# บทที่ 2

# อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

## 2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลองได้แสดงไว้ดังตารางที่ 2.1

**ตารางที่ 2.1** แสดงชื่อเครื่องมือ รุ่น และบริษัทผู้ผลิต

| ชื่อเครื่องมือ | รุ่น | บริษัทผลิต |
|---|---|---|
| 1.เครื่องเขย่าผสม (vortex) | Vortex - Genie No. 2 | Scientific Industries Inc., New York, USA. |
| 2.เครื่องเขย่าสกัดแยกสาร (extraction shaker) | A-31 | Yamato Scientific Co. Ltd.,Japan |
| 3.เครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) | RE - 52 | Yamato Scientific Co. Ltd.,Japan |
| 4.เครื่องชั่งแบบหยาบ (electronic balance) | FX - 3000 | A & D , Japan |
| 5.เครื่องชั่งแบบละเอียด (electronic balance) | FX - 180A | A & D , Japan |
| 6.เครื่อง ultrasonicator | D 200 | D.S.C. Group, Thailand |
| 7.เครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) | LC - 6A | Shimadzu , Japan |
| 8 เครื่องวิเคราะห์ผลสำหรับเครื่อง HPLC | C-R4A | Shimadzu , Japan |
| 9.คอลัมน์สำหรับวิเคราะห์ (analytical column) สำหรับHPLC | LC-ODS,STEEL | Phenomenex, Japan |
| 10.คอลัมน์สำหรับเก็บลำดับส่วน (preparative column) สำหรับHPLC | LC-ODS,STEEL | Shimpack, Japan |

## 2.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมีชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการทดลองได้แสดงไว้ดังตารางที่ 2.2

**ตารางที่ 2.2** รายชื่อสารเคมีและบริษัทผู้ผลิต

| สารเคมี | บริษัทผู้ผลิต |
|---|---|
| 1. คลอโรฟอร์ม | Merck - ประเทศเยอรมัน |
| 2. ซิลิกาเจล(silica gel) ชนิด 60 Art 7731(0.063-0.200 มม.) | Merck - ประเทศเยอรมัน |
| 3. แผ่นทินแลร์โครมาโตกราฟี ซิลิกาเจล 60 $F_{254}$ | Merck - ประเทศเยอรมัน |
| 4. เมทธานอล | Merck - ประเทศเยอรมัน |
| 5. สารมาตรฐานอะซาไดแรคติน (azadirachtin)บริสุทธิ์95% | Sigma – ประเทศสหรัฐอเมริกา |
| 6. อะซีโตน | Merck - ประเทศเยอรมัน |
| 7. เอทธานอล | กรมสรรพสามิตร ประเทศไทย |
| 8.เอทธิลอะซิเตต | Merck - ประเทศเยอรมัน |
| 9.เฮกเซน | Merck - ประเทศเยอรมัน |

## 2.3 การสกัดสารอะซาไดแรคตินจากเมล็ดสะเดา (ตามวิธีของขนิษฐา ดีประหลาด, 2541)

การเตรียมเมล็ดสะเดาโดยนำเมล็ดสะเดาที่อบแห้งที่สั่งซื้อจากบริษัทผลิตภัณฑ์เมล็ดสะเดาไทยมากะเทาะเปลือกออก นำส่วนเมล็ดมาบดละเอียดด้วยเครื่องบด เพื่อเตรียมสกัดแยกสารในขั้นตอนต่อไป

2.3.1 การสกัดสารอะซาไดแรคตินจากเมล็ดสะเดา ด้วยตัวทำละลายเมทธานอล

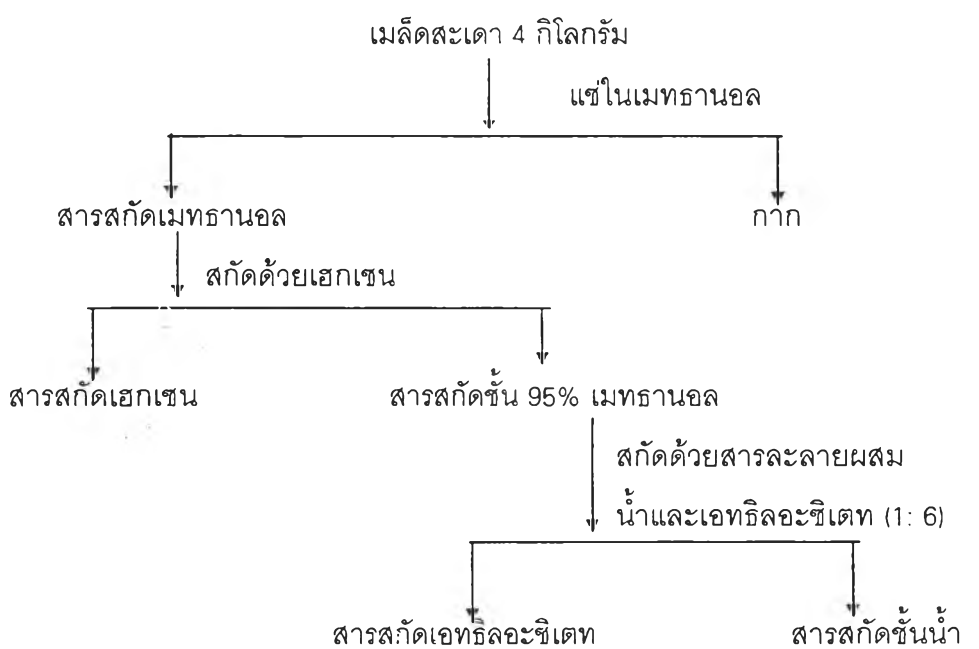
นำเมล็ดสะเดาที่ผ่านการบดแล้ว 4 กิโลกรัม มาแช่ในเมทธานอลประมาณ 20 ลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สกัดซ้ำ 3 ครั้ง นำสารละลายเมทธานอลที่ได้ ไปกลั่นแยกเมทธานอลออกด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นำสารสกัดเมทธานอลที่ได้ ( crude methanol extract ) ไปหาน้ำหนักแห้ง และตรวจสอบว่ามีอะซาไดแรคตินหรือไม่ด้วยแผ่นทินแลร์โครมาโตกราฟี

2.3.2 การสกัดสารอะซาไดแรคตินจากสารสกัดเมทธานอล ด้วยสารละลายผสม 95% เมทธานอลและเฮกเซน อัตราส่วน 1: 1

นำสารสกัดจากเมทธานอล น้ำหนักแห้ง 144.46 กรัม เติม 95% เมทธานอลให้เป็นสารละลายปริมาตร 300 มิลลิลิตร สกัดสารที่เป็นน้ำมันและสารอื่นๆ ซึ่งมีขั้วน้อยออกจากสารสกัดเมทธานอลด้วยเฮกเซน 300 มิลลิลิตร ในกรวยแยก (separating funnel) ขนาด 1,000 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำมาตั้งให้สารละลายแยกชั้นไขชั้นเมทธานอลซึ่งอยู่ส่วนล่าง ใส่กรวยแยกใหม่แล้วเติมเฮกเซน 300 มิลลิลิตร นำไปเขย่าทำซ้ำจนกว่าชั้นเฮกเซนซึ่งอยู่ส่วนบนใส ส่วนชั้นเฮกเซน ที่ได้นำไปกลั่นแยกเฮกเซนออกเพื่อนำเฮกเซนกลับมาใช้ใหม่ สำหรับสารสกัดชั้นเมทธานอล เก็บไว้ทำการสกัดแยกสารในขั้นต่อไป ( รูปที่ 2.1 )

2.3.3 การสกัดสารอะซาไดแรคตินจากสารสกัดเมทธานอล ด้วยสารละลายผสมน้ำและเอทธิลอะซิเตท อัตราส่วน 1: 6

นำสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยสารละลายผสม 95% เมทธานอลและเฮกเซน 300 มิลลิลิตร เติมเอทธิลอะซิเตท 300 มิลลิลิตร ลงในกรวยแยก เติมน้ำลงไป 50 มิลลิลิตร เพื่อสกัดสารอื่นๆที่มีขั้วมากออกจากสารสกัด นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำมาตั้งให้สารละลายแยกชั้น ไขชั้นน้ำที่อยู่ส่วนล่างใส่กรวยแยกใหม่แล้วเติมเอทธิลอะซิเตท 300 มิลลิลิตร นำไปเขย่า ทำซ้ำจนกว่าชั้นเอทธิลอะซิเตทซึ่งอยู่ส่วนบนใส นำสารละลายเอทธิล อะซิเตทที่ได้ไปกลั่นแยกเอทธิลอะซิเตทออกเพื่อนำกลับมาใช้ใหม่ สำหรับสารสกัดชั้นน้ำนำไปกลั่น เพื่อแยกน้ำออก หาน้ำหนักแห้งของสารสกัดเอทธิลอะซิเตท เพื่อแยกสารในขั้นต่อไป ( รูปที่ 2.1 )




รูปที่ 2.1 ขั้นตอนการสกัดสารอะซาไดแรคตินจากเมล็ดสะเดา *Azadirachta indica*

## 2.4 การแยกสารอะซาไดแรคตินด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี (chromatography column)

2.4.1 การแยกสารจากสารสกัดเอทธิลอะซิเตท

นำสารสกัดเอทธิลอะซิเตทน้ำหนักแห้ง 118.0 กรัม ที่ตรวจพบสารอะซาไดแรคติน มาแยกครั้งละ 16.8 กรัม โดยใช้ chromatography column ใช้ซิลิกาเจลชนิด 60 Art 7731เป็นตัวดูดซับ บรรจุซิลิกาเจลในคอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร ให้สูง 5 เซนติเมตร สารละลายตัวพาที่ใช้คือ สารละลายผสมคลอโรฟอร์มและเมทธานอลในอัตราส่วน 2:1 อัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บสารละลายจากคอลัมน์ตามลำดับส่วนละ ส่วนละ 30 มิลลิลิตรนำแต่ละส่วนที่ได้ ไปทดสอบหาอะซาไดแรคตินด้วยแผ่นทินแลร์โครมาโตกราฟี รวบรวมลำดับส่วนที่มีอะซาไดแรคตินไว้ด้วยกัน นำไประเหยตัวทำละลายออก หาน้ำหนักแห้งเตรียมสำหรับแยกสารในขั้นตอนต่อไป

2.4.2 การแยกสารจากสารที่แยกได้จากสารสกัดเอทธิลอะซิเตท

นำสารที่แยกได้จากขั้นตอน 2.4.1 น้ำหนักแห้ง 16.4 กรัม ที่ตรวจพบสารอะซาไดแรคติน มาละลายด้วยเมทธานอลปริมาณ 5 มิลลิลิตร บรรจุลงส่วนบนของคอลัมน์แก้วเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร ที่มีเซฟาเดคเจล (sephadex gel LH-20) อิ่มตัวในเมทธานอล สูง 5 เซนติเมตร โดยมีตัวชะเป็นเมทธานอล อัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที ขั้นตอนนี้เป็นการแยกสารตามขนาดโมเลกุล โดยสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่จะถูกชะออกมาก่อนสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก เก็บสารละลายจากคอลัมน์ตามลำดับส่วน ส่วนละ 30 มิลลิลิตร นำลำดับส่วนที่ได้ไปทดสอบหาสารอะซาไดแรคตินด้วยแผ่นทินแลร์โครมาโตกราฟี รวบรวมแต่ละส่วนที่มีอะซาไดแรคตินไว้ด้วยกัน นำไประเหยตัวทำละลายออกเพื่อหาน้ำหนักแห้งสำหรับแยกสารในขั้นตอนต่อไป

2.4.3 การแยกสารจากสารที่ผ่านการแยกด้วยเซฟาเดคเจล

นำสารที่แยกได้จากขั้นตอน 2.4.2 น้ำหนักแห้ง 10.66 กรัม ที่ตรวจพบสารอะซาไดแรคติน คลุกกับซิลิกาเจลปริมาณ 10 กรัม บรรจุลงส่วนบนของคอลัมน์แก้วเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.2เซนติเมตร ซึ่งมีซิลิกาเจลอิ่มตัวในสารละลายผสมคลอโรฟอร์มและอะซิโตนในอัตราส่วน 5:1 สูง 40 เซนติเมตร โดยมีตัวชะเป็นสารละลายผสมอัตราส่วนเดียวกัน อัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที ขั้นตอนนี้เป็นการแยกสารตามความแรงของขั้ว เก็บสารละลายจากคอลัมน์ตามลำดับส่วน ส่วนละ 30 มิลลิลิตร นำแต่ละส่วนที่ได้ไปทดสอบหาสารอะซาไดแรคตินด้วยแผ่นทินแลร์โครมาโตกราฟี รวบรวมแต่ละส่วนที่มีอะซาไดแรคตินไว้ด้วยกัน นำไประเหยตัวทำละลายออก หาน้ำหนักแห้งสำหรับแยกสารในขั้นตอนต่อไป

2.4.4 การแยกสารจากการชะด้วยสารละลายผสมคลอโรฟอร์มและอะซิโตน ( 5:1 )

นำสารที่แยกได้จากขั้นตอน 2.4.3 น้ำหนักแห้ง 6.11 กรัม ที่ตรวจพบสารอะซาไดแรคติน คลุกกับซิลิกาเจล ปริมาณ 10 กรัม บรรจุลงส่วนบนของคอลัมน์แก้วเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.2 เซนติเมตร ซึ่งมีซิลิกาเจลอิ่มตัวในสารละลายผสมเฮกเซน,คลอโรฟอร์มและอะซิโตน ในอัตราส่วน 3:1:1 สูง 40 เซนติเมตร โดยมีตัวชะเป็นสารละลายผสมอัตราส่วนเดียวกัน ( ซึ่งมีความแรงของขั้วสูงกว่าสารละลายผสมคลอโรฟอร์มและอะซิโตน (5:1) ) อัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บสารละลายจากคอลัมน์ตามลำดับส่วน ส่วนละ 30 มิลลิลิตร นำแต่ละส่วนที่ได้ไปทดสอบหาสารอะซาไดแรคตินด้วยแผ่นทินแลร์โครมาโตกราฟีรวบรวมแต่ละส่วนที่มีอะซาไดแรคตินเข้าด้วยกัน นำไประเหยตัวทำละลายออกหาน้ำหนักแห้งสำหรับแยกสารในขั้นตอนต่อไป

2.4.5 การแยกสารจากการชะด้วยสารละลายผสมเฮกเซน, คลอโรฟอร์มและอะซิโตน (3:1:1)

นำสารที่แยกได้จากขั้นตอน 2.4.4 น้ำหนักแห้ง 1.93 กรัม ที่ตรวจพบสารอะซาไดแรคติน คลุกกับซิลิกาเจลปริมาณ 10 กรัม บรรจุลงส่วนบนของคอลัมน์แก้วเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.5เซนติเมตร ซึ่งมีซิลิกาเจลอิ่มตัวในสารละลายผสมเฮกเซน,คลอโรฟอร์มและอะซิโตน ในอัตราส่วน 3:2:2 สูง 30 เซนติเมตร โดยมีตัวชะเป็นสารละลายผสมอัตราส่วนเดียวกัน ( ซึ่งมีความแรงของขั้วสูงกว่าในสารละลายผสมเฮกเซนต่อคลอโรฟอร์มต่ออะซิโตน (3:1:1) ) อัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บสารละลายจากคอลัมน์ตามลำดับส่วน ส่วนละ 30 มิลลิลิตร นำแต่ละส่วนที่ได้ไปทดสอบหาสารอะซาไดแรคตินด้วยแผ่นทินแลร์โครมาโตกราฟี รวบรวมแต่ละส่วนที่มีอะซาไดแรคตินไว้ด้วยกัน นำไประเหยตัวทำละลายออก หาน้ำหนักแห้งสำหรับแยกสารในขั้นตอนต่อไป

## 2.5 การแยกสารอะซาไดแรคตินด้วยรีเวอสเฟส ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิควิด โครมาโตกราฟี ( reversed phase HPLC )

นำสารที่แยกได้จากการชะด้วยสารละลายผสมเฮกเซน, คลอโรฟอร์มและอะซิโตน ในอัตราส่วน 3:2:2 (ข้อ 2.4.5) ที่ตรวจพบสารอะซาไดแรคติน ไปตรวจสอบด้วยรีเวอสเฟส ทินแลร์โครมาโตกราฟี ( reversed phase TLC ) พบว่ายังมีสารอื่นปนอยู่ จึงทำการแยกด้วย reversed phase HPLC ต่อไป โดยมีสภาวะในการแยกสารดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| คอลัมน์ | : | คอลัมน์สำหรับเก็บลำดับส่วน (preparative column) shimpack (LC-ODS,STEEL, 250×30 มิลลิเมตร) |
| สารละลายตัวพา | : | 50% เมทธานอลในน้ำที่ขจัดไอออนทวีคูณ |
| สารละลายตัวล้าง | : | 80% เมทธานอลในน้ำที่ขจัดไอออนทวีคูณ |
| อัตราการไหล | : | 8.0 มิลลิลิตรต่อนาที |
| อุณหภูมิ | : | 26 องศาเซลเซียส |
| ปริมาณสารตัวอย่าง | : | 4.0 มิลลิลิตร |
| ตัวทำละลายสารตัวอย่าง | : | 50% เมทธานอลในน้ำที่ขจัดไอออนทวีคูณ |
| ความยาวคลื่นการตรวจวัด | : | คลื่นอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร |

เตรียมสารละลายตัวอย่าง โดยนำสารสกัดที่ได้จากขั้นตอน 2.4.5 20 มิลลิกรัม ละลายด้วย 50% เมทธานอลในน้ำที่ขจัดไอออนทวีคูณ 4 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตตขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 13 มิลลิลิตร นำไปขจัดฟองอากาศด้วยเครื่องโซนิเคท (sonicator) ฉีดสารละลายเข้าเครื่อง HPLC เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ตามลำดับส่วนละ 5 มิลลิลิตรต่อหลอดทดลองจากนั้นนำแต่ละลำดับส่วนไประเหยสารละลายออกและนำมาวิเคราะห์หาอะซาไดแรคตินด้วย HPLC รวมลำดับส่วนที่มีรีเทนชันไทม์ (retention time) ตรงกับสารมาตรฐานอะซาไดแรคตินไว้ด้วยกัน ชั่งน้ำหนักแห้งของสารที่ได้และคำนวณหาปริมาณอะซาไดแรคตินต่อไป

## 2.6 การวิเคราะห์หาปริมาณอะซาไดแรคตินด้วยเครื่อง HPLC

สภาวะของเครื่องเป็นดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| คอลัมน์ | : | คอลัมน์สำหรับวิเคราะห์ (analytical column) phenomenex ( LC-ODS,STEEL, 150×4.6 มิลลิเมตร ) |
| สารละลายตัวพา | : | 60% เมทธานอลในน้ำที่ขจัดไอออนทวีคูณ |
| สารละลายตัวล้าง | : | 80% เมทธานอลในน้ำที่ขจัดไอออนทวีคูณ |
| อัตราการไหล | : | 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที |
| อุณหภูมิ | : | 26 องศาเซลเซียส |
| ปริมาณที่ใช้วิเคราะห์ | : | 10 ไมโครลิตร |
| ตัวทำละลายสารตัวอย่าง | : | 60% เมทธานอลในน้ำที่ขจัดไอออนทวีคูณ |
| ความยาวคลื่นการตรวจวัด | : | คลื่นอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร |

เตรียมสารละลายมาตรฐานอะซาไดแรคตินให้มีความเข้มข้น 0, 200, 400, 600, 800, 1,000 และ 1,200 ppm. ฉีดสารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นเข้าเครื่อง HPLC นำพื้นที่ใต้พีคจากโครมาโตแกรมที่ได้มาทำกราฟมาตรฐานของสารอะซาไดแรคติน

## 2.7 การเพาะเลี้ยงหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ (*Galleria mellonella* L.)

เก็บหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ที่เข้าทำลายรังของผึ้งในธรรมชาติ จากสถานีวิจัยชีววิทยาของผึ้ง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตำบลบางขันแตก อำเภอเมือง จ. สมุทรสงคราม แล้วทำการเพาะเลี้ยงในห้องทดลอง ที่อุณหภูมิห้อง จนหนอนเจริญเป็นตัวเต็มวัย แยกเอาตัวเต็มวัยของผีเสื้อกินไขผึ้งที่เป็นเพศผู้และเพศเมียจำนวน 10 คู่ มาใส่ในกล่องพลาสติกปากกว้าง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 เซนติเมตรสูง 10 เซนติเมตร ซึ่งบุด้วยกระดาษทิชชูเพื่อให้ผีเสื้อผสมพันธุ์และวางไข่

หลังจาก 3 – 5 วัน ตัวเต็มวัยจะเริ่มวางไข่ ตัดกระดาษทิชชูที่มีไข่ใส่ลงในกล่องที่มีอาหารเทียม ( ภาคผนวก ก ) หลังจากนั้นประมาณ 5 – 6 วัน หนอนจะเริ่มฟักออกจากไข่คอยเติมอาหารเทียมให้เพียงพอต่อจำนวนหนอนในแต่ละกล่อง พอหนอนเข้าสู่ระยะที่ 3 จึงคัดแยกหนอนมาเพื่อทำการทดลองต่อไป ส่วนหนอนที่ไม่ได้ใช้ เลี้ยงต่อไปจนเข้าดักแด้ และทำการเพาะขยายพันธุ์เป็นรุ่นต่อไป ( จักรา,2537 )

## 2.8 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดโดยชีววิธี ( bioassay )

2.8.1 การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันในเวลา 72 ชั่วโมง และหาค่า $LC_{50}$ที่ 72 ชั่วโมง โดยการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลาย, สารสกัดที่ได้จากคอลัมน์โครมาโตกราฟีที่ตรวจพบสารอะซาไดแรคติน และสารที่แยกได้จากรีเวอสเฟสไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิด โครมาโตกราฟี (reversed phase HPLC) กับหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ (*Galleria mellonella* L.)

- นำตัวหนอนระยะ 3 จำนวน 10 ตัวต่อซ้ำใช้ทั้งหมด 10 ซ้ำ งดให้อาหารเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

-นำสารสกัดมาชั่งน้ำหนัก และละลายด้วยเอทธานอล เตรียมสารละลายให้ได้ความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.10, 0.50 และ 1.00 มก.ของสารสกัด/มก.ของอาหารทดสอบ แต่ลดปริมาณสารลงในส่วนที่เป็นสารที่แยกได้จาก reversed phase HPLC เนื่องจากใช้สารที่มีความ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



บริสุทธิ์มากขึ้นชั่งน้ำหนักสารที่แยกได้จาก reversed phase HPLC ละลายด้วยเอทธานอล เตรียมสารละลายให้ได้ความเข้มข้น 0.025, 0.050, 0.075 และ 0.10 มก.ของสารสกัด/มก.ของอาหารทดสอบนำไปทดสอบกับหนอน โดยเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นอาหารที่ไม่ใส่สารใดๆ นับจำนวนหนอนที่ตายแล้วคำนวณหาค่า $LC_{50}$ ภายในเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

2.8.2 การทดสอบหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการกินอาหาร (antifeedant) โดยการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลาย, สารสกัดที่ได้จากคอลัมน์โครมาโตกราฟีที่ตรวจพบสารอะซาไดแรคตินและสารที่แยกได้จากรีเวอสเฟสไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี ( reversed phase HPLC ) กับหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ (*Galleria mellonella* L.)

- นำตัวหนอนระยะ 3 จำนวน 10 ตัวต่อซ้ำใช้ทั้งหมด 10 ซ้ำ งดให้อาหารเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

-นำสารสกัดมาชั่งน้ำหนัก และละลายด้วยเอทธานอล เตรียมสารละลายให้ได้ความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.10, 0.50 และ 1.00 มก.ของสารสกัด/มก.ของอาหารทดสอบ แต่ลดปริมาณสารลงในส่วนที่เป็นสารที่แยกได้จาก reversed phase HPLC เนื่องจากใช้สารที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้นชั่งน้ำหนักสารที่แยกได้จาก reversed phase HPLC ละลายด้วยเอทธานอล เตรียมสารละลายให้ได้ความเข้มข้น 0.025, 0.050, 0.075 และ 0.10 มก.ของสารสกัด/มก.ของอาหารทดสอบนำไปทดสอบกับหนอน โดยเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นอาหารที่ไม่ใส่สารใดๆ ชั่งน้ำหนักอาหารแห้งที่เหลือแล้วคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการกินอาหารภายในเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

2.8.3 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

2.8.3.1 คำนวณเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนที่ถูกต้องจากสูตร Abbott 's formula (Finney,1971) (ภาคผนวก จ)

2.8.3.2 คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการกินอาหารของหนอนจากสูตรของ Bently et al. ( อ้างถึงในพุทธลักษณ์, 2540 ) ( ภาคผนวก จ )

2.8.3.3 คำนวณหาค่า $LC_{50}$ โดยใช้โปรแกรมโปรบิท (Probit analysis) ของ Finney (1971) (ภาคผนวก ฉ)