# บทที่ 2

# วิธีการดำเนินการวิจัย

**2.1 ศึกษาพันธุ์ของชันโรงที่มีความเหมาะสมต่อการนำมาเลี้ยงเพื่อเก็บผลผลิต**

2.1.1 สำรวจ เก็บตัวอย่างและรวบรวมข้อมูลพื้นฐานทางชีววิทยา ของชันโรงชนิดที่เลี้ยงและมีศักยภาพที่จะเลี้ยงเชิงเศรษฐกิจในประเทศไทย

2.1.2 รวบรวมข้อมูล คัดเลือกชนิดเพื่อเลี้ยงเก็บผลผลิต

ทำการนำชันโรงที่ได้จากเกษตรกรในพื้นที่ที่ทำการสำรวจ มาคัดเลือกเพื่อแยกสายพันธุ์ที่ต้องการนำมาศึกษาวิจัย ได้แก่ *T. laeviceps T. pagdeni T.terminata และ T. fuscobalteata*

2.1.3 นำมาเลี้ยงทดลองเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสร้างผลผลิต โดยได้เลือกพื้นที่ศึกษาที่มีอาหารอุดมสมบูรณ์เพียงพอ 4 พื้นที่ ดังนี้ (ใช้เกณฑ์การวัดระดับอาหาร คือ 1-3 (1= ปริมาณอาหารน้อย ต้องให้อาหารเสริม 2= ปริมาณอาหารปานกลาง ให้อาหารเสริมไม่เกิน 1-2 ครั้งในระยะ 3 เดือน, 3= ปริมาณอาหารมากเพียงพอ ไม่จำเป็นต้องให้อาหารเสริมเลย)

**ก. พื้นที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี วิทยาเขตราชบุรี (KR)** ระดับความอุดมสมบูรณ์ของอาหารอยู่ในระดับปกติ จำนวนพืชให้น้ำหวานอยู่ในระดับ 3 จำนวนพืชให้เกสรอยู่ในระดับ 3 (ภาพที่ 1)

**ภาพที่ 1** พื้นที่ทดลองบริเวณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี วิทยาเขตราชบุรี

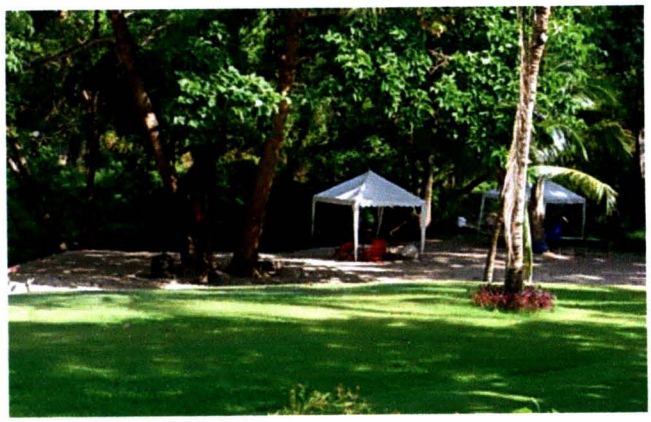
**ข. หมู่บ้านรางบัว ต.รางบัว อ.จอมบึง จ.ราชบุรี (R)** พื้นที่เป็นบริเวณบ้านลักษณะพืชอาหารโดยรอบรัศมี 100 เมตร มีไม้ดอกไม้ประดับ ไม้ผล พืชป่า หญ้า ระดับความอุดมสมบูรณ์ของอาหารอยู่ในระดับปกติ จำนวนพืชให้น้ำหวานอยู่ในระดับ 2 จำนวนพืชให้เกสรอยู่ในระดับ 3 (ภาพที่ 2)

**ภาพที่ 2** พื้นที่ทดลองบริเวณบ้านที่ทำการเลี้ยงชันโรง บ้านรางบัว ต.รางบัว อ. จอมบึง จ. ราชบุรี

**ค. บ้านระฆังทอง ต.เขาชะงุ้ม อ.โพธาราม จ.ราชบุรี (NG)** พื้นที่เป็นบริเวณบ้านลักษณะสวนกษตรผสมผสาน ซึ่งเกษตรกรได้ปลูกพืชสวนครัว พืชไร่ พืชยืนต้น พื้นที่ 21 ไร่ และพื้นที่รอบๆ รัศมี 100 มตร ที่ได้รับการเก็บรักษาไว้จากประชาชนในพื้นที่ ระดับความอุดมสมบูรณ์ของอาหารอยู่ในระดับดีมาก จำนวนพืชให้น้ำหวานอยู่ในระดับ 3 จำนวนพืชให้เกสรอยู่ในระดับ 3 (ภาพที่ 3)

**ภาพที่ 3** พื้นที่บริเวณสวนเกษตรของเกษตรกร บ้านระฆังทอง ต.เขาชะงุ้ม อ.โพธาราม จ.ราชบุรี

**ง. บ้านสวนหงษ์เหิร บ้านห้วยผาก อ. สวนผึ้ง จ. ราชบุรี (HH)** ลักษณะเป็นพื้นที่รีสอร์ท พืชอาหารโดยรอบรัศมี 100 เมตร มีไม้ดอกไม้ประดับ ไม้ผล พืชป่า หญ้า ระดับความอุดมสมบูรณ์ของอาหารอยู่ในระดับดี จำนวนพืชให้น้ำหวานอยู่ในระดับ 3 จำนวนพืชให้เกสรอยู่ในระดับ 3 (ภาพที่ 4)



**ภาพที่ 4** พื้นที่บริเวณรีสอร์ทบ้านสวนหงษ์เหิร

2.1.4 เปรียบเทียบผลผลิตที่ได้ คือ น้ำผึ้งและพรอพอลิส เก็บผลผลิตทุก 3 เดือน เป็นเวลา 1 ปี บันทึกลักษณะทั่วไป เช่น สี น้ำหนัก ความแข็ง/เปราะ/เหนียว และกลิ่น ปริมาณที่เก็บได้ต่อรัง

**การวัดการเปลี่ยนแปลงปริมาตรของรัง**

เนื่องจากการติดตามการเติบโตขยายขององค์ประกอบต่าง ๆ ไม่สามารถเปิดรังและวัดได้โดยตรง เพราะจะเป็นการรบกวนรังมากเกินไป จึงได้นำพลาสติกใส (PVC หนา 0.03 มม.) คลุมฝาด้านบน (ภาพที่ 5) เพื่อให้เปิดเช็ครังได้โดยไม่รบกวนรัง และใช้วิธีการสองวิธีประกอบกันดังต่อไปนี้

**ภาพที่ 5** แสดงการติดแผ่นพลาสติกคลุมด้านบนของรัง

ถ่ายภาพทุกสัปดาห์และนำภาพมาคำนวนหาดัชนีการขยายของรัง ดังนี้

Gt = P+F โดยที่

Gt = การเจริญเติบโตสัมพัทธ์ (Intensive growth)

$$P = \frac{\text{ปริมาตรของเซลล์ไข่+ปริมาตรของเซลล์ตัวอ่อน+ปริมาตรของเซลล์ดักแก้}}{\text{½ ของปริมาตรกล่องทั้งหมด}} \times 100$$

$$F = \frac{\text{ปริมาตรของถุงเก็บน้ำหวาน+ปริมาตรของถุงเก็บเกสร}}{\text{½ ของปริมาตรกล่องเลี้ยง}} \times 100$$

**การวัดการการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของรัง**

ชั่งน้ำหนักของรังและหาเปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นทุกๆ สองสัปดาห์

2.1.5 เก็บรักษาโดยใส่ในขวดแก้วมีฝาปิดสนิทและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 $C^{\circ}$ เพื่อการทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพขั้นต่อไป (ภาพที่ 6)

**ภาพที่ 6** น้ำผึ้งจากชันโรง

**2.2 วิเคราะห์น้ำผึ้งจากชันโรงเพื่อสร้างมาตรฐานสู่ท้องตลาด**

ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำผึ้งที่เก็บได้จากชันโรงแต่ละชนิดในแต่ละช่วงเวลา โดยตรวจ วิเคราะห์ ยีสต์รา Y/M ความชื้น (Moisture) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing Sugars) ปริมาณน้ำตาลซูโครส (Sucrose Sugars) แร่ธาตุและวิตามินบางชนิด ของแข็งที่ไม่ละลายในน้ำสูงสุด เถ้า ค่าความเป็นกรด (acidity) ปริมาณ Hydroxymethylfural และ Diastase activity ทั้งนี้ยึดชนิดและหลักการตรวจตาม *มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (มอก.)* เป็นหลัก จากนั้นศึกษาองค์ประกอบและคุณสมบัติทางเคมีที่สำคัญของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ได้จากชันโรง เพื่อนำไปพัฒนาและประยุกต์ใช้ให้เป็นประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆ ต่อไปในอนาคต

**2.3 ศึกษาองค์ประกอบและคุณสมบัติทางเคมีที่สำคัญของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ได้จากชันโรง เพื่อนำไปพัฒนาและประยุกต์ใช้ให้เป็นประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ต่อไปในอนาคต**

**2.3.1 การสกัดพรอพอลิสและการทดสอบ**

**สารสกัดหยาบ Hexane**

สกัดยางไม้หรือพรอพอลิสโดยสกัดส่วนที่ไม่มีขั้วโดยเฮกเซน (Hexane) โดยแช่เป็นเวลา 7 วันต่อชนิดของสารละลายตามลำดับ ในอัตราส่วน 400 กรัม/ลิตร ที่อุณหภูมิ 25 $^{\circ}C$ นำสารสกัดที่ได้มากรองด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นนำมาปั่นตกตะกอนด้วย centrifuge ที่ 7,000 rpm, 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บส่วนใส

นำตะกอนที่ได้มาสกัดด้วย Hexane อีกครั้ง แช่ทิ้งไว้ 3 วัน นำมาปั่นตกตะกอนด้วย centrifuge ที่ 7,000 rpm, 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บส่วนใส นำสารสกัดที่ได้จากทั้งสองครั้งมารวมกัน

**สารสกัดหยาบ Dichloromethane/Ethyl Acetate**

นำส่วนตะกอนที่เหลือทั้งหมดมาสกัดด้วยไดครอโรมีเทน (Dichloromethane/Ethyl Acetate) ปริมาตร 1 ลิตร โดยแช่เป็นเวลา 7 วันต่อชนิดของสารละลายตามลำดับ ปั่นตกตะกอนและเก็บส่วนใสที่ได้จากการสกัดครั้งที่สองนี้มารวมกับส่วนที่สกัดได้ในครั้งแรก ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นำสารสกัดที่ได้มากรองด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นนำมาปั่นตกตะกอนด้วย centrifuge ที่ 7,000 rpm, 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บส่วนใส นำตะกอนที่ได้มาสกัดด้วย Hexane อีกครั้ง แช่ทิ้งไว้ 3 วัน นำมาปั่นตกตะกอนด้วย centrifuge ที่ 7,000 rpm, 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บส่วนใส นำสารสกัดที่ได้จากทั้งสองครั้งมารวมกัน

**สารสกัดหยาบ Methanol**

นำตะกอนส่วนที่ 3 สกัดด้วยเมทานอล (Methanol) โดยวิธีการแบบเดียวกับการสกัดด้วยเฮกเซน จากนั้นนำสารละลายที่สกัดได้ทั้งหมดไประเหยแห้งด้วยเครื่อง Rotary Evaporator จนแห้ง จะได้ สารสกัดหยาบ Hexane Dichloromethane /Ethly Acetate และ Methanol ของพรอพอลิสชันโรง ชั่งน้ำหนักของสารสกัดแต่ละชนิดทั้งหมดที่สกัดได้ แล้วนำไปเก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

**2.3.2 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ของน้ำผึ้งและสารสกัดพรอพอลิส**

❖ **วิธี Agar Diffusion Assay**

จุลินทรีย์ที่ทดสอบด้วยวิธีนี้ มีทั้งสิ้น 5 ชนิดด้วยกันคือ

- เชื้อแบคทีเรียแกรมบวก 3 ชนิด *Pseudomonas aeruginosa Staphylococcus aureus* และ *Bacillus subtilis*
- เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ 1 ชนิด *Escherichia coli*
- เชื้อรา 2 ชนิด *Candida albicans ATCC5815*

*1). เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ* (Mueller-Hinton-agar (MHA), Difco$^{tm}$ )โดยวิธี Agar Well Diffusion Method (Allen *et al.*, 1991) ดังนี้

เตรียมอาหาร Mueller-Hinton agar (MHA) ในอัตราส่วนสาร 38 g ในน้ำกลั่น 1000 ml แบ่งน้ำที่ทำการตวงประมาณ 1 ใน 3 ส่วนมาทำการละลายสารที่ชั่งไว้ ค่อยๆ เติมน้ำส่วนที่เหลือ คนจนสารละลายไม่มีตะกอน เพื่อป้องกันการจับตัวเป็นก้อน ให้ความร้อนจนสารละลายเป็นเนื้อเดียว ใส่ภาชนะนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

*2). เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย ในอาหารเลี้ยงเชื้อ*

***การเตรียมเชื้อสำหรับการทดลอง***

เพาะเลี้ยงเชื้อที่จะทำการทดลองลงในอาหาร Nutrein agar Slant จนได้เชื้อที่มีอายุ 24 ชั่วโมง เตรียมน้ำกลั่น (Sterilization) ทำการ dilution เชื้อด้วยน้ำหลั่น Sterilization ให้ได้ระดับความขุ่น 0.5 *McFarland* standard และได้ปริมาตรเชื้อที่ต้องการ

***การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ***

ในระหว่างการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อในขั้นตอนการนำสารละลายใส่ภาชนะ ก่อนนำไปทำการ Sterile แบ่งอาหารใส่ภาชนะ 2 ส่วน ส่วนที่ 1 ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อลงในขวด ขวดละ 100 ml สำหรับนำไปเทใส่ Pretri dish ส่วนที่ 2 ใช้ปิเปตดูดอาหารลงใน Test tube ขนาด 50 ml หลอดละ 10 ml แล้วปิดฝาหลอด

หลังจากการ sterilization อาหาร คงอุณหภูมิอาหารทั้ง 2 ส่วน ไว้ที่ 58 องศาเซลเซียสใน water bath เพื่อป้องกันการแข็งตัวของอาหาร

เตรียมอาหารสำหรับการเลี้ยงเชื้อในส่วนแรกโดยนำอาหารในขวดออกจาก water bath จนอุณหภูมิลดลงเหลือ 55 องศาเซลเซียส ทำการเทลงใน Petri dish ประมาณ 10 - 15 ml ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ รอจนผิวหน้าอาหารเริ่มจับตัว จึงทำการเททับด้วยอาหารขั้นตอนที่ 3

***การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อในส่วนที่ 2***

นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ในส่วนที่ 2 (ใน Test tube ) ออกจาก Water bath จนอุณหภูมิลดลงเหลือ 55 องศาเซลเซียส นำปิเปตปลอดเชื้อดูด dilution เชื้อที่เตรียมไว้ปริมาตร 0.1 ml ลงในหลอดอาหาร เขย่าให้เข้ากัน นำไปเทลงใน Pretri dish ทับอาหารส่วนแรกที่เทไว้แล้ว หมุน Pretri dish ให้อาหารส่วนที่ 2 กระจายบนผิวหน้าอาหารส่วนแรกให้สม่ำเสมอและทั่วถึง

รอจนอาหารจับตัวแข็งเป็นเนื้อเดียวกัน ใช้ cork borer เบอร์ 4 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะลงบนอาหารที่แข็งตัวจำนวน 5 จุด สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยพรอพอลิส และ 6 จุด สำหรับการทดลองประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยน้ำผึ้ง กำหนดระยะห่างเท่าๆ กัน เพื่อเป็นหลุมสำหรับใส่สารละลายพรอพอลิสหรือสารละลายน้ำผึ้งที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน 5 และ 6 ระดับ

***การเตรียมสารละลายในการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์***

1. การเตรียมตัวอย่างทดสอบ

*การเตรียมสารละลายพรอพอลิส*

นำพรอพอลิสแต่ละชนิด ทำการชั่งใส่ภาชนะปลอดเชื้อ ตามการคำนวณให้ได้เปอร์เซ็นต์การละลายในน้ำกลั่นได้ความเข้มข้น 20 40 60 และ 80 เปอร์เซ็นต์

*การเตรียมสารละลายน้ำผึ้ง*

นำน้ำผึ้งแต่ละชนิด มาทำการชั่งใส่ภาชนะปลอดเชื้อตามการคำนวณให้ได้เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้น 0 (control) 20 40 60 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์

***การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยสารละลายพรอพอลิสและน้ำผึ้ง***

*การทดสอบด้วยพรอพอลิส*

นำเชื้อที่เตรียมไว้ใน petri dish แต่ละชนิด ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายพรอพอลิสปริมาณ 0.001 ml ลงในหลุมที่เจาะไว้จำนวน 5 หลุม ในแต่ละหลุมประกอบด้วย สารละลายพรอพอลิส 20 40 60 และ 80 เปอร์เซ็นต์ และ control (น้ำกลั่นปลอดเชื้อ)

*การทดสอบด้วยน้ำผึ้ง*

นำเชื้อที่เตรียมไว้ใน petri dish แต่ละชนิด ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายน้ำผึ้งปริมาณ 0.001 ml ลงในหลุมที่เจาะไว้จำนวน 6 หลุม ในแต่ละหลุมประกอบด้วยสารละลายน้ำผึ้ง 20 40 60 80 100 เปอร์เซ็นต์ และ control (น้ำกลั่นปลอดเชื้อ)

2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เวลา 2 วัน

3. ตรวจสอบผล โดยวัดขนาด Clear zone เทียบกับกลุ่มควบคุม (การวัดขนาด Clear zone ทำการวัด 2 แนวระนาบให้ทั้ง 2 แนวระนาบตั้งฉากกัน นำความยาวที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยลักษณะการวัดเคลียร์โซนดังรูป ⊕

4. เปรียบเทียบและวิเคราะห์ผล

❖ **วิธี Paper Disc Diffusion Assay**

จุลินทรีย์ที่ทดสอบด้วยวิธีนี้ มีทั้งสิ้น 5 ชนิดด้วยกันคือ

- เชื้อแบคทีเรียแกรมบวก 3 ชนิด *Pseudomonas aeruginosa* และ *Micrococcus aeruginosa*
- เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ 1 ชนิด *Escherichia coli*
- เชื้อรา 2 ชนิด *Candida albicans ATCC5815, C. albican ATCC8684*

Spread เชื้อ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งในจานแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 11 เซนติเมตร ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นนำแผ่น Paper disc วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อตามจำนวนความเข้มข้นที่เตรียมไว้ ต่อมาหยดสารสกัดน้ำผึ้งแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ ความเข้มข้นละ 100 ไมโครลิตร ลงบนแผ่น Paper disc แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสสำหรับเชื้อแบคทีเรีย และที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสสำหรับเชื้อรา เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย (inhibition zone) ในอาหารเลี้ยงเชื้อทุกวันเป็นเวลา 3 วัน ในแต่ละเชื้อและแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดแต่ละชนิด หาค่า MIC ทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ซ้ำ บันทึกผลการทดลอง แล้วเลือกเชื้อที่ถูกยับยั้งได้ดีไปทำการทดลองขั้นต่อไป (อ้างถึงข้อ คือ *M. luteus, P. aeruginosa* และ *E. coli)*

เตรียมสารสกัดอย่างหยาบของ 96% EtOH และน้ำจากขั้นตอนก่อนหน้านี้ ที่ความเข้มข้น 0, 64.5, 129, 193.5 และ 265 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์ที่เลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง โดยหยดสารสกัดปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงบนแผ่น paper disc จากนั้นนำไปบ่ม แล้ววัด clear zone เพื่อพิจารณาฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดอย่างหยาบว่ามีความสามารถในการต้านการเจริญเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่เลือกศึกษาได้หรือไม่ แล้วจึงเลือกสารสกัดที่มีฤทธิ์ดังกล่าวไปศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

**2.3.3 การตรวจหาและวิเคราะห์สารออกฤทธิ์**

เมื่อพบว่าสารสกัดมีองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ นำสารสกัดดังกล่าวมาผ่านกระบวนการคัดแยกเพื่อหา Fraction ที่ดีที่สุด

*2.3.4.1.การแยกองค์ประกอบโดยวิธีผสมผสานระหว่าง TLC และ Column Chromatography*

***Thin Layer Chromatography (TLC)***

ทดสอบหาสภาวะและอัตราส่วนของตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อพัฒนา mobile phase ที่ใช้ในการแยกแบบ column chromatography

ติดตาม fraction เคมีที่แยกได้จาก column chromatography โดยการใช้หลอด capillary หยดสารแล้ววางไว้ใน developing chamber ที่มี solvent เคลื่อนที่นำพาเอาสารที่มีคุณสมบัติต่างกันขึ้นไปตามแผ่น TLC จากนั้นสังเกตผลโดยการนำไปส่องภายใต้แสง UV ความยาวคลื่นต่างๆ หรือทำปฏิกิริยากับกรด

***Column Chromatography (CC)***

ใส่ stationary phase (เฟสคงที่) คือ silica gel ลงไปใน column ปล่อยตัวทำละลายออกจนเหลือเพียงผิวหน้า แล้วใส่สารสกัดยางไม้หรือพรอพอลิส จากนั้นชะสารตัวอย่างออกด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม (เฟสเคลื่อนที่หรือ mobile phase) และเก็บ fraction

นำ fraction ที่ได้ไประเหยให้แห้งสนิท เพื่อชั่งน้ำหนักในการวิเคราะห์สัดส่วนขององค์ประกอบ และเพื่อนำไปตรวจหาชนิดของสารองค์ประกอบที่อยู่ในพรอพอลิสโดยวิธี GC-MS ต่อไป

*2.3.4.2 วิเคราะห์ชนิดของสารออกฤทธิ์*

เมื่อได้ Fraction ที่ออกฤทธิ์แล้ว วิเคราะห์หาชนิดของสารเคมีที่ออกฤทธิ์ ตามลำดับต่อไปนี้

***การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์***

นำสารสกัดมาระเหยจนแห้ง 10 µl ผสม 100 µl pyridine, 200 µl bistrimetylsilyl trifluoroacetamide (BSTFA) + 1% trimethylchlorosilane (TMCS) ปิดฝาและทิ้งให้เกิดปฏิกิริยา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 95 °C

***การวิเคราะห์สารตัวอย่างด้วยเครื่อง GC - MS***

นำสารที่ได้ฉีดเข้าเครื่อง GC - MS Agilent Gas Chromatograph 6850 Series เชื่อมต่อด้วย Agilent 5973 mass spectrometer system (23 m, 0.25 mm id, 0.5 µm film thickness HP5-MS capillary) column โดยใช้แก๊สพาหะคือฮีเลียม อัตราการไหล 1.0 ml/min มีการปรับอุณหภูมิจาก 100 – 310 °C อัตราการแตกตัว 1:10 โดยฉีดสาร 1 µl ณ อุณหภูมิ 280 °C ความต่างศักย์ 70 eV จากนั้นตรวจวิเคราะห์หาชนิดสารโดยวิเคราะห์จากการแตกตัวของ molecular ions ของสาร library search (NIST98 MS data library)

**2.4 การอบรมถ่ายทอดเทคโนโลยีให้เกษตรกรผู้เลี้ยงชันโรง**

เป้าหมายในตอนต้นได้มุ่งถ่ายทอดเทคโนโลยีให้เกษตรกรใน ณ ต. บางขันแตก อ. เมือง จ. สมุทรสงคราม แต่เนื่องจากมีผู้สนใจเข้าร่วมอบรมจำนวนมากจึงได้ขยายเครือข่ายและจัดอบรม ตามโครงการการอบรมการส่งเสริมการเลี้ยงชันโรงเพื่อเก็บผลผลิตให้กับ เกษตรกร ชาวบ้านและครู จังหวัดสมุทรสงคราม ราชบุรี กาญจนบุรีและนครปฐม จำนวน 91 คน ณ บ้านดอนกระต่าย ตำบลสระสี่มุม อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม