

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง



อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

ก. สารเคมี

1. ยาฆ่าแมลงที่ใช้ในการทดลอง

1.1 abate

ชื่อทางเคมี 0,0,0,0 - Tetramethyl O, O-thiodi-p-phenylene phosphorothioate

ชื่อสามัญ abate

ชื่อทางการค้า Biothion ^(R)

ชนิดที่ใช้ - Technical grade 90-95 %

ได้รับจากบริษัท ที.เจ.ซี เคมีคอล จำกัด

-Commercial grade 1 % sand granular

ได้รับจากบริษัท ที.เจ.ซี. เคมีคอล จำกัด

1.2 aldrin

ชื่อทางเคมี 1,2,3,4,10,10-Hexachloro-1,4,4a,5,8,8a hexahydro-1,4-c_{endo}-exo-5,8-dimethanonaphthalene

ชื่อสามัญ aldrin

ชื่อทางการค้า Aldrex ^(R) ได้รับจาก บริษัท เซลล์แห่งประเทศไทย จำกัด

ชนิดที่ใช้ - Technical grade 98 %

ได้รับจาก บริษัท เซลล์แห่งประเทศไทย จำกัด

-commercial grade 40 % W.P. (Wetttable Powder)

ได้รับจาก บริษัท เซลล์แห่งประเทศไทย จำกัด

-Analytical standard 99 + %

1.3 chlordane

ชื่อทางเคมี 1,2,4,5,6,7,8,8-Octachloro-2,3,3a,4,7,7a-hexahydro-4,7-methanoindene

ชื่อสามัญ Chlordane

ชื่อทางการค้า - Chlordane[®], Octachlor[®]

ชนิดที่ใช้ - Technical grade 100 % ใ้รับจากบริษัท ที.เจ.ซี. เคมีคอด จำกัด

1.4 DDT

ชื่อทางเคมี 1,1,1-Trichloro-2,2-bis (p-chlorophenyl)ethane

ชื่อสามัญ Dichlorodiphenyltrichloroethane

ชื่อทางการค้า Pesdyne 250[®] ใ้รับจากบริษัท เจียไตสง เสริมเกษตรกรรมจำกัด

ชนิดที่ใช้ - Technical grade 100 % ใ้รับจากบริษัท เซลดแห่งประเทศไทย จำกัด

- Commercial grade 25 %E.C. (Emulsifier Concentration) ใ้รับจากบริษัท เจียไตสง เสริมเกษตรกรรม จำกัด

- Analytical standard 99 + %

1.5 dieldrin

ชื่อทางเคมี 1,2,3,4,10,10-Hexachloro-exo-6,7-epoxy-1,4,4a,5,6,7,8,8a-octahydro-1,4-endo-exo-5,8-dimethano-naphthalene

ชื่อสามัญ dieldrin

ชื่อทางการค้า Dieldrex[®] ใ้รับจากบริษัท เซลดแห่งประเทศไทย จำกัด

ชนิดที่ใช้

- Technical grade 98 % ใ้รับจากบริษัท
เชลล์แห่งประเทศไทย จำกัด

- Commercial grade 50 % W.P. ใ้รับจาก
บริษัทเชลล์แห่งประเทศไทย จำกัด

- Analytical standard 99 + %

1.6 endrin

ชื่อทางเคมี 1,2,3,4,10,10-Hexachloro-6,7-epoxy-1,4,4a,
5,6,7,8,8a-Octahydro-1,4-endo-endo-5,8-
dimethanonaphthalene

ชื่อสามัญ endrin

ชื่อทางการค้า Endrex[®] ใ้รับจากบริษัทเชลล์แห่งประเทศไทยจำกัด

ชนิดที่ใช้

- Technical grade 99.5 % ใ้รับจากบริษัท
เชลล์แห่งประเทศไทย จำกัด

- Commercial grade 20 % E.C. ใ้รับจาก
บริษัทเชลล์แห่งประเทศไทย จำกัด

- Analytical standard 99 + %

1.7 DDE

ชื่อทางเคมี 2,2-bis-(p-chlorophenyl)-1,1-dichloroethylene

ชื่อสามัญ dichlorodiphenyl dichloroethylene

ชื่อทางการค้า -

ชนิดที่ใช้

- Analytical standard 99 + %

1.8 TDE หรือ DDT

ชื่อทางเคมี 1,1-dichloro-2,2-bis-(p-chlorophenyl)ethane

ชื่อสามัญ dichlorodiphenyl dichloroethane

ชื่อทางการค้า Rhothane[®]

ชนิดที่ใช้

- Analytical standard 99 + %

1.9 heptachlor

ชื่อทางเคมี 1,4,5,6,7,8,8-Heptachloro-3a,4,7,7a-tetrahydro-4,7-methanoidane

ชื่อสามัญ heptachlor

ชื่อทางการค้า Alamon^(R)

ชนิดที่ใช้ - Technical grade 73-75 % ได้รับจาก
บริษัท ที.เจ.ซี. เคมีคอล จำกัด
- Commercial grade 40 % W.P. ได้รับจาก
บริษัท ที.เจ.ซี. จำกัด

1.10 lindane

ชื่อทางเคมี γ -BHC 1,2,3,4,5,6-hexachlorocyclohexane

ชื่อสามัญ gamma-BHC

ชื่อทางการค้า Gammalin^(R) Isotox^(R)

ชนิดที่ใช้ - Technical grade 99.9 % ได้รับจาก
บริษัท ที.เจ.ซี. เคมีคอล จำกัด
- Commercial grade 20 % W.P. ได้รับจาก
บริษัท ที.เจ.ซี. เคมีคอล จำกัด

1.11 toxaphene

ชื่อทางเคมี 2,2,5-endo,6-exo,8,9,10-Heptachlorobonane
(a toxic component of toxaphene)

ชื่อสามัญ toxaphene

ชื่อทางการค้า Toxakil^(R) Phenatox^(R)

ชนิดที่ใช้ - Technical grade 90 % ได้รับจากบริษัท
เซลดแห่งประเทศไทย จำกัด

2. สารเคมีอื่นๆ

- Acetone : A.R. grade
- Benzene : Chromatoquality
- Ethyl alcohol : 95 %
- Ethyl acetate : G.C. Grade
- Petroleum ether : A.R grade
- Anhydrous sodium sulfate : A.R grade
- Sea sand : Sand, Standard, Ottawa

๓. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง
เครื่องมือแก้ว

- 1 - Beaker ขนาด 250 และ 600 มล. (มิลลิลิตร)
- 2 - ขวด Specimen ขนาด 10 และ 200 มล.
- 3 - ขวด Reagent ขนาด 125 มล.
- 4 - Cylinders ขนาด 50 และ 100 มล.
- 5 - Volumetric flask ขนาด 10, 25 และ 100 มล.
- 6 - Funnels
- 7 - Pipette ขนาด 0.1, 1 และ 10 มล.

เครื่องมืออื่นๆ

- 1 - อ่างเพาะดูน้ำยุง ขนาด 24 x 29 x 11 ซม. (เซนติเมตร)
- 2 - ถาดรองพลาสติก ขนาด 7.5 x 10 x 5 ซม.
- 3 - กรงเลี้ยงยุง ขนาด 44 x 44 x 65 ซม.
- 4 - กระดาษกรอง Whatman No. I
- 5 - Mortar และ Pestle
- 6 - สวิงชอนดูน้ำ, ฝาขาวบาง และ dropper
- 7 - Petri-dish และ aluminum foil

เครื่องทำความสะอาดและตรวจหาวัตถุพิษ

1. Sweep Co-Distiller (Kontes Glass)
2. Gas-liquid chromatograph (GLC) แบบ Tracor 222
(Tracor Instruments, Austin, Texas)

ค. สัตว์ทดลอง

1. ลูกน้ำยุงลาย, Aedes aegypti (Linnaeus)
 - 1.1 ใ้รับไขยุงจากสำนักงานโครงการวิจัยทางการแพทย์ ส.ป.อ.
กรุงเทพฯ (ซีโอดีป) เมื่อวันที่ 1 ธันวาคม 2518 และไ้เพาะ
พันธ์เพื่อนำลูกน้ำยุงมาทำการทดลองกับยาฆ่าแมลง
 - 1.2 ใ้รับไขยุงจากบางซื่อ กรุงเทพฯ เมื่อวันที่ 1 มิถุนายน
2519 และไ้เพาะพันธ์เพื่อนำลูกน้ำยุงมาทำการทดลองกับยา
ฆ่าแมลง
 - 1.3 ใ้รับไขยุงจาก ค่ายบางสวน อำเภอบางคล้า จังหวัด
ฉะเชิงเทรา เมื่อวันที่ 7 มิถุนายน 2519 และไ้เพาะพันธ์
นำลูกน้ำยุงมาทำการทดลองกับยาฆ่าแมลง
2. ลูกน้ำยุงบ้าน, Culex quinquefasciatus Say
ใ้รับไขยุงจาก สำนักงานโครงการวิจัยทางการแพทย์ ส.ป.อ.
กรุงเทพฯ เมื่อวันที่ 1 ธันวาคม 2518 และไ้เพาะพันธ์
นำลูกน้ำยุงมาทดลองกับยาฆ่าแมลง
3. Golden Hamster, Mesocricetus auratus (Waterhouse)
ใ้รับจากห้องปฏิบัติการ Reproductive physiology แผนกชีว
วิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินการทดลอง

ก. การเลี้ยงยุงลาย, Aedes aegypti และยุงบ้าน, Culex quinquefasciatus
 โถทำการเพาะไขยุงในอ่างเพาะลูกน้ำยุงที่ใส่น้ำประมาณ 56000 ลบ.ซม.
 (ปริมาตร 2 ใน 3 ของอ่าง) ไขยุงลายเป็นฟองเล็กๆ ฝักอยุ่บนกระดาษฟาง เมื่อนำ
 ลงเพาะในอ่างตองกกลีหจมอยู่ใต้น้ำ ไขยุงบ้านปลดอยไหลลอยเป็นแพอยู่บนผิวน้ำ
 ไขยุงลายจะฟักออกเป็นตัว ภายในระยะเวลาต่างๆ กัน หลังจากให้น้ำขดงฟัก ซึ่งขึ้นอยู่กับ
 ระยะเวลาที่เก็บไข่ไว้ ถ้าเก็บไข่ไว้ 1-2 วัน จะใช้เวลาในการฟักออกเป็นตัว 24-48
 ชั่วโมง ถ้าเก็บไว้ 1-2 สัปดาห์ จะฟักออกเป็นตัว ภายใน 1-3 ชั่วโมง แต่ถ้าเก็บไข่
 ไว้นานเกินไป เพอร์เซนต์การฟักออกเป็นตัวจะลดลง ไขยุงบ้านมักจะฟักออกเป็นตัวภายใน
 24 ชั่วโมง หลังจากยุงวางไข่ เมื่อไขยุงฟักออกเป็นตัวแล้วให้อาหาร อย่างน้อย
 วันละ 2 ครั้ง โดยใช้เศษอาหารหนู^{1/} โรยให้ครั้งละน้อยๆ เพราะถ้าโรยให้มากเกินไป
 จะทำให้น้ำในอ่างเป็นเมือก ทำให้ลูกน้ำตาย ฉะนั้นในขณะที่เลี้ยงลูกน้ำ ถ้าพบว่า
 น้ำเป็นเมือก จะต้องเปลี่ยนน้ำใหม่ทันที

การเจริญเติบโตของลูกน้ำยุง แบ่งเป็น 4 ระยะการลอกคราบ (instar)
 หลังจากลอกคราบครั้งที่ 4 แล้ว ลูกน้ำยุงจะเป็นคักแค้ หรือที่เรียกว่า "ไอ้โม่ง" (pupa)
 ซึ่งจะมีอายุราว 2-3 วัน ก็จะลอกคราบกลายเป็นตัวเต็มวัย ระยะเวลาตั้งแต่ออกจาก
 ไขจนเป็นตัวเต็มวัย ยุงลาย 8-12 วัน ยุงบ้าน 10-14 วัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาพสิ่งแวดล้อม
 เช่น อาหารและอุณหภูมิ ในระยะที่ลูกน้ำยุงเป็น pupa ย้ายใส่กล่องพลาสติก นำไปตั้ง
 ให้เป็นตัวเต็มวัยในกรงเลี้ยงยุง เมื่อเป็นตัวเต็มวัยแล้วเลี้ยงควยน้ำตาลวาน (sucrose 5%)

1/ ของบริษัท F.E. Zuellig ประกอบด้วย

Crude protein 24%, Ash 7%, Fat 3%, Moisture 12.5%, Vitamin A, D₃,
 E, K, B₁₂, Niacin, Riboflavin, Folic acid, Pantothenic acid,
 Pyridoxin, Thiamine Aureomycin, Chlorine, Antioxidant
 Microminerals (Zn, Co, Mn, I, Cu, Fe, etc) other antibiotics

โดยใส่ใน petri-dish หรือฝากล่องพลาสติกตั้งไว้ใน กรงเลี้ยงยุง และต้อง เปลี่ยน
 ทุกๆ 2 วัน เพราะน้ำหวานจะบูด หลังจากเป็นตัวเต็มวัย 2-3 วัน ยุงจะเริ่มผสมพันธุ์
 และต้องการ เลือดซึ่งจำเป็นในการวางไข่ที่สมบูรณ์ การให้ยุงกินเลือด ทำโดยนำ
 Hamster มาให้ยุงกัดเลือดในวันที่ 4-5 หลังจากเป็นตัวเต็มวัย Hamster นี้ถูกตัดขน
 บางส่วนออก และใส่กรงขนาดพอดีตัว เพื่อให้ยุงกัดเลือดได้ง่าย ยุงลายกินเลือดเวลา
 กลางวัน ยุงบ้านกินเลือดเวลากลางคืน เมื่อยุงกินเลือดอิ่มแล้ว นำ Hamster
 ออก แลวนำ beaker ขนาด 600 มล. ใส่ยาประมาณ 125 มล. (1 ใน 4 ของ
 beaker) พันคานในควยกระดาษฟางสำหรับให้ยุงลายวางไข่ ส่วนยุงบ้านใส่กล่องพลาสติก
 ใส่น้ำ 250 มล. (2 ใน 3 ของกล่อง) ตั้งไว้ในที่แห้งๆ เก็บไข่ยุงลายหลังจาก
 ยุงวางไข่แล้ว 2-3 วัน ไข่สามารถเก็บไว้ในที่แห้งๆ ส่วนไข่ยุงบ้านเมื่อยุงวางไข่แล้ว
 ต้อง เก็บออกและปล่อยให้ฟักเป็นตัวเลย เพราะเก็บไว้นานไม่ได้ เนื่องจากไข่จะผอมหมัก

ข. ชนิดลูกน้ำยุง และยาฆ่าแมลงที่ใช้ทดสอบ

1. ลูกน้ำยุงลาย, Aedes aegypti

1.1 - ยาฆ่าแมลงที่ใช้ทดสอบความเป็นพิษกับลูกน้ำยุงลายจากซีไอแอลป์

มี 9 ชนิด คือ abate, aldrin, dieldrin, DDT, endrin,
 lindane, heptachlor, toxaphene, chlordane

ใช้ทั้งชนิด technical grade และ commercial grade

เฉพาะ chlordane และ toxaphene ใช้ชนิด technical
 grade

- ยาฆ่าแมลงที่ใช้ศึกษาพิษตกค้างในลูกน้ำยุงลายจากซีไอแอลป์มี 4 ชนิด

คือ aldrin, dieldrin, DDT และ endrin ชนิด

technical grade

1.2 - ยาฆ่าแมลงที่ใช้ทดสอบความเป็นพิษกับลูกน้ำยุงลายจากบางที่มี

5 ชนิด คือ abate, aldrin, dieldrin, DDT และ endrin

เฉพาะชนิด commercial grade

1.3 - ยำขำแผลงที่โงทคดองควำมเป็นพิษกับลูกนำยงดำนจกฉะเซ็งเทรำ
มี 5 ชนิดคือ abate, aldrin, dieldrin, DDT และ
endrin เฉพะชนิด commercial grade

2. ลูกนำยงบำน, Culex quinquefasciatus

2.1 - ยำขำแผลงที่โงทคดองควำมเป็นพิษกับลูกนำยงบำนจกซีโตเดี่ยว
มี 5 ชนิด คือ abate, aldrin, dieldrin, DDT และ
endrin เฉพะชนิด commercial grade

ค. การทคดองควำมเป็นพิษของยำขำแผลง

1. การเตรียม stock solution ของยำขำแผลง

1.1 เตรียม stock solution ของยำขำแผลงทุกชนิดใน 95 %
ethyl alcohol ให้มีความเข้มข้น 1,000 ppm ยกเว้น
DDT เตรียมให้มีความเข้มข้น 10,000 ppm เพื่อป้องกันไม่ให้
เปอร์เซ็นต์ alcohol สูงเกินไปเมื่อใช้เตรียมยำขำแผลงใน
การทคดองเก็บ stock solution ใส่ขวด reagent ไว้ที่
อุณหภูมิ 4-6 °C

วิธีเตรียมยำขำแผลงที่เป็นชนิด W.P. ชั่งมำ 1 กรัม เติม 95 % ethyl
alcohol 100 มล. จะได้ยำขำแผลงที่มีความเข้มข้น 10,000 ppm

ถ้ำชั่งมำ 0.1 กรัม เติม 95 % ethyl alcohol 100 มล. จะได้ยำขำ
แผลง มีความเข้มข้น 1,000 ppm

ยำขำแผลงที่เป็นชนิด E.C. เช่น abate 90 % E.C. นำยำขำแผลงมำ
1 มล. เติม 95 % ethyl alcohol ให้ครบ 90 มล. จะได้ยำขำแผลงมีความเข้ม
ชน 1 % หรือ 10,000 ppm

ถ้ำนำยำขำแผลงมำ 0.1 มล. เติม 95 % ethyl alcohol ให้ครบ 90
มล. จะได้ยำขำแผลงเข้มข้น 0.1 % หรือ 1,000 ppm

2. การทดลองหาช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมหรือความเข้มข้นที่ทำให้ลูกน้ำยุงตายจากน้อยไปหามาก ตามลำดับ

วิธีทดลอง - เตรียมยาฆ่าแมลงใหม่ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, และ 10 ppm ในน้ำประปาที่คั่งทิ้งไว้อย่างน้อย 2 วัน ใส่ยาฆ่าแมลงที่เตรียมลงในขวดแก้วขนาด 200 มล. ขวดละ 50 มล. ความเข้มข้นละ 2 ขวด ใส่ลูกน้ำระยะสุดท้ายของ instar ที่ 3 อายุ 5-6 วัน ลงไปขวดละ 25 ตัว จกเวลา และอุณหภูมิห้อง เมื่อครบ 24 ชั่วโมง นับจำนวนลูกน้ำที่ตายพิจารณาว่า ช่วงความเข้มข้นใดทำให้ลูกน้ำยุงตาย ตั้งแต่ร้อยละจนถึงมากที่สุด นำช่วงความเข้มข้นนี้มาแบ่งย่อยลงอีก เช่นลูกน้ำยุงตายในช่วง 0.1 ถึง 1 ppm แบ่งย่อยเป็น 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 และ 1 ppm ตามความเหมาะสม เตรียมยาฆ่าแมลงใหม่ที่มีความเข้มข้นตามที่แบ่งแล้ว ทดลองตามวิธีเดิม ทำดังนี้ไปเรื่อยๆ จนได้ช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสม ทำการทดลองอย่างน้อย 5 ระดับความเข้มข้น

3. การทดลองหาความเป็นพิษของยาฆ่าแมลงตามความเข้มข้นที่ทำได้

วิธีทดลอง - เตรียมยาฆ่าแมลงใหม่ที่มีความเข้มข้นตามช่วงที่ทำได้ ในข้อ 2 แล้วดำเนินการทดลองวิธีเกี่ยวกับการทดลองหาช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยไม่ต้องเปลี่ยนระดับความเข้มข้นอีก ทำการทดลองความเข้มข้นละ 10 ข้ำ โดยแบ่งท้าวั้นละ 2-4 ข้ำ ทุกข้ำ จะต้องมี control โดยใช้ 95 % ethyl alcohol เติมนลงในน้ำใหม่ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ ethyl alcohol ที่ใช้ละลายยาฆ่าแมลง ซึ่งมีปนอยู่ในขวดทดลองที่มีความเข้มข้นสูงสุดในแต่ละข้ำ เมื่อครบ 24 ชั่วโมง นับจำนวนลูกน้ำยุงที่ตาย แล้วคิดเปอร์เซ็นต์ลูกน้ำที่ตาย โดยใช้ Abbot's formula หลังจากได้เปอร์เซ็นต์ลูกน้ำที่ตายแล้ว เขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นของยาฆ่าแมลงกับ เปอร์เซ็นต์ลูกน้ำที่ตายในกระดาษกราฟ

โดยใช้ Probit-log scale อ่านค่า LC_{50} และ LC_{90} จาก
กราฟที่ได้

- ง. การศึกษาพิษตกค้างของยาฆ่าแมลง
1. เตรียมยาฆ่าแมลงมาตรฐาน (analytical standard insecticide)
ที่มีความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม / 5 ไมโครลิตร หรือ 0.5 มิลลิกรัม /
5 มิลลิลิตร

วิธีเตรียม - ทยายาฆ่าแมลงมาตรฐานมา 10 มิลลิกรัม ละลาย
ใน hexane 100 มล. จะได้อาฆ่าแมลงมาตรฐานที่มีความเข้มข้น
0.5 ไมโครกรัม / 5 ไมโครลิตร หรือ 0.5 มิลลิกรัม / 5 มิลลิลิตร
ตามต้องการ

2. เตรียมยาฆ่าแมลงมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0.05 ไมโครกรัม / 25 ไมโคร
ลิตร หรือ 0.05 มิลลิกรัม / 25 มิลลิลิตร

วิธีเตรียม นำยาฆ่าแมลงมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0.5 ไมโคร
กรัม / 5 ไมโครลิตร มา 0.5 มล. เติม hexane ให้ครบ 25 มล.
จะได้อาฆ่าแมลงมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0.05 ไมโครกรัม / 25 ไมโคร
ลิตร หรือ 0.05 มิลลิกรัม / 25 มิลลิลิตร ตามต้องการ

3. เตรียมยาฆ่าแมลงมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.2, 0.3,
0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.2, 1.4 และ 1.6
นาโนกรัม / 5 ไมโครลิตร

4. การสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve)

วิธีการ ตรวจจับยาฆ่าแมลงมาตรฐานที่เตรียมในข้อ 3 ด้วยเครื่อง
GLC ความเข้มข้นละ 5 ไมโครลิตร วัดความสูงของ peak เป็น
เซนติเมตร (ซม.) เขียนกราฟโดยให้ความเข้มข้นเป็นนาโนกรัม กับ
ความสูงของ peak ซม. ในกระดาษกราฟชนิดธรรมดา ลากเส้น
ตรงผ่านจุดที่ตัดกันเพื่อหา linear range ของ standard curve
สำหรับยาฆ่าแมลงแต่ละชนิด เพื่อนำไปใช้ในการเปรียบเทียบหาปริมาณ

ยุงลายที่สกัดได้จากกรวดของ หาดพิชิตกลาง

5. การเตรียมลูกน้ำยุงสำหรับศึกษาพิชิตกลาง

- ใส่น้ำยุงลาย, *Aedes aegypti* ระยะสุดท้ายของ instar ที่ 3 จำนวน 100 ตัว ต่อหนึ่งช้ำ ใส่น้ำยุงลงใน beaker ขนาด 600 มล. ซึ่งมีน้ำที่ความเข้มข้นของยุงลาย 200 มล. ให้อาหารตามปกติ ทำการทดลอง 3-4 ช้ำ และ control 2 ช้ำ หลังจากใส่ลูกน้ำยุงในยุงลายแต่ละความเข้มข้นแล้ว เมื่อครบ 24 ชั่วโมง เทลูกน้ำยุงลงในสวิงชอนลูกน้ำแล้วล้างด้วยน้ำสะอาด (น้ำกลั่น หรือน้ำประปาที่คั่งทิ้งไว้อย่างน้อย 2 วัน) 4-5 ครั้ง เพื่อชะยุงลายที่ติดอยู่ภายนอกตัวลูกน้ำให้หลุดออก หลังจากล้างเรียบร้อยแล้ว นำสวิงชอนลูกน้ำวางบนกระดาษชำระ (tissue) เพื่อซับน้ำที่ติดอยู่ที่เท้า แล้วจึงถายลูกน้ำใส่ aluminum foil ห่อเก็บไว้ในตู้เย็น หรือนำไปสกัดหาพิชิตกลางทันที

6. การสกัดหาพิชิตกลางของยุงลาย

- นำลูกน้ำยุงที่ได้จากข้อ 5 มาสกัดโดยผ่านชั้นคอนตามลำดับชั้นดังต่อไปนี้

ลูกน้ำยุง 100 ตัว

↓ Sea sand 3 กรัม + anhydrous sodium sulfate 3 กรัม

บดในกรรไกรละเอียดและให้แห้ง หากไม่แห้งก็เติม sodium

↓ sulfate อีกเล็กน้อย เทใส่ beaker ขนาด 250 มล.

↓ ใส่ petroleum ether 50 มล. เพื่อสกัดยุงลาย

↓ อุณหภูมิ 30 °C แล้วคนด้วยแท่งแก้วสักรู

↓ เติมน้ำมันกรองลงใน beaker ขนาด 250 มล.

↓ สกัดซ้ำด้วย petroleum ether อีก 2 ครั้ง ครั้งละ 50

↓ มล. ครั้งสุดท้าย เทตะกอนลงในกระดาษกรอง แล้วล้าง

↓ beaker ด้วย 20 มล. petroleum ether อีกครั้งหนึ่ง

รวม filtrate เขาคายกัน
 ↓ ตั้งทิ้งไว้ให้ระเหยในตู้ระบายความร้อน
 2 มล.
 ↓ ทำความสะอาดด้วยเครื่อง Sweep Co-Distiller
 และปรับปริมาตร
 5 มล.
 ↓ วิเคราะห์ด้วยเครื่อง GLC โดยฉีดครั้งละ 5 ไมโครลิตร
 peaks
 ↓ หาปริมาณยาฆ่าแมลงโดยเปรียบเทียบความสูงของ peak
 กับกราฟมาตรฐานของยาฆ่าแมลงชนิดเดียวกัน ซึ่งได้จาก
 การฉีดยาฆ่าแมลงมาตรฐานในเวลาใกล้เคียงกัน
 ปริมาณยาฆ่าแมลงที่สะสมในคอนำยง
 ↓ คิคเปอร์ เช้นต์จากยาฆ่าแมลงที่ใส่ลงไปทั้งหมด
 เปอร์ เช้นต์ยาฆ่าแมลงที่สกัดได้

7. การทำความสะอาดตัวอย่างด้วยเครื่อง Sweep Co-Distiller
 (Storherr and Watt, 1965)

Condition ของ เครื่อง

- sample tube : Kontes, K-898650 เส้นผ่าศูนย์กลาง
 ภายนอก $\frac{1}{2}$ " type 21, packed with glass wool,
 glass bead and sand
- adsorption column : Kontes, K - 500850
 type 21, packed with Anakrom^(R)
 type 22, packed with Florisil^(R)
- oven temperature 175 °C
- nitrogen flow rate 500 ml/min

วิธีการปฏิบัติ

เมื่อ condition เครื่องไคทีแล้ว ใช้ syringe Lux Rose[®] ขนาด 5 มล. และเข็มเบอร์ BD25 ฉีด petroleum ether 2-3 มล. ผ่าน sample tube ก่อนเพื่อไล่อสิ่งเจือปนใน column แล้วฉีดตัวอย่างที่สกัดได้ทั้งหมด (2 มล.) ตามเขาไปที่ทันที ต่อจากนั้นฉีด petroleum ether เขาไป 2 มล. ทุกๆ 1 นาที ฉีดต่อกันไปเรื่อยๆ จนครบ 30 นาที solvent ที่ฉีดเขาไปจะระเหยเป็นไอพร้อมกับพาอากาศไปด้วย และจะผ่านไปในห้องซึ่งแช่อยู่ในน้ำแข็งได้ solvent จะควบแน่น (กลั่นตัว) เป็นของเหลว และไหลผ่านลงไปยังหลอดทำความสะอาดเพิ่มเติมคือ Anakrom[®] และ Florisil[®] column ก่อนที่จะไหลลงสู่หลอดเก็บ ปริมาตรของตัวอย่างในหลอดเก็บจะมีอยู่ประมาณ 2-4 มล. ปรับปริมาตรให้เป็น 5 มล. โดยการฉีด petroleum ether ผ่านเขาไปโดยวิธีเดียวกัน เมื่อปริมาตรได้ 5 มล. แล้วเก็บใส่ขวดขนาด 10 มล. ปิดด้วย aluminium foil ก่อนแล้วปิดทับด้วยฝาขวด นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GLC ทันทีหรือเก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

8. การวิเคราะห์ตัวอย่างที่ทำความสะอาดด้วยเครื่อง Gas-liquid chromatograph

Condition ของเครื่อง

- เครื่องเป็นแบบ Tracer 222
- detector : electron capture Ni⁶³
- detector temperature : 275 °C
- column packing : 1.5 % SP 2250 + SP 2401 on 100/120 mesh Supelcon AW, DMCS
- column temperature : 200 °C
- injection temperature : 225 °C
- nitrogen flow rate : 100 ml./min. purge : 20 ml/min.

- attenuation : 4 or 8 x 10²

- chart speed : 30"/hr.

วิธีฉีดตัวอย่างเข้าเครื่อง

เมื่อ condition เครื่องใดทีแล้ว ใช้ microsyringe ขนาด 10 μ l ฉีดตัวอย่างหรือยาฆ่าแมลงมาตรฐาน ครั้งละ 5 ไมโครลิตร เข้าเครื่องโดยให้ความเข้มข้นอยู่ใน linear range ของ standard curve ของยาฆ่าแมลงแต่ละชนิด ให้ความเข้มข้นของตัวอย่างสูงเกินไป ต้องทำให้เจือจาง (dilute) ด้วย petroleum ether ถ้าตัวอย่างเจือจางมากต้องระเหยให้เหลือ $\frac{1}{2}$ หรือ 1 มล. เพื่อช่วยให้เครื่องสามารถตรวจหาได้

การที่จะศึกษาว่า ตัวอย่างมียาฆ่าแมลงชนิดใดอยู่บ้าง ทำโดยการเปรียบเทียบ retention time ของยาฆ่าแมลงในตัวอย่างกับยาฆ่าแมลงมาตรฐาน ซึ่งเปรียบเทียบโดยการฉีดเข้าเครื่องในเวลาใดเรียกกัน

วิธีหาปริมาณยาฆ่าแมลงทำได้โดย การเปรียบเทียบความสูงของ peak ในตัวอย่างกับ linear range ของ standard curve ของยาฆ่าแมลงมาตรฐาน อ่านปริมาณยาฆ่าแมลงจากกราฟ

9. การศึกษาเปอร์เซ็นต์ recovery ของ aldrin

ทำการทดลองตามวิธีสกัดหาพิษตกค้างของยาฆ่าแมลงในข้อ ง. 6 ใช้ลูกน้ำยุงที่ไม่โดนทดลองยาฆ่าแมลง แล้วหยดยาฆ่าแมลง aldrin ลงไป 0.5 ไมโครกรัม/2 มล. ในขณะที่บดเท่านั้น ส่วนวิธีอื่นเหมือนกันทุกอย่าง

ผลการศึกษาเปอร์เซ็นต์ recovery ปรากฏว่าได้ 88.60 เปอร์เซ็นต์

จ. สูตรการคำนวณที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

1. การหาค่าเฉลี่ยทางคณิตศาสตร์ (Mean หรือ \bar{X}) ใช้สูตร

$$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n}$$

2. การหาค่า standard deviation (S.D) ใตสูตร

$$S.D = \sqrt{\frac{(\sum X_i)^2 - \sum X_i^2}{n - 1}}$$

3. การเปรียบเทียบความเป็นพิษของยาฆ่าแมลงใช้ Chi-square (λ^2)

สูตรตารางสำเร็จ แบบ 2 x 2

	A	B	รวม
x	a	b	a + b
y	c	d	c + d
	a + c	b + d	N

$$\lambda^2 = \frac{(|ad - bc| - \frac{1}{2}N)^2 N}{(a+b)(a+c)(b+d)(c+d)} \dots (\text{คาน, 2519})$$

ความหมายของอักษรย่อในสูตร

\bar{X}	=	ค่าเฉลี่ย
X_i	=	ข้อมูลของยาแต่ละตัว
X	=	ยาฆ่าแมลงชนิดที่ 1
y	=	ยาฆ่าแมลงชนิดที่ 2
a, c	=	จำนวนลูกน้ำยุงที่ตาย
b, d	=	จำนวนลูกน้ำยุงที่ไม่ตาย
n	=	จำนวนกลุ่มตัวอย่าง
N	=	ผลรวมของข้อมูลทั้งหมด
A	=	ลูกน้ำยุงที่ตาย
B	=	ลูกน้ำยุงที่ไม่ตาย

4. การวินิจฉัยความเป็นพิษ Abbott's formula : (Anonymous, 1970)

$$\% \text{ mortality} = \frac{\% \text{ test mortality} - \% \text{ control mortality}}{100 - \% \text{ control mortality}} \times 100$$

จะใช้สูตรนี้ต่อเมื่อ control mortality อยู่ระหว่าง 5-20 % ถ้าค่า
 กว่ 5 % ไม่ตองนำมาคิด ถ้าสูงกว่า 20 % ตองทำการทดลองใหม่