บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 ชีววัตถุ วัสดุและอุปกรณ์

2.1.1 ชีววัตถุ (Biological materials)

2.1.1.1 ขึ้นฉ่าย (*Apium graveolens*) เมล็ดขึ้นฉ่ายซื้อมาจากร้านอี.เอ.อาร์ สมุนไพร อ. เมือง จ. เชียงใหม่ โดยแบ่งส่วนหนึ่งเก็บไว้เป็นตัวอย่างอ้างอิง (PARA-AP-001) ในคลังสมุนไพรของภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2.1.1.2 ยุงลาย *Aedes aegypti* เป็นยุงสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการ (Chiang Mai, Laboratory strain) ที่เก็บระยะลูกน้ำจากแหล่งน้ำขังภายในอำเภอเมือง จ. เชียงใหม่ และนำมาเลี้ยงไว้ในห้องเลี้ยงยุง ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2540

2.1.1.3 อาสาสมัคร อาสาสมัครที่ร่วมทำการทดสอบในงานวิจัยมีทั้งหมด 6 คน เป็นชาย 3 คน และหญิง 3 คน มีอายุอยู่ในช่วง 16-50 ปี น้ำหนัก 43-65 กก. เป็นผู้ที่มีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรง และยินยอมเข้าร่วมการวิจัยโดยสมัครใจ โดยได้ลงนามในหนังสือแสดงความยินยอมการเข้าร่วมโครงการวิจัยเรียบร้อยแล้ว

2.1.2 วัสดุและอุปกรณ์

2.1.2.1 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงยุง

- อาหารสุนัขชนิดเม็ดบดหยาบ
- น้ำหวาน (10% w/v Sucrose)
- วิตามิน (10% v/v Multivitamin syrup)
- ถาดพลาสติกสำหรับเลี้ยงลูกน้ำยุงขนาด 20 x 30 x 5 cm^3
- กรงเลี้ยงยุง (Mosquito cage) ขนาด 30 x 30 x 30 cm^3
- หลอดยางดูดลูกน้ำยุง
- ถ้วยพลาสติกสำหรับใส่ตัวโม่ง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 14 cm ลึก 7 cm
- ไม้พันสำลีขนาด 2 x 100 mm
- กระดาษกรอง
- กระชอนสำหรับตักลูกน้ำยุง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1.2.2 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดและทดสอบฤทธิ์ไล่ยุงของขึ้นฉ่าย

2.1.2.2.1 สารเคมี

- 95% Ethanol
- Absolute ethanol
- Methanol
- Hexane
- Hydrochloric acid
- Dichloromethane
- Tween 80

2.1.2.2.2 วัสดุและอุปกรณ์

- ครกบดสมุนไพร (Mortar)
- กระดาษกรอง Whatmann no. 1
- กระดาษทดสอบความเป็นกรด-ด่าง (pH-indicator paper pH 0-14)
- กรวยกรอง (Buchner funnel)
- กล่องทดสอบยุง (4 x 18 x 5 cm^3)
- เครื่องมือจับยุง (Sucking tube)
- เครื่องชั่งสาร (Analytical balance)
- เครื่องเขย่าสาร (Vortex)
- เครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator)
- เครื่องควบคุมระบบน้ำหล่อเย็น (Cooling ace)
- เครื่องดูดให้สูญญากาศโดยใช้น้ำ (Aspirator)
- ตู้แช่แข็ง (Freezer) อุณหภูมิ –20 $^{\circ}C$

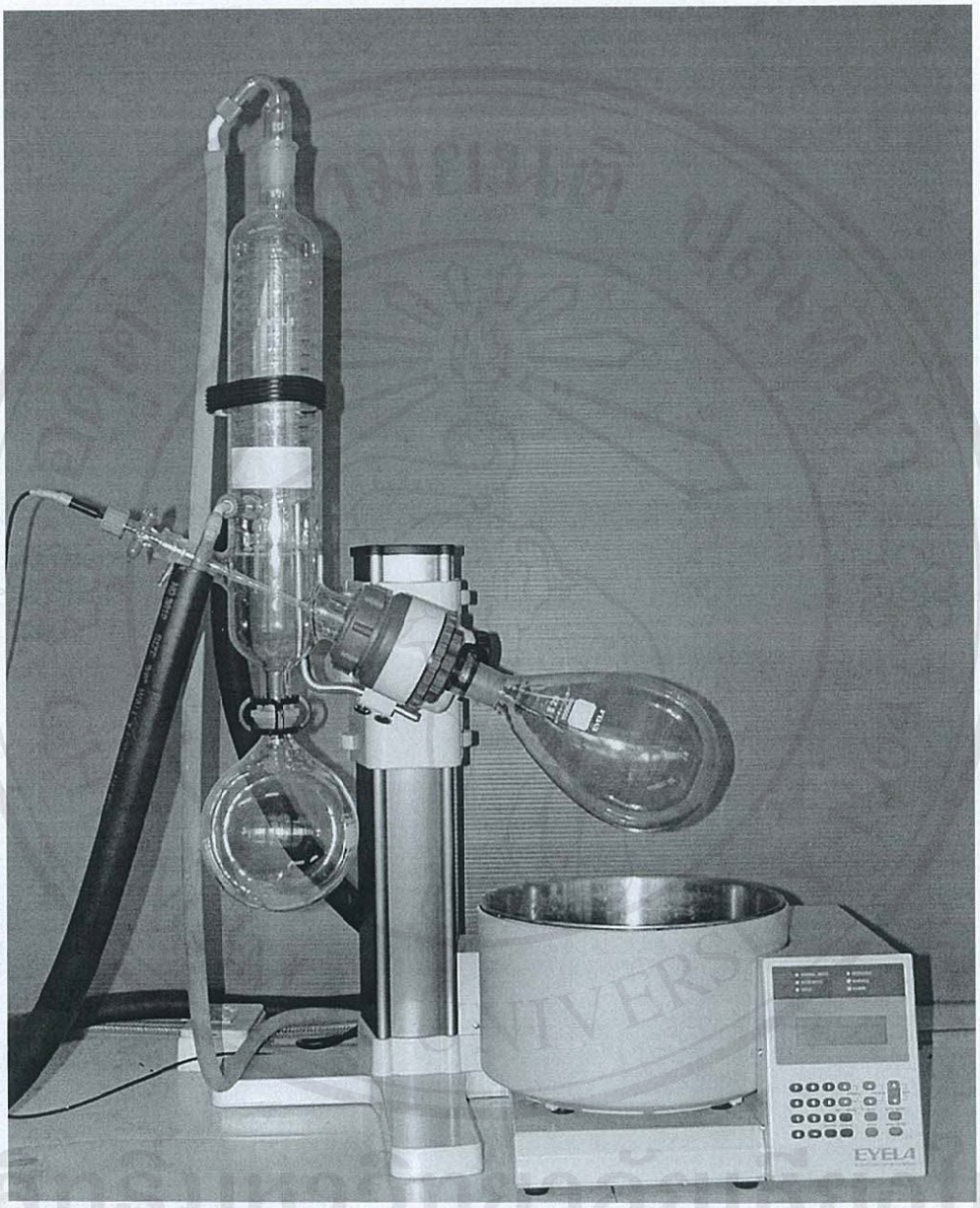
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 วิธีการวิจัย

2.2.1 การเตรียมส่วนสกัดจากเมล็ดขึ้นฉ่าย

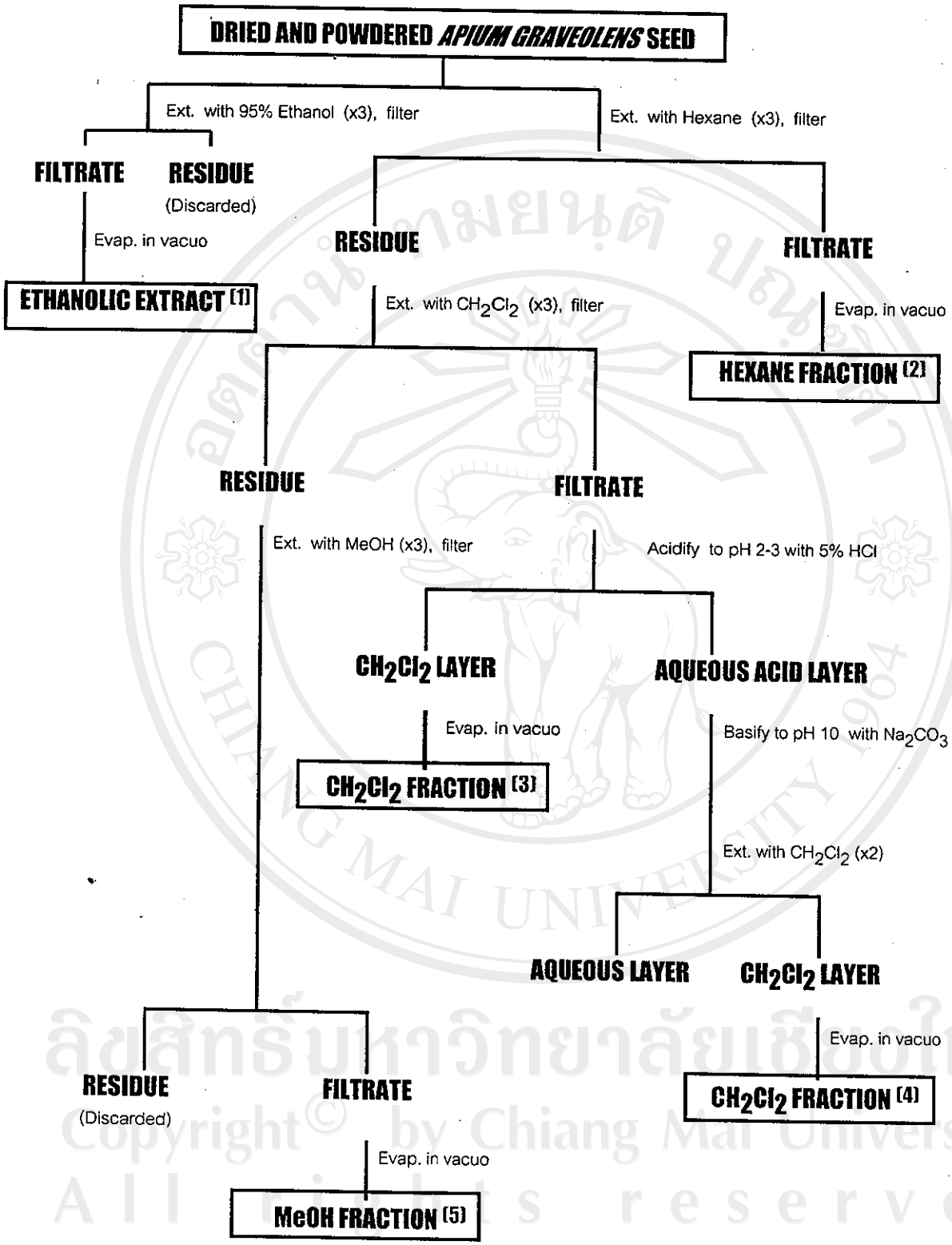
ทำการบดหรือตำเมล็ดขึ้นฉ่ายให้เป็นผงละเอียด จากนั้นนำมาสกัดด้วยวิธี Maceration โดยแบ่งผงแห้งของเมล็ดขึ้นฉ่ายออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนที่ 1 นำไปหมักด้วยเอทธานอล 95% และส่วนที่ 2 นำไปหมักด้วยเฮกเซน ในอัตราส่วน 1:1.5 (kg/l) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-7 วัน หมั่นเขย่าหรือคนบ่อย ๆ เมื่อครบกำหนดนำสารละลายที่ได้จากส่วนที่ 1 มากรองด้วยระบบสูญญากาศผ่านกรวยกรอง (Buchner funnel) ที่รองด้วยกระดาษกรอง Whatmann No.1 จากนั้นนำส่วนกากเมล็ดขึ้นฉ่ายไปหมักต่อด้วยเอทธานอล 95% และทำการกรองในลักษณะเดียวกันดังข้างต้นอีก 2 ครั้ง แล้วนำสารละลายเอทธานอลที่กรองได้ทั้งหมดมารวมกัน นำไประเหยเอาตัวทำละลายออกที่อุณหภูมิประมาณ 60°C ด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศ (Rotary evaporator) (รูป 3) จะได้ส่วนสกัดหยาบเอทธานอลของขึ้นฉ่าย (Ethanolic extract: E_1) ส่วนกากเมล็ดขึ้นฉ่ายที่เหลือจากการหมักด้วยเอทธานอล 95% จะทิ้งไป สำหรับสารละลายที่กรองได้จากส่วนที่ 2 จะนำไประเหยเอาตัวทำละลายออกที่อุณหภูมิประมาณ 40°C ด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศจนได้เป็นส่วนสกัดเฮกเซน (F_1) ส่วนกากเมล็ดขึ้นฉ่ายที่เหลือนำไปสกัดและหมักต่อด้วยไดคลอโรมีเธน (CH_2Cl_2) ในลักษณะเดียวกันกับการหมักด้วยเฮกเซน จากนั้นนำสารละลายไดคลอโรมีเธนที่กรองได้มาปรับค่า pH ให้เป็นกรดโดยเติม 5 % HCl ลงไปเรื่อย ๆ จนมี pH 2-3 ทำให้สารที่ได้แยกออกเป็นสองชั้น ทำการแยกสารทั้งสองด้วยกรวยแยกสาร (Separating funnel) โดยแยกเอาส่วนชั้นล่างที่เป็นสารละลายไดคลอโรมีเธนไประเหยเอาตัวทำละลายออกที่อุณหภูมิประมาณ 40°C ด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศ จะได้ส่วนสกัดไดคลอโรมีเธน 1 (F_2) สำหรับของเหลวที่อยู่ชั้นบนนำไปปรับค่า pH ให้เป็นด่าง ที่อุณหภูมิ 0°C โดยเติม Na_2CO_3 ลงไปเรื่อย ๆ จนมี pH 10-12 จากนั้นนำไปสกัดด้วยไดคลอโรมีเธนอีกครั้งหนึ่ง แล้วแยกเอาเฉพาะส่วนของสารละลายไดคลอโรมีเธนไประเหยเอาตัวทำละลายออกที่อุณหภูมิประมาณ 40°C ด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศ จะได้ส่วนสกัดไดคลอโรมีเธน 2 (F_3) สำหรับกากเมล็ดขึ้นฉ่ายที่เหลือจะทำการสกัดและหมักต่อด้วยเมทธานอลในลักษณะเดิม แล้วแยกเอาสารละลายเมธานอลที่กรองได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกที่อุณหภูมิประมาณ 45-60°C ด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศ จะได้ส่วนสกัดเมธานอล (F_4) ส่วนกากของเมล็ดขึ้นฉ่ายที่เหลือจะทิ้งไป นำส่วนสกัดที่ได้ทั้ง 5 ชนิด (E_1, F_1, F_2, F_3 และ F_4) ไปกำจัดน้ำออกโดยวิธี Lyophilization ด้วยเครื่อง Lyophilizer จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนักและคำนวณหา Percentage yield ของสารสกัดแต่ละชนิด เก็บสารสกัดในขวดสีชา ปิดฝาให้สนิทและเก็บไว้ที่ -20°C เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ไล่ยุงต่อไป สำหรับขั้นตอนการสกัดเมล็ดขึ้นฉ่ายโดยใช้ตัวทำละลายดังกล่าว ได้แสดงไว้ในรูป 4

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป 3 เครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป 4 แผนภาพแสดงขั้นตอนการสกัดเมล็ดขึ้นฉ่ายโดยใช้ตัวทำละลายต่าง ๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.2 การเพาะเลี้ยงยุงลาย *Aedes aegypti*

การเพาะเลี้ยงยุงลายปฏิบัติตามวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีมาตรฐานของ Limsuwan *et al.* (1978) โดยนำไข่ยุงลาย *Ae. aegypti* สายพันธุ์ห้องปฏิบัติการมาฟักเป็นตัวอ่อนในถาดเลี้ยงยุงขนาด 20 x 30 x 5 cm^3 ซึ่งมีน้ำอยู่ประมาณ 2,000 ml โดยเลี้ยงลูกน้ำยุงลายระยะที่ 1 (L_1) ประมาณ 200 ตัวต่อถาด ในวันแรก ๆ ของการเลี้ยงจะให้อาหารสุนัขชนิดเม็ดบดหยาบประมาณ 3 กรัมต่อลูกน้ำ 1 ถาด โดยให้วันละ 1 ครั้ง และให้ในปริมาณมากขึ้นเมื่อไข่ฟักเป็นตัวอ่อนแล้ว ทำการเปลี่ยนน้ำใหม่ทุก ๆ 2 วัน ในตอนเช้าจะใช้แถบกระดาษกว้างประมาณ 2 นิ้วปาดแผ่นไขมันที่จับตัวเป็นแผ่นฟิล์มบนผิวน้ำทิ้งไป เพื่อให้ลูกน้ำได้มีอากาศหายใจ ประมาณ 5-10 วัน ลูกน้ำจะเจริญเข้าสู่ระยะที่ 4 (L_4) และเจริญไปเป็นตัวโม่ง จากนั้นใช้หลอดดูด (Dropper pipette) ดูดตัวโม่งใส่ในถ้วยพลาสติกที่มีน้ำกลั่นอยู่พอประมาณแล้วนำไปใส่ในกรงเลี้ยงยุงขนาด 30 x 30 x 30 cm^3 กรงละประมาณ 400-500 ตัว ใช้เวลาประมาณ 2-3 วัน ตัวโม่งจะเจริญไปเป็นยุงตัวเต็มวัย เลี้ยงตัวเต็มวัยด้วยน้ำหวาน (10% w/v Sucrose) และวิตามิน (10% v/v Multivitamin syrup) โดยใส่ในขวดที่มีไม้พันสำลีเสียบอยู่สำหรับให้ยุงดูดกิน เปลี่ยนน้ำหวานและวิตามินทุก ๆ 2 วัน ภายในห้องที่ใช้เลี้ยงยุงตัวเต็มวัยจะถูกควบคุมให้มีอุณหภูมิที่ 27 ± 2°C ความชื้นสัมพัทธ์ 70-80% เมื่อยุงตัวเต็มวัยมีอายุประมาณ 5 วัน ให้อดอาหาร (Fasting) ประมาณ 12-18 ชั่วโมง แล้วให้ยุงกินเลือดหนูขาวโดยใส่หนูในกรงขนาดพอดีตัวและนำมาไว้ในกรงเลี้ยงยุง ทิ้งไว้จนเห็นว่ายุงกินเลือดอิ่มแล้ว (Fully engorged) จึงเอาหนูออก จากนั้นเลี้ยงยุงด้วยน้ำหวานและวิตามินต่อไปอีก 3-4 วัน แล้วนำถ้วยพลาสติกที่มีกระดาษกรองวางอยู่บนสำลีที่พรมน้ำให้กระดาษเปียกชื้นใส่ไว้ในกรงเพื่อให้ยุงวางไข่ เมื่อได้ไข่ยุงมาแล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกระดาษกรองแห้งสนิทประมาณ 2-3 วันแล้วจึงนำไข่ยุงไปขยายพันธุ์และเลี้ยงต่อไปในห้องทดลอง ในการทดสอบฤทธิ์ไล่ยุงจะใช้ยุงเพศเมียที่มีอายุประมาณ 5-7 วัน และยังไม่เคยกินเลือด (Unfed females)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.3 การทดสอบฤทธิ์ไล่ยุง *Aedes aegypti* ของส่วนสกัดจากเมล็ดขึ้นฉ่าย

2.2.3.1 การทดสอบฤทธิ์ไล่ยุงในห้องปฏิบัติการ (Laboratory repellent test)

2.2.3.1.1 การเตรียมส่วนสกัดในความเข้มข้นต่าง ๆ

นำส่วนสกัดจากเมล็ดขึ้นฉ่ายทั้ง 5 ชนิด (E_1, F_1, F_2, F_3 และ F_4) มาละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสม เช่น 95% Ethanol หรือ Absolute ethanol ในความเข้มข้นต่าง ๆ กันโดยเตรียมความเข้มข้นที่มากที่สุดก่อน จากนั้นทำการเจือจางเป็นความเข้มข้นต่าง ๆ ตามต้องการ

2.2.3.1.2 การเตรียมยุง *Aedes aegypti*

ใช้ยุงตัวเต็มวัยเพศเมียอายุ 5-7 วัน ที่ยังไม่เคยกินเลือดหนู (Unfed females) ซึ่งก่อนที่จะนำไปทำการทดสอบฤทธิ์ไล่ยุงจะต้องอดอาหารยุงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง

2.2.3.1.3 การทดสอบฤทธิ์ไล่ยุง แบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน คือ

ก. การทดสอบฤทธิ์ไล่ยุงแบบ Dose-response study

ข. การทดสอบหาระยะเวลาป้องกันยุงกัด (Protection time)

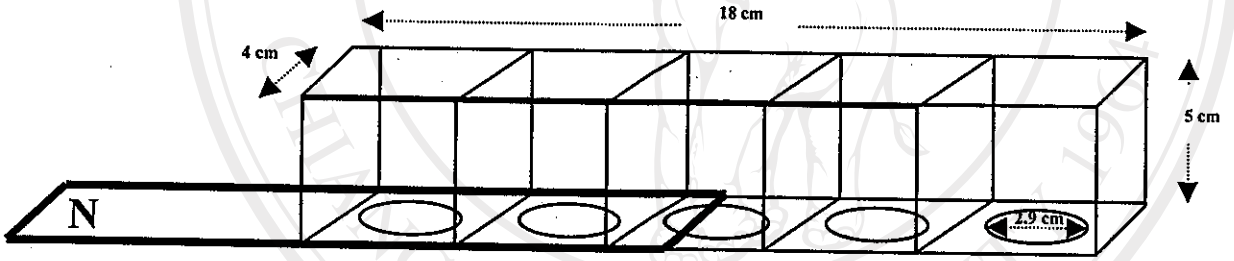
ค. การทดสอบความคงตัวทางชีวภาพของสารสกัด (Biological stability test)

ก. การทดสอบฤทธิ์ไล่ยุงแบบ Dose-response study

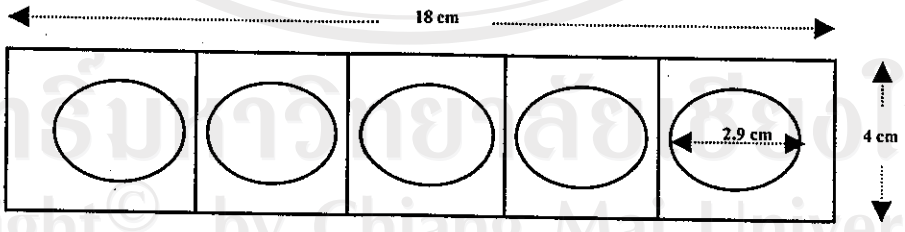
การทดสอบฤทธิ์ไล่ยุงแบบ Dose–response study ปฏิบัติตามวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Choochote *et al.* (1999) โดยดูดยุงเพศเมียแบ่งใส่ในกล่องทดสอบยุง (Mosquito test cage) ขนาด 4 x 18 x 5 cm (รูป 5 ก) ซึ่งภายในกล่องจะแบ่งเป็น 5 ช่อง ๆ ละ 10 ตัว โดยช่องแรกจะเป็นยุงกลุ่มควบคุม ส่วนช่องที่ 2-4 เป็นยุงกลุ่มทดสอบ ในการทดลองจะทาสารทดสอบ ปริมาตร 0.025 ml ลงบนผิวหนังบริเวณท้องแขนของอาสาสมัครในพื้นที่ที่ตรงกับพื้นที่ด้านล่างของกล่องทดสอบซึ่งมีลักษณะเป็นวงกลมที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.9 cm และมีฝาปิด-เปิดที่สามารถเลื่อนเข้าออกได้ โดยก่อนทาสารทดสอบจะต้องทำเครื่องหมายบริเวณท้องแขนของอาสาสมัครโดยใช้แถบทำเครื่องหมาย (Marker strip) วางทาบบนท้องแขน แล้วใช้ปากกาวาดวงกลมตามลักษณะที่ปรากฏบนแถบทำเครื่องหมาย (รูป 5 ข) เพื่อให้พื้นที่ที่ต้องการทดสอบมีลักษณะตรงกับพื้นที่ด้านล่างของกล่องทดสอบยุง ในช่องแรกซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมจะทาด้วยสารที่ใช้เป็นตัวทำละลาย ส่วนในช่องที่ 2-4 จะทาด้วยส่วนสกัดแต่ละชนิดของขึ้นฉ่าย (E_1, F_1, F_2, F_3 และ F_4) ในความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมไว้ เช่น 0.5%, 1%, 2% และ 4% ตามลำดับ ซึ่งความเข้มข้นดังกล่าวจะต้องมีฤทธิ์ไล่ยุงได้อยู่ในช่วงร้อยละ 10 - 90 ทิ้งไว้ 5 นาที เพื่อให้สารทดสอบแห้ง จากนั้นก็นำกล่องทดสอบที่ใส่ยุงไว้แล้วมาวางทาบบนผิวหนังบริเวณท้องแขนให้ตรงกันกับบริเวณที่ทาสารทดสอบ ใช้ยางรัดกล่องทดสอบให้ติดกับแขน จากนั้นเลื่อนฝาปิด-เปิดบริเวณด้านล่างของกล่องทดสอบออก เพื่อให้ยุงมีโอกาสสัมผัสกับผิวหนังที่ทาสารทดสอบ จับเวลา 5 นาที โดยสังเกตทุก ๆ 1 นาที ว่ามียุงมากัดในแต่ละช่องกี่ตัว นับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จำนวนยุงที่มากัดและบันทึกไว้ เมื่อครบ 5 นาทีแล้วจะเลื่อนฝาปิด-เปิดเข้า และเปลี่ยนยุงกล่องใหม่เข้าไปแทนที่และพักเป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบกำหนดเลื่อนฝาปิด-เปิดบริเวณด้านล่างของกล่องทดสอบออก จับเวลา 5 นาที สังเกตและบันทึกจำนวนยุงที่กัดทุก ๆ 1 นาที เมื่อครบ 5 นาที เลื่อนฝาปิด-เปิดบริเวณด้านล่างของกล่องทดสอบเข้า และเปลี่ยนยุงกล่องใหม่เข้าไปแทนที่อีกครั้งหนึ่ง เมื่อครบ 5 นาทีเลื่อนฝาปิด-เปิดออก และสังเกตในลักษณะเช่นเดิมเป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบกำหนดเลื่อนฝาปิด-เปิดเข้า ถือเป็นอันสิ้นสุดการทดลอง รวมเวลาที่ใช้ในการทดสอบทั้งหมด 25 นาที เนื่องจากยุงลาย *Ae. aegypti* เป็นยุงที่กินเลือดในเวลากลางวัน ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงทำการทดลองในช่วงเวลาตั้งแต่ 08.00 – 18.00 น. โดยใช้อาสาสมัครทั้งหมด 4 คน ทดสอบคนละ 2 ครั้ง และแต่ละครั้งจะทดลองทั้งแขนซ้ายและขวา ทำการทดสอบส่วนสกัดของเมล็ดขึ้นฉ่ายให้ครบทั้ง 5 ชนิด แล้วนำข้อมูลที่ได้มาหาค่า ED_{50} และ ED_{95} จากโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Probit analysis (Harvard Programming; Hg 1,2)



ก. กล่องทดสอบยุง (Mosquito test cage)



ข. แถบทำเครื่องหมาย (Marker strip)

รูป 5 กล่องทดสอบยุง (Mosquito test cage) และแถบทำเครื่องหมาย (Marker strip)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ข. การทดสอบหาระยะเวลาป้องกันยุงกัด (Protection time)

การทดสอบหาเวลาในการป้องกันยุงกัด (Protection time) ปฏิบัติตามวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีมาตรฐานขององค์การอนามัยโลก (WHO, 1996) โดยทำการทดสอบในช่วงเวลาตั้งแต่ 08.00 – 18.00 น. เตรียมยุงตัวเต็มวัยเพศเมียที่ผ่านการอดอาหารเป็นเวลา 12 ชั่วโมงจำนวน 200 ตัวใส่ในกรงขนาด 30 x 30 x 30 cm^3 ในการทดลองจะใช้แขนทั้งสองข้างของอาสาสมัครโดยแบ่งเป็นแขนสำหรับควบคุมและแขนทดสอบ ในแขนควบคุมจะทาด้วยสารที่ใช้เป็นตัวทำละลาย ในปริมาตร 0.1 ml ลงบนผิวหนังให้สม่ำเสมอบริเวณท้องแขนซึ่งมีพื้นที่ 3 x 10 cm^2 ส่วนบริเวณอื่น ๆ ใช้แผ่นพลาสติกใสปิดให้มิดชิด โดยจะเจาะช่องเฉพาะบริเวณผิวหนังที่ทาสารเท่านั้น และบริเวณมือจะใส่ถุงมือยางไว้เพื่อป้องกันยุงกัด ส่วนแขนทดสอบจะทาสารละลายของส่วนสกัดจากเมล็ดขึ้นฉ่ายในความเข้มข้น 25 % w/v ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่นิยมใช้ในการทดสอบหาเวลาในการป้องกันยุงกัดของสารสกัดจากพืช (Barnard *et al.*, 1999; Choochote *et al.*, 1999; Tawatsin *et al.*, 2001) ทิ้งไว้จนสารทดสอบแห้งจึงเริ่มทดสอบฤทธิ์ไล่ยุง โดยจะทดสอบเป็นช่วง ๆ ละ 30 นาที ในตอนแรกจะยื่นแขนควบคุมเข้าไปในกรงยุงก่อน จับเวลา 3 นาที สังเกตว่าภายในเวลา 3 นาทีนี้มียุงมากัดหรือไม่ หากมียุงมากัดอย่างน้อย 2 ตัว ให้เอาแขนออกจากกรงยุงทันที แล้วยื่นแขนที่ทาสารสกัดเข้าไปแทน จับเวลา 3 นาที เช่นกัน ในช่วงนี้จะสังเกตว่ามียุงมากัดหรือไม่ หากยังไม่มียุงมากัด เมื่อครบ 3 นาที ให้เอาแขนออก ทิ้งไว้ 30 นาที เริ่มทดสอบอีกครั้งหนึ่ง ทำการทดลองในลักษณะนี้ไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งแขนทดสอบมียุงมากัดอย่างน้อย 2 ตัว ภายในเวลา 3 นาที ถือเป็นอันสิ้นสุดการทดลอง โดยเวลาป้องกันยุงกัดจะคิดตั้งแต่เวลาที่ทาสารไปจนกระทั่งมียุงมากัดที่แขนทดสอบอย่างน้อย 2 ตัว ในกรณีที่มียุงมากัดแขนทดสอบเพียง 1 ตัวในเวลา 3 นาที จะยังไม่หยุดการทดลอง จะทดลองในลักษณะเดิมต่อไปเรื่อยๆ จนกระทั่งมียุงมากัดแขนทดสอบอีก 1 ตัว ถือเป็นอันสิ้นสุดการทดลอง ซึ่งหากยุงตัวที่ 2 มากัดในช่วงติดต่อกันกับยุงตัวแรก เวลาป้องกันยุงกัดจะคิดตั้งแต่เวลาที่ทาสารไปจนกระทั่งถึงเวลาที่ยุงตัวแรกกัด แต่หากยุงตัวที่ 2 กัดทิ้งช่วงไปไม่ติดต่อกับช่วงที่ยุงตัวแรกกัด เวลาป้องกันยุงกัดจะคิดตั้งแต่เวลาที่ทาสารไปจนกระทั่งมียุงตัวที่ 2 มากัดที่แขนทดสอบ ในทุกครั้งที่ทดสอบจะต้องยื่นแขนควบคุมเข้าไปก่อนเสมอ เพื่อตรวจดูสภาพของยุงว่ามีความหิวกระหายหรือไม่ หากภายใน 3 นาทีไม่มียุงมากัดแขนควบคุมเลยแสดงว่ายุงกลุ่มนี้ไม่มีความหิวกระหายตามสภาพปกติ ไม่สามารถนำมาใช้ทดสอบได้ต้องเปลี่ยนยุงกลุ่มใหม่และต้องทดลองใหม่ทั้งหมด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ค. การทดสอบความคงตัวทางชีวภาพของสารสกัด (Biological stability test)

ทำการทดสอบความคงตัวทางชีวภาพของสารสกัดจากเมล็ดขึ้นฉ่าย โดยเปรียบเทียบเวลาในการป้องกันยุงกัดของสารสกัดหลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิและช่วงเวลาต่าง ๆ กัน ซึ่งในการศึกษาจะนำสารสกัดจากเมล็ดขึ้นฉ่ายที่มีประสิทธิภาพไล่ยุงสูงสุดที่ได้จากการทดลองในห้องปฏิบัติการมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ -20°C, 4°C และอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1, 2 และ 3 เดือน จากนั้นนำมาทดสอบหาเวลาในการป้องกันยุงกัด

2.2.3.2 การทดสอบฤทธิ์ไล่ยุงในภาคสนาม (Field repellent test)

2.2.3.2.1 การเตรียมส่วนสกัดจากเมล็ดขึ้นฉ่าย

ใช้ส่วนสกัดจากเมล็ดขึ้นฉ่ายที่มีประสิทธิภาพสูงสุดจากการทดสอบกับยุงในห้องปฏิบัติการมาเตรียมที่ความเข้มข้น 25 % w/v ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่นิยมใช้ในการทดสอบฤทธิ์ไล่ยุงของสารสกัดจากพืช (Barnard *et al.*, 1999; Choochote *et al.*, 1999; Tawatsin *et al.*, 2001)

2.2.3.2.2 การทดสอบฤทธิ์ไล่ยุง

การทดสอบฤทธิ์ไล่ยุงในภาคสนามปฏิบัติตามวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Choochote *et al.* (1999) ซึ่งก่อนทำการทดสอบฤทธิ์ไล่ยุงในภาคสนามจะต้องมีการสำรวจหาพื้นที่และช่วงเวลาที่เหมาะสมในการทดลอง โดยพื้นที่ดังกล่าวต้องเป็นบริเวณที่มียุงอยู่ชุกชุม มีแหล่งเพาะพันธุ์และมีอาหารของยุงที่อุดมสมบูรณ์ เช่น มีแหล่งน้ำขัง ต้นไม้ บ้านเรือนที่อยู่อาศัยและสัตว์เลี้ยงต่าง ๆ โดยในการสำรวจจะใช้คนเป็นเหยื่อล่อเพื่อจับยุงมานับจำนวนและแยกชนิด เพื่อให้ทราบชนิดและปริมาณของยุง รวมไปถึงช่วงเวลาที่เหมาะสมในการทดลอง เมื่อได้แหล่งที่ต้องการแล้วจะทำการทดสอบฤทธิ์ไล่ยุงในอาสาสมัครทั้งหมด 6 คน แต่ละคนจะทดสอบคนละ 2 ครั้ง ซึ่งในการทดลองจะทาสารปริมาตร 2 ml บริเวณขาในพื้นที่ระหว่างหัวเข่าและข้อเท้า โดยแบ่งขาทั้งสองข้างของอาสาสมัครแต่ละคนเป็นขาทดสอบและขาควบคุม ซึ่งขาทดสอบจะทาด้วยส่วนสกัดที่เตรียมไว้ ส่วนขาควบคุมจะทาด้วยสารที่เป็นตัวทำละลายของส่วนสกัดดังกล่าว ทิ้งไว้ให้แห้ง ในการทดลองอาสาสมัครแต่ละคนจะนั่งห่างกันอย่างน้อย 20 เมตร โดยให้นั่งแยกขาทั้งสองข้างให้ห่างกันมากที่สุดเพื่อป้องกันการรบกวนซึ่งกันและกัน ในการจับยุงจะใช้ผู้จับ 2 คน ต่ออาสาสมัคร 1 คน โดยจะจับยุงที่มาเกาะบริเวณที่ทาสารทั้งสองข้างและเก็บแยกไว้ในกล่อง ในการทดสอบจะทำการจับยุงทั้งหมด 12 จุด ๆ ละ 10 นาที โดยแต่ละจุดที่เปลี่ยนจะต้องห่างกันอย่างน้อย 10 เมตร ดังนั้นในแต่ละครั้งจะใช้เวลาในการทดสอบอย่างน้อย 2 ชั่วโมง ยุงที่จับได้จากขาทดสอบและขาควบคุมจะนำไปนับจำนวนและแยกชนิดโดยใช้กุญแจของ Tanaka *et al.* (1979) และ Rattanarithikul and Panthusiri

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(1994) นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาอัตราการกัดของยุง (Mosquito biting rates) และ Percentage protection (% Protection) ของสารสกัด ที่มีสูตรการคำนวณดังนี้

$$\% \text{ Protection} = \frac{\text{bites on control} - \text{bites on treated leg}}{\text{bites on control}} \times 100$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การศึกษาฤทธิ์ไล่ยุงของสารสกัดในห้องปฏิบัติการแบบ Dose-response study จะมีการคำนวณหาความเข้มข้นของสารสกัดแต่ละชนิดที่สามารถไล่ยุงได้ร้อยละ 50 และ 95 (ED_{50} และ ED_{95}) โดยใช้ Probit analysis (Harvard Programming; Hg 1,2) ซึ่งหากในกลุ่มควบคุมมีจำนวนยุงที่ไม่กัดอยู่ในช่วงระหว่างร้อยละ 5-20 จะต้องมีการปรับข้อมูลก่อนโดยใช้ Abbott's formula ซึ่งมีสูตรการคำนวณดังนี้

$$\% \text{ correction} = \frac{\% \text{ test non-biting} - \% \text{ control non-biting}}{100 - \% \text{ control non-biting}} \times 100$$

สรุปข้อมูลในข้างต้นโดยใช้สถิติเชิงพรรณนา (Descriptive statistics) แสดงถึง ED_{50} และ ED_{95}ของสารสกัดแต่ละชนิด

การทดสอบหาระยะเวลาป้องกันยุงกัด (Protection time) และการทดสอบความคงตัวทางชีวภาพของสารสกัด (Biological stabiltity test) จะเปรียบเทียบค่ามัธยฐานและค่าสูงสุด-ต่ำสุดของระยะเวลาป้องกันยุงกัด (Median protection time) ของสารสกัดแต่ละชนิด โดยใช้ Kruskal-Wallis ANOVA (α error = 0.05)

ประสิทธิภาพในการป้องกันยุงกัดในภาคสนามจะพิจารณาและเปรียบเทียบจาก Percentage protection และอัตราการกัดของยุง (Mosquito biting rates) ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองของแต่ละช่วงเวลา (10, 60 และ 120 นาที) โดยใช้ Student's *t*-test ที่กำหนดค่า α error = 0.05 และประมวลผลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS version 10.0 หากมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าสารสกัดมีฤทธิ์ไล่ยุง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved