู่ร่างกายได้หลายทาง เช่น การกลืนกิน การหายใจ หรือการสัมผัสผิวหนัง โดยหนึ่งในช่องทางแพร่เชื้อที่สำคัญ คือ การแพร่ผ่านตัวกลางที่ไม่มีชีวิต ซึ่งสามารถป้องกันได้ด้วยการรักษาความสะอาดของสภาพแวดล้อมด้วยการใช้น้ำยาฆ่าเชื้อเพื่อทำความสะอาดเป็นการลดความเสี่ยงในการติดเชื้อจากสภาพแวดล้อม

การทำความสะอาดและการฆ่าเชื้อเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในด้านสุขอนามัยพื้นฐานในครัวเรือนจนถึงในอุตสาหกรรมอาหาร สารฆ่าเชื้อโรคที่นิยมใช้ทั่วไป ได้แก่ สารประกอบคลอรีน กรดอินทรีย์ trisodium ฟอสเฟต iodophores และสารประกอบ quaternary ammonium compounds อย่างไรก็ตาม พบว่า สารประกอบคลอรีนเช่นไอโอดีนและสารประกอบ quaternary ammonium compounds มีประสิทธิภาพมากที่สุดแม้ว่ามันอาจจะมีฤทธิ์กัดกร่อนและระคายเคืองมากกว่าสารฆ่าเชื้อโรคอื่น ๆ ในประเทศสหรัฐอเมริกา การปนเปื้อนของสารต้านจุลชีพในผลิตภัณฑ์บางอย่างได้รับอนุญาต แต่การปนเปื้อนของสารต้านจุลชีพในผลิตภัณฑ์ดังกล่าวไม่ได้รับอนุญาตในสหภาพยุโรป เนื่องจากการปนเปื้อนของสารฆ่าเชื้อโรคในบางส่วนของผลิตภัณฑ์อันเกิดจากขั้นตอนการผลิตทำให้เกิดสารเคมีตกค้าง การกำจัดออกมีราคาสูง ลดประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ หรือทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของผลิตภัณฑ์ (Hricova *et al.*,2008) ดังนั้นการหาแนวทางใหม่ในการควบคุมจุลินทรีย์เพื่อลดหรือหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีที่เป็นพิษและอันตรายจึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่น่าสนใจ

การใช้สารเคมีฆ่าเชื้อในกลุ่มอนุพันธ์ เช่น Quaternary Ammonium Compound (Quat) กำลังเป็นที่นิยมและถูกนำไปใช้อย่างกว้างขวางในหลายกลุ่มอุตสาหกรรม เนื่องจากสารประกอบในกลุ่มนี้ได้ลดข้อด้อยของสารฆ่าเชื้อในกลุ่มหลักลงไป ทั้งยังมีคุณสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดประจุบวก (Cationic surfactant) มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียสามารถทำงานได้ในสภาพแวดล้อมที่เป็นด่างสูง (คนึงนิจ, 2552) เป็นสารเคมีที่ละลายได้ดีในเอธานอล (Ethathanol) และอะซีโตน (Acetone) แต่ละลายได้ช้ากว่าในน้ำ โดยส่วนใหญ่มีจุดประสงค์เพื่อทำความสะอาดและทำลายเชื้อโรค (ธนิดา และคณะ, 2556) ตัวอย่างของสารเคมีในกลุ่มนี้คือ benzalkonium chloride ข้อดีคือ มีความเป็นอันตรายต่อผู้ใช้น้อย ไม่กัดกร่อนพื้นผิว จัดเป็นสารฆ่าเชื้อที่ออกฤทธิ์กว้างต่อเชื้อจุลชีพ สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย, รา โปรโตซัว และเชื้อไข้หวัดใหญ่ และเชื้อโคโรน่าไวรัสได้ และมี

ประสิทธิภาพในการปกป้องบนผิวหนังและพื้นผิวต่าง ๆ ได้ยาวนานกว่าแอลกอฮอล์ (วรรณพร, 2558) ข้อจำกัดคือประสิทธิภาพลดลงเมื่อสัมผัสสารอินทรีย์ และการเป็นสารลดแรงตึงผิวประจุบวกซึ่งก่อความระคายเคือง และกัดกร่อนตามความเข้มข้นและปริมาณที่รับสัมผัส (ภาณุพงศ์, 2554; ธนกร, 2012)

ตัวเลือกในการการทำความสะอาดและการฆ่าเชื้ออีกประเภทหนึ่งคือ น้ำอิเล็กโทรไลต์ (electrolyzed water; EW) ซึ่งหมายถึง น้ำที่ผ่านการแยกด้วยไฟฟ้าซึ่งมีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด และมีการทดสอบแล้วว่าไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค เนื่องจากไม่มีสารพิษตกค้างในผลผลิตและสภาพแวดล้อม (Sakurai *et al.*,2003) ปัจจุบัน EW กำลังได้รับความนิยมในการเป็นสารต้านจุลชีพในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากมีคุณสมบัติฆ่าหรือลดปริมาณแบคทีเรียบนพื้นผิวของทั้งผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปและบรรจุภัณฑ์อาหารได้ ในญี่ปุ่น กรมสุขภาพแรงงาน กระทรวงสวัสดิการได้อนุมัติให้ EW เป็นสารเติมแต่งอาหาร นอกจากนี้สำนักงานคุ้มครองสิ่งแวดล้อมของสหรัฐอเมริกายังได้อนุมัติให้เครื่องกำเนิด EW จากพลังงานไฟฟ้าสามารถใช้ในอุตสาหกรรมอาหารอีกด้วย

ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการงานวิจัยในครั้งนี้ เพื่อทดสอบคุณสมบัติทางด้านเคมีและประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่สำคัญทางการแพทย์ด้วย น้ำอิเล็กโทรไลต์ และ benzalkonium chloride โดยการทดสอบหาระยะเวลาและวิธีการที่เหมาะสมในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ผ่านการทดสอบที่จำลองสถาณการณ์การปนเปื้อนบนพื้นผิวของวัตถุและผ้าในรูปแบบต่าง ๆ มากไปกว่านั้นยังทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงต่อสารดังกล่าวด้วยเทคนิคทางห้องปฏิบัติการ เพื่อให้เกิดความมั่นใจในความปลอดภัยและเป็นแนวทางในการปฏิบัติเพื่อสุขอนามัยที่เหมาะสมในอนาคต

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1.ทดสอบคุณสมบัติทางเคมีและจุลชีววิทยาของน้ำอิเล็กโทรไลต์ และ benzalkonium chloride ด้วยเทคนิคทางห้องปฏิบัติการ

2.ทดสอบระยะเวลาและวิธีการที่เหมาะสมในการใช้น้ำอิเล็กโทรไลต์ และ benzalkonium chloride เพื่อยับยั้งการการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคสำคัญในทางเดินหายใจและทางเดินอาหาร ผ่านการทดสอบที่จำลองสถาณการณ์การปนเปื้อนบนพื้นผิวของวัตถุและผ้าในรูปแบบต่างๆ

3.ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity Assay) ที่ไม่ใช่เซลล์มะเร็งของน้ำอิเล็กโทรไลต์ และ benzalkonium chloride ด้วยวิธี MTT assay

ขอบเขตของการวิจัย

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

การวิจัยนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง โดยขั้นแรกเป็นการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของน้ำอิเล็กโทรไลต์ และ benzalkonium chloride (ความเข้มข้น 0.05 %) จากนั้นนำมาศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพที่ก่อโรคที่สำคัญทางการแพทย์ต่อเชื้อแบคทีเรีย ทดสอบจำนวน 14 สายพันธุ์ คือ *Acinetobacter baumannii, Bacillus subtilis, Enterobacter cloacae, Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Klebsiella aerogenes, Klebsiella pneumoniae, Listeria monocytogenes, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella Typhi, Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus saprophyticus* เชื้อรา ทดสอบจำนวน 2 สายพันธุ์ คือ *Candida albicans* และ *Cryptococcus neoformans* ที่ก่อโรคสำคัญทางการแพทย์ด้วยเทคนิคทางห้องปฏิบัติการตามช่วงเวลาการสัมผัสที่กำหนด

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบคุณสมบัติทางเคมีและจุลชีววิทยาของน้ำอิเล็กโทรไลต์ เพื่อนำไปต่อยอดในงานวิจัยอื่น ๆ ได้

2. ทราบระยะเวลาและวิธีการที่เหมาะสมในการใช้น้ำอิเล็กโทรไลต์เพื่อยับยั้งการการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคสำคัญทางการแพทย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

3. ความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity Assay) ที่ไม่ใช่เซลล์มะเร็งของน้ำอิเล็กโทรไลต์ และ benzalkonium chloride เพื่อความปลอดภัยในการใช้งาน

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับสารฆ่าเชื้อโรค

สารฆ่าเชื้อโรค (Disinfectant) หมายถึง สารที่ใช้กำจัดเชื้อจุลินทรีย์ได้หลากหลาย ไม่เจาะจง แต่มีความรุนแรงทำให้ไม่สามารถใช้กับพื้นผิวสิ่งมีชีวิตได้เช่นผิวหนัง จึงเหมาะสำหรับใช้กับพื้นผิวของสิ่งของต่างๆ ที่ไม่มีชีวิตเพื่อยับยั้งการแพร่กระจายของเชื้อ (พิณทิพย์ พงษเพ็ชร, 2540; กฤษณ์ ถิรพันธุ์เมธี, 2563; ภาณุพงศ์ มหาพรหม, 2020)

สารระงับเชื้อ (Antiseptic) หมายถึง สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ และใช้กำจัดเชื้อจุลินทรีย์บนผิวหรือเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต ซึ่งสารบางชนิดอาจเป็นได้ทั้ง disinfectant และ antiseptic เมื่อความเข้มข้นเปลี่ยน เช่น chlorhexidine ที่ความเข้มข้น 0.02% ใช้เป็นน้ำยาบ้วนปาก จัดเป็น antiseptic แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 0.5% จะเป็น disinfectant ใช้ทำความสะอาดพื้นผิวได้

สารฆ่าเชื้อสามารถแบ่งตามประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อได้เป็น 3 ระดับ คือ

1.สารฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูง (high level disinfectants) เป็นกลุ่มที่มีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อสูง สามารถฆ่าเชื้อได้ทุกชนิด ส่วนมากใช้ทำความสะอาดอุปกรณ์ทางการแพทย์ที่ไม่สามารถนึ่งฆ่าเชื้อได้ เช่น formaldehyde, 30% hydrogen peroxide, chlorinated compounds

2. สารฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพปานกลาง (intermediate level disinfectants) สารในกลุ่มนี้สามารถทำลายแบคทีเรียและไวรัสได้เกือบทุกชนิด นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการและโรงพยาบาล เช่น sodium hypochlorite, ethyl alcohol, isopropyl alcohol

3.สารฆ่าเชื้อประสิทธิภาพต่ำ (low level disinfectants) สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส และเชื้อราได้บางชนิด เช่น 3% hydrogen peroxide

2.2 ชนิดของน้ำยาฆ่าเชื้อกลุ่มที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย ได้แก่

2.2.1 ฟีนอลและอนุพันธ์ (Phenols and derivatives)

ตัวอย่างเช่น Phenol, Cresols, Diphenyl compound สารในกลุ่มนี้มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อดี ฆ่าเชื้อได้เร็ว และออกฤทธิ์ได้ดีในสภาวะกรด แต่ไม่มีผลต่อสปอร์ของเชื้อ นอกจากนี้ฤทธิ์จะลดลงเมื่อมีสารอินทรีย์ เช่น เลือดหรือหนอง อยู่ด้วย รวมถึงอาจระคายเคืองต่อผิวหนังและเนื้อเยื่อ ส่งผลให้ความนิยมในการใช้สารกลุ่มนี้ลดลง สารฟีนอลจะทำให้โปรตีนเสียสภาพ โดยทั่วไปจะใช้ในการฆ่าเชื้ออุปกรณ์ เช่น โถปัสสาวะผู้ป่วย และเครื่องมือในห้องปฏิบัติการ ปัจจุบันมีการนำอนุพันธ์ฟีนอลชนิดที่ไม่ระคายเคือง เช่น chloroxylenol ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักใน Dettol® และ Zurthol® ที่

นิยมใช้ในครัวเรือน นอกจากนั้นยังนิยมใช้ในสถานพยาบาลด้วย เนื่องจากมีความคงตัวกว่าและยังมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้หลากหลาย แม้มีสารอินทรีย์ปะปน นอกจากนี้ที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ ยังสามารถใช้เป็นสารระงับเชื้อ (antiseptic) บนผิวหนังได้ด้วย

คุณสมบัติ

1.สามารถฆ่าเชื้อโรคได้หลายชนิดรวมทั้งเชื้อวัณโรค แต่ไม่สามารถฆ่าสปอร์ได้

2.เป็นสารเคมีในกลุ่มลดแรงตึงผิว ช่วยให้ทำความสะอาดง่ายขึ้น

3.ไม่กัดกร่อนและไม่ให้สารตกค้าง

การใช้งาน

1.ใช้ทำความสะอาดพื้นผิวและอุปกรณ์

2.ใช้เป็นน้ำยาแช่ก่อนล้างทำความสะอาด

ข้อจำกัด

ระคายเคืองผิวหนัง ต้องระมัดระวังไม่ให้สัมผัสผิว

2.2.2 ฮาโลเจน (Halogens)

สารในกลุ่มนี้ที่นำมาใช้เป็นน้ำยาฆ่าเชื้อมี 2 ชนิด คือ

- สารประกอบคลอรีน (Chlorine และ Chlorine releasing substances) ได้แก่ Calcium Hypochlorite, 1,3-Dichloro-5,5-Dimethylhydantoin, Dichloroisocyanuric Acid and its salts (เช่น Sodium Dichloroisocyanurate), Sodium Hypochlorite, Trichloroisocyanuric acid and its salts, Chloramine โดยเมื่อใช้สารกลุ่มนี้ละลายน้ำแล้วจะให้ Hypochlorous acid และ available Chlorine ซึ่งออกฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ โรคความแรงของสารประกอบนี้จะแสดงในรูปของ available chlorine ดังตารางที่ 2.1 โดยคลอรีนจะทำให้โปรตีนเสียสภาพโดยการจับกับโครงสร้างโปรตีนส่วนที่เป็นอะมิโนอิสระ (free amino group) มีการใช้คลอรีนฆ่าเชื้อในน้ำประปา รวมถึงในสระว่ายน้ำ สารประกอบคลอรีนที่นิยมใช้เป็นน้ำยาฆ่าเชื้อ คือ โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (sodium hypochlorite) หรือน้ำยาฟอกขาวหรือคลอรีนน้ำ ซึ่งใช้เป็นสารฆ่าเชื้อในผลิตภัณฑ์ในครัวเรือนมีชื่อการค้าหลายยี่ห้อเช่น ไฮเตอร์ (Haiter®), คลอร็อกซ์ (Clorox®) และผลิตภัณฑ์อื่นๆ โดยที่วางจำหน่ายส่วนมากเป็นชนิดเข้มข้นต้องเจือจางให้มีความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ เท่ากับ 0.5% โดยปริมาตร (v/v) ข้อดีของคลอรีน คือมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อสูงและรวดเร็ว แต่ก็มีข้อเสียคือมีฤทธิ์กัดกร่อน และประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อลดลงเมื่อมีสารอินทรีย์อื่นอยู่ด้วย นอกจากนี้ ยังมีผลิตภัณฑ์ที่สามารถปลดปล่อยคลอรีนออกมาอย่างช้าๆ (slow release) คืออยู่ในรูปคลอราไมน์ (chloramines) ซึ่งจะแตกตัวอย่างช้าๆ ให้คลอรีนอิสระสู่สารละลาย ใช้ในการทำความสะอาดและซักล้าง รวมทั้งฆ่าเชื้อบนผิวหนังและเยื่อบุเนื้อเยื่ออ่อน เนื่องจากไม่ก่อความระคายเคือง

ข้อดีของโซเดียมไฮโปคลอไรด์

1.ราคาถูก

2.สามารถฆ่าเชื้อได้ดีขึ้นกับความเข้มข้นของตัวยาจึงเป็นทั้ง Antiseptic และ Disinfectant (ความเข้มข้นจะต้องเป็นเปอร์เซ็นต์ของโซเดียมไฮโปคลอไรด์ หรือ ppm ของavailable chlorine โดย 1% NaOCl=10,000 ppm available chlorine)

3.ความเข้มข้น 0.10-0.25 ppm จะสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่ได้ใน 15-30วินาที

4.สามารถฆ่าเชื้อวัณโรคได้แต่ไม่สามารถฆ่าสปอร์ได้

5.ที่ความเข้มข้น 0.5-1%สามารถทำลายไวรัสได้ถึง 100%เช่น HB virus และ HTLV-3 (AIDS) ความเข้มข้น 0.5%Sod hypochlorite (Dakin's Solution) สามารถใช้เป็นAntisepticใช้ล้างแผลสกปรกเพื่อละลายและดับกลิ่นเนื้อเยื่อที่ตายแล้ว

การใช้ประโยชน์

Dakin'S solution ใช้ล้างคลองรากฟัน ในงานทันตกรรม

ข้อเสียของโซเดียมไฮโปคลอไรต์

1.เป็นสารเคมีที่ไม่คงตัวต้องผสมน้ำยาใหม่ทุกวัน

2.ระคายเคืองเนื้อเยื่อและผิวหนัง

3.กลิ่นฉุน กัดกร่อนโลหะ

4.ใช้ทำความสะอาดพื้นผิววัตถุได้การใช้งานต้องสวมถุงมือทำความสะอาดใส่ Mask แว่นตา ป้องกันและเสื้อคลุม

5.ประสิทธิภาพจะลดลงเมื่อสัมผัสกับอินทรีย์วัตถุจึงควรทำความสะอาดเครื่องมือก่อนฆ่าเชื้อด้วยวิธีนี้

2.2.3 Chlorhexidine salts

สารในกลุ่ม ได้แก่ Chlorhexidine Gluconate, Chlorhexidine Acetate

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 2.1 ความเข้มข้นของสารประกอบคลอรีนที่ใช้ทำความสะอาด (จาก WHO safety guideline 3rd ed)

	พื้นที่สะอาด	พื้นที่สกปรก
ปริมาณคลอรีนที่ต้องการ	**0.1% (1 กรัม/ลิตร)**	**0.5% (5 กรัม/ลิตร)**
- Sodium hypochlorite (5% available Cl)	20 มิลลิลิตร/ลิตร	100 มิลลิลิตร/ลิตร
- Calcium hypochlorite (70% available Cl)	1.4 กรัม/ลิตร	7.0 กรัม/ลิตร
- Sodium dichloroisocyanurate powder (60% available Cl)	1.7 กรัม/ลิตร	8.5 กรัม/ลิตร
- Sodium dichloroisocyanurate tablet (1.5 g available Cl/ tab)	1 เม็ด/ลิตร	4 เม็ด/ลิตร
- Chloramine (25% available Cl)	20 กรัม/ลิตร	20 กรัม/ลิตร

2.2.4 สารประกอบไอโอดีน (Iodine)

มีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อเช่นเดียวกับคลอรีน และหากเชื้อนั้นเป็นราหรือแบคทีเรีย สารไอโอดีนสามารถทำลายสปอร์ของมันด้วย โดยไอโอดีนจะจับกับกรดอะมิโนไทโรซีน (tyrosine) ทำให้โปรตีนเสียสภาพ อย่างไรก็ตาม เนื่องจากไอโอดีนละลายน้ำได้ไม่ดีนัก ในการเตรียมเป็นสารละลายจึงต้องใช้ตัวละลายอื่น เช่น ไอโอดีน ละลายในเอทธานอล หรือเตรียมในรูปโปแตสเซียมไอโอไดด์ในรูปทิงเจอร์ไอโอดีนใช้ฆ่าเชื้อบนผิวหนัง แต่มีข้อเสียคือ มีสีเปรอะเปื้อนและแสบ จึงได้มีการพัฒนาให้อยู่ในรูปที่ค่อยๆ ปลดปล่อยไอโอดีนออกมา (iodophore) เมื่อใช้ทาแล้วไม่แสบและสามารถล้างออกได้แต่เนื่องจากถูกปลดปล่อยออกมาอย่างช้าๆ ฤทธิ์จึงไม่รุนแรงเพียงพอที่จะทำลายสปอร์ของราหรือแบคทีเรียได้ เช่น ผลิตภัณฑ์ Betadine®, Isodine®

คุณสมบัติ

1.ออกฤทธิ์ในการทำลายจุลินทรีย์ โดย free Iodine (I2) ผ่านผนังเซลไปทำลายโปรตีนและทำลายขบวนการสร้าง nucleic acid ของเชื้อจุลินทรีย์อย่างรวดเร็ว

2.ประสิทธิภาพ ของการฆ่าเชื้อขึ้นอยู่กับปริมาณ free Iodine ซึ่งเกิดจากการเจือจางน้ำยาอย่างถูกต้องตามข้อกำหนดของบริษัทผู้ผลิตอย่างเคร่งครัด

3.ใช้ทั้งเป็นยาระงับเชื้อ (Antiseptic)และยาฆ่าเชื้อ (Low-level ถึง intermediate–level disinfectant)

4.สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิดรวมทั้งเชื้อวัณโรคกรณีสัมผัสนาน 5 – 10 นาที

ประโยชน์ที่ใช้

1.ใช้ฆ่าเชื้อบนพื้นผิว เช่น ยูนิตทำฟัน ด้ามปรับโคมไฟ

2.ใช้ฆ่าเชื้อวัสดุฟันพิมพ์ปาก หรือ ฟันปลอม

3.ใช้เป็นน้ำยาแช่เครื่องมือก่อนล้าง

ข้อจำกัด

1.น้ำยาที่ผสมแล้วต้องเปลี่ยนใหม่ทุกวันเนื่องจากประสิทธิภาพสูงสุดในการฆ่าเชื้อวัณโรคจะเปลี่ยนไปหลังจากผสมแล้ว 24 ชั่วโมง

2.ต้องใช้น้ำกลั่นในการเจือจางน้ำยาที่จะใช้งาน หากเป็นน้ำกระด้างน้ำยาจะหมดประสิทธิภาพ

3.กัดกร่อนพื้นผิวโลหะ และติดสี ตกค้างกรณีใช้ไปนาน ๆ (ต้องเช็คด้วยแอลกอฮอร์หลังจากแช่น้ำยาแล้ว

4.เวลาที่สัมผัสน้ำยาอย่างน้อย 10 นาที จึงจะมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ

5.สารอินทรีย์จะทำให้ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อลดลง

2.2.5 แอลกอฮอล์ (Alcohols)

สารกลุ่มนี้มีฤทธิ์ต้านเชื้อที่ดีต่อทั้งแบคทีเรีย รา ไวรัส และมีผลต่อเชื้อวัณโรค (Mycobacterium) แต่ไม่สามารถทำลายสปอร์ของราหรือแบคทีเรียได้และความสามารถในการแทรกซึมผ่านสารอินทรีย์ต่ำมาก แอลกอฮอล์ที่นิยมใช้เป็นยาฆ่าเชื้อคือ ethanol และ isopropanol ซึ่งระเหยได้ จึงเหมาะกับการฆ่าเชื้อบนผิวหนังก่อนฉีดยา โดยทั่วไปแล้ว ethanol ที่ความเข้มข้น 60-80% โดยปริมาตร (v/v) สามารถฆ่าเชื้อไวรัสที่มีเปลือกหุ้ม (envelope) และไวรัสที่ไม่มีเปลือกหุ้มบางชนิดได้ แต่ที่ความเข้มข้น 70% โดยปริมาตร (v/v) จะมีประสิทธิภาพดีที่สุดและเป็นความเข้มข้นที่แนะนำให้ใช้ ความสามารถในการฆ่าเชื้อของแอลกอฮอล์จะแปรผันกับจำนวนองค์ประกอบคาร์บอนที่มี หากมีคาร์บอนมากจะมีความสามารถฆ่าเชื้อได้ดีแต่ก็ก่อให้เกิดพิษมากตามไปด้วยเช่นกัน

คุณสมบัติ

1.อัลกอฮอล์ออกฤทธิ์โดยการตกตะกอนโปรตีนและละลายไขมันที่ เยื่อหุ้มเซลล์ทำให้โปรตีนเสียสภาพและทำลายผนังเซลล์ของเชื้อ

2.เอทธิลแอลกอฮอล์ สามารถฆ่าเชื้อวัณ โรคได้และไวรัสพวก herpes, influenza, rabies ได้แก่ พวกไวรัสตับอักเสบและAIDS ยังไม่มีหลักฐานแน่ชัดขณะที่ไฮโซโพรพิลแอลกอฮอล์สามารถฆ่าได้ระยะเวลาในการฆ่าเชื้อเร็วประมาณ 1-2 นาทีฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งกรัมบวก และกรัมลบ

3.ไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อโรคได้สูงกว่า เอทธิลแอลกอฮอล์ แต่ระเหยช้ากว่าทำให้ ผิวแห้งและระคายเคืองผิวมากกว่า

4.ความเข้มข้นที่ดีที่สุดคือ 70% เพราะมีปริมาณแอลกอฮอล์น้อยที่สุดที่จะได้ผลดีที่สุด และมีปริมาณน้ำที่พอเหมาะที่จะทำให้ผิวหนังเปียกได้ดี ช่วยให้แอลกอฮอล์แทรกซึมกระจายตัวได้ดีและระเหยช้าๆ ไม่เป็นอันตรายต่อผิวหนังมากถ้าความเข้มข้นมากกว่า 80% ขึ้นไปประสิทธิภาพจะลดลงที่ความเข้มข้น 70%แอลกอฮอล์ทั้งสองชนิดนี้ใช้ได้ทั้งเป็นสารระงับเชื้อ (Antiseptic) และสารฆ่าเชื้อ (Disinfectant) นอกจากจะใช้เป็นสารฆ่าเชื้อโดยลำพังแล้วยั งใช้ร่วมกับสารฆ่าเชื้ออื่น ๆเช่น savlon 1:30 in alcohol 70%ใช้แช่เครื่องมือกรณี ต้องการฆ่าเชื้อ เร่งด่วน 2-5 นาที เป็นต้น

ข้อจำกัด ของแอลกอฮอล์

ประสิทธิภาพจะลดลงเมื่อสัมผัสสารอินทรีย์ เนื่องจาก แอลกอฮอล์ไม่ละลายโปรตีนในเลือดหรือน้ำลาย กัดกร่อน ทำลาย เลนส์และ เครื่องใช้พลาสติก

2.2.6 สารลดแรงตึงผิว Surfactants (Surface active agents; Cationic surfactants)

สารในกลุ่มนี้มีทั้งที่เป็นประจุลบ (anionic) หรือประจุบวก (cationic) หรืออาจมีทั้งสองประจุในโมเลกุลเดียวกัน (amphoteric) และบางชนิดไม่มีประจุ (non-ionic) สารในกลุ่มนี้มีฤทธิ์ในการชะล้างด้วย โดยชนิด anionic และ non-ionic มีฤทธิ์ชะล้างสูงแต่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อต่ำ จึงไม่นิยมใช้เป็นสารฆ่าเชื้อ ส่วนชนิด amphoteric สามารถแตกตัวให้ cation anion และ zwitter ion (มีขั้วบวกและขั้วลบเท่าๆ กันบนโมเลกุลเดียว) จึงมีคุณสมบัติทั้งเป็นสิ่งชะล้างและสารฆ่าเชื้อ สำหรับสาร cationic ที่สำคัญในการใช้เป็นสารฆ่าเชื้อ เช่น cetrimide และ benzalkonium chloride ซึ่งมีผลต่อแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ และรา แต่ไม่มีผลต่อสปอร์ สารกลุ่มนี้มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อดี ไม่มีสี กลิ่น รส มีความคงตัวสูงสามารถใช้กับผิวหนัง หรือบริเวณเนื้อเยื่ออ่อนได้เนื่องจากไม่ระคายเคือง จึงนิยมใช้ในงานผ่าตัด สูตินรีเวช แต่มีข้อเสียคือเกิดฟองและฤทธิ์ฆ่าเชื้อจะลดลงเมื่อมีสารอินทรีย์อยู่

2.2.7 อัลดีไฮด์ Aldehydes

สารในกลุ่ม aldehydes ที่ใช้เป็นสารฆ่าเชื้อมีอยู่ 2 ตัวคือ formaldehyde และ glutaraldehyde สารนี้จะไปสร้างแรงยึดเกาะกับโปรตีนทำให้โปรตีนไม่สามารถทำงานได้ formaldehyde มีฤทธิ์ทำลายเชื้อได้ทั้งในรูปสารละลายและแก๊ส แต่ก่อให้เกิดความระคายเคืองและเกิดผลข้างเคียงอื่น ๆ จึงไม่นิยมใช้เป็นสารฆ่าเชื้อ ยกเว้นใช้เป็นสารกันเสียในการดองอวัยวะต่าง ๆ ส่วน glutaraldehyde มีความระคายเคืองน้อยกว่าและมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีกว่า glutaraldehyde เป็นหนึ่งในสารเคมีไม่กี่ชนิดที่ใช้เป็น sterilizing agent โดยจะใช้ในรูปสารละลายตั้งแต่ 2% มีผลฆ่าทั้งแบคทีเรีย Mycobacterium ราและไวรัสภายใน 10 นาที สามารถฆ่าสปอร์ได้แต่ใช้เวลานานกว่าปกติ ปัจจุบันใช้เป็นสารฆ่าเชื้อสำหรับอุปกรณ์การแพทย์ในโรงพยาบาล

คุณสมบัติ

1.กลูตาราลดีไฮด์ ที่ความเข้มข้น≥ 2% จัดเป็นสารฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูง

2.ไม่ใช้ เป็นAntiseptic เพราะมีฤทธิ์ระค ายเคืองต่อเนื้อ เยื่อ

3.มีฤทธิ์ฆ่าสปอร์มากกว่า formaldlehyde 2-8 เท่า

4.สามารถฆ่า vegetative cell ของแบคทีเรียใน 5 นาที

5.ฆ่าไวรัสตับอักเสบและเอดส์ได้ภายใน 15-30 นาที

6.ความสามารถในการฆ่าสปอร์ ขึ้นอยู่กับ ชนิดของเชื้อและจำนวนเชื้อ

7.การฆ่าเชื้อวัณโรคจะฆ่าได้ช้าและมีฤทธิ์ฆ่าวัณโรคได้น้อยกว่าฟอร์มาดิไฮด์,ไอโอไดน์ และแอลกอฮอล์

8.มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้แม้ ปนเปื้อนเลือดหรือสารคัดหลั่ง

9.ไม่ทำลายเนื้อพลาสติกและเลนส์

10.มีฤทธิ์กัดกร่อนโลหะต่ำจึงเหมาะที่ จะนำมาใช้ปลอดเชื้อวัตถุที่ไม่สามารถทนความร้อนได้

ข้อจำกัดของกลูตาราลดีไฮด์

1.ราคาแพง

2.มีกลิ่นฉุนระคายเคืองต้องล้างออกให้หมดด้วยน้ำกลั่นหลังแช่น้ำยา ก่อนแช่น้ำยาต้องล้างสารอินทรีย์ออกให้หมดและเช็ดให้แห้งสนิทก่อน

3.ต้องระมัดระวังเรื่องวันหมดอายุ

4.ต้องสวมถุงมือใส่mask ทุกครั้งที่ใช้น้ำยานี้

5.บริเวณที่ใช้ต้องมีอากาศถ่ายเทสะดวกเพราะยาระเหยได้บ้างและมีฤทธิ์ระคายเคือง

6.น้ำยาจะมีประสิทธิภาพอยู่ได้ 28 วันแต่ถ้าแช่เครื่องมือซ้ำไปซ้ำมาน้ำยาอาจ neutralized หรือ diluted ดังนั้นจึงใช้ต่อเนื่องเพียง 2 สัปดาห์แล้ว ควร เปลี่ยน

2.2.8 ควอเทอนารีแอมโมเนียมคอมเพานด์ (Quat) ตัวอย่างเช่น benzalkonium chloride

คุณสมบัติ

1.เป็นสารช่วยลดแรงตึงผิว ช่วยในการทำความสะอาด

2.มีอันตรายต่อผู้ใช้น้อย ไม่ระคายเคืองผิวหนังและไม่กัดกร่อนพื้นผิว

3.น้ำยาเมื่อเจือจางแล้วมีความคงตัวไม่จำเป็นต้องเปลี่ยนทิ้งทุกวัน

4.สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิดรวมทั้ง Virus Aidsแต่ไม่สามารถ ฆ่าสปอร์ เชื้อวัณโรค และไวรัสตับอักเสบได้ จึงจัดเป็นน้ำยาฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพต่ำ ไม่สามารถนำมาใช้ฆ่าเชื้อเครื่องมือได้ สามารถใช้ทำความสะอาดพื้นผิวภายนอกเท่านั้น

5.ใช้เวลาในการสัมผัสพื้นผิว 10 นาทีในการฆ่าเชื้อ

6.ทำให้เกิดสารตกค้างซึ่งไม่ย่อยสลายโดยธรรมชาติ

7.ประสิทธิภาพลดลงเมื่อสัมผัสสารอินทรีย์

2.2.9 ควอเทอนารีแอมโมเนียมคอมเพานด์ผสมแอลกอฮอล์ หรือ ควอทแอลกอฮอล์ (Quat-alcohol)

เป็นน้ำยาฆ่าเชื้อชนิดใหม่ซึ่งนำข้อดีของน้ำยาในกลุ่มแอลกอฮอล์มาลดข้อด้อยของน้ำยาในกลุ่มควอท จึงเป็นการผสมผสานกันได้น้ำยาฆ่าเชื้อใหม่ จัดอยู่ในประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อปานกลาง ตัวอย่างเช่น didecyldimethylammonium chloride, diisobutylphenoxyethoxyethyl dimethyl benzyl ammonium chloride

คุณสมบัติ

1.เวลาในการสัมผัสพื้นผิวในการทำลายเชื้อลดลงครึ่งหนึ่ง (จากเดิม 10 นาที)

2.ไม่มีสารตกค้างที่พื้นผิว ไม่จำเป็นต้องล้างน้ำหลังจากขึ้นจากน้ำยา

3.ไม่กัดกร่อนทุกพื้นผิว เช่น โลหะ แก้ว พลาสติก

4.ไม่ระคายเคืองผิวหนังหรือเนื้อเยื่อ (เมื่อเจือจางแล้ว)

5.ประสิทธิภาพไม่ลดลงเมื่อสัมผัสกับสารอินทรีย์

6.ไม่ก่อให้เกิดสารตกค้างที่ไม่ย่อยสลายในสิ่งแวดล้อม

7.กรณีที่ผสมแอลกอฮอล์มากกว่า 40 % โดยมีปริมาณ quat มากกว่า 0.20% แต่ไม่มากกว่า 0.30 % สามารถฆ่าเชื้อวัณโรคได้ จึงจัดเป็นน้ำยาฆ่าเชื้อที่ประสิทธิภาพปานกลาง

การใช้ประโยชน์

1.ใช้แช่เครื่องมือก่อนล้างทำความสะอาด

2.ทำความสะอาดพื้นผิวในคลินิกทันตกรรม

3.ฆ่าเชื้อเครื่องมือและวัสดุทันตกรรมในกลุ่ม Semicritcal

คุณสมบัติของน้ำยาฆ่าเชื้อที่ดี

1.สามารถทำลายเชื้อได้รวดเร็วและหลายชนิด

2.สามารถฆ่าเชื้อวัณโรคเชื้อไวรัสชนิดมีปลอก (AIDS) และ ชนิดไม่มีปลอก (ไวรัสตับอักเสบ)

3.มีความคงตัวแม้อยู่ในสถาวะที่เป็นกรดหรือด่าง

4.ประสิทธิภาพไม่ลดลงเมื่อสัมผัสสารอินทรีย์

5.ไม่กัดกร่อนพื้นผิว (โลหะ พลาสติก ยาง)

6.ไม่ระคายเคืองผิวหนัง เยื่อเมือก ไม่เป็นอันตรายต่อร่างกาย

7.ไม่มีกลิ่นเหม็น

8.ไม่มีผลกระทบต่อระบบบำบัดน้ำเสีย

9.ราคาเหมาะสม

นอกเหนือจากคุณสมบัติเฉพาะตัวของสารฆ่าเชื้อ ยังมีปัจจัยที่อื่นมีผลต่อประสิทธิภาพของการกำจัดเชื้อ ได้แก่

1. **ปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้น** ถ้ามีปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นมาก ก็จะส่งผลให้ใช้เวลานานในการกำจัดเชื้อ
2. **ประเภทของจุลินทรีย์** เชื้อแต่ละชนิดมีความไวต่อกระบวนการฆ่าเชื้อแตกต่างกัน แบคทีเรียที่มีชีวิต (vegetative form) จะไวต่อวิธีการต่างๆ มากกว่าสปอร์
3. **สภาพแวดล้อม** สารอินทรีย์ต่างๆ เช่น เลือด หนอง มีผลต่อการออกฤทธิ์ของสารฆ่าเชื้อ เนื่องจากสารเหล่านั้นจะดูดซับสารเอาไว้ทำให้ความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อที่ไปถึงตัวเชื้อลดลง
4. **ระยะเวลา** สารฆ่าเชื้อทุกชนิดต้องอาศัยเวลาในการฆ่าเชื้อ (contact time) ดังนั้นหลังจากเช็ดหรือถูพื้นผิวด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อแล้วควรปล่อยทิ้งไว้สักระยะหนึ่งไม่ควรล้างออกทันที โดยทั่วไป เวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อนานกว่าจะฆ่าเชื้อได้มากกว่า
5. **ความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อ** สารฆ่าเชื้อบางชนิดที่ความเข้มข้นต่ำมีฤทธิ์เพียงยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อหรือจัดเป็น microbiostatic แต่ที่ความเข้มข้นสูงมีฤทธิ์เป็น microbicidal คือ ทำลายเชื้อได้

การเลือกใช้น้ำยาฆ่าเชื้อ เช่นในกรณีของไวรัสโคโรน่า COVID-19 ทาง Centers for Disease Control and Prevention (CDC) ของสหรัฐอเมริกาและองค์การอนามัยโลก (WHO) ได้แนะนำให้ใช้ ethyl alcohol (ethanol) ที่ความเข้มข้นอย่างน้อย 70% โดยปริมาตร (v/v) หรือ sodium hypochlorite เข้มข้น 0.5% ในการทำความสะอาดพื้นผิว นอกจากนี้ทาง National Environmental Agency (NEA) ของประเทศสิงคโปร์ ได้แนะนำชนิดของสารฆ่าเชื้อที่สามารถใช้กับ Coronavirus สายพันธุ์ที่เคยมีการศึกษามาก่อนไว้หลายชนิด แต่เนื่องจากเชื้อ COVID-19 เป็นเชื้อสายพันธุ์ใหม่ จึงยังไม่มีข้อมูลการศึกษา ข้อมูลต่างๆ จึงเป็นข้อมูลที่ได้จากการศึกษากับ Coronavirus ที่เคยมีรายงานไว้เท่านั้น นอกจากนี้ สารฆ่าเชื้อในปัจจุบันส่วนมากจะจำหน่ายในรูปแบบความเข้มข้นสูง ดังนั้นก่อนใช้ผู้บริโภคต้องนำมาเจือจางด้วยน้ำให้มีความเข้มข้นไม่น้อยกว่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 สารฆ่าเชื้อและความเข้มข้นที่สามารถฆ่าเชื้อ coronavirus (% โดยปริมาตร v/v)

น้ำยาฆ่าเชื้อ	ความเข้มข้น
Accelerated hydrogen peroxide	0.5%
Benzalkonium chloride (alkyl dimethyl benzyl ammonium chloride)	0.05%
Chloroxylenol	0.12%
Ethyl alcohol	70%
Iodine in iodophor	50 ppm
Isopropanol	50%
Povidone-iodine	1% iodine
Sodium hypochlorite	0.05 – 0.5%
Sodium chlorite	0.23%

แต่สารฆ่าเชื้อบางชนิดอาจหาซื้อได้ยาก ทาง NEA ได้แนะนำสารฆ่าเชื้อที่ใช้ตามบ้านเรือนและสามารถฆ่าเชื้อ Coronavirus ได้ไว้ 5 ชนิด ได้แก่ benzalkonium chloride, chloroxylenol, ethyl alcohol, isopropyl alcohol, และ sodium hypochlorite

สำหรับสารฆ่าเชื้อและความเข้มข้นที่ระบุในตารางที่ 2 เป็นสารที่ใช้กับพื้นผิวสิ่งไม่มีชีวิตเท่านั้น เนื่องจากบางชนิดมีความรุนแรงไม่สามารถใช้กับสิ่งมีชีวิตได้ สำหรับน้ำยาฆ่าเชื้อที่ใช้ทำความสะอาดผิวหนังเพื่อป้องกันเชื้อ COVID-19 นั้นทางกระทรวงสาธารณสุขของประเทศไทยแนะนำให้ใช้ ethyl alcohol ความเข้มข้นอย่างน้อย 70% ในการทำความสะอาด

2.3 กลไกการออกฤทธิ์ของสารฆ่าเชื้อจุลชีพ

สารฆ่าเชื้อจุลชีพมีกลไกการออกฤทธิ์ 3 แบบดังนี้

2.3.1 ออกฤทธิ์ที่ผนังเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) สารฆ่าเชื้อจุลชีพจะออกฤทธิ์เปลี่ยนความสามารถการซึมผ่าน (permeability) โดยเปลี่ยนความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) ของผนังเซลล์และทำลายผนังเซลล์ ทำให้สารฆ่าเชื้อจุลชีพผ่านเข้าเซลล์ และสารต่าง ๆที่จำเป็นรั่วไหลออกจากเซลล์ สารเหล่านี้ได้แก่ quaternary ammonium compounds, chlorhexidine

2.3.2 ออกฤทธิ์ที่ผนังเซลล์ชั้นใน (cytoplasmic membrane) สารฆ่าเชื้อจุลชีพจะออกฤทธิ์ทำลายผนังเซลล์ชั้นในทำให้เกิดการรั่วไหลขององค์ประกอบที่อยู่ในเซลล์ หรือขัดขวางกระบวนการหายใจระดับเซลล์ทำให้เชื้อจุลชีพตาย สารเหล่านี้ได้แก่ quateary ammonium compounds, alcohol, phenol

2.3.3 ออกฤทธิ์กับส่วนประกอบภายในเซลล์ สารฆ่าเชื้อจุลชีพจะจับกับ DNA, RNA, ribosome ทำให้จุลชีพไม่สามารถดำรงชีวิตต่อไปได้ สารเหล่านี้ได้แก่สารกลุ่มสีย้อม (dye), acridine

โดยอาศัยอำนาจตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535 ได้มีการออกประกาศกระทรวงอุตสาหกรรมเรื่องบัญชีรายชื่อวัตถุอันตราย พ.ศ. 2546 กำหนดกลุ่มของสารเคมี ชื่อสารเคมีและกลุ่มผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในบ้านเรือน หรือทางสาธารณสุข ใช้เพื่อประโยชน์แก่การฆ่าเชื้อโรค พื้น ฝาผนัง เครื่องสุขภัณฑ์ และวัสดุอื่น ๆ จัดเป็นวัตถุอันตรายในความรับผิดชอบของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ซึ่งสามารถจำแนกได้ดังนี้

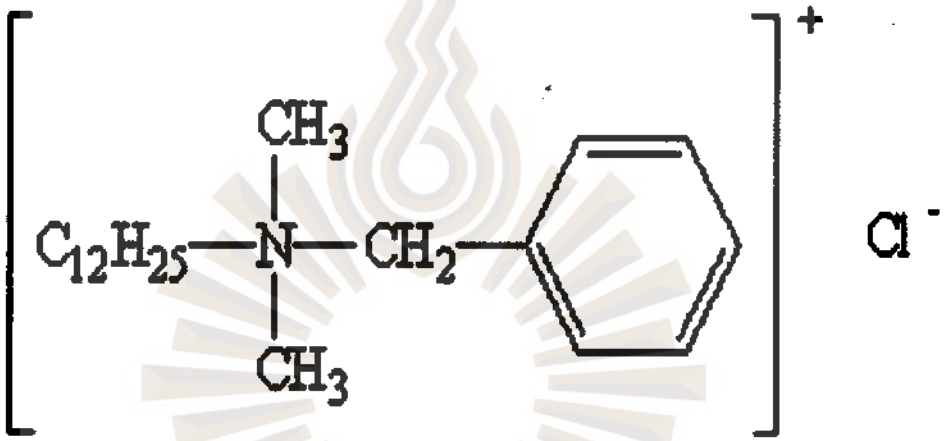
1. ACIDS
2. ALKALIS
3. ALDEHYDES
4. CHLORINE and chlorine releasing substances
5. CALCIUM HYPOCHLORITE
6. 1,3-DICHLORO-5,5-DIMETHYLHYDANTOIN
7. DICHLOROISOCYANURIC ACID and it salts
8. SODIUM HYPOCHLORITE
9. TRICHLOROISOCYANURIC ACID and its salts
10. CHLORHEXIDINE SALTS
11. PHENOLS and phenolic compounds
12. SURFACTANTS (นิยมใช้ Cationic Surfactants)
13. ผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในบ้านเรือนหรือทางสาธารณสุขเพื่อประโยชน์แก่การฆ่าเชื้อโรค ทำความสะอาดพื้น ฝาผนัง เครื่องสุขภัณฑ์และวัสดุอื่นๆ
14. ผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในบ้านเรือนหรือทางสาธารณสุขเพื่อประโยชน์ในการซักผ้าขาว การฆ่าเชื้อโรค หรือกำจัดกลิ่นในสระว่ายน้ำ

2.4 อาการเกิดพิษของสารเคมีฆ่าเชื้อ

อาการเกิดพิษของสารเคมีในกลุ่มนี้มีได้ตั้งแต่ เกิดการระคายเคืองผิวหนังเมื่อสัมผัส ระคายเคืองตาอาการเกิดพิษจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับบริเวณที่รับสัมผัส ความเข้มข้นของสาร และระยะเวลาที่รับสัมผัสหากเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความเป็นกรดและด่างมาก จะมีฤทธิ์กัดกร่อน ทำให้เกิดอาการปวดร้อน ระคายเคืองไหม้ หากรับประทานเข้าไป จะมีอาการปวดร้อนภายในปาก คอ กระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ อาเจียน อุจจาระร่วงถ่ายเป็นเลือด ความดันโลหิตลดลงอย่างรวดเร็ว ไตถูกทำลาย และในรายที่อาการรุนแรงอาจตายได้เนื่องจากการอุดตันของทางเดินหายใจ หากสูดดมไอควัน จะมีอาการไอ สำลัก ปวดศีรษะ หน้ามืด อ่อนเพลียและแน่นหน้าอก หากถูกผิวหนังจะมีอาการ ปวดร้อนและไหม้ หากเข้าตาจะมีอาการระคายเคืองปวดร้อนและน้ำตาไหล

2.5 Benzalkonium chloride (ธนกร ศิริสมุทร, 2012)

benzalkonium chloride; BKN เป็นสารลดแรงตึงผิวประจุบวก เนื่องจากมีโครงสร้างทางเคมีที่เป็นเกลือคลอไรด์ ซึ่งคลอไรด์มีประจุลบ และสายโซไฮโดรคาร์บอนเป็นอนุมูลประจุบวก (รูป 1) benzalkonium chloride ยังเป็นสารที่มีคุณสมบัติฆ่าเชื้อกลุ่ม Quaternary Ammonium Compound (Quat) มีคุณสมบัติ Antiseptics และ Disinfectant เป็นสารชำระล้างโดยไม่ทำให้เกิดการระคายเคือง มีสภาพประจุบวกทำให้สามารถเกาะบนผิวหนังได้ ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทำลายเชื้อโรคอยู่ระหว่าง 0.01-0.2%



รูป 1.1 โครงสร้างทางเคมีของ benzalkonium chloride

2.5.1 กลไกการออกฤทธิ์ของ Benzalkonium chloride

benzalkonium chloride มีชื่อทางเคมีว่า alkyldimethylbenzyl ammonium chloride ชื่อพ้องที่รู้จักกันดีคือ zephran หรือ zephiral จัดเป็นสารฆ่าเชื้อที่ออกฤทธิ์กว้างต่อเชื้อจุลชีพ สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย, รา โปรโตซัว และเชื้อไข้หวัดใหญ่ "H1N1 infuenza" และยังเชื่อว่าสามารถยับยั้งเชื้อไวรัสโคโรน่าได้ แต่เอนโดสปอร์ของเชื้อแบคทีเรียบางชนิด รวมทั้งเชื้อไวรัสและเชื้อแบคทีเรียแกรมลบบางชนิดจะดื้อต่อ benzalkonium chloride ได้ มีประสิทธิภาพในการปกป้องบนผิวหนังและพื้นผิวต่าง ๆ ได้ยาวนานกว่าแอลกอฮอล์

2.5.2 ความเป็นพิษของ benzalkonium chloride

เกิดจากการที่มีคุณสมบัติการเป็นสารลดแรงตึงผิวประจุบวกซึ่งก่อความระคายเคือง และกัดกร่อนตามความเข้มข้นและปริมาณที่รับสัมผัส โดยทั่วไปเมื่อสารละลายมีความเข้มข้นมากกว่า 7.5% จะทำให้เกิดอันตรายต่อเนื้อเยื่อ อาการพิษที่เกิดขึ้น มีได้ตั้งแต่ อาการคลื่นไส้อาเจียน ปวดท้อง

อาการแดงไหม้ที่ลำคอ คอหอยหลอดคอหาร อาการสำลัก มีเลือดออกในทางเดินอาหารตามปริมาณและความเข้มข้นที่รับสัมผัส

2.6 น้ำอิเล็กโทรไลต์ (Electrolyzed water)

น้ำอิเล็กโทรไลต์ ถูกพัฒนาและเริ่มใช้ครั้งแรกในประทศญี่ปุ่น เครื่องมือที่ใช้ในการผลิตคือกระแสไฟฟ้าทำให้เกิดกระบวนการอิเล็กโทรไลต์เกิดจากการแยกสลายสารด้วยขั้วไฟฟ้าบวกและลบ โดยเมื่อกระแสไฟฟ้าผ่านน้ำเกลือที่ความเข้มข้นต่ำประมาณร้อยละ 0.5 เข้าไปสู่บริเวณที่มีขั้วแคโทดและขั้วแอโนดอยู่คนละฝั่งที่ถูกกั้นกลางด้วยแผ่นเมมเบรน อิออนของน้ำเกลือจะเกิดการแตกตัวในระบบได้แก่ โซเดียมอิออน (Na)ไฮโดรเจนอิออน (H) คลอไรด์อิออน (CI)และไฮดรอกไซด์อิออน (OH) โดยอิออนทั้งหมดจะเคลื่อนผ่านแผ่นเมนเบรนไปที่ขั้วตรงข้ามคือ โซเดียมอิออน (Na) และ ไฮโดรเจนอิออน (H) เคลื่อนตัวผ่านเมมเบรนไปที่แคโทด ซึ่งโซเดียมอิออน (Na) จะรวมตัวกับไฮดรอกไซด์อิออน (OH) ที่แตกตัวที่ขั้วแคโทดนี้กลายเป็นโซเดียมไฮดรอกไซด์(NaOH) ทำให้สารละลายในบริเวณนี้มีคุณสมบัติเป็นสารละลายน้ำรีดิวซ์ (Electrolyzed reducing water; ERW) ส่วนคลอไรด์อิออน (CI) และไฮดรอกไซด์อิออน (0H) จะเคลื่อนผ่านแผ่นเมนเบรนไปที่ขั้วแอโนด โดยจะมีการทำปฏิกิริยากันเปลี่ยนเป็นกรดไฮโปคลอรัส (HOC) และ กรดไฮโดรคลอริก (HC) ทำให้สารละลายในบริเวณนี้มีคุณสมบัติเป็นสารละลายน้ำอิเล็กโทรไลต์ Electrolyzed oxidizing water; EOW) กลไกการเกิดปฏิกิริยาอิเล็กโทรไลซิส (electrolysis) ของสารละลายเกลือซึ่งเป็นสารประกอบที่มีไอออน คือ OH และ Cl- ดังสมการ

$NaCl + H_2O \rightarrow Na+ + Cl^- + H^+ + OH$

$2Cl^- \rightarrow Cl2 + 2e^-$

Anode: $Cl_2 + H_2O \rightarrow HOCl + HCl$

Cathode: $2Na^+ + 2H_2O \rightarrow 2NaOH + H_2$

จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าน้ำอิเล็กโทรไลต์ มีฤทธิ์เป็นกรด pH ประมาณ 2.7 หรือต่ำกว่า มีประสิทธิภาพการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น-รีดักชั่น (Oxidation Reduction Potential:ORP) มากกว่า 1,000 mV มีคลอรีนอิสระตั้งแต่10-80 ppm เป็นสารที่มีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อโรค ไม่มีสารพิษ มีความเสถียร สามารถเก็บไว้ได้นาน ราคาไม่แพง และมีความปลอดภัยต่อผู้ใช้งาน (Yu-Ru, *et al.*, 2006)

2.6.1 กลไกการฆ่าเชื้อโรคโดยน้ำอิเล็กโทรไลต์

เมื่อมีการผ่านของกระแสไฟฟ้าเข้ามาในระบบ ขั้วจะมีการสูญเสียอิเล็กตรอนเพื่อให้มีอะตอมเป็นกลางและเกิดเป็นก๊าซออกซิเจน hypochlorite ion hypochlorus, chlorine gas และ hydrochloric acid ซึ่งสาร hypochlorous ที่ได้นี้เป็นสารที่ออกซิไดซ์ได้แรงกว่าสารประกอบคลอรีน

ที่อยู่ในรูปแคลเซียมไฮโปคลอไรต์และโซเดียมไฮโปคลอไรต์ นอกจากปัจจัยของกรดไฮโปคลอรัสที่เป็นองค์ประกอบในน้ำอิเล็กโทรไลต์ ชนิดกรดแล้ว ค่า ORP ที่สูงมากกว่า 1,100 mV. ยังเป็นปัจจัยที่สำคัญในการสนับสนุนให้ประสิทธิภาพในการทำลายจุลินทรีย์ได้ดียิ่งขึ้น (Kim, *et al*., 2000) จะเห็นได้ว่าน้ำอิเล็กโทรไลต์มีศักยภาพในการฆ่าเชื้อโรคได้และมีแนวโน้มการใช้งานหลากหลายในอุตสาหกรรมอาหาร (Maria, *et al*., 2015)

2.7 วิธีทดสอบสารเคมีฆ่าเชื้อ

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาได้ออกประกาศหลักเกณฑ์การทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อโรคบนพื้นแข็งที่ไม่มีรูพรุน 2 ฉบับ คือ ชนิดของเหลวและชนิดฉีดพ่นธรรมดา หรือฉีดพ่นอัดก๊าซ

วิธีทดสอบตาม AOAC (Analysis of the Association of Official Analytical Chemists) การทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย สำหรับการใช้ในโรงพยาบาลให้ทดสอบกับจุลินทรีย์3 ชนิด คือ *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Salmonella choleraesuis* หรือ *Salmonella typhi* สำหรับการใช้ในบ้านเรือนและสถานที่อื่น ให้ทดสอบกับ จุลินทรีย์ 2 ชนิด คือ *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella choleraesuis* หรือ *Salmonella typhi* การทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อรา ให้ทดสอบกับ *Trichophyton mentagrophytes* (เนาวรัตน์ รังสีภาณุรัตน์, 2563)

กรณีอ้างการฆ่าเชื้อโรคบนพื้นผิวบนพื้นแข็งที่มีรูพรุน ฆ่าเชื้อโรคบนพื้นผิวอื่น ๆ หรือฆ่าเชื้อโรคชนิดอื่น นอกจากข้างต้น ต้องส่งผลทดสอบ ตามการกล่าวอ้าง

2.8 รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาของ Venkitanarayanan และคณะ (1999) ได้ศึกษาผลของน้ำอิเล็กโทรไลต์ต่อการยับ ยั้งเชื้อ *Escherichia coli* 0157:H7, *Salmonella enteritidis* และ *Listeria monocytogenes* พบว่าการให้น้ำอิเล็กโทรไลต์นาน 5 นาทีสามารถยับยั้งเชื้อโรคได้ 3 ชนิดและถ้าเพิ่มเวลาเป็น 10 นาทีจะสามารถยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์ (Venkitanarayanan *et. al.*,1999)

Guentzel JL และคณะ (2017) ที่มีการทดลองใช้น้ำอิเล็กโทรไลต์เพื่อฆ่าเชื้อโรคหลายชนิด เช่น *Escherichia coli, Salmonella, Staphylococcus aureus* พบว่าที่ระดับความเข้มข้นที่สูงกว่าคืออยู่ในช่วง 20-120 ppm แต่มีระยะเวลาสัมผัส 10 นาทีเท่ากันที่ทำให้เชื้อโรคทุกชนิดได้หมด (Guentzel *et. al.*,2017)

ศิริสวัสดิ์ จันทร์ศรี และ พัสวี ภัคพงศ์ (2563) ได้ทำการศึกษาผลการใช้ผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียในฟาร์มไก่เนื้อ ฟาร์มสุกร ฟาร์มโคนม และฟาร์มโคเนื้อ ด้วยการคัดเลือกผลิตภัณฑ์ฆ่า

เชื้อที่ได้รับการขึ้นทะเบียนกับกรมปศุสัตว์ 7 กลุ่ม ได้แก่ Acid, Alcohol, Aldehyde, Iodophor, Chlorine, Oxidant และ QUAT พบว่า Aldehyde สามารถลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียได้มากเป็นลำดับที่หนึ่ง และ Quat มีค่าเฉลี่ยแบคทีเรียที่ลดลงเท่ากับ 75.57 - 29. 78% (ศิริสวัสดิ์ จันทร์ศรี และ พัสวี ภัคพงศ์, 2563)

Ogilvie B.H. และคณะ (2021) ได้ศึกษาผลของสาร Benzalkonium Chloride มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 (Covid 19) และเชื้อไวรัส-แบคทีเรียอื่นๆๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ไม่มีสารพิษตกค้าง ไม่ติดไฟ มีความอ่อนโยนต่อผิวหนัง และมีความระคายเคืองน้อยกว่าแอลกอฮอล์ เมื่อใช้ในปริมาณที่เหมาะสมโดยทำเป็นเจนทิโอสเปรย์ สเปรย์ฉีดทำความสะอาดมือสูตรไร้แอลกอฮอล์ สามารถใช้กำจัดเชื้อแบคทีเรีย เชื่อไวรัส ต่างๆๆ รวมถึงเชื้อไวรัสโควิตด้วยซึ่งอ้างอิงจากผลวิจัยไม่เป็นอันตรายต่อผิวหนังของมนุษย์ (Ogilvie *et. al*, 2021)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 3

ระเบียบวิธีการวิจัย

3.1 การออกแบบการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยประเภทการพัฒนาทดลองในสาขาจุลชีววิทยา โดยใช้ระเบียบวิธี วิจัยเชิงทดลองเพื่อเปรียบเทียบการใช้น้ำอิเล็กโทรไลต์และ benzalkonium chloride ในแง่ของรูปแบบการใช้และเวลาที่สัมผัส ว่าจะทำให้ฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคทางการแพทย์แตกต่างกันอย่างไร

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.2.1 เครื่องมือ

1) Vortex Mixer (VTX-3000L)	Laboratory&Medical, Japan
2) Centrifuge Rotofix 23A	Hettich, Germany
3) เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง	Satorius, Gernamy
4) เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง Satorius	GMBH GÖTTINGEN, Gernamy
5) เครื่องต้ม Ishtar HitzStir Insta	bioAnaltik, Singapore
6) Spectrophotometer Genesys 30	Cole-Parmer, USA
7) Autoclave	HIRAYAMA, Japan
8) Hot air oven	Memmert, Germany
9) Biological Safety Cabinet	BIOBASE, China
10) Rotary evaporator	Heidolph, Germany
11) DEN-1B McFarland densitometer	Biosan, Latvia
12) Microplate reader	Biotek: Synergy HT
13) Autopipette	Scilogex, USA
14) Multichannel pipette	Biohit, Finland
15) pH meter	Accumet, Germany
16) Refrigerator 4°C	SANDEN INTER COOL, Thailand
17) Infinite F50 Absorbance microplate reader	TECAN, Switzerland

18) Cold storage	(Forma™ 900 Series -86°C Upright Ultral-Low Temperature Freezers) Thermo Fisher Scientific / USA

3.2.2 อุปกรณ์

1) Centrifuge tube ขนาด 15 mL	SIGMA-ALDRICH, France
2) Centrifuge tube ขนาด 50 mL	SIGMA-ALDRICH, France
3) Erlenmeyer flask	PYREX®/ USA
4) Cylinders	PYREX®/ USA
5) Beakers	PYREX®/ USA
6) Volumetric flask ขนาด 1000 ml.	PYREX®/ USA
7) Pipette tips, 1,000 µL , 200 µL	Gilson,Inc./ USA
8) Reservoir	TARSONS, India
9) 96-well cell culture plate	SPL LIFE SCIENCES, Korea
10) Petri Dish	Greiner bio-one, Thailand
11) Swab	Thai Gauze Co., Ltd., Thailand
12) Beaker	PYREX®/ USA
13) Volumetric flask	PYREX®/ USA
14) Funnel	PYREX®/ USA
15) Whatman No.1	GE healthcare / China
16) Whatman No.4	GE healthcare / China
17) Screw cap tube	United Science Co.,Ltd/Thailand
18) Needle	United Science Co.,Ltd/Thailand
19) Eppendrof tube	Gilson,Inc. / USA
20) Cuvette Semi-Micro 1.5 mL	Labmaster Advance / Thailand
21) Inoculating loop	United Science Co.,Ltd/Thailand
22) Spreader glass	United Science Co.,Ltd/Thailand

3.2.3 สารเคมี

1) Methanol	APEX ALCO, Thailand
2) Ethanol	APEX ALCO, Thailand
3) Phenol	SIGMA ALDRICH

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

4) NaCl	Ajax Finechem Pty Ltd
5) NaOH	Ajax Finechem Pty Ltd
6) Na2HPO4.2H2O	Ajex/Australia
7) NaH2PO4.2H2O	Ajex/Australia
8) D-MEM (1X)	Thermo fisher
9) Trypsin-EDTA	Thermo fisher
10) Phosphate buffer saline	Thermo fisher
11) Antibiotic –antimycotic	Thermo fisher
12) MEM non-essential amino acid	Thermo fisher
13) L-glutamin	Thermo fisher
14) Crystal violet	Sigma-Aldrich, Co. LCC / USA
15) MTT (3-[4,5 –dimethylthiazo l-2-yl]-2,5 -diphenyltetrazolium bromide	Sigma-Aldrich, Co. LCC / USA

3.2.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ และอาหารทดสอบชีวเคมี

1) Tryptic soy broth	Hi-Media
2) Tryptic soy agar	Hi-Media
3) Potato dextrose agar(PDA)	Hi-Media
4) MacConkey agar	BBL™ /France
5) Muller Hinton agar	Becton, Dickinson and Company / France

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียมสาร Benzalkonium chloride และ อิเล็กโทรไลต์

การเตรียมสาร Benzalkonium chloride

สาร 0.05% (V/V) Benzalkonium chloride ได้รับความอนุเคราะห์มาจากวิทยาลัยเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ทำได้โดยการเตรียมสารละลายจากสาร Benzalkonium chloride ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 0.1% และนำมาเจือจางเป็น 0.05% (V/V) Benzalkonium chloride ในน้ำกลั่น sterile และใช้ทันทีหรือเก็บในภาชนะปิดสนิทที่อุณหภูมิห้องเมื่อต้องการทดสอบ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

การเตรียมน้ำอิเล็กโทรไลต์

โดยการละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ 1 กรัมในน้ำกลั่น pH 7.0 ปริมาตร 1 ลิตร (0.1% w/v NaCl) นำเข้าผลิตน้ำอิเล็กโทรไลต์ โดยผ่านกระเสไฟฟ้า 5 นาที ในการศึกษานี้เรียกว่า "น้ำอิเล็กโทรไลต์ "โดยใช้ทันทีหรือเก็บในภาชนะปิดสนิทที่อุณหภูมิห้อง

3.3.2 การทดสอบคุณสมบัติทางเคมีของน้ำอิเล็กโทรไลต์ชนิดต่าง ๆ

ทำการวัดค่า pH และคุณสมบัติทางเคมีโดยการวัดประสิทธิภาพการเกิดออกซิเดชั่นรีดักชั่น (oxidation reduction potential;ORP) ด้วยเครื่อง Suntex TS-100 Suntex Company, USA) การตรวจวัดปริมาณคลอรีนอิสระ(available chlorine concentration: ACC) และทดสอบความคงตัวของคุณสมบัติทางเคมี pH และ ORP ของน้ำออกซิไดซ์ตั้งแต่วันที่ 1 ถึง วันที่ 7 หลังการผลิต และทำการทดสอบ 3 ครั้งแบบเป็นอิสระต่อกัน เพื่อหาค่าเฉลี่ย ,นอกจากนี้ยังวัดคุณสมบัติดังกล่าวของสารควบคุมผลลบคือน้ำกลั่น และสารฆ่าเชื้อมาตรฐานโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaOCl) เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบคุณสมบัติกับน้ำอิเล็กโทรไลต์

3.3.3 การทดสอบคุณสมบัติทางจุลชีววิทยาของน้ำอิเล็กโทรไลต์เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ

3.3.3.1 กลุ่มแบคทีเรียก่อโรคทางการแพทย์ที่ใช้ในการทดสอบ 10 สายพันธุ์ทั้งหมด เป็น clinical Isola ประกอบด้วย

1) *Pseudomonas aeruginosa*

2) *Acinetobacter baumannii*

3) *Staphylococcus aureus*

4) *Bacillus subtilis*

5) *Listeria Monocytogenes*

6) *Edwardsiella tarda*

7) *Aeromonas hydrophila*

8) *Salmonella Typhi*

9) *Klebsiella pneumonia*

10) *Shigella flexneri*

3.3.3.2 ยีสต์ก่อโรคทางการแพทย์ที่ใช้ในการทดสอบ

1) *Candida albicans* (1 isolate เป็น clinical isolate)

2) *Cryptococcus neoformans* (1 isolate เป็น clinical isolate)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

3.3.4 การเตรียมเชื้อและ cell suspension ที่ใช้ในการทดสอบ

นำเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบมาทำการ culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar; TSAจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37° C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทดสอบการเจริญในอาหารและคุณสมบัติชีวเคมีเพื่อยืนยันชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ตามมาตรฐานการเพาะเชื้อและวินิจฉัยเชื้อการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์เพื่อให้ได้ pure culture จากนั้นนำ isolated colony ของเชื้อที่ใช้ในการทดสอบมา suspend ใน 0.85% NaCl วัด absorbance ให้ได้ 0.5 McFarland Standard (ปริมาณเชื้อประมาณ 1.5 x 10^8 colony forming units per milliliter (CFU / ml)) (McFARLAND, 1907) ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างเชื้อปริมาตร 100 ul ทำการเจือจางแบบ 10 fold serial dilution ให้ได้ dilution 1:10,000 (ปริมาณเชื้อประมาณ 1.5 x 10^4 CFU / ml) ใน 0.85% NaCl

นำยีสต์ก่อโรคทางการแพทย์ที่ใช้ในการทดสอบซึ่งได้แก่ *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* ทำการ culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar; PDA จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37° C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ยกเว้นเชื้อ *Cryptococcus neoformans* บ่มที่อุณภูมิห้อง (25° C) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้ได้ pure culture จากนั้นนำ isolated colony ของเชื้อที่ใช้ในการทดสอบมา suspend ใน 0.85% NaCl วัด absorbance ให้ได้ 0.5 McFarland Standard (ปริมาณเชื้อประมาณ 1.5 x 106 colony forming units per milliliter (CFU / ml)) (Arevalo, 2003) ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างเชื้อปริมาตร 100 ul ทำการเจือจางแบบ 10 fold serial dilution ให้ได้ dilution 1:1,000 (ปริมาณเชื้อประมาณ 1.5 x 10^3 CFU / ml) ใน sterile 0.85% NaCl นำสารละลายเชื้อจุลินทรีย์ไปใช้ในการทดสอบคุณสมบัติการฆ่าเชื้อของน้ำออกซิไดซ์เละ Benzalkonium chloride (ความเข้มข้น 0.05 %) ซึ่งจะทำการทดสอบควบคู่กับสารควบคุมผลบวกและลบ

3.3.5 การทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำอิเล็กโทรไลต์ และ benzalkonium chloride

นำน้ำอิเล็กโทรไลต์ และ benzalkonium chloride (ความเข้มข้น 0.05 %) 5 mL ผสมกับเชื้อจุลินทรีย์ 5 mL ทดสอบที่เวลา 30 วินาที 1 นาที 3 นาที 5 นาที 10 นาที และ 15 นาที ตามลำดับ เมื่อครบเวลา นำสารผสมปริมาตร 100 ul มา spread plate บนผิวหน้าอาหาร TSA/PDA และใช้ 0.85% NaCl ผสมกับเชื้อและ 0.6% sodium hypochlorite เป็นชุดควบคุม บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37° C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย และ *Candida albicans* แต่ยกเว้นเชื้อ *Cryptococcus neoformans* บ่มที่อุณภูมิห้อง (25° C) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

การแปลผล

สังเกตการเจริญของเชื้อด้วยการนับจำนานเชื้อที่รอดชีวิตด้วยวิธี spread plate technique คำนวณเชื้อจุลินทรีย์รอดชีวิตในหน่วย log colony forming unit/mL (log CFU/mL) และเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเชื้อแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า

3.3.6 การวัด Intracellular protein leaking ด้วย วิธี dye-binding (Bradford)

นำน้ำอิเล็กโทรไลต์ และ benzalkonium chloride (ความเข้มข้น 0.05 %) 5 mL ผสมกับเชื้อจุลินทรีย์ 5 mL (ปริมาณเชื้อประมาณ 1.5 x 10^4 CFU / ml สำหรับแบคทีเรียและปริมาณเชื้อประมาณ 1.5 x 10^3 CFU / ml สำหรับยีสต์) ทดสอบที่เวลา 30 วินาที 1 นาที 3 นาที 5 นาที 10 นาที และ 15 นาที ตามลำดับ และใช้ 0.85% NaCl ผสมกับเชื้อและ 0.6% sodium hypochlorite เป็นชุดควบคุม เมื่อครบเวลา วัดโปรตีนที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากเซลล์จุลินทรีย์ที่แตกสลายจากการทำลายของสารฆ่าเชื้อ ทำการวัดโปรตีนดังกล่าวด้วยวิธี dye-binding (Bradford) ซึ่งจะวัดสีที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง coomassie dye กับโปรตีน วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm.

การแปลผล

นำค่า OD ที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน bovine serum albumin (BSA) เพื่อหาความเข้มข้นของโปรตีน

จากการทดสอบที่ 3.3.5, 3.3.6 เมื่อได้เวลาที่ดีที่สุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียแล้ว จะนำผลการทดสอบนั้นไปเปรียบเทียบประสิทธิภาพในขั้นตอนถัดไป

3.3.7 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำอิเล็กโทรไลต์ และ benzalkonium chloride กับสารฆ่าเชื้อชนิดต่าง ๆ

นำเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ (ปริมาณเชื้อประมาณ 1.5 x 10^5 CFU / ml สำหรับแบคทีเรียและปริมาณเชื้อประมาณ 1.5 x 10^4 CFU / ml สำหรับยีสต์) ปริมาตร 100 ul หยดลงบนแผ่นพลาสติกแข็งขนาด 5x 5 cm ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทดสอบเพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อกับสารละลายฆ่าเชื้อชนิดต่าง ๆ ได้แก่ น้ำผสมด่างทับทิม (อัตราส่วน 0.05%) น้ำผสมผงฟู (อัตราส่วน 2.5 g/L) และน้ำผสมคลอรีน (ความเข้มข้น 0.02%) เปรียบเทียบกับน้ำอิเล็กโทรไลต์ และ benzalkonium chloride (ความเข้มข้น 0.05 %) โดยมีชุดควบคุม คือ การใช้สารละลาย 0.85% NaCl และ 0.6% sodium hypochlorite ผสมกับเชื้อแทนสารทดสอบ นำสารฆ่าเชื้อชนิดต่าง ๆ ปริมาตร 100 ul หยดลงบนแผ่นพลาสติกแข็งโดยใช้ช่วงเวลาที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3.5, 3.3.6 เมื่อครบเวลา นำแผ่นพลาสติกแข็ง ใส่ลงใน sterile 0.85% NaCl ปริมาตร 1 ml ทำการเขย่าให้เชื้อกระจายด้วย vortex mixer 1 นาที นำสารผสมปริมาตร 100 ul มา spread plate บนผิวหน้าอาหาร

TSA/PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37° C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย และ *Candida albicans* แต่ยกเว้นเชื้อ *Cryptococcus neoformans* บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25° C) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

การแปลผล

สังเกตการเจริญของเชื้อด้วยการนับจำนานเชื้อที่รอดชีวิตด้วยวิธี spread plate technique คำนวณเชื้อจุลินทรีย์รอดชีวิตในหน่วย log colony forming unit/mL (log CFU/mL)

3.3.8 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำอิเล็กโทรไลต์และ benzalkonium chloride (ความเข้มข้น 0.05 %) ในการฆ่าเชื้อด้วยเทคนิคการสัมผัสรูปแบบต่าง ๆ

นำเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ (ปริมาณเชื้อประมาณ 1.5 x 10^5 CFU / ml สำหรับแบคทีเรียและปริมาณเชื้อประมาณ 1.5 x 10^4 CFU / ml สำหรับยีสต์) ปริมาตร 100 ul หยดลงบนแผ่นพลาสติกแข็งและผ้าขนาด 5x 5 cm ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทดสอบเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำอิเล็กโทรไลต์ หรือ benzalkonium chloride ในการฆ่าเชื้อด้วยเทคนิครูปแบบต่าง ๆได้แก่ แบบแช่รวมกัน และแบบสเปรย์ มีชุดควบคุม คือ การใช้สารละลาย 0.85% NaCl และ 0.6% sodium hypochlorite แทนสารทดสอบ

แบบแช่ ทำได้โดยแช่แผ่นพลาสติกแข็งในนำน้ำอิเล็กโทรไลต์หรือ benzalkonium chloride (ความเข้มข้น 0.05 %) 15 mL ทดสอบโดยใช้ช่วงเวลาที่คัดเลือกได้จากข้อ 7.5 เมื่อครบเวลา นำแผ่นพลาสติกแข็ง ใส่ลงในใน sterile 0.85% NaCl ปริมาตร 1ml ทำการเขย่าให้เชื้อกระจายด้วย vortex mixer 1นาที

แบบสเปรย์ทำได้โดยสเปรย์แผ่นพลาสติกแข็งด้วยนำน้ำอิเล็กโทรไลต์หรือ benzalkonium chloride (ความเข้มข้น 0.05 %) 10 วินาที (15 mL) จากนั้นนำแผ่นพลาสติกแข็งขึ้นมาวางบนภาชนะแห้ง ทิ้งแผ่นพลาสติกแข็งไว้ที่เวลา 30 วินาที 1 นาที 5 นาที 10 นาที และ 15 นาที ตามลำดับ เมื่อครบเวลา นำแผ่นพลาสติกแข็ง ใส่ลงในใน sterile 0.85% NaCl ปริมาตร 1ml ทำการเขย่าให้เชื้อกระจายด้วย vortex mixer 1นาที

นำสารผสมที่ได้จากแต่ละการทดสอบปริมาตร 100 ul มา spread plate บนผิวหน้าอาหาร TSA/PDA สวนชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นผสมกับเชื้อแทน EW บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37° C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย และ *Candida albicans* แต่ยกเว้นเชื้อ *Cryptococcus neoformans* บ่มที่อุณภูมิห้อง (25° C) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

การแปลผล

สังเกตการเจริญของเชื้อด้วยการนับจำนานเชื้อที่รอดชีวิตด้วยวิธี spread plate technique คำนวณเชื้อจุลินทรีย์รอดชีวิตในหน่วย log colony forming unit/mL (log CFU/mL)

3.3.9 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity Assay) ที่ไม่ใช่เซลล์มะเร็งของน้ำอิเล็กโทรไลต์ และ benzalkonium chloride ด้วยวิธี MTT assay

เซลล์ที่ใช้ทดสอบในการวิจัยครั้งนี้คือ เซลล์ OMUF cell line เป็นเซลล์จากผิวหนังชนิด fibroblast ของมนุษย์เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่มีส่วนผสมของ 2 mM Glutamine + 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS) และ gentamycin 50 µg/ml โดยเตรียมเซลล์ปริมาณ 5 x 10^4 cell/ml เลี้ยงใน 96-well culture plate ในอาหารที่อุณหภูมิ 37 °C คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และมีความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เตรียมน้ำอิเล็กโทรไลต์ หรือ 0.05 % v/v benzalkonium chloride ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรั่ม (DMEM + ยาปฏิชีวนะ 1%) จำนวน 7 ความเข้มข้นได้แก่ 0.1, 1, 10 , 25 , 50, 75 , 100 µg/ml สำหรับน้ำอิเล็กโทรไลต์ และ 0.00078, 0.00157, 0.003125, 0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05% v/v สำหรับ benzalkonium chloride และนำมาเติมลงในกลุ่มทดลอง OMUF cell line ซึ่งจะได้รับสารทดสอบแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุมและกลุ่มควบคุมคือ OMUF cell line ที่เลี้ยงใน DMEM + 10% heat inactivated FBS จากนั้นนำไปเลี้ยงใน incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา หาความเป็นพิษของสารทดสอบต่อ OMUF cell line โดยเติมสารละลาย MTT (3-[4,5 -dimethylthiazol-2-yl]-2,5 -diphenyltetrazolium bromide) ความเข้มข้น 5 mg/ml ปริมาตร 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มใน incubator เป็นเวลา 3 ชั่วโมงในที่มืด เมื่อครบเวลาเทอาหารที่มีสารละลาย MTT ออกและเติม DMSO ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุมเพื่อใช้ละลายผลึก formazan สีม่วงให้อยู่ในรูปสารละลายแล้วนำไปเขย่าเป็นเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์

$$(\%\ \text{cell viability}) = \frac{(OD\ sample)\times 100}{OD\ negative\ control}$$

$$(\%\ \text{Cytotoxicity}) = \frac{100-(ODsample)\times 100}{OD\ negative\ control}$$

ทำการทดสอบที่เหมือนกันอีก 3 ครั้ง

3.4 การรวบรวมข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การทดสอบทุกการทดสอบจะทำซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นเก็บรวบรวมผลการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของน้ำอิเล็กโทรไลต์ และ benzalkonium chloride (ความเข้มข้น 0.05 %) เช่น PH, ORP, และ ACC นำเสนอในรูปแบบของ mean ± SD เพื่อเปรียบเทียบสถิติเชิงพรรณนา รวมทั้งผลการทดสอบ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

จำนวนประชากรของจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตจากระยะเวลาต่าง ๆ และวิธีการทำการทดสอบกับสารฆ่าเชื้อที่สนใจ จากการทำการทดลอง 3 ซ้ำแบบอิสระต่อกันนำมาคำนวณและแสดงผลในรูปแบบของ log CFU/mL ทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย โดยใช้สถิติ independent student t-test (2-tailed) กำหนดระดับนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95 ($P<0.05$) โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SPSS for Windows V.22.0

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางเคมีของน้ำอิเล็กโทรไลต์ด้วยพารามิเตอร์รูปแบบต่าง ๆ

น้ำอิเล็กโทรไลต์มีค่า pH เท่ากับ 8.62±0.02 แสดงว่าคุณสมบัติเป็น alkaline electrolyte water แต่น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ 0.6% Sodium hypochlorite ที่มีความเป็นด่างสูงมาก (pH 12.18±0.05) ส่วนน้ำกลั่นมีความเป็นกลาง (pH 7.20±0.05)

เมื่อวัดค่า ORP พบว่า น้ำอิเล็กโทรไลต์มีค่า ORP เท่ากับ 114.33±1.53 mV เป็นสารออกซิไดซ์ปานกลาง ในขณะที่ 0.6% Sodium hypochlorite และ น้ำกลั่น มีค่า ORP เท่ากับ 309.67±1.15 และ 125.67±0.58 mV ตามลำดับ และเมื่อวัดค่าคลอรีนอิสระพบว่าน้ำอิเล็กโทรไลต์มีค่า ACC เท่ากับ 0.58±0.00 ppm ซึ่งต่ำกว่า ACC ของ 0.6% Sodium hypochlorite ที่มีค่าเท่ากับ 587.00±0.04 ppm ส่วนน้ำกลั่น ไม่พบคลอรีนอิสระละลายอยู่ ดังข้อมูลแสดงในตารางที่ 4.1

เมื่อเทียบความคงตัวของน้ำอิเล็กโทรไลต์ที่เก็บที่อุณหภูมิห้องในภาชนะปิดสนิท โดยทำการวัดค่า pH และ ORP ต่อเนื่อง 7 วัน เปรียบเทียบกับวันแรกของการผลิต พบว่า pH ในวันที่ 3 เป็นต้นไปมีการลดลงเล็กน้อยแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับค่า pH วันแรกของการผลิต ในขณะที่ค่า ORP ลดลงอย่างต่อเนื่องในวันที่ 3 เป็นต้นไป โดยสรุป พบว่า pH ของน้ำอิเล็กโทรไลต์มีการเปลี่ยนแปลงในช่วง 8.62±0.02 ถึง 8.41±0.01 แต่ยังคงคุณสมบัติของความเป็นด่างอยู่ และค่า ORP เปลี่ยนแปลงในช่วง +113.67±1.15 ถึง +86.67±1.53 เมื่อพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (% CV) มีที่เท่ากับ 0.01032 และ 0.11369 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.2

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 4.1 คุณสมบัติทางเคมีของน้ำอิเล็กโทรไลต์โซเดียมไฮโปคลอไรต์และน้ำกลั่น

สารทดสอบ	pH	ORP (mv)	ACC (ppm)
น้ำอิเล็กโทรไลต์	8.62±0.02	114.33±1.53	0.58±0.00
Sodium hypochlorite	12.18±0.05	309.67±1.15	587.00±0.04
น้ำกลั่น	7.20±0.05	125.67±0.58	0.00±0.00

ตารางที่ 4.2 การทดสอบความคงตัวของคุณสมบัติทางเคมี pH และ ORPของน้ำอิเล็กโทรไลต์ตั้งแต่วันที่ 1 ถึง 7 หลังการผลิต

Day	pH	ORP (mv)
1	8.62±0.02	113.67±1.15
2	8.63±0.01	112.00±1.00
3	8.53±0.02	94.00±1.00
4	8.48±0.01	91.67±1.15
5	8.46±0.02	90.67±0.58
6	8.42±0.01	89.00±1.00
7	8.41±0.01	86.67±1.53
Mean ± SD	8.51± 0.09	96.71± 11.00
%CV	0.01032	0.11369

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

4.2 การทดสอบคุณสมบัติทางจุลชีววิทยาของน้ำอิเล็กโทรไลต์และ benzalkonium chloride

4.2.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำอิเล็กโทรไลต์ และ benzalkonium chloride

เมื่อนำน้ำอิเล็กโทรไลต์ และ 0.05% benzalkonium chloride มาทดสอบคุณสมบัติประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่สำคัญทางการแพทย์เทียบกับสารฆ่าเชื้อมาตรฐาน โดยการผสมกับสารละลายเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบใน 0.85% NaCl ที่เวลา 30 วินาที 1 นาที 3 นาที 5 นาที 10 นาที และ 15 นาที ตามลำดับ เมื่อครบเวลา นำสารผสมมา spread plate บนผิวหน้าอาหารด้วยวิธี spread plate technique จากนั้นนับจำนานเชื้อที่รอดชีวิต คำนวณเชื้อจุลินทรีย์รอดชีวิตและรายงานในหน่วย log colony forming unit/mL (log CFU/mL) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ สารละลาย 0.85% NaCl ผสมกับเชื้อทดสอบ (Microbial growth control) และ 0.6% sodium hypochlorite (Positive control) ผลการทดสอบพบว่า ปริมาณของเชื้อแบคทีเรียทดสอบ (Bacterial Growth control) อยู่ในช่วง log 2.56±0.13 – log 3.74±0.05 และเชื้อราทดสอบ (Fungal Growth control) ทดสอบอยู่ในช่วง log 2.46±0.34 - log 2.80±0.03 น้ำอิเล็กโทรไลต์มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ทั้งแบคทีเรียและเชื้อรา โดยพบว่าจำนวนเชื้อทดสอบ 8 สายพันธุ์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ตั้งแต่เวลา 30 วินาทีแรกของการสัมผัสสาร และฆ่าทดสอบได้ทั้งหมดภายในเวลา 30 วินาที-1 นาที ในขณะที่ 0.05% benzalkonium chloride มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ทดสอบทั้งแบคทีเรียและเชื้อราได้ดีมากเช่นเดียวกัน โดยพบว่าจำนวนเชื้อทดสอบ 8 สายพันธุ์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ตั้งแต่เวลา 30 วินาทีแรกของการสัมผัสสาร และฆ่าทดสอบได้ทั้งหมดภายในเวลา 3-5 นาที ในขณะที่สารฆ่าเชื้อมาตรฐาน 0.6% Sodium hypochlorite สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทั้งแบคทีเรียและเชื้อราได้ทั้งหมดภายในเวลา 30 วินาที – 1 นาที ดังแสดงในตารางที่ 4.3-4.5

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ของ 0.6% Sodium hypochlorite (Positive control) แสดงค่าในรูป mean±SD จาก 3 การทดสอบที่เหมือนกัน

ลำดับที่	เชื้อทดสอบ	Growth control	Viable count (Log CFU/mL)					
			30 sec	1min	3 min	5 min	10 min	15 min
1	*Pseudomonas aeruginosa*	3.74±0.05	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
2	*Acinetobacter baumannii*	3.72±0.02	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
3	*Staphylococcus aureus*	3.68±0.05	1.30±0.00	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
4	*Bacillus subtilis*	2.93±0.05	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
5	*Listeria Monocytogenes*	3.64±0.02	1.19±0.06*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
6	*Edwardsiella tarda*	3.01±0.26	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
7	*Aeromonas hydrophila*	2.60±0.03	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
8	*Salmonella typhi*	3.41±0.05	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
9	*Klebsiella pneumoniae*	2.56±0.13	1.50±0.20*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
10	*Shigella flexneri*	3.43±0.04	1.40±0.20*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
11	*Candida albicans*	2.46±0.34	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
12	*Cryptococcus neoformans*	2.80±0.03	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*

(*) หมายถึง ปริมาณของแบคทีเรียที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$ by Student T-test)

ตารางที่ 4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำอิเล็กโทรไลต์ แสดงค่าในรูป mean±SD จาก 3 การทดสอบที่เหมือนกัน

ลำดับที่	เชื้อทดสอบ	Growth control	Viable count (Log CFU/mL)					
			30 sec	1min	3 min	5 min	10 min	15 min
1	*Pseudomonas aeruginosa*	3.74±0.05	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
2	*Acinetobacter baumannii*	3.72±0.02	1.40±0.17*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
3	*Staphylococcus aureus*	3.68±0.05	1.56±0.24*	0.59±0.00	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
4	*Bacillus subtilis*	2.93±0.05	1.83±0.21*	1.07±0.75	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
5	*Listeria Monocytogenes*	3.64±0.02	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
6	*Edwardsiella tarda*	3.01±0.26	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
7	*Aeromonas hydrophila*	2.60±0.03	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
8	*Salmonella typhi*	3.41±0.05	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
9	*Klebsiella pneumoniae*	2.56±0.13	1.50±0.17*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
10	*Shigella flexneri*	3.43±0.04	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
11	*Candida albicans*	2.46±0.34	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
12	*Cryptococcus neoformans*	2.80±0.03	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*

(*) หมายถึง ปริมาณของแบคทีเรียที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$ by Student T-test)

ตารางที่ 4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ของ 0.05% benzalkonium chloride แสดงค่าในรูป mean±SD จาก 3 การทดสอบที่เหมือนกัน

ลำดับที่	เชื้อทดสอบ	Growth control	Viable count (Log CFU/mL)					
			30 sec	1min	3 min	5 min	10 min	15 min
1	*Pseudomonas aeruginosa*	3.74±0.05	2.12±0.23*	1.68±0.49*	0.77±0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
2	*Acinetobacter baumannii*	3.72±0.02	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
3	*Staphylococcus aureus*	3.68±0.05	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
4	*Bacillus subtilis*	2.93±0.05	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
5	*Listeria Monocytogenes*	3.64±0.02	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
6	*Edwardsiella tarda*	3.01±0.26	2.87±0.04*	2.78±0.07*	2.50±0.15*	0.00*	0.00*	0.00*
7	*Aeromonas hydrophila*	2.60±0.03	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
8	*Salmonella typhi*	3.41±0.05	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
9	*Klebsiella pneumoniae*	2.56±0.13	2.22±0.59*	2.12±0.09*	1.86±0.28*	0.00*	0.00*	0.00*
10	*Shigella flexneri*	3.43±0.04	3.32±0.03*	2.80±0.16*	2.74±0.05*	0.00*	0.00*	0.00*
11	*Candida albicans*	2.46±0.34	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
12	*Cryptococcus neoformans*	2.80±0.03	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*

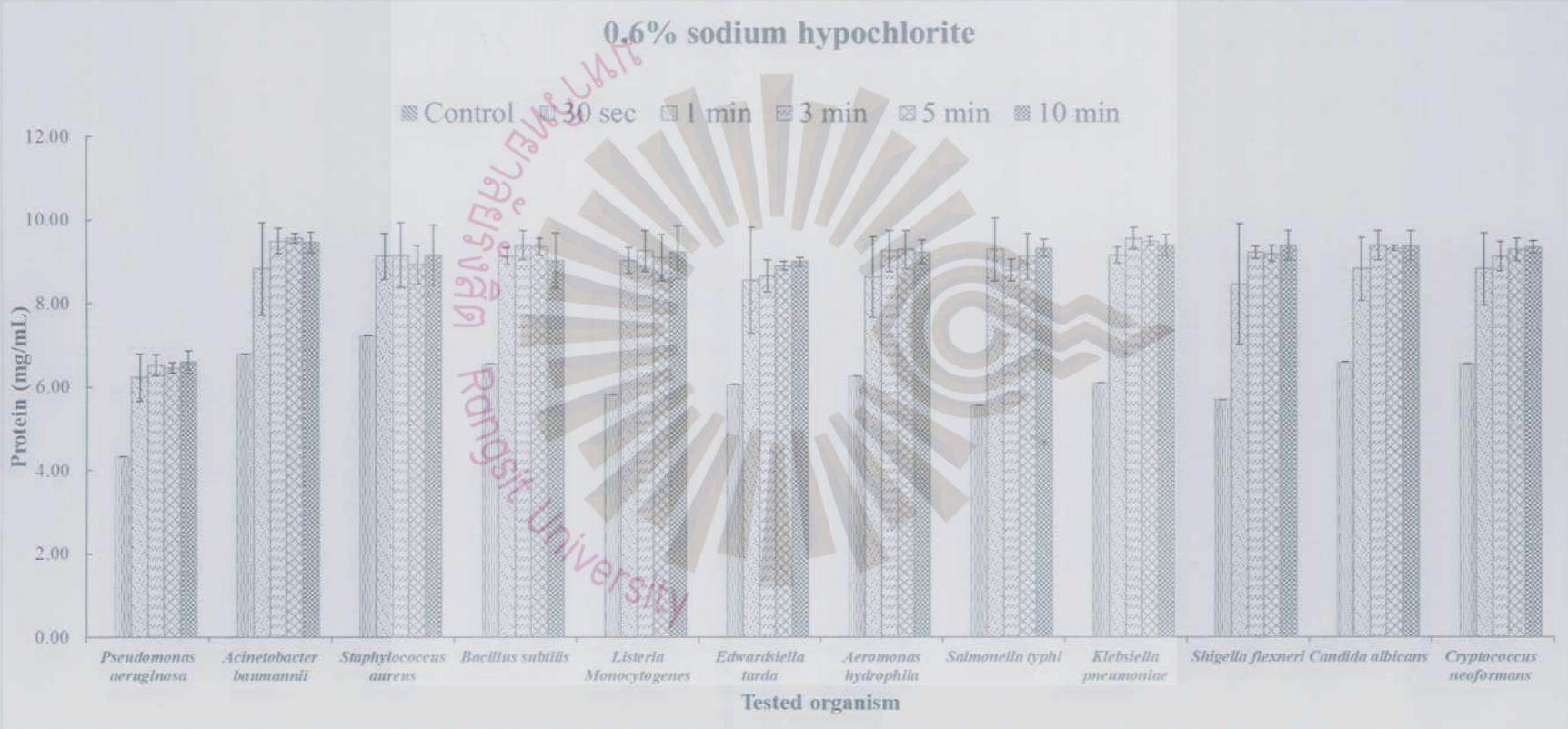
(*) หมายถึง ปริมาณของแบคทีเรียที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$ by Student T-test)

4.3 การวัด Intracellular protein leaking ด้วย วิธี dye-binding (Bradford)

การวัด Intracellular protein leaking เป็นการวัดค่าโปรตีนที่รั่วออกมาจากภายในเซลล์จุลินทรีย์เมื่อเซลล์ของจุลินทรีย์แตกสลาย ทำการทดสอบโดยการนำน้ำอิเล็กโทรไลต์และ สาร 0.05 % benzalkonium chloride ผสมกับสารละลายเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบใน 0.85% NaCl ที่เวลา 30 วินาที 1 นาที 3 นาที 5 นาที 10 นาที และ 15 นาที ตามลำดับ เมื่อครบเวลา นำมาตรวจหาโปรตีนที่รั่วไหลออกมาจากเซลล์ที่แตกสลายด้วยวิธี dye-binding (Bradford) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ สารละลาย 0.85% NaCl ผสมกับเชื้อทดสอบ (Microbial growth control) และ 0.6% sodium hypochlorite (Positive control) พบว่าหลังจากนำน้ำอิเล็กโทรไลต์สัมผัสเชื้อจุลินทรีย์ที่ระยะเวลาต่าง ๆ จะมีการรั่วไหลของโปรตีนจากภายในเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบตั้งแต่เวลาที่ 30 วินาทีและพบมากขึ้นในนาทีที่ 1 หลังการสัมผัสเชื้อและความเข้มข้นของโปรตีนค่อนข้างคงตัวในเวลาถัดๆไปที่ 3 นาที 5 นาที และ 10 นาที ซึ่งผลการทดสอบสอดคล้องกับปริมาณเชื้อที่ลดลงในผลการทดลองที่ 4.2 ในขณะที่เมื่อนำ 0.05 % benzalkonium chloride สัมผัสเชื้อจุลินทรีย์ที่ระยะเวลาต่าง ๆ จะมีการรั่วไหลของโปรตีนจากภายในเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบตั้งแต่เวลาที่ 30 วินาทีและพบมากขึ้นในนาทีที่ 1 และ 3 หลังการสัมผัสเชื้อและความเข้มข้นของโปรตีนค่อนข้างคงตัวในเวลาถัดๆไปที่ 5 นาที และ 10 นาที ซึ่งผลการทดสอบสอดคล้องกับปริมาณเชื้อที่ลดลงในผลการทดลองที่ 4.2 เช่นเดียวกัน แสดงผลในรูปที่ 4.1-4.3

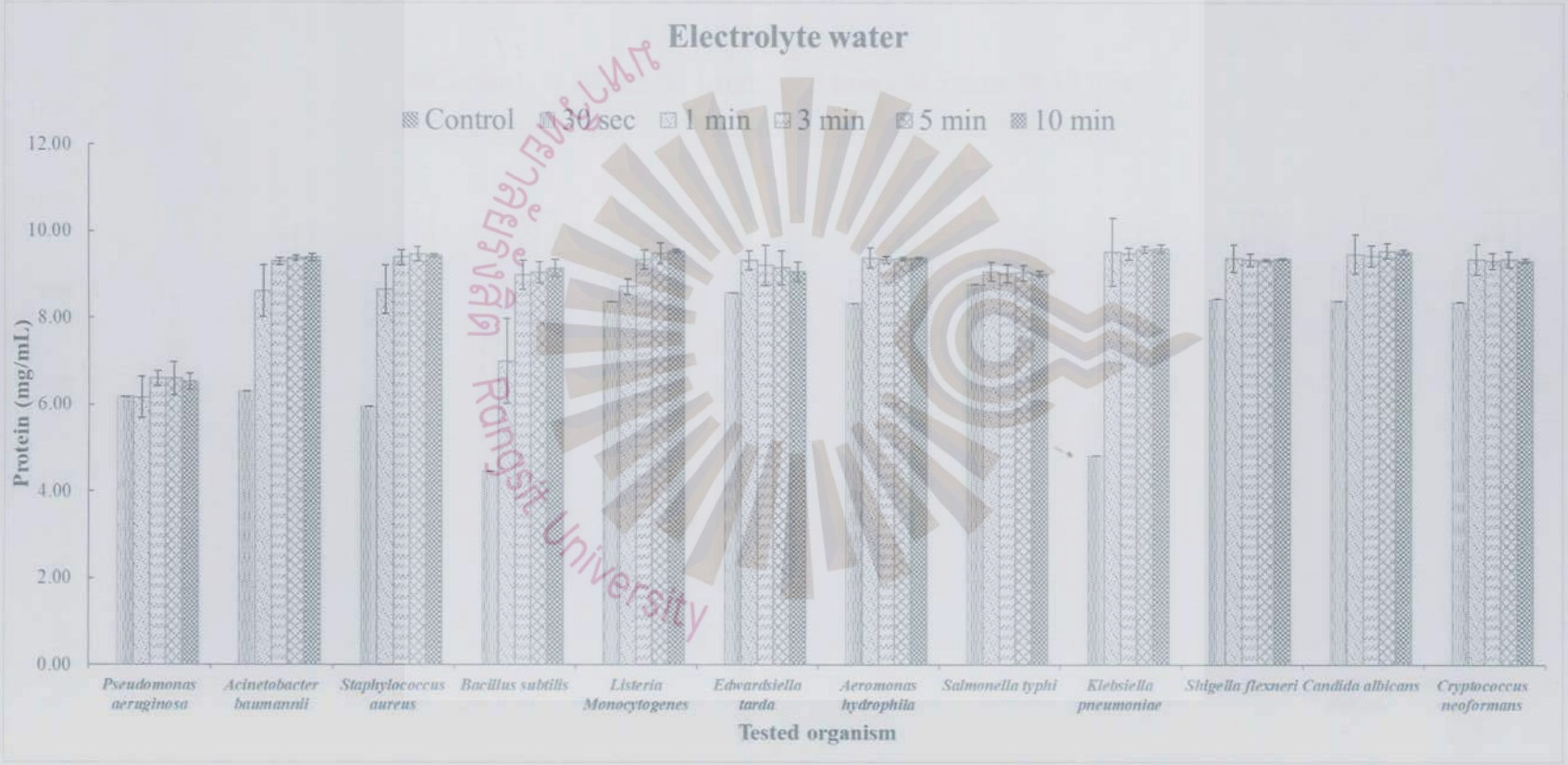
มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

รูปที่ 4.1 ปริมาณโปรตีนที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากเซลล์จุลินทรีย์ทดสอบที่ถูกทำลายด้วย 0.6% Sodium hypochlorite ที่เวลาต่าง ๆ เปรียบเทียบกับเมื่อเชื้อสัมผัสกับสารละลาย 0.85% NSSแสดงค่าในรูป mean ± SD จาก 3 การทดสอบที่เหมือนกัน



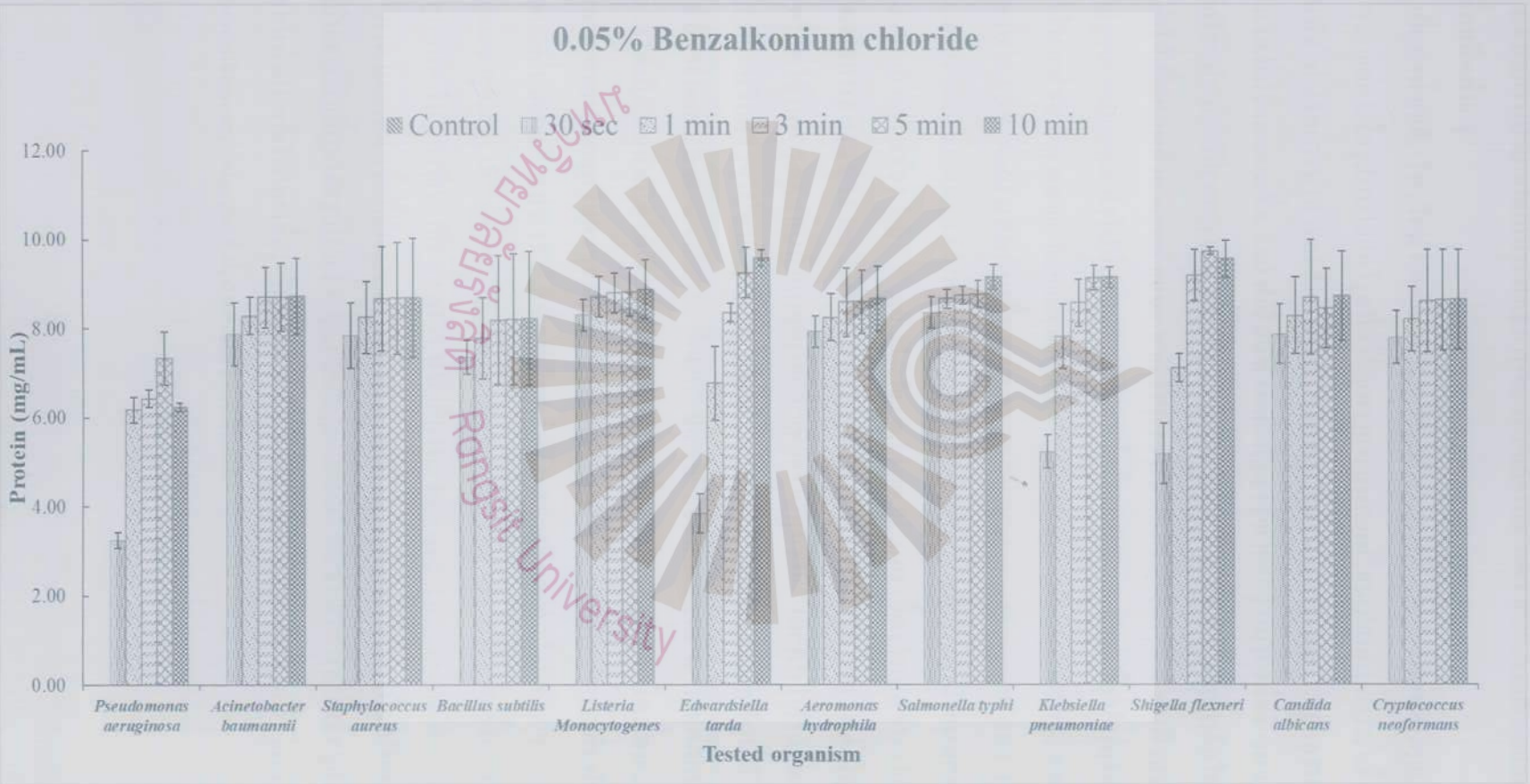
(*) หมายถึง ปริมาณของแบคทีเรียที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$ by Student T-test)

รูปที่ 4.2 ปริมาณโปรตีนที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากเซลล์จุลินทรีย์ทดสอบที่ถูกทำลายด้วยน้ำอิเล็กโทรไลต์ ที่เวลาต่าง ๆ เปรียบเทียบกับเมื่อเชื้อสัมผัสกับสารละลาย 0.85% NSSแสดงค่าในรูป mean±SD จาก 3 การทดสอบที่เหมือนกัน



(*) หมายถึง ปริมาณของแบคทีเรียที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$ by Student T-test)

รูปที่ 4.3 ปริมาณโปรตีนที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากเซลล์จุลินทรีย์ทดสอบที่ถูกทำลายด้วย 0.05% benzalkonium chloride ที่เวลาต่าง ๆ เปรียบเทียบกับเมื่อเชื้อสัมผัสกับสารละลาย 0.85% NSS แสดงค่าในรูป mean±SD จาก 3 การทดสอบที่เหมือนกัน



(*) หมายถึง ปริมาณของแบคทีเรียที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$ by Student T-test)

4.4 ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำอิเล็กโทรไลต์ และ benzalkonium chloride กับสารฆ่าเชื้อชนิดต่าง ๆ

เมื่อนำน้ำอิเล็กโทรไลต์ และ 0.05 % benzalkonium chloride มาทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่สำคัญทางการแพทย์เปรียบเทียบกับสารฆ่าเชื้อที่นิยมใช้ในครัวเรือนทั่วไป โดยการนำสารละลายเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบใน 0.85% NaCl หยดลงบนพื้นผิวแผ่นพลาสติกใสที่ปราศจากเชื้อ รอให้เชื้อแห้งและนำสารฆ่าเชื้อรูปแบบต่าง ๆมาหยดบนรอยเชื้อจุลินทรีย์แห้ง ทิ้งไว้ที่เวลา 3 และ 5 นาทีตามลำดับ เมื่อครบเวลา นำแผ่นพลาสติกใส่ลงใน 0.85% NaCl เขย่าให้เชื้อหลุดด้วย vortex mixer จากนั้นนำสารผสมมา spread plate บนผิวหน้าอาหารด้วยวิธี spread plate technique นำไปบ่มและนับจำนานเชื้อที่รอดชีวิต คำนวณเชื้อจุลินทรีย์รอดชีวิตและรายงานในหน่วย log colony forming unit/mL (log CFU/mL) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ สารละลาย 0.85% NaCl ผสมกับเชื้อทดสอบ (Microbial growth control) และ 0.6% sodium hypochlorite (Positive control) ผลการทดสอบพบว่า ปริมาณของเชื้อแบคทีเรียทดสอบ (Bacterial Growth control) อยู่ในช่วง log 5.41±0.31– log 6.13±0.02 และเชื้อราทดสอบ (Fungal Growth control) ทดสอบอยู่ในช่วง log 2.78±0.05- log 3.05±0.01 น้ำอิเล็กโทรไลต์ มีคุณสมบัติฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบทั้งแบคทีเรียและเชื้อราได้ทุกชนิด โดยพบว่าจำนวนเชื้อแบคทีเรียทดสอบลดลงหรือตรวจไม่พบการเจริญ ตั้งแต่เวลา 3 นาทีหลังการสัมผัสกับน้ำอิเล็กโทรไลต์ ในขณะ 0.05 % benzalkonium chloride มีคุณสมบัติฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบทั้งแบคทีเรียและเชื้อราได้เกือบทุกชนิดได้เช่นเดียวกัน ยกเว้นเชื้อ *Bacillus subtilis* โดยพบว่าจำนวนเชื้อแบคทีเรียทดสอบลดลงหรือตรวจไม่พบการเจริญ ตั้งแต่เวลา 3 นาทีหลังการสัมผัสกับ 0.05 % benzalkonium chloride แต่สารฆ่าเชื้อที่นิยมใช้ในครัวเรือนทั่วไป คือ 0.2% potassium permanganate 0.025% chlorine และ 0.5% baking powder ไม่สามารถฆ่าเชื้อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้หมดทุกชนิด ในเวลาที่เท่ากัน แสดงว่า น้ำอิเล็กโทรไลต์ และ 0.05 % benzalkonium chloride มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อที่ดีกว่าสารฆ่าเชื้อที่นิยมใช้ในครัวเรือนทั่วไป เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบกับสารฆ่าเชื้อมาตรฐาน 0.6% Sodium hypochlorite พบว่า สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบทั้งแบคทีเรียและเชื้อราได้ทั้งหมดภายในเวลา 3 นาที เช่นเดียวกับน้ำอิเล็กโทรไลต์ และ 0.05 % benzalkonium chloride ดังแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำอิเล็กโทรไลต์ และ benzalkonium chloride กับสารฆ่าเชื้อชนิดต่าง ๆแสดงค่าในรูป mean±SD จาก 3 การทดสอบที่เหมือนกัน

ลำดับที่	เชื้อทดสอบ	Viable count (Log CFU/mL)						
		Growth control	0.6% Sodium hypochlorite		Electrolyte water		0.05% benzalkonium chloride	
			3 min	5 min	3 min	5 min	3 min	5 min
1	*Pseudomonas aeruginosa*	5.41±0.31	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
2	*Acinetobacter baumannii*	5.99±0.04	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
3	*Staphylococcus aureus*	5.96±0.03	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
4	*Bacillus subtilis*	6.06±0.02	0.00*	0.00*	1.43±0.48	0.00*	4.49±0.20	4.74±0.13
5	*Listeria Monocytogenes*	5.54±0.14	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
6	*Edwardsiella tarda*	6.10±0.04	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
7	*Aeromonas hydrophila*	5.73±0.10	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
8	*Salmonella typhi*	6.08±0.05	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
9	*Klebsiella pneumoniae*	5.68±0.03	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
10	*Shigella flexneri*	6.13±0.02	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
11	*Candida albicans*	3.05±0.01	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
12	*Cryptococcus neoformans*	2.78±0.05	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*

(*) หมายถึง ปริมาณของแบคทีเรียที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$ by Student T-test)

ตารางที่ 4.6 ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำอิเล็กโทรไลต์ และ benzalkonium chloride กับสารฆ่าเชื้อชนิดต่าง ๆแสดงค่าในรูป mean±SD จาก 3 การทดสอบที่เหมือนกัน (cont.)

ลำดับที่	เชื้อทดสอบ	Viable count (Log CFU/mL)						
		Growth control	0.2% potassium permanganate		0.025% chlorine		0.5% baking powder	
			3 min	5 min	3 min	5 min	3 min	5 min
1	*Pseudomonas aeruginosa*	5.41±0.31	4.49±0.20	0.00*	0.00*	0.00*	4.69±0.09	0.00*
2	*Acinetobacter baumannii*	5.99±0.04	0.00*	0.00*	5.14±0.12	5.12±0.22	5.49±0.05	5.04±0.12*
3	*Staphylococcus aureus*	5.96±0.03	4.54±0.28*	4.26±0.24*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
4	*Bacillus subtilis*	6.06±0.02	4.73±0.15*	4.64±0.19*	5.27±0.12*	5.11±0.09*	5.67±0.07*	5.51±0.06*
5	*Listeria Monocytogenes*	5.54±0.14	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	5.53±0.08	5.48±0.08
6	*Edwardsiella tarda*	6.10±0.04	0.00*	0.00*	4.89±0.11*	4.84±0.24*	5.67±0.05	5.70±0.06
7	*Aeromonas hydrophila*	5.73±0.10	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
8	*Salmonella typhi*	6.08±0.05	0.00*	0.00*	4.26±0.24*	4.36±0.32*	4.90±0.05*	4.79±0.25*
9	*Klebsiella pneumoniae*	5.68±0.03	0.00*	0.00*	4.49±0.20	4.56±0.24	5.45±0.10	5.49±0.12
10	*Shigella flexneri*	6.13±0.02	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
11	*Candida albicans*	3.05±0.01	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
12	*Cryptococcus neoformans*	2.78±0.05	0.00*	0.00*	2.00±0.24*	1.66±0.10*	2.67±0.28	2.15±0.15*

4.5 ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำอิเล็กโทรไลต์ ในการฆ่าเชื้อด้วยเทคนิคการสัมผัสรูปแบบต่าง ๆ

เมื่อนำน้ำอิเล็กโทรไลต์ และสาร 0.05 % benzalkonium chloride มาทดสอบคุณสมบัติประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่สำคัญทางการแพทย์ด้วยเทคนิคการสัมผัสรูปแบบต่าง ๆโดยการนำสารละลายเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบใน 0.85% NaCl หยดลงบนพื้นผิวแผ่นพลาสติกใสและแผ่นผ้าที่ปราศจากเชื้อ รอให้เชื้อแห้งและนำตัวอย่างแผ่นพลาสติกหรือผ้ามาแช่หรือสเปรย์ด้วยสารทดสอบ ทิ้งไว้ที่เวลา 3 และ 5 นาทีตามลำดับ เมื่อครบเวลา นำแผ่นพลาสติกหรือผ้าใส่ลงใน 0.85% NaCl เขย่าให้เชื้อหลุดด้วย vortex mixer จากนั้นนำสารผสมมา spread plate บนผิวหน้าอาหารด้วยวิธี spread plate technique นำไปบ่มและนับจำนานเชื้อที่รอดชีวิต คำนวณเชื้อจุลินทรีย์รอดชีวิตและรายงานในหน่วย log colony forming unit/mL (log CFU/mL) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ สารละลาย 0.85% NaCl ผสมกับเชื้อทดสอบ (Microbial growth control) และ 0.6% sodium hypochlorite (Positive control)

สำหรับการทดสอบบนแผ่นพลาสติก ผลการทดสอบพบว่า ปริมาณของเชื้อแบคทีเรียทดสอบ (Bacterial Growth control) อยู่ในช่วง log 5.29±0.13– log 6.02±0.02 และเชื้อราทดสอบ (Fungal Growth control) ทดสอบอยู่ในช่วง log 2.60±0.05- log 3.06±0.04 น้ำอิเล็กโทรไลต์มีคุณสมบัติฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบทั้งแบคทีเรียและเชื้อราได้เกือบทุกชนิด ยกเว้น *Salmonella typhi* โดยพบว่าเมื่อนำแผ่นพลาสติกที่มีเชื้อทดสอบแห้งติดอยู่ไปแช่หรือสเปรย์ด้วยน้ำอิเล็กโทรไลต์ จะตรวจไม่พบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ 12 และ 11 สายพันธุ์ตามลำดับ ตั้งแต่เวลา 3 นาทีหลังการสัมผัสกับน้ำอิเล็กโทรไลต์ แต่ยังคงพบการเจริญของ *Salmonella typhi* แม้ว่ามีปริมาณที่ลดลงได้ เมื่อสเปรย์ด้วยน้ำอิเล็กโทรไลต์ 5 นาทีแล้ว

ในขณะที่สาร 0.05 % benzalkonium chloride มีคุณสมบัติฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบทั้งแบคทีเรียและเชื้อราได้เกือบทุกชนิดบนแผ่นพลาสติกที่มีเชื้อทดสอบแห้งติดอยู่ ยกเว้น *Bacillus subtilis, Edwardsiella tarda* และ *Shigella flexneri* โดยพบว่าเมื่อนำแผ่นพลาสติกที่มีเชื้อแห้งติดอยู่ไปแช่หรือสเปรย์ด้วย 0.05 % benzalkonium chloride จะตรวจไม่พบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ 11 และ 9 สายพันธุ์ตามลำดับ ตั้งแต่เวลา 3 นาทีหลังการสัมผัสกับ0.05 % benzalkonium chloride แต่ยังคงพบการเจริญของ *Bacillus subtilis, Edwardsiella tarda* และ *Shigella flexneri* แม้ว่ามีปริมาณที่ลดลงได้เมื่อแช่หรือสเปรย์ด้วย 0.05 % benzalkonium chloride 5 นาทีแล้ว ในขณะที่สารฆ่าเชื้อมาตรฐาน 0.6%

Sodium hypochlorite สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบทั้งแบคทีเรียและเชื้อราได้ทั้งหมดภายในเวลา 3 นาที

สำหรับการทดสอบบนแผ่นผ้า พบว่าเมื่อนำแผ่นผ้าที่มีเชื้อทดสอบแห้งติดอยู่ไปแช่หรือสเปรย์ด้วยน้ำอิเล็กโทรไลต์ จะตรวจไม่พบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ 9 และ 11 สายพันธุ์ตามลำดับ ตั้งแต่เวลา 3 นาทีหลังการสัมผัสกับน้ำอิเล็กโทรไลต์ แต่ยังคงพบการเจริญของ *Bacillus subtilis, Salmonella typhi* และ *Klebsiella pneumoniae* ได้เมื่อแช่ด้วยน้ำอิเล็กโทรไลต์ 5 นาที และยังคงพบการเจริญของ *Pseudomonas aeruginosa* ได้เมื่อสเปรย์ด้วยน้ำอิเล็กโทรไลต์ 5 นาทีแล้ว แต่มีปริมาณเชื้อที่ลดลง ตั้งแต่เวลา 3 นาทีหลังการสัมผัสกับน้ำอิเล็กโทรไลต์ แต่ยังคงพบการเจริญของ *Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis, Edwardsiella tarda, Aeromonas hydrophila* และ *Klebsiella pneumoniae* ได้

ในขณะที่นำแผ่นผ้าที่มีเชื้อทดสอบแห้งติดอยู่ไปแช่หรือสเปรย์ด้วย 0.05 % benzalkonium chloride ซึ่งมีคุณสมบัติฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบทั้งแบคทีเรียและเชื้อราบนแผ่นผ้าได้เกือบทุกชนิด ยกเว้น *Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis, Edwardsiella tarda* และ *Aeromonas hydrophila, Klebsiella pneumoniae* โดยพบว่าหากนำแผ่นผ้าที่มีเชื้อแห้งติดอยู่ไปแช่หรือสเปรย์ด้วย 0.05 % benzalkonium chloride จะตรวจไม่พบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ 12 และ 7 สายพันธุ์ตามลำดับ ตั้งแต่เวลา 3 นาทีหลังการสัมผัสกับน้ำอิเล็กโทรไลต์ แต่ยังคงพบการเจริญของ *Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis, Edwardsiella tarda, Aeromonas hydrophila* และ *Klebsiella pneumoniae* ได้เมื่อแช่หรือสเปรย์ด้วย 0.05 % benzalkonium chloride 5 นาทีแล้วแต่มีปริมาณเชื้อที่ลดลง ในขณะที่สารฆ่าเชื้อมาตรฐาน 0.6% Sodium hypochlorite สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบทั้งแบคทีเรียและเชื้อราได้เกือบทั้งหมดจากผ้าได้ภายในเวลา 5 นาทีและยังคงพบการเจริญของเชื้อบางชนิดได้เช่นกันแต่มีปริมาณที่น้อยลง ดังแสดงในตารางที่ 4.7-4.9

ตารางที่ 4.7 ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำอิเล็กโทรไลต์ และ 0.05% benzalkonium chloride ในการฆ่าเชื้อบนแผ่นพลาสติกด้วยเทคนิคการสัมผัสแบบแช่ แสดงค่าในรูป mean±SD จาก 3 การทดสอบที่เหมือนกัน

ลำดับที่	เชื้อทดสอบ	Viable count (Log CFU/mL)						
		Growth control	0.6% Sodium hypochlorite		Electrolyte water		0.05% benzalkonium chloride	
			3 min	5 min	3 min	5 min	3 min	5 min
1	*Pseudomonas aeruginosa*	5.29±0.13	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
2	*Acinetobacter baumannii*	5.40±0.01	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
3	*Staphylococcus aureus*	5.68±0.03	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
4	*Bacillus subtilis*	5.88±0.02	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	4.62±0.15	4.72±0.12
5	*Listeria monocytogenes*	5.57±0.07	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
6	*Edwardsiella tarda*	6.02±0.02	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
7	*Aeromonas hydrophila*	5.64±0.06	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
8	*Salmonella Typhi*	5.58±0.04	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
9	*Klebsiella pneumoniae*	5.67±0.02	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
10	*Shigella flexneri*	5.75±0.02	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
11	*Candida albicans*	3.06±0.04	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
12	*Cryptococcus neoformans*	2.60±0.05	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*

(*) หมายถึง ปริมาณของแบคทีเรียที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$ by Student T-test)

ตารางที่ 4.8 ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำอิเล็กโทรไลต์ และ 0.05% benzalkonium chloride ในการฆ่าเชื้อบนแผ่นพลาสติกด้วยเทคนิคการสัมผัสแบบสเปรย์ แสดงค่าในรูป mean±SD จาก 3 การทดสอบที่เหมือนกัน

ลำดับที่	เชื้อทดสอบ	Viable count (Log CFU/mL)						
		Growth control	0.6% Sodium hypochlorite		Electrolyte water		0.05% benzalkonium chloride	
			3 min	5 min	3 min	5 min	3 min	5 min
1	*Pseudomonas aeruginosa*	5.29±0.13	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
2	*Acinetobacter baumannii*	5.40±0.01	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
3	*Staphylococcus aureus*	5.68±0.03	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
4	*Bacillus subtilis*	5.88±0.02	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	5.42±0.14	5.35±0.13
5	*Listeria Monocytogenes*	5.57±0.07	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00	0.00*
6	*Edwardsiella tarda*	6.02±0.02	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	5.61±0.08	5.31±0.06
7	*Aeromonas hydrophila*	5.64±0.06	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
8	*Salmonella typhi*	5.58±0.04	0.00*	0.00*	5.71±0.04	5.51±0.04	0.00*	0.00*
9	*Klebsiella pneumoniae*	5.67±0.02	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
10	*Shigella flexneri*	5.75±0.02	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	4.10±0.17	0.00*
11	*Candida albicans*	3.06±0.04	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
12	*Cryptococcus neoformans*	2.60±0.05	0.00*	0.00*	0.00	0.00	0.00*	0.00*

(*) หมายถึง ปริมาณของแบคทีเรียที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$ by Student T-test)

ตารางที่ 4.9 ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำอิเล็กโทรไลต์ และ 0.05% benzalkonium chloride ในการฆ่าเชื้อบนแผ่นผ้าด้วยเทคนิคการสัมผัสแบบแช่ แสดงค่าในรูป mean±SD จาก 3 การทดสอบที่เหมือนกัน

ลำดับที่	เชื้อทดสอบ	Viable count (Log CFU/mL)						
		Growth control	0.6% Sodium hypochlorite		Electrolyte water		0.05% benzalkonium chloride	
			3 min	5 min	3 min	5 min	3 min	5 min
1	*Pseudomonas aeruginosa*	5.48±0.02	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	4.36±0.10*	0.00*
2	*Acinetobacter baumannii*	5.34±0.05	0.00*	0.00*	4.46±0.15	0.00*	0.00*	0.00*
3	*Staphylococcus aureus*	6.29±0.01	2.77±1.00*	2.67±0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
4	*Bacillus subtilis*	5.88±0.02	0.00*	0.00*	4.72±0.49*	4.26±0.24*	5.27±0.07*	0.00*
5	*Listeria Monocytogenes*	6.13±0.05	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	5.47±0.10*	0.00*
6	*Edwardsiella tarda*	5.62±0.02	0.00*	0.00*	2.67±2.31	0.00*	0.00*	0.00*
7	*Aeromonas hydrophila*	6.24±0.05	0.00*	0.00*	2.97±2.57	0.00*	0.00*	0.00*
8	*Salmonella typhi*	5.24±0.07	2.67±2.31*	2.67±2.31*	4.69±0.09*	4.74±0.13*	0.00*	0.00*
9	*Klebsiella pneumoniae*	5.78±0.01	0.00*	0.00*	4.10±0.17*	2.67±2.31*	0.00*	0.00*
10	*Shigella flexneri*	5.82±0.01	0.00*	0.00*	0.00*	0.00	0.67±0.58*	0.00*
11	*Candida albicans*	3.01±0.04	0.00*	0.00*	0.00*	0.00	0.00	0.00*
12	*Cryptococcus neoformans*	2.47±0.15	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	2.75±0.11*	0.00*

(*) หมายถึง ปริมาณของแบคทีเรียที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$ by Student T-test)

ตารางที่ 4.10 ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำอิเล็กโทรไลต์ และ 0.05% benzalkonium chloride ในการฆ่าเชื้อบนแผ่นผ้าด้วยเทคนิคการสัมผัสแบบสเปรย์ แสดงค่าในรูป mean±SD จาก 3 การทดสอบที่เหมือนกัน

ลำดับที่	เชื้อทดสอบ	Viable count (Log CFU/mL)						
		Growth control	0.6% Sodium hypochlorite		Electrolyte water		0.05% benzalkonium chloride	
			3 min	5 min	3 min	5 min	3 min	5 min
1	*Pseudomonas aeruginosa*	5.48±0.02	0.00*	0.00*	4.36±0.10*	0.67±0.58*	4.40±0.17*	4.20±0.17*
2	*Acinetobacter baumannii*	5.34±0.05	4.40±0.17*	4.20±0.17*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
3	*Staphylococcus aureus*	6.29±0.01	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
4	*Bacillus subtilis*	5.88±0.02	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	5.23±0.08*	2.00±2.00*
5	*Listeria Monocytogenes*	6.13±0.05	0.00*	0.00*	0.67±0.58*	0.00*	0.00*	0.00*
6	*Edwardsiella tarda*	5.62±0.02	2.67±2.31*	0.00*	2.33±1.53*	0.00	0.50±0.71*	4.00±0.00*
7	*Aeromonas hydrophila*	6.24±0.05	4.16±0.28*	4.43±0.51*	0.00*	0.00*	4.49±0.20*	4.59±0.36*
8	*Salmonella typhi*	5.24±0.07	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	2.67±2.31	0.00
9	*Klebsiella pneumoniae*	5.78±0.01	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	3.00±1.73	1.67±2.08*
10	*Shigella flexneri*	5.82±0.01	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
11	*Candida albicans*	3.01±0.04	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.87±0.75*	0.00*
12	*Cryptococcus neoformans*	2.47±0.15	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	1.50±0.17*	0.67±1.15*

(*) หมายถึง ปริมาณของแบคทีเรียที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$ by Student T-test)

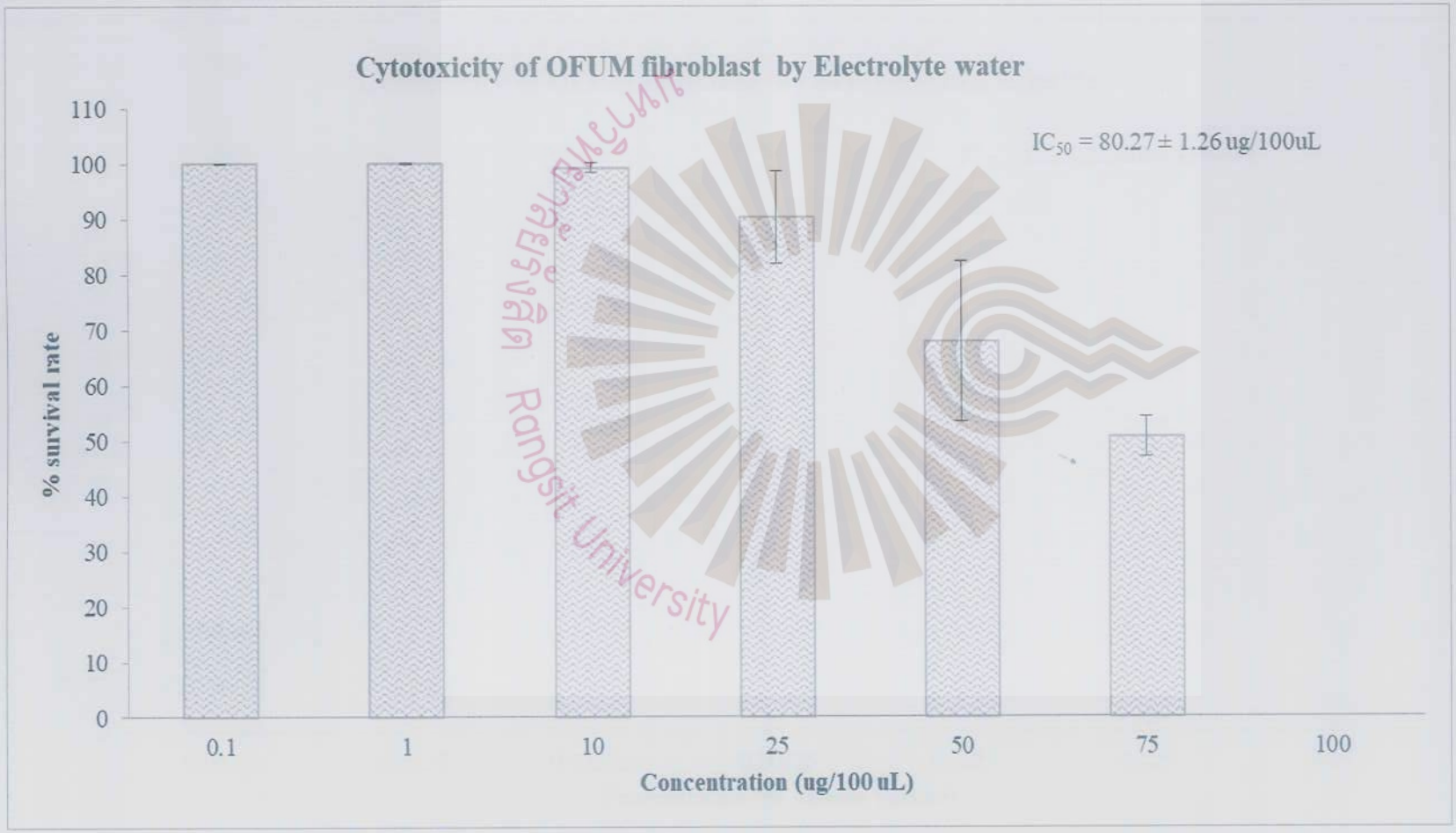
4.6 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ OMUF fibroblast ของน้ำอิเล็กโทรไลต์และสาร benzalkonium chloride

จากผลการทดลองความเป็นพิษต่อเซลล์ พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 0.1-100 µg/ 100 µL น้ำอิเล็กโทรไลต์ มีความเป็นพิษต่อเซลล์ OMUF fibroblast ในปริมาณค่อนข้างต่ำ โดยมีค่า IC50±SD เท่ากับ 80.27 ± 1.26 ug/100 uL ดังแสดงในรูปที่ 4.4

อย่างไรก็ตาม พบว่า benzalkonium chloride ที่ระดับความเข้มข้น 0.0078-0.05 % v/v มีความเป็นพิษต่อเซลล์ OMUF fibroblastในปริมาณที่สูง โดยมีค่า IC50±SD เท่ากับ 0.00081 ± 0.00013 % v/v ดังแสดงในรูปที่ 4.4-4.5

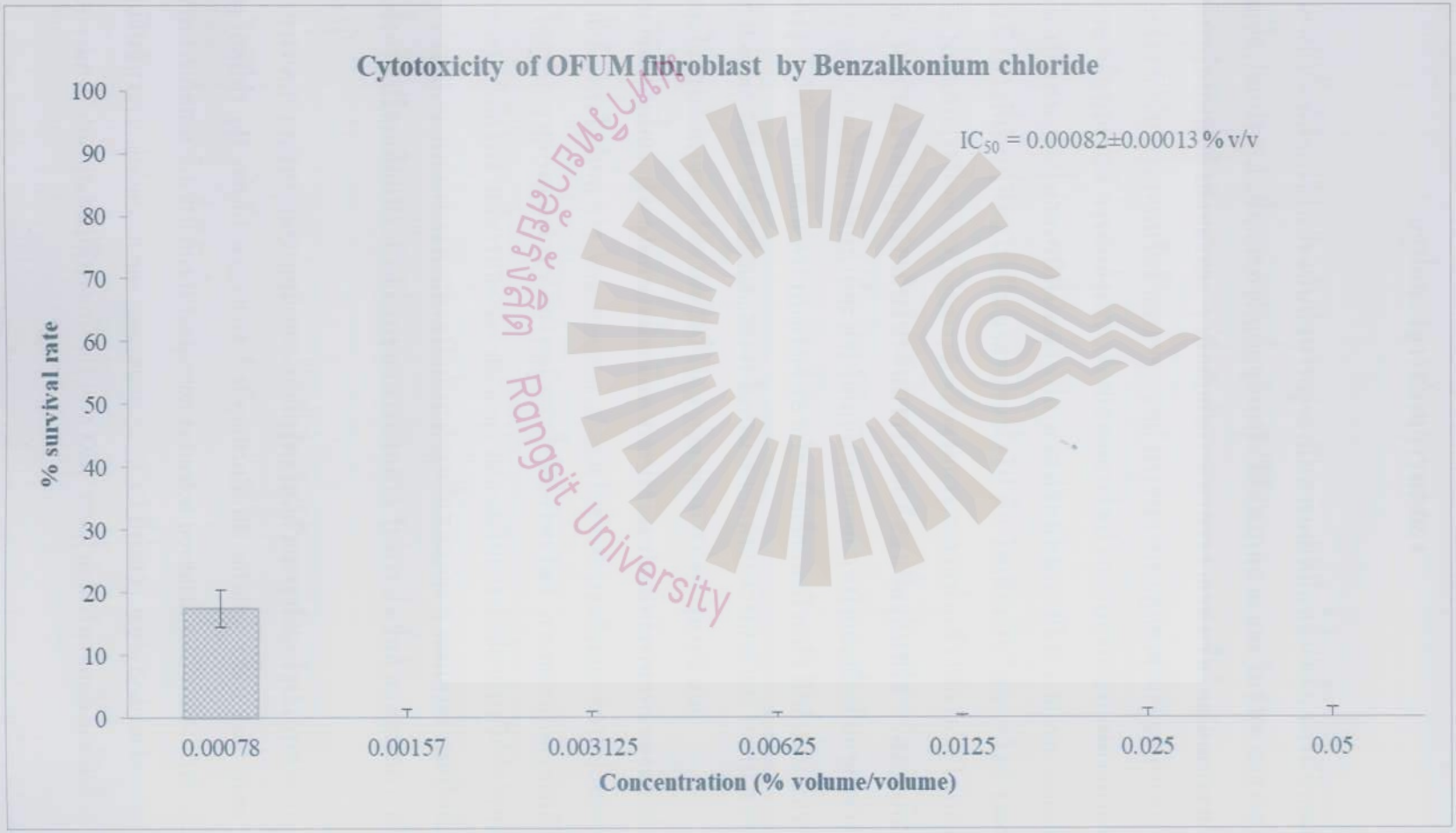
มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

รูปที่ 4.4 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ OMUF fibroblast ของน้ำอิเล็กโทรไลต์



มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

รูปที่ 4.5 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ OMUF fibroblast ของ Benzalkonium chloride



บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

น้ำยาฆ่าเชื้อที่นิยมใช้ในปัจจุบันส่วนใหญ่จะเป็นสารเคมีที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ ทำให้ปลอดเชื้อ หรือทำลายเชื้อ โดยน้ำยาฆ่าเชื้อควรกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ได้หลากหลาย และไม่จำเพาะเจาะจง ใช้กำจัดเชื้อจุลินทรีย์บนพื้นผิวสิ่งของต่าง ๆ เพื่อยับยั้งการแพร่กระจายของเชื้อโดยมีผลกระทบต่อเซลล์ในด้านต่าง ๆ เช่น การแตกหรือรั่วออกของเซลล์ การรบกวนสมดุลภายในเซลล์ การรบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ การยับยั้งกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอน เป็นต้น ทั้งนี้สารเคมีที่นิยมใช้คือ สารประกอบคลอรีน (chlorine containing compounds) ซึ่งสารที่เป็นที่นิยมใช้เป็นมาตรฐานทั่วไป คือ โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (sodium hypochlorite; NaOCl) สารนี้ออกฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อจากการละลายน้ำแล้วได้กรดไฮโปคลอรัส (hypochlorus; HOCl) เข้าทำปฏิกิริยากับโปรตีนภายในเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ หรืออาจเกิดการออกซิไดซ์ (oxidize) แต่สารเคมีเหล่านี้จะทำให้เกิดอันตรายต่อผิวหนังและเยื่อเมือกของร่างกายมนุษย์โดยตรง ทำให้ระคายเคืองต่อระบบทางเดินหายใจ เนื้อเยื่อและผิวหนัง มีกลิ่นฉุน มีฤทธิ์กัดกร่อนโลหะ (Levine, 2013; McCullough, 2014) ไม่สามารถฉีดพ่นบนร่างกาย และไม่เหมาะที่จะใช้ฆ่าเชื้อละอองไวรัสที่ติดตามของใช้ส่วนตัวหรือบรรจุภัณฑ์อาหารที่จะนำมาบริโภค

งานวิจัยฉบับนี้คณะผู้วิจัยได้สนใจที่จะศึกษาการประเมินประสิทธิภาพฤทธิ์ของสารฆ่าเชื้ออื่นๆ คือ น้ำอิเล็กโทรไลต์และสาร benzalkonium chloride ในการต้านจุลชีพและความปลอดภัยในการใช้งาน โดยทำการทดสอบคุณสมบัติทางเคมีของน้ำอิเล็กโทรไลต์ การทดสอบคุณสมบัติทางจุลชีววิทยาของน้ำอิเล็กโทรไลต์สารและbenzalkonium chloride ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารทั้งสองชนิดกับสารฆ่าเชื้อชนิดต่าง ๆ ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ รวมทั้งการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารดังกล่าว ในการฆ่าเชื้อด้วยเทคนิคการสัมผัสรูปแบบต่าง ๆ

ผลการทดสอบคุณสมบัติทางเคมีของน้ำอิเล็กโทรไลต์ด้วยพารามิเตอร์รูปแบบต่าง ๆ พบว่าน้ำอิเล็กโทรไลต์มีค่า pH เท่ากับ 8.62±0.02 ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น alkaline electrolyte water มีค่าประสิทธิภาพการเกิดออกซิเดชั่นรีดักชั่น (oxidation reduction potential; ORP) ปานกลาง และยังปริมาณคลอรีนอิสระ(available chlorine concentration: ACC) ที่ต่ำกว่า 0.6% Sodium hypochlorite ผลทดสอบความคงตัวของคุณสมบัติทางเคมี pH และ ORP ของน้ำอิเล็กโทรไลต์ตั้งแต่วันที่ 1 ถึง 7

หลังการผลิตเมื่อเทียบค่าการเปลี่ยนเปลี่ยนแปลงของ pH และ ORP พบว่าค่าทั้งสองมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยตั้งแต่วันที่ 3 เป็นต้นไป แสดงว่าน้ำอิเล็กโทรไลต์มีความคงตัวที่ดี

เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทั้งแบคทีเรียและเชื้อราก่อโรค ที่เวลา 30 วินาที 1 นาที 3 นาที 5 นาที 10 นาที และ 15 นาที เพื่อดูระยะเวลาที่น้อยที่สุดในการฆ่าเชื้อจุลชีพของน้ำอิเล็กโทรไลต์ พบว่าน้ำอิเล็กโทรไลต์สามารถฆ่าเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus subtilis*, *Edwardsiella tarda* , *Aeromonas hydrophila* , *Salmonella* Typhi , *Candida albican* และ*Cryptococcus neoformans* ได้ที่เวลา 30 วินาทีเป็นต้นไป และสามารถฆ่าเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria Monocytogenes*, *Shigella flexneri* ได้ที่เวลา 1 นาทีเป็นต้นไป สอดคล้องกับงานวิจัยของ นวลใย ญารักษา และคณะ (2021) ที่รายงานว่าน้ำอิเล็กโทรไลต์ที่เป็นกรดสามารถฆ่าเชื้อ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ตั้งแต่ 15 วินาที แรกของการสัมผัสเชื้อ (นวลใย ญารักษา และคณะ, 2021) และงานวิจัยของ Vahabi และคณะ ที่รายงานว่า น้ำอิเล็กโทรไลต์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus salivarius, Staphylococcus aureus, Lactobacillus casei, and Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ได้ภายในระยะเวลา 30 วินาที- 5 นาทีเช่นเดียวกัน(Vahabi *et.al.*,2020) ซึ่งสอดคล้องกับผลการวัด Intracellular protein leaking ด้วยการวัดค่าโปรตีนที่รั่วออกมาจากภายในเซลล์จุลินทรีย์เมื่อเซลล์ของจุลินทรีย์แตกสลาย วิธี dye-binding (Bradford) ที่เวลา 30 วินาที 1 นาที 3 นาที 5 นาที 10 นาที และ 15 นาที เปรียบเทียบกับชุดควบคุม พบว่า หลังจากที่นำน้ำออกซิไดซ์สัมผัสเชื้อจุลินทรีย์ที่ระยะเวลาต่าง ๆ จะมีการรั่วไหลของโปรตีนจากภายในเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบตั้งแต่เวลาที่ 30 วินาที และพบมากขึ้นในนาทีที่ 1 หลังการสัมผัสเชื้อและความเข้มข้นของโปรตีนค่อนข้างคงตัวในเวลาถัดๆไปที่ 3 นาที 5 นาที และ 10 นาที แสดงให้เห็นว่า กลไกในการทำลายเซลล์จุลินทรีย์ของน้ำอิเล็กโทรไลต์ คือ การทำให้เซลล์แตกและมีโปรตันรั่วออกของเซลล์ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Paola และคณะ (2005) ที่รายงานว่า น้ำอิเล็กโทรไลต์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* โดยการทำให้ผนังเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ได้รับความเสียหาย (Paola *et.al.*, 2005)

ในขณะที่ 0.05 % benzalkonium chloride พบว่าสามารถฆ่าเชื้อ *Acinetobacter baumannii, Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Listeria Monocytogenes, Aeromonas hydrophila, Salmonella typhi, Candida albicans,* และ *Cryptococcus neoformans* ได้ที่เวลา 30 วินาทีเป็นต้นไป และสามารถฆ่าเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* , *Edwardsiella tarda, Klebsiella pneumoniae* และ *Shigella flexneri* ได้ที่เวลา 3 นาทีเป็นต้นไป ซึ่งสอดคล้องกับผลการวัด Intracellular protein leaking เมื่อนำ 0.05 % benzalkonium chloride สัมผัสเชื้อจุลินทรีย์ที่ระยะเวลาต่าง ๆ จะมีการรั่วไหลของ

โปรตีนจากภายในเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบตั้งแต่เวลาที่ 30 วินาที และพบมากขึ้นในนาทีที่ 1, 3 และปริมาณโปรตีนเริ่มคงที่ที่เวลา 5 ถึง 10 นาทีเป็นต้นไป แสดงว่า กลไกในการทำลายเซลล์จุลินทรีย์ของ 0.05 % benzalkonium chloride คือ การทำให้เซลล์แตกเช่นเดียวกัน สอดคล้องกับรายงานของ ธนกร ศิริสมุทรที่ว่า benzalkonium chloride สามารถลดแรงตึงผิวและซึมผ่านผนังเซลล์จุลินทรีย์ได้ง่าย จึงทำให้เซลล์แตกสลาย (ธนกร ศิริสมุทร, 2012) ผลการทดสอบข้างต้นสอดคล้องกับงานวิจัยของ Vahabi และคณะ

ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำอิเล็กโทรไลต์และ 0.05 % benzalkonium chloride กับสารฆ่าเชื้อชนิดต่าง ๆ ที่นิยมใช้ในครัวเรือนทั่วไป พบว่าน้ำอิเล็กโทรไลต์ มีคุณสมบัติฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบทั้งแบคทีเรียและเชื้อราได้ทุกชนิด เนื่องจากจำนวนเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราทดสอบลดลงหรือตรวจไม่พบการเจริญ ตั้งแต่เวลา 3 นาทีหลังการสัมผัส ในขณะ0.5 % benzalkonium chloride มีผลทำให้จำนวนเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราทดสอบลดลงหรือตรวจไม่พบการเจริญทั้งหมด ตั้งแต่เวลา 3-5 นาทีหลังการสัมผัส แต่สารฆ่าเชื้อที่นิยมใช้ในครัวเรือนทั่วไป คือ 0.2% potassium permanganate , 0.025% chlorine และ 0.5% baking powder ไม่สามารถฆ่าเชื้อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้หมดทุกชนิด ในเวลาที่เท่ากัน แสดงว่า น้ำอิเล็กโทรไลต์และ 0.5 % benzalkonium chloride มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อที่ดีกว่าสารฆ่าเชื้อที่นิยมใช้ในครัวเรือนทั่วไป ซึ่งมีสอดคล้องกับงานวิจัยของ Naka และคณะ (2020) ที่แสดงให้เห็นว่า EW มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ NaClO (Naka *et.al*.,2020)

ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำอิเล็กโทรไลต์และ 0.05 % benzalkonium chloride เปรียบเทียบกับ 0.6% Sodium hypochlorite ในการฆ่าเชื้อบนพื้นผิวแผ่นพลาสติกใสและแผ่นผ้าที่มีเชื้อทดสอบปนเปื้อนอยู่ด้วยเทคนิคการสัมผัสรูปแบบต่าง ๆ คือ การแช่กับการสเปรย์ พบว่าน้ำอิเล็กโทรไลต์สามารถฆ่าเชื้อทดสอบบนแผ่นพลาสติกด้วยเทคนิคการแช่ดีกว่าการสเปรย์ เนื่องจากการแช่แผ่นพลาสติกใสที่มีเชื้อทดสอบปนเปื้อนในน้ำอิเล็กโทรไลต์ สามารถฆ่าเชื้อได้ตั้งแต่ 3 นาทีเป็นต้น แต่การสเปรย์ด้วยน้ำอิเล็กโทรไลต์แม้ว่าใช้เวลาถึง 5 นาทีสามารถฆ่าเชื้อทั้งหมดยกเว้น *Salmonella* typhi เพียงแต่ทำให้มีปริมาณเชื้อที่ลดลงเท่านั้น ในขณะที่การฆ่าเชื้อทดสอบบนแผ่นผ้าของน้ำอิเล็กโทรไลต์ด้วยการสเปรย์ดีกว่าการแช่เพราะการสเปรย์สามารถฆ่าเชื้อส่วนใหญ่ได้ตั้งแต่ 3 นาทีเป็นต้น และฆ่าเชื้อได้เกือบทั้งหมดในเวลา 5 นาที แต่การแช่แม้ใช้เวลาถึง 5 นาทียังไม่สามารถฆ่าเชื้อทดสอบ 3 ชนิดให้หมดไปได้ เพียงแต่ทำให้มีปริมาณเชื้อที่ลดลงเท่านั้น

0.05 % benzalkonium chloride สามารถฆ่าเชื้อทดสอบบนแผ่นพลาสติกด้วยเทคนิคการสัมผัสแบบแช่ดีกว่าแบบสเปรย์เช่นเดียวกัน เนื่องจากการแช่แผ่นพลาสติกใสที่มีเชื้อทดสอบปนเปื้อนใน 0.05 % benzalkonium chloride สามารถฆ่าเชื้อทั้งหมดยกเว้น *Bacillus subtilis* ได้

ตั้งแต่ 3 นาทีเป็นต้น แต่ การสเปรย์ด้วย0.5 % benzalkonium chloride แม้ว่าใช้เวลาถึง 5 นาทียังไม่สามารถฆ่าเชื้อทดสอบ 2 ชนิดให้หมดไปได้ เพียงแต่ทำให้มีปริมาณเชื้อที่ลดลงเท่านั้น ในขณะที่การฆ่าเชื้อทดสอบบนแผ่นผ้าของ 0.05 % benzalkonium chloride ด้วยการแช่ดีกว่าการสเปรย์ เพราะการแช่สามารถฆ่าเชื้อทั้งหมดได้ตั้งแต่ 3 นาทีเป็นต้น แต่แบบสเปรย์แม้ใช้เวลาถึง 5 นาทียังไม่สามารถฆ่าเชื้อทดสอบ 6 ชนิดให้หมดไปได้ เพียงแต่ทำให้มีปริมาณเชื้อที่ลดลงเท่านั้น

อย่างไรก็ตาม พบว่า 0.6% Sodium hypochlorite สามารถฆ่าเชื้อทดสอบบนแผ่นพลาสติกใสและผ้าได้หมดทุกชนิดตั้งแต่ 3 นาทีเป็นต้นโดยไม่ขึ้นกับเทคนิคสัมผัส

ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ OMUF fibroblast ที่ระดับความเข้มข้น 0.1-100 µg/100 µL น้ำอิเล็กโทรไลต์ มีความเป็นพิษต่อเซลล์ OMUF fibroblast ในปริมาณค่อนข้างต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Djalil และคณะ ที่พบว่าเมื่อนำน้ำอิเล็กโทรไลต์ชนิด alkaline ทดสอบความเป็นพิษกับ T47D breast cancer cell แสดงค่า IC50 สูงถึง 47.0% (Vahabi *et.al.*,2019) อย่างไรก็ตาม Reis และคณะรายงานว่าน้ำอิเล็กโทรไลต์ ชนิดที่เป็น acid มีค่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์ L929 cell linesใกล้เคียงกัน โดยให้ IC50 41.69 ± 9.68% % (Reis *et.al.*,2021)

อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ OMUF fibroblast ของสาร benzalkonium chloride ที่เริ่มต้นที่ความเข้มข้น 0.0078-0.05 % v/v พบว่ามีความเป็นพิษที่สูงมาก สอดคล้องกับการรายงานของ Halder และ Khopade ที่ได้รายงานว่าสารละลาย benzalkonium chloride ทำให้เกิดอันตรายต่อเนื้อเยื่อ Statens Seruminstitut rabbit cornea cells ค่า IC50 สูงถึง 10% - 20% (Halder และ Khopade, 2020) งานวิจัยในครั้งในใช้ความเข้มข้นต่ำกว่าที่ระบุไว้ แต่ก็ยังพบความเป็นพิษที่สูงมาก

จากผลการทดสอบทั้งหมด สรุปได้ว่า สารฆ่าเชื้อที่นำมาทดสอบในครั้งนี้คือ น้ำอิเล็กโทรไลต์และ 0.5 % benzalkonium chloride มีความคงทนและมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่นำมาทดสอบได้ทุกชนิด ใกล้เคียงกับ Sodium hypochlorite และมีความสามารถในการฆ่าเชื้อสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารฆ่าเชื้ออื่น ๆ ได้แก่ potassium permanganate, chlorine และ baking powder โดยใช้เวลาในการฆ่าเชื้อทดสอบเพียง 1-3 และ3- 5 นาที ตามลำดับ หลังการสัมผัสเชื้อเท่านั้น เทคนิคการสัมผัสเชื้อและพื้นผิวของวัตถุ มีผลต่อการฆ่าเชื้อ การแช่วัตถุและพื้นผิวเรียบลื่นจะทำให้สามารถฆ่าเชื้อทดสอบได้ดีที่สุดโดยใช้เวลาในการฆ่าเชื้อทดสอบเพิ่มขึ้นเป็น 3- 5 นาทีเป็นต้นไป จึงจะสามารถขจัดเชื้อทั้งหมดได้ อย่างไรก็ตาม เชื้อบางชนิด เช่น *Bacillus subtilis* ที่สามารถสร้างสปอร์ จะมีความคงทนและไม่สามารถใช้ 0.5 % benzalkonium chloride กำจัดไปได้ ดังนั้น ทั้งน้ำอิเล็กโทรไลต์และ 0.5 % benzalkonium chloride มีประสิทธิภาพในการการฆ่าเชื้อบน

พื้นผิวของวัตถุสิ่งของและผ้าได้เป็นอย่างดี แต่หากนำมาใช้หากฉีดพ่นบนร่างกาย 0.5 % benzalkonium chloride อาจไม่เหมาะสมเนื่องจากมีความเป็นพิษค่อนข้างสูง

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บรรณานุกรม

กฤษณ์ ถิรพันธุ์เมธี บทความเผยแพร่ความรู้สู่ประชาชน น้ำยาฆ่าเชื้อ กับ โควิด-19 โคโรน่าไวรัส [Online] Available: https://pharmacy.mahidol.ac.th/th/knowledge/article/483/โควิด-19 น้ำยาฆ่าเชื้อ/(assessed September 22, 2020)

คนึงนิจ ก่อธรรมฤทธิ์ (2552) คู่มือผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อ ผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อและทำความสะอาดสารเคมีกำจัดแมลง สัตว์รบกวนด้านการปศุสัตว์. สำนักพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าปศุสัตว์กรมปศุสัตว์. หน้า 7-9.

ธนกร ศิริสมุทร (2012) พิษวิทยาของสารทำความสะอาด วารสารเภสัชกรรมโรงพยาบาล 22(3) 258-262.

ธนิดา หรินทรานนท์, คนึงนิจ ก่อธรรมฤทธิ์, จุฬาพร ศรีหนา, และ สุดารัตน์ เคยเหล่า. (2556). การศึกษาอายุการจัดเก็บและประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของกลูตารัลดีไฮด์และอัลคิลเบนซิลไดเมทิลแอมโมเนียมคลไรด. สำนักพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าปศุสัตว์กรมปศุสัตว์. หน้า 3.

นวลใย ญารักษา, ชัดชัย แก้วตา, ศุภาวีร์ มากดี, และ ธีระ สาธุพันธ์ (2021) ประสิทธิภาพของน้ำอิเล็กโทรไลต์ชนิดกรดในการฆ่าเชื้อโรค prawarun agricultural journal, 18(2): 41 – 48

เนาวรัตน์ รังสีภาณุรัตน์ แนวทางในการวินิจฉัยและกำกับดูแลผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อที่จัดเป็นวัตถุอันตราย [Online] Available: (assessed September 22, 2020)

ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม เรื่องบัญชีรายชื่อวัตถุอันตราย พ.ศ.2546

ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่องหลักเกณฑ์การทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อโรคบนพื้นแข็งที่ไม่มีรูพรุนของผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อโรค ชนิดของเหลว

ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่องหลักเกณฑ์การทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อโรคบนพื้นแข็งที่ไม่มีรูพรุนของผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อโรค ชนิดฉีดพ่นธรรมดาหรือฉีดพ่นอัดก๊าซ

พระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535

พิณทิพย์ พงษเพ็ชร (2540) Chemical Disinfectants. เอกสารประกอบการบรรยายในการอบรม เรื่องการอบรมความรู้พื้นฐานวิชาการ ณ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา,

ภาณุพงศ์ มหาพรหม (2554) ยาฆ่าเชื้อและยาปราศจากเชื้อ (Antiseptic and Disinfectant)[Online].Available:http://www.as.mju.ac.th/EBook/t_panupong/Antiseptic and disinfectants.pdf [หน้า 2-7. (assessed September 22, 2020)

วรรณพร ศรีสุคนธรัตน์ (2558) สารต้านจุลินทรีย์ที่ใช้ในบ้านเรือนหรือทางสาธารณสุข. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา หน้า 13-40.

ศิริสวัสดิ์ จันทร์ศรี พัสวี ภัคพงศ์ การศึกษาผลการใช้ผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียในฟาร์มไก่เนื้อ ฟาร์มสุกร ฟาร์มโคนม และฟาร์มโคเนื้อ [Online].Available : http://afvc.dld.go.th/webnew/images/stories/Document/vichakan/1 9 - 8 - 6 3 / Full-paper.pdf หน้า 1-24. (assessed September 22, 2020)

Djalil A. D., Sundhani E, Wahyuningrum R., Hartanti D., Lestiowati N., Pangestu P., Setiaji R., Suwandri S. (2019) Antibacterial, *in vitro* cytotoxic, and antioxidant activities of electrolyzed oxidizing/reducing water. International Journal of Applied Pharmaceutics 11:1-4.

Guentzel, J.L., Liang, L. K., Callan, M. A., Emmons, S. A. and Dunham, V. L. (2017). Application of electrolyzed oxidising water as a sanitiser to extend the shelf-life of seafood products: a review. J Food Sci Technol. 54(5):1321-1332.

Halder A., Khopade A.J. (2020) Physiochemical Properties and Cytotoxicity of a Benzalkonium Chloride-Free, Micellar Emulsion Ophthalmic Formulation of Latanoprost. Clinical Ophthalmology.14: 3057–3064

Hricova D., Stephan R., Zweifel C. (2008) Electrolyzed Water and Its Application in the Food Industry. Journal of Food Protection, 71(9): 1934-1947.

Kim, B. S., Lee, J. Y., and Hwang, B. K. (2000). In vivo control and in vitro antifungal activity of rhamnolipid, a glycolipid antibiotic, against Phytophthora capsici and Colletotrichum orbiculare. Pest Management Science 56(12),1029-1035.

Levine, J.M. (2013). Dakin's Solution: Past, Present, & Future. Advanced Skin Wound Care, 26(9), 410–414.

Naka A., Nakamura K., Kurahashi M. (2020) Slightly Acidic Electrolyzed Water to Remove *Methylobacterium mesophilicum*, *Rhodotorula mucilaginosa* and *Cladosporium cladosporioides* in Households. Applied Microbiology, 607-614.

Maria I. Gil&Vicente M. Gómez-López&Yen-Con Hung&Ana Allende. (2015). Potential of Electrolyzed Water as an Alternative Disinfectant Agent in the Fresh-Cut Industry.Food Bioprocess Technol. 8:1 336-1348.

McCullough, M. & Carlson, G.W. (2014). Dakin's solution: historical perspective & current practice. Annals of Plastic Surgery, 73, 254–256.

Ogilvie B. H., Solis-Leal A., Lopez J. B., Poole B.D., Robison R. A., Berges B. K. (2021) Alcohol-free hand sanitizer and other quaternary ammonium disinfectants quickly and effectively inactivate SARS-CoV-2. J Hosp Infect (108),142-145.

Paola, C.L., Vivian, R.C., Mercado, M., Deaz, M., Carrascal, A.K., (2005). Effectiveness of electrolyzed oxidizing water for inactivating *Listeria monocytogenes* in lettuce. Universitas. Sci. 10, 97-108.

Reddy, K.V.R.,Yedery, R.D., and Aranha, C.(2004).Antimicrobial peptides: premises and promises. Int. J.Antimicrob.Agents 24, 536–547.

Renata N. · Natalia N. J., · Marek J., · Anna M. (2017) The preliminary study of prebiotic potential of Polish wild mushroom polysaccharides: the stimulation effect on Lactobacillus strains growth Eur J Nutr, 1-11.

Reis R., Sipahi H., Dinc O., *et al* (2021) Toxicity, mutagenicity and stability assessment of simply produced electrolyzed water as a wound healing agent *in vitro*. Human & Experimental Toxicology. 1-12.

Rivero-Pérez N, *et al.* (2016). Anti-inflammatory effect of aqueous extracts of spent Pleurotus ostreatus substrates in mouse ears treated with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. J Pharmacol. 141–144.

Rycroft, C.E., M.R. Jones, G.R. Gibson and R.A. Rastall. (2001). A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. J. Appl. Microbiol. 91: 878-887.

Saavedra (2009) Chemical composition and physicochemical properties of shiitake mushroom and high fiber products CyTA – Journal of FoodVol. 7, No. 1, May 2009, 7–14

Sakurai, Y. M., N. Y. Sato and K. Sato. (2003) Endoscope contamination from HBV- and HCV-positive patients and evaluation of a cleaning/disinfecting method using strongly acidic electrolyzed water. Digestive Endoscopy 15: 19-24.

Sangnark A, Noomhorm A (2003) Effect of particle sizes on functional properties of dietary fibre prepared from sugarcane bagasse. Food Chem 80: 221-229

Schillaci, D., Arizza, V., Gargano, M. L., and Venturella, G. (2013). Antibacterial activity of mediterranean oyster mushrooms, species of genus Pleurotus (higher basidiomycetes). Int. J. Med. Mushrooms 15, 591–594.

Siu, K.C., Chen, X., Wu J.Y. (2014) Constituents actually responsible for the antioxidant activities of crude polysaccharides isolated from mushrooms. J. Funct. Foods, 11, 548–556.

Smiderle, F. R., Carbonero, E. R., Mellinger, C. G., Sassaki, G. L., Gorin,P. A. J., & Iacomini, M. (2006). Structural characterization of a polysaccharide and a b-glucan isolated from the edible mushroom *Flammulina velutipes*. Phytochemistry, 67, 2189–2196.

Tsuchiya H.,Sato,M.,Miyazaki,T.,Fujiwara,S.,Tanigaki,S.,Ohyama,M.,*et al.*(1996).Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Ethnopharmacol. 50, 27–34.

Vahabi S.. Shokri M. Lazar M. (2020) Effects of electrolyzed water on the growth of oral pathologic bacteria species and its cytotoxic effects on fibroblast and epithelial cells at different Ph values. Iran J Med Sci. 45(4):1-9.

Venkitanarayanan, K. S., Ezeike, G. O., Hung, Y. C., and Doyle, M.P. (1999). Efficacy of electrolyzed oxidizing water for inactivating Escherichia coli O157:H7, Salmonella Enteritidis and Listeria monocytogenes. Applied and Environmental Microbiology 65, 4276-4279.

Wang JC, Hu SH, Lee WL and Tsa LY, (2001). Antimutangenicity of extracts of *Hericium erinaceus*. Kaohsiung J Med Sci 17:230–238.

Wang, Y.(2009) Prebiotics: Present and future in food science and technology. Food Res. Int., 42, 8–12.

Wasser S.P., Weis A.L., (1999) Therapeutic effects of substances occurringin higher basidiomycetes mushrooms: a modern perspective, Crit. Rev.Immunol. 19 65–96

Whitham, F.H., D. H. Blaydes, R.M. Devin and D. Van. (1971) Experiments in Plant Physiology. Nostrand company, New York. 245 p

Wijnands, M. V. W. (1999). A comparison of the effects of dietary cellulose and ferment ablegalacto-oligosaccharides, in rat model of colorectal carcinogenesis: fibre in both high and low fat backgrounds. Carcinogenesis 20(1): 651-656.

Wongputtisin, P. (2003) Selection of Oligosaccharides from Some Local Plants for Utilizing as Prebiotics. M.S. thesis, Chinghai University.

Xiao, J.HR.; Xiao, D.M.; Chen, D.X.; Xiao, Y.; Liang, Z.Q.; Zhong, J.J. (2012) Polysaccharides from the medicinal mushroom Cordyceps taii show antioxidant and immune enhancing activities in a D-galactose-induced aging mouse model. Evid. Based Complement. Altern. Med., 2012, 273435.

Xu W., Huang J.J., Cheung P.C.K., (2012) Extract of Pleurotus pulmonarius suppresses liver cancer development and progression through inhibition of VEGF-induced PI3K/AKT signalling pathway, PLoS ONE 7 e34406.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

การเตรียมสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

การเตรียมสารเคมี

การเตรียม 1 M Phosphate buffer pH 1.8, 6.6 และ 8.7

$$[K_2HPO_4] = \frac{1 \times 174.18 \times 1000}{1000}$$

$$= 174.18 \text{ กรัม}$$

ดังนั้น ชั่ง K_2HPO_4 174.18 กรัม ละลายให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

หลังจากนั้นปรับ pH โดยใช้ 6 M HCl หรือ 6 M NaOH จนกระทั่งได้ pH ที่ต้องการคือ 1.8, 6.6 และ 8.7

การเตรียม 1 M Sodium Phosphate buffer pH 7

$$[Na_2HPO_4] = \frac{1 \times 141.96 \times 500}{1000}$$

$$= 70.98 \text{ กรัม}$$

ดังนั้น ชั่ง Na_2HPO_4 70.98 กรัม ละลายให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

หลังจากนั้นปรับ pH โดยใช้ 6 M HCl หรือ 6M NaOH จนกระทั่งได้ pH ที่ต้องการ

การเตรียม 0.85% Sodium chloride (NaCl)

Sodium chloride (NaCl)	8.5 g.
DW	1000 ml.

วิธีทำ

เท Sodium chloride และน้ำกลั่นที่เตรียมไว้ใส่ในVolumetric flaskขนาด 1000 ml. แล้ว mix จนกว่าจะละลาย

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

2. เตรียม Complete media ชนิด DMEM ปริมาตร 40 ml ประกอบไปด้วย

- Media DMEM	35 mL
- Anti – Myco	400 µL
- L – glutamin	400 µL
- Non – estential	400 µL
- FBS	4 µL

3. เตรียม Triton x 1 %

Triton x 1 g ในน้ำปริมาตร 99 ml

4. เตรียม Tryptic Soy Broth

- Ingredients	Gms / Litre
- Tryptic soy agar(TSA)	30 g
- DW	1000 ml.

อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth เป็นอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไป Tryptic Soy Broth เป็นอาหารเหลว ปริมาณที่ใช้เตรียม 30.0 กรัมต่อน้ำ 1ลิตร

5. เตรียม Tryptic soy agar (TSA)

- Ingredients	Gms / Litre
- Tryptic soy agar(TSA)	40 g
- DW	1000 ml.

อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy agar เป็นอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไป Tryptic Soy agar เป็นอาหารแข็ง ปริมาณที่ใช้เตรียม 40.0 กรัมต่อน้ำ 1ลิตร

6. การเตรียม Tryptic soy broth สำหรับเก็บตัวอย่างเชื้อใน -80 °C

TSB 3 g

Glycerol 15 ml

น้ำกลั่น 85 ml

ละลายส่วนประกอบทั้งหมด ดูดใส่ Vial tube หลอดละ 1.5 ml แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C, 15-20 นาที

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ประวัติผู้วิจัย

คำนำหน้า ☐ นาย ☑ นาง ☐ นางสาว

ตำแหน่งทางวิชาการ ☐ ศ. ☐ รศ. ☑ ผศ. ☐ อื่นๆ _____ดร._____

ชื่อผู้วิจัย พรรณนภา

นามสกุลผู้วิจัย เภาทอง

ชื่อภาษาอังกฤษ Pannapa

นามสกุลภาษาอังกฤษ Powthong

ที่อยู่(บ้าน) 84/27 หมู่ 5 ตำบล บางพูน อำเภอ เมือง จังหวัด ปทุมธานี

รหัสไปรษณีย์(บ้าน) 12000

โทรศัพท์(บ้าน) -

แฟกซ์ (บ้าน) -

ที่อยู่ (ที่ทำงาน) 52/347 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต หมู่บ้านเมืองเอก ถนนพหลโยธิน ต. หลักหก อ. เมือง จ. ปทุมธานี

จังหวัด(ที่ทำงาน) ปทุมธานี

รหัสไปรษณีย์(ที่ทำงาน) 12000

โทรศัพท์(ที่ทำงาน) 0-2997-2222 ต่อ 1434

แฟกซ์(ที่ทำงาน) 0-2997-2200 ต่อ 5577

E-Mail Address : pannapa.p@rsu.ac.th

ปริญญาตรี

สาขา คณะเทคนิคการแพทย์

ปีที่จบ 2544

สถาบัน มหาวิทยาลัยมหิดล

ประเทศ ไทย

ปริญญาเอก

สาขา เวชศาสตร์เขตร้อน

ปีที่จบ 2549

สถาบัน มหาวิทยาลัยมหิดล

ประเทศ ไทย

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Post-Doctoral fellowship under the Tokyo Biochemical Research Foundation (TBRF) at Department of Appropriate Technology Development and Transfer, Research Institute, International Medical Center of Japan Ministry of Health Labour and Welfare of Japan.

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารภายในประเทศ(โปรดระบุวารสารที่ตีพิมพ์ด้วย)

-

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ(โปรดระบุวารสารที่ตีพิมพ์ด้วย)

1.Pannapa Susomboon, Yaowapa Maneerat, Paron Dekumyoy, Thareerat Kalambaheti, Moritoshi Iwagami, Kanako Komaki- Yasuda, Shinichiro Kawazu, Noppadon Tangpukdee, Sornchai Looareesuwan, Shigeyuki Kano. Down-regulation of tight junction mRNAs in human endothelial cells co-cultured with *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes, Parasitology International, Vol. 55 , 107-112, 2006.

2. Pannapa Susomboon, Moritoshi Iwagami, Noppadon Tangpukdee, Srivicha Krusood, Sornchai Looareesuwan, and Shigeyuki Kano. Population genetic structure of *Plasmodium falciparum* in the Thai-Myanmar border region - microsatellite DNA analysis, Malar J. 2008 Oct 21; 7:212.

3. Pannapa Powthong, Moritoshi Iwagami, Sornchai Looareesuwan, and Shigeyuki Kano. Early adhesion molecule induction by cytoadherence of malaria-infected red blood cells and comodulation of immune cells: the roles of parasite adhesion and time course, preparing for submit.

4. Pannapa Powthong, Acharawan Thongmee, Pattra Suntornthiticharoen. Evaluation of the Endophytic Fungi Extract for their Antimicrobial activity from *Sesbania grandiflora* (L.) Pers. International Journal on Pharmaceutical and Biomedical Research (IJPBR). 2012, 3(2), 132-136.

5. Pannapa Powthong, Acharawan Thongmee, Pattra Suntornthiticharoen. Screening of Antimicromicrobial Activities of the Endophytic Fungi from *Sesbania grandiflora* (L.) Pers., J Agri Sci Tech. Vol. 15, Supplementary issue, December 2013.

6. Pannapa Powthong, Acharawan Thongmee, Pattra Suntornthiticharoen. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Endophytic Fungi Isolated from *Sesbania grandiflora* (L.) Pers. International Journal of Phytomedicine (IJPM). 2013,Vol. 5.102-7.

7. Pannapa powthong, Pattra suntornthiticharoen. Antibacterial and Probiotic Properties of lactic acid bacteria isolated from chicken intestine, entrails of swine, and soil against gastrointestinal and urogenital pathogenic bacteria, World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences (WJPPS). 2014, Vol. 3.

8. Pannapa powthong, Pattra suntornthiticharoen. Antibacterial activity of Probiotic bacteria isolated from Thai traditional fermented food on gastrointestinal and urogenital pathogenic bacteria, Pakistan Journal of Nutrition 14 (2): 2015: 67-74.

9. Pannapa powthong, Bajaree jantrapanukorn, Pattra suntornthiticharoen. Isolation, identification and analysis of DDT-degrading bacteria for agriculture area improvements, Journal of Food, Agriculture & Environment Vol.14 (1): 2016:139-144.

10. Pannapa powthong, Bajaree jantrapanukorn, Pattra suntornthiticharoen. Isolation, characterization and identification of Roundup degrading bacteria from the agricultural area of Thailand, Asian Journal of Microbiology. Biotechnology and Environmental Science Vol. 18, No. (2) : 2016 : 11-16.

11. Bajaree Jantrapanukorn, Sawanya Pongpraritt, Pannapa Powthong, Thanet Pheungphu. The study of antibacterial activity in enteric pathogens of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) by broth micro-dilution method. Journal of Applied Pharmaceutical Science, Vol. 7 (5) : 2016 : 119-122.

12. Pannapa powthong, Pattra suntornthiticharoen. Antimicrobial and enzyme activity produced by bacillus spp. isolated from soil. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences Vol 9(3), 2017:205-210.

13. Pannapa powthong, Pattra suntornthiticharoen. Screening of active antimicrobial and biological enzymes of microbial isolated from soil in Thailand. Asian J Pharm Clin Res, Vol 10(4) 2017, 73-78.

14. Pannapa powthong, Pattra suntornthiticharoen. Isolation and characterization of biosurfactant-producing bacteria isolated from agriculture area in Thailand. Bugarian journal of agricultural science, Vol. 24 (No 4) 2018, 623–630.

15. Pannapa Powthong, Bajaree Jantrapanukorn, Pattra Suntornthiticharoen, Kamlai Laohaphatanalert. Study of prebiotic properties of selected banana species in Thailand. Journal of Food Science and Technology, Vol. 57 (7) 2020, 2490–2500.

16. Pannapa Powthong, Bajaree Jantrapanukorn, Pattra Suntornthiticharoen and Chitradee Luprasong. An in vitro study on the effects of selected natural dietary fiber from salad vegetables for lowering intestinal glucose and lipid absorption. Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture, 12, 2021,58-62.

ผลงานวิจัยที่ได้นำเสนอในการประชุมทางวิชาการภายในประเทศ(โปรดระบุหัวข้อประชุม/สัมมนาและสถานที่ด้วย)

1. Oral Presentation on "Early induction of adhesion molecule in endothelial cells by *P. falciparum* -infected red blood cells (PRBC) with the co-stimulation of immunocompetent cells" Joint International Tropical Medicine Meeting 2005, Bangkok, 30 November – 2 December 2005.

2. Oral Presentation on "Down-regulation of tight junction mRNAs in human endothelial cells co-cultured with *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes" RGJ Seminar Series XLI , Trends and research in Parasitology, Bangkok, 2 Feb 2006.

3. Oral Presentation on "Population genetic structure of *Plasmodium falciparum* in the Thai-Myanmar border region - microsatellite DNA analysis" Joint International Tropical Medicine Meeting 2007, Bangkok, 29-30 November 2007.

4. Poster Presentation on "การตรวจกรองฤทธิ์ในการยับยั้งจุลชีพของราเอนโดไฟต์ที่แยกจากต้นแคบ้าน" (Screening of Antimicromicrobial Activities of the Endophytic Fungi from *Sesbania grandiflora* (L.) Pers.) RSU conference 2010

5. Oral Presentation on " Characterization of antibiofilm activity of biosurfactant producing bacteria " The 41st Congress on Science and Technology of Thailand (STT41), Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand 2015 (By Dr. Pattra Suntornthiticharoen; coworker)

ผลงานวิจัยที่ได้นำเสนอในการประชุมทางวิชาการในต่างประเทศ(โปรดระบุหัวข้อประชุม/สัมมนาและสถานที่ด้วย)

1. Poster Presentation on "Down-regulation of tight junction mRNAs in human endothelial cells co-cultured with *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes" Molecular Parasitology Meeting 2006, Marine Biological Laboratory, Woods Hole, Massachusetts, USA , 10-14 September 2006.

2. Oral Presentation on "Microsatellite DNA polymorphisms flanking pfcrt of *Plasmodium falciparum* suggested different modes of evolution of chloroquine resistance in Thailand and Vietnam" 48 th Annual meeting of Japanese society of tropical medicine, Oeta prefecture, Japan, 12-13 October 2007.

3. Oral Presentation on "Microsatellite DNA analyses revealed different genetic population structures of Plasmodium falciparum isolates from patients with different clinical outcomes – A study in the Thai-Myanmar border region" 77th Annual Meeting of Japanese Society of Parasitologists (JSP) 2008, Nagasaki prefecture, 2-4 April 2008.

ผลงานวิจัยที่ได้รับรางวัล(โปรดระบุรางวัลที่ได้รับด้วย)

1.การตรวจกรองฤทธิ์ในการยับยั้งจุลชีพของราเอนโดไฟต์ที่แยกจากต้นแคบ้าน (Screening of Anti-micromicrobial Activities of the Endophytic Fungi from *Sesbania grandiflora* (L.) Pers.ได้รับรางวัลการเสนอผลงานวิจัย ประเภทโปสเตอร์ดีเด่น ประจำปี 2553 ที่ RSU conference 2010

บทความทางวิชาการที่ตีพิมพ์ในวารสาร(โปรดระบุวารสารที่ตีพิมพ์ด้วย)

สาขาวิชาที่นักวิจัยเชี่ยวชาญ

จุลชีววิทยา, จุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก, เภสัชวิทยา, โลหิตวิทยา, ปรสิตวิทยา, และอณูชีววิทยา

Evaluation of the antimicrobial activity and safety applications of electrolyzed water using as microbial disinfectant

Pannapa Powthong [1], Bajaree Jantrapanukorn [2], Warangkana Lektrakul[2]

[1] Department of Medical Sciences, Faculty of Science, Rangsit University, Pathumthani, Thailand 12000

[2] Faculty of Medical Technology, Rangsit University, Pathumthani, Thailand 12000

*Corresponding Author: E-Mail: pannapa.p@rsu.ac.th

Abstract

Electrolyzed water is one of the promising novel disinfectant agents that have recently been proposed as the alternative to conventional decontamination methods such as heat and chemical sanitizers. The objective of this research was to examine various properties of electrolyzed water to ensure safety and to further proper hygiene practical guideline. The tests are performed by evaluated the properties of chemical, microbiological and cytotoxicity to OMUF fibroblasts. Moreover, the efficacy of sterilization techniques (soaking and spraying) of this disinfectants was compared as well. The results showed that electrolyte has an alkaline properties and shelf life was stable over 7 days. Electrolyzed water has an ability to kill all types of microbes include bacteria and fungi after contact within 1-3 minutes. Toxicity test of electrolyzed water showed that it is low toxicity level. Moreover, immersion technique up to 3-5 minutes onwards was revealed the most effective than spray technique for surface and/or objects disinfectant. In summary, electrolyte water is effective in disinfecting surfaces of objects and fabrics and safe for cleaning surfaces, clothing and other equipment. This research contributes to increasing confidence in safety and as a guideline to carry out for the better and suitable hygiene in the future.

Keywords: disinfectant, electrolyzed water, anti-microbial, cytotoxicity, chemical physical property

Introduction

There is currently an outbreak of respiratory disease named "Coronavirus Disease 2019" (COVID-19). As a result of the COVID-19 outbreak, many recommended procedures to reduce transmission in respiratory diseases were introduced such as frequent handwashing, barrier measures, cleaning the surfaces of objects and the body with disinfectants. However, standard chemical disinfectants are irritating to the skin and unsafe to use. Therefore, finding other types of disinfectants to replace the old ones is urgently needed.

Electrolyte water is solution produced from water and salt by using principle of electrolyzed ionization to produce hypochlorous substances that are more effective than hypochlorite ions (OCl^-) which obtained by dissociation from sodium hypochlorite and calcium hypochlorite ($Ca(OC)_2$) (Grech & Rijkenberg, 1992; Kim *et al.*, 2000). Nowadays, it is easy to produce electrolyte water. Its disinfectant properties were non-toxic, stable, cost-effective, inexpensive and safe for users (Huang *et al.*, 2006).

The objective of this research was to examine the chemical properties, and stability of electrolyzed water. Then, bactericidal ability, cytotoxicity, optimal disinfection technique (immersion and spray) on difference surface object of this disinfectants was determined to ensure safety and to further proper hygiene practical guideline under simulated appropriate *in vitro* laboratory.

Materials and methods

Experimental design, microorganisms and chemicals

This was *in vitro* where 10 pathogenic bacteria and 2 pathogenic yeast were employed in testing efficiency the selected cloth mask and surgical masks. Test bacterial pathogen used in this experiment was kindly received from the faculty of Medical technology, Rangsit University. Briefly, the tested microbial strains were re-cultured on agar medium (TSA/PDA), then incubated at 37°C for 24 hours for bacteria and *Candida albicans*, and room temp., 48 hours for *Cryptococcus neoformans* to obtain log phase. Each pure isolated colony was suspended in sterile 0.85% NaCl, absorbance was measured and adjusted to 0.5 McFarland Standard (~1.5 x 10^8 colony forming units per milliliter (CFU/ml)) (McFarland, 1907). 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), fetal bovine serum (FBS), phosphate buffered saline (PBS), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), and trypsin were obtained from GIBCO BRL, Paisley, UK and Thermo Scientific HyClone respectively. All other basic reagents were of analytical grade.

Preparation of electrolyte water

One gram of sodium chloride was dissolving in 1 liter of distilled water (pH 7.0; 0.1% w/v), it was imported to produce electrolyte water. through the electrical current for 5 minutes in this study is called "Electrolyte water "Use immediately or store in a sealed container at room temperature.

Chemistry property of electrolyte water

pH and chemical properties were measured by oxidation reduction potential (ORP) with the Suntex TS-100 Suntex Company, USA). concentration: ACC). The chemical stability, pH and ORP of the oxidized water were also tested from day 1 to day 7 after production, and 3 independent tests were performed. to find the mean It also measures such properties of the negative control

agent, distilled water. and sodium hypochlorite (NaOCl) standard disinfectant for use in comparing properties with electrolyte water.

Microbiological property of electrolyte water

Determination of bactericidal activity after direct exposure to electrolyte water

The bactericidal activity by electrolyte water was performed by 5 mL of tested pathogenic microbial suspension (~ 1.5 x 10^4 CFU/ml for bacteria and ~ 1.5 x 10^3 CFU/ml for yeast) was mixed with 5 mL of electrolyte water at difference time point (30 sec, 1 min, 3 min, 5 min, 10 min and 15 min). At the end of the time, 100 µL of diluted suspension were spread on TSA /PDA plates for incubation at 37°C for 24 hours for bacteria and *Candida albicans*, and room temp., 48 hours for *Cryptococcus neoformans*. After incubation of the plates, the colony counts and quantity that grew on the culture medium was performed by manual counting method compared with the control of the cultures (0.6% sodium hypochlorite and sterile NSS as a positive control and growth control). The bacterial cells; observed after an incubation period, were indicated as a colony forming units (CFUs). The three replicates of individual experiment were performed.

Measurement of intracellular protein leaking by dye-binding method (Bradford)

Intracellular protein leaking by electrolyte water was performed by 5 mL of tested pathogenic microbial suspension (~ 1.5 x 10^4 CFU/ml for bacteria and ~ 1.5 x 10^3 CFU/ml for yeast) was mixed with 5 mL of electrolyte water at difference time point (30 sec, 1 min, 3 min, 5 min, 10 min and 15 min). At the end of the time point, 10 µL of diluted suspension were mix with 200 µL of coomassie dye using a dye-binding Bradford method (Bradford M., 1976), which measures the color produced by the coomassie dye-protein interaction. The optical density (OD) was measure at a wavelength of 595 nm. The protein concentration was calculated on the basis of the calibration curve of bovine serum albumin (BSA) protein standard curve. The results were

expressed as μg of microbial protein/mL. Positive control and growth control were 0.6% v/v sodium hypochlorite and sterile NSS respectively. The three replicates of individual experiment were performed.

Comparison of efficacy of electrolyte water with different disinfectants

The effectiveness of electrolyte water was compare with different disinfectant solutions such as 0.6% v/v sodium hypochlorite, potassium permanganate (0.05%w/v), baking soda mixture (2.5 g/L), and chlorinated water (0.02% w/v). Briefly, 100 ul of tested pathogenic microbial suspension (~ 1.5 x 10^5 CFU/ml for bacteria and ~ 1.5 x 10^4 CFU/ml for yeast) was dropped onto the surface of a sterile 5x 5 cm plastic sheet and leave to dry for about 1 hour. Then, 100 ul of various disinfectants were applied to the surface of plastic sheet at difference time point according to selected time from previous experiment (3 min, 5 min). The plastic sheet was then soaked in a 1 mL of sterile 0.85% saline solution tube, shaken for 1 min to allow the saline solution to remove bacteria from the plastic. Then, 100 μl of mixer were spread onto the TSA/PDA. and incubated at 37°C for 24 hours for bacteria and *Candida albicans*, and room temp., 48 hours for *Cryptococcus neoformans*. After incubation, the colony counts and quantity that grew on the culture medium was performed by manual counting method compared with the growth control (sterile NSS). The bacterial cells; observed after an incubation period, were indicated as a colony forming units (CFUs). The three replicates of individual experiment were performed.

Comparison of the efficacy of electrolyte water by sterilization contact techniques and surface type

The effectiveness of sterilization contact techniques (immersion and spray) and surface type (plastic sheet and fabric clothes) by electrolyte water was evaluated. Briefly, 100 ul of tested pathogenic microbial suspension (~ 1.5 x 10^5 CFU/ml for bacteria and ~ 1.5 x 10^4 CFU/ml for

yeast) was dropped onto the surface of difference sterile object (plastic sheet and fabric clothes) and leave to dry for about 1 hour. Then, the various contact techniques were performed as describe:

Immersion: The difference object was immersed in 15 mL of electrolyte water at difference time point (3 min, 5 min). After the time has passed, the object was then soaked in a 1 mL of sterile 0.85% saline solution tube, shaken for 1 min to allow the saline solution to remove microbial from the object.

Spray: The surface of difference object was spraying with electrolyte water for 10 sec (15 mL), and then leave the object at difference time point (3 min, 5 min). After the time has passed, the object was then soaked in a 1 mL of sterile 0.85% saline solution tube, shaken for 1 min to allow the saline solution to remove microbial from the object.

Then, 100 µl of mixer were spread onto the TSA/PDA. and incubated at 37°C for 24 hours for bacteria and *Candida albicans*, and room temp., 48 hours for *Cryptococcus neoformans*. After incubation, the colony counts and quantity that grew on the culture medium was performed by manual counting method compared with the growth control (sterile NSS). The bacterial cells; observed after an incubation period, were indicated as a colony forming units (CFUs). The experimental set-up was repeated in triplicate.

Cell Lines and Culture Medium

Normal human fibroblast (OUMF fibroblast cell lines) stock cells were maintained as monolayer cultures in DMEM supplemented with 10% inactivated FBS, 1% Antibiotic – antimycotic, and 1% Glutamine, in a 5% CO_2 humidified atmosphere incubator at 37°C until confluent. The stock cultures were grown in 25 cm^2 culture flasks, and the cells were dissociated

using trypsin–EDTA (0.2% trypsin, 0.02% EDTA in PBS) from their culture flasks twice weekly. All experiments were carried out in 96 microtiter plates (Nunc. Ltd., USA).

Cytotoxicity tests

For preparation of test solutions, electrolyte water was serial concentrations such as 0.1, 1, 10, 25, 50, 75, and 100% v/v was made up with non-supplemented DMEM and sterilized by filtration. The serially dilution were prepared for carrying out cytotoxic studies.

The MTT assay was performed as described by Cardile *et al.*, (2004). The viability of the cell was assessed by MTT assay, which is based on the reduction of MTT by the mitochondrial dehydrogenase of intact cells to a purple formazan product. Briefly, each cell line (5×10^4 cells/well in 100 µl medium) were seeded onto 96-well microtiter plates and routinely cultured in a humidified incubator at 37°C in 5% CO_2 for 24 h. The cultivated cells were separately treated with various serially electrolyte dilution (0.1 -100% v/v) and OMUF cell line cultured in DMEM + 10% heat inactivated FBS was used as growth control. The plate was reincubated for 24 h. Then, 10 µl of MTT dye solution (3-[4,5 -dimethylthiazol-2-yl]-2,5 -diphenyltetrazolium bromide) (5 mg/ml in PBS) was added to every well and reincubated for 4 h. After removing un-transformed MTT reagent, 100 µl of DMSO was added to dissolve the formed formazan crystals and the plate was further incubated for 5 min at room temperature. Amount of formazan was determined by measuring the optical density at a wavelength of 570 nm using a Micro-plate reader (Biotek: Synergy HT). All experiments were carried out 3 times. The absorbance reading was taken to calculate the percentage of cell survival as follow:

$$\text{(\% cell viability)} = \frac{(OD\ sample)\times 100}{OD\ negative\ control}$$

$$\text{(\% Cytotoxicity)} = \frac{100-(ODsample)\times 100}{OD\ negative\ control}$$

The data were expressed as the concentration of sample required to kill 50% (IC50) of the cells compared to the controls.

Statistical analysis

Each experiment was performed in triplicate and results were expressed as mean ± SD. Data were evaluated by One-way analysis of variance (ANOVA) using SPSS (version 22.0) for significance ($p \leq 0.05$) and the Tukey test at the 95% confidence level.

Results

Electrolyte water chemistry test

The electrolyte water had a pH of 8.62±0.02, indicating that its properties were highly alkaline but less as compared to 0.6% Sodium hypochlorite with a very alkaline (pH 12.18±0.05). While distilled water was neutral (pH 7.20±0.05) (Table 1).

ORP measurement revealed that electrolyte water had an ORP of 114.33±1.53 mV, indicating that it is a medium oxidizing agent, while 0.6% Sodium hypochlorite and distilled water had an ORP of 309.67±1.15 and 125.67±0.58. mV, respectively. Free chlorine was measuring and found that the electrolyte water had an ACC of 0.58±0.00 ppm, which was lower than the ACC of 0.6% Sodium hypochlorite (587.00±0.04 ppm). Whereas distilled water showed no dissolved free chlorine as shown in Table 1.

The stability of electrolyte water was determined. The electrolyte water was stored at room temperature in a sealed container for 7 days, pH and ORP were measured continuously compared to the first day of production. It was demonstrated that the pH of the electrolyte water was found to change in the range of 8.62±0.02 to 8.41±0.01. A slight decrease in the pH on the 3rd day onwards was seen but there was no significant difference from the first day of production pH. While the ORP value changed in the range of +113.67±1.15 to +86.67±1.53 which continued to

decline from the 3rd day onwards. The coefficients of variance (%CV) were 0.01032 and 0.11369, respectively, as shown in Table 2.

Microbiological property of electrolyte water

Determination of bactericidal activity after direct exposure to electrolyte water

The electrolyte water was tested for the inhibiting efficacy properties of clinically important pathogenic microorganisms compared to standard disinfectants. It was found that the quantity of test bacteria (Bacterial Growth control) was in the range of log 2.56±0.13 – log 3.74±0.05 and the tested fungal (Fungal Growth control) was in the range of log 2.46±0.34 - log 2.80±0.03. Electrolyte water is effective in killing both tested bacteria and fungi. It was found that the amount number of 8 test pathogens strains was significantly decreased from the first 30 seconds after exposure. All organism was killed within 30 seconds-1 minute. Whereas the standard disinfectant (0.6% Sodium hypochlorite), was able to kill all tested microorganisms, within 30 seconds-1 minute too, as shown in Table 3-4.

Intracellular protein leaking by dye-binding method (Bradford)

Intracellular protein leaking measures the protein that leaks from the breaks down microbial cell. It was found that after the electrolyte water was exposed to the microorganisms at different intervals, proteins from the intracellular organisms of the tested microorganisms were leaked from 30 seconds and increased at the 1 minute after exposure. Protein concentrations were relatively stable over the following periods at 3 min, 5 min, and 10 min, as shown in figure 1-3.

Comparison of efficacy of electrolyte water with different common household disinfectants

It was showed that the amount of test bacteria (Bacterial Growth control) was in the range of log 5.41±0.31– log 6.13±0.02 and the tested fungal (Fungal Growth control) was in the range of log 2.78±0.05 - log 3.05±0.01 respectively. Electrolyte water has antimicrobial properties in all

tested microbial. The decreasing in CFU or no growth was detected from 3 minutes after exposure to the electrolyte water. However, the common household disinfectants; 0.2% potassium permanganate, 0.025% chlorine, and 0.5% baking powder, were unable to kill all tested microorganisms at the same time point. Therefore, electrolyte water showed better disinfectant efficiency than conventional household disinfectants as showed in Table 4.

Comparative results of electrolyte water efficiency in sterilization by various contact techniques

The results from tested plastic sheet showed that the amount of tested bacteria (Bacterial Growth control) was in the range of log 5.29±0.13– log 6.02±0.02 and the test fungal (Fungal Growth control) was in the range of log 2.60±0.05- log 3.06±0.04. It was found that immersion technique can kill most tested pathogen within 3 min after exposed except *Salmonella typhi*. However, most tested pathogen was killed within 5 min after electrolyte water spraying.

The results from tested cloth pads showed that the amount of tested bacteria (Bacterial Growth control) was in the range of log 5.34±0.05– log 6.24±0.05 and the test fungal (Fungal Growth control) was in the range of log 2.47±0.15- log 3.01±0.04. It was found that immersion technique can kill 9 tested pathogen within 5 min after exposed except *Bacillus subtilis, Salmonella typhi, and Klebsiella pneumoniae*. However, most tested pathogen was killed within 5 min after electrolyte water spraying except *Pseudomonas aeruginosa*. Whereas the standard disinfectant (0.6% Sodium hypochlorite), was unable to kill most of the tested pathogen from the fabric within 5 minutes, and some microbial growth was still observed. less as shown in Table 5.

Cytotoxicity of electrolyte water to OMUF normal fibroblast

From the cytotoxicity experiment, it was found that at a concentration of 0.1-100 % v/v of electrolyte water can cuase a relatively low cytotoxic effect on OMUF fibroblast cells with an IC50±SD value of 80.27 ± 1.26 ug/100 uL, as shown in Figure 4.

Discussion

The disinfectant should kill a wide variety of microorganisms and not specific for the purpose of eliminate microorganisms from the surface of objects and limit the spread of infection. There was various mechanism for killing such as cell rupture or leakage, disturbance of intracellular balance, disturbances in the functioning of cell membranes, inhibition of enzyme activity, and inhibition of electron transfer processes, etc. Most of the disinfectants used today are chemical disinfectants. The commonly used chemicals are Chlorine containing compounds such as sodium hypochlorite (NaOCl). This substance acts as a disinfectant by soluble in water to form hypochlorous acid (Hypochlorus; HOCl) which reacts with microbial proteins or may be oxidized organic molecule. However, these chemicals can cause direct harm to the human skin and mucous membranes reaching to respiratory, tissue and skin irritation, pungent odor, and also metals corrosive (Levine, 2013; McCullough, 2014). Therefore, it can't be sprayed on the human body and not suitable for disinfection of pathogen droplets that was tracked on personal items or food packaging that will be consumed. Hence, it is better to find alternative type of disinfectant that is more safe. Electrolyte water is one of the choice.

The results of the electrolyte water chemistry test showed that the electrolyte water had a pH of 8.62±0.02, which was alkaline electrolyte water. The oxidation reduction potential (ORP) is moderate and the available chlorine concentration (ACC) is lower than 0.6% sodium hypochlorite. The chemical stability results reveal both pH and ORP of the electrolyte water

slightly change from day 3 onwards and stable over 7 days after production indicating that the electrolyte water had good stability.

For anti-bactericidal activity of the electrolyte water, the contact time was tested at 30 sec, 1 min, 3 min, 5 min, 10 min and 15 min to see the minimum time for killing microorganisms. The electrolyte water was found to kill *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus subtilis*, *Edwardsiella tarda*, *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella Typhi*, *Candida albican* and *Cryptococcus neoformans* from 30 sec after exposure. And it can be disinfected *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* at 1 minute after exposure. This is consistent with research by Yaraksa and coworker reporting that acidic electrolyte water can kill *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* from the first 15 seconds of exposure (Yaraksa *et al.,* 2021) The experiment was corresponding to the Intracellular protein leaking results which show that the mechanism for the destruction of microbial cells by electrolyte water is cell rupture and protons leak out of the cell. This was supported by Paola and coworker (2005) who reported that electrolyte water can inhibit the growth of *Listeria monocytogenes* by damaging the cell walls of microorganisms (Paola *et.al.,* 2005).

The efficacy of electrolyte water comparable with various disinfectants commonly used in households was elucidated. It was found that electrolyte water has ability to kill pathogen better than conventional household disinfectants. Since the amount of tested pathogen was reduced or no growth was detected from 3 minutes after exposure. But the common household disinfectants; 0.2% potassium permanganate, 0.025% chlorine, and 0.5% baking powder, were not able to kill all tested microorganisms at the same time point. These findings in accordance to those reported by Naka and coworker who showing that Electrolyte water has a higher bactericidal activity compared to NaClO (Naka *et.al.*,2020).

Comparison of the efficacy of electrolyte water to 0.6% Sodium hypochlorite for disinfection on surfaces of transparent plastic and cloth contaminated with tested pathogen by different contact techniques (immersion and spray). It was found that the electrolyte water was able to sterilize the contamination on the plastic sheet by immersion technique better than spray within 3 minutes after expose. Spraying with electrolyte water, even after 5 minutes, can kill all but *Salmonella typhi*. While sterilization tested on cloth pads of electrolyte water by spraying is better than soaking because spraying can kill most of the germs in 3 minutes and so on, almost all in 5 minutes. However, even soaking for up to 5 minutes is still unable to completely killed 3 tested pathogens.

However, it was found that 0.6% Sodium hypochlorite was unable to kill most of the tested pathogen from the fabric within 5 minutes, since some microbial growth was still observed.

The cytotoxicity results of electrolyte water as relatively low toxicity effect to OMUF fibroblast. It was assumed that electrolyte water is safe and harmless to human tissue.

Conclusion

From all the test results, it was concluded that the electrolyte water used as a disinfectant in this experiment were long self-life, effective in killing all types of pathogen and relatively low toxicity. It has a higher sterilization capacity compared to conventional household disinfectants such as potassium permanganate, chlorine and baking powder. Disinfecting time using only 1-3 min after exposure. Immersion techniques was the most effective method for cleaning the contaminated object and fabrics which use only 3-5 minutes onwards for disinfecting. Therefore, electrolyte water is effective enough to use as a replacement for standard disinfectants.

Based on all findings, it was determined that the electrolyte water used as a disinfectant in this experiment had a long self-life, was efficient in killing all type of pathogens, and had a low

toxicity. When compared to conventional household disinfectants like potassium permanganate, chlorine, and baking powder, it has a greater sterilizing capability. After exposure, just 1-3 minutes are needed for disinfection. Immersion methods were the most successful approach for cleaning contaminated objects and materials, with disinfection taking only 3-5 minutes. As a result, electrolyte water can be used as a substitute for traditional disinfectants.

Acknowledgements

The author would like to express her sincere gratitude to the Research Institute of Rangsit University under grant number 52/2563, to P. Powthong for providing additional funding. The author would also like to extend her thanks to Microbiology staff, Faculty of Medical Technology RSU for their providing laboratory equipment and reagent. The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

Conflict of interest statement

The author declares that they have no conflict of interests.

References

Bradford, M.M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Analytical Biochemistry, 72:248-254.

Cardile V., Renis M., Scifo C., Lombardo L., Gulino R., Mancari B., *et al.* (2004) Behaviour of the new asbestos amphibole fluoredenite in different lung cell systems. Int J Biochem Cell Biol; 36 (5): 849-60.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Grech, N.M. & Rijkenburg, F.H.J. (1992). Injection of electronically generated chlorine into citrus micro–irrigation systems for the control of certain waterborne root pathogens. Plant Disease, 76, 457–461.

Guentzel, J.L., Liang, L. K., Callan, M. A., Emmons, S. A. and Dunham, V. L. (2017) Application of electrolyzed oxidising water as a sanitiser to extend the shelf-life of seafood products: a review. J Food Sci Technol. 54(5):1321-1332.

Huang, Y. R., Hsieh, H. S., Lin, S. Y., Lin, S. J., Hung, Y.C. & Hwang, D.F., (2006). Application of electrolyzed oxidizing water on the reduction of bacterial contamination for seafood. Food Control, 17, 987–993.

Hricova D., Stephan R., Zweifel C. (2008) Electrolyzed Water and Its Application in the Food Industry. Journal of Food Protection, 71(9): 1934-1947.

Kim, B. S., Lee, J. Y., and Hwang, B. K. (2000). In vivo control and *in vitro* antifungal activity of rhamnolipid, a glycolipid antibiotic, against *Phytophthora capsici* and *Colletotrichum orbiculare*. Pest Management Science 56(12),1029-1035.

Levine, J.M. (2013). Dakin's Solution: Past, Present, & Future. Advanced Skin Wound Care, 26(9), 410–414.

Naka A., Nakamura K., Kurahashi M. (2020) Slightly Acidic Electrolyzed Water to Remove *Methylobacterium mesophilicum, Rhodotorula mucilaginosa* and *Cladosporium cladosporioides* in Households. Applied Microbiology, 607-614.

Maria I. Gil&Vicente M. Gómez-López&Yen-Con Hung&Ana Allende. (2015). Potential of Electrolyzed Water as an Alternative Disinfectant Agent in the Fresh-Cut Industry. Food Bioprocess Technol. 8:1 336-1348.

McCullough, M. & Carlson, G.W. (2014). Dakin's solution: historical perspective & current practice. Annals of Plastic Surgery, 73, 254–256.

Ogilvie B. H., Solis-Leal A., Lopez J. B., Poole B.D., Robison R. A., Berges B. K. (2021) Alcohol-free hand sanitizer and other quaternary ammonium disinfectants quickly and effectively inactivate SARS-CoV-2. J Hosp Infect (108),142-145.

Paola, C.L., Vivian, R.C., Mercado, M., Deaz, M., Carrascal, A.K., (2005). Effectiveness of electrolyzed oxidizing water for inactivating *Listeria monocytogenes* in lettuce. Universitas. Sci. 10, 97-108.

Sakurai, Y. M., N. Y. Sato and K. Sato. (2003) Endoscope contamination from HBV- and HCV-positive patients and evaluation of a cleaning/disinfecting method using strongly acidic electrolyzed water. Digestive Endoscopy 15: 19-24.

Venkitanarayanan, K. S., Ezeike, G. O., Hung, Y. C., and Doyle, M.P. (1999). Efficacy of electrolyzed oxidizing water for inactivating Escherichia coli O157:H7, Salmonella Enteritidis and Listeria monocytogenes. Applied and Environmental Microbiology 65, 4276-4279.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Table 1 Chemical properties of sodium hypochlorite, electrolyte water, and distilled water

tested substance	**pH**	**ORP (mv)**	**ACC (ppm)**
electrolyte water	8.62±0.02	114.33±1.53	0.58±0.00
Sodium hypochlorite	12.18±0.05	309.67±1.15	587.00±0.04
distilled water	.720±.005	125.67±0.58	0.00±0.00

Table 2 Chemical stability test, pH and ORP of electrolyte water from day 1 to 7 after production

Day	pH	ORP (mv)
1	8.62±0.02	113.67±1.15
2	8.63±0.01	112.00±1.00
3	8.53±0.02	94.00±1.00
4	8.48±0.01	91.67±1.15
5	8.46±0.02	90.67±0.58
6	8.42±0.01	89.00±1.00
7	8.41±0.01	86.67±1.53
Mean ± SD	8.51± 0.09	96.71± 11.00
%CV	0.01032	0.11369

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Table 3 The bactericidal activity test results of 0.6% Sodium hypochlorite (Positive control) were shown in mean±SD from the three identical tests.

No	Tested organism	Growth control	Viable count (Log CFU/mL)					
			30 sec	1min	3 min	5 min	10 min	15 min
1	*Pseudomonas aeruginosa*	3.74±0.05	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
2	*Acinetobacter baumannii*	3.72±0.02	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
3	*Staphylococcus aureus*	3.68±0.05	1.30±0.00	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
4	*Bacillus subtilis*	2.93±0.05	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
5	*Listeria Monocytogenes*	3.64±0.02	1.19±0.06*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
6	*Edwardsiella tarda*	3.01±0.26	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
7	*Aeromonas hydrophila*	2.60±0.03	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
8	*Salmonella typhi*	3.41±0.05	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
9	*Klebsiella pneumoniae*	2.56±0.13	1.50±0.20*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
10	*Shigella flexneri*	3.43±0.04	1.40±0.20*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
11	*Candida albicans*	2.46±0.34	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
12	*Cryptococcus neoformans*	2.80±0.03	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*

(*) means a statistically significant reduction in the amount of bacteria ($P<0.05$).

Table 4 The bactericidal activity test results of Electrolyte water were shown in mean±SD from the three identical tests.

No	Tested organism	Growth control	Viable count (Log CFU/mL)					
			30 sec	1min	3 min	5 min	10 min	15 min
1	*Pseudomonas aeruginosa*	3.74±0.05	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
2	*Acinetobacter baumannii*	3.72±0.02	1.40±0.17*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
3	*Staphylococcus aureus*	3.68±0.05	1.56±0.24*	0.59±0.00	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
4	*Bacillus subtilis*	2.93±0.05	1.83±0.21*	1.07±0.75	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
5	*Listeria Monocytogenes*	3.64±0.02	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
6	*Edwardsiella tarda*	3.01±0.26	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
7	*Aeromonas hydrophila*	2.60±0.03	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
8	*Salmonella typhi*	3.41±0.05	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
9	*Klebsiella pneumoniae*	2.56±0.13	1.50±0.17*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
10	*Shigella flexneri*	3.43±0.04	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
11	*Candida albicans*	2.46±0.34	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
12	*Cryptococcus neoformans*	2.80±0.03	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*

(*) means a statistically significant reduction in the amount of bacteria ($P<0.05$).

Figure 1 The amount of protein released from tested microbial cells destroyed with 0.6% Sodium hypochlorite at different times compared with growth control was shown in mean ± SD from the triplicate test.

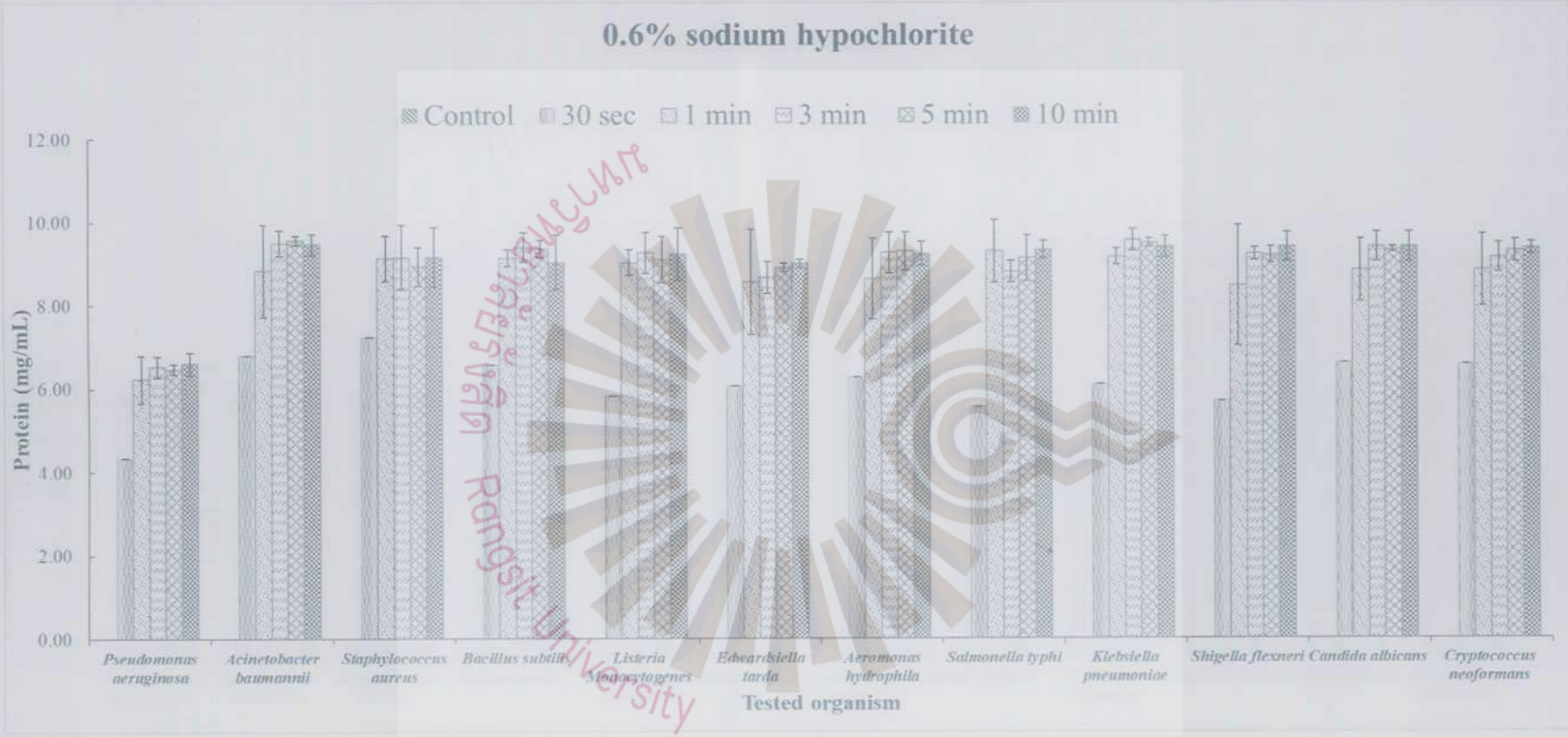


Figure 2 The amount of protein released from tested microbial cells destroyed with Electrolyte water at different times compared with growth control was shown in mean ± SD from the triplicate test.

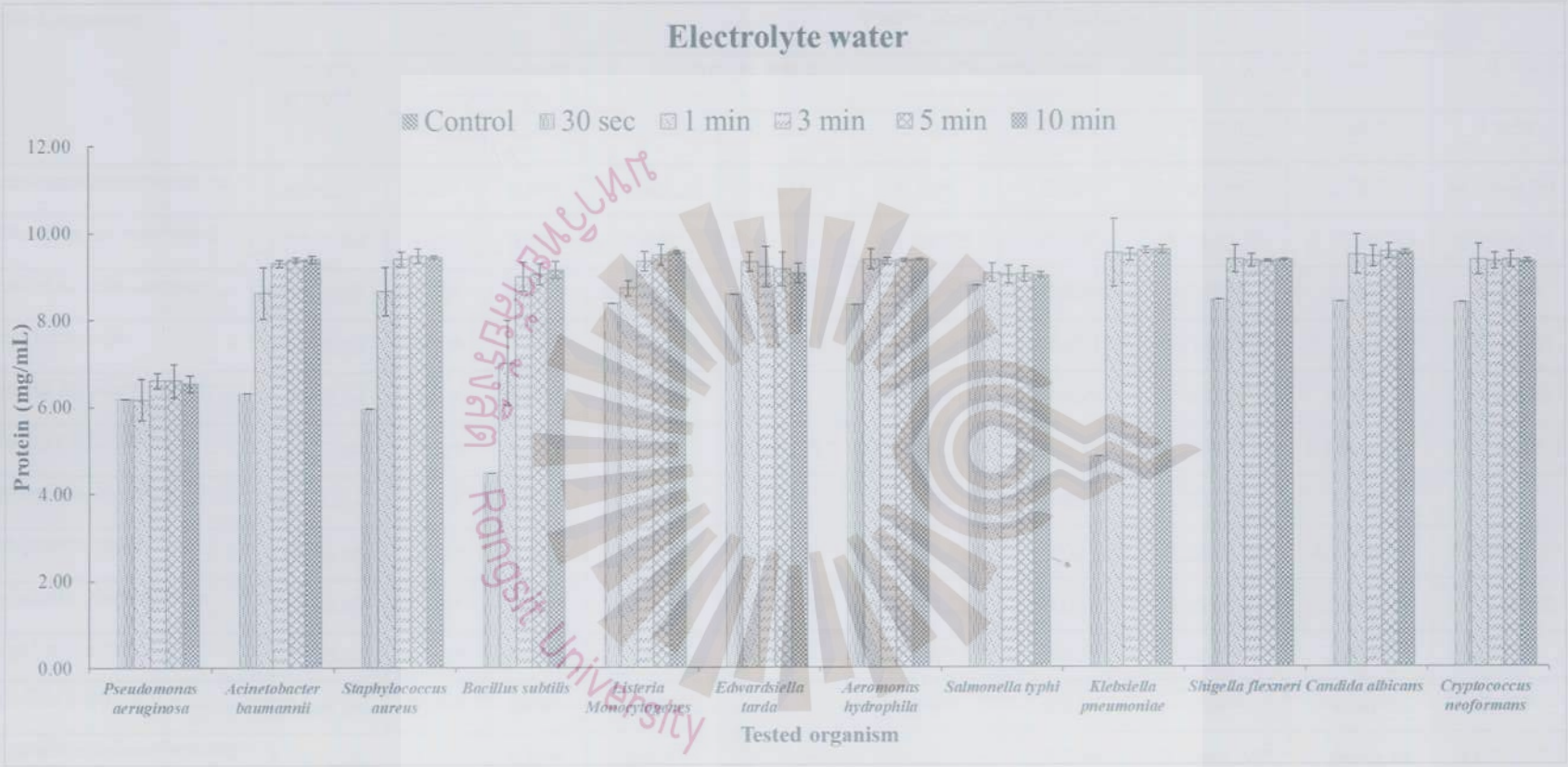


Table 5 Comparison of the efficacy of electrolyte water with different disinfectants. The values were shown in mean±SD from the three identical tests.

No.	Tested organism	Viable count (Log CFU/mL)									
		Growth control	0.6% Sodium hypochlorite		Electrolyte water		0.2% potassium permanganate		0.025% chlorine		0.5% baking powder	
			3 min	5 min	3 min	3 min	5 min	5 min	3 min	5 min	3 min	5 min
1	*Pseudomonas aeruginosa*	5.41±0.31	0.00*	0.00*	4.49±0.20	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	4.69±0.09	0.00*
2	*Acinetobacter baumannii*	5.99±0.04	0.00*	0.00*	0.00*	5.14±0.12	5.12±0.22	0.00*	5.14±0.12	5.12±0.22	5.49±0.05	5.04±0.12
3	*Staphylococcus aureus*	5.96±0.03	0.00*	0.00*	4.54±0.28	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
4	*Bacillus subtilis*	6.06±0.02	0.00*	0.00*	4.73±0.15	5.11±0.12	5.27±0.09*	4.74±0.13*	5.11±0.12*	5.27±0.09	5.67±0.07	5.51±0.06
5	*Listeria Monocytogenes*	5.54±0.14	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	5.53±0.08	5.48±0.08
6	*Edwardsiella tarda*	6.10±0.04	0.00*	0.00*	0.00*	4.89±0.11*	4.84±0.24*	0.00*	4.89±0.11*	4.84±0.24*	5.67±0.05*	5.70±0.06*
7	*Aeromonas hydrophila*	5.73±0.10	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
8	*Salmonella typhi*	6.08±0.05	0.00*	0.00*	0.00*	4.26±0.24*	4.36±0.32*	0.00*	4.26±0.24	4.36±0.32	4.90±0.05*	4.79±0.25*
9	*Klebsiella pneumoniae*	5.68±0.03	0.00*	0.00*	0.00*	4.49±0.20*	4.56±0.24*	0.00*	4.49±0.20	4.56±0.24	5.45±0.10	5.49±0.12
10	*Shigella flexneri*	6.13±0.02	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
11	*Candida albicans*	3.05±0.01	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
12	*Cryptococcus neoformans*	2.78±0.05	0.00*	0.00*	0.00*	2.00±0.24*	1.66±0.10*	0.00*	2.00±0.24*	1.66±0.10	4.67±0.28	2.15±0.15*

(*) means a statistically significant reduction in the amount of bacteria ($P<0.05$).

Table 6 Comparative of the efficacy results from electrolyte water for sterilization on plastic sheets by immersion or spray technique were shown in mean±SD from 3 identical tests.

No.	Tested organism	Viable count (Log CFU/mL)							
		Growth control	0.6% Sodium hypochlorite				Electrolyte water		
			Immersion				Immersion		Spray	
			3 min	5 min	3 min	5 min	3 min	5 min	3 min	5 min
1	*Pseudomonas aeruginosa*	5.29±0.13	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
2	*Acinetobacter baumannii*	5.40±0.01	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
3	*Staphylococcus aureus*	5.68±0.03	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
4	*Bacillus subtilis*	5.88±0.02	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
5	*Listeria monocytogenes*	5.57±0.07	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
6	*Edwardsiella tarda*	6.02±0.02	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
7	*Aeromonas hydrophila*	5.64±0.06	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
8	*Salmonella Typhi*	5.58±0.04	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	5.71±0.04	5.51±0.04
9	*Klebsiella pneumoniae*	5.67±0.02	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
10	*Shigella flexneri*	5.75±0.02	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
11	*Candida albicans*	3.06±0.04	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
12	*Cryptococcus neoformans*	2.60±0.05	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*

(*) means a statistically significant reduction in the amount of bacteria ($P<0.05$).

Table 7 Comparative of the efficacy results from electrolyte water for sterilization on cloth pad by immersion or spray technique were shown in mean±SD from 3 identical tests.

No.	Tested organism	Viable count (Log CFU/mL)								
		Growth control	0.6% Sodium hypochlorite				Electrolyte water			
			Immersion		Spray		Immersion		Spray	
			3 min	5 min	3 min	5 min	3 min	5 min	3 min	5 min
1	*Pseudomonas aeruginosa*	5.48±0.02	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	4.36±0.10*	0.67±0.58*
2	*Acinetobacter baumannii*	5.34±0.05	0.00*	0.00*	4.40±0.17*	4.20±0.17*	4.46±0.15	0.00*	0.00*	0.00*
3	*Staphylococcus aureus*	6.29±0.01	2.77±1.00*	2.67±0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
4	*Bacillus subtilis*	5.88±0.02	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	4.72±0.49*	4.26±0.24*	0.00*	0.00*
5	*Listeria monocytogenes*	6.13±0.05	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.67±0.58*	0.00*
6	*Edwardsiella tarda*	5.62±0.02	0.00*	0.00*	2.67±2.31*	0.00*	2.67±2.31	0.00*	2.33±1.53*	0.00*
7	*Aeromonas hydrophila*	6.24±0.05	0.00*	0.00*	4.16±0.28*	4.43±0.51*	2.97±2.57	0.00*	0.00*	0.00*
8	*Salmonella Typhi*	5.24±0.07	2.67±2.31*	2.67±2.31*	0.00*	0.00*	4.69±0.09*	4.74±0.13*	0.00*	0.00*
9	*Klebsiella pneumoniae*	5.78±0.01	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	4.10±0.17*	2.67±2.31*	0.00*	0.00*
10	*Shigella flexneri*	5.82±0.01	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00	0.00*	0.00*
11	*Candida albicans*	3.01±0.04	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00	0.00	0.00*
12	*Cryptococcus neoformans*	2.47±0.15	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*

(*) means a statistically significant reduction in the amount of bacteria ($P<0.05$).

Figure 3 Results of the OMUF fibroblast cytotoxicity test of water electrolytes.