

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และ วิธีการ

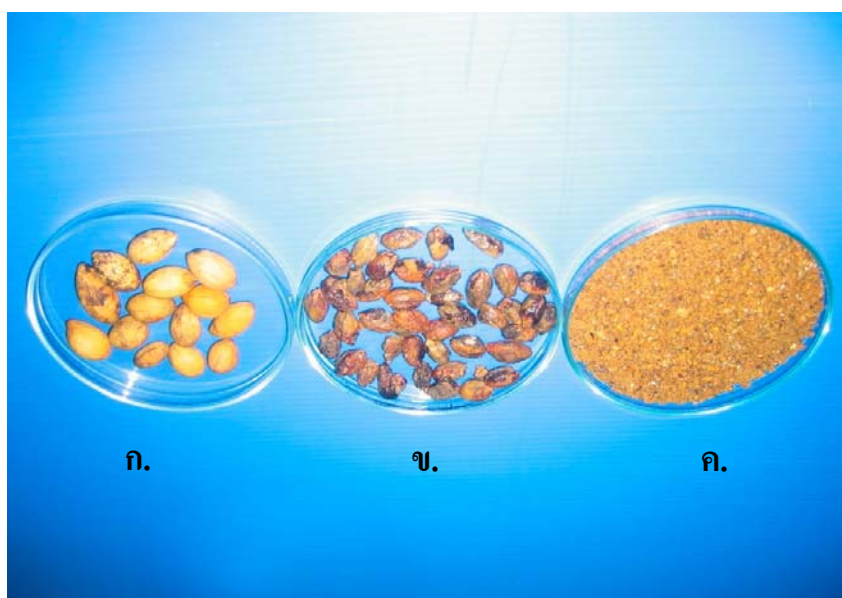
1. การสกัดสารออกฤทธิ์จากเนื้อในเมล็ดสะเดาช้าง

ในกระบวนการผลิตสารสกัดจากพืชนั้นมีกระบวนการสำคัญอยู่ 2 กระบวนการ คือ การเตรียมตัวอย่างพืชและ การสกัดสารออกฤทธิ์

1.1 การเตรียมตัวอย่างพืช

การเตรียมตัวอย่างพืชเป็นขั้นตอนที่ต้องใช้ความพิถีพิถันเพื่อให้ได้มาซึ่งวัตถุดิบที่มีคุณภาพในปริมาณที่มากเพียงพอต่อความต้องการ โดยการเก็บรวบรวมผลสุกของสะเดาช้างจากศูนย์เพาะชำกล้าไม้ที่ 6 จังหวัดสงขลา อำเภอรัตภูมิ จังหวัดสงขลา

นำผลสุกของสะเดาช้างมาบีบและแยกเอาเนื้อผลออกให้เหลือเฉพาะเมล็ด นำเมล็ดล้างน้ำและนำไปผึ่งแดดไว้ประมาณ 2-3 วัน เพื่อลดความชื้นและทำให้เมล็ดแห้ง เมล็ดที่แห้งดีแล้วจะมีลักษณะเปลือกเป็นสีครีม นำเมล็ดไปกะเทาะเปลือกออก นำเฉพาะเนื้อในเมล็ด (seed kernel) ไปป่นหยาบ (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 ลักษณะเมล็ดสะเดาช้าง (ก.) เนื้อในเมล็ดสะเดาช้าง (ข.) และผงเนื้อในเมล็ดสะเดาช้างป่นหยาบ (ค.)

1.2 การสกัดสารออกฤทธิ์

การสกัดสารออกฤทธิ์จากพืชนั้น สามารถทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับคุณสมบัติการทนความร้อนของสารที่ต้องการสกัด และชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ โดยทั่วไปนิยมใช้วิธีแช่ขุ่ย (maceration) ทำโดยการแช่ตัวอย่างพืชกับตัวทำละลายโดยให้ตัวทำละลายท่วมตัวอย่างในภาชนะปิดเช่นขวดปากกว้าง ขวดรูปชมพู่ หรือโถ เป็นต้น ทิ้งไว้ 7 วัน ระหว่างนั้นจะต้องเขย่าบ่อย ๆ เพื่อให้ตัวทำละลายสัมผัสกับตัวอย่างพืชได้อย่างทั่วถึง เมื่อครบกำหนดแล้วรินสารสกัดออกมา นำสารสกัดไปกรอง ควรทำการสกัดซ้ำหลาย ๆ ครั้ง เพื่อให้สามารถเอาสารออกฤทธิ์ออกมาให้ได้มากที่สุด (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 การแช่ขุ่ยสกัดสารออกฤทธิ์จากเมล็ดสะเดาช้าง ด้วยนอร์มอลเฮกเซน (n-hexane) หรือเมทานอล (methanol)

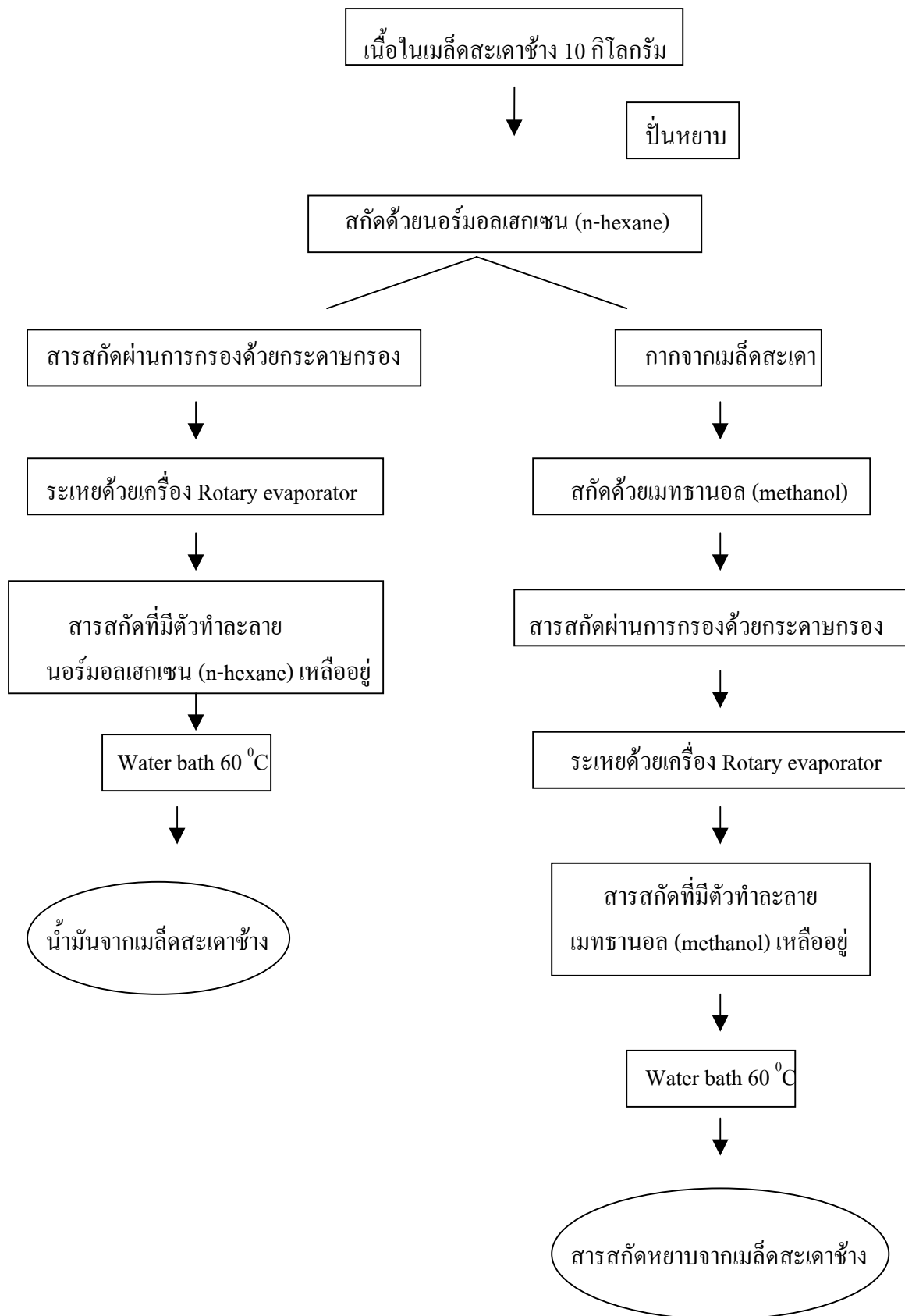
สำหรับการสกัดสารออกฤทธิ์จากเมล็ดสะเดาช้าง นำผงเนื้อในเมล็ดที่ทำการปั่นหยาบ 10 กิโลกรัม นำไปใส่ขวดปากกว้างขนาด 20 ลิตร เติมตัวทำละลายนอร์มอลเฮกเซน (n-hexane) ลงไปจนท่วมตัวอย่าง ปิดปากขวดให้สนิทด้วยจุกยางที่หุ้ม aluminum foil ทิ้งไว้ 7 วัน จากนั้นรินสารละลายออกให้หมด แล้วนำสารละลายไปกรองด้วยกระดาษกรองแบบหยาบ นำสารละลายที่ผ่าน

การกรองแล้วไประเหยโดยใช้เครื่อง rotary evaporator ซึ่งอาศัยหลักการกลั่นสารละลายที่ระดับอุณหภูมิต่ำ และความดันต่ำเกือบเป็นที่ระดับสูญญากาศเพื่อแยกเอาตัวทำละลายออกจากสารสกัด (ภาพที่ 6) และนำสารสกัดที่ได้ไปทำการระเหยส่วนของตัวทำละลายที่อาจเหลืออยู่ด้วย water bath ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ส่วนตัวทำละลายที่แยกออกจากสารสกัดนั้นนำไปทำการหมักตัวอย่างต่อไป ทำซ้ำ 3 ครั้ง ดังนั้นได้สารสกัด n-hexane extract ของเมล็ดสะเดาช้าง (น้ำมันจากเมล็ดสะเดาช้าง)

หลังจากนั้นนำกากสะเดาช้างที่ผ่านกระบวนการสกัดเอาน้ำมันออกด้วยนอร์มอลเฮกเซน (n-hexane) แล้วมาสกัดด้วยเมธานอลด้วย ingsไว้ 7 วัน จากนั้นรินสารละลายออกให้หมด แล้วนำสารละลายไปกรองด้วยกระดาษกรองแบบหยาบ นำสารละลายที่ผ่านการกรองแล้วไประเหยโดยใช้เครื่อง rotary evaporator และนำสารสกัดที่ได้ไปทำการระเหยส่วนของตัวทำละลายที่อาจเหลืออยู่ด้วย water bath ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ตัวทำละลายที่แยกออกจากสารสกัดนั้นนำไปทำการหมักตัวอย่างต่อไป ทำซ้ำ 3 ครั้ง ดังนั้นได้สาร methanol extract ของเมล็ดสะเดาช้าง (สารสกัดหยาบจากเมล็ดสะเดาช้าง) ดังแสดงในภาพที่ 7



ภาพที่ 6 การระเหยสารสกัดด้วยเครื่อง rotary evaporator



ภาพที่ 7 กระบวนการสกัดสารออกฤทธิ์จากเมล็ดสะเดาซัง

2. การเลี้ยงยุงรำคาญในห้องปฏิบัติการ

รวบรวมลูกน้ำยุงรำคาญจากสภาพในธรรมชาติจากภาควิชาการจัดการศัตรูพืช ซึ่งยุงรำคาญ (*C. quinquefasciatus*) มีลักษณะที่สำคัญคือ ตัวเต็มวัยเป็นยุงสีน้ำตาลขนาดเล็ก และ proboscis ไม่มีแถบขาว เกล็ดบน scutum เป็นเส้นเล็ก ๆ สีน้ำตาลทอง ส่วนสีของ basal bands บนปล้องท้อง (tergites) ทุกปล้องไม่เข้ม และระยะลูกน้ำหัวมีขน 3 กระจุกหรือมากกว่านั้น กระจุกละ 5-6 เส้น ด้านล่างของปล้องท้องจะมีขนเป็นกระจุก และด้านข้างจะมีลักษณะเป็นฟัน ส่วนความยาวของลำตัวจะยาว 5 เท่าของความกว้าง และปล้องท้องปล้องสุดท้ายมีท่อหายใจ ซึ่งได้จำแนกยุงรำคาญที่รวบรวมมาตามลักษณะดังกล่าวข้างต้นนี้ นำยุงรำคาญมาเลี้ยงแล้วปล่อยให้เข้าระยะดักแด้และเป็นตัวเต็มวัย ตามลำดับ โดยจะเลี้ยงตัวเต็มวัยในกรงขนาด 30 x 30 x 30 เซนติเมตร (ภาพที่ 8) ให้อาหารด้วยสารละลายน้ำตาล 6 % ผสมกับยีสต์ โดยใส่สารละลายดังกล่าวในหลอดทดลองและปิดปากหลอดด้วยสำลี นอกจากนี้ให้น้ำเปล่าโดยใส่ไว้ในหลอดทดลองปิดปากหลอดด้วยสำลีเช่นเดียวกัน เพื่อให้ยุงมาดูดน้ำหวานและน้ำจากสำลีที่ปิดอยู่ แล้วนำหลอดทดลองไปวางไว้ในกรงเลี้ยงยุง หลังจากนั้นปล่อยให้ตัวเต็มวัยกินน้ำและน้ำหวาน เมื่ออายุได้ 2 วัน ก็จะให้ดูดเลือดหนูตะเภาโดยจะนำหนูไปใส่ในกรงเวลา 18.00-20.00 นาฬิกา ปล่อยให้ยุงดูดเลือดหนูประมาณ 2 ชั่วโมง กรงที่เลี้ยงยุงนั้นจะต้องคลุมด้วยผ้าดำ หลังจากดูดเลือดแล้ว 48 ชั่วโมงก็จะนำน้ำสะอาดใส่ plate ไปวางไว้ในกรงเพื่อให้ยุงได้วางไข่และต้องเปลี่ยนน้ำทุกวัน เมื่อยุงวางไข่แล้วนำไข่มาเลี้ยงในถาดจนฟักกลายเป็นลูกน้ำให้อาหารลูกน้ำด้วย อาหารไก่ และต้องเปลี่ยนน้ำทุก ๆ 2 วัน เลี้ยงลูกน้ำจนกลายเป็นตัวเต็มวัย ทำการเลี้ยงยุงเพิ่มปริมาณ 2 รุ่น เพื่อให้ได้ปริมาณมากพอที่จะใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากเมล็ดสะเดาข้าง



ภาพที่ 8 การเลี้ยงตัวเต็มวัยของยุงรำคาญในกรงขนาด 30 x 30 x 30 เซนติเมตร

3. การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันจากเมล็ดสะเดาข้าง สารสกัดหยาบจากเมล็ดสะเดาข้างและน้ำมันตะไคร้หอมในการไล่ยุงรำคาญโดยวิธีทาผิวหนัง

การวางแผนการทดลอง เจือจางสารสกัดจากสะเดาข้างโดยใช้เอทานอล (ethanol) เป็นตัวทำละลายทั้งในรูปแบบน้ำมันและสารสกัดหยาบออกเป็น 6 ความเข้มข้น คือ 1%, 2%, 4%, 6%, 8% และ 10% w/v และน้ำมันตะไคร้หอมจากบริษัทวิทยาสรมมี 6 ความเข้มข้นคือ 1%, 2%, 4%, 6%, 8% และ 10% w/v (ภาพที่ 9) เปรียบเทียบกับสารไล่แมลง ก.ย. 15[®] มีสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ 2 ชนิด คือ deet (N, N diethyl-m-toluamide) 25.63% w/w และ dimethyl phthalate 30.60% w/w ทาบนผิวหนังให้สม่ำเสมอบริเวณหลังแขน พื้นที่ 3 x 10 เซนติเมตร ปริมาณสารเท่ากับ 1 มิลลิกรัม/ตารางเซนติเมตร ปิดบริเวณผิวหนังส่วนอื่นให้หมดด้วยถุงแขน เจาะช่องเฉพาะบริเวณผิวหนังที่ทาสารไว้ ยื่นแขนเข้าไปในกรงขนาด 30 x 30 x 30 ซม. ซึ่งมียุงเพศเมียอายุ 4-5 วัน ที่เลี้ยงด้วยสารละลายน้ำตาล 6 % ผสมกับยีสต์ และยังไม่เคยดูดเลือด จำนวน 250 ตัว เป็นเวลานาน 3 นาที ดึงแขนออก ที่ระยะนาน 30 นาที ยื่นแขนเข้าไปในกรงใหม่ 3 นาที โดยใช้แขนคนทดลอง 3 คน ซึ่งอาสาสมัครทั้ง 3 คนมีความเต็มใจและยินยอมที่จะช่วยทำการทดลองนี้และไม่ขัดกับจรรยาบรรณการใช้สัตว์ของสภากาชาดไทยปี 2542 ทำการทดลองในเวลา 18.00-21.00 นาฬิกา จนกระทั่งภายในช่วงเวลา 3 นาที (ภาพที่ 10) ที่ยื่นแขนเข้าไปยุงดูดเลือดติดต่อกัน 2 ตัว ถือเป็นเวลาหมดประสิทธิภาพในการป้องกันยุงของตัวอย่างชนิดนั้น และมาตรฐานที่นำไปใช้ในการป้องกันยุง สารสามารถป้องกันยุงดูดเลือดได้นาน 2 ชั่วโมงขึ้นไป (มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2522)

บันทึกผล นับจำนวนยุงที่เกาะแขนติดต่อกัน 2 ตัว ถือว่าหมดประสิทธิภาพในการป้องกันยุงดูดเลือด และหารระยะเวลาป้องกันยุงดูดเลือด



ภาพที่ 9 สารสกัดหยาบจากเมล็ดสะเดาช้าง (1) น้ำมันตะไคร้หอม (2) และน้ำมันจากเมล็ดสะเดาช้าง (3)



ภาพที่ 10 การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันและสารสกัดหยาบจากเมล็ดสะเดาช้าง และน้ำมันตะไคร้หอม โดยวิธีทาผิวหน้

4. การทดสอบประสิทธิภาพทำให้ยุงรำคาญที่ตกสู่พื้นของน้ำมันและสารสกัดหยาบจากเมล็ดสะเดาข้าง และน้ำมันตะไคร้หอมโดยใช้เครื่องไต่ยุงไฟฟ้า (Raid®)

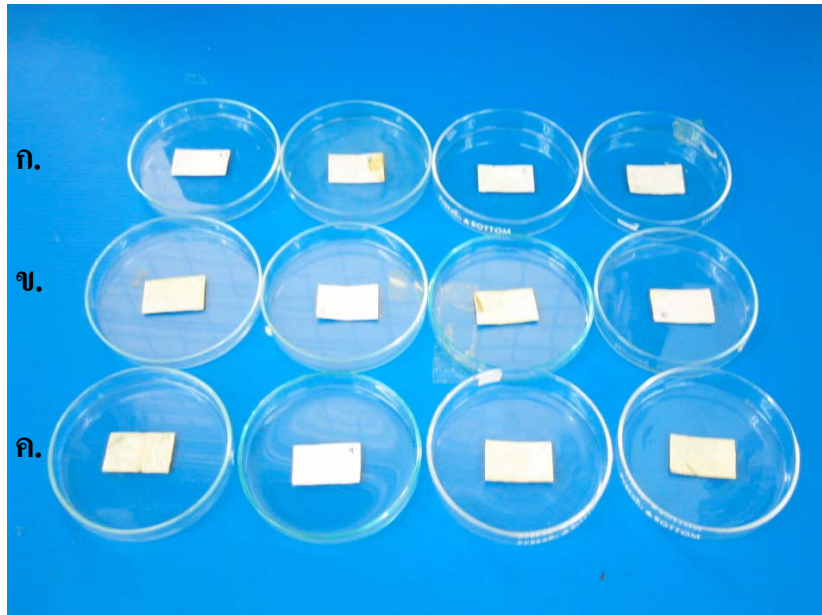
ทดสอบความเข้มข้นของน้ำมันและสารสกัดหยาบจากเมล็ดสะเดาข้าง และน้ำมันตะไคร้หอมที่สามารถทำให้ยุงรำคาญตกสู่พื้นได้เพื่อหาค่า KC_{50} (knockdown concentration 50%) และ KC_{95} (knockdown concentration 95%) หลังจากนั้นทำการทดสอบระยะเวลาในการออกฤทธิ์ที่ทำให้ยุงรำคาญตกที่ตกสู่พื้น ของน้ำมันจากเมล็ดสะเดาข้างและน้ำมันตะไคร้หอมที่ความเข้มข้นระดับ KC_{95} เพื่อนำไปหาค่า KT_{50} (knockdown time 50%) นอกจากนี้ได้ทำการทดสอบผลของสารเพิ่มประสิทธิภาพบางชนิดต่อการออกฤทธิ์ที่ทำให้ยุงรำคาญตกสู่พื้นของน้ำมันจากเมล็ดสะเดาข้างและน้ำมันตะไคร้หอม

4.1 การทดสอบความเข้มข้นของน้ำมันและสารสกัดหยาบจากเมล็ดสะเดาข้างและน้ำมันตะไคร้หอมที่ทำให้ยุงรำคาญตกสู่พื้น

การเตรียมสารสกัดจากเมล็ดสะเดาข้าง เจือจางน้ำมันและสารสกัดหยาบจากเมล็ดสะเดาข้างและน้ำมันตะไคร้หอมโดยใช้เอทานอล (ethanol) เป็นตัวทำละลาย 6 ความเข้มข้น คือ 1%, 2%, 4%, 6%, 8% และ 10% w/v เปรียบเทียบกับ เรดด์แผ่นแมทฟอยด์ 1® (Raid Laminated Foil Mat 1®) มีสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ คือ d-allethrin 4.35% w/w

วิธีการทดสอบ วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) ใช้ น้ำมันและสารสกัดหยาบจากเมล็ดสะเดาข้าง และน้ำมันตะไคร้หอม 6 ความเข้มข้นดังกล่าวข้างต้น และเรดด์แผ่นแมทฟอยด์ 1® ทำการทดลอง 4 ชั่วโมง โดยใช้ตู้กระจกขนาด 70 x 70 x 70 เซนติเมตร และภายในตู้กระจกมีเครื่องไต่ยุงไฟฟ้า (Raid®) ซึ่งมีแผ่นฟอยด์ขนาด 2.3 x 4 เซนติเมตร (ภาพที่ 11) โดยนำกระดาษสาชุบน้ำมันและสารสกัดหยาบจากเมล็ดสะเดาข้าง และน้ำมันตะไคร้หอมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาณ 5 ml. นาน 5 นาที แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำกระดาษสาที่ชุบน้ำมันและสารสกัดหยาบจากเมล็ดสะเดาข้าง และน้ำมันตะไคร้หอมมาติดกับแผ่นฟอยด์ และนำไปใส่ในเครื่องไต่ยุงไฟฟ้า (Raid®) เสียบปลั๊กทิ้งไว้ 2 นาที จึงปล่อยยุงรำคาญเพศเมียอายุ 4-5 วัน และอยู่ในสภาพสมบูรณ์เข้าไปในตู้กระจกจำนวน 20 ตัว (ภาพที่ 12) นับจำนวนยุงที่ตกสู่พื้นทุก ๆ 5 นาที จนครบ 60 นาที (ตัดแปลงมาจากมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2522)

การวิเคราะห์ผล นำจำนวนยุงที่ตกสู่พื้นมาวิเคราะห์ Analysis of Variance (ANOVA) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของชุดทดลองด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) และหาค่า KC_{50} และ KC_{95} โดยใช้วิธี probit analysis และหาเปอร์เซ็นต์ยุงที่ตกสู่พื้น



ภาพที่ 11 การเตรียมน้ำมันจากเมล็ดสะเดาช้าง (ก.) สารสกัดหยาบจากเมล็ดสะเดาช้าง (ข.)
น้ำตะไคร้หอม (ค.) ในรูปของแผ่นฟอยด์ขนาด 2.3 x 4 เซนติเมตร



ภาพที่ 12 การทดสอบน้ำมันและสารสกัดหยาบจากเมล็ดสะเดาช้าง และน้ำมันตะไคร้หอมในตู้
กระจกขนาด 70 x 70 x 70 เซนติเมตร

4.2 การทดสอบระยะเวลาในการออกฤทธิ์ที่ทำให้ยุงรำคาญตกสู่พื้นของน้ำมันจากเมล็ดสะเดาข้างและน้ำมันตะไคร้หอม

การทดลองนี้จะใช้น้ำมันจากเมล็ดสะเดาข้างเพียงอย่างเดียวโดยจะไม่ใช่สารสกัดหยาบจากเมล็ดสะเดาข้างเนื่องจากสารสกัดหยาบจากเมล็ดสะเดาข้างนั้นให้ผลในการทำให้ยุงรำคาญตกสู่พื้นน้อยกว่าน้ำมันจากเมล็ดสะเดาข้าง ดังนั้นการทดลองนี้จึงใช้น้ำมันจากเมล็ดสะเดาข้างและน้ำมันตะไคร้หอมที่ความเข้มข้น 10% โดยทำการทดสอบในตู้กระจกขนาด 70 x 70 x 70 เซนติเมตร และภายในตู้กระจกมีเครื่องไต้ยุงไฟฟ้า (Raid[®]) ซึ่งมีแผ่นฟอยล์ขนาด 2.3 x 4 เซนติเมตร การเตรียมน้ำมันจากเมล็ดสะเดาข้างและวิธีการทดลอง เหมือนกับในข้อ 4.1 บันทึกผลโดยนับจำนวนยุงที่ตกสู่พื้นเป็นเวลา 1, 3, 6, 9 และ 12 ชั่วโมง แล้วนำผลที่ได้มาหาค่า KT_{50} โดยใช้วิธี probit analysis และหาเปอร์เซ็นต์ยุงรำคาญที่ตกสู่พื้น

4.3 การทดสอบผลของสารเพิ่มประสิทธิภาพบางชนิดต่อการออกฤทธิ์ที่ทำให้ยุงรำคาญตกสู่พื้นของน้ำมันจากเมล็ดสะเดาข้างและน้ำมันตะไคร้หอม

สารที่ใช้ทดสอบ นำน้ำมันจากเมล็ดสะเดาข้างและน้ำมันตะไคร้หอมที่ทำให้ยุงรำคาญตกสู่พื้นในระดับ KC_{95} ผสมกับสารเพิ่มประสิทธิภาพ 3 ชนิด ชนิดใดชนิดหนึ่งคือ Fixer[®] 600, Latron[®] CS-7 และ Foil[®] อัตราที่ใช้ 5 ซีซีต่อน้ำ 20 ลิตร Fixer[®] 600 มีสารออกฤทธิ์ คือ Blend of Alkyl Aryl Polythoxylate and sodium salt of dialkylsulfosuccinate 60% และ Latron[®] CS-7 มีสารออกฤทธิ์ คือ Blend of alkyl aryl polythoxylate and sodium salt of alkylsulfonatedalkylate 60% ส่วน Foil[®] มีสารออกฤทธิ์ 2 ชนิด คือ Ethexylated Natural Oil 93% และ Alkylated Natural Oil 7%

วิธีทดสอบ วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) โดยมีทรีตเมนต์ในการทดลอง 12 ทรีตเมนต์ คือ

1. น้ำมันจากเมล็ดสะเดาข้าง
2. น้ำมันจากเมล็ดสะเดาข้าง + Fixer[®] 600
3. น้ำมันจากเมล็ดสะเดาข้าง + Latron[®] CS-7
4. น้ำมันจากเมล็ดสะเดาข้าง + Foil[®]
5. น้ำมันตะไคร้หอม
6. น้ำมันตะไคร้หอม + Fixer[®] 600
7. น้ำมันตะไคร้หอม + Latron[®] CS-7

8. น้ำมันตะไคร้หอม + Foil[®]
9. น้ำ + Fixer[®] 600
10. น้ำ + Latron[®] CS-7
11. น้ำ + Foil[®]
12. ชุดควบคุม (น้ำ)

ทำการทดลอง 4 ซ้ำ โดยใช้ตู้กระจกขนาด 70 x 70 x 70 เซนติเมตร และภายในตู้กระจกมีเครื่องไต่ยุงไฟฟ้า (Raid[®]) ซึ่งมีแผ่นฟอยด์ขนาด 2.3 x 4 เซนติเมตร โดยนำกระดาษชุบน้ำมันจากเมล็ดสะเดาช้างและน้ำมันตะไคร้หอมปริมาณ 5 ml. ผสมกับสารเพิ่มประสิทธิภาพในอัตราที่ใช้ 5 ซีซีต่อน้ำ 20 ลิตร นาน 5 นาที แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำกระดาษที่ชุบน้ำมันจากเมล็ดสะเดาช้างและน้ำมันตะไคร้หอมมาติดกับแผ่นฟอยด์และนำไปใส่ในเครื่องไต่ยุงไฟฟ้าแล้วเสียบปลั๊กทิ้งไว้ 2 นาที จึงปล่อยยุงรำคาญเพศเมียอายุ 4-5 วัน และอยู่ในสภาพสมบูรณ์เข้าไปในตู้กระจกจำนวน 20 ตัว นับจำนวนยุงที่ตกสู่พื้นทุก ๆ 5 นาที จนครบ 20 นาที (ดัดแปลงมาจากมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2522)

การวิเคราะห์ผล นำจำนวนยุงที่ตกสู่พื้นมาวิเคราะห์ Analysis of Variance (ANOVA) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของชุดทดลองด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)