

บทที่ 3

อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

อุปกรณ์ในการสกัดและแยกสาร

1. กระดาษ label
2. Condenser
3. ตู้อบ
4. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น mettler AJ50
5. กรอบค
6. เครื่องแก้ว เช่น บีกเกอร์ 100, 250, 600 มิลลิลิตร กระบอกตวง กรวยกรอง แท่งแก้วคน
7. Ultrasonic bath รุ่น super RX 510H ของ Bandelin Electronic Germany
8. กระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 เส้นผ่าศูนย์กลาง 12.5 และ 15 เซนติเมตร
9. ผ้าขาวบาง
10. Rotary evaporator, water bath รุ่น B-480, rotavapor รุ่น R-124 ของ BUCHI Switzerland
11. ขวดแก้วกลมฝาเกลียว เส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร สูง 5.5 เซนติเมตร
12. Capillary tube
13. แผ่นกระจก ขนาดกว้าง 20 ยาว 20 เซนติเมตรหนา 3 มิลลิเมตร
14. เครื่อง cloth plate
15. แท่งขนาด 20x5x20 เซนติเมตร
16. UV lamp รุ่น UVL-56 ของ Ultra-Violet ProD.INC.America
17. GCMS รุ่น QP 2000A ของ Shimadzu Japan

อุปกรณ์ในการเลี้ยงและทดสอบสารกับแมลงวัน

1. ขวดพลาสติกใสขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร สูง 30 เซนติเมตร
2. ตาข่ายไนลอน
3. ขางรัค
4. ตาข่ายจับแมลง

5. ขวดพลาสติกใส ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 เซนติเมตร สูง 12 เซนติเมตร
6. ปลาทุ น้ำหวาน
7. พู่กัน
8. หัวฉีดสเปรย์
9. กระดาษชำระ
10. ขวดน้ำกลั่น

3.2 สารเคมี

1. Dichloromethane ที่ผ่านการกลั่น ของ Lab-scane ประเทศ Ireland
2. Methanol ที่ผ่านการกลั่น ของ Lab-scane ประเทศ Ireland
3. Toluene ที่ผ่านการกลั่น ของ Lab-scane ประเทศ Ireland และ Merk ประเทศ Germany
4. Ethyl acetate ที่ผ่านการกลั่น ของ Lab-scane ประเทศ Ireland
5. Sodium sulfate anhydrous ของ Merk ประเทศ Germany
6. น้ำกลั่น
7. Silica gel G₆₀ ของ Merk ประเทศ Germany
8. เกล็ดไอโอดีน

3.3 สัตว์ทดลอง

แมลงวันบ้าน (*Musca domestica* Linn.) 4 ระยะการเจริญคือ ไข่ หนอน ดักแด้ ตัวเต็มวัย

3.4 วิธีดำเนินการวิจัย

1. ขั้นตอนการเตรียมแมลงวันบ้าน เพื่อใช้เป็นสัตว์ทดลอง

1.1 ขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง

ใช้ดาข่ายจับแมลง จับแมลงวันบ้านตัวเต็มวัย จากศูนย์วัฒนธรรมเชียงใหม่ ใส่ภาชนะพลาสติกทรงกลมสูง 30 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร ปิดฝาภาชนะด้วย ดาข่ายไนลอน ให้ปลาทุ และน้ำหวานเป็นอาหาร

1.2 ขั้นตอนการเลี้ยงแมลงวัน

แยกเนื้อปลาทุออกมาเมื่อพบไข่แมลงวัน โดยบรรจุใส่กล่องพลาสติกลักษณะ กลม ใส สูง 15 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 8 เซนติเมตรรองก้นกล่องด้วยกระดาษชำระที่เปียกชุ่มด้วยน้ำกลั่น ปิดฝากล่องด้วยผ้าขาวบาง เติมอาหารและน้ำกลั่น พอให้ชุ่ม จนหนอนแมลงวันโตถึงระยะที่

ต้องการนำไปทำการทดลอง โดยเลี้ยงบางส่วนต่อไปจนเข้าระยะดักแด้

แยกดักแด้ออกจากอาหารเลี้ยงหนอน บรรจุใส่ภาชนะแห้งสนิท หุ้มฝากล่องด้วยตาข่าย ดักแด้ที่ใช้ในการทดลองคือดักแด้ที่เป็นสีน้ำตาลอ่อน (ความเข้มของสีดักแด้เพิ่มขึ้นตามอายุดักแด้) ดักแด้บางส่วนบรรจุภาชนะเลี้ยงแมลงวันตัวเต็มวัย เพื่อให้เจริญเป็นตัวเต็มวัย เริ่มให้อาหารอีกครั้ง เมื่อดักแด้เปลี่ยนเป็นตัวเต็มวัย

2. ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดจากสมุนไพร

2.1 ขั้นตอนการเตรียมพืช

กานพลู ใช้ดอกกานพลูอบแห้ง ตำละเอียด

สารสกัด ใช้เมล็ดสารสกัด โดยการแช่เมล็ดสารสกัดในน้ำ 12 ชั่วโมง ขูดส่วนเปลือก และเนื้อของผล ออก ให้เหลือแต่เมล็ด นำไปอบที่อุณหภูมิ 50°C - 60°C นาน 12 ชั่วโมง จากนั้นตำให้ละเอียด โดยลอกเปลือกหุ้มเมล็ดออก

2.2 ขั้นตอนการสกัดสารจากพืช

ซังพืชแห้งบดละเอียด 100 กรัม ใส่บีกเกอร์ขนาด 600 มิลลิลิตร เติม dichloromethane 250 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ตั้งบีกเกอร์ใน Ultrasonic bath 45 นาที

กรองด้วยผ้าขาวบาง และกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 เส้นผ่าศูนย์กลาง 12.5 เซนติเมตร นำกากพืชที่เหลือมาทำการสกัดซ้ำ โดยเติม dichloromethane 150 มิลลิลิตร ทำตามวิธีเดิม

2.3 ขั้นตอนการทำสารสกัดให้เข้มข้นสูง

นำสารสกัดที่ได้มาระเหยแห้งวิธี distillation in vacuum ด้วยเครื่อง rotary evaporator จะได้ส่วนสกัดหยาบ (crude extract)

3. ขั้นตอนการแยกองค์ประกอบของสาร (บุษบาวดี, 2540)

3.1 ขั้นตอนการทำแผ่น silica gel (thin layer plate)

ซัง silica gel 50 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ปิดฝา เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ทำเป็น suspension เติ silica gel ลงบนแผ่นกระจกที่เตรียมไว้บนฐาน เครื่องเคลือบเพลต เคลือบ silica gel หนา 1 มิลลิเมตร ปล่อยให้แห้ง นำไปอบที่อุณหภูมิ 80°C , 100°C และ 120°C อย่างละ 1 ชั่วโมง

3.2 ขั้นตอนการหาตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่

ผสมวัฏภาคเคลื่อนที่ chloroform, ethyl acetate, hexane, methanol, petroleum ether,

toluene, ในอัตราส่วนที่ ต่าง ๆ กัน เทลงในแท็งค์สี่เหลี่ยม เขย่าให้สารเข้ากัน ใส่กระดาษกรองเบอร์ 1 เส้นผ่าศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร 2 แผ่น ให้ชิดทั้ง 2 ขอบ ทางด้านยาวของแท็งค์ ปิดฝา เขย่าเล็กน้อย ทิ้งไว้ให้แท็งค์อึดตัว ด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่

3.3 ขั้นตอนการหยดสารบนแผ่น silica gel

วัดระยะห่างจากขอบล่าง 1.5 เซนติเมตร ใช้ไม้บรรทัดและให้เป็นรอยเส้นจาง ๆ วัดจากแนวเส้นขึ้นไป 16 เซนติเมตร ชีดเส้นให้เห็นชัดเจน กำหนดให้เป็นระยะทางที่ตัวทำละลายเดินทางมาถึง (solvent front)

นำส่วนผสมหยด มาเจือจางด้วย dichloromethane เล็กน้อย ทำการหยดสาร บนแผ่น silica gel ด้วย capillary tube โดยหยดตามแนวรอยเส้นตรง 2 รอบ ทิ้งไว้ให้ตัวทำละลายระเหยจนหมด

3.4 ขั้นตอนการแยกสารด้วยวิธี Thin Layer Chromatography

นำแผ่น silica gel ที่หยดสารแล้ว ใส่ในแท็งค์วัฏภาคเคลื่อนที่ โดยแช่แผ่นกระจก ให้ด้านล่าง ขอบแท็งค์วัฏภาคเคลื่อนที่ ประมาณ 2 เซนติเมตร ส่วนด้านบนชิดขอบแท็งค์ ปิดฝา เมื่อวัฏภาคเคลื่อนที่เคลื่อนที่ถึง solvent front นำแผ่น silica gel ออก วางทิ้งไว้จนวัฏภาคเคลื่อนที่ระเหยออกหมด จะพบสารแยกออกจากกัน บางส่วน อาจมองเห็นด้วยตาเปล่า บางส่วนอาจตรวจสอบการเกิดสีได้โดยแช่แผ่น silica gel ในแท็งค์ไอโอไดน์ประมาณ 30 นาทีหรือตรวจสอบการเรืองแสงโดยการส่องด้วย UV-Lamp ในที่มีมืด

4. ขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดแมลงของสาร (bioassay)

4.1 การหาแถบสารที่ออกฤทธิ์ในการกำจัดแมลงวันบ้าน

นำสารที่แยกได้มาทำการทดสอบกับแมลงวันทั้ง 4 ระยะโดยในแต่ละกลุ่มการทดลองใช้แมลงวัน 30 ตัว ชูดแต่ละแถบออกมา ชั่ง 0.25 กรัม ละลายใน สารละลาย Acetone 10% 5 มิลลิลิตร ซึ่งในแต่ละระยะทดสอบโดย

ระยะไข่ วางไข่บน petri dish ทำการหยดสาร 1 หยด บนไข่ เป็นเวลา 5 วินาที นับจำนวนไข่ที่ไม่เจริญเป็นตัวหนอน หยุดนับจำนวนเมื่อ ไข่ในกลุ่มควบคุมส่วนใหญ่เจริญเป็นหนอน

ระยะหนอน แช่หนอนในสารละลายเป็นเวลา 5 วินาที บรรจุหนอนในขวดพลาสติกใส ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 เซนติเมตร สูง 12 เซนติเมตร ปิดฝาด้วยตาข่าย นับจำนวนหนอนที่ตายในเวลา 1 วัน

ระยะดักแด้ ฟ้นสารละลาย 5 มิลลิลิตร ระยะห่าง 15 เซนติเมตร นับจำนวนดักแด้ที่ไม่เจริญเป็นตัวเต็มวัย

ระยะตัวเต็มวัย ฟ้นสารละลาย 5 มิลลิลิตร ระยะห่าง 15 เซนติเมตร นับจำนวนตัวเต็มวัยที่

ตายใน 45 นาที 2 ชั่วโมง 4 ชั่วโมง

ใช้ acetone 10% เป็นกลุ่มควบคุม

ทำการวิเคราะห์ข้อมูล การทดสอบสารในแต่ละแถบ กับแมลงวันบ้าน ทั้ง 4 ระยะด้วย โปรแกรม Statistic Packages for the Social Science (SPSS) โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) แบบ Completely Randomized Design และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Least Significant Difference (LSD) ที่มีจำนวนซ้ำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 30 ตัว

4.2 การตรวจสอบสารที่ออกฤทธิ์กำจัดแมลงวันบ้าน

นำแถบสารที่พบว่าออกฤทธิ์ต่อแมลงวันบ้าน มาทำการสกัดออกจาก silica gel โดยละลายใน methanol : dichloromethane อัตราส่วน 1:1 ทำการกรองด้วยกระดาษกรอง ทำสารให้เข้มข้น จากนั้น ละลายด้วย acetone 10% ทดสอบกับแมลงวันบ้านตัวเต็มวัย ด้วยวิธีการพ่นสารละลาย ทำการนับจำนวนตัวตาย

นำสารที่มีแนวโน้มดีที่สุดที่สุดมาทำการแยกสารให้บริสุทธิ์อีกครั้งโดยใช้ mobile phase ที่มีอัตราส่วนที่ต่าง ๆ กัน นำสารที่แยกได้ทั้งหมดมาสกัด และทำการทดสอบ การออกฤทธิ์กำจัดแมลงวันบ้าน อีกครั้งหนึ่ง

5. ขั้นตอนการตรวจสอบเอกลักษณ์ของสาร

นำสารที่ได้มาทำการสกัดออกจาก silica gel โดยละลายใน methanol:dichloromethane อัตราส่วน 1:1 กรอง silica gel ออก นำสารไประเหยแห้งด้วย rotary evaporator และนำมาละลายด้วย dichloromethane เติม sodium sulfate anhydrous เพื่อกำจัดน้ำ จากนั้นนำสารที่ได้มาทำการตรวจสอบเอกลักษณ์ของสารด้วยเทคนิค GCMS